

Thesis

5-Fluorouracilの抗腫瘍効果における活性酸素の役割

埼玉医科大学外科学(消化器・一般外科部門 消化器・一般外科(II))

(指導:平山 廉三教授)

河相 開流

Role of Reactive Oxygen Species as an Anticancer Effect Induced by 5-Fluorouracil – Experimental Study Using a Human Gastric Cancer Cell Line (MKN45) –

Kairyu Kaai (Department of General and gastroenterological Surgery, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

It is well known that in a variety of anticancer agent, such as Mitomycin C, Adriamycin, CDDP, reactive oxygen species (ROS) play important roles in cytotoxic effects to tumor cells. However, as to 5-fluorouracil (5-FU) it has not been clear whether ROS can be induced by 5-FU or not and its related to anticancer effect. Therefore, in order to clarify the role of ROS in cytotoxic process induced by 5-FU, we measured ROS and 8-oxoguanidine (8-OHdG) of 5-FU-treated MKN-45 (human poorly differentiated adenocarcinomatous cells of stomach) and HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) cell lines by flow cytometry. In addition, the relation between ROS and apoptosis was investigated by flow cytometry. Trend of various enzymes related to active oxygen and promoting / inhibiting factors of apoptosis also measured by Western blotting method. Levels of ROS and 8-OHdG (specific maker of DNA damage caused by ROS) increased in MKN-45 cells exposed to CDDP or 5-FU, ROS were increased, whereas 8-OHdG showed no change in HUVEC cells. Level of SOD and p22 proteins increased, whereas catalase showed no change in MKN-45 cells exposed to 5-FU. Although DNA degradation induced by ROS via p53 and NF κ B enhancement was found in MKN-45 cells exposed to 5-FU. There are no effect of caspase-dependent apoptotic factors. In summary, our results may indicate that anticancer effect of 5-FU is mediated mainly through the caspase-independent apoptosis via the ROS induction.

Keywords: 5-FU, reactive oxygen species, 8OHdG, apoptosis

1. 目的

Mitomycin C¹⁻⁴⁾, Adriamycin⁵⁻⁷⁾, cis-diamminedichloro platinum (II) (CDDP)⁸⁾などの抗腫瘍薬では、抗腫瘍効果の発揮の機序に活性酸素種 (reactive oxygen species 以下ROS) が関与することが明らかにされている。しかし、臨床腫瘍学において繁用される5-fluorouracil (5-FU) について、その効果発現の機序へのROSの関与を検討した報告は少ない^{10, 11)}。

そこで、CDDPにおけるROSの動勢と比較を行いながら、5-FU添加によるROSの関与、およびROSによる抗腫瘍作用発現の詳細について検討を加えた。

2. 方法

1) 細胞および細胞培養

MKN45細胞(ヒト胃 poorly differentiated adenocarcinoma由来, JCRB 0254)を使用した。細胞は、10% 牛胎児血清(以下FBS, GIBCO社), streptomycin(万有製薬) 100 U/ml, およびpenicillin(明治製薬) 0.1 mg/mlを含むRPMI1640(日水製薬)を用いて、5% CO₂内、でインキュベートした。細胞の剥離は0.25% trypsin 1mM ethylenediaminetetraacetic acid(以下EDTA)によった。細胞数を2×10⁵個/mlに調整したのち、(1) 3, 30, 300 μg/mlの5-FU(協和発酵), および4, 400 μg/mlのCDDP(日本化薬)を添加して24時間インキュベートしたもの、(2) 3 μg/mlの5-FU, および4 μg/mlのCDDP

を添加して48時間の時間経過による影響をみたもの、(3) アスコルビン酸 (Sigma社) 10 μ Mを添加30分間培養し、その後3 μ g/mlの5-FUを添加し、48時間インキュベート続けたもの、(4) α -トコフェロール (Sigma社) 50 μ Mを添加30分後、3 μ g/mlの5-FUを添加して、48時間のインキュベートを続けたものの4群を実験系に用いた。また、対照としてヒト血管内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cell: CC-2571, 以下HUVEC 三光純薬) を2% FBS, streptomycin 100 U/ml, およびpenicillin 0.1 mg/mlを含むEBM培地 (三光純薬) を用いて、5% CO₂, 37°Cでインキュベートした。0.05% trypsin 1mM EDTAにより剥離し、2 \times 10⁵個/mlに細胞数を調整したのち、3 μ g/mlの5-FU, および4 μ g/mlのCDDPを添加し、48時間インキュベートを続け経時的にROS, 8OHdGを測定した。

2) 細胞内活性酸素の測定

細胞内ROSにより蛍光を発する5 mM 6-carboxy 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (C-2938, Molecular prob社) 10 μ lを培地に添加して37°Cで30分間インキュベートし、0.25% trypsin 1mM EDTAによって細胞を剥離した。PBSで懸濁した。細胞懸濁液の蛍光強度をFACScan (Becton Dickinson社) にて測定した。

3) 8OHdGの測定

Oxidative DNA Damage Assay kit (Kamiya Biomedical社) を使用した。

0.25% trypsin 1mM EDTAによって細胞を剥離し、500 μ lの2% paraformaldehydeで懸濁した。15分間、氷中下でインキュベートし、1 mlの70% ethanolを加えて固定。50 μ lのblocking solution添加ののち、37°C, 1時間インキュベートした。100 μ lのfluorescein isothiocyanate-conjugateを添加し、さらに室温暗所で1時間インキュベートした。FACS液で懸濁し、FACScanにて蛍光強度を測定した。

