

## 博士学位論文審査結果要旨

平成 30 年 2 月 22 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 飯田 沙也加

論文題目 生体中の一重項酸素や次亜塩素酸生成のプロープ分子としての尿酸

### 審査結果の要旨

平成30年2月13日に東京工科大学において、学位申請者飯田沙也加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、尿酸(UA)と一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )及び次亜塩素酸イオン( $\text{ClO}^-$ )との特異的反応生成物を同定し、UA酸化生成物を用いた酸化ストレスと疾患の関連性を評価する新規の酸化ストレス・マーカーを開発することを目的としている。そして、筋萎縮性側索硬化症(ALS)と敗血症患者の血漿を分析することでその病態における酸化ストレスとの関連性を報告している。

第1章では、研究背景として酸化ストレスと疾患、抗酸化物質、現在までに開発されてきた酸化ストレスのマーカーについて詳細に述べ、本論文の意義と目的を明らかにしている。酸化ストレスが、老化、脳梗塞及び心筋梗塞などの虚血・再灌流傷害、そしてALSなどの神経疾患に深く関与していると考えられている。そのため、これらの疾病に対する有効な抗酸化療法の開発が強く望まれている。事実、日本で開発された抗酸化物質であるエダラボンは、前述の脳梗塞急性期に対する脳保護剤として2001年に日本で認可された。また、ALSの適用薬としての応用が日本で2015年に、米国で2017年に認可された。今後、エダラボンの適用は世界規模で拡大すると予想され、同時に抗酸化療法の重要性にも注目が集まると考えられる。

一方で、抗酸化療法を考える際、*in vivo*で発生する活性酸素種(ROS)を同定することが極めて重要である。ROSは反応性が高いため直接検出することは困難であるが、適切な基質との反応生成物を検出することで、間接的に同定することが可能であると考えられる。そのための基質として、ROSに対して感受性が高く、生体内にユビキタスに、かつ高濃度に存在し、ROSに応じて異なる酸化生成物を与えるUAに着目した。本研究では、 $^1\text{O}_2$ 及び $\text{ClO}^-$ との特異的反応生成物についての報告はないことに注目し、これらの酸化生成物の同定と、酸化生成物を用いた病態における酸化ストレスとの関連性を評価することを目的とした。

第2章では、UAと $^1\text{O}_2$ の特異的反応生成物とその反応経路について検討している。 $^1\text{O}_2$ はローズベンガルを増感剤に用いた光酸化、発生剤である3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl)propionic acid (NEPO)の熱分解、そして、 $\text{ClO}^-$ またはパーオキシナイトライト( $\text{ONOO}^-$ )による過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )の2電子酸化反応で発生させている。いずれの場合でもUAが減少し、複数の不明化合物の生成を認めた。そのうち2つの不明化合物の精密MSスペクトルから組成を推定し、 $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$ と $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$ と求めた。この結果から、両者をパラバン酸(PA)と、その加水分解生成物であるオキサール尿酸(OUA)であると推定した。次にこれらの標準物質を別途調製し、LC/TOFMSを用いて検出時間とMSスペクトルを各々比較したところ、両者いずれも一致したことから、これらをPAとOUAと同定した。加えて、PA

とOUAを定量してそれらの収率（UAの減少量に対するPAとOUAの生成量の割合）を求めたところ、光酸化及びNEPOを用いた系においてほぼ100%となった。また、 $H_2O_2$ の2電子酸化反応でも高い収率（37~50%）でPA及びOUAの生成が認められた。一方、パーオキシラジカル（ $AOO\cdot$ ）、スーパーオキサイド（ $O_2^-$ ）、 $ClO^-$ 単独、そして $ONOO^-$ 単独でUAを酸化した場合には、PA及びOUAの生成はほぼ認められなかった。このことから、PAは $^1O_2$ に対して特異性及び選択性の高い反応生成物であることが示された。

さらにUAを光酸化させた反応溶液から $C_5H_4N_4O_5$ 、 $C_4H_4N_4O_3$ 、及び $C_4H_6N_4O_4$ の組成の化合物も検出され、各々UA-peroxide, dehydroallantoin (DHA), 及び4hydroxyallantoin (4HA)と推定した。このうち比較的安定なUA-peroxideと4HAを単離し弱塩基性条件下で保存したところ、これらの分解に伴うPAの生成を認めた。このことから、これらの化合物はPAの直接の前駆体であると考えられた。また、UA-peroxideは単離後、中性領域にて保存するとDHAの生成も認めた。次に、 $^{16}O_2$ の安定同位体である $^{18}O_2$ 中での光酸化を行い、これらの反応生成物の組成を求めた。溶存酸素を $^{18}O_2$ に完全に置換し光酸化したところ、PA, UA-peroxide, DHA, 及び4HAの $^{18}O$ の一置換体のみが検出された。一方で、通常の大気下で水の安定同位体 $H_2^{18}O$ 中で同様の光酸化を行った場合、UA-peroxideと4HAの $^{18}O$ 一置換体が検出され、DHAには $^18O$ が導入されなかった。これらの結果、及びUA-peroxideのフラグメンテーションから、UA-peroxideは4-N-carboxyamino-carboxy-imino-hydantoin (4CH)であると推察され、PAは4C Hの $H_2O$ 付加後の分解、もしくはCHからDHAを経て生成される4HAから生成されると推定された。

第3章では、UAと $ClO^-$ の特異的反応生成物を同定し、その反応経路を考察している。UA溶液に次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）溶液をシリンジポンプにより一定速度で導入したところ、UAの経時的減少に伴う不明化合物の生成を認め、その推定組成を $C_5H_3N_4O_4Cl$ と求めた。また、NaClOの導入速度とUAの減少速度の比が約2.0となったことから、この反応の化学量論数は2であることが示された。これらの結果から反応メカニズムを推定し、生成物は5-N-carboxy-imino-6-N-chloroaminopyrimidine-2,4(3H)-dione (CCPD)であると予想した。その後、分離・精製したこの化合物のフラグメンテーションを確認したところ、質量電荷比-173, -138, -113, 及び-110のフラグメントを確認した。これらのフラグメントイオンはCCPDの化学構造を強く支持した。このことから反応生成物はCCPDであると同定した。また、UAの減少量に対するCCPDの生成量は40-70%程度にであった。加えて、CCPDは中性領域では安定に存在することから、酸化ストレス・マーカーとしての応用が可能であると考えられた。

第4章では、LC/MS/MSを用いた微量分析系の確立を行い、健常人、ALS及び敗血症患者血漿を分析している。まず、LC/MS/MSを用いた分析法の確立を行い、いずれのUA酸化生成物も $f$  molレベルでの検出が可能であることを示した。次に、健常人とALS及び敗血症患者の血漿を分析した。健常人からはUA酸化生成物は一切検出されなかったが、ALS患者の血漿からはPAと、UAと $ONOO^-$ との反応生成物であるトリウレット（TU）が検出された。また、ALS患者の血漿ではUA濃度が健常人に比べて極めて低かった。このことからALSには従来予想されていた $ONOO^-$ に加えて $^1O_2$ が関与している可能性が示唆された。一方、敗血症患者の血漿ではTUとシアヌル酸（CA）が検出された。CAもUAと $ONOO^-$ との反応生成物であることから、敗血症患者では循環血中で発生した $ONOO^-$ による酸化ストレスの亢進が示唆された。

第5章は第2章から第4章までの結果をまとめて総合的に考察し、本研究で確立された新規酸化ストレス・マーカーが種々の疾病に応用されることを期待している。

上記の研究に対する学位審査公開發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

東京工科大学准教授 藤沢 章雄

