

博士学位論文

氏名(本籍) 森谷 俊介 (千葉県)

学位の種類 博士(工学)

学位記番号 博乙第118号

学位授与年月日 平成26年2月27日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項

学位論文題目

尿中腫瘍マーカー N^1,N^{12} -ジアセチルスペルミンの研究:

早期がん検出能の活用のためのイムノクロマトグラフィー

測定系の開発および早期がん組織における生成機構解明の

ための測定ツールの研究

論文審査委員 主査 今村 保忠 教授

副査 南雲 紳史 教授

副査 小山 文隆 教授

副査 川喜田 正夫 元教授

副査 阿部 克也 准教授

工学院大学大学院

尿中腫瘍マーカーN¹,N¹²-ジアセチルスペルミンの研究：
早期がん検出能の活用のためのイムノクロマトグラフィー測定系の開発
および

早期がん組織における生成機構解明のための測定ツールの研究

Studies on a tumor marker N¹,N¹²-diacetylspermine (DiAcSpm) in urine :
Development of an immunochromatographic assay procedure for applying DiAcSpm to
early cancer detection, and of analytical tools applicable to investigation on the
mechanism of increased DiAcSpm production in early cancer tissues.

森谷 俊介

目次

| | |
|--|----|
| 略語表 | 3 |
| 第1章 序論 | 4 |
| 第2章 イムノクロマトグラフィーによる簡易測定法の開発 | 11 |
| 第1節 序文 | 11 |
| 第2節 実験材料と方法 | 12 |
| 第1項 試薬、尿検体、装置 | 12 |
| 第2項 競合的ELISA法による抗DiAcSpm抗体の解析 | 13 |
| 第3項 抗体添加による金コロイドの安定性の評価 | 13 |
| 第4項 イムノクロマトグラフィーストリップの組み立て | 13 |
| 第5項 金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体に対するブロッキング剤の効果 | 14 |
| 第6項 DiAcSpm濃度の測定 | 14 |
| 第7項 熱加速試験による金コロイド標識抗体のイムノクロマトグラフィー ストリップ中における保存安定性の検討 | 15 |
| 第3節 結果と考察 | 15 |
| 第1項 DiAcSpmのためのイムノクロマトグラフィー法の概要 | 15 |
| 第2項 競合的ELISA法による抗DiAcSpm抗体の解析 | 16 |
| 第3項 金コロイドの安定性と抗体結合量の評価 | 16 |
| 第4項 様々な条件での抗体の結合と結合後のブロッキング効果 | 17 |
| 第5項 DiAcSpmの測定 | 19 |
| 第6項 熱加速試験によるイムノクロマトグラフィーストリップの保存安定性の 検討 | 20 |
| 第3章 同位体標識基質を用いた質量分析法によるポリアミン代謝酵素活性測定法 | 21 |
| 第1節 序文 | 21 |
| 第2節 実験材料と方法 | 22 |
| 第1項 試薬 | 22 |
| 第2項 同位体標識化合物の合成 | 22 |
| 第3項 測定試料の固相抽出 | 24 |
| 第4項 質量分析のための試料の誘導體化 | 25 |
| 第5項 質量分析装置による測定 | 25 |
| 第6項 APAO、SMO、SSATの発現と活性測定 | 25 |
| 第3節 結果と考察 | 26 |

| | | |
|-----|---|----|
| 第1項 | ポリアミンおよびアセチルポリアミンの定量 | 26 |
| 第2項 | N ¹ AcSpdとN ⁸ AcSpdの同定 | 27 |
| 第3項 | 質量分析法によるポリアミン測定の酵素活性測定法への適用 | 28 |
| 1. | APAO | 28 |
| 2. | SMO | 29 |
| 3. | SSAT | 30 |
| 第4章 | スペルミンオキシダーゼおよびN ¹ -アセチルポリアミンオキシダーゼの活性 部位に結合する不可逆阻害剤の開発 | 33 |
| 第1節 | 序文 | 33 |
| 第2節 | 実験材料と方法 | 34 |
| 第1項 | 実験材料の合成法 | 34 |
| 1. | 合成スキーム1 | 34 |
| 2. | 合成スキーム2 | 35 |
| 第2項 | 酵素活性の測定 | 38 |
| 第3項 | 質量分析による測定 | 39 |
| 第3節 | 結果と考察 | 39 |
| 第1項 | N ⁸ 位に置換基をもつスペルミジン誘導体の合成 | 39 |
| 第2項 | 異なる合成経路によるN ¹ -置換スペルミジンおよびN ⁸ -置換スペルミジン 誘導体の合成 | 40 |
| 第3項 | 合成された化合物のSMOおよびAPAOに対する阻害効果 | 41 |
| 第5章 | 総合討論 | 45 |
| | 引用文献 | 50 |
| | 図表 | 58 |
| | 謝辞 | 85 |

略語表

| | |
|----------------------|--|
| AcCad | acetyl cadaverine アセチルカダベリン |
| APAO | acetylpolyamine oxidase N ¹ -アセチルポリアミンオキシダーゼ |
| Ben | benzoxyl group ベンジル基 |
| Boc | tert-butoxycarbonyl group <i>tert</i> -ブトキシカルボニル基 |
| BSA | bovine serum albumine ウシ血清アルブミン |
| CA19-9 | carbohydrate antigen 19-9 糖鎖抗原19-9 |
| Cad | cadaverine カダベリン |
| CEA | carcinoembryonic antigen がん胎児性抗原 |
| DiAcSpd | N ¹ ,N ⁸ -diacetylspermidine N ¹ ,N ⁸ -ジアセチルスペルミジン |
| DiAcSpm | N ¹ ,N ¹² -diacetylspermine N ¹ ,N ¹² -ジアセチルスペルミン |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay 酵素免疫測定法 |
| ESI | electro spray ionization エレクトロスプレーイオン化法 |
| HFB | heptafluorobutyryl ヘプタフルオロブチル基 |
| HPLC | high performance liquid chromatography 高速液体クロマトグラフィー |
| HRP | horseradish peroxidase 西洋ワサビペルオキシダーゼ |
| IC ₅₀ | half maximal (50%) inhibitory concentration 50%阻害剤濃度 |
| MS | mass spectrometer 質量分析計 |
| MS/MS | tandem mass spectrometer タンデム質量分析計 |
| N ¹ AcSpd | N ¹ -acetylspermidine N ¹ -アセチルスペルミジン |
| N ¹ AcSpm | N ¹ -acetylspermine N ¹ -アセチルスペルミン |
| N ⁸ AcSpd | N ⁸ -acetylspermidine N ⁸ -アセチルスペルミジン |
| ODC | ornithin decarboxydase オルニチンデカルボキシダーゼ |
| PBS | phosphate buffered saline リン酸緩衝生理食塩水 |
| Pht | phthaloyl group フタロイル基 |
| PSA | prostate specific antigen 前立腺特異抗原 |
| Put | putrescine プトレシン |
| RSD | relative standard deviation 相対標準偏差 |
| SMO | spermine oxidase スペルミンオキシダーゼ |
| Spd | spermidine スペルミジン |
| Spm | spermine スペルミン |
| SSAT | spermidine/spermine acetyltransferase スペルミジン/スペルミンアセチルトランスフェラーゼ |
| TOF | time-of-flight 飛行時間 |

第1章

序論

急速な社会変化や高齢化に伴い疾病構造も近年大きく変化しており、がん、脳卒中、心臓病などの生活習慣病が死亡原因全体の60%を占めるに至っている。とりわけ、死因統計の第一位を占めるのが「がん」である。国や自治体によるがん対策が行われている現在でも、罹患率は引き続き増加しているが、一方、医学の進歩により、早期診断・治療によるがん患者の生存率の向上がみられ、がん患者の高齢化の影響を除いた死亡率はむしろ減少している⁽¹⁾。しかし、現状においてはがんの早期発見率は不十分であり、治療開始の遅れから予後不良を招くケースが依然として多い。早期に発見されれば、がんは治癒可能な疾患であると言える状況が近づいているだけに、がんの早期発見は極めて大きな課題である。がんの診断には数多くの腫瘍マーカーが日常的に利用されており、欠かせないものとなっている。しかし、以下に述べるとおり、既存の腫瘍マーカーは早期がんに対しては一般的に十分な検出感度を示さないとされてきた。我々は尿中に排泄されるN¹,N¹²-ジアセチルスぺルミン(DiAcSpm)が腫瘍マーカーとして既存のマーカーより優れた性質を備え持つことを見出し、新しい腫瘍マーカーとして確立させるための研究を行っている。

DiAcSpmはポリアミンの一成分であり、図1で示すような経路で生産される代謝物である。生体内には、主なポリアミンとして、プトレシン(Put)、カダベリン(Cad)、スペルミジン(Spd)、スペルミン(Spm)が存在し、さらにこれらが代謝されたアセチルプトレシン(AcPut)、アセチルカダベリン(AcCad)、N¹-アセチルスぺルミジン(N¹AcSpd)、N⁸-アセチルスぺルミジン(N⁸AcSpd)、N¹,N⁸-ジアセチルスぺルミジン(DiAcSpd)、N¹-アセチルスぺルミン(N¹AcSpm)、DiAcSpmの7種類が存在する。これらのポリアミンの中で、CadおよびAcCadは腸内細菌の代謝による産物であると考えられており、ヒトのポリアミン代謝の枠内では考察されないことが多い。ポリアミンはアルギニン、オルニチン、メチオニンのアミノ酸から合成される。ポリアミンレベルは、その合成および分解酵素の厳密な活性調整により制御されるが、その調節機構の詳細はまだ不明である。ポリアミン合成においては、オルニチンがオルニチン脱炭酸酵素(ODC)によって脱炭酸を受けPutが合成される⁽²⁾。さらに、メチオニンとアデノシンが結合したS-アデノシルメチオニンが、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素(AdoMetDC)によりアミノプロピル体となった後、スペルミジン合成酵素によりPutにアミノプロピル基が付加され、Spdが合成される。さらに、類似の酵素であるスペルミン合成酵素によってSpdにアミノプロピル基が付加されSpmが生成される⁽³⁾。細胞内で種々の生理的作用を担うのはアセチル化されていない遊離ポリアミンであり、アセチル化されたポリアミンは、排泄型あるいは酸化的分解経路への導入型と考えられている。ヒトの尿中に排泄されるポリアミンの大部分はAcPut、N¹AcSpd、N⁸AcSpd(およびAcCad)であり、その他のアセチルポリアミンおよび遊離ポリアミンの尿中排出はいずれも微量である。

ポリアミンは増殖の盛んな組織中に多く含まれ、細胞増殖や分裂⁽⁴⁾、タンパク質合成促進⁽⁵⁾に

も関わっている。ラジカルスカベンジャーとして活性酸素による傷害からDNAを保護しているとの報告がある⁽⁶⁾が、その一方で、ポリアミンを代謝する酵素の中には、反応の副産物として過酸化水素を発生する酵素がある⁽⁷⁾。ポリアミン代謝酵素は合成されたポリアミンの分解系として働いており、代謝の律速酵素として働いているのがスペルミジン/スペルミンN¹-アセチルトランスフェラーゼ(SSAT)であると考えられている。SSATはアセチルCoAによってSpdまたはSpmをアセチル化し、N¹AcSpd、N¹AcSpmおよびDiAcSpmを合成する⁽⁸⁻¹¹⁾。SSATは誘導酵素であり、半減期は非常に短い。細胞内では通常は非常にわずかな量しか存在せず、内在するポリアミン、ポリアミンアナログ、ホルモンおよび成長因子などさまざまな因子により誘導される⁽¹²⁾。この他に、同定されていないが、N⁸AcSpdやDiAcSpdのアセチル化に関わる酵素が核内にあるといわれている⁽¹³⁾。アセチル化されたポリアミンは、N¹-アセチルポリアミンオキシダーゼ(APAO)によって酸化分解される⁽⁷⁾。APAOは生体内で常に一定量合成されている構成酵素と考えられており、アセチルポリアミンを炭素数が3だけ短いポリアミンと3-アセトアミドプロパナールに分解し、同時に過酸化水素を生成する。通常、SpmはN¹AcSpmを経由した分解経路によって分解され、Spdを再生すると考えられているが、近年、Spmに直接働き、これをSpd、3-アミノプロパナールおよび過酸化水素に酸化分解する誘導酵素スペルミンオキシダーゼ(SMO)が報告された⁽¹⁴⁾。細胞内のポリアミンやアセチルポリアミンレベルには細胞内外への輸送系も関与している。ポリアミンの輸送機構は、原核生物については細胞内の輸送体が同定され、解明されつつあるが、真核生物についてはまだそのような輸送体は同定されていない。このように、生体内のポリアミンレベルの調節は、合成、代謝および輸送の巧みな働きによって、生体内の機能を幅広く調整していると考えられる。

ポリアミンは細胞増殖や細胞死など多くの現象と深く関わっていることから、疾患との関係についても様々な研究が行われており、がんやストレスなど様々な病気との関連が調べられている。例えば、アルツハイマー⁽¹⁵⁾や感染症⁽¹⁶⁾、さらに最近では加齢⁽¹⁷⁾についてもポリアミンの関与が研究されている。これらの研究の多くにおいて、ポリアミンは炎症と関連付けられているが、実際にポリアミンが炎症を促進させているのか、あるいは抑制しているのかについてはまだ十分に解明されていない。ポリアミンとその代謝が生体内の幅広い機能とその調節のネットワークに組み込まれ、またそれらの種々の代謝経路が複雑に絡み合っているために、研究のデザインが異なると一見矛盾する結果が得られると考えられる。

がんになると生体内は高ポリアミン状態となる。これは高濃度のポリアミンまたはその代謝回転が、がん細胞が高い増殖能を発揮する上で重要な役割を果たすためであると考えられている。そのため、ポリアミン合成経路に働く酵素をターゲットとした阻害剤やポリアミンアナログによってポリアミン代謝を阻害すること、あるいは細胞内ポリアミン濃度を低下させることによってがんの有効な薬や治療方法などを開発することを目的として多くの研究が行われているものの、目立った成果はいまだに出ていない⁽¹⁸⁻²⁰⁾。この一因として、食餌に由来するポリアミンが種々の代謝拮抗剤の作用を抑えてしまうことが考えられている。最近では、ポリアミン代謝酵素が働いて生成する過酸化水素が細胞障害を引き起こし、さらにはがん化の過程にも関与している可能性があることから、代謝酵素に注目した研究結果も報告されている⁽²¹⁾。しかし、高ポリアミン状態

が、がんの原因に関わる要因であるのか、それともがん化の結果であるのかなど、細胞内におけるポリアミン代謝とがんの関係についてはまだ十分に理解されていない。

ポリアミン代謝への介入によってがんをコントロールしようという方向性をもつこれらの研究がある一方で、がん患者の体内でポリアミンが上昇する現象を捉えてがんの診断に活用しようという研究も以前から行われてきた。1971年にRussellらは尿中のポリアミンががん患者で高く、寛解に伴って低下することを見出し、がんの診断に役立つと報告した⁽²²⁾。これによりポリアミンが腫瘍マーカーとして注目され、約20年にわたって多くの研究が行われた。その過程で、濾紙電気泳動法などの古典的な測定法に代わるポリアミン分析法が開発され、HPLC法による精密測定系が分析の主流となった。また、簡便な測定法として、すべてのポリアミン成分を分画せずに測定する尿中総ポリアミン測定法が開発され、臨床検査の一項目として採用された時期もあった。しかし、尿中総ポリアミン簡易測定法の普及によって多くの測定データが蓄積されるにつれ、がん患者でもポリアミン値が上昇しない偽陰性者が多いこと⁽²³⁾、また、炎症性疾患においてしばしばポリアミン値が上昇するほか、健常者においてもポリアミン値が上昇する偽陽性者がかなりの割合で認められること⁽²⁴⁾などから、尿中総ポリアミンの腫瘍マーカーとしての信頼性は次第に失われていった。そして、1990年代になると、腫瘍マーカーとしてのポリアミン研究は一時期ほとんど行われなくなった。

このような状況の中で、1993年に平松らは固定化酵素リアクターを用いたHPLC分析法⁽²⁵⁾による新たな遊離およびアセチルポリアミン分画分析法を開発し、それまで注目されていなかった微量成分、DiAcSpmおよびDiAcSpdを検出した。平松らはこの方法による尿中ポリアミン分析を進め、前立腺がん等のがん患者の尿中でDiAcSpmとDiAcSpdががん患者特異的に上昇することを発見した⁽²⁶⁾。特に、DiAcSpmは、他のポリアミン成分と比較してがん患者の偽陰性例が少なく、既存のマーカーより高い陽性率を示すこと、また、良性疾患では増加する例が少ないというすぐれた特徴をもつことが明らかになった。腫瘍マーカーとしてのポリアミン研究は、これをきっかけとして新たな段階に入り、DiAcSpmの臨床的意義の解明が進められる中で、DiAcSpmが大腸がんや乳がんなどのいくつかのがんで早期の段階から高い陽性率を示すという特徴をもつことが明らかになった。特に詳しく研究された大腸がんにおいては、がんが大腸粘膜内に止まり、その段階で治療すればほぼ完治の可能性が高いとされている、0期およびI期の段階⁽²⁷⁾でも約60%の検出感度を示すことが明らかになり⁽²⁸⁾、大きく注目されるようになった。CEA(がん胎児性抗原)は大腸がんの臨床で現在最も使用されている腫瘍マーカーであるが、0期およびI期の大腸がんに対するCEAの検出感度は10%にすぎない。現在しばしば腫瘍マーカーとして用いられるCA19-9(細胞膜糖鎖由来抗原の一種)の大腸癌に対する検出感度はCEAよりさらに低い。

このような臨床的意義の解明は、より効率的な測定法を開発し、臨床検査への応用とDiAcSpm検査の普及を図ろうとする研究・開発に支えられてきた。HPLC法はすべての尿中ポリアミン成分を一斉かつ精密に分画定量することができるが、検体処理能力が低く、臨床応用には適さない。臨床応用を図るためには、簡便な測定法の開発が不可欠である。このことを念頭に置いて測定法の検討がなされ、1998年にDiAcSpm特異的抗体を用いたELISA法が開発された⁽²⁹⁾。この効率的な測定法の開発により、多くの測定データを取得、解析することが可能となり、尿中DiAcSpmが

様々ながん種で上昇してくることが明らかになった。早期がんの検出感度が高いといった、腫瘍マーカーとしての大きな特徴を上記述べたが、これもELISAによる多数の検体の測定によって初めて見えてきた特性である^(28,30)。

このような知見に再び刺激される形で、臨床検査試薬として実用可能なDiAcSpm測定試薬の製品化に向けた開発が現在さらに進められている。腫瘍マーカーを含む病院で行われる血液検査のほとんどは、汎用生化学自動分析機に搭載可能な自動分析試薬を用いて行われている。DiAcSpm検査においても自動分析が可能となるように、DiAcSpm特異抗体標識金コロイドを用いた免疫学的測定法として、金コロイド凝集法による測定試薬が開発された⁽³¹⁾。この試薬を利用すれば、汎用生化学自動分析機に試薬を搭載して測定をすべて自動化し、多くの臨床検査項目と同時並行的に測定を進めることができるため、検体処理速度が著しく向上するだけでなく、ELISA法と比較しても格段に精度の高い測定を行うことが可能である。この試薬の開発によって、DiAcSpmの臨床的意義に関する研究は、大腸がん、乳がんをはじめ、肺がん、胃がんおよび悪性リンパ腫など、多くのがんを対象とする臨床研究への広がりを見せている^(32,33)。また、この試薬が多数の検体を効率よく処理できることを利用して、精密なカットオフ値の設定が可能になった⁽³⁴⁾。他の腫瘍マーカーと同様、DiAcSpmは健常者の尿中にも僅かながら排泄されており、がんになると尿中排泄量が上昇する。正常と異常を正確に識別する基準を得るために、多数の健常者を含む検体を解析し、健常人とがん患者を判定するための適切なカットオフ値を設定することが必要となる。カットオフ値としては、通常、健常者集団の95%値(集団の95%がその値未満であるような値)を用いるが、それを設定するために必要な大量の検体の測定が、この測定試薬の開発によって初めて可能になった。さらに、自動分析機を使用するこの方法の開発により、微量のサンプル量で測定が可能になったことも新たな展開の契機となった。この方法によってがん患者から得た微量の切除組織を使ったがん細胞の抽出液についても測定が行えるようになり、DiAcSpmが実際がんに組織で作られていることが明らかになったことは、DiAcSpmの生成から排泄に至る一連の過程を明らかにする上で大きな意味をもつ成果の一つである。

ここまで、腫瘍マーカーとしてのDiAcSpmの研究の経過について概略をまとめた。DiAcSpmは、既存マーカーに比べ、がんに対する検出感度が高く、特に早期がんの発見を可能にするユニークなマーカーである。また、検体の採取に苦痛を伴う他のマーカーと異なり、全く苦痛なしに採取できる非侵襲的な尿検査であり、患者への負担がない点でも優れた腫瘍マーカーである。腫瘍マーカーの有効性に関連しては、次の三つの点がしばしば議論される。第一は早期がんに対する感度についてである。腫瘍マーカーには、がん細胞で作られて血流中に放出される物質と、体内にあるがんからのシグナルを受けて非がん細胞が作り出した物質がある。いずれにしても、がん病巣がある程度拡大するまでは生産量が低いため、一般に早期がんに対しての応答性が悪く、進行してからでないと検出可能なレベルまで上昇しない。DiAcSpmは、上述のように、比較的早期の段階からがん患者の尿中で上昇するという点でユニークな腫瘍マーカーであるといえる。第二は腫瘍マーカーの判定に関わる特異度と感度についてである。マーカーを用いた診断において、偽陰性や偽陽性を100%回避することは不可能である。例えば、前立腺がんのマーカーPSA(前立腺特異抗原)は、既存の腫瘍マーカーの中では例外的に早期がんから上昇する優れたマーカーで、

いち早くがん患者を発見できる利点があるが、前立腺炎や前立腺肥大などでも上昇する場合がある⁽³⁵⁾。偽陽性の誤判定は患者へ経済的、精神的な負担を与えることから問題ではあるが、偽陰性の検査結果によって早期治療が可能だったがん患者に対し、その機会を見逃してしまう事はそれ以上に大きな問題である。DiAcSpmにも妊婦⁽³⁶⁾や炎症性の良性疾患⁽²⁸⁾を中心にがん以外でも上昇する偽陽性の問題があり、また、がん患者でも上昇しない偽陰性の症例があることも知られている。一般に、検査値の正常と異常を識別するカットオフ値を高くすれば偽陽性は減るが偽陰性が増え、低く設定すればその逆の事態が生じる。したがって、腫瘍マーカーをどのような状況において、どのような目的で使用するかという観点から、適切なカットオフ値を設定する必要がある。第三はがん種に関する特異性についてである。腫瘍マーカーCEAは、様々ながんで上昇する報告があるため、大腸がん、乳がん、胃がん等幅広いがん種で利用されている^(37,38)が、そのためこの腫瘍マーカーだけの診断では原発巣の特定が難しいという問題がある。しかし、抗がん剤や放射線治療などによる病巣への治療効果を測るモニタリングのための利用、術後の再発の監視、再発の予測などへの利用という観点に立ち、そのような場合には対象となる疾患が医師によって明確に認識されているという状況を考慮すれば、多くのがんに反応して上昇する汎用性はむしろ大きな強みと捉えることができる。DiAcSpmは、特定のがんでのみ上昇するPSAとは異なり、CEAと同様に多くのがんで上昇する。これは、細胞増殖と密接に関連して増加するというポリアミンの一般的性質に照らして当然のことであると考えられる。がん患者のモニタリングにおいてこの特性が強みであることは上に述べた。また、がん検診などのスクリーニングによる早期がんの発見という観点から見た場合、がん種に関する特異性が乏しいことには利点もある。尿中DiAcSpm検査だけで部位を特定することはいうまでもなく不可能であるが、実際にはDiAcSpm検査だけを行うことはなく、他の検査と組み合わせて判定を行うため、DiAcSpm検査が種々のがんを含む異常を早期の段階から検出し、要注意のシグナルを送ることには大きな意味があると考えられる。

罹患率の上昇を示す統計結果が示されているにも関わらず、厚生労働省が行った平成19年度の国民生活基礎調査によると、がん検診の受診率はわずか20～30%程度に止まっている⁽³⁹⁾。また、同年度の内閣府によって行われたがん対策に関する世論調査の中で、がん検診を受診しない理由として、「たまたま受けていないから」、「健康に自信があり、必要性を感じないから」、「時間がないから」、「面倒だから」と受診に対する消極的な内容の他に、「検査に伴う苦痛等に不安がある」などの受診時の体への負担についての意見もあがっている⁽⁴⁰⁾。一方で、平成24年度に行われた内閣府の同調査では、がん対策に関する政府への要望には、「がんの早期発見(がん検診)」についての要望が67.2%と最も高かった⁽⁴¹⁾。このような社会的ニーズがある中、上に述べたとおり、腫瘍マーカーとしてのDiAcSpmの非侵襲性と高い早期がん検出能の大きな特徴は、受診率の改善に貢献できるものとする。この様な特徴を活かすためには、より患者に近い場所で、大がかりな装置を必要とせず、短時間で簡便にDiAcSpmレベルを評価することができる測定系を開発する必要がある。このような目的に合致する測定法として、妊娠検査薬などでも利用されるイムノクロマトグラフィー法による尿中DiAcSpm簡易迅速測定系を構築することが望ましいと考えた。この方法を開発することができれば、一般人がDiAcSpm測定、検査を受ける機会を増すことができ、早期に異常を検知して金コロイド凝集法による精密測定やその他の検査へ誘導することによ

り、自覚症状のない段階での発見の手助けや潜在的ながん患者の拾い上げに貢献できると考えられる。このような観点から、本研究では処理能力の改善を主眼としたこれまでのアプローチとは少し異なる観点から、DiAcSpm検査の普及を目指した新たな測定法として、イムノクロマトグラフィ法によるDiAcSpm測定について、測定デバイスの製品化の基礎となる諸条件の検討を進めた。第2章にその結果を詳しく述べる。

上に述べたように、我々はこれまで、腫瘍マーカーとしての尿中DiAcSpmの臨床的な有用性を明らかにするための臨床研究、および、臨床応用をサポートするための測定法の開発を中心に研究を進めてきた。このようなアプローチの中で多くの知見と成果が得られた半面、なぜDiAcSpmが他のポリアミンよりも良く細胞増殖を反映するのか、という基本的な問題に対する答えは未だにはっきりしていない。DiAcSpmを腫瘍マーカーとして確立するためには、この点について明確な解答を得ることが不可欠である。三木らは、腎尿細管由来の培養細胞がメンブレンフィルター上で側底膜側と頂端膜側に極性分化した細胞モノレイヤーを形成することを利用して、腎尿細管における原尿からの物質再吸収について研究した⁽⁴²⁾。その結果、他のポリアミン成分は培養腎臓細胞の頂端膜側から細胞内に吸収されるのに対し、DiAcSpmは腎臓細胞へ全く再吸収されないことを見出した。すなわち、体内を循環し、腎糸球体で濾過されて原尿中に放出されたポリアミン成分の内、DiAcSpmは尿細管で再吸収されずにすべて排泄されるため、体内の生産量が直接排泄量に反映されやすいのに対して、他のポリアミン成分は、腎臓で再吸収され、体内に戻って再利用されるために、生産量の変動が尿中排泄量に反映されにくいと考えられる。尿中ポリアミンの中でDiAcSpmが特にがんと関連した上昇を示す現象は、このような腎臓における再吸収の違いによって理解できるようになった。

一方、DiAcSpmが実際がんに組織の中で生成することについては、最近ようやく確実な知見が得られた。桑田らは、大腸がん患者から外科手術によって切除したがん組織検体とその組織に隣接した正常組織中に含まれるDiAcSpm量を分析し、がん組織中のDiAcSpm量が正常組織のそれより多いことを見出し、DiAcSpmはがん組織中で生成していると結論した⁽⁴³⁾。桑田らはさらに、がんが大腸粘膜内に限られる早期がん組織、および、前がん状態と考えられる高度異型大腸腺腫の組織においてもDiAcSpmが高い頻度で上昇している事を明らかにし、さらに、組織DiAcSpm量ががんの進行度を反映していることを示唆する結果を報告している。これらの事実は、DiAcSpmが組織悪性化の初期から、がん化に向かう組織の細胞内で生成し、組織から体液中に排出されたDiAcSpmが腎尿細管における再吸収を受けることなく尿中に排泄されるという一連の流れを示しており、がん化の早期からがん組織の中で増加するDiAcSpmが早期のがん患者の尿中におけるDiAcSpmの上昇をもたらしているというメカニズムを強く示唆している。

ここで、DiAcSpmの体内動態に関して残された課題は、DiAcSpmががん化する細胞の中で、悪性化の比較的早い段階から上昇するメカニズムの解明であると考えられる。このような観点から本研究においては、第二の課題として、生体内のポリアミン動態の解析法およびポリアミン代謝酵素の活性測定法の開発に取り組むこととした。第3章および第4章ではこの課題に関連する研究結果について述べた。

生体内のポリアミン動態の解析は、腫瘍マーカーとしてのDiAcSpmの挙動とその生化学的基礎

について理解するために重要であるだけでなく、がんを含む種々の疾病とポリアミンの関係を生体内のポリアミン動態との関連において理解するためにも重要である。ポリアミンの動態を正確に解明するには、各ポリアミン成分の正確な分析に止まらず、代謝関連酵素の活性とその変動について詳しく解析することが必要である。例えば、DiAcSpmの上昇が、SSATの活性化によって起きているのか、APAOの活性抑制によってもたらされているのか、または二つの要因の相乗作用によるものであるのかなど、代謝物だけの解析ではこれらの結論を出すことができない。

このような観点から、本論文の第3章では、安定同位体標識化合物と質量分析装置を利用した、生体内のポリアミン成分の測定とポリアミン代謝酵素の活性測定法の構築を行った。これまで一般的に用いられてきた代謝酵素の活性測定法には、特に、材料の入手が量的に限られている生体材料から得られる粗抽出液中の活性測定に適さないいくつかの問題点がある。それらを克服して種々の混在物質による干渉を受けにくい正確な新規の測定法を開発し、それにより実際の患者から得られた検体を用いた酵素活性解析を可能にして、がん組織におけるDiAcSpmの上昇の原因を探索するための手段を提供したいと考えた。測定法開発の過程では、さらに新たな課題が認識された。細胞抽出液のように種々の物質や酵素が混在する酵素液中の酵素活性を測定および解析するにあたっては、必要に応じて特定の酵素の活性を抑制する有効な阻害剤が有用な研究ツールとなる。しかし、ポリアミン代謝酵素の一つであるSMOに対しては、これまで有効な阻害剤が存在しなかった。そこで、第4章では新規阻害剤の合成を課題として取り上げ、従来の阻害剤より格段に有効なSMO阻害剤を開発した。SMOはDiAcSpmの代謝に直接関与する酵素ではないが、生成してくる過酸化水素ががん化を招く危険性を持つことや、腎不全や脳梗塞ではSMOが生成する3-アミノプロパナールから毒性の高いアクロレインが生成され、これが発症に関係するという報告があり^(44,45)、近年、いくつかのポリアミン研究グループによって注目されている酵素である。ここで新たに合成した阻害剤は、この酵素の研究ツールとして今後のポリアミンおよび関連代謝過程の研究において、有用なツールの一つとして活用されることが期待される。

本研究はDiAcSpmを高感度、汎用性の腫瘍マーカーとして開発し、普及させることを目標として行った。そして、開発の現段階においては、DiAcSpmの長所を最大限に活用するために、個人、あるいはクリニックでたやすく利用できる迅速簡易測定系が望まれると考え、DiAcSpmのイムノクロマトグラフィー測定系の開発を行った。さらに、DiAcSpmの臨床応用に関心を示している多くの臨床家から寄せられている根本的な疑問、すなわち、DiAcSpmが高性能の腫瘍マーカーとして機能するのはなぜか、その仕組みの解明に向けて、細胞内のポリアミン濃度の正確な定量法、および、ポリアミン代謝酵素の活性測定法の開発を行った。さらに、一連の研究を通じて、生体内のポリアミンおよびその動態を解明するツールを提供することができた。

