

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08420

研究課題名(和文) アントラサイクリン系抗がん剤と活性酸素との関係；その解明のための情報の再構築

研究課題名(英文) Relationship between anthracycline anticancer drug and reactive oxygen species; reconstruction of information for its elucidation

研究代表者

水谷 秀樹 (Mizutani, Hideki)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80397504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： アントラサイクリン系抗がん剤(AC)と活性酸素(ROS)との情報の再構築した。ドキソルビシン(DOX)、エピルビシン(EPI)、ダウノルビシン(DNR)、イダルビシン(IDR)、アクリルビシン(ACL)でのDNA損傷性と細胞死で評価した。Cu(II)の存在下でACはDNAを損傷し、その強度は、DOX EPI > THP IDR > ACR >> DNRで、DNRでは損傷が認められなかった。一方、THP, ACR, IDRの細胞死を検討した結果、THP, ACRの細胞死にはROSが関与したが、IDRではしなかった。また、ACRの細胞死でCu(I)が関与し、Cuの重要性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アントラサイクリン系抗がん剤の作用機序として活性酸素種の関与が知られているが、その詳細については明らかでない。我々はこれまでドキソルビシンのCu(II)存在下での新しい酸化的DNA損傷機構を明らかにしたが、今回、ピラルビシン、アクリルビシン、イダルビシンでも同様にCu(II)存在下でDNA損傷することを明らかにし、アクリルビシンによる細胞死でCu(I)の関与を明らかにした。これらの成果はアントラサイクリンの新しい作用機序の解明につながり、創薬の場、臨床の場へフィードバックすることにより、新規抗がん剤の開発、がんの薬物治療の進展につながり、社会への還元が期待される。

研究成果の概要(英文)： We reconstructed the relational information between anthracycline anticancer drug (AC) and reactive oxygen species (ROS). Experiments were evaluated for DNA damage and cell death in doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI), daunorubicin (DNR), idarubicin (IDR), aclarubicin (ACL). AC damaged DNA in the presence of Cu (II), and its intensity was (DOX, EPI) > (THP, IDR) > ACR >> DNR, and no damage was observed in DNR. On the other hand, as a result of detailed examination of cell death of THP, ACR and IDR, it was suggested that ROS was involved in cell death of THP and ACR, but ROS was not involved in IDR. In addition, Cu (I) was involved in ACR cell death, and the importance of Cu was clarified.

研究分野：がん治療薬学、酸化ストレス学、医療薬学、医療薬剤学

キーワード：アントラサイクリン 抗がん剤 活性酸素

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは、わが国の死因の第一位を占め、現在もなお死亡数は増加傾向にある。がん治療には、手術療法、放射線療法、薬物療法がある。薬物療法として、抗がん剤の投与が広く行われており、抗がん剤に対する国民の期待は高い。代表的な抗がん剤の系統の1つとしてアントラサイクリン系抗がん性抗生物質(アントラサイクリン系抗がん剤、以下アントラサイクリン)がある。1963年に見出されたダウノルビシンを始めとして、多くのアントラサイクリンが開発され、特にドキソルビシンとそのエピマー体であるエピルビシンは、乳がん、造血器腫瘍、肉腫などの多くのがんで使用されている。アントラサイクリンの作用機序として、1)がん細胞のDNAの塩基対に入り込み(インタカレート)トポイソメラーゼIIを阻害することにより、DNA鎖を切断する。2)分子内のキノン基、ヒドロキノン基による活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)生成により、DNA鎖を切断する。そして、DNA鎖切断が契機になってアポトーシスが誘導され、抗がん活性を示すと考えられている。現在のところ、トポイソメラーゼII阻害がアントラサイクリンの抗がん活性のメインであり、ROSの生成はアントラサイクリンの重大な副作用の1つである心毒性と関係が深いとされているが、ROSの役割や生成機構、活性酸素シグナル伝達機構については、必ずしも十分に解明されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

