

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25460229

研究課題名(和文) 抗がん剤の作用機序における活性酸素シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of reactive oxygen signaling in the 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、抗がん剤と活性酸素(ROS)との関係に注目し、抗がん剤の効果・副作用の発現を酸化ストレスの観点から明らかにすることである。今回、薬物としてマイトマイシンC(MMC)、ピラルビシン(THP)、カルノシン酸(CA)を使用した。THP、CAは、Cu(II)存在下では濃度依存的にDNAを損傷し、この損傷にはROSが関与していた。また、培養細胞の実験で、MMC、THP、CAの細胞死において共にH₂O₂の関与を示唆しており、これらの細胞死誘導因子すなわち抗がん作用因子としてROSの1つであるH₂O₂が重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to clarify effects and adverse effects of the anticancer drugs from an oxidative stress point of view, to take notice of relationship between anticancer drugs and reactive oxygen species (ROS). Mitomycin C (MMC), pirarubicin (THP) and carnosic acid (CA) were used in this research. THP and CA induced oxidative DNA damage in concentration-dependent under Cu (II), and ROS participated in this DNA damage. Participation of H₂O₂ is suggested together in cell death of MMC, THP and CA by experiments of culture cell lines. As these cell death inducer, or factor of anticancer action, it is revealed that H₂O₂, one of ROS, is an important factor.

研究分野：がん治療薬学、酸化ストレス学、医療薬剤学

キーワード：抗がん剤 活性酸素 アポトーシス

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。がん治療の主要な方法の1つ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。多くの抗がん剤は 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) を誘導することにより抗がん効果を発揮する。

研究代表者らは、トポイソメラーゼ I, II 阻害剤 TAS-103 やアントラサイクリン系抗がん剤ドキシソルビシン (慣用名: アドリアマイシン) のアポトーシス誘導に ROS が関与し、この ROS 生成には NADPH oxidase の活性化が関係していることを明らかにした [水谷ら, *J. Biol. Chem.* (2002); 水谷ら, *Life Sci.* (2005)]。他の抗がん剤や天然生理活性物質において、アポトーシス誘導時に ROS の生成や ROS による酸化ストレスの関与が報告されている [Russell ら, *Anticancer Res.* (2012); Zhou ら, *Mol. Cancer Res.* (2012) など]。一方、アポトーシス誘導と ROS 産生とは関係ないという報告 [Bernuzzi ら, *Chem. Biol. Interact.* (2009); Zhang ら, *Cancer Biol. Ther.* (2007)] も散見され、抗がん剤によるアポトーシス誘導時の 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

抗がん剤によるアポトーシス誘導時における ROS の関与を明らかにし、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することで、抗がん剤の作用機序に関する有益な基盤情報の構築を目的とする。

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 550 nm 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 O₂ 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ングアノシン (8-OHdG) の生成量は、ELISA 法により測定する。

(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 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、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、H₂O₂ 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) キノン系抗がん性抗生物質マイトマイシン C (MMC) で 24 h 処理後の DNA ラダーは、HL-60 において 0.5 μM から観察されたのに対して、HP100 では 2.0 μM から観察された。また、核凝縮、LDH 遊離を指標とした細胞死、Caspase-3/7 活性についても HL-60 で顕著であり、HP100 において MMC によるアポトーシスの抑制が認められた。また、細胞内 ROS 産生は、1 h 後、2 h 後では認められなかったが、18 h 後において認められ、その産生は、HL-60 > HP100 であった。以上により MMC のアポトーシス誘導因子すなわち抗がん作用因子として ROS の1つである H₂O₂ が重要であることが明らかになった。

(2) アントラサイクリン系抗がん性抗生物質ピラルビシン (THP) のプラスミド DNA の実験において、THP 単独では DNA 損傷は認められなかったが、Cu(II) 存在下 THP 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、シトクロム c 還元法により、Cu(II) 存在下で THP は O₂ を生成した。細胞実験において、THP による細胞死と核凝縮は HL-60 > HP100 であり、Caspase-3/7 活性、ミトコンドリア膜電位の変化、ROS 産生についても HL-60 で顕著であった。以上により THP 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、その活性種は OH ラジカルよりも Cu(I) と H₂O₂ とによる complex と考えられた。ヒト培養細胞での結果も H₂O₂ の関与を示唆しており、THP のアポトーシス誘導因子すなわち抗がん作用因子として ROS の1つである H₂O₂ が重要であることが明らかになった。

