

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659740

研究課題名（和文）細胞傷害の原因となる一重項酸素を細胞内外で特異的に消去する

## 薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of the novel compound which specifically scavenges singlet oxygen extra- and intracellularly.

研究代表者 荒井 俊之 (Arai Toshiyuki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80175950

## 研究成果の概要（和文）：

プテリンとエダラボンを反応させてジメチルプテリン(DPH)と命名した化合物を得た。このDPHはラマン分光法により、一重項酸素消去能を有することが分かった。さらにDPHはヒト好中球が産生する活性酸素のうち一重項酸素のみならずスーパーオキシドも消去した。

DPHは、神経細胞内で一重項酸素を発生させた細胞死モデルおよび初代培養したヒト角化上皮細胞を用いた放射線照射によるDNA傷害モデルにおいて、傷害を抑制した。

## 研究成果の概要（英文）：

Dimethyl-hydropterin (DPH) was newly synthesized through the reaction with pterin and edaravone. The direct analysis of near-infrared luminescence using Raman spectroscopy proved that DPH quenched the photochemically generated singlet oxygen in a cell-free system. Further, the chemiluminescence assay revealed that DPH scavenged not only singlet oxygen but also superoxide generated in activated neutrophils. When singlet oxygen was generated photochemically in neuronal cells, cell death was induced. DPH prevented the singlet oxygen-induced cell death. And, when keratinocytes was weakly exposed to the ionized radiation, cell death was not observed but the DNA damage was observed. DPH attenuated the DNA damage, probably due to scavenging singlet oxygen.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医歯薬学

キーワード：一重項酸素、特異的消去剤、神経細胞、皮膚細胞、細胞死、放射線障害

### 1. 研究開始当初の背景

活性酸素は生命活動に必須の酸素代謝に伴う副産物であり、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルならびに一重項酸素といった種類がある。活性酸素は生体防御や細胞内信号伝達に関与する一方、その高い反応性から過剰に発生すると組織・細胞傷害を引き起こすことが知られている。これらの活性酸素の中で、一重項酸素は他の活性酸素に比べてあまり注目されておらず、生体における役割も不明な点が多かった。しかし近年、一重項酸素が神経細胞死に関与していることが報告され、その重要性が認識されるようになった (Valencia et al, Free Radic Biol Med 36, 1112-5, 2004)。我々は、急性脳梗塞の治療薬として本邦で唯一臨床使用が認められている薬物エダラボンが強力な一重項酸素消去能を有することを示した (Sommani et al, J Pharmacol Sci 103, 117-20, 2007)。また、これまで虚血再灌流傷害モデルで有効とされてきた薬剤がすべて強力な一重項酸素消去能を有することも示した (Senda et al, J Pharmacol Sci 107, 460-4, 2008; Kawai et al, J Pharmacol Sci 108, 545-9, 2009)。このことから脳梗塞や心筋梗塞でみられる虚血再灌流傷害においては、一重項酸素が傷害の原因である可能性が高いとの仮説を立てるに至った。一方で、一重項酸素

を有する薬剤のうちでプテリン化合物はその置換基を変化させることで、一重項酸素消去能が著しく増強することを示した (Mori et al, Biol Pharm Bull 33, 905-8, 2010)。またプテリン化合物とエダラボンは容易に反応し、その反応物はそれぞれの単体よりも細胞内へ取り込まれやすいことも示した (Arai et al, J Pharmacol Exp Ther, 324, 529-38, 2008)。これらの知見から、細胞内外で特異的に一重項酸素を消去する薬剤を自ら新たに開発するという着想を得るに至った。以上が研究開始当初の背景である。

### 2. 研究の目的

活性酸素は生命活動に必須の酸素代謝に伴う副産物であり、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルならびに一重項酸素といった種類がある。活性酸素は生体防御や細胞内信号伝達に関与する一方、その高い反応性から過剰に発生すると組織・細胞傷害を引き起こすことが知られている。これらの活性酸素の中で、一重項酸素は他の活性酸素に比べてあまり注目されておらず、生体における役割も不明な点が多かった。しかし近年、一重項酸素が神経細胞死に関与していることが報告され、その重要性が認識されるようになった (Valencia et al, Free Radic Biol Med 36, 1112-5, 2004)。