上述の通り、「アントラサイクリンとROS」の関係は必ずしも十分に解明されていない。そこで、アントラサイクリンとROSとの関係を単に明らかにするだけでなく、アントラサイクリンによるアポトーシス誘導時のROSによる酸化ストレスマーカーと活性酸素シグナル伝達との関係を明らかにし、アントラサイクリンの作用機構と創薬に関する基盤となり得る活性酸素シグナル伝達に関する情報を再構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) プラスミドDNA(pBR322など)を用い、抗がん剤とDNAをリン酸緩衝液(pH7.8)中、37°Cで反応させる。反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、トランスイルミネーターでDNA損傷を検出する。各種フリーラジカルスカベンジャーを併せて用いることにより、ROSとの関わりを解析する。シトクロムc還元法による550nmにおける吸光度を測定することで活性酸素種の1つであるO<sub>2</sub>生成の測定を行う。さらにDNAとROSとの反応によって生成する酸化修飾DNAのマーカーである8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の生成量を測定する。

(2) ヒト培養がん細胞を抗がん剤で処理し、細胞毒性、アポトーシスに顕著な核DNA断片化(DNAラダー)の検出、ミトコンドリア傷害の指標であるミトコンドリア膜電位の変化、アポトーシスの実行過程の1つであるcaspase活性を解析する。細胞毒性とcaspase活性については、CytoTox-Glo™ AssayやCaspase-Glo® 3/7 Assayなど(共にPromega)を用い発光プレートリーダーで測定する。ミトコンドリア膜電位の変化は、蛍光試薬であるDiOC<sub>6</sub>(3)を用い、細胞を染色しイメージングサイトメーター(Tali®, Invitrogen™)により解析する。これら細胞を用いた実験では、HL-60細胞由来のカタラーゼ過発現株であるHP100細胞(HP100はHL-60の18倍のカタラーゼ活性を持ち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対し340倍の耐性を示す)を併せて用いることで、それぞれの抗がん剤によるアポトーシスイベントとROSとの関係の有無を解析する。

### 4. 研究成果

(1) ドキソルビシン(DOX)、エピルビシン(EPI)、ダウノルビシン(DNR)、イダルビシン(IDR)、アクラルビシン(ACL)を用いてCu(II)存在下でのDNA損傷性とPI染色による細胞死について検討した。Cell-freeの実験において、アントラサイクリン単独ではDNA損傷は認められず、Cu(II)存在下でアントラサイクリンは濃度依存的にDNAを損傷したが、DNRは損傷しなかった。この損傷の強度は、DOX≒EPI>THP≒IDR>ACR>>DNRであった。EPIによるDNA損傷はmethionalおよびCu(I)と特異的に結合するbathocuproineにより抑制されたが、フリーOHラジカルスカベンジャーでは抑制されなかった。また、Cu(II)存在下でEPIはO<sub>2</sub>を生成した。細胞実験において、EPIとDNRによる細胞死は、HL-60≒HP100であった。DNR以外のアントラサイクリンはCu(II)存在下でDNAを損傷した。その強度は化合物の構造により異なり、その損傷にはROSの関与が考えられた。一方、EPIとDNRによる細胞死にはROSの関与が認められなかった。

(2) これまで、報告者はトポイソメラーゼ阻害剤であるTAS-103並びにdoxorubicinによるアポトーシスにDNA修復酵素であるPARP(poly ADP ribose polymerase)の活性化によるROSの関与を明らかにした。その際の実験に用いたPARP阻害薬は4-amino-1,8-naphthalimide, 6(5H)-phenanthridinoneであり、いわゆるPARPに対する選択性が低い第一世代の阻害薬であった。今回、PARPに対する選択性がより高い新世代のPARP阻害薬であるolaparib, veliparib並びにPRAPの基質であるNAD<sup>+</sup>の生合成を阻害するFK866(daporinad/APO866)を用いTAS-103とdoxorubicinの細胞毒性に対する影響について検討した。実験はヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞を用い、薬物を作用させた。細胞毒性の評価はトリパンプルーによる色素排除試験法により行った。結果として、まずTAS-103とdoxorubicinの至適時間は24時間、至適濃度はTAS-103が0-0.5 μM、doxorubicinが0-5 μMであった。次に併用薬であるolaparib, veliparib, FK866の有効濃度(阻害活性があり無毒性)を決定したところ、olaparib, veliparibでは1 μM, 10

