

2021 年度（第 46 回）
学 術 研 究 振 興 資 金

The Science Research Promotion Fund

学 術 研 究 報 告

令和 4 年 9 月

はじめに

この報告書は、2021年度（第46回）学術研究振興資金を配付した研究課題について、その研究成果を取りまとめたものです。掲載した研究成果には、この年度に初めて資金を受けたもの、前年度から2年目、3年目と継続して資金を受けたものなどがあり、すべての研究が完了しているわけではありません。したがって現在も進行中の研究については、その進捗状況を記してあります。

「学術研究振興資金」は、私立の大学、短期大学、高等専門学校の研究振興のために、私学事業団が広く一般から寄付を集めて、これを「学術研究振興基金」として運用し、その運用益から私立大学等における社会的要請の強い学術研究に対して助成を行っているものです。

昭和51年度に配付を開始して以来、令和4年5月末までに配付した資金総額は、3,457件、81億958万円にのぼっております。これも、深いご理解を示された経済界をはじめとする多くの方々のご協力の賜物と心から感謝し、ご寄付くださった皆様に研究者の方々とともに御礼申し上げる次第でございます。

お蔭をもちまして、本基金の保有額は、令和4年8月末で、54億1,524万円に達しました。本事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに本基金を充実させたいと考えております。本基金の趣旨をご理解のうえ、一層のご支援とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

おわりに、研究に携わる皆様におかれましては、この貴重な資金を有効にご活用いただき、特色ある学術研究の充実発展に寄与し、社会の要請に応えられますことを心からお祈りいたします。

令和4年9月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長 福原 紀彦

目 次

- I 2021 年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況
- II 学術研究振興基金 年度別受領状況
- III 学術研究振興資金 研究分野別配付状況
- IV 2021 年度学術研究振興資金 研究課題一覧
- V 2021 年度（第 46 回）学術研究振興資金 学術研究報告

I 2021年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況

区 分		応募		採択		採択率	
		件数(件)	希望額(千円)	件数(件)	配付額(千円)		
合 計		136	302,200	39	81,200	28.7%	
内	新規・継続別	新 規	108	220,500	17	33,000	15.7%
		継 続 2 年 目	16	43,700	13	27,900	81.3%
		継 続 3 年 目	12	38,000	9	20,300	75.0%
訳	学校種別	大 学	133	300,400	39	81,200	29.3%
		短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	3	1,800	0	0	0.0%
	研究区分別	人 文 ・ 社 会 科 学 系	32	27,800	9	7,100	28.1%
理 工 系 、 農 学 系		44	124,900	13	33,700	29.5%	
生 物 学 系 、 医 学 系		60	149,500	17	40,400	28.3%	

Ⅱ 学術研究振興基金 年度別受領状況

(単位：千円)

年度 区分	1975(昭和50)～ 2014(平成26)年度	2015年度 (平成27年度)	2016年度 (平成28年度)	2017年度 (平成29年度)	2018年度 (平成30年度)	2019年度 (令和元年度)	2020年度 (令和2年度)	2021年度 (令和3年度)	合 計
経済団体	2,122,328	5,000	5,000	0	0	0	0	0	2,132,328
個別会社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学校法人	1,460,833	0	0	0	0	0	0	0	1,460,833
個人	199,374	213	0	90	0	270	3	129	200,079
合 計	5,404,535	5,213	5,000	90	0	270	3	129	5,415,240
基金保有額	5,404,535	5,409,748	5,414,748	5,414,838	5,414,838	5,415,108	5,415,111	5,415,240	-

Ⅲ 学術研究振興資金 研究分野別配付状況

年度 研究分野	1976(昭和51)～ 2014(平成26)年度	2015年度 (平成27年度)	2016年度 (平成28年度)	2017年度 (平成29年度)	2018年度 (平成30年度)	2019年度 (令和元年度)	2020年度 (令和2年度)	2021年度 (令和3年度)	合 計
医学	2,813,780	36,900	28,400	29,100	27,000	29,100	38,800	39,300	3,042,380
環境科学	216,240	1,000	3,000	3,000	4,500	0	0	0	227,740
理学	892,510	20,700	9,500	13,000	19,800	20,900	11,300	5,500	993,210
工学	1,623,360	2,600	4,400	10,700	9,700	12,400	16,300	21,000	1,700,460
農学	286,500	11,500	16,100	8,300	6,500	9,900	4,400	5,300	348,500
文学	716,160	7,000	11,400	9,500	7,400	4,100	2,500	1,400	759,460
法学	104,320	2,300	500	300	0	0	2,500	0	109,920
経済学	236,580	1,400	900	900	1,900	1,400	2,600	2,800	248,480
家政学	214,260	3,000	3,200	3,000	0	0	0	0	223,460
体育学	26,800	0	1,000	2,000	2,000	0	0	3,000	34,800
教育学	185,270	3,400	1,700	800	1,800	3,300	2,000	2,900	201,170
小 計	7,315,780	89,800	80,100	80,600	80,600	81,100	80,400	81,200	7,889,580
若手研究者 奨励金	82,100	19,400	19,400	18,400	-	-	-	-	139,300
合 計	7,397,880	109,200	99,500	99,000	80,600	81,100	80,400	81,200	8,028,880

(注1) 研究分野の「医学」には薬学、歯学を、「理学」には生物学、生物科学、生理人類学(生物系理学)を、「工学」には情報科学、原子力学を、「文学」には哲学、心理学、社会学、文化人類学、史学を、「法学」には政治学をそれぞれ含む。

(注2) 学術研究振興資金としての「若手研究者奨励金」の配付は、平成20年度から平成29年度までである。

IV 2021年度学術研究振興資金 研究課題一覧

	学校名	研究分野	研究課題	配付額 (千円)
1	東北工業大学	工学	ヒト脳オルガノイドの多機能同時計測法の開発と薬効評価	1,900
2	青山学院大学	理学	多種における心臓の発生発達機構の解明	2,300
3	北里大学	医学	サイトヘジン2小胞輸送経路による慢性疼痛の制御機構の解明	1,900
4	工学院大学	農学	不活性化酵素, 偽遺伝子からの活性化酵素の作成	3,000
5	東京慈恵会医科大学	医学	がんにおける型破り分泌の機序解明と制御研究	2,300
6	実践女子大学	教育学	OECDの枠組みに基づく世代別金融リテラシーの調査研究	600
7	順天堂大学	医学	細胞老化の多様性とその病態生理学的意義の解明	4,600
8	成蹊大学	工学	ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む	1,300
9	成城大学	経済学	経済のデジタル化の加速に向けた金融制度・税制度の対応のあり方	500
10	中央大学	工学	ヘモグロビンナノ粒子からなる人工酸素運搬体の開発	4,600
11	東京歯科大学	医学	マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立	1,500
12	東京理科大学	理学	ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御	1,100
13	東邦大学	医学	腸上皮細胞による腸内細菌叢の調節と免疫恒常性の維持機構	3,000
14	日本体育大学	体育学	アジア人の遺伝的背景に基づいたサルコペニア予防戦略	3,000
15	文教大学	教育学	ペアレンティングによる親子介入支援の長期的効果検証とマニュアル作成	600
16	立正大学	経済学	新型コロナウイルス感染拡大下における人々の行動の規定因	700
17	自治医科大学	医学	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用	3,000
18	白梅学園大学	教育学	性的問題行動を示す発達障害の青少年と保護者向けySOTSEC-ID支援	1,100
19	帝京平成大学	教育学	Withコロナ社会における自己分析プログラムの開発	300
20	金沢医科大学	医学	糖尿病性腎臓病の進展抑制に対する抗炎症的治療法の探索	1,900
21	光産業創成大学院大学	理学	光活性化タンパク質の活性制御機構の解明と細胞の光制御への応用	1,100
22	藤田医科大学	医学	がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法の開発	4,600
23	名城大学	工学	次世代大容量Liイオン電池実現に向けた新規ナノ複合材料の創製	2,300
24	京都外国語大学	文学	中米の古代パンアメリカンハイウェイがつなぐ南北交流の研究	1,400
25	京都薬科大学	医学	ダウン症候群の出生前および出生後治療法の構築	1,500
26	同志社大学	工学	宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究	3,000
27	龍谷大学	経済学	中山間地域(日伊)の農業/農村のソーシャルイノベーション研究	1,600
28	大阪医科薬科大学	医学	ナノメディックによる安全な再生医療等製品の作出技術の開発	2,300
29	関西大学	工学	高速磁化反転技術の開発と省エネルギー動作デバイス応用	3,300
30	関西医科大学	医学	弾性線維の再生技術の開発	3,000

IV 2021年度学術研究振興資金 研究課題一覧

	学校名	研究分野	研究課題	配付額 (千円)
31	大阪成蹊大学	教育学	効果的なレポート論題に関する実証研究	300
32	神戸学院大学	理学	PDI酸化酵素GPx7/8の酸化還元依存的な構造変化の解明	1,000
33	神戸薬科大学	医学	AAアミロイドーシス発症制御因子の解明	1,500
34	兵庫医科大学	医学	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明	3,800
35	安田女子大学	医学	歯周病菌による脳・腸バリア破綻に基づくAD型認知症増悪機序	2,300
36	福岡歯科大学	医学	DNA損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明	1,500
37	熊本保健科学大学	医学	発作性夜間血色素尿症における血栓症発症の分子メカニズムの解明	600
38	南九州大学	農学	高効率な無農薬害虫防除の実現に向けた昆虫ウイルス製剤シーズの探索	2,300
39	沖縄科学技術大学院大学	工学	スピンを用いた極低温・超低雑音マイクロ波増幅	4,600
			配付額計	81,200

(注) 研究分野の「医学」には薬学、歯学を、「理学」には生物学、生物科学、生理人類学(生物系理学)を、「工学」には情報科学、原子力学を、「文学」には哲学、心理学、社会学、文化人類学、史学を、「法学」には政治学をそれぞれ含みます。

V 2021 年度（第 46 回）

学術研究振興資金 学術研究報告

ヒト脳オルガノイドの多機能同時計測法の開発と薬効評価

1. 研究の目的

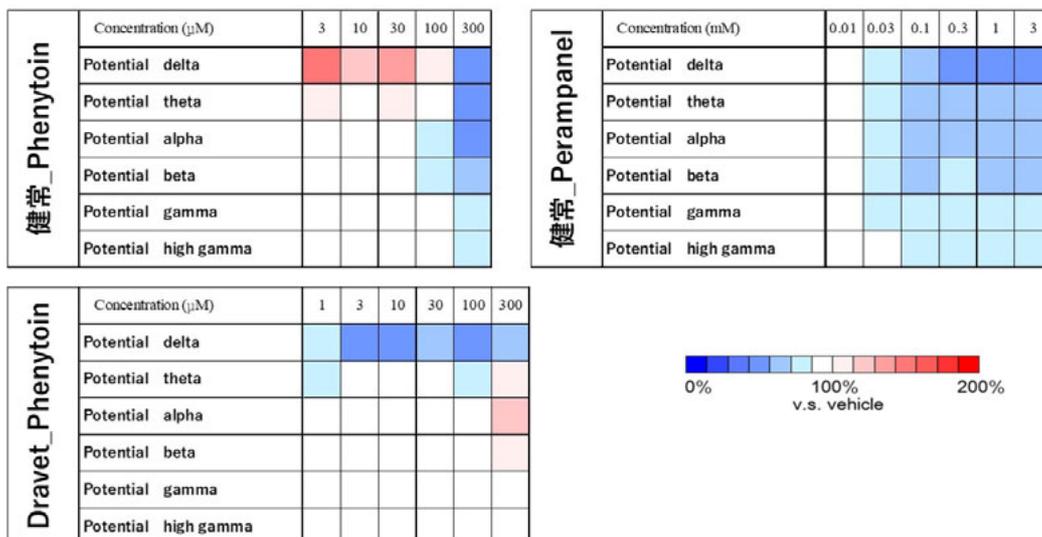
ヒト脳オルガノイドの電気活動（細胞外電位）と神経伝達物質放出（グルタミン酸・GABA）の同時計測技術を確立し、ヒト脳オルガノイドのオシレーションを指標とした薬効評価系の構築を目的とする

2. 研究の計画

- (1) 健常者・各種てんかん患者由来脳オルガノイドを用いて既存薬に対する応答を評価する。
 - ①各疾患オルガノイドの自発活動特性を明らかにする。
 - ②既存薬に対する各疾患オルガノイドの周波数特性の変化を明らかにする。
- (2) 分散培養（2D）と脳オルガノイド（3D）の薬剤応答性の違いを明らかにする。
- (3) 脳オルガノイドからのグルタミン酸・GABA 放出の同時計測法を確立する。
 - ①GABAの検出限界を明らかにし、グルタミン酸とGABAの同時計測系を構築する。
 - ②マウス急性脳スライスを用いて、細胞外記録と電気化学計測を同時に行い、グルタミン酸とGABAの検出感度を評価する。グルタミン酸やGABAの放出を促す薬剤を投与することによって、グルタミン酸、GABA放出の変化を算出する計測系を確立する。
 - ③各疾患脳オルガノイドからグルタミン酸、GABAの放出を記録し、疾患別のグルタミン酸とGABAの放出比率および薬剤変化を検出する。

3. 研究の成果

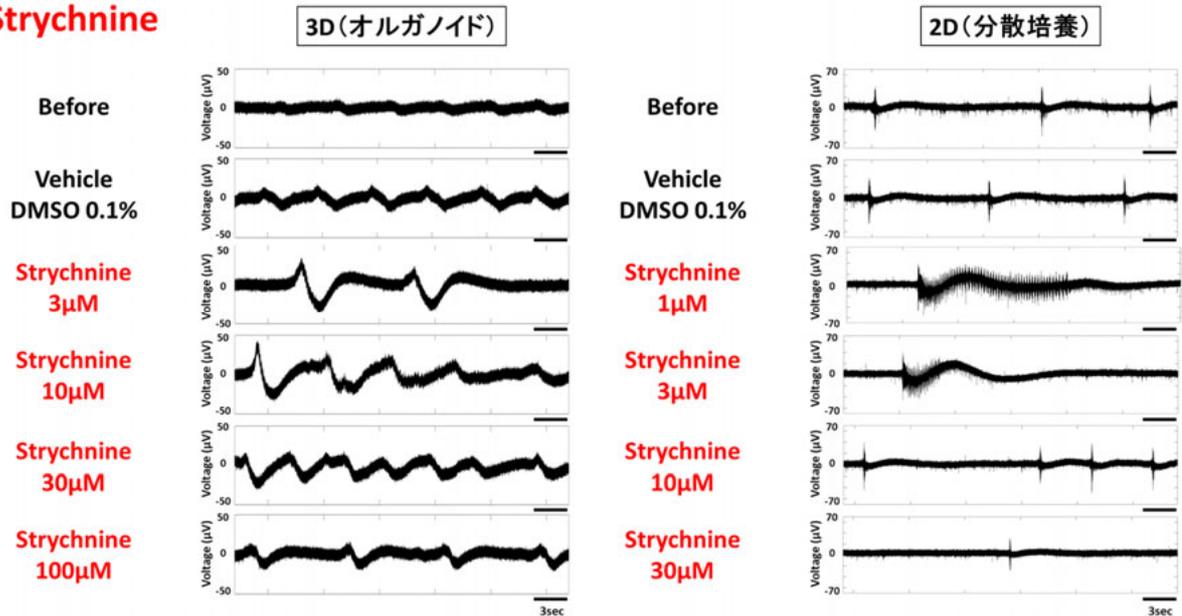
(1) 患脳オルガノイドにおける抗てんかん薬の応答と健常者脳オルガノイドの応答を比較した。下図は健常者脳オルガノイドおよびドラベ症候群の脳オルガノイドに抗てんかん薬を用量依存的に投与した際の周波数強度変化を示している。δ波（1-3 Hz）、θ波（4-8 Hz）、α波（8-14 Hz）、β波（15-30 Hz）、γ波（35-50 Hz）、High-γ波（80-150 Hz）、150-500Hz 帯の波形を抽出し、周波数強度を解析した。健常者脳オルガノイドにおいて、フェニトイン 100 μM 投与により α波、β波の周波数強度の減少が見られ、300μM 投与より全周波数帯で周波数強度が減少した。一方、ペランパネル投与においては、用量依存的に δ波から High-γ波の周波数強度の減少が認められた。AMPA 受容体阻害が用量依存的に現れた結果だと考えられ、脳オルガノイドにおいても、抗てんかん薬の種類に依存して応答が異なることがわかってきた。ドラベ症候群脳オルガノイドにおいては、フェニトイン 300μM 投与で δ波は減少したものの、健常オルガノイドと比べ各周波数帯強度の減少は観察されなかった。ドラベ症候群の禁忌薬剤であるフェニトインの応答を示している結果であると考えられる。



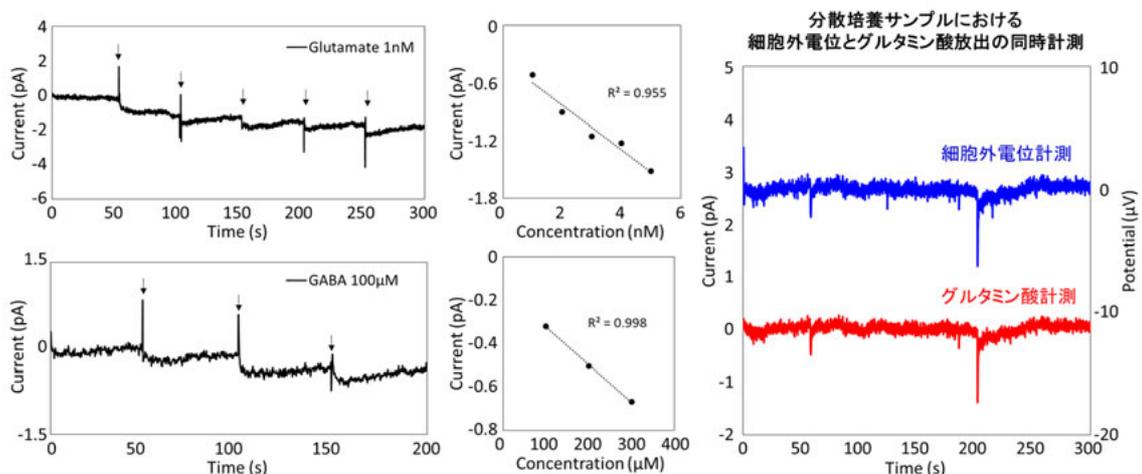
(2) 健常者株から分化した神経ネットワークをMEA上に分散培養した2Dサンプルと健常者株脳オルガノイド（3D）に痙攣誘発化合物であるStrychnineを投与した際の薬剤応答を比較し

た。下図はそれぞれの活動電位波形を示している。オルガノイドは Strychnine の投与でオシレーションの振幅・頻度が増加し、高濃度では減少したのに対し、分散培養は Strychnine の投与で同期バースト発火の Duration が増加・頻度が減少し、高濃度では Duration が減少した。着目する現象は異なるがオルガノイド・分散培養ともに Strychnine に対する濃度依存的な反応は一致していた。2D 分散培養と 3D オルガノイドの薬剤応答を比較するデータを複数薬剤にて取得し、現在データ解析を行っている。

Strychnine



(3) シナプス機能である神経伝達物質の放出を細胞外電位（活動電位情報）と同時に計測する為に、カーボンナノチューブ（CNT）を電極材料とした CNT 電極を開発した。本年度は、主要な神経伝達物質である GABA を計測する為に、塗布する酵素を検討し GABA を計測可能な CNT 電極を開発した。塗布する酵素に GABASE を追加することにより GABA をグルタミン酸へと選択的に変換し、次いで Glutamate oxidase (GOx) によりグルタミン酸を選択的に酸化する。グルタミン酸酸化時に発生した H_2O_2 を西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を用いて検出する方法である。GABASE を追加することにより GABA 100 μM の検出に成功し、線形性 ($R=0.998$) を確認した。また酵素を CNT 電極にコーティングする方法を検討した結果、グルタミン酸の検出限界 1nM 以下、線形性検出範囲 1nM-10 μM を達成し電極の高感度化に成功した（下図）。高感度化したグルタミン酸計測用 CNT 電極を用いて、Rat 皮質ニューロンの分散培養サンプルを計測し、1 細胞レベルでのグルタミン酸の放出と活動電位の同時計測に成功した（下図）。



4. 研究の反省・考察

(1) 疾患脳オルガノイドと健常者オルガノイドの活動特性において、低周波成分の解析が有

効であることがわかり、差異が検出できることがわかった。オルガノイド研究の性質上、均一なオルガノイド作製が難しいことが挙げられる。iPS 細胞の状態を管理維持し、サンプル数を増やす必要がある。また、各疾患において、複数ドナーの iPS 細胞および株を用意する必要性が出てきた。疾患間差を明らかにしたいが、ドナー間差なのか、株間差なのかを未だ不明な点がある為である。今年度は、同一疾患において複数の iPS 株を用いて検証することとした。本年度の成果として、疾患の禁忌薬剤に対する応答性が認められたことは今後の発展が期待できる。

(2) 2D 分散培養と 3D オルガノイドにおける薬剤応答データを取得した。オルガノイドは低周波解析が有効であり、2D はスパイク解析が主となるため、それぞれの解析法で得られたパラメータ値の比較、毒性用量の比較を今後進めて行く予定である。また、2D 分散培養においても低周波解析を行うことで、同一パラメータでの比較も実施して行く予定である。薬剤応答を比較する上で、組織化学的に、3D オルガノイドと 2D 分散培養において、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの割合を比較する必要もある。今年度の課題とすることとした。

(3) 酵素 GABASE を用いることで、GABA の用量依存的な応答を検出できることがわかった。しかしながら、細胞から放出される GABA をリアルタイムに計測する為には、感度が足りないこと、およびグルタミン酸も GABASE 電極で反応する為、グルタミン酸と GABA の分離が難しいことがわかった。今後は、グルタミン酸、ドーパミンに焦点をあて、細胞から放出される神経伝達物質のリアルタイム計測を実施することとした。我々の独自技術である細胞外記録(活動電位)と神経伝達物質のリアルタイム同時計測において、培養細胞においてもグルタミン酸のリアルタイム計測に成功した点は今後の発展が期待できる成果である。今年度は、脳オルガノイドを用いて、疾患と健常の差異、薬剤応答について、解析を進める予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①N Matsuda, A Odawara, Y Ishibashi, K Kinoshita, A Okamura, T Shirakawa, I Suzuki. Raster plots machine learning to predict the seizure liability of drugs and to identify drugs. *Sci Rep.* 2022 12(1):2281. doi: 10.1038/s41598-022-05697-8
- ②R Yokoi, T Kuroda, N Matsuda, A Odawara, I Suzuki. Electrophysiological responses to seizurogenic compounds dependent on E/I balance in human iPSC-derived cortical neuronal networks. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2022 148(2):267-278. doi: 10.1016/j.jphs.2021.12.006
- ③Yokoi R, Shibata M, Odawara A, Ishibashi Y, Nagafuku N, Matsuda N, Suzuki I. Analysis of signal components < 500 Hz in brain organoids coupled to microelectrode arrays: a reliable test-bed for preclinical seizure liability assessment of drugs and screening of antiepileptic drugs. *Biochem and Biophys Res.* 2021 28:101148. Doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101148
- ④N. Matsuda, Kenichi Kinoshita, Ai Okamura, Takafumi Shirakawa, and I Suzuki. Histograms of Frequency-Intensity Distribution Deep Learning to Predict the Seizure Liability of Drugs in Electroencephalography. *Toxicological Sciences.* 2021 182(2):229-242. doi: 10.1093/toxsci/kfab061
- ⑤Y Ishibashi, A Odawara, K Kinoshita, A Okamura, T Shirakawa, I Suzuki. Principal Component Analysis to Distinguish Seizure Liability of Drugs in Human iPSC Cell-Derived Neurons. *Toxicological Sciences.* 2021 184(2):265-275 doi: 10.1093/toxsci/kfab116

(2) 口頭発表

- ①鈴木郁郎, “Evaluation of drug toxicity and efficacy based on human iPSC-derived neuronal activities”, シンポジウム, 「New Frontiers in the Treatment of Epilepsy 2020」第62回 日本神経学会学術大会 2021/5/19-22
- ②鈴木郁郎, “In vitro, ex vivo, in vivoにおける神経活動を指標とした薬剤性痙攣リスク評価”, シンポジウム, 第48回日本毒性学会学術年会 2021/7/7~7/9
- ③鈴木郁郎, “ヒトiPS細胞由来ニューロンおよび脳オルガノイドを用いた医薬品の毒性評価”, ランチョンセミナー ベリタス, 第48回日本毒性学会学術年会 2021/7/7~7/9

- ④鈴木郁郎, “ヒトiPS細胞由来神経細胞の電気活動に基づいた毒性および薬効評価”, ランチョンセミナー アズワン, 第48回日本毒性学会学術年会 2021/7/7~7/9
- ⑤鈴木郁郎, “iPSニューロンの機能を指標とした中枢および末梢神経毒性評価”, 安全性評価研究会 第29回 夏の教育フォーラム これでわかる! 非臨床試験その2ー中枢神経毒性・腎毒性ー 2021/9/10
- ⑥Mikako Shibata, Remi Yokoi, Aoi Odawara, Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Ikuro Suzuki, “MEA measurement of human cerebral organoid”, 2021 Safety Pharmacology Society”, 2021/10/4-8
- ⑦鈴木郁郎, “ヒト iPS 神経の電気活動に基づいた医薬品候補化合物の評価”, 安全性評価研究会 令和3年度AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発交流会 2021/9/8
- ⑧鈴木郁郎, “MEAを用いた化合物の神経毒性評価法の開発”, 電気化学会第89回大会, 2022/3/15-17
- ⑨永福菜美, 横井れみ, 柴田実可子, 石橋勇人, 松田直毅, 鈴木郁郎, “MEAを使用した脳オルガノイド計測における低周波解析の有効性”, 第13回日本安全性薬理研究会学術年会, 2022/2/4-2/5

(3) 出版物

なし

多種における心臓の発生発達機構の解明

—心臓の物理学的形成を定量的に調べる3D検出装置の開発—

1. 研究の目的

胎児の心臓の発達は、生命科学の分野では遺伝的なものと考えられてきたが、臨床の現場では環境要因の影響を受けていることが示唆されている。すなわち、後天的にヒトの胎児に先天性心疾患（内臓心房複合体、内臓逆位など）を誘発し、母胎内の環境、つまり外的因子が影響をしているとの考えである。胎児の発生・発達をマイクロなスケール、すなわち細胞単位で考えると、細胞の分裂、増殖、分化は、周囲の細胞が作り出す環境（KやClなどのイオン、酸素分子、力場）に敏感に影響をうける。in vitro と呼ばれるシャーレ上での実験では、これらの細胞への化学的薬剤の投与や機械的なストレスの影響が調べられ、薬剤試験にも、この系がもちいられる。心臓の構成する心筋細胞は、in vitro、つまり、シャーレ上で伸縮運動を行う。そして、他の心筋細胞と集合体をつくり、伸縮を同期化する。この現象が、起源となり、心臓組織による拍動運動が起こる。細胞レベルでは、化学的薬剤の投与や機械的なストレスなどの外的因子に敏感で、特に胎児期の細胞では、薬剤等による拍動機能の低下が報告されている。また、近年では、力学的刺激に応答するチャンネルが、発生期には、とても豊富で、発生による形状変化にも、力学的な刺激やストレスが寄与をする可能性がある。本研究グループでも、ソフトマテリアル上での心臓の初代培養で生成する、心筋細胞の集合体に、メカニカルな刺激を与えて、その影響を観測してきた。本課題では、特に自律拍動を行う細胞の集合体に対して、リアルタイム画像プロセッシングを行い、その自律拍動との位相を制御して、力学的刺激を長時間にわたり与える装置を完成した。また、このような in vitro における実験から、心臓の発生過程における、外的因子の影響が予想されていて、例えば先天性心疾患では、環境による影響が臨床の現場から示唆されている。しかし、in vivo における、外的因子の影響の直接観測は行われていない。理由は、単純に母胎内の胎児の体内の心臓を観測することが難しいからである。超音波スコープでは、解像度の限界があり、CTはX線を使用するので、胎児の心臓観測には適さない。そこで、本研究では、動物実験として、ニワトリ胚とゼブラフィッシュの心臓の発生過程を観測する装置を構築する。そして、薬剤投与の第一段階として、エタノール投与、カフェイン投与、低温による鶏胚の、特に心臓の発生の違いの観測を試みた。また、ゼブラフィッシュでは、心臓の硬さと心臓の形態変化を調べて、部位による違いを評価する。そして、発生期の心臓の硬さの変化のレファレンスを作成して、次に外的刺激の影響を調べる装置を開発する。

2. 研究の計画

- (1) 鶏胚を殻の外で成長させて、心臓の発生過程を近赤外線によるトモグラフィーである光干渉断層撮影(OCT)により観測をする。
 - ① 特定の環境が心臓の発生に与える影響を、3Dの時間変化、つまり4D像により調査する。期間は発生後から約4日間とする。すでに知られているCT像などと比べて、観測によるダメージがないかを確認する。
 - ② 過去の調べられている薬剤投与の例として、エタノールやカフェインがある。致死率等の統計的データがある。殻外による成長における致死率と比べて、同程度であれば、それらの薬剤による影響と特定できるので、その薬剤が心臓に与える影響を、OCTにより観測する。また、発生の遅れが確認されている低温による発生の観測も行う。
- (2) 心筋細胞の集合体の自律拍動をインキュベータ内で長期的に観測を行い、リアルタイムフィードバック制御による力学的刺激を与える。
 - ① 刺激に対する応答と、自律拍動のタイミングを調べるために、同一個体で、位相差をパラメータとする。刺激を与えながら、応答を調べる。
 - ② 長期的に、細胞の集合体の形態変化も含めて、刺激を与え続け、拍動間隔の変化、応答の感度の変化を、48hにわたり調べる。
- (3) ゼブラフィッシュの心臓の硬さを調べるための試料台と、AFMによるフォースカーブを得る。
 - ① 真骨魚類のモデル生物としてゼブラフィッシュを用い、心臓の硬さの測定のために、脱細胞化し細胞外マトリックスのみを残し、脱細胞化したサンプルを原子間力顕微鏡によ

って測定する。カンチレバーの先端は、非常に鋭角のため、そのままだと心臓に穴をあけてしまう。そこで、レバーの先端に直径5μm程のビーズを付加するなど、生体組織に適した条件を検討する。

3. 研究の成果

(1) 鶏胚心臓の光干渉断層撮影 (OCT) による観測

①2021年度は殻外鶏胚の成長の成功と共に、OCTにより1個体の心臓の発生過程の精密な観測に成功した。光源のアップグレードによる効果が大きかった。複数の個体で、心臓の奇形と判断できる心臓の像の取得にも成功した。形態変化の報告は過去にもあるが、申請者の知る限り1個体の発生過程を追いながら、心奇形となる心臓の観測は世界初である。

②エタノールやカフェインの添加、そして、低温における鶏の発生を観測を行った。過去の報告と、同程度の致死率が得られた。OCT観測では、光源のアップグレードにより、エタノール添加における、拍動低下のみならず、心奇形と考えられるOFTと呼ばれる部位の形状異常が確認され、また、拍動の連動を精査すると、血流ポンプとして機能をしていないことがわかった。カフェイン投与では、過去の報告にある拍動間隔の低下はみられなかったが、胚が成長するにつれて、痙攣を起こすような動きが観測された。心臓以外にも神経系に異常をきたすとの過去の報告があり、現在、神経の異常と痙攣との関連の調査をしている。低温の観測では、発生が遅れるのは観測されたが、発生の遅れは個体差が大きく表れ、今後調査が必要である。

(2) 心筋細胞の力学的刺激応答

①心筋細胞の集合体への、外的、力学的刺激による応答の観測に成功した。特にリアルタイムフィードバック制御による力学的刺激では、明らかに位相差（自律拍動と刺激のタイミング）による影響が確認された。

②長期的な効果では、位相差に関して、同期、逆位相、そして、自律拍動の直前をタイミングとして刺激を与え続けた。同期では、自律拍動に変化はあらわれず、一方で、逆位相では、拍動は一時的に不安定になり、24hの刺激により、拍動間隔は1.5倍程度に遅くなるが安定化した。直前をタイミングでは、最初の10h程度は、拍動間隔が短くなるが、その後、徐々に長くなった。細胞の集合体の形態変化に関しては、剥がれが多く観測されて、共培養であり線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が予想され、現在、共焦点顕微鏡による抗体染色にて、定量的に分化の割合を調べている。

(3) 魚類の心臓の弾性と進化

①ゼブラフィッシュの心臓の硬さを調べる研究では、脱細胞化し細胞外マトリックスのみを残すことが困難だった。昨年度に脱細胞化に成功したと考えていたが、安定したフォースカーブがとれず、異なる脱細胞化の手法を、2021年度は行った。現在も、安定した脱細胞化の実験を継続して行っており、部位や場所による硬さの違いが安定して再現できるようになった。また、測定のためのカンチレバーの針先へのビーズ付着も、担当者が変わり安定して、行えるようになった。

4. 研究の反省・考察

(1) OCTの改良に時間を要したが、光源により得られる最高感度の鶏胚の観測に成功した。

①ヒトの心奇形との関連を調べて、要因の探査が必要である。左右対称の破れの時点に散逸として、物理・化学的刺激を与え、それにより、左右の反転が確認されたら、科学的にのみならず、医学的にも興味深い結果となる。

②各種添加においては、添加の時期を固定したが、明らかにカフェインの影響は、発生時期により異なり、今後は、4つの室が形成された後に、カフェインを投与して、拍動の変化を調べる必要がある。発生初期においては、心臓の変化よりも神経系の異常のほうが顕著に表れたと考察している。痙攣がその症例である。

(2) フィードバック制御による刺激は安定して与えられるようになった。

①位相差による応答は確認されたが、個体差もあらわれた。そこで、2021年度の後半に、初代培養を行う胚の時期を7日目から5日目に変更した。5日目のほうが刺激に応答するチャンネルが豊富という報告があるからだ。しかし、心臓のサイズから使用する個体

数を増やす必要がある。結果として、5日目の細胞の方が、応答が顕著にあらわれた。反省としては、昨年度の早い段階において、5日目の細胞に変更をするべきだった。

- ② in vitro による力学的刺激の与える細胞集合体の応答では、画像処理のための光学的観測を行う。そのためには、インキュベータ内で、バックライトの照射が必要である。結果として連続的に光刺激を与えると、光によるダメージと、培地の温度上昇が懸念され、刺激を与える期間の制限を行った。今後はフラッシュなどの光量削減と、集合体以外の場所への光の遮断のための装置改良が必要である。
- (3) ゼブラフィッシュの心臓の硬さを調べる研究では、安定した脱細胞化に時間を要した。
 - ① 反省点としては、早い段階で、脱細胞化に成功した研究グループに連絡をとり、この手法の修得のために、直接的に指導を受けるべきだった。コロナの状況もあり、出張等のチョイスがなく、自力で脱細胞化のノウハウを磨く必要があった。また、硬さの測定のためのカンチレバーに必要な、針先へのビーズ付着は、付着したビーズ付きのカンチレバーの購入を検討すべきだった。現在は、安定してビーズが付着でき、安価でレバーを作れるメリットを得たが、成果報告に遅れが生じている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 大堀笙子、山岡喬志、守山裕大、三井敏之、OCT観測による心臓の発生とエタノールの与える影響、第82回応用物理学会秋季学術講演会、2021年9月10日
- ② 城所龍、野崎庄太、小島快斗、佐々木亜優、守山裕大、三井敏之、リアルタイムフィードバックを用いた心筋細胞への力学的刺激の応答、第82回応用物理学会秋季学術講演会、2021年9月10日
- ③ 山岡喬志、松原圭祐、大堀笙子、守山裕大、三井敏之、SS-OCT観測によるニワトリ胚心臓の発生にエタノールが与える影響、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月26日
- ④ 2-13-1724 A dynamic self-organization of single cells, Ryuta Watanabe, Riichi Horikawa, Ryu Kidokoro, Shota Nozaki, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, (Dept. Phys., Aoyama Gakuin Univ.) 第59回日本生物物理学会年会、2021年11月27日
- ⑤ 3-09-1354 Development of a mechanical device for stimulus on cardiac cells with feedback control system, Ayu Sasaki, Kazuki Mammoto, Ryu Kidokoro, Shota Nozaki, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui (Dept. Phys., Aoyama Gakuin Univ.) 第59回日本生物物理学会年会、2021年11月27日
- ⑥ 3-09-1406 Change in phase stability of cardiac cell clusters affected by to mechanical stimulus with feedback control, Shota Nozaki, Ryu Kidokoro, Kaito Kojima, Ayu Sasaki, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui (Dept. Phys., Aoyama Gakuin Univ.) 第59回日本生物物理学会年会、2021年11月27日
- ⑦ 佐々木亜優、城所龍、野崎庄太、渡辺隆太、小島快斗、守山裕大、三井敏之、Real-Time Feedback 機構を用いた細胞集合体への機械刺激による拍動間隔の変化、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月23日

ポスター発表

- ① 山岡喬志、大堀笙子、守山裕大、三井敏之、SS-OCTによるE2~E4のニワトリ胚心臓のイメージング、第82回応用物理学会秋季学術講演会、2021年9月21日
- ② 小島快斗、城所龍、野崎庄太、佐々木亜優、守山裕大、三井敏之、心筋細胞と線維芽細胞の集団におけるダイナミクス、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月24日
- ③ 小島快斗、城所龍、野崎庄太、佐々木亜優、守山裕大、三井敏之、心筋細胞と線維芽細胞の集団におけるダイナミクス、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月25日
- ④ 松木翔、渡辺隆太、守山裕大、三井敏之、AFMによるゼブラフィッシュ成魚の心臓の弾性率評価、第69回応用物理学会春季学術講演会、2022年3月25日

(3) 出版物

なし

サイトヘジン2 小胞輸送経路による慢性疼痛の制御機構の解明 ーサイトヘジン2の慢性疼痛の治療標的としての可能性に向けてー

1. 研究の目的

慢性疼痛は、神経の損傷や炎症により生じる痛覚感受性が持続的に亢進した状況で、痛覚過敏や異痛症などを伴うことより、患者のQOLの低下に大きく影響する。慢性疼痛は近年の人口構造や疾病構造の変化により増加しているが、有効な治療法は確立しておらず、その発症機序の解明とそれに基づく創薬・治療法の開発が望まれる。

慢性疼痛の脊髄レベルでの発症機序のひとつとして、脊髄後角ニューロンにおいて、持続的な痛覚刺激によりグルタミン酸受容体が活性化し、持続的な興奮性の亢進を引き起こす可塑的な変化が生じることが知られている。これまでグルタミン酸受容体自体を標的とした阻害剤の慢性疼痛への有効性が動物実験レベルでは示されているが、認知障害や運動失調などの重篤な中枢神経系の副作用から、臨床応用に至っていないのが現状である。そのため、慢性疼痛により特異性の高いグルタミン酸受容体のシグナル経路や制御機構のさらなる解明が病態の理解や新たな治療戦略の開発に重要である。

申請者は、低分子量GTP結合タンパク質ADPリボシル化因子6 (Arf6)により制御される細胞内小胞輸送経路の神経機能の解明を目指し、これまでに学習・記憶の細胞レベルでの基盤現象である海馬のシナプス可塑性において、Arf6経路がグルタミン酸受容体のシナプス発現に関わる主要な小胞輸送経路であることを明らかにしてきた (Fukaya et al., *J. Neurosci.* 2020)。その研究過程で、Arf6の活性化制御因子のひとつであるサイトヘジン2が脊髄後角ニューロンに豊富に発現することを見出し、グルタミン酸受容体制御経路が慢性疼痛と海馬のシナプス可塑性との間で共通性を示すことから、「サイトヘジン2-Arf6小胞輸送経路が、脊髄後角ニューロンでのグルタミン酸受容体依存的な慢性疼痛の新たな制御機構である」可能性を検証する本研究内容を着想するに至った。

本研究は、(1) サイトヘジン2の脊髄後角での発現局在、(2) サイトヘジン2遺伝子欠損マウスを用いた慢性疼痛への機能関与の可能性、(3) 慢性疼痛におけるサイトヘジン2-Arf6の作用機構、(4) 慢性疼痛の治療標的としてのサイトヘジンの可能性を明らかにすることを目的として実施した。

2. 研究の計画

(1) 脊髄後角におけるサイトヘジン2発現局在に関する免疫組織学的解析

サイトヘジン2の脊髄での発現局在を明らかにするために、サイトヘジン2特異抗体を用いて光学及び電子顕微鏡レベルで免疫組織学的検討を行う。

(2) 中枢神経系特異的サイトヘジン2遺伝子欠損マウスを用いた慢性疼痛における機能解析

① 中枢神経系特異的サイトヘジン2遺伝子欠損マウスの樹立

東京薬科大学・山内淳司教授から供与を受けたサイトヘジン2 flox マウスと Nestin プロモーター制御下に中枢神経系に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを交配し、中枢神経特異的にサイトヘジン2遺伝子を欠損する遺伝子改変マウスを樹立する。

② 慢性疼痛モデルにおける行動解析

野生型マウスとCytohesin-2遺伝子欠損マウスを用いて炎症性疼痛モデル (完全フロイトアジュバント投与モデル) と神経障害性疼痛モデル (坐骨神経部分結紮モデル) を作成し、von Frey試験で疼痛感受性の変化を評価する。

③ 慢性疼痛におけるサイトヘジン2の作用機序の解明

疼痛刺激後の脊髄に対して抗リン酸化ERK1/2抗体を用いたウエスタンブロット解析を実施する。

(3) サイトヘジン選択的阻害薬 SecinH3 の髄腔内投与の慢性疼痛への効果の検討

サイトヘジン経路の慢性疼痛における治療標的としての可能性を検討するため、サイトヘジン選択的阻害薬(SecinH3)の髄腔内投与による慢性疼痛の抑制効果を von Frey 試験による疼痛感受性の変化で評価する。

3. 研究の成果

- (1) 脊髄後角におけるサイトヘジン 2 発現局在に関する免疫組織学的解析
成熟期マウスの脊髄腰膨大部において、サイトヘジン 2 は脊髄後角 I / II 層に豊富に発現しており、細胞マーカーとの二重免疫蛍光染色法により、サイトヘジン 2 陽性の後角ニューロンの多くは、興奮性の介在ニューロンや投射ニューロンであることが明らかになった。さらに免疫電子顕微鏡解析により、サイトヘジン 2 は後角ニューロンにおいてシナプス近辺の樹状突起に豊富に分布し、興奮性シナプスにおいてシナプス後肥厚部(PSD)の近傍(ペリシナプス)のシナプス後膜に優位に局在することを見出した。二重免疫蛍光染色法によりサイトヘジン 2 の一部が代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 を共局在すること、さらに mGluR5 もペリシナプスに豊富に局在する報告があることより、免疫沈降法により検討した結果、脊髄においてサイトヘジン 2 は mGluR5 と複合体を形成することを明らかにした。以上の結果より、サイトヘジン 2 は脊髄の後角ニューロンに豊富に発現し、興奮性シナプスのペリシナプスで mGluR5 と複合体を形成し機能する可能性が示唆された。
- (2) 中枢神経系特異的サイトヘジン 2 遺伝子欠損マウスの樹立と慢性痛覚行動解析
サイトヘジン 2 floxマウスとNestinプロモーター制御下Creリコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスを交配し、ウエスタンブロット解析及び免疫組織化学解析により中枢神経系特異的にサイトヘジン 2 の発現が消失していることを確認した。次に野生型及び遺伝子欠損型マウスを用いて、足底部への完全フロイトアジュバント投与による炎症性痛覚モデルおよび坐骨神経の部分結紮による神経損傷性痛覚モデルを作成し、von Frey試験により機械的刺激に対する痛覚閾値の変化を行動学的に検討した。その結果、野生型マウスおよび遺伝子欠損型マウスともに、処置後2日をピークに最低7日間持続する痛覚閾値の低下が認められたが、痛覚閾値の低下の程度は遺伝子欠損型マウスにおいて有意に少ないことが判明した。さらに、痛覚刺激後の脊髄において、Arf6の活性化が刺激後12時間にピークを示すことを明らかにした。
- (3) 慢性疼痛におけるサイトヘジン 2-Arf6 の作用機構の解析
サイトヘジン2が脊髄においてmGluR5と複合体を形成すること、mGluR1/5がERK1/2の活性化を介して慢性疼痛の発現に関与することより、サイトヘジン2がmGluR1/5依存的な慢性疼痛の制御に関与する可能性を検討するために、mGluR1/5選択的アゴニストであるDHPGの髄腔内投与により生じる疼痛に対する行動学的変化の野生型と遺伝子欠損型マウス間での相違を検討した。その結果、遺伝子欠損型マウスは野生型に比較して機械的刺激に対する痛覚閾値の低下が少ないことが明らかになり、脊髄ニューロンのサイトヘジン2が、mGluR5の下流シグナル経路として慢性疼痛の発現に関与する可能性が示唆された。さらに、mGluR1/5の主要な下流シグナル経路であるERK1/2の活性化を抗リン酸化ERK1/2抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討した結果、遺伝子欠損型マウスの脊髄では、DHPGの髄腔内投与によるERK1/2の活性化が著明に減弱していることが明らかになった。
- (4) サイトヘジン選択的阻害薬 SecinH3 の髄腔内投与の慢性疼痛への効果の検討
サイトヘジンの慢性疼痛に対する治療標的としての可能性を検証するために、SecinH3 を野生型マウスの髄腔内に投与し、炎症性および神経障害性疼痛モデルを作成し、von Frey試験により機械的刺激に対する疼痛閾値を検討した。その結果、SecinH3 の髄腔内投与により SecinH3 非投与群、投与群いずれも疼痛モデル作成後 2 日目で疼痛閾値は低下したが、SecinH3 投与群は、非投与群と比較して疼痛閾値は有意に高かった。さらに Arf6 活性は、SecinH3 非投与群では疼痛モデル作成後 12 時間でピークを示したが、SecinH3 投与群では Arf6 活性の有意な増大は認められなかった。以上の結果は、SecinH3 によるサイトヘジンの阻害は慢性疼痛の緩和を示し治療標的となりうる可能性が明らかになった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 脊髄後角ニューロンにおける新たな慢性疼痛制御経路としてのサイトヘジン 2-Arf6 経路

本研究では、免疫組織学的解析および免疫沈降法により、Arf6 活性化制御因子であるサイトヘジン 2 が脊髄の後角ニューロンの興奮性シナプスのペリシナプスに mGluR5 と複合体を形成し局在することを明らかにした。さらに、個体レベルでの疼痛行動解析により、① 中枢神経系特異的サイトヘジン 2 遺伝子欠損マウスにおいて、炎症性および神経損傷性痛覚刺激により生じる持続的な痛覚感受性の亢進の緩和を示すこと、② SecinH3 の野生型マウスの髄腔内投与におけるサイトヘジンの機能阻害により、サイトヘジン 2 遺伝子欠損マウスの表現型と同様に疼痛行動の緩和を示すとともに、脊髄での Arf6 の活性化が抑制されること、③ DHPG 髄腔内投与による脊髄の mGluR1/5 の活性化により生じる痛覚感受性の亢進が、遺伝子欠損型マウスにおいて緩和されることを見出した。これらの結果より、サイトヘジン 2 は、脊髄後角ニューロンにおいて mGluR5 の下流制御経路として Arf6 の活性化を介した疼痛感受性の制御に関与する可能性が強く示唆された。一方、サイトヘジン 2-Arf6 経路による痛覚感受性の制御機構のひとつとして、慢性疼痛の発現に重要な mGluR1/5 の主要な下流シグナル経路である ERK1/2 経路の関与を見出したが、その詳細な分子制御機構については未解決問題として残された。

(2) 慢性疼痛の治療標的としてのサイトヘジン 2-Arf6 経路の可能性

本研究では、髄腔内に SecinH3 の投与による脊髄におけるサイトヘジンの機能阻害により、炎症性および神経損傷性疼痛モデルにおける持続的な痛覚感受性の亢進が緩和されることを見出し、サイトヘジン 2-Arf6 経路の慢性疼痛の新たな治療標的としての可能性を見出した。しかしながら、サイトヘジン 2-Arf6 経路は脊髄後角ニューロン以外に広く神経組織や末梢組織においても発現し、細胞の普遍的な機能に関与していることより、SecinH3 投与により様々な副作用が生じる可能性が考えられ、今後、慢性疼痛の発現過程におけるサイトヘジン 2-Arf6 経路の詳細な分子制御機構の解明により、特異性の高い標的分子の探索が必要であると考えられた。

以上の研究成果は、*Neurobiology of Disease* に 2021 年 11 月号に報告した（研究発表学会誌①）。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ito A, Fukaya M, Sugawara T, Hara Y, Okamoto H, Yamauchi J, Sakagami H. (2021) Cytohesin-2 mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent mechanical allodynia through the activation of ADP ribosylation factor 6 in the spinal cord. *Neurobiol. Dis.* 159:105466.
- ② Murakami M, Murakami AM, Matsuzaki Y, Sawamura D, Ohba T, Miyoshi I, Itagaki S, Sakagami H. Attenuated β -adrenergic response in calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV-knockout mice. *PLoS One*, 16:e0249932 (2021).
- ③ Ishibashi Y, Shoji S, Ihara D, Kubo Y, Tanaka T, Tanabe H, Hakamata T, Miyata T, Satou N, Sakagami H, Mizuguchi M, Kikuchi K, Fukuchi M, Tsuda M, Takasaki I, Tabuchi A. Expression of SOLOIST/MRTFB i4, a novel neuronal isoform of the mouse serum response factor coactivator myocardin-related transcription factor-B, negatively regulates dendritic complexity in cortical neurons. *J. Neurochem.* 159: 762-777 (2021)
- ④ Chomphoo S, Sakagami H, Kondo H, Hipkewo W. Localization of PIP5K γ selectively in proprioceptive peripheral fields and also in sensory ganglionic satellite cells as well as neuronal cell membranes and their central terminals. *J. Anat.* 239: 1196-1206 (2021)
- ⑤ Kawarada L, Fukaya M, Saito R, Kassai H, Sakagami H, Aiba A. Telencephalon-specific Alkbh1 conditional knockout mice display hippocampal atrophy and impaired learning. *FEBS Lett.* 595:1671-1680 (2021)
- ⑥ Nishinarita R, Niwano S, Niwano H, Nakamura H, Saito D, Sato T, Matsuura G, Arakawa Y, Kobayashi S, Shirakawa Y, Horiguchi A, Ishizue N, Igarashi T, Yoshizawa T, Oikawa J, Hara Y, Katsumura T, Kishihara J, Satoh A, Fukaya H, Sakagami H, Ako J. Canagliflozin Suppresses Atrial Remodeling in a Canine Atrial Fibrillation Model. *J Am Heart Assoc.* 10: e017483 (2021)
- ⑦ Kato Y, Ochiai A, Seki Y, Morimoto T, Oizumi H, Ohbuchi K, Mizoguchi K, Yamamoto M, Sakagami H, Miyamoto Y, Yamauchi J. (2021) Phospholipase D and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1 are involved in the regulation of oligodendrocyte morphological differentiation. *Exp Cell Res.* 405:112654 (2021)
- ⑧ Sirisin J, Kamnate A, Polsan Y, Somintara S, Chomphoo S, Sakagami H, Kondo H, Hipkewo W, Localization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) α confined to the surface of

lipid droplets and adjacent narrow cytoplasm in progesterone-producing cells of in situ ovaries of adult mice. *Acta Histochem.*, 123: 151794 (2021)

(2) 口頭発表

- ① 深谷 昌弘, 伊藤 諭子, 岡本 浩嗣, 山内淳司, 阪上 洋行「マウス脊髄でのcytohesin-2-Arf6経路を介した代謝型グルタミン酸受容体依存的な機械的アロディニアの発症機序」
第44回日本神経科学大会 2021年7月31日

(3) 出版物

該当なし

不活性化酵素, 偽遺伝子からの活性化酵素の作成

—酸性キチナーゼの構造, 活性と進化—

1. 研究の目的

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、カニなどの甲殻類、昆虫、真菌類などの多様な生物 (これらをキチン含有生物と呼ぶ) の主要な構成成分である。このため、キチンは、セルロースの次に豊富に存在するバイオマスである。

ヒトとマウスは内在性のキチンを持たないが、**キチンを加水分解する酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia; 別名称 acidic mammalian chitinase, AMCase)** を発現している。

最近、研究代表者らは、マウス、ニワトリ、ブタ、マーモセット (雑食性動物) の胃で、Chia タンパク質が多量に発現し、胃や腸の条件下で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し、キチンを、炭素、窒素そしてエネルギー源である (GlcNAc)₂ へと分解することを報告した [Ohno et al., (2016) *Sci Rep.* 6, 37756; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 6662; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 12963]。

これに対し、イヌ、ウシなどの肉食性と草食性動物の Chia は、雑食性動物と比べ、キチンの分解能力がとて低かった [Tabata et al., (2018) *Sci Rep.* 8, 1461]。さらに、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマでは Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた (Tabata et al., 未発表データ)。

これまでの研究で提示された問題点は以下の 2 点である。

- (1) イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia のキチナーゼ活性は、なぜ低いのか?
- (2) 肉食性動物のネコ科で見つかった Chia の偽遺伝子化の意義はなにか?