4) Western blot法

細胞に1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) 500 μ lを加えて懸濁し、Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Reagent Kit (PIERCE) を用いて蛋白定量を行った。一定の細胞を含む液を5% 2-mercaptoethanol (Sigma社) を加えた10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) の溶液で100°C, 5分間の還元処理を行った。10% SDS添加のpolyacrylamide gelにて電気泳動を行ったのち、polyvinilidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore社) に転写しBlock ace (大日本製薬) にて1時間ブロッキング。1次抗体として抗Cu, Zn-SOD抗体 (Binding Site社), 抗Catalase抗体 (Calbiochem社), 抗p22抗体 (順天堂大学長岡 功先生から供与), 抗NF- κ B抗体, 抗Bax抗体, 抗p53抗体, 抗caspase3, 8, 9抗体, 抗Apaf 1抗体, 抗cytochrome C抗体,

抗Fas抗体, 抗TNF- α 抗体 (Santa Cruz biotechnology社) をそれぞれ1時間作用させ、peroxidase標識2次抗体 (Binding Site社) を45分間作用させたのち、ECLキット (Amersham社) によりperoxidase活性を発色させてX線フィルム上にバンドとして検出した。その後バンドをデンストメーターにて定量した。

5) apoptosisの検出

Annexin-V-FITC kit (医学生物学研究所) を使用した。MKN45を、0.25% trypsin-EDTAで剥離しPBSで洗浄後、binding buffer 85 μ lを加えて懸濁。さらにAnnexin V-FITC 10 μ lとPropidium iodide 5 μ lを加えて室温で15分間反応させた。そののち、binding buffer 400 μ lを加えFACScanにより蛍光強度を測定した。

3. 結果

1) MKN45 細胞における 5-FU濃度によるROSと 8OHdGの変化

5-FUの低濃度 (3 μ g/ml) 添加群において、ROSは非添加群の2.2倍、8OHdGは1.4倍に増加した。しかし、中等および高濃度 (30, 300 μ g/ml) 添加において、ROSは増加したが、8OHdGの増加は認めなかった (Fig. 1)。

2) MKN45 細胞におけるCDDP濃度によるROSと 8OHdGの変化

CDDPの低濃度 (4 μ g/ml) 添加群において、ROSは非添加群の1.65倍に、8OHdGは1.4倍に増加した。

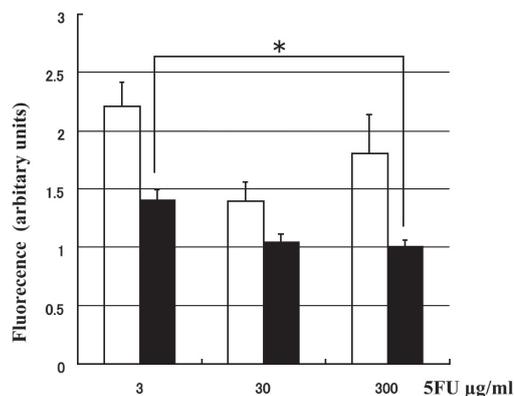


Fig. 1. Intracellular production of ROS and 8OHdG in MKN45 cells treated with 5-FU. MKN45 cells (1×10^6 /ml) were incubated for 48 hours without (control) or with various concentrations (3, 30, 300 μ g/ml) of 5-FU and stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generation of ROS and 8OHdG expressed as % of control. MKN-45 = human poorly differentiated adenocarcinomatous cells of stomach C-2938 = 6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester). Intracellular generation of ROS; \square 8OHdG; \blacksquare Each bar is mean \pm SD of three determinations in three independent experiments. * Significant difference between concentrations 3 μ g/ml and 300 μ g/ml of 5-FU in ROS, $p < 0.05$. Kruskal-Wallis test.

しかし、高濃度 (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の添加において ROS は増加したが、8OHdG の増加は軽微であった (Fig. 2).

3) 5-FU 添加 MKN45 細胞における ROS と 8OHdG の経時的変化

MKN45 細胞内の ROS 産生は、5-FU 添加後、24 時間で、非添加群の 2.1 倍、48 時間では 2.4 倍に増加した。8OHdG は、24 時間で 1.25 倍、48 時間で 1.39 倍に増加した (Fig. 3, 4).

4) CDDP 添加 MKN45 細胞における ROS と 8OHdG の経時的変化

MKN45 細胞内における ROS 産生は、CDDP 添加の 24 時間で非添加群の 1.4 倍、48 時間では 2.2 倍に増加した。8OHdG は、24 時間で 1.2 倍、48 時間で 1.5 倍に増加した (Fig. 5).

5) 5-FU, CDDP 添加の HUVEC 細胞における ROS と 8OHdG の経時的変化

HUVEC 細胞における ROS 産生は、5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の添加で 24 時間に非添加群の 1.92 倍、48 時間には 2.35 倍。CDDP (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の添加で 24 時間に 2.26 倍に増加した。しかし、5-FU, CDDP いずれの添加によっても、8OHdG の増加は僅かであった (Fig. 6, 7).