$\mu$  M (24 時間)、FK866 では 10 nM(48 時間), 1  $\mu$  M(24 時間)であった。さらに併用効果について検討したところ、TAS-103 と doxorubicin の細胞毒性に対する olaparib, veliparib の併用効果は見られなかった。また、TAS-103 と doxorubicin の細胞毒性に対する FK866 の併用効果は TAS-103 で見られなかったが、doxorubicin では観察された。

(3) アクラルビシン (ACR)を用いて Cu(II)存在下での DNA 損傷性と細胞死について検討した。アポトーシス誘導ではヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 および HL-60 由来でカタラーゼ高活性の HP100 細胞を用いた。DNA 損傷の解析にはプラスミド DNA を使い、ACR と金属イオンを 37°C で反応させた。さらに cytochrome *c* 還元法により O<sub>2</sub>生成を測定した。細胞実験において ACR による細胞死、DNA ラダー形成、caspase-3/7 活性上昇が認められ、HL-60 > HP100 であった。Cell-free の実験において、ACR 単独では DNA 損傷は認められなかったが、Cu(II)存在下 ACR は濃度依存的に DNA を損傷した。この損傷は methional および Cu(I) と特異的に結合する bathocuproine により抑制され、catalase で抑制されたが、フリー OH ラジカルスカベンジャーでは抑制されなかった。また、Cu(II) 存在下で ACR は O<sub>2</sub>を生成した。ACR のアポトーシスイベントは HL-60 > HP100 であり、その作用機序に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が関与すると考えられ、ACR の細胞死で Cu(I)の関与が認められた。また、ACR は Cu(II) 存在下で活性酸素種を生成し、DNA を損傷することが判明した。この活性種は OH ラジカルよりも Cu(I) と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> とによる complex と考えられた。これらの機構は、ACR の細胞死における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の関与を支持している。

