

## 博士学位論文審査結果要旨

西暦 2022年 2月 11日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 雨倉 咲希子

論文題目 医療用抗酸化物質エダラボンの次亜塩素酸イオンおよび一重項酸素消去メカニズム

### 審査結果の要旨

令和4年2月9日に東京工科大学において、学位申請者雨倉咲希子の学位審査公開発表会が開催され、以下の要旨に示す博士論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

本学位論文は、医療用抗酸化物質であるエダラボンと次亜塩素酸イオン ( $\text{ClO}^-$ )、および一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) との特異的反応生成物を同定し、それらの反応メカニズムを詳細に解明している。さらに、同定したエダラボン酸化生成物を、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者血漿から検出し、発生している活性酸素種 (ROS) について報告している。

第1章では、本研究の背景と問題点、それを踏まえた本研究の目的を記述している。種々の疾病との関連が多く報告されている酸化ストレスは ROS によって引き起こされる。酸化ストレスが関与していると考えられている疾病に対する治療法は、これら ROS を捕捉・消去し、無害化することである。初期の抗酸化療法では ROS の中でもラジカル種に着目し、多くの介入試験が実施された。しかしながら、予防効果や症状改善効果はみられたものの、期待していたほどの結果は得られなかった。酸化ストレスの関与が疑われている虚血再灌流障害や炎症などの患者生体内では、ラジカル他、パーオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ )、 $\text{ClO}^-$ 、 $^1\text{O}_2$  も生成していると予想される。したがって、今後の抗酸化療法では、 $\text{ONOO}^-$ 、 $\text{ClO}^-$ 、 $^1\text{O}_2$  などの ROS に対する対処法も考える必要がある。

2001年に開発された人工抗酸化物質であるエダラボンは、脳梗塞急性期の治療薬として応用されている。虚血・再灌流時に発生するフリーラジカルを消去し、酸化傷害から脳組織を保護することで予後を改善するとされている。実際に、エダラボンは水溶性、脂溶性ラジカルに対して高い反応性を示し、2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid (OPB) を生成することが明らかになっている。しかし、その効果を考えると、ラジカル以外の ROS に対しても効果的であると推察され、事実、 $\text{ONOO}^-$  に対しても高い反応性を示し、4-NO-edaravone および 4- $\text{NO}_2$ -edaravone を生成することが報告されている。しかしながら、 $\text{ClO}^-$ 、 $^1\text{O}_2$  に対するエダラボンの反応性は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、エダラボンの  $\text{ClO}^-$ 、 $^1\text{O}_2$  に対する反応性を検討し、反応生成物の同定および反応メカニズムの解明を行うことを目的とした。

第2章では、エダラボンの  $\text{ClO}^-$  に対する反応性を検討し、反応生成物の同定および反応メカニズムの解明を行った。 $\text{ClO}^-$  との反応速度定数が既知の抗酸化物質を均一溶液中でエダラボンと共存させ、そこに  $\text{ClO}^-$  を一定速度で導入して競争反応を行った。両者の減少速度から反応速度定数比を算出し、エダラボンと  $\text{ClO}^-$  の擬二次反応速度定数を間接的に求めた。対照とした抗酸化物質にはグルタチオン、システイン、メチオニンおよび尿酸を用いた。これにより、エダラボンの  $\text{ClO}^-$  に対する擬二次反応速度定数は  $10^6$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  程度と見積もられた。次に、エダラボン単独で  $\text{ClO}^-$  と反応させたところ 2 つの不明化合物 (UK1, UK2) が認められ、これらを飛行時間型質量分析計付き HPLC (LC/TOFMS) にて分析した。得られた精密質量電荷比から推定された化学組成は  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}$  (UK1) および  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$  (UK2) であり、このことから UK1 は 4-Cl-edaravone、UK2 は (*E*)-2-chloro-3-[(*E*)-phenyldiazenyl]-2-butenic acid (CPB) と推定した。

4-Cl-edaravone および CPB を分離・精製し、 $\text{ClO}^-$  と反応させた。4-Cl-edaravone は  $\text{ClO}^-$  と反応し CPB が生成した。一方、CPB は  $\text{ClO}^-$  とは反応しなかった。このことから 4-Cl-edaravone は一次生成物、CPB は最終代謝物であることが示唆された。さらに詳細に反応を解析したところ、4-Cl-edaravone と  $\text{ClO}^-$  の反応の化学量論数は約 1.0 であり、4-Cl-edaravone と  $\text{ClO}^-$  は 1 分子対 1 分子で反応することが示唆された。同様にしてエダラボンと  $\text{ClO}^-$  の反応の化学量論数も検討したところ、これも 1.0 と推察された。このことからエダラボンと  $\text{ClO}^-$  の反応メカニズムを以下のように推定した。エノール型のエダラボンは 1 分子の  $\text{ClO}^-$  と反応し 4-Cl-edaravone を生成する。さらに 4-Cl-edaravone はもう 1 分子の  $\text{ClO}^-$  と反応し中間体として 4,4-dichloro-edaravone を生成する。4,4-dichloro-edaravone は 1N-5C 間が加水分解されて 2,2-dichloro-3-phenylhdrazono butanoic acid となり、 $\text{Cl}^-$  と水の脱離を経て CPB が生成する。また、4-Cl-edaravone と CPB は分子内に Cl を有していることから、 $\text{ClO}^-$  に特異的な反応生成物であり、エダラボンを投与された生体試料からこれらの化合物が検出されれば、 $\text{ClO}^-$  の関与が示される。