6) アスコルビン酸と 5-FU 添加 MKN45 細胞における ROS と 8OHdG の変化

5-FU のみの添加では癌細胞中の ROS は 2.18 倍、8OHdG は 2.09 倍であったが、アスコルビン酸と 5-FU 添加で非添加群に比べて ROS は 1.71 倍、8OHdG は 1.87 倍に減り減少傾向を示した (Fig. 8).

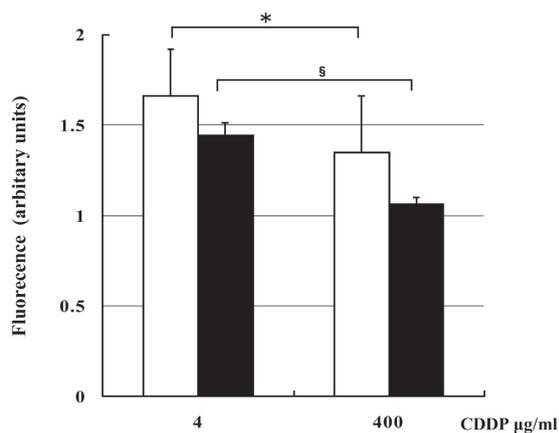


Fig. 2. Intracellular production of ROS and 8OHdG in MKN45 treated with CDDP. MKN45 cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 48 hours with various concentrations (4, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or without (control) of CDDP and stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescence intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generation of ROS and 8OHdG are expressed as % of control. Each bar is mean \pm SD of three determinations in three independent experiments. Significant difference between concentrations 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CDDP and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in ROS (*), $p < 0.05$. in 8OHdG (§), $p < 0.05$. Kruskal-Wallis test.

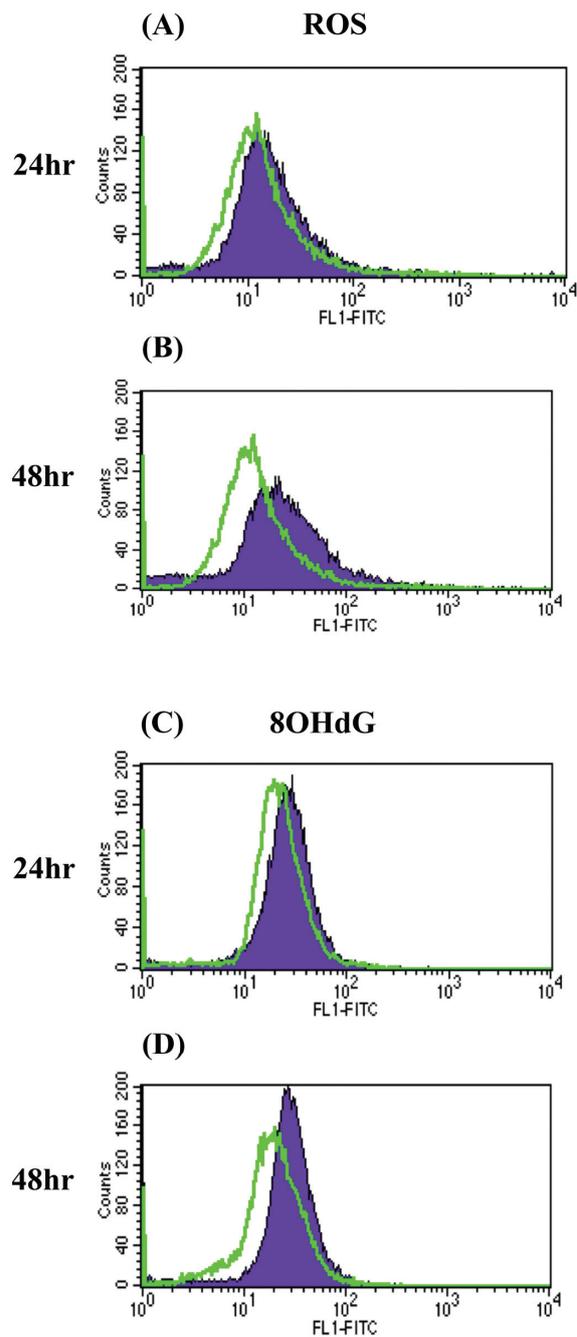


Fig. 3. Flow cytometric histogram of ROS, 8OHdG in MKN45 cells. (A)-ROS (24hr), (B)-ROS (48hr). (C)-8OHdG (24hr), (D)-8OHdG (48hr). (A), (B). MKN45 cells were incubated for 24hr or 48hr in the absence or presence of 5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then the culture medium was replaced with freshly prepared RPMI-1640 medium containing 5 μM C-2938. After 30 minutes of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, fluorescence intensity was monitored by flow cytometry. (C), (D). MKN45 cells were incubated for 24h or 48h in the absence or presence of 5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then the cells were washed with PBS. The cells were suspended in 500 μl of 2% paraformaldehyde. Thereafter incubation for 15 min, the cell was fixed in ice-cold 70% ethanol and stored at 20 $^{\circ}\text{C}$. After addition of blocking solution, the cells were incubated for 1 hour. After addition FITC-conjugate, the cells were incubated for 1 hour at 37 $^{\circ}\text{C}$, fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Solid line: control, solid histogram: 5-FU-treated cells.

7) α -トコフェロールと 5-FU 添加 MKN45 細胞における ROS の変化

α -トコフェロールの添加により ROS の産生が抑制された (Fig. 9).

8) p22, SOD, カタラーゼ 蛋白量の変動

5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加の 48 時間後に, p22 は非添加群の 1.27 倍に増加し, SOD は 1.41 倍に増加した. しかし, カタラーゼの変化は認められなかった (Fig. 10).

