

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651074

研究課題名(和文) 微細緑藻類による放射性物質除染法開発とその発癌抑制効果

研究課題名(英文) Development of nuclear decontamination procedures using a novel algal strain, *Parachlorella sp binos*, and its application to reduction of thyroid cancer risk

研究代表者

志村 浩己 (SHIMURA, HIROKI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40303416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規に発見した微細緑藻類 *Parachlorella sp binos* (Binos) は、福島第一原子力発電所事故にて環境中に放出された主な核種である放射性ヨウ素およびセシウム、ストロンチウム等の放射性陽イオンを高効率に取り込むことを明らかにした。さらに、二次元質量分析により、ヨウ素は細胞質内に取り込み、陽イオンはアルギン酸に富む細胞外マトリックスに結合することにより吸着することを明らかにした。さらに、ヨウ素は光合成により発生された活性酸素により能動輸送されることにより取り込まれることを明らかにした。本藻類を利用した環境中の放射性物質の除染方法は、現在、実際の福島県内の除染に利用されている。

研究成果の概要(英文)：We found that a novel algal strain, *Parachlorella sp binos*, uptakes radioactive iodine and radioactive cations such as cesium, and strontium, which were leaked from the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant. High-resolution secondary ion mass spectrometry (SIMS) showed a localization of accumulated iodine and cations in the cytosol, and the extracellular matrix, respectively. In addition, radioiodine was actively uptaken in the presence of superoxide generated by the photosynthesis. At present, the decontamination method using this algal strain is used for decontamination of the environment of Fukushima Prefecture.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：放射性物質 除染 微細緑藻類 甲状腺癌 活性酸素 RhoB 甲状腺ホルモン受容体

### 1. 研究開始当初の背景

東日本大震災により誘発された福島第一原子力発電所事故により、環境中に大量の放射性物質が放出され、降下した放射性物質による外部被曝および内部被曝による健康被害が危惧されていた。環境中に降下した放射性物質の除染および、原子力発電所内に貯蔵されている汚染水の除染は、福島復興に向けて、第一に取り組みなければならない課題であった。当研究代表者らは新種の微細緑藻類(バイノス)が非常に高効率に放射性物質を取り込む能力を持つことを見いだしており、これを利用した除染技術の開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

今回の研究では、バイノスの放射性物質取り込み機構の解明と、取り込み能力の増幅法の開発、バイノス投与による発癌抑制効果について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

放射性物質取り込みを検討するため、 $\text{Na}^{125}\text{I}$ 、 $^{85}\text{SrCl}_2$ 、 $^{137}\text{CsCl}$  を培養液に添加し、光照射下あるいは暗環境で培養し、取り込み率を検討した。また、放射性物質取り込み機構の解析するため、取り込まれたヨウ素とストロンチウムの細胞内分布を High-resolution secondary ion mass spectrometry (SIMS)により同定した。さらに、安定核種との共培養等により取り込み能の定量をおこなった。さらに、過酸化水素の添加等により、取り込み能増強方法の検討を行った。

また、甲状腺癌の抑制効果については、ヒト乳頭癌由来の BHP18-21 細胞を用い、実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 放射性ヨウ素の取り込み

1.5 kBq/ml の  $^{125}\text{I}$ -NaI をバイノスが懸濁した水中に加えると、時間依存的に放射性ヨウ素の取り込みが増加し、添加後 2 4 時間でほぼ最大レベルに達した。この取り込み反応は光照射(実験では 2000 lux)下でのみ観察され、光非照射下では取り込み反応は認められなかった。ヨウ素取り込み量はバイノスの濃度依存性に増加し、100 mg/ml (湿重量)では  $38.7 \pm 3.1\%$  を取り込み(図 5b)、濃縮率(バイノス/水層比)は最大  $19.3 \pm 0.5$  だった。

バイノスへのヨウ素の最大結合能を検討するため、非放射性 NaI を使用して  $^{125}\text{I}$  の結合阻害実験を行った。その結果求められた解離定数(Kd)と最大結合能(Bmax)は下記の通りである。

$$Kd = 141 \mu\text{M} \text{ (95\% CI: } 104 - 191)$$

$$B_{\text{max}} = 2.52 \text{ nmol/mg wet weight (CI: } 14.9 - 16.1) = 50.4 \text{ nmol/mg dry weight}$$

