

抗がん剤による活性酸素種を介した DNA 損傷及びアポトーシス誘導機構

水谷 秀樹

Mechanism of DNA Damage and Apoptosis Induced by Anticancer Drugs through Generation of Reactive Oxygen Species

Hideki MIZUTANI

College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University, 2-1723 Omori, Moriyama-ku, Nagoya 463-8521, Japan

(Received June 4, 2007)

A number of anticancer drugs exert their effect by causing DNA damage and subsequent apoptosis induction. Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and super oxide anion (O_2^-), participate in apoptosis and DNA damage induced by some anticancer drugs, however, the precise mechanism of apoptosis *via* ROS formation remains to be clarified. I investigated the mechanism of apoptosis and DNA damage induced by anticancer drugs, especially topoisomerase inhibitors, using human cultured cells. TAS-103, a topoisomerase inhibitor, induces apoptosis through DNA cleavage and subsequent H_2O_2 generation mediated by poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and NAD(P)H oxidase activation. Doxorubicin (DOX), an anthracycline antibiotic and topoisomerase inhibitor, induces apoptosis through direct oxidative DNA damage leading to indirect H_2O_2 generation mediated by PARP and NAD(P)H oxidase activation. DOX caused site-specific oxidative DNA damage in the presence of copper (II), which may contribute to apoptosis. These findings suggest that ROS formation plays important roles in apoptosis induced by anticancer drugs. Furthermore, these studies may provide an insight into the development of new effective chemotherapeutic drugs.

Key words—apoptosis; reactive oxygen species (ROS); DNA damage; hydrogen peroxide; topoisomerase inhibitor; doxorubicin

1. はじめに

多くの抗がん剤は、がん細胞にアポトーシスを誘導させることによりその作用を発現する。これらの抗がん剤の多くは DNA を標的とし、アポトーシス誘導において DNA 損傷が重要な役割を果たす。一方、抗がん剤によるアポトーシス誘導過程で、過酸化水素 (H_2O_2) 及びスーパーオキシド (O_2^-) を代表とする活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の生成が報告されている。¹⁻⁵⁾ ROS 生成及び DNA 損傷を介したアポトーシス誘導機構としては、1) 抗がん剤自身より生成された ROS による DNA 損傷からアポトーシスに至る場合、及びわれわれが新規機構として見出した、2) 抗がん剤による DNA 損傷を介して二次的に ROS が生成し、アポ

トーシスに至る場合が考えられる。しかしながら、抗がん剤による ROS 生成機構については、アントラサイクリン系抗がん性抗生物質の報告¹⁾があるのみで詳細な検討はほとんど行われていない。本総説では、これらの抗がん剤を介したアポトーシス誘導における ROS 生成と DNA 損傷の役割及びその分子機構について、筆者の研究を中心に概説する。

2. トポイソメラーゼ I, II 阻害剤 TAS-103 のアポトーシス誘導機構⁶⁾

TAS-103 (6-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-3-hydroxy-7H-indeno [2,1-c] quinolin-7-one dihydrochloride) は、大鵬薬品工業⁶⁾で合成されたキノリン骨格を有するトポイソメラーゼ阻害剤であり、DNA トポイソメラーゼ I と II の両方を阻害する。その阻害活性により DNA を切断し、抗がん作用を発現する。TAS-103 の細胞毒性 (IC_{50} : 0.0030–0.23 μM) は、カンプトテシンやエトポシドより強力であり、イリノテカンの代謝活性物の SN-38 と同程度であり、各種固形がん細胞に対しても有効である

金城学院大学薬学部医療薬学分野 (〒463-8521 名古屋
市守山区大森 2-1723)

e-mail: mizu@kinjo-u.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞
の受賞を記念して記述したものである。

