

論文の内容の要旨

論文題目 抗酸化剤ルチンによる放射線防護基礎過程の研究
Study on fundamental process of radiation protection by antioxidant rutin

氏 名 于 嵩

1. はじめに

がんの放射線治療では放射線によってがん細胞中の DNA 損傷を引き起こすことで効率よく腫瘍を取り除く。ただ、治療では正常細胞も照射されることを避けられない。放射線による DNA 損傷は、直接作用と間接作用に由来するものに分類できる。直接作用では、エネルギーが DNA 分子に直接吸収され、励起またはイオン化が起こる。一方、間接作用では、水分子が放射線のエネルギーを吸収し、水の放射線分解で生成した $\cdot\text{OH}$ （ヒドロキシルラジカル）が DNA を酸化させて初期損傷を形成する。このようにして生じた初期損傷が修復されないまま安定化してしまうと、次第に鎖切断や塩基損傷といった安定な損傷となり、最終的にはがん治療の副作用や術後障害などにつながる。

放射線防護剤は放射線障害を抑える薬剤の総称である。チオール (SH) 基やカテコール構造を持つ抗酸化剤は、高い還元作用、つまり $\cdot\text{OH}$ などの酸化性ラジカルを捕捉して除去できる（ラジカル捕捉）能力が高く、放射線防護剤として期待されている。*In vivo* 実験では照射前に抗酸化剤の微量添加で高く防護効果を示された [C.K.K. Nair, et al., *J. Radiat. Res.*, **42**, 21 (2001).]。日常的な酸化ストレスと違って、水の放射線分解により生成された $\cdot\text{OH}$ は局所に集中しているにもかかわらず、微量でも効果が見られたことから、ラジカル捕捉以外のもっと遅いプロセスの存在が示唆され、近年ではこれを化学回復であると提唱されている [K. Hata, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 341 (2013).]。化学回復とは $\cdot\text{OH}$ に酸化された DNA 初期損傷が抗酸化剤の還元作用によりゆっくりと回復する過程のことである。ラジカル捕捉は間接作用由来の酸化性ラジカルの除去にしか効果がないことに対し、化学回復は放射線の直接作用・間接作用のどちらに由来する初期損傷に対しても効果があると考えられ、放射線防護ではラジカル捕捉よりも重要な機能を果たすことが期待される。

先行研究では、放射線防護基礎過程のうち、特に化学回復はほとんど解明されていなかった。*In vivo* の細胞実験では、ラジカル捕捉と化学回復の寄与を分離することが難しく、抗酸化剤の放射線防護効果はラジカル捕捉によると帰着されることが

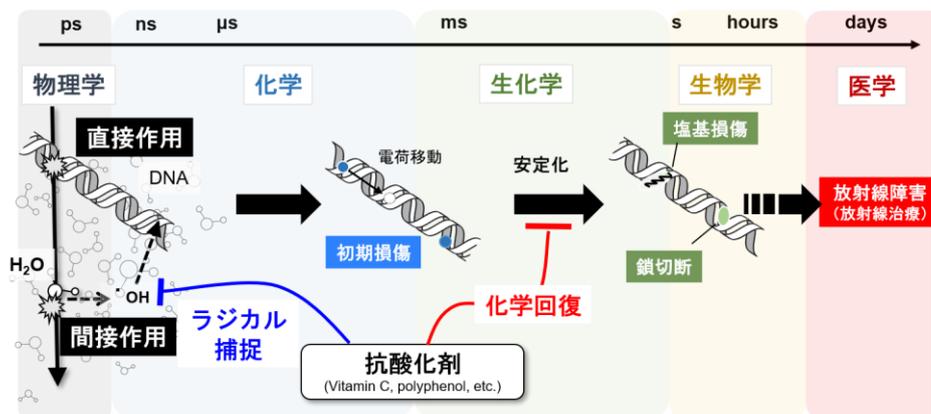


図 1. 放射線による DNA 変異誘発とその防護過程における抗酸化薬剤の役割

多かった。そこで本研究では抗酸化剤の放射線防護基礎過程の解明を目的とし、生化学的レベルでの検討を行った。まず、(1) 短時間領域における反応挙動、抗酸化薬剤と放射線水分解ラジカル・酸化された DNA ラジカルとの反応をパルスラジオリシス法で直接観測した。また、(2) 放射線由来の安定 DNA 変異を電気泳動法で検出及び定量し、微量抗酸化剤の添加効果を評価した。

2. 実験手法

2.1 試料 (抗酸化剤と DNA)

抗酸化剤としては、天然フラボノイドの一つであるルチンとその配糖体である α G-ルチンを使用した。比較のために代表的な抗酸化剤であるアスコルビン酸も利用した。パルスラジオリシス実験では DNA の単量体 dGMP (デオキシグアノシンーリン酸) を DNA モデルとして使用した。安定な DNA 変異検出では大腸菌から抽出したプラスミド DNA を用いた。