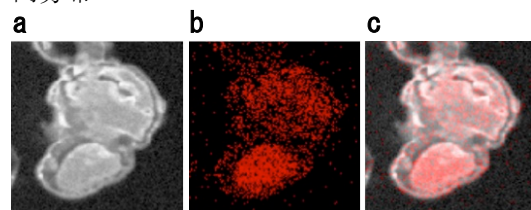
Bmax より最大結合放射エネルギーを  $^{131}\text{I}$  の比放射能 4600 TBq/g より計算すると、 $B_{\text{max}} = 1.52$

TBq/g・binsos となる。

バイノスでは、ヨウ素は光照射下でのみ取り込み反応が起こるため、バイノスに豊富に存在する葉緑体において光から転換したエネルギーを利用して取り込み反応が起こっていると考えられた。光合成により得られたエネルギーはスーパーオキシドを生成することが知られているため、スーパーオキシドの一種である過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )のヨウ素取り込みへの作用を検討した。その結果、暗環境においても 10  $\mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  が存在することにより、明環境とほぼ同等のヨウ素取り込み反応が起こることが判明した。

さらに、SIMS 法を用いてヨウ素の細胞内分布領域を解析した(図 1)。ヨウ素は細胞外マトリックスにはあまり分布せず、細胞質内に多く分布していた。図 1 の結果も併せると、ヨウ素は光合成により生成されるスーパーオキシドを利用し、細胞壁と細胞膜を通過し、細胞質内に取り込まれていると考えられた。

図 1 二次元質量分析によるヨウ素の細胞内分布



1  $\mu\text{M}$  の NaI 存在下にてバイノスを培養後の  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  (a) および  $^{127}\text{I}$  (b) の分布、および両者のマージ像(c)

#### 2. 放射性ストロンチウムの取り込み

2 kBq/ml の  $^{85}\text{Sr}$ - $\text{SrCl}_2$  をバイノスが懸濁した水中に加えると、バイノスの濃度依存性に取り込み量が増加し、100 mg/ml (湿重量)では  $75.9 \pm 4.2\%$  を取り込み、濃縮率(バイノス/水層比)  $31.9 \pm 6.7$  に達した。ストロンチウムの取り込みは添加後 1 分より認められ、10 分後には最大レベルに達した。

バイノスへのストロンチウムの最大結合能を検討するため、非放射性  $\text{SrCl}_2$  を使用して  $^{85}\text{Sr}$  の結合阻害実験を行った。その結果求められた解離定数(Kd)と最大結合能(Bmax)は下記の通りである。

$$Kd = 387 \mu\text{M} \text{ (95\%信頼区間(CI): } 318 - 472 \mu\text{M)}$$

$$B_{\text{max}} = 15.5 \text{ nmol/mg wet weight (CI: } 14.9 - 16.1) = 310 \text{ nmol/mg dry weight (CI: } 298 - 322)$$

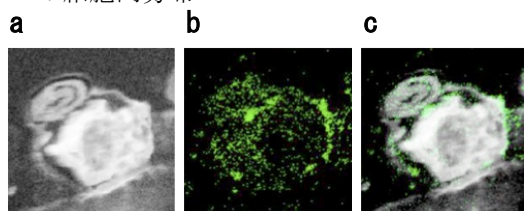
Bmax より最大結合放射エネルギーを  $^{90}\text{Sr}$  の比放射能が 5.11 TBq/g であるため、 $B_{\text{max}} = 6.73$  GBq/g・binsos となる。

Sr は 2 価のカチオンであることからカルシウムイオンとの類似性が知られている。 $\text{CaCl}_2$  による放射性ストロンチウムの結合阻

害実験を行った結果、IC50 および Ki とともに 183  $\mu\text{M}$  (141-238  $\mu\text{M}$ ) であり、ストロンチウムとほぼ同等の性質を示した。