9) apoptosis

5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加により annexinV の蛍光強度の経時的増加がみられた. 非添加群と比較すると, 24 時間で 4.7 倍, 添加後 48 時間で 7 倍に達した (Fig. 11).

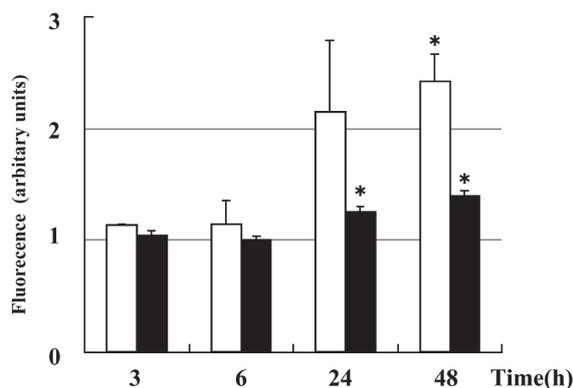


Fig. 4. The time dependent change of ROS and 8OHdG induced by 5-FU in MKN45 cells. MKN45 cells were incubated for various times (3hr, 6hr, 24h, 48h) in the absence or presence of 5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generations of ROS and 8OHdG are expressed as % of control. Data are expressed as means \pm SD of three experiments. *Significant difference from untreated control in ROS, $p < 0.05$. Kruskal-Wallis test.

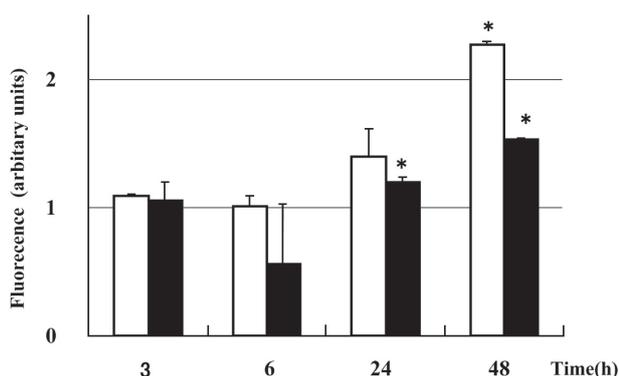


Fig. 5. The time dependent change of ROS and 8OHdG induced by CDDP in MKN45 cells. MKN45 cells were incubated for various times (3hr, 6hr, 24h, 48h) in the absence or presence of CDDP (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generations of ROS and 8OHdG are expressed as % of control. Data are expressed as mean \pm SD of three experiments. *Significant difference from untreated control, $p < 0.05$. Kruskal-Wallis test.

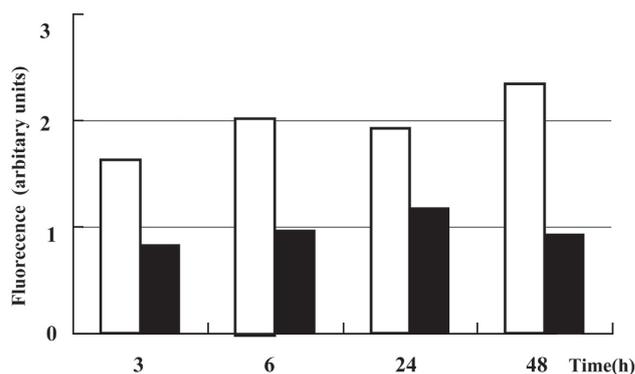


Fig. 6. The time dependent change of ROS and 8OHdG induced by 5-FU in HUVEC. HUVEC were incubated for various times (3hr, 6hr, 24h, 48hr) in the absence or presence of 5-FU (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generations of ROS and 8OHdG are expressed as % of control.

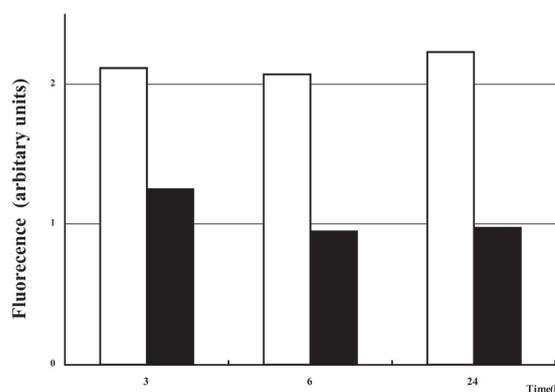


Fig. 7. The time dependent change of ROS and 8OHdG induced by CDDP in HUVEC. HUVEC were incubated for various times (3hr, 6hr, 24h) in the absence or presence of CDDP (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generations of ROS and 8OHdG are expressed as % of control.

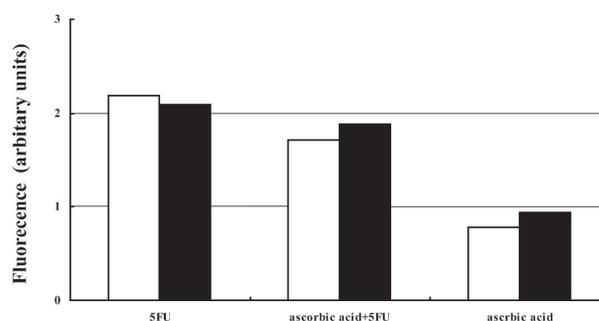


Fig. 8. Intracellular production of ROS and 8OHdG in MKN45 cells. treated with 5-FU and ascorbic acid. MKN45 cells were incubated for 48h in the absence or presence of 5-FU (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and ascorbic acid and then stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generation of ROS and 8OHdG are expressed as % of control.