ことが報告されている。⁷⁾ TAS-103 は、他の抗がん剤と同様にアポトーシスを誘導するが、その分子機構については、十分解明されていない。

筆者らは、TAS-103 によるアポトーシス誘導機構をヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 とそのカタラーゼ過発現株 HP100 を用いて検討した。HP100 は親細胞の HL-60 に比べ 18 倍のカタラーゼ活性を持ち、 H_2O_2 に対して 340 倍耐性である。⁸⁾ パルスフィールドゲル電気泳動法による巨大 DNA 断片 (1–2 Mb) の検出、すなわちトポイソメラーゼ阻害による DNA 切断は、1 時間後から起こり HL-60 と HP100 との間で差がなかった。一方、DNA のラダー状の断片化は、HL-60 は 4 時間後に HP100 は 6 時間後に明瞭に形成された。したがって、TAS-103 のトポイソメラーゼ阻害による DNA 切断には H_2O_2 は関与しないが、さらに下流のアポトーシス誘導には関与することが示唆された。細胞内の過酸化物の生成は蛍光色素 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を、ミトコンドリア膜電位の変化 ($\Delta\psi_m$) は 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC₆(3)] を用いてフローサイトメトリーにより測定した。カスパーゼ 3 活性は、その合成基質 [z-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (DEVD-AFC)] を用いて測定した。その結果、それぞれの現象は、HL-60 細胞に比しカタラーゼの活性が高い HP100 細胞で遅延や減弱がみられたことから、 H_2O_2 が関与していることが示唆された。経時的な変化は、1) 細胞内 H_2O_2 の上昇、2) ミトコンドリア膜電位の変化、3) 細胞内カスパーゼ-3 活性の上昇、4) 核 DNA 断片化の順にみられた (Table 1)。

さらに、筆者らは TAS-103 のアポトーシス誘導における H_2O_2 生成機構について検討した。DNA

cleavage の修復機構として poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) が活性化する点、⁹⁾ PARP が NAD^+ を基質とする点¹⁰⁾に注目し、「PARP の活性化が NAD^+ の大量消費をもたらし、消費された NAD^+ を補給するために NAD(P)H oxidase が活性化され、 H_2O_2 が生成する」という作業仮説を立て、これを検証した。HL-60 における TAS-103 による DNA ラダー形成は、PARP 阻害剤である 4-amino-1,8-naphthalimide (ANI), 6(5H)-phenanthridinone (PHEN) で抑制され、細胞内 H_2O_2 の上昇とミトコンドリア膜電位の変化も ANI により抑制された。また、TAS-103 による DNA ラダー形成は、NADPH oxidase 阻害剤である diphenyleneiodonium chloride (DPI), apocynin (APO) で抑制されたが、xanthine oxidase 阻害剤である allopurinol (ALLO) では抑制されなかったことから、DNA ラダー形成は、NADPH oxidase が関与し、xanthine oxidase は関与しないことが示唆された。さらに、TAS-103 により細胞内 NAD^+ と $NADP^+$ の有意な減少が認められた。したがって、TAS-103 のアポトーシス誘導には PARP の活性化が重要であり、細胞内 H_2O_2 生成とミトコンドリア膜電位の変化に先駆けて起こることが示された。また、 NAD^+ と $NADP^+$ の減少を補うために NADPH oxidase が活性化し、細胞内で O_2 及び H_2O_2 が生成される。さらに H_2O_2 によりミトコンドリアが傷害され、ミトコンドリア膜電位の変化を生じ、¹¹⁾ チトクローム c の放出に伴い、カスパーゼ-3 が活性化し、DNA ラダーが形成する。

以上の結果から、TAS-103 のアポトーシスカスケードとして、トポイソメラーゼ阻害による DNA 切断に伴う PARP の活性化と NAD^+ の消費が重要であり、この消費により NAD(P)H oxidase が活性化され、 H_2O_2 が生成する。そして H_2O_2 により、mitochondrial permeability transition pore が開き、¹¹⁾

