

2022年度（第47回）
学術研究振興資金

The Science Research Promotion Fund

学術研究報告

令和5年10月

はじめに

この報告書は、2022年度（第47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5年5月末までに配付した資金総額は、3,494件、81億9,018万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5年8月末で、54億1,564万円に達しました。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5年10月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長 福原 紀彦

目 次

- I 2022年度學術研究振興資金 応募状況及び採択状況
- II 學術研究振興基金 年度別受領状況
- III 學術研究振興資金 研究分野別配付状況
- IV 2022年度學術研究振興資金 研究課題一覽
- V 2022年度（第47回）學術研究振興資金 學術研究報告

I 2022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		142	340,000	41	80,700	28.9%	
内 訳	新規・継続別	新 規	114	273,200	23	45,200	20.2%
		継 続 2 年 目	14	33,100	10	19,500	71.4%
		継 続 3 年 目	14	33,700	8	16,000	57.1%
	学校種別	大 学	138	336,600	41	80,700	29.7%
		短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	4	3,400	0	0	0.0%
	研究 区 分 別	人 文 ・ 社 会 科 学 系	36	47,900	10	8,000	27.8%
理 工 系 、 農 学 系		43	106,000	12	23,500	27.9%	
生 物 学 系 、 医 学 系		63	186,100	19	49,200	30.2%	

II 学術研究振興基金 年度別受領状況

(単位：千円)

年度 区分	1976(昭和51)～ 2016(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)	2022年度 (令和4年度)	合 計
経済団体	2,132,328	0	0	0	0	0	0	2,132,328
個別会社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学校法人	1,460,833	0	0	0	0	0	0	1,460,833
個人	199,587	90	0	270	3	129	404	200,483
合 計	5,414,748	90	0	270	3	129	404	5,415,644
基金保有額	5,414,748	5,414,838	5,414,838	5,415,108	5,415,111	5,415,240	5,415,644	-

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)～ 2016(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)	2022年度 (令和4年度)	合 計
医学	2,879,080	29,100	27,000	29,100	38,800	39,300	47,800	3,090,180
環境科学	220,240	3,000	4,500	0	0	0	0	227,740
理学	922,710	13,000	19,800	20,900	11,300	5,500	5,200	998,410
工学	1,630,360	10,700	9,700	12,400	16,300	21,000	8,900	1,709,360
農学	314,100	8,300	6,500	9,900	4,400	5,300	6,000	354,500
文学	734,560	9,500	7,400	4,100	2,500	1,400	3,500	762,960
法学	107,120	300	0	0	2,500	0	0	109,920
経済学	238,880	900	1,900	1,400	2,600	2,800	3,700	252,180
家政学	220,460	3,000	0	0	0	0	2,000	225,460
体育学	27,800	2,000	2,000	0	0	3,000	2,800	37,600
教育学	190,370	800	1,800	3,300	2,000	2,900	800	201,970
小 計	7,485,680	80,600	80,600	81,100	80,400	81,200	80,700	7,970,280
若手研究者 奨励金	120,900	18,400	-	-	-	-	-	139,300
合 計	7,606,580	99,000	80,600	81,100	80,400	81,200	80,700	8,109,580

