

研究報告書

「脂質ラジカル選択的蛍光・質量分析マルチプローブの開発と疾患モデルへの適用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 山田 健一

1. 研究のねらい

脂質は、エネルギー産生やシグナル伝達など多くの生理機能を有している。しかし、ひとたび酸化されると過酸化脂質を生じ、その後様々なアルデヒド体に代謝分解される。そしてこれら酸化代謝産物のひとつひとつが炎症や変異原性を誘発する。さらに近年では、この代謝産物がタンパク質と複合体を形成し、腫瘍血管新生や加齢黄斑変性など疾患に密接に関わることが報告された。ここで、これら代謝産物や複合体の生成基点は、「脂質ラジカル」である。さらに、脂質ラジカルは連鎖反応の中心の分子である。すなわち脂質ラジカルを検出できれば、疾患に至る過程で最もアクティブな場・分子を特定でき、疾患の予防・治療に大きく貢献できるのではないかと考えた。しかし、代謝中間体である脂質ラジカルは、極めて反応性が高く微量なために検出が非常に困難であった。

ここで私は、異分野で利用されている技術に着目した。つまり、スピン化合物が持つ物理化学的性質である蛍光消光作用、および炭素中心のラジカル結合能を利用できれば、脂質ラジカルを特異的に検出できるのではないかと考えた。そこで、脂質ラジカルに対する反応選択性を付与するために、スピン化合物の新規合成法を開発し、実際に選択性の高い化合物をこれまで見出ししてきた。さらに、脂質ラジカル選択的蛍光検出系を考案し、脂質ラジカルと反応すると蛍光が ON になる化合物開発にも成功している。

以上の背景のもと本研究では、「脂質ラジカルを選択的・高感度に検出・構造解析できる技術を開発し、疾患成因に直接関わる分子を明らかにすること」を目的とした。そのために、1) 検出技術の確立、2) 動物実験による概念実証、3) 他疾患モデルへの適用、などの研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、疾患実態を反映する分子として「脂質ラジカル」に着目し、1) 検出技術の確立、2) 動物実験による概念実証、3) 他疾患モデルへの適用、などを研究目的とした。

まず、様々な蛍光団とスピン化合物を組合せ、物理化学的パラメーター等を測定・比較することで、脂質ラジカルを高感度に検出できる蛍光プローブを開発した。実際に、本プローブを肝炎症モデルであるニトロソアミン (DEN) 誘発培養細胞、および動物モデルに投与したところ、蛍光強度が上昇し、脂質ラジカルを検出することができた。また、その産生時期は非常に早い段階であることがわかった。ここでもし、脂質ラジカルが疾患に密接に関与しているのであれば、その抑制により疾患は軽減するはずである。そこで、DEN 誘発動物モデルにて脂質ラジカルが産生している時期に、上記蛍光プローブの脂質ラジカル反応部位のみを投与すると、その後の

炎症ならびに発がんは劇的に減少した。したがって、本検討より、脂質ラジカルおよびその代謝産物が疾患に密接に関与しているという概念を実証することができた。加えて、他の疾患モデルにも適用した。

以上の結果より、高感度検出技術の開発および疾患モデルでの概念実証を行うことで、「脂質ラジカル」が疾患実態を反映する分子のひとつであることを明らかにできた。

(2) 詳細

上記、研究目的毎に記載する。

1) 検出技術の確立

蛍光検出: 脂質ラジカルを検出するために、いくつかの蛍光団と我々が開発したニトロキンドを組み合わせた蛍光プローブを複数合成した(図 1A)。脂質ラジカルとの反応性、化合物の物理化学的パラメーターから、脂質ラジカルと最も効率的に検出できるプローブ NBD-Pen を今後の実験に用いることとした(図 1B)。また、開発した蛍光プローブの過渡吸収、酸化還元電位を測定し、エネルギーダイアグラムを作成した。NBD-Pen の消光メカニズムは光誘起電子移動反応(PeT)であることが分かった。

2) 動物実験による概念実証

次に、培養細胞にて脂質ラジカルを検出できるか否か検討した。細胞に、アラキドン酸、あるいはニトロソアミン(DEN)などにて、刺激することにより、NBD-Pen の蛍光強度が有意に上昇した(図 1C)。さらに、阻害剤を添加することで、蛍光強度の上昇は抑制された。加えて、蛍