我々は、急性脳梗塞の治療薬として本邦で唯一臨床使用が認められている薬物エダラボンが強力な一重項酸素消去能を有することを示した(Sommani et al, J Pharmacol Sci 103, 117-20, 2007)。また、これまで虚血再灌流傷害モデルで有効とされてきた薬剤がすべて強力な一重項酸素消去能を有することも示した(Senda et al, J Pharmacol Sci 107, 460-4, 2008; Kawai et al, J Pharmacol Sci 108, 545-9, 2009)。このことから脳梗塞や心筋梗塞でみられる虚血再灌流傷害においては、一重項酸素が傷害の原因である可能性が高いとの仮説を立てるに至った。一方で、一重項酸素を有する薬剤のうちでプテリン化合物はその置換基を変化させることで、一重項酸素消去能が著しく増強することを示した(Mori et al, Biol Pharm Bull 33, 905-8, 2010)。またプテリン化合物とエダラボンは容易に反応し、その反応物はそれぞれの単体よりも細胞内へ取り込まれやすいことも示した(Arai et al, J Pharmacol Exp Ther, 324, 529-38, 2008)。これらの知見から、細胞内外で特異的に一重項酸素を消去する薬剤を自ら新たに開発するという着想を得るに至った。以上が研究開始当初の背景である。

### 3. 研究の方法

#### 1. 新たな薬剤の合成

a) 合成用原料のプテリン、ジメチルホルムアミド(DMF)ならびに塩化ピバロイルを反応用フラスコに入れて攪拌する。b) 12時間おきに反応溶液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析し、反応物の生成をモニターする。c) 生成がストップした時点で、溶媒をエバポレーターで除去する。d) 得ら

れた生成物は混合物であるのでクロロホルム-メタノール溶媒に溶かし、シリカゲルカラムを用いて分離精製を行う。e) 溶媒をエバポレーターで除去し、質量分析機能付き液体クロマトグラフィー(LC-MS)を用いて物質の同定と純度の測定を行い、仮称ジメチルプテリン(DP)と命名した単一生成物の粉末を得る。f) このDPとエダラボンを反応用フラスコに入れてリン酸バッファー溶液(PBS)中で反応させる。g) 反応物をHPLCを用いて分取し、さらにLC-MSを用いて物質の同定と純度の測定を行い、仮称ジメチルプテリン(DPH)と命名した単一最終反応物を得る。h) これを凍結乾燥して粉末のDPHを得る。i) DPHの化学構造を質量分析法や核磁気共鳴法を用いて決定する。

#### 2. 試薬系における新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能の評価

この系では一重項酸素の測定法として最も信頼度が高い近赤外ラマン分光法を用いて、新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能を評価する。方法は、光増感剤であるローズベンガル(RB)を重水に溶かし、これに波長520 nmの緑色レーザー光を照射して重水溶液中に一重項酸素を発生させる。この一重項酸素が発する波長1270 nmのリン光を近赤外ラマン分光法にて検出する。重水使用の目的は、重水中では一重項酸素の寿命が数 $\mu$ sから数十 $\mu$ sまで延長するので、一重項酸素の信号強度が高まり、それによって検出感度を高めて、より正確で定量的な測定を行うためである。この時、新たに合成した薬剤を投与して一重項酸素の信号に与える影響をみる。またエダラボンやアジ化ナトリウムなど、他の一重項酸素消去剤の効果と比較検討することで、新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能の評価を行う。

