

主論文の要旨

Histological detection of catalytic ferrous iron with the selective turn-on fluorescent probe RhoNox-1 in a Fenton reaction-based rat renal carcinogenesis model

フェントン反応に基づいたラット腎発癌モデルにおける選択的活性化蛍光プローブ RhoNox-1 の触媒二価鉄イオンの組織学的検出に関する研究

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病理病態学講座 生体反応病理学分野

(指導：豊國 伸哉 教授)

向出 貴裕

【緒言】

鉄は、生物に必要不可欠であり、ヒトに最も豊富な遷移金属である。生体に存在する金属元素のうち、最も多く約 4g を占める。生体の鉄は、約 60%が赤血球中のヘモグロビンに存在し、ヘム補欠分子族として酸素を結合・遊離する。次いで残りの鉄は、細胞または血清を含む細胞外空間に存在している。鉄は、様々な酵素の補因子であり、血清中のトランスフェリンに強固に結合され、フェリチン鉄を形成、増加により不溶性のヘモジデリン鉄に変化する。

鉄にはメリットとデメリットの両方があると考えられる。鉄欠乏は貧血や筋力低下を引き起こし、鉄過剰または局所的な過剰状態は、感染症、癌、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患など様々な疾患リスクとなることが多くの報告からわかってきた。現在、確立されている鉄の取込みトランスポーターDMT1 (NRAMP2)、肝臓ペプチドホルモンは以前に発見され、ヘプシジンなどは鉄が関与する感染症リスクとして報告された。ヒト・動物研究において鉄過剰は発癌にかかわることが数多く報告されている。

一般論として、上記のほとんどの病態において生体内でフェントン反応が引き起こされ反応性の高いヒドロキシルラジカルが生じていることが原因となって認められている。そのため、フェントン反応の触媒となる二価鉄イオン [Fe (II)] の役割は極めて重要である。しかし、これまで [Fe (II)] は不安定なため簡便に検出する組織学的方法に関しては確立されていない。現在、生理活性物質の機能イメージングを可能にする蛍光プローブは生命医学研究に欠かせないツールとなっている。最近、初めて不安定な [Fe (II)] を選択的に検出する高感度蛍光プローブ (RhoNox-1) が開発された。そこで、フェントン反応誘発ベースとして確立されている鉄 (III) ニトリロ三酢酸 [Fe (III) -NTA] 腎発癌ラットモデルにこの蛍光プローブの応用を試みた。本研究では、*in vivo* でのフェントン反応を介した酸化損傷後の腎臓の凍結切片から二価鉄イオンの動態や分布に焦点を当て解析を行った。

【対象及び方法】

Male Wistar rat 8週齢 (N=42) に Fe (III) -NTA を単回腹腔内投与後、時間群 (0, 1, 2, 4, 6, 24 and 48 h, 10 mg iron/kg body weight, N=3)、用量群 (0, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 mg iron/kg, 1 h after administration, N=3) に分類した。これらのラットは単回腹腔内投与前・後に体重、投与後に両腎臓重量を測定した。

単回腹腔内投与後、所定の時点で直ちに両方の腎臓を摘出、凍結組織切片作製のための包埋処理を行った。残りの腎臓の一部は 10%リン酸緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋を行った後、4 μ m の厚さに薄切してヘマトキシリンエオジン染色された。

RhoNox-1 (岐阜薬科大学、平山祐、永澤秀子ら) は以前の報告により合成し、鉄溶液 (二価鉄イオン [Fe (II)] 溶液、三価鉄イオン [Fe (III)] 溶液)、鉄キレート溶液 (鉄 (II) ニトリロ三酢酸 [Fe (II) -NTA]、鉄 (III) ニトリロ三酢酸 [Fe (III) -NTA]) の 4 種類溶液を作製して RhoNox-1 の反応性を Powerscan 4 で評価した。

凍結切片 (8 μ m) に 20%リン酸緩衝ホルマリン・メタノール固定後、RhoNox-1 を浸透させた。その後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、ヒドロキシフェニルフルオレセンイ (HPF)、4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)、それぞれ同様に染色した。画像データ収集は蛍光顕微鏡 (BZ-9000) と内蔵のソフトウェア (BZ-II アナライザー)、ImageJ を使用して定量的な理解に繋がる画像データ解析を行った。

【結果】

RhoNox-1 の *in vitro* の実験では、Fe (III)、Fe (II) -NTA、Fe (III) -NTA と反応しなかったが 0-10 μ M の範囲内で Fe (II) と濃度依存的に反応した (Figure 1)。Fe (III) -NTA 腎発癌モデルは、腹腔内注射後 30 分-3 時間の初期において脂質過酸化反応および DNA 修飾の増加を示し、鉄を介した酸化ストレス状況下が最大に達することが報告されている。

経時的な研究では、Control 群の腎臓の特性を考慮して、露光時間、画像の取得条件、蛍光バックグラウンドを調整した。RhoNox-1 の特異的な蛍光強度が投与 1 時間後には有意に増加を示し、さらに 6 時間後ピークまで持続的に増加を続けた。その後、蛍光強度は 24-48 時間の間、減少し (Figure 2A-C)、大部分の近位尿細管壊死が観察された。腎臓重量は 6 時間後から有意に増加した (Figure 2A-A)。HPF の蛍光強度は RhoNox-1 より減少した同様の増減を示し、核に特異的な DAPI の蛍光強度は Fe(III) -NTA 投与後、顕著に減少して、細胞数も減少した (Figure 2A-C)。この原因となる近位尿細管細胞の変性や壊死の進行を示していた (Figure 3-A)。