10) caspase3, 8, 9, Apaf, TNF- α , Fas, cytochrome C 蛋白質量の変化

caspase3, 8, 9, Apaf, TNF- α , Fas, は5-FU添加前後で変化は認められず, cytochrome Cは5-FU添加では検出されなかった (Fig. 12).

11) p53, Bax, NF κ B蛋白質量の変化

5-FU (3 μ g/ml) 添加48時間後に, P53は非添加群

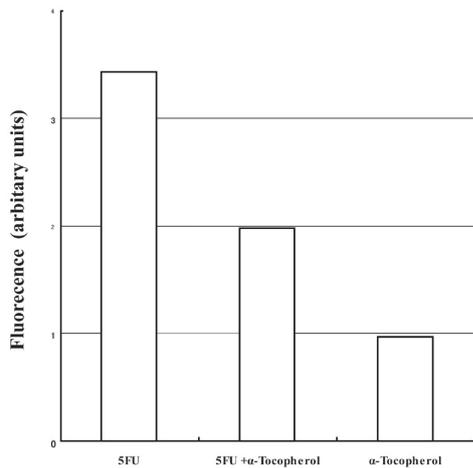


Fig. 9. Intracellular production of ROS in MKN45 cells treated with 5-FU or α -tocopherol. MKN45 cells were incubated for 48h in the absence or presence of 5-FU (5 μ g/ml) and α -tocopherol and then stained with C-2938 or with FITC-conjugate. Fluorescent intensity was monitored by flow cytometry. Intracellular generations of ROS are expressed as % of control.

の5.07倍, Baxは 1.41倍, NF κ Bは1.31倍に増加した (Fig. 13).

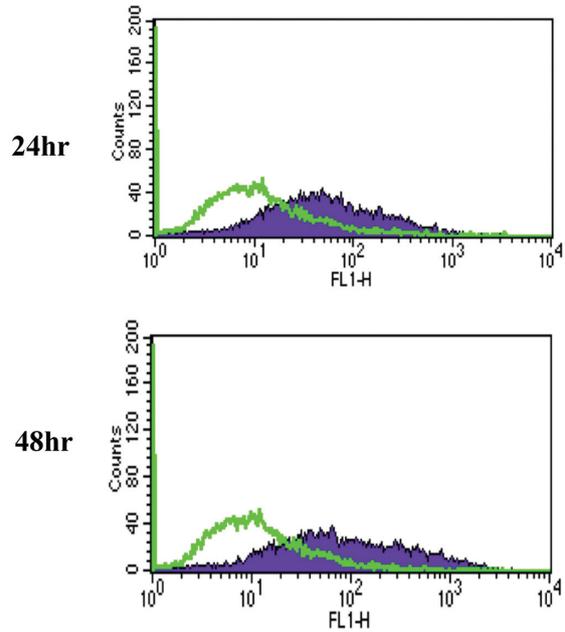


Fig. 11. Flowcytometric Analysis of Apoptosis induced by 5-FU in MKN45 cells. MKN45 cells (1×10^6 /ml) were incubated for 48hours with 5-FU (3 μ g/ml) or without (control) and then the cell were incubated 1hour at 37 $^{\circ}$ C with 0.5 μ g/ml FITC-conjugated AnnexinV in HEPES-buffered RPMI culture medium. Thereafter the cells were washed twice with fresh medium, Fluorescent intensity was measured by flow cytometry. Solid line : control, solid histogram : 5-FU-treated cells.

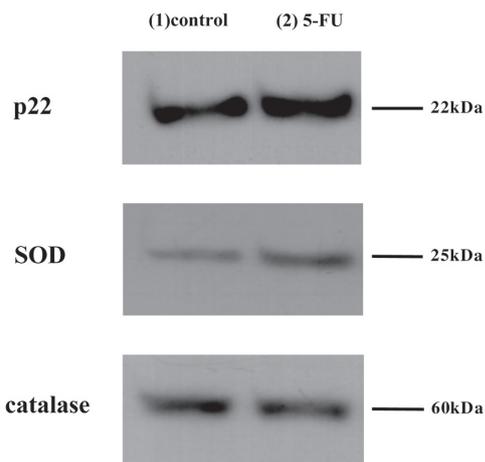


Fig. 10. Western blotting patterns, p22, SOD and catalase in MKN45 treated for 24hrs with 5-FU. Western blot analysis of p22, SOD and catalase in MKN45 treated with 5-FU (3 μ g/ml) for 48hr. Total protein (20 μ g) from the homogenates of MKN45 was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5 % or 12 %)polyacrylamide gel under reducing conditions. Molecular mass expressed in kilodaltons (kDa). The lane labels are (1) untreated control (2) 5-FU treated.

