

審査の結果の要旨

氏名 中村 立二

リン脂質から遊離されたアラキドン酸の酵素的代謝産物であるプロスタグランジン、ロイコトリエン(LT)、hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)、epoxyeicosatrienoic acid(EET)などエイコサノイドは、リピッドメディエーターとして強力かつ多様な生理活性を有している。近年、生体内において生成されたフリーラジカルによってアラキドン酸がリン脂質にエステル結合した状態で酸化され、生理活性を有するエイコサノイド様化合物が生成されると言う報告がなされている。本研究ではこれを拡張し、いくつかの脂質過酸化のモデルシステム中におけるエイコサノイドの網羅的な測定を試みることによって、生理活性を有する他のエイコサノイドは存在するか、最も多量に産出される分子種は何か検討することを目的とした。これを可能にするために、本研究では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とエレクトロスプレー・タンデムマスペクトロメトリー(ESI-MS/MS)を連結し、両者の特徴を最大限に生かした実験系を工夫している。

以下にその主な結果を示す。

1) ヒト赤血球リン脂質膜の酸化による HETE および EET の生成

ヒト赤血球膜中にラジカル反応で産出したアラキドン酸の酸化物、HETE および EET の ESI-MS/MS スペクトルはそれぞれの位置同位体に特徴的なプロダクトイオンからなっていた。この特徴的なプロダクトイオンを選択的にモニターする方法 (multiple reaction monitoring: MRM 法) と逆相 HPLC による分離を利用し、HPLC だけでは分離できずしかも全て同じ質量の 10 種の HETE および EET を同時に測定する方法を確立した。次に、*tert*-BuOOH によってヒト赤血球に引き起こされた過酸化反応によって、HETE および EET を脂肪酸残基として含む酸化リン脂質が全てのリン脂質クラスにおいて増加している事を示した。特に EET は GPE、GPS および GPC の各クラスで未処理群と比べそれぞれ、49, 34, 59 倍もの存在量が認められた。この結果は非酵素的に EET が生成する事をはじめて示した例である。

2) マウス肺組織内リン脂質のアラキドン酸酸化物の分析

In vivo モデルシステムとしてマウスの肺を用いた。測定に先立ち、組織からの脂質成分の抽出法、固相抽出カートリッジを用いた簡単な遊離脂肪酸分画とリン脂質分画の分離法を工夫し、良好な抽出効率、分離効率を得た。遊離脂肪酸分画はそのまま、リン脂質分画は加水分解後、遊離脂肪酸として酸化リン脂質の生成を HPLC-ESI-MS/MS 法によって測定した。*tert*-BuOOH 処置群においては、リン脂質フラクション内のすべての HETE 異性体の存在量が増加していた。更に、生成物がフリーラジカル反応由来であることを確かめるために、微量に生成しているリン脂質由来 15-HETE の

光学分析を HPLC と GC/MS を組み合わせることによって達成している。

3) ヒト頸動脈硬化におけるプラーク不安定性と HETE の関係

フリーラジカル反応と関連性があるといわれる動脈硬化に注目し、ヒト由来の頸動脈プラーク内の各種のエイコサノイド (6 種の HETE、4 種の EET、3 種の *ketoaikosatetraenoic acids*、F₂-イソプロスタン) を HPLC-MS/MS 法によって定量した。対照群としては、正常の動脈組織を用いた。プラーク内においてこれらエイコサノイドのうち特に HETE の増加量が著しく、これらは非酵素的な過酸化機構によって生成したものであると想定した。また、不安定プラークにおいてはトータル HETE の存在量が安定プラーク内における存在量より有意に増加しており、これは他のエイコサノイドには見られないものであった。この結果からプラークの進展とフリーラジカルによる HETE の増加量には何らかの関連性がある事を示唆した。

4) 5-リポキシゲナーゼ(5-LO)非依存性の LT 生成

LT 生成の始発酵素として重要な役割を持っている 5-LO は、リン脂質から酵素的に遊離されたアラキドン酸を 5-HPETE へ、引き続いて LTA₄ へと変換する 2 つの酵素活性を有する。LTA₄ はその後、酵素的に加水分解を受け LTB₄ に、またはグルタチオンの付加を受けて LTC₄ へと変換される。近年 15-LO もまた 5-HPETE を LTA₄ へと変換させる活性を有している事が報告された事を受け、本研究では、フリーラジカル反応によって 5-HPETE が生成すればその後 15-LO 及び下流の酵素活性により、全く 5-LO に依存しない LT 生成経路の可能性を検討した。5-HPETE は 5-HETE の前駆体であり、フリーラジカル反応によって生成している事はこれまでの結果から容易に推定される。5-LO ノックアウトマウスの腹膜マクロファージに *zymosan* を作用し、食作用を引き起こさせた後の反応溶液中に LTC₄ 由来のピークを捉えた。次にこのマクロファージと 5-HPETE をインキュベートした反応液中に、やはり LTC₄ が生成している事を捉えた。これらの結果から 5-LO 非依存的なロイコトリエン生成の可能性を強く示唆した。

以上、本研究はリン脂質で起こるフリーラジカル過酸化反応による予期出来ない化学反応の結果を、HPLC 法と ESI-MS/MS 法を用いて分子レベルで示そうと試み、生理活性を有する微量なエイコサノイドの生成を定量的に捉えている。その結果、非酵素的な EET の生成、動脈硬化プラークの進展と HETE の関連性、5-LO 非依存的な LT 生成の可能性を強く示唆する結果を得た。本研究は生体組織中の微量なエイコサノイドを分析するための方法論を提供し、また酸化ストレスと脂質過酸化による生物学的反応メカニズムを探るための示唆に富むものとして、分析化学や薬理学へ貢献していると評価し、博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと認めた。