

(様式5)

学 位 論 文 要 旨

平成 30年 1月 10日

学位申請者

(永瀬 翠) 印

学位論文題目

生体内の酸化ストレスと酸化傷害評価法：百寿者と心肺停止症候群及び筋萎縮性側索硬化症患者への応用

学位論文の要旨

酸化ストレスとは生体内の酸化と抗酸化のバランスが崩れ前者に傾き、生体にとって好ましくない状態と定義されている。酸化ストレスは加齢、糖尿病、ガン、小児線維筋痛症、パーキンソン病など様々な疾病に関与していると言われている。我々はこれまで、血漿中酸化ストレスマーカーとしてコエンザイム Q10 (CoQ10) の酸化還元バランス、組織の酸化傷害マーカーとして血漿中遊離脂肪酸とその組成に注目し、分析法の確立と応用を行なってきた。CoQ10 はミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達系でエネルギー産生を担う重要な物質であるが、一方で生体内で生合成される脂溶性抗酸化物質としての役割も持つ。CoQ10 の抗酸化作用は高く、VE と同程度であるということが報告されている。また CoQ10 には還元型と酸化型があり、還元型 CoQ10 は定量的に酸化型になる。そのため、酸化ストレスの定義や還元型 CoQ10 の鋭敏性から、血漿中の全 CoQ10 中の酸化型の割合 (%CoQ10) は生体内の酸化ストレスマーカーとして有用であると思われる。しかし、%CoQ10 は全身の酸化ストレスを評価しているが、必ずしも組織の酸化ストレスを評価しているわけではない。そのため、組織の酸化傷害を評価するには、他のマーカーが必要となってくる。組織が酸化傷害を受けると生体膜中の非常に酸化されやすいリノール酸 (18:2) , リノレン酸 (18:3) , アラキドン酸 (20:4) やドコサヘキサエン酸 (22:6) などの高度不飽和脂肪酸 (PUFA) が減少する。PUFA の減少は細胞膜の流動性の低下をもたらすので、これを補償するために飽和脂肪酸を 1 価不飽和脂肪酸に変換するステアシル CoA 不飽和化酵素 (SCD) を活性化し、ステアリン酸 (18:0) をオレイン酸 (18:1) , パルミチン酸 (16:0) をパルミトオレイン酸 (16:1) に変換する。さらに酸化傷害が進むと細胞は死に至り、膜成分は加水分解され遊離脂肪酸として血中に放出されると考えられる。したがって、組織が酸化傷害を受けると血漿中の全遊離脂肪酸量

(FFA) は増加し、そのうちの PUFA の割合 (%PUFA) は減少し、16:1 の割合 (%16:1) や 18:1 の割合 (%18:1) は増加すると考えられる。これまで当研究室では、肝炎、肝硬変、肝ガン患者、新生児、小児線維筋痛症患者、パーキンソン病患者など様々な疾病の酸化ストレスを評価してきた。本研究では心停止後症候群 (PCAS) 患者、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者、百寿者における酸化ストレスを評価した。さらに、将来局所的な酸化ストレスマーカーとして有用になると考えられる脳脊髄液 (CSF) 中の CoQ10 の酸化還元バランスの測定法を確立した。

PCAS とは心停止後から自己心拍が再開した後に起こる、重篤な病態の総称である。PCAS 患者では新生児と同様に全身の虚血/再灌流障害に曝されていると考えられる。入院時の患者の酸化ストレス亢進は %CoQ10 と FFA 量が年齢が一致した健常人よりも有意に大ききこと、%PUFA が有意に低いことより確認した。また健常に比べ遊離コレステロール (FC) よりもエステル型コレステロール (CE) の減少が大きいため、FC/CE 比は有意に増加した。これは肝臓から HDL と共に分泌され、FC を CE に変換するレシチン：コレステロースアシルトランスフェラーゼが不足していることを意味し、肝障害が起こっていることを示唆する。さらに、転帰状態の違いにより患者を 6 つの群に分け、上記パラメーターの経時変化を比較した。入院 1 日で死亡した患者では急激な FC と CE レベルの低下が認められたが、1 週間で退院した患者では FC と CE レベルは安定していた。これらの結果から、コレステロール代謝異常が患者の生死を分ける一因であると考えられた。入院患者の約 7 割には PCAS に対する治療の一つである低体温療法を導入したが、復温時に CoQ10/全コレステロール比の有意な上昇を認めた。また CoQ10 結合タンパク質であるプロサポシン (Psap) は入院時に有意に上昇しており、心停止のような緊急時に生体は CoQ10 を必要とすると考えられ、今後の展開が期待される。

ALS とは筋萎縮と筋力低下を特徴とし、進行が速く、最終的には嚥下障害をきたし、2-4 年で死亡する神経難病である。家族性 ALS ではスーパーオキシドを不均化する抗酸化酵素である SOD1 に変異があることがわかっており、さらにチロシンのニトロ化生成物である 3-ニトロチロシンが CSF 中で増加するなど、酸化ストレスが病態の進行に重要な役割を果たすとされている。ALS に対する治療薬として、世界初のフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが注目されている。そこで、ALS 患者における酸化ストレスとエダラボン投与効果を評価した。エダラボンの投与は 1 週間に 1-4 回行われ、採血はエダラボン投与前後、1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後に行われた。同年齢の健常人と比較すると、%CoQ10 は有意に増加しており、酸化ストレスの亢進が確認できた。また、FFA 量は健常人とほぼ同じであったが、%PUFA が有意に低下していた。さらに ALS の進行度合いを評価する ALSFRS-R が 6 ヶ月後も減少しなかった患者を経過良好群、1-4 点下がった患者を中間群、5 点以上下がった患者を悪化群の 3 つの群に分けて経時間変化を比較したところ、経過良好群では上記のパラメーターは安定していたが、悪化群では %CoQ10 や FFA 量の一過性の上昇が認められ、酸化ストレスが病態の進行に重要な役割を果たすと考えられた。