(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 2022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	1,800
2	獨協医科大学	医学	革新的T細胞製剤によるユニバーサル肺炎球菌ワクチンの開発	1,100
3	北里大学	医学	早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略	3,800
4	慶應義塾大学	医学	CLIP細胞由来の細胞外小胞による新規肝線維化修復治療の開発	4,300
5	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	500
6	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	4,300
7	上智大学	文学	現代イスラームにおける公共性再構築をめぐる動態の研究	2,100
8	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	400
9	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	4,300
10	東海大学	理学	創薬展開を見据えたリラキシンの化学合成基盤の創出	2,100
11	東京歯科大学	医学	新規の歯根膜幹細胞を活用した顎骨修復治療法の開発	1,400
12	東京農業大学	農学	アフリカの農業を救うストリゴラクトン高活性類縁体の創出	2,100
13	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	1,000
14	東京薬科大学	医学	ミトコンドリア断片化に伴う血液がん病態形成の分子基盤解明	2,100
15	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	3,900
16	日本獣医生命科学大学	農学	獣医てんかん外科の発展に資する包括研究	2,100
17	日本医科大学	医学	新規バイオバンクによる老化実態解明のための疾患横断的基盤研究	3,500
18	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	2,800
19	東京国際大学	経済学	アスベスト使用における先進国の消費者責任	500
20	法政大学	文学	日本資本主義と女性の社会的環境に関する総合的研究	800
21	星薬科大学	医学	標的タンパク質分解誘導を促進・高効率化する新規複合分子の創製	4,300
22	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
23	自治医科大学	医学	侵襲的脳活動計測・介入によるヒト情動・共感の神経機序の解明	2,100
24	新潟薬科大学	医学	多発性骨髄腫治療用sgRNA薬候補の作用機構の解明	2,100
25	新潟青陵大学	教育学	GISを用いた災害福祉教育プログラムの開発と実践	300
26	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	800
27	愛知大学	経済学	公共心を通じたソーシャル・キャピタルの誘発効果	500
28	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	4,300
29	中部大学	理学	染色体異常の高精度な修復を目指した新規ゲノム編集法の開発	600
30	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	1,400

IV 2022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	立命館大学	農学	イネいもち病菌でのCas9スクリーニング系の確立とその応用	1,800
32	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
33	関西大学	工学	血小板ヒッチハイキング型ドラッグデリバリーシステムの創生	700
34	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	700
35	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	1,400
36	兵庫医科大学	医学	MHC class II制御異常による炎症性疾患の探索	4,300
37	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	2,100
38	中村学園大学	家政学	栄養によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の研究	2,000
39	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	1,400
40	九州看護福祉大学	文学	産後うつ病予防に対するWRAPを用いたピアサポーターの効果検証	600
41	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	2,100
			配付額計	80,700

(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 2022 年度（第 47 回）

學術研究振興資金 學術研究報告

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

- 疾患脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答を微小電極アレイ（MEA）にて評価する。
 - ①ドラベ症候群、レット症候群オルガノイドに対する禁忌薬を含めた応答を評価する。
- 神経伝達物質グルタミン酸および H_2O_2 と細胞外電位の同時計測法を確立する。
 - ①グルタミン酸と H_2O_2 の用量依存的な電気化学応答および阻害物質の作用を明らかにする。
 - 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、グルタミン酸と細胞外電位のリアルタイム計測を検証する。

3. 研究の成果

(1) 疾患脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答評価

自発活動において、オシレーションの長さにドラベ症候群と健常者脳オルガノイドで差が認められた。低周波解析により、特定の周波数強度が健常者脳オルガノイドとドラベ症候群脳オルガノイドで異なっていた（論文執筆中）。禁忌薬剤投与により、健常者脳オルガノイドはすべての周波数帯で強度が減少したが、ドラベ症候群オルガノイドでは、特定の周波数帯で強度が増加した。他の禁忌薬剤において、健常者オルガノイドでは、オシレーション頻度が用量依存的に減少したが、ドラベ症候群では、用量依存的に増加した。上記、自発活動における周波数特性および禁忌薬応答は、ドラベ症候群患者脳の特徴を反映した応答であることが示唆された。

