

## フリーラジカルを介したアドリアマイシンの心臓毒性発現機構に関する研究

村岡早苗,\* 三浦俊明

## Free Radicals Mediate Cardiac Toxicity Induced by Adriamycin

Sanae MURAOKA\* and Toshiaki MIURA

Hokkaido College of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru 047-0264, Japan

(Received May 13, 2003; Accepted July 24, 2003; published online July 28, 2003)

Anthracycline antibiotics, including adriamycin (ADM), are widely used to treat various human cancers, but their clinical use has been limited because of their cardiotoxicity. ADM is especially toxic to heart tissue. The mechanisms responsible for the cardiotoxic effect of ADM have been very/extremely controversial. This review focuses on the participation of free radicals generated by ADM in the cardiotoxic effect. ADM is reduced to a semiquinone radical species by microsomal NADPH-P450 reductase and mitochondrial NADH dehydrogenase. In the presence of oxygen, the reductive semiquinone radical species produces superoxide and hydroxyl radicals. Generally, lipid peroxidation proceeds by mediating the redox of iron. ADM extracts iron from ferritin to form ADM-Fe<sup>3+</sup>, which causes lipid peroxidation of membranes. These events may lead to disturbance of the membrane structure and dysfunction of mitochondria. However, superoxide dismutase and hydroxyl radical scavengers have little effect on lipid peroxidation induced by ADM-Fe<sup>3+</sup>. Alternatively, ADM is oxidatively activated by peroxidases to convert to an oxidative semiquinone radical, which participates in inactivation of mitochondrial enzymes or including succinate dehydrogenase and creatine kinase. Here, we discuss the activation of ADM and the role of reductive and oxidative ADM semiquinone radicals in the cardiotoxic effect of this antibiotic.

**Key words**—adriamycin; anthracycline; free radical; lipid peroxidation; mitochondrial enzyme

## 1. はじめに

アドリアマイシン (ADM) はアントラサイクリン系抗腫瘍薬の代表的薬剤として 1960 年代から臨床に広く使用されてきた抗腫瘍性薬剤の 1 つである。ADM の抗腫瘍スペクトルは広く、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、急性白血病などの造血器腫瘍のみならず、乳ガン、卵巣ガン、小児悪性腫瘍などに及んでいる。<sup>1)</sup>しかしながら、アントラサイクリン系抗腫瘍薬は強い心臓毒性を有しており、中でも ADM は投与量に依存した心筋の障害を引き起こし、重篤なうっ血性の心不全を発症させるため、使用頻度は厳しく制限されている。<sup>2,3)</sup>

アントラサイクリン系抗腫瘍薬はいずれも鉄と錯体を作り、<sup>4-6)</sup>作用機構は類似していると思われるが、その抗腫瘍スペクトルには大きな違いが見られる。例えば、ダウノマイシンと ADM はアグリコ

ンクロモフォアと呼ばれる 4 つの環とアミノ糖を持ち、DNA や RNA 合成を同程度阻害する。両者の違いは 14 位の水酸基の有無だけであるにもかかわらず、ダウノマイシンは白血病に対する有効な化学療法剤であるのに対し、ADM の抗腫瘍スペクトルは上述したように広く、造血器腫瘍のみならず、乳ガンや卵巣ガンなどに対しても有効な化学療法剤として用いられている。<sup>7)</sup>この 14 位の水酸基は、2 つの水分子を介して DNA のリン酸の酸素分子と水素結合をしている。ADM やダウノマイシンの DNA との直接作用はほとんど同じであるが、これらの複合体間の構造的な差異は、複合体を取り囲む水分子の水素結合ネットワークにある。スベルミン分子と DNA の相互作用が ADM 複合体とダウノマイシン複合体の間で異なることから、14 位水酸基によって引き起こされる水分子-DNA の相互作用の違いが、抗腫瘍スペクトルに反映されていると考えられている (Fig. 1)。<sup>4)</sup>

アントラサイクリン系抗腫瘍薬の分子はほぼ平面

北海道薬科大学生物科学研究室 (〒047-0264 小樽市桂岡町 7-1)

e-mail: muraokas@hokuyakudai.ac.jp

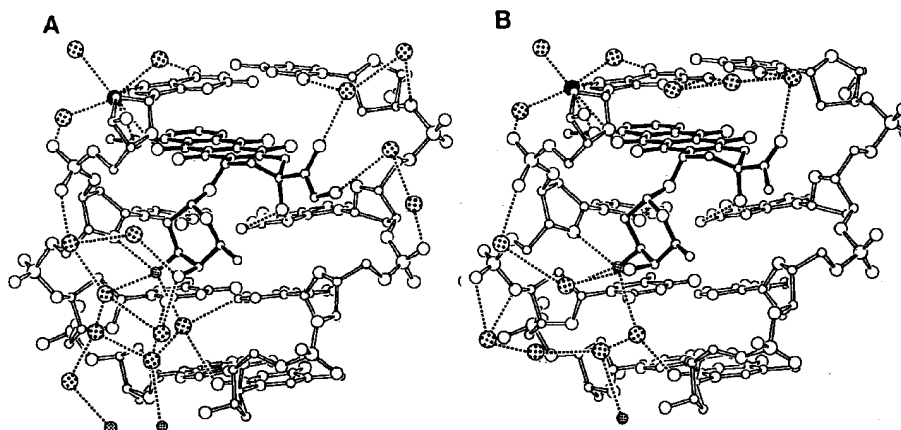


Fig. 1. Stereoview of the Hydrogen-bonding Interactions between ADM (A) or Daunomycin (B) and DNA Fragment d (CGATCG)<sup>4)</sup>

—: Drug    —: DNA    - - - - -: Hydrogen bond    ⊕: H<sub>2</sub>O    ○: O    ⊙: C    ⊗: N

構造をしていることから、ADMの抗腫瘍作用は、隣接する核酸塩基対間へのADM分子のインタカレーションを始めとしたDNAとの相互作用に基づくと考えられている (Fig. 1)。DNAとADMの複合体ではADMがGC塩基対間にインタカレートしており、インタカレーション部位の両側においてDNAの構造変化が起こる。GCサイトにおいてADMが結合すると、ヘリカーゼによるDNA巻き戻しが阻止されること、<sup>8)</sup>あるいはADMがトポイソメラーゼIIを阻害するため、<sup>9,10)</sup>酵素によるDNA鎖の切断-再結合ができなくなることによって、細胞の複製に支障を来して抗腫瘍性が発現されると考えられている。

一方、ADMの心臓毒性発現機構として、カルジオリピンとの相互作用があげられる。心臓に存在するリン脂質の中でカルジオリピンは25%もの含有率を示し、この負に帯電したリン脂質は特にミトコンドリア内膜に多量に存在している。カルジオリピンはADMと強く結合して2:1の複合体を形成し、結合定数は $K=1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と大きく、この値はADMのDNAに対する結合定数 $K=2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ に匹敵する。<sup>11,12)</sup> その他の酸性リン脂質であるホスファチジン酸やホスファチジルセリンに対してもADMは1:1の複合体を形成するが、これらのリン脂質との結合定数は $K=1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ と2桁ばかり小さく、またホスファチジルコリンのような中性脂質とは結合しない。カルジオリピンとの複合体形成には、ADMの糖鎖中の正電荷とリン脂質中の負電荷との間で、静電的な相互作用が重要な役割

を果たしている。カルジオリピンはミトコンドリアの酸化基質の移動に何らかの役割を果たしていると考えられており、カルジオリピンとADMとの結合は電子伝達系を不活性化する。ミトコンドリア酵素であるcomplex I (NADデヒドロゲナーゼ)、complex III (シトクロームcリダクターゼ)、complex IV (シトクロームオキシダーゼ)が最大速度となるためにはカルジオリピンを必要とするが、ADMとカルジオリピンとの結合が、これらの酵素活性を抑制してしまう。<sup>13)</sup>

