

最終講義

フリーラジカルの医学

吉 川 敏 一

京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学*

Free Radicals and Medicine

Toshikazu Yoshikawa

*Department of Molecular Gastroenterology and Hepatology,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

抄 録

種々の疾患の病因, 病態における活性酸素・フリーラジカルの役割が明らかになりつつある。また, 多くの活性酸素・フリーラジカルの関与する疾患群が明らかにされてきている。活性酸素の産生機構には多くのものが存在している。白血球をはじめとする食細胞は生体内における最大の活性酸素産生源であるが, 環境因子としての紫外線, 放射線, 喫煙などもその産生源として重要である。活性酸素・フリーラジカルは生体膜, 核酸, 蛋白, 生体内活性因子などに種々の障害を与え, 膜脂質の過酸化反応, 酸化 DNA 損傷, 蛋白変性などを引き起こすだけでなく, 多くの生命現象の情報伝達の制御因子としても作用している。最終講義として, 活性酸素・フリーラジカルの生成と消去における基本的事項, 疾病との関わりについて, 研究の歴史を振り返りながら解説する。

キーワード: フリーラジカル, 活性酸素, 酸化ストレス, 酸化修飾タンパク。

Abstract

There is a growing body of experimental and clinical data to suggest that several organs may be subjected to considerable oxidative stress induced by oxygen-derived free radicals associated with acute and chronic inflammation. Many sources are present in the production of free radicals, but activated phagocytes including neutrophils may play an important role as an endogenous source of free radicals. As exogenous sources, ultraviolet, radiation, and smoking are also important. Free radicals can attack biological molecules such as lipids, proteins, and DNA, inducing lipid peroxidation, protein oxidation, and oxidative DNA damage. Recently, many markers of oxidative stress have been proposed, including 4-hydroxy-2-nonenal, isoprostan, 8-hydroxyguanine, and ubiquinol-10. It has been developed that the free radicals act as a mediator of the regulation of many life phenomena. We explained it how generation and elimination of free radical were associated with life style-related diseases for a final lecture while looking back toward the history of my research.

Key Words: Free radicals, Reactive oxygen species, Oxidative stress, Oxidative modified protein.

フリーラジカル，活性酸素，酸化ストレスとは？

通常，原子は原子核を中心として，各電子軌道に2個の電子が対になって存在するが，まれに対になっていない電子がある．これを不対電子といい，この不対電子をもつ分子や原子をフリーラジカルという(図1)．不対電子は対になるうとするため，フリーラジカルは一般に不安定で反応性が大きい．酸素 O_2 は，その生体内における代謝過程で四電子還元されるわけであるが，その還元過程あるいはエネルギー付与による電子の励起，遷移金属との結合により，反応性が高まる．このようにして生じる酸素分子より活性の高い酸素種を総称して活性酸素と呼ぶ．スーパーオキシド，過酸化水素，ヒドロキシルラジカル，一重項酸素を狭義の活性酸素というが，広義には図2に示すように多くのフリーラジカルを含むこともある．構造式で右肩

に示した不対電子をもつものがフリーラジカルである．たとえば，過酸化水素は活性酸素ではあるが，不対電子を持たないためフリーラジカルではない．ただし，過酸化水素は鉄などの遷移金属の存在下では容易に1電子還元され，ヒドロキシルラジカルを生じるため，重要な活性酸素として位置づけられている．好氣的生物にとっては，これらの反応性の高い活性酸素を解毒消去することが生命維持に不可欠で，進化の過程でさまざまな抗酸化的防御機構を獲得してきた．また，その高い反応性をうまく利用することにより，種々の生命現象を調節してきたのも事実である．

生命現象との関わりにおいては，フリーラジカルのなかでも酸素に由来する種々のフリーラジカルが注目されているが，以下のような理由がある．生体内では，酸素を利用する過程において種々の活性酸素種が生成している．しかし，生体はこの活性酸素種を消去する極めて巧

