

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590143

研究課題名（和文） 抗がん剤副作用発現の組織特異的な分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular machinery underlying tissue-specific development of adverse drug reactions induced by anticancer drugs

研究代表者

沼澤 聡（NUMAZAWA SATOSHI）

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：80180686

研究成果の概要（和文）：本研究は、5-フルオロウラシル（5-FU）による骨髄抑制と酸化ストレスの因果関係を明らかにし、骨髄と腫瘍組織の応答性の差異から副作用発現に関わる組織特異的機序の解明を目指した。5-FU による骨髄毒性は、酸化ストレスで活性化される転写因子 Nrf2 やグルタチオン量と直接関連することを示し、5-FU による骨髄毒性に一部酸化ストレスが関与することを明らかにした。また、移植がん組織と骨髄では 5-FU に対する p53 の応答性が異なることから、その相違が 5-FU 毒性の臓器選択性と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify whether 5-fluorouracil (5-FU)-induced myelotoxicity is a cause of oxidative stress and to demonstrate machinery involved in tissue-specific development of adverse-drug reactions. 5-FU-induced myelotoxicity in mice was directly linked to intracellular glutathione and activity of Nrf2, indicating that oxidative stress is involved in the process. In addition, 5-FU induced different responses of p53 in the bone marrow and tumor xenografts, which could be participated in the tissue selectivity of the 5-FU-mediated toxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：臨床薬学、化学療法、副作用発現機構、5-フルオロウラシル、p53

## 1. 研究開始当初の背景

古典的抗がん剤の多くは核酸合成や機能を標的とし、腫瘍細胞のみならず分裂周期の短い正常組織細胞の増殖も阻害する結果、消化器、骨髄、皮膚などを中心に多彩な副作用を引き起こす。これらの副作用は、患者 QOL を損なうだけでなく、時として治療の用量規定因子となる。これら抗がん剤の副作用を積極的にコントロールできる支持療法が開発

されれば、新規レジメンとして極めて有効ながん治療の武器になりうる。抗がん剤の副作用は、その薬効本態と同様に主に遺伝子複製や核酸機能を阻害することにより正常組織に対しても細胞死を誘導するものとされてきた。それに加えて、近年では一部の抗がん剤では酸化ストレスが細胞障害において重要な役割を演じていることが明らかになってきている。しかし、報告のほとんどがドキ

ソルビシンやシスプラチンなど濃度依存性（細胞周期非依存性）抗がん剤であり、本邦で固形がんに対する化学療法に最も汎用されている5-フルオロウラシル（5-FU）をはじめとする時間依存性（細胞周期依存性）抗がん剤での報告はほとんどなされていない（水谷，薬学雑誌 **127**，1837-1842，2007）。一方、消化器症状、特に口内炎では時間依存性薬剤の基礎的エビデンスがほとんどないにもかかわらず、酸化ストレスが主要な初期原因であるように考えられており、その支持療法の開発戦略において機構解明への本格的な取り組みが急務となっている。

5-FU など抗がん剤の骨髄抑制は、主に血球前駆細胞の増殖阻害やストローマ細胞を含めた細胞毒性の結果と理解されてきた。一方、骨髄造血組織はベンゼンをはじめとする環境汚染物質が引き起こす酸化ストレスに対して感受性が高いことが広く知られている（Subrahmanyam VV *et al.*, Free Radic Biol Med. **11**, 495-515, 1991）。従って、抗がん剤による骨髄毒性にも酸化ストレスが関与することを予測することは可能であるが、それを示した報告は驚くべきことにこれまで全くなされていない。