Table 1. Time Course and Intensity of Apoptotic Events Induced by TAS-103

Apoptotic events	Time of apoptotic events		Comparison of apoptotic events' intensity
	HL-60	HP100	
DNA cleavage	1 h	1 h	HL-60=HP100
H_2O_2 Generation	3 h	3 h	HL-60>HP100
$\Delta\psi_m$	4 h	5 h	HL-60>HP100
Activation of caspase 3	4 h	5 h	HL-60>HP100
DNA ladder	4 h	6 h	HL-60>HP100



水谷秀樹

金城学院大学薬学部医療薬学分野准教授。1962年三重県生まれ。名古屋市立大学薬学部卒業、同大学院博士前期課程修了、三重大学大学院医学系研究科博士課程修了。1988年三重大学医学部附属病院薬剤部入局、1996年薬剤主任、2005年講師・副薬剤部長。2007年4月から現職。医療の場から教育の場に移り、教育の重要性を改めて感じている。

カスパーゼ-3 活性が上昇し、DNA ラダー形成に至るといふ新規機構を証明した (Fig. 1).

3. 抗がん性抗生物質ドキシソルビシンのアポトーシス誘導機構¹²⁾

ドキシソルビシン (DOX, 慣用名アドリマイシン) は、アンラサイクリン系の抗がん性抗生物質であり、現在最も臨床で使用されている抗がん剤の1つである。DOX の抗がん活性機序はいまだ不明な点が多いが、トポイソメラーゼ II 阻害や ROS 生成により生じる DNA 損傷が関与すると考えられている。¹⁾

筆者らは、DOX によるアポトーシス誘導機構を HL-60 及び HP100 を用いて検討した。DOX は、HL-60 及び HP100 においてアポトーシスを誘導した。核 DNA 断片化、細胞内過酸化物の生成、ミトコンドリア膜電位の変化、カスパーゼ-3 の活性の上昇は、HL-60 に比しカタラーゼの活性が高い HP100 で減弱されたことから、DOX のアポトーシス誘導には H₂O₂ が関与していると考えられた。さらに、酸化 DNA 損傷の指標の1つである 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) の生成の増加は、HL-60 で認められたが、HP100 細胞では認められなかった。これらの現象の経時的な変化は、1) 細胞内 H₂O₂ の上昇及び 8-oxodG の生成、2) ミトコンドリア膜電位の変化、3) 細胞内カス

パーゼ-3 活性の上昇、4) 核 DNA 断片化の順にみられた (Table 2).

次に DOX のアポトーシス誘導時の H₂O₂ 生成機構について検討した。DOX が分子内にパラキノン残基とパラヒドロキノン残基の両方を有することから、分子内レドックス反応が進行することにより、H₂O₂ が生成する¹⁾と考えられた。これは、酸化 DNA 損傷の指標である 8-oxodG が1時間という早期から上昇することからも支持される。一方、PARP 阻害剤と NADPH oxidase 阻害剤によって DOX のアポトーシス誘導が減弱された。したがって、DOX のアポトーシス誘導にも、PARP と NADPH oxidase の活性化が関与していることが示唆された。一方、cell-free の系で DOX は、Cu(II) 存在下で単離 DNA を損傷したが、TAS-103 では損

Table 2. Time Course and Intensity of Apoptotic Events Induced by DOX

Apoptotic events	Time of apoptotic events		Comparison of apoptotic events' intensity
	HL-60	HP100	
H ₂ O ₂ generation	1 h	—	HL-60>HP100
8-OxodG	1 h	—	HL-60>HP100
Δψ _m	4 h	5 h	HL-60>HP100
Activation of caspase 3	4 h	6 h	HL-60>HP100
DNA ladder	7 h	8 h	HL-60>HP100

