

ファイテン化環境が細胞に及ぼす影響

2020年研究報告書

2021年2月8日

ネクスジェン株式会社

【目的】

ファイテン化環境の生体への影響については様々な報告があり、種々の身体症状の改善をもたらすことが明らかとなっているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。ネクスジェン株式会社は、これまで細胞レベル、特に細胞増殖および細胞遊走に関する解析を行ってきており、ファイテン化環境では細胞の増殖能および遊走能が亢進する傾向が認められるものの、その変化は微小であり、より詳細に解析を行うためには1細胞レベルでの変化を捉えることが重要であるとの結論を得た。

そこで、2020年はこれまで行ってきたファイテン化環境における細胞への影響に関する研究をより詳細に解析するため、細胞増殖能に関して従来の細胞集団での解析ではなく1細胞レベルでの解析を行うことを目的とした。

細胞増殖能の解析には形態または生理機能に影響を与えることなく細胞分裂を長期間追跡可能な蛍光色素CellTrace™ Violetを用いた。

一方、ファイテン化環境で細胞分裂が亢進することは、抗がん剤の薬効を促進させる可能性も示唆されるため、ファイテン化環境における抗がん剤Etoposideの薬効評価も行った。

【材料および方法】

(材料)

Ba/F3細胞 (マウスpro-B細胞株) (RCB4476、理研セルバンク)

CellTrace™ Violet 細胞増殖アッセイ用試薬 (Thermo Fisher Scientific, MA., U.S.A.)

SYTOX™ Blue Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, MA., U.S.A.)

Etoposide (和光純薬、東京)

96 wellプレート (コントロール・ファイテン化プレート) (Corning, NY, U.S.A)

BD FACSAria™ III セルソーター (Becton, Dickinson and Company, NJ, U.S.A.)

BD FACSCanto™ II フローサイトメーター (Becton, Dickinson and Company, NJ, U.S.A.)

FlowJo™ 解析用ソフトウェア (Becton, Dickinson and Company, NJ, U.S.A.)

(細胞増殖能の1細胞解析)

1. CellTrace™ Violetで細胞を染色 (製品説明書と同一プロトコールで実施)
2. 96 wellプレートに200 uLの培地を分注 (ファイテン化プレート、未処理プレート)
3. BD FACSAria™ IIIでBa/F3細胞を1500 cells/wellソーティングを行う (n=16)
4. CO₂インキュベーターにて37°C、72時間培養
同一インキュベーター内にコントロールプレートとファイテン化プレートを配置。
ただし、ファイテン化プレートは鉛シート (厚さ3 mm) で遮蔽を行い、上下左右方向も出来る限り距離を取り配置・培養した (図1)。
5. BD FACSCanto™ II で蛍光強度を測定
6. FlowJo™ 解析用ソフトウェアを用いて、生細胞数および細胞分裂回数を検出

CO₂インキュベーター

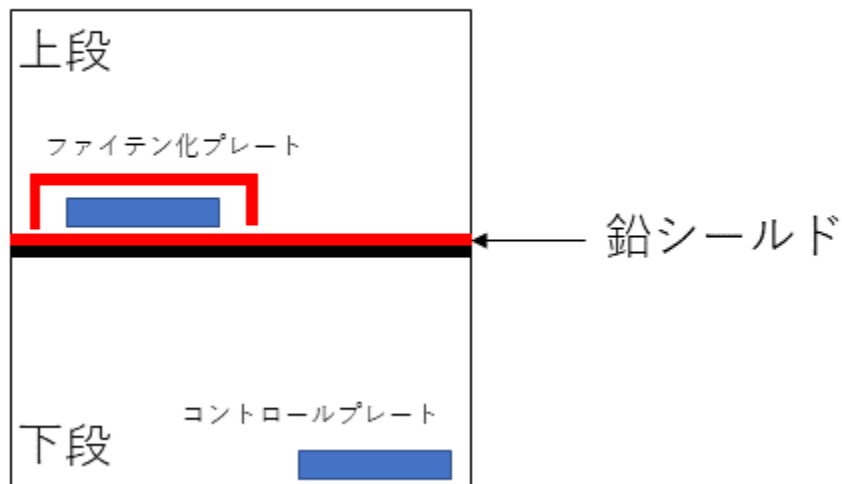


図1 CO₂インキュベーター内におけるプレート配置

(抗がん剤の薬効評価)