2.2 パルスラジオリシス法による放射線誘起反応の直接観測

東京大学原子力専攻の電子線加速器施設 LINAC において、35 MeV の電子線パルス (パルス幅 10 ns) を用いてパルスラジオリシス実験を実施した。パルスあたりの吸収線量はチオシアン線量計で測定し、5–70 Gy の範囲に制御した。ルチンと \cdot OH の反応メカニズムを調べる際、 $N_3\cdot$ を比較のために用いた。ルチンと \cdot OH の実験では測定 15 分前から試料に N_2O ガスを飽和し、水和電子を \cdot OH に変換させた。ルチンと水和電子との実験では *t*-BuOH より \cdot OH を除去し、Ar 飽和状態で実施した。すべての試薬は市販で最高純度のものを購入し、精製はせずに利用した。

ルチンと \cdot OH との反応速度は、ヨウ化物イオン (I^-) を競争相手とした競争反応法で決定した。競争反応法では、 I^- とルチンの \cdot OH に対する捕捉能の比を求め、 \cdot OH と I^- の反応速度定数は既知のため、ルチンと \cdot OH の反応速度が求められる。水和電子との反応速度は、抗酸化剤の添加濃度に応じる水和電子の減衰速度の変化から決定した。

2.3 電気泳動法による DNA 損傷の定量評価

2.3.1 概要

細胞内は複雑な環境となっており、素過程を描きらかにするには適していない。そこで、抗酸化剤のラジカル捕捉や化学回復について調べるために、安定な DNA 構造変異を好感度に検出できる大腸菌プラスミド DNA (pUC18, 2686 bps) を使用した。pUC18 は損傷していない状態と一本鎖切断 (SSB) または二本鎖切断 (DSB) が生じた状態では高次構造が異なり、電気泳動で分離できる。塩基除去修復酵素を利用して塩基損傷を SSB に変換することで、その収率も定量した。

2.3.2 DNA の高純度化

プラスミド DNA は大腸菌 (*E. coli* JM 109) から抽出するが、DNA の抽出・保存工程に、混入・残存したエタノールなどの有機分子は \cdot OH と高い反応性を持ち、微量の抗酸化剤の効果を調べるためには、それらの不純物を除去する必要がある。リン酸緩衝液の溶質であるリン酸イオンは \cdot OH との反応性が低く、抗酸化剤添加による pH 変化も抑制できるため、これを溶媒として使用した。プラスミド DNA 試料をリン酸緩衝液に浸漬することで透析し、一日 1~3 回程度でリン酸緩衝液を置換した。1~2 日おきに DNA 試料を微量に取り出し、X

線照射による損傷収率が一定となるまでに透析を続けた。

2.3.3 高純度 DNA 試料への X 線照射

不純物を除去した高純度 DNA 試料に X 線を照射した。吸収線量は電離箱で評価した。放射線の間接作用は DNA 希薄水溶液を、直接作用はフィルム状 DNA をそれぞれ用いて調べた。希薄水溶液では DNA 周囲に大量に存在バルク水から生じる OH ラジカル由来の損傷が支配的となる。一方、フィルム状 DNA は DNA 周囲の水分子の数をヌクレオチドあたり数十個程度までに低減した状態となり、放射線からのエネルギーの大半が直接 DNA に吸収される。

3. 結果と考察

3.1 α G-ルチンと \cdot OH の反応

α G-ルチンと \cdot OH の反応の過渡吸収スペクトルでは、400、440 および 550 nm に吸収ピークが確認された。時間経過に伴って、スペクトル形状が変化して各波長の吸光度の比が変化し、生成物が複数存在することが示唆される。 \cdot OH は付加反応・電子引抜反応・水素引抜反応のいずれも引き起こせるため、複数の吸収ピークがそれぞれの反応の生成物に対応すると考えられる。同定のため、電子引抜き型の酸化性ラジカル $N_3\cdot$ を α G-ルチンとの反応を観測した。 $N_3\cdot$ との反応では最初に 400 nm のピークのみ確認された。これは α G-ルチンが $N_3\cdot$ に電子を引き抜かれ、カチオンラジカルとなる反応であると考えられる。また、上記の吸収ピークは時間とともに長波長側 (440 nm) にシフトし比較的安定な生成物となった。これは、 α G-ルチンのカチオンラジカルからプロトン (H^+) が外れて生じた中性ラジカルと考えられる。

3.2 DNA モデルを用いた化学回復の観察

次に化学回復の直接観測を試みた。図 2 左には dGMP と \cdot OH との反応で観測された過渡吸収スペクトルを示してある。450、530 及び 680 nm 付近にピークがあるが、全体的にブロードな吸収となっている。次に、dGMP 試料内に dGMP よりも \cdot OH 捕捉能の十分低い α G-ルチンを添加した (図 3 右)。dGMP 濃度が 1.5 mM で α G-ルチン濃度が 50-100 μ M の場合、ほとんどの \cdot OH は dGMP と反応するため、1 μ s 程度では抗酸化剤を添加していない場合とほとんど変わらなかった。しかし、50 μ s 程度になると、440 nm 前後に新たなピーク生成が見られた。この吸収の立ち上がる速さは α G-ルチンの添加濃度に応じて変化した。この新たに生成された 440 nm の吸収ピークは、 α G-ルチンの水素引抜反応で得られる生成物のピークと一致しており、OH ラジカルにより酸化された dGMP が α G-ルチンから水素原子を一つ奪うことで還元されたといえる。化学回復の観測は、代表的な抗酸化剤の一つであるアスコルビン酸などでもこれまでに報告されているが、今回の α G-ルチンのように非常に明瞭に観測できたのは初めてである。