研究代表者らの研究で提示された問題は、「肉食性と草食性動物における Chia の不活性化と偽遺伝子化」である。

本研究は、肉食性と草食性動物の不活性化 Chia と偽遺伝子から活性化 Chia を作製する。そして、Chia の不活性化、偽遺伝子化のメカニズムおよび進化的意義を解明する。

以下の 2 項目を研究する。

- (1) キチナーゼ活性の低い①イヌ (肉食性動物) あるいは②ウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする。
- (2) 活性の高いマウス Chia の遺伝子情報を参考に、偽遺伝子から活性化キチナーゼを作製し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) キチナーゼ活性の低い ①イヌ (肉食性動物) あるいは ②ウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする

① イヌ: 2019、2020 年度の研究結果で学術論文を投稿し、Editor と Reviewers の全てのコメントに応えるべく追加実験と論文修正をし、受理されることを目指した。

② ウシ: 草食性動物で、活性の低いウシ Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにした。2019、2020 年度に行ったイヌ Chia の活性化の研究計画と同様に、ウシとマウス Chia キメラタンパク質の作成と解析を行った。マウス vs. ウシ Chia のキメラタンパク質を 6 種作製し、ウシ Chia の活性化を試みた。そして、ウシ Chia の不活性化に関わるアミノ酸を同定することを試みた。

- (2) 活性の高いマウス Chia の遺伝子情報を参考に、偽遺伝子から活性化キチナーゼを作製し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする

2020 年度の研究で、肉食性動物のネコ Chia 偽遺伝子から変異 Chia を大腸菌で発現できた。しかし、その活性は、認められなかった。2021 年度は、肉食性動物で、アミノ酸配列がよく似ていて、キチナーゼ活性が高いミーアキャット Chia のアミノ酸配列と比較し、その活性化を試みる。

3. 研究の成果

(1) キチナーゼ活性の低い ①イヌ (肉食性動物) あるいは ②ウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする

①イヌを含めた肉食性動物における Chia の分子進化の解明：キチン分解能の低いイヌ Chia および肉食性動物全体に焦点を当て、なぜその機能が失われたのかについて論文をまとめた。Molecular Biology and Evolution 誌で、Editor と Reviewers から 28 ものコメントをもらい、追加実験も行い、新規データも加え、すべてに答え、論文をブラッシュアップした。その結果、生化学、分子生物学的な結果に加え、分子進化学の観点からイヌ Chia の不活性化の原因を明らかにし、受理された (Tabata et al., *Mol Biol Evol.* 39, msab331, 2022)。

②ウシにおける Chia の不活性化について：雑食性動物であるマウスの Chia は強力なキチナーゼ活性を有するのに対し、草食性動物のウシ Chia のキチナーゼ活性はマウス Chia の約 1/10 程度である。イヌの場合と同様に、マウスとウシの Chia cDNA を組換えてキメラ体を構築し(図 1 上)、ウシ Chia が不活性化した原因領域を特定した。6 種類のキメラタンパク質の中で、N 末領域 (exons 3-5) をマウス Chia と置換したウシキメラ体は活性が上昇し、逆に、ウシ Chia の同じ領域で置換したマウスキメラ体は活性が低下した(図 1 下)。以上のことから、ウシの exons 3-5 がコードする領域に活性低下の原因が存在することが示唆された(図 2)。次に、N 末領域をさらに細分化したキメラ体を作製し、上記と同様に解析を行なった。その結果、マウスの exons 3-4 及び exon 3 領域を導入したウシ Chia キメラ体は、活性の上昇が認められなかった(図 3)。このことから、ウシ Chia の活性低下の原因は、exon 5 がコードする領域に存在することが分かった。さらに、アミノ酸の絞り込みを行った結果、3 アミノ酸まで狭めることができた。

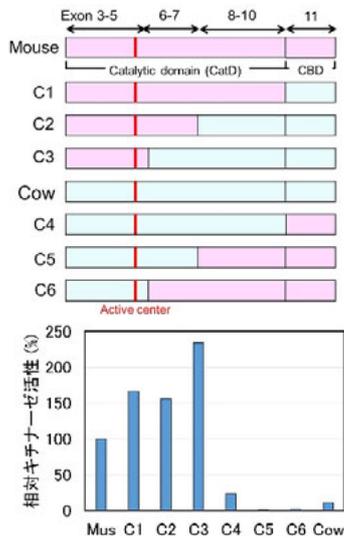


図 1. マウスとウシ Chia 間でのキメラ体の作製 (上)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。

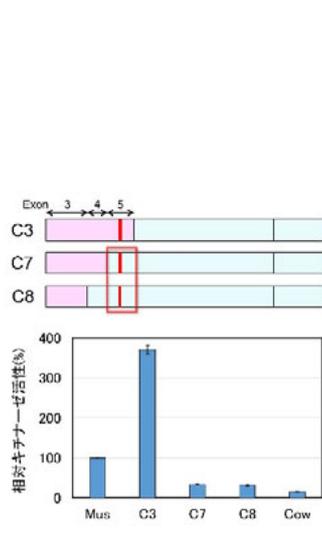


図 2. ウシ Chia の不活性化の原因領域の絞り込みのキメラ (上)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。

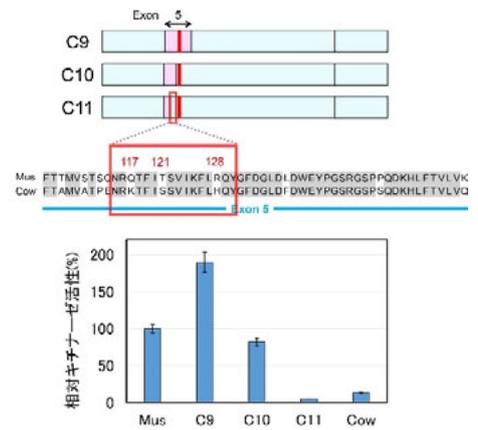


図 3. ウシ Chia exon 5 の不活性化の原因領域の絞り込みのキメラ (上)と候補のアミノ酸のアライメント (中)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。

(2) 活性の高いマウス、ミーアキャット Chia の遺伝子情報を参考に、偽遺伝子から活性化キチナーゼを作製し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする

肉食性動物のネコの Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた。本研究ではネコ Chia の偽遺伝子から活性化酵素を作製し、この分子が、酵素活性を失うように進化した道筋とその意義を解明することを目的とした。まず、活性の高いマウス Chia の遺伝情報を参考に、肉食性動物のネコ Chia 偽遺伝子から活性を有するネコ Chia (Cre-Cat Chia) を作製した。しかし、Cre-Cat Chia には活性が認められなかった(図 4 左)。次に、Chia 分子の Cys 残基の保存性に注目し、Cys を修正した変異体 (Cys-Cat Chia) を作製したが、不活性のままだった(図 4 中)。この結果は、ジスルフィド結合を含む Cys 残基だけでなく、タンパク質の構造と機能に関与するいくつかのアミノ酸置換が存在することを示唆していた。そこで、

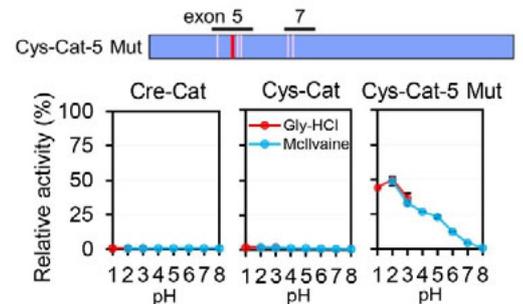


図 4. Exon 5 と 7 に存在する 5 アミノ酸置換の導入 (上)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。Cys-Cat-5 Mu は活性化した。

キチナーゼ活性が強いミーアキャット Chia との間でキメラ体を作製し、Cys-Cat Chia のキチン分解活性の喪失の原因となる領域を特定した。ミーアキャットの exon 5 と 7 領域がネコ Chia を活性化させ、さらに 5 つのアミノ酸置を導入した Cys-Cat-5 Mu は活性化した (図 4 右)。以上の結果は、ネコ Chia 偽遺伝子は、ORF 破壊後に、タンパク質の構造と機能に関与するアミノ酸に変異が導入され、偽遺伝子化した可能性を強く示唆した (図 5)。

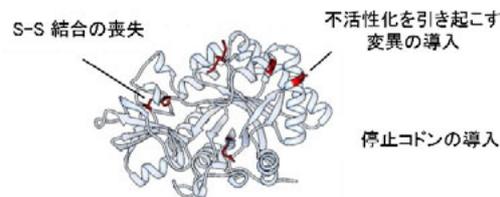


図 5. ネコ Chia 偽遺伝子は、ORF 破壊、タンパク質の構造と機能に関与するアミノ酸に変異が導入され、偽遺伝子化した可能性が高い。

4. 研究の反省・考察

(1) イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia のキチナーゼ活性は、なぜ低いのか？

① イヌを含めた肉食性動物における Chia の分子進化の解明

イヌを研究対象にした 3 年間の研究で、肉食性動物全般について、食性と Chia 遺伝子の関係を明確にでき、High-Impact Journal に学術論文として報告できた (Tabata et al., *Mol Biol Evol.* 39, msab331, 2022)。

② ウシにおける Chia の不活性化について

ここまでの研究で、ウシ Chia の活性低下の原因は、exon 5 がコードする領域に存在することがわかり、さらに、アミノ酸の絞り込みを行った結果、3 アミノ酸まで狭めることができた。今後、(1)-①のイヌと同様のアプローチで原因アミノ酸を絞り込み、草食性動物における食性と Chia 遺伝子の関係を明確にする予定である。

(2) 活性の高いマウス Chia の遺伝子情報を参考に、偽遺伝子から活性化キチナーゼを作製し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする。

この項目の研究内容は、前述の論文 (Tabata et al., *Mol Biol Evol.* 39, msab331, 2022) で報告することができた。

昆虫は、良質なタンパク質、脂質、糖質、そして様々なミネラルに富むので、高栄養価である。そのため、現在、世界的に「昆虫の飼料化」が注目されている。しかし、キチン含有生物を家畜飼料として利用する試みは進んでいない。これは、昆虫の主要な構成成分のキチンが、動物体内で、難消化性の食物繊維である、と長い間考えられてきたことによる。

肉食性動物における昆虫の分解に関わる Chia の活性化は、動物に昆虫を投与するための契機となり得る。3年間の研究では、ウシをはじめとする草食性動物の Chia の不活性化原因の解明まではたどり着けなかったが、イヌで確立した実験手法で、今後さらに実験を行い、ウシをはじめとした草食性動物でも同様のレベルの解明を進め、論文をまとめたい。その結果、昆虫の家畜飼料化に道筋をつけることができると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Tabata, E., Itoigawa, A., Koinuma, T., Tayama, H., Kashimura, A., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P.O., **Oyama, F.** (2022) Noninsect-Based Diet Leads to Structural and Functional Changes of Acidic Chitinase in Carnivora, *Mol Biol Evol.* 39, msab331. [Impact factor 16.240]
- ② Uehara, M., Takasaki, C., Wakita, S., Sugahara, Y., Tabata, E., Matoska, V., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2022) Crab-eating monkey acidic chitinase (CHIA) efficiently degrades chitin and chitosan under acidic and high-temperature conditions. *Molecules* 27. 409. [Impact factor 4.412]
- ③ Wakita, S., Sugahara, Y., Nakamura, M., Kobayashi, S., Matsuda, K., Takasaki, C., Kimura, M., Kida, Y., Uehara, M., Tabata, E., Hiraoka, K., Seki, S., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2021) Mouse acidic chitinase effectively degrades random-type chitosan to chitoooligosaccharides of variable lengths under stomach and lung tissue pH conditions. *Molecules* 26. 6706. [Impact factor 4.412]
- ④ Uehara, M., Tabata, E., Okuda, M., Maruyama, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.**

(2021) Robust chitinolytic activity of crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) acidic chitinase under a broad pH and temperature range, *Sci Rep.* **11.** 15470. [Impact Factor 4.379]

(2) 口頭発表

- ① 田畑 絵理、鯉沼 拓海、田山 拓史、樫村 明德、坂口 政吉、小山 文隆、日本農芸化学会 **2022 年度大会**、口頭発表、2022年3月17日、非昆虫ベースの食餌は、肉食性動物の酸性キチナーゼの構造と機能を変化させる
- ② 小山文隆、鯉沼拓海、田山拓史、樫村昭徳、坂口政吉、田畑絵理、日本農芸化学会 **2022 年度大会**、口頭発表、2022年3月17日、ネコ酸性キチナーゼ偽遺伝子の活性化
- ③ 小山文隆、鯉沼拓海、田山拓史、樫村昭徳、坂口政吉、田畑絵理、**第 35 回日本キチン・キトサン学会大会**、口頭発表、2021年8月26日、キメラ体を利用したイヌの酸性キチナーゼの活性化
- ④ 田畑絵理、鯉沼拓海、田山拓史、樫村昭徳、坂口政吉、小山文隆、**第 35 回日本キチン・キトサン学会大会**、口頭発表、2021年8月26日、食肉目動物の食性と酸性キチナーゼの機能に関する研究

(3) 出版物

なし

がんにおける型破り分泌の機序解明と制御研究

—がんと型破り分泌の関係解明—

1. 研究の目的

- (1) PKC δ 型破り分泌における E-Syt 依存性
 - ①E-SytとPKC δ の相互作用
 - ②PKC δ 型破り分泌と小胞体との関係
- (2)PKC δ 型破り分泌と腫瘍形成との関係
 - ①E-Sytと非結合性PKC δ 変異体の解析
 - ②抗体によるE-SytとPKC δ 相互作用阻害による効果

2. 研究の計画

- (1) PKC δ 型破り分泌における E-Syt 依存性
 - ①E-SytとPKC δ の相互作用:近接標識法であるBioID法を利用して、PKC δ とBioIDタンパク質 (BirA) 癒合タンパク質をドキシサイクリン誘導性に発現するプラスミドを作製した。その後、HepG2細胞に安定に発現する細胞株を樹立し、Tet-onシステムを構築した。その後、PKC δ と相互作用する膜因子の探索を質量分析により行った。方法は2DICALと呼ばれる手法を用いた。得られた候補タンパク質との結合性は、immunoblot法や共焦点レーザー顕微鏡や3D-SIMなどによる免疫染色法で行った。またCRISPR-Cas9によるノックアウト細胞も樹立して検証作業を行った。
 - ②PKC δ 型破り分泌と小胞体との関係:今回、E-Sytと呼ばれる小胞体因子が同定されたので(3. 研究の成果を参照)、小胞体での局在をSec61 β やERseeingをマーカーに用いて共局在解析した。近接ライゲーションアッセイ (PLA) 染色法のシステムを立ち上げ、共局在の定量を試みた。
- (2)PKC δ 型破り分泌と腫瘍形成との関係
 - ①E-Sytと非結合性PKC δ 変異体の解析:PKC δ の変異体を用いて、BioID法でE-Sytの局在領域の同定を試みた。非結合性変異体が多量に得られた場合、その局在に関して小胞体局在の有無を蛍光染色法で検討した。また、変異体の分泌も検討した。免疫不全マウスの皮下に移植し腫瘍形成における意義を検討した。
 - ②抗体によるE-SytとPKC δ 相互作用阻害による効果:市販のPKC δ 抗体のうち、E-Sytとの相互作用を阻害する抗体を得る。このとき、抗体の細胞内送達には脂質drug delivery system (DDS) 試薬を用いて行った。その場合の細胞増殖能もWST-8を用いて評価する。また、腫瘍形成能を評価するため、3Dスフェロイド形成能を比較解析した。

3. 研究の成果

- (1) PKC δ 型破り分泌における E-Syt 依存性
 - ①E-SytとPKC δ の相互作用:2種類の独立した株を用いたプロテオミクス解析により最もPKC δ と相互作用するタンパク質としてE-Sytを得た。この相互作用の妥当性を評価するため、BioID後のimmunoblot解析や通常の共焦点レーザー顕微鏡観察、3D SIM解析により検証して、相互作用を確認した。
 - ②PKC δ 型破り分泌と小胞体との関係:E-Sytのノックアウト細胞を作製し、培養上清のimmunoblot解析を行ったところ、PKC δ やその他importin α 1の分泌が抑制されることが分かった。またPLA染色を行ったところ、PKC δ と小胞体マーカーであるSec61 β との共局在はE-Sytノックアウト細胞で減少した。興味深いことに、PKC δ やimportin α 1を細胞外分泌しない細胞 (Yamada et al., Cancer Res, 2021; Yamada et al., Sci Rep, 2016) ではPKC δ -Sec61 β 相互作用はほとんど観察されなかった。
- (2)PKC δ 型破り分泌と腫瘍形成との関係
 - ①E-Sytと非結合性PKC δ 変異体の解析:C末端を欠損したPKC δ はE-Sytとの相互作用能が減弱することが分かった。またimmunoblot解析から、この変異体は、培養上清中に分泌されないことも突き止めた。さらに、この変異体をマウスの皮下に移植したところ、全長のPKC δ を発現する細胞と比べて腫瘍の大きさが明らかに小さいことが分かった。

②抗体による E-Syt と PKC δ 相互作用阻害による効果：市販の PKC δ 抗体のうち、C 末端を認識する抗体で E-Syt との結合を抑制するものを見出した。この抗体を脂質 DDS で細胞内に導入したところ、肝がん細胞の細胞増殖能を阻害することを見出した。このとき、PKC δ を分泌しない細胞株にはこの DDS-抗体の増殖抑制効果は見られなかった。またこの傾向は 3D スフェロイド形成能についても同様の結果をもたらした。

4. 研究の反省・考察

(1) PKC δ 型破り分泌における E-Syt 依存性

①E-Syt と PKC δ の相互作用：PKC δ が E-Syt と相互作用していることを始めて見出した成果である。E-Syt は小胞体-細胞膜接触点（コンタクトサイト）の構成因子であり、PKC δ との相互作用に関して、このコンタクトサイトの機能に影響しているのか、E-Syt の多機能性を意味しているのかはまだ不明であり、今後の研究が待たれる。今回、E-Syt 以外に PKC δ と相互作用しているタンパク質のなかに小胞体タンパク質が多く見つかっており、PKC δ の新たな多機能性が小胞体から行われている可能性が推察される。また、E-Syt との相互作用が PKC δ のみならず、他の細胞内タンパク質の型破り分泌に関与していることが示唆されており、今後、E-Syt の作用機序が研究されることになる。

②PKC δ 型破り分泌と小胞体との関係：PKC δ の小胞体及び E-Syt との共局在は型破り分泌に極めて重要な役割を果たしていることが本研究により分かった。特に、この小胞体局在に関しては、他の型破り分泌される細胞内タンパク質（importin $\alpha 1$ や nucleolin）でも見られることも分かっているので、型破り分泌が小胞体から生じている可能性を示唆させる。現時点で、型破り分泌の起点となるメカニズムとして、シスゴルジに存在する TMED10 トランスポーターによる小胞侵入が知られているが、本研究では TMED10 のロックダウンで PKC δ 分泌が抑制できなかったことからこの説は否定される。本研究により小胞体での局在の重要性を提案しているので、その分子機構解明を通して、分泌機序の解析を行おうと考えている。

(2) PKC δ 型破り分泌と腫瘍形成との関係

①E-Syt と非結合性 PKC δ 変異体の解析：本研究成果は、PKC δ が型破り分泌するためには C 末端配列が必須であることを強く示唆している。つまり、型破り分泌されるためには E-Syt との相互作用が担保されることが必須となる。この点、他の細胞内タンパク質での検討はまだ行われていないが、共通配列などが見つければ大変面白いと考えている。現在のタンパク質の局在はシグナル仮説により説明されており、シグナルペプチドを有するものが分泌タンパク質となる。この概念を変えるためには、共通配列の特定と普遍性を証明する必要があるが、今後更なる検討を計画している。また、本研究により PKC δ 分泌の腫瘍形成における意義の検証も出来た。PKC δ は細胞外に放出され、細胞膜上から増殖因子として機能している。

②抗体による E-Syt と PKC δ 相互作用阻害による効果：E-Syt と PKC δ の相互作用について DDS を用いて抗体で阻害する実験の意義が示せた。またこの成果は、細胞外 PKC δ の腫瘍形成能への影響も評価できるため、上記の (2)-②同様の結論が導けた。本研究は型破り分泌が腫瘍形成と関係することを様々な視点で解析され、サポートされていることから、その機構を阻害するという創薬理論に基づいた DDS-抗体創薬が今後臨床応用されることが期待される。現在、製薬業界でオルガネラ創薬が注目されていることを考えると、我々の研究は小胞体を標的とした創薬に位置付けられ、予後不良の肝がんに対する医療ニーズに応える解決策になることも期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Kohji Yamada, Kiyotsugu Yoshida. Multiple subcellular localizations and functions of protein kinase C δ in liver cancer. *World Journal of Gastroenterology* 14: 188-198 (2022)

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

OECD の枠組みに基づく世代別金融リテラシーの調査研究

1. 研究の目的

金融リテラシーには、全世代・属性に求められる内容もあれば、特定の世代・属性に重点的強化が必要な内容もあり、オーダーメイド方式による金融教育の展開が必要である。そのためには、OECD が示した若者、成人、中小零細企業家向けのフレームワークを参考に、自ら考え、現実社会における取引を学べるアクティブラーニングを中心とした実践教授型教育が有効であると考えられる。そこで、value-added assessment、matrix puzzle など最新の評価手法を組み入れた、より適切な尺度、厳格な評価方法に基づく信頼性・妥当性の高い日本独自の調査票を設計し、真の金融リテラシーを測定する。

① emerging adulthood (Arnett 2000) とは、年齢的には高校を卒業し、就職や進学で親元を離れ、独り立ちの生活が始まる 18~25 歳であり、青年期から初期成人期にかけて生じ、かつ、どちらの時期とも異なるという特徴を持つ。この時期は、自己に日常生活が焦点づけられ、青年でもオトナでもないという感覚を持ち、不安定であるが大きな希望と期待を抱きながら、自分がどうありたいのか、どう生きたいのか、アイデンティティを探索している。同時にこの時期は、高校までに修得してきた知識・スキルを現実社会で実際に活用しはじめる時期でもある。たとえば、一人暮らしを開始すれば、途端に収入・支出のバランスをはかる家計管理スキルが求められる。大学など高等教育機関への進学に伴い貸与型奨学金の活用も増えている。さらに 2022 年からの成人年齢引き下げ (18 歳成人) に伴い、成年初心者として悪質業者のターゲットとなりかねない。この時期、これらが上手く行えない時に蒙る精神的打撃は大きく、それは、後の人生の well-being にも大きなマイナスの影響を与えることが先行研究から示唆されている。

② 本研究においては、学校教育、家族やメディアといった社会的エージェントが、emerging adulthood の経済的自立にどのような影響を与えているのか、family financial socialization theory やエージェント理論をベースに検討を行う。日本は、貯蓄は大事と躑躅ける一方で、日々の生活費や教育費といった実践的知識は子どもには教えない、という文化を持つ。この文化がアメリカやイギリス、さらには近隣東南アジア諸国とどのように異なるのか。政府は「貯蓄から投資へ」を推進しようとしているが、2021 年においても家計資産のうち「預貯金」が過半数を占めている。なぜ、間接金融から直接金融への移行が進まないのか。それらのヒントを本研究を通して明らかにする。

2. 研究の計画

2021 年度は、emerging adulthood 世代を対象に研究を行う。具体的なテーマ・計画は以下の通りである。

① emerging adulthood に関連の深い金融経済領域である「奨学金」(邦文は「奨学金」、英文は「student loan」) に関して制度や利用実態等に関する内外の先行研究を調査して、どのような研究蓄積があるのか論点を整理し、量的調査の項目として組み込む尺度の選定を行う。

② これら先行研究の知見をベースに、4 年制大学に通う大学生を対象とした奨学金に関する知識、奨学金の制度理解と金融リテラシーの関係について、インターネットによるアンケート調査 (以降、インターネット調査と略記) を実施し、分析を行う。

仮説 1-1: 金融知識得点は、男性の方が女性より高いだろう

仮説 1-2: 金融知識得点は、奨学金を貸与していない学生ほど、高いだろう

仮説 2: 奨学金利用者に限定すると、奨学金の制度について理解しているものほど、金融知識得点が高いだろう

仮説 3-1: 奨学金の制度理解や JASSO に関する基礎的知識は、家族コミュニケーションの在り方によって有意に異なるだろう

仮説 3-2: 家族の中でフランクな会話の多い学生ほど、奨学金の制度理解や JASSO に関する基礎的知識は高くなるだろう

③ 研究成果は研究会で報告・議論した後、順次、学会発表を行う。

なお、研究代表者が奨学金に関して量的調査を行うのは今回が初めてである。そこで、今年度の研究の重点は、①により比重が高いものとなった。

3. 研究の成果

全国の4年制大学に通う1500名（男女1：1）を対象に、図1の分析フレームワークにより奨学金の制度理解、利用実態、金融態度に関するインターネット調査を実施した。

その結果、表1より

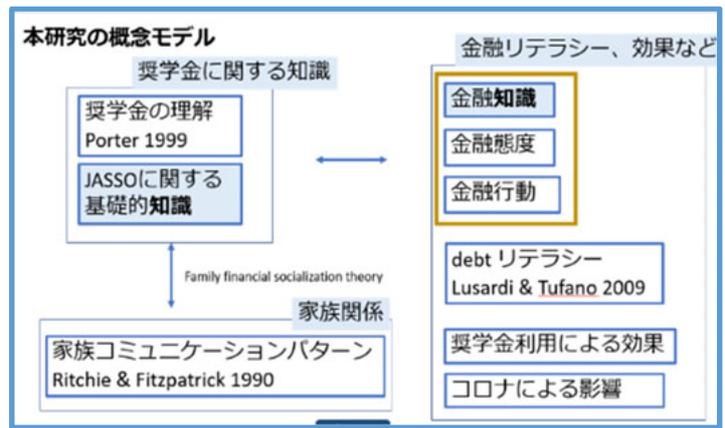
① 金融知識得点は、男子の方が有意に高い項目と、女子の方が有意に高い項目がある。

② 金融知識得点は、概して、奨学金貸与学生より奨学金給付学生または奨学金非利用学生の方が有意に高い傾向にある。

③ 奨学金利用者に限定すると、奨学金の制度について理解しているものほど、金融知識得点が高い。

④ 奨学金制度に関する理解度は低く、「わからない」(Do Not Know; 以下、DNK と略記) と回答する割合が一定数存在する。などが明らかになった。

そこで、金融知識問題のDNKの回答数（合計）を従属変数に回帰分析を行ったところ、性別では女性ほど、また金融知識得点が高いほど、有意に多くなる傾向があることが示唆された。奨学金知識も同様、金融知識得点や奨学金知識得点が高いほど、有意にDNK回答数が多くなる傾向があることが示唆され、仮説の一部が支持された（表2）。



【図1】分析フレームワーク

【表1】金融知識得点、一元配置分散分析結果

	問題	正答率%	性別	Type2(3分類)	Type3(2分類)
Q0201	円高	73.2		* 利用なし>貸与、給付	** 非活用>活用
Q0202	インフレ	76.7			
Q0203	預金・複利計算	62.2			* 非活用>活用
Q0204	預金・複利計算	43.9	** 男子>女子		
Q0205	金利上昇局面	65.4			
Q0206	長期運用	49.6		* 給付、利用なし>貸与	
Q0207	3ヶ月、1年預金	53.3			
Q0208	インフレ	63.6		* 利用なし>貸与、給付	** 非活用>活用
Q0209	住宅ローン	77.7	*** 女子>男子		
Q0210	分散投資	72.3	* 女子>男子		

(注)正答率:「わからない」を除いた値。
(注)Type2:貸与型・給付型・活用せず。Type3:奨学金活用・奨学金活用せず
(注)学年:Q0202、Q0206ともに5%水準有意だがグループは1つとなったため割愛。

【表2】DNK、回帰分析

	DNKの数	
	金融知識	奨学金知識
女性ダミー	.057 ***	-.013
学年	.012	.011
金融知識得点	-.864 ***	-.195 ***
奨学金知識得点		-.647 ***
修正済R2乗	.766	.536
F値	1807.766	227.516

(注1)奨学金知識: JASSO利用者のみ対象。
(注2) $r(\text{奨学金知識, 金融知識}) = .334, p < .000$

4. 研究の反省・考察

(1) 奨学金の研究・調査は始まったばかりである。今回の調査では、予期せずDNK回答割合が高く、なぜDNK回答割合が高いのかの検討に時間を割くこととなり、仮説の検証が未完となってしまった。引き続き、2022年度も仮説の検証を行う。

(2) 家庭の経済力と大学生の知識力にプラスの相関が確認された。ただし、「子の経済を何歳まで支えるか」といった親の子に対する経済的支援に関する考え方を問う質問がなかったため、疑似相関となっている可能性も拭いきれない。この点は効果を分離できるよう、調査票を設計する必要がある。

(3) 本学学生を対象に、両親からお金の管理などについて何を学んだかのヒアリング調査を実施したところ、父親が料理を行う頻度が高いほど、その過程で父親と娘（大学生）との会話が増え、仕事のこと、生き方やお金の使い方、株主優待など直接金融に関する会話が自然とされていることが明らかになった。こういった観点も研究に盛り込む予定である。

(4) なお、大学生の奨学金の制度、JASSOに関する基礎的知識得点は想定外に低かった。そのため、2022年度以降の講義で「奨学金」に関する話題も展開する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Abe, Shintaro, Takahashi, Keiko, & Inose, Takenori. (2022.3). Financial Literacy among Japanese University Students: Current State and Issues, The Bulletin of Josai International University, 30(1), 41-54.

(2) 口頭発表

①Takahashi, Keiko, & Fujiwara, Saki. (2021.5), A financial behavior and an impact of influencers among Japanese university students, Poster presented at the annual conference of the American Council on Consumer Interests (ACCI), (Web)

②Takahashi, Keiko, Abe, Shintaro, & Inose, Takenori. (2021.6), Current State and Issues of Financial Literacy among Japanese University Students, Paper Presented at the annual conference of the 10th annual AEA Conference on Teaching and Research in Economic Education (CTREE), (Web)

③高橋桂子・阿部信太郎・猪瀬武則・中野裕美子(2021.10)金融リテラシー3ヶ国調査の結果：日本・アメリカ・韓国の比較、経済教育学会第37回全国大会(Web)

④Takahashi, Keiko. (2021.11), Parental financial socialization and healthy financial behaviors among Japanese university students, Paper presented at the 2021 annual conference of National Council on Family Relations (NCFR), (Web)

⑤高橋桂子・阿部信太郎・猪瀬武則・小川正人(2022.3)奨学金制度の理解と金融リテラシーの関連、経済教育学会春季研究集会(Web)

(3) 出版物

なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	順 天 堂 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	細胞老化の多様性とその病態生理学的意義の解明	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①細胞老化 ②生活習慣病		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 野 徹	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	教 授	研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 田 陽 子	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	特 任 准 教 授	マウス解析
須 田 将 吉	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	非 常 勤 助 教	細胞生物学的解析・マウス解析
勝 海 悟 郎	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	特 任 助 教	細胞生物学的解析・オミックス解析
降 旗 高 明	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	助 教	マウス解析
古 内 亮	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	非 常 勤 助 教	マウス解析
蕭 捷 倫	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	博 士 研 究 員	マウス解析
蕭 詠 庭	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科	博 士 研 究 員	細胞生物学的解析

細胞老化の多様性とその病態生理学的意義の解明

1. 研究の目的

加齢に伴う糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の罹患率の増加は、虚血性心疾患や脳卒中の発症をもたらすことによって、健康寿命の短縮に参与している。加齢に伴う様々な臓器機能不全（病的臓器老化）が、これらの生活習慣病の発症・進展の原因の一つとなっていることが示唆されているが、その機序は不明である。

これまで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に加齢に伴う病的老化形質を担う」という細胞老化仮説に基づいて進めてきた。その結果、ヒト動脈硬化巣に老化血管細胞の集積が認められること（*Circulation* 2002）、蓄積した老化血管細胞が様々な血管機能障害の形質（NO 産生の低下や炎症分子の発現の亢進など）を示すことによって、動脈硬化やインスリン抵抗性の発症・進展に参与していることを明らかにした（*Circulation* 2003, 2006, *EMBO J* 2004, *Cell Rep* 2014, *JMCC* 2019）。また、肥満マウスや2型糖尿病患者の内臓脂肪においても老化細胞が蓄積しており、p53/p21 シグナルの活性化とともに Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子による慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性を誘導していた。これらの形質は、脂肪特異的 p53 欠失によって改善したことから、脂肪組織における老化細胞の蓄積が、2型糖尿病の発症・進展に重要であることが明らかとなった（*Nat Med* 2009）。さらに、心不全の病態において、心臓組織内の心筋・血管・マクロファージの p53 シグナルの活性化がその発症・進展に参与していること（*Nature* 2007, *JMCC* 2015）、心不全に伴って脂肪組織における p53 シグナルの活性化が惹起されることでさらに心機能が負に制御されていること、これらの悪循環は脂肪組織特異的 p53 欠失・抑制により改善することを明らかにしてきた（*Cell Metab* 2012）。

以上の結果は、p53 依存性老化シグナルの活性化が病的老化に参与しており、その活性化を抑制することによって動脈硬化や心不全、糖尿病などの加齢関連疾患の発症・進展を抑制できる可能性を示唆する（*Circ Res* 2007, *Nat Rev Cardiol* 2008, *Cell Metab* 2014）。しかしながら、実際には p53 を標的とした抗老化治療はがん化を促進する可能性が高いため、異なった治療のストラテジーの開発が必要である。これに対して Baker らは、薬剤によって p16 陽性老化細胞をアポトーシス誘導により除去しうる遺伝子改変マウスを作製し、老化細胞の除去 (Senolysis) が早老症モデルマウスや高齢マウスの様々な老化形質を改善するとともに、寿命を延長させることを報告した（*Nature* 2011, *Nature* 2016, *Science* 2016）。さらに最近、老化細胞除去薬 (Senolytics) が、老化細胞の除去が高齢マウスの様々な老化形質を改善するとともに、寿命を延長させること、逆に少量の老化細胞の移入によって病的老化形質を促進され、寿命短縮をもたらされることが示された（*Nat Med* 2018）。しかしながら、これまで報告されている Senolytics は老化細胞がアポトーシス抵抗性になることを標的とした非特異的なものが多く、その副作用の発現が危惧されている。また、老化細胞が分泌する炎症分子を標的とした治療についても、免疫抑制など副作用の発現が危惧されている。そこで研究提案では、下記の項目を明らかにすることで、老化細胞蓄積の病的意義を検証するとともに、老化細胞を標的とした新規治療開発の基盤とすることを目指す。

1. 細胞老化の多様性を明らかにする
2. Senescence-associated secretory phenotype (SASP) の多様性を明らかにする
3. 生理的細胞老化の制御メカニズムを明らかにする

2. 研究の計画

(1) 細胞老化の多様性を明らかにする
組織に蓄積する老化細胞は一様でないことが予想され、その老化形質や遺伝子発現、病的老化に対する病態生理学的な役割なども細胞・組織特異的な変化を示すと考えられる。このような

細胞・組織特異的相違を明らかにすることは、細胞・組織特異的な老化細胞除去治療の確立に対して、重要な知見をもたらす。そこでまず、細胞・組織特異的な老化細胞の多様性を明らかにするため、細胞・組織特異的な老化細胞リポーターマウスを確立する。具体的には、p16 遺伝子座に in frame で floxed stop-tTA をノックインした (p16-stop-tTA KI) マウスを作製する。これまでの老化細胞標識・除去モデルマウスは、p16/Arf BAC clone やその一部 (~2kb) のプロモータを用いたトランスジェニックマウスであったのに対して、このマウスでは、内因性の p16 の発現を変化させることなく、同モル数の tTA を発現し、その転写効果を Cre-TetO システムにより組織特異的に増幅できるようにデザインした(確立済み)。p16-stop-tTA KI マウスに TetO-Tomato マウス；組織特異的(内皮・平滑筋・脂肪細胞・単球など) Cre マウスを交配することで、細胞特異的な老化細胞の標識を行う。これらのマウスから細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、細胞・組織特異的な老化細胞の特異的抗原を同定するとともに、その老化形質の相違を明らかにすることで、細胞・組織特異的な老化細胞除去治療開発の基盤とする。

(2) Senescence-associated secretary phenotype (SASP) の多様性を明らかにする

蓄積した老化細胞は NF- κ B 依存的に SASP 因子の発現を増加させることで、組織の慢性炎症を惹起し、病的老化形質の発現に寄与することが知られている。培養老化細胞を用いた研究において、SASP 因子は細胞の種類によって多様であることが知られているが、個体の組織における SASP 因子の多様性やそれぞれの SASP 因子の病的役割については明らかでない。そこでまず、p16-stop-tTA KI ; TetO-Tomato ; 組織特異的 Cre マウスから、細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、細胞・組織特異的な SASP 因子を同定する。次に、p16-stop-tTA KI マウスに TetO-mutant I- κ B ; 組織特異的 Cre マウスを交配することで、時間・空間的に老化細胞の SASP 因子の発現を制御可能なモデルを確立し、それぞれ組織特異的 SASP 因子が、どのように病的老化形質に関与しているかについての検証も進めていくことで、細胞・組織特異的な SASP 因子治療開発の基盤とする。

(3) 生理的細胞老化の制御メカニズムを明らかにする

組織における老化細胞の蓄積は、加齢やメタボリックストレスなどによって加速し、臓器老化に関与していると考えられている。一方、創傷治癒過程においても老化細胞の特徴を持った細胞が出現し、創傷治癒を促進していることも観察されている。病的な老化細胞の蓄積は持続的であるのに対して、生理的な老化細胞の蓄積は一過性であり、病的なインパクトを持たないことが知られている。したがって、これらの制御メカニズムの相違を明らかにすることは、老化細胞を標的とした新規治療開発につながる可能性がある。そこでまず、p16-stop-tTA KI ; TetO-Tomato ; 組織特異的 Cre マウスにおいて、病的な老化細胞の蓄積モデル(高カロリー食負荷など)と生理的な老化細胞の蓄積モデル(創傷治癒モデルなど)を作製し、それぞれのモデルから、細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、病的細胞老化と生理的細胞老化の相違点を理解する。特に、病的な老化細胞の蓄積が持続的であるのに対して生理的な老化細胞の蓄積が一過性であるメカニズムについて、老化細胞に対する免疫制御に焦点を当てて解析を進める。

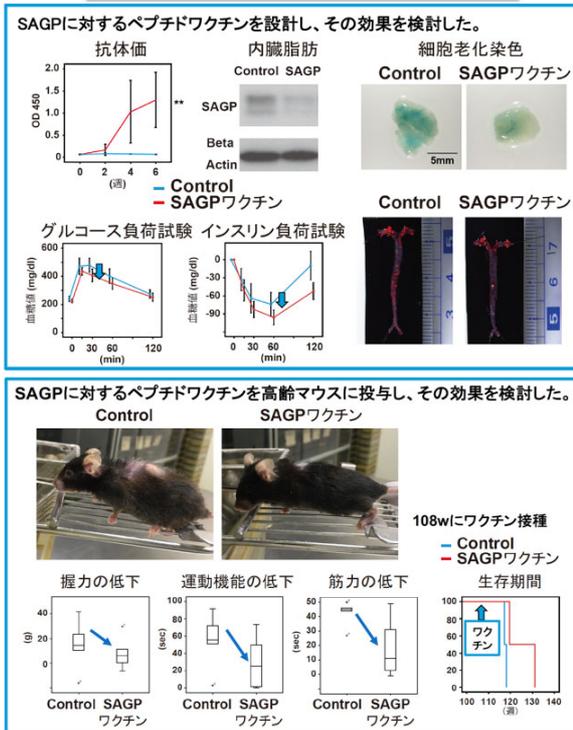
3. 研究の成果

2021 年度は計画 1 を中心に進めた。老化血管内皮細胞のオミックス解析から同定した老化細胞の特異的抗原 Seno-antigen のなかで、ヒトの加齢と関連が示唆されている Senescence-associated glycoprotein (SAGP) についてまず検討を進めた。本分子は、ヒト老化血管内皮細胞において発現が著明に増加していた。その発現の亢進は、高齢マウスや動脈硬化マウスの大動脈や肺組織から単離した血管内皮細胞においても観察された。特に高齢マウスにおいては、大

動脈だけではなく血管の多い組織や内臓脂肪、骨髄組織においてもその発現の亢進が見られた。動脈硬化のある患者の動脈組織においてもその発現の亢進は認められた。ヒト血管内皮細胞において SAGP をノックダウンすると、分裂寿命がむしろ短縮しており、p53 や p21 の発現上昇を伴っていたことから、SAGP はヒト血管内皮細胞の分裂寿命を正に制御していることがわかった。局在を検討すると、細胞膜のみならず、細胞内への internalization を認め、その局在はライソゾームであることがわかった。SAGP をノックダウンした細胞では、ライソゾーム機能が低下していることも観察された。さらに、SAGP はライソゾームにおける V-ATPase と結合しており、その V1 サブユニットと Vo サブユニットの結合制御によって V-ATPase 活性を調整していることがわかった。SAGP の発現制御を調べるために ATAC-seq を行ったところ、老化細胞の SAGP 遺伝子領域において MITF/TFE の結合領域が活性化していることがわかった。実際、ChIP-PCR にて老化細胞における MITF/TFE の結合の増強を確認した。MITF/TFE の発現は老化細胞において上昇していること、MITF/TFE をノックダウンすると SAGP の発現が低下すること、ライソゾームストレスを加えると、MITF/TFE の活性化とともに SAGP の発現が亢進することなどから、SAGP は老化に伴うライソゾームストレスによって増加し、ライソゾーム機能を性に制御する老化細胞の Survival factor であることが示唆された。

次に、SAGP が Senolysis の標的になるかどうかについて調べるために SAGP 陽性老化細胞を標識しつつ、DT 投与により老化細胞を除去できるマウスモデルを作製した。その結果、SAGP 陽性老化細胞除去によって、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化などが改善することがわかった。そこで、SAGP を標的としたワクチンの作成を試みた。その結果、ワクチン接種により ADCC 活性を持った抗体の誘導が確認できた。さらに、高脂肪食負荷に伴って内臓脂肪や動脈硬化巣に蓄積する SAGP 陽性老化細胞がワクチン摂取により除去されていること、その結果、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化などが改善することが明らかとなった。これらの効果は SAGP 欠失マウスでは認められなかった。また、NK/T 細胞を除去することでワクチンの効果が減弱したことから、ワクチンによって誘導される ADCC 活性を持った抗体が作用していることが示唆された。これまでの Senolytics と効果を比較したところ、ワクチンはより持続的に作用し、血球減少などの副作用が少ないことがわかった。さらに、ワクチンによる SAGP 陽性老化細胞除去は、高齢マウスのフレイルの改善や早老症マウスの寿命の延長といった効果があることも明らかとなった。

SAGP(老化細胞除去)ワクチン



4. 研究の反省・考察

2021年度の計画は順調に進んでおり、大きな問題点はなかった。

5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① Joki Y, Konishi H, Ebinuma H, Takasu K, Minamino T. Circulating sLR11 levels predict severity of pulmonary hypertension due to left heart disease. **PLoS One**. 2021; 16(12): e0261753. doi: 10.1371/journal.pone.0261753.
- ② Fujiki S, Kashimura T, Okura Y, Kodera K, Watanabe H, Tanaka K, Bannai S, Hatano T, Tanaka T,

- Kitamura N, [Minamino T](#), Inomata T. Incidence and Risk Factors of Future Need for Long-Term Care Insurance in Japanese Elderly Patients With Left Ventricular Systolic Dysfunction. **Circ J**. 2021; 86(1): 158-165. doi: 10.1253/circj.CJ-21-0580.
- ③ Ueda R, Nishizaki Y, Nojiri S, Iwata H, Miyauchi K, Matsuyama K, Sanada S, [Minamino T](#), Daida H. Factors Associated With the Acceleration of Patient Enrollment in Clinical Studies: A Cross-Sectional Study. **Front Pharmacol**. 2021; 12: 753067. doi: 10.3389/fphar.2021.753067.
- ④ Ishiwata S, Kasai T, Sato A, Suda S, Matsumoto H, Shitara J, Yatsu S, Murata A, Shimizu M, Kato T, Hiki M, Matsue Y, Naito R, Daida H, [Minamino T](#). Prognostic effect of sleep-disordered breathing on hospitalized patients following acute heart failure. **Clin Res Cardiol**. 2021 Nov 11. doi: 10.1007/s00392-021-01969-x.
- ⑤ Tomizawa N, Nozaki Y, Fujimoto S, Takahashi D, Kudo A, Kamo Y, Aoshima C, Kawaguchi Y, Takamura K, Hiki M, Dohi T, Okazaki S, [Minamino T](#), Aoki S. A phantom and in vivo simulation of coronary flow to calculate fractional flow reserve using a mesh-free model. **Int J Cardiovasc Imaging**. 2021 Nov 2. doi: 10.1007/s10554-021-02456-0.
- ⑥ Suda M, Shimizu I, Katsuumi G, Yoshida Y, Matsumoto N, Hayashi Y, Ikegami R, Yoshida Y, Mikawa R, Katayama A, Wada J, Seki M, Suzuki Y, Iwama A, Nakagami H, Nagasawa A, Morishita R, Sugimoto M, Okuda S, Tsuchida M, Ozaki K, Nakanishi-Matsui M, [Minamino T](#). Senolytic vaccination improves normal and pathological age-related phenotypes and increases lifespan in progeroid mice. **Nat Aging**. 2021; 1: 1117–1126. doi:10.1038/s43587-021-00151-2.
- ⑦ Kunimoto M, Yokoyama M, Shimada K, Matsubara T, Aikawa T, Ouchi S, Fukao K, Miyazaki T, Fujiwara K, Abulimiti A, Honzawa A, Shimada A, Yamamoto T, Amano A, Saitoh M, Morisawa T, Takahashi T, Daida H, [Minamino T](#). Relationship between skin autofluorescence levels and clinical events in patients with heart failure undergoing cardiac rehabilitation. **Cardiovasc Diabetol**. 2021; 20(1): 208. doi: 10.1186/s12933-021-01398-0.
- ⑧ Kamo Y, Fujimoto S, Nozaki YO, Aoshima C, Kawaguchi YO, Dohi T, Kudo A, Takahashi D, Takamura K, Hiki M, Okai I, Okazaki S, Tomizawa N, Kumamaru KK, Aoki S, [Minamino T](#). Incremental Diagnostic Value of CT Fractional Flow Reserve Using Subtraction Method in Patients with Severe Calcification: A Pilot Study. **J Clin Med**. 2021; 10(19): 4398. doi: 10.3390/jcm10194398.
- ⑨ Nakao M, Shimizu I, Katsuumi G, Yoshida Y, Suda M, Hayashi Y, Ikegami R, Hsiao YT, Okuda S, Soga T, [Minamino T](#). Empagliflozin maintains capillarization and improves cardiac function in a murine model of left ventricular pressure overload. **Sci Rep**. 2021; 11(1): 18384. doi: 10.1038/s41598-021-97787-2.
- ⑩ Fukase T, Dohi T, Chikata Y, Takahashi N, Endo H, Doi S, Nishiyama H, Kato Y, Okai I, Iwata H, Okazaki S, Isoda K, Miyauchi K, Daida H, [Minamino T](#). Serum apolipoprotein E levels predict residual cardiovascular risk in patients with chronic coronary syndrome undergoing first percutaneous coronary intervention and on-statin treatment. **Atherosclerosis**. 2021; 333: 9-15. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.08.021.
- ⑪ Morisawa T, Saitoh M, Takahashi T, Watanabe H, Mochizuki M, Kitahara E, Fujiwara T, Fujiwara K, Nishitani-Yokoyama M, [Minamino T](#), Shimada K, Honzawa A, Shimada A, Yamamoto T, Asai T, Amano A, Daida H. Association of phase angle with hospital-acquired functional decline in older patients undergoing cardiovascular surgery. **Nutrition**. 2021; 91-92:111402. doi: 10.1016/j.nut.2021.111402.
- ⑫ Noguchi M, Dohi T, Okazaki S, Matsumura M, Takeuchi M, Endo H, Kato Y, Okai I, Nishiyama H, Doi S, Iwata H, Isoda K, Usui E, Fujimura T, Seike F, Mintz GS, Miyauchi K, Daida H, [Minamino T](#), Maehara A. Comparison of 6-month vascular healing response after bioresorbable polymer versus durable polymer drug-eluting stent implantation in patients with acute coronary syndromes: A randomized serial optical coherence tomography study. **Catheter Cardiovasc Interv**. 2021; 98(5): E677-E686. doi: 10.1002/ccd.29892.
- ⑬ Otsuki S, Izumi D, Sakaguchi Y, Suzuki N, Hakamata T, Ikami Y, Hasegawa Y, Yagihara N, Iijima K, Chinushi M, [Minamino T](#), Takayuki I. Efficacy of antitachycardia pacing alert by remote monitoring of implantable cardioverter-defibrillators for out-of-hospital electrical storm. **Pacing Clin Electrophysiol**. 2021; 44(10): 1675-1682. doi: 10.1111/pace.14334.
- ⑭ Fukase T, Dohi T, Kato Y, Chikata Y, Takahashi N, Endo H, Doi S, Nishiyama H, Okai I, Iwata H, Okazaki S, Isoda K, Miyauchi K, Daida H, [Minamino T](#). High Apolipoprotein E Levels Predict Adverse Limb Events in Patients with Peripheral Artery Disease Due to Peripheral Artery Disease Undergoing Endovascular Treatment and On-Statin Treatment. **Int Heart J**. 2021; 62(4): 872-878. doi: 10.1536/ihj.20-816.
- ⑮ Fujiki S, Watanabe H, Obata H, Suda M, Mitsuma W, Tomii A, Sakai K, Uehara A, Shimizu I, Kashimura T, Ozaki K, [Minamino T](#). Association of adipokines with frailty in heart failure. **Acta Biomed**. 2021; 92(3): e2021195. doi: 10.23750/abm.v92i3.9228.
- ⑯ Nozaki YO, Fujimoto S, Aoshima C, Kamo Y, Kawaguchi YO, Takamura K, Kudo A, Takahashi D,

Hiki M, Kato Y, Okai I, Dohi T, Okazaki S, Tomizawa N, Kumamaru KK, Aoki S, Minamino T. Comparison of diagnostic performance in on-site based CT-derived fractional flow reserve measurements. **Int J Cardiol Heart Vasc**. 2021; 35: 100815. doi: 10.1016/j.ijcha.2021.100815.

- ⑰ Ishiwata S, Matsue Y, Nakamura Y, Dotare T, Sunayama T, Suda S, Yatsu S, Kato T, Hiki M, Kasai T, Minamino T. Clinical and prognostic values of urinary alpha1-microglobulin as a tubular marker in acute heart failure. **Int J Cardiol**. 2021; 338: 115-120. doi: 10.1016/j.ijcard.2021.06.041.
- ⑱ Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Yamada M, Honzawa A, Kunimoto M, Sugita Y, Fujiwara K, Matsubara T, Matsumori R, Abulimiti A, Shimada A, Yamamoto T, Asai T, Amano A, Saitoh M, Morisawa T, Takahashi T, Daida H, Minamino T. Association Between Constipation and Frailty Components in Patients Undergoing Late Phase II Cardiac Rehabilitation. **Cardiol Res**. 2021; 12(3): 169-176. doi: 10.14740/cr1246.
- ⑲ Takeuchi M, Wada H, Ogita M, Takahashi D, Okada-Nozaki Y, Nishio R, Yasuda K, Takahashi N, Sonoda T, Yatsu S, Shitara J, Tsuboi S, Dohi T, Suwa S, Miyauchi K, Daida H, Minamino T. Impact of Prior Stroke on Long-Term Outcomes in Patients With Acute Coronary Syndrome. **Circ Rep**. 2021; 3(5): 267-272. doi: 10.1253/circrep.CR-21-0010.
- ⑳ Kagiya N, Hiki M, Matsue Y, Dohi T, Matsuzawa W, Daida H, Minamino T, Kasai T. Validation of telemedicine-based self-assessment of vital signs for patients with COVID-19: A pilot study. **J Telemed Telecare**. 2021: 1357633X211011825. doi: 10.1177/1357633X211011825.

(2)口頭発表

国際学会・シンポジウム招待講演

- ① Minamino T. Targeting senescent cells as a novel treatment of cardiovascular aging. ESC Preventive Cardiology 2021, Healthy cardiovascular aging – Is it possible? 2021/4/17, Web
- ② Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. The 10th international meeting on ageing -Functional phenotype of the aged cardiovascular system, 2021/9/4, Heart Centre University Hospital Halle (Saale), Web
- ③ Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, 2021/12/13, Osaka

国内学会・シンポジウム招待講演

- ① Minamino T. 細胞老化を標的とした抗老化治療の開発 第120回日本皮膚科学会総会 教育講演10 アンチエイジング医学:老化は疾患である 2021年6月10日 パシフィコ横浜
- ② Minamino T. 抗老化治療として運動を考える 第27回日本心臓リハビリテーション学会総会 シンポジウム6:基礎研究を心臓リハビリテーションのエビデンスに活かす (Bench to Bedside) 2021年6月19日 幕張メッセ
- ③ Minamino T. 老化細胞を標的とした生活習慣病治療開発 第50回日本心臓血管作動物質学会 シンポジウム講演4 2021年7月12日 信州大学 松本キャンパス
- ④ Minamino T. 老化細胞除去 Senolysis による抗老化治療の開発 第63回日本平滑筋学会総会 2021年8月6日 Web開催
- ⑤ Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease 第38回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR) 2021年12月10日 Web開催
- ⑥ Minamino T. 糖尿病の多因子介入の重要性について考える～経口GLP-1受容体作動薬に期待すること～ 第59回日本糖尿病学会 関東甲信越地方会 ランチョンセミナー1 2022年1月22日 パシフィコ横浜
- ⑦ Minamino T. 老化細胞除去 Senolysis による抗老化治療の開発と組織再生の可能性 第21回日本再生医療学会総会 シンポジウム23「細胞の体内環境を考えた再生誘導治療のストラテジー」 2022年3月18日 Web開催
- ⑧ Minamino T. 老化細胞を標的としたアンチエイジング 日本抗加齢医学会専門医・指導士認定委員会主催大阪開催/基礎・受験編講習会 2022年3月20日 Web開催
- ⑨ Minamino T. 細胞老化を標的とした抗老化治療の開発 第42回日本肥満学会 JASSO シンポジウム10 肥満症医療のイノベーション 2022年3月27日 パシフィコ横浜 3階

(3)出版物

- ① Katsuumi G, Minamino T. Cellular Senescence in Disease. 1st Edition - November 27, 2021. Editors: Manuel Serrano, Daniel Munoz-Espin. eBook ISBN: 9780128225158. Paperback ISBN: 9780128225141. Chapter 9. Vascular diseases. ii. Atherosclerosis and atherosclerotic cardiovascular diseases.
- ② Suda M, Shimizu I, Yoshida Y, Katsuumi G, Minamino T. Textbook of Arterial Stiffness and Pulsatile Hemodynamics in Health and Disease. 1st Edition - April 15, 2022. Editor: Julio Chirinos. Hardcover ISBN: 9780323913911. Endothelial cell dysfunction and Senescence: Biologic mechanisms and Hemodynamic consequences.

