

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07210

研究課題名(和文) 抗がん薬の作用メカニズムにおけるPARPと活性酸素シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) The PARP and ROS signaling pathways in the mechanism of action of anticancer drugs.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん薬の作用機序におけるPARPと活性酸素(ROS)について検討した。PARPの働きはPARP阻害薬(Olaparibなど)の有無で評価した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(反応時間：4 h)は、HL-60細胞に対して細胞生存率を低下させた。この低下はPARP阻害薬によって抑制された。Pirarubicin (THP)(反応時間：4 h)は細胞生存率を低下させ、この低下はOlaparibの影響を受けなかった。一方、THP(24 h)は細胞生存率を低下させ、この低下はOlaparibにより抑制された。Doxorubicin (DOX)(24 h)は細胞生存率を低下させ、この低下はOlaparibにより増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん薬の作用機序におけるPARPと活性酸素(ROS)シグナル伝達機構について検討することにより、抗がん薬の作用機序におけるPARPの働きを明らかにした。PARP, ROS, および関連する分子が抗がん薬治療の新しいバイオマーカーに成り得ることを示唆しており、新しいがん治療標的分子の提案につながり、これらを用いた新しいがん化学療法の開発と創薬への基盤情報となり得る。

研究成果の概要(英文)：PARP and ROS signalling mechanisms in the mechanism of action of anticancer drugs were investigated. The function of PARP was assessed with and without PARP inhibitors (e.g. olaparib). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reaction time: 4 h) induced apoptosis and reduced cell viability in HL-60 cells. Pirarubicin (THP) (4 h) reduced cell viability in HL-60 cells and this reduction was not affected by olaparib. In contrast, THP (24 h) reduced cell viability against HL-60 cells, which was inhibited by olaparib. Doxorubicin (DOX) (24 h) reduced cell viability against HL-60 cells, which was enhanced by olaparib. This reduction was potentiated by olaparib.

研究分野：医療系薬学

キーワード：抗がん薬 PARP阻害薬

## 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（化学療法、分子標的療法）があり、薬物療法（化学療法）として抗がん薬の投与が広く行われており、抗がん薬に対する国民の期待は高い。多くの抗がん薬はDNAを始めとする細胞内器官や細胞内物質にまず作用し、細胞内を各種シグナルが伝達され、最終的に細胞死（アポトーシスなど）を誘導することにより抗がん効果を発揮するが、現在でもその作用機序には不明な点が多い。

近年、PARP (poly ADP ribose polymerase) はがん治療の標的分子としての注目を受け、PARP 阻害薬の分子標的治療薬としての有用性が確認されている。PARP 阻害薬は、DNA 修復阻害の他、NF- $\kappa$ B 阻害、NAD 枯渇・ポリ(ADP-リボース)産生抑制、BRCA 変異・相同組換え修復異常を標的とする合成致死効果などの多彩な作用を持つ薬剤である。また、PARP 阻害薬は開発中の薬剤も多く、PARP 阻害薬単独ばかりでなく抗がん薬との併用療法も試みられているが、効果の増強、減弱、不変など一定の評価が得られていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、単に PARP 阻害薬が抗がん薬に及ぼす影響を明らかにするだけでなく、PARP 阻害薬併用時の PARP と活性酸素種 (reactive oxygen species: 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することで、抗がん薬の作用機序に関する有益な基盤情報を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ヒト培養がん細胞を抗がん薬で処理し、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(GloMax® Navigator, Promega)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 DiOC6(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、PARP 阻害薬を併せて用いることで、それぞれの抗がん薬によるアポトーシスイベントと PARP との関係を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) DNA 損傷能を有する過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に対する PARP 阻害薬の効果

抗がん薬による検討の前段階として、DNA 損傷能を有する ROS の1つである過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を用いて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の細胞毒性に対する PARP 阻害薬の影響を検討した。

PARP 阻害薬として Olaparib、Veliparib、Niraparib を用い、細胞としてヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を使用した。細胞生存率は CellTiter-Glo Assay (プロメガ)を用い、発光プレートリーダー (GloMax Navigator System、プロメガ) で測定した。細胞死のマーカーとして、ミトコンドリア膜電位、細胞内 ROS、Caspase-3/7 活性、DNA ラダーを測定した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (濃度: 50, 100, 200  $\mu$ M; 反応時間: 4 h) は、HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導し、細胞生存率を低下させた。この細胞生存率の低下は PARP 阻害薬によって抑制された。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるミトコンドリア膜電位の低下も PARP 阻害薬によって抑制された。しかしながら、細胞内 ROS、Caspase-3/7 活性、DNA ラダーについては、PARP 阻害薬による顕著な効果は認められなかった。PARP 阻害薬による細胞生存率の低下の抑制は、PARP 阻害薬がミトコンドリアに対する保護作用を有するものであると考えられる。