ADMによる心臓毒性機構のもう1つの可能性としては、ADMの酸化還元に伴って生成するフリーラジカルあるいは酸素ラジカルの関与する組織障害が考えられる。本稿において、この可能性について筆者らの研究を中心に述べる。<sup>14-23)</sup>

## 2. 生体膜の脂質過酸化

ADMはミトコンドリアのcomplex I (NADHデヒドロゲナーゼ)やミクロソームのNADPHシトクロームP450リダクターゼによって1電子還元され、セミキノンラジカルとなる。<sup>24,25)</sup> 引き続いてこのセミキノンが酸素と反応してスーパーオキシド( $\text{O}_2^-$ )が生成される (Fig. 2)。 $\text{O}_2^-$ は種々の生体物質を酸化して、代謝変調を誘発すると考えられる。しかしながら、 $\text{O}_2^-$ が不飽和脂肪酸から直接電子を引き抜いて脂質過酸化を惹起することはなく、多くの脂質過酸化反応を始めとした酸化障害には、微量の遷移金属として特に鉄を必要とすることが多い。一方、ADMは強力な鉄のキレート剤でもある。赤血球膜を用いてADM- $\text{Fe}^{3+}$ によって引き起

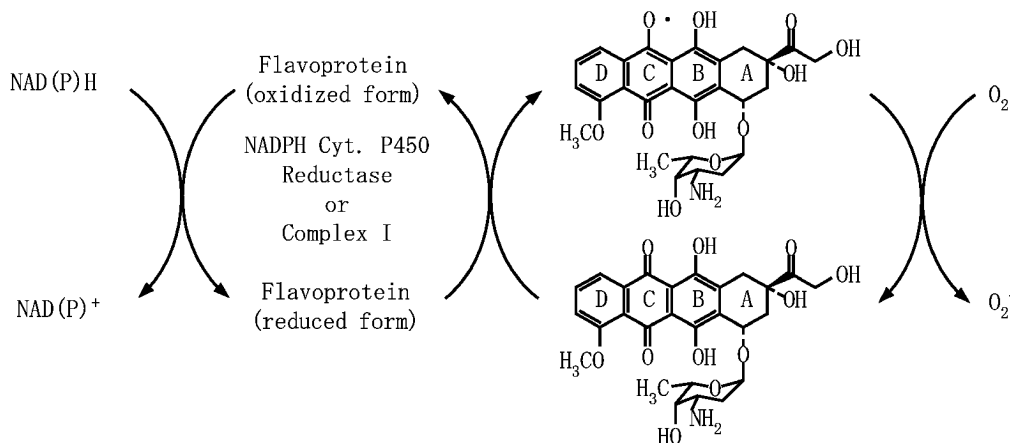
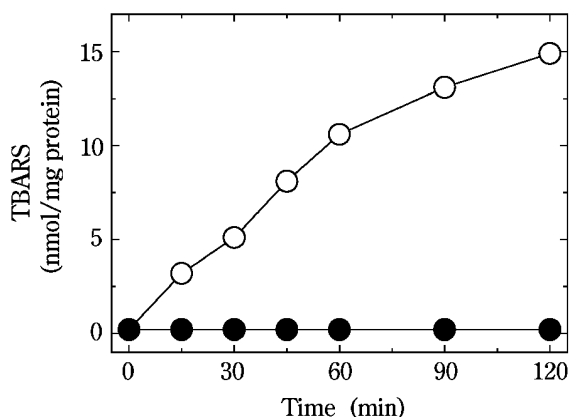


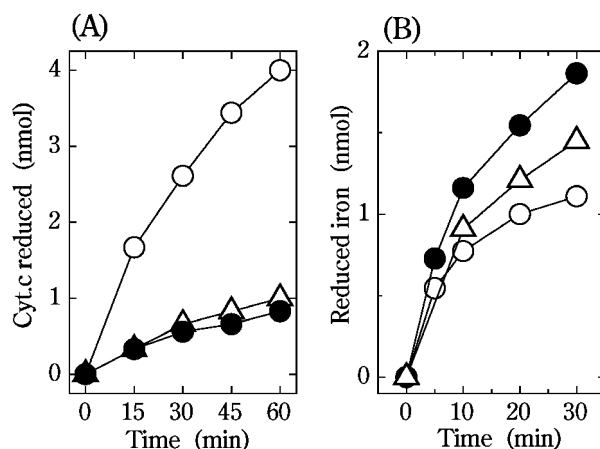
Fig. 2. Redox of C-ring in ADM

Fig. 3. Lipid Peroxidation of Erythrocyte Membranes Induced by ADM-Fe<sup>3+</sup>

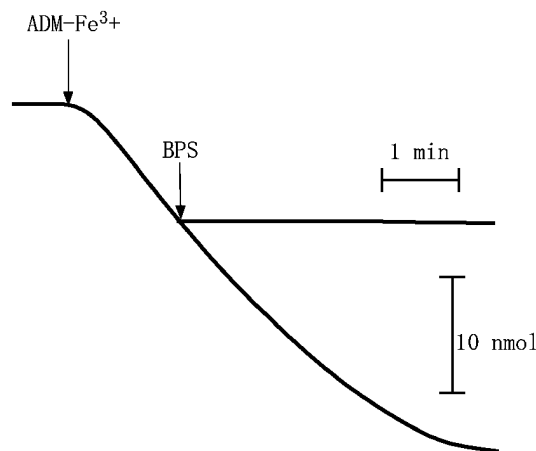
Reaction mixtures contained erythrocyte membranes (0.2 mg/protein/ml) and ADM-Fe<sup>3+</sup> (0.1 mM ADM: 0.05 mM Fe<sup>3+</sup>) (○) or 0.1 mM of ADM (●) in 0.15 M NaCl at pH 7.4. Each point represents the mean of three experiments.

こされる脂質過酸化の機構について調べると、ADM-Fe<sup>3+</sup> は濃度に依存して赤血球膜の脂質過酸化を惹起した (Fig. 3).<sup>23)</sup>

好氣的条件下、ADM-Fe<sup>3+</sup> は cytochrome *c* (Cyt. *c*) を還元し、superoxide dismutase (SOD) は Cyt. *c* の還元を強く抑制した (Fig. 4).<sup>23)</sup> また Fe<sup>2+</sup> のキレート剤であるバソフェナンスロリン-2-硫酸 (BPS) は、ADM-Fe<sup>3+</sup> によって誘導された酸素吸収を完全に抑制した (Fig. 5).<sup>23)</sup> これらのことから、O<sub>2</sub><sup>-</sup> は Fig. 6 に示すように ADM-Fe<sup>3+</sup> の自発的な酸化還元を介して発生しているものと考えた。しかしながら、カタラーゼ (Cat) にはわずかな脂質過酸化の抑制が認められるものの、SOD やヒドロキシルラジカル (HO<sup>-</sup>) スカベンジャーは脂質過酸化に対してほとんど抑制効果を示さず (Fig. 7),<sup>20,23)</sup>

Fig. 4. Reduction of Cytochrome *c* Induced by ADM-Fe<sup>3+</sup> (A) and Ferrous Ion Formation (B)

(A) The reaction mixture contained 0.03 mM ferricytochrome *c* and 0.1 mM ADM-Fe<sup>3+</sup> in 0.15 M NaCl at pH 7.4. (B) The reaction mixture contained 0.1 mM BPS and ADM-Fe<sup>3+</sup> in 0.15 M NaCl at pH 7.5. (○) under aerobic conditions, (△) addition of SOD (3 × 10<sup>-3</sup> mM) under aerobic conditions, (●) under anaerobic conditions.

Fig. 5. Oxygen Consumption Induced by ADM-Fe<sup>3+</sup>

The reaction mixture contained 0.1 mM ADM-Fe<sup>3+</sup> in 0.15 M NaCl at pH 7.4. Arrow indicates the addition of 1.0 mM BPS.

