

(様式5)

## 学 位 論 文 要 旨

平成 30 年 1 月 10 日

学位申請者

飯田 沙也加 印

### 学位論文題目

生体中の一重項酸素や次亜塩素酸生成のプロープ分子としての尿酸

Uric acid as a molecular probe of singlet oxygen and hypochlorite formation *in vivo*

### 学位論文の要旨

酸化ストレスが、老化、脳梗塞および心筋梗塞などの虚血・再灌流傷害、そして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。そのため、これらの疾病に対する有効な抗酸化療法の開発が強く望まれている。事実、日本で開発された抗酸化物質であるエダラボンは、前述の脳梗塞急性期に対する脳保護剤として2001年に日本で認可された。また、ALSの適用薬としての応用が日本で2015年に、米国で2017年に認可された。今後、エダラボンの適用は世界規模で拡大すると予想され、同時に抗酸化療法の重要性にも注目が集まると考えられる。抗酸化療法を考えていく上で重要なのが、生体にかかる酸化ストレスを正確に評価することである。

第1章では、研究の背景及び既存の研究による問題点について記述し、それらの内容を踏まえて本研究の目的を設定した。種々の疾病において生体内で過剰な酸化反応が起きていることは現在までに検討されている。例えば、F<sub>2</sub>-isoprostaneやcholesteryllinoleate酸化物などの過酸化脂質、8-OH-dGなどの核酸の酸化物、そしてカルボニル化タンパク質などの酸化生成物が生体試料中から検出されている。しかし、生体内にはビタミンC (VC) やビタミンE (VE)、そしてコエンザイムQ (CoQ) の還元型といった抗酸化物質が豊富に存在し、これらの共存下では過酸化脂質などは生成しない。したがって、初期の酸化ストレスを評価するためには、酸化ストレスに対して鋭敏に反応する抗酸化物質の変化を追跡することが重要である。

一方で、酸化ストレスは種々の活性酸素種 (ROS) によって引き起こされる。ROSはヒドロキシルラジカル (HO $\cdot$ ) などのラジカル種と、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) やパーオキシナイトライト (ONOO $^-$ )、次亜塩素酸イオン (ClO $^-$ ) や一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) などの非ラジカル種がある。これらのROSは反応機序や生成機序が異なるため、一概に酸化ストレスとして一括りにすることはできない。したがって*in vivo*で発生するROSを同定することは、臨床的にも極めて意義が大きい。しかし、これらのROSはその反応性の高さゆえに不安定であり、直接検出することは非常に困難である。そこでROSに対して特異的な反応生成物を同定し、これをマーカーとして生体試料から検出することができれば、間接的にはあるが*in vivo*で発生するROSの同定が可能になる。その目的に適切な基質としての条件は、ROSに対して感受性が高いこと、そして生体内にコピキタスに、かつ高濃度に存在することが必須であると考えられる。この条件を満たす化合物に尿酸がある。

尿酸はヒトおよびある種の霊長類におけるプリン体の最終代謝物である。ヒト以外の尿酸オキシダーゼ (ウリカーゼ) を有している動物は、尿酸をさらに酸化分解してアラントインとして代謝・排出する。しかしヒトは進化の過程でこの酵素を欠損し、さらに腎臓で再吸収する機能を備えているため、血漿中の濃度は数百 $\mu$ Mとほぼ飽和濃度となる。尿酸は溶解度が

低く結晶化しやすい。これが関節包の内部で析出・結晶化して炎症を引き起こす。これが痛風である。したがって、ヒトは痛風のリスク負ってまで高濃度の尿酸を体内に有するよう進化したと言える。一方で尿酸は非常に優れた抗酸化物質である。尿酸の抗酸化物質としての特徴は、種々のROSに対して高い反応性を示すということである。ラジカル種のみならず、 $\text{ONOO}^-$ や $^1\text{O}_2$ 、 $\text{ClO}^-$ などのROSと広く反応し、これらを消去することが知られている。さらに、その酸化生成物は反応するROSに特異的な化合物となることが推察される。例えば、ラジカル種との反応ではアラントイン (AL) が生成することが知られている。さらにBeckmanらは、 $\text{ONOO}^-$ との反応でトリウレット (TU) が生成することを報告した。またHendersonらは一酸化窒素 ( $\text{NO}\cdot$ ) との反応では6-アミノウラシル (AU) の生成を見出している。このように尿酸とROSとの反応ではROSに特異的な生成物を与えると予想される。そこで、未だ明らかにされていない $^1\text{O}_2$ または $\text{ClO}^-$ との特異的反応生成物を同定することを、本研究の目的とすることにした。

