

昔取った杵柄で今も現役！



小島 周二
Kojima Shuji

1. 学部での卒業研究，大学院，そして帝京大学での研究

過去を振り返ると筆者の研究生活は RI と共に歩んできたと言える。RI との最初の出会いは 1972 年の東京理科大学薬学部での卒業研究時であった。当時は大学での RI を使ったトレーサ実験は珍しく、主として旧帝大や研究所のみで行われていた。そのことから、この手法を修得すれば今後の筆者の研究に役立つであろうと思い、RI を用いる研究テーマを選んだ。卒業研究の実験は「放射性医薬品 ^{125}I -馬尿酸による腎機能診の基礎的研究」であった。実験的腎炎や腎不全モデルラットを作製し、各疾患での ^{125}I -馬尿酸の尿への排泄パターンを左右両輸尿管に挿入したカニューレから経時的に各チューブに回収、放射能の排泄パターンが各腎障害モデルにどのように反映されるかを検討した。

学部卒業後に進学した千葉大学大学院薬学研究科では、アミノ酸の 1 つであるエチオニンによる肝癌発生に関するテーマを与えられた。この研究では転写 RNA のエチル化をみるために、 ^{14}C -エチオニンを用いた。当時所属していた研究室では、RI を使用するの筆者が初めてということもあり、管理区域内使用場所の確保や、器機・器具類の準備に追われたのを覚えている。

大学院修了後は、新設の帝京大学薬学部（神奈川県相模湖）に赴任することとなった。第 1 種放射線取扱主任者免許取得早々で実務経験の無い筆者の仕事は、RI 施設の設計と、科学技術庁放射線安全課への申請であった。この申請を作成して行く途中、予想もしない難題に突き当たった。神奈川県「水がめ」である津久井湖が近くにあるため「RI 廃水は一滴たりとも下水道に放流できない！」というものである。大学当局とも、蒸発乾固法をはじめとし

た種々の廃水処理方法を検討し、最終的にはタンクローリ方式を採用した。都内にある医学部の RI 廃水槽へ一時貯留した後に排水する許可を取得するのに、約 1 年も要した。

RI 施設が稼働してからは、濃度限度以下の廃液であっても、神奈川県～東京間の公道を使ってタンクローリ車が廃液を運搬するため、交通事故やら車からの廃水の漏出やらで、心配の種は尽きなかった。赴任 3 年目あたりからは少しずつ研究にも専念できる様になり、特異性の高いがん診断のための放射性医薬品の開発を目指して、当時問題となっていた「 ^{67}Ga -クエン酸のがん及び炎症組織への集積機序」の研究に着手した。

1.1 ^{67}Ga -クエン酸はがん及び炎症組織へ何故集積するのか？

1969 年 Edward と Hayes により、放射性金属である ^{67}Ga (Ga-citrate) がホジキン氏病患者のリンパ腫に集積することが明らかとなって以降、 ^{67}Ga (Ga-citrate) は、がんの核医学的診断用放射性医薬品として今日まで用いられている。しかしながら、本医薬品のがん組織集積性の特異性は低く、また炎症組織へも集積性を示すことから、がん組織により高い集積性を有する新規診断薬の開発が求められていた。そこで、新規がん診断用放射性医薬品の開発の手始めとして、 ^{67}Ga の両組織への集積機序の詳細を検討することにした。帝京大学薬学部を転出するまでの約 10 年間に渡る研究の結果、両組織への ^{67}Ga の集積に酸性ムコ多糖の 1 つであるヘパラン硫酸 (HS) が関与することを明らかにできた。即ち、「Ga(III) イオンが HS と極めて強固な配位結合を形成する」、「HS が多くのがん組織及び炎症組織に増加することにより、本金属元素ががん組織のみならず炎症部位にも集積する」という新規機序を解明することがで

きたのである。

1.2 リポソーム封入⁶⁷Gaによる特異的がん診断の試み

⁶⁷Gaによるがんのみの診断は不可能であることが集積機序により明らかになったことから、次のがん部位に指向性を示すことが報告されていたリポソームを⁶⁷Gaの担体として用いて、がん組織集積性の向上を検討することにした。リン脂質を水溶液に懸濁すると、2分子膜より成る閉鎖小胞を形成する。この小胞がリポソームであり、今日医薬品等のドラッグ・デリバリー・システム（DDS）に用いられているのは周知の通りである。