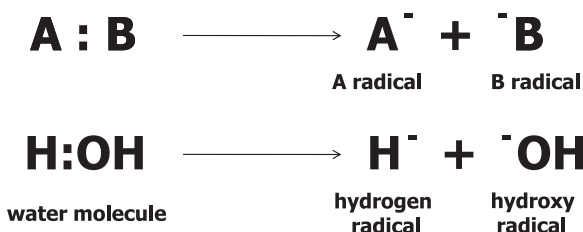


図1 フリーラジカルとは

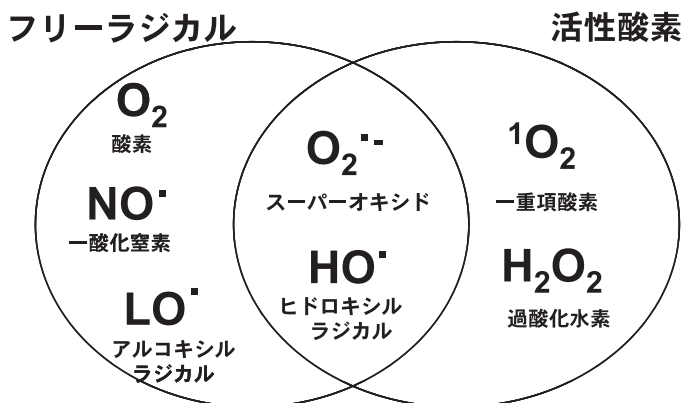


図2 フリーラジカルと活性酸素の関係

みな防御機構を十分にそなえているために、生理的条件下では酸素代謝の副産物である活性酸素・フリーラジカルは、必ずしも怖いものではない。しかし、活性酸素の過剰な生成や、あってはならない場所での生成は、その局所での生成と消去の平衡関係を崩すこととなり、いわゆる酸化ストレス負荷の状態となり、活性酸素・フリーラジカルは生体の膜や組織を構成する生体内分子を攻撃して、各種疾患を誘発する。つまり酸化ストレスとは「生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾き、生体にとって好ましくない状態」と定義されている。その後、故意に酸化ストレスを利用する場合（例えば出産における産道確保のためのアポトーシス）や、酸化ストレスを契機に生体防御能を増強する（たとえば適度の運動や虚血）などポジティブな側面も解明されてきた。そこで、酸化ストレスは単に「生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、前者に傾いた状態」と定義するほうがより一般的である。

活性酸素・フリーラジカルの 生体内での生成

フリーラジカルは生体内で生成されるだけでなく、外部環境にも多く存在する。フリーラジ

カルを生成する環境因子としては、大気汚染物質、放射線、ある種の薬剤、放射線、紫外線、たばこなどが知られており、こうした環境因子に接することによりフリーラジカルを生体に取り込むことになる（図3）。一方、生体内でもフリーラジカルは発生している。ミトコンドリア電子伝達系あるいはミクロソーム電子伝達系内のある種の酵素、オキシダーゼ系酵素、鉄含有タンパク質などがフリーラジカル、とくに酸素に由来するフリーラジカルの生成源である（図4）。炎症、虚血性疾患などとの関連では、好中球をはじめとする食細胞が最も注目されている。好中球を含む食細胞は、細菌、種々の粒子状または可溶性刺激物により細胞膜に存在するNADPH oxidaseが活性化されると、爆発的な酸

- 遷移金属 (Fe^{2+} , Cu^{+})
- 虚血再灌流
- 白血球、Nox/Duox
- ミトコンドリア
- 種々の代謝酵素
- 薬剤
- 環境因子

図4 活性酸素・フリーラジカルの生成源



図3 環境因子による活性酸素・フリーラジカルの生成

素消費と相当するスーパーオキシド産生が生じる。好中球の生成するスーパーオキシドならびにそれより派生する種々の活性酸素・フリーラジカル種は殺菌作用や抗腫瘍効果の主たるメディエーターであり、生体防御の点で重要な役割を果たしている。好中球の NADPH oxidase の遺伝子異常として慢性肉芽腫症が有名であるが、幼少時からくり返し重篤な感染を引き起こす(図5)。しかし、一方では、好中球より生成される過剰な活性酸素種は虚血再灌流障害や自己免疫疾患をはじめとする炎症反応において組

