

抗がん剤投与による酸化ストレス由来細胞死誘導能の調査

深澤 真実*¹, 井内 勝哉*², 久富 寿*³

Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the cancerous cell lines

Mami FUKASAWA*¹, Katsuya IUCHI*², Hisashi HISATOMI*³

(Received May 17, 2021)

1. 背景

生体内には活性酸素種を消去する抗酸化システムが備わっている¹⁾。抗酸化システムは、Superoxide dismutase (SOD) やCatalaseなどの抗酸化酵素およびGlutathione (GSH) や尿酸などの抗酸化物質に大別される。酸素消費に伴って生成される活性酸素種は、これらの抗酸化システムにより消去される^{2, 3)}。活性酸素種の消去により、生体内の酸化と抗酸化のバランスは保たれている⁴⁾。しかし、酸化と抗酸化のバランスは主に2つの要因により崩壊する。1つ目に、喫煙や薬物摂取などに伴う抗酸化システムによる消費量を超過した活性酸素種の発生量の増加が挙げられる⁵⁾。2つ目に、統合失調症や貧血などの疾患や老化に伴う抗酸化システムの活性の低下に起因した活性酸素種の消費量の減少が挙げられる⁶⁾。2つの要因に伴った酸化抗酸化バランスの崩壊により、酸化ストレスが誘導される⁴⁾。

一般的に抗がん剤は酸化ストレスを誘導するとされている^{1, 2)}。酸化ストレス下では、活性酸素種がタンパク質、脂質、糖質および核酸などの生体分子を酸化し、正常細胞の細胞死を誘導する³⁾。したがって、酸化ストレスが抗がん剤投与による副作用の原因の1つとして考えられている。しかし、当研究室での20種類の抗がん剤の検討において、酸化ストレスを誘導する抗がん剤は一部であると判明している⁴⁾。我々は抗がん剤のCamptothecin, Paclitaxel, VinorelbineおよびVinblastineの培養細胞への投与による強い酸化ストレスの発生を、蛍光性プローブCellROXの蛍光として確認している。また、それら4種類の抗がん剤のうちVinorelbineおよびVinblastineの

投与による細胞死誘導を、アポトーシス検出試薬AnnexinVの蛍光として確認している⁴⁾。しかし、抗がん剤投与による細胞死誘導の中で、酸化ストレスによる細胞死誘導の割合は明らかではない。そこで、本研究では抗酸化物質であるN-acetyl-L-cysteine(NAC)の投与により、VinorelbineおよびVinblastine由来の酸化ストレスの軽減を試みた。また、酸化ストレスの軽減された条件下における、VinorelbineおよびVinblastine投与による細胞死誘導を調査した。これにより、抗がん剤由来の酸化ストレスが細胞死を誘導し副作用の原因であるか調査した。

2. 材料と手順

2. 1 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株DLD-1およびヒト膵臓がん細胞株SUIT-2を東北大学加齢医学研究所より入手した。10% Fetal Bovine Serum(FBS), 64 µg/mL Benzylpenicillin Potassium, 45 µg/mL Streptomycin, 0.25 µg/mL Amphotericin Bに調整したRPMI 1640培地(Thermo Fisher Scientific)を用いて、37°C, 5% CO₂条件下で培養した。また、組織培養用48 well plate(Thermo Fisher Scientific)に8×10⁴ cells/mLの密度でDLD-1細胞およびSUIT-2細胞を播種した。

2. 2 NAC投与およびVinorelbine, Vinblastine投与

NACを培養細胞へ1 mM投与し、37°C, 5% CO₂条件下で1 hrインキュベートした。1 hr培養後、VinorelbineまたはVinblastineを10 µMずつ投与し、14 hr培養した。

2. 3 CellROX® Green染色における酸化ストレスの確認

CellROX® Green(Life Technologies)を5 µM添加し37°C, 5% CO₂条件下で30 minインキュベートした。その後、3.7% formaldehydeを200 µL添加し、15 min室温固定した。固定後、蛍光顕微鏡で観察した。