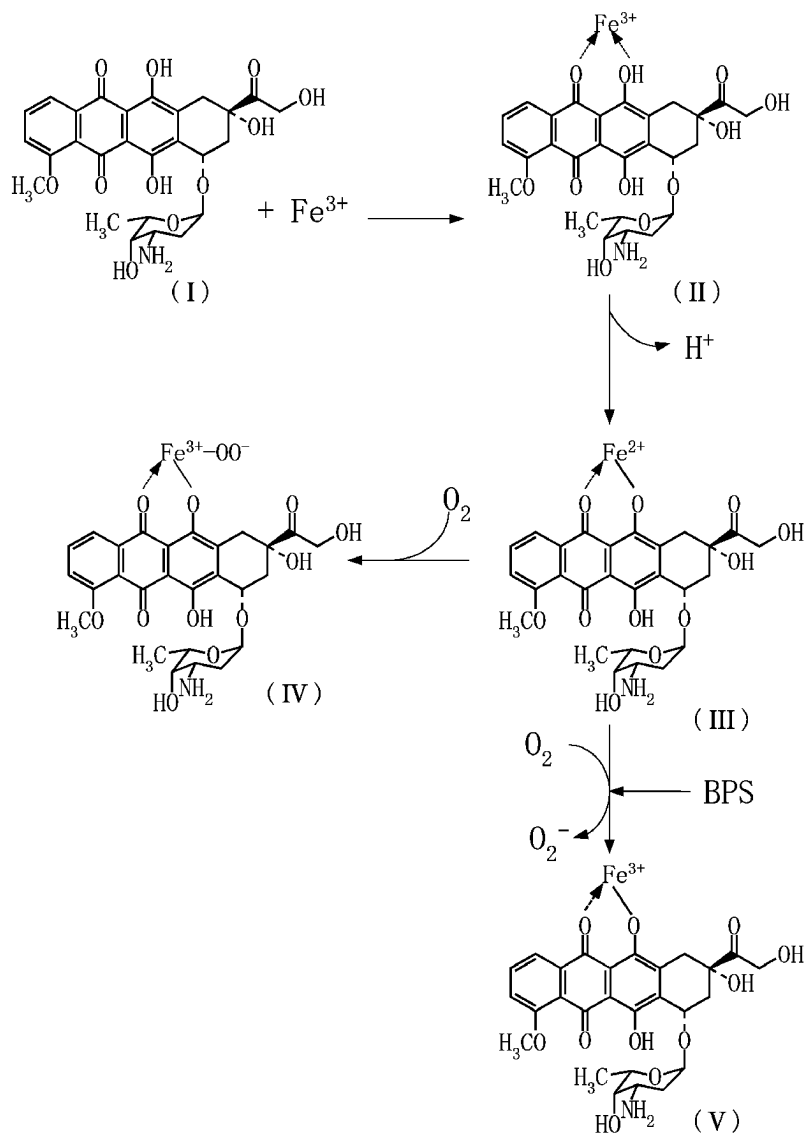


Fig. 6. Generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> from ADM-Fe<sup>3+</sup>

これらのことは、O<sub>2</sub><sup>-</sup>やHO<sup>-</sup>が、膜脂質過酸化に関与していないことを示すものであった。

脂質過酸化の反応速度はADM-Fe<sup>3+</sup>/ADM-Fe<sup>2+</sup>の比に依存しており、1:1の時に最大となった(Fig. 8).<sup>18)</sup> これらのことより、ADM-Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub>-ADM-Fe<sup>2+</sup>で表されるフェリル(Fe(IV)=O)又はパーフェリルイオン(Fe(V)=O)が膜を構成している不飽和脂肪酸から電子を引き抜くことにより脂質過酸化を惹起していると考えた。これらの鉄イオンはFig. 6において示した(III)にさらに酸素が付加して生成されていると思われる。

ADMとフェリチンを赤血球膜と共にインキュベートすると、フェリチンからは鉄が遊出し(Fig.

9),<sup>21)</sup> 脂質過酸化が惹起された(Fig. 10).<sup>21)</sup> フェリチンからの鉄の遊出にはコア中の鉄が還元される必要がある。ADMはフェリチンコア中で鉄と結合してFig. 6に示す機構で還元して鉄を遊出させて脂質過酸化を引き起こしているものと考えられる。

### 3. 膜たん白質と脂質過酸化

ADMによる心臓毒性の発現は、ミトコンドリアの酸化的障害に依存していることを示す報告も多い。<sup>26-33)</sup> DemantとJansen<sup>29)</sup>は代表的なミトコンドリア電子伝達系酵素であるシトクロームオキシダーゼとNADHオキシダーゼが、ADMによって不活性化されることを報告している。その機構としてFig. 2に示したように、ミトコンドリア complex

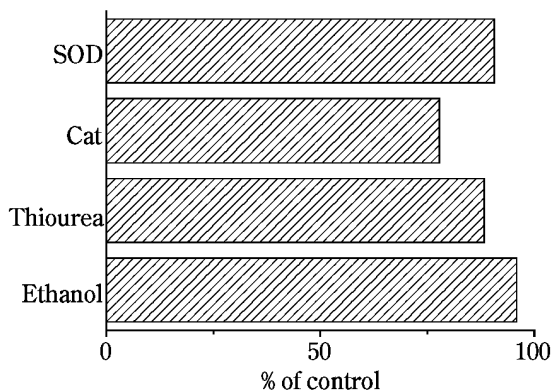


Fig. 7. Effect of Scavengers of Reactive Oxygen Radicals on Lipid Peroxidation

Conditions were the same as described for Fig. 3, except for adding scavengers. Each value represents the mean of three experiments. SOD:  $3 \times 10^{-3}$  mM, Cat:  $4 \times 10^{-3}$  mM and Thiourea, Ethanol: 10 mM.

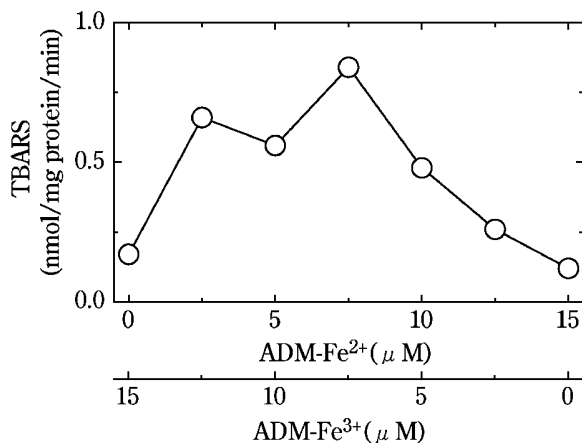


Fig. 8. Effect of ADM-Fe<sup>2+</sup>/ADM-Fe<sup>3+</sup> Ratio on the Peroxidation Reaction

The reaction mixture contained erythrocyte membranes (0.2 mg protein/ml) and various ratio of ADM-Fe<sup>2+</sup>/ADM-Fe<sup>3+</sup>. After incubation for 3 min, TBARS formation was measured. Each point represents the mean of three experiments.

Iによって還元されたADMが還元型(C環)ADMセミキノンラジカルとなり、酸素との相互作用を経て生成した種々の酸素ラジカルが、ミトコンドリア膜を障害して、膜酵素の不活性化が発現してくると考えられている。<sup>26-31,35-41</sup>ミトコンドリアのクレアチンキナーゼ(CK)はミトコンドリア内膜に存在し、エネルギー代謝において重要な役割を果たしている。<sup>39</sup>したがって、ミトコンドリアCKの不活性化はエネルギー代謝を低下させ、重大な機能不全を招来すると予想される。そこで、ミトコンドリアを用いて、ADM-Fe<sup>3+</sup>誘導脂質過酸化のミトコンドリアCKに対する影響について調べるとADM-Fe<sup>3+</sup>誘導の脂質過酸化に伴って、ラット心

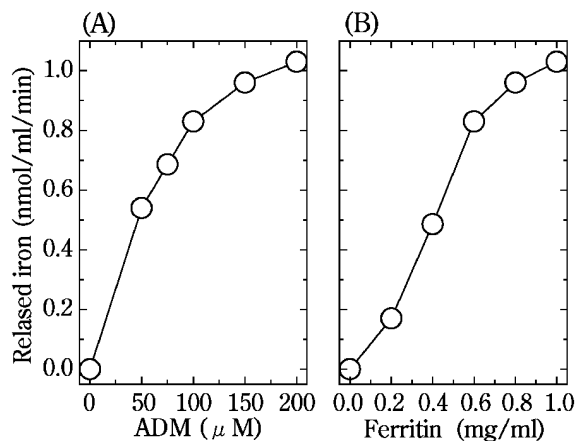


Fig. 9. Iron Release from Ferritin by ADM

The reaction mixture contained 1.0 mM BPS and ADM or ferritin in 0.15 M NaCl at pH 7.4. In (A) and (B), 1.0 mg/ml of ferritin and 100 μM of ADM was presented, respectively. Each point represents the mean of three experiments.