(3) 西洋ハーブのローズマリー含有成分の1つであるカルノシン酸 (Carnosic Acid : CA) のプラスミド DNA の実験において、CA 単独では DNA 損傷は認められなかったが、Cu(II) 存在下で CA は 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 CA は O₂ を生成した。また、CA は細胞毒性を示し、その毒性は HP100 に比べ HL-60 で強かった。CA は Cu(II) 存在下で活性酸素種を生成し、酸化的に DNA を損傷することが判明した。さらに培養細胞の実験において CA により DNA ラダーが形成され、Caspase-3/7 活性が上昇した。CA による細胞生存率は、2h では HL-60 ≒ HP100 であったが、4h, 24h では HL-60 < HP100 であった。また、ミトコンドリア膜電位の変化は、2h, 4h 共に HL-60 > HP100 であった。CA による DNA ラダー形成、Caspase-3/7 活性上昇が見られたことから、CA による細胞死はアポトーシスであることが示唆された。CA による細胞生存率、ミトコンドリア膜電位の変化における HL-60 と HP100 との差異は、HP100 が HL-60 由来のカタラーゼ過発現株であることから、CA による細胞死には ROS が関わっていると考えられた。さらに CA がアポトーシスを誘導することは、CA 誘導体が抗がん剤のリード化合物に成り得ることを示唆している。

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] (計 7 件)

- ① Morita A, Soga K, Nakayama H, Ishida T, Kawanishi S, Sato EF. Neuronal differentiation of human iPS cells induced by baicalin via regulation of bHLH gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 465(3):458-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.039. 査読あり
 - ② Ohnishi S, Murata M, Ida N, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by metabolites of chloramphenicol, an antibiotic drug. *Free Radic Res*. 2015;49(9):1165-72. doi: 10.3109/10715762.2015.1050963. 査読あり
 - ③ Muto T, Usuda H, Yamamura A, Yoshida K, Ohashi A, Mitsui-Saitoh K, Sakai J, Sugimoto Y, Mizutani H, Nonogaki T, Hotta Y. Protective effects of fluvoxamine against ischemia/reperfusion injury in isolated, perfused guinea-pig hearts. *Biol Pharm Bull*. 2014; 37(5):731-9. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/37/5/37_b13-00552/_article 査読あり
 - ④ Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*. 2014; 16(1):193-217. doi: 10.3390/ijms16010193. 査読あり
 - ⑤ Hiraku Y, Goto H, Kohno M, Kawanishi S, Murata M. Metal-mediated oxidative DNA damage induced by methylene blue. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(9): 2776-82. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.04.020. 査読あり
 - ⑥ Murata M, Midorikawa K, Kawanishi S. Oxidative DNA damage and mammary cell proliferation by alcohol-derived salsolinol. *Chem Res Toxicol*. 2013; 26(10):1455-63. doi: 10.1021/tx400182n. 査読あり
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 大西志保、水谷秀樹、川西正祐、糖尿病治療薬による酸化的 DNA 損傷増強効果、日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26-29 日、神奈川県横浜市)
 - ② 水谷秀樹、高木麻衣、岩崎由華、松浦史佳、神波菖乃、平工雄介、川西正祐、抗酸化物質カルノシン酸による酸化的 DNA 損傷とアポトーシス、日本酸化ストレス学会東海支部・第 4 回学術集会 (2016 年 2 月 6 日、三重県鈴鹿市)
 - ③ 大西志保、水谷秀樹、川西正祐、ビッグアニド化合物による酸化的 DNA 損傷増強とラジカル生成、日本酸化ストレス学会東海支部・第 4 回学術集会 (2016 年 2 月 6 日、三重県鈴鹿市)
 - ④ 水谷秀樹、高木麻衣、岩崎由華、神波菖乃、平工雄介、川西正祐、抗酸化物質カルノシン酸による細胞死の解析、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 2015 (2015 年 11 月 1 日、愛知県名古屋市)
 - ⑤ 大西浩之、稲山里美、宮澤大介、山田和代、水谷秀樹、大原直樹、がん細胞・マクロファージ間相互作用における c-Met とマンノース受容体の機能解析、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 2015 (2015 年 11 月 1 日、愛知県名古屋市)
 - ⑥ Shiho Ohnishi, Hideki Mizutani, Shosuke Kawanishi, The suppression of oxidative DNA damage by antidiabetic buformin in relation to anti-cancer effect. 第 74 回日本癌学会学術総会 (2015 年 10 月 8 日-10 月 10 日、愛知県名古屋市)
 - ⑦ 水谷秀樹、神波菖乃、平工雄介、川西正祐、抗酸化物質カルノシン酸による酸化的 DNA 損傷と細胞毒性、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2015 年 6 月 11, 12 日、鹿児島県鹿児島市)
 - ⑧ 水谷秀樹、神波菖乃、平工雄介、川西正祐、抗酸化物質カルノシン酸による酸化的 DNA 損傷、日本薬学会第 135 年会 (2015 年 3 月 26-28 日、兵庫県神戸市)
 - ⑨ 水谷秀樹、堀田沙希、西本彩乃、平工雄介、川西正祐、アントラサイクリン系抗がん剤ピラルビシンによる DNA 損傷とアポトーシス誘導機構、第 67 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15~18 日、京都府京都市)