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	成 蹊 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む －対破壊電流密度にどれだけ近づけられるか？－		研究分野 工 学
キ ー ワ ー ド	① 超伝導 ② 臨界電流密度 ③ 対破壊電流密度 ④ ナノ組織制御		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 浦 正 志	理 工 学 部	教 授	研究総括および超伝導薄膜の創製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
神 原 陽 一	慶 應 義 塾 大 学 理 工 学 部	教 授	キャリア制御技術の開発
DC Mahendra	米 国 ス タ ン フ ォ ー ド 大 学	研 究 員	トポロジカル絶縁体への応用
Boris Maiorov	米 国 ロ ス ア ラ モ ス 国 立 研 究 所	研 究 員	超高磁場中特性評価
Serena Eley	米 国 コ ロ ラ ド 鉱 山 大 学	助 教	磁化測定による熱擾乱の評価
鈴 木 匠	成 蹊 大 学 理 工 学 部	助 教	磁場中特性評価

ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む —対破壊電流密度にどれだけ近づけられるか？—

1. 研究の目的

安価かつ無尽蔵である液体窒素温度下 $\text{REBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ (RE123) 超伝導線材は、発電機、MRI(磁気共鳴画像)、NMR(核磁気共鳴)装置など次世代エネルギー及び医療機器応用に期待されている。これらの応用上最も重要となるのが臨界電流密度(J_c)である。現状の J_c 値は、 J_c の限界値である対破壊電流密度(J_d)の 10%程度であり応用に適さない状況となっている。これは、RE123 超伝導内に侵入したナノサイズの量子化磁束が①ローレンツ力($F_L=J_c \times B$)及び②熱擾乱($S \propto k_B T$ (k_B 及び T は、ボルツマン定数及び温度))により運動し、 J_c が低下するためである。

本研究では、 J_c 値の向上に向けて独自のインコヒーレント非超伝導相導入技術に加えて、高キャリア注入による熱的臨界磁場(B_c)向上技術を融合することで J_c を最大限に活かす超伝導材料設計の指針を確立し、未だ誰も実現していない 100 MA/cm² 以上の J_c を目指す。

近年、申請者らが構築した独自 J_c 理論モデルをもとに J_c 向上には『キャリア密度向上による B_c 向上が鍵』であると考えた。そこで革新的 J_c には 4 つの課題を解決する必要がある。本研究では、特に高キャリア注入技術を開発し、以下の課題を解決し、目標達成を目指す。

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加

2. 研究の計画

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
 - ① 金属有機酸塗布(MOD)法を用いたインコヒーレントナノ粒子導入RE123薄膜創製
 - ② パルスレーザ蒸着(PLD)法を用いたインコヒーレントナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜創製
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
 - ① 密度・サイズの異なるナノ粒子がRE123薄膜の熱擾乱に及ぼす影響の解明
 - ② 密度・サイズの異なるナノ粒子が鉄系超伝導薄膜の熱擾乱に及ぼす影響の解明
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
 - ① キャリア制御技術によるナノ粒子導入RE123薄膜の高 T_c 維持
 - ② 化学圧力・キャリア制御技術によるナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の高 T_c 維持
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加
 - ① 高キャリアがナノ粒子導入RE123薄膜の熱的臨界磁場に及ぼす影響の解明
 - ② 高キャリアがナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の熱的臨界磁場に及ぼす影響の解明
- (5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価
 - ① 高キャリア注入がナノ粒子導入RE123薄膜の J_c 特性に及ぼす影響の解明
 - ② 高キャリア注入がナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の J_c 特性に及ぼす影響の解明
- (6) 新超伝導であるニッケル酸化物超伝導薄膜の作製
 - ① 元素置換による化学圧力が $(\text{RE}_{1-x}\text{Sr}_x)\text{NiO}_2$ 薄膜の T_c に及ぼす影響
- (7) ナノ組織制御技術のトポロジカル絶縁体薄膜への応用
 - ① ナノ組織制御技術がトポロジカル絶縁体薄膜のスピンホール角(θ_{SH})等の諸特性に及ぼす影響

3. 研究の成果

2021年度は、2019及び2020年度に得た研究成果をもとに2.研究の計画の(2)(4)(5)(7)に関して実施し、以下の結果を得た。

- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
 - ① 2021年度は、銅系超伝導 $\text{REBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ (RE123) 薄膜に導入するナノ粒子の密度・サイズが磁束の熱擾乱に及ぼす影響を調べた。その結果、ナノ粒子密度は量子化磁束の密度に近いほど、ナノ粒子サイズは量子化磁束のサイズに近いほど、磁束の熱擾乱が抑制されることが

明らかになった。また、高キャリア注入技術によりオーバードープしたRE123+ナノ粒子薄膜ほど、磁束の熱擾乱が抑制できることが分かった。これは、理論的には予測されていたが実験的に明らかにしたのは本研究が初めてである。

(4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加

熱的臨界磁場(B_c)は、コヒーレンス長(λ)と磁場侵入長(ξ)を用いて $B_c=1/(\lambda\xi)$ で表される。2020年度に引き続き、銅系超伝導REBa₂Cu₃O_y(RE123)薄膜及び鉄系超伝導体BaFe₂(As_{1-x}P_x)₂(Ba122:P)薄膜を対象として更なる検討を行った。

①2021年度は、ナノサンドイッチ構造による c 軸方向に圧縮ひずみと基板からの ab 面内引張ひずみの両方を導入することでRE123+ナノ粒子薄膜のキャリアが向上させた。その結果、 λ と ξ が減少し、従来の(Y,Gd)123薄膜に比べて約3倍まで B_c を向上した。

②2021年度は、ナノ粒子密度の異なるBa122:P+ナノ粒子薄膜のAs/P組成比を制御し、化学圧力制御技術による B_c を試みた。その結果、ナノ粒子の密度によらず母相のAs/P組成がキャリアに大きく影響を及ぼすことが明らかになった。その結果、ナノ粒子の有無にかかわらず最適組成比 $x=0.33$ で薄膜の λ と ξ が減少し、 B_c が向上することが分かった。

(5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価

① 2021年度に実施した高キャリア注入技術によりRE123+ナノ粒子薄膜の J_d の約30%まで J_c を向上させることに成功した。この特性は、2020年度に得た130 MA/cm²(4.2K)を超える150 MA/cm²(4.2K)を実現したことになる。更に4.2Kにおける磁場中特性を評価した結果、25 Tまでどの超伝導材料よりも高い世界最高の J_c を維持することが分かった。

(7) その他：ナノ組織制御技術のトポロジカル絶縁体薄膜への応用

磁気抵抗メモリ (MRAM) は、ランダムアクセスメモリの一種であり、不揮発性に加えて、高速動作、極めて高い耐久性など、大変優れた特性を持つ。これらに必要とされるトポロジカル絶縁体の特性向上が応用への鍵となっている。本研究では、スタンフォード大との共同研究でトポロジカル絶縁体として高温まで安定かつこれまで報告例のない MnPdを選び、(1)異なる結晶構造・格子定数を有する基板の上に薄膜作製し、MnPd 薄膜の結晶性・構造を制御、(2)磁性薄膜相との界面を薄膜作製後の熱処理により制御によりそれらがスピンホール角(θ_{SH})・電気伝導率(σ)・スピンホール伝導率(σ_{SH})・磁化反転電流密度(J_{sw})特性に及ぼす影響を調べた。その結果、これまでの材料とは異なる新たな現象が現れるとともに他の材料に比べ MRAM 素子としての特性が優れていることが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

2021年度に得られた成果は、2021年度内に行われた国際学会2報、国内学会2報で成果報告した。得ている実験結果としては、3.研究の成果に記した当初の計画通りの成果が得られている。その一方で、2021年度に得られた研究成果をまとめて投稿した学術論文は、1件掲載、4件査読中である。今回投稿した学術論文の多くが、学術誌の影響力の大きさを測る指標の一つであるインパクトファクターの高い論文であり、査読や査読者への反論文作成などのプロセスに長い時間を要しており報告書を提出する時期までに受理されなかったことに関して反省している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①S.C. Jones, **M. Miura**, R.Yoshida, T. Kato, L. Civale, R. Willa and S. Eley, “Designing high-performance superconductors with nanoparticle inclusions: comparisons to strong pinning theory” *APL Materials* **9** (2021) 091105

②M. DC, D. Shao, V. D.-H. Hou, P. Quarterman, Y. Chang, B. Venuti, **M. Miura**, B. Kirby, A. Vailionis, C. Bi, X. Li, F. Xue, Y. Huang, Y. Deng, S. Lin, W. Tsai, S. Eley, W.Wang, J. Borchers, E. Tsymbal, and S. X. Wang “Observation of anti-damping spin-orbit torques generated by in-plane and out-of-plane spin polarizations in MnPd₃” *Nature Materials* (査読中, 論文番号 NM20124573B)

- ③ **M. Miura**, M. Osada, I. Nekrashevich, F. Balakirev, S. Lin, B. Y. Wang, K. Lee, H. Yoon, K. Sakuma, D. Li, R. Yoshida, T. Kato, L. Civale, H. Y. Hwang and B. Maiorov “Nearly isotropic superconductivity in an infinite-layer $\text{Pr}_{1-x}\text{Sr}_x\text{NiO}_2$ films: Not all infinite-layer superconductors are created equal” *Nature Communications* (査読中, 論文番号NCOMMS-21-07668-T)
- ④ **M. Miura**, G. Tsuchiya, R. Yoshida, T. Kato, T. Harada, K. Nakaoka, T. Izumi, M. Kiuchi, T. Matsushita, L. Civale, and B. Maiorov “Thermodynamic approach to enhance of superconducting critical currents/performance” *NPG Asia Materials* (査読中, 論文番号AM2022069)
- ⑤ T. Suzuki, K. Sakuma, J. Ohta, Y. Ogimoto, K. Takahashi, T. Ozaki, A. Ibi, T. Izumi, T. Yamaki, H. Okazaki, S. Yamamoto, H. Koshigawa, T. Okada, S. Awaji and M. Miura “Improvement of J_c for RTR-PLD-(Eu,Er) $\text{Ba}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ +BaHfO₃ coated conductors with O²⁺ ion irradiation defects” *Supercond. Sci. Technol.* (査読中, 論文番号SUST-105021.R1)

(2) 口頭発表

- ① S.C. Jones, **M. Miura**, R. Yoshida, T. Kato, L. Civale, R. Willa and S. Eley “T Designing high-performance superconductors with nanoparticle inclusions: comparisons to strong pinning theory” 7th International Conference on Superconductivity and Magnetism, Bodrum, Turkey, 2021/10/2
- ② H.Saito, T. Harada, T. Suzuki, S. Eley and **M. Miura** “Effect of density and size of BaMO₃ nanoparticle on in-field superconducting properties for TFA-MOD ($\text{Y}_{0.77}\text{Gd}_{0.23}$) $\text{Ba}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ +BaMO₃ coated conductors” 34th International Symposium on Superconductivity 2021, 2021/12/1
- ③ 原田工夢, 土屋豪, 木内勝, 松下 照男, **三浦 正志** “($\text{Y}_{0.77}\text{Gd}_{0.23}$) $\text{Ba}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ +BaMO₃線材における臨界電流密度の膜厚依存性” 第82回応用物理学会秋季学術講演会(名城大学 天白キャンパス&オンライン), 2021/9/11
- ④ 齋藤寛晃, 原田工夢, 鈴木匠, **Serena Eley**, **三浦正志** “BaMO₃ナノ粒子サイズや密度がTFA-MOD法($\text{Y}_{0.77}\text{Gd}_{0.23}$) $\text{Ba}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ +BaMO₃線材の磁場中特性に及ぼす影響” 第82回応用物理学会秋季学術講演会(名城大学 天白キャンパス&オンライン), 2021/9/11

(3) 出版物

なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	成 城 大 学	研究所名等	経 済 研 究 所
研 究 課 題	経済のデジタル化の加速に向けた金融制度・税制度の 対応のあり方		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①デジタル・エコノミー ②情報通信技術(ICT) ③人工知能(AI) ④リテール・ファイナンス ⑤キャッシュレス決済 ⑥金融リテラシー教育 ⑦暗号通貨 ⑧デジタル課税		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 田 真 佐 男	成城大学 経済学部 / 成城大学 経済研究所	教授 / 所員	研究全体の統括 調査研究と論文執筆（決済システムへの影響）

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 馬 宏 之	成城大学 社会イノベーション学部 / 成城大学 経済研究所	教授 / 所員	調査研究と論文執筆 (AI化のヒューマンインテリジェンスへのインパクト)
内 田 真 人	成城大学 社会イノベーション学部 / 成城大学 経済研究所	教授 / 所員	調査研究と論文執筆 (金融リテラシー教育の重要性)
花 井 清 人	成 城 大 学 経 済 学 部 / 成 城 大 学 経 済 研 究 所	教授 / 所員	調査研究と論文執筆 (デジタル課税の展望 / オーストラリア分析)
後 藤 康 雄	成城大学 社会イノベーション学部 / 成城大学 経済研究所	教授 / 所員	調査研究と論文執筆 (リテール金融への影響 企業側からの分析)
福 島 章 雄	成 城 大 学 / 成 城 大 学 経 済 研 究 所	非常勤講師 / 客員所員	調査研究と論文執筆 (リテール金融への影響 銀行側からの分析 / 東南アジア分析)
柿 原 智 弘	グ ア ダ ラ ハ ラ 大 学 経 済 経 営 学 部 / 成 城 大 学 経 済 研 究 所	教 授 / 客 員 所 員	調査研究と論文執筆 (リテール金融への影響 銀行側からの分析 / 中米分析)

経済のデジタル化の加速に向けた金融制度・税制度の対応のあり方

1. 研究の目的

- (1) AIの発展が中長期的に個人や企業の意思決定や行動にもたらしうる変革を明確化
 - ① AIとヒューマンインテリジェンスとの補完・代替性について検証
 - ② 脳（神経）模倣型AIのインテリジェンス特性が経済・社会に及ぼす中長期的なインパクトを検証
- (2) 経済のデジタル化への望ましい対応のあり方に関する有意義な政策を提言
 - ① 決済サービスの高度化：日本においてキャッシュレス決済の普及を進めていくための課題を明らかにし、その解決に資する施策を提言
 - ② デジタル化時代に即した金融教育：日本において家計の証券投資を促進していくうえでの望ましい金融リテラシー教育のあり方を提言
 - ③ 雇用形態に中立的な税制 および 企業へのデジタル課税：働き方の多様化や企業活動のボーダーレス化といった問題をふまえ、デジタル・エコノミー進展下における望ましい税制のあり方を提言
 - ④ リテール金融の技術革新：企業側・金融機関のそれぞれの視点から、経済のデジタル化に対応した今後のリテール金融の方向性を展望
- (3) 中米・東南アジアを対象にリープフロッグが生じる条件を検証
 - ① 既存の経済システムが十分に成熟していない国でも、ICTやAIを有効に活用すれば、デジタル経済の先進国に短期間で追いつくいわゆる「リープフロッグ」現象に着目
 - ② 新興国を主な対象としてリープフロッグ現象を考察し、経済のデジタル化で後れをとる日本に適用できる点があるか検証

2. 研究の計画

- (1) 現行のAIは2つのタイプがあり、既に実用化段階に入っているのは「ビッグデータ型AI」であるが、未だ実用化には至っていないものの、中長期的に経済・社会により大きなインパクトを及ぼすと期待されるのは「脳（神経）模倣型AI」である。本研究課題では、経済学に加え、計算機科学・半導体集積回路や脳神経科学の視点から、「脳（神経）模倣型AI」のインテリジェンス特性を明らかにし、人的資本（すなわちヒューマンインテリジェンス）との補完・代替性について分析を進めていく。
- (2) 経済のデジタル化に即した金融・税制のインフラ再構築の望ましいあり方を明らかにするため、まずは4つの小グループに分かれて分析を進め、得られた成果を政策提言のパッケージとしてまとめることを目指す。
 - ① 決済サービスの高度化：欧米主要国や近隣の中国・韓国と比較してキャッシュレス化が進んでいない日本の現状をふまえ、主にTwo-sided Marketのプラットフォーム競争のフレームワークを用いた理論分析により、日本においてキャッシュレス決済の普及を進めていくための課題を明らかにしていく。
 - ② デジタル化時代に即した金融教育：AIを導入したロボアドバイザー・サービスなど、証券投資でも「デジタル化」が進んでいる。マクロ経済スライドによって今後も公的年金の所得代替率の低下が見込まれ、家計部門には長期的な視野に立った資産形成が求められることをふまえ、行動経済学の各種認知バイアスの可能性などから日本の家計で証券投資が普及しない要因を明らかにしたうえで、外国の事例なども参照しながら望ましい金融リテラシー教育のあり方を明らかにしていく。
 - ③ 雇用形態に中立的な税制 および 企業へのデジタル課税：シェアリングエコノミーやギグエコノミーの拡大により、副業の解禁やフリーランスの増加など、個人の働き方が多様化している。また、経済のデジタル化の進展に伴い、巨大プラットフォーム企業などによる国際的な租税回避スキームの利用が問題化している。こうした現状をふまえ、ミクロ経済学の理論モデル分析などにより、デジタル・エコノミー進展下における望ましい税制のあり方を明らかにしていく。
 - ④ リテール金融の技術革新：AIやICTの発展により、スコアリング融資や金融型のクラウドファンディングなどリテール金融分野でも大きな技術革新が生じている。こうした現

状をふまえ、企業側の視点、金融機関の視点から、個票調査を用いた実証分析などにより、経済のデジタル化に対応した今後のリテール金融の方向性を明確にしていく。

- ⑤ 政策提言の立案：各自は互いの分析についてコメントを交換するとともに、所属学会での論文報告を通じて外部からも広くコメントを集める。それらをもとに内容を改善し、研究内容の連携・接続の方向性について共通理解を深める。そのうえで、研究成果を整理統合し、政策提言としてまとめていく。
- (3) 対象地域（中米・東南アジア）で現地調査を実施し、調査した事例をもとに新興国において企業や金融機関が急速に進展するデジタル化にどのように対応しているかを分析したうえで、研究成果をもとにいわゆる「リープフロッグ」が実現されるための条件を明らかにしていく。

3. 研究の成果

- (1) 決済サービスの高度化に関しては、「自然災害時への対応」と「キャッシュレス決済にアクセスできない消費者への対応」の2点に着目し、望ましい対応のあり方について研究した。このうち自然災害への対応については、MPM方式のコード決済が災害時にも安定的に機能しうることから、長期的には「災害に強いキャッシュレス」を実現すべく、国や通信会社が移動電源車・移動基地局車・移動ICTユニット等の整備を加速させるとともに、消費者・店舗側も平時から十分な予備電源確保を徹底していくことが望ましい。ただし、その実現までには一定の移行期間を要するため、移行過程で災害が発生した場合への備えも必要となる。2つめのキャッシュレス決済にアクセスできない消費者への対応に関しても、「金融包摂」の視点からの配慮が必要になる。これらを考慮すると、当面は一定規模の現金決済インフラを維持し、キャッシュレス決済との「複線的」な決済インフラを構築していくことが望ましい。この成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ①」として刊行した。
- (2) デジタル化時代に即した金融教育に関しては、単にデジタルデバイスを導入するだけでなく、広報プログラムのなかで、消費者（学生）・企業（金融機関）・政府が有機的にコラボレートし、戦略的に金融教育にデジタル技術を活用していくことの重要性を明らかにした。
- (3) デジタル社会に対応した税制に関しては、デジタル化された金銭価値が瞬時に国境を移動し、かつ、暗号資産の台頭によってその補足が難しくなっている点をふまえ、多国間で協議を進め、連携して国際課税の枠組みを構築することの重要性を明らかにした。
- (4) リテール金融の技術革新に関しては、第1に、公的金融の資金供給の望ましい在り方について、農業分野を事例に挙げて分析を行い、産業への投融資を円滑に行っていくために克服すべき課題を明らかにした。具体的には、設備資金に関しては、協調融資やファンドのスキームを基本として、公的金融と民間金融が連携を強めながら農業の成長を支援していく方向性が望ましい。また、日本政策金融公庫として3事業（国民生活・中小企業・農林水産）が統合され、組織運営の一体化も進むなかで、6次産業化のマッチング支援や販路紹介・事業承継支援など、資金量だけでなくネットワーク（情報）で農業者を支援できるようになっており、公的金融と民間金融の連携にあたってはこうしたネットワークを活用していくことも重要である。さらに、畜産における動産担保融資へのICTやAIの活用など、農業分野での金融仲介技術の高度化に積極的に取り組み、その普及を図っていくことも公的金融の大きな役割である。この成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ②」として刊行した。第2に、わが国の信用保証と短期的な経済変動の時系列的関係を実証分析によって明らかにした。具体的には、都道府県別データを用いてパネル型グレンジャー因果性検定を実施し、景気等の実体経済から信用保証への因果性は存在するが逆の関係は乏しいことを示した。この結果から判断する限り、わが国の信用保証は総じて実体経済を補完的に支援する範囲で運用されていると評価でき、デジタル技術の導入によって公的信用保証の制度がさらに高質化されることが期待される。この成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ③」として刊行した。
- (5) この他、政府系金融機関の実務者・シンクタンク研究員を招き、2回にわたって本研究課題に即したテーマでシンポジウムを開催し、専門知識の聴取と意見交換を行った。

第1回シンポジウム

【日 時】 2022年3月10日（木）15:00~16:30

【報告】 佐々木真佑 氏（日本政策金融公庫 国民生活事業本部 リスク管理部）

【テーマ】 「中小企業におけるAI活用の現状と求められる支援」

第2回シンポジウム

【日時】 2022年3月15日(火) 14:00～15:30

【報告】 井上考二 氏（日本政策金融公庫 総合研究所）

【テーマ】 「自然災害が中小企業の経営に及ぼす影響」

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の考察

1つめの研究目的である「AIの発展が中長期的に個人や企業の意味決定や行動にもたらしうる影響の検証」に関しては当初の計画通りに2020年度中にほぼ研究が完了し、デジタル化、すなわち、AIやICTの発展が経済・社会に及ぼす影響について、研究メンバー間でほぼ共通認識を持つことができた。そのうえで、2021年度は、金融制度・税制度の再構築に関する研究を担っている各小グループが、AIやICTの発展が及ぼす影響をより明示的に考慮した分析を行い、1つの研究課題として統一感を高めることが課題となった。「3. 研究の成果」の記述からもわかるように、この課題は概ね達成することができたと考えられる。2022年度は当初の予定通り研究の総括にあて、これまでの「AI発展の影響」・「制度インフラ再構築」両グループの研究成果をもとに、経済のデジタル化への対応に不可欠な高質な「制度的インフラストラクチャー」としての金融制度と税制のあり方に関する政策提言の完成を目指す。

(2) 研究の反省

本研究課題では国際比較の観点から海外への現地調査を予定していたが、2020年度に引き続き新型コロナウイルス感染症の感染拡大の影響を受け、2021年度も海外の現地調査を実施できなかった。このため、3つめの研究目的である「中米・東南アジアを対象にしたリープフロッグの研究」のうち東南アジアの研究と、2つめの研究目的のうち、分析手法として国際比較を重視する「デジタル化時代に即した金融教育の研究」において予定通りに研究を進めることができなかった。この点を反省し、現地を結んでのオンライン会議のさらなる活用も含め、迅速かつ効果的に研究を進めていく手立てを講じていく必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①中田 真佐男 「対面決済のキャッシュレス化の進展に伴って検討すべき諸問題とその対応の方向性」 『国民生活研究』 第61巻第2号 32-55頁 2021年12月
- ②中田 真佐男 「農業分野における資金供給の効率性向上に向けた課題」 『フィナンシャル・レビュー』 第174号 59-86頁 2022年3月
- ③後藤 康雄 「政策金融としての信用保証による経済・金融への影響」 『フィナンシャル・レビュー』 第174号 32-58頁 2022年3月
- ④福島 章雄 “Have the Purchases of ETF Raised Stock Prices? Recent Japanese Case” Bulletin of Applied Economics, Risk Market Journals, vol. 8(1) pp. 109-119 (co-author: Yutaka Kurihara, Shinichiro Maeda)

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	ヘモグロビンナノ粒子からなる人工酸素運搬体の開発 －臨床利用可能な赤血球代替物の実現に向けて－	研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①蛋白質 ②コア-シェル型ナノ粒子 ③人工酸素運搬体 ④赤血球代替物 ⑤輸血治療 ⑥遺伝子組換え蛋白質 ⑦酸素結合能 ⑧X線結晶構造解析		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 松 晃 之	中央大学理工学部	教 授	研究代表者(総括)、ヘモグロビンナノ粒子(HbNP)およびSFヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)の合成と酸素結合能の解明、有効性評価、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 寛 敏	中央大学理工学部	教 授	Hb微細構造の分子軌道計算
森 田 能 次	中央大学理工学部	助 教	HbNPの酸素、一酸化炭素結合能の解析
加 藤 遼	中央大学理工学部	助 教	HbNPの保存安定性評価、溶液物性測定
木 平 清 人	宇宙航空研究開発機構 (JAXA)	研 究 員	HbのX線結晶構造解析
河 野 光 智	東海大学医学部	准 教 授	HbNPの有効性評価

ヘモグロビンナノ粒子からなる人工酸素運搬体の開発 —臨床利用可能な赤血球代替物の実現に向けて—

1. 研究の目的

(1) 研究背景

現在、日本では輸血用血液製剤の85%が50歳以上の患者に使用されている。少子高齢化が進行し、献血者層人口が減少すると、2025年には“年間約65万人分の血液が不足する”と予測されている(献血推進2025、厚生労働省)。血液型に関係なく、ウイルス感染の心配もなく、いつでもどこでも誰にでも使用できる人工酸素運搬体(赤血球代替物)の実現が、輸血治療を補完するための医療対策の一環として強く望まれる状況にある。これまでに酸素輸送タンパク質であるヘモグロビン(Hb)を用いた人工酸素運搬体が数多く開発されてきたが、未だ実用化には至っていない。2013年、申請者はHbを血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)で包み込んだ新しい人工酸素運搬体“(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター”(Hb-HSA₃クラスター)を合成し、それが安全性・有効性に優れた赤血球代替物として機能することを明らかにした(*Biomacromolecules* 2013, 14, 1816など。新聞掲載、TV報道多数)。現在、実用化に向けた評価試験を医学チームと共同で推進している。

(2) 研究目的

Hb-HSA₃クラスターは臨床に近い製剤の一つとして国内外から注目を集めているが、さらに理想的な人工酸素運搬体にするためには、2つの改良が必要であることがわかってきた。(i)分子サイズ:Hb-HSA₃クラスターの粒径は15nmと小さいため、肝臓では類洞血管内皮細胞の小孔を通過し、肝実質細胞で代謝される。その際、肝臓に負担をかける可能性がある。つまり、粒径は90nm以上が好ましい。血中滞留性の延長も期待できる。(ii)酸素錯体の安定性:Hb-HSA₃クラスターは中心Hbの自動酸化に伴い、徐々に酸素結合能を失う。生体内で酸素輸送能を長時間発揮するためには、抗酸化能を併せ持つことが望まれる。

本研究は、上記(i)(ii)の条件を完全に満たした新しい人工酸素運搬体として、Hbからなる球状微粒子の表面をHSAで被覆したコア-シェル型ヘモグロビンナノ粒子(HbNP、粒径90nm)を合成し、その構造、酸素結合能、有効性、安全性を明らかにすることを目的としている。Hb-HSA₃クラスターの優れた特性を保ちながら、安全性に優れ、生体内で長時間酸素を輸送できる革新的な人工酸素運搬体の創製を目指す。本研究で得られる成果は、先進医療、人類の健康増進に多大な貢献をもたらすばかりでなく、我々の生活に大きな波及効果を与えると期待される。

2. 研究の計画

以下の3項目を実施した。

- (1) 赤血球から赤血球膜を除去しただけのストロマフリーHb(SFHb)を用いて SFHb ナノ粒子(SFHbNP)を合成し、その酸素結合能を明らかにする。SFHbには微量の酵素が残存するため、酸素錯体の安定性が向上する。
- (2) SFHbNPの酸素結合パラメーターを精密に測定し、粒子構造との相関を解明する。また得られたSFHbNP溶液の保存安定性を評価する。
- (3) SFHbNP溶液([Hb]=5g/dL)のコロイド浸透圧を測定し、溶液物性を明らかにする。さらに、SFHbNPとヒト全血を混合した溶液の赤血球数、白血球数、血小板数の変化を6時間後まで計測することにより、SFHbNPの血液適合性を評価する。

3. 研究の成果

(1) ストロマフリーHbを用いたSFHbNPの合成

ヒト赤血球から得たSFHbを用いてSFHbNPを合成した。最適調製条件はHbNPと同様で(収率80%)、粒径90nmの均一な球状構造が形成されていることを明らかにした。SFHbには微量のカタラーゼ(Cat、過酸化水素不均化酵素)が残存するため、酸素錯体の安定性は格段に向上した。驚いたことに20 μ M過酸化水素水溶液中でもヘム鉄の酸化が抑制され、Hbの酸化速度は1/10に低減した。そこで、今後の実験は全てSFHbNPを用いて行うこととした。

(2) SFHbNP の酸素結合能の解明と保存安定性評価

SFHbNP の P_{50} は 7Torr、Hill 係数 (n) は 1.4 であり、酸素結合速度定数も HbNP と同等であった。SFHbNP 溶液 ([Hb]=5g/dL) は 4°C 冷蔵下においてきわめて安定で、6 ヶ月間、粒径、酸素結合能、コア Hb の酸化率 (5%以下) に変化は見られなかった。1 年以上の保存安定性を実証するため、測定を継続している。

(3) コロイド浸透圧、血液適合性の測定

SFHbNP の濃度とコロイド浸透圧の相関を解明した。コロイド浸透圧を生理条件に揃えるための添加 HSA 濃度は 4g/dL が最適であった。また、SFHbNP とヒト全血を SFHbNP/血液 =10、20、40vol% の割合で混合した溶液の赤血球数、白血球数、血小板数は、6 時間後まで変化せず、SFHbNP の高い血液適合性が明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 赤血球内には酸素運搬の役割を担う Hb のほかに、抗酸化能を有する Cat やスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) などの酵素が共存しているため、SFHb を用いて合成した SFHbNP は安定な酸素錯体を形成した。SFHbNP の Cat 活性、SOD 活性を評価し、どちらの酵素が中心 Hb の抗酸化能に寄与しているかを検証した。SFHb と SFHbNP の Cat 活性は同等であったのに対し SFHbNP の SOD 活性は SFHb の 1/13 に低下することがわかった。SFHbNP の抗酸化能は Cat 活性に由来すると考えられる。
- (2) 赤血球製剤の保存期間は 4°C 冷蔵下において 3 週間と定められている。長期保存可能な SFHbNP 溶液 ([Hb]=5g/dL) は理想的な人工酸素運搬体制剤である。
- (3) SFHbNP 溶液はタンパク質粒子の分散液であるため、コロイド浸透圧がない。それは必ずしも欠点ではなく、HSA を添加することにより、自由にコロイド浸透圧を調整できることを意味している。SFHbNP とヒト全血を混合しても、血球数に変化はなく、血小板の凝集も全く認められなかった。今後、動物実験による安全性評価、有効性評価に研究を進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Protein Triad Comprising Genetically Fused Hemoglobin and Human Serum Albumins as an Artificial O₂ Carrier Resistant to Haptoglobin Binding, Y. Morita, Y. Shindo, T. Komatsu, *Chem. Lett.* **2021**, *50*, 2011-2014. (2021.12.1)
- ② Genetically and Chemically Tuned Haemoglobin-Albumin Trimers with Superior O₂ Transport Efficiency, Y. Morita, R. Takada, A. Saito, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 9144-9147. (2021.9.16)
- ③ Methemoglobin-Albumin Cluster Incorporating Protoporphyrin IX: Dual Functional Protein Drug for Photodynamic Therapy”, T. Yamada, T. Komatsu, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2526-2529. (2020.8.3)

(2) 口頭発表

- ① 高山夏実、岡本 航、長谷川 舞、小松晃之、人工酸素運搬体としてのストロマフリーヘモグロビンナノ粒子の合成と抗酸化能評価、日本化学会第102春季年会 (2022.3.23)
- ② 船本瑞稀、高田諒也、森田能次、小松晃之、光線力学療法のためのアルブミン-ミオグロビン融合タンパク質の合成、日本化学会第102春季年会 (2022.3.25)
- ③ 勝見真帆、山田大雅、小松晃之、プロトポルフィリンIX結合(カタラーゼ-アルブミン)クラスターの合成と光線力学活性、日本化学会第102春季年会 (2022.3.25)
- ④ 岡本 航、長谷川舞、臼井朝音、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、HemoAct™の安全性・有効性評価 (50%出血性ショックラットの蘇生試験)、第28回日本血液代替物学会年次大会 (2021.10.14) (**優秀発表賞受賞**)
- ⑤ 長谷川舞、岡本 航、小松晃之、抗酸化能を有するストロマフリーヘモグロビンナノ粒子 (SFHbN) の合成、第28回日本血液代替物学会年次大会 (2021.10.14) (**最優秀発表賞受賞**)
- ⑥ 臼井朝音、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、動物用人工血漿増量剤としてのポリオキサゾリン修飾血清アルブミン (Aloxa™) の合成、第28回日本血液代替物学会年次大会 (2021.10.15)

- ⑦ 高田諒也、森田能次、小松晃之、アルブミン-ミオグロビン融合タンパク質の合成、第11回CSJ化学フェスタ2021 (2021. 10. 20) (**優秀ポスター賞受賞**)
- ⑧ 澤口玲実、森田能次、小松晃之、ビスターピリジン鉄錯体で連結したヘモグロビン超構造体の合成と形態制御、錯体化学会第71回討論会 (2021. 9. 16)
- ⑨ 吉田瑠佳、森田能次、小松晃之、酸素吸脱着により構造変化する組換えヘモグロビン集合体の合成、錯体化学会第71回討論会 (2021. 9. 16)
- ⑩ 小林樹広、岡本 航、長谷川舞、森田能次、小松晃之、組換えヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素結合能、第15回バイオ関連化学シンポジウム (2021. 9. 8)
- ⑪ 石丸真里花、山田大雅、小松晃之、抗酸化剤を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第15回バイオ関連化学シンポジウム (2021. 9. 8)
- ⑫ 森田能次、小松晃之、協同効果を有する人工酸素運搬体(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成と酸素親和性制御、第70回高分子討論会 (2021. 9. 6) (**依頼講演**)
- ⑬ 澤口玲実、森田能次、小松晃之、金属配位結合で連結した組換えヘモグロビンナノファイバーの合成、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑭ 高田諒也、森田能次、小松晃之、協同性を保持した(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成と酸素親和性制御、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑮ 石丸真里花、山田大雅、小松晃之、抗酸化能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑯ 吉田瑠佳、森田能次、小松晃之、 α 99 位置アミノ酸置換ヘモグロビンの合成と酸素親和性、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑰ 岡本 航、臼井朝音、河野光智、田口和明、小松晃之、動物用血漿増量剤としてのポリオキサゾリン修飾アルブミンの合成、第70回高分子学会年次大会 (2021. 5. 27) (**優秀ポスター賞受賞**)
- ⑱ 山田大雅、小松晃之、がん治療用光増感剤としてのプロトポルフィリンIX結合(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第70回高分子学会年次大会 (2021. 5. 27) (**優秀ポスター賞受賞**)

(3) 出版物

なし

マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立 ー象牙芽細胞賦活シグナルネットワーク解析ー

1. 研究の目的

- (1) 本申請は継続3年目である。初年度・継続2年目研究で得られた知見を更に発展させる。
 - ①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子および標的受容体の同定を行う。
 - ②象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化する物質のin Vivoでの象牙質再生効果を明らかにする。
 - ③象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。

2. 研究の計画

- (1) 2年目から継続の研究：
 - ①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子の同定：iPS細胞から象牙芽細胞への分化を促す因子を同定する。また、象牙芽細胞を死滅させたマウスにおいて象牙芽細胞局所分化を促進する因子を特定する。
- (2) 継続3年度からの研究：象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。
 - ①すでに見出している象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化し、細胞内酵素を触媒する物質（物質“X”）のin Vivoでの象牙質再生効果を、マイクロCT・組織化学イメージングを用いて評価する。

3. 研究の成果

- (1) 2年目から継続の研究：
 - ①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子の同定：マウス歯胚間葉系細胞で、象牙芽細胞分化に関与する候補転写因子を同定した（in Preparation）。これらを歯胚間葉系細胞に発現させ、歯胚間葉系細胞の象牙芽細胞形質発現を促進する、または形質脱分化を抑制する効果を検証した。
 - ②象牙芽細胞特異的に発現するdentin matrix protein-1 (DMP1) の遺伝子座にT2A配列とCre遺伝子を挿入しEGFPをレポーターとしたDmp1-T2A-Creノックインマウス系統を作製した。象牙芽細胞分化を追跡したところ、canonical Wnt/ β -cateninとfibroblast growth factor 8 (FGF8)シグナルが歯胚における象牙芽細胞分化に重要であることが示された（Kimura et al. 2022）。
 - ③象牙芽細胞の亜集団に着目した象牙芽細胞の発生学的起源の解析から、象牙芽細胞の局所分化因子と考えられる新規Z因子（未発表データの為具体的名称の表記を避ける）を推定した。歯髄細胞中にはZ因子を発現する細胞が存在し、歯髄内の未分化間葉系細胞から象牙芽細胞への分化マーカーであろうことが示唆された（in Preparation）。このZ因子を発現する細胞は、Aイオンチャネル（未発表データの為具体的名称の表記を避ける）と共陽性を示した（Z因子陽性Aチャネル陽性細胞）。加えて、ジフテリア毒素投与により象牙芽細胞の枯渇が誘発されたtype1(2.3kp)-collagen Cre/flox-stop-flox-difteria toxin receptor (DTR) マウス(Zhao et al. 2021)を用いた実験では、歯髄細胞稠密層にZ因子陽性細胞の増殖を認め、象牙芽細胞前駆マーカーであるNestinやAイオンチャネルと免疫陽性を認めた。
- (2) 継続3年度からの研究：象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対

する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。

①象牙芽細胞は高pHに感受性を持ち、象牙質形成を促進する(Kimura et al. 2016; Kimura et al. 2018)。そこで求電子反応性を有するイソチオシアネート (ITC) 基を有し、生体への安全性が高い「わさび (*Eutrema Japonicum*)」の抽出成分であるwasabi sulfinylの一つである6-MSITC (6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate) の象牙質形成能を検討した。6-MSITCは、象牙芽細胞による濃度依存的な石灰化を促進した。一方で6-MSITC存在下で、炭酸脱水酵素阻害薬を同時投与すると、6-MSITC単独投与による石灰化能が有意に減少した。加えて、6-MSITCによる石灰化は、細胞膜カルシウムイオン排出系である細胞膜カルシウムATPaseの阻害薬(Kimura et al. 2021)、ナトリウム-カルシウム交換体の阻害薬で有意に減少した。以上の結果から、6-MSITCは、細胞膜センサータンパク質の活性化をもたらし、細胞膜Ca²⁺/HCO₃⁻輸送を促進する結果、第3象牙質形成を促進することが示唆された(特許出願中)。本物質をラット臼歯に作成した窩洞に充填し、数週間後に、その第三象牙質形成能をマイクロCTで評価したところ、明らかな第3象牙質形成が観測された。本物質を臨床応用することで、目的とする象牙質再生分子創薬が確立できた。

4. 研究の反省・考察

(1) 2年目から継続の研究：

①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子の同定：同定された象牙芽細胞分化に関与する候補転写因子は、象牙質再生の標的物質候補としての可能性が高い。今後、in Vivoで動物の臼歯に作成した窩洞に充填し、その象牙質形成能を評価したい。

②発生学的な象牙芽細胞分化の本質的なマスター因子として、Wnt/ β -cateninとfibroblast growth factor 8 (FGF8)シグナルが同定された。同様に、今後、in Vivoで動物の臼歯に作成した窩洞に充填し、その象牙質形成能を評価したい。

③推定された象牙芽細胞の局所分化因子と考えられる新規Z因子は、象牙芽細胞の局所再生に関与する象牙芽細胞分化誘導マスター因子である可能性が示された。Z因子陽性細胞は象牙芽細胞直下に存在することから、歯髄損傷に伴う象牙芽細胞の局所分化(self-renewal)に関与するであろう。このことは、臨床的歯髄損傷時に、この物質を応用することで急速な第3象牙質形成が期待できる事を示唆している。象牙芽細胞の局所再生因子の解明は、臨床的な第3象牙質形成促進因子の創薬標的としての可能性が極めて高い。

(2) 継続3年度からの研究：象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。

①6-MSITCは、細胞膜センサータンパク質の活性化をもたらし、細胞膜Ca²⁺/HCO₃⁻輸送を促進する結果、第3象牙質形成が促進されることが示された(特許出願中)。本物質を臨床応用することで、目的とする象牙質再生分子創薬が確立できた。今後、同物質を広く社会に還元することが急務であろう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Inoue H, Kuroda H, Ofusa W, Oyama S, Kimura M, Ichinohe T, Shibukawa Y. Functional Coupling between the P2X₇ Receptor and Pannexin-1 Channel in Rat Trigeminal Ganglion Neurons. *Int J Mol Sci*. 22:5978. 2021. doi: 10.3390/ijms22115978.

② Kimura M, Mochizuki H, Satou R, Iwasaki M, Kokubu E, Kono K, Nomura S, Sakurai T, Kuroda H, Shibukawa Y. Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase in Rat and Human Odontoblasts Mediates Dentin Mineralization. *Biomolecules*. 2021 Jul 10;11(7):1010. doi: 10.3390/biom11071010.

- ③ Matsunaga M, Kimura M, Ouchi T, Nakamura T, Ohyama S, Ando M, Nomura S, Azuma T, Ichinohe T, Shibukawa Y. Mechanical Stimulation-Induced Calcium Signaling by Piezo1 Channel Activation in Human Odontoblast Reduces Dentin Mineralization. *Front Physiol.* 2021 Aug 24;12:704518. doi: 10.3389/fphys.2021.704518.
- ④ Odaka K, Sato S, Abe Y, Takizawa H, Matsunaga S, Takano N. Probabilistic finite element analysis of fatigue life of additively manufactured clasp. *Dent Mater J*, 41:286-294, 2021.
- ⑤ Matsumoto T, Matsunaga S, Kasahara M, Kasahara N, Nakano T, Ishimoto T, Nishii Y. Effect of sustained horizontal load on bone surrounding orthodontic anchor screws. *J Hard Tissue Biol*, 2021 (Accepted).
- ⑥ Kimura M, Saito A, Onodera S, Nakamura T, Suematsu M, Shintani S, Azuma T. The concurrent stimulation of Wnt and FGF8 signaling induce differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblast-like cells. *Med Mol Morphol.* 2022 Mar;55:8-19.
- ⑦ Aoki H, Suzuki E, Nakamura T, Onodera S, Saito A, Ohtaka M, Nakanishi M, Nishimura K, Saito A, Azuma T. Induced pluripotent stem cells from Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation. *Med Mol Morphol.* in Press
- ⑧ Takada K, Odashima A, Onodera S, Saito A, Aida N, Furusawa M, Azuma T. Optimal Combination of Signaling Factors for Odontoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Med Mol Morphol.* in Press
- ⑨ Nakamura Y, Onodera S, Takano M, Katakura A, Nomura T, Azuma T. Development of a targeted gene panel for the diagnosis of Gorlin syndrome. *Int. J. Oral & Maxillo Surgery.* in press
- ⑩ Onodera S, Morita N, Nakamura Y, Takahashi S, Hashimoto K, Nomura T, Katakura A, Kosaki K, Azuma T. Orphanet J Rare Dis. 2021;16(1):443. doi: 10.1186/s13023-021-02033-7.
- ⑪ Okumura K, Shiwaki Y, Hamai R, Mizoguchi T, Tsuchiya K, Takahashi T, Suzuki O. Differentiation of committed osteoblast progenitors by octacalcium phosphate compared to calcium-deficient hydroxyapatite in *Lepr-cre/Tomato* mouse tibia. *Acta Biomater*, 2022, in press. doi: 10.1016/j.actbio.2022.02.016.
- ⑫ Nagashima T, Ninomiya T, Nakamura Y, Nishimura S, Ohashi A, Aoki J, Mizoguchi T, Tonogi M, Takahashi T. p53 deficiency promotes the regeneration of bone defect by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts. *J Bone Miner Metab*, 142:332, 2022. doi: 10.1007/s00774-022-01314-w.
- ⑬ Hiraga T, Ito S, Mizoguchi T. Opposing Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Initiation and Progression of Breast Cancer Bone Metastases. *Mol Cancer Res*, 19(12):2110, 2021.
- ⑭ Wu JW, Jung Y, Yeh SA, Seo Y, Runnels JM, Burns CS, Mizoguchi T, Ito K, Spencer JA, Lin CP. Intravital fluorescence microscopy with negative contrast. *PLoS One*, 16(8):e0255204, 2021
- ⑮ Zhao L, Ito S, Arai A, Udagawa N, Horibe K, Hara M, Nishida D, Hosoya A, Masuko R, Okabe K, Shin M, Li X, Matsuo K, Abe S, Matsunaga S, Kobayashi Y, Kagami H, Mizoguchi T. Odontoblast death drives cell-rich zone-derived dental tissue regeneration. *Bone*, 150:116010, 2021
- ⑯ Mizoguchi T, Ono N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *J Bone*

Miner Res, 36(8):1432, 2021

⑰ Islam S, Kitagawa T, Azuma T, Kuramitsu Y. *Anticancer Res.* 2021;41(10):4979-4984. doi: 10.21873/anticancerres.15311.

⑱ Ito S, Kasahara N, Kitamura K, Matsunaga S, Mizoguchi T, Htun MW, Shibata Y, Abe S, Takano M, Yamaguchi A. Pathological differences in the bone healing processes between tooth extraction socket and femoral fracture. *Bone Rep.* 16:101522. doi: 10.1016/j.bonr.2022.101522.

⑲ Tasaka A, Okano H, Odaka K, Matsunaga S, Goto T, Abe S, Yamashita S. Comparison of artificial tooth position in dentures fabricated by heat-curing and additive manufacturing. *Aust Dent J*, 66(2):182-187, 2021.

⑳ Morita S, Moriishi T, Matsunaga S, Kitamura K, Abe S, Yamaguchi A. Characteristic Distribution of Hematopoietic Cells in Bone Marrow of *Xenopus Laevis*. *Bull Tokyo Dent Coll*, 8;62(3):171-180, 2021

㉑ Kusaba G, Matsunaga S, Kitamura K, Kasahara M, Shimoo Y, Abe S, Nakano T, Ishimoto T, Hikita A, Nojima K, Nishii Y. Micro/nanostructural characteristic changes in the mandibles of rats after injection of botulinum neurotoxin. *J Hard Tissue Biol*, 30(2):183-192, 2021 (doi.org/10.2485/jhtb.30.183).

㉒ Aoki K, Matsunaga S, Ito S, Shibahara T, Nomura T, Matsuzaki H, Abe S, Yamaguchi A. Persistent bone resorption lacunae on necrotic bone distinguish bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw from denosumab-related osteonecrosis. *J Bone Miner Metab*, 39: 737-747, 2021. (doi:10.1007/s00774-021-01223-4.)

㉓ Okamura M, Suzuki T, Oomura Y, Matsunaga S, Nomura T. Effect of bacterial infection on bone quality and structure in osteonecrosis of the jaw by Bisphosphonate (BP) administration. *J Hard Tissue Biol*, 30(3):323-330, 2021. (doi.org/10.2485/jhtb.30.323)

㉔ Kasahara N, Matsunaga S, Yamamoto M, Morita S, Odaka K, Abe S, Yamamoto H. Comparative study of the morphology and distribution of valves in the human retromandibular vein. *Bull Tokyo Dent Coll*, 4;62(2):99-106, 2021 (doi: 10.2209/tdcpublication.2020-0046.).

㉕ Otsu Y, Matsunaga S, Furukawa T, Kitamura K, Kasahara M, Abe S, Nakano T, Ishimoto T, Yajima Y. Structural characteristics of the bone surrounding dental implants placed into the tail-suspended mice. *Int J Implant Dent*, 7:89, 2021.

(2) 口頭発表：55 篇

(3) 出版物

① 澁川義幸 他, 歯痛制御から歯を再生誘導できるか: 歯髄/象牙質疾患への分子創薬の挑戦: 「歯髄」をめぐる基礎と臨床の架け橋 歯界展望, 138(6), 1120-1126, 202

② 澁川義幸、急性炎症時はSRPの痛みを感じやすいのでしょうか。読者が本当に聞きたいこと、全部答えます。歯科衛生士、45 (6) : 84、2021

③ 澁川義幸、生理学実習書 第3版、岩田幸一・井上富雄・船橋誠・加藤隆史・重村憲徳・篠田雅路・小野堅太郎編、医歯薬出版、2022、ISBN978-4-263-45869-3

ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御

1. 研究の目的

(1) 背景

化学エネルギーや光エネルギーなどを分子の運動へと変換できる分子マシンは大変興味深い研究対象である。2016年のノーベル化学賞の対象となった研究が「分子マシンのデザインと合成」であることからわかるように、分子マシンの研究は学術的、社会的に非常に重要な研究分野であり、長年にわたり活発な研究が進められている。化学合成された分子マシンの例としては、共有結合の生成と開裂、あるいは光エネルギーによる異性化反応を利用した分子運動が実現している。しかしながら、アクトミオシンやATPアーゼのように触媒反応により駆動する人工分子マシンの例は未だ存在しない。

研究代表者は近年簡便かつ高収率なロタキサンの新規合成法の開発に成功し、その動的挙動に関しても検討を進めている。ロタキサンは環構造と軸構造という、共有結合で結びつけられていない構成成分からなる分子である。そのためロタキサンはユニークな動的挙動を示すことが知られており、また分子マシンの創製に適している。そこで研究代表者は分子マシンに関する研究の現状とその重要性、将来における大きな可能性を踏まえ、「ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御」を研究目的とした。

(2) 具体的な研究目標

① 触媒部位を有するロタキサン型分子マシンの合成

環構造に触媒活性を有する部分構造を導入したロタキサンを設計、合成する。その際、研究代表者らがこれまでに開発したロタキサン合成法、ロタキサン修飾法を活用することとし、動的挙動の解明等に必要な量のロタキサンを効率よく合成する。

② ロタキサン型分子マシンの配座、ならびにその動的挙動の解明

NMRをはじめとする分光学的手法などを用いることによりロタキサンの構造、ならびにその配座を明らかにする。また、環構造が軸構造に沿って移動する際の動的挙動を明らかにする。さらにロタキサンが触媒として機能することを確認する。

③ ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御

触媒部位を分子内に含むロタキサンを用いた触媒反応について検討し、反応の進行に伴いロタキサンの配座が変化することを確認する。このことによりロタキサンが触媒反応により分子マシンとして駆動することを示す。

2. 研究の計画

触媒反応を利用してロタキサンの配座を変化させるためには環構造に触媒部位を導入する必要がある。そこで環構造が形づく平面に対して垂直方向に触媒部位が位置するロタキサンを設計した。具体的には触媒部位を有する大環状フェナントロリン-銅錯体を合成する。環構造にフルオレンから誘導したスピロ骨格を組み込むことにより、触媒部位を環構造に対して垂直に位置するような形で導入する。さらに研究代表者らが確立したフェナントロリン-銅錯体の触媒活性を利用した合成法を活用しロタキサンを得る。すなわち、大環状フェナントロリン-銅錯体とダンベル構造を有する末端アルキンを反応させ、酸化的二量化反応を環内部で選択的に進行させることによりロタキサンを合成する。次に銅触媒の存在下、ロタキサンとアニリン誘導体を反応させることによりピロール構造を有する[2]ロタキサン型分子マシンを得る。軸構造にはジフルオロフェノール誘導体を導入することにより、¹H NMRだけではなく、¹⁹F NMR を利用したロタキサンの配座解析を可能にする。このことによりスペクトルが複雑化した場合にも解析が可能となるようなロタキサンを構築する。

3. 研究の成果

(1) スピロ骨格を有するロタキサンの合成

研究計画に沿ってロタキサンの合成を進めた結果、重要な合成中間体である大環状フェナントロリン-銅錯体、およびダンベル構造とジフルオロフェノール構造を組み込んだ末端アルキンの合成に成功した。大環状錯体については環構造を構成するメチレン鎖の長

さを変更すること、あるいは芳香環を導入することにより様々な環サイズの化合物を得た。さらに、大環状錯体と末端アルキンを炭酸カリウムとヨウ素の存在下反応させ、引き続きアンモニアを用いて銅イオンを除去することにより目的とするロタキサンの合成に成功した。さらにアルキル鎖の長さを変更する、あるいは芳香環を導入することにより環構造のサイズを変更したロタキサン、軸構造のアルキル基の長さを変更したロタキサンを合成した。

(2) ¹H NMR, ¹⁹F NMRスペクトルを用いたロタキサンの配座解析

¹H NMR, ¹⁹F NMR を主な解析手段として用い、合成したロタキサンの配座を解析した。その結果、ロタキサンの構造と配座の相関を明らかにした。例えば、非対称なスピロ構造を導入したロタキサンのNMRスペクトルを測定したところ、軸構造の非対称化が観測された。この非対称化は環構造が大きい場合には顕著ではないものの、環構造が小さい場合にはその影響が大きいことがスペクトルデータから示唆された。また、対称なスピロ構造を導入したロタキサンのスペクトルと比較することにより、単純な置換基効果によりこの非対称化が生じているわけではないことも判明した。さらに軸構造のアルキル基の長さが異なるロタキサンのスペクトルデータを比較した結果、非対称化の効果はアルキル基の長さにあまり依存しないことがわかった。以上の結果から環構造が小さいロタキサンにおいては、環構造が軸構造の特定の部位（2つの3重結合からなるジイン構造）に局在化していることを明らかにした。さらに、環構造が局在化していることが軸構造の非対称化を誘起する要因である可能性があることを示した。

4. 研究の反省・考察

研究開始当初は今回合成したロタキサンにおいて環構造と軸構造はその構造にかかわらずそれらの相互作用は小さく、比較的自由に運動しているものと予想していた。ところが、実際に合成した化合物の一部においては環構造が局在化していることは意外であった。軸構造の高さの違いが予想以上に環構造の配座に影響を与えた可能性がある。また、環構造と軸構造の間には弱い相互作用が存在することも環構造の局在化をもたらす要因となり得る。環構造が小さいことが局在化に寄与していることは確かである。本研究でこれまでに得られたロタキサンの構造と配座に関する情報を今後の研究に活用していきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① Synthesis and shuttling behavior of [2]Rotaxanes with macrocyclic phenanthroline ring, Shinichi Saito, Yoshiaki Yamashita, Yusuke Matsuoka, Yusuke Kawasaki, Yuichiro Mutoh, 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2021環太平洋国際化学会議、online、招待講演、2021年12月)

② Spirofluorene Based Novel [2]rotaxanes: Synthesis and NMR Studies, Showkat Rashid, Takashi Murakami, Yusuke Yoshigoe, Shinichi Saito, 日本化学会第102春季年会、オンライン、2022年3月

(3) 出版物

なし

腸上皮細胞による腸内細菌叢の調節と免疫恒常性の維持機構

1. 研究の目的

[背景] 腸内細菌叢を適正に維持することは、消化管における局所的な宿主防御だけでなく、免疫系をはじめとする全身性の生体応答の調節に不可欠である。腸上皮細胞が粘膜構成因子や抗菌タンパク質の放出を介して腸内細菌叢の維持に寄与していることは疑いないが、宿主に恩恵をもたらす細菌群を保持しつつ、感染症や免疫異常を招く細菌を排除する仕組みについては不明な点が多い。研究代表者は以前、I κ B ζ と命名した転写調節因子（遺伝子名: *Nfkbiz*）を新規にクローニングし、この分子が自然免疫応答に重要であることを示してきた (*Nature* 2004; *J. Biol. Chem.* 2001, 2005a, 2005b, 2008 など)。最近、腸上皮細胞で I κ B ζ を欠損するマウス (*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウス) を作出したところ、小腸の常在菌であるセグメント細菌 (Segmented Filamentous Bacteria, SFB) の過剰増殖が認められた。SFB は、様々な自己免疫疾患の発症に関与する Th17 細胞の生成を促進することが知られていたため、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの小腸粘膜固有層の免疫細胞を解析したところ、Th17 細胞が増加しており、さらに、ヒトの多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) の重篤化が認められた。従って、このマウスでは腸上皮細胞の機能低下により腸内細菌叢が変化し、全身性の免疫応答異常を招いている可能性が示唆された。そこで、次の(1)~(3)を明らかにすることを目的として研究を実施した。

(1) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

- ① 網羅的な遺伝子発現解析をおこない、腸上皮での I κ B ζ の欠損により小腸組織レベルでの遺伝子発現プロファイルにどのような影響が及ぶかを明らかにする。
- ② 発現変動遺伝子を同定し、小腸組織内におけるそれらの機能を明らかにする。
- ③ 転写調節因子としての I κ B ζ の役割を踏まえ、ゲノムワイドでのクロマチン構造変化への影響を明らかにする。

(2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明

- ① 小腸組織片および糞便サンプルから調製した DNA を用いて網羅的な細菌叢解析をおこない、腸上皮の機能変化による細菌叢への影響を明らかにする。
- ② 細菌叢の多様性や均一性に関わるパラメーターを算出し、複数の分類レベルでの細菌組成の変化を明らかにする。

(3) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明

- ① 小腸粘膜固有層における免疫細胞の構成の違いを明らかにし、上述の EAE モデルを誘導した後の病態とその病態形成への免疫細胞の関与を明らかにする。
- ② 抗 CD3 ϵ アゴニスト抗体の投与による小腸炎モデルの病態形成への影響を明らかにする。
- ③ Dextran Sulfate Sodium (DSS) 投与による大腸炎モデルの病態形成への影響を明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

- ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸組織片を用いてマイクロアレイ解析や RNA-seq 解析をおこなう。
- ② 発現変動遺伝子を抽出し、個体数を揃えた RT-qPCR 法により発現変動を確認すると共に、オントロジー解析による機能予測をおこなう。さらに、EDTA 処理により小腸組織を上皮と粘膜固有層に分画し、着目している変動遺伝子が上皮に発現している場合は、マウス小腸上皮由来のオルガノイド培養系を用いてこれらが上皮細胞において直接 I κ B ζ による発現調節を受けているかを検討する。
- ③ *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸組織片を用いて ATAC-seq 解析をおこない、クロマチン構造が弛緩しているゲノム領域を明らかにする。クロマチン構造の違いが発現変動遺伝子の周辺に認められるかを明らかにする。

(2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明

- ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスおよびコントロールマウスについて個体数を揃え、検体採取前

に十分なco-housing(1週間ずつローテーションで合計4週間程度)を実施することにより、暴露される細菌叢を均一化する。その後、小腸組織内の複数の部位および糞便からDNAを調製し、16S rRNA遺伝子領域を対象にした網羅的な細菌叢解析をおこなう。

②細菌叢解析で用いられる多様性や均一性のパラメーターを算出し、門、綱、目、科のレベルでの構成割合の変化を明らかにする。特定の細菌種の含量が変動している可能性を検討する。

(3)腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明

①Th17細胞に着目し、フローサイトメトリーにより、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸粘膜固有層に存在する免疫細胞の解析をおこなう。次にこれらにEAEモデルを誘導し、小腸およびEAEの標的組織である中枢神経系について組織像および免疫細胞の浸潤を検討する。Th17細胞を介した免疫応答に焦点を当て、小腸および脊髄においてTh17細胞が産生するサイトカインの発現を解析する。

②マウスの腹腔に抗CD3 ϵ アゴニスト抗体を繰り返し注射すると、T細胞受容体の非特異的な活性化により小腸炎を誘導することができる。このモデルでは特に小腸の上流域(十二指腸~空腸)で著しい組織損傷が起きることが知られている。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスにこのモデルを誘導し、投与後の体重減少を経時的に測定するとともに、急性期の組織像およびサイトカイン産生を検討する。

③Dextran Sulfate Sodium (DSS)投与による大腸炎モデルを誘導し、体重変化を指標に症状の重篤化を評価する。

3. 研究の成果

(※全体像を図に示す)

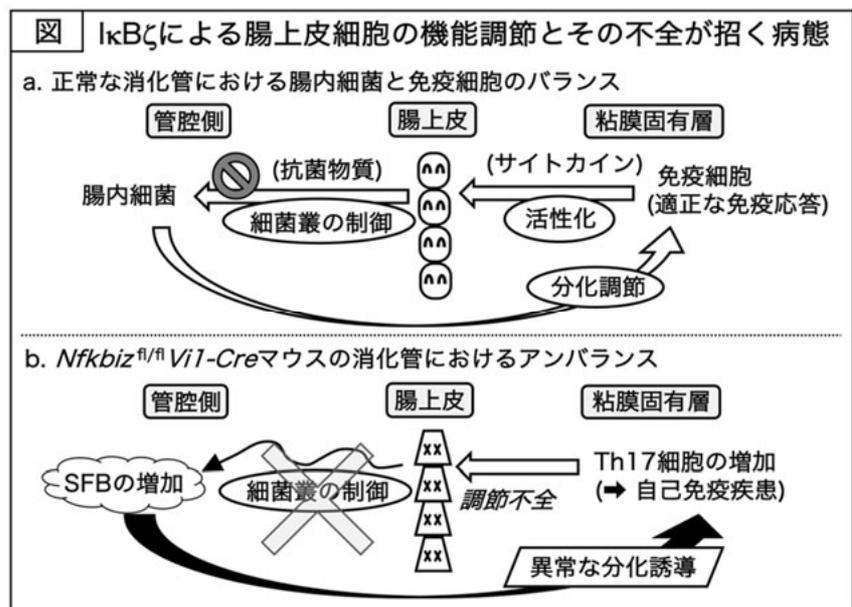
(1)腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

①*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスの回腸末端部の小腸組織片を用いてマイクロアレイ解析をおこなった。また、小腸では部位によって発現遺伝子に差異があることが知られていたため、空腸領域の組織片を用いてRNA-seq解析を実施した。

②回腸末端部の組織片を対象にしたマイクロアレイ解析の結果、腸管粘膜で重要な役割を果たすIgAの産生に不可欠なPolymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR)やCCL28のほか、抗菌ペプチドである一群の α -Defensinファミリーの発現が低下していた。EDTAを用いた野生型マウスの小腸組織の分画をおこなったところ、これらの遺伝子はいずれも上皮面分に発現していたことから、転写調節因子であるI κ B ζ が欠損することにより、上皮細胞におけるこれらの宿主防御因子の発現が障害されたと考えられた。そこでマウス小腸から調製したオルガノイド培養系を用いてこれらの遺伝子の発現を検討したところ、pIgRやCCL28などの発現はIL-17A刺激に

応答してI κ B ζ 依存的に発現誘導されることが明らかになった。一方、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスの小腸で発現が亢進している遺伝子が複数あったが、これらは、後述するように、粘膜固有層で増加しているTh17細胞によるものであると考えられた。

すなわち、Th17細胞が発現するIL-17やIL-22などのサイトカインや、それらのシグナルを受けた上皮細胞で誘導されるReg3などの遺伝子の発現が亢進していた。さらに、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill1-Cre*マウスの空腸領域の組織片を用いたRNA-seq解析では、回腸末端



部と同様にIgA産生や抗菌ペプチド関連の発現低下が認められたことに加え、Th17細胞が発現するサイトカイン遺伝子の発現亢進が回腸末端部よりも顕著に認められ、さらに驚いたことにIFN- γ の標的遺伝子の発現が強く誘導されていた。以上のことから、腸上皮細胞でI κ B ζ が欠損することにより、宿主防御因子の産生が障害され、恐らく腸内細菌の変化を介して慢性的な炎症状態に陥ると考えられた。

③ *Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスの小腸では、回腸末端部より空腸領域において発現変動遺伝子が多く見出されたため、空腸領域を標的にしたATAC-seq解析をおこなったところ、pIgRやCCL28をコードする遺伝子座の周辺でI κ B ζ 依存的に弛緩したクロマチン構造をとる領域が見出された。一方、 α -Defensinファミリー遺伝子の周辺ではI κ B ζ の欠損によってクロマチン構造が変化する領域は認められなかったことから、I κ B ζ の欠損による発現低下は小腸組織内での間接的な影響であると考えられた。IFN- γ 誘導性遺伝子については、発現上昇と矛盾なくクロマチン構造の弛緩が認められた。

(2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内の腸内細菌叢変化の解明

① 十分なco-housingをおこなった *Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスおよびコントロールマウス (n=9) について、空腸、回腸、糞便検体からDNAを調製し、16S rRNA遺伝子領域を対象にした網羅的な細菌叢解析をおこなった。