1. 96 wellプレートに200 uLのEtoposide含有培地を分注
(終濃度0 uM, 1 uM, 10 uM, 100 uM)
2. FACS AriaIIIを使用してBa/F3細胞を5000 cells/wellでソート (n=8)
3. CO₂インキュベーターにて37°C、24時間培養
4. SYTOX Blue (終濃度1/10000希釈) で死細胞を染色
5. FACS Cantoで測定
6. FlowJoを用いて、各サンプルごとの生細胞数を算出
7. Etoposideの濃度別に生細胞数比較

【結果】

細胞増殖能の1細胞解析

Ba/F3細胞をファイテン化プレートと未処理プレートを用いて37°Cで72時間培養し、生細胞数および細胞分裂回数の比較検討を5回行った (各N=16)。その結果、3回の実験においてファイテン化プレートの培養において有意な細胞数の減少が認められた (図2 実験1~3)。一方、2回の実験において有意差は認められなかった (図2 実験4~5)。

さらに分裂回数に関する検討を行った結果、生細胞数の有意な減少が認められた実験1~3において、特に実験3において、ファイテン化プレートにおいて分裂回数の多い (5回以上) の細胞群の有意な減少が認められた (各N=16)。一方、生細胞数で有意差が認められなかった実験4~5においては、細胞分裂回数についてコントロールプレートとファイテン化プレートに有意な差は認められなかった (図3)。