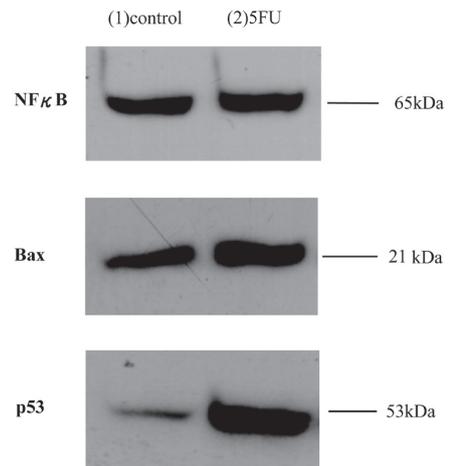


Fig. 12. Western blotting patterns of cytochrome C and caspase 3 in MKN45 treated with 5-FU. Western blot analysis of cytochrome C and caspase 3 in MKN45 treated with 5-FU (3 μ g/ml)exposed for 48hr. Total protein (20 μ g) from the homogenates of MKN45 was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(7.5 % or 12 %)polyacrylamide gel under reducing conditions. Molecular mass expressed in kilodaltons(kDa). The lane labels are (1) untreated control (2) 5-FU treated.

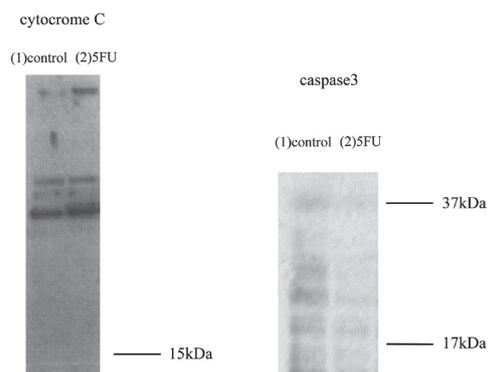


Fig. 13. Western blotting patterns of p53, Bax and NF κ B in MKN45 treated with 5-FU. Western blot analysis of p53 and NF κ B in MKN45 treated with 5-FU (3 μ g/ml) for 48hr. Total protein (20 μ g) from the homogenates of MKN45 was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% or 12%) polyacrylamide gel under reducing conditions. Molecular mass expressed in kilodaltons(kDa). The lane labels are (1) untreated control (2) 5-FU treated.

4. 考 察

5-FUは、Heidenbergerの発見(1957年)から40年を経過した今日、各種の固形癌に対するキードラックとなった¹³⁾。この間、5-FUの抗腫瘍効果の発現機序の詳細が明らかにされ、2つの機序が考えられている。一つは、DNA合成障害を引き起こす機序である。5-FUは生体内でジヒドロピリミジン脱水素酵素dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)によって速やかにF- β -alanineに分解されるが、分解を免れた5-FUはリン酸化を受けてFdUMPになる。FdUMPは、還元型葉酸、およびDNAのde novo系合成酵素であるチミジル酸合成酵素thymidylate synthase (TS)の3者でternary complexを形成する。このときTSが消費されて活性低下が生じDNA合成障害が生じて抗腫瘍効果が発現する。他は、RNA機能障害を起す機序である。腫瘍細胞内において、5-FUがリン酸化され、FUMP、FUDPを経てFUTPとなる。このFUTPを取り込むとRNAに機能障害が生じ抗腫瘍効果が発揮される¹⁴⁾。

Mitomycin C, Adriamycinなどのキノン系抗腫瘍薬では、細胞内でキノン構造がセミキノンラジカルになるときに産生されたROSにより、DNA鎖が切断されるために癌細胞は死滅する。CDDP, Bleomycinなどでは、金属イオンの配位に際してROSの産生によってDNA障害が起こる。このように、抗腫瘍作用を発揮する機序にROSが関与する抗腫瘍薬は多い^{11,12)}。しかし、5-FUにおいて、TS活性阻害によるDNA合成障害と、FUTPによるRNA機能障害が顕著であるところから、抗腫瘍効果発現におけるROSの関与に関心が寄せられることは少なく、僅かに扁平上皮癌細胞への5-FU添加により活性酸素種産生をみたという報告、NA細胞や、

HeLa細胞へ5-FU添加によりSOD活性の増強をみたという報告などがあるのみである¹⁵⁻¹⁷⁾。

そこで、5-FUによる抗腫瘍効果の発現機序とROSとの関係を検討した。

我々は、ROSの測定に蛍光色素6-carboxy2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)を用いた。この蛍光色素は、細胞内に取り込まれると加水分解されて透過性を失うため細胞外への漏出が少なく、細胞内にあるROSにより酸化されたときに蛍光を発する¹⁶⁾。このことから、FACSによる蛍光強度の測定によって、細胞内ROS量が計測できる。

ROSの産生は、5-FUが低濃度(3 μ l/ml)のときに多く、暴露時間が長いほど、その産生度はより増加した。当初、5-FUは、時間依存性とされていたが、低濃度長時間でDNA合成障害が生じ、高濃度短時間でRNA機能障害が発現することが近年、明らかにされた¹⁷⁾。今回の検討において、低濃度長時間の暴露でROSの産生が特に顕著であった。

さて、ROSのうち、ヒドロシキラジカルと一重項酸素によりDNA傷害が生じる。ヒドロシキラジカルはDNAのグアニン残基と反応して8-hydroxy-2' deoxyguanosine (8OHdG)を形成することから、8OHdGはROSによるDNA障害の指標とみなされる^{17,21)}。今回、CDDPおよび5-FUの暴露によりMKN45癌細胞中の8OHdGは増加した。長時間低濃度の5-FUに暴露された癌細胞において、ROSおよび8OHdGの産生が増強された。また抗酸化剤添加により、ROSや8OHdGの低下を認めたことから、5-FUの抗腫瘍効果にはROSが関与し、特にDNA合成障害がもたらされる可能性が窺われた。