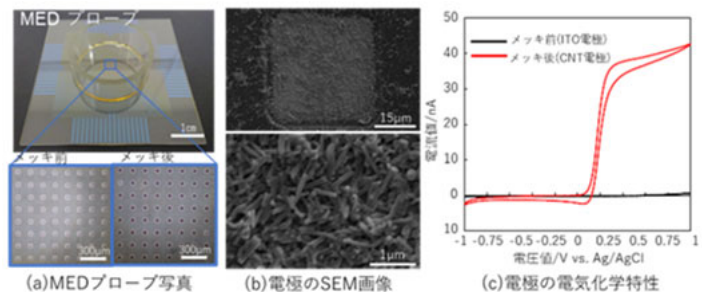
レット症候群脳オルガノイドにおいては、カルママゼピン投与により、健常者オルガノイドと異なり、同期バースト発火数の増加が認められた。また、用量依存的なスパイク数の変化も健常者オルガノイドと有意差が認められた。レット症候群患者の化合物応答の特徴を反映した応答であることが示唆された（論文執筆中）。

本研究結果から、ドラベ症候群およびレット症候群患者由来 iPS 細胞から作製した脳オルガノイドの本解析手法は、創薬開発において、有効な評価法となることが期待される。

(2) 神経伝達物質と細胞外電位同時計測法の開発

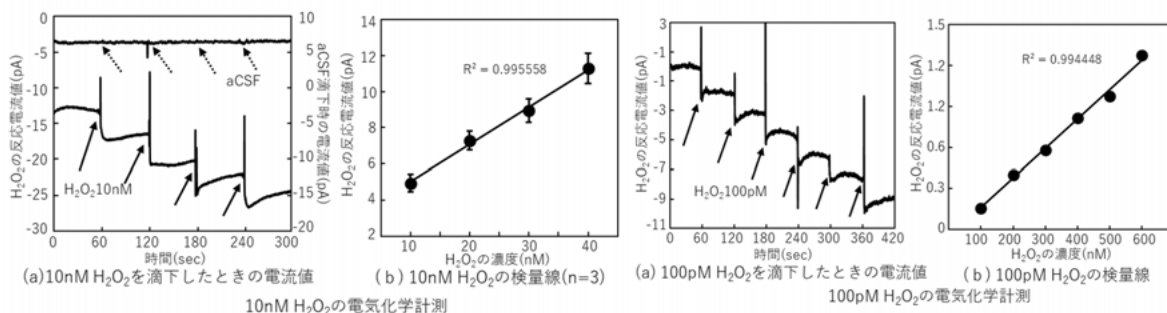
2.1 電極作製と電気化学特性

グルタミン酸を電気化学的に高感度測定可能な電極にするために CNT をメッキした MEA (CNT-MEA) を作製した。走査型電子顕微鏡観察により、メッキした CNT は、管状の形状を保持していることが確認された。次に、PBS 溶液中の 10mM フェロシアン化カリウムを使用して、ITO 電極と CNT 電極の電気化学的応答を比較した。CNT-MEA の CV 特性は、微小電極の特徴であるシグモイド型を示した（右図）。また、電流密度は、 $1.5 \mu A/cm^2$ であり、高い電気化学反応特性が確認された。



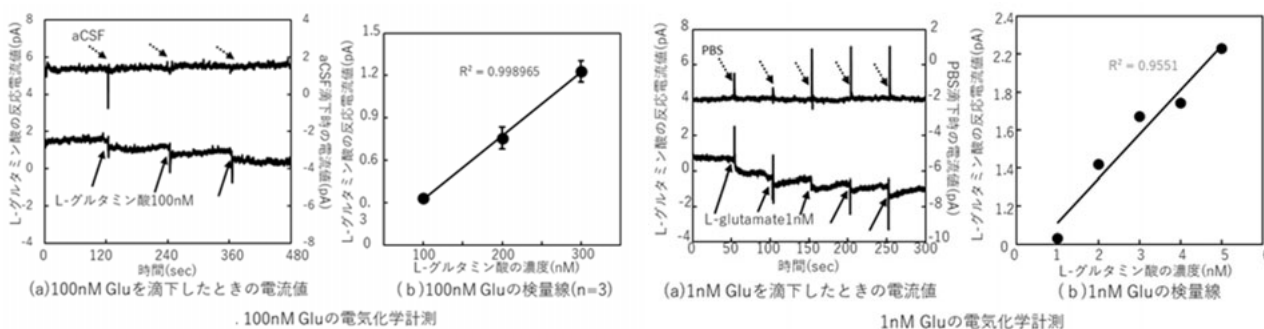
2.2 酵素修飾 CNT-MEA の過酸化水素 (H₂O₂) 反応電流値の濃度依存性