② サンプルごとに固有の多様性や均一性を示す α -多様性については、遺伝子型に対応した差異は認められなかったが、サンプル間の比較によって得られる β -多様性については、小腸サンプルで有意な違いが認められた。また、コントロールマウスの小腸ではHelicobacteraceae科の細菌が占める割合が圧倒的であるのに対し、*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスではClostridiales科の割合が有意に増えている。これは、この科に属するSFBの増加によることが明らかになった。SFBは通常、回腸の末端部に多く観察されるが、*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスの小腸では、空腸などの小腸上流域で顕著に増加していた。回腸末端部と空腸では発現する抗菌タンパク質の種類が異なることが報告されているので、腸上皮でのI κ B ζ の欠損によって部位ごとに異なる影響が生じたと考えられる。

(3) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明

① *Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスの小腸粘膜固有層からリンパ球を単離し、フローサイトメトリーをおこなったところ、*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスでTh17細胞の有意な増加が認められた。また、Th17細胞が発現するサイトカイン遺伝子である *Il17a*, *Il17f*, *Il22*の発現は、*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスの回腸末端部より空腸で強く増強されていた。これは、SFBによってTh17細胞の分化が促進される事実とよく一致する。次に *Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスに対して、通常より弱い条件下でEAEを誘導したところ、*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスは同腹コントロールマウスよりも症状が重篤化していた。

② 抗CD3 ϵ アゴニスト抗体の投与による小腸炎においても、*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスで明確な重篤化が認められた。また、体重減少の程度が大きく、組織像で絨毛の短小化が著しかった。さらに、小腸内の複数の部位におけるサイトカイン遺伝子の発現を検討したところ、特に十二指腸などの上流部位で発現上昇が見られた。*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスの小腸では特に上流域での抗菌活性の低下により、SFBの増加を中心とした腸内細菌叢の変化が生じる結果、Th17細胞が増加して炎症性疾患の症状が悪化すると考えられた。

③ *Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスおよび同腹コントロールマウスにDSSを投与して大腸炎を誘導したが、体重減少を指標に評価した限り、遺伝子型に対応した症状の違いは認められなかった。*Nfkbiz^{fl/fl} Vill1-Cre*マウスでは、大腸でもpIgRなどの遺伝子の発現が障害されており、抗菌スペクトルが変化していることが予想されたが、このモデルで誘導される上皮傷害による炎症反応や組織修復の過程に大きな差はないと考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織の遺伝子発現プロファイル変化の解明

① 種々の分解酵素を大量に含む小腸だが、適切に組織片を調製し、高い精度で遺伝子発現プロファイルの知見を得ることができた。また、回腸末端部だけでなく、小腸の上流部の組織片についても解析したことにより考察が深まった。

② オントロジー解析により、発現変動遺伝子群に共通の生理機能が抗菌作用であることを

明らかにできた。また、上皮細胞での遺伝子発現変化だけでなく、粘膜固有層での免疫細胞の変化も見出すことができた。さらに、小腸由来のオルガノイドを用いた解析を実施したことにより、発現変動遺伝子の発現調節の仕組みに迫ることができた。

- ③ ATAC-seq解析を実施したことにより、発現変動遺伝子の発現調節機構に関する理解を深めることができた。一方、ATAC-seq解析のようなゲノムワイドの解析には極めて多額の費用が必要になることを再認識した。
- (2) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による小腸組織内および糞便内での腸内細菌叢変化の解明
 - ① 網羅的な細菌叢解析により、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの小腸内および糞便内での細菌組成について有意な差を認めた。
 - ② 標準的な解析方法により多様性・均一性および、種々の分類レベルでの細菌組成の変化を明らかにすることができた。細菌叢解析においても小腸内の複数の部位でサンプリングしたことにより遺伝子発現解析との対応を含め深い理解に繋がった。
- (3) 腸上皮細胞での I κ B ζ の欠損による炎症関連疾患の病態形成への影響の解明
 - ① Th17細胞が産生するサイトカインに着目して複数の小腸組織内の部位での発現を検討したことにより、抗菌活性の変化や細菌叢の変化と対応させることができた。小腸でのTh17細胞の増加によりEAE誘導時に中枢神経系に浸潤するTh17細胞が単純に増えるのではないことが判明した。
 - ② 抗CD3 ϵ アゴニスト抗体の投与による小腸炎モデルでは、小腸でのTh17細胞の増多と病態がよく一致することが明らかになった。一定の定常状態にある*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの小腸にこのモデルを誘導したことにより、病態の形成機構について新たな知見を得ることができた。
 - ③ Dextran Sulfate Sodium (DSS)投与による大腸炎モデルを誘導したことにより、大腸と小腸の上皮細胞におけるI κ B ζ の役割の違いを明らかにすることができた。今後、さらに別の大腸炎モデルの誘導を実施したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Communications Biology 4, 80 (2021) 「MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitination of cFLIP_L」 Nakabayashi O, Takehashi H, Moriwaki K, Komazawa-Sakon S, Ohtake F, Murai S, Tsuchiya Y, Koyahara Y, Saeki Y, Yoshida Y, Yamazaki S, Tokunaga F, Sawasaki T, Nakano H
- ② Immunological Medicine 20, 1-12 (2021) 「Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB」 Katagiri T, Kameda H, Nakano H, Yamazaki S
- ③ Nature Communications 12, 2281 (2021) 「Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer」 Nishina T, Deguchi Y, Ohshima D, Takeda W, Ohtsuka M, Shichino S, Ueha S, Yamazaki S, Kawauchi M, Nakamura E, Nishiyama C, Kojima Y, Adachi-Akahane S, Hasegawa M, Nakayama M, Oshima M, Yagita H, Shibuya K, Mikami T, Inohara N, Matsushima K, Tada N, Nakano H
- ④ Scientific Reports 11, 20231 (2021) 「Identification and characterization of a novel *Enterococcus* bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis」 Nishio J, Yanai H, Hasegawa H, Ishii Y, Tanji Y, Taniguchi T
- ⑤ Cytokine 146, 155652 (2021) 「CXCL1/fractalkine regulates the differentiation of human peripheral blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells into osteoclasts」 Muraoka S, Kaneko K, Motomura K, Nishio J, Nanki T
- ⑥ Pharmaceuticals 14, 474 (2021) 「Treatment with and anti-CX3CL1 antibody suppresses M1 macrophage infiltration in interstitial lung disease in SKG mice」 Mizutani S, Nishio J, Kondo K, Monomura K, Yamada Z, Masuoka S, Yamada S, Muraoka S, Ishii N, Kuboi Y, Sendo S, Mikami T, Imai T, Nanki T
- ⑦ Front Cell Infect Microbiol 11, 602833 (2021) 「Increased incidence and plasma-

biofilm formation ability of SCC mec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from patients with bacteremia] Hamada M, Yamaguchi T, Sato A, Ono D, Aoki K, Kajiwara C, Kimura S, Maeda T, Sasaki M, Murakami H, Ishii Y, Tateda K

(2) 口頭発表

- ① 第50回日本免疫学会学術集会 (奈良/Web hybrid) 2021年12月8日 「Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia」 Yamazaki S, Yonehara S, Nakano
- ② 第65回日本リウマチ学会総会 (Web開催) 2021年4月28日 「肺胞細菌叢が関与する間質性肺炎の病態の研究」 山田善登, 水谷聡, 佐藤洋志, 村岡成, 西尾純子, 南木敏宏
- ③ 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス (Web開催) 2021年11月12日 「間質性肺炎における細胞老化機構の関与」 山田善登, 本村香織, 西尾純子, 南木敏宏
- ④ 第50回日本免疫学会学術集会 (奈良/Web hybrid) 2021年12月9日 「Identification and characterization of a novel *Enterococcus* bacteriophage with potential to ameliorate murine colitis」 Nishio J, Negishi H, Hangai S, Yanai H, Taniguchi T
- ⑤ The 15th Vaccine Congress 2021年10月3日 「Intranasal vaccine development using probiotic *E. coli*-derived membrane vesicles carrying pneumococcal capsular polysaccharides」 Nakao R, Iwabuchi Y, Kimura S, Hirayama S, Morino S, Suzuki M, Ohnishi M
- ⑥ The 3rd Asian Pneumococcal Symposium 2021年12月2日 「Genetic linkage analysis identifies pneumococcal susceptibility locus in mice」 Shindo R, Kimura S, Ishii Y, Tateda K
- ⑦ Orthopaedic Research Society 2022年2月6日 「The study of the candidate drug to prevent the cytotoxic effects of vancomycin on osteoblasts」 Tsuji K, Kimura S, Tateda K, Takahashi H

(3) 出版物

なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	日 本 体 育 大 学	研究所名等	体 育 研 究 所
研 究 課 題	アジア人の遺伝的背景に基づいたサルコペニア予防戦略		研究分野 体 育 学
キ ー ワ ー ド	①サルコペニア ②アジア人 ③アセトアルデヒド脱水素酵素2 ④アクチニン3 ⑤遺伝子多型 ⑥遺伝子編集 ⑦遺伝子改変動物 ⑧運動介入		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 里 浩 一	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 沼 憲 治	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	医学的見地からの助言
岡 本 孝 信	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	世田谷・青葉コホート研究の総括
小 林 正 利	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	教 授	アジア人サルコペニアモデル実験指導(病理学)
菊 池 直 樹	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	准 教 授	世田谷・青葉コホート研究の実施
田 村 優 樹	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	助 教	アジア人サルコペニアモデル実験の総括
鴻 崎 香 里 奈	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	助 教	アジア人サルコペニアモデル実験の実施
小 谷 鷹 哉	日 本 体 育 大 学 学 部 日 本 体 育 研 究 所	助 教	アジア人サルコペニアモデル実験の実施

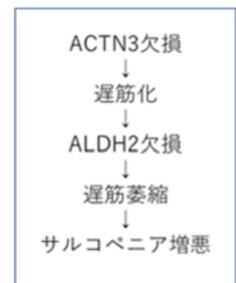
アジア人の遺伝的背景に基づいたサルコペニア予防戦略

1. 研究の目的

サルコペニアは加齢に伴って生じる骨格筋機能・筋量の低下を指す。サルコペニアは日常生活活動動作に支障をきたすのみならず転倒リスク等の整形外科的疾患発生につながるため、超高齢社会においてその予防はすでに重要課題と位置付けられている。サルコペニアの診断基準はやはり筋力、筋機能、筋量による。2019年11月に日本サルコペニア・フレイル学会にてアジア人のエビデンスに基づいたサルコペニア診断基準が発表された。がん、感染症などと同様、サルコペニアも人種等の遺伝性要素が重要視されつつある。

近年、アルコール代謝欠損の原因となるALDH2(アルデヒド脱水素酵素2)遺伝子多型(rs671)はアジア人の遺伝的特性と報告された。すなわち、アジア人の遺伝的特性であるALDH2遺伝子多型はミトコンドリアおよびサルコペニア発生に関与することが示唆される。我々は既にALDH2ノックアウトマウスの骨格筋ミトコンドリアにおいて活性酸素種産生亢進を確認しており(Wakabayashi et al., Am J Physiol, 2020)、ミトコンドリアが豊富な遅筋においてその影響が強く出る可能性が示唆される。一方、速筋の構造タンパク質であるアクチニン3タンパク質を欠失するACTN3遺伝子多型(rs1815739)はスポーツパフォーマンスとの関連性が明らかになっていることに加え、特にアジア人コホートにて加齢性筋機能・筋量低下との関連性が報告されている(Cells. 2019 Dec 19;9(1):12)。従って、ACTN3遺伝子多型がアジア人のサルコペニア発生に影響を与える可能性が示唆される。

では、ALDH2およびACTN3遺伝子多型はどのようにアジア人サルコペニア発生に関与するのであろうか。ACTN3KOマウスでは骨格筋の遅筋化が促進されること(Hum Mol Genet. 2014)が報告されており、ALDH2KOマウスでのミトコンドリアの活性酸素産生能亢進による遅筋の萎縮を仮定すれば、ACTN3多型が遅筋化を促しALDH2多型による加齢時の遅筋萎縮の影響をより強く受けるとするALDH2、ACTN3遺伝子多型によるアジア人特異的サルコペニア発生の生理学的メカニズム(右図)が仮定できる。本研究の目的は遺伝子改変動物およびヒトを対象とした生理学的手法でこの仮説を検証することとする。



2. 研究の計画

(1) 加齢ALDH2ノックアウトマウスにおける筋萎縮の特徴

ヒトALDH2遺伝子多型は酵素活性失活型であり、ALDH2ノックアウトマウスはヒトALDH2遺伝子多型のモデルとして利用可能である。本研究ではALDH2活性欠失がミトコンドリア活性酸素種産生を亢進することより、加齢ALDH2ノックアウトマウスにおける遅筋選択的な筋萎縮を仮定・検証することとした。

(2) ヒトALDH2遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

本学キャンパスが存在する東京都世田谷区および横浜市青葉区の住民を対象に2011年より体力測定を実施しデータ収集している(世田谷・青葉コホート)。本研究ではヒトALDH2遺伝子多型と加齢による筋力低下の関係を検討することとした。

(3) iGONAD法を用いた遺伝子編集によるダブルノックアウトマウスの作出と飼養

我々は既にC57B1/6Jを背景とするALDH2KOマウスを保有している。さらに我々はCRISPR/Cas9および卵管電気刺激を用いた受精卵の遺伝子編集技術(iGONAD法: improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery, Genome Biology, 2019)による遺伝子編集実験に着手し、すでに複数の遺伝子ノックアウトに成功している。これらの技術を用いてALDH2KOマウスに対してACTN3遺伝子を遺伝子編集にてノックアウトすることでアジア人特異的サルコペニアモデルであるALDH2, ACTN3ダブルノックアウト(DKO)マウスを得ることを本年度の計画とした。

3. 研究の成果

(1) 加齢 ALDH2 ノックアウトマウスにおける筋萎縮の特徴

ALDH2 欠損は、加齢野生型マウスと比較して腓腹筋およびヒラメ筋の体重あたりの筋湿重量を有意に減少させた。また、ALDH2 欠損は、加齢野生型マウスと比較してヒラメ筋の筋線維断面積を減少させる傾向が見られた。断面積の低下はミトコンドリア含有が多い筋線維において特徴的であった。ALDH2 欠損が助長した骨格筋萎縮のメカニズムを検討するために ALDH2 欠損が加齢筋の酸化ストレス代謝やミトコンドリア恒常性に影響を及ぼすかどうかを検討した。その結果、ALDH2 欠損は、加齢野生型マウスと比較して酸化ストレスマーカーの 1 つである 4-HNE を増加させる傾向が見られた。また、ALDH2 欠損は、ROS 産生を増加させた。

(2) ヒト ALDH2 遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

健康な日本人1,902名（23-94歳）を対象としてALDH2rs671遺伝子多型と筋力の関係を検討した。まず全体を対象として性別、年齢、体重などを考慮した比較を行うと欠損型（AA）における握力が低値であることが見出された。次に対象者の中でも55歳以上に限定して同様の検討を行ったところ、握力、椅子立ち上がりテストなどが欠損型において有意に低値であることが示された。以上から加齢性の筋力低下においてALDH2遺伝子多型の中でも欠損型であるAA型は増悪因子となりうることが示された。

(3) iGONAD 法を用いた遺伝子編集によるダブルノックアウトマウスの作出と飼養

我々はまず野生型マウスで ACTN3 遺伝子編集条件を確立し、ALDH2KO マウスにてその条件を用いて DKO マウスを得るという戦略で実験を進めている。これまでに、右表のような条件で野生型雌マウス 11 匹に対して iGONAD を行い ACTN3 遺伝子が KO された産仔を得ることに成功、さらに 7 月から ALDH2KO マウスに iGONAD を行い 9 月時点で 2 母親から産仔 8 匹を獲得済みである。

gRNA-L	GGCAGGAGTAAATATCATAG
gRNA-R	CAGAAGTACTTCTAGGATGG
欠失される領域	エクソン7~エクソン8*

※ mRNAタンパク質コード領域の79%がフレームシフトにより欠失することでノックアウトが達成される

さらに ALDH2KO マウスに対して同様の方法で iGONAD を実施し、7 匹以上の産仔を得た。mRNA およびタンパク質レベルにて ACTN3 発現が欠落していることも確認済みである。現在実験に十分な個体数を確保するために飼養中であり、2022 年 8 月にはアークリソース（株）に生殖工学によるコロニーエクспанションを依頼予定である。

4. 研究の反省・考察

(1) 加齢 ALDH2 ノックアウトマウスにおける筋萎縮の特徴

これまでに ALDH2 ノックアウトマウスにおける骨格筋ミトコンドリアは活性酸素種産生が亢進していることを見出していたが、若年齢における骨格筋量は野生型との差が観察されていなかった。今回加齢骨格筋においてその量に差が見られたことは、ALDH2 ノックアウトによる活性酸素種産生の影響は決して大きなものではないが、その蓄積によって加齢時に差が現れることを示唆している。そして骨格筋量に与える影響は速筋あるいは遅筋といった筋線維タイプではなくミトコンドリア量に依存することがわかった。このことから ALDH2 活性が低下しているアジア人においてはミトコンドリア生合成あるいはその健全性を高める有酸素運動などが特に加齢時における骨格筋量維持には有効であることを示唆している。

(2) ヒト ALDH2 遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

マウスを用いた検討（1）におけるミトコンドリア含有量の多い筋線維での加齢時の骨格筋萎縮が顕著であることと同様、55 歳以上のヒトを対象とした横断的コホート研究においても同様に ALDH2 活性欠損者における筋力の低値が観察された。ただしマウスにおいては筋力、ヒトにおいては骨格筋量での検討が十分とは言えない。マウスでは筋力発揮に重要な神経筋接合部の解析、ヒトでは骨格筋量の精密な測定がそれぞれ今後の検討課題である。

(3) iGONAD 法を用いた遺伝子編集によるダブルノックアウトマウスの作出と飼養

現在までに iGONAD 法による ACTN3 ノックアウトには成功しており、実験に必要な個体数は 2022 年 10 月までに得られる予定である。11 月には骨格筋量、筋線維断面積、ミトコンドリア機能、骨格筋における RNAseq などを実施する予定であり、本年度内には若年齢

マウスにおけるDKOの影響の詳細が明らかになることが十分に期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kasai A, Jee E, Tamura Y, Kouzaki K, Kotani T, Nakazato K., Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency promotes skeletal muscle atrophy in aged mice., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2022 Jun 1;322(6):R511-R525.
- ② Kikuchi N, Tajima T, Tamura Y, Yamanaka Y, Menuki K, Okamoto T, Sakamaki-Sunaga M, Sakai A, Hiranuma K, Nakazato K., The ALDH2 rs671 polymorphism is associated with athletic status and muscle strength in a Japanese population., *Biol Sport.* 2022 Mar;39(2):429-434.

(2) 口頭発表

- ① 笠井茜、Jee Eunbin、田村優樹、鴻崎香里奈、小谷鷹哉、中里浩一、ALDH2欠損が加齢性骨格筋萎縮および骨格筋ミトコンドリアに与える影響、第76回日本体力医学会、三重
- ② 服部桜、田村優樹、鴻崎香里奈、小谷鷹哉、中里浩一、C57B1/6J系統ノックアウトマウスにおけるiGONAD法を用いたダブルノックアウトマウスの作出、第69回日本実験動物学会、仙台

(3) 出版物

とくになし

ペアレンティングによる親子介入支援の 長期的効果検証とマニュアル作成

1. 研究の目的

(1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

①現在参加中で継続希望の被験者、および新規に募集し参加希望する被験者において、ペアレンティング効果を主観的・生理学的・心理学的・脳科学的に解析・検証することで、長期効果の実証を得る。

②新規参加家族と長期継続家族の比較検討や同一家族での経時的変化の検討

(2) 得られた結果をもとにした理論の体系化とペアレンティングマニュアルの提言

①この実践理論に基づいたペアレンティングマニュアルを社会に広く認知させることで、密室育児で不安を高めた親が虐待や過干渉、共依存などの不適切な育児に陥ってしまう事例を減少させ、適切な子どもの生育環境が担保され、より良い発達が促されることを目的とする。

②蓄積データと個々の事例検討による独自のマニュアル作成

2. 研究の計画

(1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

①家庭におけるペアレンティング（親などが子どもに与える生活・養育環境）の質が、遺伝素因以上に子どもの思春期以降の心身機能と行動・情緒に大きく影響するという科学的根拠をもとに、2017年8月より開始している親子介入支援を継続して行う。

②上記継続支援により2017年8月～2021年4月までに継続的に採取している子の発達障害関連評価、親子の生理学的評価、心理学的評価、及び脳科学的評価の測定結果の解析を行い、個人データの前後比較と、集団としての比較、また新規参加家族と長期継続家族の比較検討や同一家族での経時的変化の検討を行う。

(2) 得られた結果をもとにした理論の体系化とペアレンティングマニュアルの提言

①複数の学会での発表（小児心身医学会、日本心理学会などを予定）、および論文作成を予定。

②被験者集団からの蓄積データと個々の事例を詳細に検討し、独自のペアレンティングマニュアルの作成を目指す。

3. 研究の成果

(1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

①今年度は、2017年から2021年までペアレンティング指導を用いた親子介入支援を行い、生理学的・心理学的データを蓄積した家族のうち3組の自閉症スペクトラム子とその母について、母子両面からの効果解析を行った。この間に2018年～2019年の支援中断期間、および2020年初頭からのCOVID19パンデミックがあったため、その影響についても検討した。その結果、親子関係検査においては、母が「随順」「溺愛」をはじめとする複数項目が経時的・平均的に改善したのに対し、子は一定の改善傾向を見ることができず、思春期の主観的な反抗心などの影響が示唆された(図1)。この傾向は、中断やCOVID19パンデミックに影響を受けていなかった。一方、子のS-HTP描画法による評価得点(図2)は支援期間に改善し、支援中断やCOVID19パンデミックにより悪化する傾向がみられ、これは母の特性不安得点(図3)と同じ傾向であった。介入支援の存在は母の不安を軽減し、それにより子の認知特性の変容を促す可能性が示唆された。

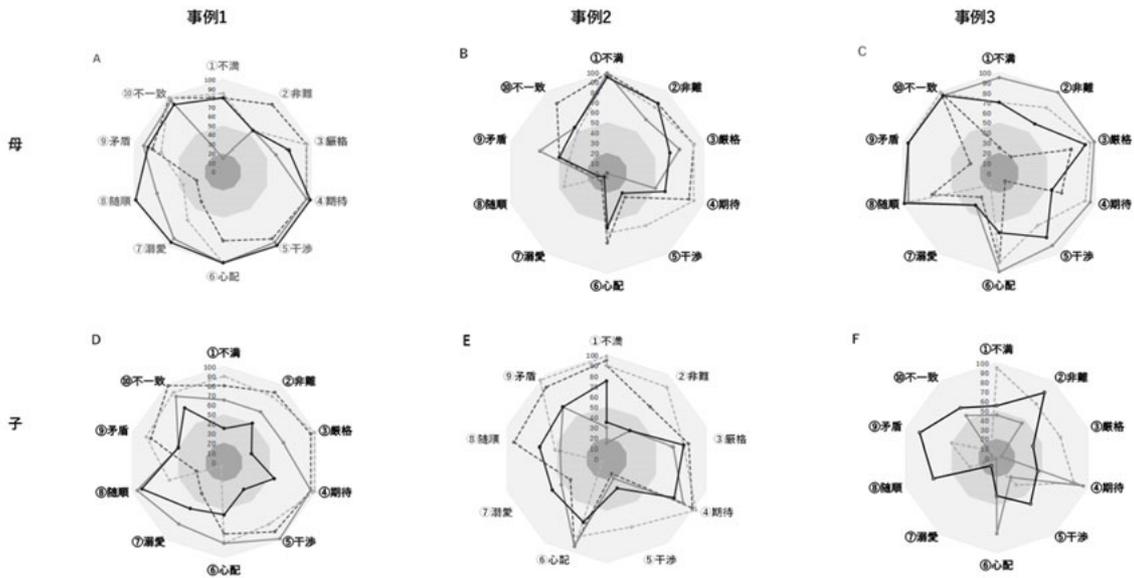


図1：母子 TK 式診断的新親子関係検査の経時変化研究期間中に採取した TK 式診断的新親子関係検査各項目のパーセント値を円グラフで表す。A:事例1母、B:事例2母、C:事例3母、D:事例1子、E:事例2子、F:事例3子の結果であり、それぞれ 2017年8月、2018年8月、2019年8月、2020年4月の結果を示す。なお、事例3子は2017年8月時点で質問紙の適応年齢に達していなかったためデータ採取はできなかった。
 安全域 中間域 危険域

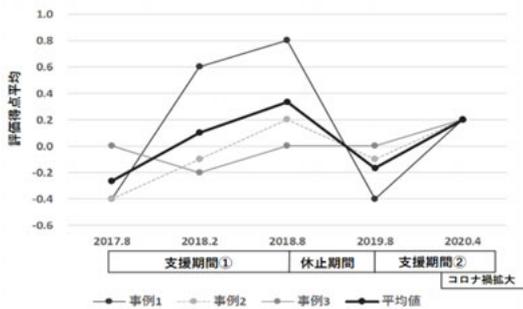


図2：子統合型HTP描画評価得点平均値の経時変化
 子3事例の各描画を評価基準表を用いて採点し平均点をプロットして経時変化を示した。さらに3事例の平均点もグラフ内に示した。

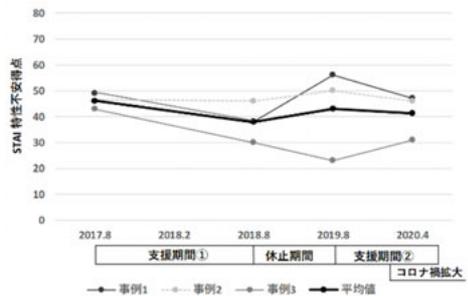


図3：母特性不安得点の経時変化
 母3事例のSTAI不安尺度から採点した特性不安得点の経時変化を示した。さらに3事例の平均点もグラフ内に示した。

②上記①の結果を2021年度小児心身医学会にて口頭発表(優秀推薦演題に選ばれる)した。現在、得られた膨大なデータを引き続き分析しており、今後は、それぞれのパラメーターの関連性についても解析していく。

(2) 得られた結果をもとにした理論の体系化とペアレンティングマニュアルの提言

①2020年度当初は複数の学会や大会での発表・招待講演を予定していたが、COVID19感染拡大の影響により多くが中止延期など変更となり、計画通り遂行できなかった。

②多くの得られた蓄積データから獲得した親子介入支援の実際を、ワーク形式にまとめたうえで、親子支援マニュアルとして文章に起こす作業を行った。現在、出版社が入り、原稿推敲作業を行っている状態である。

4. 研究の反省・考察

(1) 考察

①親子介入支援を継続することで、全体として親子関係は親子双方とも段階的に改善し、長期効果があることが考察された。親子相互作用も存在した。親子関係は支援中断やパンデミックに大きくは左右されなかったが、子が思春期に入ったことによる主観的な親評価

の低下がみられた。

②一方で、親の不安と子の投映的描画評価の変化は、一致して介入支援で改善している傾向がみられた。子の主観が入りにくいという点で、描画法は意義があると考えられた。

これらのことより、継続的なペアレンティング・トレーニングを用いた介入支援を親子同時に行うことは、特に自閉症スペクトラム等発達障害のある児の養育家庭において、良好なペアレンティングの維持に有効であることが示唆された。

(2) 反省

①COVID19パンデミックにより対面でのデータ採取が大きく制限されたため、後半は質問紙を被験者自宅に郵送して記入、返送する形をとった。そのためデータの不正確性が考えられることと、脳機能測定等の採取ができなかった。

②小児被験者からの協力が得られず、欠損値となるデータが散見されるため、データ数が統計学的検討に値しないものがある。COVID19感染拡大の終息後は、被験者を増やすことも考慮に入れ、研究を継続したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①成田奈緒子

脳科学にもとづく親子支援プログラム
指導と評価 68(1):39-41, 2022

(2) 口頭発表

①成田奈緒子

子どもたちの発達のカギを握る「正しい睡眠」
小児歯科学会第36回関東地方会大会2021. 10. 17 (Web開催)

②成田奈緒子、田副真美

ペアレンティングトレーニングを用いた長期親子介入支援の事例検討
第39回日本小児心身医学会学術集会2021. 9. 23-25 香川 (オンライン)

(3) 出版物

①山中伸弥、成田奈緒子

山中教授、同級生の小児脳科学者と子育てを語る 200p
2021. 10. 20 講談社 ISBN 978-4-06-525912-2

②高橋弥生・臼井達矢 (編著)

保育内容 健康 192p 中 149-160p
2022. 3. 23 青踏社 ISBN978-4-902636-69-7

新型コロナウイルス感染拡大下における人々の行動の規定因 —沈黙の螺旋と社会的ジレンマの枠組みを用いた分析—

1. 研究の目的

本課題の目的は新型コロナウイルス (COVID-19) 感染が拡大する環境下における人々の行動の規定因と規範意識の変化を明らかにすることで、社会の分断を回避しつつ感染拡大を抑える行動規範やコミュニケーション環境のあり方を提案することである。

COVID-19 感染の拡大は人類にとって大きな脅威である。ワクチンの開発など医学的な対応が重要なのはもちろんのこと、感染拡大を防止するためには人々の行動変容や生活様式の再構築が求められている。日本においては 2020 年 4 月 7 日に政府が緊急事態宣言を発出したが、人々の行動に対する強制力を持った規制はしかれておらず社会の構成員の自発的な行動変容を基盤とした対策が取られている。この方針は、個人個人の行動の自由といった人権は担保するという面がある一方で、各自の行動基準や規範によって許容される範囲が異なるため、社会の中で衝突や分断を生むという功罪両面がある。特に近年は SNS 等を通じた情報の拡散が非常に広範囲かつ高速であるため、これらの分断は可視化されやすく過激な言葉や行動と共に異なる価値観への攻撃へと繋がる危険がある。具体的には「経済重視」「医療優先」といった規範が双方を攻撃し社会の寛容性が失われるという問題が表面化している。またワクチン接種の遂行についても深刻な対立が生じている。これらの分断が拡大するメカニズムや人々の規範に与える影響を解明しないまま諸所の対策を講じていくことは、将来的に深刻な社会的分断が固定化する危険性をもっている。

2. 研究の計画

研究計画は (1) Web 調査の実施、(2) SNS データの収集・分析、(3) シミュレーションモデルの構築、(4) 知見の統合、の 4 つのフェーズから構成される。

- (1) 第一に Web 調査を行い人々の心理態度の分布を明らかにする。
- (2) 第二に SNS データの収集を行い回答者の SNS 上での情報環境 (どのような人々や意見と接触しているか) を分析する。このデータを用いて回答者以外の多数の SNS 利用者の意見や態度を推定する推定器を機械学習によって構築する。これにより回答者だけでなく、大量の SNS 利用者の意見や行動の分布を分析することができる。
- (3) 第三にここまで得られたデータをパラメータとしたシミュレーションモデルの構築をおこなう。沈黙の螺旋も社会的ジレンマも理論面での研究は非常に発達しているため基本的なシミュレーションモデルは多く提案されている。これらを援用し実データをパラメータや要因として取り入れたシミュレーションを実施することで、様々な環境によって起こり得る現象の帰結をシナリオとして検討することができる。
- (4) 最後にこれらの知見を統合し、あるべきコミュニケーション環境の条件を示す。また、種々によるシミュレーション結果をシナリオ案として提示し、社会に対して広く公表しフィードバックを得る。

3. 研究の成果

2021 年度は、コロナ禍における外出自粛に関するパネル調査の結果から、メディア接触やメディアに対する態度が外出自粛態度の変化に与える効果について検討を行った。2020 年 4 月と 2021 年 4 月の 2 時点でパネル調査を行い、外出自粛とメディア接触に関する項目について測定した。各時点で外出程度が異なる 3 段階のクラスターを抽出し、クラスターごとの特徴を探索的に分析した。その結果から、SNS の閲覧が自粛に対して一貫して効果を持つことや、2020 年と 2021 年では外出する人の特徴が異なっていることも示された。さらに、2 時点の間に自粛から外出にシフトした人たちの特徴についても分析したところ、政治関心が高く、SNS を閲覧し、メディアに対する主観的なリテラシーが高い人ほど外出にシフトしていることも示された。

さらに、メディア接触が政策および新型コロナウイルスワクチンに関する意見の形成に与える影響について検討した。本調査は 2 度目の緊急事態宣言が解除された後、再び感染者数が増加し 3 度目の緊急事態宣言が発出される以前で、高齢者を対象としたワクチン接種が始まった頃の 2021 年 4 月 13 日から 4 月 14 日にかけて行った。その結果、マスメディアとソーシャルメディアでは人々の意見の形成に対して対照的な影響を与えていることが明らかとなった。感染拡

大防止と経済再生という大きく 2 つの意見が並列している現在の状況において、マスメディア接触は一貫して感染拡大防止を重視する意見の形成に正の効果を、マスメディアの第三者効果は負の効果を持っていた。対照的にソーシャルメディア接触は一貫して経済再生を重視する意見の形成に正の効果を、ソーシャルメディアの第三者効果は負の効果を持っていた。このことからマスメディアの情報は、新型コロナウイルス感染症の重症化リスクや死亡リスク、また医療崩壊リスクなどの感染症拡大による直接的な影響を人々に印象付け、ソーシャルメディアの情報は、外出自粛要請や時短営業要請など新型コロナウイルス感染拡大防止措置によって生じる景気の悪化という間接的な影響を人々に印象付けていることが示唆される結果となった。

加えてニュースメディアの影響の詳細について分析するために、メディアに特化した分析もおこなった。様々なニュースメディアが存在するなか、人々のニュースに対する意識や行動も多様化してきている。ネット上におけるニュース接触に関しても、新聞社・通信社が運営するニュースサイトや、ポータルサイトからニュースを知るといった場面だけでなく、SNS 上でニュースを知るといった場面も一般的になりつつある。一方で、Twitter などの SNS は同質な情報環境になりやすいことから、利用者が接触できるニュースの範囲や内容が限定的になってしまうことで、多様な情報に接触する機会が低下してしまうことが懸念される。本研究では、Twitter 上でのニュースツイートに着目し、このツイートの閲覧者がその後どのようなニュース動画の視聴行動を行ったかを分析することで、Twitter 上でのニュース閲覧の効果を考察する。具体的には、ニュースのツイートとそこからリンクされるニュース動画の視聴ログを用いて、ニュースの継続視聴や視聴ジャンルの変化などの行動を分析した。

4. 研究の反省・考察

2021 年度は 2020 年、2021 年の 2 波にわたるパネル調査の分析を中心に実施した。その成果を国際学術誌 PLOS ONE に投稿したが、学術誌のスコープとの乖離や結果の解釈についての議論が査読者と一致せず採択には至らなかった。査読の指摘に従い一部を改稿し、現在他の学術誌に投稿し (SocioInformatics)、査読中である。

一方で、2022 年 4 月には第 3 波調査を実施した。コロナ禍の初期から 3 波にわたるパネルデータを保有していることは学術的にも社会的にも非常に大きな意義を持つため、これらの分析結果を早急に発信していくことが 2022 年度の主たる目的となる。特に、2021 年度調査で抽出された、新型コロナワクチンに対する強い忌避を持つ人々のクラスターを持つ特徴やどのような要因でワクチン忌避が強化されたのかという分析は今後のワクチン政策立案にとって重要な知見となることが期待される。2022 年度は詳細な分析を行い成果を公表していく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 小川祐樹、高野雅典、森下壮一郎、高史明：Twitterにおけるニュースツイートの閲覧と動画視聴の関連性、2021年度人工知能学会全国大会（第35回） 2021
- ② 梅谷凌平、後藤晶、岡田勇、山本仁志 アップストリーム互惠性の規定因 一搾取という側面からの検討一、日本社会心理学会第62回大会 (PR0239) 2021
- ③ 梅谷凌平、山本仁志、後藤晶、岡田勇 搾取がアップストリーム互惠的協力に与える影響 第28回社会情報システム学シンポジウム 2022
- ④ 鈴木貴久、山本仁志、小川祐樹、梅谷凌平、コロナ禍における外出自粛に対するメディアの効果 第28回社会情報システム学シンポジウム 2022
- ⑤ 山本仁志、鈴木貴久、小川祐樹、梅谷凌平、コロナ禍における向社会的行動の規定因：2時点パネル調査による分析 Workshop of Social System and Information Technology (WSSIT2022) 2022

(3) 出版物

なし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 －深層学習による中枢神経薬の効果判定－	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①麻薬依存、②深層学習、③畳み込みニューラルネットワーク、④受容体、⑤ベータアレスチン、⑥生物発光共鳴エネルギー転移		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
興 水 崇 鏡	分 子 薬 理 学 部 門	教 授	研究者代表、深層学習、データベース作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
土 屋 裕 義	分 子 薬 理 学 部 門	講 師	動物行動解析、動物モデルの解析
東 森 生	分 子 薬 理 学 部 門	学 内 講 師	組織学的評価、個体での化合物評価
持 丸 雄 太	分 子 薬 理 学 部 門	助 教	細胞モデルの解析、遺伝子解析
Chortip Sajjaviya	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	行動の深層学習と解析、薬物効果判定
Fujianti Casmad	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	免疫組織化学的解析
神 永 洋 彰	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	生化学的解析、薬物効果判定

マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 — 深層学習による中枢神経薬の効果判定 —

1. 研究の目的

(1) 疼痛のない状態で麻薬を娯楽目的に使用した場合、容易に我々の生体は麻薬が体内に存在する状態に慣れた「依存症」に陥る。依存症は古くより知られる麻薬鎮痛薬の有害作用ですが、現段階で麻薬が起こす依存を効果的に治療する手段は非常に限られている。本研究では、麻薬をはじめとする薬物や、さらには賭博などの行為の習慣性が過度となる広い依存症の治療について、最新のコンピューター科学の力を最大限に取り入れ、新しい治療法を開発することを目的とした。具体的には、コンピュータービジョンによる画像取り込みと認識に加えて、物体認識の進んだ学習能力を世界に先駆けて依存症の理解に導入し、対処法を開発することに挑戦した。

(2) 実験手法として、申請者らが独自に開発に成功したユニークな麻薬感受性を示す遺伝子改変マウスを解析対象として利用した。このマウスは依存症の病態の理解に加え、麻薬鎮痛薬を含む中枢神経薬の効果を効率良く解析するために有用と考えられる。その上で、依存を避けながら鎮痛効果を安全に得るための投与方法を開発し、依存の状態と治療過程を信頼度高く評価する方法を確立する。

(3) この研究で得られる成果として、世界的な社会問題となっている麻薬依存の克服に向けた貢献が期待できる。依存を取り巻く医学的、社会的問題状態は深刻であり、特に米国では、麻薬オピオイドの依存による過量投与によって、連日 100 人に及ぶ命が失われている。この数は、米国の銃と交通事故による死者を合わせた数よりも多く、米国大統領令により危機的状況クライシスが宣言され、英国でも同様にプレクライシスとされる。新型コロナウイルスによる感染症は、経済的、医療的な弱者である依存症の患者層を直撃し、依存症患者の死亡率を平時よりもさらに高めることに繋がった。よって、麻薬を含む物質への依存症、並びの行為の依存は、現代の世界的難題と言える。この難題への突破口と、安全で先進的痛み治療の確立が我が国でも求められている。

2. 研究の計画

(1) 物体検出と追尾による依存状態の検出と評価系を確立する。近年の目覚ましい技術革新が生む計算力のハードおよびソフト面での進歩を、現実世界で直面する課題に応用した場合、ヒトが本来備える能力を超えて困難な問題に対処できると期待される。特に画像認識と判別に深層学習を用いる方法論は急速に成熟し、画像診断や病理診断の補助技術として応用が進められている。本研究では、麻薬依存症マウスモデルを作成し、その過程を動画から連続画像として 1 秒間に 5 枚の精緻な切り出しを行う。続いて深層学習のための OS を Ubuntu 16.04 から 18.04、さらに 20.04 へとバージョンアップして計算速度と効率の上昇を達成する。Tensorflow はバージョンが 1.x から 2.x へ向上し、最新のソフトウェアに更新して Keras ソフトウェアと一体で解析を進める。複数の GPU 用グラフィックボードは、Nvidia 社のドライバーソフト CUDA を導入し、並列計算環境を構築する。続いて画像内の物体の教師付き深層学習の環境を構築する。これらソフトウェアのバージョンを合致させながら、最新の状態で計算機パフォーマンスを最大限に発揮させるため、仮想環境の中で試行的に計算環境を運用することを試みる。物体検出アプリケーションとしては、そのために、Google が提供する Tensorflow を利用し、マウスの行動パターンを 5D テンソルデータとして学習させる。その際、190 万枚の最新画像データベース ImageNetV4 から訓練画像を取得する。これまでに、深層学習を終えたリカレントニューラルネットワークモデルを転用し学習効果を向上させる方法について確立しており、効率的、正確性の高い計算モデルを構築する。得られた計算結果を用い、新たな依存マウスを検出できるか検証する。以上より、信頼度が高く依存状態を検出し、治療開発に繋がる計算モデルを作成する。

(2) 動物実験において生体での理解と共に、細胞系を用いて分子レベルの依存症研究も展開する。特に、麻薬の依存に関係性が示唆される V1b 受容体について、その作用を調節する化合物の検索手段を確立し、実際に化合物のスクリーニングを実施する。具体的には、カルボキシル末端にロイシンが多く出現する V1b 受容体と、 β アレスチンの相互作用は、オピオイドの

依存症成立に必要な細胞内シグナルの開始点と考えられる。しかし、V1b- β アレスチン-オピオイドの 3 分子が相互作用するこの段階を評価する方法が存在せず、検出法の確立が課題であった。我々は、多くの条件検討を重ねることにより、精緻に V1b 受容体と β アレスチンの相互作用を検出する手技を確立しつつあることから、この方法の改善を押し進める。

3. 研究の成果

(1) 物体検出する深層学習モデルの改善：我々は前年度に、画像分類課題において‘何が’写っているかについては、直列的な転移深層学習モデルを作成して 95%以上の高確率で正答可能となる学習条件を見出していた。今年度はさらに進んで‘何処に’どのような‘状態（コンテキスト）’で存在するかを学習により判断する正確性の向上に成功した。すなわち、マウスを物体として検知しラベル化することで意味づけを行うことが可能であった。計算環境としては、オープンソース主導で革新を続けるコンピュータサイエンスの成果を、直ちに本研究に応用するため、トライアンドエラーが可能で柔軟な深層学習計算環境を前年度から引き続いて構築、改善した。

①Miniconda仮想環境を、Ubuntu OSバージョンを超えて汎用可能に構築：OS更新時には、全ソフトウェアバージョンの整合性を見直し、ソースからビルドして動作確認する場合には多くの時間と労力を要する。そこで、OSに依存しない仮想環境に変更した。パッケージマネージャのMinicondaは、数日かけていた計算環境のソースからの構築に代わり、必要なインストールを数分で終了する。このため、挑戦的なプログラムも素早く試行可能であった。UbuntuのOS 20.04においても安定して計算可能であった。Tensorflowバージョンは2.x系で進化を継続したが、この場合も最新の環境を導入可能であった。よって、中央演算子CPUと複数のGPUによる強力な並列計算が可能となった。この系を用いることにより、10日間に渡り継続的に記録した動画より100万枚を超える画像のビックデータより、依存に特長的な行動変化を捉える深層学習技術の開発に成功した。

(2) NanoBit-NanoBRET を構築し 3 分子相互作用の高感度化に成功：

①我々は、依存に関わると予想されるGタンパク質受容体の二量体と β アレスチンとの相互作用解析に、世界で初めてNanoBit-NanoBRETシステムを導入することに成功した（参考文献1）。相互作用の特異性を証明する細胞実験系として、BRETのドナータンパクを一定量として、アクセプタータンパクを増加させた場合のBRETの効率を測定、計算したところ、非特異的相互作用よりも遥かに高いアクセプターの蛍光を得て相互作用の特異性を証明した。

②V1b- β アレスチン間は、刺激非依存性に複合体が形成され、高感度化に成功したBRET計測において刺激と共にさらにBRETシグナルの増加を検出した。これにより、V1b- β アレスチンの相互作用は、非刺激時の構成的相互作用を第一段階とし、刺激に依存する第二段階の相互作用を仮定できることが、GPCRの中でも初めて明らかとなった。

③さらに、本研究の開始前には不可能であったV1b- β アレスチン-オピオイド受容体の3分子間相互作用の刺激依存性変化を見出すことに成功した。即ち、V1bは β アレスチンとオピオイド受容体のそれぞれと相互作用するため、両者を橋渡ししていることが明らかとなった。この3者の複合体をV1bあるいはオピオイドで刺激すると、3者間のBRETシグナルはさらに増強することが判明した。以上の結果より、オピオイド鎮痛薬の依存シグナルの起点となるV1b- β アレスチン-オピオイド受容体の機能的特徴を解明し、依存を抑制する方法の基盤的知見を得ることに成功した。

4. 研究の反省・考察

(1) 深層学習を用いた物体認識において、依存モデルマウスを 90%以上の正答率で検出する計算モデルを構築することに成功した。訓練に用いるラベル付き画像を 3,000 枚から 16,000 枚に増加させることにより、正確性は 95%以上に上昇することが判明した。さらに、Tensorflow のバージョン 2.9.1 は現時点で最新の機能を利用することに成功している。本研究の計画時点での物体認識システム構築の目標はほぼ達成されたと考えられるが、さらに、最近では画像判別アルゴリズムとして、ビジョントランスフォーマー (ViT) が注目されており、今後の課題として ViT を取り入れた判別系の導入が課題と考えられた。

(2) 依存シグナルの起点となる V1b- β アレスチン-オピオイド受容体複合体の機能解析において、3 分子間相互作用解析の手法である NanoBit-NanoBRET 法の導入に世界で初めて成功した。

この方法を用いることにより、これまでは困難であった V1b- β アレスチン間の相互作用を減弱あるいは、上昇を阻害する薬物の探索が可能となった。このような薬物は、麻薬耐性や依存性を減弱させる可能性が考えられ、スクリーニング法の確立は大きな前進と考えられた。時間的制限があり、実際に化合物の大規模スクリーニングには進むことができなかった。しかし今後実際に実施する場合には、今回の成果を踏まえて効率的に進めることが可能と考えられた。

(3) 本研究で開発に成功した 3 分子相互作用解析法は、700 種類を超える GPCR 受容体ファミリーに広く応用が可能である。これまでは、受容体から G タンパク質を介する情報伝達が治療薬開発の対象とされてきたが、 β アレスチンを介する情報伝達は未だ薬物開発に至る例は少ない。加えて受容体側の二量体を形成する組み合わせは多岐にのぼるため、 β アレスチンを加えた 3 分子が薬物開発対象となる次の段階の治療薬開発には、大きな成果が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Agonist dependency of the second phase access of β -arrestin 2 to the heteromeric μ -V1b receptor. Ngamlertwong N, [Tsuchiya H](#), [Mochimaru Y](#), [Azuma M](#), Kuchimaru T, [Koshimizu TA](#). Sci Rep. 2021 Aug 4;11(1):15813.

② Epidemiology and Risk Factors for Giant Coronary Artery Aneurysms Identified After Acute Kawasaki Disease. Masuda H, Ae R, [Koshimizu TA](#), Matsumura M, Kosami K, Hayashida K, Makino N, Matsubara Y, Sasahara T, Nakamura Y. Pediatr Cardiol. 2021 Apr;42(4):969-977.

(2) 口頭発表

① Sensitive detection of agonist-dependent interaction between heteromeric μ -opioid and V1b vasopressin receptors and beta-arrestin 2. Ngamlertwong N., [Tsuchiya H.](#), [Azuma M](#) and [Koshimizu TA](#) 第94回日本薬理学会年会 Web開催

② Agonist-dependent second-phase access of β -arrestin 2 to μ -V1b receptor heteromer. [Koshimizu TA](#) and Ngamlertwong N. International narcotics research conference 2021. Web開催

(3) 出版物

なし

性的問題行動を示す発達障害の青少年と保護者向け ySOTSEC-ID 支援 ー発達支援と臨床的プログラムの開発ー

1. 研究の目的

(1) 「ySOTSEC-ID “Keep Safe”」日本版マニュアルプログラムのモデル実施と効果測定

①本研究は、性的問題行動を示す知的障害・発達障害のある青年期の人々に対する効果的な発達の・臨床的支援方法を研究することを目的とし、イギリスで開発された「性的問題行動（HSB）を示す知的障害・発達障害のある青少年と保護者向けのグループ治療プログラム ySOTSEC-ID “Keep Safe”」に注目した。

ySOTSEC-ID “Keep Safe”（以下、“Keep Safe” とする）とは、有害な性行動（HSB）をとる知的障害のある青少年（CYP）の現場に関わる実践者と研究者が開発したものである。成人向けの支援の中で対象者の相当数とその不適切な性行動や性犯罪行為が青少年期に始まっていることに気づき、思春期・青年期への発達の支援や臨床的アプローチが必要であることが指摘されており、青少年への対応の重要性が指摘されているにも関わらず、彼等に対するサービスはわずかであり、調査研究も少ない。

②そこで筆者らは、“Keep Safe”Project 代表のロウィーナ・ロシター博士 (Rowena Rossiter) と連携して資料を整え共同研究を行うこととした。日本においても活用できる「性的問題行動を示す知的障害・発達障害のある青少年とその保護者への支援プログラム」日本版マニュアルを検討し、日本に合わせたプログラム内容の編集や適切な教材の作成を行うこととした。

(2) “Keep Safe” 日本版のモデル実践と効果測定

① “Keep Safe” 日本版の妥当性を検討するために、モデル実践を行うこととした。モデル実践を実施する前に、対象者の障害特性、リスクアセスメント、触法・非行分析を行うこととし、検査バッテリーを検討した。

② “Keep Safe” 日本版のセッション実施を確定するために、モデルセッションのプログラム構成および実施方法を検討することとした。モデルセッションでは、どのような効果を得ることができるか、エビデンスのある予防的・発達支援の取り組みとすることとした。

これらにより、性的問題行動を示す知的障害を含む発達障害のある青少年とその家族に対して、有効な発達のおよび臨床的支援を提供することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) “Keep Safe” 日本版マニュアルの教材作成と妥当性の検討

① “Keep Safe” イギリス版マニュアルの翻訳研究協力チーム12名を編成し（大学研究者の他、少年院教官、特別支援学校教員、弁護士、児童相談所心理士など）、和訳とともにマニュアルに使用される認知行動療法に関する事例や知的障害・発達障害のある人向けに作成された視覚的教材が日本においても妥当であるか検討を行うこととした。

② “Keep Safe” 日本版マニュアルで使用するのに妥当である事例を作成し、日本版の文化に合わせたストーリーやアニメ等の視覚的教材が妥当であるかを検討した。

(2) “Keep Safe” 日本版のモデル実践と効果測定

① “Keep Safe” 日本版マニュアルのプログラム効果を測定するために、A, B, C, D地区の4地区においてモデル実践を行った。プログラム本体は週1回～隔週1回、2時間、全18回、23回、38回のセッションで行うこととした。主要セッションの選択と焦点化を事前に検討しプログラムを実施した。

②事前にリスクアセスメント、知的能力、自閉スペクトラム症の特徴把握、環境状況のアセスメント等を行った。対象者は、知的障害・発達障害のある青年と成人、合計13人であった。年齢は12歳～40歳代、知的能力はIQ50台～80台、13人とも自閉スペクトラム症の特徴を有し、1人はADHD特徴が顕著であった。13人中12人はほぼ全セッションに参加した。

3. 研究の成果

(1) “Keep Safe” 日本版マニュアルの作成と視覚的教材の妥当性の検討

知的障害・発達障害のある青少年とその家族に向けた“Keep Safe”の日本版マニュアル（全365ページ）で作成したストーリーおよび視覚教材が妥当であるかを検討した。

① “Keep Safe”日本版マニュアルの目的は次の2つに焦点を当てた。

A；ウェルビーイングの向上（ニーズを、社会に適応した方法で満たす）

B；再犯に至るリスクの低下（ニーズを、性加害や他の不適切な方法で満たさない）

② “Keep Safe”日本版マニュアルのモジュール構成（当事者6モジュール38セッション、保護者モジュール7：16セッション）と主要教材は2019年度に作成したプログラムで妥当であることがわかった。特に、日本の思春期・青年期の当事者に合わせたストーリーやアニメも合わせて作成したが、ストーリーは、対象者のトラブル特性や認知特性、経験特性に合わせて、プログラムを実施する支援者チームによってアレンジして作成することが効果的であることが明らかになった。

(2) “Keep Safe”日本版のモデル実践と事前事後のアセスメントの検討

“Keep Safe”日本版のプログラム内容の妥当性を検証するために、全国の4か所でモデル実践を行った。A地区グループは児童相談所と知的障害児支援施設が把握する性問題行動を有する当事者4人、B地区グループは発達障害者支援センターがコアになって把握していた性問題行動を有する当事者3人が対象であった。C地区グループは市基幹相談支援センターと地域生活定着支援センター、相談支援事業所のスタッフがチームを組んで実施した。D地区は特別支援学校高等部の生徒を対象に実施した。生活年齢は12歳～40歳代、知的能力はほぼ軽度であり、認知行動療法が求める情報の共有やコミュニケーションを取ることが可能であった。リスクアセスメントはARMIDILO-S（The Assessment of Risk and Manageability for Individuals with Developmental and Intellectual Limitations who Offend Sexually）により行った。

事前事後のアセスメントバッテリーは“Keep Safe” Group 治療の適合性スクリーニングテスト、静的リスクアセスメント Static99、動的リスクアセスメント ARMIDILO-S、ERQ-CA：感情コントロール尺度、SDQ：強みと弱み尺度、ENDCORE：ソーシャルスキル尺度、時間的展望尺度、MES：共感尺度、POMS（Profile of Mood States）：気分の尺度 35項目の短縮版であった。

事前のアセスメントは低リスク4人、中リスク6人、高リスク2人であったが、セッション後はいずれも事前のリスクよりリスクが低下していた。特に顕著な変化は「監督の順守」および「グッドウェイ、バッドウェイの理解」であり、生活ルールを守り他者に共感する行動や、自分に不利な事態であっても事前に身近な支援者に相談し解決しようとする姿勢が見られていた。最終的な質的分析においてもそれぞれの対象者には効果が明らかであった。

4. 研究の反省・考察

(1) “Keep Safe”日本版マニュアル視覚的教材の検討および正規インストラクター養成実施

① “Keep Safe”日本版マニュアルの作成と視覚的教材の検討は、おおむね目的に達した。知的障害・発達障害のある思春期青年期の当事者に合わせ、理解しやすいような視覚的教材や演習方法などを導入し、より効果的な認知行動療法になるようプログラムを改良した。

②日本語版マニュアルの検討と同時に、“Keep Safe”セッションを実施するインストラクター養成を行った。理論的研修を2日間、対面とオンライン研修にて行った。全国5か所で順調に実施でき、全国で120人の正規インストラクターが養成された。インスト研修における演習方法も効果的な方法を作成することができた。

(2) “Keep Safe”日本版の社会実装にむけた研究の開始

本年度に本プログラム全セッション38回をC地区で実施し、知的障害・発達障害のある性問題行動や性加害行為を起こした本人たちにむけエビデンスベースでのプログラムであることが確認できた。セッションを実施するインストラクター養成も順調に進み、全国で120人の正規インストラクターが養成され、約10人がチームを組んで実施することが有効な方法であることが明らかになった。事前事後のアセスメントバッテリーは、ARMIDILO-S、ERQ-CA：感情コントロール尺度、SDQ：強みと弱み尺度、ENDCORE：ソーシャルスキル尺度、時間的展望尺度、MES：共感尺度、POMS（Profile of Mood States）：気分の尺度 35項目の短縮版で行うことが妥当であることを確認した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①堀江まゆみ（2022）性問題行動を示す知的障害・発達障害の青少年と保護者向けの Keep Safe 実践. 吉川徹（編），こころの科学 Vol 223 (pp. 67-72). 日本，日本評論社
- ②堀江まゆみ（2022）自立活動・職業指導で取り組む性問題行動に向けた「KeepSafe」プログラム. 実践みんなの特別支援教育、7月号、学研

(2) 口頭発表

- ①堀江まゆみ（2021）性的問題行動を示す知的障害・発達障害の青少年と保護者向け KeepSafe プログラム. 自閉スペクトラム症と性加害を考えるー予防と再教育におけるソーシャルストーリーTMの可能性ー. 自閉スペクトラム学会、自主シンポジウム
- ②堀江まゆみ他（2022）性問題行動を示す知的障害・発達障害生徒へのKeepSafe実践ー特別支援学校の自立活動・職業指導への導入と効果ー. 日本特殊教育学会第60回大会自主シンポジウム（エントリー中）

(3) 出版物

なし

With コロナ社会における自己分析プログラムの開発

－慈悲 i-Collage 回想法を用いた検討－

1. 研究の目的

新型コロナウイルスの感染拡大により、世界的規模で生活スタイル、働き方の変革が求められている。特にアイデンティティ確立の重要な時期にある青年期にとって、仲間との密接な関係の形成維持を妨げられている現状は発達上の危機とも言えるだろう。特に大学生はオンライン授業の割合が他の校種に比べ多く（小中高 5%：大学 66%、文部科学省 2020 年 4 月時点）、対面授業が少ないことから孤立感や不安感を訴える者も多かった（65.7%：全国生協連）。特に就職活動を行う、大学 3～4 年生は教職員の支援を受けつつも、個別での非常に心理的負荷の高い就職活動を行わざるを得ない事態となっている。

従来であれば、対面する友人関係の中で情緒的安定や自己/他者理解を深め、自己分析に取り組むことができていたが、三密を避ける現状では難しい。就職活動を通じた進路決定は、アイデンティティ形成の大きな節目であり、どのように選択、納得という自己決定をしたかが、その後の自己の有様や進路選択、社会との関わりにも大きな影響を与える（宮下，2008）。特に「自分とは何者か」を問う自己分析について、With コロナ社会における新しい支援の枠組みが求められていると言えるだろう。