次に、単回腹腔内投与 1 時間後の用量依存的な研究を行った。35 mg iron/kg の投与群は約 30 分後に全て死亡した。30 mg iron/kg の投与群の腎臓重量は有意に増加を示し (Figure 2A-B)、腎臓は浮腫で膨潤していた。RhoNox-1 と HPF の蛍光強度は、10 mg iron/kg 投与群から一過性に上昇、その後、継続的に有意に増加を示した (Figure 3A-B)。

細胞内の用量-反応を示す指標として任意の相対蛍光単位を用いた。相対蛍光単位は細胞ひとつあたりの密度を表す指標として領域を核数により割って算出した。相対蛍光強度は未処理と比較して用量段階に有意に増加を示し、用量相関性の傾向を認めた (Figure 3A-C)。RhoNox-1 と HPF は近位尿細管細胞内、細胞外において共局在を示し (Figure 3A-A)、蛍光強度は強い相関を認めた $r=0.912$ (Figure 4)。

【考察】

選択的に Fe (II) を検出する RhoNox-1 は、選択性が高く、定量的な性能など等、汎用性のある有効なプローブである。以前の開発報告では培養細胞に適用していた。本研究では、ラット組織の凍結切片に初めてこの蛍光プローブを用いた。この手法では、全身蛍光像情報を得ることができ、簡便にヒトならびに他の種のサンプルに試み、生命現象の解明、定量的理解に資することができる。

Fe (III) -NTA は中性 pH で可溶性の鉄キレート錯体であり、6本の配位子のうちまだ3-4本の触媒となる自由配位子を残している。したがって、この分子は、還元後のフェントン反応に最も強力な鉄触媒であると考えられる。Fe (III) -NTA を腹腔内注射すると、全身の血流に吸収された後、腎臓の糸球体で濾過され、近位尿細管内腔でフェントン反応を起こす。これは、グルタチオンサイクルからのシステインにより Fe (III) -NTA が Fe (II) -NTA に還元されると考えられている。このモデルにおける多くの報告では、*in situ* でのヒドロキシル基で修飾された分子生成があげられる。例えば、急性期における酸化的 DNA 塩基修飾、様々なアルデヒド (マロンアルデヒド、4-ヒドロキシ-2-ノネナール、アクロレイン等) などである。最終的には反復投与により腎細胞癌を生じて、それは最近、これらの癌におけるゲノム変化がヒトの変化と対応して類似していることが示された。

不安定な Fe (II) の検出は、腎臓の近位尿細管内腔、周辺の細胞に見られ、その蛍光シグナルを定量化した結果、明確な用量依存性を認めた。このプローブが組織から得られた凍結切片に有用であり、一方、別の標本に対して従来法の Perl's iron staining により検討したが、明確な結果を得ることができなかった。Perl's iron staining ではヘモジデリン、フェリチン鉄を検出していると考えられ、これらの化合物が生体内で細胞分子に損傷を与えているかどうかは明らかではない。しかし、一部の化合物は、触媒の形に可溶化されている可能性がある。すなわち、この手法は不安定な鉄イオンに直接的に作用して検出していると言える。

本研究では、データが示すように生体内で Fe (III) -NTA から Fe (II) が産生されることを証明して明らかにした。しかるに、Fe (II) -NTA は γ -グルタミルトランスフェラーゼ及びジペプチダーゼといった管壁の酵素群から分解されたグルタチオン由来 L-システインを介して還元により生成されたものではなく、この原因は明らかではないが、腎臓の近位尿細管内腔の軽度の酸性 pH により脱キレート化されたと考えれば、その後、DMT1 を介して絨毛腔側膜から Fe (II) として吸収されたと考えることも可能である。この仮説は断定的なものではなくさらなる調査が必要である。

酸化ストレスのために多くのマーカーがすでにあり、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) および 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) などのヒドロキシルラジカルとの反応によって修飾された分子が含まれる。これらに対するモノクローナル抗体を、この動物モデルのホルマリン固定パラフィン包埋切片に適用することができた。すなわち、これらのモノクローナル抗体と RhoNox-1 との間には概念的な違いがある。

RhoNox-1 と HPF は蛍光の強い近位尿細管細胞内だけでなく蛍光の弱い細胞外においても共局在を示した。この結果は、陽性病巣において実際に *in situ* でフェントン反応を引き起こすことを示している。したがって、RhoNox-1 は、触媒作用となる Fe (II) を選択的に探索して検出し、分布を明らかにすることができ、酸化ストレス関連疾患を評価するための新規のマーカーである。

まとめとして、いくつかの疑問や報告において、さらなる研究により解明される必

要がある。: 1) この方法は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片に適用可能であるか。; 2) このプローブと様々なモデルの他の酸化的修飾物に関するデータとの間に不一致があり、それは何を意味していたか (不安定な Fe (II) は、過酸化水素が存在しない場合では安定である可能性がある)。; 3) この方法は、動物を用いたタイムラプスの研究にも適しているか。; 4) RhoNox-1 の蛍光検出におけるバックグラウンドを低下できるかどうかである。

【結論】

本研究では、凍結切片に触媒性 Fe (II) を視覚化するための新規の戦略を提案する。このプローブは、様々な酸化ストレス関連疾患のための新たな研究領域へ発展していくことが期待される。