

生活習慣病に関わる生体レドックス変動の検出と予防法の開発

九州大学大学院 薬学研究院 機能分子解析学
山田 健一

1. はじめに

活性酸素は、シグナル伝達や遺伝子発現など、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。その一方で、脂質、タンパク質、あるいはDNAを損傷し、癌やアルツハイマー病などの様々な酸化ストレス疾患を引き起こす¹⁾。なかでも、脂質過酸化生成物やその代謝産物は、タンパク質・DNA複合体を形成し、変異原性や発癌性、さらに血管新生など疾患の発症・進展に深く関与している^{2,3)}。この脂質過酸化物の生成は、脂質ラジカルを起点とし、連鎖反応により増大する。したがって、脂質ラジカルを検出・あるいは捕捉することができれば、その後の連鎖反応を抑制でき、酸化ストレス疾患の機序解明の一助となると考えられる。

一方で、ニトロキシドプローブは、脂質ラジカルなど炭素中心ラジカルと鋭敏に反応する。そのため抗酸化剤として、あるいは磁気共鳴法における造影剤として広く用いられてきた。しかし、大型の設備が必要であり、また検出した分子種の同定や感度など、克服すべき課題は数多い。そこで我々はこれらの問題点を解決するため、以下の点に着目した (図1a)。

① 蛍光物質は不対電子存在下で消光反応を示す⁴⁾

② ニトロキシド化合物は、フリーラジカルとの“ラジカル-ラジカル結合”により安定化する⁵⁾

③ その結果分子内不対電子が消失し、蛍光を示すであろうこと

以上より、生体内あるいは細胞内で生じている反応を可視化し、結合した分子種を組織切片などから特定できると考えた。

そこで本研究では、脂質ラジカルと反応すると蛍光がONになる蛍光ニトロキシドを合成し、脂質ラジカルと反応するか否か、また細胞レベルでの評価を行った。さらに、本化合物を脂質ラジカル捕捉プローブとして用い、ジエチルニトロソアミン (DEN) 誘発肝癌モデルラットにおける肝癌抑制効果を検討した。

2. 方法

蛍光ニトロキシド：Dansyl Chlorideをリード化合物として、TEMPO系蛍光ニトロキシド化合物を合成し、評価に用いた (図1b)。

X-band ESR測定、蛍光測定：脂質ラジカル産生系として、リノール酸/リポキシゲナーゼ系を用いた。ニトロキシド化合物添加後、ESRスペクトルおよび蛍光強度を経時的に測定した。

細胞実験：DENを細胞に添加し、30分インキュベート後PBSにて洗浄し、10 μ Mの蛍光ニトロキシドプローブを加え蛍光を測定した。

DEN誘発肝癌モデル：F344ラット (雄性、6週齢) を自由摂食・飲水の条件下で1週間馴化させた後、DEN (100 mg/kg) を腹腔内投与した。その後、2~4週目に0.02%AAF含有飼料にて飼育し、12週後に肝臓を摘出し実験に供した。なお、DEN投与1あるいは24時間後にDansyl-TEMPOをラットに単回投与し、上記と同様に飼育した。

Fociの数・面積の測定：肝を摘出した後、脱血前に肝五葉全ての写真をとり、foci数をサイズごとに計測した。

免疫染色：肝臓を脱血後、10%ホルマリン溶液で固定後、パラフィンブロックを作成し切片を作成した。それらの切片を用いPCNA (proliferating cell nuclear antigen) 染色を行った。キーエンス顕微鏡にて観察し、陽性部分をキーエンス解析ソフトにより抽出し、陽性数を測定した。

3. 結果・考察

Dansyl-TEMPOは、脂質ラジカルと未反応の状態では蛍光をほとんど発しなかったが、リポキシゲナーゼ添加後からESRシグナル強度が減衰し、蛍光強度は上昇した(図1c,d,e)。また、脂質ラジカルとの反応後、蛍光波長が545→487 nmにシフトした。これは炭素中心ラジカルとの反応により蛍光原子団が疎水環境に置かれることで短波長シフトしたものと考えられる。シフト後の波長にて測定を行うことで、還元体等の影響を低減でき、より脂質ラジカルに特異的な解析が可能になった。さらに、LC/MS測定により反応後の構造解析を行ったところ、発生した炭素中心ラジカルとプローブが直接反応し、アダクトを形成していることが示唆された。ニトロキシドとペルオキシラジカルとの反応速度定数は小さく、安定なアダクトを生成しないことから、脂質過酸化反応の上流を捉えていると考えられる。