第2章

免疫クロマトグラフィーによる簡易測定系の開発

第1節 序文

DiAcSpmは従来の腫瘍マーカーと比較して高感度であり、大腸がんでは進行度の低い初期段階においても60%以上の陽性率を示すことが報告されている⁽²⁸⁾。研究の早い時期から臨床応用の期待が持たれ、DiAcSpm検査の普及を目指してより簡便な測定法の開発が進められてきた。測定簡便化の第一段階として、抗原抗体反応を用いたELISA法⁽²⁹⁾が最初に開発された。DiAcSpmは分子量286の低分子物質であるため、高分子の担体にハプテンとして結合させたハプテン抗体としての取得が試みられた。健常者の尿中の解析において、DiAcSpm排泄量は全ポリアミンアセチル体の0.4%(約100 nM)程度⁽²⁶⁾と極微量であるため、尿中DiAcSpmの定量のためには感度の良い抗体が必要である。さらに、ポリアミンアセチル体の中にはDiAcSpmと近い構造をもったN¹AcSpdが存在し(図8参照)、それがDiAcSpmの約30倍量存在する⁽²⁶⁾ため、特異性の高い抗体が要求された。これらの難度の高い条件を満たす抗体が取得され、ELISA法が構築されて多数の実検体が測定された結果、DiAcSpmの腫瘍マーカーとしての有用性が確認された。これを契機としてさらに、精度が高く、より大量の検体の処理を目的とした製品化が進められ、金コロイド凝集法による測定試薬が開発された⁽³¹⁾。金コロイド凝集法は液相中において、金ナノ粒子で標識した特異的な抗体を使って抗体と測定対象物質の結合を検出する測定法である。金ナノ粒子標識・抗体は分散状態と凝集状態で吸収極大波長が変化する。この現象を利用して、金コロイド粒子の吸光度変化の比色測定によって測定対象物質を定量する。この測定試薬の開発により、専門的な臨床検査施設などで使用されている生化学自動分析機を用いたDiAcSpmの測定が可能になり、一日に数百検体を処理することが可能になった。しかし、HPLC法も含めたDiAcSpm研究の初期に用いられたこれらの方法は、測定精度に関しては十分である半面、特別な施設や装置の準備および測定の技術が必要とされるため、測定の手軽さの点でやや難点がある。

がんの早期発見は重要な課題であるが、その中で、がん検診受診率が低い水準に止まっていることが問題となっている。その要因の一つとして、診断にかかる時間と手間という問題が指摘されている。このような問題を生じさせている一因である既存の測定法の弱点を補うため、患者のすぐ傍で利用でき、本人でも扱えるような場所を選ばない測定法が開発が待たれている。DiAcSpm検査には2つの大きな特徴がある。一つは尿を利用する検査のため患者自身が簡単に検体の採取を行える事、もう一つは早期がんへの感度が比較的高い特徴を持つ事である。患者の身近で利用できる簡易DiAcSpm検査を開発することができれば、このようなDiAcSpmの特徴を最大限に活用できると考えられる。患者自身の測定への関与は、健康への意識を高め、受診意識の向上にもつながると考えられる。また、このようにして測定、検査の機会を増すことにより、自

覚症状のない段階での発見や潜在的ながん患者の拾い上げに貢献できると考えられる。

このような観点から、本研究では妊娠検査薬や薬物検査などにも用いられているイムノクロマトグラフィー法を利用する尿中DiAcSpm濃度測定系の構築を目指し、検出試薬や捕捉試薬など様々な条件を検討した。DiAcSpmは低分子であることに着目し、競合法によるイムノクロマトグラフィー測定系を構築した。使用する抗体の選定から検討を開始し、金コロイドの分散安定化の条件など、イムノクロマトグラフィーストリップ作製の条件の最適化を行った。最適化されたストリップは、DiAcSpm濃度の増加とともに、目視でもわかるテストラインの発色強度の現象が観察され、イムノクロマトリーダを用いた測定では標準液を用いた測定において、30~1,000 nMのDiAcSpm標準液の測定ができ、右肩下がりのスタンダードカーブを作製することができた。さらに、尿検体を用い測定した結果は、20~700 nMの範囲で金コロイド凝集法との良好な相関が得られた。

第2節 実験材料と方法

第1項 試薬、尿検体、装置

マウス抗DiAcSpmモノクローナル抗体(抗DiAcSpm抗体) CN647はトランスジェニック社から提供された。マウス抗DiAcSpmモノクローナル抗体#535、#2009、#2043、#8028、#10040、#10051はミクリ免疫研究所社から提供された。これらの抗体の免疫抗原には、DiAcSpmに酷似するハプテン構造をもつように合成したコンジュゲートを使用した。N¹AcSpmのアミノ基に4-マレイミド酪酸N-スクシンイミジルを用いてアシル化したハプテンと、BSAに2-(アセチルチオ)こはく酸無水物を結合させキャリアタンパクとを結合させ、架橋試薬との間のアシルアミド結合をもつように設計した。抗マウスIgG(H+L)抗体はライフテクノロジーズ社から購入した。金コロイド粒子は、ワインレッドケミカル社から購入したWRGH1(φ50 nm、OD = 12、[Au] = 550 ppm)を使用した。ニトロセルロースメンブレンカード(Cat No. HF180MC100)、グラスファイバーコンジュゲートパッド(Cat No. GFPC103000)およびセルロースサンプルパッド(Cat No. CFSP223000)は、Merck Millipore社から購入したものを使用した。AcSpm-GMB-BSAは以前の報告⁽⁴⁶⁾に従い作製した。人工尿としては、0.42 M尿素、0.15 M塩化ナトリウム、27 mM塩化カリウム、4 mM塩化カルシウム、9 mM硫酸マグネシウム、0.05%アンモニア、60 mMアスコルビン酸、8.8 mM(= 100 mg/ml)クレアチニン、0.15 mg/ml BSA、0.09%アジ化ナトリウムを超純水で溶解し、りんを用いてpH 6.0に調整したものを使用した⁽⁴⁷⁾。その他の一般試薬は和光純薬から購入した特級試薬を使用した。

尿検体はインフォームドコンセントを得た健康なボランティアから採取した。この検体は0.09%になるようアジ化ナトリウムを添加し、-20℃で保存した。この検体の使用に関しては、東京都臨床医学総合研究所(現、東京都医学総合研究所)の倫理委員会からの承認を得て研究を行った。

ニトロセルロースメンブレンカードへのテストラインとコントロールライン(図2参照)の塗布

は、AirJet Quanti™ (BioDot社)を取り付けたZX1000分注ワークステーション(BioDot社)を用いて行った。イムノクロマトグラフィーストリップ上の発色ライン強度は、イムノクロマトリーダーC10066(浜松ホトニクス社)を使用して、イムノストリップからの反射光を測定することにより、550 nmの吸光度を測定した。

第2項 競合的ELISA法による抗DiAcSpm抗体の解析

ELISAによる測定は以前に報告された方法⁽⁴⁶⁾を基に測定を行った。プレート抗原としては、N¹AcSpmをペプチドに結合させたものを作製した。N¹AcSpmのアミノ末端に、架橋剤となるN-(8-マレイミドカプリルオキシ)スクシンイミド(HMCS)を結合させN¹AcSpm-HMCSを準備した。これを、ペプチドのN末端に2-(アセチルチオ)コハク酸無水物を結合させSH基を導入したペプチドと反応させ、AcSpm-HMCS-peptideを合成した⁽⁴⁶⁾。NUNC 96 穴マイクロウェルプレートMaxsorp (Thermo Scientific社)上に、適当濃度のAcSpm-HMCS-peptide(0.05 ml)を添加、固定化した後、5%スキムミルク(0.3 ml)で未反応プレート表面をブロッキングした。系列希釈したDiAcSpm標準液またはN¹AcSpd標準液(50 µl)と抗DiAcSpm抗体(50 µl)を添加し、室温で1時間振とうし、反応させた。0.05% Tween 20含有PBS (-) (PBS-T)でプレートを洗浄後、6,000倍に希釈したHRP標識-抗マウスIgG (H+L)抗体(Zymed社)を各ウェルに添加(0.1 ml)し、室温で1時間振とうし、反応させた。その後、PBS-Tで3回の洗浄を行い、0.33 mMテトラメチルベンジジン/0.1 Mクエン酸緩衝液(pH 5.0)、0.05%過酸化水素溶液を各ウェルに添加し、37°Cのインキュベータ(IC240S、ヤマト科学社)内で20分間発色反応を行った。1 N硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー Model 550(BioRad社)で450 nmの吸光度を測定した。

第3項 抗体添加による金コロイドの安定性の評価

抗DiAcSpm抗体 1 µgを0.1 mlの各種緩衝液中に溶解した。緩衝液としては、2 mM HEPES (pH 7.0または8.0)、2 mM Tris (pH 8.0または9.0)または2 mM CHES (pH 9.0)のいずれかを使用した。抗体溶液に金コロイドWRGH1 10 µlを添加し、37°Cで30分間反応させた。金コロイド安定性試験のため、10%塩化ナトリウム 10 µlを添加し、室温で15分間放置し、分光光度計によりA₅₈₀₋₅₃₀を測定した⁽⁴⁸⁾。さらに、抗体結合量の評価のため、反応後の溶液を20,000 ×g、15分間、20°Cで遠心分離し、Easy-titer mouse IgG assay kit (Thermo Scientific社)を用いて上清中の未反応抗体の測定を行った。測定手順はキットに添付された説明書に従った。

第4項 イムノクロマトグラフィーストリップの組み立て

イムノクロマトグラフィーストリップの概要を図2に示した。金コロイド標識した抗DiAcSpm抗体を含浸させたコンジュゲートパッドは以下の手順で作製した。2 mM HEPES (pH 7.0)に溶解した0.1 mg/ml抗DiAcSpm抗体溶液1 mlに、金コロイド溶液0.1 ml (OD₅₃₀ = 12)を添加し、37°Cで30分間攪拌しながら抗体と金コロイドを結合させた。金コロイド表面の未反応部位をブロッキングするため、ブロッキング試薬(1% BSA、0.1% PEG/ 2 mM HEPES (pH 7.0)) 0.12 mlを添加し、さらに37°Cで30分間攪拌して反応させた。20,000 ×g、15分、20°Cの遠心操作後上清を除去

し、抗体の結合した粒子を分離した。ペレット状になった粒子をブロッキング剤溶液で懸濁し、1 mlとした。この操作を3回繰り返すことにより未反応抗体の除去を行った。最終的に3倍希釈したLiquid Plate Sealer™ (CANDOR Bioscience GmbH社)を含んだブロッキング試薬で $A_{530} = 3$ となるように調整し、抗体結合金コロイド溶液を作製した。これを10 mm高(幅は作製量により調整)のグラスファイバーコンジュゲートパッドに60 $\mu\text{l}/\text{cm}$ の割合で含浸させた。グラスファイバーコンジュゲートパッドは真空デシケーター中で一昼夜乾燥させた。

分析部となるメンブレンは、Hi-Flow Plus HF180メンブレンカード(300 × 60 mm)を使用した。テストラインの材料として、0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を使用して50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AcSpm-GMB-BSAコンジュゲートを調製した。高さ25 mmのメンブレンの下端から8 mmの場所にAirJet Quanti™を取り付けたZX1000分注ワークステーションで、1 $\mu\text{l}/\text{cm}$ (Drop Volume 31.25 nl、Drop Pitch 0.31 mm、On Time 0.25 sec)となるように塗布した。同様にコントロールラインには、0.01 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解した0.1 mg/ml抗マウスIgG(H+L)抗体を、メンブレンの下端から16 mmの高さに塗布した。メンブレンカードをN101ブロッキング試薬(日本油脂社)に20 分間浸漬し、純水で洗浄し、3%スクロース水溶液に10分間浸漬させた。余分なスクロース水溶液は測定の妨害を招くのため、メンブレンを傷つけないよう注意しながら、キムワイブなどで余分な水分をふき取った。これを50°Cに設定した乾燥器で2時間乾燥させた後、真空デシケーター中で保存した。

作製したコンジュゲートパッド、ニトロセルロースメンブレンは、別途用意しておいたサンプルパッド、吸収パッドと合わせて図2に示す順序に組み立てた。最後に、5 mm幅に裁断し、イムノクロマトグラフィーストリップを作製した。

第5項 金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体に対するブロッキング剤の効果

2 mM HEPES (pH 7.0)に溶解した0.1 mg/ml抗DiAcSpm抗体溶液1 mlに、金コロイド溶液0.1 ml ($OD_{530} = 12$)を添加し、抗体と金コロイドを結合させた。ブロッキング試薬を添加し、37°Cで30分間ブロッキングを行った。この際ブロッキング試薬として、2 mM HEPES (pH 7.0)に溶解した1%BSA、1%カゼイン、1%オブアルブミン、0.1%ポリエチレングリコール(PEG)、0.1%ポリビニルピロリドン(PVP)、0.1%ポリビニルアルコール(PVA)、およびタンパク溶液と高分子化合物を組み合わせた各種の溶液を使用した。ブロッキング反応後、未反応物の除去を行い、20,000 ×g、15分、20°Cの遠心操作によりペレット状の金コロイド粒子を回収した。この金コロイド標識抗体を、最終的に3倍希釈したLiquid Plate Sealer®に懸濁し、コンジュゲートパッドを作製した。これらのコンジュゲートパッドを用いてイムノクロマトグラフィーストリップを作製し、測定を行った。

第6項 DiAcSpm濃度の測定

イムノクロマトグラフィー法による測定は、測定試料溶液0.2 mlをストリップのサンプルパッド部に添加して行った。溶液はコンジュゲートパッドからメンブレンへと展開され、15分後、メンブレンに出現したラインの発色強度をイムノクロマトリーダーC10066(浜松ホトニクス社)で測定

した。

金コロイド凝集法によるDiAcSpmの測定は、自動分析装置BioMajesty™ Series JCA-BM6010(日本電子社)を使用し、Auto DiAcSpm試薬キット(アルフレッサファーマ社)を用いて行った。

第7項 熱加速試験による金コロイド標識抗体のイムノクロマトグラフィーストリップ中における保存安定性の検討

2 mM HEPES (pH 7.0)に溶解した0.1 mg/ml抗DiAcSpm抗体溶液1 mlに、金コロイド溶液0.1 ml(OD₅₃₀ = 12)を添加し、抗体と金コロイドを結合させた。ブロッキング試薬を添加し、ブロッキングを行った後、未反応物の除去を行い、20,000 ×g、15分、20℃の遠心操作により金コロイド粒子をペレット状に回収した。この金コロイド標識抗体を、最終的に5%マンニトール、5%トレハロース、5%スクロース、または3倍希釈Liquid Plate Sealer®中にそれぞれ懸濁し、各懸濁液を用いてコンジュゲートパッドを作製した。

これらのコンジュゲートパッドを用いてストリップを作製し、乾燥剤を封入したアルミパウチに入れ、50℃に設定した乾燥器の中で0、1、2、4および8週間保存した。

第3節 結果と考察

第1項 DiAcSpmのためのイムノクロマトグラフィー法の概要

DiAcSpmは低分子化合物(MW 286)であるため競合法によるイムノクロマトグラフィーストリップの構築が適当であると考えた⁽⁴⁹⁾。ストリップは、セルロース濾紙を使ったサンプルパッドと溶液吸収パッド、グラスファイバー濾紙を使ったコンジュゲートパッド、ニトロセルロースを使ったメンブレンカードで構成される(図2)。グラスファイバー濾紙には金コロイド標識された抗DiAcSpm抗体が乾燥状態で含有されており、上流から展開してきた溶液により素早く溶解し、下流のメンブレンへとリリースされる。メンブレンは検出部としての役割を持ち、分析対象物の存在量により発色強度が変化するテストラインと、系が正常に働いていることを確認するためのコントロールラインが形成されている。各ラインには、金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体を集積させるためのAcSpm-GMB-BSA (DiAcSpm類似体)と、抗DiAcSpm抗体のFc部を捕捉するための抗マウスIgG抗体が固定化されている。

測定原理を図3に示した。採取した試料溶液をそのままの状態サンプルパッドへ添加し、その時点から測定が開始される。添加された試料溶液中のDiAcSpm (抗原)は、コンジュゲートパッド中の抗体と反応、結合しながら、下流へと展開されていく。テストラインまで進むと金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体はAcSpm-GMB-BSAと反応し捕捉され、赤色のラインが出現する。この時、添加した試料にDiAcSpmがあると、金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体はテストラインに到達する以前に抗原と複合体を形成しているために、テストラインでAcSpm-GMB-BSAと反応せず、発色ラインは出現しない(図3、右図)。テストラインで捕捉されなかった金コロイド標識-抗DiAcSpm

抗体はコントロールラインまで展開され、複合体の形成にかかわらず抗マウスIgG抗体によって捕捉される。つまり、試料中にDiAcSpmが存在しなければテストライン、コントロールラインの2本のラインが出現し、存在すればコントロールラインだけが出現することになる。

第2項 競合的ELISA法による抗DiAcSpm抗体の解析

イムノクロマトグラフィー法で使用するのに適した抗体の選別を行うため、7種類の抗体の特性を競合的ELISA法で検討した。どの抗体も、DiAcSpm濃度の増加とともに発色が弱くなる、右肩下がりの標準曲線を描いた。それぞれの抗体の解析結果は表1に示す。CN647、#10040、#10051の抗体が低濃度DiAcSpmの検出感度が高く、0.01~10 nMの範囲でDiAcSpmを測定することが可能であった。

さらに、抗DiAcSpm抗体のN¹AcSpdへの交差性の解析も行った。N¹AcSpdの構造はDiAcSpm構造に類似しており、しかも、健常者の尿中でDiAcSpmの約30倍量存在している⁽²⁶⁾。7種類の抗体のいずれについても、N¹AcSpdの阻害曲線はDiAcSpmと並行した曲線を描いており、競合阻害であった。それぞれの抗体について、阻害率が50%となる値を比較すると、DiAcSpmとN¹AcSpdでは300~1,000倍の反応性の違いが認められた。CN647、#8028、#10040、#10051はDiAcSpmに対する選択性が高く、N¹AcSpdとの交差率は最大でも0.16%であった。これらの結果に基づいて、感度の高かったCN647および#10051の2つの抗体と、特異性の良かった#8028の抗体を選択し、イムノクロマトグラフィー法によるDiAcSpm測定法構築の検討を行うこととした。

第3項 金コロイドの安定性と抗体結合量の評価

金コロイド標識-抗体を調製するための最適条件を知るために、いくつかの異なるpHの緩衝液中で抗体と金コロイド粒子を反応させ、生成する金コロイド標識抗体の分散安定性を調べた。未標識の金コロイド粒子は酸性溶液中に保存すると凝集する傾向があったため、実験は中性またはアルカリ性の条件下で行った。金コロイドの安定化は、金コロイド溶液と抗体とを反応させた後、塩化ナトリウムを添加した際に凝集によって起こる色調変化の大きさを、A₅₃₀₋₅₈₀の値を指標として評価した。未標識の金コロイド粒子は、それぞれの表面電荷による電気的反発力により分散状態を保っているが、電解質の添加により反発が弱まり凝集が起きる⁽⁴⁸⁾。そのため、塩化ナトリウムの添加と共にワインレッドから灰色に変化し、A₅₃₀₋₅₈₀が低下する。金コロイドの表面は負に帯電しているため、リジン等の正に電荷したタンパク質と電気的に結合し、トリプトファン等とは疎水的相互作用により結合する。また、チオール基の硫黄原子やアミノ基の窒素原子は配位子をもち、金と配位結合を形成する。このような作用を介してタンパク質と結合させることで、金コロイド粒子の分散状態は安定化され、電解質の添加による凝集が防がれることはしばしば認められている^(48,50)。タンパク質などの添加により保護された場合、金コロイド粒子は塩化ナトリウムの添加によって凝集せず、A₅₃₀₋₅₈₀の値は変化しない。このとき、ワインレッドからの色の変化も起きなかった。

この事象を利用して検討した結果、抗体の結合によって金コロイド粒子は、酸性環境下での凝集からも効果的に保護され分散安定化されることが明らかになった。図4の実験条件下においては、

抗体タンパク質添加量0.2~0.5 μg の間で金コロイド粒子は種々の程度に塩化ナトリウム添加による凝集から保護された。特に#8028と#10051の添加が凝集の保護に効果的であり、最適のpH条件下では、1 μg 以上のタンパク質が存在すれば、最大の保護効果が得られることが明らかになった(図4 A)。金コロイド標識-抗体コンジュゲートの安定性は、#10051では緩衝液のpHによってかなり変化する一方、#8028ではすべての緩衝液およびpHで安定していた。この実験条件下ではCN647と金コロイド粒子の反応溶液は分散安定的ではなかった。

抗体の種類やpHによる金コロイド粒子安定化の効果の違いが、抗体の結合量を単純に反映したものであるのかを明らかにするために、金コロイドに結合した抗体量を測定した。金コロイド粒子と抗体との結合量は、反応後の金コロイド標識-抗体を遠心分離によって回収した後に、上清に含まれる抗体の量を測定することによって評価した。金コロイドに結合した抗体量は、pHや抗体の種類によらず、いずれも類似の直線的な増加を示した(図4 B)。これらの結果に基づき、ここで比較した3つの抗体から、感度や特異性だけでなく、様々な実験条件下で安定な金コロイド標識-抗体を与える#8028抗体を選択してさらなる最適化の検討を行った。

イムノクロマトグラフィー法は、金コロイド標識された抗体がメンブレン中の小孔の中を進む動きの中で分析が行われるため、金コロイドが凝集し大きな構造になると移動が制限されて分析が不正確になる。上述のように、金コロイド粒子はタンパク質の結合によってしばしば分散安定化されることが知られている^(48,50)が、この研究では抗体の結合量がコンジュゲートの安定化の唯一の要因でないことが明らかになった。様々な緩衝液、pHおよび抗体を用いて検討したところ、抗体と金コロイドの反応における抗体結合量には大きな違いがなかったが、コンジュゲートの安定性には抗体、コンジュゲート形成時のpHおよび緩衝液の種類によって大きな違いがみられた。これは、結合環境によるタンパク質のコンフォメーション変化や、側鎖のアミノ基の電荷状態が変わるために、金コロイドとの相互作用が変化し、抗体の結合量や配向が変化したためではないかと考えられるが、明確な理由は明らかではない。また、添加する抗体自身が電解質であるため、抗体タンパク質の性質によっては金コロイドの反発力を奪ってしまう可能性も考えられる。金コロイド粒子の凝集に関するオリゴペプチドによる金コロイド表面へのコーティングの効果が、用いたペプチドによって異なるという結果が以前に報告されている⁽⁵¹⁾。本研究で観察された事実はこの報告と矛盾しない。金コロイド粒子は、抗体と金コロイド粒子の反応の間、コンジュゲートパッド中に乾燥状態で保持される期間を通じて凝集を避けるように注意を払う必要がある。これに加え、最終的に製作されたストリップの状態で十分な性能を保っていなければならない。そこで次項では、実際にストリップを作製し、性能テストを行う中で測定系をさらに改良することを試みた。

第4項 様々な条件での抗体の結合と結合後のブロッキング効果

#8028抗体1 μg と10 μl のWRGH1金コロイドを種々の緩衝液0.1 ml中で結合させ、得られた金コロイド標識した#8028抗体を用いてイムノクロマトグラフィーストリップを作製し、その性能を試験した。シグナル強度はpHだけでなく、どのような緩衝液を使って結合させたかによっても変化した(図5)。HEPES (pH 7.0)中で作製した金コロイド標識-抗体を用いた際に最も強いテスト

ラインシグナルが得られ、また、DiAcSpmに反応して大きくシグナル強度が変化することが明らかになったため、以後、この条件を採用することにした。pH 7.0より高いpH値ではシグナル強度が弱くなる傾向があった。抗体と金コロイド粒子のコンジュゲート形成反応については、最適な条件を理論的に予測することが現状では難しい。金コロイドの表面電荷との関連で、コンジュゲート作成時のpHの違いにより使用時のパフォーマンスが変化するという事は以前から広く知られている。本研究ではさらに、同じpHであっても緩衝液の違いによって形成されたコンジュゲートのパフォーマンスが異なる事が明らかになった。緩衝液の成分の違いがコンジュゲートの性能に影響を及ぼすという事実は、これまで報告されていない。このような違いが生じる原因は現在不明であるが、イムノクロマトグラフィー測定系を設計する際の新たな検討項目の一つとして、緩衝液の種類にも留意する必要があることが示されたといえよう。

分析に使われる金コロイド標識抗体に未反応の金コロイド表面が残っていると、メンブレンや他の成分と非特異的な吸着が起き、バックグラウンド上昇やシグナル強度の低下が引き起こされる可能性がある。したがって、適当なブロッキング試薬を使い、未反応表面に対してブロッキングを行う必要がある。抗体結合後の金コロイドの未反応表面のブロッキング剤として最適な組成を見出すために、ブロッキング目的で一般的に用いられるタンパク質と、しばしば表面処理に使われるいくつかの合成ポリマーを使った実験を行い、比較検討を行った。ブロッキング剤としてタンパク質を用いた場合はどのタンパク質でもほぼ同じ効果が得られたが、ポリマー類を単独で用いた場合には発色強度が著しく低かった(図6)。しかし0.1%ポリエチレングリコール(PEG)には、バックグラウンドを抑制するという特徴的な効果が認められた(図7)。そこで1%BSAと0.1%PEGの組み合わせによるブロッキングを試みたところ、高いテストラインのシグナル強度が得られるとともに、バックグラウンド抑制が起きることが示された。0.1%ポリビニルアルコール(PVA)や0.1%PVPとBSAやカゼインとの組み合わせは、いずれもテストラインシグナルの発色を妨げた。これらの結果から、BSA/PEG混合溶液がブロッキング剤として最適であると判断した。

ブロッキング試薬は金コロイド粒子に結合する事で表面の化学的な性質を変え、また立体障害による非特異的な吸着をおさえる。Dworetzkyらは、RNAを結合させた金コロイド粒子を用いて核と細胞質の間のRNAトランスポートの研究を行った⁽⁵²⁾。彼らは、BSA、オボアルブミン、ポリグルタミン酸、PVPなどの種々の物質が、RNA結合金コロイド粒子と核膜孔成分の間の非特異的相互作用を抑制する上でいずれも有効であることを報告している。本研究においては、BSA、カゼイン、オボアルブミン、PEG、PVPおよびPVAを用い、その効果を試験した。その結果から、タンパク質と合成ポリマーがそれぞれ異なった効果を与える事がわかった。今回行った検討では、PEGとPVPがバックグラウンドを抑制する事に効果的だったが、これらの化合物を単独で用いると、テストラインのシグナル強度が著しく低下した。そのため、タンパク質(BSA)と多価アルコール(PEG)の組み合わせが、高いシグナル強度と低いバックグラウンドを得るのに最も効果的だった。電子顕微鏡による組織免疫染色に用いた金標識抗体には、凝集防止のため多価アルコールが添加されていたが、これらの化合物のブロッキング効果については、文献中には言及されていない^(50,53)。金コロイド粒子の凝集はイムノクロマトグラフィーにおけるバックグラウンドを上昇させる可能性がある。多価アルコールによるバックグラウンドの抑制は、金コロイド標識抗体の安

定化にも部分的に関連している可能性があり、金コロイド粒子側の要因とともに、分析膜の表面のブロッキングも必要である。この分析膜表面のブロッキングには、市販のブロッキング試薬 N101が有効であった。

第5項 DiAcSpmの測定

第1～4項の実験結果に基づいて最終的に決定した条件でイムノクロマトグラフィーストリップを作製し、それを用いて尿検体の測定を行った。これまでの基本的な条件検討では、DiAcSpmをPBS溶液に溶解したものを試料として利用してきた。しかし、実際の検体は尿であることを考慮して、これ以後は尿に近い組成の展開液を用いて検討することにした。その結果、DiAcSpm標準液の測定においても、DiAcSpmを溶解する溶媒の組成がテストラインの強度におよぼす影響が異なることが明らかになった。例えば、DiAcSpmのPBS溶液を使用した場合は10~100 nM程度の狭い濃度範囲でシグナルの消失が起こった。一方、人工尿をDiAcSpmの溶媒とした場合には、PBSを溶媒とした場合に比べ、標準曲線の吸光度の変化はより緩やかであった(データ未掲載)。pH 6.0に調整した人工尿に溶解したDiAcSpmを標準液として用いた場合、図8 Aに示したように、テストラインのシグナル強度は10~1,000 nMの間で徐々に減少した。PBSと人工尿でDiAcSpm濃度依存性が異なる原因としては、人工尿に含まれる尿素のほか、溶媒のpHが影響していると考えられる。

イムノクロマトグラフィー法による測定の感度は、金コロイド粒子に結合させる抗体量によっても変化する。すなわち、より多量の抗体を用いて金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体を作製した場合には、テストラインの発色強度を減少させるためにより高いDiAcSpm濃度が必要とされる傾向があった(データ未掲載)。測定のダイナミックレンジと感度の最適化にあたっては、金コロイド粒子に結合する抗体の量の調節もパラメーターの一つとなる可能性があると考えられる。

図8 Aに示した標準曲線を用い、pH 5.5~7.5において、55人から採取したヒト尿検体各0.2 ml中のDiAcSpm濃度をイムノクロマトグラフィー法によって測定した。イムノクロマトグラフィー法による測定結果と金コロイド凝集法による測定値の相関を図8 Bに示した。R = 0.936の相関係数で、金コロイド凝集法によって得られる測定値と、イムノクロマトグラフィー法によって得られる測定値($y = 1.04x + 12$ (nM))はよく相関していた。我々が先行研究で報告したとおり、金コロイド凝集法によって得られる測定値と質量分析で測定された測定値は非常によく相関している⁽⁵⁴⁾。したがってこの結果は、イムノクロマトグラフィー法による測定値が正確で、信頼できる数値であることを示している。本研究の中で開発したイムノクロマトグラフィーストリップでは、20~700 nMまでの尿中DiAcSpm濃度を測定することができた。これは、多くの場合、健常者および癌患者から通常採取される尿検体中のDiAcSpm濃度範囲に対応しており、この測定系の感度およびダイナミックレンジが十分実用的であるといえることができる。しかし、回帰直線から逸脱したデータポイントも多く、今後はこの点の改善が必要である。この逸脱は尿検体の組成によるものかもしれない。上述のように標準液の組成の変更や調整により測定精度が改善されたことを踏まえて、測定系の最適化によって精度が向上する可能性についての検討をさらに進める必要があるであろう。

第6項 熱加速試験によるイムノクロマトグラフィーストリップの保存安定性の検討

検査試薬などを新医薬品として厚労省へ申請する場合、製品の安定性試験に関する評価として、長期保存での安定性のデータが必要になる。体外診断薬等の長期安定性は、最低でも $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で1年以上の条件が必要となる。しかし、実際にその時間を費やして評価するのは効率が悪いいため、より過酷な環境で劣化速度を速めて製品を評価する加速試験が一般的な代替法として用いられる。本研究でも、熱加速試験によるイムノクロマトグラフィーストリップの保存安定性の予測を行った。ストリップの物理的、化学的劣化がアレニスウスの式に従うという仮定のもとに、 50°C で32日間の保管が 25°C で6カ月の保管に相当し、 50°C で65日間の保管が 25°C で1年に相当するものとして実験を行った。ストリップの作製当日の発色強度を100%として保存期間中での性能維持を評価した。スクロースとLiquid Plate Sealerにより、8週間後の保存でも90%以上の発色強度を維持できた。Liquid Plate Sealerは初めの 50°C で1週間の保存で初期の発色強度からわずかに発色強度が落ちた後、その後8週間は初期の強度の90%を維持した(図9)。Liquid Plate Sealer中に最終懸濁した金コロイド標識抗体を使用して作成したイムノクロマトグラフィーストリップについては、 25°C でほぼ1年の品質の保証が示されたといえることができる。したがって、本研究で開発したイムノクロマトグラフィー測定系は、簡易測定キットのプロトタイプとしての基準を満たすものであるといえることができる。DiAcSpmの測定は随時尿で行っているため、尿測定時の濃度の補正法についての課題もまだあるが、今後はこの点を含めて、このプロトタイプを臨床検査薬として製品化するために、検査薬メーカーと共同開発を進めていく予定である。