高齢化社会は日本だけでなく世界中で進んでおり、寿命と健康寿命の差が大きいことは社会問題となっているが、100年以上生きている百寿者の人口は増加している。百寿者ではC反応性タンパクやIL-6などの炎症性サイトカインが高いことが分かっている。しかし酸化ストレスは加齢に関与しているといわれながらも、百寿者で抗酸化物質について報告されたものはない。そこで、76歳の健常コントロールと百寿者の血漿中CoQ10、抗酸化物質として知られている、ビタミンC (VC)、尿酸(UA)、遊離ビリルビン (BR) や遊離脂肪酸とその組成、コレステロールの比較を行った。UAは年齢による変化はないが、%CoQ10は年齢と共に有意に増加しており、酸化ストレス負荷が亢進していることがわかった。また、百寿者ではコレステロール値の低下がみられたが、FC/CE比は増加しているため、肝機能の低下が示唆された。さらに、CoQ10結合タンパク質であるPsapは血漿中CoQ10量が減少しているにも関わらず、増加していることがわかった。組織のCoQ10量は加齢と共に減少するため、これらのことから、百寿者では組織のCoQ10不足を補おうとPsapが増加しているのではないかと考えられる。そのため、百寿者にとってCoQ10を補うことは有用なことではないかと示唆された。

酸化ストレスが関与していると言われているALSやパーキンソン病(PD)のような神経変性疾患に対する治療は難しいとされている。しかし、ALS患者に対して、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが治療薬として日本およびアメリカでも追加承認された。また、PDではCoQ10を投与したところ、進行期のPD患者でプラセボ群と比べて、Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)が有意に減少したことが報告されている。これらのことから、酸化ストレスが関与しているとされる神経変性疾患への治療として今後、抗酸化物質やフリーラジカル消去薬の効果が期待されるであろう。しかしその際重要となるのは、酸化ストレスをどのように評価するかである。血漿中%CoQは全身の酸化ストレスを、脂肪酸とその組成で組織の酸化傷害を評価することができるが、どちらの酸化ストレスマーカーも局所的に脳での酸化ストレスを評価するには不十分であると考えられる。しかし、血漿では不十分だとしても、脳と脊髄を満たしているCSF中CoQ10の酸化還元バランスを測定するのは有用であると考えられる。実際にALSでは、ペルオキシナイトライドの酸化生成物である3-ニトロチロシンの増加がCSF中で確認されている。しかし、CSF中のCoQ10量は血液中に比べると非常に少量である。還元型CoQ10は非常に反応性が高く、またそれが少量ともなれば容易に酸化される。CSF中の%CoQ10を酸化ストレスマーカーとして用いるためには、還元型と酸化型が同時に分析できることも必要であるが、何よりも抽出操作中に還元型が酸化されないことが重要となる。そのため、CSF中に存在する微量な還元型CoQ10を酸化させずに測定する方法が必要となる。そこで、我々はtert-butylhydroquinoneを用いて還元型CoQ10の酸化を防ぐサンプルの抽出方法を見出し、実際にヒトのCSFにその抽出法が応用できることを確認した。

これらの結果から、PCAS、ALS患者および百寿者において酸化ストレス亢進や肝機能の低下に対する対策が必要であることが示唆された。またこれらのことは、死亡率が高

いPCAS患者や治療が困難とされているALS患者，延いては高齢化社会の進む世界で健康寿命を改善する治療方針の策定に役立ち，臨床現場での酸化ストレス評価に有用であると考えられる。

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。

(様式6)

S u m m a r y

Applicant for degree :

(Midori Nagase)

Title of thesis :

Methods for evaluating in vivo oxidative stress and damage: Application of centenarians and patients with post-cardiac arrest syndrome and amyotrophic lateral sclerosis

Oxidative stress is defined as a disturbance in the pro-oxidant-antioxidant balance in favor of the former. Therefore, the percentage of the plasma oxidized form of coenzyme Q10 (CoQ10) in the total amount of CoQ10 (%CoQ10) should be a useful marker of oxidative stress in the circulation. Furthermore, plasma free fatty acids (FFA) and their composition can be used as markers of tissue oxidative damage. Because polyunsaturated fatty acids (PUFA) in biomembranes are highly susceptible to oxidation and FFA should enter the bloodstream through leakage or lysis of oxidatively damaged tissues.

In this study, we applied these methods to human subjects under oxidative stress such as patients with post-cardiac arrest syndrome (PCAS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and centenarians. We observed significantly higher %CoQ10 levels and significantly lower %PUFA levels as compared with healthy controls. Furthermore, ratio of free cholesterol to cholesterol esters were significantly higher than healthy controls. This indicates some impairments of liver function since this ratio is determined by the activity of lecithin-cholesterol acyltransferase secreted from the liver.

Especially, this ratio was found to be one of the key factors determining the survival of PCAS patients. In addition, edaravone administration was effective for the treatment of ALS patients and we concluded that it functioned therapeutically as a scavenger of peroxynitrite since edaravone administration raised plasma levels of uric acid, an endogenous scavenger of peroxynitrite. We also concluded CoQ10 deficiency in centenarians. Finally, we developed the method for simultaneous detection of reduced and oxidized form CoQ10 in cerebrospinal fluid to meet a recent demand for measuring local oxidative stress. We believe that our findings are novel and will provide useful suggestions for future treatments.

備 考

1. 要旨は300語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A4版 上質紙を使用すること。