10 nM 過酸化水素を 60 sec ごとに滴下し、過酸化水素の反応電流値を測定した結果、過酸化水素の濃度に依存した電流値の増大が認められた。また、100 pM 過酸化水素を 60 sec ごとに滴下した試験においても用量相関が得られた。検出限界は、100 pM 以下であった。10 nM H₂O₂ の反応電流値と 100 pM H₂O₂ の反応電流値に大きな差が認められなかった原因は、作製電極毎の反応性の差であると考えられる。



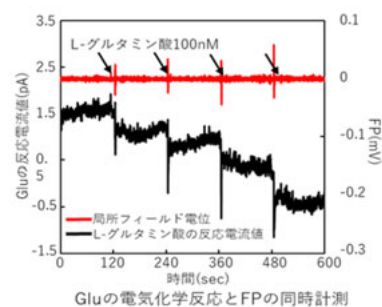
2.3 酵素修飾 CNT-MEA のグルタミン酸反応電流値の濃度依存性

100 nM グルタミン酸を 120 sec ごとに滴下し、グルタミン酸の反応電流値を測定した結果、グルタミン酸の濃度に依存した電流値の増大が認められた。また、1 nM グルタミン酸を 50 sec ごとに滴下した試験においても用量相関が得られた。検出限界は、1 nM 以下であった。100 nM Glu の反応電流値と 1 nM Glu の反応電流値に大きな差が認められなかった原因は、作製電極毎の反応性の差であると考えられる。



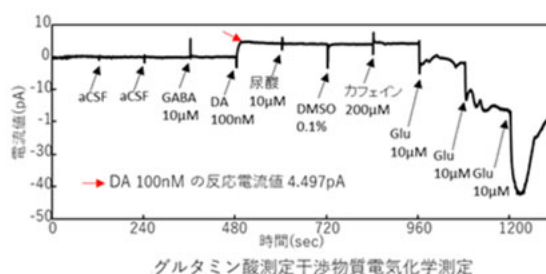
2.4 グルタミン酸の電気化学反応と細胞外電位 (FP) の同時計測

グルタミン酸の電気化学計測が FP 計測に影響を及ぼさないことを確認するために、同時計測状態で、グルタミン酸 100 nM を累積投与した。右図が示すように、グルタミン酸の電気化学反応による FP (局所フィールド電位) への影響は確認されなかった。