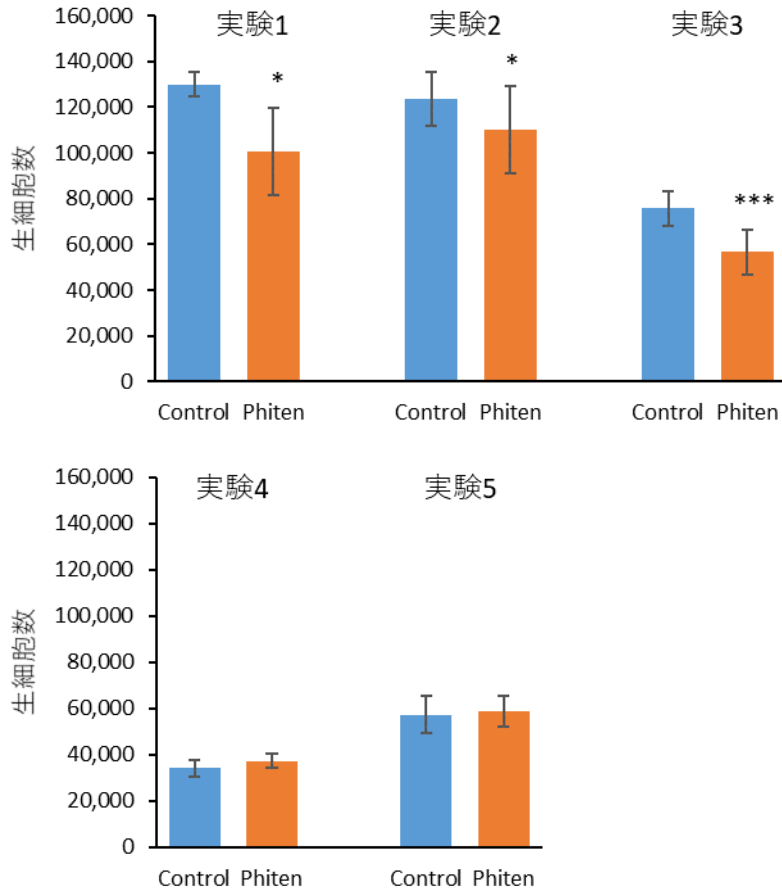
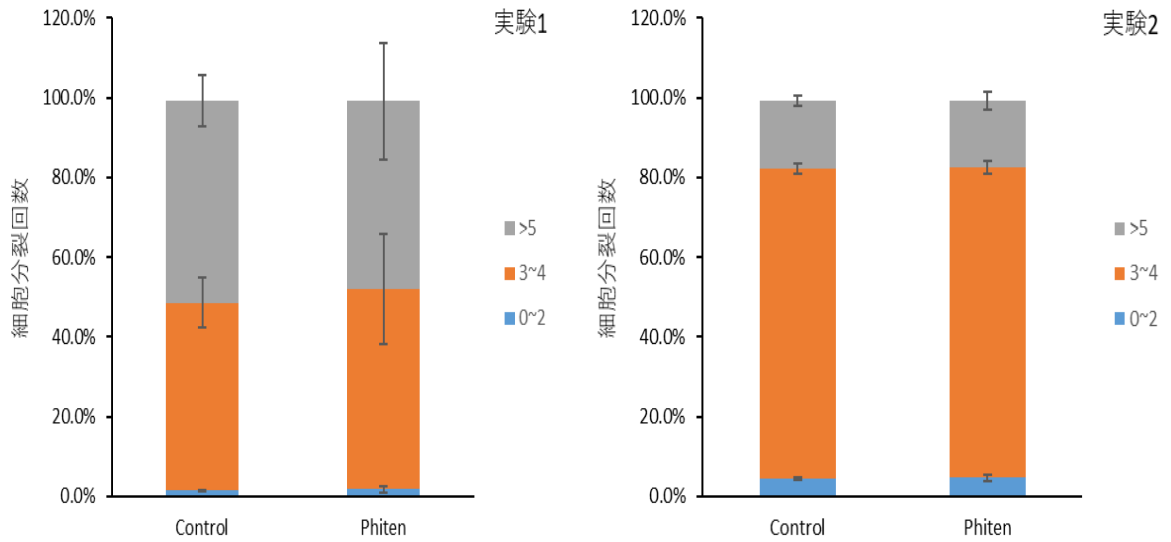