第3章

同位体標識基質を用いた質量分析法による

ポリアミン代謝酵素活性測定法

第1節 序文

近年、ヒトの疾患と関連したポリアミン代謝への関心が増している。CaseroとPeggは、ポリアミンの代謝の過程はがんを含む疾患の解明や治療薬の開発のターゲットとなる可能性があるを指摘している⁽⁵⁵⁾。哺乳類のポリアミン代謝経路の概略を図10に示した。ただし、簡略化のため、非特異的なポリアミンオキシダーゼ(EC 1.5.3.17)と生合成酵素はこの図からは省略した。ポリアミンの異化的代謝には3種類の酵素、SSAT (EC 2.3.1.57)、APAO (EC 1.5.3.13)およびSMO (EC 1.5.3.16)が関わっている。SSATは、環境条件の変化に応じて合成量が変化する誘導酵素であり、アミノプロピル基の末端アミノ基に、アセチルCoAからアセチル基を転移し、アセチルアミドプロピル基をつくる。APAOは、N¹-アセチルポリアミンのアセチルアミドプロピル基を酸化し、炭素数が3だけ短いポリアミンと3-アセトアミドプロパナールおよび過酸化水素を生成する。SMOも環境要因により誘導される酵素であり、Spmのアミノプロピル基を酸化し、Spdと3-アミノプロパナールと過酸化水素を生成する。これらの3つの酵素に加えて、まだ特定されていないSpdのN⁸-アセチル化を触媒する核内酵素が存在することが知られている⁽⁵⁶⁾。これらの酵素の作用に関連して、生体内には5種類のアセチルポリアミン、すなわちN¹AcSpd、N⁸AcSpd、DiAcSpd、N¹AcSpmおよびDiAcSpmがある。生体内のポリアミンレベルは、合成酵素活性変動とともにポリアミン代謝酵素の活性変動によっても影響され、様々な生理的な環境変化を受けて変動している。各種のポリアミンとアセチルポリアミンの定量法としては、HPLCによる分画分析法や質量分析法による方法が利用されてきた。特に後者については、N-エトキシカルボニル-N-ペンタフルオロプロピオニル誘導体化を行ったGC-MS分析⁽⁵⁷⁾、カルバモイル誘導体化を行ったLC-ESI-MS/MS分析⁽⁵⁸⁾、誘導体化せずにLC-ESI-MS/MSを使った方法⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾が報告されている。これらの従来法においては、質量分析装置の前にガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーを使い、ポリアミン成分を分離するステップが必要である。我々は操作を簡易化させるため、分離操作を用いない方法として安定同位体標識内部標準物質^(62,63)を使ったESI-MS分析法を提案し、ESI-TOF-MSを使ったDiAcSpd、AcSpd、DiAcSpm測定によって、尿中バイオマーカーとしてのDiAcSpmの有用性を報告した⁽⁵⁴⁾。これらの方法を更に改良し、N¹AcSpdとN⁸AcSpdの2種類のAcSpd異性体を識別、同定してポリアミン代謝経路中の3種類のポリアミンと5種類のアセチルポリアミンをすべて同時に定量するために、ESI-TOF-MS/MSによって分析を行った。本研究においては、この方法をさらに酵素の活性測定に拡張することを目的とし、それに用いる安定同位

体標識化合物を設計し、合成した。それぞれの酵素活性測定に用いる安定同位体標識基質とその基質からの生成物は以下の通りである：APAO；[4,9,12- $^{15}\text{N}_3$]- N^1 -アセチルスペルミン($^{15}\text{N}_3$ - N^1AcSpm)を基質として[1,4,8- $^{15}\text{N}_3$]-スペルミジン($^{15}\text{N}_3$ -Spd)が生成、SMO；[1,4,8,12- $^{15}\text{N}_4$]-スペルミン($^{15}\text{N}_4$ -Spm)を基質として $^{15}\text{N}_3$ -Spdが生成、SSAT； $^{15}\text{N}_3$ -Spdを基質として[1,4,8- $^{15}\text{N}_3$]- N^1 -アセチルスペルミジン($^{15}\text{N}_3$ -AcSpd)が生成。次いで、これらの基質および培養細胞中で発現させたSSAT、APAO、SMOを用いて酵素活性測定を行い、測定法を確立した。そして、最終的に、生体試料からの抽出液を用いて、粗酵素溶液中の各酵素もこの方法によって簡単に測定できることを示した。

第2節 実験材料と方法

第1項 試薬

プトレシン二塩酸塩(Put \cdot 2HCl)、スペルミジン三塩酸塩(Spd \cdot 3HCl)、スペルミン四塩酸塩(Spm \cdot 4HCl)、 N^1 -アセチルスペルミジン二塩酸塩($\text{N}^1\text{AcSpd}\cdot$ 2HCl)、 N^8 -アセチルスペルミジン二塩酸塩($\text{N}^8\text{AcSpd}\cdot$ 2HCl)、 N^1 -アセチルスペルミン三塩酸塩($\text{N}^1\text{AcSpm}\cdot$ 3HCl)はSigma-Aldrich社から購入した。

以下の安定同位体標識ポリアミンは、それぞれの参考文献をもとに合成した：[1,4- $^{15}\text{N}_2$]-Put($^{15}\text{N}_2$ -Put) \cdot 2HCl⁽⁵⁸⁾、[1,4- $^{13}\text{C}_2$,1,4- $^{15}\text{N}_2$]-Put($^{13}\text{C}_2$, $^{15}\text{N}_2$ -Put) \cdot 2HCl⁽⁵⁹⁾、[1,4,8- $^{15}\text{N}_3$]-Spd($^{15}\text{N}_3$ -Spd) \cdot 3HCl⁽⁵⁸⁾、N-(3-アミノプロピル)-1,4- $^{15}\text{N}_2$ -ブタン-1,1,4,4- d_4 ($^{15}\text{N}_2$, D_4 -Spd) \cdot 3HCl⁽⁶⁰⁾。[1,4,8,12- $^{15}\text{N}_4$]-Spm($^{15}\text{N}_4$ -Spm) \cdot 4HClは参考文献⁽⁵⁸⁾を参考にし [1,1,4,4- d_4]-Putを使い合成した。

以下のポリアミンのアセチル誘導体は、それぞれの参考文献を参考に合成を行った：[1,4,8- $^{15}\text{N}_3$]- N^1 -AcSpd($^{15}\text{N}_3$ - N^1AcSpd) \cdot 2HCl⁽⁶¹⁾、DiAcSpd \cdot HClと[1,4,8- $^{15}\text{N}_3$]- N^1 , N^8 -DiAcSpd($^{15}\text{N}_3$ -DiAcSpd) \cdot HCl⁽⁵⁷⁾、DiAcSpm \cdot 2HCl⁽⁵⁷⁾、[1,4,9,12- $^{15}\text{N}_4$]- N^1 , N^{12} -DiAcSpm($^{15}\text{N}_4$ -DiAcSpm) \cdot 2HCl⁽⁶¹⁾、 ^{15}N -(N-3-ブロモプロピル)フタルイミド⁽⁵⁸⁾。

MDL72527(N,N'-ジ-2,3-ブタジエニル-1,4-ブタンジアミン)はTocris Bioscience社から購入した。ギ酸(LC/MSグレード、和光純薬社)、酢酸アンモニウム(LC/MSグレード、Sigma-Aldrich社)、アセトニトリル(LC/MSグレード(和光純薬社))とその他の全ての試薬は、利用できる限りで最もグレードの高い試薬を使用した。

第2項 同位体標識化合物の合成

それぞれの同位体標識アセチルポリアミンは以下の手順で合成を行った：[アセチル-1,2- $^{13}\text{C}_2$]- N^8 -アセチルスペルミジン($^{13}\text{C}_2$ - N^8AcSpd)は、 N^1 -フタロイル(Pht)、 N^4 -ベンジル(Ben)および N^8 -*tert*-ブトキシカルボニル(Boc)スペルミジン(N^1 -Pht, N^4 -Ben, N^8 -Boc Spd)から文献⁽⁶⁴⁾の方法によって合成した。 N^1 -Pht, N^4 -Ben, N^8 -Boc Spdは、さらに以前に報告された方法⁽⁶⁵⁾を使用し、プトレシンと二炭酸ジ-*tert*-ブチル(和光純薬社)から調製した N^1 -Bocプトレシンを前駆体として合成した。この保護基の付いた N^1 -Pht, N^4 -Ben, N^8 -Boc Spd (626 mg, 1.34 mmol)をアルコ

ール性0.5 M塩酸(関東化学社)15 mlに溶解し、55°Cで20時間反応させ、Boc基の脱保護反応を行った。脱保護された生成物は、二塩酸塩の結晶としてほぼ定量的に回収した。この塩酸塩(263 mg、0.6 mmol)を5 mlのピリジンに溶解し、1,1',2,2'-¹³C₄-無水酢酸(Cambridge Isotope Laboratories, Inc., 0.085 ml、0.8 mmol)を添加し、室温にて3時間アセチル化反応を行った。十分なアセチル化の後に反応液を蒸発乾固し、残渣をメタノール10 mlに溶解してヒドラジン-水和物0.2 mlと共に3時間還流し、Pht基の脱保護を行った。反応液の蒸発後にクロロホルムと4 Mアンモニア水で抽出を行い、クロロホルム層をろ紙でろ過して、蒸発乾固した。得られた残渣物を酢酸に溶解し、パラジウム炭素を触媒として60°Cで20時間、水素による加水素分解を行いBen基の脱保護を行った。反応後に過量の水素化リチウムアルミニウムを用いて通常のやり方(水素化リチウムアルミニウム100 mg使用の場合：水 0.1 ml、2 M水酸化リチウム0.1 ml、水0.3 mlの順で滴下、しばらく攪拌、ろ過)で後処理し、触媒のろ過、溶媒の蒸発後、残渣物を10mlのエタノールに溶解した。0.5 M塩酸(アルコール性)3 mlを添加して塩酸塩に置換後溶媒を除去し、得られた結晶をエタノールで再結晶して¹³C₂-N⁸AcSpd · 2HClを得た(114 mg、0.44 mmol)。元素分析としては、¹³C₂C₇H₂₃N₃OCl₂の計算値は(H, 8.84; C, 41.92; N, 16.03)であり、実測値は(H, 8.77; C, 41.33 (¹³C補正); N, 15.91)であった。¹³C₂C₇H₂₁N₃Oの精密質量(ESI-TOF)は、計算値が190.1830 [M+H]⁺であり、測定値は190.1826であった。

[アセチル-1,2-¹³C₂]-N¹-アセチルスぺルミジン(¹³C₂-N¹AcSpd)は文献⁽⁶²⁾を参考に、¹³C₂-N⁸AcSpdとは異なる保護基を付けたSpd前駆体(N¹-Pht, N⁴-Ben, N⁸-ベンジルオキシカルボニル Spd)と1,1',2,2'-¹³C₄-無水酢酸から合成した。元素分析としては、¹³C₂C₇H₂₃N₃OCl₂の計算値は(H, 8.84; C, 41.92; N, 16.03)であり、実測値は(H, 8.81; C, 42.03 (¹³C補正); N, 15.85)であった。¹³C₂C₇H₂₁N₃Oの精密質量(ESI-TOF)は、計算値が190.1830 [M+H]⁺であり、測定値は190.1825であった。

[アセチル-2-¹³C, 5,8-¹³C₂, 1,4,8-¹⁵N₃]-N¹-アセチルスぺルミジン(¹³C₃,¹⁵N₃-N¹AcSpd)は、¹³C₂,¹⁵N₂-プトレシンのモノBoc誘導体を使って合成した。Boc基保護された前駆体(269 mg、0.57 mmol)を5 mlをメタノールに溶解し、ヒドラジン-水和物(0.18 ml)の存在下で3時間還流し、Pht基を脱保護した前駆体を得た(180 mg)。これを3.5 mlのピリジンに溶解し、2,2'-¹³C₂-無水酢酸(Cambridge Isotope Laboratories, Inc., 0.065 ml)でアセチル化した。十分にアセチル化を行った後、溶媒を除去し、その残渣を0.5 M 塩酸(アルコール性) 5mlに溶解して、50°Cにて48時間攪拌を行い、Boc基の脱保護反応を行った。反応液を蒸発させ、残渣を、クロロホルムと4 Mアンモニア水で一度抽出した後、先に述べた方法で加水素分解によるBen基の脱保護を行った。通常の後処理を行った後、得られた¹³C₃,¹⁵N₃-N¹AcSpdの塩酸塩をエタノールで再結晶した。しかし、この結晶の薄層クロマトの分析結果は、Spdに一致するRf値を示す夾雑物質の混入を示した。それを取り除くために、CM-セルロースによる精製を行った。溶媒には、2 Mピリジンと2 M酢酸を等量混合して調製した1 Mピリジン/酢酸緩衝液(pyr/AcOH)を用いた。1 M pyr/AcOHを100倍希釈し10 mM pyr/AcOHを調製し、結晶(95 mg)をこの10 mM pyr/AcOH 5 mlに溶解した。この溶液を10 mM pyr/AcOHで平衡化したCM-セルロース(7 g、和光純薬社)カラム(φ2×30 cm)にアプライし、10 mM pyr/AcOH 20 ml、0.1 M pyr/AcOH 15 mlの順に続けて洗浄を行い、0.2 M pyr/AcOH

30 mlで溶出させた。この溶出画分を蒸発させ、濃硫酸を入れた真空デシケーター中でピリジンの完全除去を行った。その残渣物をエタノールに溶解し、2 mlの0.5 M塩酸(アルコール性)を添加し溶媒を蒸発させた。結晶性の残渣はエタノールから再結晶し、90 mg(0.34 mmol)の結晶を得た。元素分析では、 $^{13}\text{C}_3\text{C}_6\text{H}_{23}^{15}\text{N}_3\text{OCl}_2$ の計算値はH, 8.71; C, 41.73; N, 16.92であり、実測値はH, 8.68; C, 41.10 (^{13}C 補正); N, 17.10 (^{15}N 補正)であった。 $^{13}\text{C}_3\text{C}_6\text{H}_{21}^{15}\text{N}_3\text{O}$ の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が194.1775 [M+H]⁺であり、測定値は194.1771であった。

[4,9,12- $^{15}\text{N}_3$]-N¹-アセチルスペルミン($^{15}\text{N}_3$ -N¹AcSpm)は以下の方法で合成した。 $^{15}\text{N}_2$ -プトレシンのモノBoc誘導体を原料として、文献⁽⁶²⁾を参考にN¹-Pht, $^{15}\text{N}^4$ -Ben, $^{15}\text{N}^8$ -Boc Spdを合成した。この前駆体(768 mg, 1.64 mmol)を14 mlのメタノールに溶解し、ヒドラジーン水和物0.5 mlとともに3時間還流し、脱フタロイル化した $^{15}\text{N}^4$ -Ben, $^{15}\text{N}^8$ -Boc保護Spdを得た(530 mg, 1.6 mmol)。これを10 mlのピリジンに溶解し、無水酢酸(0.18 ml)によるアセチル化反応を行った。蒸発乾固した残渣を0.5 M塩酸(アルコール性)16 mlに溶解して、50°C、48時間で攪拌を行い、Boc基の脱保護反応を行った。蒸発乾固後の脱Boc基AcSpd誘導体は、クロロホルムと4 Mアンモニア水で抽出したのち、溶媒を蒸発させた。オイル状の残渣物(444 mg, 1.6 mmol)に対し、第一級アミン基へ、モノベンジル化反応を行った(反応溶液: メタノール 16 ml、トリエチルアミン1 ml、硫酸マグネシウム 270 mg、ベンズアルデヒド0.175 ml、水素化ホウ酸ナトリウム172 mg)。生成した[$^{15}\text{N}^4$, $^{15}\text{N}^8$ -Ben]-N¹AcSpd (441 mg, 1.2 mmol)をジエチルエーテルと水で抽出し、回収したジエチルエーテル層を蒸発させた。この残渣物をアセトニトリル5 mlに溶解し、 ^{15}N -(N-3-プロモプロピル)フタルイミド(0.34 g, 1.27 mmol)、フッ化カリウムセライト(0.8 g)とともに20時間還流した。残渣中の生成物([$^{15}\text{N}^4$, $^{15}\text{N}^8$ -Ben, $^{15}\text{N}^{12}$ -Pht]-N¹AcSpm)を、ベンゼン:アセトン混合溶媒系を用いてシリカゲルカラム(10 g, φ2×30 cm)クロマトによって精製した。ベンゼン:アセトン(4:1)によって純粋な生成物 (605 mg, 1.08 mmol)が溶出した。そして、脱フタロイル反応、脱ベンジル反応、0.5 M 塩酸(アルコール性)による塩酸塩への置換を経て、粗 $^{15}\text{N}_3$ -N¹AcSpm・3HClを得た。色のついた残渣を80%エタノール3 mlに溶解させ、そこへ100%エタノール5 mlを添加し、高純度の $^{15}\text{N}_3$ -N¹AcSpm・3HCl (303 mg, 0.85 mmol)を得た。元素分析では、 $\text{C}_{12}\text{H}_{31}^{15}\text{N}_3\text{N}_1\text{OCl}_3$ の計算値はH, 8.70; C, 40.39; N, 16.55であり、実測値はH, 8.43; C, 39.84; N, 16.59(^{15}N 補正)であった。 $\text{C}_{12}\text{H}_{28}^{15}\text{N}_3\text{N}_1\text{O}$ の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が248.2252 [M+H]⁺であり、測定値は248.2250であった。

以上、測定に使用したすべての標識ポリアミンを図11にまとめた。

第3項 測定試料の固相抽出

測定試料からCM-セルロースを用いてPut、Spd、Spm、N¹AcSpd、N⁸AcSpd、N¹AcSpm、DiAcSpmを固相抽出した。2 mlのディスパーサブルポリスチレンカラム(Thermo Scientific社)に0.3 mlのCM-セルロースを詰めたカラムを作製し、カラムの10倍容量の1 M pyr/AcOHで洗浄後、カラムの10倍量の10 mM pyr/AcOHで平衡化した。対象の試料中に、定量したいポリアミン成分に対応した内部標準物質を各2 nmol (40 μM, 50 μl)添加し、直後に5%トリクロロ酢酸0.15 mlを添加して除タンパクを行った。20,000 ×g, 4°C、15分間の遠心分離を行い、得られた上清に50 mM

ピリジン2 mlを添加して中和した。中和後の試料をカラムに添加し、カラムを3 mlの10 mM pyr/AcOHと3 mlの50 mM pyr/AcOHで順に洗浄し、1 mlの1 M pyr/AcOHで溶出して溶出画分を回収した。

溶出画分は、真空遠心エバポレーター(CVE-200D、EYELA社)を用いて一度乾固させ、0.1 M 塩酸(アルコール性)を0.1 ml添加して酢酸塩から塩酸塩に変換した後、再び乾固した。ヘプタフルオロブチル基(HFB)誘導体化の前に塩酸塩に置換することは、混合酸無水物の生成を避けるために重要な操作であった。多量の夾雑物が混在する生体試料の測定においては、しばしばイオン化の抑制によって測定が妨害され、分析の信頼性が低下することがあるが、この方法を用いた我々の測定条件下ではイオン化の抑制は起こらなかった。仮に、抑制が起こった場合でも、以前に我々が報告した標準物質添加法⁽⁵⁴⁾を使用すれば、イオン化の抑制によるエラーを最小限にすることができる。

第4項 質量分析のための試料の誘導体化

前項で得られた試料を、アセトニトリル(0.1 ml)の溶媒中で、30分間、100°Cで無水ヘプタフルオロ酪酸(20 µl、Sigma-Aldrich社)と反応させ、HFB誘導体化を行った。その後、反応溶液に乾燥窒素ガスを吹きかけ試料を乾燥させた。

測定直前に、乾燥試料を0.05%ギ酸、0.1%酢酸アンモニウム、50%アセトニトリル溶液(3 ml)に溶解して測定試料を調製した。

第5項 質量分析装置による測定

QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS system(AB Sciex社)を使用して測定を行った。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法のイオン源としてTurboIonsprayを用い、Harvardシリンジポンプによるインフュージョン法により、流速10 µl/minで試料を注入した。以前に我々が報告した方法⁽⁵⁴⁾に従い、0.05%ギ酸、0.1%酢酸アンモニウム、50%アセトニトリルを溶媒として使用した。測定はポジティブモードで行い、TOF-MSのスキャン範囲はm/z 100~1,100(60 cycle/1sec)に設定した。さらに、581.10 Daに検出されたピークについては、m/z 50 ~ 1,000 (60 cycle/1sec)、Q1 Low resolution、collision energy 35.0 eV (collision gas 5)のMS/MSモードによって分析した。

その他のTOF-MS、MS/MSの装置の設定は以下に示す：ion source 1、15；curtain gas、25；ion spray voltage、5500.0；declustering potential 1、60.0；focusing potential、265.0；declustering potential 2、15.0；ion release delay、6.0；ion release width、5.0；ion energy 1、2.0。

第6項 APAO、SMO、SSATの発現と活性測定

ヒト(*h*)APAO cDNA、*h* SMO cDNAが挿入されたプラスミドはOrigene社から購入した。宿主細胞としてはRIKEN CELL BANKから提供を受けたHEK293細胞株を使用した。HEK293細胞 5×10^6 細胞を10 cmの培養皿に播種し、10% FBS含有RPMI-1640培地中で24時間、90~95%コンフルエントとなるように培養(培養条件：37°C、5% CO₂)した。リポフェクタミン™2000(Life

Technologies社)を用い、メーカーのマニュアルに記載された方法に従ってhAPAO cDNAまたはhSMO cDNAを遺伝子導入した。37°Cにおいて24時間培養後に細胞を回収し、1/100容量のプロテアーゼインヒビターカクテル(P8310、Sigma-Aldrich社)を添加した0.05 M HEPES(pH 7.5)に懸濁して、ソニケーションにより細胞破碎を行った。破碎液は15,000 ×g、4°C、10分間遠心分離し、得られた上清を酵素溶液として使用した。

h SSAT cDNAは、かずさDNA研究所から購入した。pFN21A (HaloTag®7) CMV Flexi®ベクターからSgfIとPmeIによってh SSAT cDNAを切り出し、同様にSgf IとPme Iで切断したpFN19K (HaloTag®7) T7 SP6 Flexi®ベクターに挿入し連結させた。このrecombinant cDNAを*E. coli* BL21 (DE 3)に導入し、LB/カナマイシンによるセレクションによりN末にHaloタグを持つh SSAT cDNAを導入したBL21 (DE 3)を得た。得られた形質転換体を、37°Cのインキュベータ中で0.1%グルコース、0.05 mg/mlカナマイシン含有LB培地中で大量培養した。OD₆₀₀ = 0.6になったところで、終濃度0.5 mMになるようにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに3時間培養を行った。大腸菌を遠心分離によって回収し、プロテアーゼインヒビターカクテルの入ったPBS(-)に懸濁後超音波破碎した。15,000 ×g、4°C、10分間の遠心分離によって得られた上清をSSAT溶液として使用した⁽⁶⁶⁾。

それぞれの酵素の活性測定は以下の反応条件で行った。APAOについては、0.2 mMアミノグアニジン、0.2 mMパーズリン、0.2 mM ¹⁵N₃-N¹AcSpmを含む40 mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)に適量のAPAO酵素溶液を加え、37°C、30分間反応させた。阻害実験は、あらかじめ0.1 mM MDL72527と酵素溶液を37°Cで15分間プレインキュベーション後、基質を添加し活性を測定した。SMOについては、0.2 Mアミノグアニジン、0.2 Mパーズリン、0.6 mM ¹⁵N₄-Spmを含む40 mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)に適量のSMO酵素溶液を加え、37°C、30分間反応させた。阻害実験は、あらかじめ0.1 mM MDL72527と酵素溶液を37°Cで15分間プレインキュベーション後、基質を添加し活性を測定した。SSATについては、1 mMジチオトレイトール、0.2 mMアミノグアニジン、0.2 mMパーズリン、1.5 mMアセチルCoA、1 mM ¹⁵N₃-Spdを含む0.04 M HEPES (PH7.5)に適量のSSAT酵素溶液を加え、37°C、30分間反応させた。阻害実験は、アセチルCoAを添加しない反応溶液中で酵素と阻害剤を37°Cで30分間反応後、アセチルCoAを添加して活性を測定した。

第3節 結果と考察

第1項 ポリアミンおよびアセチルポリアミンの定量

AcSpd、DiAcSpd、N¹AcSpm、DiAcSpmのHFB化誘導体の分子イオンはプロトンアダクトとして、Put、Spd、SpmのHFB誘導体の分子イオンはアンモニウムアダクトとして検出された。これらのイオンのモノアイソトピック質量を定量に利用した。それぞれのポリアミン成分は、各成分のピークエリア面積と、それに対応する質量数が3または4大きい内部標準物質(¹³C₂,¹⁵N₂-Put、¹⁵N₂,D₄-Spd、¹⁵N₄-Spm、¹⁵N₃-DiAcSpd、¹⁵N₃-N¹AcSpm、¹⁵N₄-DiAcSpm)のピーク面積を基に

面積比によって定量した。AcSpdの定量は第2項に述べる理由で質量数が2大きい内部標準物質 ($^{15}\text{N}_2\text{-N}^1\text{AcSpd}$ 、 $^{15}\text{N}_2\text{-N}^8\text{AcSpd}$)を用いて行った。

TOF-MSスペクトルの1例を図12に示した。等量の各ポリアミン成分を同時に測定した時のイオン強度は、DiAcSpd (m/z 426と429)、Put (m/z 498と502)、DiAcSpm (m/z 679と683)、Spd (m/z 751と754)、 N^1AcSpm (m/z 833と836)、Spm (m/z 1004と1008)の順に、m/z値の増加と共に減少する傾向があった。しかし、AcSpd (m/z 580と582)については、 N^1AcSpd と N^8AcSpd の2つの異性体が含まれているため、全体のピークの中で2番目に高いイオン強度を与えた。各検出領域の拡大図(図12の下部のパネル)で分かるように、測定を行ったm/z範囲で良い分解能が得られていた。各成分の定量の回帰直線の傾きとy切片、および、良好な直線性の指標としての相対標準偏差(RSD)を表2にまとめた。この結果より、ここで示した方法の有用性が示された。

添加する内部標準物質の量を2 nmolから10 nmolまで増やした場合でも、回帰直線の傾きは影響を受けなかった。内部標準物質を過剰に添加した実験の結果から、試料に添加した内部標準物質が対象成分のイオン抑制をもたらし、測定誤差の原因となる可能性は除外できると判断した。

第2項 N^1AcSpd と N^8AcSpd の同定

N^1AcSpd と N^8AcSpd は、MS/MS分析で生じるAcSpdのフラグメントイオン、すなわち、 N^1AcSpd に由来するアセチルアミドプロピル基(m/z 100)と、 N^8AcSpd に由来するアセチルアミドブチル基(m/z 114)の分析によって同定および定量した。測定に使う内部標準物質は、天然のAcSpdより質量数が2大きいものを使用した。MS/MS測定時に与える衝突エネルギーを、天然AcSpd由来のイオン(m/z 580)と標識内部標準物質にしたAcSpd由来のイオン(m/z 582)の間のm/z 581に設定すれば、2種類のイオンに対して均等にエネルギーを与えられると考えられる。このような考察に基づいて、本研究では内部標準物質として天然のAcSpdより質量数が2大きいものを選択した。

N^1AcSpd と N^8AcSpd の同定を行うため、図12中のAcSpd領域に検出されたAcSpdとその内部標準物質のピークに対し、MS/MS分析を行った結果を図13に示した。AcSpd領域のMS/MSフラグメントイオンは、m/z 100~116の範囲に2組のペアイオンとして検出された(図13 B、拡大図:13 C)。等量の N^1AcSpd と N^8AcSpd を混合した試料を測定したところ、それらから得られた2種類のフラグメント、アセチルアミドプロピル基とアセチルアミドブチル基の生成効率には、かなりの差が認められ、2種類のフラグメントイオンの強度はかなり異なっていた。しかし、これらの2つのピークを利用して内部標準添加法で測定した結果は、表2にまとめたように、高い直線性を示しており、MS/MS分析によるこの方法で、 N^1AcSpd と N^8AcSpd を定量できる事が明らかになった。

この方法を用いて、ヒト尿中の N^1AcSpd と N^8AcSpd の分析を行った場合に、尿中物質が測定結果に不測の影響を与える可能性について検討した。尿中 N^1AcSpd および N^8AcSpd 濃度は、それぞれ4208 nmol/Lと3810 nmol/Lと算出された。 N^1AcSpd と N^8AcSpd の値を合算した値(8018 nmol/L)は、以前に我々が報告したAcSpd値 7648 nmol/L⁽⁵⁴⁾に対して104.8%の値であった。本測定における N^1AcSpd および N^8AcSpd のRSD値を考慮すると、今回の測定結果と文献⁽⁵⁴⁾の測定結果はよく一致していると評価できる。したがってこの結果は、尿検体中にMS/MS分析による

N^1AcSpd および N^8AcSpd の分析を妨害する内因性物質は含まれていないことを示すものであると考えられる。

第3項 質量分析法によるポリアミン測定の酵素活性測定への適用

前項までに述べたポリアミン類の定量的測定法をポリアミン代謝関連酵素、APAO、SMO、SSATの活性測定に利用するために以下の実験を行った。ポリアミンと、がんやその他の疾患との関連を明らかにするためには、患者の組織中のポリアミン代謝酵素の研究が不可欠であるが、生体試料から得た抽出物中には多くの物質や酵素が混在するため、目的の酵素の活性を正確に測定できない。従来の方法で生体試料から得た抽出物中の酵素活性を測定しようとする、目的の酵素以外のタンパク質の活性を測定している様子が観察された。また、そのような研究にあたっては、提供される検体試料に量的な制限があるため、多くの場合、酵素活性の測定は組織の粗抽出液を用いて行わざるを得ない。目的の酵素の活性を正確に測定するためには、混在成分による副次的な反応を除外して、目的の反応の進行のみを正しく評価することが必要である。安定同位体標識された天然のポリアミン成分と異なる質量数の基質を利用して、生成する標識ポリアミン生成物を定量することは、そのための優れた方法の一つであると考えられる。基質として用いる安定同位体標識ポリアミンよりさらに質量の大きい安定同位体標識ポリアミン($^{15}N_2, D_4\text{-Spd}$ 、 $^{13}C_3, ^{15}N_3\text{-AcSpd}$)を内部標準物質として用いることにより、酵素反応生成物の量を定量的に求めることができる。

今回の酵素の活性測定法と同様に、安定同位体標識した基質を使用した酵素活性測定法として、 β -ガラクトシダーゼとN-アセチル- α -D-グルコサミン⁽⁶⁷⁾、アルギニン：グリシンアミジノトランスフェラーゼ⁽⁶⁸⁾、脂肪酸アミド加水分解酵素⁽⁶⁹⁾の活性測定など、これまでにいくつかの報告がある。

1. APAO

通常、APAOの測定は、副産物として生成する過酸化水素の定量によって行われる。過酸化水素の定量には、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を使用したホモバニリン酸による蛍光反応⁽⁷⁰⁾や、ルミノール反応による化学発光⁽⁷¹⁾などが利用されている。しかし、生体試料から抽出した試料溶液を用いた実験では、試料中に他のオキシダーゼを含む多くの夾雑物が混入しており、種々の基質に作用するこれらの酵素から過酸化水素が生成し、目的の酵素では検出されないはずの生成物が確認された。例えば、スペルミジンのような、本来、酵素の基質にならないことが確立されている物質からの酸化が起こり、高いバックグラウンドの活性が検出され、正確な測定結果が得られない。また、 N^1, N^{11} -ジダンシルノルスペルミンを基質とし、蛍光性の生成物をHPLCで分析する測定法⁽⁷²⁾も報告されているが、本来の生理的な基質ではないために、結果の解釈に問題が残る場合がある。同位体を用いる方法は、本来の基質から目的の酵素の作用によって生成した基質を選択的に測定できるため、バックグラウンドも低く、これまでの測定法の問題点を解決する方法であると考えられる。

APAOが N^1AcSpd より N^1AcSpm を優先的に基質にするという報告^(73,74)にもとづいて、本研究では、APAO活性測定のための基質として $^{15}N_3\text{-}N^1AcSpm$ を用いた。生体中の N^1AcSpm の存在量は

微量であるため、天然の基質による競合を受けにくいと考えられることも N^1AcSpm を基質に選んだ理由の一つである。APAOの作用によって生成した $^{15}N_3\text{-Spd}$ が、混在するSSATの作用でアセチル化され測定が妨げられる可能性を除外するために、活性測定はアセチルCoAのない状態で行った。反応後、内部標準物質 $^{15}N_2,D_4\text{-Spd}$ を用いて内因性のSpdと共に $^{15}N_3\text{-Spd}$ を定量した。

