

氏名	野々川 満 <small>の がわ みつる</small>
学位(専攻分野)	博士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第 146 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	エネルギー科学研究科エネルギー社会・環境科学専攻
学位論文題目	新規プテリン誘導体の開発とその化学的および生物学的特性に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 牧野圭祐 教授 森井孝 助教授 小瀧 努

### 論文内容の要旨

本論文は、生体中で葉酸から生成する内因性化合物であり、NADH 存在下の光照射によって活性酸素種 (ROS) を生成し、虚血再灌流傷害から神経細胞を保護する等の生理活性をもつ6-ホルミルプテリン (6FP) に関し、誘導体化によって実用化の懸案であった水あるいは有機溶媒への溶解性向上に成功し、さらには遮光下で活性酸素種を生成する新しい6FP誘導体の開発を行い、その化学および生化学特性を明らかにし、6FP の作用機序解明の糸口を作り、6FP 特性の医療応用の可能性を開いた研究の成果をまとめたものであり、以下の7章からなっている。

第一章は研究の背景のまとめである。特に、6FP の細胞レベルで観測される生理学的現象および ROS 生成を中心とした化学的性質が詳述されている。

第二章では、6FP 応用の最大の問題である、水および有機溶媒への溶解性の極端な低さを解決するために、同様にこれまでに解決することが困難であった6FP の誘導体化を成功させ、溶解性の問題も同時に解決している。具体的には、2位と3位を *N,N*-ジメチルアミノメチレンアミノ基やピバロイル基等へと効率良く置換できる合成法を開発し、2-(*N,N*-ジメチルアミノメチレンアミノ)-6-ホルミル-3-ピバロイルプテリジン-4-オン (DFP) 等の6FP 誘導体の開発に成功している。これらの誘導体は光存在下で NADH などの還元剤を酸化して ROS を生成することが証明されている。

第三章では6FP 誘導体 DFP を膵臓癌細胞である Panc-1 細胞へ適用し、光照射下における ROS 生成を利用した光線力学療法 (PDT) への応用を試みている。DFP は6FP に比べて高濃度で細胞に取り込まれ、UV 光照射によって癌細胞中で一重項酸素  $^1O_2$  を生成し、細胞を死滅させた。誘導体が癌治療への PDT 応用のための医薬品になる可能性を示している。

第四章では、光遮蔽下での誘導体の化学的反応性が解析されており、3位の水素原子を他の置換基へと置換した6FP 誘導体が、NADH 存在下で ROS 生成を行うことが示されている。3位未修飾の場合は、水溶液中で3位の水素原子がプロトンとして脱離することによりプテリジン環の電子状態に変化が生じてこのような特性を消失すると推察し、生体内でなぜ6FP が強い生理活性を発現したかについて考察し、「水素原子が予め他の置換基に置き換えられる」あるいは「タンパク質等の生体高分子との水素結合によって3位に固定される」ことなどによって3位の水素原子がプロトンとして脱離する過程が妨げられることによるのではないかと推察している。

第五章では誘導体 DFP を用い、HeLa 細胞に取り込ませて増殖および生存率を調べ、24時間経過しても細胞が死滅するほどの強い効果は観察されなかったが、この系にエダラボンを作用させることによって、HeLa 細胞中で ROS の生成等による強力な生理活性を発揮することを示すと共に、このシステムを用いることで細胞に導入する生理活性の強さを調節できることを報告している。

第六章では、ヌクレオシド類似の構造をもつ6FP 誘導体 1-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-2-(*N,N*-ジエチルアミノメチレンアミノ)-6-ホルミルプテリジン-4-オン (REDF) 等を新規開発し、この誘導体が遮光下で DFP が示した活性を持つことや、DFP と同様にエダラボンと使用することで強い細胞死滅効果が生じることを示している。リボースをもつ RDEF 等の

誘導体は核酸化学合成法と組み合わせて容易に核酸へ導入することができるため、今後の用途は大きいとしている。また、1位を修飾することによって3位を修飾した6FP誘導体が遮光下でも活性を獲得するという結果から、上で示した6FPの活性発現の機構が正しいとしている。

第七章では第6章で開発したリボースをもった6FP誘導体を核酸に導入することによって考えられる今後の展開について示している。

以上、6FPの誘導体化に初めて成功し、水溶性を向上することによって、6FP研究の進展に貢献する結果がまとめられている。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、虚血再灌流傷害から神経細胞を保護する生理活性、アポトーシス誘導あるいは抑制、NF- $\kappa$ Bの活性化やサイトカインの生成などの抑制効果等の生理活性をもつ内因性生理活性化合物6-ホルミルプテリン(6FP)は医薬品としての開発が囑望されてきたが、この化合物は水溶性に乏しく、生理活性発現機構の解明は困難であった。また、この化合物はNADH存在下の光照射で一重項酸素、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素等の活性酸素種(ROS)を生成することが報告されているが、同じ理由で詳細な検討は行われていなかった。本研究では

1. 有機化学的手法を用いて6FP誘導体化法の開発に成功し、例えば2位と3位に*N,N*-ジメチルアミノメチレンアミノ基やピバロイル基を導入した2-(*N,N*-ジメチルアミノメチレンアミノ)-6-ホルミル-3-ピバロイルプテリジン-4-オン(DFP)等の種々の誘導体合成を行った。結果、水への溶解性を付与することに成功した。

2. 種々の位置に置換基を有した6FP誘導体を用い、これらのうち、3位あるいは1位を修飾した場合に、NADH存在下、光遮蔽下で溶存酸素から過酸化水素等の活性酸素種(ROS)を生成することを発見した。

3. これらの結果から、3位の水素の解離がないことが上記の化学的・生理学的活性発現に重要であり、6FPは細胞中で修飾されるあるいは他の分子との相互作用で活性を保っていることを推察した。

4. 開発した3位修飾誘導体は細胞への取り込みに優れており、例えばDFPはPanc-1細胞へ取り込まれ、UV光照射によって癌細胞中で一重項酸素を生成して細胞を死滅させ、癌治療用光増感剤になることを明らかにした。

5. 3位修飾誘導体は、他の薬剤との併用で強い細胞殺傷能力をもち、癌治療に応用することができることを明らかにした。

6. 1位をヌクレオシドで誘導した1-( $\beta$ -D-リボフラノシル)-2-(*N,N*-ジエチルアミノメチレンアミノ)-6-ホルミルプテリジン-4-オン等を開発し、核酸オリゴマーへ挿入して生体内の特定の場所や特定の分子に対して作用する薬品開発への道を開いた。

以上、本研究は、生理活性物質6FPに関し、重大な課題である水溶性をもった誘導体開発法を完成し、6FPの生理作用機序を明らかにし、より高い制御された活性をもつ6FP誘導体開発に大きな貢献を行ったと評価する。よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成19年1月25日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。