

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 向 出 貴 裕

論 文 題 目

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)

論文審査担当者 名古屋大学教授

主 査 委 員 藤 本 豊 士 

名古屋大学教授

委 員 若 井 建 志 

名古屋大学教授

委 員 大 野 欽 司 

名古屋大学教授

指 導 教 授 豊 岡 伸 哉 

論文審査の結果の要旨

鉄過剰または局所的な鉄過剰状態は、感染症、癌、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患など、種々の疾患リスクであることが数多く報告されている。これらのほとんどの病態において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 ($\cdot\text{OH}$) が生成されることが報告されている。そのため、フェントン反応の触媒作用となる二価鉄イオン $[\text{Fe}(\text{II})]$ の役割は極めて重要である。鉄 (III) ニトリロ三酢酸 $[\text{Fe}(\text{III})\text{-NTA}]$ 腎発癌ラットモデルは、腎近位尿細管内腔においてフェントン反応誘発するとされている。このモデルは、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 ($\cdot\text{OH}$) との酸化的修飾によって生成された分子が数多く報告されている。最近、初めて不安定な $[\text{Fe}(\text{II})]$ 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、この蛍光プローブの *in vitro* での標識特異性を検証し、凍結切片への応用を試みた。本研究は、*in vivo* フェントン反応を介した酸化損傷後の腎臓から $[\text{Fe}(\text{II})]$ の動態や分布を検討した。

本研究の新知見と意義は要約すると以下のとおりである。

不安定な $\text{Fe}(\text{II})$ の検出は、腎近位尿細管内腔、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、明確な用量相関性の傾向を認めた。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、他方、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る。




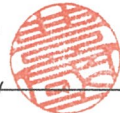
$\text{Fe}(\text{III})\text{-NTA}$ から $\text{Fe}(\text{II})$ が産生されることを見出した。しかるに、 $\text{Fe}(\text{II})\text{-NTA}$ は γ -グルタミルトランスフェラーゼおよびジペプチダーゼといった管壁の酵素群から分解されたグルタチオン由来 L-システインを介して還元により生成されたものではなく、この原因は明らかではないが、腎近位尿細管内腔の軽度の酸性 pH により脱キレート化されたと考えれば、その後、鉄イオン取込みトランスポーター DMT1 を介して絨毛腔側膜から $\text{Fe}(\text{II})$ 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。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片と凍結切片での RhoNox-1 の蛍光検出可能性について検討した。その結果、蛍光検出や分布に関して同様の結果を得ることができなかったことから、切片組織上での蛍光色素の反応に違いがあることを確認した。

不安定な $\text{Fe}(\text{II})$ と ($\cdot\text{OH}$) は腎近位尿細管細胞内において共局在を示した。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 $\text{Fe}(\text{II})$ を選択的に探索し、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。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	向出 貴裕
試験担当者		主査	藤 本 豊 	名井 建志  大野 敏司 
		指導教授	豊 岡 伸 哉 	
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 選択的活性化蛍光プローブの組織学的検出の方法と開発について 2. 鉄イオンを介したフェントン反応によるラジカル形成メカニズムについて 3. 定量的理解につながるイメージ・インフォマテックス解析について 				
<p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、生体反応病理学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				