測定系の動作を確認するために、酵素源としてhAPAO発現HEK293細胞の抽出液を使い、生成した $^{15}N_3\text{-Spd}$ (m/z 754)を定量した。APAO反応の時間依存性を図14に示す。検出されたピークの分解能は、いずれも、標準物質を測定した時と同様に良好であった。また、内部標準物質等のシグナル強度も細胞抽出物の添加によって影響を受けていなかった。現在の測定条件では、細胞抽出液の使用、高濃度で使用している基質濃度はいずれも、イオン化抑制を引き起こしていないことが明らかになった。APAOの阻害剤MDL72527と酵素をプレインキュベーションし、活性を阻害した場合には、生成物のピークは全く検出されなかった。 $^{15}N_3\text{-Spd}$ 生成量は反応時間とともに直線的に増加することが確認された(図15 A)。ミカエリス・メンテンの式による解析から、Km値は2.7 μM と求められた。これは以前報告された値1.1 μM ⁽⁷⁵⁾と近い値であった。

この測定法を組織の粗抽出液に適用した際の測定精度について検討することを目的として、hAPAO発現HEK 293細胞抽出液とマウス肝臓ホモジェネートの上清、またはそれらの混合液を使い、APAOの酵素活性を測定した。その結果を表3のAPAO欄にまとめた。測定は四重測定で行った。測定値間のRSD値は検体の酵素活性が増加するに伴いより低くなった。マウス肝臓ホモジェネートの上清にhAPAO発現細胞抽出液 (APAO酵素溶液2.5 μl または5 μl)を加えた反応液の活性測定の結果から、APAO活性の回収率は十分に許容される範囲であり、肝臓ホモジェネート中の成分はhAPAO発現細胞抽出液中のAPAO活性を抑制しないことが明らかになった。これらのデータに基づいて算出したマウス肝臓ホモジェネート上清中のAPAO活性値は52.6 pmol/mg/minであった。また、データは示さないが、MDL72527とのプレインキュベーションによりこのAPAO活性も完全に阻害された。この実験では、マウス肝臓ホモジェネート上清中(2.5 μl)には、測定に用いた基質($^{15}N_3\text{-}N^1AcSpm$)と競合する天然 N^1AcSpm は検出されなかった。マウス肝臓ホモジェネートの上清中に検出された他のポリアミン成分は、Put 0.006、Spd 0.135およびSpm 0.140 (nmol/2.5 μl)であった。

2. SMO

これまで、SMO活性測定にはAPAOと同様の蛍光基質を用いたHPLC分析による方法⁽⁷¹⁾や化学発光法⁽⁷²⁾が利用されてきた。しかし、これらの方法には、APAO測定で観察される問題と同様の問題点があるため、組織抽出液にも十分な精度で適用できる方法の開発が望ましいと考えられた。そこで本研究では、SMO活性の測定のために、基質として $^{15}N_4\text{-Spm}$ を使って生成する $^{15}N_3\text{-Spd}$ を測定する方法を開発した。APAOの測定と同様に、SSATの作用による妨害を除外するためにアセチルCoAを含まない反応液を使用した。 $^{15}N_3\text{-Spd}$ ならびに内在性のSpdは、APAOと同様に内部標準物質 $^{15}N_2,D_4\text{-Spd}$ を用いて定量した。反応生成物によって酵素が阻害を受ける可能性が報告されていること⁽⁷⁶⁾を考慮して、同時に内在性Spdを測定することにより存在量を求めた。hSMO発現HEK293細胞の抽出液を使って $^{15}N_3\text{-Spd}$ (m/z 754)の生成量を測定した結果、30分間の反応の過程で $^{15}N_3\text{-Spd}$ の生成は直線的に増加した(図15 B)。ミカエリス・メンテンの式による解析から、

SMOのKm値は34.3 μM と算出された。これは以前報告された文献値20 μM ⁽⁷⁴⁾と近い値であった。今回の測定条件下において、APAOは0.1 mM MDL72527によって上述の通り完全に阻害されたが、SMO活性は0.1 mM MDL72527では70%程度しか阻害されなかった。0.1 mMよりさらに高濃度のMDL72527を用いれば完全に阻害することも可能であると考えられるが、より効果的な阻害剤が開発されることがより望ましい。この点については第4章で詳しく述べる。

SMO活性測定法を組織の粗抽出液に適用した際の測定精度について検討することを目的として、hSMO発現HEK293細胞抽出液をマウス肝臓ホモジェネート上清中に加え、SMO活性がホモジェネート中の夾雑物質による妨害を受けることなく測定できるかどうかについて検討した。添加回収率と測定精度の解析結果を表3 (SMO)にまとめた。SMOの活性測定は四重測定で行い、hSMO発現HEK293細胞抽出液中の活性に関するRSD値は2.5%以下であった。これは、この測定法がSMO活性の定量に十分な精度をもつことを示している。一方、酵素活性の回収率は、マウス肝臓ホモジェネート上清中の活性を差し引いた理論値より少し高い値が得られた。これは、単純な実験誤差であるかもしれないが、ホモジェネート上清中に存在する何らかの因子が酵素活性に影響を及ぼしている可能性も考慮する必要がある、今後の検討課題であると考えられる。もし、内因性因子の影響であるならば、測定の際に既知量の標準酵素標品を添加し、その回収率に基づいて実測値を補正することにより、問題を解決することができる。一連の測定の結果から、マウス肝臓ホモジェネートの上清中のSMO活性は28.0 pmol/mg/minと算出された。この活性は、hSMO発現HEK293細胞抽出液中の活性と同様に、0.1 mM MDL72527によって部分的に阻害された。活性測定の際に同時に測定された内在性のSpm濃度は2.8 μM であった。これは反応溶液中の¹⁵N₄-Spm 0.6 mMに比べるとはるかに低いため、内在性Spmの測定系への影響は無視することができる。基質の使用濃度としては、1 mMの高濃度でも基質阻害等の影響がないことを確認し、0.6 mMに決定した(データ未掲載)。この結果から、0.6 mMの基質(¹⁵N₄-Spm)を使い、通常の生体試料使用量の範囲であれば、内在性Spmによる同位体希釈効果を考慮する必要はなく、活性測定が可能であることが明らかになった。さらに、この方法では、SMO活性を測定する際に内在性Spm濃度も同時に測定することができるので、内在性Spmを考慮に入れた解析も可能である。この点は本研究で開発したSMO活性測定法の強みの一つであると考えられる。

3. SSAT

一般にSSAT活性は、APAOを阻害した条件下で、放射性同位体標識したアセチルCoAからSpdへの放射性アセチル基の転移量を定量することによって測定される^(9,76)。これについても、生体試料抽出液を酵素標品として用いた場合には、上述の酸化酵素の場合と同様に、目的以外のタンパク質のアセチル基転移活性が観察された。SSATは、Spdをアセチル化して、N¹AcSpdを生成するが、N⁸側のアミノ基をアセチル化し、N⁸AcSpd、DiAcSpdを生成する事はできない。リコンビナントSSATでは文献通りの性質であったが、生体試料の抽出液を用いた場合には、N¹AcSpdを基質として加えた際にも、アセチル化転移の反応が検出され、N⁸側をアセチル化する活性が見かけ上あるような結果となってしまった。また、生体内にはこの他にもアセチルCoAを補酵素として利用するアセチル化酵素が多数あるため、組織抽出液中のSSATを正しく評価するために、特定の基質から生成するアセチル体を精密に測定できる方法の開発が必要であると考えられた。他の

SSAT活性測定法としては、蛍光性基質 N^1 -ダンシルノルスペルミンを使ったHPLC法⁽⁷⁷⁾やNMRを使った測定法⁽⁷⁸⁾も報告されている。本研究においては、SSATの活性測定のために $^{15}N_3$ -Spdを基質として用い、その生成物($^{15}N_3$ -AcSpd)を内部標準物質($^{13}C_3,^{15}N_3$ -AcSpd)と共に測定する方法を開発した。基質としてSpdを選択した理由は、Spmを基質とすると N^1 AcSpm、DiAcSpmの2種類の生成物ができてしまうために結果の解析が困難になるためである。Spmを用いると検出されるピークのシグナル強度が低い(図12参照)ことも基質として用いる上では不利な性質である。

SSAT活性測定の条件を検討するために、SSATを発現させた大腸菌抽出液を用いて、反応時間に伴う $^{15}N_3$ -AcSpdの生成量の変化を測定し、その結果を図15 Cに示した。測定に用いた条件下で、反応は少なくとも30分間にわたって直線的に進行した。アセチルCoAを添加しない場合は、SSAT発現大腸菌抽出液を添加しても $^{15}N_3$ - N^1 AcSpdはまったく生成されなかった。ミカエリス・メンテン式による解析から、大腸菌で発現させたSSATの K_m 値は22 μM と算出された。この値は以前に報告された22 μM ⁽⁶⁶⁾と一致していた。

このSSAT測定法を組織の粗抽出液に適用した場合の測定精度を検討するため、マウス肝臓ホモジェネート上清にSSAT発現大腸菌抽出液を添加して測定を行い、その結果を表3にまとめた。SSAT活性測定のRSD値はSSAT発現大腸菌抽出液、マウス肝臓ホモジェネートのいずれについても1%以下の極めて良好な値を示した。また、SSAT発現大腸菌抽出液中の活性の回収率もほぼ100%であり、この方法が非常に高精度で、組織抽出液中の成分の影響も受けない優れた測定法であることが示された。この測定結果から、マウス肝臓ホモジェネート中のSSAT活性値は28.7 pmol/mg/minと算出された。マウス肝臓ホモジェネートを用いた測定においても、アセチルCoAを反応溶液中に添加しない場合には $^{15}N_3$ -Spdのアセチル化はまったく認められなかった。

細胞内にはアセチル化されていない遊離のポリアミンが相当量含まれるため、この方法によるSSAT活性測定においては、SpdとSpmの影響を考慮する必要がある。また、反応生成物である N^1 AcSpdはAPAOの良好な基質であるため、APAOの影響についても考慮する必要がある。しかし、マウス肝臓ホモジェネート上清を含んだ反応溶液(5 μl)中のSpdとSpmの濃度はそれぞれ2.7 μM と2.8 μM であった。これは、使用した $^{15}N_3$ -Spd濃度1 mMよりはるかに低いため、粗酵素試料中の内在性ポリアミンの影響は無視できると判断した。一方、通常APAOの阻害の目的で使用されるMDL72527(MW 192.3)は、AcSpdの内部標準 ($^{13}C_3,^{15}N_3$ -AcSpd、MW 193.3、HFB化後はm/z 586に検出)に非常に近い、m/z 585にメインピークが検出され、定量を妨害することから現在の測定系には利用できないことが明らかになった。この問題を回避するために、MDL72527に代わる新規阻害剤の開発を試みた。それについては第4章で述べる。しかし、阻害剤を添加しない条件下においても、SSAT活性測定はSSATの至適pH 7.5で行われ、このpHでは組織ホモジェネート中の弱いAPAO活性は、その至適pH 9.0付近と比較してさらに大きく低下するために妨害は減弱すると考えられる。SSAT測定に対するAPAOの妨害の可能性をさらに減少させるために、天然の N^1 AcSpdを添加し、同位体希釈効果により $^{15}N_3$ - N^1 AcSpdの分解の影響をさらに減らすことも可能である。

検討してきたように、本研究で開発したAPAO、SMOおよびSSATの活性測定法は、当該酵素の活性測定と同時(または別途)に測定できるSpdやSpmの内在量や、APAOの活性値を基に適切な

補正を加えることにより、組織抽出液やその他の生体試料中のAPAO、SMOおよびSSAT酵素活性測定として適応できることが明らかになった。

第4章

スペルミンオキシダーゼおよびN¹-アセチルポリアミン オキシダーゼの活性部位に結合する不可逆阻害剤の開発

第1節 序文

哺乳類の酵素、SMOとAPAOはポリアミン代謝に関わる酵素であり、がんをはじめとするいくつかの疾患に関係があると報告されている⁽⁶⁵⁾。SMOはSpmを酸化し、Spd、過酸化水素および3-アミノプロパナールを生成する誘導酵素である(図16 A)。一方、APAOはN¹-アセチルポリアミンを基質とし、アセチルアミドプロピル基が離脱したポリアミンと3-アセチルアミドプロパナールおよび過酸化水素を生成する酸化的分解反応を触媒する酵素であり、細胞内に構成的に存在する酵素と考えられている。

第3章で述べたように、細胞内の酵素の活性について研究する際に、特異的な阻害剤は研究ツールとして有用である。APAOの強力な不可逆阻害剤であるMDL72527 (*N,N*-ジ-2,3-ブタジエニル-1,4-ブタンジアミン)は、1985年にBeyらによって報告されたそのような阻害剤の一つであり⁽⁷⁹⁾、効果的にAPAOを阻害するため現在まで広く利用されている。SMOは比較的近年の、2001年に初めて発見された酵素である。発見以来^(14,80)いくつかの競合阻害剤が開発されてきたが⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾、上記のMDL 72527にSMOを不可逆的に抑制する作用があることが見出され、現在はMDL72527が一般的なSMO抑制剤として使用されている。しかし、我々は第3章に述べた質量分析によるポリアミン代謝酵素の活性測定法⁽⁸⁵⁾を開発する過程で、MDL72527によるSMO活性阻害が十分でない事を見出した。また、これも前章で述べたとおり、SSAT活性の測定の際にAPAO阻害剤の添加が必要であるが、MDL72527は反応産物の定量を妨害するためこの目的には使用できないことが明らかになった。このような状況をふまえて、MDL72527より効果的にSMOを抑制する新規の阻害剤を開発することを目的として研究を行った。新規物質がAPAOに対しても阻害効果を示せば、その物質をAPAO抑制の目的でSSAT活性測定系に添加することも可能である。

本章では、SMOの不可逆的阻害剤を開発する目的として、モノアミンオキシダーゼの不可逆阻害剤⁽⁸⁶⁾やAPAOの不可逆阻害剤⁽⁷⁹⁾がもつ不飽和の阻害活性置換基を、N⁸位の窒素に導入したいくつかのスペルミジン誘導體を合成しようと試みた。それらの化合物は、以下の考察に基づいて設計されたものである。1) SMOは、炭素数3または4のメチレン鎖単位から構成された様々な直鎖のペンタミンをよい基質として、スペルミジンを生成する⁽⁸⁷⁾。2) MDL72527はAPAO阻害濃度よりも高濃度で用いればSMOに不可逆的な阻害効果を示したので、MDL 72527の阻害活性基である2,3-ブタジエニル基はSMOとも反応することが予想される。

このような特徴をもつ化合物として、本研究においては、*N*-(3-アミノプロピル)-*N*'-2-プロピニ

ル-1,4-ブタンジアミン(N^8 -ブタジエニルSpd)、 N -(3-アミノプロピル)- N^2 -プロピニル-1,4-ブタンジアミン(N^8 -プロピニルSpd)、 N -(3-アミノプロピル)- N^2 -プロピニル-1,4-ブタンジアミン(N^8 -プロピニルSpd)、 N -[3-(2,3-ブタジエニルアミノ)プロピル]-1,4-ブタンジアミン(N^1 -ブタジエニルSpd)、 N -[3-(2-プロピニルアミノ)プロピル]-1,4-ブタンジアミン(N^1 -プロピニルSpd)および N -[3-(2-プロピニルアミノ)プロピル]-1,4-ブタンジアミン(N^1 -プロピニルSpd)の6種類のスペルミジン誘導体を合成し、その性質について検討した(図16 B)。合成した誘導体の内、 N -(3-アミノプロピル)- N^2 ,3-ブタジエニル-1,4-ブタンジアミン(N^8 -ブタジエニルSpd)は、Beyによる特許明細書(88)に記載されているが、これまで、実際に化合物を合成した報告はない。

第2節 実験材料と方法

第1項 実験材料と合成法

1. 合成スキーム1

4-[Ben[1-(フタルイミド)プロピル]アミノ]酪酸エチル 2: 4-アミノ酪酸エチル塩酸塩(0.67 g、4 mmol)をトリエチルアミン(4 ml)、ベンズアルデヒド(0.45 ml、4.4 mmol)、硫酸マグネシウム(0.7 g)と共にメタノール35 mlに溶解し、氷上で攪拌させながら、水素化ホウ素ナトリウム(0.45 g)少量ずつ添加した。メタノールを蒸発除去した後、その残渣物をジエチルエーテルと水で抽出した。これにより得られた粗 N -Ben-4-アミノ酪酸エチルをアセトニトリル(18 ml)中で、 N -3-(ブロモプロピル)フタルイミド(1.2 g、4.5 mmol)とフッ化カリウムセライトと共に20時間、還流した。得られた粗化合物**2**をベンゼン:アセトンを用いたシリカゲルカラム(15 g)によるフラッシュクロマトによって精製し、化合物**2** (1.43 g、3.5 mmol)を得た。

4-[(Boc)[3-[(Boc)アミノ]プロピル]アミノ]酪酸エチル 3: 化合物**2** (1.17 g、2.87 mmol)を、10%パラジウム炭素と共に酢酸(30 ml)に溶解し、60°Cで4時間、水素化反応を行い、Ben基脱保護を行った。その後、通常法で後処理し濾別したろ液を4 Mアンモニア水とクロロホルムで抽出した。回収したクロロホルム層を減圧蒸発し、その残渣物、トリエチルアミン(0.3 ml)および二炭酸ジ-*tert*-ブチル((Boc)₂O) (0.23 ml、2.9 mmol)をアセトニトリル(16 ml)に溶解し、室温で12時間攪拌してBoc基保護を行った。反応後、溶媒を減圧下で蒸発除去し、残渣物をジエチルエーテルに溶解し、1 M重硫酸カリウム水溶液、1 M炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水を順に用いて洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過し、回収したろ液を蒸発させた。この結果得られた化合物(1.05 g、2.52 mmol)をメタノール(19 ml)に溶解し、ヒドラジーン-水和物(0.75 ml)と共に3時間還流してPht基脱保護反応を行った。この反応液を減圧下で蒸発させた後、4 Mアンモニア水とクロロホルムで抽出した。エチル N -Boc- N -(3-アミノプロピル)-4-アミノ酪酸エステル(0.6 g、2 mmol)に対して同様の方法でBoc基誘導体化を行い、化合物**3** (0.7 g、1.8 mmol)を得た。

N,N^2 -ビス(Boc)- N -[4-[(メチルスルフォニル)オキシ]ブチル]-1,3-プロパンジアミン 4: 化合物**3** (0.7 g)を脱水ジエチルエーテル(6 ml)に溶解し、同様に脱水ジエチルエーテル(8 ml)に懸濁させた

水素化リチウムアルミニウム(0.11 g)に少量ずつ滴下し、攪拌しながら3時間反応させた。反応に伴い水素化リチウムアルミニウムは大きな塊となったが、そのままの状態に攪拌した。反応後に過量の水素化リチウムアルミニウムを通常法(水素化リチウムアルミニウム100 mg使用の場合：水 0.1 ml、2 M水酸化リチウム0.1 mlおよび水0.3 mlをこの順番に滴下、しばらく攪拌後ろ過)で後処理し、エタノールを加え沈殿を濾別した後に溶媒を除去し、フラッシュクロマトグラフィー(4 g、ベンゼン：アセトン溶媒)により*N*²-ビス-*Boc*-*N*¹-(4-ヒドロキシブチル-1,3-プロパンジアミン)(0.44 g、1.3 mmol)を得た。これを脱水ピリジン(0.4 ml)およびジクロロメタン(1.5 ml)に溶解し、水冷下でメタンスルホニルクロリド(0.12 ml、1.6 mmol)を加え2~3時間反応させた。完全に反応させた後、反応溶液を1 M重炭酸ナトリウムとクロロホルムで抽出した。有機層から得られる残渣物を、シリカゲルカラム(4 g)によるフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル溶媒=3:1)により精製し、化合物4 (0.50 g、1.2 mmol)を得た。

***N*¹-(*Boc*)-*N*²-[3-[(*Boc*)アミノ]プロピル]-*N*²-2-プロパニル-1,4-ブタンジアミン 7**：文献⁽⁸⁹⁾に従い、ジメチルホルムアミド(6 ml)中に、化合物4 (1.2 mmol)、2-プロピニルアミン (0.39 mmol、6 mmol)、炭酸セシウム(100 mg)を溶解し、4 Åモレキュラーシーブス (150 mg)を添加して室温で24時間反応させた。この反応液を純水24 mlで希釈し、酢酸エチルで2~3回抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を蒸発除去させた後、残渣物をフラッシュカラムクロマトグラフィー(4 g、クロロホルム：メタノール：酢酸溶媒=10:1:0.1)により精製し、化合物7 (0.14 g)を得た。

***N*¹-(3-アミノプロピル)-*N*²-2,3-ブタジエニル-1,4-ブタンジアミン (*N*⁸-ブタジエニル Spd) 10**：文献⁽⁹⁰⁾に従い、*Boc*基保護した化合物7 (0.11 g、0.23 mmol)を、ジオキサン (0.7 ml)の溶媒中に、ジイソプロピルアミン (0.045 ml)、37%ホルムアルデヒド(0.035 ml)および臭化銅(I) (14 mg)とともに溶解し、90分間還流した後1 M 酢酸 (0.7 ml)で反応を停止した。ジエチルエーテルで抽出後、有機層から得られた残渣物をフラッシュクロマトグラフィー(2 g、ベンゼン：アセトン=30:1)により精製した。化合物9 (0.08 g、0.16 mmol)は0.5 M塩酸(アルコール性)を2 ml使って、50°Cで12時間*Boc*基脱保護反応を行い、化合物10の塩酸塩をエタノールから再結晶した(0.04 g、0.13 mmol)。

この他の化合物6および8は同様の方法で合成を行った。化合物6、8および10の¹H NMRと元素分析のデータは、以下に続くスキーム2の項にまとめた。

2. 合成スキーム2

手順A (アミンのアルキル化)：アセトニトリル (5 ml)に溶解したアミン(1~2.5 mmol)と*N*-3-(ブロモプロピル)フタルイミド、または*N*-4-(ブロモブチル)フタルイミド (1 mmol)を、フッ化カリウムセライト⁽⁹¹⁾ (0.3 g)と共に3~16時間攪拌させながら還流した。フッ化カリウムセライトは、使用前に五酸化二リンを用いて完全に乾燥させた。反応後、濾別したろ液を蒸発させ、残渣物をシリカゲルカラムによって精製した。**手順B (*Boc*基保護)**：アミン(1 mmol)、トリエチルアミン(0.3 ml)および二炭酸ジ-*tert*-ブチル(0.23 ml、1.06 mmol)をアセトニトリル(6 ml)に溶解し、室温で12時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発除去し、残渣物をジエチルエーテルに溶解した後に、1 M重硫酸カリウム水溶液、1 M炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水を順に用いて洗浄した。有

機層に硫酸マグネシウムを添加して乾燥させた後、硫酸マグネシウムを濾別してろ液を蒸発させた。得られた残渣物を次の反応に使用した。**手順C (ヒドラジン分解)**: メタノール(7 ml)に溶解した化合物(1 mmol)とヒドラジン-水和物(0.3 ml)を3時間還流した。溶媒を減圧下で蒸発させた後、残渣物を4 Mアンモニア水とクロロホルムで抽出した。有機層をセルロースろ紙でろ過し、再び蒸発させた。この結果得た残渣物を次の反応に使用した。**手順D (Boc基脱保護)**: 3つあるアミノ基をすべてBoc基保護したスペルミジン誘導體(1 mmol)を、エタノール(12 ml)とアルコール性0.5 M塩酸(12 ml)に溶解し、50°Cで12時間攪拌した。スペルミジン誘導體の塩酸塩は白い結晶として沈殿した。さらに、この結晶はエタノールを使用して再結晶を行った。

スキーム2中に示した6種類の化合物**6**、**8**、**10**、**20**、**22**および**24**の中から、代表として化合物**10**と**24**を選び、実験条件の詳細を含む合成法を以下にまとめた。化合物**11**を原料としたプロペニルSpd誘導體の中間体(化合物**13**、**15**、**17**および**19**)も同様の手順によって合成した。中間体化合物については、薄層クロマトによる分析で単一なバンドであることを確認しながら合成を進め、それらの化合物の見かけの収率は重量による計算によって求めた。すべての溶媒や化合物は特に明記しない限り購入した製品を使用した。

2-[4-(2-プロピニルアミノ)ブチル]-1*H*-イソインドール-1,3(2*H*)-ジオン (14a): 手順Aに従い、2-プロピニルアミン**12** (0.65 ml, 10 mmol)を*N*-(4-ブロモブチル)フタルイミド(1.13 g, 4 mmol)と3時間反応させてアルキル化を行った。シリカゲルカラム (8 g)を用いて、ベンゼン:アセトン(10:1)溶媒で精製し、化合物**14a** (0.75 g, 74%)を得た。

2-[3-(2-プロピニルアミノ)プロピル]-1*H*-イソインドール-1,3(2*H*)-ジオン(14b): 手順Aに従い、2-プロピニルアミン**12**(0.65 ml, 10 mmol)を*N*-(3-プロモプロピル)フタルイミド(1.07 g, 4 mmol)と3時間反応させてアルキル化を行った。シリカゲルカラム(8 g)を用いて、ベンゼン:アセトン(10:1)溶媒で精製し、化合物**14b** (0.75g, 78%)を得た。

2-[4-[(Boc)[3-[(Boc)(2-プロピニル)アミノ]プロピル]アミノ]ブチル]-1*H*-イソインドール-1,3(2*H*)-ジオン (18a): 手順Bに従い、化合物**14a** (0.75 g, 3.1 mmol)のBoc基保護を行った。Boc基保護**14a**(1.0 g, 2.86 mmol)を手順Cに従って脱フタロイル化し、化合物**16a** (0.6 g, 2.65 mmol)を得た。手順Aに従い、*N*-(4-プロモプロピル)フタルイミド(0.75 g, 2.8 mmol)を用いて3時間アルキル化を行った。シリカゲルカラム(9 g)を用いて、クロロホルム:メタノール:酢酸(20:1:0.1)溶媒で精製した。精製された生成物(0.66 g, 1.6 mmol)を手順Bに従ってBoc基保護し、化合物**18a**を得た(0.76 g、**14a**から**18a**までの収率: 52%)。

2-[4-[(Boc)[3-[(Boc)(2-プロピニル)アミノ]プロピル]アミノ]ブチル]-1*H*-イソインドール-1,3(2*H*)-ジオン (18b): 化合物**14b** (0.75 g, 3.1 mmol)を手順Bに従ってBoc基保護し、得られた化合物**14b** (1.0 g, 3.0 mmol)をさらに手順Cに従って脱フタロイル化して化合物**16b** (0.59 g, 2.8 mmol)を得た。手順Aに従い、化合物**16b**を*N*-(4-プロモブチル)フタルイミド(0.85 g, 3.0 mmol)と反応させてアルキル化した後、シリカゲルカラム(9 g)を用いて、クロロホルム:メタノール:酢酸 (20:1:0.1)溶媒で精製し、化合物**18a**を得た。精製された生成物(0.76 g, 1.6 mmol)を手順Bに従ってBoc基保護し、化合物**18b**を得た(0.68 g、**14b**から**18b**までの収率: 43%)。

***N*2,3-ブタジエニル-*N,N'*-ビス(Boc)-*N'*[3-[(Boc)アミノ]プロピル]-1,4-ブタンジアミン (23a)**: 手

順Cに従って脱フタロイル化を行い、化合物**18a** (0.76 g, 1.5 mmol)から化合物**21a**(0.49 g, 1.3 mmol)を得た。そして、手順Bに従い、Boc基保護された化合物**21a** (0.62 g, 1.27 mmol)を得た。さらに、Casaraらによって報告された方法⁽⁹⁰⁾に従い、ジオキサン(4 ml)溶媒中で、37%ホルムアルデヒド(0.2 ml)、ジイソプロピルアミン(0.25 ml)および臭化銅(I) (0.08 g)とともに90分間還流し、1 M酢酸(4 ml)で反応を停止した。ジエチルエーテルにより抽出した残渣物を、シリカゲルカラム(7 g)を用いてベンゼン：アセトン(40：1)溶媒で精製し、化合物**23a** (0.47 g, **18a**から**23a**までの収率：63%)を得た。

N[3-[2,3-ブタジエニル(Boc)アミノ]プロピル]-**N,N'**ビス(Boc)-1,4-ブタンジアミン (**23b**) : 化合物**18b** (0.68 g, 1.3 mmol)を手順Cに従って脱フタロイル化し、化合物**21b** (0.47 g, 1.24 mmol)を得た。この生成物から、手順 Bに従い、Boc基保護された化合物**21b** (0.58 g, 1.2 mmol)を得た。このサンプルの一部(0.4 g, 0.84 mmol)を、ジオキサン(4 ml)溶媒中で37%ホルムアルデヒド(0.2 ml)、ジイソプロピルアミン(0.25 ml)および臭化銅(I) (0.08 g)とともに90分間還流後、1 M 酢酸(4 ml)で反応を停止した。ジエチルエーテルにより抽出した残渣物を、シリカゲルカラム(7 g)を用いて、ベンゼン：アセトン(40：1)溶媒で精製し、化合物**23b**を得た(0.29 g, **18b**から**23b**までの収率：65%)。

N(3-アミノプロピル)-**N'**2,3-ブタジエニル-1,4-ブタンジアミン (**N**⁸-ブタジエニル Spd) (**10**) : 手順 Dに従って、化合物**23a** (0.47 g, 0.94 mmol)のBoc基脱保護反応を行い、化合物**10**の塩酸塩(0.25 g, 87%)を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O)の結果は、 δ 5.14 (quin, $J=6.7$ Hz, 1H)、4.86 (dt, $J=6.7, 2.7$ Hz, 2H)、3.46 (dt, $J=6.7, 2.7$ Hz, 2H)、2.88 - 3.00 (m, 8H)、1.86 - 1.95 (m, 2H)、1.54 - 1.64 (m, 4H)であった。元素分析の結果、C₁₁H₂₆N₃Cl₃の計算値は、H, 8.54, C, 43.08, N, 13.70であり、実測値はH, 8.40, C, 42.93, N, 13.71であった。C₁₁H₂₃N₃の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が198.1970 [M+H]⁺で、測定値は198.1967だった。

N[3-(2,3-ブタジエニルアミノ)プロピル]-1,4-ブタンジアミン (**N**¹-ブタジエニル Spd) (**24**) : 手順Dに従って化合物**23b** (0.29 g, 0.59 mmol)のBoc基脱保護反応を行い、化合物**24**の塩酸塩 (0.15 g, 85%)を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O)の結果は、 δ 5.16 (quin, $J=6.7$ Hz, 1 H)、4.89 (dt, $J=6.7, 2.6$ Hz, 2H)、3.50 (dt, $J=6.7, 2.6$ Hz, 2H)、2.85 - 3.05 (m, 8H)、1.91 - 2.01 (m, 2H)、1.54 - 1.68 (m, 4H)であった。元素分析の結果、C₁₁H₂₆N₃Cl₃の計算値は、H, 8.54, C, 43.08, N, 13.70であり、実測値はH, 8.54, C, 43.12, N, 13.73であった。C₁₁H₂₃N₃の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が198.1970 [M+H]⁺で、測定値は198.1965だった。

N(3-アミノプロピル)-**N'**2-プロペニル-1,4-ブタンジアミン (**N**⁸-プロペニル Spd) (**6**): 手順Dに従って化合物**19a**のBoc基脱保護処理を行い、化合物**6**の塩酸塩を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O)の結果は、 δ 5.72 (ddt, $J=17.2, 10.3, 6.8$ Hz, 1H)、5.32 (dq, $J=17.2, 1.2$ Hz, 1H)、5.30 (dq, $J=10.3, 1.2$ Hz, 1H)、3.48 (br d, $J=6.8$ Hz, 2H)、2.86 - 3.00 (m, 8H)、1.86 - 1.94 (m, 2H)、1.54 - 1.64 (m, 4H) であった。元素分析の結果、C₁₀H₂₆N₃Cl₃の計算値は、H, 8.89, C, 40.76, N, 14.26であり、実測値はH, 8.65, C, 40.62, N, 14.25であった。C₁₀H₂₃N₃の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が186.1970 [M+H]⁺で、測定値は186.1964であった。

N[3-(2-プロペニルアミノ)プロピル]-1,4-ブタンジアミン (**N**¹-プロペニル Spd) (**20**) : 手順Dに従

って化合物**19b**の脱Boc基保護処理を行い、化合物**20**の塩酸塩を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O)の結果は、 δ 5.75 (ddt, $J=17.1, 10.3, 6.8$ Hz, 1H)、5.36 (dq, $J=17.1, 1.2$ Hz, 1H)、5.34 (dq, $J=10.3, 1.2$ Hz, 1H)、3.53 (br d, $J=6.8$ Hz, 2H)、2.85 - 3.02 (m, 8H)、1.90 - 1.99 (m, 2H)、1.54 - 1.67 (m, 4H)であった。元素分析の結果、C₁₀H₂₆N₃Cl₃の計算値は、H, 8.89、C, 40.76、N, 14.26であり、実測値はH, 8.68で、C, 40.91、N, 14.16であった。C₁₀H₂₃N₃の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が186.1970 [M+H]⁺、測定値は186.1964であった。