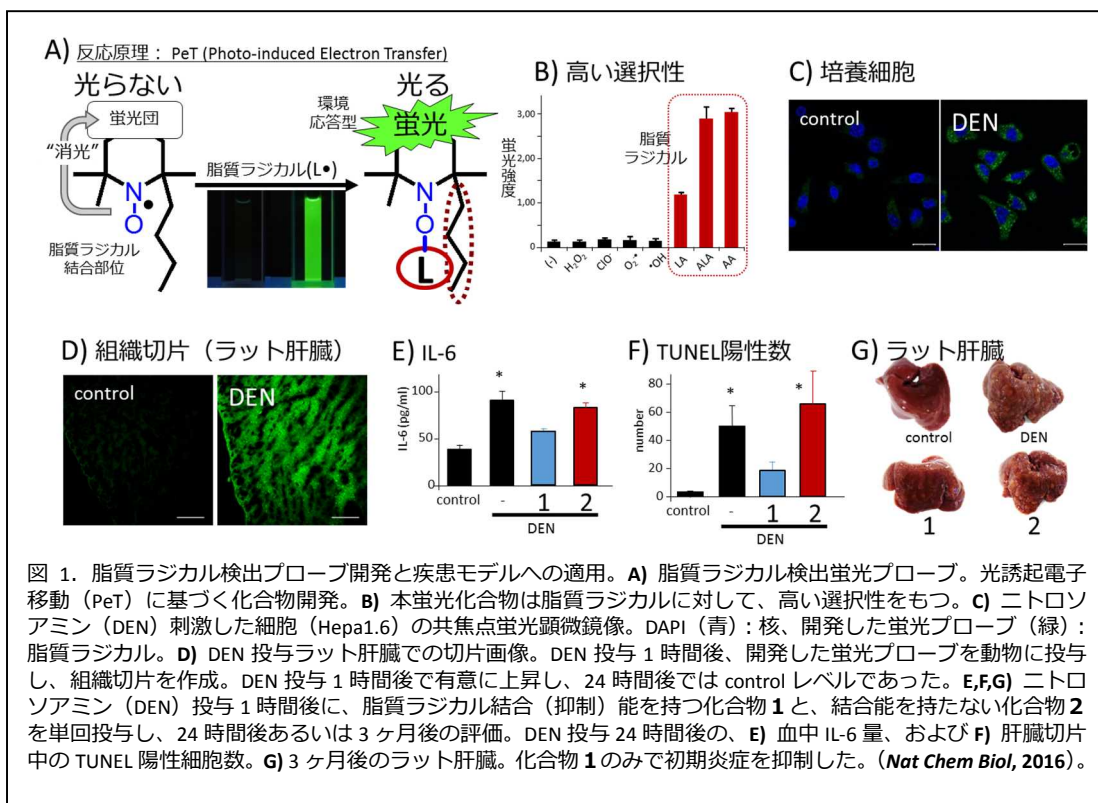


図 1. 脂質ラジカル検出プローブ開発と疾患モデルへの適用。A) 脂質ラジカル検出蛍光プローブ。光誘起電子移動 (PeT) に基づく化合物開発。B) 本蛍光化合物は脂質ラジカルに対して、高い選択性をもつ。C) ニトロソアミン (DEN) 刺激した細胞 (Hepa1.6) の共焦点蛍光顕微鏡像。DAPI (青) : 核、開発した蛍光プローブ (緑) : 脂質ラジカル。D) DEN 投与ラット肝臓での切片画像。DEN 投与 1 時間後、開発した蛍光プローブを動物に投与し、組織切片を作成。DEN 投与 1 時間後で有意に上昇し、24 時間後では control レベルであった。E, F, G) ニトロソアミン (DEN) 投与 1 時間後に、脂質ラジカル結合 (抑制) 能を持つ化合物 1 と、結合能を持たない化合物 2 を単回投与し、24 時間後あるいは 3 ヶ月後の評価。DEN 投与 24 時間後の、E) 血中 IL-6 量、および F) 肝臓切片中の TUNEL 陽性細胞数。G) 3 ヶ月後のラット肝臓。化合物 1 のみで初期炎症を抑制した。(Nat Chem Biol, 2016)。

光共染色により本プローブは、細胞全体に分布していた。以上の結果より、本蛍光プローブは培養細胞でも脂質ラジカルを検出できることが示された。

一方、ミトコンドリアは、生体内で活性酸素を産生する主要な部位であることから、脂質過酸化反応も亢進していることが想定される。そこで、ミトコンドリア移行性を付与した脂質ラジカル検出蛍光プローブを合成した。さらに、刺激した培養細胞にて、確かにミトコンドリアで脂質ラジカルが生成していることが、蛍光共染色することにより分かった。