織障害性に働いていることも明らかとなりつつある。生じたスーパーオキシドは、酵素的あるいは非酵素的に還元を受け、より反応性の高い活性酸素種(過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、次亜塩素酸)となる。急性呼吸窮迫症候群、潰瘍性大腸炎、急性胃粘膜病変、ペーチェット病などは活性化した好中球により産生される活性酸素種が病変形成に関与している。さらに、多くの疾患において活性化好中球が関与することが明らかとなり、我々は「好中球病」なる疾患概念を提唱している(図6)。最近では、血管

- NADPH酸化酵素の異常に起因する遺伝性疾患
- 好中球の活性酸素産生障害
- 乳児期より肉芽腫形成を特徴とし、重症感染を繰り返す

Common infection sites in CGD patients

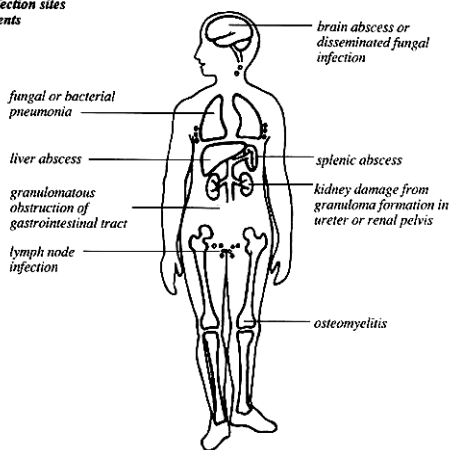


図5 慢性肉芽腫症 Chronic granulomatous disease (GD)

- 内科・小児科領域
 - 呼吸器領域：気管支喘息、間質性肺炎
 - 消化器領域：潰瘍性大腸炎、自己免疫性肝炎
 - 免疫異常疾患：関節リウマチ、SLEなどの膠原病
 - 腎臓疾患：ネフローゼ症候群
 - 重症感染症
 - 血液疾患：溶血性貧血
- 外科・整形外科領域
 - 手術侵襲、外科的ショック
 - 強直性脊椎炎
- 皮膚科領域
 - 湿疹・皮膚炎群、天疱瘡群、乾癬および類症など
- 眼科領域
 - ぶどう膜炎などの炎症
- 耳鼻咽喉科領域
 - 難治性口内炎

図6 好中球病

内皮，平滑筋細胞，消化管粘膜上皮そのものからも活性酸素が産生されることが明らかとなっている．このような非貪食細胞に発現する活性酸素産生酵素 gp91-phox の 6 つのホモログが新たに同定され，NADPH oxidase (Nox) Dual oxidase (Duox) ファミリーとして整理され，その生理作用に注目が集まっている．消化管粘膜上皮では，消化管粘膜固有の自然免疫応答を制御する新たな機構として，toll-like receptor (TLR) ファミリーを介する Nox1 の活性化と，活性酸素依存性の nuclear factor- κ B (NF- κ B)

の活性化経路が明らかとなり，炎症・活性酸素によるがん発症を結びつける新たな経路と考えられている．

フリーラジカルによる障害とその防御

フリーラジカルは非特異的な反応をすることが多く，多くの生体内分子を標的としている(図7)．脂質，核酸，アミノ酸，炭水化物，種々の生物学的活性物質などを標的とするが，標的が異なるがゆえに多くの病態・疾患と関連していることになる(図8)．とくに，すべての細胞膜

Target	Consequence
Lipid	peroxidation, membrane change
Nucleic acids	cell cycle change, mutation, base modification
Amino acids	protein denaturation, degradation, enzyme inhibition, cross linking
Carbohydrate	cell surface receptor change
Cofactors	Metabolic change
Hyaluronic acid	depolymerization
Biological factors	Inactivation of α 1-antitrypsin, chemotactic factors, mediators, NO