そこで本研究では、情報通信技術を活用した自己分析プログラムの開発を目的としてセルフ・コンパッションを導入した新しいグループ回想法である“慈悲 i-Collage 回想法”（タブレット型端末機器を用いて、各自の思い出の写真を使用したコラージュ作品を作成し、作品の相互閲覧及び話し合いを行う。感情コントロールのためにマインドフルネスのセルフ・コンパッションを導入する回想法）が、大学生に対して①不安・抑うつの低減、②時間的展望の獲得（就職活動の見通しを含む）をもたらすか、また実施することでどのような気分や効果の意識を生じさせるかを、グループ対話のみの回想法実施群（対話群）及び個別で課題に取り組む記入する群（個別記入群）とのランダム化比較実験を実施し、その有効性を検証する。オンライン形式での開発を検討しているが、まずは対面形式でのそれぞれのプログラムの効果検証を行うこととする。

自己分析が不十分な状態で就職することは、就職先企業とのミスマッチを生じやすく、就労意欲の低下や離職率の高さにつながりかねない。ニートやひきこもりとなった場合、社会的には甚大な損失ともなりうる。With コロナ時代に本プログラムを全国に普及することで、年間約 44 万人の就職活動予定の大学生に対して自己分析の促進に広く貢献でき、こうした社会的損失を未然に防ぐ可能性がある。政府は 2020 年度末までに小中学校での学習端末 1 人 1 台の配備を進めている。大学生に限らず、小中高校生（特に新入学年）や不登校・ひきこもり等孤立した状況にある者においても、仲間集団を形成するための自己紹介プログラムツールとして、i-Collage 回想法を活用することが期待できる。

2. 研究の計画

研究 1：慈悲 i-Collage 回想法を用いた自己分析プログラムの効果検証

(1) 目的：慈悲 i-Collage 回想法を用いた自己分析プログラムの効果を明らかにするために、比較対象として対話のみの回想法の条件、個別に記入を行う条件を設定し、ランダム化比較研究にて効果検証を行った。（研究 2 として、オンライン形式での調査実施を予定していたが、単年度の助成となったので、研究 1 のみの結果を述べる）

(2) 対象：大学 3 年生 33 人を 3 条件にランダムに割り当てた。慈悲 i-Collage 回想法群 14 人、対話群 8 人、個別記入群 11 人であった。平均年齢は、20.8 歳（±.43）であった。（なお、現在もプログラム実施中の条件があり、予定では、2022 年 7 月下旬には最終的に各条件 15 人となることが見込まれる。2022 年度では研究 2 でオンライン形式への応用を計画していた）

(3) 介入：慈悲 i-Collage 回想法群では、慈悲 i-Collage 回想法を対面で 1 グループ 3～4 人



の構成により、3グループで実施した。全5回を1クールとする（約10週間：2か月半）。1クール終了後に別グループで同様に実施した。

慈悲 i-Collage 回想法は、図1の i-Collage 技法を用いて、①自分の好きなもの、②幼児～小学校6年生、③中学1年生～現在、④これから、をテーマに自身の写真（もしくはインターネット上の画像データ）を用意してもらい、各回1作品完成後に作品（出来事や体験）及び自分の考えや感情の紹介、互いにコメントを述べるグループワークを行った（計4回）。その際、研究代表者はファシリテーターとして最小限の関与を行った。合わせて、ネガティブな想起や感情が生じた場合のケアとして、マインドフルネスのセルフコンパッション（慈悲）のワークを導入した。5回目には全体の振り返りを行った。

対話群では、慈悲 i-Collage 回想法条件と扱うテーマや手続きは同様であるが、i-Collage 技法による作品制作は行わなかった。**個別記入群**でも、テーマは同様であるが、テーマの教示が与えられた用紙に自分の回想を記入するものであり、他者との対話はなかった。

(4) 評価：プログラム実施前後に①**不安・抑うつ**の測定のため K6 日本語版 (Fukukawa et al., 2008) 及び②**時間的展望体験**の測定として時間的展望体験尺度 (白井, 1997) を実施した。時間的展望体験尺度は、目標指向性（進路の指向性も含む）、希望、現在の充実感、過去受容の4つの下位尺度 19 項目 5 件法から構成されている。③各回の取り組み実施前後には、**気分評定**として日本語版 PANAS (佐藤・安田, 2001) を用いた。ポジティブ気分とネガティブ気分の2因子各 10 項目から構成されている。④第5回調査では、このプログラム体験の効果を、回想法の機能尺度 (Webster, 2003) を参考にした 10 項目で尋ねた。

3. 研究の成果

(1) 不安・抑うつに対する効果

3つのプログラムが不安・抑うつにどのような効果を示すかについて、プログラム前後の K6 日本語版による得点で、時期(2)×群(3)の反復分散分析を行った。その結果、時期と群の主効果、及び交互作用に有意差は認められなかった（それぞれ $F(1, 30)=1.66$, $n.s.$; $F(2, 30)=2.59$, $p<.10$; $F(2, 30)=.12$, $n.s.$ ）。

(2) 時間的展望体験に対する効果

3つのプログラムが時間的展望体験にどのような効果を示すかについて、時間的展望尺度の4因子各得点で、時期(2)×群(3)の反復分散分析を行った。結果を以下に示す。

①**充実感**：時期と群の主効果、及び交互作用に有意差は認められなかった（それぞれ $F(1, 30)=1.57$, $n.s.$; $F(2, 30)=2.44$, $n.s.$; $F(2, 30)=5.63$, $n.s.$ ）。

②**希望**：時期の主効果が認められ、**前より後で有意に高くなっていた**（ $F(1, 30)=17.86$, $p<.001$ ）。群の主効果及び交互作用に有意差は認められなかった（それぞれ $F(2, 30)=2.88$, $p<.10$; $F(2, 30)=.59$, $n.s.$ ）。

③**目標指向**：時期の主効果が認められ、**前より後で有意に高くなっていた**（ $F(1, 30)=8.13$, $p<.01$ ）。群の主効果及び交互作用に有意差は認められなかった（それぞれ $F(2, 30)=.55$, $n.s.$; $F(2, 30)=.42$, $n.s.$ ）。

④**過去受容**：時期の主効果が認められ、**前より後で有意に高くなっていた**（ $F(1, 30)=6.12$, $p<.05$ ）。群の主効果及び交互作用に有意差は認められなかった（それぞれ $F(2, 30)=.40$, $n.s.$; $F(2, 30)=.29$, $n.s.$ ）。

(3) 各回の気分変容

3つのプログラムにおいて、各回の実施が気分にどのような影響を与えたか、PANAS 尺度のポジティブ気分得点とネガティブ気分得点について、時期(2)×群(3)の反復分散分析を行った。結果を以下に示す。

①**ポジティブ気分得点**：**すべての回で時期の主効果が認められ、前より後で有意に高くなっていた**（第1回から第4回それぞれ $F(1, 30)=14.85$, $p<.01$; $F(1, 30)=32.36$, $p<.001$; $F(1, 30)=20.18$, $p<.001$; $F(1, 30)=20.84$, $p<.001$ ）。いずれの回でも群の主効果は認められなかった。**第1回と第4回**で交互作用に有意差が認められ（それぞれ $F(2, 30)=5.67$, $p<.01$; $F(2, 30)=4.23$, $p<.05$ ）、単純主効果検定を行ったところ、**実施後の水準で個別記入群よりも対話群において、5%水準で有意に高くなっていた**。

②**ネガティブ気分得点：第1回と第2回で時期の主効果が認められ、前より後で有意に低く**なっていた ($F(1, 30)=14.31, p<.01$; $F(1, 30)=4.48, p<.05$)。いずれの回でも群の主効果は認められなかった。第1回で交互作用に有意差が認められ ($F(2, 30)=4.33, p<.05$)、単純主効果検定を行ったところ、有意差が確認できなかった。

(4) 回想法の機能

一元配置分散分析により、各得点の比較を行ったところ、以下の5項目で主効果が有意となったため、LSD法による多重比較を行った。

①「電子機器への興味」では、慈悲i-Collage回想群>対話群>個別記入群の順で高かった ($F(2, 33)=5.99, p<.01$)。

②「**自己の強み理解**」「**問題解決能力の自認**」「**メンバーとのつながり**」では、**慈悲i-Collage回想群・対話群>個別記入群の順で高かった** (それぞれ $F(2, 33)=10.55, p<.001$; $F(2, 33)=8.81, p<.01$; $F(2, 33)=37.75, p<.001$)。

③「**就活への活用**」は、**対話群>個別記入群の順で高かった** ($F(2, 33)=4.30, p<.05$)。

4. 研究の反省・考察

(1) まとめと考察

途中経過のデータではあるが、現状以下のことが示された。**プログラムの種類を問わず、希望、目標指向、過去受容を高め、テーマに関わらずポジティブな気分を高める。効果としては、個別記入群よりも、慈悲 i-Collage 回想法群・対話群の方が、自分の強みを理解し、本来持っている問題解決能力に気づきやすく、同じプログラムを行ったメンバーとのつながりを強く意識していた。**就職活動に活かせるという点については、対話群が個別記入群よりも高くなっていたが、就職活動では言語によるコミュニケーションが中心となるために、写真を用いた作品を中心にしたプログラムよりも効果を実感しやすかったと考えられる。

以上のことから、**自己分析を実施するにあたっては、個別で行っても一定の効果はあるものの、グループにより対話を行ったり、視覚的な素材を用いた自己表現によってコミュニケーションを取り入れることは、さらに自己分析を深める**ことが示唆された。学生の特性によって、どちらのプログラムが適しているかが異なることも考えられる(自分について言語のみで伝えることへの抵抗が強い場合は、慈悲 i-Collage 回想法が適しているなど)。また、今後さらに新たな感染症拡大や災害などで対面が困難になる時期を想定し、オンライン形式への応用へと本研究をさらに発展したい。

(2) 反省

2021年度4月にiPadの購入を行ったが、コロナ禍で生産や物流に支障があり、入手できたのが7月であった。そのため、研究の実施を予定よりも大幅に延期せざるをえなかった。より効率的な研究実施へ軌道修正などを行っても良かったかと思われる。また質的なデータ(記述やグループでの対話内容)の分析は今後丁寧に行う必要があり、手法の検討も行うべきと考えている。2022年7月下旬に研究1の調査が終了する。その時点でのデータを持って、年内にも積極的な学会発表や論文発表を行いたい。特に英文での論文投稿を検討する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 なし

(2) 口頭発表 なし

(3) 出版物 なし

*2021年度のみ研究助成であったため、成果の発表は2021年度中に行っていないが、2022年9月に心理臨床学会で発表の予定である。

糖尿病性腎臓病の進展抑制に対する抗炎症的治療法の探索

— プランルカストの糖尿病性腎臓病抑制効果 —

1. 研究の目的

糖尿病性腎臓病 (Diabetic Kidney Disease: DKD) において腎機能低下が速く進行性に経過する患者 (Rapid GFR decliner) は、末期腎不全への進展リスクが高いため、その病態解明と新規治療法の開発は急務である。申請者らは、これまでに 2 型糖尿病/肥満 (Wistar fatty (fa/fa)) ラットの腎では高度な炎症性変化と尿細管間質障害を認めることを報告してきた。また DNA アレイ解析の結果、非糖尿病ラットと比較して、糖尿病ラット腎では、システインロイコトリエン受容体 1 (CysLTR1)、インターロイキン(IL)-1 β 、リポカリン-2 を含む炎症関連遺伝子の高度な発現増加を認めるため、これらによる炎症が進行性の腎障害に密接に関与していると考えた。本研究では、CysLTR1 に着目し、糖尿病腎の炎症の病態形成と腎病変の進展における CysLTR1 の果たす役割を CysLTR1 拮抗薬プランルカストを用いて解明することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 実験 1: Wistar fatty ラットに対するプランルカストの DKD 抑制効果の検証

① Wistar lean ラット: コントロール (Cont), Wistar fatty (fa/fa) ラット: 糖尿病 (DM) の各ラット (雄, 36 週齢, 各 n=7) を以下の群に分別し 8 週間治療介入。
群: 1) Cont+対照液、2) Cont+プランルカスト 3mg/kg/日、3) DM+対照液、4) DM+3mg/kg/日。 ※プランルカスト: ゾンデにて経口投与。

② 評価項目:

ア. 治療介入後の体重、血糖値、腎重量、尿中アルブミン/ L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP)/ クレアチニン (Cr) 比、HbA1c 値。

イ. 腎組織: マッソン・トリクローム染色 (線維化)、CD68 免疫染色 (マクロファージ浸潤)、p-S6RP 免疫染色 (mTORC1 の活性化)、p62 免疫染色 (オートファジー)、CysLTR1 発現 (腎皮質)、炎症性サイトカイン・ケモカイン発現 (腎皮質) (RT-PCR): IL-1 β 、TNF- α 、CCL2、リポカリン-2 (Lcn2)、線維化マーカー発現 (腎皮質) (RT-PCR): コラーゲン III、尿細管障害マーカー発現 (腎皮質) (RT-PCR): Kidney injury molecule (Kim)-1。

(2) 実験 2: 培養した近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) の高ブドウ糖によるオートファジーおよび炎症の変異に対するプランルカストの効果の検証

① HK-2 細胞をケラチノサイト SFM 培地で培養・継代し実験に用いた。

② 高ブドウ糖刺激は、30mM ブドウ糖含有培地 (High Glucose (HG)) にて 24 時間培養した。なお、5mM ブドウ糖含有培地に 25mM マンニトールを加えた培地をコントロール (Cont) とした。

③ プランルカストは、最終濃度 1-50 μ M にて MTT アッセイおよび LDH release アッセイにて細胞毒性の評価を行った。

④ HG およびプランルカスト付置 24 時間後に、リン酸化-AMPK (p-AMPK)、AMPK、リン酸化-S6 ribosomal protein (p-S6RP)、S6RP、LC3、CysLTR1、リン酸化-NF- κ B (p-NF κ B)、NF- κ B、nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)、IL-1 β 、TNF- α 、 β -actin 発現を WB 法にて評価した。

⑤ 実験結果は、3 回の独立した重複実験の平均士標準偏差 (SD) 値を表し、一元配置分散分析とそれに続く Tukey の多重比較を使用して、3 群間以上の差異の有意性を評価した。p<0.05 値を統計的に有意であるとした。

3. 研究の成果

(1) 実験 1

① 治療介入後 (44 週) の時点で、DM 群では、Cont 群と比較して、有意に体重、腎重量、随時血糖値、HbA1c 値の上昇を認めたが、DM 群と DM+プランルカスト群の間に差を認めなかった (Fig 1A-D)。

② 尿中アルブミンおよび L-FABP/Cr 比は、Cont 群と比較して DM 群で有意に増加した (Fig 1E, F)。尿中アルブミン/Cr 比は、DM 群と DM+プランルカスト群の間に差を認めなかったが

(Fig 1E)、尿中 L-FABP/Cr 比は、DM+プラニルカスト群で、DM 群と比較して有意に減少した(Fig 1F)。

- ③ MT 染色、3 型コラーゲン発現、Kim-1 発現で評価した腎尿細管間質の線維化、尿細管細胞障害は、Cont 群に比較して DM 群で有意に増加し、DM+プラニルカスト群で有意な低下を認めた(Fig 2A-D)。
- ④ CD68 免疫染色、CD68、CysLTR1、Tnf- α 、TLR2、CCL2、Il-1 β 、Lcn2 発現で評価した炎症は、Cont 群に比較して DM 群で有意に増加し、DM+プラニルカスト群で有意な低下を認めた(Fig 3A-D)。
- ⑤ p-S6RP、p62 発現は、Cont 群に比較して DM 群で有意に増加し、DM+プラニルカスト群で低下を認めた。電子顕微鏡にて評価した近位尿細管細胞におけるミトコンドリア形態変化は、DM 群で断片化、クリステの消失を認めたが、DM+プラニルカスト群で改善した。

(2) 実験 2

- ① Cont と比較して、HG(0)にて有意な p-AMPK 発現の低下、p-S6RP 発現の増加を認めた。プラニルカストは、1~50 μ M の附置にて、1~10 μ M では用量依存的に (Fig 5A)、10~50 μ M では、ほぼ同等に(Fig 5B)、p-AMPK の増加および p-S6RP 発現の低下、LC3-II 発現の増加を認めた。
- ② プラニルカストの細胞毒性に関して、MTT アッセイ(Fig 6A)および LDH release アッセイ(Fig 6B)にて評価したところ、50 μ M でのみ細胞毒性を示した。
- ③ HG により誘導される CysLTR1、p-S6RP 発現の増加、p-AMPK 発現の低下は、プラニルカスト 10 μ M の附置にて、CysLTR1、p-S6RP 発現は低下、ならびに p-AMPK 発現は増加を認めた(Fig 7A-D)。LC3II 発現は、プラニルカストにより有意な増加を示した(Fig 7A, E)。
- ④ HG により誘導される炎症に関しては、p-NF- κ B、NLRP3、IL-1 β 、TNF- α 発現は、プラニルカスト 10 μ M の附置にて有意に低下を認めた(Fig 8A-E)。

Fig 1

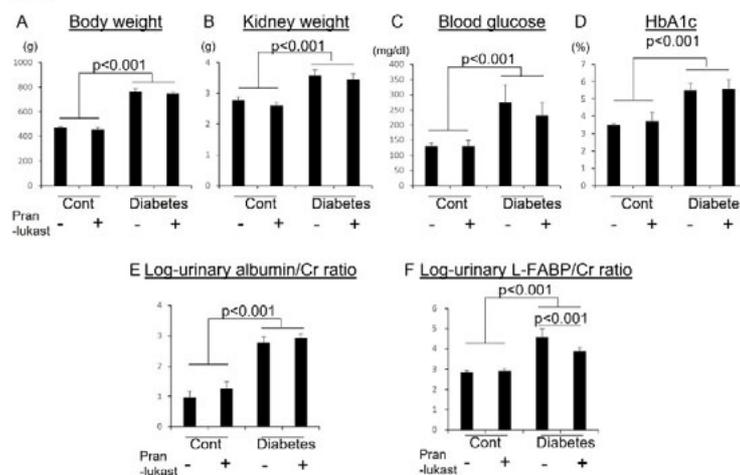


Fig 2

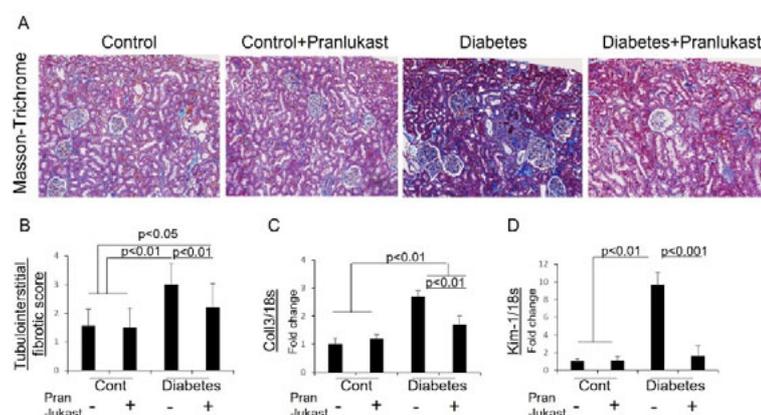


Fig 3

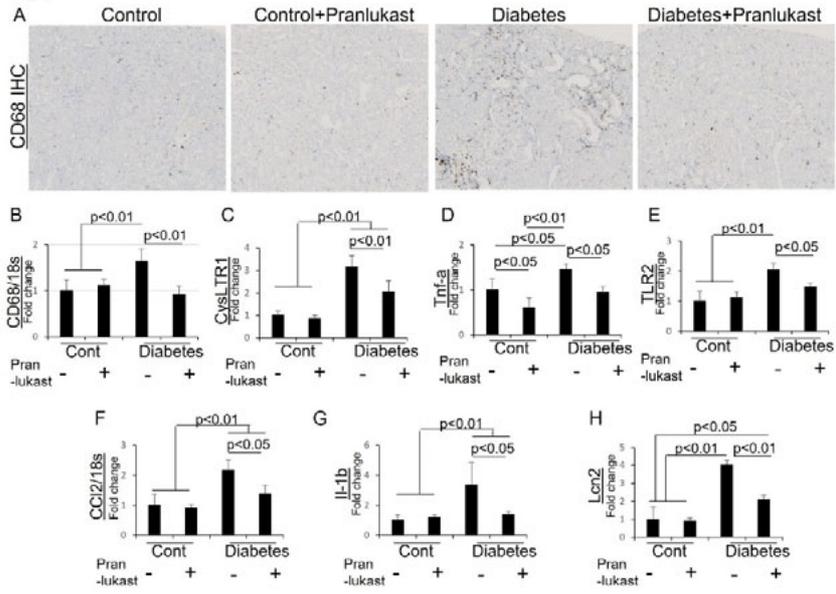


Fig 4

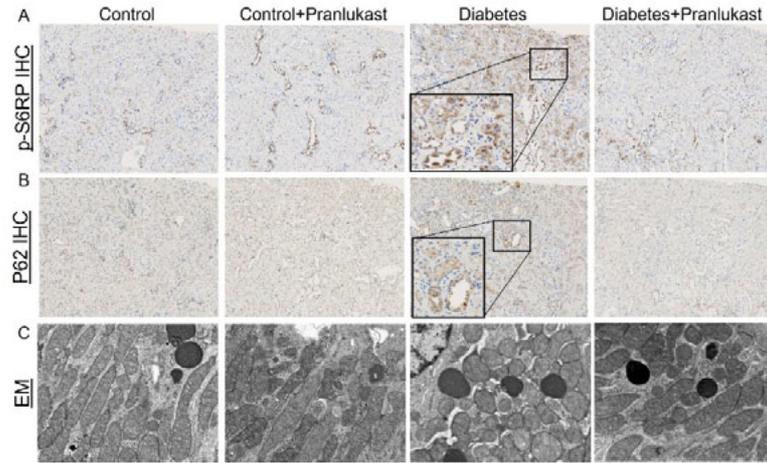


Fig 5

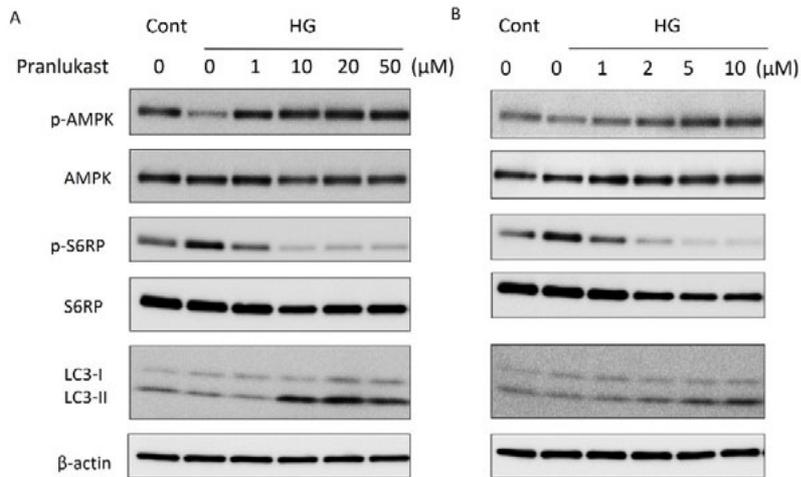


Fig 6

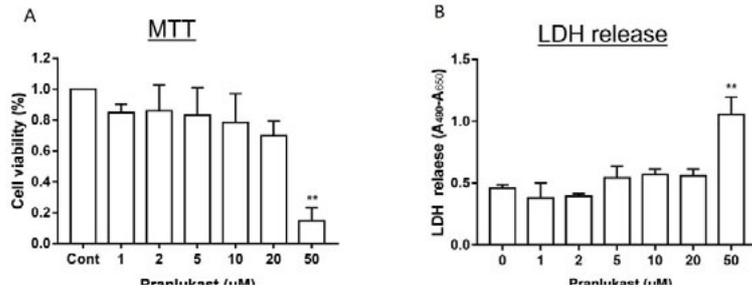


Fig 7

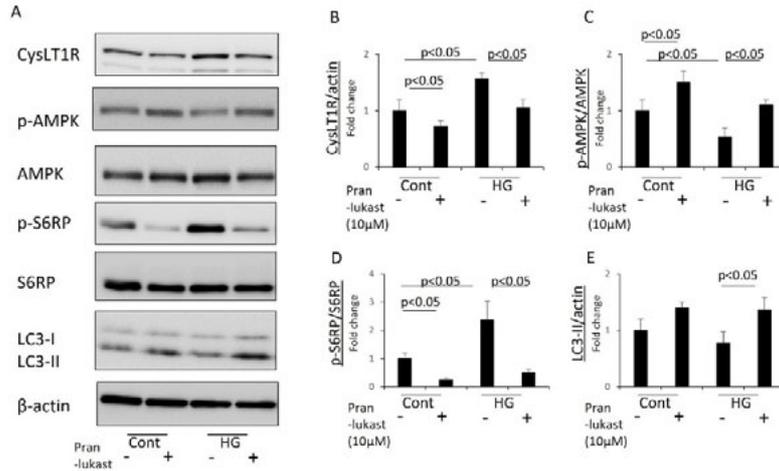
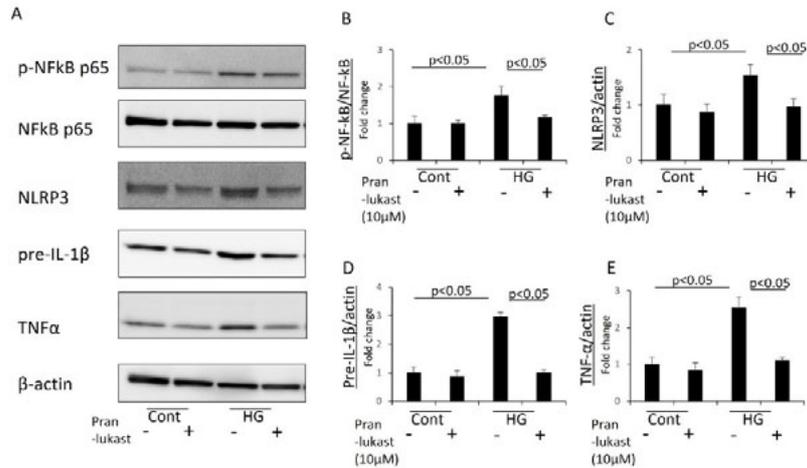


Fig 8



4. 研究の反省・考察

プラニルカストは、糖尿病状態の腎近位尿管細胞において認められる栄養応答シグナル変異 (AMPK 活性の低下と mTORC1 活性の低下)、ならびにそれと関連するオートファジーの低下を回復することで、炎症を改善し、腎保護効果を発揮する可能性が示唆された。今後、今回示されたプラニルカストの腎保護効果が、CysLT1R を介した効果であるかどうか、in vivo 実験における CysLT1R ノックアウトマウス、ならびに in vitro 実験における CysLT1R ノックダウン・システムを用いた検討により明らかにする予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
ありません
- (2) 口頭発表
ありません
- (3) 出版物
ありません

光活性化タンパク質の活性制御機構の解明と細胞の光制御への応用 —構造機能相関を基盤とした新規オプトジェネティクスツールの開発—

1. 研究の目的

本研究では、光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC) の活性制御機構を明らかにするとともに、明らかにした活性制御機構の情報を基に幅広い光量の光刺激で様々な cAMP 産生能を示す新たな改変体群を創製することを目的とする。

近年、「光感受性タンパク質」の働きを光でオン/オフすることで、目的の細胞の働きを光制御する技術である「オプトジェネティクス」が急速に広まっている。本研究のターゲットである「光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC)」は、青色光刺激によりセカンドメッセンジャーである cAMP を産生する光感受性タンパク質であり、cAMP が重要な役割を果たす心筋細胞、脂肪細胞、筋肉細胞などの様々な細胞で細胞機能を光制御できる可能性を秘めている。本研究では、PAC の一種であるユレモから見つかった PAC (0aPAC) の構造—機能相関に迫ることで 0aPAC の活性制御機構を明らかにし、その知見をもとにバリエーションに富んだ改変体群を創製する。そこで、本年度は下記の 2 点を目標とし、各項目に記載した事項について検討を行った。

(1) 0aPAC の光依存的な構造変化の可視化

- ① 0aPAC の構造変化の FRET での検出のための蛍光標識
- ② Cy3 と Cy5 で標識した 0aPAC 変異体の蛍光強度変化の測定 (多分子計測)
- ③ ナノ開口基板を用いた高濃度蛍光性 ATP 結合の 1 分子イメージング系の確立

(2) 0aPAC の C 末端の光感受性調節機構の解明と、新規 0aPAC 改変体の創製

- ① C 末端アミノ酸変異体の作製
- ② 酵母を利用した変異体の cAMP 産生能の測定
- ③ 培養細胞を利用した変異体の cAMP 産生能の測定

2. 研究の計画

(1) 0aPAC の光依存的な構造変化の可視化

① 0aPAC の構造変化の FRET での検出のための蛍光標識

0aPAC の活性変化に伴う構造変化を光学的に捉えるため、特定のアミノ酸に蛍光分子を特異的に標識した。システイン残基のチオール基に特異的に結合するマレイミドを用いて標識するため、まず 0aPAC の内在性の 5 つのシステインをアラニンに置換した変異体を作製し、その後その変異体に蛍光標識用のシステイン残基を 1 つ導入した。具体的には、光感受部位 (BLUF ドメイン) にある 16 番目のグリシンまたは触媒ドメインにある 306 番目のイソロイシンをシステインに置換した。また、以前我々が見つけた光感受性調節部位である C 末端にシステインを付加した変異体も作製した。その後、作製した変異体にマレイミド基が付いた 2 つの蛍光分子、Cy3 (ドナー) と Cy5 (アクセプター) を反応させ、導入したシステイン残基をこれらの蛍光分子で標識した。ちなみに、0aPAC は二量体を形成するため、各変異体は 2 つのシステイン残基を持つ。

② Cy3 と Cy5 で標識した 0aPAC 変異体の蛍光強度変化の測定 (多分子計測)

蛍光分光光度計を用いて蛍光標識した 0aPAC の蛍光強度を測定し、光照射に伴う変化を捉えた。具体的には、標識した 0aPAC 溶液に高輝度 LED で青色光 ($500 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を 30 秒間照射し、照射をオフした直後からの Cy3 と Cy5 の FRET に伴う Cy5 の蛍光強度の変化を捉えた。

③ ナノ開口基板を用いた高濃度蛍光性 ATP 結合の 1 分子イメージング系の確立

高濃度での蛍光分子の 1 分子検出が可能な直径 100 nm のナノ開口基板を用いて、蛍光性 ATP が ATP 結合蛋白質に結合・解離する様子を EM-CCD カメラを用いて観察した。

(2) 0aPAC の C 末端の光感受性調整機構の解明

① C 末端アミノ酸変異体の作製

0aPAC の光感受性に関わっている C 末端の活性に影響を与えるアミノ酸を絞り込むため、C 末端のアミノ酸の疎水度と電荷に着目し、アミノ酸の置換により疎水度や電荷を変化させた変異体を数種類作製した。前年度に作製した C 末端の 12 残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体に加え、今年度は C 末端の 9 残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体と、

362番目の正に荷電したリジンを中性のアラニンに置換した変異体を変異導入キットを用いて作製した。

②酵母を利用した変異体のcAMP産生能の測定

以前の研究により、OaPACを酵母に発現させた場合、cAMP活性が高いOaPACでは酵母の増殖能が低下することが示されている。この特性を利用し、変異体を発現した酵母の増殖能を活性の指標として捉え、cAMP産生能を調べる。具体的には、作製した変異体を酵母に形質転換し、青色照射下と暗所で変異体の発現を誘導しながらプレート上で培養し、増殖の様子を観察した。

③培養細胞を利用した変異体のcAMP産生能の測定

培養細胞（HEK細胞）にOaPAC変異体遺伝子と、cAMPのバイオセンサーの遺伝子をリポフェクション法で導入した。このセンサーはルシフェラーゼベースのバイオセンサーで、cAMPが結合すると発光する。これらのタンパク質を発現させた細胞に様々な強度の青色光を照射し、産生されたcAMPを発光として捉えた。また、導入したOaPAC遺伝子には2A自己切断ペプチドを介して赤色蛍光タンパク質（RFP）の遺伝子を付加し、OaPAC変異体の発現量をRFPの蛍光強度で見積もった。これにより、各OaPAC変異体の同一の発現量におけるcAMP産生量を比較した。

3. 研究の成果

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

①OaPACの構造変化のFRETでの検出のための蛍光標識

2020年度にATP結合部位付近をCy3とCy5で蛍光標識し、これらの間でのFRETを捉えようとしたが、青色光照射による蛍光強度の変化が小さく、捉えるのが難しかった。そのため、FRETで効率よく距離変化を捉えることができるフェルスター距離を考慮して、新たに3つのアミノ酸（16、306、367番目）のいずれかにシステインを導入し、マレイミド基を持つCy3とCy5で標識した。その結果、16番目または306番目にシステインを導入した変異体では、それぞれOaPAC : Cy3 : Cy5 = 1 : 0.15 : 0.16、または1 : 0.23 : 0.33の標識率で標識された。しかしながら、367番目にシステイン残基を導入した変異体は、標識時間や温度を変化させても、ほとんど標識されなかった。このことから、C末端の末端はタンパクの表面に位置しておらず、蛍光分子が届かない内部に位置していると思われる。

②Cy3とCy5で標識したOaPAC変異体の蛍光強度変化の測定（多分子計測）

Cy3とCy5で標識したOaPACを用い、青色光照射によって活性化された状態から不活性化状態への構造変化をCy3とCy5のFRET効率の変化で捉えた。蛍光標識OaPACへ青色光を照射し、照射直後のCy5の蛍光強度の変化を蛍光分光光度計で測定した。その結果、BLUFドメインに存在する16番目のアミノ酸を蛍光標識した変異体では、暗所時と比べ光照射終了直後の蛍光強度は高く、約5secで暗所時の蛍光強度に戻った。Cy3とCy5の距離が近づくとCy5の蛍光強度が高まるので、光照射によりOaPACが活性化された状態では、二量体間の標識部位の距離は近づくことがわかった。一方触媒ドメインの306番目のアミノ酸に標識した変異体では光照射直後の蛍光強度は暗所時と変わらず、変化が見られなかったことから、この部位では二量体間で光依存的な距離の変化はないことがわかった。

③ナノ開口基板を用いた高濃度蛍光性ATP結合の1分子イメージング系の確立

ELISA法を用いてOaPACの活性（cAMP産生）を測定した結果、OaPACのKm値は μM オーダーであり、通常1分子イメージングで使用される全反射顕微鏡での蛍光1分子の検出限界である50 nMを大幅に超えていた。そのため、全反射顕微鏡と比べてより局所照明が可能な直径100 nmのナノ開口基板を用いて蛍光性ATPの結合・解離を捉える系を確立した。このナノ開口基板を用いて、蛍光性ATPが100nMの存在下でATP結合蛋白質へのATPの結合・解離を1分子イメージングすることができた。

(2) OaPACのC末端の光感受性調整機構の解明

①C末端アミノ酸変異体の作製

作製した変異体である、C末端の9残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体（疎水性-9）と362番目の正に荷電したリジンを中性のアラニンに置換した変異体（K362A）について、シークエンスを確認し、目的のアミノ酸に変異が入っていることを確認した。

②酵母を利用した変異体のcAMP産生能の測定

作製した変異体2種に加え、2020年度に作製したC末端の12残基をすべて疎水性アミノ酸にした変異体（疎水性-12）と、野生型OaPAC（WT）をそれぞれ酵母に形質転換し、発現誘導処理によりOaPAC変異体を酵母に発現させ、10 μ Wから230 μ Wの様々な強度の青色光照射下または暗所で増殖能の違いを調べた。その結果、暗所ではすべてのOaPACが増殖した一方、青色光照射下では、WTと疎水性-9はすべての光強度下で増殖したが、疎水性-12では約130 μ W以上の強度では増殖率が低くなった。以前の研究によりcAMP活性が高いOaPACが発現した酵母ではその増殖能が低下することが報告されているので、この結果はC末端の12残基がすべて疎水性になるとOaPACの活性が高まることを示唆している。また、K362Aは、約230 μ Wでは増殖率がWTより低くなった。このことから、362番目の正電荷を持ったアミノ酸を中性化すると、OaPACの活性が若干高まることが示唆された。

③培養細胞を利用した変異体のcAMP産生能の測定

培養細胞に作製した変異体を発現させ、光照射によりOaPAC変異体から産生されたcAMPをcAMPのバイオセンサーを用いて発光として捉えた。その結果、それぞれの変異体のcAMP産生能は酵母を用いた計測の結果と同様の傾向を示した。同一の光強度で、疎水性-9はWTとほぼ同じcAMP依存的な発光量であった一方、疎水性-12は約100倍、K362Aは約10倍の発光量を示した。このことから、C末端の12残基をすべて疎水性にするとOaPACの活性が約100倍高まり、正電荷を持った362番目を中性化すると活性が約10倍高まることがわかった。

4. 研究の反省・考察

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

BLUFドメインと触媒ドメインをCy3とCy5で蛍光標識した変異体の蛍光特性を調べること、青色光による活性化時と不活性化時のBLUFドメインの構造状態の違いを捉えることができた。活性化時に二量体間のBLUFドメインの16番目のアミノ酸同士の距離が近づいたことから、これらの部位は光に依存して構造変化をすることがわかった。この部位はバンドルが作られているヘリックスの両側に位置していることが結晶構造解析で明らかとなっている。このバンドルを中心に、16番目のアミノ酸を含むBLUFドメイン同士が近づく方向へねじれるのではないかと考えられる。

また、ナノ開口基板を用いて蛍光性ATPの1分子イメージングを行い、ATPの結合・解離を輝点のオン・オフとして捉えることができた。今後この系を用いてOaPACへのATPの結合・解離を捉えると同時に、BLUFドメインの16番目のアミノ酸に標識したCy3とCy5のそれぞれの照射光に依存した蛍光強度の変化を1分子レベルで捉えることで、OaPACの光に依存した構造変化と機能変化を明らかにする。

(2) OaPACのC末端の光感受性調整機構の解明

酵母と培養細胞を利用して、C末端のアミノ酸の一部を置換した変異体のcAMP産生能を測定した結果、疎水性-9と疎水性-12で青色光照射時に大きな違いがあった。疎水性-9はWTとほぼ同じ活性であるのに対し、疎水性-12の活性はWTと比べて約100倍高まることがわかった。これらの変異体の違いは、疎水性-9では356番目と357番目のアミノ酸がWTと同じ親水性のアミノ酸である（セリンとグルタミン）であるのに対し、疎水性-12ではどちらのアミノ酸も疎水性であるアラニンである点である。このことから、C末端の中でもこの2つのアミノ酸の疎水度が活性に大きく影響を与えることがわかった。また、362番目の正に荷電したリジンを中性のアラニンに置換した変異体もWTより活性が約10倍高まったことから、このアミノ酸も活性にある程度の影響を与えていることがわかった。今後はこの絞り込んだ活性に重要なアミノ酸がどのように活性を制御しているのかをさらに調べる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①平野美奈子 “オプトジェネティクスツールとしての光活性化アデニル酸シクラーゼ”
浜松ホトニクス株式会社中央研究所・研究交流会 2021/5/10

②平野美奈子 “チャネル活性測定法の開発と光感受性タンパク質の研究・応用” 公益財団法人新世代研究所・2021年度第2回バイオ単分子研究会 2022/2/10

(3) 出版物
なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	藤 田 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法の開発 － γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼGGCTを標的として－	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 活性酸素 ② がん幹細胞 ③ γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT) ④ 乳がん		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
下 野 洋 平	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	研究の統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
喜 島 祐 子	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
内 海 俊 明	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
河 田 健 司	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
林 孝 典	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の分子生物学的解析
前 田 真 男	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の分子生物学的解析
渡 辺 崇	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の画像解析
ベフヌーシユ ハレディアン	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	助 教	検体の分子生物学的解析
平 田 宗 嗣	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の収集および解析

がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法の開発 ー γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ GGCT を標的としてー

1. 研究の目的

乳がん組織中に存在する「がん幹細胞」は、幹細胞としての自己複製能と並外れた腫瘍形成能力をあわせもつ特殊ながん細胞であり、がんの発生、進展、転移に中心的な役割をはたす。本研究では、乳がん幹細胞で発現上昇しているがん遺伝子「 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)」に着目して、その乳がん幹細胞における働き、がん進展における役割、および臨床的特性との関連を統合的に解析する。治療標的としての GGCT の意義を明らかにすることで、がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法を実現するための基盤データを得る。

2. 研究の計画

本年度は、GGCT ががん幹細胞性の制御に働く分子機構、GGCT による脂質代謝制御機構、がん転移における GGCT の役割を解明するため、乳がん患者検体、乳がん異種移植マウス腫瘍 (PDX)、およびがん細胞株を用いた解析を行う。

(1) GGCT 変異体を活用したがん幹細胞性制御機構の解析

① GGCTの酵素活性とがん幹細胞性制御能との関連

酵素活性部位に変異を導入した酵素活性喪失変異型GGCTを作製する。GGCTの γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ活性の喪失をその代謝産物の吸光度測定により確認する。つぎに、GGCT発現のノックダウン（発現抑制）により低下した乳がん細胞のオルガノイド形成能やスフェロイド形成能を、野生型あるいは酵素活性喪失変異型GGCTの追加導入が回復させる能力を解析する（レスキュー実験）。

② GGCTが制御するがん幹細胞関連シグナルや標的分子の解析

GGCTノックダウン細胞を用いて次世代シーケンサー解析を行い、がん幹細胞性の制御に関わるシグナルや標的分子を同定する。

③ GGCT抑制による抗がん剤感受性の解析

GGCTノックダウン乳がん細胞株の三次元培養を行い、GGCTの発現抑制が各種抗がん剤の感受性に及ぼす影響を解析する。

(2) GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構の解析

① GGCTによる乳がん細胞の脂質代謝制御機構の解析

脂質代謝は核酸代謝などと同様ながん細胞の基本骨格の供給に関わり、細胞活性を維持するエネルギー産生やシグナル伝達にも重要である。上述の次世代シーケンサー解析にてGGCTが脂質代謝酵素の発現を制御する可能性を見出した。そこで、脂質代謝酵素発現のGGCT依存性と、三次元培養した乳がん細胞に対する脂質代謝阻害剤の効果を解析する。

(3) GGCT による腫瘍形成能の解析

① GGCT発現阻害による腫瘍形成および転移の抑制効果

がん幹細胞は腫瘍の形成のみならず転移巣の形成にも中心的な役割をもつ。本研究では、GGCTの発現を抑制した乳がん細胞株や、遠隔臓器への潜在的な微小転移が観察可能な乳がんPDX腫瘍 (Yanagi H, Shimono Y, Cancer Science, 2020ほか) をマウスに移植することで、GGCTノックダウンが腫瘍形成能や乳がん細胞の転移能に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の成果

(1) GGCT 変異体を活用したがん幹細胞性制御機構の解析

① GGCTの酵素活性とがん幹細胞性制御能との関連

今回作製した GGCT 変異体は酵素活性を完全に喪失していた。つぎに、shGGCT 発現ウイルスにて GGCT の発現をノックダウンした乳がん細胞に、野生型あるいは酵素活性喪失変異型 GGCT を再発現させるレスキュー実験を行った。野生型あるいは酵素活性喪失変異型 GGCT はともに、GGCT 発現をノックダウンした乳がん細胞のオルガノイド形成能やスフェロイド形成能を回復させた。GGCT には酵素活性に依存しないがん幹細胞性の亢進能があることは、前年度の乳がん患者検体の解析から考察される結果とも一致する。

② GGCT が制御するがん幹細胞関連シグナルや標的分子の解析

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、GGCT ノックダウンによりがん幹細胞遺伝子 CD44 や BMI1 (ポリコム群遺伝子) に加え脂質代謝酵素の発現も低下することを見出した。

③ **GGCT 抑制による抗がん剤感受性の解析**

GGCT ノックダウンによりシスプラチンに対する乳がんオルガノイドの感受性が高まったため、引き続き検討を行っている。

(2) **GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構の解析**

① **GGCT による乳がん細胞の脂質代謝制御機構の解析**

GGCT ノックダウンおよび GGCT の特異的阻害剤 (Pro-GA) により乳がん細胞における脂質代謝酵素の転写およびタンパク質発現が抑制された。また、脂質代謝酵素の阻害剤は乳がん PDX 細胞のオルガノイド形成能を有意に抑制した。

(3) **GGCT による腫瘍形成能の解析**

① **GGCT 発現阻害による腫瘍形成および転移の抑制効果**

乳がん細胞株を移植したマウスの自然転移は GGCT ノックダウンにより顕著に抑制された。そこで、乳がん PDX 細胞を異種移植したマウスを用いてがんの遠隔転移の解析を行ったが、GGCT ノックダウンによる転移抑制効果は明らかではなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) **脂質代謝によるがん幹細胞性制御機構**

がん細胞では、ATP 産生経路や脂質・核酸合成、アミノ酸代謝などの細胞内代謝の変化がおこり、がん化が誘導される (代謝リプログラミング)。さらに、がん組織を構成するがん細胞は不均一であり (がんの不均一性)、例えば、がん幹細胞の糖代謝制御機構は他のがん細胞と異なるが、がん幹細胞を特徴づける脂質代謝機構は依然明らかではない。本研究では、乳がん幹細胞の制御因子として解析を続けてきた GGCT が脂質代謝制御に関わるという新知見を踏まえ、GGCT による「脂質代謝とがん幹細胞」の研究をテーマとして引き続き解析を続ける。

(2) **GGCTの酵素活性非依存性がん幹細胞制御機構**

GGCTはγ-グルタミルシクロ転移酵素活性をもち、グルタチオン生合成を介して細胞内の活性酸素種の除去を行う。活性酸素種の除去能はがん幹細胞性に関わる重要な因子であることから、当初はGGCTの酵素活性ががん幹細胞性の制御に重要であるという想定で研究を立案した。本研究を通じてGGCTのがんおよびがん幹細胞性の促進機構には、酵素活性非依存性の働きも重要である可能性が明らかになった。今後、GGCTの結合タンパク質の解析などを進めることでGGCTの未知の機能の解明を目指す。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Mizuno M, Khaledian B, Maeda M, Hayashi T, Mizuno S, Munetsuna E, Watanabe T, Kono S, Okada S, Suzuki M, Takao S, Minami H, Asai N, Sugiyama F, Takahashi S, Shimono Y. Adipsin-Dependent Secretion of Hepatocyte Growth Factor Regulates the Adipocyte-Cancer Stem Cell Interaction. *Cancers*. 2021;13(16):e4238. doi: 10.3390/cancers13164238.
- ② Ishihara S, Sasagawa Y, Kameda T, Yamashita H, Umeda M, Kotomura N, Abe M, Shimono Y, Nikaido I. Local states of chromatin compaction at transcription start sites control transcription levels. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(14):8007-8023. doi: 10.1093/nar/gkab587.
- ③ Hisamori S, Mukohyama J, Koul S, Hayashi T, Rothenberg ME, Maeda M, Isobe T, Valencia Salazar LE, Qian X, Johnston DM, Qian D, Lao K, Asai N, Kakeji Y, Gennarino VA, Sahoo D, Dalerba P, Shimono Y. Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells. *J Gastroenterology*. 2022. doi: 10.1007/s00535-022-01865-9.

(2) 口頭発表

- ① Shimono Y, Yanagi H, Watanabe T, Nishimura T, Hayashi T, Okada S, Suzuki M, Kawada K, Minami H, Gotoh N. Role of S100A10 in the metastatic colonization of breast cancer stem cells. AACR Virtual Annual Meeting 2021、2021年
- ② Shimono Y, Nishimura T, Kono S, Shibuya N, Yanagi H, Hayashi T, Watanabe T, Maeda M, Kakeji Y, Kawada K, Asai N, Takao S, Minami H, Kijima Y, Suzuki M, Gotoh N. Application of organoids to breast cancer research. 第80回日本癌学会学術総会 (コアシンポジウム)、2021年

次世代高容量Liイオン電池実現に向けた 新規ナノ複合材料の創製

1. 研究の目的

本研究の目的は、従来のカーボン材料を大きく凌駕するリチウム(Li)イオン電池電極材に適した物性値を有するナノ複合負極膜を新規プロセスで実現し、次世代高容量Liイオン電池をブレークスルーすることにある。1回の充電で500 km以上の長距離走行を可能とする電気自動車の本格的な普及には、現行の2倍以上のエネルギー密度を有する革新的Liイオン電池の開発が必要不可欠であり、電極材料の高容量化は最優先研究課題である。IV族半導体のシリコン材料(Si)は、 $\text{Li}_{4.4}\text{Si}$ の合金を形成しLiを4個以上吸蔵することができるため、従来のカーボン(グラファイト)負極容量372 mAh/gの10倍以上の高容量化が可能である。しかしながらSiは、Liイオン取込時の体積膨張率が420%とカーボンの112%に比べ極めて高く、充電と放電の繰り返しにより、合金が微粉化し、そのため寿命が極めて短いという課題がある。このような課題に対し、本研究では、カーボンナノ材料を基軸に、高容量化が期待できるSiナノ材料を複合化することにより、Liイオン電池の高容量化と長寿命化を両立できる新規ナノ複合負極膜を開発することを研究目的とする。

2. 研究の計画

本研究では、ナノ材料膜の探索と電池デバイスの実証を研究の2つの柱として実験を計画した。特にナノ材料膜の探索に関しては、電池電極材への展開を視野に入れ、以下の2つのナノ複合材料を創製する。

- (1) 高密度Siナノ粒子含有カーボンナノウォールの合成(図1(a)参照) 本研究グループで開発した独自のプラズマプロセスで作製する超高密度カーボンナノウォール材料(グラフェンが基板の垂直方向に自立した構造)は高い比表面積を有している。カーボンナノウォールとSiナノ粒子を組み合わせた新たなカーボン/Siナノ複合材料を新規プラズマプロセスで創製する。
- (2) Siナノ粒子接合カーボン複合負極膜の創製(図1(b)参照) 高容量が期待できるSiナノ粒子間を、プラズマで生成した分子サイズの活性ラジカルで強力に接合し、さらにカーボン系材料と複合化した新規負極膜を創製する。

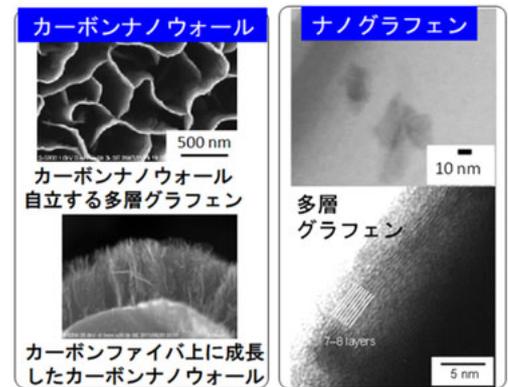
Liイオン電池デバイスの実証に関しては、従来の電池容量の2倍以上の1,500 mAh/gの高容量化と充放電100サイクル以上の高安定駆動を実証する。

3. 研究の成果

研究計画(3年)の2年目となる本年度は、主に上記(2)のSiナノ粒子接合カーボン複合負極膜の創製研究を中心に取り組み、以下の研究成果を得た。

- (1) カーボン/Siナノ複合膜を負極とするLiイオン電池の実証

本研究では、バインダー無しの活物質のみで構成されるカーボン/Siナノ複合膜を独自の高压プラズマスパッタドライプロセスを開発することにより実現した。図2に直径14 μm の球晶カーボン微粒子をバインダーと混合してスラリー化して、通常の塗布と焼成プロセスで作製したカー



本研究：Liイオン電池用カーボン複合電極材料の創成

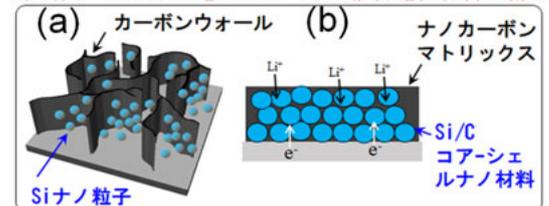


図1：カーボンナノ材料をSi材料と複合化し、Liイオン電池の高容量化と長寿命化を実現する

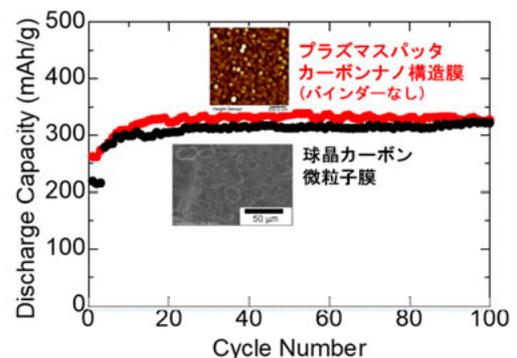


図2：プラズマスパッタドライプロセスで作製したバインダー無しのCナノ粒子負極膜のLiイオン電池の充放電サイクル特性

ボン負極膜の Li イオン電池と、今回我々が開発した高圧プラズマスパッタドライプロセスで作製した平均粒径 51 nm のカーボン(グラファイト)ナノ粒子で構成されるカーボン負極膜の Li イオン電池の充放電サイクル特性を示す。両電池ではほぼ同等な良好なサイクル特性が得られた。100 サイクル後、従来型の球晶カーボン負極電池で 321 mAh/g、バインダー無しのカーボンナノ粒子負極電池で 326 mAh/g の値となり、バインダー無しのカーボンナノ粒子負極膜で従来球晶カーボン負極膜と同等の値を得た。

同様の高圧プラズマスパッタドライプロセスで、バインダー無しの Si ナノ粒子負極膜電池を試作し評価した。図 3(a)に作製した Si 負極膜の SEM 写真を示す。Si ターゲットを用いた He ガス 100 mTorr スパッタで、平均粒径 60 nm の Si 結晶ナノ粒子負極膜を、また、スパッタ条件を探索し SiSn(6%)ターゲットを用いた Ar ガス 100 mTorr スパッタで、平均粒径 202 nm の Si アモルファスナノ粒子負極膜を作製した。このように Si ナノ材料の粒径以外にも、結晶、アモルファスなどの材料の結晶性を簡易な加熱無しのシングルステッププロセスで制御できる点が、開発したドライプロセスの大きな利点である。図 3(b)にそれぞれの Li イオン電池の充放電サイクル特性を示す。結晶、アモルファスの両電池ではほぼ同等の高容量が得られ、50 サイクル後、Si 結晶ナノ粒子負極膜で 714 mAh/g、SiSn アモルファスナノ粒子負極膜で 784 mAh/g となった。

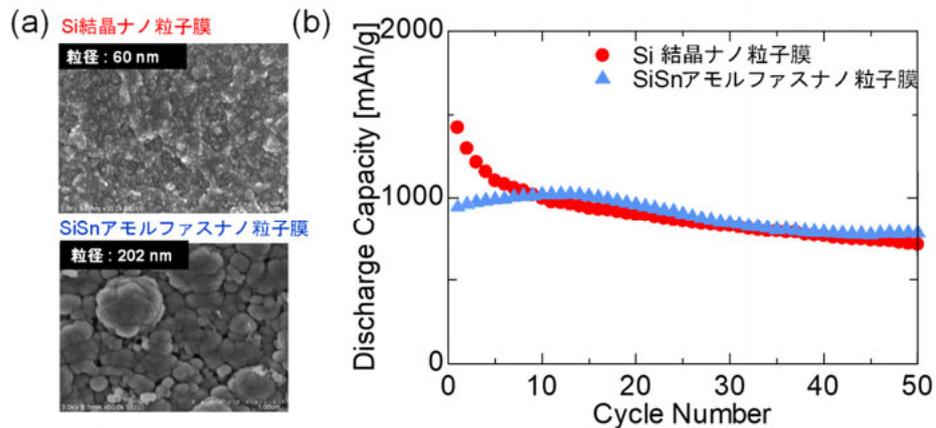


図 3: 高圧プラズマスパッタドライプロセスで作製したバインダー無しの Si ナノ粒子負極膜の (a) SEM 写真と (b) Li イオン電池の充放電サイクル特性

次に開発したドライプロセスを用いて図2、図3で示したカーボン(グラファイト)ナノ粒子膜と Si ナノ結晶膜を連続的に積層した新たなカーボン/Si ナノ複合負極膜を作製し Li イオン電池特性を評価した。図 4(a)に積層負極膜の断面 SEM 写真を示す。充電時の Si 材料の体積膨張による集電体からの剥離を防止するために、最下層にカーボンナノ粒子層を配置した。また、最上部にも同様にカーボンナノ粒子層を配置し、Si の体積膨張を上方向から抑制するとともに、有機電解液とカーボン層との反応により安定した SEI 層を形成することを意図した。図 4(b)に Li イオン電池の充放電曲線(電圧-容量曲線)を示す。初期 6 サイクルまでの結果であるが、放電容量の大きな低下は観測されず、1,890 mAh/g の高容量を維持する良好な結果が得られた。

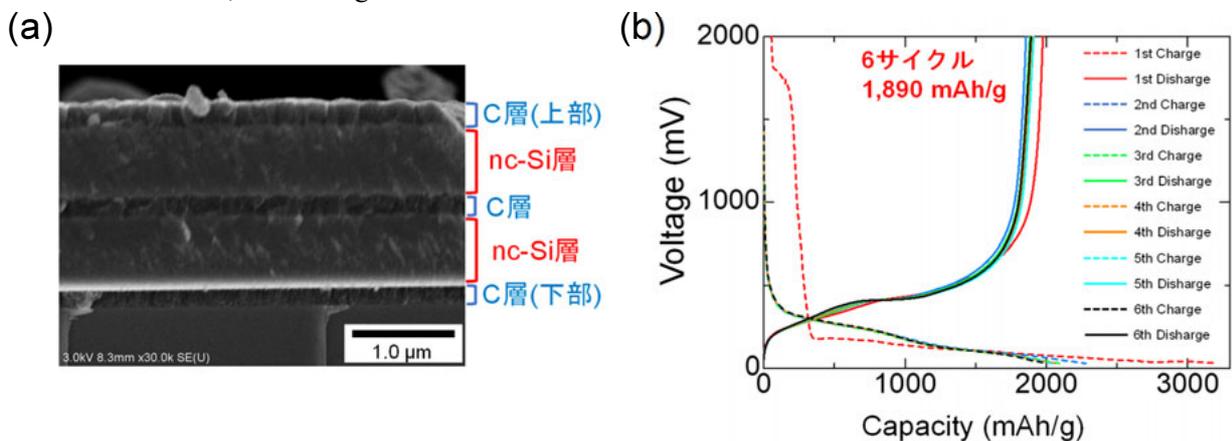


図 4: 高圧プラズマスパッタドライプロセスで作製したバインダー無しのカーボン/Si ナノ複合負極膜の (a) SEM 写真と (b) Li イオン電池の充放電曲線(電圧-容量曲線)