次に本プローブが疾患モデルにも適用できるか否か検討した。疾患モデルとして、肝細胞がんモデルであるニトロソアミン(DEN)誘発モデルラットを用いた。DEN 投与初期に本蛍光プローブをラットに投与すると、蛍光強度が肝組織にて有意に上昇した(図 1D)。さらにこの上昇は、DEN の代謝酵素阻害剤で有意に減少した。そこで、蛍光強度が上昇した時間(DEN 投与 1 時間後)に脂質ラジカル結合部位のみ(蛍光プローブから蛍光団部位を除いた安定スピン化合物)を肝細胞がんモデル動物に注射した。その結果、DEN 投与 24 時間後に上昇していた脂質過酸化代謝産物、アポトーシス、肝障害、8-OHdG(8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアニン、DNA 酸化損傷のマーカー)などが有意に低下した。さらに、興味深いことに、脂質ラジカルが上昇していた DEN 投与 1 時間後に、化合物の脂質ラジカル結合部位のみをラットに 1 度投与すると、3ヶ月後の肝細胞のがん化部位を有意に減少させた(図 1E~G)。以上の結果より、NBD-Pen は疾患モデル動物でも利用できること、DEN 投与モデルにおいては、脂質ラジカルが初期炎症および発がんの初期に密接に関与していることが分かった(Yamada K, *et al.*, *Nat Chem Biol*, 2016)。したがって、本検討より、脂質ラジカルおよびその代謝産物が疾患に関与しているという概念を実証することができた。

3) 他疾患モデルへの適用

本プローブが、他疾患モデルにも適用できるか否か検討した。国際強化支援策として、タイマヒドン大学の Dr. Noppawan Phumala Morales と共同で、サラセミア症の増悪に関与する酸化 LDL 内の脂質ラジカルの検出を目的とした。LDL を Cu イオンおよび Fe イオンで刺激後 NBD-Pen を加え、試料を電気泳動した。その結果、NBD-Pen を用いることで、LDL の酸化時に生成する脂質ラジカルをきちんと蛍光検出できることがわかった。さらに、サラセミア疾患モデル動物である鉄過剰症モデルでも、NBD-Pen を用いることで血中および肝臓中での脂質ラジカルを検出できた。また、動脈硬化モデル、肥満症+DEN 投与モデル、四塩化炭素投与モデルなどにおいても、脂質ラジカルを検出できた。

以上の研究結果より、当初予定をほぼすべて達成できたと考えている。

3. 今後の展開

上記結果より、脂質ラジカルあるいはその代謝産物が疾患に密接に関与しているのは間違いない。しかし、どのように疾患を発症させるのかそのメカニズムなどは不明である。また、疾患毎にその経路は異なるのか、また肥満症によりその経路は変動するのかなど、解決すべき点は多い。今後はより高感度なプローブ、またより特異的な阻害剤の開発などを進め、疾患の発症メカニズム解析などを進めていく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、生体内標的分子として脂質ラジカルを想定し、その効率的な検出・構造解析手法を開発した。さらに脂質ラジカルが疾患実態を反映する分子であり、創薬標的にもなり得ることを証明した。これらの成果は、領域内外の研究者と共同研究を推進することにより、より大きな成果につなげることができた。今後、これら技術をさらに深化させることにより、疾患実態を反映する脂質ラジカル等、酸化障害を基点とした創薬基盤技術の確立につながると確信している。

したがって、以上の成果は、新たな技術創出のみでなく、創薬基盤への寄与が見込まれ、当初予定を上回る成果であると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

生体内で生じる活性酸素であるヒドロキシルラジカルは、極めて反応性が高く、脂質、タンパク質、糖質、DNA など様々な生体物質と反応し細胞や組織にダメージをもたらす、癌、生活習慣病、老化などの原因・危険因子であると考えられている。しかしながら、ヒドロキシルラジカルより生じる様々なラジカルは、極めて反応性が高く微量なために、従来は検出が非常に困難であった。そのため、疾患発症や病態の進行において、細胞や組織のどこで、どのようなラジカルが生成し、いかなる疾患を生じさせるかについてや、その治療薬開発のための基礎的知見については不明な点が多かった。

そこで、本研究は、ヒドロキシルラジカルなどにより生じる重要なラジカルの一つである脂質ラジカルに着目し、まずその高感度検出のための蛍光プローブ NBD-Pen を開発した。この非常に優れた蛍光プローブの開発は、化学製品の製造で利用されているラジカル捕捉剤からヒントを得たスピン化合物と蛍光団の組み合わせを検討したもので、分子設計のアイデアを様々な基礎・応用分野に求めるという本研究者の柔軟な発想が実を結んだと思われる。