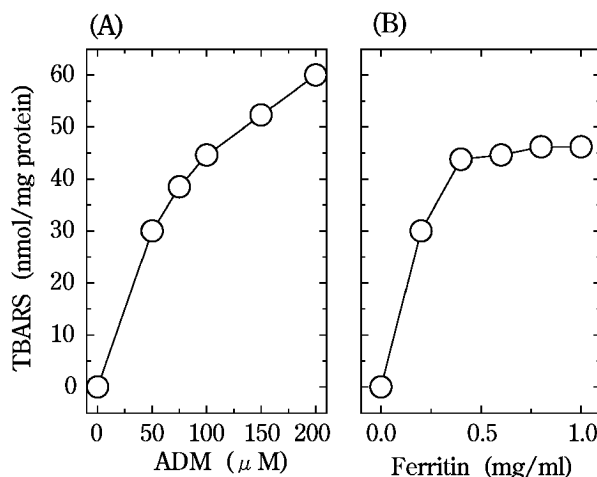


Fig. 10. Effect of ADM (A) and Ferritin (B) Concentration on Lipid Peroxidation

The reaction mixture contained erythrocyte membranes (0.2 mg protein/ml) in 0.15 M NaCl at pH 7.4. After incubation for 1 hr, the TBARS were measured. Each point represents the mean of three experiments.

臓ミトコンドリアCKの不活性化が起こることがわかった (Fig. 11).<sup>19)</sup>

SOD, Cat 及び HO- スカベンジャーは ADM-Fe<sup>3+</sup> 誘導の脂質過酸化及びCKの不活性化に影響を与えず、抗酸化剤である *tert*-butyl-hydroxytoluene (BHT) は、脂質過酸化だけでなくCKの不活性化も強く抑制した (Fig. 12).<sup>19)</sup> このことは、O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), HO- がこれら反応に関係しているのではなく、脂質過酸化物あるいは lipid-derived radicals が、ミトコンドリアCKを不活性化していることを示していた。GSHは、脂質過酸化を抑制することなくCKの不活性化を防御し

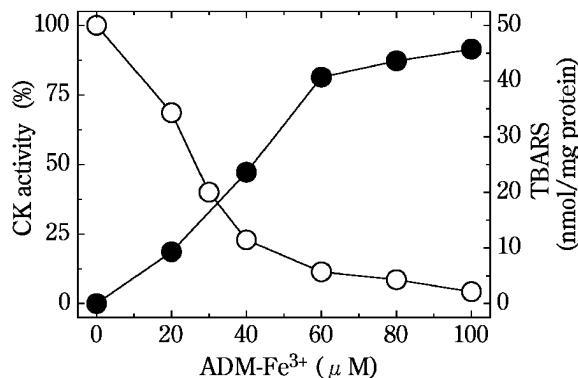


Fig. 11. Effect of ADM-Fe<sup>3+</sup> Concentration on CK Activity and Lipid Peroxidation

Mitochondria (0.1 mg protein/ml) were incubated with ADM-Fe<sup>3+</sup> in 10 mM Hepes buffer at pH 7.4, containing 0.15 M NaCl. After exposure for 2 hr, CK activity and lipid peroxidation were measured. (○): CK activity and (●): TBARS formation.

たので (Fig. 12), 脂質過酸化の過程で生成した過酸化物質又は, lipid-derived radicals が酵素の SH 基を酸化し, 酵素の不活性化が招来されたものと考えられる。

ADM-Fe<sup>3+</sup> とインキュベートしたミトコンドリアの SDS-PAGE (ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動) において, 30 kilo dalton (KDa) のたん白質の消失と, 原点付近に新たなバンドの生成が認められた (Fig. 13).<sup>16)</sup> BHT, トロロックス, α-トコフェロールは, 30 KDa たん白質の消失及び原点付近に認められたバンドの生成を強く阻止したので, 脂質過酸化がミトコンドリアたん白質の酸化変性を惹起したものと考えた。

Nakabayashi ら<sup>42)</sup> も, NADPH に依存したミトコンドリアの脂質過酸化に伴って 30 KDa のミトコンドリアたん白質がゲル上から消失することを示している。しかしながら, CK は分子質量が 170 KDa の 2 量体たん白質であるので, ここで観察された 30 KDa のたん白質は CK に相当していない。

#### 4. ペルオキシダーゼによって活性化された ADM による CK の不活性化

Kolodziejczyk ら<sup>43)</sup> は, アントラサイクリン系抗腫瘍薬のキノン類似薬物である 5-イミノダウノマイシンが西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) により, 容易に酸化, 活性化されて 5-イミノキノンラジカルとなることを示した。このことはペルオキシダーゼが ADM 毒性発現に寄与している可能性を示すものであり, 心臓における ADM の代謝を考える際には極めて重要なことと考えられ

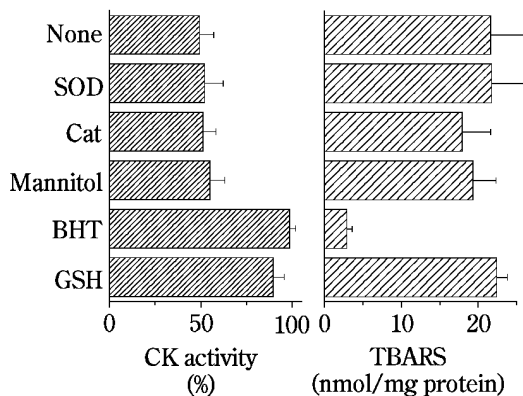


Fig. 12. Effect of Radical Scavengers on ADM-Fe<sup>3+</sup>-induced CK Inactivation and Lipid Peroxidation

Conditions were the same as described for Fig. 11, except for adding scavengers. After incubation for 1 hr, CK activity and lipid peroxidation were measured. Each value represents the mean ± SD of four experiments. SOD:  $3 \times 10^{-4}$  mM, Cat:  $4 \times 10^{-4}$  mM, Mannitol: 10 mM, BHT: 1 μM and GSH: 100 μM.

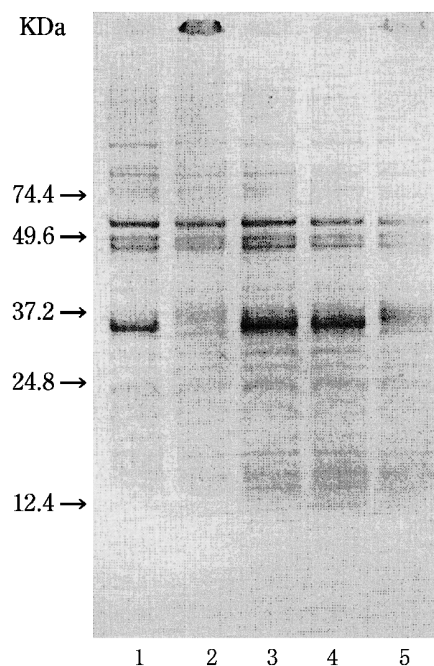


Fig. 13. SDS-PAGE Analysis of Mitochondrial Protein after Incubation with ADM-Fe<sup>3+</sup>

Conditions were the same as described for Fig. 11. After incubation with ADM-Fe<sup>3+</sup> for 2 hr at 37°C, mitochondria were denatured with 10% TCA and centrifuged. The resultant precipitate was solubilized in SDS and applied to PAGE. Lane 1: native mitochondria, lane 2: +ADM-Fe<sup>3+</sup>, lane 3: 2+BHT, lane 4: 2+Trolox and lane 5: 2+α-tocopherol.