リポソームはその形状や粒子径により、Multi-lamella Vesicle (MLV), Small Unilamella Vesicle (SUV), Large Unilamella Vesicle (LUV) の3種に分類されるが、がん部位に集積性を有するリポソームは100 nm以下のSUVであった。そこでこのSUVに、金属キレートであるニトロトリ酢酸 (NTA) を配位子として用いて⁶⁷Gaを封入し、がん組織への集積性を検討した。その結果、⁶⁷Ga-クエン酸より遥かに優れたがん組織集積性を示した。更には、⁶⁷Ga-クエン酸はがん組織と炎症組織にはほぼ同程度の集積性を示すのに対して、SUV封入⁶⁷Gaは炎症組織よりもがん組織に顕著に高い(約4倍)集積性を示したのである。実用には至らなかったが、これらの結果は、“臨床で汎用されている⁶⁷Ga-クエン酸自身では不可能であるがんと炎症部位の鑑別診断を可能にする成果”であったと確信している。

2. 東京理科大学着任後の研究

12年間勤めた帝京大学を転出し、1989(平成元)年4月1日付で、母校である東京理科大学に新設された総合研究所生命科学部門に着任した。研究所には幾つかの冠講座が設置されており、民間数社の研究員が研究活動を行っていた。これら講座とRI施設をはじめとする共通機器の管理・運営が筆者らスタッフの業務であった。前大学で放射薬品学を担当した筆者は、本学着任と同時に、至極当然に研究所放射線施設の放射線取扱主任者に選任された。以降10年間、RI施設の管理・運営と放射線業務従事者の指導にあたった。幸い、両大学を通して1つの

事故を起こすこと無く無難にRI施設を管理・運営することができた。その結果、そのご褒美としてであろうか? 1999年10月に優良主任者として科学技術庁長官賞を授与された。これを契機に、帝京大学～理科大学に渡る“主任者”というストレスの多い任務を解かれ、放射線施設の管理業務から解放されたのである。ホッとしたというのが当時の正直な気持ちであった。そして学部とは違い研究所に所属していたことから、講義の負担は殆ど無く、本研究所着任時より開始した「低線量放射線に対する生体の適応応答」の研究に専念できた。

2.1 低線量放射線による生体内抗酸化系の誘導と免疫細胞の活性化

種々の動物あるいは培養細胞に、キノン系抗癌剤、金属、紫外線、過酸化水素等を曝露させることにより、生体は適応応答し、ROSに対する防御機構である抗酸化系を活性化することが知られている。そこで、マウスや培養細胞を用いて低線量のγ線照射による生体内抗酸化系の誘導を検討した。その結果、低線量のγ線照射によってグルタチオン (GSH) やチオレドキシシン (Trx) 等が誘導されることを、遺伝子及びタンパク質レベルで明らかにした。

低線量放射線の生体に対する作用が、水分子の放射線分解により生体内に産生されたROSに起因する。このことから、これら抗酸化物質の誘導はROSに対する適応応答の一反応であり、引き続き来襲する放射線 (ROS) に対処するための防御機構を整えるためであろうと考えられる。

この放射線による生体内抗酸化能の誘導が、Natural killer (NK) 細胞等の免疫細胞の活性化に繋がり、固形がんや転移がんの抑制/遅延をもたらすことも、その後明らかにできたのである。

2.2 ATPシグナリングの放射線バイスタンダー効果での役割

バイスタンダー (bystander = 傍観者) 効果とは、「直接放射線照射された細胞のみならず、周囲に存在する非照射細胞においても何らかの影響が現れる現象」を言い、“巻き添え効果”とも呼ばれる。

この効果のメカニズムとしては、

1) 細胞間のギャップジャンクションを介した情報伝達

2) 照射細胞から放出されたりガンドと非照射細胞膜に存在する受容体との相互作用

3) 照射細胞から放出されたバイスタンダー因子と非照射細胞膜に存在する受容体との相互作用

4) 照射細胞から放出されたバイスタンダー因子が直接非照射細胞に作用する
等が報告されていたが、その全容は十分とは言えなかった。

バイスタンダー効果は放射線の二次的影響に関与している可能性が高いため、本効果のメカニズムを明らかにし、放射線による二次的影響の一端を解明することは極めて重要な課題であった。筆者らは、刺激に応じて細胞外に放出される ATP と、細胞膜上に発現する ATP 受容体 (P2 受容体) に着目し、バイスタンダー効果の新規情報伝達分子としての ATP の機能の解明に 2006 年より着手した。ご存知の通り、ATP は細胞内ミトコンドリアで産生され、エネルギー通貨としてのみならず、細胞外からのストレス (液性や浸透圧変化、電気・機械的刺激) により容易に細胞外に放出され、情報伝達因子として働くことが、これまで神経伝達分野で報告されていた。しかしながら、放射線生物学の分野では、ATP の情報伝達因子としての報告はこれまで皆無であった。