本プローブは抽出液試料の脂質ラジカルの分析のみならず、培養細胞やミトコンドリア、疾患モデル動物の組織切片においても、画像解析により脂質ラジカルの高感度検出が可能となった。さらに脂質ラジカル結合部位のみを肝細胞がんモデルラットに注射することにより、3ヶ月後の肝細胞のがん化部位を有意に減少させたことは、創薬のための基礎データとしてたいへん興味深い。

さらに、サラセミア症とそのモデル動物の LDL 酸化時に生成する脂質ラジカル、そして動脈硬化モデルや肥満症+DEN 投与モデル、四塩化炭素投与(急性肝障害)モデルなどで生成する脂質ラジカルなども、蛍光プローブ NBD-Pen で検出できた。よって、脂質ラジカルの生成が主因・危険因子である様々な疾患を対象とした創薬のために、蛍光プローブ NBD-Pen の脂質ラジカル結合部位(およびその誘導体)の利用が期待される。

学会発表、論文発表、共同研究を積極的に行い、本さきがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野の顕著な研究者の一人として注目されるようになり、研究者

としての飛躍につながった(平成 28 年 4 月に教授に昇任)。

今後も柔軟な発想で、脂質ラジカルに対するより高感度なプローブの開発、迅速・簡便・低コストな検出キットの開発、脂質ラジカルによる疾患発症の分子メカニズムの解明など広範な分野で研究を展開していくことを期待する。また、現時点で非公表の研究成果も多数あることから、これらの今後の展開(学会・論文発表、知財確保)にも期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Yamada K, Mito F, Matsuoka Y, Ide S, Shikimachi K, Fujiki A, Kusakabe D, Ishida Y, Enoki M, Tada A, Ariyoshi M, Yamasaki T, Yamato M. Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals. *Nat Chem Biol.* 2016, 12(8):608-613.
2. Matsuoka Y, Ohkubo K, Yamasaki T, Yamato M, Ohtabu H, Shirouzu T, Fukuzumi S, *Yamada K. A profluorescent nitroxide probe for ascorbic acid detection and its application to quantitative analysis of diabetic rat plasma. *RSC Advances*, 2016, 58(1):16-22.
3. Yamato M, Kawano K, Yamanaka Y, Saiga M, *Yamada K. TEMPOL increases NAD⁺ and improves redox imbalance in obese mice. *Redox Biol.* 2016, 8:316-322.
4. Matsuoka Y, Yamato M, *Yamada K. Fluorescence probe for the convenient and sensitive detection of ascorbic acid. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2016, 58(1):16-22.
5. Tun X, Yasukawa K, *Yamada K. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Biol Med.* 2014, 74:108-117.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. 山田健一、「多様な酸化還元電位を有するニトロキシドの開発とその応用」、第 18 回 ESR フォーラム研究会、2014 年 7 月 26 日、愛知
2. Ken-ichi Yamada: Development and Application of α -Substituted Piperidine Nitroxides: Special Seminar, Seminar in Pharmacology (SCPM681): 2015/2/6 (Bangkok, Thailand)
3. Ken-ichi Yamada: Functional fluorescence probe for lipid derived radicals detection: Pacificchem2015: 2015/12/15-20 (Hawaii, USA)
4. 山田健一、「脂質ラジカル蛍光検出プローブの開発とその応用」、第 19 回 Vitamin E Update Forum、2016 年 8 月 16 日、東京
5. Ken-ichi Yamada: Fluorescence Probes to Detect Lipid-derived Radicals and Its Application: 2016 ISLS:2016/11/24(Taipei, Taiwan)

6. Ken-ichi Yamada: Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals:Frontiers2016 joint Symposium of the EPFL:2016/12/6(Lausanne, Switzerland)
7. 山田健一、「脂質ラジカルの検出と構造解析技術開発」、日本生物工学会 学際的脂質創生研究部会、2017年1月27日、福岡
8. Ken-ichi Yamada: Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals and its application. The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences (JSPS-NRCT 2017 and IAMPS33), 2017/3/2-3 (Bangkok, Thailand)
9. 山田健一、「脂質ラジカルの検出と疾患への応用」、第13回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2017年3月16~17日、奈良

シンポジウム

1. 山田健一、「脂質ラジカルをターゲットとした機能性造影剤の開発」日本薬学会第135年会、2015年3月25~28日、神戸
2. 山田健一、「脂質ラジカル蛍光検出プローブ開発とその応用」、日本薬学会第136年会、2016年3月26~29日、横浜
3. 山田健一、「酸化ストレスと還元ストレス」、日本薬学会第136年会、2016年3月26~29日、横浜

受賞

1. 日本酸化ストレス学会学術賞(2016年8月30日)

プレスリリース

1. 「脂肪の「錆び」が 癌化を促進することを発見!」、九州大学、2016年6月14日
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/25>