そのROSの機序であるが、細胞内にはキサンチンオキシターゼ、シクロオキシゲナーゼ、NO synthetase (NOS)、NADPHオキシターゼなど多くのROS産生系酵素がある。特にMMCにおいてはNADPHオキシターゼが関与するとされている²²⁻²⁴⁾。今回、我々はウエスタンブロット法にてNADPHオキシターゼの活性中心サブユニットであるp22蛋白を検出したところ、5-FU添加の48時間後にp22蛋白の増加が明らかであった。しかも、SODなどの消去系酵素も、経時的増加を示したことから、5-FUによる活性酸素産生にNADPH oxidaseが関与すること、さらに、過剰のスーパーオキシド産生による相補作用としてSODの産生増加が予測された。

これまでCDDPによるROS産生の著明な上昇が報じられている¹²⁾が、今回の実験において、CDDPと同様5-FUによって、癌細胞におけるROSの増加および、8OHdGの増加が認められた。これについては、5-FU添加が癌細胞にとって大きなストレスとなってROS産生が亢進し、DNA障害が引き起こされると考えられた。一方、非癌細胞の血管内皮細胞では、5-FU、CDDPによりROS増加をみたものの、8OHdGの産生

増加がなかったことから、5-FUによるROSを介したDNA損傷にいたることは少ないものと考えられた。

また、ROSによるDNA障害は核のDNAのみならず、ミトコンドリアのDNA (MtDNA) にも及ぶ。そのためROSが最も多く生成されるミトコンドリアで、その傷害が生じたときROSの放出は顕著である。ROS放出が抗酸化系での処理能を超えたとき、残余の活性酸素はMtDNAに障害を与え、MtDNA損傷による転写阻害から細胞死滅に至り、抗腫瘍効果が発揮されるものとも考えることもできる。

また、5-FUによるapoptosisについては、cytchrome C, caspase 9, caspase 3の変動がWestern blot法で認められなかったことからミトコンドリア系を介したapoptosisは否定された。また、Fas, caspase 8の変動もみないことから、Fasを介するapoptosisも否定できた。更にTNF- α の変動も認められなかったことから、通常のapoptosisを介したものではないと考えられた。

一方、ROSの細胞伝達シグナルであるNF- κ Bの上昇が認められ、Baxおよびp53産生が亢進したことから、caspase-independentなapoptosisにより抗腫瘍作用が生ずると考えられた。

これまで、5-FUについては癌細胞のDNA合成障害、RNA機能障害の機序が明らかにされてきたが、今回の検討により、5-FUによる抗腫瘍作用に、ROSの産生増加に伴うDNA損傷、およびROSの産生増加に伴うNF- κ B, Bax, p53を介したcaspase-independentなapoptosisが関与しているものと考えられた²⁵⁾。

5. 謝 辞

稿を終えるに当たり、埼玉医科大学外科学(消化器・一般外科部門 消化器・一般外科(II)) 平山廉三教授の御校閲、当教室、辻美隆講師、ならびに生化学教室 菰田二一教授、松永俊之助手の御指導に深謝いたします。実験助手 三吉さおり様と河相淳子に感謝いたします。

6. 文 献

- 1) 三上公治, 白日高歩, 鶴尾隆. 癌抑制蛋白質と制癌剤 その構造と機能 制癌剤 DT-diaphorase. 癌と化学療法 1997;24:1606-10.
- 2) 五味克成. マイトマイシンC耐性のメカニズムと耐性腫瘍に有用な誘導体. BIOmedia 1991;6:482-5.
- 3) 田口鐵男. マイトマイシン 癌化学療法の歩みとともに. 東京:(株)協和企画通信;1984.p.81-2.
- 4) 佐伯修二, 西山正彦, 青儀健二郎, 峠哲哉. ヒト培養細胞におけるNAD (P) H: quinone oxidoreductase 活性とマイトマイシンC感受性. 医学のあゆみ 1993;164:917-8.
- 5) Berlin V, Haseltine WA. Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. J Biol Chem 1981;256:4747-56.
- 6) Alegria AE, Samuni A, Mitchell JB, Riesz P, Russo A.

