

論文の内容の要旨

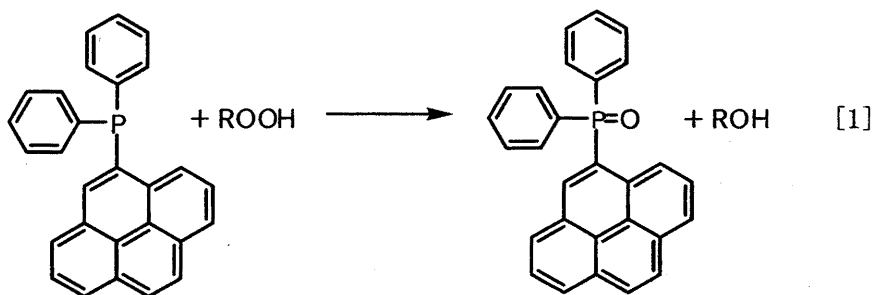
論文題目 新規蛍光プローブ DPPP を用いた生物学的酸化反応分析法の開発

氏名 沖本 優子

動脈硬化をはじめとする種々の疾病、ガン、老化の進展には活性酸素種による生体組織の損傷が深く関わっていると考えられる。活性酸素の標的となるのは脂質、タンパク、DNA であるが、脂質は高度不飽和脂肪酸のビスアリル水素が非常に酸化されやすい性質を持つため最も攻撃を受けやすい。動脈硬化に於いては動脈硬化と血液中の低比重リポタンパク (LDL)濃度が高い相関を示すこと、動脈硬化病巣から酸化的変性を受けた LDL が回収されたことなどから 1989 年 Steinberg らにより酸化 LDL 仮説が提唱された。それによると LDL が血管壁で酸化変性を受けると、通常の LDL レセプターではなく、スカベンジャーレセプター経由でマクロファージがそれを貪食し、泡沫化して血管壁内部に蓄積・隆起することで動脈硬化が進行するというものである。LDL の酸化は生体内で発生する活性酸素種が関与すると考えられているが、具体的な酸化機構は明かではない。

従来 LDL の酸化を測定する試みとして脂質の酸化一次生成物であると考えられている過酸化脂質を紫外吸収や化学発光を用いて測定する方法が行われてきた。しかし、これらの方法は特異性が低いという問題があった。そこで本研究では高感度性と高選択性を兼ね備えた蛍光法により脂質の過酸化物を検出する新規の方法を開発し、生物学的な系における酸化を追跡することを目的とした。過酸化物が共通に持っているヒドロペルオキシドの

選択的な反応としてトリフェニルフォスフィンへの還元が知られている。このフェニル基の一つを蛍光性の発色団であるピレンに置換したジフェニル-1-ピレニルフォスフィン(DPPP)は、トリフェニルフォスフィンと同様ヒドロペルオキシドを還元しジフェニル-1-ピレニルフォスフィンオキシド(DPPP=O)となる。この際 DPPP は無蛍光であるのに対し DPPP=O は蛍光を生じるため (式[1])、DPPP=O の蛍光を利用して系の過酸化物の量を追跡することができる。



まず、均一系およびリポソーム系における DPPP の過酸化物との反応性を調べた。均一溶液中では DPPP は水溶性の過酸化物である過酸化水素(H_2O_2)とも脂溶性の過酸化物であるリノール酸メチルヒドロペルオキシド(MeLOOH)とも反応性を示した。生体膜や LDL のモデルとして使用されるジオレオイルフォスファチジルコリンリポソーム懸濁液に DPPP を取り込ませ、同様に過酸化物を添加したところ、 H_2O_2 との反応性は大幅に減少し、MeLOOH との反応性は増大した。DPPP は脂溶性のため、リポソーム膜内の疎水領域に局在すると考えられるが、この時水溶性の過酸化物とは共存しないため反応性がほとんど消失する。一方、脂溶性の過酸化物とは膜という限られた領域に共存するため両者の局所濃度が非常に増大し、反応速度が非常に大きくなる。すなわち、不均一系においては DPPP は疎水性の過酸化物である過酸化脂質と主に反応するプローブとして用いることができることがわかった。

