

研究要旨 (4000 字)

酸化ストレスは老化、脳梗塞および心筋梗塞などの虚血・再灌流傷害、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経疾患に深く関与していると考えられている。酸化ストレスは種々の要因で生体内で発生する活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) によって引き起こされる。その要因の一つに炎症がある。炎症時には好中球からミエロペルオキシダーゼ (MPO) が放出され、ROS の一種である次亜塩素酸イオン (ClO^-) を生成する。さらに、生成した ClO^- から一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が生成する。したがって炎症には、過剰に発生した ROS を消去する抗酸化物質を用いた抗酸化療法が有効であると推察される。本研究では、現在、脳梗塞急性期の脳保護剤および ALS 治療薬として臨床応用されている抗酸化物質のエダラボンに着目した。そして、MPO 由来の ClO^- や $^1\text{O}_2$ に対する抗酸化活性、反応生成物、およびその生成メカニズムについて詳細に検討した。

第 1 章では、本研究の背景と問題点、それを踏まえた本研究の目的を記述した。種々の疾病との関連が多く報告されている酸化ストレスは ROS によって引き起こされる。狭義の ROS にはスーパーオキシド (O_2^-)、ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$)、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が含まれる。酸化ストレスが関与していると考えられている疾病に対する治療法は、これら ROS を捕捉し消去・無害化することである。初期の抗酸化療法では ROS の中でもラジカル種に着目し、ラジカルに対し高い抗酸化能を示すビタミン E を用いた介入試験が多く実施された。しかしながら、予防効果や症状改善効果はみられたものの、期待していたほどの結果は得られていない。虚血再灌流障害や炎症が起きている患者生体内では、狭義の ROS の他、パーオキシナイトライト (ONOO^-)、次亜塩素酸イオン (ClO^-) も生成していると予想される。したがって、これら ROS に対する対処法も考える必要がある。

2001 年に開発された人工の抗酸化物質であるエダラボンは、脳梗塞急性期の治療薬として広く利用されている。虚血・再灌流直後に脳組織で発生する有害なフリーラジカルを消去無害化し、再灌流に伴う酸化傷害から保護することで予後の症状を飛躍的に改善するとされている。また、現在では ALS 治療薬としても臨床応用されている。脳梗塞を発症した患者の約 8 割が予後が悪くなるなか、エダラボン投与によりその割合は大幅に減少し、約 6 割の患者の予後が良くなることが既に報告されている。また、虚血再灌流障害モデルに対するエダラボン投与では、エダラボン濃度依存的な梗塞部位の減少がみられ、脳梗塞モデルに対するエダラボン投与では脳浮腫の優位な抑制効果が確認されるなど、エダラボンの高い脳保護効果が認められている。また、脳梗塞によるモノアミン系の異常な代謝の改善効果や、脂質過酸化に対する抑制効果なども報告されている。エダラボンは水溶性、脂溶性ラジカルどちらに対しても高い反応性を示し、2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid (OPB) を生成することが既に明らかになっている。また、エダラボンは ONOO^- に対しても高い抗酸

化能を示すことが報告されている。このことから、2電子酸化剤に対する反応性も期待される。このように、酸化ストレスが関与していると考えられる疾病ではラジカル種以外の ONOO^- 、 ClO^- 、 $^1\text{O}_2$ なども生成していると考えられ、これら ROS に対しての対処法を考える上でエダラボンは非常に期待できる薬剤である。しかしながら、 ClO^- や $^1\text{O}_2$ に対する反応性の検討は未だされていない。そこで本研究ではそれらについて検討を行う。

第2章では、エダラボンの ClO^- に対する反応性、反応生成物の同定、および反応メカニズムについて検討した。

まず、エダラボンと、 ClO^- との反応速度定数が明らかなグルタチオン、システイン、メチオニンおよび尿酸との競争反応を行い、それらの減少速度からエダラボンと ClO^- の擬二次反応速度定数を 10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度と見積もった。

次に、エダラボン単独で ClO^- と反応させたところ、2つの不明化合物 (UK1, UK2) が生成され、これらを LC/TOFMS にて分析した。得られた精密質量電荷比から推定された化学組成は $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}$ (UK1) および $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$ (UK2) であった。また、UK2 のフラグメントイオンから、UK2 はその構造内にカルボキシル基を持つことが示唆された。この結果から、UK1 は 4-Cl-edaravone, UK2 は (*E*)-2-chloro-3-[(*E*)-phenyldiazenyl]-2-butenic acid (CPB) と推定した。