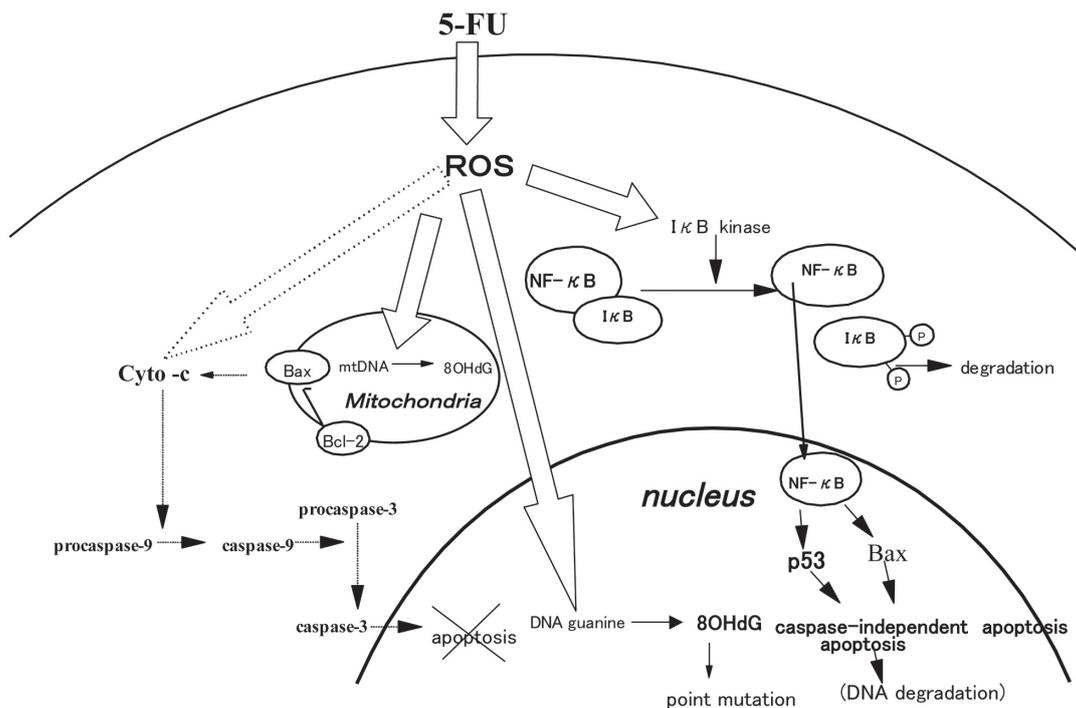


Fig. 14. Schematic representation of 5-FU in cancer cell death mechanism.

- Free radicals induced by adriamycin-sensitive and adriamycin-resistance cells: A Spin-Trapping study. *Biochemistry* 1989;28:8653-8.
- 7) 古倉聡, 吉川敏一, 岸明彦, 富井隆, 辻際雅哉, 安田光徳. アントラサイクリン系抗癌剤腫瘍作用における活性酸素の役割. *癌と化学療法* 1990;17:1711-4.
- 8) Sasada T, Iwata S, Sato N, Kitaoka Y, Hirota K, Nakamura K, et al. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 1996;97:2268-76.
- 9) Tonetti M, Giovine M, Gasparini A, Benatti U, De Flora A. Enhanced formation of reactive species from cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) (carboplatin) in the presence of oxygen free radicals. *Biochem Pharmacol* 1993;46:1377-83.
- 10) Kurt S, Zanker, Ronald Kroczeck. In vitro Synergistic Activity of 5-Fluorouracil with Low-Dose Ozone against a Chemoresistant Tumor Cell Line and Fresh Human Tumor Cells. *Chemotherapy* 1990;36:147-54.
- 11) Hara N, Ichinose Y, Motohiro A, Kuda T, Aso H, Ohta M. Influence of chemotherapeutic agents on superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer* 1990;66:684-8.
- 12) Masuda H, Tanaka T, Takahama U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1175-80.
- 13) 和田洋巳, 田中文啓. 抗癌剤経口投与のススメ. 大阪:メディカルレビュー社;2001:p.13-25.
- 14) 金丸竜之介, 涌井昭. 抗腫瘍剤の作用機序からみた化学療法 RNA代謝の面からみた抗腫瘍剤の作用. *癌と化学療法* 1988;15:1011-8.
- 15) Ueta E, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Manganese superoxide dismutase negatively regulates the induction of apoptosis by 5-fluorouracil, peplomycin and gamma-rays in squamous cell carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:555-64.
- 16) 谷口直之. 活性酸素プロトコール 秀潤社;1999: p.23-30.
- 17) Gogun Y, Sakurada S, Kimura Y, Nagumo M. Enhancement of Superoxide Dismutase Activity in Cancer Cell Lines by Anticancer Drugs *J Clin Biochem Nutr* 1990;8:85-9.
- 18) Bravard A, Beaumatin J, Dussaulx E, Lesuffleur T, Zweibaum A, Luccioni C. Modifications of the anti-oxidant metabolism during proliferation and differentiation of colon tumor cell lines. *Int J Cancer* 1994;59:843-7.
- 19) Inaba M, Mitsuhashi J. Flow cytometric analysis of cell-killing actions of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cells. *Oncol Res* 1994;6:303-9.
- 20) 中島円, 竹内亨, 荻野景規. 酸化的DNA損傷物質8ヒドロキシデオキシグアノシン 酸化ストレス指標としての有用性と発がん性について. *Journal of Physical Fitness, Nutrition and Immunology* 2000;10:153-60.
- 21) Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-63.
- 22) de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999;26:202-26.
- 23) Takaki A, Shimizu N. An 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) formation as an oxidant stress marker. *Jpn J Physiol* 2001;51 Suppl:S278.
- 24) Komiyama T, Kikuchi T, Sugiura Y. Generation of hydroxyl radical by anticancer quinone drugs, carbazilquinone, mitomycin C, aclacinomycin A and adriamycin, in the presence of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem Pharmacol* 1982;31:3651-6.
- 25) Maria Tomaz. H₂O₂ generation during the redox cycle of mitomycin C and DNA-bound mitomycin C. *Chem Biol Interaction* 1976;13:89-97.
- 26) Johnson MD, Xiang H, London S, Kinoshita Y, Knudson M, Mayberg M, et al. Evidence for involvement of Bax and p53, but not caspases, in radiation-induced cell death of cultured postnatal hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 1998;54:721-33.