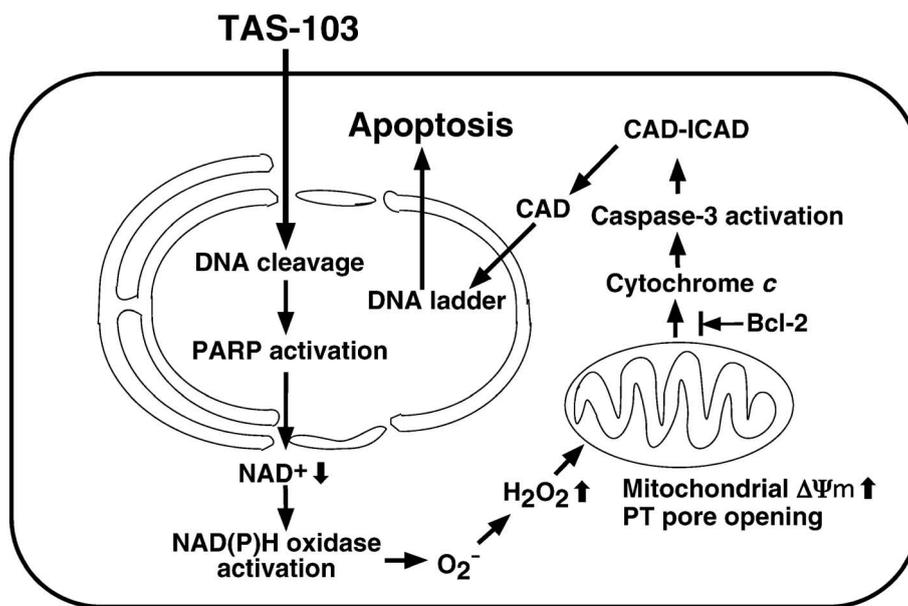


Fig. 1. Proposed Mechanism of TAS-103-induced Apoptosis Mediated by H₂O₂ Generation
 PT pore: permeability transition pore, CAD: caspase-activated DNase, ICAD: inhibitor of caspase-activated DNase. Modified from Ref. 6).

傷しなかった。DOXとTAS-103はそれぞれトポイソメラーゼ阻害活性を有し、DOXはそれ自身でROSを生成するが、TAS-103は生成しない。したがって、DOXのアポトーシス誘導には、ROSによる酸化的DNA損傷がトポイソメラーゼ阻害より大きく寄与する可能性が示唆された。以上のことからDOXのアポトーシス誘導機構として、細胞内でDOX自身からH₂O₂が生成し、DNAが酸化的に損傷され、PARPとNADPH oxidaseの活性化、ミトコンドリア傷害を経て、カスパーゼ-3が活性化され、アポトーシスが誘導される経路の存在が示唆された。

4. 抗がん性抗生物質ドキソルビシンの酸化的DNA損傷機構¹³⁾

前項において、DOXのアポトーシス誘導に酸化的DNA損傷が重要な役割を果たしていることが示

された。DOXの酸化的DNA損傷機構としてNADPH-cytochrome P450 reductaseによる還元型セミキノンラジカルを介した反応¹⁴⁾が知られている。しかしながら、DOXは、酸化型セミキノンラジカルをとること¹⁵⁾も可能であり、このラジカルを介した酸化的DNA損傷が起こる可能性も十分考えられる。そこで、金属イオン存在下でのDOXの酸化型セミキノンラジカルを介したDNA損傷機構について検討した。

実験としては、³²PでラベルしたDNA(c-Ha-ras-1ヒトがん原遺伝子及びp53がん抑制遺伝子)を用い、DOXと金属イオンをリン酸緩衝液(pH 7.8)中、37°Cで反応させた。ピペリジン処理後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、オートラジオグラムでDNA損傷を検出した。Maxam-Gilbert法を併用し、オートラジオグラムをレーザーデ