我々は本研究に先立つ予備的検討において、5-FU が *in vivo* でマウス骨髄細胞の活性酸素発生を増加させ、酸化ストレスに鋭敏に反応するマーカータンパクである Heme oxygenase-1 (HO-1) を誘導する実験事実を掴んでいた。またこのようなストレスマーカーは、5-FU による骨髄細胞毒性と並行して生じていた。これらの結果は、5-FU の骨髄抑制に酸化ストレスが関連することを示唆する。一方、5-FU はがん細胞の核酸機能障害を介してがん抑制遺伝子産物 p53 を活性化することが知られており、それが薬効発現と密接に関連することが示されている（Longley DB *et al.*, Nat Rev Cancer, **3**, 330-8, 2003）。また、p53 は抗酸化ストレスタンパクの抑制性転写因子である Bach1 を介して酸化ストレス応答に関与することが報告（Dohi Y *et al.*, Nat Struct Mol Biol. **15**, 1246-54, 2008）されている。このような実験事実や報告は、5-FU が骨髄細胞では多くのがん細胞と異なる作用機序により細胞障害作用を発揮していることを示唆する。

## 2. 研究の目的

本研究では、5-FU の骨髄組織の p53 やその調節因子に対する作用をがん細胞と比較検討する。さらに、p53 と相互作用する Bach1 と相反して抗酸化ストレスタンパクを正に

制御する転写因子 Nrf2 (Numazawa S & Yoshida T, J Toxicol Sci, **29**, 81-89, 2004) に対する作用を詳細に解析することにより、骨髄抑制と酸化ストレスの因果関係を明確にし、その発症機序と酸化ストレスとの関連性を明らかにする。これらの検討により、5-FU を用いた化学療法に起因する副作用克服戦略の基盤を構築することを本申請の最終目的とする。

## 3. 研究の方法

雄性 C57BL/6 または Nrf2<sup>-/-</sup> マウスに、5-FU (75 mg/kg, ip. または 150 mg/kg, ip.) を投与した。一部の実験では FM3A 乳がん細胞を移植した雄性 C3H マウスを用いた。骨髄毒性は、骨髄細胞を IL-3、IL-6 および SCF を含むメソカルト培地で 10 日間培養し、生じたコロニー数をカウントすることにより評価した。遺伝子発現は、全 RNA を逆転写後、TaqMan プローブを用いた定量 PCR 法により検出した。タンパクレベルは免疫ブロット法により検出した。グルタチオン量は DTNB-グルタチオンレダクターゼリサイクリングアッセイにより求めた。遺伝子発現の網羅的解析は、アジレント社マイクロアレイを用いて行った。細胞周期は、ヨウ化プロピジウムで染色後フローサイトメーターを用いて測定した。

## 4. 研究成果

5-FU を投与したマウスの骨髄において、酸化ストレスのバイオマーカーである heme oxygenase-1 (HO-1) やシスチン/グルタミン酸トランスポーターが用量および時間依存的に誘導された。また、5-FU による HO-1 誘導は *in vitro* でも認められた。一方、5-FU による HO-1 誘導作用は Nrf2 欠損マウスでは減弱して認められた（図 1A）。さらに Nrf2 欠損マウスでは 5-FU の骨髄毒性が野生型に比べ顕著に出現した（図 1B）。5-FU のマウスへの投与は骨髄グルタチオン量を 48 時間後に

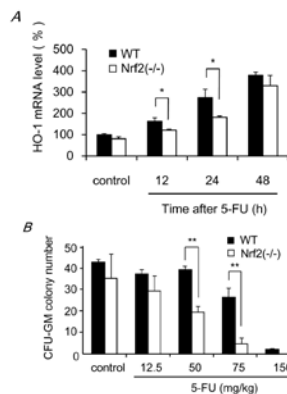


図 1 野生型および Nrf2 KO マウスにおける 5-FU による HO-1 誘導 (A) と骨髄毒性 (B)

減少させたが、N-アセチルシステイン (250 mg/kg, ip.) の前投与はグルタチオンに対する 5-FU の効果を無効とした。5-FU 投与により認められた骨髄毒性は、N-アセチルシステイン前処置によりほぼ完全に回復した (図 2)。