図2 ファイテン化環境における生細胞数の変化



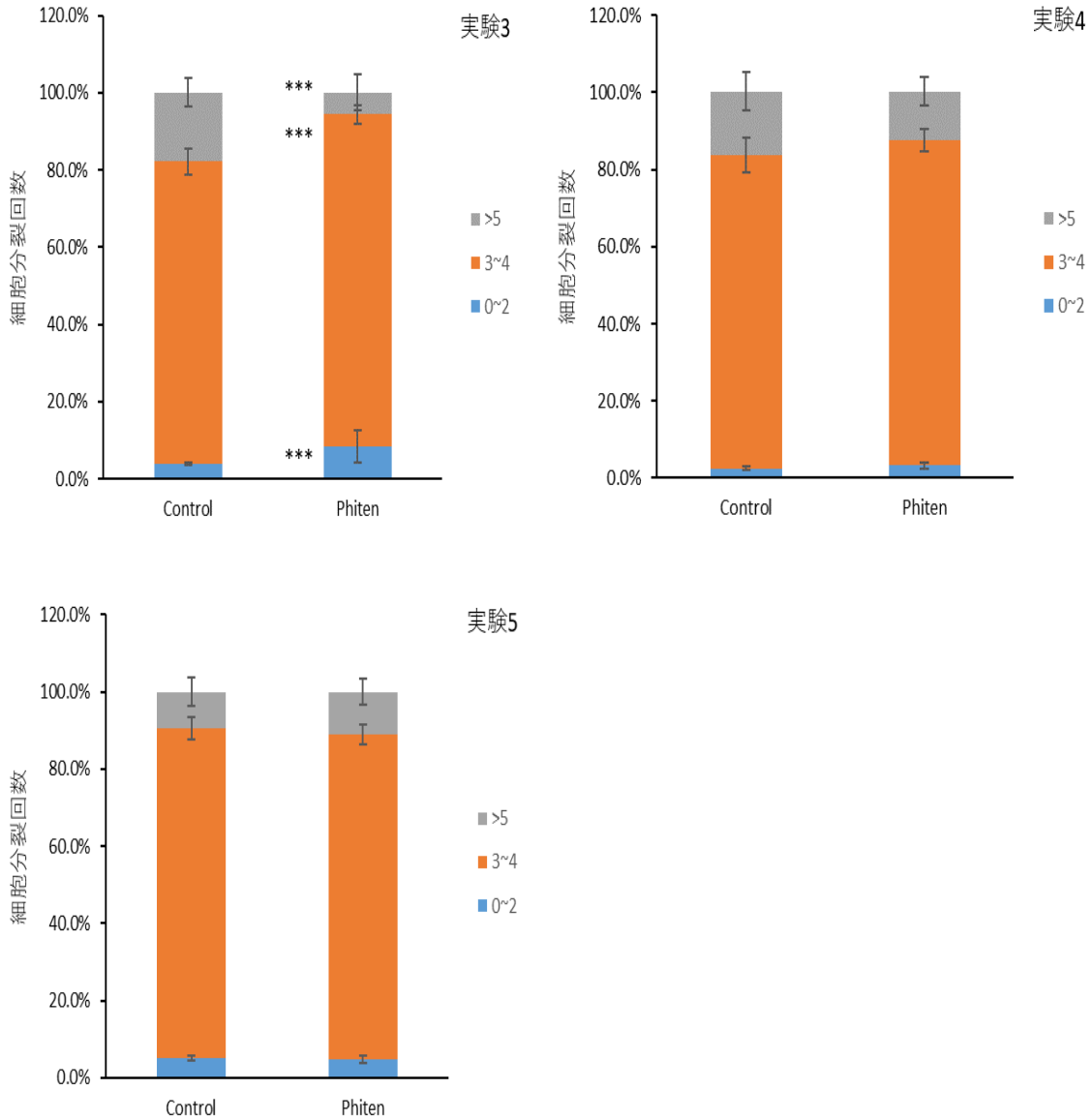


図3 ファイテン化環境における細胞分裂回数の変化

抗がん剤の薬効評価

Ba/F3細胞に対して24時間Etoposide処理を行った。その結果、Etoposideの細胞障害性、すなわち生細胞率の減少は10および100 uM群で認められ、特に高濃度Etoposide条件（100 uM）において、コントロールプレートと比較してファイテン化プレートで生細胞率の減少傾向が認められた（N=8, p=0.08）（図4）。