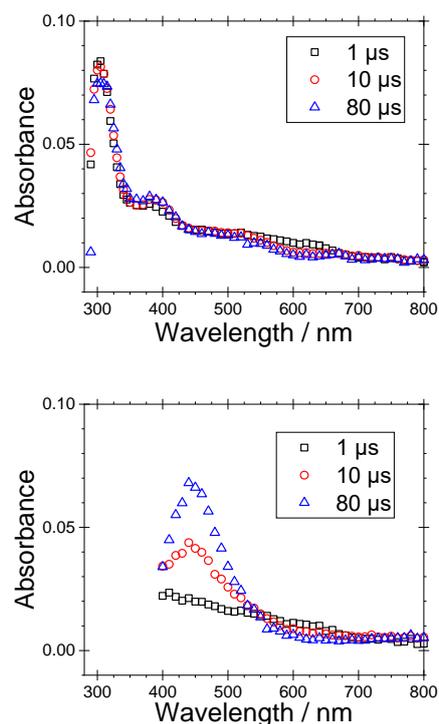


図 2. 1.5 mM dGMP と \cdot OH の反応の過渡吸収スペクトル
(上: α G-ルチン無添加、下: 0.1 mM α G-ルチン添加)

3.3 反応速度定数の評価

表 1 にルチン・ α G-ルチンと反応する水分解ラジカルである OH ラジカルと水和電子、更に酸化された DNA ラジカルとの反応速度定数をまとめる。水分解ラジカルのいずれに対しても高い反応性を示した。糖鎖の導入は反応速度定数に影響していないことから、各ラジカルとの反応はルチンの主要骨格に起こっていることが示唆される。

表 1. ルチン、 α G-ルチンが e_{aq}^- 、 \cdot OH 及び dGMP ラジカル (dGMP \cdot) との反応速度定数 (単位: $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

	ルチン	α G-ルチン
e_{aq}^-	1.1 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2
\cdot OH	1.3 \pm 0.3	1.0 \pm 0.1
dGMP \cdot	0.09 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01

3.4 不純物除去による DNA 損傷の収率変化

不純物の除去の結果、DNA 損傷の収率に変化が見られた。透析を 1~2 日継続すると、DNA 損傷の収率が大幅に増加した。しかし、1 週間程度まで継続すると、DNA 損傷の収率は一定水準で飽和した。DNA 周囲の不純物が除去でき、より高感度な DNA 試料を入手できたといえる。

3.5 間接作用と直接作用の比較

照射する DNA 試料の水分を調節することで、間接作用と直接作用の違いを調べた。同じ吸収線量では、間接作用由来の損傷が直接作用由来の損傷より収率が高かった。このことから、水分解ラジカルの \cdot OH が高効率で DNA 損傷を誘発することが分かった。

3.6 抗酸化剤の微量添加による影響

抗酸化剤であるアスコルビン酸や α G ルチンを微量添加した結果、いずれも鎖切断や塩基損傷の収率低減が確認された。鎖切断と比べて塩基損傷は低減効果 (防護率) が高い傾向であった。これは、重篤な鎖切断よりも、抗酸化剤が選択的に塩基損傷を防護または修復する可能性が高いことを示唆している。各種類の DNA 損傷に対する防護率がことなっていたため、これは、抗酸化剤の種類によって、防護・修復されやすい DNA 損傷の種類が異なることが分かった。

4. まとめと今後の展望

本研究は、生化学レベルでの抗酸化剤ルチンの放射線防護基礎過程を解明することを目的とし、パルスラジオリシス実験で抗酸化剤ルチンと水分解ラジカルや酸化された DNA ラジカルとの反応挙動を観測し、ラジカル捕捉だけでなく化学回復という防護過程についてもその存在を明瞭に観測できた。

また、微量抗酸化剤の添加効果を安定な DNA 変異の収率の変化という観点からも調べた。放射線の直接作用と間接作用由来の損傷をそれぞれ検出する手法を確立し、定量的な評価に成功した。また、試料に抗酸化剤を微量添加した際の DNA 損傷の収率の変化から、抗酸化剤ルチンの防護効果を調べた。

抗酸化剤にはまだ水溶性・細胞膜透過性などの問題が残されている。今後は、より生体に近い環境をモデルとした抗酸化剤の防護効果を調べることで、放射線がん治療の臨床用基礎データを蓄積していくことが期待される。