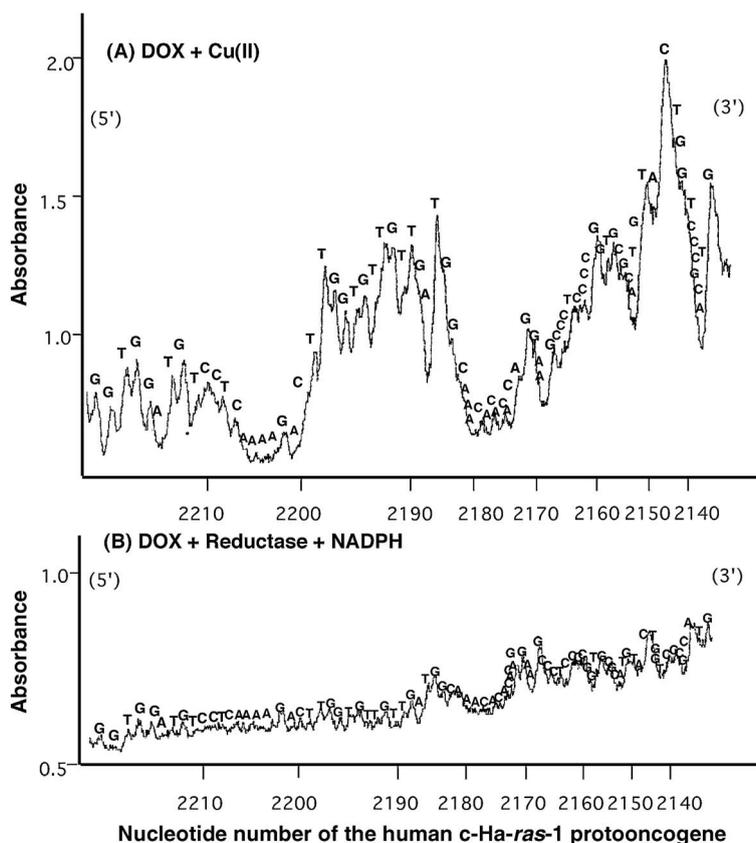


Fig. 2. Comparison of Site Specificity of DNA Cleavage Induced by DOX in the Presence of Cu(II) or Cytochrome P450 Reductase

(A) The reaction mixture contained the ³²P-5'-end-labeled 341-bp fragment (*Xba*I 1906-*Ava*I *2246), 2 μM/base of calf thymus DNA, 20 μM CuCl₂ and 20 μM DOX in 200 μl of 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 2.5 μM DTPA. The mixture was incubated at 37°C for 30 min. (B) The reaction mixture contained the ³²P-5'-end-labeled 341-bp fragment (*Xba*I 1906-*Ava*I *2246), 2 μM/base of calf thymus DNA, 20 μg/ml of cytochrome P450 reductase, 2 mM NADPH and 400 μM DOX in 200 μl of 0.4 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 2.5 μM DTPA. The mixture was incubated at 37°C for 60 min. After the incubation, followed by the piperidine treatment, the DNA fragments were electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel using a DNA-sequencing system, and the autoradiogram was obtained by exposed X-ray film to the gel. The relative amounts of oligonucleotides produced were measured by a laser densitometer (LKB 2222 UltraScan XL). The piperidine-labile sites of the treated DNA were determined by direct comparison with the same DNA fragment after undergoing DNA sequence reaction according to the Maxam-Gilbert procedure. The horizontal axis shows the nucleotide number. Reproduced from Ref. 13).

ンシトメーターでスキャンし、DNA 損傷性と塩基配列特異性を解析した.¹⁶⁻¹⁸⁾

その結果、DOX 単独では DNA 損傷は認められなかったが、Cu(II) 存在下で DOX は、0–20 μM の間で濃度依存的に DNA を損傷した。一方、NADPH-cytochrome P450 reductase 存在下で、DOX は DNA を損傷させたが、Cu(II) 存在下での 20 倍の DOX が必要であり、かつ DNA 損傷は、Cu(II) 存在下の場合と比較すると弱かった。一方、他の金属イオン存在下では、Fe(II) で若干の DNA 損傷は認められたが、それ以外の金属では、DNA 損傷は認められなかった。Cu(II) 存在下での DNA 損傷は、methional 及び Cu(I) のキレート剤である bathocuproine により抑制され、カタラーゼで部分的に抑制されたが、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。したがって、この DNA 損傷には、 H_2O_2 と Cu(I) から生成される金属-酸素錯体のようなクリプト OH ラジカルが関与していることが示唆された。

Maxam-Gilbert 法を併用した DNA 損傷性と塩基特異性の検討では、Cu(II) 存在下での DOX による DNA 損傷は、G, T に特異的であり、特に、5'-GG-3', 5'-GT-3', 5'-TG-3' が強く損傷されたのに対

し、5'-GC-3' の G の損傷は弱かった (Fig. 2(A)).

