

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08458

研究課題名(和文) 酸化ストレスが誘引する抗癌剤による副作用発現因子の解明

研究課題名(英文) Explore of side effect onset factor on oxidative stress-induced by anticancer drugs

研究代表者

菅野 秀一 (Kanno, Shuichi)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00347907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは薬の効果や毒性発現機序に深く関与する。アントラサイクリン系抗癌剤のドキソルビシン(DOX)は様々な癌種に適応されるが、癌患者に対して酸化ストレスを介した重篤な心毒性を生ずることが問題となっている。本研究では、マウスを用いたin vivoの実験と、心筋細胞株を用いたin vitroの実験により、生体内のインターロイキン-6(IL6)とProgrammed cell death 1(Pdcd1)の遺伝子発現が、DOX誘発心毒性の感受性因子として存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤は主作用のみならず副作用も強い。抗癌剤による治療は癌患者へ大きな負担をかけることになる。抗癌剤の作用機構として、酸化ストレスの関与が示唆されている。また、酸化ストレスは病気の発症や免疫系など、生体内で多岐に渡る様々な生理作用にも関与する。アントラサイクリン系抗癌剤のドキソルビシン(DOX)は、効果の反面、癌患者に対して酸化ストレスを介した重篤な心毒性を生ずることが問題となっている。そこで、DOXをはじめとする酸化ストレスが誘引する抗癌剤の副作用発現因子を解明できれば、癌患者における副作用の発現を軽減し、有効かつ安全な癌化学療法を施行できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Anthracyclines, such as doxorubicin (DOX), have been widely used in the treatment of variety of solid and hematological malignancies. However, these drugs can inflict cumulative dose-dependent and irreversible damage to the heart, leading to the development of heart failure. Accordingly, if the risk of cardiotoxicity could be known prior to the drug administration, it would help render chemotherapy safer and more effective. The present study was carried out to identify genes that can predict the DOX-induced cardiotoxicity (DICT). Among various candidate genes, the plasma mRNA levels of the genes encoding interleukin 6 (IL6) and programmed cell death 1 (Pdcd1) in blood exhibited significant and positive correlation with the severity of DICT. The levels of transcription of both IL6 and Pdcd1 in cardiomyocytes play a protective role against DICT, and that the accumulation of these gene transcripts in blood is a predictive marker for DICT.

研究分野：毒性薬理学

キーワード：酸化ストレス 抗癌剤 ドキソルビシン 心毒性 副作用発現因子 遺伝子発現 Interleukin 6 Programmed cell death 1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性酸素を介した生体作用、即ち酸化ストレスは、癌・免疫・神経など国内外において多岐に渡り、様々な分野で研究が行われている。種々の薬による薬理作用や毒性発現機構などにおいても、酸化ストレスの発現は重要な作用機序の一つであるとされる。特に、抗癌剤の作用機序としても酸化ストレスが関与し、副作用の発現にも影響をおよぼす。我々はこれまでに様々な薬物における酸化ストレスと細胞毒性との関連を報告してきた。解熱鎮痛薬として世界中で最も多用される「アセトアミノフェン」による薬剤性肝障害の発現において、生体内で生成する酸化ストレスの影響が深く関与すると知られている。一般に、薬物中毒による毒性発現機構には、血中薬物濃度の増大が大きく影響すると考えられているが、近年における我々の実験結果では ddY 系雄性マウスにおいて、アセトアミノフェン(500 mg/kg)の経口投与による毒性の発現に個体差が存在し、血中薬物濃度の変動よりも生体側因子の影響が大きいものと示唆された(Kanno S et al., *Biol Pharm Bull.* 2016;39(3):440-5.)。さらに、薬物投与前に血液を採取し、酸化ストレスの発現やアセトアミノフェンの代謝に関与する血中 RNA の発現を薬物投与後における毒性発現の有無や障害の重症度を分類してリアルタイム PCR にて定量解析したところ、*Gpx3*, *Mt1*, *Ttr*, *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Il10* と 6 つの感受性因子が候補として挙げられた。この中の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼ - 3 (*Gpx3*) は血漿中に多く存在する抗酸化酵素であり、性ホルモンや加齢による影響で変動することが報告されている。性差や加齢などは、薬物による毒性発現や酸化ストレスによる感受性に対しても強く影響する。すなわち、*Gpx3* のように薬剤性酸化ストレスに関与する因子の影響を突き止めることは、薬の効果や毒性発現に関わる個々の感受性を解明する上で、大変に意義が深い。

2. 研究の目的

抗癌剤はその効果を生体内で発揮するために、元々は強い細胞毒性を有する。時に、それは癌に対する薬物療法を受けている患者へ重大な副作用を発現し、生命を危険な状態に陥ることもある。つまり、個々の癌患者における抗癌剤の副作用発現を予測して回避することは、有効かつ安全な癌化学療法を施行するために、極めて重要な課題である。抗癌剤の中でも、酸化ストレスを介して作用を示すものは多く、これまでに多くの作用機序や分子内メカニズムについて様々な報告がなされている。本研究は、生体側を精査することから開始するという新しい実験のアプローチにより、酸化ストレスを介する抗癌剤を標的とした、生体側の遺伝子レベルでの情報と抗癌剤による副作用の発現を解析し、患者への負担を軽減して適切な癌化学療法の施行を目的とする研究である。

