

氏名(本籍)	まみや まえだ 間宮(前田) るい (茨城県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4996号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Evaluation of Water-Soluble Fullerene Vesicle as a Radical Scavenger of Angiotensin II Induced Oxidative Stress (アンジオテンシンⅡ誘導性の酸化ストレスに対する活性酸素消去剤としての水溶性フラーレンベシクルの評価)		
主査	筑波大学教授	理学博士	林 純一
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	中田 和人
副査	東京大学准教授	博士(医学)	野入 英世

論文の内容の要旨

現在、動脈硬化をはじめとする血管障害では、活性酸素は重要な因子として位置づけられている。特に高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満と言った生活習慣病あるいは、喫煙等の危険因子は、NADH/NADPH オキシダーゼを介して活性酸素の産生を増加させる事が知られている。このように産生された活性酸素は、血管内皮から放出される血管内皮機能調節因子である一酸化窒素(NO)を直接的に不活性化することで、血管内皮機能障害・血管老化が生じると考えられている。生体内ではアンジオテンシンⅡ(AngⅡ)がNADH/NADPH オキシダーゼの代表的な活性化因子であり、AngⅡが原因の酸化ストレスは血管内皮の障害や、微小血管の障害に影響を与えている。

本研究では、活性酸素が医学上重要な標的である事を踏まえ、活性酸素に対する、新たな効果的な消去・治療物質を見いだす事を目指した。薬の候補として近年著しく発展しているナノカーボン素材(炭素クラスター)を用いた。炭素クラスターを用いる利点は、光エネルギーを吸収しやすく化学反応性も高い事と全くの生体外の物質の為、抗体認識がされない事である。また、化学反応性が高い事から生体膜に親和性を持たず為などの化学修飾が可能である点などがあげられる。

本研究で用いた、水溶性二重膜ベシクル構造を持つフラーレン(Phk)は、東京大学理学部中村教授らによって開発された炭素クラスターの一つである。その特殊な構造をしたフラーレンの特徴は次の通りである。

- (1) フラーレンは自身のもつ30個の炭素二重結合により高い O_2^- スカベンジ能力を持つこと。
- (2) サイズが30nm前後と、エンドサイトーシスされる為にちょうどよい大きさであること。
- (3) 水溶性であり、生体膜を模倣した二重膜構造を持っていること。

これらの特徴から、Phkは、生理的条件下で発生した細胞内の活性酸素に対し細胞内で消去剤として働き細胞保護効果が得られると予測された。

本研究では、NADH/NADPH オキシダーゼを有し、AT1, 2レセプターをもつヒト血管内皮細胞のHUVECを用いることで生理的な細胞内活性酸素の条件を模倣した。

(1) 細胞保護効果の検討

まず、細胞外性の活性酸素に対する効果を計る為、HUVECに過酸化水素を投与して、細胞外性活性酸素に対するPhkの細胞保護作用(細胞毒性、活性酸素の低減効果)を観察した。その結果、水溶性ベシクルフラレン(Phk)は過酸化水素0.1mMの刺激に対して、劇的に活性酸素を低減し、細胞を活性酸素から保護した。次に、HUVECに対し、アンジオテンシンII(Ang II)を 10^{-7} Mを添加し、細胞内性の活性酸素(NADH/NADPHオキシダーゼが活性化する事で主に O_2^- が発生)を発生させ、細胞内活性酸素に対するPhkの細胞保護効果を観察した。また、Ang II刺激実験のコントロール群として、アンジオテンシンレセプターブロッカー(ARB)であるRNH-6270を用いて検討した。その結果Ang II刺激による実験でも同様に細胞保護効果を発揮し細胞毒性を低減していた。

(2) 細胞内活性酸素の量および、活性酸素による細胞障害の評価

薬剤刺激時に細胞内で発生した、 O_2^- や OH^- などの活性酸素に対しても、活性酸素蛍光指示薬H2DCF-DAにより消去している事が証明された。また、ONOO $^-$ の産生量を測定に有利な蛍光指示薬HPFでもPhk添加群ではONOO $^-$ を低下させている事が証明された。PhkはHUVECのアポトーシスに関して減弱効果を有し、この作用は少なくとも細胞の脂質過酸化抑制作用を介すことが分かった。ここで観察されたPhkによる細胞障害の軽減は、ARBであるRNH-6270と同等あるいはそれ以上の効果を発揮した。

これまでにもフラレンを用いた抗酸化作用の報告はあったが、細胞内での効果を検討した研究は本研究が初めてである。本研究において、水溶性ベシクルフラレンが細胞内で、NADH/NADPHオキシダーゼから発生する O_2^- をトラップし、NOの不活性化を抑制することで、ONOO $^-$ 産生を優位に減少させる結果が得られた事は非常に興味深い。つまり、Phkは一連の病態形成の最初に位置する活性酸素を除去する事で、それ以後に発生するONOO $^-$ の産生、膜の脂質過酸化などを早期に食い止め、その結果、血管内皮細胞のアポトーシスを抑制する事が出来たと考えられる。これらの事はPhkが細胞内にとりこまれ、細胞内活性酸素の除去に効果的である事を示唆している。

審査の結果の要旨

本学位論文において間宮(前田)氏はフラレンベシクルの細胞内外における活性酸素消去作用を証明し、新たな炭素クラスター物質の薬剤への可能性を示した。近年の生活習慣病を始めとする3大疾病の疾患コントロールには活性酸素の除去が非常に重要であり、本研究はこの分野の研究に新たな切り口で貢献するものであることから、本学位論文は学問的価値が高いと判断できる。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。