図7 フリーラジカルの標的となる分子

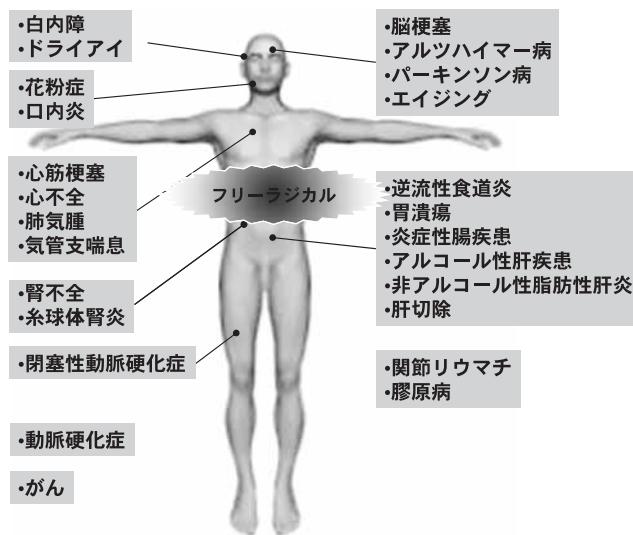


図8 フリーラジカルと疾患

の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸は活性酸素により攻撃され、脂質過酸化連鎖反応を介して過酸化脂質を生成する。生体膜は脂質や蛋白で構成されているが、それらは細胞や小器官を仕切る隔壁としてのみならず、生理活性物資の素材として、あるいは酵素として、膜表面の受容体として多様な機能を集約した場を形成している。それゆえ、この連鎖的脂質過酸化反応は、膜構造の破壊だけでなく、そこで働く蛋白の酵素作用や受容体機能も大きな障害を被ることになる。このようなフリーラジカルによる脂質過酸化反応は生体膜すべてに共通しており、その障害がたとえば神経細胞におよぶと、細胞壊死、アポトーシス、リポフスチンの沈着などを生じる。

このフリーラジカル連鎖反応を開始させるものとしては、ヒドロキシルラジカルや鉄-酸素錯体などが推定されている。スーパーオキシドはそれ自体よりも、これら活性種の前駆体として重要とされている。それゆえ、これらの活性酸素種・フリーラジカルの消去剤は、脂質過酸化反応の開始を予防することができる可能性がある（予防的抗酸化剤）(図9)。いったん不飽

和脂肪酸より水素引き抜き反応が生じると、ペルオキシラジカルを担体として脂質過酸化反応は連鎖的に進行し、脂質過酸化物が生成する。このペルオキシラジカルを捕らえ、連鎖反応を断つものとしてトコフェロールのようなラジカル捕捉型抗酸化剤がある。また、生成した過酸化脂質はそれ自体も悪玉であり、局所より血液中に流出し、血管病変をはじめとする二次的病変の原因にもなりうる。それゆえ、この過酸化脂質をアルコールなどに還元するものも生体内で抗酸化作用を発揮する可能性がある（過酸化脂質消去剤）。また、酸化的な損傷を受けた脂質、蛋白質、DNAなどを修復・再生する機構も、フリーラジカルに対する最終的な防御機構となる。

フリーラジカルと消化器疾患

活性酸素・フリーラジカルの関与が証明されたのは1983年 Granger らが小腸の虚血再灌流傷害がスーパーオキシドを消去するスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の投与により抑制されることを報告したのが最初である。その後、多くの臓器でこの現象が確認され、フリー