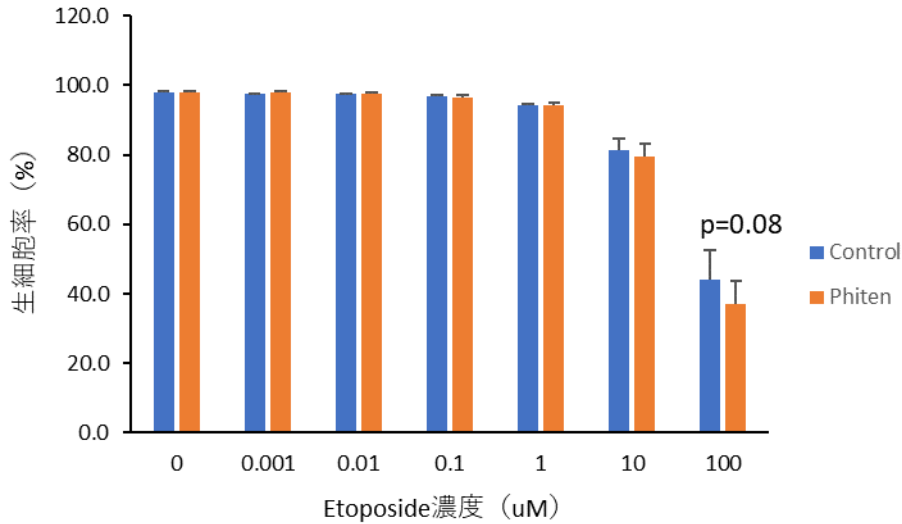


図4 ファイテン化環境における抗がん剤Etoposide薬効評価

【考察】

細胞増殖能に対するファイテン化の影響については、がん細胞Ba/F3細胞をファイテン化環境とコントロール環境で比較培養した結果、各N=16で行った5回の実験のうち3回では生細胞数の有意な減少を示したが、2回の実験においては有意差が認められなかった。

前々回の報告（2020年7月27日）では水溶性テトラゾリウム塩WST-8を用いた発色法によりファイテン化環境において若干の細胞数の増加が認められたが、前回の報告会（2020年11月11日）で述べたようにフローサイトメトリー法による1細胞解析では有意差は見られなかった。

今回、微小な変化を検出するため出来る限り同一に近い環境で比較することを目的に、様々な予備実験を繰り返した後、コントロールプレートと厚さ3mmの鉛シートで遮蔽したファイテン化プレートを図1に示すように同一のインキュベーター内に設置して培養を行った。一方、前回までは両群を別々のインキュベーターで培養を行っていた。通常の細胞生物学実験においてインキュベーターによる差が見られることは無いが、今回のより厳密な実験結果から考察すると、前々回の結果はインキュベーター間の微小な環境の差が、結果に影響した可能性が示唆される。

また上述のとおり今回の実験においては、ファイテン化プレートを鉛シートで包むことでファイテン化プレートからコントロールプレートへの影響を防いだが、ファイテン化の物理化学的メカニズムが不明であるので、鉛シートで包むだけでコントロールプレートへの影響が完全に回避されたかどうかは確定できない。

このように実験のデザインを考える上でファイテン化の物理化学的なメカニズムが不明であることは大きな課題である。細胞生物学的影響を調べることと並行して、物理化学的な現象を観察・解析することも必要ではないだろうか。例えば、細胞の増殖には培養液の成分以外に培養容器の電荷が影響すること、具体的には細胞接着や細胞増殖の促進に材料表面のゼータ電位が大きく関わることは既に報告されている¹。従って、ファイテン化プレートの細胞への影響を評価するためには、ファイテン化に伴い培養プレートで発生する電荷の変化を計測することも必要かもしれない。

また本実験では一般的な基礎的細胞生物学実験と同様にかん細胞株を用いているが、かん細胞株は既に増殖が促進された状態にあり、ファイテン化環境が細胞増殖にプラスの影響を与えると仮定すると、既に増殖促進状態にあるかん細胞株ではその変化を捉えることが難しい可能性もある。対案としては、実験の難度は上昇するが、正常細胞を用いた評価を行うこともファイテン化環境の影響を調べる為には必要であると考えられる。

一方、抗がん剤の薬効評価については、かん細胞Ba/F3細胞に対して抗がん剤Etoposideによる処理を24時間行った結果、10および100 μ M濃度においてEtoposideの細胞障害性すなわち生細胞率の減少が認められた。特に高濃度Etoposide条件（100 μ M）においては、コントロールプレートと比較してファイテン化プレートで生細胞率の減少傾向が有意に認められたので、抗がん剤Etoposideの薬効がファイテン化プレートにより増強される傾向があると思われる。