る。なぜならば, 心筋中には大量のミオグロビンが含まれており, ミオグロビンは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応してフェリルミオグロビンとなり, このフェリルミオグロビンがペルオキシダーゼ活性を持っているからである。<sup>44,45)</sup> 一方, CK は種々の酸化的ストレスに対す

る感受性が高く、<sup>46-49)</sup> また心臓組織に大量に存在するところから、<sup>50)</sup> ADMの心臓毒性発現の指標になると考えられる。そこでHRPとADMとの反応過程でウサギ骨格筋のCK活性が消失する機構について調べた。

ADMがHRPで酸化される過程で、ADMの深赤色溶液の退色とともに (Fig. 14),<sup>15)</sup> CK活性の著しい低下が起こることが観察された (Fig. 15).<sup>15)</sup> CKの不活性化は嫌気的な条件下においても同様に起こってくるため、この過程には酸素は関与していないものと考えられる。HRPによってADM(I)のB環が酸化されてB環ADMセミキノラジカル(II)となり、さらに酸化されてB環ADMキノン(III)若しくはB環ADMキノンエポキシド(IV)が生成していると考えた (Fig. 16).<sup>15)</sup> ADM

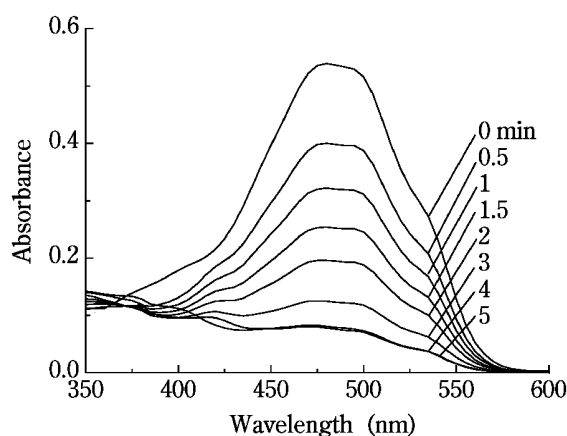


Fig. 14. Spectral Change of ADM Induced by HRP

The reaction mixture contained ADM (50.0  $\mu\text{M}$ ), HRP (1.25  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ). In 10 mM Hepes buffer containing 0.15 M NaCl at pH 7.4. Numbers in the figure refer to the incubation time (min). After incubating, the spectrum of ADM was recorded.

とHRPの反応後においてもCKの不活性化が起きてきたので (Fig. 17),<sup>15)</sup> CKの不活性化を引き起こしている分子種はB環ADMセミキノンよりはむしろB環ADMキノン又はB環ADMキノンエポキシドであると思われる。活性中心のSH基がB環ADMキノン又はB環ADMキノンエポキシドによって酸化され、酵素活性の不活性化が引き起こされたと考えられる。

### 5. アントラサイクリン系抗腫瘍薬によるミトコンドリア酵素の不活性化

Demant と Jansen,<sup>29)</sup> Davies と Doroshow,<sup>36)</sup> Marcillat ら<sup>51)</sup> はADMの細胞内の標的器官がミトコンドリアであると考え、電子伝達系酵素がADMによって不活性化することを示した。特にDavies

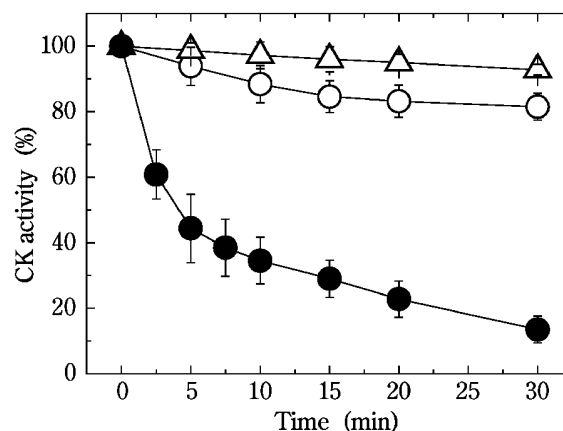


Fig. 15. Inactivation of CK Induced by ADM with HRP

Conditions were the same as described for Fig. 14, except for addition of ADM (10  $\mu\text{M}$ ). After incubating at 37°C, an aliquot of the reaction mixture was removed and then the activity of CK was measured. Each point represents the mean  $\pm$  SD of five experiments. (○): ADM not added, (●): ADM added and (△): without HRP and  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

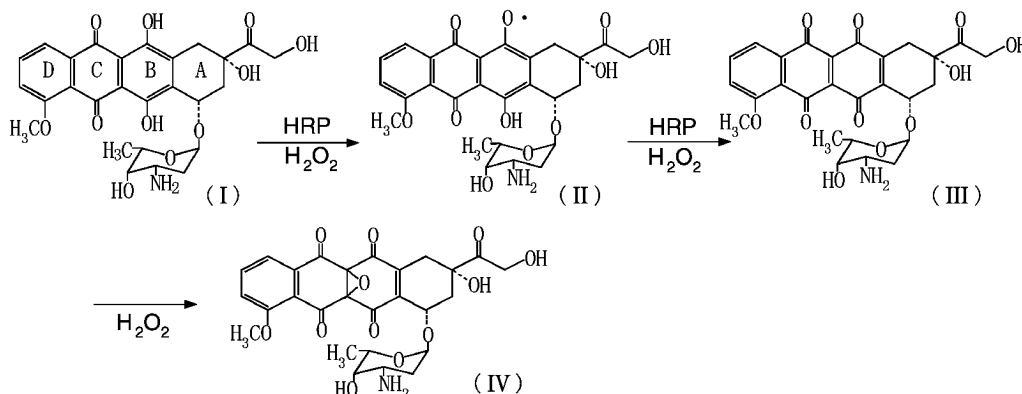


Fig. 16. Oxidation of ADM by HRP

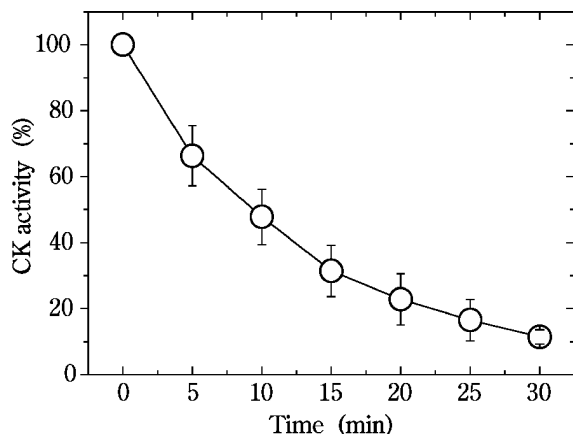


Fig. 17. CK Inactivation Induced by a Colorless Compound from ADM

Conditions were the same as described for Fig. 15, except for CK. After incubating for 5 min, catalase ( $0.04 \mu\text{M}$ ) was added to the reaction mixture and then CK ( $1.23 \mu\text{M}$ ) was added and the mixture was further incubated. Each point represents the mean  $\pm$  SD of five experiments.