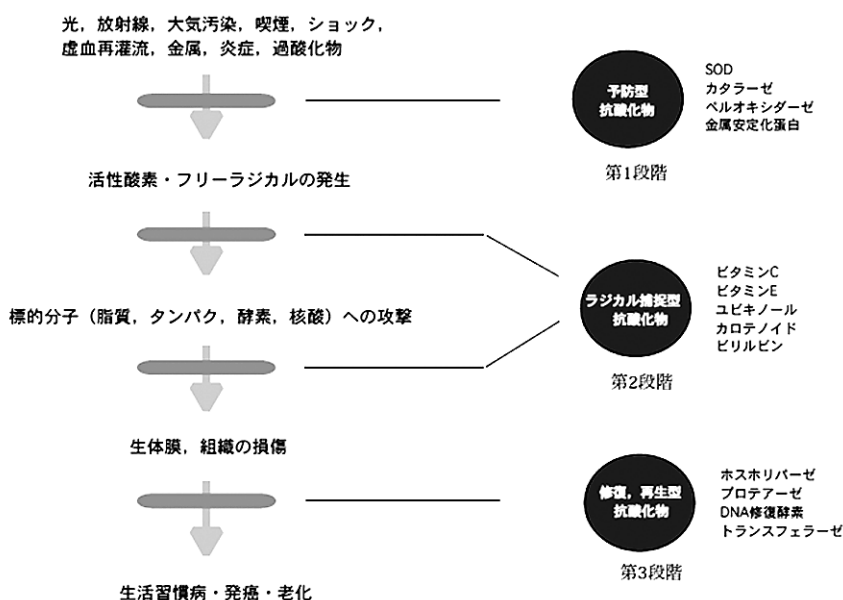


図9 活性酸素・フリーラジカルに対する生体の防御機構

ラジカル研究が盛んになった経緯がある。われわれもラット腹腔動脈を血管鉗子により遮断することにより虚血再灌流性胃粘膜傷害モデルを作成し、活性酸素・フリーラジカルの関与を報告した(図10)。虚血を継続させるよりも虚血30分後に再灌流した方が胃粘膜傷害の程度は強く、脂質過酸化の指標であるチオバルビツール酸反応物質はより高値であることを報告した。さらに、活性酸素消去酵素(SOD+カタラーゼ)は病変を抑制するだけでなく、脂質過酸化反応の指標の上昇を有意に改善させた。肝臓移植、肝切除術においても再灌流傷害は重要な問題であり、磁気共鳴スピン装置を用いたフリーラジカルの測定により、15分以内の虚血であれば再灌流後のフリーラジカル生成が有意に少ないことを報告した(図11)。この実験結果は、現在臨床の肝切除術の現場で実際に応用さ

れている。

潰瘍性大腸炎における実験モデルでの検討でも好中球の関与、活性酸素の関与は明らかであり、このような活性化した白血球を取り除くことが病態改善につながるのではないかと考え、白血球除去療法の臨床応用に関わるようになった。結果、白血球除去療法は潰瘍性大腸炎に有効であり(図12)、さらにクローン病・関節リウマチなどにも臨床応用されることになった。

フリーラジカル反応を利用した癌治療

フリーラジカル反応により組織障害が引き起こされることが明らかになると、フリーラジカルを癌治療に応用することを考えついた。加水分解ジャガイモデンプンを肝動脈に注入すると30分間の虚血を引き起こし、その後アミラーゼにより溶解されることから、肝臓で虚血再灌流