バイノスがストロンチウムを取り込む機序を明らかにするため、二次元質量分析法 (SIMS) を用いてストロンチウムの細胞内分布領域を解析した。本法では、ストロンチウムを取り込んだバイノスを凍結の上、薄切し、セシウムレーザーを照射することにより二次元質量分析を行う。図 3a では、炭素と窒素原子の分布を画像化したものであるが、バイノスの細胞質に多く分布し、細胞外マトリックス辺縁にも線状に分布していた。一方、ストロンチウム (図 2) は細胞外マトリックスの辺縁のみに分布していた。バイノスはアルギン酸を多く含む細胞外マトリックスを持ち、ストロンチウムはそのカルボキシル基に電氣的に結合することが示唆される。

図 2 二次元質量分析によるストロンチウムの細胞内分布



1 $\mu\text{M}$  の  $\text{SrCl}_2$  存在下にてバイノスを培養後の  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  (a) および  $^{88}\text{Sr}^{35}\text{Cl}$  (b) の分布、および両者のマージ像 (c)

### 3. 放射性セシウムの取り込み

2 kBq/ml の  $[^{137}\text{Cs}]\text{-CsCl}$  をバイノスが懸濁した水中に加えると、バイノスの濃度依存性に取り込み量が増加し、100 mg/ml (湿重量) では  $41.0 \pm 4.8\%$  を取り込み (図 4a)、濃縮率 (バイノス/水層比)  $8.00 \pm 1.49$  であった (図 4b)。セシウムの取り込みは添加後 1 分より認められ、10 分後には最大レベルに達した。また、バイノスへのセシウムの最大結合能を検討するため、非放射性  $\text{CsCl}$  を使用して  $^{137}\text{Cs}$  の結合阻害実験を行った (図 4c: ●)。その結果求められた解離定数 (Kd) と最大結合能 (Bmax) を求めたが、ストロンチウムと異なり、低親和性と高親和性の結合部位が想定される結果であった。

高親和性結合部位

$$K_d = 19.90 \mu\text{M} \text{ (CI: } 6.20 - 64.2)$$

$$B_{\text{max}} = 21.3 \text{ pmol/mg wet weight (CI: } 16.6 - 25.9) = 426 \text{ pmol/mg dry weight}$$

低親和性結合部位

$$K_d = 7.25 \text{ mM (CI: } 3.11 - 16.90)$$

$$B_{\text{max}} = 7.80 \text{ nmol/mg wet weight (CI: } 6.43 - 9.17) = 156 \text{ nmol/mg dry weight}$$

低親和性結合部位の Bmax より最大結合放射エネルギーを  $^{137}\text{Cs}$  の比放射能 3.215 TBq/g より計算すると、 $B_{\text{max}} = 3.44 \text{ GBq/g} \cdot \text{binos}$  となる。

Cs は 1 価のカチオンであることからナト

リウムあるいはカリウムイオンとの類似性が知られている。 $\text{NaCl}$  による放射性ストロンチウムの結合阻害実験を行った結果 (図 4c: ○)、高親和性結合部位が  $\text{IC}_{50} = 0.670 \text{ mM}$  (CI: 0.059 - 7.61),  $K_i = 0.585 \text{ mM}$  (CI: 0.052 - 6.64), 低親和性結合部位が  $\text{IC}_{50}$  および  $K_i$  とともに 92.1 mM (CI: 36.9 - 230.4) であり、セシウムの 1/10 以下の結合親和性を示した。この結果は比較的高い  $\text{NaCl}$  下においても Cs を吸着しうる事を示している。セシウム取り込み機序については、前述の SIMS はセシウムレーザーを使用するためセシウムの解析が不可能である。セシウムはストロンチウムとほぼ同等に 10 分以内にて最大結合に達すること、1 価のカチオンであるため、細胞外マトリックスに結合しうる事が想定されている。