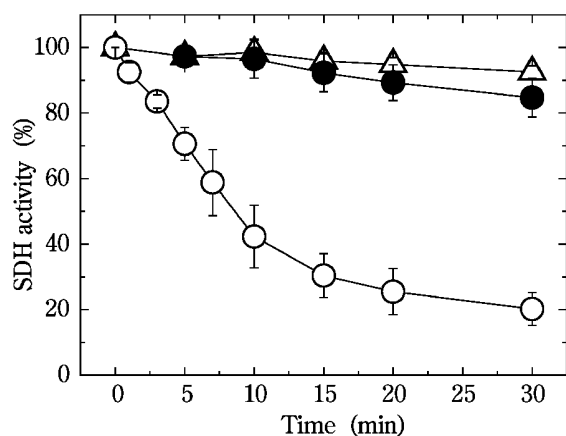


Fig. 18. Loss of Mitochondrial SDH Activity Induced by ADM Activated by HRP

Submitochondrial particles ( $0.1 \text{ mg protein/ml}$ ) were incubated with  $10 \mu\text{M}$  ADM,  $0.12 \mu\text{M}$  HRP,  $100 \mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in  $50 \text{ mM}$  Hepes buffer at pH 7.4. After the incubation at  $37^\circ\text{C}$ , an aliquot of the reaction mixture was used for measurement of SDH activity. Each point represents the mean  $\pm$  SD of five experiments. (○): ADM, (●): without ADM and (△): ADM without HRP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

と Doroshow<sup>36)</sup>あるいは Marcillat ら<sup>51)</sup>は、ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase, SDH) が ADM に対して感受性を有することを示した。ミトコンドリアの損傷は重大なエネルギー代謝の障害をもたらす、筋収縮の抑制を招来すると考えられる。しかしながら、彼らは SDH の不活性化を惹起するために数百  $\mu\text{M}$  という極めて大量の ADM を用いており、SDH 不活性化は活性酸素ではなく ADM の直接作用によって引き起こされると結論づけた。組織内、あるいは細胞

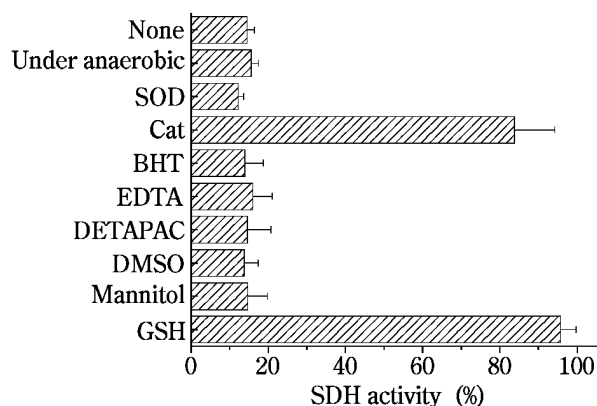


Fig. 19. Effect of Radical Scavengers and Iron-chelators on the SDH Inactivation

Conditions were the same as described for Fig. 18, except for adding radical scavengers and iron chelators. Each value represents the mean  $\pm$  SD of five experiments. SOD:  $3 \times 10^{-4} \text{ mM}$ , Cat:  $4 \times 10^{-4} \text{ mM}$ , BHT, EDTA, DETAPAC, GSH:  $0.1 \text{ mM}$  and Mannitol:  $10 \text{ mM}$ .

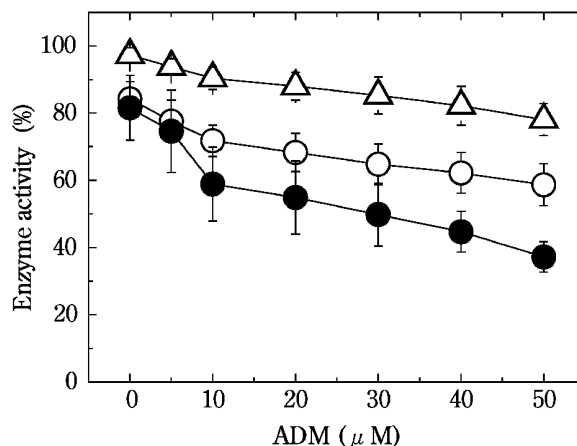


Fig. 20. Loss of Mitochondrial Respiratory Enzymes during the Interaction of ADM with HRP

Conditions were the same as described for Fig. 18, except for concentrations of ADM. (○): cytochrome c oxidase, (●): NADH oxidase and (△): NADH dehydrogenase.

内における ADM の濃度が数百  $\mu\text{M}$  に達するとは到底考えられない。これまでの実験を踏まえて筆者らは、HRP によって活性化された ADM を始めとしたアントラサイクリン系抗腫瘍薬がミトコンドリア電子伝達系酵素である SDH をどのように不活性化するかを調べた。

ADM-HRP は、ミトコンドリア電子伝達系酵素である SDH を速やかに不活性化した (Fig. 18)<sup>14)</sup> が、BHT、鉄キレート剤である ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC), SOD, HO-スカベンジ



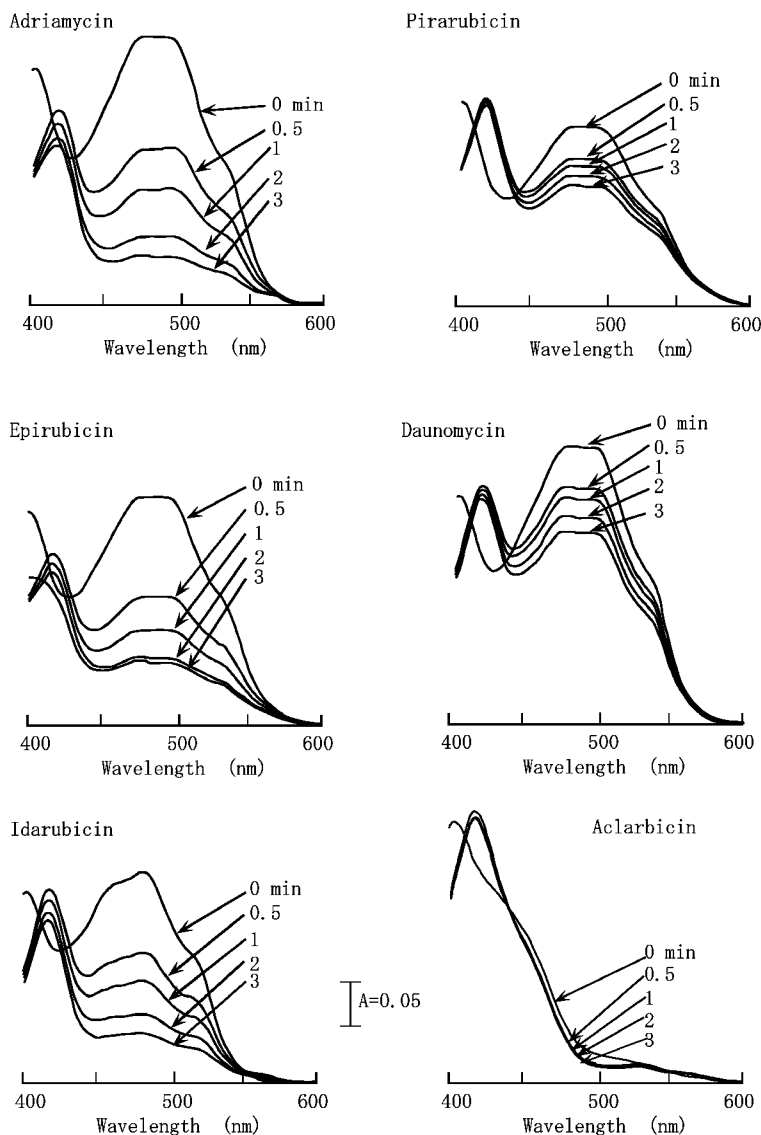


Fig. 21. Spectral Change in Anthracycline Drugs Induced by HRP

Conditions were the same as described for Fig. 18. Spectral changes were recorded during the interaction of anthracycline drugs with HRP. Number of curves refer to time (min) of incubation.