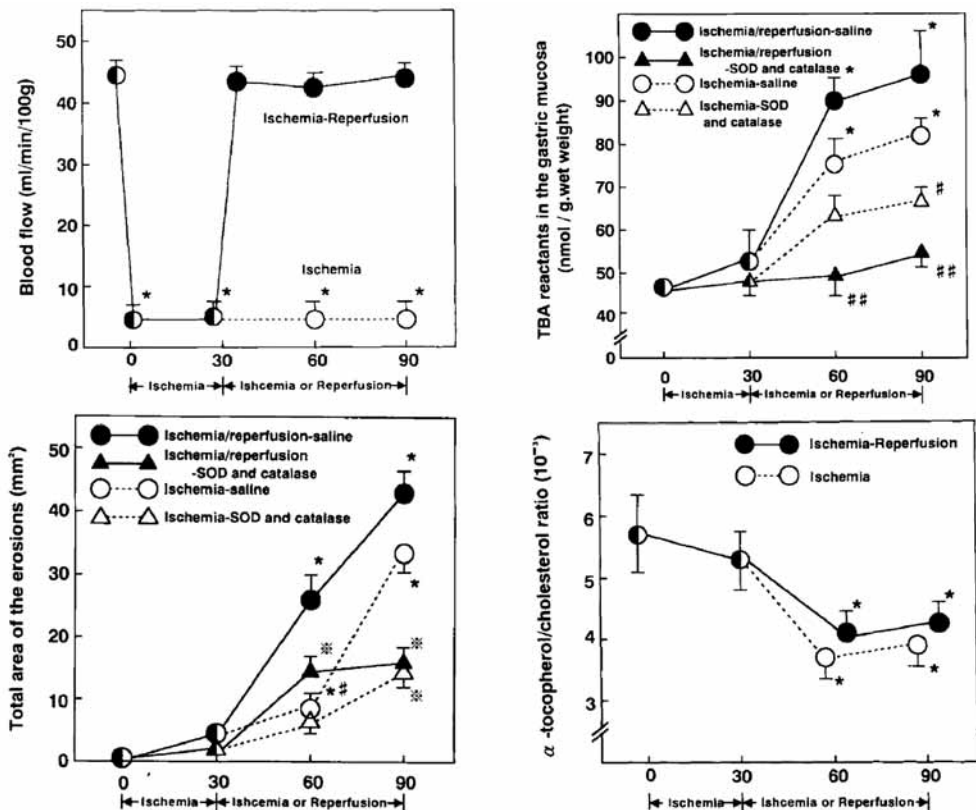


図10 虚血再灌流性胃粘膜傷害と資質過酸化反応

肝虚血(15分)後、再灌流(A:5分、B:15分)後のフリーラジカル生成をin vivo POBNスピントラッピングで検出

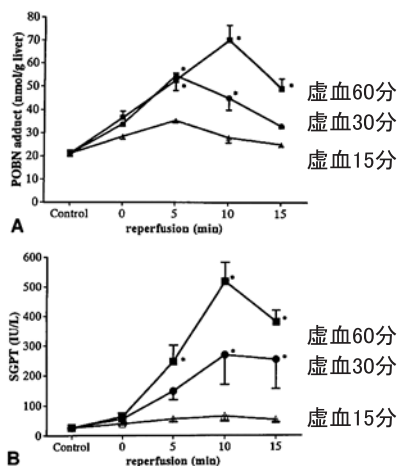
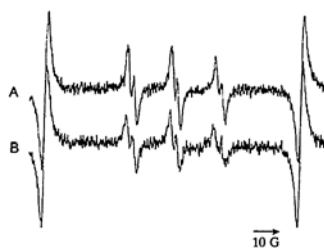


図 11 肝虚血 15 分以内であればフリーラジカル生成も少なく、再灌流傷害を抑制できる

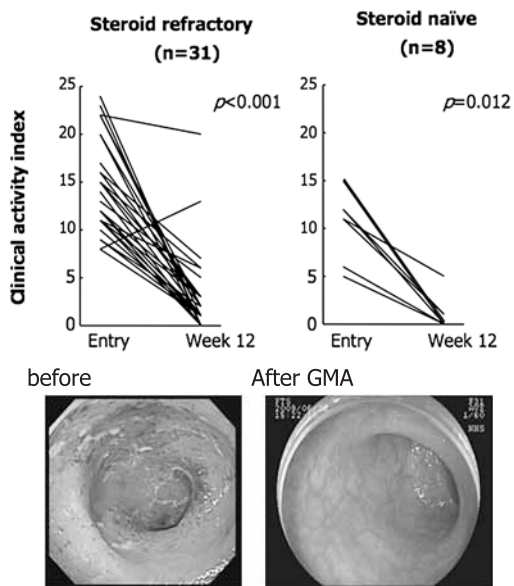
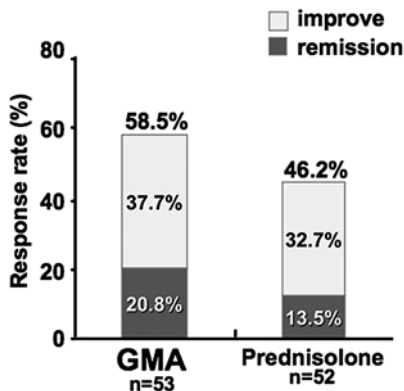


図 12 白血球除去療法は潰瘍性大腸炎治療に有効

傷害を惹起することに成功した。この方法を数回繰り返すことにより、移植した癌腫瘍が明らかに縮小し、SOD+カタラーゼの併用投与はその抗腫瘍効果をキャンセルした(図 13)。その後、温熱療法の抗腫瘍効果にも活性酸素・フ