第2章では、尿酸と一重項酸素の特異的反応生成物とその反応経路について検討し、考察した。通常、酸素分子の一重項状態への遷移は光増感反応によって起こるため、 $^1\text{O}_2$ は体表など光に曝露される部位で生成すると考えられている。しかし、 $\text{H}_2\text{O}_2$ の2電子酸化でも生成することが明らかになっており、これには光を必要としない。したがって $\text{H}_2\text{O}_2$ と $\text{ClO}^-$ などの2電子酸化剤が共存する系では $^1\text{O}_2$ が生成すると考えられる。

まず、尿酸を $^1\text{O}_2$ と反応させ、反応生成物の同定を行った。尿酸のリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、光増感剤としてローズベンガル (RB) を加え、紫外線を照射して $^1\text{O}_2$ を発生させた。反応溶液を経時的に飛行時間型質量分析計 (TOFMS) 付きHPLC (LC/TOFMS) で分析した。さらに、尿酸を $^1\text{O}_2$ 発生剤である3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl) propionic acid (NEPO) の熱分解、 $\text{ClO}^-$ または $\text{ONOO}^-$ による $\text{H}_2\text{O}_2$ の2電子酸化反応で生成した $^1\text{O}_2$ と反応させた。また、生体試料として日光に曝露した皮膚をメタノールに浸漬して分泌物を回収し、これをLC/MS/MSを用いて分析した。

光酸化にともない尿酸の減少と複数の不明化合物の生成を認めた。そのうちの2つの未知化合物U1とU2の精密MSスペクトルを測定してそれらの推定組成を求めたところ、U1が $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 、U2が $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$ となった。この結果からU1をパラバン酸 (PA)、U2をその加水分解生成物であるオキサール尿酸 (OUA) と推定した。そこで、PAおよびOUAの標準物質を用い、U1とU2のHPLCクロマトグラム上での検出時間およびLC/TOFMSを用いてMSスペクトルを各々比較した。その結果、検出時間およびMSスペクトルが一致し、このことから両者をPAとOUAと同定した。

その後、光酸化、NEPOの熱分解、および $\text{H}_2\text{O}_2$ の2電子酸化により発生した $^1\text{O}_2$ で尿酸を酸化し、PAとOUAを定量してそれらの収率 (尿酸の減少量に対するPAとOUAの生成量の割合) を求めたところ、光酸化およびNEPOを用いた系において100%近い収率となった。このことから、尿酸と $^1\text{O}_2$ との反応ではPAのみが生成することが示された。また興味深いことに $\text{H}_2\text{O}_2$ の2電子酸化反応では酸化剤として $\text{ClO}^-$ 以外にも $\text{ONOO}^-$ を用いたが、いずれの系でも高い収率 (37~50%) でPAおよびOUAの生成が認められた。このことから、炎症時や虚血・再灌流時のように $\text{H}_2\text{O}_2$ と $\text{ONOO}^-$ が共存することが予想される場合にも $^1\text{O}_2$ が生成すると考えられる。

一方、パーオキシラジカル ( $\text{AOO}\cdot$ )、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ )、および $\text{ClO}^-$ または $\text{ONOO}^-$ 単独で尿酸を酸化した場合には、PAの生成はほぼ認められなかった。このことから、PAの生成は $^1\text{O}_2$ に対して極めて特異性の高い反応であると推察される。また、ヒト皮膚表面からも尿酸とPAが検出され、日光曝露後に有意にレベルが上昇することが観察された。このことから、ヒト皮膚上で日光曝露によって生成した $^1\text{O}_2$ による尿酸の酸化が起こったことが推察された。

尿酸と $^1\text{O}_2$ との反応経路を推定した。尿酸を光酸化した反応溶液を分析条件を変えて分析したところ、U3に加えて、U4、U5が検出された。U3  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_5$ は、U4は $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ 、U5は $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$ であった。U3とU5を単離したところ、PAに変化した。このことから、U3とU5はPAの前駆体であると考えられた。U4は単離したところ、すぐにPA及びU5に変化した。このことから、U4はU5の前駆体であると考えられた。

光酸化反応では水溶液中の溶存酸素が $^1\text{O}_2$ となる。そこで、溶存酸素を窒素ガスで除き、 $^{18}\text{O}_2$ に置換して同様の実験を行った。 $^{18}\text{O}$ が置換したU3, U5が観察された。このことから、 $^1\text{O}_2$ が尿酸に付加すると水の酸素原子と交換し、その後の反応が進行していることが示唆された。以上から、尿酸は $^1\text{O}_2$ と反応すると、U3, U5, U4を経てPAになることが推察された。