### 3. 細胞系における新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能の評価

細胞系では、一重項酸素を産生することが確実に分かっているヒト好中球を用いて、合成した薬剤の一重項酸素消去能を評価する。方法は、まず健常人血液を採取し、比重差を利用して、主に好中球からなる多核白血球の分画と、単球ならびにリンパ球を含む単核球の分画に分離する。このうち多核白血球の分画を好中球として使用する。なお採血ならびにヒト好中球の分離収集は後述の「人権の保護等」に払拭し、専門的な知識や経験も必要とするので、血液・腫瘍内科医である研究分担者の山下浩平が責任を持って実施する。次に収集した好中球をオプソニン化ザイモザンで貪食刺激して活性酸素を産生させる。好中球は酸素からスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素といった一連の活性酸素を産生することができる。しかし、検出試薬としてメトキシビニルピレン(MVP)を発光試薬として用いると、産生する種々の活性酸素のうち一重項酸素のみを特異的に検出出来ることが分かっている。そこで、この MVP を用いた化学発光法にて好中球が産生する一重項酸素に及ぼす影響をみることで、新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能の評価を行う。

a) 神経細胞の細胞内外で人為的に活性酸素を発生させた時に惹起される細胞傷害に対する新たに合成した物質の効果の検討  
ラット大脳皮質神経細胞を用いる。光線力学療法でも使用されている光増感剤フォトフリン(PF)を細胞内に取り込ませ、波長 630 nm の赤色光を照射することで細胞内に一重項酸素を発生させる。この細胞外に発生した一重項酸素により誘導される細胞死を MTT アッセイやフローサイトメトリ

ーを用いて定量的に、また共焦点レーザー顕微鏡を用いて定性的に、さらにはタイムラプスイメージングシステムを用いて経時的に評価し、新たに合成した薬剤の効果を検討する。

b) 皮膚細胞の細胞内外で人為的に活性酸素を発生させた時に惹起される細胞傷害に対する新たに合成した物質の効果の検討  
ヒト角化細胞を用いる。細胞内外での一重項酸素の発生と細胞死の評価ならびに新たに合成した薬剤の効果の検討は、神経細胞の場合と同様であるが、皮膚細胞の場合は紫外線照射による細胞傷害についても検討する。この場合は細胞内外のどちらで一重項酸素が発生するのか明確ではないが、一重項酸素が傷害を惹起するのは間違いがないので、検討に値すると考える。

### 4. 研究成果

#### 1. 新たな薬剤の合成について

a) 合成用原料のプテリン、ジメチルホルムアミド(DMF)ならびに塩化ピバロイルを反応用フラスコに入れて攪拌し、12時間おきに反応溶液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析し、反応物の生成をモニターした。b) 得られた生成物は混合物であるのでクロロホルム-メタノール溶媒に溶かし、シリカゲルカラムを用いて分離精製を行った。c) 溶媒をエバポレーターで除去し、質量分析機能付き液体クロマトグラフィー(LC-MS)を用いて物質の同定と純度の測定を行い、仮称ジメチルプテリン(DP)と命名した単一生成物の粉末を得た。d) このDPとエダラボンを反応用フラスコに入れてリン酸バッファー溶液(PBS)中で反応させ、反応物をHPLCを用いて分取し、さらにLC-MSを用いて物質の同定と純度の測定を行い、仮称ジメチルプテリン(DPH)と命名した単一最終反応物を得た。

ここまでは成功したが、次の、e) 得られた最終反応物の化学構造を質量分析法や核磁気共鳴法を用いて決定する。が予想以上に困難であったため、成功していない。

2. 試薬系における新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能の評価については、ラマン分光法を用いた測定を行い、新たに合成した薬剤は、エダラボンやアジ化ナトリウムに匹敵する一重項酸素消去能を有することが分かった。

3. 細胞系における新たに合成した薬剤の一重項酸素消去能の評価については、ヒト好中球が産生する活性酸素に及ぼす新たに合成した薬剤の効果を検討し、この薬剤は、エダラボンと同様に、一重項酸素消去能を示すのみならず、エダラボンが有さないスーパーオキシド消去能をも有することが分かった。