(4) イダルビシン (IDR)を用いて Cu(II)存在下での DNA 損傷性と細胞死について検討した。DNA 損傷の解析にはプラスミド DNA である pBR322 を使い、IDR と金属イオンを 37°C で反応させた。さらに cytochrome *c* 還元法により O<sub>2</sub>生成を測定し、CT-DNA と反応させることで酸化ストレスマーカーの 1 つである 8-OHdG も測定した。アポトーシス誘導ではヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 および HL-60 由来で catalase 高活性の HP100 細胞を用いた。Cell-free の実験において、IDR 単独では DNA 損傷は認められなかったが、Cu(II)存在下で IDR は濃度依存的に DNA を損傷した。この損傷は Cu(I)と特異的に結合する bathocuproine によって強く抑制され、フリーOH ラジカルスカベンジャー、SOD、catalase、methional での抑制は小さかった。また、Cu(II) 存在下で IDR は O<sub>2</sub>、8-OHdG を生成した。細胞実験において IDR による細胞死、DNA ラダー形成、caspase-3/7 活性上昇が認められ、アポトーシス誘導が認められたが、必ずしも HL-60 と HP100 との間で大きな差異は認められなかった。また、Cu(I)の特異的プローブを用いた実験において、Cu(I)が生成しているかどうかは確認できなかった。以上、IDR は Cu(II)存在下で活性酸素種を生成し、DNA を損傷することが判明した。この機構として、Cu(I)の関与が示唆された。しかしながら、IDR のアポトーシス誘導には活性酸素種の関与が十分に認められるとは言えなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizutani Hideki, Hayashi Yuka, Hashimoto Miyabi, Imai Masanori, Ichimaru Yoshimi, Kitamura Yuki, Ikemura Kenji, Miyazawa Daisuke, Ohta Kinya, Ikeda Yoshiaki, Maeda Tohru, Yoshikawa Masae, Hiraku Yusuke, Kawanishi Shosuke	4. 巻 39
2. 論文標題 Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Aclarubicin, an Anthracycline: Role of Hydrogen Peroxide and Copper	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3443 ~ 3451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Noriko, Mizutani Hideki, Ishihama Tomoko, Ito Miho, Hashibe Arisa, Nakayama Tatsushi, Uno Bunji	4. 巻 67
2. 論文標題 Study on Redox Properties and Cytotoxicity of Anthraquinone Derivatives to Understand Antitumor Active Anthracycline Substances	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 717 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani Hideki, Nishimoto Ayano, Hotta Saki, Ikemura Kenji, Imai Masanori, Miyazawa Daisuke, Ohta Kinya, Ikeda Yoshiaki, Maeda Tohru, Yoshikawa Masae, Hiraku Yusuke, Kawanishi Shosuke	4. 巻 38
2. 論文標題 Oxidative DNA Damage Induced by Pirarubicin, an Anthracycline Anticancer Agent, in the Presence of Copper(II)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2643 ~ 2648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani Hideki, Hotta Saki, Nishimoto Ayano, Ikemura Kenji, Miyazawa Daisuke, Ikeda Yoshiaki, Maeda Tohru, Yoshikawa Masae, Hiraku Yusuke, Kawanishi Shosuke	4. 巻 37
2. 論文標題 Pirarubicin, an Anthracycline Anticancer Agent, Induces Apoptosis Through Generation of Hydrogen Peroxide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6063 ~ 6069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi Shiho, Mizutani Hideki, Kawanishi Shosuke	4. 巻 50
2. 論文標題 The enhancement of oxidative DNA damage by anti-diabetic metformin, buformin, and phenformin, via nitrogen-centered radicals	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 929 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2016.1204651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水谷秀樹、伊藤章希、清水緑、鈴木さつき、和久田純花、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 HDAC阻害薬CI-994によるアポトーシス誘導機構
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第8回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷秀樹、伊藤章希、清水緑、鈴木さつき、和久田純花、宮澤大介、前田徹、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 HDAC阻害薬タセジナリン(CI-994)による活性酸素生成を介したアポトーシス
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷秀樹、橋本未耶美、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 抗がん性抗生物質アクラルピシンによる酸化的DNA損傷とアポトーシス：過酸化水素と銅の重要性
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷秀樹、橋本未耶美、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 抗がん性抗生物質アクリルピシニンによる酸化的DNA損傷と細胞死
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第7回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷秀樹、橋本未耶美、林由佳、宮澤大介、前田徹、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 抗がん性抗生物質アクリルピシニンによる酸化的DNA損傷とアポトーシス誘導
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷秀樹、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 抗がん性抗生物質ピラルピシニンによる酸化的DNA損傷とアポトーシス誘導機構
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第6回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮澤大介、井上純奈、柳井琴音、田平知子、水谷秀樹、北森一哉、大原直樹
2. 発表標題 食餌脂肪酸が母親マウス脳の脂肪酸組成と神経栄養因子産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷秀樹、大野奈々、松浦史佳、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 植物ポリフェノール化合物シリビニンのDNA損傷性と活性酸素を介したアポトーシス
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第5回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水谷秀樹、大野奈々、松浦史佳、平工雄介、川西正祐
2. 発表標題 抗酸化物質シリビニンのDNA損傷性と活性酸素を介したアポトーシス
3. 学会等名 第69回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hideki Mizutani, Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi
2. 発表標題 Silibinin, a plant polyphenol, induces apoptosis through the generation of hydrogen peroxide.
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shiho Ohnishi, Hideki Mizutani, Shosuke Kawanishi
2. 発表標題 The enhancement of oxidative DNA damage by anti-diabetic biguanides.
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金城学院大学学術研究データベース  
<http://tdb.kinjo-u.ac.jp/search/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	平工 雄介  (Hiraku Yusuke)  (30324510)	福井大学・医学部・教授    (13401)	
連携研究者	川西 正祐  (Kawanishi Shosuke)  (10025637)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授    (34104)	