

氏名	富田 勉		
学位の種類	博士（工学）		
学位記番号	博甲第 8481 号		
学位授与年月日	平成 30年 3月 23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	数理物質科学研究科		
学位論文題目	生体関連フリーラジカルの動的イメージングと評価		
主査	筑波大学教授	工学博士	長崎幸夫
副査	筑波大学教授(連携大学院)	博士(工学)	陳 国平
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	荏原 充宏
副査	筑波技術大学教授	博士(医学)	平山 暁

論 文 の 要 旨

本論文は、生体内で発生するフリーラジカルの生理的、病理的役割について、イメージング技術を用いて、生物材料を生かしたまま動的に解析した結果を述べたものである。

第1章では、本研究者がイメージングに携わるようになった経緯と本研究の動機、および細胞レベルから生体レベルまでフリーラジカルが作用する各段階で動的に生体反応との関連性を示すという目的が述べられている。

第2章では、現在知られている細胞内の主なフリーラジカル発生源を概説したのち、フリーラジカルの検出方法について解説している。

第3章では、本研究者が開発してきたイメージングの手法について、本研究の基盤となった先行事例を挙げて概説している。

以上を背景に、様々な発生源から産生される生体由来のフリーラジカルの作用について、細胞レベルから生体組織レベルまで、本研究を成す第4, 5, 6章の検討がなされている。

第4章では、外因性に投与された薬剤が引き起こす酸化ストレスについて、消化管粘膜傷害の副作用が問題となっている NSAIDs の一つインドメタシンを取り上げ、*in vitro* で示唆されていたミトコンドリア機能障害による粘膜上皮細胞の活性酸素種(ROS)濃度上昇と細胞傷害によるメカニズムを、経口投与したインドメタシンに起因するマウス消化管傷害モデルを用いて確認することができたと述べている。小腸粘膜上皮細胞は、病変が形成される前から ROS 濃度が高くなって、脱落しやすくなり粘膜バリアが脆弱化していたことを *in vivo* ライブイメージングによって明らかにしている。

第5章では、内因性の酸化ストレス起因物質の中で最も重要なものの一つとされ、動脈硬化や各種生活

習慣病との関係が注目されているホモシステインについて、背景となる代謝経路と酸化ストレスとしての作用の概略を述べたのち、近年高ホモシステイン血症との関連が明らかになった骨粗鬆症性の骨折リスクについて、*in vitro* で骨芽細胞株を用いて活性酸素種の発生源、細胞生存・機能に対する作用を述べている。これに対してエストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)の作用を併せて検討し、作用メカニズムを考察している。

第6章では、血管内皮細胞からの一酸化窒素(NO)産生を生きた実験動物の血管で *in vivo* で可視化し評価する方法について、漢方薬、桂枝茯苓丸の作用に関連して述べている。漢方で言う瘀血状態は酸化ストレスによって血管内皮機能が低下し血行不全をきたした状態と考えられるとし、瘀血の治療薬として血流改善作用が知られている桂枝茯苓丸が血管内皮細胞からの NO 産生を増加させて血流を改善することをライブイメージングによって初めて示したとしている。血管内皮機能の低下は、動脈硬化、血栓症、糖尿病、アルツハイマー病など、様々な疾患の基盤にあると考えられ、5章で取り上げたホモシステインの主な作用点であると考えられていることから、*in vivo* における NO 産生能による血管内皮機能の評価、解析系の構築は意義があるとしている。

第7章では、ここまで述べた総括と今後の展望が述べられている。*in vitro*, *in vivo* の各レベルで生体関連フリーラジカルのイメージングによる評価が可能となったとし、生物材料を生きた状態のまま少なくとも2点以上の時間経過でイメージングすることにより、状態の違いを検出できたと述べられている。*in vitro* の知見を *in vivo* で検証できる定量性をさらに高めたイメージング評価系の構築を目指す述べている。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文では、ライブイメージングと蛍光プローブを組み合わせる手法を、*in vitro* から *in vivo* まで展開し、細胞内で発生するフリーラジカル及び活性酸素種(ROS)の生理的、病理的な作用を明らかにしている。生体内の組織を構成する細胞単位でライブイメージングによる評価を可能にしたことは *in vitro* の知見を生体内で検証することを可能にするものとして期待できる。

インドメタシンによる小腸粘膜傷害モデルでは、粘膜の状態の違いをROSの産生量と時間経過による脱落細胞の多さで評価している。生きたままの観察が、生体反応の違いを検出することを可能にし状態の違いを把握することを可能にした。

内因性の酸化ストレス誘導因子として注目されるホモシステインの骨への作用を培養骨芽細胞を用いて検討した研究では、ホモシステインによるアポトーシスに先立ちカスパーゼ9と8の両方が活性化することや、アポトーシスを誘導しない低濃度のホモシステインでも ROS の上昇が見られ酵素の発現が抑制されることなど、ホモシステインの作用メカニズムを考察する上で重要な知見が得られている。

血中ホモシステイン高値は動脈硬化の危険因子としてよく知られており、酸化ストレスにより血管内皮機能を低下させることが主な作用点と考えられているが、次に本研究者は実験動物の生体内の血管内皮細胞からの一酸化窒素(NO)の産生をライブイメージングにより可視化し、薬剤の投与による作用を評価可

能にした。NO 産生だけでなく、血管反応、血行動態を併せて評価できる点が興味深い。ホモシステインは動脈硬化などの血管病の他にも各種生活習慣病や神経変性疾患などに関与し、酸化ストレスによる血管内皮機能の低下が共通する基盤として存在すると考えられているため、in vivo のライブイメージング評価系が新たな知見をもたらすことが期待される。

以上のように、in vitro から in vivo まで、細胞単位で ROS と生体反応を可視化する手法を提供することは学術的貢献を果たし得る。よって本論文は博士(工学)の学位論文に値するものと認める。

〔最終試験結果〕

平成 30 年 2 月 16 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。