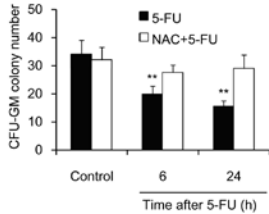


図 2 N-アセチルシステインによる 5-FU 誘導骨髄毒性の軽減

Keap1 は Nrf2 の阻害タンパクで、その遺伝子欠損により恒常的な Nrf2 活性化が生じる。Keap1 のヘテロ欠損動物では、5-FU による骨髄毒性の軽減が認められた。さらに Keap1 ホモ欠損胎児から得た繊維芽細胞 (MEF 細胞) では、5-FU の増殖抑制作用が减弱した。これらの結果より、5-FU は骨髄において Nrf2 依存性に酸化ストレスタンパクの誘導を引き起こすことが明らかになった。Nrf2 の活性化は Keap1 の不活性化が引き金となることから、5-FU は Keap1 のレドックス状態を酸化状態に変化させることが示唆された。従って、5-FU による骨髄毒性には一部酸化ストレスが関与することが明らかになった。

次に 5-FU が骨髄において惹起する生化学的応答を解析する目的で、遺伝子発現の網羅的解析を実施した。その結果、5-FU 投与初期 (12~24 時間後) に細胞周期関連遺伝子が一群として変動していることが明らかになった。特に、G1 期の制御に関連し、p53 が直接

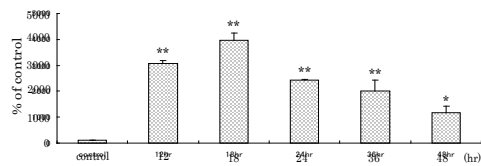


図 3 5-FU による骨髄中 p21 waf1/cip1 誘導

転写活性を促す標的遺伝子であるサイクリン G1 と p21WAF2/CIP1 の発現増加 (図 3、定量 PCR の結果) は、p53 が 5-FU により活性化していることを示す明らかな証拠であり、

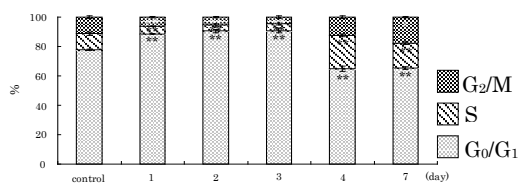


図 4 5-FU 投与による骨髄細胞の細胞周期変化

5-FU によりがん細胞と同様に骨髄細胞でも DNA 障害に伴う p53 の活性化が生じていることが示唆された。さらに多くの E2F 依存性遺伝子がダウンレギュレートされており、フローサイトメトリーの結果 (図 4) と合わせて、骨髄細胞において主に G1 arrest が生じていることが明らかとなった。一方、酸化ストレスに応答する遺伝子発現はいずれも投与 24 時間以後に認められたことから、5-FU は骨髄細胞に対して初めに DNA 障害による細胞周期停止を惹起し、その後ストレス応答遺伝子を含む細胞応答を誘導していることが示唆された。

網羅的解析の結果より p53 に着目し、FM3A 乳がん細胞を移植した C3H マウスにおいて、5-FU に対する応答性が骨髄とがん種で異なるかどうかを検討した。5-FU はがん種 p53 を誘導したが、骨髄では逆に p53 の遺伝子発現とタンパクレベルが低下することが明らかとなった。一方、リン酸化 (Ser15) p53 のレベルはがん種では 5-FU の用量に依存して増加したのに対し、骨髄では非線形性に増加することが判明した。以上の結果より、5-FU の p53 に対する作用は、同一個体において移植がん組織と骨髄で異なる応答性を示すことが明らかになり、その相違が 5-FU 毒性の臓器選択性と関連する可能性が示唆された。特に化学療法剤による p53 のダウンレギュレーションは、腫瘍細胞では知られていないことから、5-FU の骨髄細胞への特徴的作用であることが示唆された。