N-(3-アミノプロピル)-**N**²-プロペニル-1,4-ブタンジアミン (**N**²-プロピニル Spd) (**8**): 手順 Dに従って化合物**21a**のBoc基脱保護処理を行い、化合物**8**の塩酸塩を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O)の結果は、 δ 3.75 (m, 2H)、2.88 - 3.06 (m, 8H)、2.80 (t, $J=2.6$ Hz, 1H)、1.86 - 1.95 (m, 2H)、1.57 - 1.65 (m, 4H)であった。元素分析の結果、C₁₀H₂₄N₃Cl₃の計算値はH, 8.26、C, 41.04、N, 14.36であり、実測値はH, 8.10、C, 40.81、N, 14.28であった。C₁₀H₂₁N₃の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が184.1814 [M+H]⁺で、測定値は184.1809であった。

N[3-(2-プロピニル)プロピル]-1,4-ブタンジアミン (**N**¹-プロピニル Spd) (**22**): 手順 Dに従って化合物**21b**のBoc基脱保護処理を行い、化合物**22**の塩酸塩を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O)の結果は、 δ 3.80 (m, 2H)、2.85 - 3.14 (m, 8H)、2.85 (m, 1H)、1.92 - 2.02 (m, 2H)、1.54 - 1.68 (m, 4H)であった。元素分析の結果、C₁₀H₂₄N₃Cl₃の計算値は、H, 8.26、C, 41.04、N, 14.36であり、実測値はH, 8.25、C, 41.00、N, 14.29であった。C₁₀H₂₁N₃の精密質量(ESI-TOF)は、計算値が184.1814 [M+H]⁺で、測定値は184.1808であった。

第2項 酵素活性の測定

SMOおよびAPAOは、ヒト(*h*)SMO cDNAと*h*APAO cDNAを、第3章、第2節、第6項に記した方法でEK293細胞中で発現させたものを用いた。以下に要点を示す。10% FBS含有RPMI 1640培地中で細胞を培養した。HEK293細胞を5×10⁶ cell/10 cm培養皿の密度で播種し、37°C、5% CO₂で24時間培養した後、リポフェクタミン® 2000 (Life Technologies社)を用いて*h*SMO cDNAまたは*h*APAO cDNAを導入した。24時間後、細胞を回収し、1×10⁷ cells/10 cm培養皿に対しCellLytic M (Sigma-Aldrich社) 1 mlを添加し5分間、攪拌させながら細胞を溶解した後、4°C、20,000 ×gで15分間遠心分離し、上清を回収した。

それぞれの発現酵素にはDYKDDDDKタグとc-Mycタグが付加されているため、酵素はこれを利用して以下の方法で容易に精製することができる。細胞抽出液の上清を、抗DYKDDDDKタグ抗体ビーズ(0.3 g、和光純薬社)を詰めたカラムに添加した。カラム容量の10倍のPBS(-) (pH 7.4)で洗浄後、0.1 Mグリシン/水酸化ナトリウム (pH 10.0) 1.5mlで溶出し回収した。ゲルろ過カラムPD-10(GE Healthcare Life Science社)を用いて脱塩を行い、その試料をさらに抗c-Mycタグ抗体ビーズ(0.3 g、和光純薬社)を詰めたカラムに添加した。カラム容量の10倍のPBS(-) (pH 7.4)で洗浄後、0.1 M グリシン/水酸化ナトリウム(pH 10.0) 1.5mlで溶出して精製酵素を回収した。精製酵素は0.09% アジ化ナトリウムを含む50%グリセロール中に懸濁し、-20°Cの冷凍庫で凍結保存した。

酵素活性に対する阻害剤の効果に関する実験は、第3章、第2節、第6項の手順を以下のよう

に若干修正して用いた。測定試料の前処理は第3章、第2節、第3項の手順に従った。0.5 mg/ml BSAを含む40 mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)中に、適量の精製SMOまたはAPAOを加え、SMO 活性測定の場合には0.2 mM $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spm}$ を、APAO 活性測定の場合には $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-N}^1\text{AcSpm}$ をそれぞれ添加することにより反応を開始した。37°Cでインキュベーションを行い、30分後に $^{15}\text{N}_3, \text{D}_4\text{-Spd}$ (内部標準物質) 2 nmol (40 mM, 50 μml)を添加し、直ちに5%トリクロロ酢酸溶液(0.3 ml)を添加して反応を停止し、除タンパクを行った。反応後の溶液を、20,000 $\times g$ で15分間遠心分離して上清を回収した。この上清をCM-セルロースカラム (0.3 ml)に添加し、10 mMおよび50 mM pyr/AcOHによって順に洗浄した後、1 M pyr/AcOHでポリアミン画分を溶出した⁽⁸⁵⁾。回収したポリアミン画分は、一度乾固させた後に0.1 M 塩酸(アルコール性)で塩酸塩に置換し、再び乾固させた。残渣物を、アセトニトリルの溶媒中で無水ヘプタフルオロ酪酸と100°C、30分間反応させて誘導体化した後、窒素気流下で蒸発乾固させた。乾固残渣物を移動相(0.05% ギ酸、0.2% 酢酸アンモニウム、50% アセトニトリル) 10 mlに溶解し、測定に用いた。

第3項 質量分析による測定

測定には、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MSシステム(アジレントテクノロジーズ社)にDual-ESI ion sourceを装着した質量分析装置を使用した。移動相には0.05%ギ酸-0.2% 酢酸アンモニウム-50%アセトニトリル溶液を使用し、流速0.1 ml/min、インジェクション量1 μl で行った。その他の質量分析装置のパラメーターを以下に示す：positiveイオンモード、extended dynamic range mode (2 GHz)；Vcap, 3500 V；nebulizer pressure, 35 psi；drying gas 8 L/min；gas temp, 300°C；fragmentor, 150 V；skimmer, 65；VOct 1 RF Vpp, 750 V；Accurate mass spectra；100 ~ 1,100 m/z。HFB化されたSpd、 $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spd}$ 、 $^{13}\text{C}_3, \text{D}_4\text{-Spd}$ は、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ としてm/z 751、755、758に検出された。Spdまたは $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spd}$ の定量は、 $^{13}\text{C}_3, \text{D}_4\text{-Spd}$ (内部標準物質)のピーク面積を基準とし、検出されたピークの面積との比に基づいて算出した。

第3節 結果と考察

第1項 N^8 位に置換基をもつスペルミジン誘導体の合成

3種類のスペルミジン誘導体、 N^8 -(3-アミノプロピル)- N^2 -2-プロペニル-1,4-ブタンジアミン(N^8 -プロペニルSpd、化合物**6**)、 N^8 -(3-アミノプロピル)- N^2 -2-プロピニル-1,4-ブタンジアミン(N^8 -プロピニルSpd、化合物**8**)、および N^8 -(3-アミノプロピル)- N^2 -2-プロピニル-1,4-ブタンジアミン (N^8 -ブタジエニルSpd、化合物**10**)、を、スキーム1に示した経路で合成した。4-アミノ酪酸エチル**1**のアミノ基をモノベンジル化し、さらに N -(3-ブロモプロピル)フタルイミドによってアルキル化し、以前に報告されたポリアミン合成法⁽⁶⁴⁾によって化合物**2**を合成した。化合物**2**のBen基を脱保護反応させた後Boc基で再保護し、次いでPht基の脱保護を行って化合物**3**を得た。Beyの特許明細書には、この段階で化合物**3**のエステル結合をカルボキシル基に置換し、 N, N^2 -ジシクロヘキシルカルボジイミドを縮合剤としてこのカルボキシル基と2-プロペニルアミン、または2-プロピニルアミ

ンをアミド結合させる方法が記載されている^(79,88)。そして、この結果生じたアミド結合に水素化リチウムアルミニウムを用いて還元することにより、化合物**5**または**7**が得られる。しかし、実際にこの方法を試みたところ、カルボン酸の活性化反応の際に複雑な分子内リアレンジメントが生じるため、この合成経路は採用できないことが明らかになった。この問題はカルボニルジイミダゾール試薬の使用によって解決することができた⁽⁹²⁾が、それでもなお、分子内リアレンジメントの問題とは別に、最終生成物中にわずかながらSpdのコンタミネーションが生じるという問題点が見出され、このSpdを除去することは非常に困難であった。Spdのコンタミネーションは、アミド結合の水素化リチウムアルミニウム還元を行う限り避ける事の出来ない問題であると考えられた。酵素の阻害実験では、わずかなSpdのコンタミネーションであっても測定結果に大きく影響して測定を妨害するため、この方法は断念せざるを得ないと判断した。これに代わる方法として我々は、メシル活性化した化合物**4**を用いて2-プロピルアミンと2-プロピニルアミンの第一級アミノ基のモノN-アルキル化を行う方法を試みた。しかし、この方法によるアルキル化反応後の化合物の収量は非常に低く(30%以下)、実用的な合成法ではないと判断された。低収率の原因としては、反応時に化合物**4**の部分的な分解が起こっている可能性が高いと考えられた。

第2項 異なる合成法によるN¹-置換スペルミジンおよびN⁸-置換スペルミジン誘導体の合成

前項の方法では最後のアルキル化のステップで化合物の大きなロスが起きるため、この問題を回避するために異なる方法を考案した。スキーム2に示した新たな合成ルートは、スキーム1よりも合成ステップ数が少なく簡単である。また、この合成ルートは、収率も良く、しかも、同じような手順でN¹-置換基とN⁸-置換基Spdのどちらの合成も可能であるという点でも優れた方法であると考えられる。

アミン化合物、すなわち2-プロピニルアミン(化合物**11**)または2-プロピルアミン(化合物**12**)を出発物質とし、アセトニトリル溶媒中でフッ化カリウムセライトと共にN⁸-置換誘導体を得るためにはN-(4-ブロモブチル)フタルイミドと、一方N¹-置換誘導体を得るためにはN-(3-ブロモプロピル)フタルイミドとそれぞれ還流し、それぞれ化合物**13**または**14**を得た。反応後、シリカゲルによるフラッシュカラムクロマトグラフィーによってこのアルキル化反応の間に生じる第三級アミンの副生成物を除去し、化合物を容易に精製することができた。化合物**11**または**12**を過剰量使用しているため、N-(4-ブロモブチル)フタルイミド、またはN-(4-ブロモプロピル)フタルイミドの使用量を基に化合物**13**または**14**の収率を計算した場合、それぞれ約70%と見積もられた。ヒドラジン分解による脱フタロイル基反応後、Boc基保護して化合物**15**または**16**を得、再びアセトニトリル溶媒中でそれぞれ等量のN-(3-ブロモプロピル)フタルイミドまたはN-(4-ブロモブチル)フタルイミドをフッ化カリウムセライトと共に還流することにより、Spd骨格を持った化合物**17**または**18**を得た。この2度目のアルキル化反応後の溶液中には、第三級アミンの副産物と共いくつかの未知の生成物が薄層クロマトによって観察されたが、続けてBoc基保護反応を行い、その後にフラッシュクロマトグラフィーを行うことにより、副生成物を分離除去して化合物**17**または**18**を精製した。化合物**15**または**16**の重量を基準にした場合、化合物**17**または**18**の収量は約50%であった。

今回の合成経路では、6種類の化合物のいずれの場合にも、それぞれのステップの反応様式に大

きな違いがなく、そのため活性基やSpdへの導入部位に関わりなく、6種類の化合物を同様の収率で合成することができた。N⁸-プロペニルSpd(化合物6)、N¹-プロペニルSpd(化合物20)、N⁸-プロピニルSpd(化合物8)およびN¹-プロペニルSpd(化合物22)は、化合物 17または18のBoc基とフタルイミド基の脱保護反応を行った後、大幅なロスを生じることなしに得ることができた。N⁸-ブタジエニルSpd(化合物10)とN¹-ブタジエニルSpd(化合物24)の塩酸塩は、Casaraらによって報告された方法⁽⁹⁰⁾に従いトリBoc基保護した化合物 21の2-プロピニル基を化合物 23の2,3-ブタジエニル基へ伸長反応させた後、同様の手順で塩酸塩に置換して回収することができた。

第3項 合成された化合物のSMOおよびAPAOに対する阻害効果

種々の化合物の阻害効果を評価するために、SMOとAPAOをそれぞれHEK293細胞で発現させ、発現細胞の抽出液から精製したSMOとAPAOを使用して酵素活性を測定した。活性測定は、質量分析装置を用いて第3章、第2節に示した方法で行った。ただし、測定に使用する基質としては、SMO活性測定においては[5,8-¹³C₂,4,9-¹⁵N₂]-Spm (¹³C₂,¹⁵N₂-Spm)、APAO測定においては[5,8-¹³C₂,4,9-¹⁵N₂]-N¹-AcSpm (¹³C₂,¹⁵N₂-N¹AcSpm)を用いた。精製SMOのKm値は0.12 mM (pH9.0)であった。この値は報告されている文献値0.19 mM(pH8.3)⁽⁹³⁾とほぼ一致した。また、精製APAOのKm値は1.7 μMであった。この値は文献中に報告されているKm値 0.85 μM (pH 8.0)⁽⁷⁾と比較的近い値であった。

精製APAOおよび精製SMOを用いて、合成した化合物、N¹-ブタジエニルSpd、N⁸-ブタジエニルSpd、N¹-プロペニルSpd、N⁸-プロペニルSpd、N¹-プロピニルSpdおよびN⁸-プロピニルSpdの、SMOとAPAOに対する阻害効果の検証を行った。各酵素と1 μM濃度の各化合物とを37°C、15分間プレインキュベーションし、その後、第3章、第2節、第6項に示した活性測定法で酵素の残存活性を測定して阻害率を求めた(図17)。SMO活性はN⁸-ブタジエニルSpdによって強力に阻害され、N¹-ブタジエニルSpdによって中程度に阻害された。MDL72527およびその他の4種類の化合物は1 μMの濃度では、ほとんどSMO活性を阻害しなかった。一方、APAO活性はMDL72527、N¹-ブタジエニルSpdおよびN⁸-ブタジエニルSpdによって強く阻害された。しかし、N¹-プロペニルSpdとN⁸-プロペニルSpdによるAPAO阻害は1 μMの濃度では中程度の阻害であり、また、N¹-プロピニルSpdとN⁸-プロピニルSpdはAPAOをほとんど阻害しなかった。この結果は、SMO活性部位がこれらの化合物をAPAOの活性部位より厳密に認識、識別している事を示唆している。SMO活性部位のこのような特徴は以前の報告と一致している^(80,87,94)。この2つの酵素の活性部位の基質選択性の特徴は、SMO特異的な阻害剤開発についての難しさを示している。APAO活性部位はSMOより基質の認識に関して柔軟であるため、SMOの活性部位に結合する化合物はAPAO活性部位にも結合する事が考えられる。そのため、新たにSMOの強い阻害剤を開発できたとしても、N⁸-ブタジエニルSpdと同様にAPAOにも強く阻害する可能性がある。化合物の阻害効果の検証の結果に基づいて、以下、阻害効果の高かったN¹-ブタジエニルSpdとN⁸-ブタジエニルSpdを選択し、両酵素に対するこれらの化合物の阻害効果についてさらに実験を行った。

N¹-ブタジエニルSpdとN⁸-ブタジエニルSpdは、APAOのmechanism-based不可逆阻害剤^(79,95)と考えられているMDL72527と同一の反応活性基を持っている。そのため、これらの物質による

阻害も不可逆的阻害である可能性が高いと考えた。これを検証するため、図17の実験で行ったブレインキュベーションを省略し、阻害剤と基質を同時に添加して酵素反応を測定し、SMOとAPAOの作用によって生じるSpdの生成量のタイムコースについて検討した(図18)。阻害剤を添加していない場合、SMOの作用によって $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spm}$ から生成した $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spd}$ 、および、APAOの作用によって $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-N}^1\text{AcSpm}$ から生成した $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spd}$ の量は、いずれも時間依存的に直線的に増加した。一方、阻害剤を基質とともに反応溶液中に添加した場合、それぞれの酵素による $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}_2\text{-Spd}$ の生成速度は30分間の時間経過の間に次第に減少した。この結果は酵素の活性が時間依存的に失われて行った事を示している。酵素活性の低下速度は阻害剤の濃度に依存していた。10 μM N^8 -ブタジエニルSpdを用いた場合、SMOおよびAPAOの酵素活性は30分後には完全に失われていた。10 μM N^8 -ブタジエニルSpd共存下で30分間反応させることにより一度活性を失った酵素を含む反応液から、スピンカラムを用いたゲルろ過により阻害剤を取り除き、再度基質を添加して活性測定を行ったが、活性の回復は認められなかった(図19)。この結果から、これらの化合物による阻害効果は不可逆であると結論した。APAO活性の阻害に関しては、 N^1 -ブタジエニルSpdが N^8 -ブタジエニルSpdより若干効果が強かった。一方、SMO活性の阻害に関しては N^8 -ブタジエニルSpdが N^1 -ブタジエニルSpdより強力な阻害効果を示すことが明らかになった。この様な違いがみえた理由については、高尾らによるSMO活性部位の基質特異性の研究⁽⁸⁷⁾によって説明できる。高尾らは種々のペンタミンをSMOの基質として用いた場合、SMOはペンタミン分子内のSpd構造を認識し、Spd構造の N^8 側に炭素鎖が伸長しているペンタミンに対して伸長している炭素側で基質を酸化的に切断することによりSpdを生成することを示している。逆に N^1 側に炭素鎖が伸長しているペンタミンに対しては、SMOの反応性が著しく低下する。 N^8 -ブタジエニルSpdと N^1 -ブタジエニルSpdの阻害効果の大きな違いは、この様なSMOの特異性のためSpd構造の N^1 側、 N^8 側、どちらに修飾基が結合しているかで、活性部位への結合力に差が生じ、阻害効果の差として表れたものと考えている。

我々は N^1 -ブタジエニルSpdおよび N^8 -ブタジエニルSpdが、SMOとAPAOに対してMDL72527と同様mechanism-based阻害剤として作用するか検討を行った。Waleyによって提唱されたmechanism-based阻害の分岐モデル⁽⁹⁶⁾(スキーム3参照)によれば、2,3-ブタジエニル置換基を持ったスペルミジン誘導体による不可逆阻害がmechanism-based阻害であるならば、酵素の完全な失活が起こるまでに、ある一定量の阻害剤が酵素反応の基質(自殺基質)となって分解され、生成物としてSpdが生じるはずである。このような考察に基づいて、我々は、異なる量のAPAOを使用し、 N^1 -ブタジエニルSpdまたは N^8 -ブタジエニルSpdを添加してインキュベーションすることにより生成するSpdの量を定量した。図20に結果を示す。Spd生成量は時間経過とともに急速に減少し、阻害剤による酵素の不活性化の進行を反映していると考えられた。APAOを完全に不活性化するまでに分解される阻害剤量を調べるため、測定結果を外挿して完全失活に至る時点におけるSpd生成量を予測した。使用したAPAOと生成したSpdのモル比から、APAOの1 pmolに対して、 N^1 -ブタジエニルSpdについては約60 pmolのSpdが生成され、 N^8 -ブタジエニルSpdについては約80 pmolのSpdが生成すると推定された。この結果は、2種類の化合物がAPAOの自殺基質であること、すなわち、酵素反応によって阻害剤から生じた生成物が酵素活性の不可逆的阻害を引き起こすよ

うな物質であることを示し、これらの化合物による阻害機構が典型的なmechanism-based阻害であることを示している。これとは対照的に、SMOとN¹-ブタジエニルSpdもしくはN⁸-ブタジエニルSpdとをインキュベーションした場合には、酵素は上述のように不可逆的に阻害されたにもかかわらず、Spdの生成は事実上全くみとめられなかった。これらの化合物はSMOの活性部位に強い親和性をもつために結合するが、酵素の基質としては認識されず、活性基の反応性によって酵素に不可逆的に結合して酵素を失活させるものと考えられる。SMOを、プロペニル置換基およびプロピニル置換基をもつSpd誘導体とインキュベーションした場合にもSpdは生成しなかった。しかし、これらの誘導体は阻害効果も示さなかったことから、SMOによって基質アナログとして認識されなかったと考えられる。

N⁸-ブタジエニルSpdによるSMOの明確な阻害メカニズムは未だに明らかにされていないが、低濃度で有効な阻害剤として作用することは、この物質が酵素の活性部位に良く結合する事を示唆している。類似の構造をもつMDL72527がAPAOを阻害する場合、まず活性部位に強く結合した後、徐々にAPAOの活性部位近傍に共有結合したフラボシアニンのイソアロキサジン環のN⁵位の窒素に結合することで不可逆的に阻害していると提唱されている⁽⁹⁵⁾。今後、酵素が結晶化されてエックス線構造解析の情報が得られるようになれば、N⁸-ブタジエニルSpdによるSMO阻害のメカニズムの解明が進むだろうと考えられる。

SMOとAPAOに対するN¹-ブタジエニルSpd、N⁸-ブタジエニルSpdおよびMDL72527の阻害効果濃度を、基質との競合条件下および基質なしでプレインキュベーションした後に活性測定を行う条件下で比較し、それぞれのIC₅₀を表4に示した。SMOに対しN⁸-ブタジエニルSpdはMDL72527に比べ約50倍強い阻害を示した。MDL72527のAPAO活性阻害は、競合する¹³C₂,¹⁵N₂-N¹AcSpmが共存すると効果が弱くなった。一方、N¹-ブタジエニルSpdとN⁸-ブタジエニルSpdは基質による競合の影響をあまり受けなかったため、結果的に、競合物質の存在下で阻害実験を行った場合にはMDL72527より2~3倍高い効果を得た。基質共存下での阻害効果はN¹-ブタジエニルSpdやN⁸-ブタジエニルSpdの培養細胞実験等への応用の可能性を示す。これまで培養細胞などを使った実験でAPAO活性の阻害を図る場合には、MDL72527を使用するのが常であった。しかし、内在性成分との競合や細胞内での代謝作用等により、細胞内での酵素の阻害効果が弱められる事が指摘されているため、細胞レベルでAPAO活性を阻害するためには高濃度のMDL72527を使用する必要がある。ところが、高濃度のMDL72527はアポトーシスによる細胞死を引き起こすといった別の問題があった⁽⁹⁷⁾。N⁸-ブタジエニルSpdが内在性成分の共存下でMDL72527より高い効果を示したことは、N¹-ブタジエニルSpdやN⁸-ブタジエニルSpdが培養細胞実験においてMDL72527に代わる阻害剤として利用できる可能性を示す。

以上、検討してきた結果から、本研究で新たに合成した化合物であるN⁸-ブタジエニルSpdは、SMOとAPAOの生物学的意義に関する研究を進める上で有用な試薬であると考えられる。N⁸-ブタジエニルSpdはMDL72527よりはるかに低濃度でSMOを完全に抑制することができる。この化合物によってSMOとAPAOをそれぞれ選択的に阻害することは難しいが、N⁸-ブタジエニルSpdが基質と共存する条件下では、低濃度で、APAO活性よりSMO活性を効果的に阻害する事を考慮すると、内在ポリアミンが存在する生体中ではSMO活性を選択的に阻害できる可能性がある。ま

た、N⁸-ブタジエニルSpdがAPAOの自殺基質であることを利用して、¹⁵N₂-標識したN⁸-ブタジエニルSpdから生成する¹⁵N₂-標識Spdを質量分析によって検出し定量することにより、APAOの不活性化を検出および解析できる可能性がある。標識した阻害剤は¹⁵N-標識*N*-(*n*-プロモプロピル)フタルイミド、または¹⁵N-標識*N*-(*n*-プロモブチル)フタルイミドを原料化合物とすることにより、必要に応じて本章で述べた方法によって合成することができる。さらに、本章の序文に記したとおり、MDL72527はAPAO抑制の目的で質量分析法によるSSAT活性測定系に添加する物質としては不適當である。新規に合成されたN⁸-ブタジエニルSpdはSSAT活性測定を妨害せず、しかも、APAOに対しても低濃度で阻害効果を示すことが明らかになった。したがってこの化合物は、SSAT活性測定系に添加するAPAO抑制物質としても適當な化合物であると考えられる。

第5章

総合討論

本研究は、尿中DiAcSpmを高感度で汎用性のある腫瘍マーカーとして開発、実用化し、普及させるための課題の解決を目標として行った。腫瘍マーカーとしての臨床的意義については、これまでも多くの知見が積み重ねられてきており、測定法にも改良が加えられ、検査薬メーカーが参加する形で、大規模検査施設における精密測定のための試薬の開発が進められている。DiAcSpmががん組織で作られ、その生成量をよく反映する形で尿中に排泄される動態についても、理解が深まってきている。この段階で、尿中DiAcSpm検査の実用化と普及に向けて求められている課題にはどのようなものがあるだろうか。

その一つは、腫瘍マーカーとしての尿中DiAcSpmの特性、すなわち早期がん検出能が高いことを生かした簡易迅速測定法の開発であると考えられる。このような観点から、本研究においてはイムノクロマトグラフィー法の開発を行った。これは、各種のがんの早期発見率の向上に向けて、これまでに開発された大規模施設向けの精密検査試薬を補完する役割を果たすことができる検査法である。

第二の課題は、生体内のDiAcSpmの上昇がなぜ高性能の腫瘍マーカーとして機能するのかという問題の解明である。これは、一見腫瘍マーカーの臨床応用とはやや遠い基礎的な問題であるかのように見える。しかし、DiAcSpmの臨床的意義とその臨床応用をめぐる臨床医との会話の中で、臨床サイドから、「DiAcSpmは、各種のがんの診断とその経過観察の指標として、経験的に非常に魅力的な特性をもつことは認めてよい。だが、診断の指標として安心して使うには、それだけではまだ心許ない。なぜそのように魅力的な振る舞いをするのか、そのことがはっきりすると、新しいマーカーとして実際に使ってみようという強い動機付けが得られるのだが」というような発言をしばしば聞く。これは、この基礎的な問題の解明がDiAcSpmの臨床応用の普及のために極めて重要であることを示している。DiAcSpmの細胞内レベルが、がん化する細胞の中で、正常組織と比較して非常に早期から上昇することが明らかになった現在、DiAcSpmがなぜ高性能の腫瘍マーカーとして機能するのかの解明に向けて、がん化する細胞内のポリアミン動態を詳しく研究すること、そのための研究手段を開発し提供することは重要な課題であると考えられる。このような観点から、本研究においては、第二の課題として生体内の各ポリアミン濃度の定量法およびポリアミン代謝酵素の活性測定法の開発を行った。そして、生体内のポリアミンおよびその動態を解析する強力なツールを提供することができた。

本論文では、第一の課題への取り組みを第2章に述べた。第2章では、イムノクロマトグラフィー法によるDiAcSpmの簡易測定法を確立した。DiAcSpmは大腸がんや乳がんなどの早期ステージのがん患者においても、他の腫瘍マーカーより早期に上昇してくる尿中腫瘍マーカーである⁽³¹⁾。近年では、早期に発見されたがんは多くの場合治癒可能であると考えられている。したがっ

てがんを早期に発見することは、がんによる死亡率を減少させるうえで極めて重要であり、DiAcSpmのがん早期発見能はその意味で極めて有用である。個人利用も可能な簡易DiAcSpm測定系としてのイムノクロマトグラフィ測定系の開発は、自覚症状をもたない段階で自主検査によって異常を発見する機会を提供し、専門医療機関への早期受診の動機付けを与えることにより早期がんの発見機会を増やすことに貢献できる可能性がある。また、そのようなスクリーニングマーカーとしての性能を評価する臨床研究を行うためにも、人間ドックや個人の居住地近隣にあるクリニックなどの、健康診断の最前線で利用できる簡易検査の手段を提案できる意義は大きい。本研究においては、個人利用を目的とした簡便な尿中DiAcSpm測定系のプロトタイプを作製する事が出来た。これによって、これまでに使われているELISA法や金コロイド凝集法よりはるかに患者に近い場所で手軽にDiAcSpm測定が行えるようになり、イムノクロマトグラフィーストリップに尿を添加するだけで、わずか15分後には測定結果がわかるようになった。この手軽さは一般利用にあたって大きなメリットになると考えられる。本論文においては、イムノストリップに現れたシグナルラインの強度を定量測定することを目的としているため、インフルエンザや妊娠検査の目視での判定とは異なり、イムノクロマトリーダの様な測定装置を測定に用いている。測定装置を用いることには測定結果を客観的な数字として判断できるという利点がある。また、結果をデータ化できる事で情報管理が容易になり、自身で行う健康管理だけでなく、医療機関への電子データの送付による検診の様な使い方も将来的には可能であるかもしれない。しかし、測定装置を個人使用に導入するためには安価な測定装置の提供も必要であり、今後はそのような方向への開発も求められると考えられる。また、一般利用を考える上では、測定時の尿濃度を補正する方法についても考慮する必要がある。DiAcSpm測定は随時尿を使用しているため、採尿における制約がない一方で、飲食や発汗などによる尿濃度の変動によって大きな影響を受ける。臨床検査の分野では、一般的にクレアチニン濃度との相対量によって尿濃度を補正する方法が利用されているため、クレアチニンを簡便迅速に測定し、DiAcSpm濃度の補正まで自動で行える装置および方法が求められる。測定の簡便性を考慮すると、DiAcSpm測定と同じ操作および同じ測定時間で行えるクレアチニン測定系が望まれるため、この測定系にもイムノクロマトグラフィ法による測定を考えている。そこで、抗体の作製のために用いる免疫抗原のハプテンとして、クレアチニン誘導体の化学合成を行った。これをハプテンとした免疫抗原を用いて、抗クレアチニン抗体の取得を試みた結果、クレアチニンと特異的に反応する抗体を得ることができた⁽⁹⁸⁾。しかし、この抗体の性能は、尿中クレアチニンを測定するにはまだ十分でない。DiAcSpmとの同時測定可能な測定キットについてはさらに検討を進める必要がある。

我々は、これまで駒込病院との共同研究により、DiAcSpmの腫瘍マーカーとしての性能の解析を行ってきた。今後も情報収集と解析を行い、新しいDiAcSpmの特性と応用の可能性を探索していく必要があるが、その中の課題の一つにスクリーニングマーカーとしてのDiAcSpmの性能についての既存スクリーニングテストとの比較が挙げられる。しかし、これについては、現状では難しい問題がある。それは大学病院や地域病院で診療の対象になる患者は、すでに何らかの検査または自覚症状により一次的なスクリーニングを受けた後に受診する機会が多いという問題である。そのような被験者を対象に比較を行っても公正な評価にはならない。意味のある比較データを得

るためには、健康診断などを行っている小規模な医療機関などで既存テストとの比較を行うことが必要ではないかと考える。今回開発した方法は、検査コストが比較的安価であり、初期導入が容易であるためこの様な問題にも対処でき、上記のような形で比較を行うことによりスクリーニングマーカーとしてのDiAcSpmの長所や問題点が明確になる可能性がある。免疫クロマトグラフィーによるDiAcSpm測定キットの製品化までには、本研究の中で検討された諸条件のさらなる修正が必要である。また、今後装置の改善や開発を進めながらより高い精度の測定系の構築を目指し、どの様なシーンでの利用が有益なのか、どの様な測定のパッケージが利用しやすいのかも含めてこの測定法が活用できるよう研究を進めていきたい。

免疫クロマトグラフィーの開発は、プロトタイプ在完成を受けて、今後は検査薬メーカーとの共同開発の段階に入る。そのことをふまえて、本研究の後半では、腫瘍マーカーとしての普及に欠かせない基礎的研究の課題である、DiAcSpmがなぜ優れた腫瘍マーカーとして振る舞うかの解明、すなわち、この物質の生成機構の解明に向けた問題の解決に取り組むこととした。

本研究と並行して行われた駒込病院との共同研究の中で、DiAcSpmががん組織の中で、がん化の早期から顕著に上昇することが明らかになったため、細胞内におけるポリアミン代謝の解明が問題解決の鍵になると考えた。ポリアミン代謝について様々な研究が行われているが、生体試料を対象にした研究報告は少ない。その理由の一つとして、ポリアミン成分を測るにしても酵素活性を測るにしても、正確で簡便な測定法がないことがあげられる。生体試料、特に患者由来の検体は、入手可能な量が限られている。そのために、研究を進めるためには少量の生体試料でも正確な測定が可能な方法を開発する必要がある。このような観点から本研究の第3章および第4章では、上記第二の課題への取り組みとして組織ポリアミン測定方法の検討を行い、質量分析法を利用した測定法を新たに開発した。

