

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790038

研究課題名（和文） 脂質ラジカル検出手法開発

研究課題名（英文） Development of lipid-derived radical detection method

研究代表者

山田 健一（YAMADA KENICHI）

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60346806

研究成果の概要（和文）：

生体内で生じる脂質ラジカルや過酸化物は、生活習慣病などの原因として広く認知されている。しかしながら、その疾患を誘発するキーファクターでもある脂質ラジカルの検出手法は、未だ確立していない。我々はこれまで、ニトロキシドラジカルが脂質ラジカルとラジカル-ラジカル反応すること、また蛍光団と不対電子の相互作用により消光反応が生じることに着目し研究を進めてきた。そこで本研究では、蛍光物質を開発し生体内で産生する脂質ラジカルの新たな検出手法の開発を目的とした。

研究成果の概要（英文）：

Lipid-derived radicals and peroxides are involved in the pathogenesis of oxidative stress diseases. However, a useful lipid radical detection method has remained tentative. We focused on nitroxide reactivity, which allows spin trapping with carbon-centered radicals via radical-radical reactions and fluorophore quenching through interactions with nitroxide's unpaired electron. Thus, the aim here was to demonstrate a useful detection method for lipid-derived radicals in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：脂質、過酸化脂質、ラジカル、蛍光、スピン、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

我々が生活していく上で、エネルギー生成や物質の移動には、電子の授受（酸化還元反応）が基盤となっている。しかしながら、人体でこの酸化還元反応の破綻、すなわち、「酸化

ストレス」が生じると、疾病が発症する。例えば、高血圧や糖尿病、脳卒中などの生活習慣病の患者の爆発的な増加は、酸化還元の破綻がキーとなり、ドミノ倒しのごとく疾患が

連鎖していくともいえる。この中で脂質ラジカルは、酸化ストレスの連鎖反応開始点となり得、細胞膜機能の破綻を引き起こし、またそれ自身が細胞障害のキーファクターでもある。しかしながら、脂質ラジカルを直接検出する手法は、ESR/スピントラップ法以外開発されていない。一方、我々はこれまで、有機化合物であるニトロキシドラジカル (>N-O 安定ラジカル体)が脂質ラジカルなどと、“ラジカル-ラジカル反応にて共有結合する”ことに着目し、造影剤や抗酸化剤としての利用に向け研究を行ってきた。例えば、発癌物質であるニトロソアミン誘発肝癌モデルでは、過酸化脂質の二次代謝産物よりもかなり早い時期に脂質ラジカルが産生していることを報告した。

一方で、このニトロキシドラジカルは、生体内で容易に還元されるという問題点があった。そこで我々は、この分子の反応点周囲である 2, 6 位を置換すると酸化還元電位や反応性が変化するのはとの考え、新たな合成手法を開発した。その結果、酸化還元電位が変化し、また生体内還元剤とも全く反応せずに、フリーラジカルと反応する化合物の創出に成功した。

2. 研究の目的

以上の背景のものと、本研究では、酸化ストレス疾患時に産生する脂質ラジカルの検出手法を開発し評価するために、蛍光ニトロキシド内の不對電子と蛍光物質の消光反応に着目し、以下 3 点を目標とした。

- 1) 脂質ラジカルの検出手法開発
- 2) モデル実験による検証
- 3) 細胞・疾患モデルを用いた検証

3. 研究の方法

1) 蛍光消光原理を利用した脂質ラジカル検出ニトロキシドの開発：

Dansyl-TEMPO は、Likhtenshtein ら報告に従い合成した。また、2, 6 位を置換したニトロ

キシドは、申請者らがこれまで開発してきた手法を用いて蛍光ニトロキシドを合成した。

2) モデル実験による検証 (脂質ラジカルとの結合評価)： ESR 法、HPLC 法、LC-MS 法を用いて評価した。脂質ラジカル産生系は、リノール酸またはラット肝ミクロソームを用いた。リノール酸はリポキシゲナーゼと室温で、ラット肝ミクロソームは FeSO₄/システイン共存下 37°C でインキュベートの後、実験に供した。また、酸素濃度の影響は、実験に用いる全ての試薬・溶液を 100%窒素ガスまたは 99%窒素/1%酸素ガスでバブリングし、3 種類の酸素濃度溶液 (0.8、1.7、21.6%) を作成した。なお、溶液中の酸素濃度は電極法にて測定した。また、すべての実験操作は、グローブボックス内で行った。

3) 細胞・動物実験モデルでの検証 (ニトロソアミン誘発肝障害モデルを用いた評価)：細胞培養にニトロソアミンと蛍光ニトロキシドプローブを加えインキュベート後、細胞を固定し蛍光測定を行った。また、ニトロソアミンをラットに腹腔内投与し、一定時間後に蛍光ニトロキシドプローブ投与、肝を摘出し、組織染色を行った。コントロール群には生理食塩水を腹腔内投与した。

4. 研究成果

1) 脂質ラジカルの検出手法開発

有機スピン化合物であるニトロキシド化合物のラジカル近傍に異なる性質の置換基を導入することにより、脂質ラジカルとの結合を安定化できるのではないかと考えた。そこで、新規合成法を用いて合成し評価したところ、新規化合物が脂質ラジカルに対し数倍高い反応性を示す化合物の合成に成功した。また、蛍光物質が不對電子存在下、消光反応を示すことに着目し、ニトロキシド化合物が脂質ラジカルと結合すると光る (不對電子消失のため)、新たな検出試薬の開発にも成功した。