3. 研究の方法

In vivo における検討として、実験には C57BL/6J マウスを使用した。酸化ストレスが関与して副作用を発現する薬物の実験モデルとして、アントラサイクリン系抗癌剤であるドキシソルビシン(DOX)による心毒性を対象として実験を行った。DOX 投与前のマウスより予め採血をし、酸化ストレスや心毒性に関連する血中の遺伝子発現をリアルタイム PCR により、個々のマウスでプロファイルする。次に、DOX をマウスに蓄積投与し、心毒性の指標となる血清生化学的変動を元に、モデル動物を作製する。DOX 投与により心毒性を発現したマウスの個体差と、DOX 投与前における血中遺伝子発現の差異を照合し、副作用の発現に関連する候補遺伝子を探索する。また *in vitro* における検討としては、心筋細胞であるラット H9c2 細胞株を用いて、抗癌剤処理による標的遺伝子の発現変動を精査する。*In vivo* と *in vitro* の結果より、抗癌剤による副作用の発現に関与する標的遺伝子を見出す。更に、DOX による心毒性発現因子をより明らかとするため、siRNA によるジーンサイレンシングにより遺伝子ノックダウンを心筋細胞株にて行い、DOX 処理による心筋細胞の細胞生存率や細胞内活性を測定し、標的遺伝子の影響を検証する。

4. 研究成果

(1) DOX による心毒性の発現モデルを確立するため、マウスに DOX を蓄積投与して検討を行った。C57BL/6J 雄性マウスを搬入 1 週間後に、tail cut により採血を行い、全血より total RNA を抽出した。cDNA を鋳型とし、リアルタイム PCR により酸化ストレス関連遺伝子群の発現をプロファイルした。採血をして更に 1 週間後、DOX 3.33 mg/kg を腹腔内へ 1 日置きに 7 回(計 14 日間)蓄積投与をした。最終投与日から 1 週間後において、生食を投与したコントロール群と比較し、DOX 投与群では体重と心重量の減少、

～DOX心毒性のスコア～

項目	スコア (Total 0～10)
LDH, AST	1
CK-MB, Troponin T	3
死亡	10

～DOX心毒性のスコアの割合～

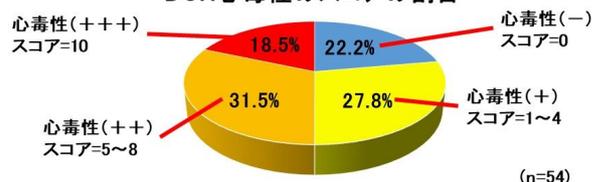


図1. DOX投与により、全体の77.7%に心毒性を認めた。

心線維化マーカー (*ctgf* mRNA) の有意な上昇を認めた。心毒性の指標として、血清中の乳酸脱水素酵素 (LDH)、アミノトランスフェラーゼ (AST)、クレアチンキナーゼ - MB (CK-MB)、トロポニン T 値を指標として評価を行い、DOX 心毒性のスコア化を行った (図 1)。DOX 投与群全体の 77.7% に DOX 心毒性を認め、22.2% では心毒性が発現せず、18.5% が死亡した。このように、DOX 心毒性の発現に感受性の差異を示したため、酸化ストレスや細胞死関連因子の関与が示唆される 32 種類の遺伝子発現のうち、さらに個体差が明らかである 11 種類の遺伝子発現を標的として、DOX 心毒性との関連性を検討した。DOX 投与後の心毒性スコアと DOX 投与前における標的遺伝子発現との相関係数を算出したところ、5 種類の遺

～標的遺伝子とDOX心毒性の相関係数～

標的遺伝子	相関係数 (r)	P-value
<i>Gpx2</i>	0.0876	0.5287
<i>Gpx3</i>	0.3343	0.0216
<i>Gsta1</i>	0.0279	0.8461
<i>Hspa1b</i>	0.2216	0.1181
<i>I16</i>	0.4669	0.0004
<i>Mapk8</i>	0.2176	0.1176
<i>Mt1</i>	0.3024	0.0347
<i>Nqo1</i>	0.2410	0.1027
<i>Pdcd1</i>	0.3653	0.0136
<i>Sod3</i>	0.3874	0.0071
<i>Ttr</i>	0.2337	0.1223

図2. 5種類の遺伝子 (*I16*, *Pdcd1*, *Sod3*, *Gpx3*, *Mt1*) に有意な正の相関が認められた。

伝子 (*I16*, *Pdcd1*, *Sod3*, *Gpx3*, *Mt1*) に有意な正の相関が見られた (図 2)。

(2) DOX 心毒性における *in vitro* での影響を検討するため、ラット心筋細胞株 H9c2 を用いて実験を行った。DOX は H9c2 細胞に対して用量と時間に依存した細胞毒性和、それに先立つアポトーシスの発現を生じたが、DOX 1 μ M 処理 3 時間後までは、アポトーシスの発現やアポトーシス実行機構であるカスパーゼ-3/7 活性の上昇が認められなかったため、DOX 1 μ M 処理 3 時間後に total RNA を抽出し、cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR により標的遺伝子の発現を網羅的に検出した。1st スクリーニングとして 105 種類の遺伝子発現を標的とし、2nd スクリーニングとして 18 種類の標的遺伝子を検出したところ、DOX 非処理群 (Control) に比較して *Pdcd1*, *Hspa1b*, *Sod3* の増大と *I16*, *Gadd45a*, *Myc*, *Serpine1* の減少が認められた。