一方、5-FU により骨髄中で生じる p53 応答およびそれに引き続く G1 停止と、その後認められる酸化ストレス惹起との関連性に関して本研究で明らかにするには至らず、今後の課題として残された。今後この点に関する詳細な解析により、5-FU などの化学療法剤による副作用克服への補助療法戦略の立案に繋がるとも考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (7 件)

① Shizu R, Shindo S, Yoshida T and Numazawa S. Cross-talk between constitutive androstane receptor and hypoxia-inducible factor in the regulation of gene expression. *Toxicol Lett.* 査読有 **219**, 143-150, 2013

DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.03.014

② Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S. Redox-sensitive transcription

factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 査読有 33, 760-768, 2013.

DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300614.

③Shizu R, Shindo S, Yoshida T and Numazawa S. MicroRNA-122 down-regulation is involved in phenobarbital-mediated activation of the constitutive androstane receptor. *PLoS One.* 査読有 7:e41291, 2012. DOI:10.1371/annotation/75898a72-dfcb-4002-b749-8c04d78ba6e1

④Numazawa S, Takase M, Ahiko T, Ishii M, Shimizu S and Yoshida T. Possible involvement of transient receptor potential channels in electrophile-induced insulin secretion from RINm5F cells. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有 35 346-354, 2012

<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.35.346>

⑤ Ashino T, Sugiuchi J, Uehara J, Naito-Yamamoto Y, Kenmotsu S, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Auranofin protects against cocaine-induced hepatic injury through induction of heme oxygenase-1. *J Toxicol Sci.* 査読有 36, 635-643, 2011

<http://dx.doi.org/10.2131/jts.36.635>

⑥ Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, Yamamoto M, Yoshida T. Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 査読有 108, 40-45, 2011.

DOI: 10.1111/j.1742-7843.2010.00621.x.

⑦ Kaizaki A, Tanaka S, Tsujikawa K, Numazawa S, Yoshida T. Recreational drugs, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and diphenylprolinol, inhibit neurite outgrowth in PC12 cells. *J Toxicol Sci.* 査読有 35, 375-381, 2010

<http://dx.doi.org/10.2131/jts.35.375>

[学会発表] (計 24 件)

① 田中佐知子, 坂爪伸一郎, 沼澤聡 Peripheral inflammation caused neurodegeneration in the central nervous system. 第 86 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月, 福岡

② 貝崎明日香, 田中佐知子, 芦野隆, 沼澤聡 The current status of "uncontrolled

drug" and effect of novel recreational drug such as  $\alpha$ -PVP and ethylphenidate.

第 86 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月, 福岡

③ Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S. The redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates reactive oxygen species-dependent vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia. The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2012 年 12 月, 徳島

④ Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S Role of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 in vascular smooth muscle cell migration and vascular remodeling. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012 年 7 月, 仙台

⑤ Tanaka S, Ishii A, Ohtaki H, Shioda S, Numazawa S Activated microglia induced animal model of Parkinson's disease, but not in IL-1 knockout mouse. 8th Federation of European Neurosciences - Forum of Neuroscience, 2012 年 7 月, バルセロナ, スペイン

⑥ Suwa M, Numazawa S, Yoshida T Preparation of ssDNA aptamers, selectively bind 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), by SELEX method. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, 2012 年 6 月, 浜松

⑦ 芦野隆, 上原淳奈, 杉内仁子, 岩倉洋一郎, 塩田清二, 沼澤聡, 吉田武美 オーラノフィンによるヘムオキシゲナーゼ-1 誘導を介したコカイン誘発肝障害防御作用. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌

⑧ 田中佐知子, 石井敦子, 大滝博和, 塩田清二, 吉田武美, 沼澤聡 炎症誘発によるパーキンソン病モデルマウスの作製と IL-1 の重要性. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌

⑨ Ashino T, Sugiuchi J, Uehara J, Naito-Yamamoto Y, Kenmotsu S, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Auranofin protects against cocaine-induced hepatic injury through induction of heme oxygenase-1. The Society of Toxicology 51st Annual Meeting and ToxExpo, 2012 年 3 月, サンフランシスコ, アメリカ

⑩ Tanaka S, Ishii A, Ohtaki H, Nakamachi T, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T.