第3章ではTOF-MS法によって、ポリアミン代謝の経路に関係する全3種類のポリアミンおよび5種類のアセチルポリアミンの同時測定法を開発することができた。それぞれの成分とそれに対応した内部標準物質とのピーク面積比に基づいて求めた測定値の相対標準偏差から、この測定法は信頼性の高い方法であることが示された。さらに、MS/MS法により N^1AcSpd と N^8AcSpd の異性体を同定、定量する方法を開発した。異性体の定量のためには、2種類の異性体の内部標準物質として $^{13}C_2-N^1AcSpd$ と $^{13}C_2-N^8AcSpd$ を利用し、MS/MS分析によって生じるフラグメントイオン(アセトアミドプロピル基とアセトアミドブチル基)を内部標準物質との面積比に基づいて定量した。

章の後半では、前半で述べたポリアミンおよびアセチルポリアミンの同定、定量法を利用したポリアミン代謝関連酵素の活性測定法について検討した。そして、安定同位体標識ポリアミンを基質として酵素反応を行ない、生成する同位体標識生成物を定量することにより、APAO、SMOおよびSSATを強制発現させた細胞の抽出液中の酵素活性を測定することができた。さらに、この方法を利用して、多くの夾雑物が存在するマウス肝臓のホモジェネート上清中の低レベルの酵素活性を測定できることも明らかになった。これまで、ポリアミンの成分分析はHPLCなどのカラムを用いた分離による方法が一般的であり、1検体の測定に時間がかかるという難点があった。また、酵素活性の測定に関しても、既存の多くの方法には副反応によるバックグラウンドの上昇などの問題があり、夾雑物の多い生体試料中の活性測定には不十分であった。本研究の中で開発し

た測定法は、分離カラムを必要とせず、わずかな前処理を行うだけで数mg程度の少量組織を用いてポリアミンの成分分析を行うことができるだけでなく、少量の組織抽出液など複雑な組成の生体材料中の酵素活性を正確かつ特異的に測定することを可能にすると考えられる。単純な測定法の開発により多量の検体処理が可能になり、今後、酵素の活性を含めたメタボローム解析も行えるようになると思われる。この方法は、今後生体内のポリアミンの成分とその代謝、および代謝に関わる酵素の変動とそのメカニズムを解明する上で有効な研究手段となることが期待される。

夾雑物の多い生体試料中の酵素活性の測定に当たっては、強力かつ特異的な酵素阻害剤が有用である。ポリアミン代謝酵素のSMO阻害剤については、これまでも様々な研究グループが開発を行ってきたが、期待通りの効率のよい阻害剤が得られていないという問題があった。第4章で述べたとおり、過去の報告に基づいてSMOの新規阻害剤の候補物質を設計して合成を試みた結果、既存の阻害剤より格段に性能のよい阻害剤として、スペルミジン骨格に様々な官能基を付加させた新たな化合物を合成することができた。SMOはがんの発生との関わりも示唆されており、この新規化合物は治療薬としての可能性も秘めている。「ポリアミンとがん」という文脈の中においてはそのような効果も視野に入れる必要があり、その意味でも重要な化合物になる可能性がある。特にN⁸-ブタジエニルSpdは、SMOとプレインキュベーションすることにより、MDL72527より低濃度で酵素を完全に阻害することができ、その阻害様式は不可逆的阻害であった。また、N⁸-ブタジエニルSpdは、APAOへの阻害に対してもMDL72527と同レベルの濃度で活性阻害をすることもわかった。内在ポリアミンが存在するin vivoの環境に近い状況でのN⁸-ブタジエニルSpdの阻害効果を検討するため、基質との共存下で阻害実験を行った結果、APAOに対する阻害が競合物質によって減弱するのに対して、SMOに対する阻害は競合物質による影響が小さかった。N⁸-ブタジエニルSpdは、競合ポリアミンの存在下において、APAOも阻害するがSMOに対してより阻害剤として有効であることが分かった。

N⁸-ブタジエニルSpdのAPAOへの阻害効果は、生体内のSSATの酵素活性の測定の際にAPAOによる測定の妨害を抑えるために有用であると考えられる。N⁸-ブタジエニルSpdがAPAO活性を抑制するため、SSATの活性測定の際にAPAOによる生成物の分解を考慮する必要がない。この新規阻害剤の開発により、第3章で検討した測定法と併せて、生体組織内のAPAO、SMOおよびSSATの解析の準備が整ったといえることができる。N⁸-ブタジエニルSpdと質量分析法による酵素活性測定法という新たな手段によって、生体内のポリアミン動態についての解析を進めるのが今後の大きな課題である。

APAOの阻害剤であるMDL72527は、がんに対する治療薬として期待され開発が進められている。がん細胞株に投与し制がん効果についての研究が行なわれたが、APAOへの阻害とは異なる作用によって引き起こされる細胞毒性が問題となり、これまでのところ期待に応える成果はでていない⁽⁹⁷⁾。N⁸-ブタジエニルSpdは、ポリアミンの競合下でも低濃度で酵素を阻害することから、培養細胞などを用いたがん治療への応用を念頭に置いた研究への適用にも期待が持てる。

酵素への選択性を考える上で、N⁸-ブタジエニルSpdとMDL72527のわずかな構造の違いが、SMOやAPAOに対して効果や作用機構の点で本論文中に述べたように異なる挙動を示したことは興味深い。N¹-ブタジエニルSpdとN⁸-ブタジエニルSpdのSMOへの活性部位結合状態がどの様

に異なり、それがどのように阻害特性の違いをもたらしているのかも今後の研究課題として興味を持たれる点である。APAOおよびSMOの活性部位については、酵母ポリアミンオキシダーゼFms1を用いたAPAOおよびSMO特異的阻害剤の設計に関する研究⁽⁹⁹⁾などで少しずつ解明が進んでいるが、特異的阻害剤の開発までには時間が必要であろう。さらなる阻害メカニズムの解析の中でこの点について明確な説明が得られれば、よりSMO特異的な阻害剤の開発が可能になるのではないかと考えられる。酵素阻害剤の治療薬としての適用を考慮するためには、阻害剤が細胞内のポリアミン成分やその代謝酵素にどのような影響を与え、その影響が生体の機能とどの様に関わっているかを解明しなければならない。そのような研究を進めるにあたっては、生体内での働きをトレースできるような同位体標識阻害剤、例えば、N⁸-ブタジエニルSpdなどが必要になるかもしれない。

本研究の中では、これらの測定方法や新たに開発した阻害剤を十分に活用して細胞内ポリアミン代謝酵素およびその活性変動とDiAcSpmの関連を明らかにするには至らなかった。しかしながら、今後の研究に向けて有効な研究ツールを提供できたことの意義は大きいと考えている。

以上、腫瘍マーカーとしてのDiAcSpmを中心として、その普及のための新規測定法と機能解析のための新規測定法の開発を行った。腫瘍マーカーはそれ自体で「がん」を治すことはできない。しかし、潜在的ながん患者に対して早期にがんの存在を警告し、早期治療によって完治する患者を増やすことは、がんによる死者の数を減らすという究極の目的に沿う貢献であり、「攻めの治療」への貢献であると考えられる。発見が遅れた癌に対して使われるがん治療薬の進歩にはめざましいものがあるが、治療薬とそれを必要とする以前の段階で患者を発見するための手段とは、がんの克服に向けて相互補完的な役割を果たすものと位置づけることができる。広汎かつ急速な医療技術の進歩の中で、腫瘍マーカーとしてのDiAcSpmの役割は限定的なものであるかもしれないが、がんの克服に向けて、現状における問題への一つの解決策として、基礎研究と臨床研究を通じて、研究成果を社会に還元できればよいと考えている。

引用文献

1. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H and The Japan Cancer Surveillance Research Group, (2013) Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2007: A Study of 21 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, **43**(3), 328-336,
2. Wu WH, Morris DR, (1973) Biosynthetic arginine decarboxylase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **248**(5), 1687-1695.
3. Pegg AE, Shuttleworth K, Hibasami H. (1981) Specificity of mammalian spermidine synthase and spermine synthase. *Biochem. J.*, **197**(2), 315-20.
4. Pegg, AE, (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.*, **234**(2), 249-262
5. Raina A, Jänne J, (1975) Physiology of the natural polyamines putrescine, spermine and spermidine. *Med. Biol.*, **53**(3), 121-147
6. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA Jr, (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**(19), 11140-11145.
7. Wang Y, Hacker A, Murray-Stewart T, Frydman B, Valasinas A, Fraser AV, Woster PM, Casero RA., Jr, (2005) Properties of recombinant human N¹-acetylpolyamine oxidase (hPAO): potential role in determining drug sensitivity. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **56**(1), 83-90.
8. Shappell NW, Fogel-Petrovic MF & Porter CW, (1993) Regulation of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase by intracellular polyamine pools. Evidence for a functional role in polyamine homeostasis. *FEBS Lett.*, **321**(2-3), 179-183.
9. Casero RA, Jr., Celano P, Ervin SJ, Wiest L & Pegg AE, (1990) High specific induction of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase in a human large cell lung carcinoma. *Biochem. J.*, **270**(3), 615-620.
10. Fogel-Petrovic M, Vujcic S, Brown PJ, Haddox MK & Porter CW, (1996) Effects of polyamines, polyamine analogs, and inhibitors of protein synthesis on spermidine/spermine N¹-acetyltransferase gene expression. *Biochemistry*, **35**(45), 14436-14444.
11. Seidel ER & Snyder RG (1989) Pentagastrin induction of spermine/spermidine N¹-acetyltransferase and mucosal polyamines. *Am. J. Physiol.*, **256**(1 Pt 1), G16-21.
12. Desiderio MA, Pogliaghi G & Dansi P, (1998) Regulation of spermidine/spermine

- N¹-acetyltransferase expression by cytokines and polyamines in human hepatocarcinoma cells (HepG2). *J. Cell Physiol.*, **174**(1), 125-134.
13. Desiderio MA, Weibel M, Mamont PS, (1992) Spermidine nuclear acetylation in rat hepatocytes and in logarithmically growing rat hepatoma cells: comparison with histone acetylation. *Exp. Cell Res.*, **202**(2), 501-506.
 14. Vujcic S, Diegelman P, Bacchi CJ, Kramer DL, Porter CW, (2002) Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem. J.*, **367**(Pt 3), 665-675.
 15. Yatin SM, Yatin M, Aulick T, Ain KB, Butterfield DA, (1999) Alzheimer's amyloid beta-peptide associated free radicals increase rat embryonic neuronal polyamine uptake and ornithine decarboxylase activity: protective effect of vitamin E. *Neurosci. Lett.*, **263**(1), 17-20.
 16. Nishimura K, Yanase T, Nakagawa H, Matsuo S, Ohnishi Y, Yamasaki S, (2009) Effect of polyamine-deficient chow on *Trypanosoma brucei brucei* infection in rats. *J. Parasitol.*, **95**(4), 781-786.
 17. Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S, Konishi F, (2009) Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp. Gerontol.*, **44**(11), 727-732.
 18. Pegg AE, (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, **48**(4), 759-774.
 19. Samejima K, Nakazawa Y. (1980) Action of decarboxylated S-adenosylmethionine analogs in the spermidine-synthesizing system from rat prostate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**(1), 241-246.
 20. Casero RA Jr, Woster PM. (2001) Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.*, **44**(1), 1-26.
 21. Casero RA Jr, Wang Y, Stewart TM, Devereux W, Hacker A, Wang Y, Smith R, Woster PM, (2003) The role of polyamine catabolism in anti-tumour drug response. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**(2), 361-365.
 22. Russell DH, (1971) Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature New Biol.*, **233**(39), 144-145.
 23. Bachrach U, (2004) Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids*, **26**(4), 307-309.
 24. Löser C, Fölsch UR, Paprotny C, Creutzfeldt W, (1990) Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum, and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer*, **65**(4), 958-966.
 25. Hiramatsu K, Kamei S, Sugimoto M, Kinoshita K, Iwasaki K, Kawakita M, (1994) An improved method of determining free and acetylated polyamines by HPLC involving an enzyme reactor and an electrochemical detector. *J. Biochem.*, **115**(3), 584-589.

26. Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, Hoshino M, Kinoshita K, Iwasaki K, Kawakita M, (1995) Determination of amounts of polyamines excreted in urine: demonstration of N¹,N⁸-diacetylspermidine and N¹,N¹²-diacetylspermine as components commonly occurring in normal human urine. *J. Biochem.*, **117**(1), 107-112.
27. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY, (2004) Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**(19), 1420-1425.
28. Hiramatsu K, Takahashi K, Yamaguchi T, Matsumoto H, Miyamoto H, Tanaka S, Tanaka C, Tamamori Y, Imajo M, Kawaguchi M, Toi M, Mori T, Kawakita M, (2005) N¹,N¹²-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. *Clin. Cancer Res.*, **11**(8), 2986-2990.
29. Hiramatsu K, Miura H, Kamei S, Iwasaki K, Kawakita M, (1998) Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system that can replace HPLC analysis for the determination of N¹,N¹²-diacetylspermine in human urine. *J. Biochem.*, **124**(1), 231-236.
30. Yamaguchi K, Nakamura M, Shirahane K, Konomi H, Torata N, Hamasaki N, Kawakita M, Tanaka M, (2005) Urine diacetylspermine as a novel tumour marker for pancreatobiliary carcinomas. *Dig. Liver. Dis.*, **37**(3), 190-194.
31. Kawakita M, Hiramatsu K, Yanagiya M, Doi Y, Kosaka M, (2011) Determination of N¹,N¹²-diacetylspermine in urine: a novel tumor marker. *Methods Mol Biol.* **720**, 367-378.
32. Kawakita M, Hiramatsu K. (2006) Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. *J. Biochem.*, **139**, 315-322.
33. Stejskal D, Humenanska V, Hanulova Z, Fiala R, Vrtal R, Solichova P, Karpisek M., (2006) Evaluation of urine N¹,N¹²-Diacetylspermine as potential tumor marker for urinary bladder cancer. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, **150**(2), 235-237.
34. Hiramatsu K, Sakaguchi K, Fujie N, Saitoh F, Takahama E, Moriya S, Iwasaki K, Sakaguchi M, Takahashi K, Kawakita M. (2013) Excretion of N¹, N¹²-diacetylspermine in the urine of healthy individuals. *Ann. Clin. Biochem.*, DOI: 10.1177/0004563213496978. [Epub ahead of print]
35. Velonas VM, Woo HH, Remedios CG, Assinder SJ, (2013) Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(6), 11034-11060
36. Van den Berg GA, Kingma AW, Visser GH, Muskiet FA., (1988) Gestational-age-dependent concentrations of polyamines, their conjugates and metabolites in urine and amniotic fluid. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **95**(7), 669-675.
37. Gold P, Freedman SO, (1965) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic

- carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, **121**, 439-462.
38. 黒木正秀 (2010) 「がん胎児性抗原(CEA)」『広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか—[第7版]』日本臨床社 **68** 卷(増刊号7), pp.674-667.
 39. 厚生労働省大臣官房統計情報部, 2007, 『平成19年 国民生活基礎調査の概要』
 40. 内閣府大臣官房政府広報室, 2007, 『平成19年9月調査 世論調査報告書 がん対策に関する世論調査』
 41. 内閣府大臣官房政府広報室, 2012, 『平成25年1月調査 世論調査報告書 がん対策に関する世論調査』
 42. Miki T, Hiramatsu K, Kawakita M. (2005) Interaction of N¹,N¹²-diacetylspermine with polyamine transport systems of polarized porcine renal cell line LLC-PK1. *J. Biochem.*, **138**(4), 479-484.
 43. Kuwata G, Hiramatsu K, Samejima K, Iwasaki K, Takahashi K, Koizumi K, Horiguchi S, Moriya SS, Kobayashi M, Kawakita M, (2013) Increase of N¹, N¹²-diacetylspermine in tissues from colorectal cancer and its liver metastasis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **139**(6), 925-932.
 44. Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, Ueda S, Irie Y, Murotani N, Igarashi K, (2003) Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**(1), 143-149.
 45. Tomitori H, Usui T, Saeki N, Ueda S, Kase H, Nishimura K, Kashiwagi K, Igarashi K, (2005) Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke*, **36**(12), 2609-2613.
 46. Hiramatsu K, Miura H, Sugimoto K, Kamei S, Iwasaki K, Kawakita M. (1997) Preparation of antibodies highly specific to N¹,N⁸-diacetylspermidine, and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system for its sensitive and specific detection., *J. Biochem.*, **121** (6), 1134-1138.
 47. Brooks T, Keevil C, (1997) A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**(3), 203-206.
 48. Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS, (2000) Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods*, **22**(1), 53-60.
 49. O'Farrell B, (2009) Evolution of lateral flow-based immunoassay systems. In: R Wong, H Tse, editors. Lateral Flow Immunoassay. New York: Humana Press. pp1-33.
 50. Horisberger M, Rosset J, (1977) Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**(4), 295-305.
 51. Levy R, Thanh N, Doty R, Hussain I, Nichols R, Schiffrin D, Brust M, Fernig DG, (2004) Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(32), 10076-10084.

52. Dworetzky S, Feldherr C, (1988) Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.*, **106**(3), 575-584.
53. Geoghegan WD, Ackerman GA, (1977) Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**(11), 1187-1200.
54. Samejima K, Hiramatsu K, Takahashi K, Kawakita M, Kobayashi M, Tsumoto H, Kohda K, (2010) Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **401**(1), 22-29.
55. Casero Jr, RA, Pegg AE, (2009) Polyamine catabolism and disease, *Biochem. J.*, **421**(3), 323-338.
56. Desiderio MA, Mattei S, Biondi G, Colombo MP, (1993) Cytosolic and nuclear spermidine acetyltransferases in growing NIH 3T3 fibroblasts stimulated with serum or polyamines: relationship to polyamine-biosynthetic decarboxylases and histone acetyltransferase. *Biochem. J.*, **293**(Pt 2), 475-479.
57. Paik MJ, Lee S, Cho KH, Kim KR, (2006) Urinary polyamines and N-acetylated polyamines in four patients with Alzheimer's disease as their N-ethoxycarbonyl-N-pentafluoropropionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal. Chim. Acta.*, **576**(1), 55-60.
58. Byun JA, Lee SH, Jung BH, Choi MH, Moon MH, Chung BC, (2008) Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **22**(1), 73-80
59. Häkkinen MR, Keinänen TA, Vepsäläinen J, Khomutov AR, Alhonen L, Jänne J, Auriola S, (2007) Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **45**(4), 625-634.
60. Häkkinen MR, Keinänen TA, Vepsäläinen J, Khomutov AR, Alhonen L, Jänne J, Auriola S, (2008) Quantitative determination of underivatized polyamines by using isotope dilution RP-LC-ESI-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**(2), 414-421.
61. Hakkinen MR, (2011) Polyamine Analysis by LC-MS. *Methods Mol. Biol.*, **720**, 505-518.
62. Kobayashi M, Samejima K, Hiramatsu K, Kawakita M, (2002) Mass spectrometric separation and determination of N¹,N¹²-diacetylspermine in the urine of cancer patients. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(3), 372-374.
63. Samejima K, Otani M, Murakami Y, Oka T, Kasai M, Tsumoto H, Kohda K, (2007) Electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometric method for simultaneous determination of spermidine and spermine. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(10), 1943-1946.

64. Hara T, Xu YJ, Sasaki H, Niitu M, Samejima K, (2000) Syntheses of [¹³C,¹⁵N]-labeled polyamines. *J. Labelled. Comp. Radiopharm.*, **43**(10), 1005-1011.
65. Hansen JB, Nielsen MC, Ehrbar U, Buchardt O, (1982) Partially Protected Polyamines. *Synthesis*, **1982**(5), 404-405.
66. Hegde SS, Chandler J, Vetting MW, Yu M, Blanchard JS, (2007) Mechanistic and structural analysis of human spermidine/spermine N¹-acetyltransferase. *Biochemistry*, **46**(24), 7187-7195.
67. Gerber SA, Scott CR, Turecek F, Gelb MH, (1999) Analysis of Rates of Multiple Enzymes in Cell Lysates by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**(5), 1102-1103.
68. Verhoeven NM, Schor DS, Roos B, Battini R, Stöckler-Ipsiroglu S, Salomons GS, Jakobs C, (2003) Diagnostic Enzyme Assay That Uses Stable-Isotope-labeled Substrates to Detect L-Arginine:Glycine Amidinotransferase Deficiency. *Clin. Chem.*, **49**(5), 803-805.
69. Rakers C, Zoerner AA, Engeli S, Batkai S, Jordan J, Tsikas D, (2012) Stable isotope liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for fatty acid amide hydrolase activity. *Anal. Biochem.*, **421**(2), 699-705.
70. Suzuki O, Matsumoto T, Katsumata Y, (1984) Determination of polyamine oxidase activities in human tissues. *Experientia*. **40**(8), 838-839.
71. Wang Y, Murray-Stewart T, Devereux W, Hcker A, Frydman B, Woster PM, Casero RA Jr., (2003) Properties of purified recombinant human polyamine oxidase, PAOh1/SMO. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**(4), 605-611.
72. Takao K, Shirahata A, (2011) Fluorescent substrates for polyamine catabolic enzymes and transport. *Methods Mol. Biol.*, **720**, 463-474.
73. Vujcic S, Liang P, Diegelman P, Kramer DL, Porter CW, (2003) Genomic identification and biochemical characterization of the mammalian polyamine oxidase involved in polyamine back-conversion. *Biochem. J.*, **370**(1), 19-28.
74. Wu T, Yankovskaya V, McIntire WS, (2003) Cloning, sequencing, and heterologous expression of the murine peroxisomal flavoprotein, N¹-acetylated polyamine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **278**(23), 20514-20525.
75. Järvinen A, Keinänen TA, Grigorenko NA, Khomutov AR, Uimari A, Vepsäläinen J, Närvänen A, Alhonen L, Jänne J., (2006) Guide molecule-driven stereospecific degradation of alpha-methylpolyamines by polyamine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **281**(8), 4589-4595
76. Libby PR, Bergeron RJ, Porter CW, (1989) Structure-function correlations of polyamine analog-induced increases in spermidine/spermine acetyltransferase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **38**(9), 1435-1442.
77. Takao K, Miyatake S, Fukazawa K, Wada M, Sugita Y, Shirahata A, (2008)

- Measurement of spermidine/spermine-N¹-acetyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with N¹-dansyl norspermine as the substrate. *Anal. Biochem.*, **376**(2), 277-279.
78. Montemayor EJ, Hoffman DW, (2008) The Crystal Structure of Spermidine/Spermine N¹-Acetyltransferase in Complex with Spermine Provides Insights into Substrate Binding and Catalysis. *Biochemistry*, **47**(35), 9145-9153.
 79. Bey P, Bolkenius FN, Seiler N, Casara P, (1985) N^{2,3}-Butadienyl-1,4-butanediamine derivatives: Potent irreversible inactivators of mammalian polyamine oxidase. *J. Med. Chem.*, **28**(1), 1-2.
 80. Wang Y, Devereux W, Woster P, Stewart T, Hacker A, Casero RA Jr, (2001) Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure. *Cancer Res.*, **61**(14), 5370-5373.
 81. Bacchi CJ, Rattendi D, Faciane E, Yarlett N, Weiss LM, Frydman B, Woster P, Wei B, Marton LJ, Wittner M, (2004) Polyamine metabolism in a member of the phylum Microspora (*Encephalitozoon cuniculi*): effects of polyamine analogues. *Microbiology*, **150**(Pt 5), 1215-1224.
 82. Bianchi M, Polticelli F, Ascenzi P, Botta M, Federico R, Mariottini P, Cona A, (2006) Inhibition of polyamine and spermine oxidases by polyamine analogues. *FEBS J.*, **273**(6), 1115-1123.
 83. Emanuela B, Minarini A, Tumiatti V, Milelli A, Lunelli M, Pegoraro M, Rizzoli V, DiPaolo ML, (2012) Synthetic polyamines as potential amine oxidase inhibitors: a preliminary study. *Amino Acids*, **42**(2-3), 913-928.
 84. Cervelli M, Polticelli F, Fiorucci L, Angelucci E, Federico R, Mariottini P, (2013) Inhibition of acetylpolyamine and spermine oxidases by the polyamine analogue chlorhexidine. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **28**(3), 463-467.
 85. Moriya S, Iwasaki K, Samejima K, Takao K, Kohda K, Hiramatsu K, Kawakita M, (2012) A mass spectrometric method to determine activities of enzymes involved in polyamine catabolism. *Anal. Chim. Acta.*, **748**, 45-52.
 86. Kalir A, Sabbagh A, Youdim MBH, (1981) Selective acetylenic 'suicide' and reversible inhibitors of monoamine oxidase types A and B. *Br. J. Pharmacol.*, **73**(1), 55-64.
 87. Takao K, Shirahata A, Samejima K, Casero Jr. RA, Igarashi K, Sugita Y, (2013) Pentamines as substrate for human spermine oxidase. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**(3), 407-411.
 88. Bey P, N^{2,3}-Butadienyl-1,4-butanediamine derivatives. U.S. Patent 4,551,550, 1985-11-5.
 89. Salvatore RN, Nagle AS, Jung KW, (2002) Cesium effect: high chemoselectivity in direct N-alkylation of amines. *J. Org. Chem.*, **67**(3), 674-683.
 90. Casara P, Jund K, Bey P, (1984) General synthetic access to α -allenyl amines and

- α -allenyl- α -amino acids as potential enzyme activated irreversible inhibitors of PLP dependent enzymes. *Tetrahedron Lett.*, **25**(18), 1891-1894.
91. Ando T, Yamawaki J, (1979) Potassium fluoride on celite. A versatile reagent for C-, N-, O-, and S-alkylations. *Chem. Lett.*, **8**(1), 45-46.
 92. Paul R, Anderson GW, (1960) *N,N'*-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**(17), 4596-4600.
 93. Adachi MS, Juarez PR, Fitzpatrick PF, (2010) Mechanistic studies of human spermine oxidase: kinetic mechanism and pH effects. *Biochemistry*. **49**(2), 386-392.
 94. Häkkinen MR, Hyvönen MT, Auriola S, Casero RA Jr, Vepsäläinen J, Khomutov AR, Alhonen L, Keinänen J, (2010) A Metabolism of N-alkylated spermine analogues by polyamine and spermine oxidases. *Amino Acids*, **38**(2), 369-381.
 95. Wu T, Ling K-O, Sayre LM, McIntire WS, (2005) Inhibition of murine N¹-acetylated polyamine oxidase by an acetylenic amine and the allenic amine, MDL 72527. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **326**(2), 483-490.
 96. Waley SG, (1985) Kinetics of suicide substrates. Practical procedures for determining parameters. *Biochem. J.*, **227**(3), 843-849.
 97. Seiler N, Renault J, Gossé F, Roussi S, Raul F, (2005) Cytotoxicity of the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 to cancer cells: comparison with a saturated structural analogue. *Int. J. Oncol.*, **27**(6), 1669-1676.
 98. Moriya S, Terayama N, Hiramatsu K, Kawakita M, Kiryu T, Kawanishi T, Yasui E, Nagumo S, (2014) Synthesis of 1-(4-Aminobutyl)-2-iminoimidazolidin-4-one Aimed at Preparation of a Creatinine-specific Antibody., *Chem. Pharm. Bull.*, **62**(4), 350-353.
 99. Tavladoraki P, Cervelli M, Antonangeli F, Minervini G, Stano P, Federico R, Mariottini P, Polticelli F, (2011) Probing mammalian spermine oxidase enzyme-substrate complex through molecular modeling, site-directed mutagenesis and biochemical characterization. *Amino Acids*, **40**(4), 1115-1126.

表1 モノクローナル抗体の特性

| 抗体 | 競合的ELISAにより求めたKi値(nM) | | 交差率(%) |
|--------|-----------------------|----------------------|--------|
| | DiAcSpm | N ¹ AcSpd | |
| CN647 | 0.32 | 337.8 | 0.095 |
| #535 | 15.63 | 4706.2 | 0.33 |
| #2009 | 1.07 | 436.0 | 0.25 |
| #2043 | 1.06 | 461.4 | 0.23 |
| #8028 | 2.35 | 2580.0 | 0.091 |
| #10040 | 0.72 | 492.1 | 0.15 |
| #10051 | 0.82 | 525.1 | 0.16 |

表2 各種ポリアミン濃度とポリアミンピーク面積/内部標準物質ピーク面積比の間の回帰直線の傾きとy切片

| 化合物 ^{a)} | 傾き | y切片 | 相対標準偏差(% ^{b)} |
|----------------------|-------|--------|------------------------|
| DiAcSpd | 0.487 | -0.001 | 2.4 |
| Put | 0.490 | 0.000 | 3.4 |
| N ¹ AcSpd | 0.585 | -0.014 | 5.3 |
| N ⁸ AcSpd | 0.465 | -0.007 | 5.5 |
| DiAcSpm | 0.565 | -0.003 | 3.8 |
| Spd | 0.525 | 0.025 | 1.4 |
| N ¹ AcSpm | 0.516 | 0.007 | 4.2 |
| Spm | 0.587 | -0.013 | 3.0 |

a) それぞれのポリアミン内部標準物質2 nmolに対して、各ポリアミン標準品を0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6および2.0 nmol添加した。(n=2)

b) 標準物質濃度8点での相対標準偏差の平均を示した。(n=3)

表3 組織抽出液中のAPAO、SMOおよびSSAT活性の測定：ポリアミン標準品の添加回収試験および測定値の再現性の検討

| APAO | | | | | | |
|-----------------------------------|--|---|------|---------|-----------------|--|
| 上清添加量 ^{a)} (μ l) | <i>h</i> APAO抽出液 添加量 ^{b)} (μ l) | ¹⁵ N ₃ -Spd (pmol/min) | | | 酵素活性の回収率 (%) | |
| | | mean (n=4) | SD | RSD (%) | | |
| 2.5 | 0 | 4.25 | 0.43 | 10.1 | | |
| 0 | 2.5 | 12.6 | 0.45 | 3.6 | 100.0 | |
| 2.5 | 2.5 | 16.9 | 0.43 | 2.6 | 100.1 | |
| 2.5 | 5.0 | 31.1 | 0.16 | 0.5 | 106.1 | |
| SMO | | | | | | |
| 上清添加量 ^{a)} (μ l) | <i>h</i> SMO抽出液 添加量 ^{c)} (μ l) | ¹⁵ N ₃ -Spd (pmol/min) | | | 酵素活性の回収率 (%) | |
| | | mean (n=4) | SD | RSD (%) | | |
| 2.5 | 0 | 2.26 | 0.10 | 4.6 | | |
| 0 | 2.5 | 9.99 | 0.15 | 1.5 | 100.0 | |
| 2.5 | 2.5 | 13.3 | 0.33 | 2.5 | 110.6 | |
| 2.5 | 5.0 | 24.7 | 0.32 | 1.3 | 112.1 | |
| SSAT | | | | | | |
| 上清添加量 ^{a)} (μ l) | <i>h</i> SSAT抽出液 添加量 ^{d)} (μ l) | ¹⁵ N ₃ -N ¹ AcSpd (pmol/min) | | | 酵素活性の回収率 (%) | |
| | | mean (n=4) | SD | RSD (%) | | |
| 2.5 | 0 | 2.32 | 0.01 | 0.4 | | |
| 0 | 2.5 | 15.0 | 0.07 | 0.5 | 100.0 | |
| 2.5 | 2.5 | 17.3 | 0.18 | 1.0 | 100.3 | |
| 2.5 | 5.0 | 33.2 | 0.24 | 0.7 | 103.3 | |

(a) マウス肝臓ホモジェネートの上清 (32.3 mg/ml) : マウスの肝臓345 mgを0.1 M HEPES (pH 7.5) 1.035 mlとプロテアーゼインヒビターカクテル10 μ l中でホモジェナイズし、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、15分間の遠心分離によって回収される上清画分。

(b) *h*APAO発現HEK293細胞の抽出液(0.055 mg/ml)

(c) *h*SMO発現HEK293細胞の抽出液(0.040 mg/ml)

(d) *h*SSAT発現BL21(DE3)の抽出液(0.045 mg/ml)

表4 各化合物のSMOおよびAPAOに対する阻害性能の比較

| 阻害剤(μM) / プレインキュベーション | SMO | | APAO | |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | あり ^{a)} | なし ^{b)} | あり ^{a)} | なし ^{b)} |
| MDL72527 | 5.4 | 64.6 | 0.02 | 12.6 |
| N ¹ -ブタジエニル Spd | 0.6 | 8.5 | 0.03 | 4.9 |
| N ⁸ -ブタジエニル Spd | 0.1 | 1.8 | 0.05 | 4.5 |