(2) カーボン、Si 以外の負極材料への応用展開

本研究で開発した高圧プラズマスパッタドライプロセスを、上記に結果を示したカーボンや Si 以外の材料へと応用展開した。Si と同じ IV 族半導体で、理論容量が 1,670 mAh/g と従来カーボンに比べ約 5 倍高い Ge 系材料に着目した。図 5(a) に Ge ナノ粒子膜の表面と断面 SEM 写真を示す。作製する基板の位置を中心($r = 0$)と中心から 30 mm($r = 30$ mm)の位置に設置して、電極膜を作製した。その結果、中心位置では平均粒径 100 nm のナノ粒子膜が、また、中心から 30 mm の位置では 30-40 nm のナノ粒子負極膜が作製でき、一回の合成プロセスで粒径が異なるナノ粒子材料を生成、制御できた。また電極膜の多孔度を導出したところ約 30%と高く、断面写真からも空隙 (pore) の多いナノポーラス構造となっていることが明らかになった。図 5(b) に粒径 30-40 nm の Ge、GeSn ナノ粒子負極膜をもつ Li イオン電池の充放電サイクル特性を示す。特に GeSn ナノ粒子負極膜で高い容量が得られ 60 サイクル後、1,128 mAh/g となった。今回、新たに開発したドライプロセスで作製したバインダー無しの GeSn ナノ粒子負極膜で、1,000 mAh/g 以上の高容量を達成した。

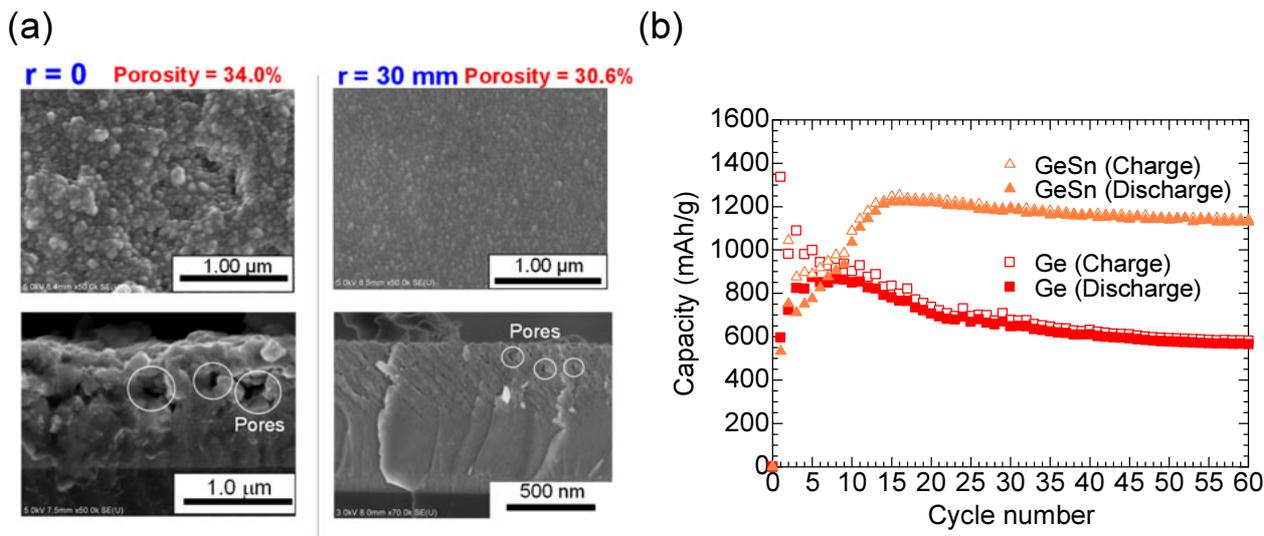


図 5: 高圧プラズマスパッタドライプロセスで作製したバインダー無しの Ge ナノ粒子負極膜の (a) SEM 写真と (b) Li イオン電池の充放電サイクル特性

4. 研究の反省・考察

本研究では、負極膜作製に関して、焼成などの従来の長時間プロセスを使用しない新規ドライプロセスを開発し、バインダー無しのカーボン/Si ナノ複合負極膜の作製と Li イオン電池の特性評価を行った。高速ナノ粒子膜堆積のためのドライプロセスとして、従来のプラズマスパッタプロセスより 1~2 桁圧力の高い高圧プラズマスパッタリングを開発し、ガス種、スパッタターゲット材料などを実験的に探索した。その結果、本ドライプロセスを用いた簡易なシングルステッププロセスで、ナノ粒径と結晶性を精密に制御したバインダー無しのナノ材料負極膜の作製に成功した。その作製したナノ粒子負極膜を用いて Li イオン電池を試作し評価した結果、カーボン(グラファイト)ナノ粒子膜で 326 mAh/g(100 サイクル)、Si ナノ粒子膜で 714~780 mAh/g(50 サイクル)、カーボン/Si ナノ複合負極膜で 1,890 mAh/g(3 サイクル)と良好な値を得た。また、本ドライプロセスを Ge 系材料にも展開し、GeSn ナノ粒子負極膜の Li イオン電池で 1,128 mAh/g(60 サイクル)の高容量を達成した。本研究のまとめとして、焼成などの長時間プロセスを使用しないナノ負極膜作製のための新規ドライプロセスを開発するとともに、作製したバインダー無しのナノ粒子負極膜を有する Li イオン電池で、目標値に迫る 1,000 mAh/g 以上、60 サイクル維持に成功した。今回開発したドライプロセスは、他の材料にも広く適用可能であることから、今後は固体電解質ナノ材料合成にも応用展開し、ナノ粒子負極膜と組み合わせた次世代の高容量全固体 Li イオン電池の実現を目指し、研究を推進していく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① G. Uchida, K. Nagai, Y. Habu, J. Hayashi, Y. Ikebe, M. Hiramatsu, R. Narishige, N. Itagaki, M. Shiratani, Y. Setsuhara “Nanostructured Ge and GeSn films by high-pressure He plasma sputtering for high-capacity Li ion battery anodes”, Scientific Reports Vol. 2, pp. 1742-1 – 1742-10 (2022). **【査読有り】**
- ② J. Hayashi, K. Nagai, Y. Habu, Y. Ikebe, M. Hiramatsu, R. Narishige, N. Itagaki, M. Shiratani, Y. Setsuhara, G. Uchida, “Morphological control of nanostructured Ge films in high Ar-gas-pressure plasma sputtering process for Li ion batteries”, Japanese Journal of Applied Physics Vol. 61, pp. SA1002-1 – SA1002-7 (2021). **【査読あり】**
- ③ Y. Sakai, K. Takeda, M. Hiramatsu, “Graphene growth in microwave-excited atmospheric pressure remote plasma enhanced chemical vapor deposition”, Jpn. J. Appl. Phys. 61, SA1018 (2022). **【査読有り】**

(2) 口頭発表

- ① 羽生侑真、林純希、永井健太、木賀海晴、山田輝也、内田儀一郎「全固体Liイオン電池のためのスパッタLiPON薄膜のイオン導電率測定」第82回応用物理学会秋期学術講演会、2021年9月10～13日、オンライン。
- ② 林純希、永井健太、羽生侑真、木賀海晴、山田輝也、内田儀一郎「全固体Liイオン電池のためのプラズマスパッタリングLiAlGePO電解質膜の開発」第82回応用物理学会秋期学術講演会、2021年9月10～13日、オンライン。
- ③ 永井健太、若菜文佳、林純希、羽生侑真、木賀海晴、山田輝也、内田儀一郎「プラズマスパッタリング法を用いたGeSn薄膜ナノ構造制御とLiイオン電池への応用」第82回応用物理学会秋期学術講演会、2021年9月10～13日、オンライン。
- ④ 山田輝也、羽生侑真、林純希、永井健太、木賀海晴、内田儀一郎「スパッタリングSi系ナノ構造薄膜を負極としたLiイオン電池の特性評価」第82回応用物理学会秋期学術講演会、2021年9月9～13日、オンライン。
- ⑤ 木賀海晴、羽生侑真、林純希、永井健太、山田輝也、内田儀一郎「プラズマスパッタリング法を用いたLiTiOナノ構造膜の堆積とLiイオン電池負極への応用研究」第82回応用物理学会秋期学術講演会、2021年9月10～13日、オンライン。
- ⑥ 羽生侑真、林純希、永井健太、木賀海晴、山田輝也、内田儀一郎「全固体Liイオン電池のためのスパッタLiPON薄膜のイオン導電率制御」SPP39/SPSM34、2022年1月24～26日、オンライン。
- ⑦ 林純希、永井健太、羽生侑真、木賀海晴、山田輝也、内田儀一郎「全固体Liイオン電池のためのプラズマスパッタリングLiAlGePO電解質膜の組成制御」SPP39/SPSM34、2022年1月24～26日、オンライン。
- ⑧ 永井健太、若菜文佳、花井稜、林純希、羽生侑真、内田儀一郎「sub-Torrプラズマスパッタリングを用いたGe薄膜のナノ構造制御とLiイオン電池アノードへの応用」SPP39/SPSM34、2022年1月24～26日、オンライン。
- ⑨ 内田儀一郎、林純希、永井健太、羽生侑真、木賀海晴、山田輝也「全固体Liイオン電池のためのプラズマスパッタリングLiAlGePO電解質膜のイオン導電率測定」第69回応用物理学会春期学術講演会、2022年3月22～13日、オンライン。
- ⑩ G. Uchida, “Fabrication of nanostructured GeSn films by using plasma sputtering process for Li ion battery anode”, INTERFINISH2020, 2021年9月6～8日、on-line.
- ⑪ 内田儀一郎「Sub-Torr プラズマプロセスによる Ge ナノ構造膜制御と高容量 Li イオン電池への応用」第37回九州・山口プラズマ研究会、2021年11月6日、佐世保。
- ⑫ 内田儀一郎、池田純一郎、竹中弘祐、節原裕一「大気圧低温プラズマジェット照射溶液によるがん細胞殺傷に関する研究」スマートプロセス学会 2021年度学術講演会、2021年11月15日、オンライン。
【招待講演】
- ⑬ G. Uchida, K. Nagai, A. Wakana, R. Hanai, J. Hayashi, Y. Habu “Fabrication of Ge nanostructured films by high-pressure plasma sputtering for high-capacity Li ion battery electrode”, APSPT-12, 2021年12月9～11日、オンライン。**【招待講演】**
- ⑭ G. Uchida, K. Nagai, J. Hayashi, Y. Habu “Nanostructured Ge films by high-pressure plasma sputtering for high-capacity Li ion battery anode”, MRM2021, 2021年12月13～16日、横浜。
- ⑮ 内田儀一郎「プラズマ生成ナノ粒子を用いた2次電池応用」令和3年度東北大学電気通信研究所共同研究プロジェクト研究会 物理・化学混成系プラズマにおける情報系機能発現、2022年2月12日、オンライン。

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	京 都 外 国 語 大 学	研究所名等	京 都 外 国 語 大 学 ラテンアメリカ研究所
研 究 課 題	中米の古代パンアメリカンハイウェイがつなぐ南北交流の研究 —交流の道・足・物を考古学から読み解き地域社会へ還元する—	研究分野	文 学
キ ー ワ ー ド	①中間領域、②先住民文化、③南北交流、④コミュニティミュージアム、⑤内発的開発、⑥岩刻画、⑦地域活性化		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 博 史	国 際 貢 献 学 部 京 都 外 国 語 大 学 ラテンアメリカ研究所	教 授 員 研 究 員	研究代表者、研究統括、考古学調査・分析、フィールドミュージアム構想の提案・実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
市 川 彰	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 名古屋大学人類文化遺産アクト学 研究センター	客員研究員 研究員	考古学資料分析(とくにメソアメリカ太平洋側土器との比較研究)、生業研究(製塩など)
嘉 幡 茂	国際言語平和研究所	嘱託研究員	研究副代表者、考古学調査・資料分析(小原豊雲コレクション土器)、金属製品の比較研究
柴 田 潮 音	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 エルサルバドル文化省 文化自然遺産局考古課	客員研究員 顧問	考古学調査・資料分析(とくに石彫、岩刻画などの比較研究)
村 野 正 景	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 京都文化博物館学芸課	客員研究員 学芸員	考古学資料分析(とくにニカラガ中央部土器との比較研究)、土器の移動、製作技法の研究 博物館活動の実施
ミリアム メンデス	La Dirección de Arqueología, Ministerio de Cultula	Apoyo Técnico	タマニケ地方サンシドロ地区考古学調査 コミュニティ・ミュージアム活動の実施
フランシスコ コラレス	Arqueología en el Museo Nacional de Costa Rica	Antropólogo	オサ半島地方カンタレロ遺跡考古学調査 ガジャルド村コミュニティ・ミュージアム活動の実施
フリエタ・マルガリータ＝ロペス・フアレス	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所	客員研究員	考古学資料分析(とくに土器の科学分析) 国内資料調査

中米の古代パンアメリカンハイウェイがつなぐ南北交流の研究 — 交流の道・足・物を考古学から読み解き地域社会へ還元する —

1. 研究の目的

(1) 中間地域とされてきた中米地域の太平洋側が、「古代パンアメリカンハイウェイ」（古代メソアメリカ文明と古代アンデス文明を結ぶ道）であったという仮説を「道→何のために＝地域事情」、「足→どのように＝方法」、「物→何を＝運ばれるもの」の考古学研究から実証する。

①「道→何のために＝目的」に向けた調査

エルサルバドルタマニケ地方サンイシドロ地区、およびチャルチュアパ地方カサブランカ遺跡、コスタリカのオサ半島カンタレロ遺跡において、現地研究機関の考古学調査に協働し、当該遺跡の各地域における歴史的文化的な位置づけを明らかにし、土器の移動を中心に研究を試みる。

②「足→どのように＝方法」に向けた調査

ヒスイと金製品は両文明の威信財として運ばれており、コスタリカ国立博物館、ヒスイ博物館と協働してその再現に取り組む。とくに砂金の産出地にあるカンタレロ遺跡の考古学調査によって関連資料の収集を目指す。

③「物→何を＝運ばれるもの」に向けた調査

土器、土偶、金、ヒスイ、石彫を対象とする遺物研究。とくに小原コレクションのコスタリカおよびエクアドルの土器と土偶を用いて、他地域との比較研究を行う。

なお、新型コロナウイルス感染拡大に伴う海外調査の実施が困難な状況にあっても、寄贈を受けた「小原豊雲コレクション」のコスタリカ、エクアドルの土器・土偶の実証的研究を学内にて継続的に実施できる。これによって現地資料との比較研究が可能となる。

(2) コミュニティ住民を主体とする文化資産を活用した地域活性化活動（コミュニティ・ミュージアム活動と定義）に参画し、研究の成果を還元した地域の持続可能な開発に貢献するワールドミュージアムマネジメント活動を実施する。

①ガジャルド村住民への考古学調査成果の報告およびコミュニティミュージアムに向けて住民の意識調査

②タマニケ地方サンイシドロのコミュニティミュージアム展示施設での博物館活動を行い、住民との意見交換会の実施。

2. 研究の計画

(1) 国内調査（国際文化資料館）

①コスタリカ、エクアドル遺物調査：研究代表者、研究分担者（嘉幡茂）

活動：昨年度リストアップした小原コレクションの精査

②小原コレクション写真撮影

活動：精密写真の撮影：研究代表者、研究分担者（嘉幡）、研究協力者

(2) 海外調査Ⅰ期【2021年8-9月】

①エルサルバドル：2週間程度／代表者、研究分担者（ミリアム・メンデス）、研究協力者

調査地：タマニケ地方サンイシドロ地区

活動：2019年2月に実施した地形図をもとに、遺跡情報を加えた遺跡分布図を作成。地区住民の協力の元、準備をはじめた遺跡ガイドンスルールの整備をすすめる。

②エルサルバドル：1週間程度／研究分担者（柴田潮音、村野正景、市川彰）

調査地：チャルチュアパ地区カサブランカ遺跡公園

活動：出土遺物の再検討、遺物カード、データベースの作成、遺跡公園博物館を利用したコミュニティとの交流活動

③コスタリカ：1週間／代表者、研究分担者（フランシスコ・コラレス、嘉幡）、研究協力者

調査地：オサ半島カンタレロ遺跡

活動：遺跡の精密測量、表面踏査を行い次期の試掘調査に向けた準備を行う。ガジャルド村にて報告会およびワークショップ

(3) 海外調査Ⅱ期【2022年2-3月】

①エルサルバドル：1週間程度／代表者、研究分担者（柴田、村野、市川）、研究協力者

調査地：チャルチュアパ地区カサブランカ遺跡公園

活動：出土遺物の再検討、遺物カード、データベースの作成、コミュニティ交流活動

②ニカラグア：1週間程度／代表者、研究分担者（嘉幡）、研究協力者

調査地：ニカラグア国立博物館

活動：ニカラグア国立博物館から協力願いのあった収蔵品の登録作業に協働し、必要とする資料の遺物カード、データベースを作成

③コスタリカ：2週間程度／代表者、研究分担者（コラレス）、研究協力者

調査地：オサ半島カンタレロ遺跡

活動：試掘を行う。土器編年資料などの回収。ガジャルド村にて報告会・ワークショップ

3. 研究の成果

(1) 国内調査

①小原コレクションの記録化作業

コスタリカ、エクアドルの考古資料の確認作業に引き続き、隣接地域の考古学資料の確認作業を行った。約500点を対象に順次資料の記録作業を開始した。

②国際文化資料館デジタルミュージアム公開に向けての作業

新型コロナウイルス禍の中、国際文化資料館では小原コレクション遺物の調査を踏まえて、学術的な分析・評価を行った上で（研究協力者：南山大学人類学研究所非常勤研究員佐藤吉文）3D撮影を行い（嘉幡）、デジタルミュージアムとして公開を開始した。

(2) 海外調査

昨年度に引き続き、今年度も新型コロナウイルス感染拡大のため、予定していた海外調査は実施できなかった。海外研究協力者も自国の行動制限により調査を実施できなかった。

カリブ海側ウルワにおいて、歴史地理学からフィールドワークを実施している横浜国立大学池口明子氏より、岩刻画調査の成果について放送大学（6月放送予定）での講義に使用したいという要望があり、研究協力者の深谷岬（京都外国語大学博士課程後期）が出演した。

(3) フィールドミュージアム研究

①ニカラグアのカリブ海側およびエルサルバドル太平洋側での考古学と博物館を仲介者とした実践的地域研究については、海外調査が実施できず、現地コミュニティとの活動は停止している状況である。一方、コスタリカのオサ半島ガジャルド村では、研究分担者フランシスコ・コラレス（コスタリカ国立博物館）が、現地とのコミュニケーションを継続し、早期の調査再開に向け準備を進めている。

②ニカラグアのキラグア山西麓ティエラブランカを中心としたフィールドミュージアム活動については、考古学調査を含め現地調査再開に向けて、マティグアス市内の拠点を中心として、ニカラグア国立自治大学出身の考古学者の協力のもと現地情報の収集につとめている。

4. 研究の反省・考察

(1) 小原コレクションの研究

京都外国語大学国際文化資料館収蔵資料調査は、新型コロナウイルス感染拡大により作業が制限されたため大幅に遅れている。一方、国際文化資料館VRミュージアムの公開が始まっており（<https://www.kufs.ac.jp/umc/index.html>）、これに協働しながら2022年度以降も作業を継続する。

(2) 岩刻画の研究

今年度現地調査は実施できなかったが、エルサルバドルの岩刻画を集成した資料集を個人から預かることができたのでこれらに掲載されている事例の分析を開始した。

マタガルパ県マティグアス郡ラスベガス遺跡出土遺物の研究から、カリブ海側との交流の可能性について指摘してきた。一方、エルサルバドル側の資料の提供を受けたことで、太平洋側、とくにエルサルバドル方面など、カリブ海側以外と内陸部の交流の解明を目指したい。

(3) フィールドミュージアム研究

ニカラグアカリブ海自治区大学、エルサルバドル文化省文化自然遺産局、コスタリカ国立博物館それぞれの研究分担者・協力者を通して、現地の様子などを確認しているが、現地もまた行動が制限されているため十分なやりとりはできていない。Withコロナを考えオンラインでの調査、交流方法も考えたが、エルサルバドル太平洋側やニカラグアのカリブ海側では現地インフラの問題もあって実現できていない。コスタリカについては研究分担

者が準備を進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

南博史「中米における博物館活動の現状と課題～エルサルバドル、ニカラグア、コスタリカを中心に～」、文化遺産国際協力コンソーシアム第16回中南米分科会、2021年7月29日、東京国立文化財研究所

(3) 出版物

南博史「考古学・歴史学の立場からの活かし方」松本茂文編著『ヘリテージマネジメント』学芸出版社、2022年、25 - 31頁。

ダウン症候群の出生前および出生後治療法の構築 —脳免疫細胞数異常および微量金属元素量異常に着目して—

1. 研究の目的

ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体 (HSA21) が 3 本 (トリソミー) となった最も出生頻度の高い染色体異常症であり、発達遅滞や知的障害をはじめ様々な特徴を示す。DS のリスク因子としては母体の年齢増加であり、晩婚化の進む現代社会においては、DS 出生頻度の上昇が懸念されているにもかかわらず、知的障害をはじめ多くの病態メカニズムは未だ不明であり、有効な治療法はない。そこで、我々は DS の知的障害メカニズム解明と新規治療法の開発を目指して、DS モデルマウスを用いた研究を行っている。

マウス 16 番染色体 (MMU16) のテロメア側領域が HSA21 の大部分と相同であることから、現在、様々な長さの MMU16 の一部を 3 コピー有するマウスが DS モデルマウスとして使用されている。我々は、トリソミー領域に DS 知的障害との関連性が示唆されているアミロイド前駆蛋白質 *App* や活性酸素消去酵素 *Sod1* 遺伝子を含まないものの、記憶学習障害を示す Ts1Cje マウスを使用している。これまでに、Ts1Cje マウスの胎生期脳の大脳皮質での神経新生減少を明らかにしており (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*)、最近、この Ts1Cje マウス胎生期脳での神経新生減少がトリソミー遺伝子である *Erg* 遺伝子の 3 コピー化によって引き起こされること、また胎生期脳でのミクログリア数の減少や炎症亢進を明らかにした (Ishihara et al., 2020 *Brain Pathol.*)。一方、Ts1Cje マウスの成体脳において酸化ストレスが亢進していることも明らかにしており (Ishihara et al., 2009 *J. Neurochem.*)、最近この酸化ストレス亢進の原因が Ts1Cje マウス成体脳での銅蓄積であることを明らかにした (Ishihara et al., 2019 *Free Radic. Biol. Med.*)。このように、我々は Ts1Cje マウスを用いた研究から、新規 DS 治療標的を提示することに成功している。そこで、本研究課題では、Ts1Cje マウス以外の既存の DS マウスや新規に作製する DS モデルも用いて、これらの新規 DS 治療標的の可能性について検証を行う。すなわち、胎生期脳での炎症亢進やミクログリア数減少、また成体脳での銅蓄積について複数の DS モデルマウスで検証し、その責任遺伝子の絞り込みや新規治療標的に即した治療の施行による改善を試みることで、未だない DS 治療薬あるいは細胞治療法の開発に向けた基礎実験データの蓄積を行う。

2. 研究の計画

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

- ① **ミクログリア前駆細胞補充療法の検討:** Ts1Cjeマウスの胎生期での脳マクロファージ数の減少がみられたことから、脳マクロファージのどのポピュレーションが減少しているか突き止め、胎内治療を想定したミクログリア前駆細胞の胎仔脳室への移植を行い、神経新生減少の改善を検討する。

(2) 生後の治療を目指した研究

- ① **領域選択型新規DSモデルマウスの作製:** CRISPR-Cas9を利用したゲノム編集により作製した新規DSモデルマウスの染色体コピー数に関して目的の領域の染色体操作の成否に関してCGH解析により確認を行う。
- ② **複数のDSモデルマウスを用いた銅蓄積責任遺伝子の絞り込み:** 作製した領域選択型新規DSモデルマウスでの銅蓄積について検討し、Ts1Rhrマウスとの結果を合わせ、DSモデルマウスでの銅蓄積責任遺伝子の絞り込みを進める。
- ③ **Ts1Cjeマウスへの低銅食投与による脳内銅蓄積抑制効果とその意義に関する検討:** Ts1Cjeマウスあるいは項目②の絞り込みで銅蓄積が認められるモデルマウスに低銅含有食を投与し、記憶学習能の改善について明らかにする。(恐怖条件付け行動試験装置(ショックジェネレーター他)を用いた行動解析を行う。)

3. 研究の成果

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

① **ミクログリア前駆細胞補充療法の検討:** Ts1Cjeマウス胎仔脳での脳マクローファージ数の減少を見出しているが、ミクログリアや血管周囲や髄膜に介在する脳境界マクローファージ(BAMs)のどちらが減少しているかについて、FACS解析を行なった。その結果、BAMsではなく、ミクログリアの減少が明らかとなったことから(図1)、ミクログリア前駆細胞の移植を行うこととした。まず、移植の手技の確認として、胎齢14.5日目マウスの脳室へのEGFPタンパク質発現マウスES細胞の移植を行なったが、現在のところ移植され正着細胞を認めるまで至っていない。

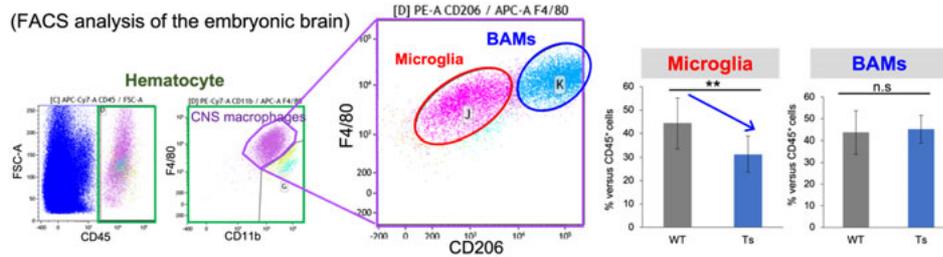


図1. Ts1Cjeマウス胎仔脳でのミクログリア数の減少

(2) 生後の治療を目指した研究

① **領域選択型新規DSモデルマウスの作製:** CRISPR-Cas9を利用したゲノム編集により作製した新規DSモデルマウスのCGH解析を行い、予想通りの染色体改変マウス(領域選択型新規DSモデルマウスおよび新規部分欠損マウス)が作製できたことを確認した(図2)。

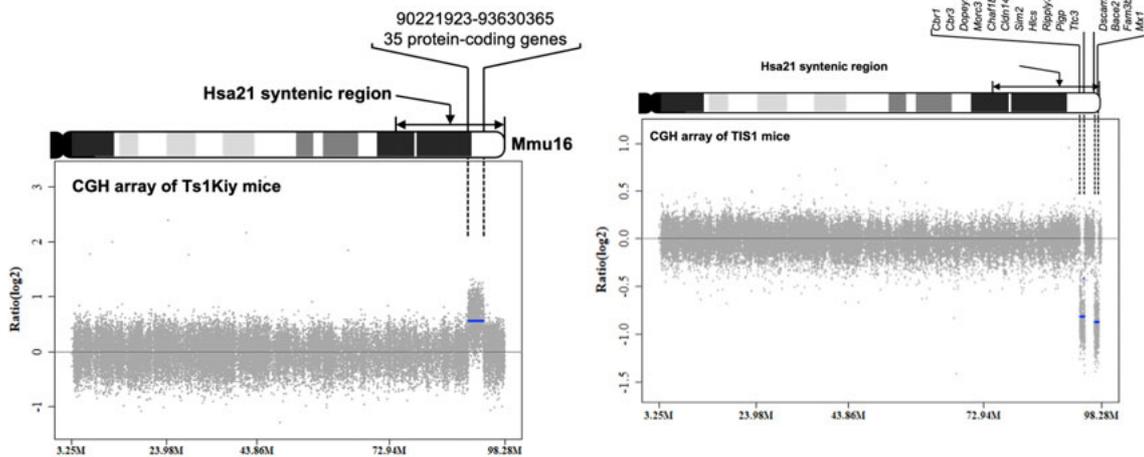


図2. CGHアレイ解析による新規DSモデルマウスのコピー数確認。一部の領域が3コピーとなった新規モデル(左)と一部の領域が1コピーとなった新規染色体改変マウス(右)

② 複数のDSモデルマウスを用いた銅蓄積責任遺伝子の絞り込み： 作製した領域選択型新規DSモデルマウスでの銅蓄積について検討した。まず、領域選択型新規DSモデルマウスは銅蓄積が認められたTs1Cjeマウスのトリソミー領域（約70遺伝子）のセントロメア側約半分の領域（約35遺伝子）が3コピーとなっており、一方既存のTs1Rhrマウスはテロメア側約半分の領域（約30遺伝子）を3コピー有する。これらマウス脳での銅蓄積についてICP-MSにて解析したところ、銅蓄積が領域選択型新規DSモデルマウスでは認められず、Ts1RhrマウスでTs1Cjeマウスと同程度認められた。そこで、新たに作成した部分欠失TIS1マウスとTs1Rhrマウスを交配させ得られるTIS1-Rhrマウス（16遺伝子が3コピー）の銅濃度を検証したところ、このマウスでも銅の蓄積が検出された（図3）。以上の結果より、銅蓄積遺伝子座を70遺伝子領域から16遺伝子領域にまで絞り込むことができた。

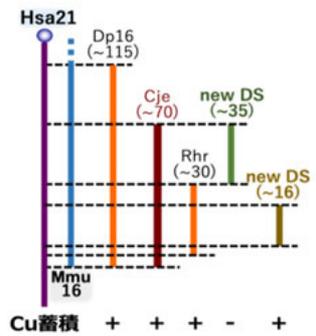


図 3. 新規マウスでの銅蓄積とその3コピー領域

③ Ts1Cjeマウスへの低銅食投与による脳内銅蓄積抑制効果とその意義に関する検討： Ts1Cjeマウスあるいは項目②の絞り込みで銅蓄積が認められるモデルマウスに低銅含有食を投与し、記憶学習能について検討した。記憶学習評価には、恐怖条件付け行動試験を行い、Mac mini (Apple, Z12P)にて解析を行なった。その結果、図4に示したように、銅蓄積と関連した記憶学習障害を検出した。これらの結果は、銅蓄積がDSモデルマウスでの記憶障害に関与している可能性を示すものである。

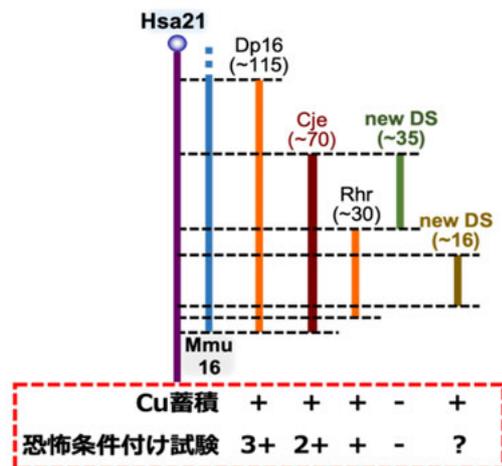


図 4. 新規マウスでの銅蓄積と情動記憶障害。恐怖条件付け試験における+は障害が認められたことを示す。

4. 研究の反省・考察

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

DSの胎生期での治療の実現化を目指し、胎内治療の意義を示すために、我々はTs1Cjeマウスの胎仔脳での脳内マクロファージ減少を見出しているが、今年度、BAMsのマーカー分子を用いたフローサイトメトリー解析にて、Ts1Cjeマウスの胎仔脳でのミクログリア数の減少を明らかにした。このことから、当初の計画通り、ミクログリア前駆細胞の移植による胎内治療の検証を行う方針で行うことに決定した。胎仔脳室への移植に関しては、すぐに達成できると考えていたが、使用する毛細管の径や先端の形状など、非常に条件設定が難しいことが分かった。現在、色々な条件を検討し、脳室への移植後に胎仔が死亡しない条件までは設定できたが、移植細胞の生着が認められる個体はまだ得られていないことが反省点である。

(2) 生後の治療を目指した研究

今年度の研究によって、生後脳の銅蓄積の責任遺伝子をTs1Cjeトリソミー領域の70遺伝子から16遺伝子に絞り込むことができた。これらの遺伝子のなかに銅濃度を規定する可能性のある遺伝子としては、唯一Dscr3遺伝子が挙げられた。この遺伝子は、初期エンドソームの関連分子であり、初期エンドソームが銅トランスポーターの膜発現の調節を行なっていることが示唆されていることから、本遺伝子に注目するに至った。今後は、Dscr3のみが正常の2コピーとなったDSモデルマウスを作製し、銅蓄積について検証する予定である。

情動記憶障害に関しては、銅蓄積と相関性が認められるような結果が得られた。しかし、

低銅含有食によって銅蓄積を改善したDSモデルマウスの検討では、低銅含有食によってむしろ脳内の銅濃度が低下したことから、野生型マウスの情動記憶の低下が認められる問題が生じた。今後は、銅蓄積遺伝子の同定後、その遺伝子のみを2コピーとしたDSモデルマウスでの恐怖条件付け試験を行うことで、銅蓄積と情動記憶障害の関係性を明らかにしたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Keiichi Ishihara, Genes associated with disturbed cerebral neurogenesis in the embryonic brain of mouse models of Down syndrome. *Genes (Basel)* 12:10, 1598 (2021)
- ② 石原慶一、ダウン症候群の知的障害における脳炎症の関連の可能性。 *糖尿病・内分泌代謝科* 51:1, 35-41 (2021)

(2) 口頭発表

- ① 石原慶一、ダウン症の脳発生における神経血管ユニットの破綻の可能性。第64回日本神経化学学会大会（シンポジウム）2021.10 [オンライン開催]
- ② 石原慶一、ダウン症候群での生命金属恒常性の破綻。第94回日本生化学大会（シンポジウム）2021年11月 [オンライン開催]

(3) 出版物

なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	同 志 社 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す 統合的研究	研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①抗重力筋活動 ②メタボリックネットワーク ③リハビリテーションデバイス ④健康寿命 ⑤脳活動 ⑥活性酸素 ⑦宇宙放射線		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 内 伸 好	理 工 学 部	教 授	抗重力筋活動促進装置の開発

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 平 充 宣	研 究 開 発 推 進 機 構	客 員 教 授	神経・筋の適応機構・抑制策の追究
井 澤 鉄 也	ス ポ ー ツ 健 康 科 学 部	教 授	骨格筋—脂肪組織間のメタボリックネットワークの 解明
櫻 井 芳 雄	脳 科 学 研 究 科	教 授	抗重力活動と脳・神経系関連の追及
加 藤 久 詞	研 究 開 発 推 進 機 構	特 別 研 究 員	骨格筋—脂肪組織間のメタボリックネットワークの 解明
河 野 史 倫	松本大学 健康科学研究科	准 教 授	神経・筋の適応機構・抑制策の追究

宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究

1. 研究の目的

超高齢社会を迎えた我が国においては、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）や骨粗鬆症などによるロコモティブシンドローム（運動器障害）の増加が見られ、また身体の不活動やエネルギー消費のアンバランスにより糖尿病や高血圧を発症するメタボリックシンドローム（代謝障害）も増加している。それらの予防と改善のためにはこれらの身体諸機能の低下が起こる原因の解明と対応策の構築が必須である。ロコモティブシンドロームの最大の原因は抗重力筋活動の低下・抑制にある。抗重力筋活動抑制は筋萎縮のみならず、脳における遺伝子やタンパク質発現の変化等も誘発するとされている。さらに、抗重力筋などの骨格筋は脂肪組織の代謝と相互作用していることから、骨格筋の萎縮はメタボリックシンドロームやサルコペニア肥満に繋がっている。一方、身体諸機能の低下は宇宙環境滞在などの微小重力環境下で助長されることが分かっており、微小重力環境暴露によってロコモティブ・メタボリック両シンドロームの進展過程が増幅されることも分かっている。すなわち、微小重力環境を利用した研究は、両シンドロームの原因と対応策を追究するうえで格段に優れており、地球上での微小重力の模擬環境下や宇宙空間での身体諸機能を追究する「宇宙生体医工学」を応用することで、地球上における健康長寿の獲得を目指した研究が可能となることから、次の各分野において研究に取り組む。

- ①生理学：ラットやマウスにおける重力レベルに応じた発育や老化、日常生活における抗重力筋の張力発揮、運動神経活動や代謝活性レベルが、抗重力筋、脳・運動神経の可塑性に及ぼす機構を追求する。老化や身体活動抑制は、生体に悪影響を及ぼす活性酸素産生を助長し、宇宙環境では、長期間飛行中の宇宙放射線被曝も憂慮される問題である。そこで、マンガン・スーパーオキシド・ディスムターゼ (MnSOD) 等を使ったこれらの抑制処方解明も目指す。
- ②生化学：骨格筋－脂肪組織間のクロストークを仲介する生理活性物質の発現・分泌に及ぼす抗重力筋活動や不活動、老化の影響を追究し、その調節機構の詳細と新規調節物質の同定、ならびに脂肪組織の脱分化・形質転換や体脂肪量・分布を決定する因子を明らかにするための、脂肪由来幹細胞 (ADSC) の分化調節に及ぼす影響を解明する。こうした知見から、肥満症の予防や治療（新規運動療法の提案や創薬）に貢献する基盤的知見を提供し、メタボリックシンドロームを防止・抑制する処方策の開発に繋げる。
- ③神経科学：抗重力筋活動抑制や運動が脳や神経系に及ぼす影響を解明する。動物の筋活動や運動機能の計測と神経回路の活動を測定する電気生理学および免疫組織化学を組み合わせることで、身体機能と脳機能の相互作用を明らかにし、身体運動の負荷により生じる神経細胞の活動や新生を解析することで、衰えた脳機能を活性化するための身体トレーニング法や新たな運動療法、リハビリテーション方策を提案する。
- ④生体医工学：アメリカ航空宇宙局ジョンソンスペースセンター (NASA-JSC) 保有の重力免荷能動制御システム (ARGOS) や反重力トレッドミル、弾道飛行実験による微小・低重力模擬環境下で、歩行やランニングの実験を行い、ウェアラブルな歩行解析システムを使って、下肢抗重力筋の活動状態と機能発揮状況をより詳細に解明する。下肢抗重力筋に有効な刺激や負荷を与え、足首を積極的に動かすことで、自分の意思で歩行面を蹴ることが可能な自走式トレッドミルを開発し、有人探査時の宇宙飛行士の運動処方や飛行前歩行訓練に役立つ新規トレーニング方法の提案、リハビリテーション処方や装置の開発に繋げる。

2. 研究の計画

①②③の動物実験による基礎研究での検証と④での歩行解析などによるヒトの活動状況の

研究により新規の運動療法や装置の開発を目指す。

①生理学：オスWistar Hannoverラットの老化に伴う骨格筋特性の変化を、MnSOD投与で抑制できるか追究する。15か月齢のラットにおける特性と、2-3か月間のMnSODまたはPBS投与群と比較する。

②生化学：これまでの研究において候補となった鍵遺伝子をノックアウトまたは過剰発現させたADSCを作成し、脂肪細胞への分化能を確認する。候補となった新規アディポカインの生理作用を検討し、脂肪組織-骨格筋のメタボリックネットワークを解明する。

③神経科学：ラットに自発的運動を一定時間行わせることで抗重力筋の活動を賦活し、同時に運動野と大脳基底核の神経細胞活動を測定することで、抗重力筋の賦活に伴う脳活動の変化を定量化する。抗重力筋の活動と脳活動の相関について統計的に解析する。

④生体医工学：試作した「重力免荷能動制御装置」と移動式フォースプレートを組み合わせ、歩行実験により得られた情報を入力して、Hillタイプの全身の筋骨格シミュレーションによる逆運動解析を実施し、低重力下での歩行形態と下肢骨格筋の発揮筋力の関係を明らかにする。筋骨格シミュレーションによる低重力下の歩容を再現することで、廃用性筋萎縮の原因を明らかにし、予防と回復に有効な評価指標を確立する。開発した「シングルベルト式トレッドミル」の、下肢抗重力筋への負荷が効果的となる駆動制御アルゴリズムを開発し、その有効性を検討する。

3. 研究の成果

①生理学：オス老化促進マウスにおける老化に伴う活性酸素産生およびX線照射による生体への悪影響を、MnSOD投与で抑制する実験における骨格筋の反応を追求した。オスWistar Hannoverラットにおける老化および身体活動減少に伴う活性酸素産生増大による生体諸機能への悪影響の抑制が、骨格筋等の特性に及ぼす影響を追求する実験、骨格筋の分析を実施。ラット後肢の遅筋（ヒラメ筋）と速筋（足底筋）のアキレス腱を交互に接続した場合の筋の反応を追求した実験、分析を実施。

これまで実施された動物を使った宇宙実験で、地球帰還後に採取された抗重力筋に損傷が見られたことから、その原因の解明と防止策の開発を目指して、2020年度に同志社大学訪知館実験室に整備した動物用遠心機を利用した実験を実施した。2021年度発表のマウスを使った宇宙実験 (npj Microgravity 7: 34, 2021. doi: 10.1038/s41526-021-00164-6) のスケジュール等に合わせて、30日間の後肢懸垂による抗重力筋活動抑制後、各種レベルの過重力暴露後、抗重力筋であるヒラメ筋の採取・分析を進めている。引き続き学外メンバーと共同にて、2022年度に分析結果をとりまとめる。

また、損傷や萎縮からの骨格筋の再生促進に温熱刺激が有効であるという知見を得ているため、2021年度実施したbupivacaine注入により損傷を誘発したラットヒラメ筋の再生に関する論文投稿に向けて追加実験を実施した。分析は2022年度も進行中である。

②生化学：皮下脂肪組織由来ADSCの脂肪分化能の静水圧負荷に対する応答性を検討したところ、脂肪分化のマスターレギュレーターであるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ タンパク質の発現量が静水圧と正の相関を示し、回帰直線の傾きは運動トレーニング群で対照群と比較して有意に小さくなることが分かった。さらに、内臓脂肪組織由来ADSCについて皮下脂肪組織由来ADSCと同様に、SMG環境と1G環境下における脂肪分化後のRNA-seq解析を行った。GOエンリッチメント解析ならびにKEGGパスウェイ解析の結果、内臓脂肪組織由来ADSCにおいても、細胞骨格や細胞接着パスウェイに関連する遺伝子の発現が運動トレーニングの修飾を受けるが、内臓脂肪組織由来ADSCでは、皮下脂肪組織由来ADSCとは異なり、とりわけDNAの発現や複製に関わる経路が運動トレーニングによって強く影響を受けていることが明らかとなった。こうした運動トレーニングの影響は、運動トレーニングラットのADSCをSMG環境下で培養すると、ほぼ消失することがわかった。以上の結果は、新規かつ非常に興味深い知見であるため、2022年度にさらに実験を進め、より堅牢な研究

成果として学会発表、誌上発表を行う予定である。

③神経科学：ラットの運動・筋活動・神経細胞活動を精細に同時計測するシステムをさらに小型化して完成させた。加速度センサー、ジャイロセンサー、ヘッドアンプを一体化した超小型の集積回路を作製し、ラットの微細な運動と運動野の神経細胞活動を同時記録し、その関係について解析を進めた。特に微細な運動計測については、④のグループから助言を得て、より高精度で小型化を進めた。また①のグループと共同で、弾道飛行中のラットから脳活動を記録する準備を進めた。さらに脳機能を活性化するためのトレーニング法やリハビリテーション法についても、ニューラルオペラント条件づけの方法を中心に検討した。

④低重力環境を模擬するために、人の移動に対しても目標となる荷重を常時アクティブに制御可能な、吊り上げ式免荷重装置を開発するため、制御装置の安全性、性能、制御方式の有効性の検証を実施した。PIDコントローラによって制御された本装置によって被験者を安全に免荷するために、被験者に見立てた60kgのおもりを吊り上げ、実験を行った。実験結果から本装置のモデルを同定し、同定されたモデルを用いてカスケード制御系の設計を実施した。その結果、本装置は0.10 Hzから3.0 Hzの周波数範囲で、線形なシステムであることが明らかとなり、提案したモデルおよび制御手法が妥当であることが実証された。

負荷制御型トレッドミルの適切な負荷の検証に関しては、定速トレッドミルでの歩行に比べてヒラメ筋の総筋活動量や立脚終期の足関節モーメントが増加することが明らかとなった。また、負荷パターンを調整することで、負荷量を大きくしても疲労度を抑制しながら歩行を続けられることが示唆された。

さらに、下肢装具に空気圧シリンダを取り付けたリハビリテーション装置を開発した。開発した装置には、ポテンショメータ、力覚センサを搭載し、リハビリテーションの有効性を検証可能にした。開発したリハビリテーション装置を用いて、ヒラメ筋、腓腹筋を効果的に刺激するリハビリテーション方法を実験により検討した。実験の結果、開発したリハビリテーション装置を用いて空気圧シリンダによる推力に抵抗しながら運動を行うことでヒラメ筋が最も活性化し、効果的なリハビリテーションを実現できることが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

本研究プロジェクトは学内に運営委員会をおき、自己評価、外部評価をふまえて研究の進捗を点検、次年度の計画に反映させる体制をとり、研究計画の変更などにも応じた研究のマネジメントを実施している。

2021年度は、2020年度に引き続き、当初予定のESTECの施設を利用した共同実験が、COVID-19感染拡大の影響等で中断している。海外連携機関とは情報交換を引き続き実施し、国内でオスWistar Hannoverラットにおける老化および身体活動減少に伴う活性酸素産生増大による生体諸機能への悪影響の抑制が、骨格筋等の特性に及ぼす影響を追求した。

また、NASA-JSCとの共同研究についても、上述の状況により、当初計画から研究の遅れが懸念されるが、NASA-JSCでの実験に替えて、NASA、ARGOS機能に走行負荷制御が可能なトレッドミルを組み合わせた吊り下げ式免荷重実験装置の開発へ計画を見直し、試作を完了した。2021年度は当該制御装置の安全性、性能、制御方式の有効性の検証を実施した。

海外研究機関に向いて実験する方法は、今後も厳しい状況が続くことが懸念されるが、国内での研究に重点を置き、学内研究費を充当し、引き続き成果の導出に繋げる予定である。

負荷制御型トレッドミルの制御アルゴリズムは、既に使用されている床反力計が搭載されたトレッドミルであれば搭載可能であるため、研究成果の公開を進め、リハビリテーション機関等への導入を展開する。

5. 研究発表

(1)学会誌等

①

Ohira, T., Y. Ino, Y. Kimura, Y. Nakai, A. Kimura, Y. Kurata, H. Kagawa, M. Kimura, K. Egashira, C. Matsuda, Y. Ohira, S. Furukawa, and H. Hirano. Effects of microgravity exposure and fructo-oligosaccharide ingestion on the proteome of soleus and extensor digitorum longus muscles in developing mice. *npj Microgravity* 7: 34, 2021. doi: 10.1038/s41526-021-00164-6.

Zhang, S.*, D. Ueno*, T. Ohira, H. Kato, T. Izawa, S. Yamanouchi, Y. Yoshida, A. Takahashi, and Y. Ohira. Depression of bone density at the weight-bearing joints in Wistar Hannover rats by a simulated mechanical stress associated with partial gravity environment. *Frontiers Cell Develop. Biol.* 9: 707470, 2021. doi: 10.3389/fcell.2021.707470. *: Equally contributed authors.

Ohira, T., F. Kawano, K. Goto, and Y. Ohira. Responses of neuromuscular properties to unloading and potential countermeasures during space exploration missions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 136: 104617, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104617>.

Hasebe, R., K. Murakami, M. Harada, N. Halaka, H. Nakagawa, F. Kawano, Y. Ohira, T. Kawamoto, F.E. Yull, T.S. Blackwell, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Watanabe, N. Watanabe, H. Hotta, T. Yamashita, D. Kamimura, Y. Tanaka, and M. Murakami. ATP spreads inflammation to other limbs through crosstalk between sensory neurons and interneurons. *J. Exp. Med.* 219 (6): e20212019, 2022. <https://doi.org/10.1084/jem.20212019>.

②なし

③

Yury Ivanenko; Daniel P. Ferris; Kyuhwa Lee; Yoshio Sakurai; Irina N. Beloozerova; Mikhail Lebedev. Editorial: Neural Prosthesis for Locomotion. *Frontiers in Neuroscience*, 15, November 2021.

Yukitoshi Sakaguchi; Yoshio Sakurai. Paradoxical Enhancement of Spatial Learning Induced by Right Hippocampal Lesion in Rats. *Symmetry*, 13(11) 2138-2138, November 2021.

Yukitoshi Sakaguchi; Yoshio Sakurai. Disconnection between Rat's Left and Right Hemisphere Impairs Short-Term Memory but Not Long-Term Memory. *Symmetry*, 13(10) 1872-1872, October 2021.

Motoki Yamada; Yoshio Sakurai. Medial prefrontal cortex stimulation disrupts observational learning in Barnes maze in rats. *Cognitive Neurodynamics* (In press, published online), September 2021.

Shogo Takamiya; Kazuki Shiotani; Tomoya Ohnuki; Yuma Osako; Yuta Tanisumi; Shoko Yuki; Hiroyuki Manabe; Junya Hirokawa; Yoshio Sakurai. Hippocampal CA1 Neurons Represent Positive Feedback During the Learning Process of an Associative Memory Task. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 15(article 718619), September 6, 2021.

Tomoya Ohnuki; Yuma Osako; Hiroyuki Manabe; Yoshio Sakurai; Junya Hirokawa. Overrepresentation of fundamental decision variables in the prefrontal cortex underlies decision bias. *Neuroscience Research*, 173, 1-13, December 2021.

Yuma Osako; Tomoya Ohnuki; Yuta Tanisumi; Kazuki Shiotani; Hiroyuki Manabe; Yoshio Sakurai; Junya Hirokawa. Contribution of non-sensory neurons in visual cortical areas to visually guided decisions in the rat. *Current Biology*, 31, 1-13, July 12, 2021.

Yuta Tanisumi; Kazuki Shiotani; Junya Hirokawa; Yoshio Sakurai; Hiroyuki Manabe. Bi-directional encoding of context-based odors and behavioral states by the nucleus of the

lateral olfactory tract. *iScience*, 24(4) 102381-102381, April 2021.

④

K.Kitano, A.Ito, and N.Tsujiiuchi. Analysis of Dexterity Motion by Singular Value Decomposition for Hand Movement Measured Using Inertial Sensors. 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (0952.pdf), pp.7143-7146, November 2021. (査読付国際会議議事録)

A.Oshima, T.Wakahara, Y.Nakamura, N.Tsujiiuchi, and K.Kamibayashi. Time-series changes in intramuscular coherence associated with split-belt treadmill adaptation in humans. *Experimental Brain Research*, Vol.239 [DOI: 10.1007/s00221-021-06127-3], pp.2127-2139, July 2021.