ヤーである dimethylsulfoxide (DMSO), マンニトールはこの SDH の不活性化を阻止せず (Fig. 19),<sup>14)</sup> また嫌氣的条件下においても, ADM-HRP は SDH を不活性化した. これらのことから, lipid-derived radicals, ADM-鉄-酸素複合体,  $O_2$ ,  $HO\cdot$  は SDH の不活性化には関与せず, 酸化的に活性化された ADM が, 直接酵素に作用して失活させたものと考えられる. 一方, GSH は強く SDH の不活性化を防御したので, HRP により活性化された ADM が SDH の SH 基を酸化して不活性化を引き起こしていると推定した.

NADH デヒドロゲナーゼ, NADH オキシダーゼ, シトクローム *c* オキシダーゼのミトコンドリア

電子伝達系酵素は ADM-HRP に対する感受性は SDH に比してずっと低いものであった (Fig. 20).<sup>14)</sup>

ADM は特に強い心臓毒性を有するために,<sup>52-54)</sup> 抗腫瘍性を減じることなく, 心臓毒性のみを軽減させるためにさまざまなアントラサイクリン系の抗腫瘍薬が開発されてきた. しかしながら, なぜその抗腫瘍薬が心臓毒性を軽減しているのかその機構については明らかではない.

ADM, エピルピシン, イダルピシン, ピラルピシン, ダウノマイシン, アクラルピシンのアントラサイクリン系抗腫瘍薬を HRP とインキュベートすると, アクラルピシンを除いて経時的に溶液の深赤

色は退色し (Fig. 21),<sup>14)</sup> SDH 及び CK は不活性化された (Fig. 22).<sup>14)</sup> Figure 23 の構造式に示すように, アクラルピシンを除いて, いずれのアントラサイクリン系抗腫瘍薬も B 環にヒドロキノン構造を有しており, B 環が酸化されて生成された B 環セミキノン, B 環キノン又は B 環キノンエポキシドによって酵素の不活性化が引き起こされていると考えられる. アクラルピシンは B 環がフェノールとなっているので HRP による効率的な酸化は認められず (Fig. 21),<sup>14)</sup> また SDH や CK の効率的な不活性化も観察されなかった (Fig. 22).<sup>14)</sup> このように SDH 及び CK の不活性化の強さとその溶液の深赤色の退色とはおおよそ一致しており, 心臓毒性発現には, ミトコンドリアの SDH や CK の不活性化が寄与しているものと考えられる.

従来 ADM の心臓毒性の原因とされてきた脂質過酸化あるいはミトコンドリア酵素の阻害は, 高い濃度の ADM を用いて示されており, ミトコンドリア電子伝達系構成成分の非酸化的障害には数百  $\mu\text{M}$  の ADM が必要である.<sup>51)</sup> ADM 毒性の主なターゲットであるミトコンドリア膜はカルジオリピンに対して ADM が強い親和性を有しているため, 特

に高い濃度の ADM を蓄積すると思われる.<sup>11,12)</sup> しかしながら, ADM を  $90 \text{ mg/m}^2$  投与して, 検出される血中の初期濃度は, おおよそ  $5 \mu\text{M}$  である.<sup>51)</sup> 本実験条件下において, SDH に対する ADM の  $\text{IC}_{50}$  は, 約  $0.8 \mu\text{M}$  であった.

アントラサイクリン系抗腫瘍薬は HRP によって ADM > エピルピシン > イダルピシン > ピラルピシン ≒ ダウノマイシン > アクラルピシンの順で酸化さ

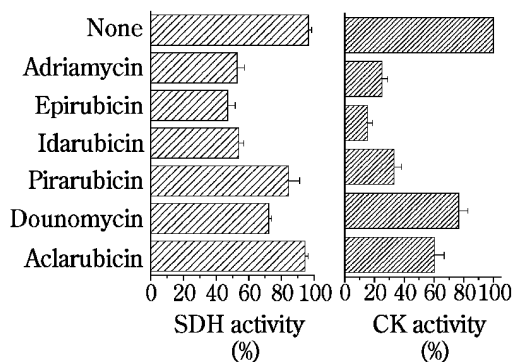


Fig. 22. Anthracycline Drugs-induced CK and SDH Inactivation during the Interaction with HRP

Conditions were the same as described for Fig. 18, except for replacement of ADM for anthracycline drugs. Submitochondrial particles contained  $11.3 \text{ u/mg}$  protein CK activities. Each value represents the mean  $\pm$  SD of five experiments.

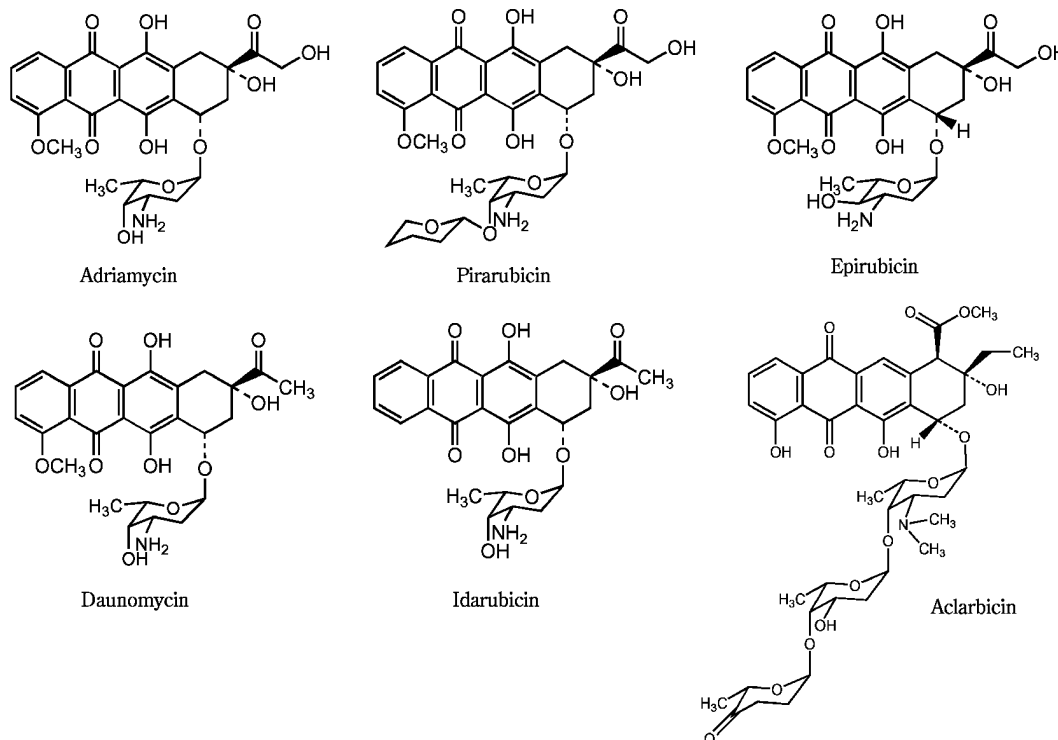


Fig. 23. Structure of Anthracycline Drugs

れ、ほぼ同じ順位でSDH又はCKを不活性化した。

Platelら<sup>52)</sup>は、ラットの心臓毒性にADMとイダルピシンを比較検討し、同様な毒性の症状がイダルピシン:ADM=1:4の割合で投与されたときに得られることを報告している。また、Hiranoら<sup>53)</sup>又はTemmaら<sup>54)</sup>はADM、エピルピシン、ピラルピシンの心臓毒性を心電図や組織病理学的検査によって調べたところ、ピラルピシンはADMとエピルピシンより弱いことを示した。これらの知見は、アントラサイクリン系抗腫瘍薬の心臓毒性とHRPによる酸化を介して観察される心臓ミトコンドリア酵素の不活性化がおおよそ一致することを示している。