(a) 基質を添加しない状態でのプレインキュベーションを行い、その後で酵素と基質を反応させ、測定を行った。酵素活性を50%阻害するのに必要な濃度(μM)を示した。

(b) 阻害剤と基質を同時添加して酵素反応を測定し、酵素活性を50%阻害するのに必要な濃度(μM)を示した。

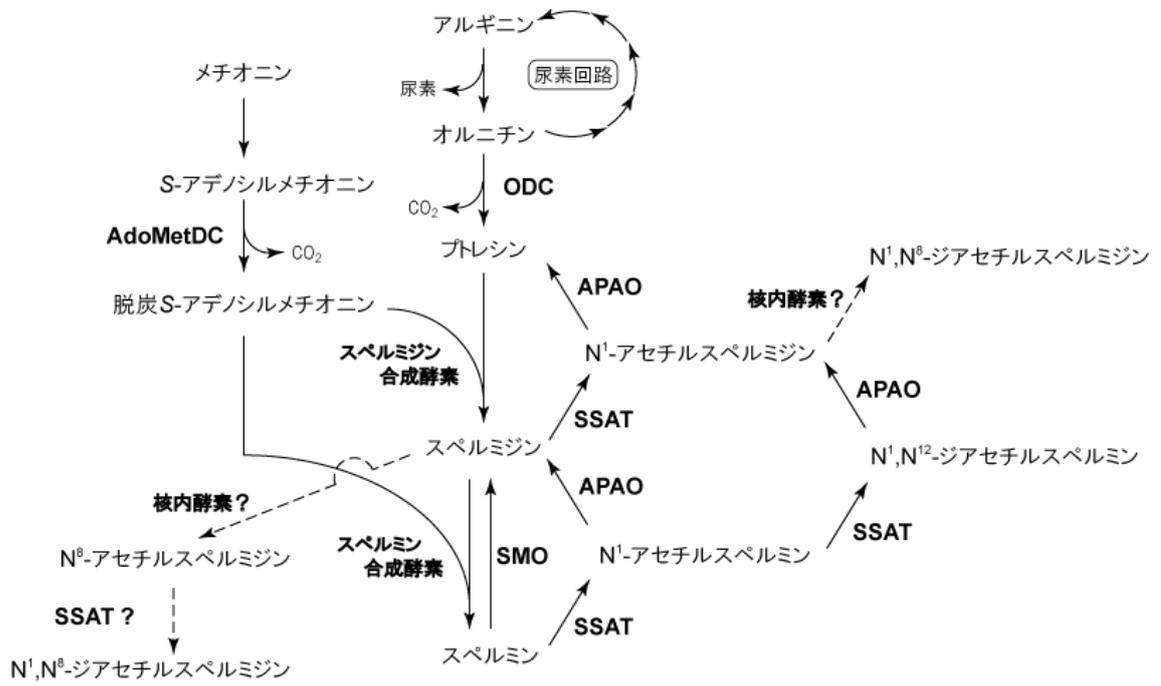


図1 ポリアミンの生合成経路

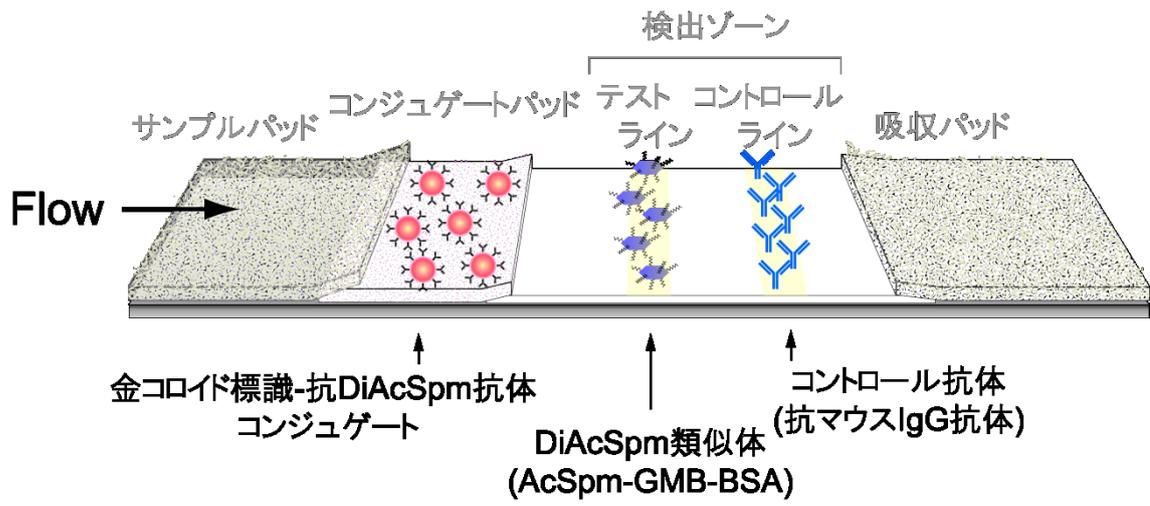


図2 DiAcSpm測定用免疫クロマトグラフィーストリップの概要

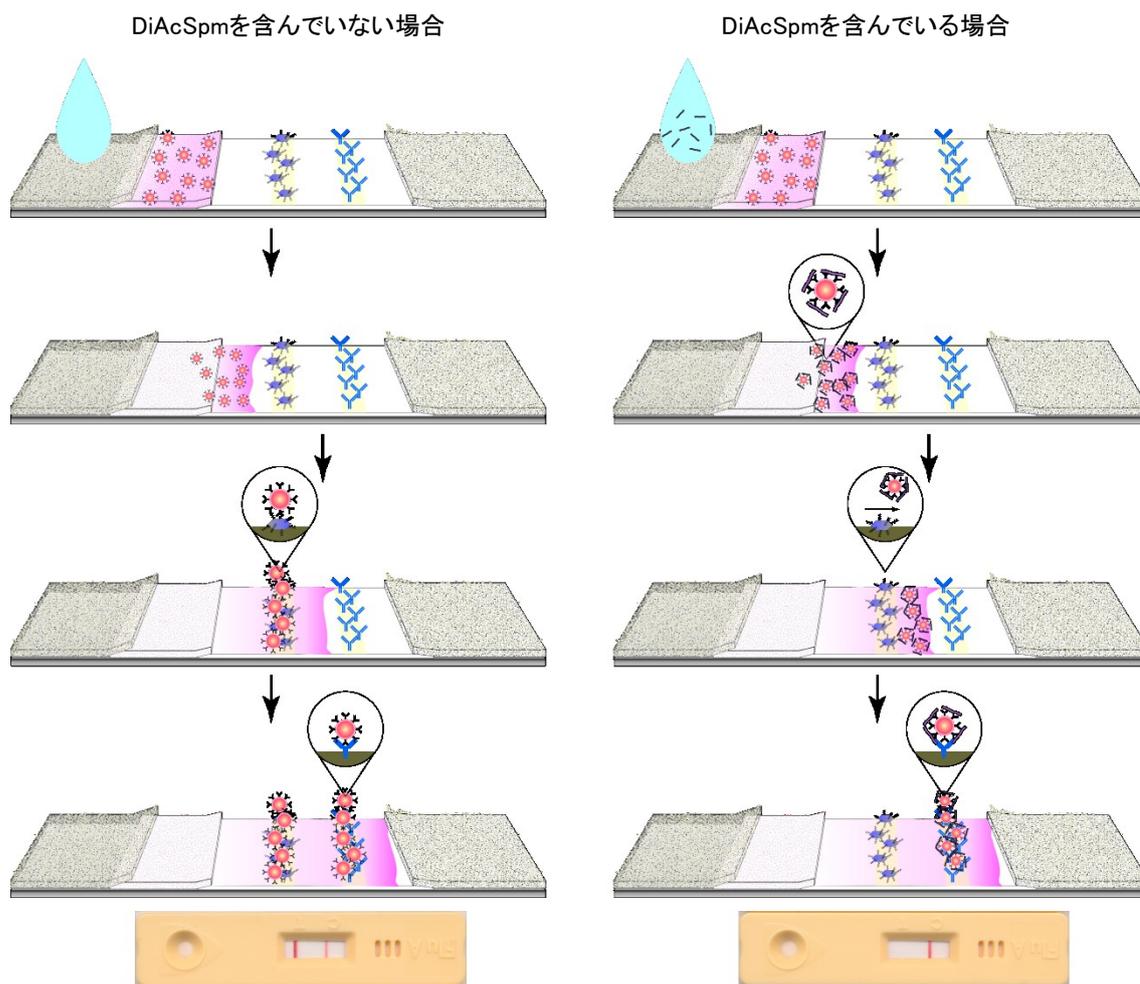


図3 競合系イムノクロマトグラフィー法によるDiAcSpmの検出原理

左図：添加した検体の中にDiAcSpmを含まない場合。金コロイド標識抗体は、DiAcSpm類似体とコントロール抗体で捕捉され、発色ラインは、テストラインとコントロールラインに現れる。右図：添加した抗体の中にDiAcSpmを含んでいる場合。金コロイド標識抗体は、コントロールラインだけに捕捉され、コントロールライン1本しか発色しない。

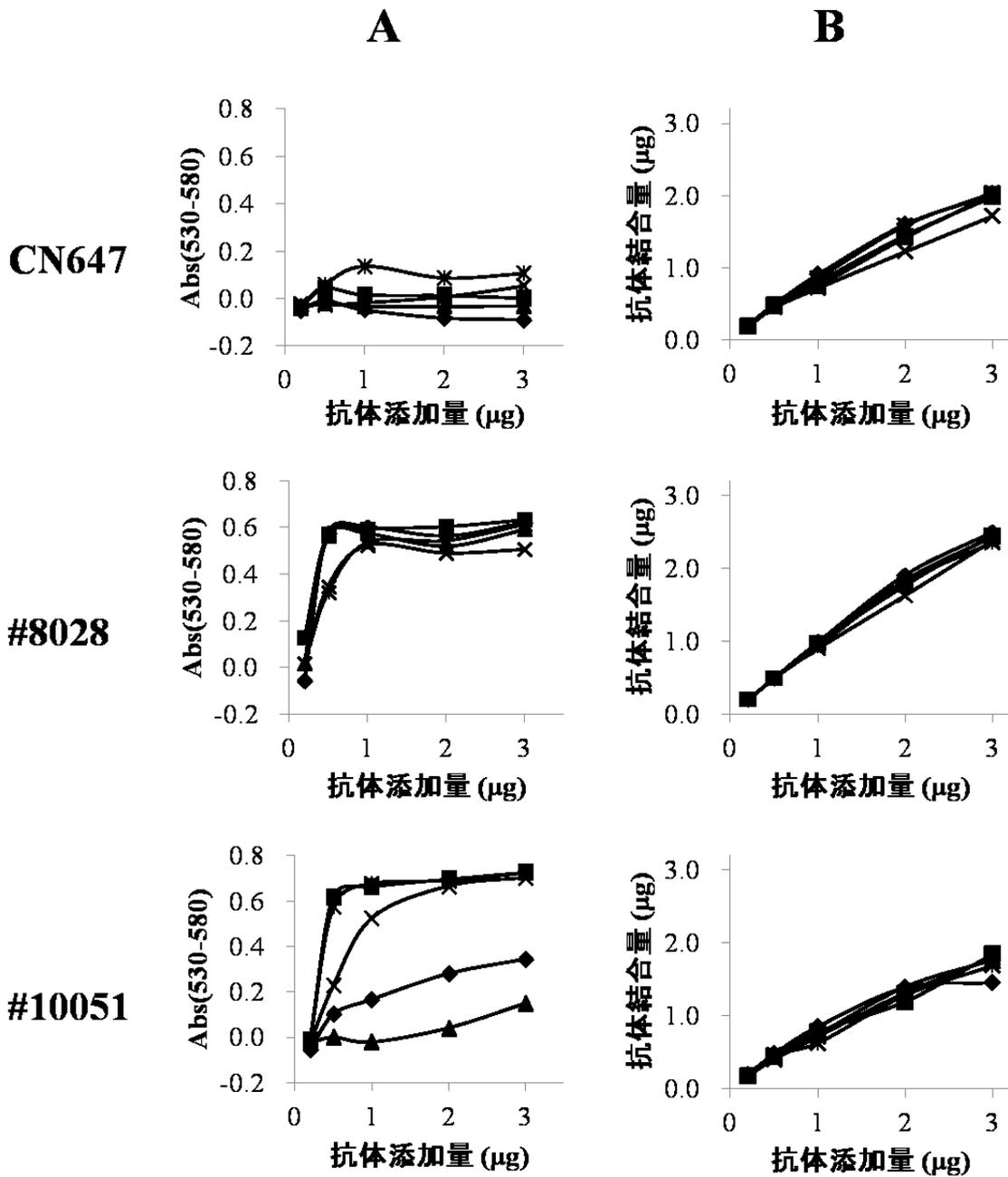


図4 pHの異なる緩衝液における金コロイド標識抗体の電解質に対する分散安定性

(A)種々のpHの緩衝液中で金コロイド粒子に結合させた標識抗体の電解質中における安定性を示す。電解質添加後のAbs(530-580)の値で評価した。HEPES (pH 7.0) (◆)、HEPES (pH 8.0) (■)、Tris (pH 8.0) (▲)、Tris (pH 9.0) (×)およびCHES (pH 9.0) (*)。 (B) (A)で用いた各種の緩衝液中で異なる濃度の抗体を結合させた金コロイドの抗体結合量。

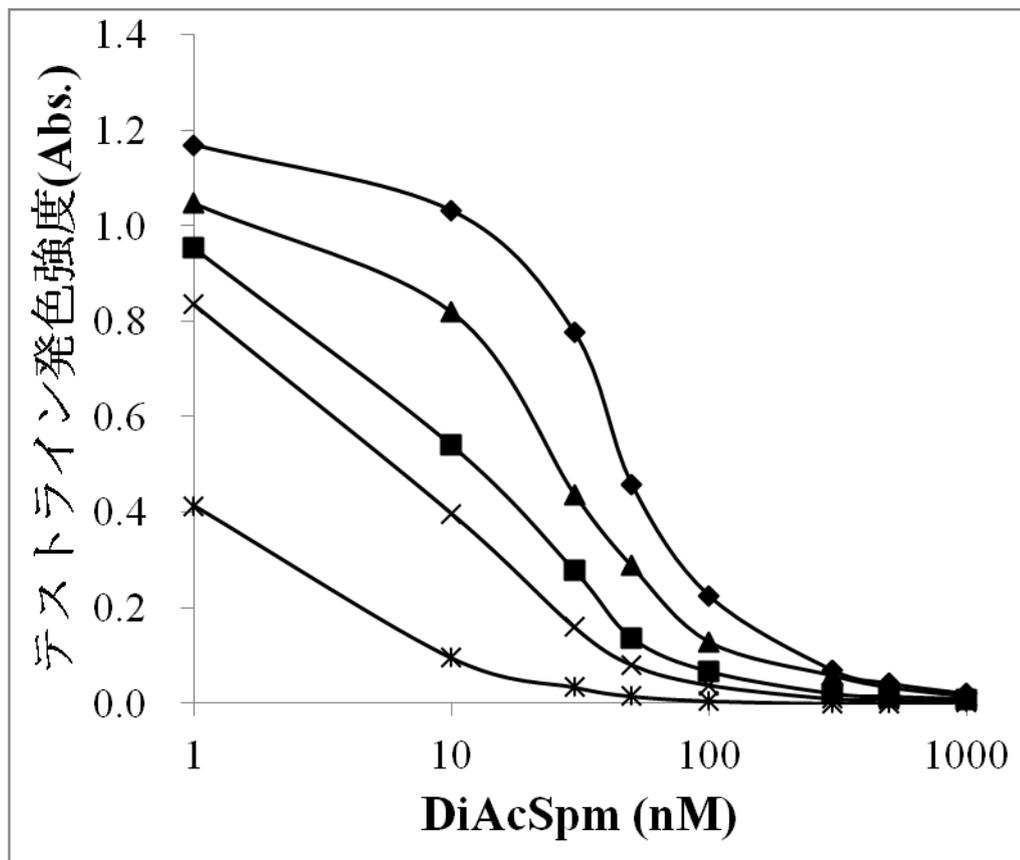


図5 異なる条件下で結合させた金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体の性能のイムノクロマトグラフィによる評価

抗体#8028 (1 μ g)をHEPES (pH 7.0) (◆)、HEPES (pH 8.0) (■)、Tris (pH 8.0) (▲)、Tris (pH 9.0) (×)およびCHES (pH 9.0) (*)の各緩衝液(0.1 ml)に溶解し、10 μ lのWRGH1金コロイド懸濁液を添加して金コロイド標識抗体を調製した。これらの標識抗体を使って、イムノクロマトグラフィーストリップを作製した。作成したイムノクロマトグラフィーストリップに種々の濃度のDiAcSpmを添加して展開し、テストラインの強度によって性能を評価した。

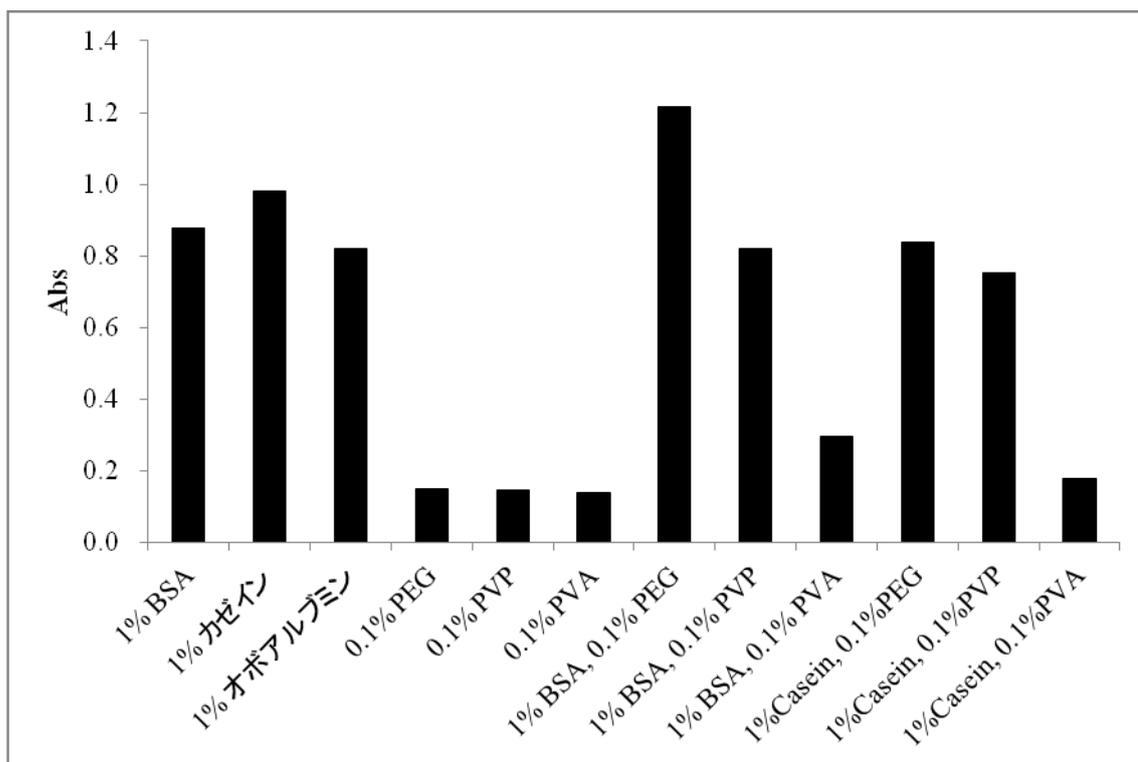


図6 金コロイド表面へのブロッキング試薬とそれらがライン強度に与える影響

抗体結合金コロイドは#8028抗体1 μg と10 μl のWRGH1を2 mM HEPES (pH 7.0)中で結合させて作成した。未反応の表面を不活性化するために以下のブロッキング試薬で処理した。これらの標識抗体を使用しストリップを作製し、発色強度の測定を行った。ブロッキング試薬：1% BSA、1%カゼイン、1%オボアルブミン、0.1% PEG、0.1% PVP、0.1% PVA、1% BSA + 0.1% PEG、1% BSA + 0.1% PVP、1% BSA + 0.1% PVA、1%カゼイン + 0.1% PEG、1%カゼイン + 0.1% PVPおよび1%カゼイン+ 0.1% PVA。

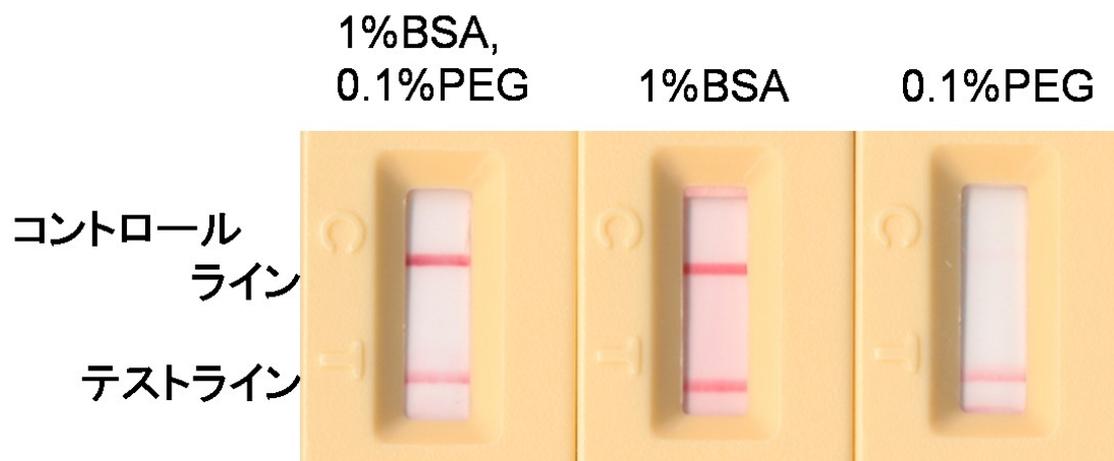
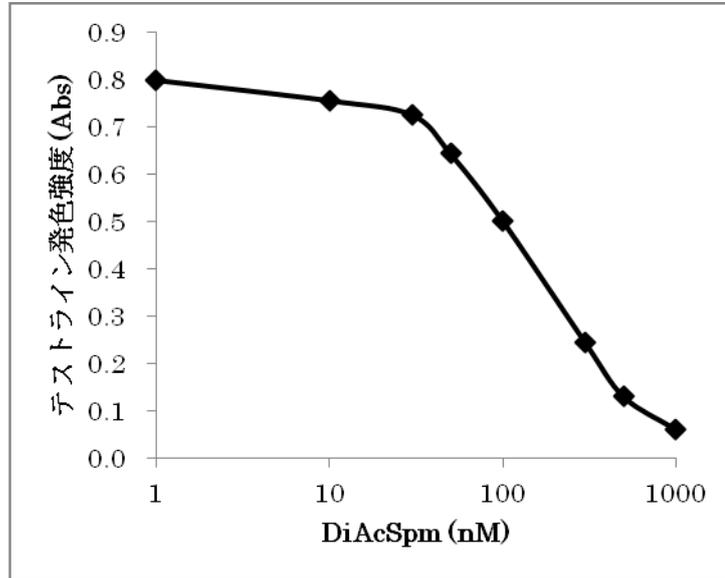


図7 各金コロイドブロッキング剤によるライン発色強度の比較

ブロッキング剤は、金コロイドと抗体の結合反応後に未反応表面への非特異的結合を防ぐ目的で使用した。結合反応後の溶液に0.1% PEG溶液、1% BSA溶液または0.1% PEG溶液をそれぞれ10% V/Vずつ添加し、37°Cで30分間ブロッキング操作を行った。それぞれの溶液を使用して作製したイムノクロマトグラフィーストリップを測定し、発色強度を比較した。

A



B

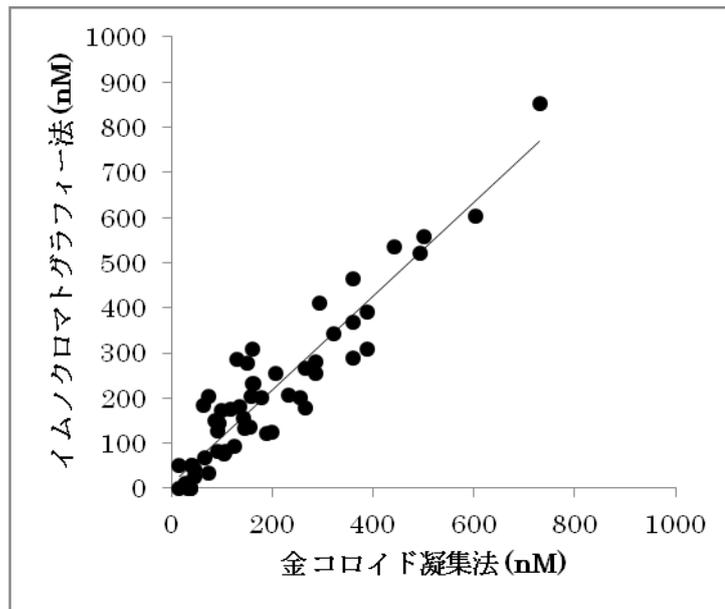


図8 イムノクロマトグラフィー法によるDiAcSpmの測定

(A) DiAcSpm標準液を用いた標準曲線。人工尿(pH 6.0)を用いて調製した0.2 mlのDiAcSpm標準液をイムノクロマトグラフィーストリップに添加し、テストライン強度を測定した。(B)尿検体のイムノクロマトグラフィー法による測定値と金コロイド凝集法による測定値の相関。横軸に自動分析機を用いたAutoDiAcSpmによる金コロイド凝集法の測定結果、縦軸にAの標準曲線を使用して求めたDiAcSpm濃度をプロットした。

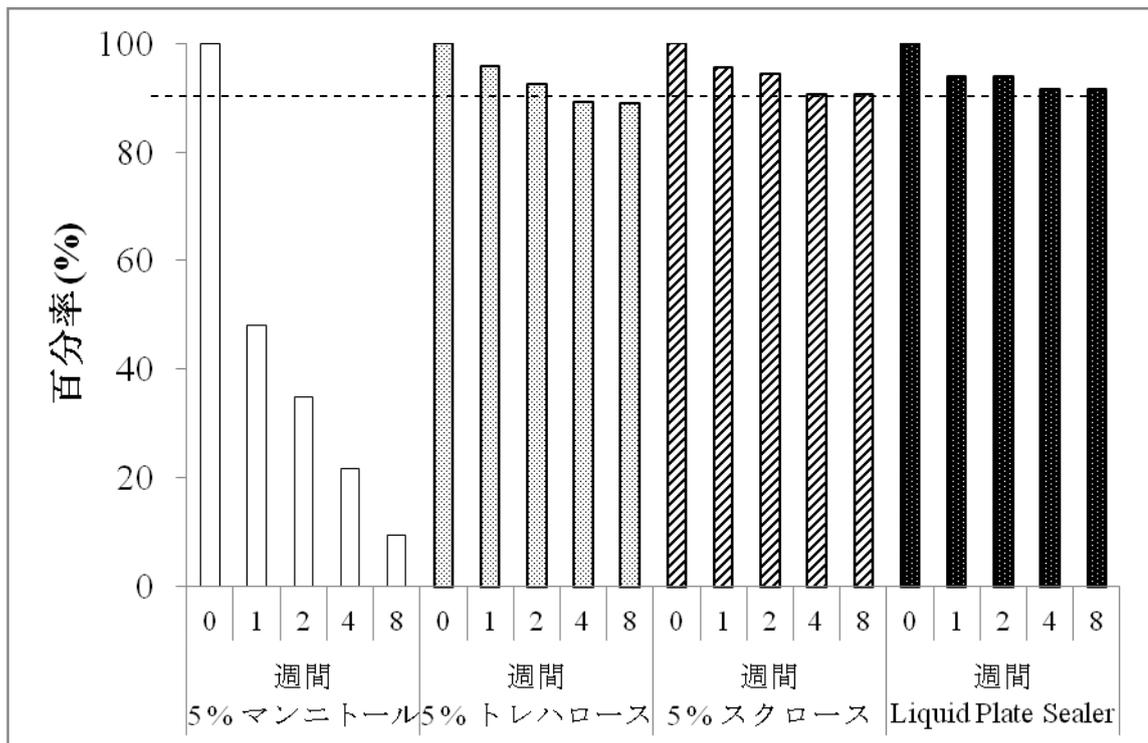


図9 金コロイド標識-抗DiAcSpm抗体の最終懸濁に用いる溶液の標識抗体安定化効果：熱加速試験によるストリップの安定性の評価

抗体結合金コロイドコンジュゲートを、5%マンニトール (□)、5%トレハロース (■)、5%スクロース (▨)または、Liquid Plate Sealer (■)中に懸濁させ、免疫クロマトグラフィーストリップの作製に用いた。免疫クロマトグラフィーストリップを保存温度50℃で、横軸で示した期間保存し、テストラインの強度を測定した。作製直後に測定したストリップのシグナル強度を100%とし、各保存期間後のシグナル強度を百分率で表した。図中に示した点線は、90%発色強度を示す。

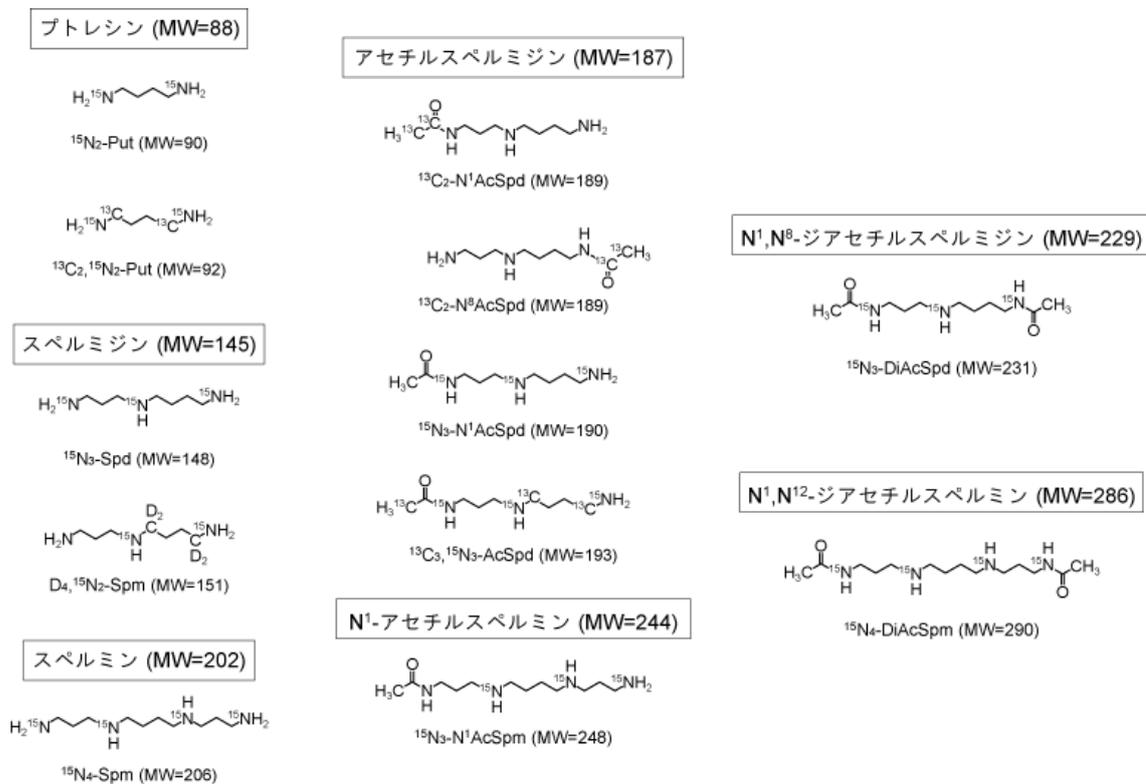


図11 安定同位体標識したポリアミンとアセチルポリアミンの構造式

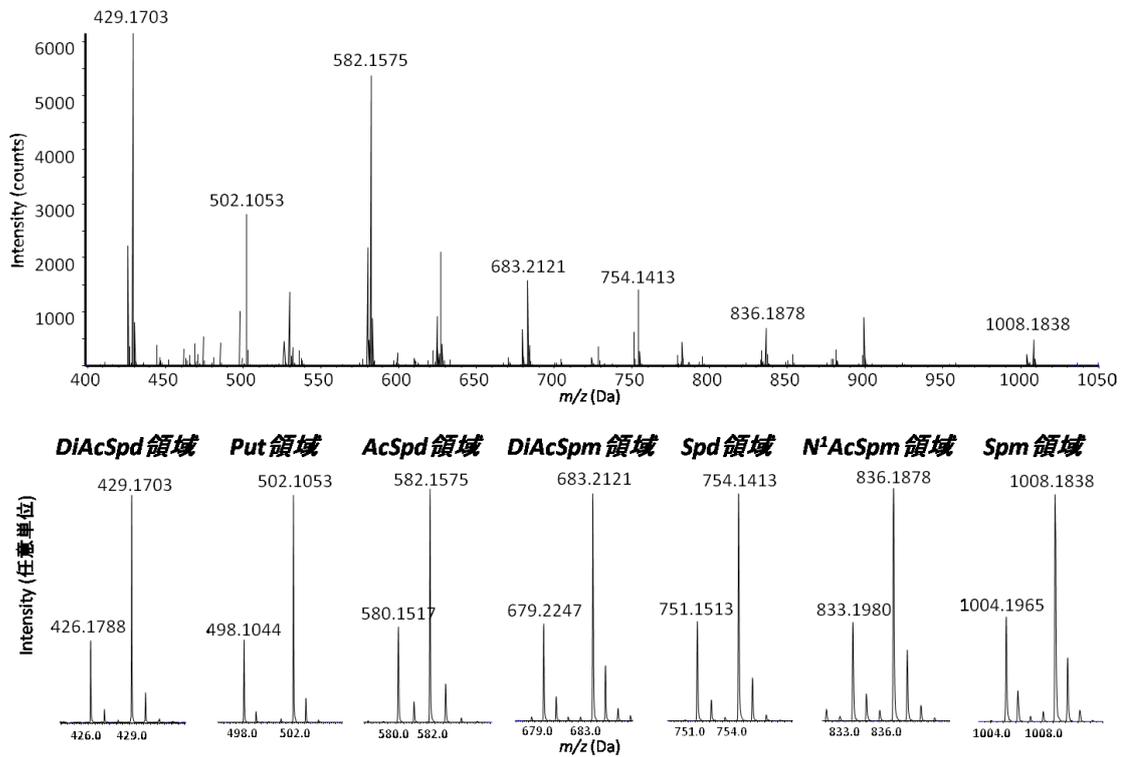


図12 TOF-MSによる3種のポリアミンおよび5種のアセチルポリアミンのHFB誘導体の同時測定のマスペクトル

それぞれの標準品(0.8 nmol/チューブ)とそれに対応した内部標準物質(2.0 nmol/チューブ)を用いて、第3章、第2節で記述される手順によって測定した。上図はm/z 100~1,100のスキャン範囲のスペクトル、下図はそれぞれの測定領域の拡大図。この段階ではN¹AcSpdとN⁸AcSpdは識別されず、同一質量数のピークとして検出されている。