Involvement of IL-1 in the activated microglia-induced Parkinson's disease animal model. 8th International Brain Research Organization World Congress of Neuroscience, 2011年7月, フィレンツェ, イタリア

⑪志津怜太, 沼澤聡, 吉田武美. フェノバルビタールによる miR-122 ダウンレギュレーションを介した CYP2B 誘導機構. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011年7月, 横浜

⑫瀧憲二, 丸茂瑠佳, 芦野隆, 田中佐知子, 沼澤聡, 吉田武美. ニコチン脳室内投与によるマウス海馬における神経毒性発現に関連する miRNA の変動. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011年7月, 横浜

⑬Ishii A, Tanaka S, Ohtaki H, Nakamachi T, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Neurotoxicity in the LPS dosage in the mouse substantia nigra. The Society of Toxicology 50th Annual Meeting and ToxExpo, 2011年3月, ワシントン DC, アメリカ

⑭Tanaka S, Takahashi S, Itoh Y, Numazawa S, Yoshida T. Anti-inflammation effects of nicotine and GTS-21 via alpha7 nAChR in rat hippocampal slice cultures and BV-2 cells. Neuroscience 2010, 2010年11月, サンディエゴ, アメリカ

⑮Ishii A, Tanaka S, Ohtaki H, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Activation of microglia lead to onset of Parkinson disease animal model. Neuroscience 2010, 2010年11月, サンディエゴ, アメリカ

⑯Numazawa S, Murakami C, Shizu R, Yoshida T. Participation of microRNAs in phenobarbital-induced changes in the expression of genes encoding drug-metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. International Society for the Study of Xenobiotics 9th International Meeting, 2010年9月, イスタンブール, トルコ

⑰Uehara J, Shindo S, Numazawa S, Yoshida T. Inhibitory effect of sesamol on LPS-mediated inflammatory response. The XII International Congress of Toxicology, 2010年7月, バルセロナ, スペイン

⑱Miyake S, Sugihara K, Numazawa S, Yoshida T. Possible involvement of p53 mediated pathways in the myelosuppression induced by 5-FU. The XII International Congress of Toxicology, 2010年7月, バルセロナ, スペイン

⑲Yamamoto T, Kaizaki A, Tanaka S, Numazawa S, Yoshida T. Effects of recreational drugs on neurite outgrowth in PC12 cells. The XII International Congress of Toxicology, 2010年7月, バルセロナ, スペイン

⑳上原淳奈, 進藤佐和子, 沼澤聡, 吉田武美. セサモールの LPS によるマクロファージ活性化阻害について. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月, 沖縄

㉑三宅祥太, 杉原加寿子, 沼澤聡, 吉田武美. 5-フルオロウラシルによる骨髄毒性発現メカニズム-p53 との関連性-. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月, 沖縄

㉒山本卓, 貝崎明日香, 田中佐知子, 沼澤聡, 吉田武美. 乱用薬物が神経伸張に及ぼす影響~PC12 細胞を用いて~. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月, 沖縄

㉓志津怜太, 進藤佐和子, 沼澤聡, 吉田武美. フェノバルビタールの CYP2B 誘導における Hypoxia inducible factor-1 の役割. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月, 沖縄

㉔石井敦子, 田中佐知子, 大滝博和, 塩田清二, 沼澤聡, 吉田武美. マウス黒質内リポポリサッカライド投与によるパーキンソン病モデルマウス作製における神経毒性発現機序. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010年6月, 沖縄

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沼澤 聡 (NUMAZAWA SATOSHI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号 : 80180686