(2) 口頭発表

①なし

②

加藤久詞, 大澤晴太, 高倉久志, 井澤鉄也, 「運動トレーニングによって脂肪由来幹細胞から分泌されるエクソソームが脂肪分化に及ぼす影響」、第76回日本体力医学会大会(三重)、2021年9月17日～19日

大澤晴太, 加藤久詞, 高倉久志, 井澤鉄也, 「脂肪由来幹細胞の分化シグナルに及ぼす運動の影響」、第76回日本体力医学会大会(三重)、2021年9月17日～19日

加藤久詞, 井澤鉄也, 「運動刺激による褐色脂肪組織の変容」、シンポジウム①『褐色脂肪を基軸とする新たな健康戦略』、第40回日本臨床運動療法学会学術集会(京都)、2021年9月11日～12日

加藤久詞, 井澤鉄也, 「時間運動学を基盤とした持続的運動トレーニングの最適な実施タイミング」、シンポジウム4『身体機能の最適化・最大化を目指した若手研究者による最新の基礎運動生理学』、第29回日本運動生理学学会大会(東京)、2021年8月20日～21日

③

櫻井芳雄 シン・ブレインマシンインターフェイス—神経活動のオペラント条件 日本行動分析学会第30回年次大会、2021年08月28日

④

寺川翔, 辻内伸好, 伊藤彰人, 大島裕子, 青井伸也(京都大学), 土屋和雄(京都大学) その場歩行とその場走行の遷移現象の解析 第65回システム制御情報学会研究発表講演会、2021年5月

黒川美月, 辻内伸好, 伊藤彰人, 迫田空 筋骨格モデルを用いたトラクタの乗降性評価 日本機械学会2021年度年次大会、2021年9月

友國佑哉, 辻内伸好, 伊藤彰人, 大内陽, 廣瀬圭(久留米工業大学) 負荷制御型トレッドミルの負荷パターンが下肢へ与える影響評価 日本機械学会2021年度年次大会、2021年9月

松岡大成, 辻内伸好, 伊藤彰人, 安田和磨, David Gonzalez Pomaes 慣性センサによる手首推定位置に基づいたロボット遠隔教示システムの構築 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2021、2021年9月

北野敬祐, 伊藤彰人, 辻内伸好 慣性センサによる手指動作計測結果に対する特異値分解と階層型クラスタリングを用いた手指巧緻性の解析 LIFE2020-2021 日本機械学会福祉工学シンポジウム2021、2021年9月

三間郭凱, 伊藤彰人, 辻内伸好, 北野敬祐, 植田慎也 慣性センサによるヒトの関節位置を考慮した上体運動計測モデルの構築 日本機械学会第17回「運動と振動の制御」シンポジウム、2021年12月

江上静子, 寺川翔, 大島裕子, 伊藤彰人, 辻内伸好, 青井伸也(京都大学), 土屋和雄(京都大学) 足踏み動作の力学解析—垂直床反力パターンの解析— 2021年度計測自動制御学会関西支部・システム制御情報学会シンポジウム、pp.73-74、2022年

(3) 出版物

なし

中山間地域（日伊）の農業／ 農村のソーシャルイノベーション研究 －国際的・学際的な研究組織でイタリアの先進事例に学ぶ－

1. 研究の目的

日伊の農村・農業再生の事例と政策を比較し、持続可能な中山間地域を実現するために必要な条件を明らかにすることである。具体的には、イタリア農村の社会革新の動きを、マクロ（国家・EU政策）とミクロ（事例）の両面から調査し、日本の事例と比較し、中山間地域の農業／農村にイノベーションを醸成するためのエコシステム——どのような人材育成システム・農村コミュニティが求められるか、を明らかにする。着目点は、外部人材が引き起こす社会システムの変容とし、その分析のために、社会革新をもたらす外部人材の①技能／経験／ネットワーク、②地域に入る（戻る）理由、③地域での就業形態、④コミュニティとどのような付き合い方をしているか、⑤その関係はどのように熟成して行くかを分析視点とする。

2. 研究の計画

前半は、文献調査・国内調査の整理と分析により、SIをもたらす外部人材の知識・スキル・能力を明らかにし、外部人材育成のエコシステムの仮設定を行う。後半では、日本の農村でSI醸成の実証的研究を進める。調査対象は、地域フードポリシー、移民政策、都市農村交流、若手起業等。実証的研究ではイタリアのSIキット（ワークショップ）を日本の農村で実施し、その効果をソーシャル・ネットワーク分析により追跡調査をする。

- (1) 月例研究会の開催（4月～3月）
- (2) EU・イタリア現地調査（各機関訪問ヒアリング・事例フィールド調査）（10月～11月）
- (3) SI醸成キットの試行（Va'zzapメンバーを招聘、研究会及び国内現地視察）（12月～1月）
- (4) 成果取りまとめ、龍谷大学紀要への投稿、国際成果発表会開催（2月～3月）

3. 研究の成果

(1) 農業・農村におけるソーシャル・イノベーションに関する理論的研究について

① 農業／農村におけるSIの定義について、欧米を中心とする文献分析により共通するキーコンセプトを抽出した。草の根活動にリンクするガバナンス（Bottom-Linked Governance）、世代間・地域間・セクター間を超えた多様な関係性の構築などが挙げられる。また、農村地域の内部資源と外部資源の相互作用、すなわち都市農村交流が促進され、その中で、起業家精神を醸成するエコシステムの構築ができるかが、鍵となる。

② 国際セミナーを開催し、欧州連合政策と食農政策の現状と課題について知見を深めることができた。またイタリア地域食の認証制度がSIをもたらした事例研究を通じて、制度・コミュニティ・地域リーダー・ネットワーク等、農村地域におけるSIに求められる条件について検討することができた。

具体的に実施した研究会・国際セミナーは以下のとおりである。

開催日	場所	報告者	テーマ
5/13	オンライン	矢作 弘	「アルベルゴ・ディッフーズと地域再生」
7/28	オンライン	石田雅芳	「スローフードの保護食材運動とアマルフィの魚醤」
10/1	オンライン	中村貴子	「6次産業化による地域振興について」
	チャン・シンホア		「農村におけるソーシャル・イノベーションの文献分析（進捗報告）」
12/27	鴨川会館	石倉 研	「中山間地域コミュニティの持続性、直接支払制度、CAPとの関係性」
		大石尚子	「日伊共同セミナー Contadinner in 亀岡 報告」

2/3 オンライン Eric Ponthieu The European Green Deal-The EU blueprint for the transformation towards a carbon neutral economy

- 3/8 オンライン チャン・シンホア 「農村におけるソーシャル・イノベーションの
文献分析（中間報告）」
大石尚子 「亀岡農業者へのヒアリング調査(コンタディナー
開催に向けてのニーズ調査)について」
- 3/23 オンライン Eric Ponthieu The Farm to Fork Strategy-For a fair, healthy
and environmentally-friendly food system

(2) イタリアの農業・農村 SI モデルの日本での実装化に向けた実践的研究について

- ① 京都府亀岡市にて、日伊共同セミナー「持続可能な農業・農村コミュニティを考えるー
日伊の経験を通じて」を開催し、イタリアのSIモデルのワークショップを試行的に実施
することができた。本来は、対面で行うものであったが、Covid19 の影響により、当初来
日予定であったイタリア人農業者やファシリテーターは、オンラインでの参加となったが、
日本側参加者は対面で集まり、日伊の農村・農業の抱える課題の類似性や異質性について、
ある程度理解することができた。また実際のワークショップの疑似体験では、参加者の農
業者の中から本格的なワークショップに参加したい、また地元での開催を望む声が聞かれ
た。
- ② ワークショップに参加した農業者へのヒアリング調査を実施し、次年度、本格的にワークシ
ョップを展開していく上での当事者側のニーズについて把握することができた。
- (3) 国内調査では、持続可能な農業・農村の構築を目指す取り組みとして、ポスト資本主義社
会の構築を目指す取り組み（Next Commons Lab西条、SAIHATEエコビレッジ、ひろんた村）
や有機農業を中心としたファーマーズコミュニティ、イタリア料理を通じた農業振興、地
域資源を活用した農村コミュニティの再生の事例を訪問調査し、その実態と課題について
把握することができた。

4. 研究の反省・考察

(1) 農業・農村における SI の理論的考察の深化について

日伊共同研究者による国際セミナー・研究会を通じて、日伊双方の農業・農村コミュニ
ティにおけるSIについて、政策や制度等のマクロレベルから、ローカルな事例等のミクロレ
ベルまで、一定の知見を得ることができたが、日伊の農村におけるSIの定義について議論
を深められておらず、今後は日伊の農業・農村におけるSIの要素の抽出と定義やSIを測る
インジケータの抽出が喫緊の課題である。

(2) イタリア農業・農村 SI モデルの実装化に向けた取り組みについて

- ① 2021年度はイタリアSIモデル「Farmers Dinner」の試行を行うことができたが、その効
果について、参加者に対して行ったヒアリング調査の分析が未完成であり、2022年度の本
格的実施に向けて分析結果を明らかにしていく必要がある。
- ② 今年度着手したイタリアのSIモデルの試行では、参加者募集に際して効果的なアプロ
ーチができなかった。2022年度の本格的な実施に向けて、学部の地域連携プログラムの学生
と協働し、参加者を確保し、ソーシャル・ネットワーク分析によってSIモデルの有効性
について明らかにする必要がある。

(3) 研究成果の日伊共同研究発表について

- ① これまで2年間新型コロナウイルスの影響により、イタリア現地調査ができなかった。
2022年度に現地調査を実施し、これまでの文献調査、研究会での成果と併せて最終目的
である日伊の農業・農村コミュニティのSIのかたちを明らかにすることが課題である。
- ② 新型コロナウイルスの影響によりイタリアから研究者・実践者を招聘することができず、
オンラインでの日伊共同セミナーの実施となり、日本側としては一定の効果は得られたも
のの、イタリアからの一方的な紹介に留まった。2022年度はイタリアからの招聘可能とな
っているため、市レベルあるいはローカルレベルのワークショップに招聘し、日伊の対面
相互交流と分析方法の共有を通じて、本研究事業の最終的な目的を果たしたい。イタリア
の農村SIモデルの本格実施に参加してもらい、日伊の農業農村のSIについての相違を明ら
かにしたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①秋津元輝「食政策の統合によって地域の魅力を取り戻すー日本版ローカル・フードポリシーの意義と役割」（『農業と経済』第87巻第4号、2021年4月、6-16ページ）
- ②秋津元輝「農業政策から食農政策へー食に関わる者たちすべての参加を前提に」『季刊農業と経済』2021年夏号、2021年8月、43-54ページ）
- ③石倉研(2021)「農山村振興のためのボトムアップ政策：リーダー事業（LEADER）の成功事例」（『ビオシティ』87、2021年7月、74-91ページ）
- ④石倉研(2021)「諫早のまちづくりと地域経済の変容」（『日本環境会議（JEC）「諫早湾干拓問題検証委員会」報告書 “宝の海”を再び！：日本一の干潟を取り戻そう』2021年8月、101-110ページ）
- ⑤白石克孝「域学連携から始まる持続可能な地域づくりー再生可能エネルギー等を活用した洲本モデルー」（『地域づくり2月号』通巻392号、地域活性化センター発行、2022年2月1日刊、20~21ページ）

(2) 口頭発表

- ①中野栄美子・石倉研「東近江三方よし基金による資金支援の成果と課題：域内循環の構築に着目して」、日本NPO学会第23回研究大会、オンライン開催（東北大学）、2021年6月20日
- ②坂梨健太「在日アフリカ人の移動と労働」、マイグラント研究会、2021年7月12日
- ③Sakanashi, K. “Rethinking Rural Livelihood Diversification in Tropical Africa”, 2021 KU-NTU Bilateral Symposium on Agri-Environmental Policies in Developed and Developing Countries, Online, Sep. 14, 2021
- ④坂梨健太「ハワイ島における学生実習の構築と「食の循環」ー農学・農業、日系移民の視点から」、「北米における日本関連在外資料調査研究・活用：ー言語生活史研究に基づいた近現代の在外資料論の構築ー」オンライン研究発表会、2021年11月27日
- ⑤大石尚子「ソーシャル・イノベーション醸成のための政策展開ー欧州・イタリアを事例として」、日本質的心理学会企画シンポジウム『資本主義とポスト資本主義の境界領域を探る：政策、美的科学、政治哲学のあいだ』、2021年10月24日

(3) 出版物

- ①秋津元輝「直売所と地産地消」（野林厚志編『世界の食文化百科事典』丸善出版、2021年1月、144-145ページ）
- ②秋津元輝・池上甲一・久野秀二（編）『食と農の世界をたてなおすー政策と実践と知の総合化』（季刊『農業と経済』2021年夏号、英明企画編集、2021年8月）
- ③大石尚子、「マルチチュードとしての多文化共生社会」（『越境者との共存に向けて』村田和代編、ひつじ書房、2022年、79-102ページ）
- ④大石尚子「食と農をめぐるソーシャル・イノベーションの展開ーイタリア南部の農業・農村政策を中心に」（『ソーシャル・イノベーションの理論と実践』今里滋編、明石書店、2022年、81-99ページ）
- ⑤白石克孝・西芝雅美・村田和代編「第1章 座談会：知識をもってまちに出よう」、「第10章 大学の第3の使命と京都アライアンス」（『大学が地域の課題を解決する『ポートランド州立大学のコミュニティ・ベースド・ラーニングに学ぶ』ひつじ書房、2021年9月）
- ⑥矢作弘「アメリカの窓からーカリフォルニアの「ファンファーレ」が鳴る」（岩波書店『図書』2021年9月、24-28ページ）
- ⑦矢作弘「アフターコロナの「都市の「かたち」」ーアメリカの経験から考える」（都市住宅学会『都市住宅学』2021年秋号、19-24ページ）
- ⑧矢作弘「アフターコロナの「都市のかたち」」ーパンデミックとジェントリフィケーション」（日本都市計画学会『都市計画』2022年1月 vol.71 no.1 354 38-41ページ）

ナノメディックによる安全な再生医療等製品の作出技術の開発 —新規タンパク質送達法の医用応用にかかる基盤技術の確立—

1. 研究の目的

(1) 我々は iPS 細胞を経由せず体細胞を直接別の系統の細胞に分化させる direct cell reprogramming (DCR) をモデルに、再生医療に欠かせない「安全な再生医療等製品」を作出するための基盤技術を構築することを研究の目的に掲げる。

①日本が世界に貢献したiPS細胞は再生医療成功の鍵を握っている。しかし、臨床応用に際しては安全性への懸念がある。そのひとつが治療用細胞の腫瘍化である。iPS細胞は転写因子を体細胞に導入することにより作出されるが、導入法に内在する問題は改善の余地がある。タンパク質を直接細胞内に導入する技術も報告されているが技術的な完成度は高いとは言えない。エフェクター分子導入技術の開発とは別に、近年ではiPS細胞に内在性のゲノム不安定性があると指摘されている。脱分化そのものがゲノム不安定性を誘発していると考えられる (Adv Exp Med Biol 2019)。

②iPS細胞を利用した臨床試験に注目が集まる一方、安全性に関する懸念を払拭するための基礎的な技術開発は遅れている。iPS細胞を経由しないDCRは治療用細胞の作出に要する期間も短く、変異誘発リスクが比較的低いとされ、再生医療を実用化する観点から高く評価されている (J Biol Engineer 2019)。そこで、我々はDCRを研究の柱として位置付ける。

(2) 線維芽細胞から神経系や筋肉細胞を直接誘導するDCRは以前から報告されてきた。中でも単一転写因子によるDCR技術はin vivo投与を念頭においた再生医療に極めて有用である。しかし、iPS細胞の樹立・再分化と共通する問題点としてゲノム障害・細胞悪性化を回避できる簡便かつ一過性の転写因子導入技術は確立されていなかった。

①我々はAMEDの支援を得てこれを解決する技術基盤NanoMEDIC法を開発した。これはタンパク質やRNAを直接細胞に導入する非常に簡便な方法で、我々がウイルス学の基礎研究で得た成果に基づいて独自に開発した技術である (Nat Commun 2020)。他のエフェクター分子の細胞導入手法と比較すると、全ての点においてNanoMEDIC法が優れている。これまでに遺伝子編集酵素Cas9やレポータータンパク質を細胞に送達することに成功している。

②本研究では転写因子Ngn2及びMyoDタンパク質をヒト線維芽細胞にNanoMEDICを用いて導入してDCRが達成できるかを検証する。この技術が確立すれば、安全性の観点から足踏みしていた再生医療の多くが実現に向かって大きく前進すると期待される。

2. 研究の計画

(1) 転写因子誘導体の構築：単一の転写因子で線維芽細胞を脱分化させる Ngn2 及び MyoD をモデルとする。これらに NanoMEDIC 粒子への取り込みを促進するための DmrC タグを融合させた哺乳類細胞発現プラスミドベクターを構築する。融合遺伝子の発現を Western blot 法により確認すると同時に、融合遺伝子の発現により標的遺伝子 MyoG, fMyHC, MyoD NeuroD4, N Sox 1, Ngn2 などの発現誘導が可能かをトランスフェクションした細胞から RNA を抽出し RT-PCR により検証する。増幅のインターナルコントロールに GAPDH を用いる。細胞はヒト細胞株 NP2, 293FT, 初代線維芽細胞 IMR-90 を用いる。タグの位置を Ngn2 と MyoD の N 末端または C 末端側にするか、リンカーのアミノ酸配列と長さを数種類試験して転写因子機能が保たれている誘導体を選択する。一方、dCas9-VPR を利用して内在性の Ngn2 と MyoD 発現を誘導する dCas9 哺乳類細胞発現プラスミドベクターを構築し、Ngn2 と MyoD のプロモーター配列に対する guide RNA を数種類デザインして一過性トランスフェクション系にて機能解析する。遺伝子発現が十分に誘導できない場合には VP16, 64, VPR 誘導体, gRNA などを逐次改変し転写活性が増強できるように工夫する。また、タンパク質デリバリー効率 VSV-G 以外の膜融合タンパク質で上昇するかについて Measles virus glycoprotein 及び Baboon retrovirus envelope を用いて検証する。

(2) NanoMEDICの産生と機能評価：最も生物学的活性が高い誘導体を選択しNanoMEDICを産生させる。293T細胞へDmrAタグを付加したNanoMEDIC構造タンパク質、転写因子、粒子表面を被服するVSV-Gの発現プラスミドをtripartite transfectionし、転写活性を有する分子を

NanoMEDIC粒子に取り込ませるため培養液にA/C heterodimerizerを添加する。細胞培養上清を0.45 μ mフィルターで濾過し、PEG沈殿にてNanoMEDICを回収し、容量を指標に100倍濃縮する。Western blot法にてNanoMEDIC粒子への取り込み効率を評価する。

3. 研究の成果

全ての予定していた NanoMEDIC production 用の plasmid 構築を完成させ、ヒト細胞におけるタンパク質発現を Western blotting により検証した。転写因子の機能は、その標的活性化分子に対する RT-PCR により確かめた。NanoMEDIC 粒子への Cargo 取り込みは VP16 や VPR 付加により次第に低下することがわかった。これは分子量、protein trafficking の2つの要因があると推定されるが、VP16 と VPR は NLS の機能が強いいため NanoMEDIC 形成の場である細胞質に Cargo 分子が分布しにくいことが主な原因と思われた。VSV-G pseudotyping に対して Baboon retrovirus envelope は NanoMEDIC producer cells への細胞融合による毒性が強く、反復的収穫が出来ないため、予想に反して total yield が低くなることが分かった。送達効率の増大よりも産生効率の低さの方が問題となることが判明した。

4. 研究の反省・考察

NanoMEDIC による転写因子の導入を機能的に評価したところ、RT-PCR で標的因子の発現増強を確認した。あらかじめ予定していた実験計画の通りに実施できた。NanoMEDIC 粒子の中に封じ込めることができる分子の特性がわかるようになってきたこと、転写因子を NanoMEDIC で送達することができることが証明できたことは DCR の実現に向けて評価できる結果である。細胞の形態的、機能的分化の検証は今後の研究に期待する。以上より、NanoMEDIC protein にかかる技術的な基礎はある程度固めることが出来たと考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①2021年第44回分子生物学会 Kurita et al.,

新規タンパク質送達法 NanoMEDIC による転写因子送達の実証

②2022年第7回日本ゲノム編集学会 Tomita et al., (ポスター賞)

新規 RNP 導入法 NanoMEDIC による Cas9/gRNA 送達の有用性に関する研究

(3) 出版物

なし

高速磁化反転技術の開発と省エネルギー動作デバイス応用

－高速動作不揮発性磁気メモリの実現に向けて－

1. 研究の目的

磁気メモリは不揮発性のメモリである。磁気メモリでは情報担体として磁化の向きが用いられている。したがって、情報を速く書き換えるためには高速な磁化反転が必要である。また、メモリを低消費電力で動作させるためには、低消費電力な磁化反転が必要である。低消費電力で強磁性金属の磁化を反転させる方法として強磁性体に接続された重金属配線を用いたスピン軌道トルク法(SOT法)がある。この方法では、重金属に電流が流れるとキャリア電子がスピンホール効果によってスピン偏極する。偏極したスピンの純スピン流として重金属に注入され、重金属の磁化を反転させる。我々は二つの重金属配線を用いた補助書込SOT法を提案した。補助書込SOT法では、先に補助書込用の重金属配線から主書込用の重金属配線とは異なる向きのスピンの強磁性体へ注入される。主書込では、強磁性体の磁化を目的の向きに反転させるためのスピン(目的の向きに向けたスピン)が注入される。従来型SOT法では主書込のみのため、強磁性体の磁化は反転するが、磁化反転の初動が小さく、磁化反転に要する時間が長かった。補助書込によって磁化反転の初動を増大させることで磁化反転を高速化できる。

(1) 補助書込SOT法による高効率磁化反転

補助書込SOT法は数値シミュレーションによって従来型SOT法に対して優位性が示された後、実証実験によって磁化反転に必要な電流量や反転時間の低減が確認された。しかし、電流の印加条件(パルス形状、時間等)、磁性体の形状、書込線の幾何配置等と磁化反転特性との相関は理論・実験ともに未解明である。更なる高速・低消費電力化にはこのような知見が重要となる。そこで複数の条件下における理論解析と実験の相互比較を行う。具体的には以下のような目的で研究を行う。低消費電力での高速な磁化反転手法を確立することが最終目標である。

- ① 補助書込SOT法における磁化反転過程の解析。
- ② 理論と実験における磁化反転特性の相違を評価。
- ③ 高精度な理論予測が可能なシミュレーション手法を構築。

(2) スピンホール効果による強磁性体へのスピン注入の検討

重金属に電流が流れるとき伝導キャリアにスピンホール効果が作用する。伝導キャリアのアップスピンとダウンスピンがそれぞれ逆向きに曲がり、スピンの偏極する。強磁性体と重金属の界面では偏極したスピンの純スピン流として強磁性体へ注入される。注入スピンの量が多いほど高速に磁化が反転される。しかし、重金属や強磁性体の材料パラメータと注入スピンの量との関係は明確ではない。したがって、これらの関係を明らかにする。具体的には以下のような目的で研究を行う。

- ① スピンホール効果によるスピン注入の解析
- ② 高効率なスピン注入の提案

2. 研究の計画

(1) 補助書込SOT法による高効率磁化反転

① 数値シミュレーションによるアプローチ

補助書込SOT法をスピン注入による磁化反転トルクの効果を導入したランダウーリフシツツギルバート方程式に基づいたマイクロマグネティクスモデルによりシミュレーションする。強磁性体として膜厚が5nmで長辺の長さが20nm、100nm、500nmの直方体のFeNi合金(パーマロイ)を想定する。SOT法によるスピン注入のトルクには、接合界面からの距離でスピンの指数関数で減衰しながら磁化へトルクを与える純スピン流注入モデルを用いる。強磁性体のスピン拡散長は2nmとする。補助書込電流の印加時間や主書込電流とのタイミングや各スピン注入量を変更して磁化反転に必要な時間や消費電力をサンプリングし低電力で高速に磁化反転できるように最適化する。

② 実験によるアプローチ

パーマロイやCoFeBなどの複数種類の強磁性体において磁化反転を実施し、系統的な

理解を目指す。強磁性体のサイズを変更して実験する。磁化反転に必要な電流値を探索し、磁化反転に要する電流値で整理する。更に書込電流のパルス時間、補助書き込み電流と主書き込み電流の間のタイミング、試料温度等をパラメータとして系統的に検証する。得られた情報をシミュレーションによる解析にフィードバックし、実験と解析との差違を補正・定式化し高精度な理論予測を可能にする。

(2) スピンホール効果による強磁性体へのスピン注入の検討

半導体デバイス特性の数値解析で用いられる電気伝導の計算手法に、伝導キャリアのスピン依存性、スピン散乱の効果、重金属におけるスピンホール効果を導入して、スピンの流れを計算し、重金属から強磁性体へ注入されるスピンの流れを解析する。

3. 研究の成果

(1) 補助書込SOT法による高効率磁化反転

① 数値シミュレーションによるアプローチ

補助書込用の純スピン流を数ナノ秒だけ流した後に主書込用の純スピン流を流し始め、磁化の反転時間をシミュレーションした。その結果、補助電流の印加時間が長すぎると反転時間が増加してしまうこと、つまり補助電流の印加時間に最適値があることが明らかになった。また、磁化反転過程での磁化の挙動を従来型SOT法と比較した。強磁性体の長さが20nmと100nmの場合の磁化反転においては、補助書込SOT法と従来型SOT法のどちらも単磁区に近い磁区形状を保ったまま磁化が反転した。ところが、強磁性体の長さが500nmの場合には、従来型のSOT法と補助書込SOT法とで反転時間だけでなく磁化反転過程も大きく異なった。従来型のSOT法においては、強磁性体の様々な箇所から磁化反転が疎らに起こり磁化が反転したのに対し、補助書込SOT法では磁性体の長辺端から磁化反転が起こり始め、単磁区(もしくは二つの磁区)に近い磁区形状を保ったまま磁化が反転した。この結果は、大きなサイズの強磁性体の磁化反転において、補助書込SOT法のほうが、反転確率が高いことやサンプル依存性が少ないことを示唆する。

② 実験によるアプローチ

おおよそ100nm、500nm、1000nmの長さの直方体のパーマロイを用いて磁化反転実験を行なった。補助書き込み用の電流と主書き込み用の電流を同時に流し始め、ある時間(横軸)で補助電流を止め、磁化の反転時間(縦軸)を理論予測した。その結果、補助電流の印加時間が長すぎると反転時間が増加してしまうこと、つまり補助電流の印加時間に最適値があることが明らかになった。これは数値シミュレーションによる結果と定性的に一致した。

(2) スピンホール効果による強磁性体へのスピン注入

スピンに依存したドリフト拡散法により重金属/強磁性体多層膜における重金属から強磁性体へのスピン注入量を解析可能にした。ドリフト拡散法には、ドリフト電流と拡散電流に加えてスピン拡散の効果と重金属配線のスピンホール効果を導入した。解析の結果、重金属の電気伝導度や強磁性体のスピン拡散長の減少で重金属へのスピン注入量が増加し、強磁性体の電気伝導度や重金属のスピン拡散長の増加で重金属へのスピン注入量が増加することが明らかになった。また、重金属の膜厚が重金属のスピン拡散長の3倍程度の長さよりも薄い場合、強磁性体へのスピン注入量が減少した。この低膜厚による注入量の減少は、重金属と強磁性体の接合における形状の変化で改善されることを明らかにし、改善案を提案した。

4. 研究の反省・考察

磁化反転のシミュレーションと実験を比較すると、定性的には整合する結果が得られた。しかし、実験において補助書込SOT法を用いることによる磁化反転に必要な電力量の従来型SOT法からの減少量にばらつきが大きかった。この原因はシミュレーションからは考察できておらず、より詳細な検討が必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Y. Yamaki, **S. Honda**, H. Itoh, “Spin injection into ferromagnetic metal from heavy metal owing to spin Hall effect”, Science and Technology Reports of Kansai University, vol. 64, pp. 51-59 (2022).
 - ② Y. Kaiya, **S. Honda**, H. Itoh, and T. Ohsawa, “Depth-dependence of magnetization at a ferromagnet edge under the interfacial Dzyaloshinskii-Moriya interaction”, Science and Technology Reports of Kansai University, vol. 64, pp. 61-72 (2022).
 - ③ K. Itoh, **S. Honda**, T. Suemasu, “Transition metal nitrides and their mixed crystals for spintronics”, Nanotechnology, vol. 33, pp. 062001-1 – 21 (2022).
 - ④ 特願2021-63691、**本多周太**、“磁化制御デバイス及び磁気メモリ装置”、(2021年4月2日).
 - ⑤ 特願2021-63692、**本多周太**、“磁化制御デバイス及び磁気メモリ装置”、(2021年4月2日).
 - ⑥ 特願2022-007392、**本多周太**、“磁気素子および磁気メモリ装置”、(2022年1月20日).
- (2) 口頭発表
- ① 家登正堯、大澤友克、**本多周太**、“強磁性多層構造による電流駆動型磁気メモリの安定動作”、第28回電気学会山梨・静岡東部支所研究発表会、YS.28-02、(2021年11月30日).
- (3) 出版物
- ① なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	関 西 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	弾性線維の再生技術の開発		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①細胞外マトリックス ②弾性繊維 ③再生		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 邨 智 之	医 学 部	教 授	研究の統括

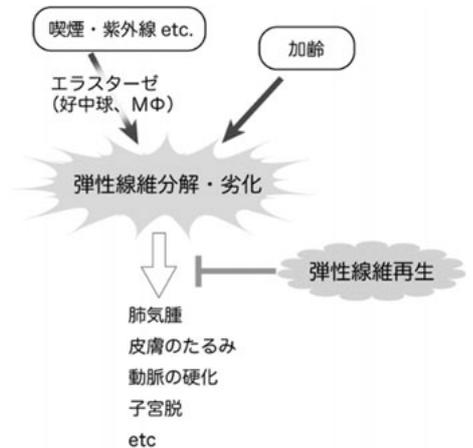
○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 間 智 也	医 学 部	准 教 授	CRISPRiスクリーニング
平 井 希 俊	医 学 部	講 師	弾性繊維定量評価法の開発
三 木 貴 雄	医 学 部	講 師	遺伝子改変マウスの作成
覚 道 奈 津 子	医 学 部	教 授	皮膚組織の採集
塩 島 一 朗	医 学 部	教 授	培養組織弾性繊維の解析

弾性線維の再生技術の開発

1. 研究の目的

弾性線維は、伸び縮みする組織（皮膚・動脈・肺など）に多くあって、その伸縮性を担う細胞外マトリックスである。皮膚のたるみだけでなく、心疾患予後悪化因子である動脈中膜硬化、高齢者の重要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・分解が直接原因と考えられているため、弾性線維の劣化予防と再生は高齢化社会における極めて重要な課題である（図1）。しかし弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、加齢組織では新たな弾性線維形成はおこらないため、弾性線維の再生は困難と考えられてきた。



弾性線維形成には、①ミクロフィブリル線維束形成 ②エラスチンの凝集 ③エラスチンのミクロフィブリルへの沈着 ④エラスチンどうしの架橋 といったプロセスがあることがわかりつつある。研究代表者らは、②③のプロセスに必須の分泌タンパク質 **Fibulin-5** を同定した (*Nature* 2002, *J Cell Biol* 2007)

のを皮切りに、**LTBP-2** (プロセス①)、**LTBP-4** (プロセス③)、**Fibulin-4** (プロセス④) といった弾性線維形成因子を同定・機能解明してきた (*EMBO J* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 2013, *Hum Mol Genet* 2014, *Sci Rep* 2017 など)。ここにきてこれらがつながり、弾性線維形成機構の全容が姿を現しつつある。

本研究では、これら弾性線維形成因子の中で加齢組織において不足するものを見出し、弾性線維の再生に必要な条件を明らかにすることを目指す。前年度までに、Fibulin-4 がエラスチン架橋酵素リシルオキシダーゼ (LOX) の活性化に必須であることを明らかにした。しかし LOX の活性化が Fibulin-4 のすべての機能であるのかどうかは不明である。特に、Fibulin-4 の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Fbln4 SMKO) は上行大動脈瘤の疾患モデルとして用いられ、その疾患発症機序や薬物治療標的について多くの研究がされてきた。これまでに、Fibulin-4 が不足すると血管平滑筋細胞のメカニカルストレス感知機構に異常が生じること、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE) やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) によって大動脈瘤発症が予防できることなどが報告されている。これらが LOX 活性化不全に伴うエラスチンやコラーゲンの架橋不足によるものか、あるいは Fibulin-4 の別の機能を反映しているのかが次の重要な課題である。本年度は、LOX の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) を作成して Fbln4 SMKO と表現型を比較することを目指した。

次に、新たな弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の同定を目指して siRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングの系を構築することを目指した。もし弾性線維形成と同時に膠原線維 (コラーゲン線維) の形成も評価できれば、両者を別々にコントロールする機構の解明と「望ましい細胞外マトリックスの作り分け」技術に発展する可能性がある。そのため、線維芽細胞培養の弾性線維形成および膠原線維形成のための最適条件を検討した。

さらに、ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚を用いた加齢皮膚の弾性線維形成タンパク質の変化についての研究をまとめ、出版した。

2. 研究の計画

(1) LOX の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) の作製と解析

①Lox floxマウスの作製：定法に則り、Lox遺伝子の1つのエクソンの上流と下流にLoxP配列を挿入したプラスミドコンストラクトを作製し、ES細胞にエレクトロポレーションで導入する。薬物選択の後、相同組換えをおこしたクローンをPCRを用いて選択し、マウス胚にインジェクションしてキメラマウスを作製する。野生型マウスと交配してLox floxヘテロ

マウスになるものを選ぶ。

②Lox SMKOマウスの作製：Fbln4 floxマウスとSM22-Cre Tgマウス（平滑筋細胞にCreリコンビナーゼを発現するマウス）を掛け合わせたFbln4 SMKOマウスが上行大動脈瘤モデルマウスとして使われてきた。Lox floxマウスをSM22-Cre Tgマウスと掛け合わせ、Lox flox/flox, Cre(+)マウスおよびLox flox/ Δ , Cre(+)マウスを作製する。

③Lox SMKOとFbln4 SMKOの表現型の比較：Lox SMKOにもFbln4 SMKOと同じく上行大動脈瘤が生じるのかどうかを調べる。さらに、電子顕微鏡を用いて動脈弾性板の形成を両者で比較する。RNAseq解析により両者および野生型マウス大動脈の遺伝子発現の違いを比較検討する。

④分子標的の検討：もしLox SMKOマウスでも上行大動脈瘤が生じる場合は、Fbln4 SMKOマウスで報告されているのと同様にアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACE）やアンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）によって大動脈瘤発症が予防できるかどうかを調べる。

(2) 弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の網羅的スクリーニング

①ヒト皮膚線維芽細胞の96穴プレートにおける弾性線維形成条件、膠原線維形成条件の検討：培地の種類、血清濃度、培養期間をさまざまに設定し、抗エラスチン抗体と抗コラーゲンtype 1抗体を用いて弾性線維と膠原線維それぞれの形成条件を探る。

②遺伝子ノックダウン条件の検討と抗体の作製：ノックダウンすると弾性線維が形成されなくなることを以前見出したLTBP-4遺伝子のsiRNAを用いて、96穴プレートでのノックダウン条件を検討する。またsiRNAライブラリーは1万種類以上の遺伝子についてそれぞれ3つのsiRNAから構成されているので、大量の抗体を必要とする。抗エラスチン抗体はメーカーから大ロットで購入できたが、抗コラーゲンtype 1抗体はメーカーが納品した大ロットのものが低タイターであったため、新たにラットコラーゲンtype 1をニワトリに免疫し、抗原カラムを用いて抗体を精製した。

(3) ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚における弾性線維形成因子発現データの解析とまとめ

昨年度までに若年皮膚5例、加齢皮膚18例、日光弾性線維症皮膚8例のサンプルを用いてFibulin-4, 5, LTBP2, 4, Fibrillin-1, エラスチン、コラーゲンtype 1の蛍光免疫染色を行った。染色のパターンからカテゴライズし、弾性線維形成因子の発現の変化の法則性を探った。

3. 研究の成果

(1) LOX の平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) の作製と解析

相同組換えで生じたLox floxアレルが生殖系列に入ったヘテロマウスを得た。このマウスとSM22-Cre Tgマウスを掛け合わせ、Lox flox/flox, Cre(+)マウスおよびLox flox/null, Cre(+)マウスを得た。

Lox SMKOマウスはFbln4 SMKOマウスと同様、上行大動脈瘤を来した。Fbln4 SMKOはFbln4の片側アレルをnullにしないと大動脈瘤にならなかったが、Lox SMKOはflox/floxでもflox/nullでも大動脈瘤を発症した。

Lox SMKO, Fbln4 SMKO, WTマウスそれぞれの大動脈における遺伝子発現の変化については、いくつかの週齢について現在検討中である。

薬物投与による大動脈瘤発症予防についても現在検討中である。

(2) 弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の網羅的スクリーニング

ヒト皮膚線維芽細胞の96穴プレートにおける最適な弾性線維形成条件、膠原線維形成条件はそれぞれ異なることが明らかとなった。1回のスクリーニングで96穴プレート300枚以上を染色する必要があるため一度で二重染色をする予定であったが、別々のスクリーニングを行うこととした。

新たに作成したニワトリ抗コラーゲンtype 1抗体は市販の抗コラーゲンtype 1モノクローナル抗体と同じ染色パターンを示し、十分にスクリーニングに用いることができることがわかった。

(3) ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚における弾性線維形成因子発現データの解析とまとめ

加齢に伴いいずれの弾性線維形成因子も減少傾向にあるが、Fibrillin-1は比較的保たれていた。一貫してLTBP-4が最も減少しており、ほとんど検出されないサンプルも多かった。日光弾性線維症ではエラスチン、Fibrillin-1、LTBP-2、Fibulin-4が増加しており、Fibulin-5が増えるタイプ（5例）と減少するタイプ（3例）の2つに分類できることが明らかとなった。すべての日光弾性線維症の症例でLTBP-4の染色が消失していた。

4. 研究の反省・考察

(1) LOXの平滑筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (Lox SMKO) の作製と解析

Lox SMKOマウスでもFbln4 SMKOマウスと同様に上行大動脈瘤ができたことは、Fbln4 SMKOマウスの大動脈瘤が局所のLOX活性低下を介している可能性を示唆しており、LOX活性化以外にFibulin-4の機能があるかどうかはまだ結論づけられない。RNAseqによる網羅的な遺伝子発現解析、同じ薬物による発症予防が可能かどうかを調べることで、結論を出す予定である。

(2) 弾性線維形成因子、弾性線維形成抑制因子の網羅的スクリーニング

siRNAライブラリーは購入済であるが、条件検討と大量の抗体の準備に時間がかかったためスクリーニングを期間内に行うことができなかった。しかし今は準備が整ってスクリーニングを開始するところである。

(3) ヒト加齢皮膚と日光弾性線維症皮膚における弾性線維形成因子発現データの解析とまとめ

データをまとめた結果、加齢皮膚での弾性線維再生能消失の原因の1つはLTBP-4の発現減少であること、日光弾性線維症で正常な弾性線維が作られずに異常なエラスチンの沈着になることの原因の1つはやはりLTBP-4の消失であることが考えられた。この成果は***Acta Derm Venereol* 101(1):adv00372, 2021**に発表した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Makino T*, Kagoyama K, Murabe C, Nakamura T*, Shimizu T. Association of Development of Solar Elastosis with Increased Expression of Fibrillin-1, LTBP-2 and Fibulin-4 in Combination with Decreased Expression of LTBP-4. ***Acta Derm Venereol* 101(1):adv00372, 2021.** doi: 10.2340/00015555-3738. (*は責任著者)

(2) 口頭発表

該当なし

(3) 出版物

該当なし

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	大 阪 成 蹊 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	効果的なレポート論題に関する実証研究	研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①レポート ②論題 ③ライティング ④アカデミックライティング ⑤論証型レポート ⑥カリキュラムマップ		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
成 瀬 尚 志	大阪成蹊大学 経営学部	准 教 授	研究代表 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
笠 木 雅 史	広島大学 大学院 人間社会科学研究科	准 教 授	文献調査担当
児 島 功 和	山 梨 学 院 大 学 経 営 学 部	准 教 授	効果分析担当
崎 山 直 樹	千 葉 大 学 大 学 院 国 際 学 術 研 究 院	准 教 授	効果分析担当
高 橋 亮 介	東 京 都 立 大 学 人 文 社 会 学 部	准 教 授	論題分析担当
片 山 悠 樹	愛 知 教 育 大 学 教 育 学 部	准 教 授	調査設計担当

効果的なレポート論題に関する実証研究

1. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、大学教員に対する web 調査およびインタビュー調査を通して、大学で実際に出题されているレポート課題に関して以下の点を明らかにすることである。

①初年次教育として設定されているアカデミックライティング指導科目（AW科目）においてどのようなレポートのタイプが指導されているかを明らかにすること。また、その中で求められている「論証型レポート」としてどのようなことが求められているかを明らかにすること。

②実際に出题されているレポート課題を収集し、教員のねらいに応じたタイプに分類すること。

③上記の分類に基づいて、それぞれの論題タイプにどのような特徴があるのか、また、そのタイプがどのような評価と親和性が高いかについて明らかにすること。

(2) レポート論題の多様性を踏まえた上での提言

レポート課題に関して教員のねらいを学生に伝えやすくするための分類方法に関する提言を行なう。

2. 研究の計画

(1) 調査設計

①2020年度に実施した予備調査を踏まえ、効果的な論題分析のための仮説形成を具体的に行ない、本調査に向けて質問項目を修正する。

②サンプリング調査のために、偏差値や学問分野を考慮し、調査対象の選定を行なう。

③web調査対象者の中からインタビュー調査を実施し、どのようなレポート論題を出題しているかについて、そのねらいとともに調査する。また、アカデミックライティング指導科目担当者には、その科目でどのようなタイプのレポートを書かせることを目指しているかについても調査する。

(2) 論題分析

①AW科目でどのようなタイプのレポート課題が求められているかを調査し分類する。

②インタビュー調査を通して、講義科目でのレポート論題に関して教員側のねらいを調査し分類する。また、そのねらいの分類に基づいて、web調査で収集した論題の分類を試み、実質的に機能する論題の分類について検討する。

3. 研究の成果

(1) 調査概要

研究メンバーの学問分野（哲学、歴史学、教育学）を専門にする大学教員にレポート課題に関するweb調査の依頼をし、そのweb調査の中で聞き取り調査への依頼を行なった。web調査は2021年11月～12月に実施し、129件の回答があった。また、インタビュー調査は2022年2月～3月に実施し、37名に対して半構造化インタビューを行なった。

(2) AW 科目の調査

①AW科目担当教員4名（3大学）にインタビュー調査を行なった。また、大学教育学会誌で取り上げられていた授業実践2事例を加え5事例を分析した。調査から求められるレポートのタイプを分類する観点として「テーマ設定」「情報収集」「構成についての指示」「論証に関する具体的な指示」の4つの観点でそれぞれの事例を特徴づけられることがわかった。すべてに共通していたのは何らかの形の「論証」が求められていたことであり、この点はAW科目で指導されるのが「論証型レポート」であることを示している。

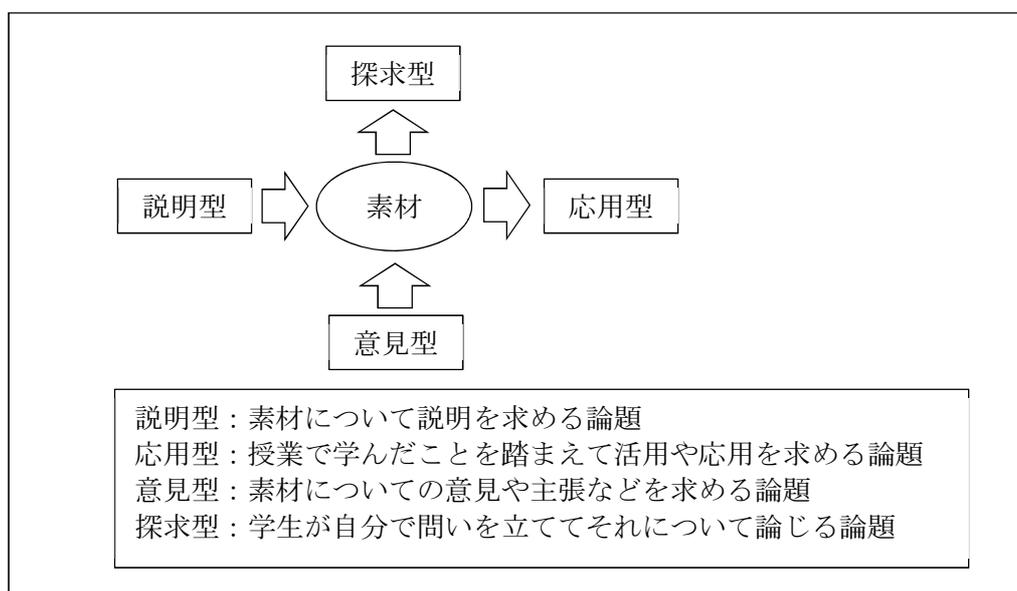
	事例 A	事例 B	事例 C	事例 D	事例 E
テーマ設定	自由	自由	教員が設定 (是非型)	教員が設定 (是非型)	教員が設定 (是非型)
情報収集	学生／教員	学生／教員	学生／教員	学生	学生／教員
構成についての指示	具体的な指示あり	具体的な指示あり	具体的な指示あり	具体的な指示あり	具体的な指示あり
論証に関する具体的な指示	根拠の提示	複数のパターンを提示	反論に対する反論の要求	反論に対する反論の要求	反論に対する反論の要求

②AW科目で「論証型レポート」が指導されるとしても、そこで求められているレポートの型は多様であった。事例CDEのように反論に対する反論を求めるケースもあれば、単に「根拠の提示」だけが求められているケースもあった。

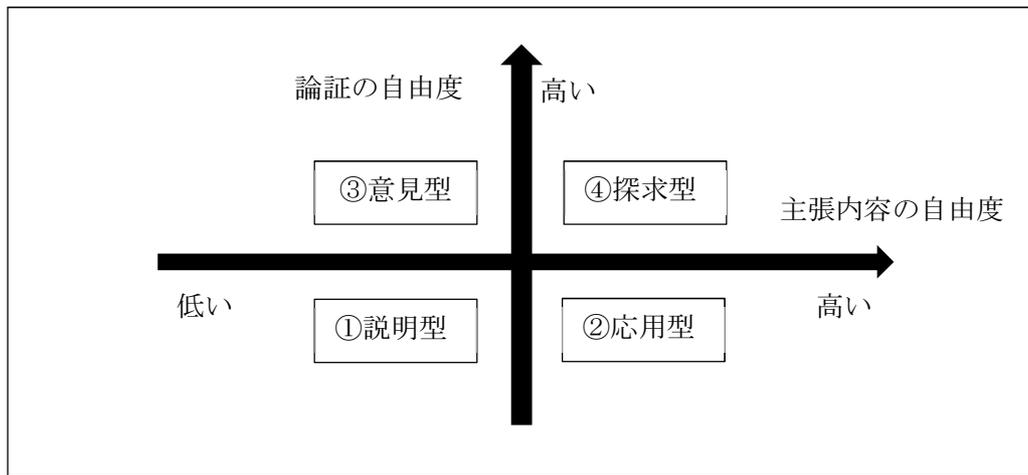
(3) 文系講義科目のレポート課題の論題の分類

①論題を分類するに当たって文系の講義科目担当教員37名の教員にインタビュー調査を行った。その中で教員のねらいは、レポート課題で型を身につけさせることに重きを置く「型重視派」と、レポート課題では授業で学んだことを学生が応用できているかどうかを重視する「応用重視派」の大きく2つに分かれることがわかった。

②web調査で収集した91論題も含め、指示文レベルで分析した結果、論題は（上記の2分類を含めた）以下の4つのタイプに分類できることが分かった（以下の「素材」とは主に授業で説明されたことを指す）。



たとえば、「Aについて説明せよ」という論題は説明型に当てはまるが、この場合、レポートの内容は指定されたAに関するものでしかなく、その点で（主張）内容の自由度は非常に低い。一方、応用型に当たる「Bの事例を挙げ、なぜそれがその事例となるか説明せよ」という論題の場合、事例は具体的なものであるため自由度が高い（これを主張内容の自由度とする）。一方、根拠の部分に関しては、授業で説明されたことが根拠となるため自由度は低い（これを論証の自由度とする）が、それゆえ、この応用型は授業の理解度を確認するには有効であると言える（根拠の部分が固定されることで評価がしやすくなるため）。このように「主張内容の自由度」と「論証の自由度」という2つの観点で整理すると、先の4つのタイプの論題は下記のようにプロットできることがわかった。



(4) レポート課題の分類に関する提言

①すでに先行研究でも指摘されていたが、本研究の調査でも、教員のねらいが学生にうまく伝わっていなかったケースや、教員ごとに求められるレポートのタイプが異なることで学生が教員のねらいを誤解していたケースがあることがわかった。こうした問題を解決するためにも多様なレポート論題を分類することが必要であることが分かった。

②本研究で提示した4分類をベースに、「アカデミックレポート」と「学習レポート」という2つの名称を提案したい。アカデミックレポートはAW科目で指導されるタイプの論証型レポートのことである。卒業論文もこの論証型にあたることから、初年次教育としてのAW科目と卒業論文で求められるタイプは一貫していることが分かる。一方、学習レポートは4分類で言う「説明型」と「応用型」にあたる。これらの論題は必ずしも論証（の工夫）が求められているわけではなく、見出しなどの形式に関してもアカデミックライティングで求められているタイプのレポートとは異なっている。しかしながら、応用型に関して言えば、授業の理解度を確認するために効果的な論題であることから、講義科目のレポート課題で求められるべきものであると言える。しかしながら、これらはアカデミックレポートとは異なるという理解が、教員にも学生にも必要である。そのために、「アカデミックレポート」と「学習レポート」という分類は教員のねらいをうまく学生に伝えるためにも、また、学生が教員のねらいを理解するためにも有効なツールになると考えられる。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の考察

①AW科目と講義科目でのレポートのタイプの違い：AW科目で指導されているレポートのタイプと講義科目で求められるレポートのタイプが異なっている（ケースがある）ことは、教員間では周知の事実ではあったがこれまで問題視されてこなかった。しかし、初年次で学んだレポートの書き方が、その後の講義科目で出題されるレポートを書く際に活かすことがそもそもできないのであればそれは大きな問題である。また、両者が別物であるとするならばAW科目を指導する教員も学生にそのことを伝えるべきである。しかしながら、現状ではその二つのタイプのレポートの違いに関して分類する基準がなかったため、ひとくくりに「レポート」と呼ばれていたのが現実である。しかし、実際に調査すると、AW科目で指導されているいわゆる「アカデミックライティング」では論証の工夫が求められているが、講義科目でのレポート課題（の一定数）はそうした論証の工夫はそもそも求められていないことがわかった。

②4分類の有効性：こうした違いは学生に混乱を生じさせるだけではない。教員自身もどのような論題を出せばどのような評価が可能となるかを理解していないことも明らかになることになった。これまでレポート課題の分類を目指した先行研究はいくつかあったが、実際の出題者のねらいをベースとし、論証の自由度と主張内容の自由度という二つの軸で分類することができたこの4分類は、実際に出題されている91論題を分類することができ、有効であることがわかった。

③カリキュラムマップの実質化に向けて：本研究で示された4分類はある程度の段階性を有

している。探求型は非常に自由度が高く、卒業論文で求められることそのものである。学生自身が問いを立てることは非常にハードルが高いが、卒業論文を執筆する際にはかならず身につけておかないといけないスキルである。一方、説明型や応用型は講義科目でのレポート論題として数多く見られたが、そうした論題にしか取り組んでいないのであれば、学生が問いを立てる能力は養われない。つまり、卒業論文で問いを立てることが求められているならば、どこかでその能力を養わないといけないのである。現在、多くの大学では、カリキュラムにおける各科目の目標を整理するためにカリキュラムマップが作成されている。多くの場合、どの科目でどの能力が養われるかを整理したものである。こうしたカリキュラムマップは、カリキュラムを通して体系的にゴールとなるディプロマポリシーで求められる能力を身につけるために非常に重要である。しかしながら、そのカリキュラムマップがどれほど実質的に機能しているかに関してはまだまだ改善の余地があるのが現状であろう。こうした現状において、本研究で示された論題の4分類はあらたなカリキュラムマップのモデルとして機能すると考えられる。つまり、各科目で出題する論題が4つのタイプのうちのどれであることを示すことで、卒業論文執筆までのステップを明確にするのである。現時点でそうした論題をベースにしたカリキュラムマップについてはまったく検討されていないが、卒業論文を教育上のゴールとするのであれば、有効な選択肢となり得るだろう。また、従来型の養う能力によるマッピングとは異なり、具体的なレポート論題としてのマッピングのため、各授業に対する影響力も高く、成否に関する評価もしやすくなると考えられる。

(2) 研究の反省点

分野ごとの回収率のばらつきがあったため、分野ごとの統計的分析にまでいたらなかった点が改善の余地として挙げられる。また、web調査において教員のレポート観（レポートにおいて重視していることや評価する際のポイントなど）を調査しているが、その教員が出題している論題を本研究で見いだした4分類に基づいて分析した上で、その教員のレポート観とどういった関係があるのかについてはまだ十分分析できていないため、今後継続して分析していきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①成瀬尚志「レポート課題を軸に考える授業設計—剽窃を防ぎ、学生を思考にいざなうレポート課題の設定—」2021年度第1回中京大学FDセミナー、2021年9月14日

②成瀬尚志「ファシリテーションから考えるレポート課題」第4回ファイシリテートされる・する研究会、2022年2月18日

(3) 出版物

なし

PDI 酸化酵素 GPx7/8 の酸化還元依存的な構造変化の解明 —時間分解赤外分光法に立脚した GPx7/8 の動的構造解析—

1. 研究の目的

タンパク質分子は細胞内で新生された後、翻訳後修飾として分子内ジスルフィド結合の導入により正しい立体構造を形成する。ジスルフィドは、PDI (protein disulfide isomerase) と PDI 酸化酵素の連携によって正しく導入されることで、タンパク質分子の品質管理が行われている。図 1(a) に示す GPx7/8 は比較的近年に発見された PDI 酸化酵素であり、触媒機能に関わるジスルフィド結合が分子内の離れた位置 (11 Å 離れたシステイン残基間) で架橋されるため、GPx7/8 ではジスルフィドが起こす大きな構造変化が予見されている。

これまでに代表者は光刺激を用いて、分子内でジスルフィド結合形成させることによって、タンパク質分子構造変化を誘起させる手法を報告している (Kuroi (3rd) et. al, *Chem. Commun.*, **53**, 10014–10017 (2017), Kuroi et. al, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 1137–1144 (2020))。この方法では、図 1(b) に示すように、タンパク質分子のシステイン残基のチオール (SH) 基に一酸化窒素 (NO) を付加することで、ニトロシル (SNO) 基とする前修飾を用いる。SNO 基は波長 340 nm 付近の紫外光によって、NO が光解離を起こして、その結果、残された硫黄ラジカル同士が近傍でジスルフィド結合を形成する。したがって、光励起によって分子内ジスルフィド結合形成を誘起できることになる。光刺激の利点から、ジスルフィド結合形成に伴う分子構造変化の精緻な分光学的解析や構造変化の時間分解測定が可能になる。

本研究では、光でジスルフィド結合を形成させる上記の技術を GPx7/8 に適用し、GPx7/8 のジスルフィド結合に誘起される構造変化ダイナミクスを赤外分光法から明らかにする。本研究では、2021 年度は、以下の (1) (2) を目的に定めて研究を進めた。

(1) GPx7/8 の構造変化を光誘起で起こす系の構築

GPx7/8 のシステイン残基に一酸化窒素 NO を付加させ、実際に紫外光励起でジスルフィド結合形成が起こる実験系を確立する。

(2) 赤外分光計測系の構築

光誘起赤外差スペクトルが取得可能な測定系を構築する。そのために、まずは以前に代表者が報告した糖結合タンパク質ガレクチンにおける、光誘起ジスルフィド結合形成による構造変化の結果を再現することで、測定系の評価を行う。

2. 研究の計画

本研究は、共同研究者である関西学院大学理学部の金村氏の協力を得ながら遂行を行う。GPx7/8 の試料作成は金村氏が関西学院大学で行い、その他の SNO 基の導入・分光測定などは代表者が神戸学院大学にて行った。以下、目的で述べた (1)、(2) について研究計画を述べる。

(1) GPx7/8 の構造変化を光誘起で起こす系の構築

GPx7/8 への SNO 基の導入・光誘起ジスルフィド結合形成の実験系の確立を行う。GPx7/8 への NO 付加においては、先行研究に倣い、小タンパク質であるメタロチオネイン (metallothionein; MT) を用いた NO 転移反応を用いた。亜硝酸ナトリウムにより NO 付加の前処理をした MT (SNO-MT) を GPx7/8 と混合することで、NO 基が SNO-MT より転移して、GPx7/8 に SNO 基が導入される。GPx7/8 が実際に SNO 化されたかは、紫外可視吸収スペクトルにおいて、SNO 基に由来する波長約 334 nm を中心とするブロードな吸収バンドの出現によって確認を行う。

SNO 基を導入した GPx7/8 が実際に光励起により、実際にジスルフィド結合形成が行われていることの確認も行う。光励起には、光源として波長 365 nm に強い光強度を持つ水銀キセノンランプスポット光源 (LC8 (浜松フォトニクス)) を用いる。光照射後に SNO 基由来の吸収帯が消失することで、NO の光解離が起こっていることを確認可能である。また、SH 検出試薬であるエルマ

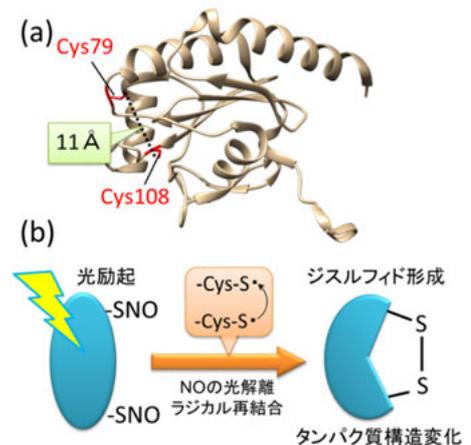


図 1 (a) GPx8 の立体構造、分子内システイン残基の位置と距離も示す。(b) NO の光解離を用いたジスルフィド結合の形成。

ン試薬を用いて、光励起後に SH 基の消失を見ることでジスルフィド結合の形成を間接的に確認可能である。

(2) 赤外分光計測系の構築

赤外分光器 Nicolet6700 を用いて、測定系の構築を行う。赤外吸収測定は透過型で行う。前述のように、測定系の評価のために、測定試料として SNO 化されたガレクチンを用いる。タンパク質試料溶液を乾燥させて、乾燥フィルム状にしてフッ化カルシウム製の窓材に貼り付けた物を測定試料とする。GPx7/8 でも同様な手法で赤外吸収測定を行っていく。(1) で述べた紫外光スポット光源からの紫外光 (約 140 mW) をレンズによって試料フィルム上に集光させて、光励起前後の赤外吸収差スペクトル測定を行う。得られる赤外吸収差スペクトルが、ジスルフィド結合形成で誘起される構造変化の情報を反映する。なお、安定した水蒸気レベル下での測定が必要であったため、乾燥空気発生機を購入して、乾燥空気下で測定を行う。

3. 研究の成果

(1) GPx7/8 の構造変化を光誘起で起こす系の構築

・ SNO 化 GPx7 (SNO-GPx7) の調製

共同研究者の金村氏が精製した還元型 GPx7 について SNO 化修飾を試みた。その結果、図 2 (およびインセット内) の実線に示すように、SNO 基由来の吸収帯が 334 nm 付近に確認された。GPx7 単体の吸収スペクトルは図中の破線 (GPx7) である。334 nm における SNO 基の吸光度と GPx7 由来の吸光度 (280 nm) の比から、それぞれの吸収係数を用いて、GPx7 に付加された SNO 基の当量を求めると 2.4 等量となった。すなわち、GPx7 の 2 つの SH 基の完全な SNO 化が確認された。

・ SNO-GPx7 への光照射

SNO-GPx7 へ紫外光照射を行うことで、期待通りに NO が光解離を起こして分子内ジスルフィド結合が組まれるのか検討を行った。光照射後の SNO-GPx7 の吸収スペクトルを図 2 の点線 (+UV) で示す。SNO 基由来の吸収帯 (334 nm) がほぼ消失したことから、NO が光解離したことが分かった。また、照射後は 250 nm 付近の吸光度が増大していた。この領域では、ジスルフィド結合が吸収を持つため、吸光度の増大は光照射後のジスルフィド結合の生成を示唆していた。

次に、エルマン試薬を用いて光照射後の SNO-GPx7 の持つ SH 基の検出試験を行った。エルマン試験では、SH 基の量に比例して、410 nm に吸収ピークが出現する。図 3(a) にその結果について示す。図中で -UV と記した結果 (黒線) は、GPx7 単体で測定した結果であり、分子中の 2 個の SH 基が 410 nm における吸収ピークとして検出されている。+UV と記した結果 (灰線) は、SNO-GPx7 に光照射後における結果であり、SH 基はほぼ無いことが分かる。図 2 で示したように、光照射によって SNO 基は消失するため、光照射後に SH 基が検出されなかったことは、ジスルフィド結合が形成されていることを示唆している。

しかしながら、ジスルフィド結合は GPx7 分子間で組まれる可能性も否定できない。そこで、期待通りにジスルフィド結合が分子内で組まれることを確認するために、SNO-GPx7 について光照射前後で非還元 SDS-PAGE を行った (図 3(b))。非還元 SDS-PAGE ではジスルフィド結合で会合した多量体も検出される。図 3(b) の結果は、光照射前後でいずれも 15-20 kDa に単一のバンドを示しており、光照射によってジスルフィド結合を介した分子間会合体は検出されていないこ

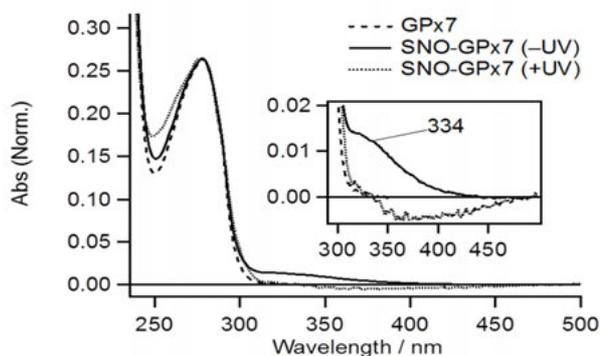


図 2 GPx7, 紫外光照射前後 (±UV) の SNO-GPx7 の吸収スペクトル。280 nm の吸光度で規格化してある。インセットには SNO の吸収帯付近の拡大図を示す。破線にて SNO 化前の GPx7 の結果も示す。

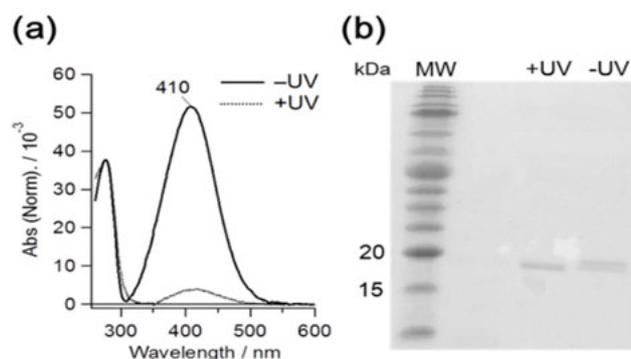


図 3 (a) エルマン試薬と GPx7 と混合させた後の吸収スペクトル。410 nm の吸光度から SH 基量を定量可能。-UV が GPx7 の結果、+UV が SNO-GPx7 に光照射した物の結果。(b) SNO-GPx7 の非還元 SDS-PAGE の結果。