### (2) アントラサイクリン系抗がん薬の Pirarubicin (THP) に対する PARP 阻害薬の効果

抗がん薬としてアントラサイクリン系抗がん薬の Pirarubicin(THP)を用い、THP の細胞毒性に対する PARP 阻害薬の影響を検討した。

PARP 阻害薬として Olaparib を用い、細胞としてヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を使用した。細胞生存率は PI (propidium iodide)を用い、Tali™ Image-Based Cytometer (Invitrogen) で測定した。細胞死のマーカーとして、ミトコンドリア膜電位、細胞内 ROS、Caspase-3/7 活性を測定した。

THP (濃度: 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10  $\mu$ M; 反応時間: 4 h) は、HL-60 細胞に対し細胞生存率を低下させ、この低下は Olaparib の影響を受けなかった。一方、THP (濃度: 0.05, 0.1, 0.2, 0.5  $\mu$ M; 反応時間: 24 h) は、HL-60 細胞に対し細胞生存率を低下させ、この低下は Olaparib により抑制された。また、THP によるミトコンドリア膜電位の低下も Olaparib によって抑制された。さらに、細胞内 ROS の上昇、Caspase-3/7 活性の上昇についても Olaparib により抑制された。Olaparib による効果は、Olaparib がミトコンドリアに対する保護作用を有するものであると考えられる。

### (3) アントラサイクリン系抗がん薬の Doxorubicin (DOX) に対する PARP 阻害薬(Olaparib)の効果

抗がん薬としてアントラサイクリン系抗がん薬の Doxorubicin (DOX)を用い、DOX の細胞毒性

に対する PARP 阻害薬の影響を検討した。

PARP 阻害薬として Olaparib を用い、細胞としてヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を使用した。細胞生存率はトリパンプルーを用い、Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen) で測定した。細胞死のマーカーとして、蛍光顕微鏡 (EVOS FLoid Imaging System, Invitrogen) でのヘキスト 33342 によるクロマチン凝縮、Tali™ Image-Based Cytometer (Invitrogen) による細胞サイズとミトコンドリア膜電位を測定した。

DOX (濃度 : 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0  $\mu\text{M}$  ; 反応時間 : 24 h) は、HL-60 細胞に対し細胞生存率を低下させ、この低下は Olaparib により増強された。また、DOX によるミトコンドリア膜電位の低下も Olaparib によって増強された。一方、クロマチン凝縮、細胞サイズの低下については、Olaparib により抑制された。DOX の細胞毒性は、Olaparib により増強が見られたが、相反するデータもあり、さらなる検討が必要である。

(4) アントラサイクリン系抗がん薬の Doxorubicin (DOX) に対する PARP 阻害薬 (Veliparib と Niraparib) の効果

PARP 阻害薬として Veliparib と Niraparib を用い、細胞としてヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を使用した。細胞生存率はトリパンプルーを用い、Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) で測定した。細胞死のマーカーとして、蛍光顕微鏡 (EVOS FLoid Imaging System, Invitrogen) を用いたヘキスト 33342 染色によるクロマチン凝縮、AO/EtBr 染色によるクロマチン凝縮と生死判定、DiOC<sub>6</sub>(3) によるミトコンドリア膜電位を測定した。

DOX (濃度 : 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0  $\mu\text{M}$  ; 反応時間 : 24 h) は、HL-60 細胞に対し細胞生存率を低下させ、この低下は Veliparib と Niraparib により抑制された。また、DOX によるミトコンドリア膜電位の低下も Veliparib と Niraparib によって抑制された。一方、クロマチン凝縮、細胞サイズの低下については、Veliparib と Niraparib により抑制された。したがって、DOX の細胞毒性は、Veliparib と Niraparib により抑制が見られたが、相反するデータもあり、さらなる検討が必要である。