### 4. 放射線被曝による甲状腺癌の抑制

Small GTPase の一つである RhoB は、放射線照射後の細胞においてアポトーシスを誘導する作用があることが判明していることから、RhoB との関係を検討した。その結果、甲状腺癌症例の癌組織において RhoB の発現が著明に低下している事が明らかになった。甲状腺ホルモン受容体 (TR) の dominant negative 点変異を導入した TR $\beta$  PV ノックインマウス (TR $\beta$  PV/PV) は遠隔転移を伴う甲状腺癌が自然発症するため、逆に甲状腺ホルモンにより TR を活性化したところ、RhoB の発現を増加させ、甲状腺癌の増殖を抑制することを明らかにした。従って、放射性ヨウ素内部被曝後の甲状腺に甲状腺ホルモンアナログ等で甲状腺内に RhoB の発現を誘導することは、発癌およびその進行に対し、非常に有効な手段になりうる事が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Shimura H, Itoh K, Sugiyama A, Ichijo S, Ichijo M, Furuya F, Nakamura Y, Kitahara K, Kobayashi K, Yukawa Y, Kobayashi T: Absorption of radionuclides from the Fukushima nuclear accident by a novel algal strain. PLoS One 7: e44200, 2012. 査読有
- ② Takahashi K, Furuya F, Shimura H, Kaneshige M, Kobayashi T. Impaired oxidative endoplasmic reticulum stress response caused by deficiency of thyroid hormone receptor  $\alpha$ . J Biol Chem. 289: 12485-12493, 2014. 査読有
- ③ Ichijo S, Furuya F, Shimura H, Hayashi Y, Takahashi K, Ohta K, Kobayashi T,

Kitamura K.  
Activation of the RhoB Signaling Pathway by Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  in Thyroid Cancer Cells. PLoS One 9: e116252, 2014. 査読有

- ④ 志村浩己: 微細藻類「バイノス」による放射性物質の除去. 山梨医科学雑誌 27: 23-30, 2013. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Sayaka Ichijyo, Fumihiko Furuya, Masashi Ichijyo, Hiroki Shimura, Yoshitaka Hayashi and Tetsuro Kobayashi. Liganded-thyroid Hormone Receptor  $\beta$  Induces Anaplastic Thyroid Cancer Cell Death via Activation of the RhoB signaling Pathway. ENDO 2013 The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo. 2013/06/16
- ② Kazuya Takahashi, Fumihiko Furuya, Hiroki Shimura and Tetsuro Kobayashi: Oxidative Endoplasmic Reticulum Stress Response Caused By Deficiency of Thyroid Hormone Receptor  $\alpha$ . ICE-ENDO 2014 THE ENDOCRINE SOCIETY'S 96th ANNUAL MEETING & EXPO. 2014/06/22
- ③ Fumihiko Furuya, Kazuya Takahashi, Hiroki Shimura, Sayaka Ichijyo and Tetsuro Kobayashi: Ligand-Bound Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  Induces Cancer Cell Cycle Arrest. ICE-ENDO 2014 THE ENDOCRINE SOCIETY'S 96th ANNUAL MEETING & EXPO. 2014/06/22
- ④ 一條沙耶花、古屋文彦、志村浩己、一條昌志、北村健一郎: 甲状腺ホルモン受容体は RhoB 経路を活性化し甲状腺癌細胞増殖を抑制する. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015/04/23
- ⑤ 古屋文彦、志村浩己、一條沙耶花、遠藤登代志、北村健一郎: 低分化甲状腺癌 RhoB プロモータ領域において TR $\beta$  はリガンド依存性にヒストンアセチル化を誘導する. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015/04/23

[図書] (計 1 件)

- ① 志村浩己, 伊藤勝彦, 杉山篤, 湯川恭啓, 小林哲郎: 微細緑藻類「バイノス」を用いた放射性物質の除去. 齋藤勝裕監修: 東日本大震災後の放射性物質汚染対策. 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京, p 223-229, 2012.

[その他]

- ① 志村浩己: 福島除染で活用へ. 毎日新聞

2012/9/12

- ② 志村浩己: 除染に効果 新種の藻. 読売新聞 2012/9/12

- ③ 志村浩己: 藻類で 99%超除染. 山梨日日新聞 2012/9/12

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志村浩己 (SHIMURA, Hiroki)  
福島県立医科大学医学部臨床検査医学講座・主任教授  
研究者番号: 40303416

### (2) 研究分担者

古屋文彦 (FURUYA, Fumihiko)  
山梨大学医学部第三内科・講師  
研究者番号: 90456450

### (3) 連携研究者

一條昌志 (ICHIJO, Masashi)  
山梨大学医学部第三内科・助教  
研究者番号: 504336854