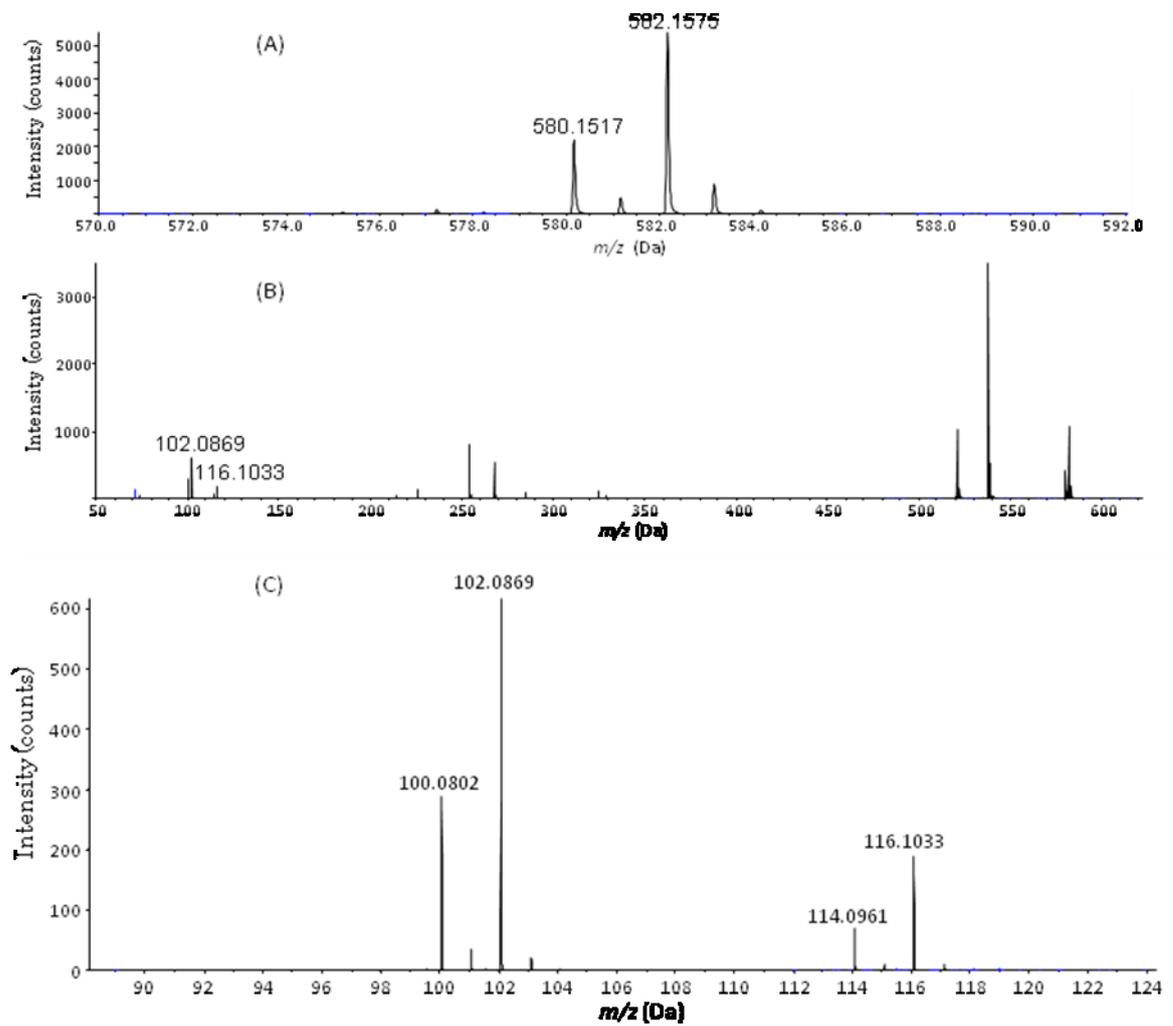


図13 MS/MSによるN¹AcSpdとN⁸AcSpdの分析および識別

(A) 図12のAcSpd領域の拡大表示。(B) MS/MS測定において親イオンからフラグメント化された娘イオンのスペクトル。(C) アセチルアミドプロピル(m/z 100と102)とアセチルアミドブチル(m/z 114と116)領域の拡大図。

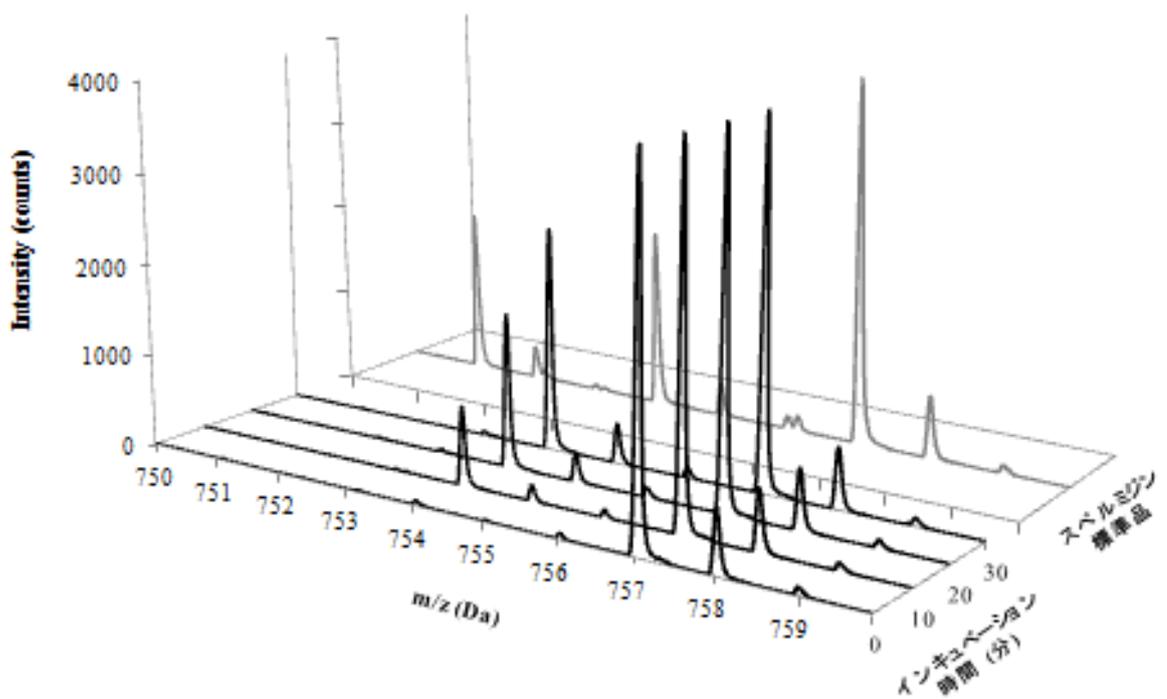


図14 APAO発現細胞抽出液による $^{15}\text{N}_3\text{-N}^1\text{AcSpm}$ の酸化の時間経過

30分間のインキュベーションの各時点で得られたマススペクトルを重ね合わせて表示し、 $^{15}\text{N}_3\text{-N}^1\text{AcSpm}$ から生成した $^{15}\text{N}_3\text{-Spd}$ の増加を示した。グレーの線は、Spd 1nmol、 $^{15}\text{N}_3\text{-Spd}$ 1nmolおよび $^{15}\text{N}_2, \text{D}_4\text{-Spd}$ 2nmolを混合した標準液のスペクトル。インキュベーションの条件は本文中に記載した。m/z 751、754および757に検出されたピークは、それぞれ、Spd、 $^{15}\text{N}_3\text{-Spd}$ および $^{15}\text{N}_2, \text{D}_4\text{-Spd}$ のHFB誘導体のアンモニウムアダクトを示す。各反応時間のスペクトルは、内部標準物質のピークを基準にスケールを調整した。

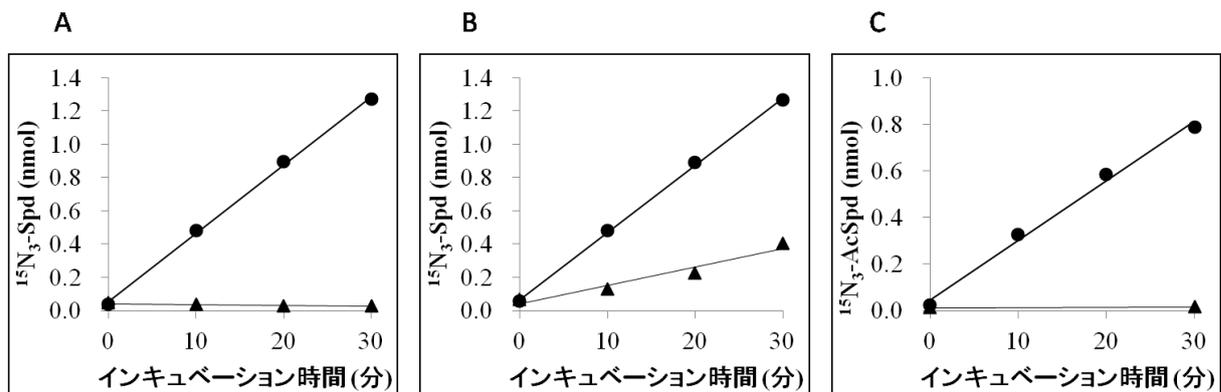


図15 APAO、SMOおよびSSAT酵素反応のタイムコース。

APAO、SMOおよびSSATの活性を、本文中に記載した方法で、それぞれ¹⁵N₃-AcSpm、¹⁵N₄-Spm および¹⁵N₃-Spdを基質として測定した。測定はいずれも二重測定で行った。(A)APAOの働きによって¹⁵N₃-AcSpmから生成した¹⁵N₃-Spdの増加のタイムコース。阻害剤MDL72527 (0.1 mM、30分間のプレインキュベーション)のない場合(●)とある場合(▲)。回帰直線： $y = 0.041x + 0.055$ 、 $R^2 = 0.999$ 、(B) SMOの働きによって¹⁵N₄-Spmから生成した¹⁵N₃-Spdの増加のタイムコース。阻害剤MDL72527(0.1 mM、30分間のプレインキュベーション)のない場合(●)とある場合(▲)。回帰直線： $y = 0.040x + 0.068$ 、 $R^2 = 0.999$ 、(C) SSATの働きによって¹⁵N₃-Spdから生成した¹⁵N₃-AcSpmの増加のタイムコース。アセチルCoAを添加した場合(●)と添加しない場合(▲)。回帰直線： $y = 0.026x + 0.047$ 、 $R^2=0.993$ 。

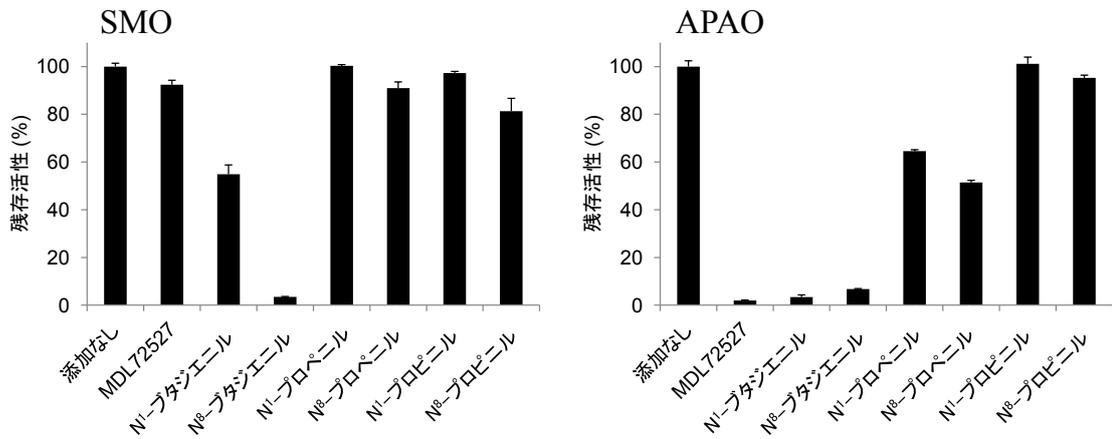


図17 合成したSpd誘導体とMDL72527のSMOおよびAPAOへの阻害効果

適量の酵素と各化合物1 μM を、37°Cで15 分間プレインキュベーションした後に活性を測定した。活性測定は第4章、第2節、第2項に記した方法で行った。(平均値 \pm SD、n=4)

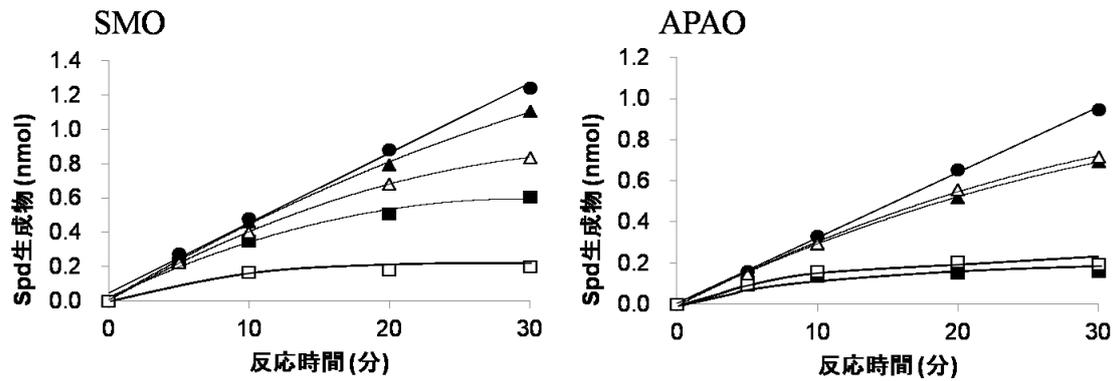


図18 N¹-ブタジエニルSpdおよびN⁸-ブタジエニルSpdによる酵素の経時的不活性化。

SMOおよびAPAOを、N¹-ブタジエニルSpdまたはN⁸-ブタジエニルSpdと0.2 mMの基質 (¹³C₂,¹⁵N₂-Spm(SMO活性測定用)または¹³C₂,¹⁵N₂-AcSpm (APAO活性測定用))を含む37°Cの溶液中で反応させた。経時的に反応液の一部を採取し、反応を停止して生成物である¹³C₂,¹⁵N₂-Spd量を測定した。阻害剤の濃度；添加なし(●)、N¹-ブタジエニルSpd 1 μM (▲)および10 μM (■)、N⁸-ブタジエニルSpd 1 μM (△)および10 μM (□)。

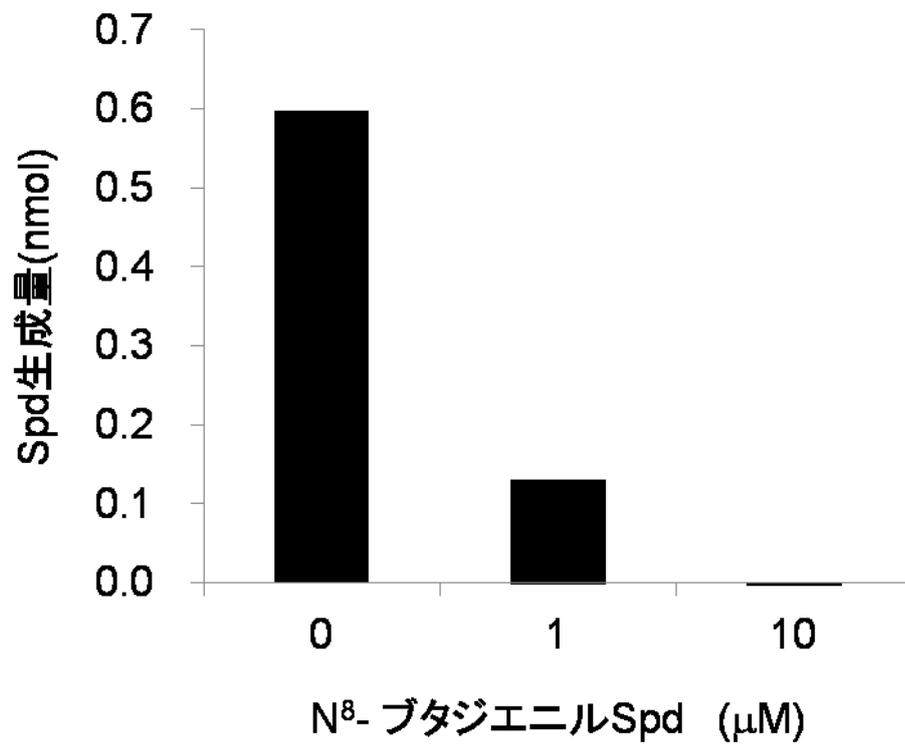


図19 SMOのN⁸-ブタジエニルSpdの阻害からの活性回復実験。

図18のSMOのタイムコース実験で使用した反応溶液を回収し、ゲルろ過によって脱塩を行った後、再び基質を添加してSMOの活性測定を行った。

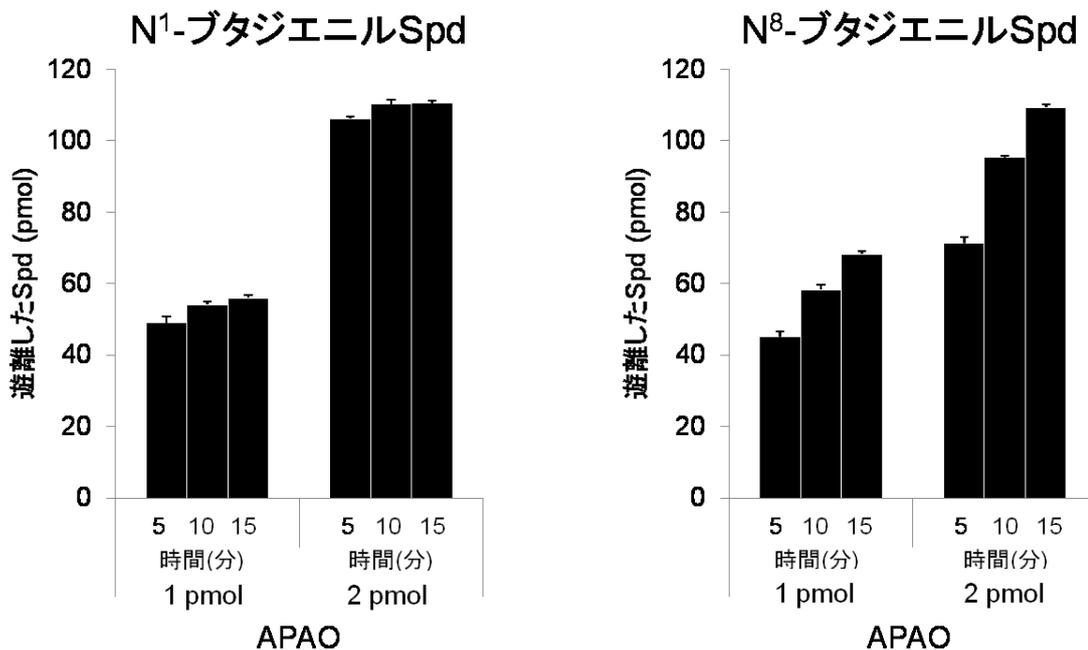
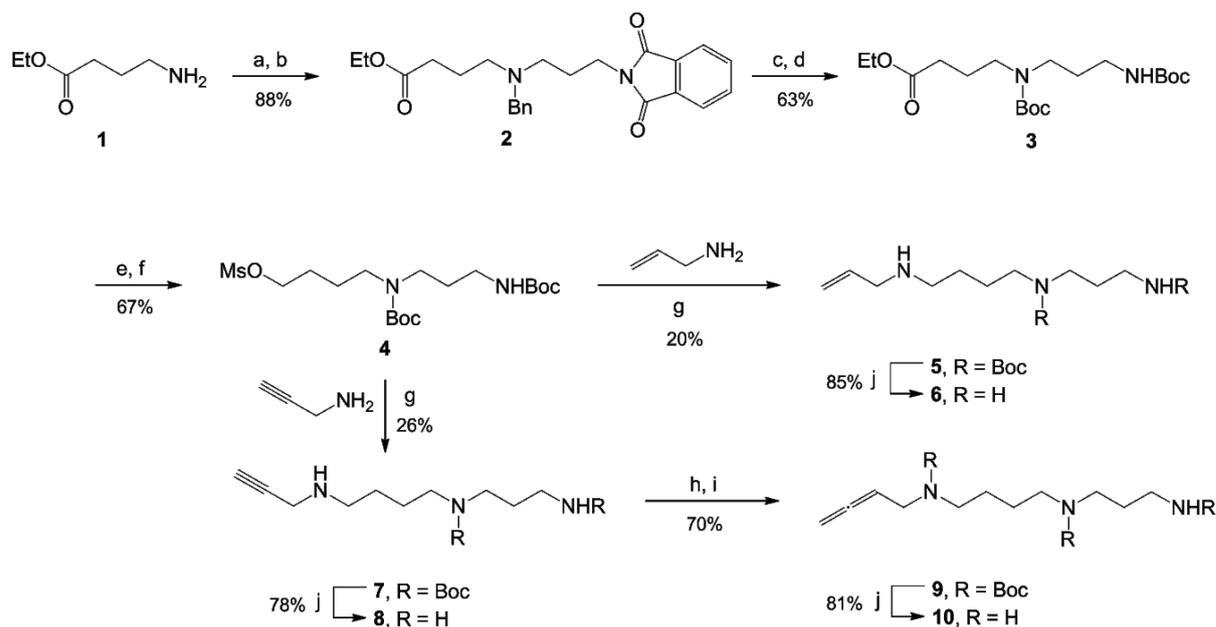


図20 N¹-ブタジエニルSpdおよびN⁸-ブタジエニルSpdとAPAOの反応によって生成するSpd量の時間経過

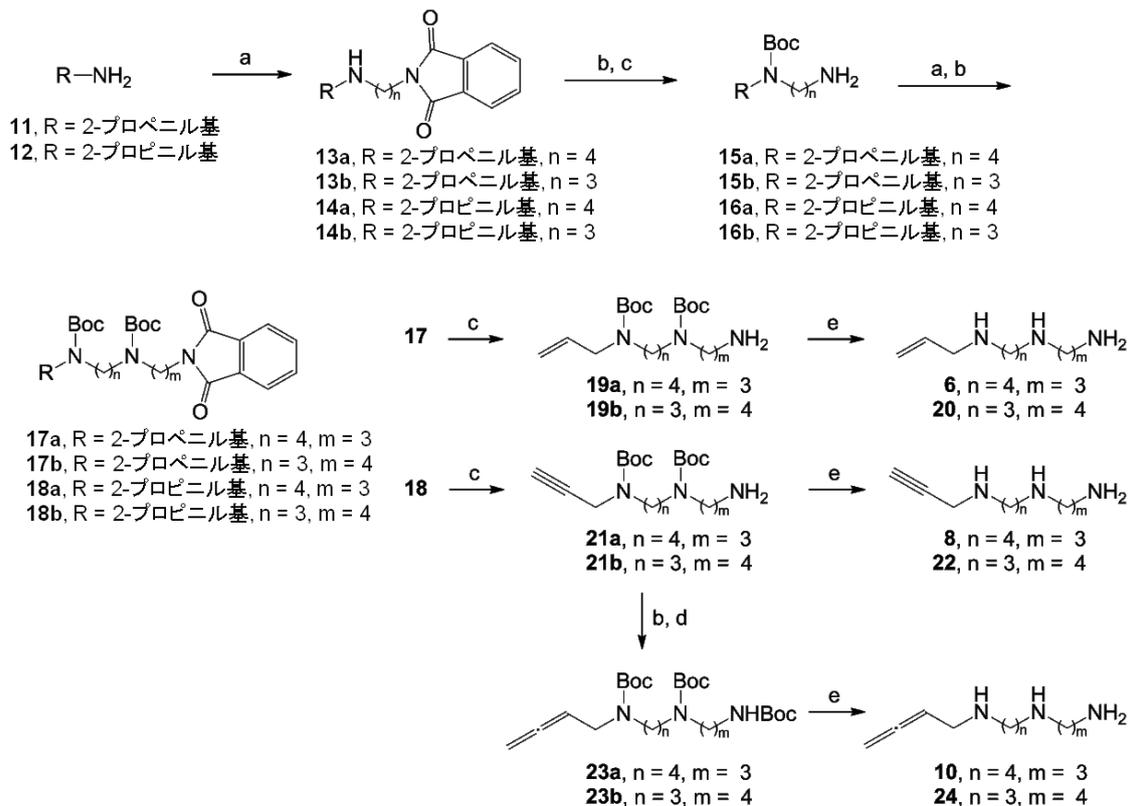
10 μ MのN¹-ブタジエニルSpdおよびN⁸-ブタジエニルSpdをAPAOに加え、37°Cで図中に示した各時間反応させた。生成したSpd量を、第4章、第2節の手順に従って測定した。ただし、質量分析のために試料を溶解する移動相の容積（標準法では10 ml）を0.2 mlに変更した。

スキーム 1 N⁸-置換基スペルミジン誘導体の合成^{a)}



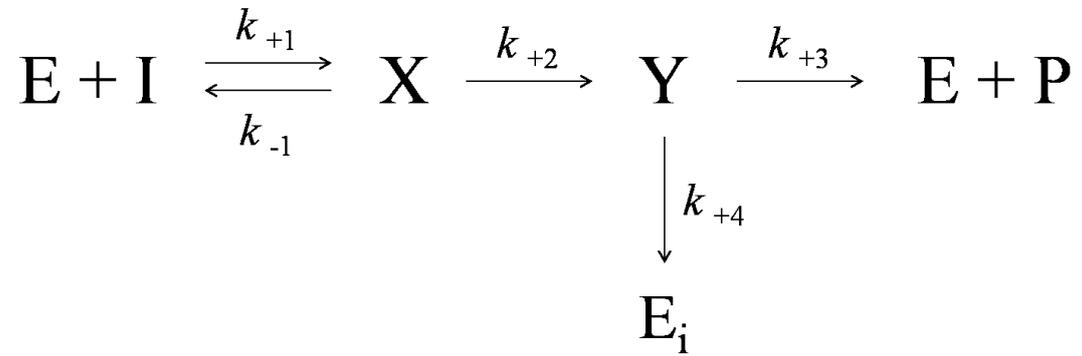
反応条件 : (a) ベンズアルデヒド、水素化ホウ素ナトリウムおよびメタノール、2時間、(b) *N*-(3-ブロモプロピル)フタレイミド、フッ化カリウム-セライトおよびアセトニトリル、還流、16時間、(c) パラジウム炭素および酢酸、60℃、4時間、その後、二炭酸ジ-*tert*-ブチル((Boc)₂O)およびアセトニトリル、12時間、(d) ヒドラジンおよびメタノール、還流、3時間、その後、(Boc)₂Oおよびアセトニトリル、12時間、(e) 水素化リチウムアルミニウムおよびジエチルエーテル、3時間、(f) メタンスルホニルクロリド、ピリジンおよびジクロロメタン、2時間、(g) 炭酸セシウム、モレキュラーシーブおよびジメチルホルムアミド、24時間、(h) (Boc)₂Oおよびアセトニトリル、12時間、(i) ホルムアルデヒド、臭化銅(I)、ジイソプロピルアミンおよびジオキサン、還流、1時間、(j) 塩酸(エタノール性)、50℃、12時間

スキーム2 N¹-置換スペルミジン誘導体およびN⁸-置換スペルミジン誘導体の合成^{a)}



試薬と反応条件: (a) *N*-(4-ブロモブチル)-フタルイミドまたは*N*-(4-ブロモプロピル)-フタルイミド、フッ化カリウム-セライトおよびアセトニトリル、還流、3時間、(b) (Boc)₂Oおよびアセトニトリル、12時間、(c) ヒドラジンおよびメタノール、還流、3時間、(d) ホルムアルデヒド、臭化銅(I)、ジイソプロピルアミンおよびジオキサン、還流、2時間、(e) 塩酸 (エタノール性)、50°C、12時間

スキーム3 不可逆阻害モデル



謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さった(公財)東京都医学総合研究所 病院等連携研究センター 連携推進室の川喜田正夫先生に心より感謝申し上げます。不自由なく研究するための環境を整えて頂き、日頃より温かく見守って下さったとともに、多くのご支援、ご指導を賜りましたことに心より感謝申し上げます。ならびに、熱心にご指導を賜り、いつもやさしくお言葉で励まして下さいました同研究室の鮫島啓二郎先生に心より感謝申し上げます。鮫島先生が日頃よりお話して下さった研究への情熱に引き込まれ、課題に取り組む楽しさを教えて頂きました。同研究室の平松恭子博士は細かなお気遣いで研究に支障がないよう陰から支えて下さりました。また、研究について直接ご指導、ご鞭撻を頂き、論文の内容についてご助言を頂いた工学院大学大学院 工学研究科 化学応用学専攻 有機合成化学研究室の南雲紳史教授、寺山直樹さんのご尽力に感謝申し上げます。先生方皆様のご指導に、改めまして心より感謝申し上げます。

本実験で使用した酵素の発現におきましては、岩崎香里博士、伊部一生さん、三浦俊之さんのご尽力に心より感謝申し上げます。尿検体の測定におきましては、斎藤文江さん、高浜恵美さんのご尽力に心より感謝申し上げます。尿検体の採取におきましては、都立駒込病院 大腸外科の高橋慶一先生、化学療法科の下山達先生をはじめ、沢山の先生方やスタッフのご尽力に心より感謝申し上げます。生成化合物の元素分析、NMRの測定におきましては、城西大学 薬学部 薬科学科 生物有機化学研究室の杉田義昭准教授、高尾浩一助教のご尽力に心より感謝申し上げます。本実験へ抗体を提供して下さったトランスジェニック社とミクリ免疫研究所株式会社の松本恭一博士に心より感謝申し上げます。

最後に、常に温かく応援してくれた両親に深く感謝します。