そこで、DPPP を用いてマウス腹腔白血球の細胞膜内の脂質過酸化を検出した。マウス白血球に DPPP を DMSO 溶液として添加すると一部が膜に取り込まれる。取り込まれなかったものを取り除いたのち、 H_2O_2 および MeLOOH と反応させた。リポソーム懸濁液の場合と同様に、白血球中の DPPP は H_2O_2 よりも MeLOOH によって非常に効率よく酸化された。DPPP の入った白血球を PMA で刺激すると、DPPP=O が生成し蛍光が経時的に増加した。DPPP=O の生成は刺激をしない場合はほとんど起こらなかったことから考えると、刺激によって生成した活性酸素種が脂質の過酸化を引き起こしていると考えられる。細胞膜中の脂質過酸化は顕微鏡を用いて観察することもできた。MeLOOH を白血球に添加した 30 分後、蛍光が増加しているのを顕微鏡によって可視化することが出来た (図 1A)。

過酸化物を添加しない場合は蛍光はほとんど増加しなかった (図 1B)。

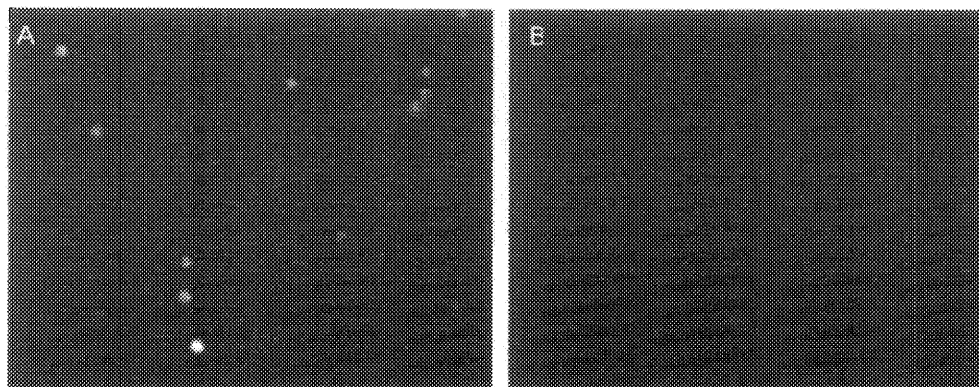


図1 リノール酸メチルヒドロペルオキシド(MeLOOH)添加時におけるDPPP標識白血球中の蛍光増加。DPPP標識PMN 1×10^6 cells/ml, HBSS (1% FBS) A: $5 \mu\text{M}$ MeLOOH添加30分後 B: 過酸化物無添加30分後

さらに、DPPP を用いて LDL 内の脂質過酸化を検出した。LDL に DPPP を DMSO (10 % Pluronic F-127) 溶液として添加すると一部が膜に取り込まれる。取り込まれなかったものを取り除いたのち、 H_2O_2 および MeLOOH と反応させた。やはり LDL 中の DPPP は H_2O_2 よりも MeLOOH によって非常に効率よく酸化された。DPPP で標識した LDL をラジカル開始剤により酸化したところ、 $\text{DPPP}=\text{O}$ が生成し蛍光が経時的に増加した。 $\text{DPPP}=\text{O}$ の生成はラジカル開始剤を添加しない場合はほとんど起こらず、ラジカル開始剤の濃度に依存した。未標識 LDL および標識 LDL 内のコレステリルリノリエートヒドロペルオキシド (CEOOH) およびヒドロキシド (CEOH) を HPLC を用いて定量したところ、未標識 LDL と標識 LDL を酸化した際の CEOOH と CEOH の総和が両者でほぼ等しく、標識 LDL で