また、本化合物を培養細胞系へ応用した結果、DEN処理により細胞に生じた脂質ラジカルを可視化することにも成功した(図2)。

一方で、我々はこれまでに、ラットにDENを投与すると投与1時間後に脂質ラジカルが生成し、24時間後では検出できないことをESR/スピントラップ法を用いて報告している⁶⁾。また、DEN投与24時間後にはフリーラジカルによるDNA損傷の指標である8-OHdGレベルが最大となり、8-OHdG生成量とその後の前癌病変の進展が相関することも報告されている⁷⁾。すなわち、DEN投与により生成した脂質ラジカルが、発がんに密接に関与しているのであれば、脂質ラジカルの検出・消去は、その後のがん化を抑制すると考えられる。そこで、DEN投与1時間あるいは24時間後にDansyl-TEMPOを単回投与し、その影響を観察した。その結果、DEN誘発肝癌モデルにおいて増加した前癌病変foci数と合計面積、核内増殖抗原であるPCNA(+)数が、DEN投与1時間後にDansyl-TEMPOを投与することで有意に減少した。一方、DEN投与24時間後にDansyl-TEMPOを投与した群では、効果はなかった(図3)。以上の結果より、DEN投与初期に生成した脂質ラジカルを適切に捉えることで、肝癌抑制効果をもたらす可能性が示唆された。

4. まとめ

本研究では、蛍光ニトロキシドプローブが脂質ラジカルと反応することで、蛍光のOFF/ONを制御できることを示した。同時にプローブとの反応生成物の同定を行うことで、脂質ラジカルなどの反応中間体の検出が可能であることを示した。さらに細胞レベルでも使用できることがわかった。また脂質ラジカルを適切に捉えることで、その後のがん化を有意に抑制することも示した。本研究における蛍光ニトロキシドプローブの評価、および解析手法の構築への基礎的検討は、今後の新規化合物開発の方向性を示すとともに、多方面からのフリーラジカル解析への応用展開につながると期待できる。

5. 参考文献

- 1) Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol*, 153:6-20, 2008.
- 2) West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG, Byzova TV. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature*. 467:972-976, 2010.
- 3) Blair IA. DNA adducts with lipid peroxidation products. *J Biol Chem*. 283:15545-15549, 2008
- 4) Green SA, Simpson DJ, Zhou G, Ho PS, Blough NV. Intramolecular quenching of excited states by stable nitroxyl radicals. *J Am Chem Soc*, 112:7337-7346, 1990.
- 5) Wright PJ, English AM. Scavenging with TEMPO* to identify peptide- and protein-based radicals by mass spectrometry: advantages of spin scavenging over spin trapping. *J Am Chem Soc*, 125:8655-8665, 2003.
- 6) Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine (DEN) in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med*, 40: 2040-2046, 2006.
- 7) Nakae D, Kobayashi Y, Akai H, Andoh N, Satoh H, Ohashi K, Tsutsumi M, Konishi Y. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Res*, 57: 1281-1287, 1997.

