

氏名	朝日 尚		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第5375号		
学位授与の日付	平成28年 3月25日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	DNA halogenation as potential biomarkers during the early inflammation stage and its regulation by food constituents (炎症反応に由来する DNA 傷害産物の生成機構解明と食品因子による制御)		
論文審査委員	教授 中村 宜督	教授 村田 芳行	教授 木村 吉伸

学位論文内容の要旨

発癌因子の一つとして炎症の関与が示唆されており、炎症初期の有用な酸化ストレスマーカーとして、強力な活性酸素種である次亜ハロゲン酸 (HOCl や HOBr) と DNA ヌクレオシドの一つである 2'-デオキシグアノシン (dG) との反応生成物である 8-ハロゲン化 dG (8-Cl-dG, 8-BrdG) を見出した。そこで、8-ハロゲン化 dG に注目し、その病理生理学的役割の理解と生成の化学的制御と目的として、(1) 生体内アミンによる 8-ハロゲン化 dG 生成の制御、(2) 炎症初期の新規酸化ストレスマーカーとしての 8-ハロゲン化 dG の評価、(3) 8-ハロゲン化 dG 生成を阻害する食品因子の探索に関する研究を行った。

(1) では、次亜ハロゲン酸に加え、生体内に存在するアミンと次亜ハロゲン酸との反応から生成されるハロゲン化アミン (クロラミン、ブロマミン) の関与に着目し、dG のクロロ化、ブロモ化反応機構の違いを明らかにした。クロラミンは dG のクロロ化に全く影響を与えなかったのに対し、ブロマミン、特にジブロマミンを介した間接的な反応が dG のブロモ化を増強することが明らかとなった。また、このブロモ化促進作用は、炎症部位で活性化される好中球に多く含まれるタウリンのような β -アミノ酸で顕著に認められ、ヌクレオシドの中でも dG に特異的であることも確認された。以上の結果から、8-BrdG の生体での新しい生成機構を提案することができ、酸化ストレスマーカーとしての意義をより現実的なものにした。

次に(2)では、8-ハロゲン化 dG は、組織に加え、尿中からも検出可能な炎症初期の酸化ストレスマーカーであることを免疫組織化学的手法、及び機器分析により明らかにした。8-ハロゲン化 dG のモノクローナル抗体を作製し、リポポリサッカライド (LPS) を投与した炎症モデルマウスの肝臓での評価を行ったところ、MPO^{-/-}マウスでは染色が確認されなかったことから、本モデルにおける *in vivo* での 8-ハロゲン化 dG 生成は MPO に由来していることが確認された。一方で、LPS 投与後の経時的な評価を行なったところ、ハロゲン化は酸化に比べ、より早期に起きていることが示唆された。さらに、8-ハロゲン化 dG は、8-OHdG と同様に、尿中へと排出されることも明らかとなった。また、実際に炎症との関連が示唆される糖尿病患者さんの尿中において、8-ハロゲン化 dG の尿中への排出量が健常者に比べ増加していることも確認された。以上より、8-ハロゲン化 dG は組織に加え、尿中からも検出可能な炎症初期の新規の酸化ストレスマーカーであることが示唆された。

続いて(3)では、8-ハロゲン化 dG を指標とした新規抗酸化食品因子の評価を行い、エルゴチオネインの抗炎症作用を *in vitro*、*in vivo* において明らかにした。エルゴチオネインは、キノコに比較的豊富に含まれている天然アミノ酸の一つである。エルゴチオネインの *in vitro* 抗ハロゲン化作用を評価したところ、8-ハロゲン化 dG の捕捉作用に加え、MPO 酵素活性を直接阻害することが明らかとなった。また、その作用は、アスコルビン酸やグルタチオンよりも有意に強力であった。さらに、UV 照射誘発皮膚炎症モデルラットに、エルゴチオネインを高濃度で含むキノコ抽出物を経口投与することで、皮膚炎症並びに DNA ハロゲン化傷害が抑制されることも、免疫組織化学的解析、及び病理学的解析により明らかにした。

以上の研究から、生体から検出可能な 8-ハロゲン化 dG の初期炎症特異的酸化ストレスマーカーとしての役割を明確にし、その実用性を強く支持した。また、生体内に存在するタウリンは 8-BrdG の生成を増強すること、一方、天然に存在するアミノ酸のエルゴチオネインは 8-ハロゲン化 dG の生成を強力に抑制することを見出し、これらの化合物が 8-ハロゲン化 dG 生成の化学的制御を可能にすることを示した。ハロゲン化は炎症部位で活性化している MPO や EPO に特異的な反応であり、ハロゲン化が酸化やニトロ化よりも初期に起こる可能性を見出したことから、今後、8-ハロゲン化 dG を炎症部位における早期酸化ストレス指標として臨床的にも確立できれば、ハロゲン化制御が慢性疾患の早期発見、早期治療の有望なターゲットになりえるものと期待される。

論文審査結果の要旨

次亜ハロゲン酸（HOCl、HOBr）の過剰生成はDNAの不可逆的修飾を誘発し、がんをはじめとした慢性疾患の病原的・増悪的要因となると考えられている。本研究では、次亜ハロゲン酸と2'-デオキシグアノシン（dG）の反応生成物である8-ハロゲン化dGの病理生理学的役割を理解し、その生成を化学的に制御する方策を探索した。

まず、生体内アミンと次亜ハロゲン酸との反応から生成されるハロゲン化アミン（クロラミン、ブロマミン）のdGハロゲン化への影響を検討した。その結果、ブロマミンのみがdGのプロモ化を増強すること、この促進作用はβ-アミノ酸で特に顕著であることを明らかにし、炎症過程における8-BrdGのバイオマーカーとしての意義をより現実的なものにした。

次に、8-ハロゲン化dGが有用な酸化ストレスマーカーであることを、マウス炎症モデルを用いて免疫組織化学的及び分析化学的手法により明らかにした。また、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）ノックアウトマウスを用いることで、8-ハロゲン化dG生成へのMPOの寄与を証明した。さらに、糖尿病患者尿中で8-ハロゲン化dGの増加を確認し、ヒトに応用可能なマーカーであることを示唆した。

最後に、8-ハロゲン化dG生成を指標とした新規抗酸化食品因子の評価を行い、エルゴチオネインが8-ハロゲン化dGの捕捉に加え、MPO酵素活性を直接阻害することを確認した。また、エルゴチオネインを含むキノコ抽出物の経口投与はUVA誘導皮膚炎症を顕著に抑制することを見出した。

以上の研究から、8-ハロゲン化dGの初期炎症特異的酸化ストレスマーカーとしての役割を明確にし、その実用性を強く支持するだけでなく、8-ハロゲン化dG生成のアミノ酸による化学的制御の可能性を示した。本研究内容は、学術的な価値のみならず、実用に結びつく技術の礎となるものであり、本審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位論文に値するものと判断した。