2) モデル実験による検証

以上の検討をもとに、モデル系としてリノール酸／リポキシゲナーゼ系で産生する脂質ラジカルに適用した。その結果、本化合物を用いることで、脂質ラジカルを検出できることを、ESR (ラジカル検出)、HPLC (蛍光検出、分離)、LC-MS (分離、質量解析) にて解析することに成功した。

一方、現在酸化ストレスの評価法として脂質過酸化生成物の定量が広く用いられているが、脂質過酸化反応には酸素分子が深く関与し、生体内の酸素濃度は部位により大きく異なる。そこで、蛍光ニトロキシドの特性を利用して、低酸素条件下における脂質ラジカル検出を行った。低酸素条件下で、リノール酸、及びラット肝ミクロソームの脂質過酸化を惹起し、スピントラップ、TBARs にて測定した。さらに、蛍光ニトロキシドの蛍光強度変化から脂質ラジカルを検出を行った。その結果、低酸素条件下においてスピントラップ法から、炭素中心ラジカルの生成量が増加し、TBARs 法から脂質過酸化生成物量が低下することがわかった。さらに、低酸素条件下では蛍光ニトロキシドの蛍光強度が増強した。

3) 細胞・疾患モデルを用いた検証

ニトロソアミン処理により、細胞中での蛍光ニトロキシドの蛍光強度は有意に上昇した。また、SYTOX® Green Nucleic Acid Stain、Alexa Fluor® 594 conjugate により多重染色した。その結果、蛍光ニトロキシドプローブは、細胞膜内で蛍光を発していることが示され、細胞内に生じた炭素中心ラジカル産生を捉えている可能性が示唆された。

次に、ラットにニトロソアミン投与一定時間後、蛍光ニトロキシドを腹腔内投与し、肝を摘出後凍結切片を作成した。その結果、コントロール群と比べ、ニトロソアミン投与群で、有意に蛍光ニトロキシドの蛍光強度が増加していた。しかし、ある程度のバックグラウンド蛍光が観察されることから、今後は、より長波長の蛍光団を用いた化合物の開発を目指す予定である。

以上の結果より、新たに蛍光ニトロキシドを開発することで、生体内での脂質ラジカルを掲出できる可能性が示唆された。今後、この手法を利用して、酸化ストレス疾患の発症・進行における脂質ラジカルの変動が解析可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yamasaki T, Mito F, Ito Y, Pandian S, Kinoshita Y, Nakano K, Murugesan R, Sakai K, Utsumi H, **Yamada K.** Structure-reactivity relationship of piperidine nitroxide: electrochemical, ESR and computational studies. *J Org Chem.* 76(2):435-40. 2011. DOI: 10.1021/jo101961m (査読あり)
2. Yamasaki T, Ito Y, Mito F, Kitagawa K, Matsuoka Y, Yamato M, **Yamada K.** Structural concept of nitroxide as a lipid peroxidation inhibitor. *J Org Chem.* 76(10):4144-8. 2011. DOI: 10.1021/jo200361p (査読あり)
3. Mito F, Kitagawa K, Yamasaki T, Shirahama C, Oishi T, Ito Y, Yamato M, **Yamada K.** Oxygen concentration dependence of lipid peroxidation and lipid-derived radical generation: application of profluorescent nitroxide switch. *Free Radic Res.* 45(9):1103-10. 2011. doi:10.3109/10715762.2011.595410 (査読あり)
4. Kinoshita Y, **Yamada K.**, Yamasaki T, Mito F, Yamato M, Kosem N, Deguchi H, Shirahama C, Ito Y, Kitagawa K, Okukado N, Sakai K, Utsumi H. In vivo evaluation of novel nitroxyl radicals with reduction stability. *Free Radic Biol Med.* 49(11): 1703-9. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.027> (査読あり)

あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. **Yamada K.** Matsuoka Y, Yamasaki T, Mito F, Kitagawa K, Oishi T, Ito Y, Shirahama C, Yamato M. Lipid-derived radical detection method: profluorescent nitroxide switching. Society for Free Radical Biology and Medicine 18th Annual Meeting, Atlanta, USA November 16-20, 2011.
2. **Yamada K.** Yamasaki T, Mito F. Development and Application of α -Substituted Piperidine Nitroxides. International conference devoted to Synthesis, Properties and Implications of Nitroxides. Marseilles, France, September 26-2, 2011.
3. **Yamada K.** Kinoshita Y, Yamasaki T, Mito F, Yamato M, Ito Y, Kitagawa K, Kosem N, Pandian S, Nakano K, Murugesan R, Okukado N, Sakai K, Utsumi H. In vivo evaluation of novel nitroxyl radicals (nitroxide) with reduction stability. International Symposium of Free Radical Research: Contribution to Medicine, Kyoto, January 20-22, 2011.
4. **Yamada K.** Kinoshita Y, Yamasaki T, Mito F, Yamato M, Kosem I, Deguchi H, Shirahama C, Ito Y, Okukado N, Sakai K, Utsumi H. General consideration of ascorbic acid resistance nitroxide. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), Hawaii, USA, December 15-20, 2010.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 健一 (YAMADA KENICHI)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60346806

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：