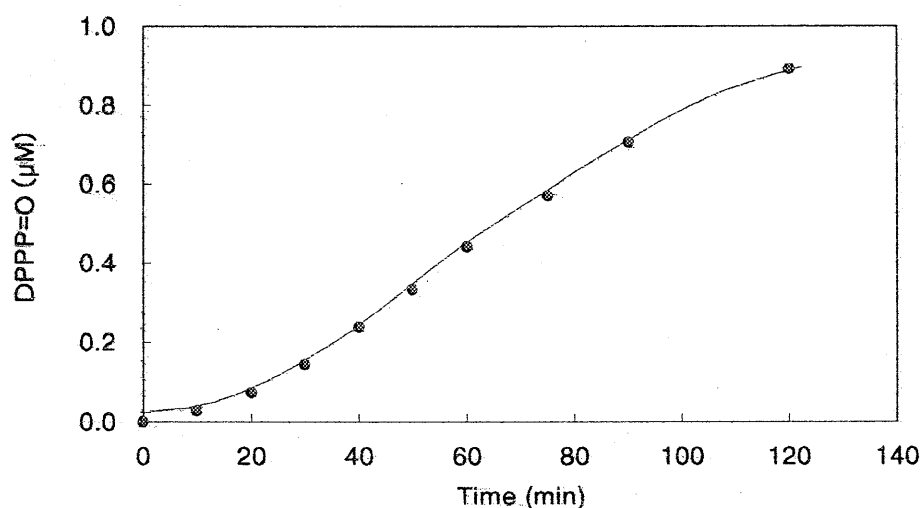


図2 活性化好中球によるLDLの酸化。DPPP標識LDL $0.1 \mu\text{M}$, ヒト好中球 5×10^5 cells/ml, 100 nM フォルボールエステル in HBSS

CEOHが多くなっていた。これは、LDL粒子中でラジカル開始剤によって生じた過酸化脂質(CEOOH)がDPPPと反応してDPPP=Oを与えていることを示している。また、ヒト好中球をPMAで刺激し、DPPP-LDLとインキュベートしたところただちにLDLが酸化され蛍光が増加することがわかった(図2)。細胞を刺激しない場合ほとんどLDLは酸化されないことから、好中球活性化で発生する何種類かの活性酸素種がLDLの脂質過酸化を起し、DPPP=Oが生成したのであろう。また、DPPP-LDLを用いてマクロファージ中のLDLの酸化についても観測することができた。マクロファージをF-10中でDPPP-LDLおよびDPPP=O標識LDL(DPPP=O-LDL)とインキュベートすると4時間後までに細胞内に蛍光が蓄積する。両者の蛍光を比較すると0, 2時間後ではDPPP=O-LDLを加えた方がDPPP-LDLを加えたものより蛍光が強いのにに対して4時間後の両者の差はほとんど見られない。これは、細胞内に未酸化の状態に取り込まれたDPPP-LDLが細胞内で酸化されている現象を示していると考えられる。

以上のように新規の蛍光プローブを用いて生物学的脂質過酸化を追跡する方法を開発した。これにより、マウス白血球細胞膜内の脂質過酸化および、ヒトLDL内の脂質過酸化を追跡することに成功した。

従来の過酸化脂質検出法に比べ、DPPPを用いた本法は以下のような特色を持つ。第一に高感度性である。検出に蛍光を用いているため、紫外吸収を用いる方法に比べ感度は10~100倍高い。第二に簡便さである。本法では生細胞浮遊液またはLDL溶液を蛍光セルに入れるだけで脂質過酸化が測定できる。これは抽出してHPLCで分析する方法と比較すると格段に操作が少ないため、操作中の影響を最低限に抑えることができる。第三に可視化できる点である。脂質過酸化を蛍光の増加により可視化できるため細胞を培養した状態のまま連続的に顕微鏡で観察することができる。系を破壊しないで脂質過酸化の様子を視覚的に表現できるということはより生理的な環境での脂質過酸化を検出できることにつながる。Dichlorodihydrofluoresceinやdihydrorhodamine 123も同様に細胞や組織内の酸化ストレスに応答して蛍光が増加することが知られているプローブであるが、これらは反応過程でラジカル中間体を經由し、 O_2 と反応して $O_2^{\cdot-}$ を発生させるとの報告がある。そのため特異性が低く、人為的な酸化を起こす危険性がある。また、ペルオキシダーゼ等の酸化酵素の存在を必要とするため蛍光強度が過酸化物の量のみ依存しているとは言い難い。DPPPは過酸化物と直接反応して蛍光を発するためそのような問題は生じない。

このような性質から、混合培養系、組織、whole bodyでの細胞膜またはLDLの脂質過酸化の可視化あるいは尿・血液中の脂質過酸化の微量分析の分野等に本法が応用できることが期待できる。