これに対し、ヒト P450 reductase+NADPH 存在下での DOX の DNA 損傷には、塩基特異性は認められず、Cu(II) 存在下との比較において大きな差異が認められた (Fig. 2(B)). さらに、Cu(II) 存在下において、DOX は酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxodG を 0–50 μM の間で濃度依存的に増加させた。

以上の結果より、DOX は Cu(II) 存在下で ROS を生成し、DNA を酸化的に損傷することが判明した。その活性種は、 H_2O_2 と Cu(I) とによる金属-酸素錯体と考えられ、酸化型セミキノラジカルを介することが明らかになった。この損傷機構は、数百 μM が必要なヒト P450 reductase + NADPH 存在下での還元型セミキノラジカルを介した場合は異なり、生体内 DOX 濃度^{1,19)}に近い低濃度での反応であることから、酸化型セミキノラジカルが DOX の作用発現、すなわちアポトーシス誘導に重要な役割を演じていると考えられる (Fig. 3).

5. おわりに

抗がん剤のアポトーシス誘導機構及び DNA 損傷機構について、筆者は ROS が果たす役割を中心と

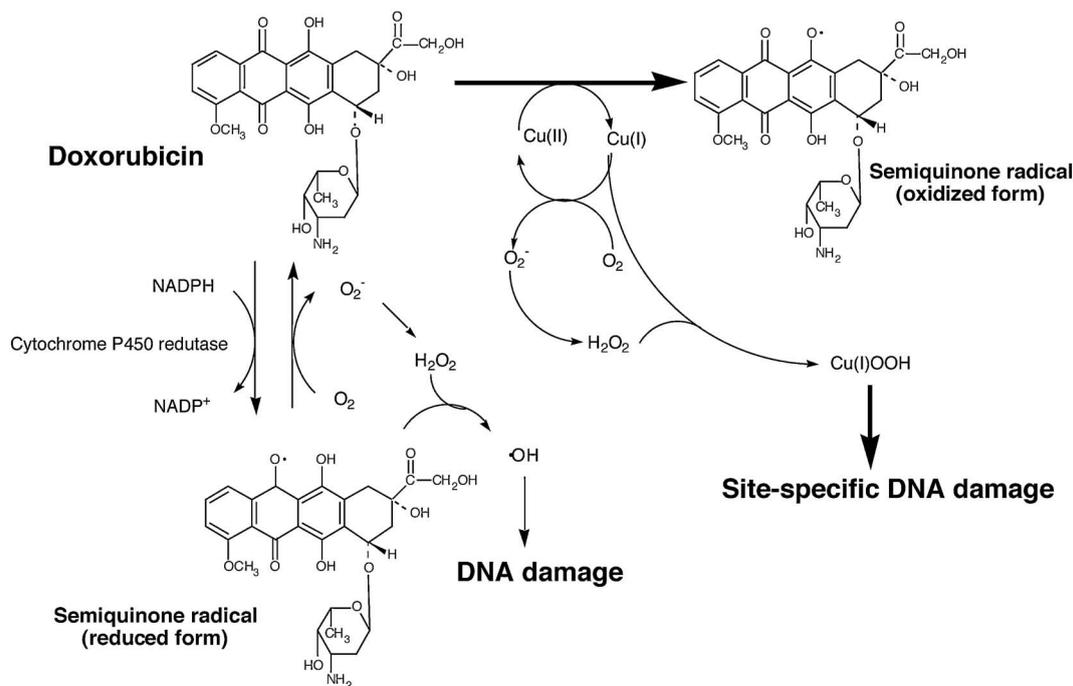


Fig. 3. Proposed Mechanisms for DNA Damage Induced by DOX
Reproduced from Ref. 13).