4. 神経細胞の細胞内外で人為的に活性酸素を発生させた時に惹起される細胞傷害に対する新たに合成した物質の効果の検討

ラットの初代培養神経細胞を用いて、光増感剤であるフォトリンを細胞内に取り込ませ、波長630 nmの赤色光を照射することで細胞内に一重項酸素を発生させ、神経細胞死の検出を試みた。その結果、一重項酸素誘導性傷害モデルにおける神経細胞活性の低下及びその細胞活性低下が一重項酸素消去剤によって緩和されることをAlamar Blue法及び蛍光染色により確認した。また、その傷害時にオートファジーが起こっていることを走査型電子顕微鏡観察及び蛍光免疫染色により確認した。次に、グルタミン酸による神経細胞傷害モデルを構築し、同様に神経細胞死の検出を試みた。その結果、グルタミン酸傷害モデルにおける神経細胞活性の低下及び、その細胞活性低下が一重項酸素消去剤によって緩和されることを確認した。これは、先の一重項酸素誘導性傷害モデルで見られた細胞死形態と

一致した。さらに、一重項酸素が発生していることを電子スピン共鳴法(ESR)により検出した。このことから、グルタミン酸による神経細胞傷害には一重項酸素が関与していることが示唆された。

5. 皮膚細胞の細胞内外で人為的に活性酸素を発生させた時に惹起される細胞傷害に対する新たに合成した物質の効果の検討

初代培養したヒト角化上皮細胞を用いて構築した放射線照射による細胞傷害モデルにおいて、DNA損傷の検出を試みた。その結果、damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2) 及びその上流のp53の活性化が検出され、一重項酸素消去剤によりその発現及び活性化が抑制されることを確認した。また、ESRにより放射線照射後に産生された一重項酸素を検出した。このことから、放射線障害には一重項酸素が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Nishinaka Y, Arai T, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K: Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 75-79, 2011 (査読有り)  
doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.052

[学会発表] (計6件)

1. Yoko Nishinaka, Toshiyuki Arai, Makiko Morita, Yasuyuki Arai, Kiyomi Mizugishi, Souichi Adachi, Akifumi Takaori-Kondo, Kouhei Yamashita: A novel role of uric acid in neutrophils extracellular trap formation. 第74回日本血液学会総会。2012年10月19-21日 京都(京都国際会

議場)

2. 西中瑤子、森田真紀子、山下浩平、荒井俊之、  
足立壮一：高濃度尿酸による NADPH oxidase  
非依存性 NETosis の誘導。第 21 回日本 Cell  
Death 学会。2012 年 7 月 27-28 日 名古屋(名  
古屋大学)
3. Yoko Nishinaka, Makiko Morita, Toshiyuki  
Arai, Souichi Adachi, Akifumi  
Takaori-Kondo, Kouhei Yamashita: Akifumi  
Takaori-Kondo, Kouhei Yamashita: Singlet  
oxygen is essential for neutrophil  
extracellular trap formation. 第 53 回米国  
血液学会。2011 年 12 月 12 日 San Diego (San  
Diego Convention Center, CA, USA)
4. Kouhei Yamashita, Yoko Nishinaka,  
Toshiyuki Arai, Souichi Adachi, Akifumi  
Takaori-Kondo: Singlet oxygen is  
essential for neutrophil extracellular  
trap formation. 第 73 回日本血液学会総会。  
2011 年 10 月 14-16 日 名古屋 (名古屋国際  
会議場)
5. 西中瑤子、森田真紀子、山下浩平、荒井俊之、  
足立壮一：NETosis における一重項酸素の役  
割。第 20 回日本 Cell Death 学会。2011 年 7  
月 30 日 東京 (東京大学)
6. 森浩子、西中瑤子、荒井俊之：細胞内で発生  
させた一重項酸素による細胞死に対する脳  
梗塞治療薬エダラボンの効果について。第 58  
回日本麻酔科学会。2011 年 5 月 19 日 神戸  
(神戸ポートピアホテル)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者：荒井 俊之 (Arai Toshiyuki)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80175950
- (2) 研究分担者：山下 浩平 (Yamashita  
Kouhei) 京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：80402858
- (3) 連携研究者：遠藤 伸之 (Endo Nobuyuki)  
若狭湾エネルギー研究センター・  
研究開発部・主査研究員  
研究者番号：30359244