*¹: 大学院理工学研究科

*²: 物質生命理工学科 助教

*³: 物質生命理工学科 教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

3. 結果

VinorelbineまたはVinblastine投与細胞において、NAC処理により酸化ストレスの軽減が確認された。また、NAC処理細胞において、細胞死誘導の抑制は確認されなかった (図1)。

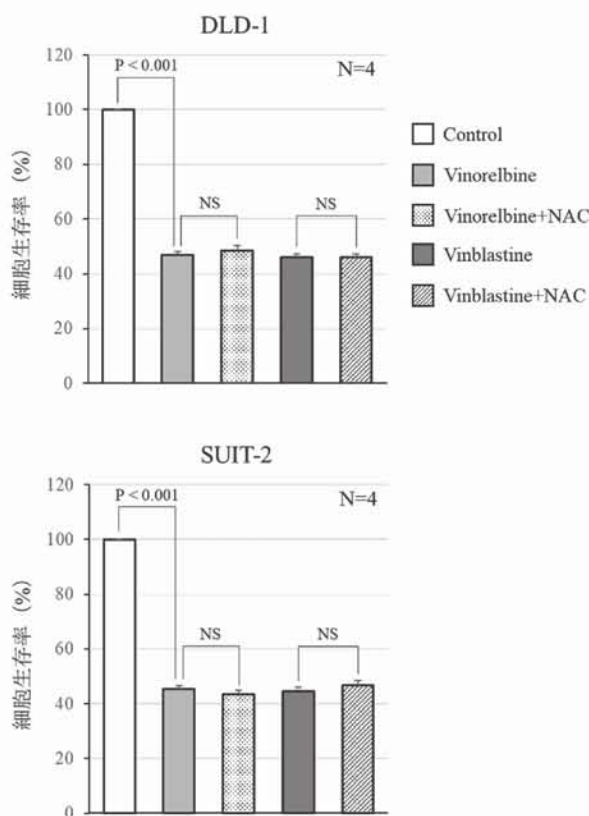


図1 NAC処理細胞における
抗がん剤由来酸化ストレスの細胞死誘導

4. 考察

我々は抗がん剤のVinorelbineおよびVinblastineの培養細胞への投与による強い酸化ストレスの発生を、蛍光性プローブCellROXの蛍光として確認している。そこで本研究では、強い酸化ストレスを誘導するVinorelbineおよびVinblastineに着目した。NAC処理による酸化ストレスの軽減により細胞死の抑制が予想された。NACはGSHの前駆体であり、活性酸素のヒドロキシルラジカルを消去する。したがって、NAC処理によるVinorelbineおよびVinblastine由来のヒドロキシルラジカルの抑制が考えられた。しかし、酸化ストレスの軽減された条件下においてもNAC未処理細胞と同様な細胞死誘導が確認された。したがって、VinorelbineおよびVinblastineの投与により生成されるヒドロキシルラジカルの細胞死誘導への関与は低いと考えられた。今後、その他の活性酸素種による細胞死誘導の調査のため、抗酸化物質の尿酸あるいは抗酸化酵素のGlutathione PeroxidaseやGlutathione Reductaseを用いた酸化ストレスの軽減により、VinorelbineおよびVinblastine由来酸化ストレスの細胞死誘導への関与を調査する必要がある。

5. 参考文献

- 1) Dean P. : Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295 (4), C849-68, 2008
- 2) Anna V, GeorgeS, Alexey A, *et.al.* : Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7, 44879-44905, 2016
- 3) Marco C, Giovanna B, Raffaella P, *et.al.* : Mutant p53-Associated Molecular Mechanisms of ROS Regulation in Cancer Cells. *Biomolecules*, 10(3), 361, 2020
- 4) Čedo D, Aleksandra N, Duško B, *et.al.* : Association between neurological soft signs and antioxidant enzyme activity in schizophrenic patients. *Psychiatry Res*, 269, 746-752, 2018
- 5) Giorgio M, Pierantonio M, Emanuela S, *et.al.* : Anthracyclines:molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56, 185-229, 2004.
- 6) Chikako Y, Yuto S, Mika E, *et.al.* : Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. *Oncol Lett*, 14, 6066-6070, 2017