

氏名	ソムマニ ピヤナート SOMMANI PIYANART
学位(専攻分野)	博士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第 161 号
学位授与の日付	平成 19 年 9 月 25 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	Study on the Modulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cellular Systems and Its Effects on Some Biologically Significant Events (細胞内活性酸素生成制御およびその生物学的に重要なシステムへの影響に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 牧野圭祐 教授 吉川 暹 教授 小瀧 努

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、環境中に多量存在し、生物の生命維持にとって欠かすことのできない分子である酸素分子 (O_2) について、 O_2 を基質とした生理作用や O_2 から生じて生理作用に関与する活性酸素 (Reactive Oxygen Species, ROS) の生体内での動態制御に関し、内因性含窒素複素環化合物6-ホルミルプテリン (6FP) とその誘導体のもつ効果を細胞レベルで評価し、分子構造と効果との関係を明らかにし、環境変化による O_2 を中心とした生理作用の変化を制御することの可能性に関する研究の成果を纏めたものであり、以下の5章からなっている。なお、本研究は、 O_2 と生命との関係を細胞レベルで明らかにした希少な例である。

第一章は研究の背景の纏めである。特に、 O_2 と生命活動の恒常性との関係や虚血誘導因子HIF-1 α タンパク質を中心とした生理作用における O_2 の役割、ROSがもつ生理活性や生体における役割、また、6FPとその誘導体が持つROS生成やROS消去に関する化学的性質、さらには本研究で参照化合物として用いた高効率一重項酸素 (1O_2) 消去作用をもつ医薬品エダラボンの特性等が詳述されている。

第二章では、ヒト肝細胞の癌細胞を用い、6FPにより細胞中で生成するROSがHypoxia (低酸素濃度) 条件下で発現するHIF-1 α タンパク質を酸化することを明らかにした。Normoxia (通常酸素濃度) 条件下では、酸素を基質とした酵素反応等によって、HIF-1 α は常に酸化され分解されることが知られているが、本条件下でも、生体内で通常行われるのと同様のメカニズムで分解を受け、結果的に生体内のHIF-1 α の量が減少することを解明した。6FPの虚血性疾患等の治療への応用はもとより、HIF-1 α は癌組織の血管伸張を促進する作用等をもつため、癌細胞中でHIF-1 α を抑制することのできる6FPが癌治療に貢献できる可能性があること記述している。また、6FPによって生成するROSを利用してHIF-1 α 等の生体分子を酸化して生体の代謝系を制御する可能性について述べている。

第三章では、ヒト好中球細胞系を用い、新しく開発された6FP誘導体がROSの一つであり高い酸化能を有した 1O_2 の高効率消去能を持つことを明らかにした。好中球により生成された 1O_2 に対して、6FPの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置換した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-オン等の6FP誘導体が、6FPと比較して高い 1O_2 の消去能をもつことを示し、6FPに対して置換基を導入することにより、6FPの持つ 1O_2 の消去能を調整できることを明らかにした。また、これらの化合物は6FPに比べてはるかに高い改良された水溶性を持ち、このため細胞系での実験に適しており細胞による取り込みにも優れていることを示し、またこれらが暗所で、NADH存在下、活性酸素種スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot O_2^-$) を産生する分子であることも示した。さらに、虚血性疾患用治療薬として多用されているエダラボンが高い 1O_2 消去能をもつことを示し、6FP誘導体との比較も行った。

第四章では、6FP応用の最大の問題である水への極端な低溶解性解決のために、有機化学的手法で6FPの1位にリボース

を修飾することで水溶性を向上させることに成功するとともに、そのような6FP誘導体である1-(β-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 (RDEF) が生体内と同様の遮光下、中性条件下で $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することを明らかにした。上で示したように、このような条件下で $\cdot\text{O}_2^-$ を生成する6FP誘導体は $^1\text{O}_2$ 消去能もあわせてもつことから、本研究で開発したRDEFが虚血性疾患等の治療に大きな貢献ができると述べている。

第五章では、研究の纏めが述べられている。

以上、ROSが関わる生体内での反応機構の解明やそれに関わるROSの制御に関して、6FPおよび6FP誘導体の作用機序解明とそれに基づくROS生成・消去制御の可能性等が纏められており、得られた結果に基づく虚血性疾患の治療に関する見解など、難しい研究課題である O_2 の関係する生命科学にとって重要な結果が示されている。

論文審査の結果の要旨

酸素分子 (O_2) は環境中に多量存在し生物の生命維持にとって欠かすことのできない分子であるが、生体に取り込まれた O_2 の一部は反応性の高い活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) へと変換される。生物はROSを殺菌、情報伝達、生体分子の分解などの生命活動維持にとって必須の機能に用いており、生物にとって必要不可欠なものであるが、一方では、ROSによる生体損傷も常に付随する。ROSの生体内での役割やそれによる疾病発症の機構の詳細に関しては未知の部分が多く、ROSおよびROSによって誘起される生体内反応を生体内で制御する手法を開発することは重要な研究課題である。本論文は、含窒素複素環化合物6-ホルミルプテリジン (6FP) とその新規誘導体によるROS生成あるいは消去に関する分子レベルおよび細胞レベルにおける解析結果を示し、さらにはその生物学的意義を詳細に記述している。特に、

1. ヒト肝細胞の癌細胞を用い、6FPにより細胞中で生成するROSがHypoxia (低酸素濃度) 条件下で発現するHIF-1 α タンパク質を酸化することを明らかにした。Normoxia (通常酸素濃度) 条件下では常にHIF-1 α は O_2 を基質として酸化され分解されることが知られているが、これまでは未検討の研究領域であったHypoxia状態におけるHIF-1 α 量の制御法を提案した。HIF-1 α に関連した虚血性疾患等への応用はもとより、HIF-1 α は癌組織の血管伸張を促進する作用等をもつため、癌治療への貢献が期待される。また、6FPにより生成するROSによって生体分子を酸化させることで代謝を制御する方法を提案した。
2. ヒト好中球を用い、6FPおよび誘導体が一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 消去能をもつことを明らかにすると共に、消去能が6FP誘導体の置換基の構造と修飾位置に強く依存することを明らかにして、生体中で用いることのできる効率よい $^1\text{O}_2$ 消去剤設計を可能にした。用いた誘導体の $^1\text{O}_2$ 消去能を、虚血性疾患治療薬エダラボンの消去能と比較することにも成功している。また、消去能をもつ誘導体の検査法として、暗所で、NADH存在下、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) 生成を指標とする方法を見出した。
3. 有機化学的手法を用いて、高い水溶性をもち、有機化学的な誘導化に適した糖で修飾した構造を持つ6FP誘導体の開発に成功し、この6FP誘導体がNADH存在下、暗所・中性条件下で $\cdot\text{O}_2^-$ を生成する化学的性質を持つことを明らかにし、 $^1\text{O}_2$ 消去能を有していることを示唆した。
4. O_2 およびROSと生命との関係を、研究例の少ない細胞レベルで明らかにした。

以上、本研究は6FPおよびその誘導体のもつ細胞レベルにおけるROSとのかかわりを詳細に解析し、生体内でROS生成を制御することのできるシステムの構築、ROS生成に起因する生体反応の反応機構の解明、それによる疾患の治療に関する情報提供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8月24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。