して解析した。抗がん剤がそれ自身で生成する ROS による DNA 損傷機構に加え、筆者らが提唱した「抗がん剤による DNA 損傷→PARP の活性化→NAD⁺ の消費→NAD(P)H oxidase の活性化→H₂O₂ の生成」という新規の分子機構は、抗がん剤のアポトーシス誘導に重要な役割を果たしているものと考えられる。今後、こうした研究の成果が、新規抗がん剤の開発や抗がん剤の耐性機構や併用理論の構築、さらに抗がん剤の副作用の軽減化へと発展し、「医薬品の適正使用」に貢献できることを期待したい。

謝辞 本研究の遂行に際し、終始、御指導御鞭撻を賜りました三重大学名誉教授 川西正祐先生（現 鈴鹿医療科学大学教授）に心より感謝申し上げます。また、研究の機会を与えていただきました三重大学医学部附属病院薬剤部 小島康生名誉教授並びに奥田真弘教授に感謝致します。本研究は三重大学大学院医学系研究科環境分子医学分野並びに三重大学医学部附属病院薬剤部において行われたものであり、環境分子医学分野の平工雄介講師、及川（多田）佐枝子博士、及川伸二准教授、村田真理子教授並びに関係者の皆様に深謝致します。なお、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金並びに三重医学研究振興会研究助成金により行われたものであり、併せて感謝致します。

REFERENCES

- 1) Gewirtz D. A., *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 727–741 (1999).
- 2) Hiraoka W., Vazquez N., Nieves-Neira W., Chanock S. J., Pommier Y., *J. Clin. Invest.*, **102**, 1961–1968 (1998).
- 3) Tada-Oikawa S., Oikawa S., Kawanishi M., Yamada M., Kawanishi S., *FEBS Lett.*, **442**, 65–69 (1999).
- 4) Varbiro G., Veres B., Gallyas Jr. F., Sumegi B., *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 548–558 (2001).
- 5) Murata M., Suzuki T., Midorikawa K., Oikawa S., Kawanishi S., *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 793–802 (2004).
- 6) Mizutani H., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Oikawa S., Kojima M., Kawanishi S., *J. Biol. Chem.*, **277**, 30684–30689 (2002).
- 7) Aoyagi Y., Kobunai T., Utsugi T., Oh-hara T., Yamada Y., *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 578–587 (1999).
- 8) Kasugai I., Yamada M., *Leuk. Res.*, **16**, 173–179 (1992).
- 9) Scovassi A. I., Poirier G. G., *Mol. Cell. Biochem.*, **199**, 125–137 (1999).
- 10) Martin D. S., Bertino J. R., Koutcher J. A., *Cancer Res.*, **60**, 6776–6783 (2000).
- 11) Chandra J., Samali A., Orrenius S., *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 323–333 (2000).
- 12) Mizutani H., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M., Kawanishi S., *Life Sci.*, **76**, 1439–1453 (2005).
- 13) Mizutani H., Oikawa S., Hiraku Y., Murata M., Kojima M., Kawanishi S., *Cancer Sci.*, **94**, 686–691 (2003).
- 14) Berlin V., Haseltine W. A., *J. Biol. Chem.*, **256**, 4747–4756 (1981).
- 15) Chinami M., Kato T., Ogura R., Shingu M., *Biochem. Int.*, **8**, 299–304 (1984).
- 16) Yamashita N., Murata M., Inoue S., Hiraku Y., Yoshinaga T., Kawanishi S., *Mutat. Res.*, **397**, 191–201 (1998).
- 17) Yamamoto K., Kawanishi S., *J. Biol. Chem.*, **266**, 1509–1515 (1991).
- 18) Kawanishi S., Yamamoto K., *Biochemistry*, **30**, 3069–3075 (1991).
- 19) Brenner D. E., Galloway S., Cooper J., Noone R., Hande K. R., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **14**, 139–145 (1985).