(3) *In vivo* と *in vitro* の結果より、標的遺伝子の中から DOX 心毒性に対して *I16* と *Pdcd1* の関与が深く示唆されたため、siRNA を用いたジーンサイレンシングにより H9c2 細胞における

～siRNA (siI16, siPdcd1)による遺伝子ノックダウン～

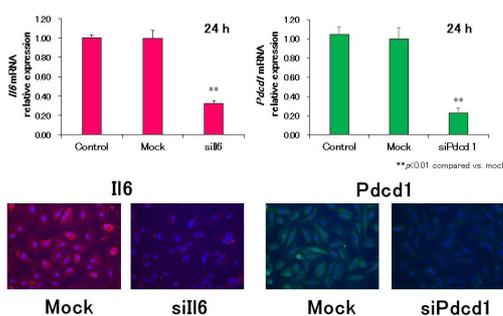


図3. siRNAを導入して24時間後、*I16*と*Pdcd1*の発現低下を確認した。

siPdcd1) において DOX 1 μ M を処理し、アポトーシスの発現を経時的に測定したところ、各々のノックダウン細胞においてアポトーシスが有意に増大することを認めた (図 4)。更に、DOX 処理して 4 および 8 時間後におけるカスパーゼ-3/7 活性は、DOX (0.01-1 μ M) の用量に依存して増大することを示した。一方で、アポトーシス発現過程の上流にあるイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ

遺伝子ノックダウンを行った。H9c2 細胞に siRNA を導入して 24 時間後、*I16* と *Pdcd1* の mRNA 発現をリアルタイム PCR により、タンパク発現を免疫蛍光染色法により検出し、いずれも明らかに発現が低下したことを確認した (図 3)。作成したそれぞれのノックダウン細胞 (siI16,

～DOXによるsiRNAノックダウン細胞のアポトーシス～

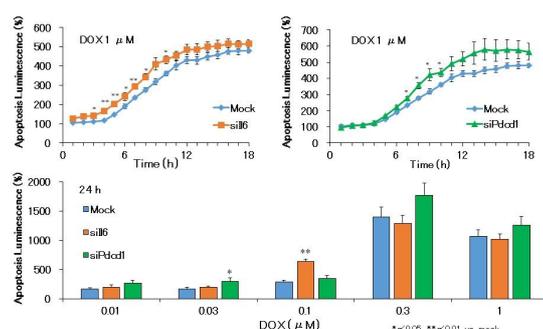
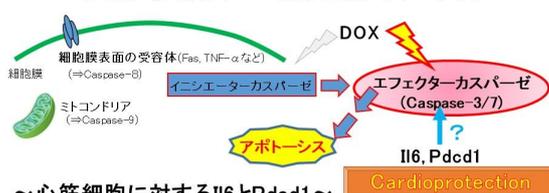


図4. DOXによるアポトーシスはいずれのノックダウン細胞においても増大した。

～DOXによるカスパーゼ活性とアポトーシス～



～心筋細胞に対するI16とPdcd1～

- 【I16】**
- One of cardioprotective chemokines
 - Cardiomyocyte regeneration
 - Inflammatory cytokine

- 【Pdcd1】**
- Pdcd1 is expressed in rodent and human cardiomyocytes
 - Pdcd1-deficient mice develop dilated cardiomyopathy
 - Cardiovascular toxic effects of Pdcd1 inhibitors

図5. *I16*と*Pdcd1*はDOX心毒性に対して心保護作用を示すことが示唆された。

(4) 以上のことより、*I16* と *Pdcd1* は酸化ストレスを介した DOX 心毒性の感受性因子となることが示唆された。両者は、心保護 (Cardioprotection) 作用として働き、DOX によるカスパーゼ-3/7 を介したアポトーシスの発現を制御している可能性が考えられる (図 5)。心毒性は癌患者の生死に関わる最も重要な副作用の一つであり、今後の研究において、*I16* と *Pdcd1* が DOX 使用患者における心毒性の発現に対して、予防と治療に利用できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野秀一、蓬田伸、原 明義
2. 発表標題 I16とPdcd1はドキシソルピシン誘発心毒性の感受性因子となる
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野秀一、蓬田伸、原 明義
2. 発表標題 ラット心臓由来H9c2細胞株において、I16とPdcd1の遺伝子ノックダウンはドキシソルピシンによるアポトーシス発現を増大する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北医科薬科大学薬学部薬物治療学教室研究内容 http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/yakuchi/index.html

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
---------------------------	-----------------------	----