とを示している。従って、ジスルフィド結合は分子内で組み立てられていることが示唆された。

以上の結果から、SNO-GPx7 への光照射によって、期待通り分子内ジスルフィド結合が組み立てられていることが強く示唆された。

(2) 赤外分光計測系の構築

赤外分光器 Nicolet6700 を用いて、GPx7/8 の分子内ジスルフィド結合による構造変化を、赤外差スペクトルとして検出するための測定系の構築を行った。紫外線スポット光源からの紫外光をレンズによって、赤外分光器の試料室内部の試料部に集光させて、SNO 化したヒトガレクチン 1 (SNO-hGal-1) 試料の光照射を行った。光照射前後での差スペクトル (「光照射後」 - 「光照射前」) を取ることにより、SNO-hGal-1 の光誘起赤外差スペクトルを得た。その結果、図 4 左のような差吸収スペクトルを得た。この結果を、既報の結果 (図 4 右) と比較すると、2 次構造変化を示すピークが同じ位置に出ており (1695(-), 1666(+), 1647(-), 1626(-)), その他にカルボキシ基の出現 (1728(+)), SNO 基の消失 (1508(-)) などのピークも再現されている。したがって、構築した測定系によって、光誘起ジスルフィド結合形成による赤外差スペクトルを取得できることが確認できた。

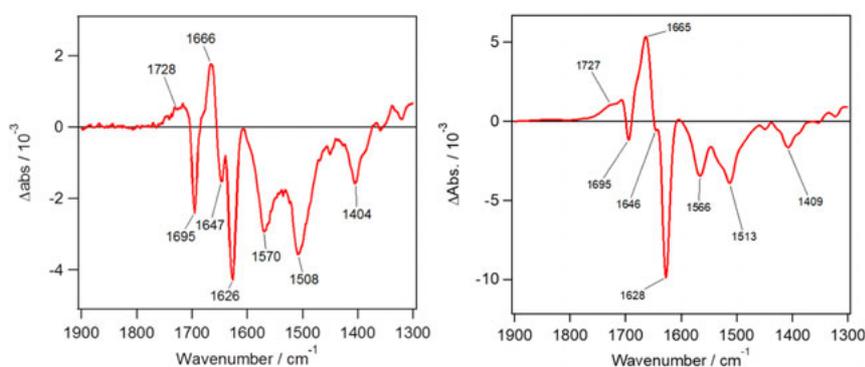


図 4 SNO-hGal1 の光誘起赤外差スペクトル。左が今回の測定結果であり、右は既報 (Kuroi. et. al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 1137-1144 (2020)) の結果。

4. 研究の反省・考察

本研究では、GPx7/8 について分子内ジスルフィド結合形成によって起こる構造変化の検出、更には、その時間分解検出を目的としている。そのために NO の光解離を利用した、光刺激ジスルフィド結合形成を用いた手法を適用する。研究計画(1)では、実際に GPx7 の SNO 化、および期待通りに紫外光による光照射で分子内ジスルフィド結合が形成されることを示すことが出来た。しかしながら、GPx7 の試料溶液に対して光照射を行う中で、GPx7 溶液が白濁する様子も見られた。GPx7 が分子内ジスルフィド結合を形成すると安定性が低下するのかもしれない。または、近年では、タンパク質分子が起こす相分離現象 (liquid-liquid phase separation; LLPS) が盛んに議論されているが、溶液の白濁も分子内ジスルフィド結合を形成した GPx7 が LLPS を起こしていることに起因する可能性もある。SNO 化した GPx7 (SNO-GPx7) の光照射条件等について、上記の LLPS の可能性も含め、更に今後検討していく必要がある。また、GPx8 についての SNO 化の達成には至っておらず、GPx8 についても検討が必要である。

研究計画(2)では、光照射赤外誘起赤外差スペクトルを取得するために測定系の構築と、既報の SNO 化ガレクチン試料を用いた測定系の評価を行った。構築した測定系で得られた SNO 化ガレクチン試料の光誘起赤外差スペクトルは、既報の結果を再現することを確認できた。GPx7/8 でも、ガレクチンと同様な赤外差スペクトルが得られることが期待される。その結果をもとに、ジスルフィド結合形成によって起こる GPx7/8 の構造変化について、詳細に議論していくことが可能となる。しかしながら、今後、更に光照射後の時間分解赤外測定を行うにあたって、光照射条件が不十分であることも露呈した。現状の水銀キセノンランプ光源 LC-8 では 100 ミリ秒程度の光の導入では十分な信号強度が得られず、集光が十分ではない課題が見出された。時間分解測定を行うにあたっては、タンパク質構造変化の速度に比べて十分に短時間の光照射が必要になる。そのために、今後は試料の光励起用の光源として、指向性・集光性に優れる高出力の紫外レーザー光源を用いる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、山口宏、齋尾智英、齋尾智英、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹、「ガレクチンの酸化還元機能制御の分子構造基盤」日本蛋白質科学会年会（2021）

② 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、齋尾智英、山口宏、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹、「酸化還元制御によるヒトガレクチン 1 の構造機能調節の理解」日本分子生物学会年会（2021）

(3) 出版物

なし

AA アミロイドーシス発症制御因子の解明

—アミロイドーシスの病態に関わる糖鎖合成制御因子と翻訳後修飾—

1. 研究の目的

(1) アミロイド前駆タンパク質の変異や翻訳後修飾と糖鎖に着目し、AA アミロイドーシスの進展への関与を調べる。病理学的な解析から、AA アミロイドーシス患者組織で、翻訳後修飾を受けた SAA 分子や細胞外マトリクス成分である硫酸化糖鎖の一種、グリコサミノグリカン (GAG) が検出されていることから、これらがアミロイドーシスの病態に深く関わる可能性が示唆されているが、その分子基盤は不明であるため、本研究で明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 翻訳後修飾された SAA と GAG 鎖との相互作用メカニズムの解明

① 大腸菌発現系により得たリコンビナントの SAA タンパク質、および SAA 分子中でアミロイド原性が高い N 末端領域からなる合成ペプチドを用い、SAA の化学修飾 (アセチル化・カルバモイル化・酸化) がアミロイド線維形成能や GAG 鎖との相互作用に及ぼす影響を、速度論的・熱力学的な解析手法を用いて調べた。

② アミロイド線維が沈着した *EXTL2* ノックアウトマウスの組織やマクロファージ由来の GAG を高速液体クロマトグラフィーで生化学的に解析した。

(2) GAG 鎖を介した AA アミロイドーシス発症に関わる SAA の翻訳後修飾の同定

解析された様々な翻訳後修飾を受けた SAA 分子のうち、GAG 鎖と相互作用のあるものについて、アミロイド線維を形成させ細胞毒性を評価した。また、二次構造の差異が認められた試料について、コンフォメーション特異的抗体を利用した凝集体の立体構造評価を行い、さらに透過型電子顕微鏡 (TEM) を利用した凝集体の形態観察を行った。

(3) AA アミロイドーシス患者サンプルを用いた *EXTL2* の発現解析

ヒト疾患においても *EXTL2* 遺伝子の発現が重要な役割を果たすことを推測するために、AA アミロイドーシス患者サンプルとコントロール検体を用いて *EXTL2* 遺伝子の発現を解析した。

3. 研究の成果

(1) 翻訳後修飾された SAA と GAG 鎖との相互作用メカニズムの解明

① リコンビナントタンパク質およびフラグメントペプチドの化学修飾 (アセチル化・カルバモイル化・酸化) を行い、化学修飾されたアミノ酸を質量分析により同定した。我々の実験条件下では SAA タンパク質のカルバモイル化は分子全体にわたって 5 か所で起こっていたが、SAA ペプチドを用いた結果より、N 末端アミノ基のカルバモイル化のみで全長タンパク質と同様の線維形成挙動を示した。また、リコンビナントタンパク質には、その N 末端に余分なメチオニン残基が存在し、それが酸化を受けるが、N 末端にメチオニンを含まない SAA ペプチドを用いた結果より、アミノ酸配列中の 17 および 24 残基目のメチオニン酸化が線維形成に大きく影響することが示唆された。

② アミロイド線維が沈着した *EXTL2* ノックアウトマウスの組織やマクロファージ由来の GAG を高速液体クロマトグラフィーで生化学的に解析した。*EXTL2* ノックアウトマウスの組織ではグリコサミノグリカンの量と硫酸化パターンが変化していること、特に、*EXTL2* ノックアウトマウスのマクロファージでは、内因性のダメージ関連分子パターンとして作用することが知られているデルマタン硫酸の合成が上昇していることがわかった。

(2) GAG 鎖を介した AA アミロイドーシス発症に関わる SAA の翻訳後修飾の同定

解析された様々な翻訳後修飾を受けた SAA 分子のうち、GAG 鎖と相互作用のあるものについて、アミロイド線維を形成させ細胞毒性を評価した。まず、MTT アッセイを用いてヒト胎児腎細胞 (HEK293) に対する毒性を評価したところ、SAA ペプチドのアセチル化やカルバモイル化修飾により線維形成能に差異が認められていたにもかかわらず、いずれも同様に濃度依存的な細胞毒性を示した。一方、LDH アッセイを用いて評価したところ、いずれの試料も HEK293 に対する毒性を示さなかった。そこで、アミロイド線維添加時の細胞の様子を顕

微鏡で観察したところ、MTTを加えたときにのみ細胞外にホルマザン結晶と思われる突起物が出現した。すなわち、アミロイド線維の非添加時には認められない異常現象が起こることから、アミロイド線維が細胞に対して「毒性」を示していると考えられるが、「細胞死」のような明確なものではないことが示された。

(3) AAアミロイドーシス患者サンプルを用いたEXTL2の発現解析

市販されている倫理審査承認済みのAAアミロイドーシス患者検体（腎臓：2検体、大腸3検体）を用いてEXTL2の発現を免疫組織染色およびリアルタイムPCR法を用いて調べた。コントロール検体ではEXTL2の発現が認められたが、AAアミロイドーシス患者検体ではEXTL2の発現が検出限界以下まで低下していることが免疫組織染色、リアルタイムPCR法によって明らかになった。

4. 研究の反省・考察

(1) SAAの翻訳後修飾の影響について

①SAAは生体内で主に高密度リポタンパク質（HDL）をはじめとする脂質に結合した状態で存在する。これまでに、別途、SAAの脂質結合に及ぼす翻訳後修飾の影響についても調べており、本研究のメインテーマではないが、AAアミロイドーシス発症制御因子を考える上で、脂質も欠くことのできない因子の一つであるといえる。

②タンパク質凝集体の形態と細胞に対する毒性については、他のアミロイド原性タンパク質において様々な議論がなされている。したがって、SAAの翻訳後修飾が細胞毒性に及ぼす影響を調べる以前に、SAAの凝集体がもたらす細胞毒性メカニズムを詳細に明らかにする必要がある。そのうえで、細胞に対する特異性なども考慮しながら、翻訳後修飾の影響について調べる。

(2) グリコサミノグリカン(GAG)の影響について

①これまでに、EXTL2ノックアウトマウスを用いて、EXTL2の発現低下によりアミロイドの沈着が促進する現象を見出している。ヒトにおいても、EXTL2の発現低下がアミロイドの沈着に関連するかどうかを調べるために、ヒトの臨床検体を用いてEXTL2の発現を調べる。2021年度に実施した実験により、AAアミロイドーシス患者の検体（倫理審査承認済の市販品）でEXTL2の発現が顕著に低下していることが示された。さらに、検体数を増やすために、神戸大学医学部附属病院腎臓内科との共同研究の実施を検討し、腎生検により採取した検体を解析するための倫理審査の手続きを行い、検体を解析する準備を整えた。

②SAAのアミロイド線維の形成促進の分子機構を調べる。研究代表者らは、非アルコール性脂肪性肝炎モデルを用いて、Ext12ノックアウトマウスにおいて野生型マウスよりも早い段階で肝細胞がんが発生することを明らかにしたが、この現象の原因は、Ext12欠損下で合成されるGAG鎖が炎症性サイトカインの産生に関わるマクロファージのToll-like receptor 4-NF κ B経路を直接活性化することである可能性を考えている（Nadanaka, S., *et al.* (2020) *FASEB J.* 34(6), 8385-8401)。Toll-like receptor 4が刺激されることによって、炎症誘発性サイトカインやSAAのプロセッシングに関わるインフラマソームの活性化がプライミングされることが報告されているため（Zhong, Z., *et al.* (2018) *Nature* 560, 198-203; Babelova, A. *et al.* (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 24035-24048）、この点に着目し研究を進める予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

田中将史 「SAA分子の特徴とアミロイド原性」 第8回日本アミロイドーシス学会学術集会、2021年11月

(3) 出版物

なし

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 —抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道—	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①炎症性腸疾患 ②腸内細菌叢 ③腸管免疫 ④ノバイオート		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	主 任 教 授	研究統括、細菌叢解析、細菌単離、動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	講 師	細菌叢・免疫細胞解析、動物実験
孫 安 生	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	助 教	細菌叢・免疫細胞解析、細菌単離、動物実験
池 内 浩 基	兵 庫 医 科 大 学 部 兵 医 学	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
内 野 基	兵 庫 医 科 大 学 医 学 部	准 教 授	臨床データの収集・解析
大 野 博 司	理 化 学 研 究 所 生 命 科 学 研 究 セ ン タ ー	チ ーム リ ー タ ー	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析の指導
加 藤 完	理 化 学 研 究 所 生 命 科 学 研 究 セ ン タ ー	研 究 員	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析
中 西 裕 美 子	理 化 学 研 究 所 生 命 科 学 研 究 セ ン タ ー	研 究 員	臨床サンプルの代謝産物解析

細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 — 抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道 —

1. 研究の目的

(1) 潰瘍性大腸炎 (UC) の発症にかかる異常細菌叢の関与を検討し、発症機構の解明を目指すことを目的としている。具体的には、潰瘍性大腸炎術後回腸囊炎を UC のモデルとして解析することを目的としている。

2. 研究の計画

- (1) 回腸囊炎患者の糞便における検討 (2021 年度までに収集したサンプルについての統合的解析)
- ① 検査時における抗菌剤 (シプロキサ) 投与の有無別に次の点についての検討を行う
 - ア alpha diversity, beta diversity と臨床スコア mPDAI との関係についての解析
 - イ 臨床スコア mPDAI および Calprotectin との相関を持つ細菌の同定
 - ウ 抗菌剤治療前後での細菌叢の変化の同定
 - (2) 回腸囊炎患者の細菌叢における pathobiont、symbiont の探索
 - ① アから得られた pathobiont、symbiont の候補菌の毒性に関する in vivo での検討

3. 研究の成果

- (1) 回腸囊炎患者の糞便における検討 (2021 年度までに収集したサンプルについての統合的解析)
- ① 検査時における抗菌剤 (シプロキサ) 投与の有無別についての検討

ア alpha diversity, beta diversity と臨床スコア mPDAI との関係についての解析

抗菌剤投与有無の区別なしでの total 165 サンプルの解析の結果

a. alpha diversity (Shannon) と mPDAI あるいは calprotectin との関連

alpha diversity と mPDAI とは $R=-0.21$, $p=0.007$ 、alpha diversity と calprotectin とは $R=-0.27$, $p=0.001$ でありそれぞれ優位な相関が認められた。回腸囊炎の重症度によって、細菌叢の多様性が減少することが明らかとなった。

b. beta diversity と mPDAI あるいは calprotectin との関連

beta diversity (Bray Curtis) とそれぞれの相関は、 $p=0.002$ (mPDAI)、 $p=0.016$ (calprotectin) と優位であった。これらのことから、回腸囊炎の重症度によって、細菌叢構成が変化することが明らかとなった。

エントリーの際に抗菌剤投与を受けていなかった症例 (101 サンプル) での検討

a. mPDAI と calprotectin の関連

初診時に抗菌剤投与を受けていなかった群にて、 $R=0.65$, $p<0.001$ と優位な相関が認められ、臨床所見と実際の炎症状態がリンクすることが明らかとなった。

b. alpha diversity と mPDAI あるいは calprotectin との関連

alpha diversity (Shannon) と mPDAI は $R=-0.21$, $p=0.038$ 、alpha diversity (Inverese Simpson) と calprotectin は、 $R=-0.2$, $p=0.047$ であり、それぞれ優位な相関が認められた。抗菌剤投与有無を区別しない検討と同様の結果であり、回腸囊炎の重症度によって細菌叢の多様性が減少することが明らかになった。

イ 臨床スコア mPDAI との相関を持つ細菌の同定 (Phylum, Family, Genus レベルでの検討)

抗菌剤投与有無の区別なしでの total 165 サンプルの解析の検討

Phylum での検討では、Firmicutes が mPDAI と負の相関 ($R=-0.19$, $p=0.015$)、Proteobacteria が正の相関 ($R=0.22$, $p=0.004$) を示した。Family での検討では、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Clostridiaceae 1, Ruminococcaceae, Veillonellaceae が mPDAI と負の相関と示し、Enterobacteriaceae, Actinomycetaceae, Saccharimonadaceae が mPDAI と正の相関を示した。Genus での検討では、[Ruminococcus] gnavus group, Bifidobacterium, Clostridium sensu stricto 1 が mPDAI を負の相関を示した。Gemella, Rothia が mPDAI と正の相関を示した。

エントリーの際に抗菌剤投与を受けていなかった症例での検討

基本的に抗菌剤投与有無の区別なしでの検討と同じ結果であった。Phylum では、

FirmicutesがmPDAIと負の相関、ProteobacteriaがmPDAIと正の相関を示した。Familyでの検討では、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Ruminococcaceae, ErysiplotrichaceaeがmPDAIと負の相関と示し、PasteurellaceaeがmPDAIと正の相関を示した。Genusでの検討では、[Ruminococcus] gnavus group, BifidobacteriumがmPDAIを負の相関を示した。FusobacteriumがmPDAIと優位に正の相関を示した。

ウ 抗生剤治療前後での細菌叢の変化の同定

エントリー時に抗生剤の投与を受けていなかった21人の回腸囊炎患者について、抗生剤（シプロキサ）による治療前後での細菌叢変化と、治療効果との相関について検討を行った。その結果、alpha diversity (Shannon)は、治療効果と関係なく、効果ありと、効果なし群で両者ともに減少傾向を示しており、優位な差は認められなかった。Phylumレベルでの検討にて、Firmicutesが、治療奏効群にて優位に抗生剤治療後に増加し、Proteobacteria、Fusobacteriaが優位に減少した。これらの結果と前述の結果（回腸囊炎のmPDAIと相関する細菌変化）を合わせると、Firmicutesの減少、Proteobacteriaの増加が回腸囊炎の原因である可能性を強く示唆していると考えられた。

(2) 回腸囊炎患者の細菌叢における pathobiont、symbiont の探索

①アから得られたpathobiont、symbiontの候補菌の毒性に関するin vivoでの検討

(1)①から、Proteobacteria、Fusobacteriaに属する細菌が、pathobiontの候補と考えられた。したがって、それぞれに属する細菌を単離培養し、マウスへの投与実験にてそれらの病原性についての検討を行った。マウスは予め抗生剤にて常在菌を消失させ、その後、単離された候補細菌を移植し、約30日後にマウス大腸の粘膜固有層における炎症性細胞の数、炎症性マーカーについての検討を行った。その結果、Fusobacteriaに属する細菌がマウスの大腸にて生着し、その増加により炎症性細胞数が増加することを見出した。しかしながら、炎症マーカーの上昇は認められなかった。symbiontの候補細菌として、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceaeに属する細菌が候補として挙がり、それらを分離した。それらをマウスへの投与実験によって、炎症抑制作用の検討を行ったが、残念ながら、優位に炎症を抑制するとの結果を得ることは出来なかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 回腸囊炎患者の糞便における検討（2021年度までに収集したサンプルについての統合的解析）

①今回の検討から、回腸囊炎の発症原因としての細菌群の有力候補を得ることが出来た。これらの結果は欧州での結果と同様であることから、さらなる検討によって、日本のみではなく、世界レベルにおける原因細菌の同定に向かうことが出来ると考えられる。本施設は、炎症性腸疾患の治療において日本有数のハイボリュームセンターであることから、引き続き解析を行い、世界へ重要な発信ができるものとする。

(2) 回腸囊炎患者の細菌叢における pathobiont、symbiont の探索

①我々の研究施設は、gnotobionteを用いての検討が出来ない状態であった。その中で、抗生剤により常在菌を消失させることによって、マウスへの投与実験を行ったが、抗生剤のみによるdysbiosisによる炎症によって解析が困難となった。すなわち、コントロールにてすでに、dysbiosisによる腸炎がおり、pathobiontの検討が極めて困難であった。その中で、Fusobacteriaがマウス腸管に生着し、炎症前状態を誘起する可能性が得られたことは、評価に値するものであると考える。まずは、この結果をもとに、さらに研究環境を整えgnotobionteを用いてのpathobiontの検討を行いたいと考えている。さらには、マウスでのヒト細菌叢の検討が出来る環境の構築が必要であるとも考えている。ヒト由来の細菌がマウスにて定着することで初めて詳細な病理学的な解析が可能になると考えられることから、様々なヒト細菌がマウスにて生着出来るマウスモデルの構築が、これからのヒト細菌叢のin vivoでの解析に重要であると考えられた。具体的には、ヒト由来細菌のレセプターを持つ遺伝子改変マウスの作成などを今後検討したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①2021年度近畿腸管微生物研究会 研究発表会 ヤクルト本社中日本支店 2021年6月12日

(3) 出版物

なし

歯周病菌による脳・腸バリア破綻に基づくAD型認知症増悪機序 —ジンジパイン-PAR2シグナリングによる脳・腸バリア機能変容—

1. 研究の目的

(1) 歯周病がアルツハイマー型認知症を増悪する2つの経路が想定される。一つは全身循環経路で、歯肉血管より全身循環系に入った主要な歯周病菌のジンジバリス菌が脳内に侵入し、ミクログリア活性化により脳炎症を惹起し、認知機能を低下させる経路である(図1:全身循環ルート)。二つ目は唾液経路で、唾液と伴に飲み込まれたジンジバリス菌が腸内細菌叢の攪乱を起こし、変容した腸内細菌代謝産物が認知機能を低下させる経路である(図2:唾液ルート)。ジンジバリス菌が産生分泌する歯周破壊酵素であるジンジパインは、プロテアーゼ活性化受容体2(PAR2)の活性化による密着結合タンパク質(ZO-1、オクルディンなど)の局在

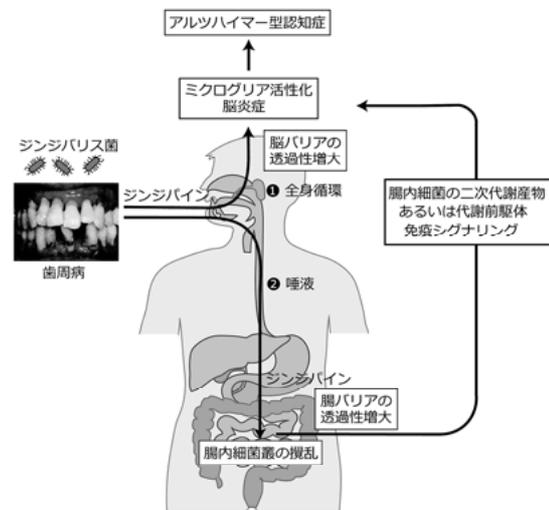


図1: 想定されるジンジパイン作用経路の模式図

変化、あるいは密着結合タンパク質の直接的分解を行うことが考えられる。本研究では、ジンジパインが脳・腸バリア機能を変容させ認知機能低下を引き起こす可能性を解析し、歯周病がアルツハイマー型認知症の増悪因子となるメカニズムを明らかにする。一方、ジンジバリス菌は恒常的にジンジパインやリポ多糖類などほぼ全ての病原因子を含む外膜小胞(OMVs)を恒常的に分泌している。そこでジンジバリス菌に加え、OMVsの役割についても解析する。

2. 研究の計画

(1) ジンジバリス菌感染あるいはOMVs添加による脳・腸バリアの「細胞」レベルでの *in vitro* 解析

- ① ヒト脳血管内皮由来細胞(hCMEC/D3細胞)を用いた脳バリア機能変容ならびにそのメカニズムに関する解析
- ② ヒト結腸腺がん由来細胞(Caco-2細胞)を用いた腸バリア機能変容ならびにそのメカニズムに関する解析

(2) ジンジバリス菌感染あるいはOMVs添加による脳・腸バリア機能ならびに認知機能変化のマウス「個体レベル」での *in vivo* 解析

- ① 脳・腸バリア機能の解析
- ② ステップスルー受動回避試験ならびに新奇物体探索行動試験を用いた認知機能の解析

3. 研究の成果

(1) ジンジパインの脳バリア機能変容メカニズムの解明

- ① ジンジバリス菌感染あるいはジンジバリス菌培養上清の適応によりhCMEC/D3細胞の透過性が有意に増大した。この透過性増大はアルギニンジンジパイン(Rgp)阻害剤KYT1とリジンジンジパイン(Kgp)阻害剤KYT36の併用によりほぼ完全に抑制され、RgpならびにKgpの作用によりhCMEC/D3細胞の単層バリアの透過性が増大することが明らかとなった。

② ジンジバリス菌感染により、hCMEC/D3 細胞の密着結合タンパク質であるオクルディンならびに ZO-1 は有意に減少したが、VE-カドヘリンには変化は認められなかった。Kgp 欠損株の感染では、ZO-1 は有意に減少したがオクルディンには有意な変化は認められなかった。一方、Kgp/Rgp 欠損株の感染では、オクルディンならびに ZO-1 の有意な変化は認められなかった (図2)。ジンジバリス菌野生株、Kgp 欠損株ならびに Kgp/Rgp 欠損株の培養上清を用いた実験でも、ほぼ同様の結果が得られた。

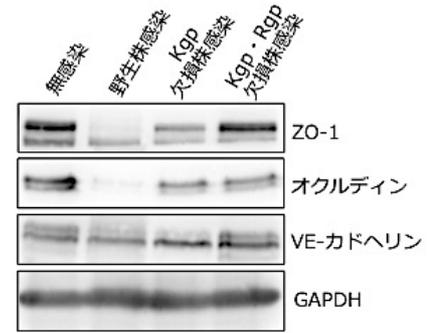


図2 ジンジバリス菌感染によるhCMEC/D3細胞の密着結合タンパク質分解

- ③ Kgp ならびに Rgp は hCMEC/D3 細胞の PAR2 を活性化し、下流シグナル分子の ERK1/2 を活性化したが、PAR2 活性化ならびにその下流シグナルは Kgp と Rgp によるオクルディンならびに ZO-1 の分解に関与しないことが明らかとなった。
- ④ Kgp ならびに Rgp が直接的にオクルディンならびに ZO-1 を分解する可能性について検討した結果、Kgp は単独でオクルディンの直接的な分解に関与し、Kgp と Rgp の協調作用が ZO-1 の直接的な分解に関与することが明らかとなった。
- ⑤ 抗ジンジバリス菌抗体を用いた免疫染色により、ジンジバリス菌感染あるいは OMVs の添加により Kgp ならびに Rgp は hCMEC/D3 の細胞質に局在することが分かった。

(2) ジンジバインの腸管バリア機能変容メカニズムの解明

- ① ジンジバリス菌感染ではCaco-2細胞の透過性に変化は認められなかったが、OMVsのapical側への添加により透過性は有意に増大した(図3)。また、Kgp/Rgp欠損株から調整したOMVsのapical側への添加では透過性増大は認められなかった。
- ② OMVs添加によりCaco-2細胞の密着結合タンパク質であるオクルディンならびにZO-1のタンパク質量の有意な変化は認められなかった。

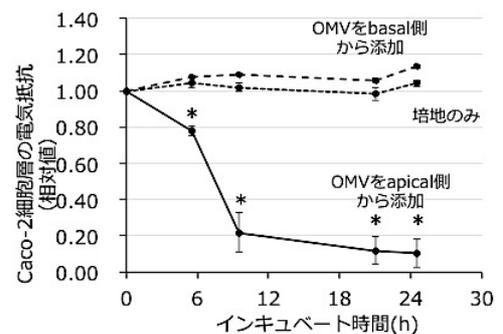


図3 OMV添加時のCaco-2細胞層の電気抵抗値の経時変化

以上の結果より、「ジンジバリス菌から分泌されたKgpならびにRgpを含むOMVsがヒト脳血管内皮細胞のhCMEC/D3細胞に取り込まれ、KgpならびにRgpが細胞内からオクルディンならびにZO-1を分解し、脳バリア透過性を増大する」という新知見が得られた。さらに、OMVsはヒト腸管上皮細胞のCaco-2細胞に取り込まれKgpならびにRgp依存的に透過性を有意に増大させた。しかし、オクルディンならびにZO-1の分解は認められなかった。このことから、「腸管上皮細胞において、KgpならびにRgpはPAR2活性化によりオクルディンならびにZO-1の内在化を誘導することで透過性を増大させた」可能性が考えられる。このように、KgpならびにRgpは異なったメカニズムで脳ならびに腸バリア機能を障害することが示唆された。

4. 研究の反省・考察

- (1) 「ジンジバインがPAR2活性化により脳・腸バリアの透過性を高める」という作業仮説に基づいて研究を開始した。ジンジバインは脳バリアでは密着結合タンパク質の直接的な分解、腸バリアではPAR2活性化による密着結合タンパク質の内在化という異なったメカニズムで透過性を増大しており、作業仮説にこだわり過ぎたためメカニズムを突き止めるのに時間を費やしてしまった。
- ① hCMEC/D3細胞の透過性がジンジバイン依存的に増大することが確認できた。しかし、「ジンジバインによるhCMEC/D3細胞のPAR2活性化は透過性増大には関係しておらず、ジンジバインによる直接的な密着結合タンパク質(オクルディンならびにZO-1)分解で透過性が増大する」ことを突き止めた (Nonaka et al., *Neurochem Int.* 154:105282, 2022)。
- ② 一方、Caco-2細胞の透過性もジンジバイン依存的に増大することが確認でき、ジンジバインによる直接的な密着結合タンパク質(オクルディンならびにZO-1)分解で透過性が

増大することが予想された。しかし、密着結合タンパク質（オクルディンならびにZO-1）分解は認められなかった。最近、PAR2活性化により密着結合タンパク質（オクルディンならびにZO-1）の内在化により透過性が増大することが示唆する実験結果が得られた（論文準備中）。

(2)培養細胞を用いた脳・腸バリア機能の解析は予定通り進んでいるが、マウス個体を用いた脳・腸バリア機能の解析の進行は予定より若干遅れている。

- ① 全浸循環ルート（マウス尾静脈内投与）：ジンジバリス菌ならびにOMVsのマウス尾静脈内投与の予備実験を行っているが、尾静脈内投与が予想外に難しく、安定的な尾静脈内投与ができていないため研究が遅れている。尾静脈注入用のシリンジならびにマウス固定器を用いることで成功率が上がってきている。
- ② 唾液ルート（マウス経口投与）：ジンジバリス菌ならびにOMVsのマウスへの経口投与の予備実験も開始している。
- ③ 認知機能解析：マウス個体を用いた実験では、脳・腸バリアの機能解析だけではなく、認知機能解析も行う予定のため認知機能解析装置（ステップスルー受動回避試験装置ならびに新奇物体探索行動装置）のセットアップを完了した。

5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① Nakanishi H, Ni J, Nonaka S, Hayashi Y. Microglial circadian clock regulation of microglial structural complexity, dendritic spine density and inflammatory response. *Neurochem Int.* 142:104905, 2021.
- ② Tanaka J, Takahashi H, Yano H, Nakanishi H. Generation of CSF-1 independent ramified microglia from leptomeninges *in vitro*. *Cells* 10:24, 2021.
- ③ Ni J, Zhang X, Reinheckel T, Turk V, Nakanishi H. Cathepsin H deficiency decreases hypoxia-ischemia-induced hippocampal atrophy in neonatal mice through attenuated TLR3/INF- β signaling. *J. Neuroinflammation* 18:176, 2021.
- ④ Hayashi Y, Kato H, Nonaka K, Nakanishi H. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth attenuate neuropathic tactile allodynia in mice through distinct from sigrec-9/MCP-1-mediated tissue-repairing mechanism. *Sci Rep* 11:20053, 2021.
- ⑤ Liu Y, Li H, Hu J, Wu Z, Meng J, Hayashi Y, Nakanishi H, Qing H, Ni J. Differential expression and distinct roles of proteinase-activated receptor 2 in microglia and neurons in neonatal mouse brain after hypoxia-ischemic injury. *Mol Neurobiol.* 59:717-730, 2022.
- ⑥ Xie Z, Meng J, Kong W, Wu Z, Lan F, Narengaowa, Hayashi Y, Qinghu Yang Q, Bai Z, Nakanishi H, Qing H, Ni J. Microglial cathepsin E plays a role in neuroinflammation and amyloid β production in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 00:e13565, 2022.
- ⑦ Nonaka S, Kadowaki T, Nakanishi H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce increased permeability of human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins. *Neurochem Int.* 154:105282, 2022.

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし

DNA 損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明

1. 研究の目的

細胞は DNA 損傷に応答して傷の修復あるいは細胞死を誘導することでゲノムの恒常性を維持しているが、細胞がどちらをどのようにして選択しているかについては未だ明らかになっていない。我々はアルキル化 DNA 損傷が引き起こす細胞死誘導過程において、ミスマッチ修復 (MMR) 複合体がクロマチン制御因子 SMARCAD1 と協働しながら損傷を認識し、ATR/CHK1 キナーゼを介した DNA 損傷応答シグナリングを活性化することを明らかにしてきた。本研究では、損傷領域特異的なクロマチンの動態と ATR/CHK1 シグナル経路の活性化の機能連関を解析することで、DNA 損傷が引き起こす選択的な細胞死誘導の制御機構を明らかにすることを目的とする。「DNA 修復」を選択することの方が一考するとポジティブに捉えることができるが、生存するために「損傷乗り越え DNA 合成」や「非相同末端結合」等の修復系を選択した場合はエラーを伴い、その結果、突然変異や染色体異常を伴った状態で細胞が生き残ることとなる。ヒトのような多細胞生物にとっては、このような突然変異細胞の出現を防ぐために「細胞死」を選択することの方が、ゲノム安定化の観点ではポジティブな細胞応答と捉えることができる。得られる知見は、化学療法剤に対する細胞の感受性を亢進させるための標的となることが期待でき、社会的な意義は大きい。また、ゲノムの恒常性維持の観点からもこの分子機構の解明の学術的意義は大きい。

2. 研究の計画

本研究では、DNA 損傷が引き起こす細胞死誘導を制御するクロマチン動態と DNA 損傷応答シグナリングを分子レベルで明らかにする。細胞は口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, HSC3 等) を用いる。方法としては、(1)クロマチン動態の解析では、近年開発された ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin) 法 (Chen *et al.*, Nat. Methods, 2016) を用いて、損傷領域のクロマチン動態の可視化と損傷クロマチンに集積するタンパク質の同定を行う。(2)DNA 損傷応答シグナリングの解析では、ATR/CHK1 キナーゼ経路の活性化を制御する TopBP1 と ETAA1 に着目し、両タンパク質が保有する AAD (ATR activation domain) を介したシグナリング活性化のしくみを明らかにする。

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷領域クロマチン動態の可視化

我々は細胞死誘導の初期過程において、SMARCAD1に依存した損傷領域クロマチンのリモデリングが必要であることを見出している。ATAC法はトランスポゾンTn5を利用した解析手法で、Tn5が弛緩したクロマチン領域特異的に標識オリゴDNAを挿入することで、オープンクロマチン領域を顕微鏡下で可視化できる。化学薬剤処理した細胞において、損傷領域のクロマチンがSMARCAD1依存的に弛緩することをMMR因子との共局在を指標に解析する。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① TopBP1, ETAA1遺伝子ノックダウン細胞の解析

我々はTopBP1あるいはETAA1遺伝子のノックダウン細胞を作成し、いずれの細胞もアルキル化剤とシスプラチンに高い感受性を示すことを見出している。遺伝子ノックダウンのDNA損傷応答シグナリングへの影響はATRとCHK1のリン酸化、また、細胞死誘導への影響はCaspase-9の活性化を指標に解析することで、DNA損傷応答シグナリングと細胞死誘導の関係を明らかにする。さらに、遺伝子ノックダウン細胞におけるDNA損傷領域のクロマチン動態とDNA構造変化(一本鎖DNAの露出や二本鎖DNA切断)を解析し、細胞死誘導の直接的な要因を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷領域クロマチン動態の可視化

Addgeneより入手したpTXB1-Tn5プラスミドを用いて、大腸菌内で発現誘導したIntein-

tagged Tn5をその親和性を利用してchitinカラムに吸着させ、DTT添加によるタグ切断によりTn5タンパクを単一標品まで精製することが出来た。また、標識オリゴDNAの入手も行ない、顕微鏡観察を始める準備を整えたところである。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① TopBP1, ETAA1遺伝子ノックダウン細胞の解析

2021年度はTopBP1ノックダウン細胞について解析を進め、TopBP1ノックダウン細胞ではシスプラチン投与後にサブG₁細胞の割合とカスパーゼ9の活性化が増大することを明らかにした(図1)。この時にCHK1(S317)のリン酸化は低下し、一本鎖DNA結合タンパクであるRPA2(S8)のリン酸化が亢進していた(図2)。また、ATM/CHK2のリン酸化には明らかな変化は認めなかった。ATR/CHK1経路の抑制が薬剤感受性を亢進することはATR阻害剤を用いた実験においても確認できた。この結果よりTopBP1がDNA損傷応答の活性化に関与し、損傷DNAを保護することでアポトーシスを抑制していることが考察され、この成果を*Oral Sci. Int. 誌*に報告した(Obayashi et al., 2021)。現在は、SAS, HSC3の他にも様々な癌細胞株を準備して、各細胞株でのTopBP1の発現レベルとTopBP1ノックダウンによる薬剤感受性の相関を調べている。また、TopBP1が保有する8つのBRCA1 C-Terminal (BRCT) ドメインの中でリン酸化ATRとの結合に重要と考えられているBRCA7/8に着目して、その細胞死誘導における機能解析も進めている。

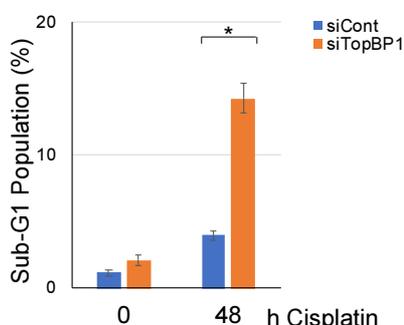


図1. TopBP1ノックダウンSAS細胞のシスプラチン投与によるアポトーシス誘導

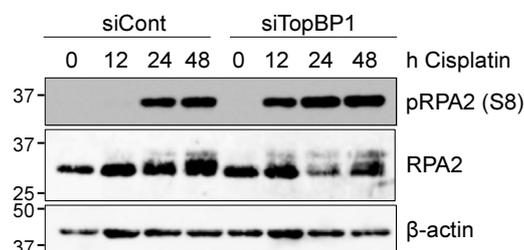


図2. TopBP1ノックダウンSAS細胞のシスプラチン投与後のRPA2のリン酸化

4. 研究の反省・考察

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷領域クロマチン動態の可視化

大腸菌内で発現誘導したIntein-tagged Tn5のchitinカラムへの吸着効率、ならびにDTT添加による溶出効率が期待していたほど高くなく、Tn5タンパクを十分量精製するのに手間取ってしまった。Intein-tagged Tn5のchitinカラムへの吸着時間、ならびに吸着タンパクのDTTによる処理時間を長くする等のプルトコールの修正により、単一標品のTn5タンパクを十分量精製することができた。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① TopBP1, ETAA1遺伝子ノックダウン細胞の解析

今年度はDNA損傷応答で機能する中心的なタンパクキナーゼであるATRの制御因子TopBP1に着目し、TopBP1が化学療法剤の感受性を亢進する標的となりうるかの検討を行なった。その結果、作成したTopBP1ノックダウン細胞はシスプラチンに対する薬剤感受性が亢進し、細胞死誘導の指標であるsub-G₁細胞の割合、ならびにCaspase-9の活性化、PARP1の切断が増加した。この時、DNA損傷応答の活性化の指標となるCHK1(S317)のリン酸化が有意に低下していたが、ATR(T1989)のリン酸化には明らかな変化を認めなかった。この結果は先にLiuらによって報告された論文結果(Liu et al., 2011)とよく合致するものであった。この条件下において、1本鎖DNA結合タンパク質RPA2(S8)のリン酸化が強く亢進しており、TopBP1の抑制は細胞周期チェックポイントの活性化の低下を引き起こし、DNA損傷で停止した複製フォークに一本鎖DNA領域を蓄積させることで細胞死誘導を促進すると考えられた。以上のことより、TopBP1が癌細胞において化学療法に対する感受性の効果を促進させる治療戦略の標的となりうる可能性を見出した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Obayashi Y., Fujikane R., Morita S., Uechi Y., Hiraki A., and Hidaka M. Suppression of TopBP1 function increases the efficacy of chemotherapeutic treatments by enhancing the induction of apoptosis. Oral Science International, 18, 209–216, 2021
- ②Shioi S., Shimamoto A., Song Y., Hidaka K., Nakamura M., Take A., Hayashi N., Takiguchi S., Fujikane R., Hidaka M., Oda S., Nakatsu Y. DNA polymerase delta Exo domain stabilizes mononucleotide microsatellites in human cells. DNA Repair, 108, 103216, 2021

(2) 口頭発表

- ①藤兼亮輔、森田祥、上地有香、日高真純、アルキル化DNA損傷応答におけるミスマッチ修復因子PMS1の機能の解析、第44回日本分子生物学会年会、2021年12月2日
- ②織田信弥、塩井誠次郎、瀧口聡一、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、中津可道、DNAポリメラーゼ δ Exoドメイン変異によって不安定化される一塩基繰り返しマイクロサテライト、第80回日本癌学会学術総会、2021年9月30日

(3) 出版物

なし

発作性夜間血色素尿症における血栓症発症の分子メカニズムの解明 —新規止血薬ターゲット分子の探索とその可能性—

1. 研究の目的

(1) 発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : PNH) は、後天的な多能性造血幹細胞における phosphatidylinositol glycan class-A (PIG-A) 遺伝子の後天的点突然変異に起因し、glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型膜蛋白が生合成されない疾患で、血球の補体感受性が亢進することにより発作的・慢性的に血管内容血を起こす。しかし、補体による血小板活性化への影響、PNH 患者と健常人の間で血小板構造や機能に違いがあるのか、さらには他の溶血性貧血にはない PNH に特徴的な合併症である血栓症がどのようにして誘発されるのか、その分子メカニズムも未だ解明されていない。一方、我々は、安全かつ有効な止血方法の開発に着手し、重炭酸塩が血小板活性化を増強することや血小板製剤の長期保管により機能が減弱した血小板製剤機能を回復させること、保管血小板製剤中に phosphatidylserine (PS) 陽性 microparticle (MP) や血小板膜糖タンパク GPIb の断片である glycolalicin (GC) が増加し、その MP や GC は脱シアル化されていること、PNH 患者において脱シアル化血小板の割合が多いことも見出した。また、脱シアル化 MP の機能を明らかにするために血小板を neuraminidase で脱シアル化した後、血小板を刺激したところ、脱シアル化血小板で MP 産生が増加することを見出した。しかしながら、製剤上清中に増加する GC の産生メカニズムや脱シアル化血小板の機能については知られていない。そこで本研究では、血小板製剤上清中に増加する GC 産生メカニズムを明らかにするとともに、脱シアル化血小板の機能を検証することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) GC 産生メカニズムの解析とその定量

①血小板からの GC の切断

本研究では、血小板膜糖タンパク GPIb を切断することが報告されている matrix metalloproteinase (MMP) に着目し、血小板より GC が産生されるメカニズムを MMP 阻害剤を中心に使用して検証した。また、MMP 阻害剤添加による GC 切断阻害を western blotting や flow cytometry を利用して検証した。

②GC の定量 (検体を ELISA により解析)

(2) 脱シアル化血小板機能解析

①血小板凝集能 (agonist: collagen, ADP)

②血小板活性化マーカー測定 (p-selectin, PS exposure を flow cytometry で測定)

3. 研究の成果

(1) GC 産生メカニズムの解析とその定量

①血小板からの GC の切断

健常者より採血して作成した保管血小板を22℃・振盪保管し、経時的に保管後血小板製剤の上清を回収後、ELISA にて測定したところ、保管するに従い GC 濃度は増加した。一方、血小板より GC が産生されるメカニズムを明らかにするために、CD42b を切断する可能性がある matrix metalloproteinase (MMP) に着目し、MMP 阻害剤、GM6001 を保管血小板に添加した結果、CD42b 切断が抑制された。

(2) 脱シアル化血小板機能解析

①血小板凝集能

健常人ボランティアより採血し、platelet rich plasma (PRP) を回収後、neuraminidase 処理により脱シアル化を誘導した。collagen, ADP, ristocetin 刺激による血小板凝集能は未処理血小板と比較し脱シアル化血小板で増強していた。また、neuraminidase 処理後 PRP を洗浄し、洗浄血小板を作製し、thrombin 刺激下で検証したところ、pRP と同様に脱シアル化血小板で凝集能が増強していた。

②血小板活性化マーカー測定

Neuraminidase 処理により得られた脱シアル化血小板または未処理血小板を 抗 CD62P 抗

体または annexinV を用いて P-selectin 発現血小板や PS 露出血小板の割合を測定したが両者で差は認められなかった。次に、これら血小板を collagen 刺激後、P-selectin 発現血小板を測定した結果、脱シアル化血小板でその割合は増加していた。また、PS 露出血小板の割合も脱シアル化血小板で増加傾向が認められた。

4. 研究の反省・考察

(1) GC 産生メカニズムの解析とその定量

CD42b の発現は、血小板製剤の保管に従い低下する一方、製剤上清には CD42b の断片である GC が増加した。以前、Jansen らは matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤, GM6001 をマウス血小板に添加したところ、CD42b 発現低下を抑制することが可能であると報告していた (Jansen AJG, et al. Blood 119: 1263-1273, 2012.)。そこで、ヒト血小板においても GM6001 に同様の効果があるか検証したところ、CD42b の切断は抑制された。CD42b は、血小板が血管損傷部位に接着する際に重要な蛋白であることから、血小板製剤保管に伴い CD42b 発現を維持するために MMP 機能を阻害することは極めて重要であると考えられる。一方、GC は以前血小板の損傷マーカーとして測定されていたが、その機能は不明である。今後は血小板製剤の保管と共に増加する GC の機能を明らかにするとともに、我々生体内に GC がどのくらい存在するのか検証する予定である。

(2) 脱シアル化血小板機能解析

近年老化血小板として注目されている脱シアル化血小板の機能については全く報告がない。そこで、neuraminidase 処理により脱シアル化した血小板の凝集能や P-selectin 発現率、PS 露出血小板の割合を測定したところ、未処理血小板と比較していずれも増強していた。これまで我々は、PNH 患者において脱シアル化血小板の割合が多いことを見出している。一方、PNH における特徴的な合併症として血栓症が知られているがどのようにして誘発されるのかその分子メカニズムも未だ解明されていない。従って、PNH 患者における脱シアル化血小板の割合の増加が血栓症発症に関与する可能性もあり、今後はより詳細な血小板機能解析は勿論、凝固への関与についても検証するが必要と考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①登尾一平, 田邊香野, 山本隆敏, 南部雅美, 檜原真二, 川口辰哉, 上妻行則, Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた血小板凝集能検査実習の試み、臨床検査学教育 14(1)、18-23頁、2022年3月

(2) 口頭発表

①登尾一平, 山本隆敏, 田邊香野, 南部雅美, 川口辰哉, 内場光浩, 上妻行則, Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた血小板凝集能検査実習の試み、第15回日本臨床検査学教育学会学術大会(Web 開催 (2021年8月18-26日 の期間オンデマンド配信))、2021年8月

②Noboru I, Nambu M, Kawaguchi T, Kozuma Y. Significance of measuring microparticles derived from stored platelets. The 6th Allied Health Sciences International Symposium 2021. 2021年12月

③Kano Tanabe, Yukinori Kozuma. Protein phosphatase is involved in the maintenance of homotypical aggregation by CD40 stimulation in Ramos cells. The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2021年12月

(3) 出版物

なし

高効率な無農薬害虫防除へ向けた昆虫ウイルス製剤シーズの探索

1. 研究の目的

- (1) 常在性昆虫ウイルスを網羅的に探索・スクリーニング
 - ①昆虫に感染するウイルスには宿主に顕著な影響を及ぼさないウイルス（常在性昆虫ウイルス）が存在するが、今までほとんど注目されてこなかった。常在性昆虫ウイルスの中には、宿主に対しては無害だが、非宿主に感染すると高い病原性を示すものがある。本研究の目的は、最先端の核酸解析技術を駆使することにより、非宿主害虫に対して高い病原性を示す常在性昆虫ウイルスを網羅的に探索・スクリーニングし、その多様性を俯瞰する。
- (2) 常在性昆虫ウイルスを利用した害虫防除
 - ①害虫防除資材として有用なウイルスが見つかり次第、製剤化に向けた特許取得、製薬会社への協力要請に取り掛かるなど、無農薬害虫防除資材のシーズとして提示することにある。

2. 研究の計画

- (1) サンプルの昆虫の採集
 - ①ヤガ上科の昆虫100種について100個体以上の採集を試みる。
- (2) ウイルスの探索
 - ①次世代シーケンサーによる解析は、DNAウイルス用、RNAウイルス用に分けて行う。

3. 研究の成果

- (1) サンプルの昆虫の採集
 - ①サンプルの昆虫はほぼ揃い、雌雄の個体別に分けた。
- (2) ウイルスの探索
 - ①次世代シーケンサーによる解析は、一部のサンプルを使用して予備的な実験を行いDNAウイルス用とRNAウイルスを分けて分析する方法を確立することができた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 今後の展望
 - ①研究の途中段階であるが、サンプル昆虫の採集もほぼ完了し、一部の昆虫は累代飼育が簡単であることも分かった。しかし、結果の全体像を見るに至らなかった。
- (2) コロナ禍の影響
 - ①コロナ禍でもあり教育研究活動に制限があったことが響いたと言わざるを得ない。しかし、今後もこの研究を続行していく予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし

スピンを用いた極低温・超低雑音マイクロ波増幅 —古くて新しい量子技術の確立を目指して—

1. 研究の目的

(1) マイクロ波量子情報技術と超低雑マイクロ波増幅器

量子情報科学の分野で開発・蓄積された技術を産業化する気運が高まっている。これらは総称して「**量子技術**」と呼ばれ、次世代基幹技術として期待されている。その最たる例が量子コンピュータであり、日米欧中において国家プロジェクトが幾つも進行しており、開発研究の競争が激しさを増している。さらに、Google、Intel、IBM、Microsoft、アリババ集団などの主要なIT企業による大型投資も始まり、多くのスタートアップ企業も創設されるなど、量子技術には世界の産業界も注目している。

この背景には、マイクロ波周波数帯で動作する固体量子デバイスの目覚ましい進展がある。そして、その根幹をなす技術が極低温(約10mK)における**超微弱なマイクロ波信号の増幅**である。これを可能にしたのが**超伝導パラメトリック増幅器**で、雑音を重畳することなく無散逸で信号を増幅する優れたデバイスである。しかし、パラメトリック増幅器が抱える重大な問題点、すなわち**微弱な飽和パワーはいまだ本質的には解決されていない**。現在までに報告されている最高値はわずか0.1pWである。また、パラメトリック増幅器は磁場中では動作に支障が出るので、量子センシングやイメージング応用の弊害にもなる。

研究代表者らは最近、スピンメーザー(誘導放出によるマイクロ波増幅)を用いた量子マイクロ波増幅器を実現し、極めて高い飽和パワーを持ちながらも超低雑音を実現されていることを示した[特許申請済、論文準備中]。そこで本研究では、このメーザー増幅器を発展させ、超高感度スピン共鳴や量子ビットへの測定に有用であることを実証し、スピンメーザーという「古くて新しい」汎用的量子技術を確立する。

2. 研究の計画

研究代表者らが実証したメーザー増幅器は極めて有用なマイクロ波量子技術になり得ることを示しており、原理実証として価値がある。しかし、増幅の帯域幅が非常に狭い(~200 kHz)。つまり、速く時間変化する信号を増幅することは不可能であり、応用上の課題である。そこで初年度は広帯域化に取り組む。初年度は帯域~100 MHzのメーザー増幅器を開発・実証する。以下に初年度の計画・方法を記す。

(1) 広帯域導波路の組み込み

広帯域化のために、進行波型(Traveling-Wave)と呼ばれるメーザー増幅器を実現する。進行波型メーザー増幅器においては2次元の広帯域導波路がスピンを含む基板(メーザー媒質)の上にパターンされており、入力信号は伝送線路を進行する間に徐々に増幅される。この方式で帯域を大幅に拡大することが可能になる[Siegman 1964]。

2次元導波路は超伝導体薄膜を用いて作製する。メーザー増幅器をマイクロ波周波数帯で機能させるには50-300mT程度の磁場が必要なので、磁場への耐性があるNb、NbN、NbTiNなどの超伝導体薄膜を用いる。これらの超伝導体薄膜をスパッタでルビー基板上に堆積させ、光学リソグラフィと反応性イオンエッチングにより広帯域導波路を作製する。これらのプロセスに必要な装置は研究代表者の研究機関に既に存在するが、スパッタ用の超伝導体ターゲット及びリソグラフィに必要な消耗品を計上した経費で購入する。

(2) ルビー結晶の利用

初年度はメーザー媒質として素性がよく分かっており、大型基板と高濃度ドーパが容易なルビー結晶を(サファイア中のCr³⁺スピン)を用いたメーザー増幅器を実証する。Crの濃度を変化(0.01%から0.2%まで)させたルビー結晶の購入に計上した経費を使用する。

(3) 極低温マイクロ波実験

極低温において進行波型メーザー増幅器の実証をする。このためにまず磁場と周波数を実験パラメータにして最適動作点を決定する。試料を極低温に冷却するのに必要な希釈冷凍機は研究代表者の研究機関に存在する。一方で、ここで使用する低温用のマイクロ波アイソレータ、マイクロ波増幅器、超伝導ケーブルなどを計上した経費で購入する。また、ルビーに印加する静磁場を発生させるために超伝導マグネットに大電流を流す必要がある。そのために使用する専用のマグネット電源が1つ不足しているので購入する。

3. 研究の成果

(1) 広帯域導波路の作製・実証

広帯域化のために進行波型メーザー増幅器デバイスを作製した。磁場への耐性がある NbTiN の超伝導体薄膜をサファイア基板にスパッタ堆積させ、光学リソグラフィと反応性イオンエッチングを用いて2次元超伝導導波路を作製した。当初の予定ではこの作製プロセスは研究代表者の所属機関で全て完結する予定であったが、スパッタ装置の性能が NbTiN の成膜条件を満たしていないことが判明した。そこで、NbTiN の成膜に関して日本随一の経験及び設備を誇る情報通信研究機構 (NICT) の寺井弘高博士と共同研究を開始し、スパッタ薄膜の提供を受けながら本研究を遂行していくように軌道修正をした。この項目は順調に進展した。

(2) ルビー結晶の利用

進行波型メーザー増幅器には $\sim\text{cm}^2$ 以上の大型で平坦な基板が好ましく、大型基板の入手が困難なダイヤモンドは適切な材料ではない。そこで、メーザー媒質として研究実績があるルビー (サファイア中の Cr^{3+} スピン) を用いた。この項目も順調に進展した。

(3) 極低温マイクロ波実験

上記(1、2)で作製したデバイスを用いて極低温マイクロ波透過測定を行い、デバイスが設計通り広帯域に動作することを実証した。一方で、十分なマイクロ波磁場強度でのポンプが困難であり利得を生み出すことができなかった。この理由は、導波路の線幅が20ミクロンと広いためにマイクロ波磁場密度を高めることができなかったからである。これは単純な技術的な理由 (光学リソグラフィ装置の精度やクリーンルームのクラスなど) に起因する。この項目はやや遅れている。

4. 研究の反省・考察

(1) 広帯域導波路の設計・作製

広帯域導波路を作製する際に、電磁界シミュレータを用いてマイクロ波磁場強度を見積もり、必要最低限の導波路の幅を綿密に導出しておくべきであった。そうすれば現有している装置ではデバイスの作製が困難であることが比較的早い段階で明らかになったはずであり、従って導波路の作製も外注もしくは他の研究機関の装置を使用するなどの代替案へと計画を変更することで上記(3)の項目も順調に達成できたかもしれない。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① J. F. da Silva Barbosa, M. Lee, P. Campagne-Ibarcq, P. Jamonneau, Y. Kubo, S. Pezzagna, J. Meijer, T. Teraji, D. Vion, D. Esteve, R. W. Heeres, and P. Bertet, “Determining the Position of a Single Spin Relative to a Metallic Nanowire”, *Journal of Applied Physics* 129, 144301 (2021)

(2) 口頭発表

- ① Yuimaru Kubo et al., “Broadband Pulse Electron Spin Resonance Spectroscopy using a Superconducting Waveguide,” 招待講演, MRM2021 (Materials Research Meetings) Pacifico Yokohama, 2021/12/15
- ② Yuimaru Kubo, “A “masing” Spin Ensemble: Maser for Quantum Information Technologies”, 招待講演, Invited seminar series at Centre for Quantum Technology,

(3) 出版物

- ① Y. Kubo, “Hybrid Quantum Systems with Spins in Diamond Crystals and Superconducting Circuits”, in Hybrid Quantum Systems, edited by Y. Hirayama, K. Ishibashi, and K. Nemoto (Springer Singapore, Singapore, 2021), pp. 119-142.

2021 年度(第 46 回)学術研究振興資金 学術研究報告

令和 4 年 9 月発行

編 集 日本私立学校振興・共済事業団
助成部 寄付金課

発行所 日本私立学校振興・共済事業団
〒102-8145 東京都千代田区富士見 1-10-12

TEL 03 (3230) 7315・7319・7320

FAX 03 (3230) 8223

禁無断転載