そこで、 ClO^- との反応でのエダラボン、4-Cl-edaravone, および CPB の経時変化を追跡した。4-Cl-edaravone はエダラボンの減少に伴って生成し、反応後期には次第に減少したのに対し、CPB の生成にはラグタイムが観察され、反応の最後まで増加し続けた。次に、4-Cl-edaravone および CPB を単離し、 ClO^- と反応させた。4-Cl-edaravone は減少し、それに伴って CPB が生成した一方、CPB は安定であった。このことから、4-Cl-edaravone はエダラボンと ClO^- との一次生成物であり、さらに 4-Cl-edaravone が ClO^- と反応して CPB を生成することが示唆された。そこで、4-Cl-edaravone 溶液に種々の濃度の NaClO 水溶液を添加したところ、4-Cl-edaravone は NaClO の濃度依存的に減少した。そして、NaClO の添加量を 4-Cl-edaravone の減少量で除して化学量論数を求めたところ、約 1.0 となり、4-Cl-edaravone と ClO^- の反応は 1 分子対 1 分子の反応であることが示唆された。同様にしてエダラボンと ClO^- の反応の化学量論数も検討したところ、これも 1.0 と推察された。これらをもとにエダラボンと ClO^- の反応メカニズムを以下のように推定した。エダラボンのエノール型は 1 分子の ClO^- と反応し 4-Cl-edaravone を生成する。さらに 4-Cl-edaravone はもう 1 分子の ClO^- と反応し中間体として 4,4-dichloro-edaravone を生成する。4,4-dichloro-edaravone は 1N-5C 間が加水分解されて 2,2-dichloro-3-phenylhydrazono butanoic acid となり、塩素と水の脱離を経て CPB が生成すると推察した。また、4-Cl-edaravone と CPB は分子内に Cl を有していることから、 ClO^- に特異的な反応生成物であり、エダラボンを投与された生体試料からこれらの化合物が検出されれば、 ClO^- の関与が示される

第3章では、エダラボンと $^1\text{O}_2$ に対する反応性について検討し、この反応における反応生成物の同定および反応メカニズムの解明を行った。

まず反応性の検討は、 ClO^- と同様に尿酸、メチオニン、システイン、トリプトファンとの競争反応で検討した。その結果、擬二次反応速度定数は 10^8 - $10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度と算出された。また、その反応速度は溶液のpHに大きく依存し、エダラボンエノールのpKa (7.0) 付近で急激に増加した。このことからエダラボンの $^1\text{O}_2$ に対する反応性は、アニオン化により生成するオキシド基からの電子供与により上昇するピラゾリン環の電子密度に依存するものと強く推察された。

次にLC/TOFMSを用いて、エダラボンの光酸化で生成した不明化合物の精密質量電荷比を求め、その化学組成を $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$ と推定した。この組成はエダラボンとラジカルの反応生成物である2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid (OPB)と同一であったことから、OPBと予想された。そこで別途標品とHPLCクロマトグラムおよびMSスペクトルを比較したところ、完全に一致した。このことからエダラボンと $^1\text{O}_2$ との反応でOPBが生成することが示された。ラジカルによるOPBの生成メカニズムは既に報告されており、中間体として4-oxoedaravoneが生成する。しかし、光酸化では4-oxoedaravoneは観察されず、ラジカル酸化反応とは異なる経路となることが示唆された。そこで、そのメカニズムを以下のよう推定した。エダラボンアニオンの4,5間の二重結合と反応して4,5-ジオキセタンを生成する。その後5位のCO間がヘテロ開裂して生成したパーオキシルアニオンと水分子が反応し、 HO^- の脱離によりOPBが生成する。この反応は HO^- の脱離が律速段階であり、pHが9以上になると反応速度が減少することとも一致する。

最後にMPOによるエダラボンの酸化を行った。その結果、エダラボンの減少に伴って、4-Cl-edaravoneとCPB, OPBの生成が確認された。このことから、4-Cl-edaravoneとOPBの同時検出はMPO活性のマーカーになり得ると期待される。

第4章ではエダラボン酸化生成物を酸化ストレスマーカーとして用い、エダラボンが投与されたALS患者血漿の分析を行った。血漿中のエダラボン代謝物は非常に低濃度であると予想されるため、分析には高感度・高選択性が期待されるLC/MS/MSを使用することとし、その分析系を確立した。この系を用いてALS患者血漿を分析したところ、エダラボン、OPB, 4-Cl-edaravoneが検出され、ALS患者生体内中での ClO^- や $^1\text{O}_2$ の生成が示唆された。これらROSが病態へどのように関与しているのか興味もたれる。

第5章では結語として、エダラボンの臨床応用の拡大に対する期待を議論した。様々なROSと高い反応性を示すエダラボンは脳梗塞やALSのみならず、敗血症などの病態にも応用が可能だと考えている。また、その酸化生成物はROSに対して特異的な反応生成物を与える。エダラボンが投与された患者の生体試料を分析することで、生体内で発生しているROSの同定が可能になると期待される。

(4227 字)

英文要旨 (300 語)

Mechanism for hypochlorous anion and singlet oxygen scavenging activity of a clinical antioxidant edaravone.

Oxidative stress, intimately related to various diseases is caused by reactive oxygen species (ROS). For example, in the case of ischemic reperfusion injury and inflammation, ROS such as peroxynitrite (ONOO^-) hypochlorite (ClO^-), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) are thought to be formed. Therefore, treatment with antioxidant can be beneficial for these injuries.