リーラジカルが関与することを次々と明らかにし、フリーラジカル反応を用いた癌の集学的治療として現在臨床応用されている(図 14)。

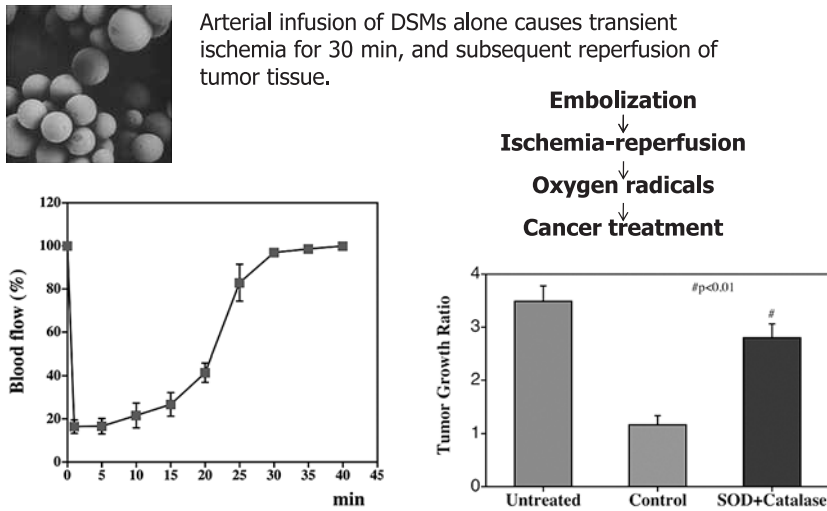


図 13 DSM (degradable starch microsphere) は虚血再灌流を惹起し、抗腫瘍効果を発揮する。

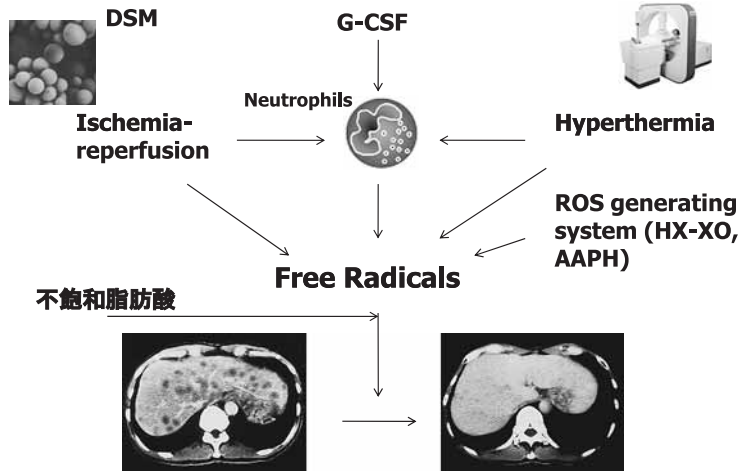


図 14 フリーラジカル反応を利用したがん治療

脂質過酸化反応は 細胞内シグナルを揺さぶる

細胞膜不飽和脂肪酸は活性酸素・フリーラジカルによる酸化により連鎖的脂質過酸化反応を生じ、細胞障害に寄与することを明らかにしてきた。最近では、その過酸化反応の中間反応物として、アクロレイン、4 ヒドロキシ 2 ノネナル (HNE) などの反応性アルデヒドが生じ

るが、これらのアルデヒド類のほとんどはタンパク質との反応によりユニークなアミノ酸付加体を生成することが解明されつつある (図 15)。このような活性種の標的分子を明らかにするために、酸化修飾タンパク質を指標としたプロテオミクス解析を推進してきた。最も一般的な方法は、二次元電気泳動と免疫プロット法を組み合わせた解析法である。この方法では、二次元で分離したゲルはプロットングにより膜に転

