

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 谷野 豊

日本人の死亡原因の約 30%を占め、増加傾向にある癌のメカニズムを解明し、治療や診断法を開発することは、ストレスの多い高齢化社会を迎える日本にとって最大の課題となっている。癌を含めた加齢に伴い増加する疾患の大きな要因としてラジカルの関与が注目されている。

フリーラジカルは DNA を酸化的に修飾し、8-ヒドロキシグアニンやチミングリコールを生成させ、DNA の複製エラーを起こすことが明らかになっており、発がんイニシエーターとしての役割が指摘されている。一方、発がんのプロモーターとしては外因性のホルボールエステル類が多く研究されており、ホルボールエステル類と同様に酸化ジアシルグリセロール(酸化 DAG)がプロテインキナーゼ C(PKC)をよく活性化することが知られている。癌や代謝性疾患における酸化DAGの役割を探るため、本論文では酸化DAGの検出法の開発に取り組み、酸化ストレスが関与する疾患動物モデルを用いて実証的な検討・考察を行っている。

第1章では序論として、酸化ストレスの概要と生体内で起こる酸化反応について述べ、活性酸素およびジアシルグリセロールと発ガンプロモーター仮説について概説している。酸化 DAG が病理的意義を持つかどうかは、生体試料中に酸化 DAG が検出されるかどうかにかかっているが、第2章ではその方法を詳しく述べている。まず超高感度で分析するためにピレン-1-カルボニルシアニドを用いた蛍光誘導化法を採用している。触媒はキヌクリジンが良いことを明らかにしている。誘導化後は逆相高速液体クロマトグラフィーにより、脂肪酸側鎖の違いや、酸化、未酸化の違いによって良好に分離することができることを明らかにし、さらに未酸化 DAG は $220 \text{ fmol} \cdot 1 \text{ nmol}$ の範囲において、酸化 DAG においては $30 \text{ fmol} \cdot 1 \text{ nmol}$ の範囲においてピーク面積と注入モル数との間に良好な比例関係を認めている。生体試料を分析する場合、抽出溶媒として 2-プロパノールでの抽出効率が高く、再現性があるとしている。また、生体試料中の妨害物質を除き、濃度が低い酸化 DAG を濃縮するために、内部標準を添加後、蛍光誘導化する前に、逆相 HPLC、順相 HPLC で精製、濃縮することが必要であることを明らかにしている。同上の操作による損失も少なく、再現性もある事から、本研究で開発した酸化 DAG 分析法は信頼性があると結論している。さらに、健常人血漿から酸化 DAG の検出を試みており、予想通り酸化 DAG は検出されず、

検出限界から考えると 0.88nM 以下であると論じている。このことから、以降の章で酸化ストレスの関与が指摘されている動物モデルから酸化 DAG の検出を試みている。

第3章では遺伝的な肝炎、肝がん自然発症モデル動物として樹立された Long Evans Cinnamon (LEC) ラットからの酸化 DAG の定量を試みている。以前の研究から LEC ラットは肝炎発症時に酸化ストレスが亢進することが明らかになっている。肝臓中の酸化 DAG レベルも肝炎発症前に比べ、肝炎発症後に有意に増加することを認めている。銅イオンのキレート剤であるトリエンチンを飲料水に混ぜ摂取させると、肝炎を発症せず酸化 DAG レベルも増加しなかった。以上の結果から、肝炎の発症に伴う酸化ストレスの亢進時に酸化 DAG が生成している事を明らかにしている。

第4章では UV 照射したヘアレスマウス皮膚からの酸化 DAG の検出を試みている。未照射あるいは低用量の紫外線に比べ、発赤する用量の UVA あるいは UVB を照射後、数時間で酸化 DAG レベルが有意に増大することが認められたと述べている。また、皮膚中に砒素が沈着することが原因とされていて、活性酸素の関与が考えられている皮膚の疾病であるボーエン病患者皮膚からの酸化 DAG の検出も試みており、正常皮膚組織からは検出されなかったが、病変組織からは酸化 DAG が検出されたことを明らかとしている。

以上、酸化 DAG の生体試料中での検出法を開発し、酸化ストレス下の動物組織中で検出できたことは、未だ説明が不十分である酸化 DAG の病理的意義を明らかにする上で重要な貢献と考えられた。

したがって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。