第3章では尿酸と $\text{ClO}^-$ の特異的反応生成物とその反応経路について検討し、考察した。ミエロパーオキシダーゼ (MPO) は塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) と $\text{H}_2\text{O}_2$ を基質に $\text{ClO}^-$ を生成する酵素で、炎症時に好中球から放出される。よってMPOが作用する場合には、基質である $\text{H}_2\text{O}_2$ と生成物である $\text{ClO}^-$ が近傍に共存しており、このような状況では $^1\text{O}_2$ が生成することが十分に考えられる。よって炎症時には $\text{ClO}^-$ に加えて $^1\text{O}_2$ も生成すること、そしてこれらが尿酸と反応すると考えられる。一方、尿酸と $\text{ClO}^-$ の特異的反応生成物は報告されていないことから、特異的反応生成物を同定した。

まず、尿酸と $\text{ClO}^-$ との反応を検討した。尿酸溶液に次亜塩素酸ナトリウム ( $\text{NaClO}$ ) 溶液をシリンジポンプにより一定速度で導入し、尿酸の減少と反応生成物の生成をHPLCで追跡した。 $\text{NaClO}$ 溶液を一定速度でゆっくりと導入すると、ALの生成は観察されず、HPLCクロマトグラム上に不明ピークが出現した。これは尿酸の経時的減少にともない生成したことから、プライマリーな反応生成物であると推察された。そこでこの化合物をLC/TOFMSで分析したところ、その推定組成は $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}$ となり、5-*N*-carboxyimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione (CCPD) であると予想された。また、尿酸の減少量に対するCCPDの生成量は40-70%程度にであった。加えて、CCPDは中性領域では安定に存在することから $\text{ClO}^-$ が関与する炎症疾患における酸化ストレス・マーカーとしての応用が可能であると考えられた。

第4章はLC/MS/MSを用いた微量分析系の確立及びヒト血しょうの分析である。尿酸酸化生成物は生体中では微量であることが予想された。そこで、LC/MS/MSを用いた分析法の確立を行った。いずれの尿酸酸化生成物も $f$  molレベルでの検出が可能となった。次に健常人とALS患者の血しょうを分析した。健常人からは尿酸のみが検出されたが、ALS患者の血しょうからはOUAとTUが検出された。また、ALS患者の血しょうでは尿酸濃度が健常人に比べて極めて低かった。これらことからALS患者では酸化ストレスが亢進していることが推察された。

第5章は結語である。尿酸と $^1\text{O}_2$ の特異的反応生成物を同定した。また、 $\text{ClO}^-$ の特異的反応生成物を見出した。現在までに報告された尿酸とROSとの反応生成物を網羅的に解析する手法を開発することで、*in vivo*で発生するROSの同定が可能になると期待される。

(4,005文字)

#### 備 考

1. 要旨は4000字程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA 4版 上質紙を使用すること。

## S u m m a r y

Applicant for degree :10/01/2018

Sayaka Iida

Title of thesis :

Uric acid as a molecular probe of singlet oxygen and hypochlorite formation *in vivo*

Oxidative stress is associated with lipid peroxidation and DNA damage, and thus can cause many diseases such as cancer, and diabetes. Since oxidative stress is initiated by the formation of reactive oxygen species (ROS), identification of specific ROS *in vivo* is important in pathological studies.

For identifying ROS *in vivo*, detection of ROS-specific oxidation products of endogenous antioxidants is a reasonable strategy. Uric acid (UA) is a suitable substrate for this purpose. It reacts with various ROS to afford specific products, e.g., free radical-induced oxidation gives allantoin, ONOO<sup>-</sup>-induced oxidation yields triuret, and nitric oxide (NO) gives 6-aminouracil. On the other hand, singlet oxygen- and a hypochlorite (ClO<sup>-</sup>)-specific oxidation products of UA have not yet been characterized.

We identified parabanic acid (PA) as a singlet oxygen-specific oxidation product of UA, which was confirmed by LC/TOFMS analysis. PA was stable at acidic pH (< 5.0), but hydrolyzed to oxaluric acid (OUA) at neutral or alkaline pH. The total yields of PA and OUA based on consumed UA were ~100%. We demonstrated its formation on human skin surfaces after sunlight exposure.

We also identified 5-*N*-carboxyimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3H)-dione (CCPD) as ClO<sup>-</sup>-specific oxidation product of UA. The yield of CCPD was 40-70% regardless of the rate of mixing of ClO<sup>-</sup> with UA. Kinetic studies revealed that the formation of CCPD required two molecules of ClO<sup>-</sup> per UA reacted. The identity of CCPD was determined from its molecular formula (C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) and a plausible reaction mechanism. This assumption was verified by the fact that all mass fragments. Isolated CCPD was stable at pH 6.0-8.0 at 37 °C for at least 6 hours.

Above results indicate that PA and CCPD are good markers of singlet oxygen and ClO<sup>-</sup> generation *in vivo*.      300 words