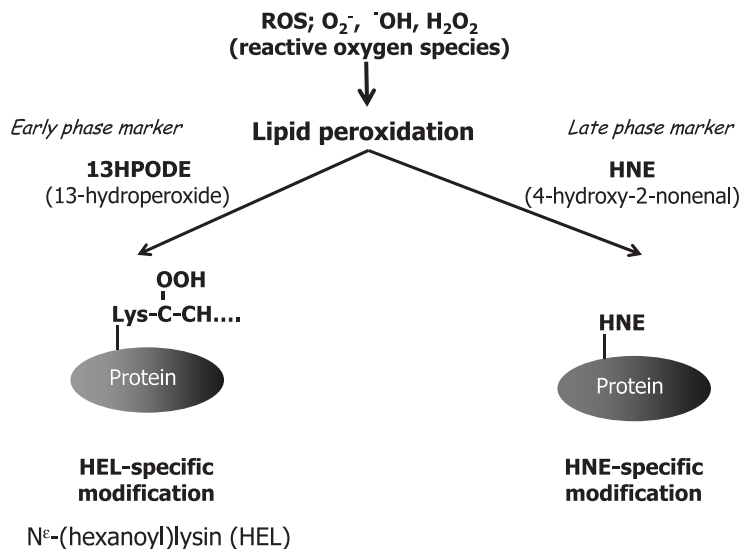


図 15 脂質過酸化反応に由来する活性種と標的タンパク質翻訳後修飾

写し，抗酸化修飾タンパク質抗体を免疫組織化学法により検出するものである。従来より，消化管炎症病態においては脂質過酸化の意義が報告されてきたが，その詳細な機構は不明な点が多く存在していた。しかし，この脂質過酸化アルデヒド修飾タンパク質の探索により，標的タンパク質が同定されるようになった結果，病態の新しい理解，修飾分子を標的とした治療法の開発などに繋がっていくものと考ええる。

ま と め

研究をはじめたころは理由も理論もわからず

「補体」や「ビタミンE」を測定するばかりであった。目の前にいる患者さんの血液をいただいてひたすら測定する毎日であった。「今日は臨床が忙しいから」「今日は気分が乗らないから」「計画をもっと詰めてから」と自分に言い訳をしていると，時間ばかりが流れていく。だから若い先生には，何はともあれ実験は開始せよと説いてきた。今すぐ可能なものがあれば部分的でもよいから始めなさいと指導してきた。結果が出ようが，出まいが，「なんとかなる」。そのような中で生まれた創造と成功の歡喜がわれわれ研究者を幸せにしてきたのではないかと考える。

著者プロフィール



吉川 敏一 Toshikazu Yoshikawa

所属・職：京都府立医科大学・学長

略 歴：1973年3月 京都府立医科大学卒業

1973年5月 京都府立医科大学附属病院第三内科研修医

1981年4月 京都府立医科大学 第一内科学教室助手

1983年5月 医学博士

1984年1月 米国ルイジアナ州立大学客員教授

1985年8月 京都府立医科大学第一内科学教室講師

1993年4月 東京大学先端科学技術研究センター客員教授

2000年9月 京都府立医科大学第一内科学教室教授

2003年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科生体機能制御学教授

2003年9月 京都府立医科大学東洋医学講座教授（併任）（～H21年8月）

2004年5月 京都府立医科大学生体安全医学講座教授（併任）
（～H22年3月）

2005年6月 京都府立医科大学生体機能分析医学講座教授（併任）
（～H22年5月）

2006年1月 東京大学大学院農学生命科学研究科アグリバイオインフォマ
ティクス特任教授（併任）

2007年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科免疫内科学（名称変更）
教授
京都府立医科大学予防健康医学講座教授（併任）
（～H22年3月）

2008年2月 京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学教授

2008年5月 京都府立医科大学がん免疫細胞制御学教授（併任）

2008年7月 京都府立医科大学消化器先進医療開発講座教授（併任）

2009年4月 京都府立医科大学医療センター所長（兼任）
（財）ルイ・バスターール医学研究所所長（兼任）

2010年11月 京都府立医科大学大学院医学研究科生体免疫制御学講座
教授（併任）

2010年12月 京都府立医科大学大学院医学研究科生体食品機能学講座
教授（併任）

2011年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学 教授退任

主な著書：フリーラジカル入門（先端医学社）

続フリーラジカル入門（先端医学社）

フリーラジカルの科学（講談社）

フリーラジカルの医学（診断と治療社）

よくわかる最新版ビタミンブック（主婦の友社）

活性酸素・フリーラジカルのすべて（丸善株式会社）

ビタミン・ミネラル早わかり（幻冬舎）

不老革命（朝日新聞社）

ヘルシーエイジングのすすめ（ブレーン出版）

老化を抑える，抗酸化力（土屋書店）

アンチエイジング教室（毎日コミュニケーションズ）

いくつになっても年をとらない9つの習慣（扶桑社）

食べて免疫力がUP！病気に強くなる！1日1600kcal レシピ（PHP研究所）

新しい考え方ビタミンミネラル速効事典（土屋書店）

なぜ、あの人はいくつになっても若いのか（家の光協会）

きれいな人は内蔵が強い（PHP研究所）

京都府立医大のがん温熱免疫療法（PHP研究所）

100歳，元気あたりまえ！（朝日新聞出版）