## 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 Miyazawa Daisuke, Suzuki Kinari, Sato Hikari, Katsurayama Natsumi, Tahira Tomoko, Mizutani Hideki, Ohara Naoki	4. 巻 17
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid contributes to increased CaMKII protein expression and a tendency to increase nNOS protein expression in differentiated NG108-15 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 209 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2023.01003	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 Ichimaru Yoshimi, Kato Koichi, Nakatani Rina, Isomura Risa, Sugiura Kirara, Yamaguchi Yoshihiro, Jin Wanchun, Mizutani Hideki, Imai Masanori, Kurihara Masaaki, Fujita Mikako, Otsuka Masami, Kurosaki Hiromasa	4. 巻 71
2. 論文標題 Structural Characterization of Zinc(II)/Cobalt(II) Complexes of Chiral <i>N,N'-bis(2-picolyl)amine</i>- (Anthracen-9-yl)methyl- <i>N,N'</i> -bis(2-picolyl)amine and Evaluation of DNA Photocleavage Activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 545 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c23-00043	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 Daisuke Miyazawa, Yeonjoo Lee, Mao Tsuchiya, Tomoko Tahira, Hideki Mizutani, Naoki Ohara	4. 巻 45
2. 論文標題 Docosahexaenoic Acid Increases Vesicular Glutamate Transporter 2 Protein Levels in Differentiated NG108-15 Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1385-1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00132	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 Yoshimi Ichimaru, Koichi Kato, Rina Nakatani, Kirara Sugiura, Hideki Mizutani, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tohru Koike, Wanchun Jin, Masanori Imai, Hiromasa Kurosaki	4. 巻 147
2. 論文標題 Characterization of Zinc(II) Complex of 1,4,7,10-Tetrazacyclododecane and Deprotonated 5-Fluorouracil (FU) in Crystalline/Solution States and Evaluation of Anticancer Activity: Approach for Improving the Anticancer Activity of FU	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry Communications	6. 最初と最後の頁 110221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.inoche.2022.110221	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 -

1. 著者名 Hideki Mizutani, Chiaki Shiga, Masanori Imai, Kenji Ikemura, Yuki Kitamura, Kinya Ohta, Daisuke Miyazawa, Mayuko Sakanashi, Tomoko Tahira, Tohru Maeda, Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi	4. 巻 40
2. 論文標題 Idarubicin, an anthracycline, induces oxidative DNA Damage in the presence of copper (II)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5399-5404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14548	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hideki Mizutani, Shosuke Kawanishi
2. 発表標題 Analyses of cell death induced by amrubicin, an anthracycline: role of reactive oxygen species.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷秀樹、内田朱音、巴山唯寧、加藤里菜、山中春奈、余語一紗、川西正祐
2. 発表標題 アントラキノン系抗がん薬ミトキサントロンによる細胞死の解析
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第12回学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 水谷秀樹、箕田祥子、星川真理子、宮澤大介、前田徹、Aswin Mangerich、Alexander Buerkle、川西正祐
2. 発表標題 PARP阻害薬オラパリブが抗がん薬ピラルピシンの細胞毒性に与える影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮澤大介、李妍周、土屋茉央、田平知子、水谷秀樹、大原直樹
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸が分化誘導下NG108-15細胞の小胞グルタミン酸トランスポータータンパク質発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷秀樹、星川真理子、川西正祐
2. 発表標題 アントラサイクリン系抗がん薬アムルピシンによる細胞死の解析
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第11回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永優里奈、田村梨歩、伊藤梓、柿本桃佳、水谷秀樹、奥村典子
2. 発表標題 ラット神経膠腫細胞を用いたアントラサイクリン系モデル化合物の細胞死におけるH2O2の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷秀樹、箕田祥子、Aswin Mangerich、Alexander Buerkle、川西正祐
2. 発表標題 抗がん薬ビラルピシンの細胞毒性におけるPARP阻害薬オラパリブの影響
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第10回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤梓、曾我杏莉沙、木下瑞希、大野詩乃、柿本桃佳、水谷秀樹、北村祐貴、奥村典子
2. 発表標題 ラット神経膠種細胞を用いたアントラサイクリン系モデル化合物の細胞死メカニズムの評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮澤大介、李妍周、土屋茉央、北森一哉、水谷秀樹、田平知子、大原直樹
2. 発表標題 ドコサヘキサエン酸がNG108-15細胞のシナプス小胞関連タンパク質に及ぼす影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤梓、曾我杏莉沙、木下瑞希、竹内堂朗、水谷秀樹、北村祐貴、奥村典子
2. 発表標題 アントラサイクリン系モデル化合物の酸化還元特性と細胞毒性
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部・第9回学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 水谷秀樹 他	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 952
3. 書名 薬物治療学 改訂12版	

1. 著者名 水谷秀樹 他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 920
3. 書名 薬物治療学 改訂11版	

1. 著者名 水谷秀樹 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 910
3. 書名 薬物治療学 改訂10版	

1. 著者名 水谷秀樹 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 912
3. 書名 薬物治療学 改訂9版	

1. 著者名 水谷秀樹 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 677
3. 書名 図解 腫瘍薬学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金城学院大学 学術研究データベース <a href="https://research.kinjo-u.ac.jp/kighp/KgApp/">https://research.kinjo-u.ac.jp/kighp/KgApp/</a>
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	University of Konstanz		