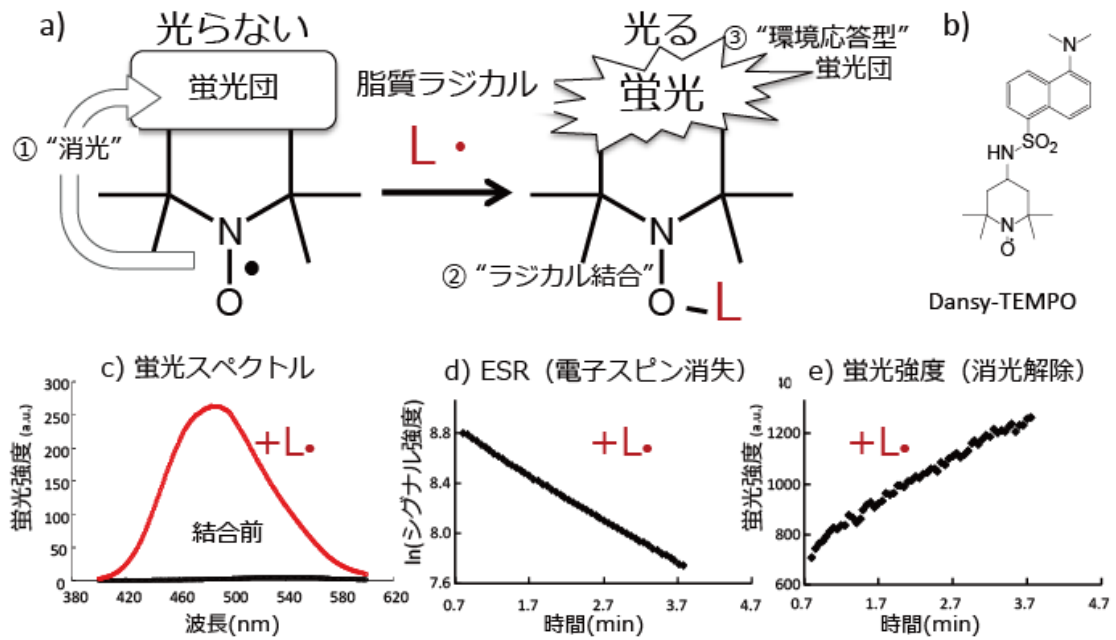


図1. 蛍光ニトロキッドを用いた脂質ラジカルの検出。a) 反応原理。b) Dansyl-TEMPO 構造。c) 蛍光ニトロキッドと脂質ラジカルとの反応後の蛍光スペクトル。d) ESR シグナル強度、e) 蛍光強度変化。脂質ラジカルは、リノール酸/リポキシゲナーゼ系にて発生させた。

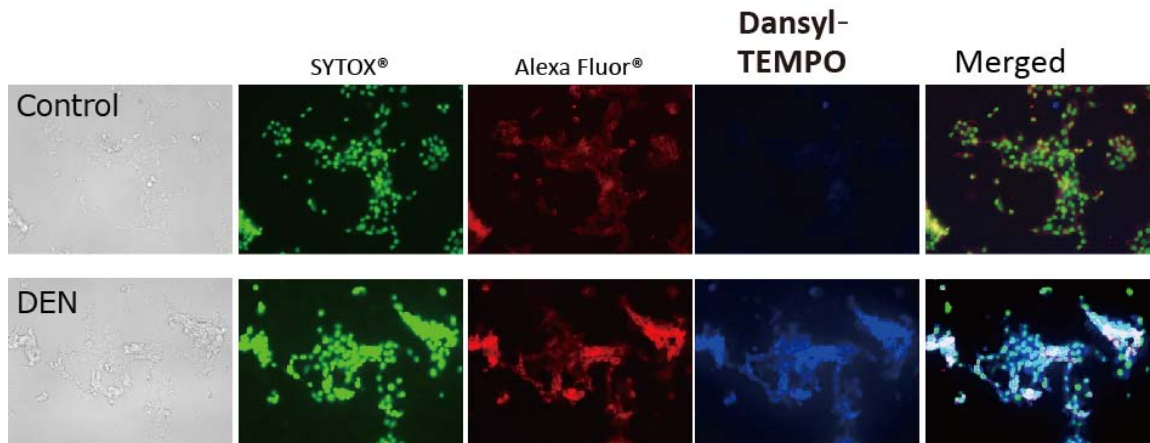


図2. ニトロソアミンを細胞に添加し、Dansyl-TEMPO にて脂質ラジカルを検出。

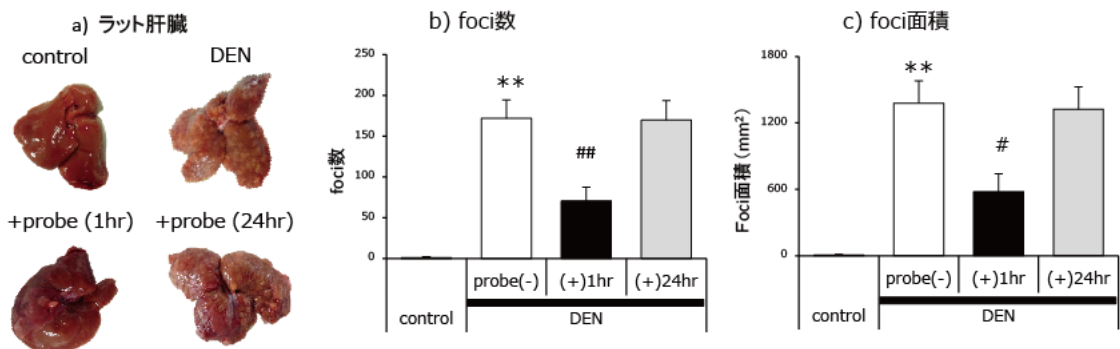


図3. 化学発がんモデル動物を用いたニトロキッドの抑制効果。DEN 投与 1 時間後にニトロキッドをラットに単回投与し、12 週間後の Foci を評価。a) ニトロソアミン投与 12 週目のラット肝臓。b) foci 数、c) foci 面積