第 3 章では、エダラボンの  $^1\text{O}_2$  に対する反応性の検討、反応生成物の同定、および反応メカニズムの解明を行っている。 $\text{ClO}^-$  の時と同様に、対照に尿酸、メチオニン、システイン、トリプトファンを用いた競争反応で、間接的にエダラボンの  $^1\text{O}_2$  に対する擬二次反応速度定数を算出した。その結果、擬二次反応速度定数は  $10^8\text{-}10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  程度と算出された。また、その反応速度は溶液の pH に大きく依存し、エダラボンエノールの pKa (7.0) 付近で急激に増加した。そして、その酸化速度を溶液の pH に対してプロットしたところ、エダラボンの電離の理論曲線とよく一致した。このことからエダラボンの  $^1\text{O}_2$  に対する反応性は、アニオン化で生じるオキシド基からの電子供与によりピラゾリン環の電子密度が上昇することに依存するものと強く推察された。次に LC/TOFMS を用いてエダラボンの光酸化生成物を分析したところ、上述の OPB と同一の MS スペクトルが得られ、HPLC クロマトグラムも完全に一致した。このことからエダラボンと  $^1\text{O}_2$  との反応で OPB が生成することが示された。ラジカルによる OPB の生成メカニズムは既に報告されており、中間体として 4-oxoedaravone が生成する。しかし、光酸化では 4-oxoedaravone は観察されず、ラジカル酸化反応とは異なる経路となることが示唆された。そこで、そのメカニズムを以下のように推定した。 $^1\text{O}_2$  はエダラボンアニオンの 4,5 間の二重結合と反応して 4,5-ジオキセタンを生成する。その後 5 位の CO 間がヘテロ開裂して生成したパーオキシルアニオンと水分子が反応し、 $\text{HO}^-$  の脱離により OPB が生成する。この反応は  $\text{HO}^-$  の脱離が律速段階であり、pH が 9 以上になると反応速度が減少することとも一致する。最後に生体内で  $\text{ClO}^-$  および  $^1\text{O}_2$  の発生源となるミエロパーオキシダーゼ (MPO) によるエダラボンの酸化を行った。その結果、エダラボンの減少に伴って、4-Cl-edaravone と CPB、OPB の生成が確認された。このことから、4-Cl-edaravone と OPB の同時検出は MPO 活性のマーカーになり得ると期待される。

第 4 章ではエダラボンが投与された ALS 患者血漿の分析を行い、エダラボン酸化生成物の検出を試みた。血漿中のエダラボン代謝物は非常に低濃度であると予想されるため、分析には高感度・高選択性が期待されるタンデム型質量分析計付き HPLC (LC/MS/MS) を使用した。この系を用いて ALS 患者血漿を分析したところ、エダラボン、OPB、4-Cl-edaravone がエダラボン投与後の ALS 患者血漿から検出された。また、その生成量は病状の亢進度合いを示す指標と弱い相関関係にあった。このことから、本病態患者血漿中で  $\text{ClO}^-$  および  $^1\text{O}_2$  が発生していることが示唆された。両 ROS が発生する系として、前述の MPO が予想されたため、ALS 患者血漿を電気泳動後、MPO の特異的抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法で分析したところ、MPO 重鎖が観察された。以上のことから、ALS に MPO が関与していると考えられる。

第 5 章では結語として、エダラボンの臨床応用の拡大に対する期待を議論している。様々な ROS と高い反応性を示すエダラボンは脳梗塞や ALS のみならず、敗血症などの病態にも応用が可能だと期待される。また、エダラボンは ROS に対して特異的な反応生成物を与える。エダラボンが投与された患者の生体試料を分析することで、患者生体内で発生している ROS の同定が可能になると期待される。

上記の研究に対する学位審査公開発表及び応答も妥当なものであり、審査員会は、本論文の著者に対し、博士 (工学) の学位を授与するための十分な学力と能力を有しているものと認める。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 加柴 美里