- ⑩ 大西浩之、小島亜衣梨、宮澤大介、山田和代、大原直樹、水谷秀樹、岡清正、水野信哉、中村敏一、HGFβ 鎖/マンノース受容体系がマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響、第 67 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15~18 日、京都府京都市)
- ⑪ 水谷秀樹、荻須菜美、平工雄介、古川忠志、高谷芳明、丹羽正武、齊藤久美子、堀田芳弘、川西正祐、環状ジペプチド(ジケトピペラジン) の酸化的 DNA 損傷抑制作用、第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2014 年 9 月 4, 5 日、京都府京都市)
- ⑫ 奥村典子、白井美皓、浅田あゆ美、水谷秀樹、宇野文二、酸化的 ROS 生成に関する電気化学的考察、第 38 回有機電子移動化学討論会 (2014 年 6 月 26, 27 日、岐阜県岐阜市)
- ⑬ Hideki Mizutani, Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi, Generation of hydrogen peroxide is critical apoptotic trigger of Mitomycin C, 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 3 日-10 月 5 日、神奈川県横浜市)
- ⑭ 池村健治、山本弥里、宮崎さおり、水谷秀樹、岩本卓也、奥田真弘、miR-145 による小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の転写後発現調節機構、第 59 回 (平成 25 年度) 日本薬学会東海支部大会 (2013 年 7 月 6 日、愛知県名古屋市)

[図書] (計 3 件)

- ① 水谷秀樹, 貧血, 播種性血管内凝固症候群 (DIC) 「薬物治療学改訂 4 版」、吉尾隆、鍋島俊隆 他編、南山堂, 貧血: p92~p101、DIC: p110~p114、(2015).
- ② 水谷秀樹, 貧血, 播種性血管内凝固症候群 (DIC) 「薬物治療学改訂 3 版」、吉尾隆、鍋島俊隆 他編、南山堂, 貧血: p97~p106、DIC: p115~p119、(2014).
- ③ 水谷秀樹, 貧血, 播種性血管内凝固症候群 (DIC) 「薬物治療学改訂 2 版」、吉尾隆、鍋島俊隆 他編、南山堂, 貧血: p99~p108、DIC: p117~p121、(2013).

[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/index.php/search/top>

6. 研究組織

(1)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

(2)連携研究者

平工 雄介 (HIRAKU, Yusuke)
 三重大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号: 30324510

川西 正祐 (KAWANISHI, Shosuke)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
 研究者番号: 10025637