筆者らは、ヒト表皮ケラチノサイト HaCaT 細胞に低線量の γ 線を照射することによって細胞外に ATP が放出されること、その後 P2 受容体の活性化を介したカルシウムイオンの細胞内流入の促進、細胞増殖等に関わる extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK-1/2) の活性化を明らかにした。

2.3 γ 線曝露チオレドキシシン (Trx-1) 誘導の P2X7・P2Y6 受容体の関与

放射線に高感受性を示し適応応答の 1 つとして抗酸化系の誘導が確認されているマウス・マクロファージ様 RAW264 細胞で、 γ 線照射による細胞外への ATP 放出を始めに検討し、P2X7 受容体、及びエキソサイトーシス等多くの経路を介して放出されていることを明らかにした。

次に、マウス・マクロファージ様 RAW264 細胞を用いて γ 線照射による P2Y6 受容体を介した Trx-1 の誘導を明らかにした。この誘導は、 γ 線照射に ATP 自身の細胞への添加によっても確認されたことから、放射線照射による Trx-1 誘導に、ATP

とその後の受容体 (P2Y6) の活性化を介した情報伝達系の関与を示唆することができた。

2.4 放射線抵抗性の ATP シグナリングからの検討

Priming/Adapting/Conditioning dose と呼ばれる低線量の放射線をあらかじめ照射しておき、その後 Challenging dose と呼ばれる致死線量の放射線を照射した際、致死率が有為に低下する現象は「放射線抵抗性の誘導」と呼ばれている。この現象の機構の詳細は未だ十分に解明されていないが、放射線による生体内抗酸化・DNA 修復能やがん抑制遺伝子等の発現誘導、シグナル伝達、アポトーシスによる死細胞の排除、免疫能の活性化等の関与がこれまでに報告されている。

DNA が放射線に暴露されると種々の損傷が生じる。これら損傷のうち、二重鎖切断の場合には、切断部位で ATM (ataxia telangiectasia mutated) が活性化し、ヒストン H2AX がリン酸化 γ H2AX (phosphorylated histone variant H2AX) される。更に、その部位に 53BP1 (tumor suppressor p53-binding protein 1) 等の修復タンパク質が集積し、最終的に二重鎖切断が修復される。しかし、今日までこのメカニズムについては十分明らかにされておらず、筆者らはこの修復機構の ATP シグナリングの解明に着手した。

肺がん A549 細胞に γ 線 (2.0 Gy) 照射すると、DNA 損傷修復機構の指標である γ H2AX, 53BP1 及び ATM の Focus 形成が増加するが、これらは細胞外 ATP 分解酵素添加により有意に抑制された。反対に、照射前の細胞外 ATP 分解酵素阻害薬添加、及び照射後の ATP, UTP (1,10 μ M) 添加によりこの Focus 形成は有意に増加した。このことから γ 線誘発 DNA 損傷修復機構に細胞外ヌクレオチドが関与する可能性が示唆された。更に、P2 受容体阻害薬を用いて ATP 放出に関与する受容体を同定した結果、P2X7 受容体が同定された。次に、 γ 線照射による DNA 損傷修復機構に関与する P2 受容体サブタイプを検討すると、P2Y6 と P2Y12 受容体阻害薬添加により有意な抑制が認められた。更に、P2Y6 及び P2Y12 受容体ノックダウン (KD) 細胞を調製し、両受容体の関与を確認した。これらの結果から、 γ 線照射による DNA 損傷修復機構に、P2X7, P2Y6 及び P2Y12 受容体に関与する可能性を示唆することができた。

以上、 γ 線誘発 DNA 損傷応答においても、 γ 線照射により P2X7 受容体を介して ATP が放出され、その後の P2Y6, P2Y12 受容体の活性化を介して γ H2AX, 53BP1 及び ATM の Focus が形成されることで、DNA 損傷が修復されるという新規メカニズムを提唱することができた。

2.5 放射線生物影響での ATP シグナリングの役割

これまで放射線による生物影響に P2 受容体を介した細胞外シグナル伝達が関与することは知られていなかったが、筆者らのこれまでの一連の研究によって ATP をはじめとする細胞外ヌクレオチド放出とその後のプリン受容体の活性化 (ATP シグナリング) が重要な役割を担っていることが新たに明らかとなった。