Etoposideはアメリカハッカクレン（*Podophyllum peltatum*）の地下茎に含まれるポドフィロトキシン（podophyllotoxin）を原料として1966年に合成され、1983年に米国FDA（Food and Drug Administration）に承認された抗がん剤である。その作用メカニズムは2本鎖DNAを切断・再結合する酵素であるDNA topoisomerase II と結合しDNAの複製を阻害、結果として細胞増殖を抑制または細胞死を惹起させると考えられている^{2, 3}。その作用はかん細胞のようなDNA topoisomerase II 発現レベルの高い細胞でより薬効を発揮することが明らかとなっている⁴。

本実験で、ファイテン化環境においてEtoposideの薬効が促進される傾向が認められたことにより、ファイテン化環境が直接あるいは間接的にDNA topoisomerase II 発現レベルを促進させたことが示唆される。その詳細なメカニズムは現段階では不明であるものの、DNA topoisomerase IIを糸口として細胞周期関連遺伝子の発現レベルを網羅的に解析することでファイテン化環境の細胞分裂へ影響を明らかにすることが可能であると考えられる。

一方、臨床的な視点で考察すると、ファイテン化環境によりDNA topoisomerase II 発現レベルの増強、さらにはEtoposideの薬効が促進されることは、ヒトのがん治療においてがん局所または全身性にファイテン化環境に暴露させることで、抗がん剤作用の増強効果が期待される。しかしながら、元々、発現レベルが亢進しているかん細胞のDNA topoisomerase II 発現をより亢進させることの負の影響についても十分に考察する必要があると考えられる。

近年、かん細胞株が均一な細胞集団でなくsub populationが存在することが明らかとなってきている。これらの細胞は自己複製能、多分化能、造腫瘍能を有することから「がん幹細胞」と名づけられ、aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)など特徴あるマーカー分子も発見されている⁵。

本研究においては、前回までの細胞全体を一集団として測定する方法よりも詳細な解析が可能なフローサイトメーターを用いた1細胞解析により、ファイテン化環境で培養することで細胞分裂に変化をもたらす集団が存在することを想定し様々な検討を実施した。しかしながら上述の通り、高濃度の抗がん剤の薬効評価を増強する傾向は認められたものの、細胞増殖能については5回の実験からは（各N=16）明確な有意差は認められなかった。

このことからファイテン化環境の細胞に与える影響は抗がん剤のような顕著なものではなく、極めて小さな隠微なものであると考えられる。このような小さな変化を検出する為には

コントロール環境とファイテン化環境の違いが「ファイテン化」のみであることが理想的であり、上述のように物理化学的メカニズムを考慮した実験デザインの検討が必要であると思われる。

【結論】

本研究によりファイテン化環境が細胞に与える影響について解析した。その結果、細胞増殖に関してはファイテン化環境の影響について結論を導くことは出来なかった。一方、ファイテン化環境が高濃度での抗がん剤の薬効を増強することが明らかとなり、ファイテン化環境が細胞内分子の発現に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。本研究成果を糸口にその分子機構についてより詳細に検討することで、ファイテン化環境の細胞への影響が明らかになるとと思われる。

【参考文献】

1. Metwally S, Stachewicz U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Nov;104:109883. doi: 10.1016/j.msec.2019.109883.
2. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J*. 2015 Jan 19;14:95-108. doi: 10.17179/excli2015-561. eCollection 2015.
3. Hainsworth JD, Greco FA. Etoposide: twenty years later. *Ann Oncol*. 1995 Apr;6(4):325-41. doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a059180.
4. Edwards CM, Glisson BS, King CK et al. Etoposide-induced DNA cleavage in human leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; 20:162-8.
5. Li D, Zhang T, Gu W, Li P, Cheng X, Tong T, Wang W. The ALDH1+ subpopulation of the human NMFH-1 cell line exhibits cancer stem-like characteristics. *Oncol Rep*. 2015 May;33(5):2291-8. doi: 10.3892/or.2015.3842.