Reszkaら<sup>57)</sup>は亜硝酸存在下で、ラクトペルオキシダーゼがダウノマイシンを速やかに酸化することを示している。その際ラクトペルオキシダーゼは亜硝酸をNOラジカルとし、それがダウノマイシンを酸化することを明らかにした。ペルオキシダーゼの基質特異性は低く、多くの薬物を酸化することが明らかとなっている。<sup>58-61)</sup>これらのことは、アントラサイクリン系抗腫瘍薬の心臓毒性は他の薬物の併用時に、増悪される可能性を示唆している。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は様々な生体反応で生成され、心筋中に大量に存在するミオグロビンはフェリルミオグロビンとなってペルオキシダーゼとして作用する可能性は極めて大きい。ADMはフェリルミオグロビンのペルオキシダーゼ活性によって酸化、活性化されて組織中のSH基を減少させ、CKやSDHを始めとしたミトコンドリア酵素の不活性化を惹起して、エネルギー代謝系の障害を招来し、心臓毒性が発現されると考えられる。

## 6. おわりに

生体内においてADMはフェリチンから鉄を引き抜いてADM-Fe<sup>3+</sup>となり細胞膜の脂質過酸化を惹起させる。一方、酸化的に活性化されたADMは直接ミトコンドリア膜酵素の不活性化を引き起こし、エネルギー代謝の変調を招来し、心臓毒性が発現してくるものと考えられる。

## REFERENCES

- 1) Ogura M., *Gan to Kagaku Ryoho*, **28**, 1331-1338 (2001).
- 2) Legha S. S., Benjamin R. S., Mackay B., Ewer M., Wallace S., Valdivieso M., Rasmussen S.

- L., Blumenschein G. R., Freireich E. J., *Ann. Intern. Med.*, **96**, 133-139 (1982).
- 3) Wakasugi S., *Nippon Rinsho*, **58**, 204-211 (2000).
- 4) Sugioka K., Nakano M., *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 333-343 (1982).
- 5) May P. M., Williams G. K., Williams D. R., *Eur. J. Cancer*, **16**, 1275-1276 (1980).
- 6) Eliot H., Gianni L., Myers C., *Biochemistry*, **23**, 928-936 (1984).
- 7) Cullinane C., Phillips D. R., *Biochemistry*, **29**, 5638-5646 (1990).
- 8) Simpkins H., Pearlman L. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **783**, 293-300 (1984).
- 9) Bachur N. R., Johnson R., Yu F., Hickey R., Applegren N., Malkas L., *Mol. Pharmacol.*, **44**, 1064-1069 (1993).
- 10) Bachur N. R., Yu F., Johnson R., Hickey R., Wu Y., Malkas L., *Mol. Pharmacol.*, **41**, 993-998 (1992).
- 11) Goormaghtigh E., Huart P., Praet M., Brasseur R., Ruyschaert J. M., *Biophys. Chem.*, **35**, 247-257 (1990).
- 12) Goormaghtigh E., Pollakis G., Ruyschaert J. M., *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 889-893 (1983).
- 13) Goormaghtigh E., Brasseur R., Ruyschaert J. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 314-320 (1982).
- 14) Muraoka S., Miura T., *Chem.-Biol. Interact.*, **145**, 67-75 (2003).
- 15) Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 95-99 (2000).
- 16) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 514-517 (1995).
- 17) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Res. Commun. Mol. Path. Pharm.*, **87**, 133-143 (1995).
- 18) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Pharmacol. Toxicol.*, **74**, 89-94 (1994).
- 19) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1220-1223 (1994).
- 20) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **79**, 75-85 (1993).
- 21) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 664-667 (1993).
- 22) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **71**, 115-124 (1991).

- 23) Miura T., Muraoka S., Ogiso T., *Pharmacol. Toxicol.*, **69**, 296–300 (1991).
- 24) Doroshow J. H., *Cancer Res.*, **43**, 460–472 (1983).
- 25) Goepfert A. R., Te Koppele J. M., Lamme E. K., Pique J. M., Vermeulen N. P., *Mol. Pharmacol.*, **44**, 1267–1277 (1993).
- 26) Bachur N. R., Gordon S. L., Gee M. V., Kon H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 954–957 (1979).
- 27) Bachur N. R., Gordon S. L., Gee M. V., *Mol. Pharmacol.*, **13**, 901–910 (1977).
- 28) Goodman J., Hochstein P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 797–803 (1977).
- 29) Demant E. J., Jansen P. K., *Eur. J. Biochem.*, **132**, 551–556 (1983).
- 30) Mimnaugh E. G., Gram T. E., Trush M. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**, 806–316 (1983).
- 31) Mimnaugh E. G., Trush M. A., Bhatnagar M., Gram T. E., *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 847–856 (1985).
- 32) Mimnaugh E. G., Kennedy K. A., Trush M. A., Sinha B. K., *Cancer Res.*, **45**, 3296–3304 (1985).
- 33) Schwartz H. S., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **10**, 51–64 (1975).
- 34) Ellis C. N., Ellis M. B., Blakemore W. S., *Biochem. J.*, **245**, 309–312 (1987).
- 35) Thayer W. S., *Chem.-Biol. Interact.*, **19**, 265–278 (1977).
- 36) Davies K. J., Doroshow J. H., Hochstein P., *FEBS Lett.*, **153**, 227–230 (1986).
- 37) Davies K. J., Doroshow J. H., *J. Biol. Chem.*, **261**, 3060–3067 (1986).
- 38) Doroshow J. H., Davies K. J., *J. Biol. Chem.*, **261**, 3068–3074 (1986).
- 39) Bessman S. P., Carpenter C. L., *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 831–862 (1985).
- 40) Bittl J. A., Weisfeldt M. L., Jacobus W. E., *J. Biol. Chem.*, **260**, 208–214 (1985).
- 41) McCord J. M., Russell W. J., “Oxygen Radicals in Biology and Medicine,” eds. by Simic M. G., Taylor K. A., Word J. F., von Sonntag C., Plenum Press, New York, 1988.
- 42) Nakabayashi H., Takeshige K., Minakami S., *Biochem. J.*, **202**, 97–105 (1982).
- 43) Kolodziejczyk P., Reszka K., Lown J. W., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 803–809 (1989).
- 44) Giulivi C., Cadenas E., *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 269–279 (1998).
- 45) Giulivi C., Cadenas E., *Methods Enzymol.*, **233**, 189–202 (1994).
- 46) Muraoka S., Miura T., *Life Sci.*, **72**, 1897–1907 (2003).
- 47) Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y., *Free Radic. Res.*, **34**, 167–175 (2001).
- 48) Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y., *Chem.-Biol. Interact.*, **134**, 13–25 (2001).
- 49) Watts D. C., “Creatine Kinase,” *The Enzymes VII*, ed. by Boyer P. D., Academic Press, New York and London, 1973, pp. 383–455.
- 50) Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y., *Pharmacol. Toxicol.*, **90**, 66–72 (2002).
- 51) Marcillat O., Zhang Y., Davies K. J., *Biochem. J.*, **259**, 181–189 (1989).
- 52) Platel D., Pouna P., Bonoron-Adele S., Robert J., *Anticancer Drugs*, **10**, 671–676 (1999).
- 53) Hirano S., Wakazono K., Agata N., Iguchi H., Tone H., *Drugs Expm. Clin. Res.*, **20**, 153–160 (1994).
- 54) Temma K., Akera T., Chugun A., Kondo H., Hagane K., Hirano S., *Eur. J. Pharmacol.*, **234**, 173–181 (1993).
- 55) Brenner D. E., Galloway S., Cooper J., Noone R., Hande K. R., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **14**, 139–145 (1985).
- 56) Greene R. F., Collins J. M., Jenkins J. F., Speyer J. L., Myers C. E., *Cancer Res.*, **43**, 3417–3421 (1983).
- 57) Reszka K. J., McCormick M. L., Britigan B. E., *Biochemistry*, **40**, 15349–15361 (2001).
- 58) Duescher R. J., Elfarra A. A., *J. Boil. Chem.*, **267**, 19859–19865 (1992).
- 59) Metodiewa D., Reszka K., Dunford H. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 601–608 (1989).
- 60) Metodiewa D., Dunford H. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 1211–1216 (1990).
- 61) Mottley C., Toy K., Mason R. P., *Mol. Pharmacol.*, **31**, 417–421 (1987).