更にその後、どのようなメカニズムで細胞は放射線を感じ、細胞外へ ATP を放出するのかを、TRP チャンネル (Transient Receptor Potential channel) に着目し検討した。その結果、 γ 線による酸化ストレスによって TRPM2 チャンネルが活性化、P2X7 受容体依存的にコネキシン 43 を介して ATP 等のヌクレオチドが放出、その後細胞表面の P2Y6 及び P2Y12 受容体が活性化し、EGFR-ERK1/2 活性化、DNA 損傷修復、ROS 産生や抗酸化物が誘導されることを明らかにした。

以上、この ATP シグナリングは放射線からの生体の防護や修復といった放射線ストレス応答の効果的な誘導に重要であること、更に放射線適応応答や低線量放射線の生体に対する有益な効果やがん細胞の放射線抵抗性に関与している可能性も示唆される。ATP は細胞外に放出されるため、近傍の細胞に作用する可能性が示唆されるが、現在までの検討では、近傍の非照射細胞への影響 (バイスタンダー効果) への細胞外ヌクレオチドの確かな関与までは言及できない。バイスタンダー効果への ATP の役割をより明確にする為には、今後マイクロビームによる単細胞照射実験を用いて、照射細胞から非照射細胞に ATP 等を介して情報が伝わるのか詳細な検討が必要であろう。一方でごく最近、Mancuso らはマウス個体での放射線バイスタンダー効果で ATP とコネキシン 43 が関与するという非常に興味ある報告をしている。

「放射線生物影響における ATP シグナリング」の

研究は、放射線生物学 (生物物理学) と生理学・薬理学との境界領域で生まれた未開な研究領域といえ、今後更なる発展が期待される。

3. 定年後に見つけた楽しい毎日

大学 4 年時での卒業研究から定年退職までの間、放射線を使って研究をしてきた。医療での病気の診断や治療を目指した基礎研究であったが、実際にヒトに用いられたものは殆ど無かった。その理由は、ヒトでのトライアル (治験) は実施医療機関で「治験責任医師」の下で行われ、薬剤師や研究者が関わられるのは「治験協力者」として (医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令) であり、治験までのハードルが極めて高い為である。退職後は常勤の所属機関こそないものの、臨床医指導の下でヒトでの治験も可能になる。筆者の研究生活の後半 (10 年間程) では、動物を用いた小線量放射線のリウマチや、がん等の免疫病態に対する改善データを得ており、ヒトでの効果も期待できた。幸いなことに、数年前に研究会での筆者のプレゼン内容に興味を持ってくれた臨床医が出現し、以降筆者が作った治療計画に従って、がんやリウマチ患者に対するトライアルを今日まで実施している。ごく最近、大変感激した例を以下に紹介したい。

2016 年 8 月 22 日に余命数か月と言われた脳転移を有する乳癌患者さんの治療にかかわることになった。治療開始前の彼女は痩せて、生気もなく、杖無しでは歩行困難、更にはがんの脳転移による視力障害もあった。治療開始後 3 か月経過すると改善の兆しが現れ、その後劇的に回復、がんマーカー (CA15-3) 値もほぼ正常域までに低下した。その年の 12 月暮れの面会時に、ふっくらとしたお化粧顔で「こんにちは！」と挨拶された時には感激して“鬼の目にも涙”であった。

余命を宣告された患者さんに、「がん罹患者でない筆者がアドバイスするのは烏滸がましいことである！」とつい昨今まで思っていたが、これまでの経験を通して昨年筆者にできる励まし方を見出した。それは、各疾患に対する最新治療法の紹介である。ネットで掲載されている世界中の最新治療法を検索して、ヒットした論文を日本語に翻訳し、臨床医を介して患者に配信するというものである。

仮に筆者が余命宣告された場合、短い長いに関わらず「最期まで希望をもって日々を過ごせたら、それで良し！」として生きることが筆者の切なる願いである。

人が生まれてから最期を迎えるまで、束縛やストレスも無く思うままに毎日を過ごせることが幸せか否かは分からない。だが、少なくともやりたいと思っ

たことが実行できれば筆者は満足である。「あれこれ考えない!」、また「四の五の言わない!」、「今日は一生!」との思いで、毎日の生活にベストを尽くしたい。

(東京理科大学名誉教授)