3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (edaravone) is a synthetic antioxidant that has been applied for treatment against acute phase cerebral infarction since 2001 in Japan. The edaravone scavenges free radical to produce 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-4,5-dione (4-oxoedaravone) as an oxidation product and it is subsequently hydrolyzed to 2-oxo-3-(phenylhydrazono)butanoic acid (OPB). Edaravone also reacted with two-electron oxidants like peroxynitrite, yielding predominantly 3-methyl-4-nitroso-1-phenyl-2-pyrazoline (4-NO-edaravone). However, the reactivity of edaravone with ClO^- and $^1\text{O}_2$ has not been clarified.

We evaluated the reactivity of edaravone toward ClO^- by competitive reaction with established ClO^- scavengers such as reduced glutathione (GSH), cysteine (Cys), methionine (Met), and uric acid (UA). From the results, a rate constant of edaravone was estimated as 10^6 – 10^7 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ whereas those of references are 10^5 – 10^8 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ suggesting that edaravone shows comparable reactivity to these antioxidants. Furthermore, two reaction products were identified. 4-Cl-edaravone was formed as a primary oxidation product by edaravone oxidation, which was then further oxidized to (*E*)-2-chloro-3-[(*E*)-phenyldiazenyl]-2-butenic acid (CPB).

We also evaluated the reactivity of edaravone toward $^1\text{O}_2$ in comparison with established $^1\text{O}_2$ scavengers such as UA, histidine (His), Met, and tryptophan (Trp). Edaravone showed higher reactivity than the reference antioxidants, and the rate constant was estimated at 10^8 – 10^9 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. We then identified that this reaction produces OPB.

The source of ClO^- and $^1\text{O}_2$ in vivo is considered to be the myeloperoxidase (MPO) system. We conducted MPO-induced edaravone oxidation. In addition to 4-Cl-edaravone and CPB, OPB was formed with edaravone degradation, indicating that $^1\text{O}_2$ generated from the MPO system reacted with edaravone to produce OPB. Edaravone was also oxidized by $^1\text{O}_2$ formed from MPO, indicating that edaravone treatment may be beneficial for MPO-related injuries such as inflammation. A combination of OPB and 4-Cl-edaravone detected from patient samples treated with the drug can be a marker for MPO activation.

(351 語)

研究概要(1200 字)

酸化ストレスは、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) によって引き起こされ、現在、様々な疾患にて酸化ストレスの関与が疑われている。

エダラボンは 2001 年に脳梗塞急性期の治療薬として認可された、人工の抗酸化物質である。虚血・再灌流直後に脳組織で発生する有害なフリーラジカルを消去無害化し、再灌流に伴う酸化傷害から保護することで予後の症状を飛躍的に改善するとされている。また、現在では筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 治療薬としても応用されている。エダラボンは種々の ROS と高い反応性を示すと考えられる。そこで本研究では、炎症時に発生すると考えられる次亜塩素酸イオン (ClO^-) および一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) との反応性と、その反応生成物および反応メカニズムを検討した。

反応性の検討では、 ClO^- にならびに $^1\text{O}_2$ に対する反応速度定数が既知の化合物とエダラボンとの競争反応を行い、それらの減少速度からエダラボンの反応速度定数を見積もった。すると、 ClO^- に対しては 10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度、 $^1\text{O}_2$ に対しては 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度と見積られ、これらに対してエダラボンが高い抗酸化活性を示すことが示された。

また、エダラボンと ClO^- との反応では 4-Cl-edaravone, および 4-Cl-edaravone がさらに ClO^- と反応して生成する (*E*)-2-chloro-3-[(*E*)-phenyldiazenyl]-2-butenic acid (CPB) を反応生成物として見出した。さらに、 $^1\text{O}_2$ との反応では 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid (OPB) の生成を認めた。そして、これらの反応メカニズムを詳細に検討し、解明した。

生体内での ClO^- および $^1\text{O}_2$ の発生源として、炎症時に好中球から放出されるミエロペルオキシダーゼ (MPO) が考えられる。実際にエダラボンを MPO で酸化すると、4-Cl-edaravone, CPB に加えて、OPB も生成することが分かった。したがって、炎症などの MPO が関与すると考えられる、敗血症などの病態に対して、エダラボンの応用が効果的であることが推察される。

エダラボンは各 RSO と鋭敏に反応し、特異的反応生成物を与えることが明らかとなった。このことから、エダラボンが投与された患者の生体試料を分析することで、病態に関与して患者体内で発生している ROS の同定も可能になると期待される。現在、エダラボンは筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬として応用されている。そこでエダラボンによる治療を受けた ALS 患者血漿を分析した。その結果、ALS 患者血漿中からエダラボン、OPB、4-Cl-edaravone が検出された。このことから、ALS 患者生体内中では $^1\text{O}_2$ および ClO^- が生成していると示唆され、非常に興味深い結果となった。

(1203 字)