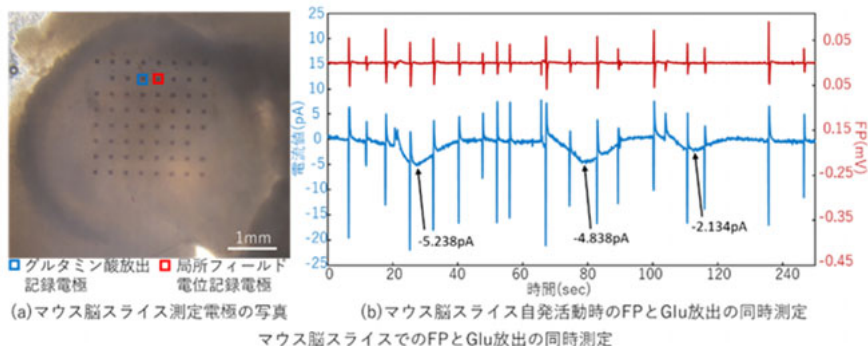
2.5 グルタミン酸測定干渉物質の電気化学測定

グルタミン酸測定において干渉物質の影響を考慮する必要がある。干渉物質として 10 μM γ-アミノ酸 (GABA)、100 nM ドーパミン (DA)、10 μM 尿酸、ジメチルスルホキシド (DMSO) 0.1%、200 μM カフェイン (caffeine) を順次滴下し、その後、10 μM グルタミン酸 (Glu) を 60 sec ごとに滴下した。10 μM GABA、10 μM 尿酸、0.1% DMSO、および 200 μM カフェインでは反応はみられなかった。100 nM ドーパミン (DA) はグルタミン酸とは逆のプラス電流値で反応を検出した。これらの干渉物質の存在下においても、グルタミン酸の応答が検出できることが示された。



2.6 酵素修飾 CNT 微小電極による急性マウス海馬スライスの活動電位とグルタミン酸放出の同時測定

酵素修飾 CNT-MEA にマウス脳組織(海馬)を乗せ、aCSF に酸素 95%、二酸化炭素 5%を含んだ空気を通気し灌流させた。対極に Pt 電極、参照極に CNT 電極を用いて作用極に 0.0 V vs. CNT を印加、保持し、還元電流値を測定した。下図に細胞外電位記録とグルタミン酸の同時計測の結果を示す。CA 2 領域の隣接する電極で細胞外電位計測(赤)と電気化学計測(青)を実施した。細胞外電位計測により、集合電位が観察され、電気化学計測によりグルタミン酸の放出電流値が観察された。しかしながら、全ての活動において、グルタミン酸放出電流値は検出されなかった。海馬組織のどのニューロン群による活動であるかで、電極表面に流れ出るグルタミン酸量が異なることなどが要因であると考えている。現在、要因解明の為の実験を進めている。



4. 研究の反省・考察

(1) 疾患脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答評価

ドラベ症候群およびレット症候群患者由来iPS細胞から作製した脳オルガノイドの周波数特性や禁忌薬の応答は、疾患の特徴を反映した成果であり、創薬開発において、有効な評価法となることが期待される。

(2) 神経伝達物質と細胞外電位同時計測法の開発

本実験で酵素修飾型 CNT-MEAを開発した結果、グルタミン酸や H_2O_2 (データ割愛) の放出と細胞外電位の同時計測に成功した。脳オルガノイドのデータ解析まで至らなかった点が反省点であるが、今後解析を進めてゆく。これらの結果を基に、神経伝達物質の放出と細胞外電位の両指標を用いた化合物の薬効および毒性評価法を構築してゆく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

1. Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Mikako Shibata, Ikuro Suzuki, Development of the Prediction Method of Peripheral Neuropathy Based on Firing Pattern of Each Single Neuron, Safety Pharmacology Society 2022, 2022/9/11-14
2. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience2022, 2022/11/12-16
3. Naoki Matsuda, Mikako Shibata, Ikuro Suzuki, Detection of spontaneous firing patterns and drug responses in brain organoids with each single neuron resolution, Neuroscience2022, 2022/11/12-16
4. Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, Development of a microfluidic culture device for in vitro neural toxicity assessment with AI image analysis, Neuroscience 2022, 2022/11/12-16
5. 石橋 勇人, 木村新伍, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動を用いた依存症評価法の検証, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
6. 永福菜美, 柴田実可子, 松田直毅, 鈴木郁郎, MEA 計測による脳オルガノイドの電気活動評価, 第 49 回日本毒性学会, 2022/6/30-7/2
7. 黒田妙子, 松田直毅, 石橋勇人, 鈴木郁郎, MEA 計測法を用いたアストロサイトの痙攣陽性化合物に対する応答評価, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2

8. 長谷川あい子, 松田直毅, 鈴木郁郎, 細胞外電位と神経伝達物質放出のリアルタイム同時計測を可能とする微小電極アレイ(MEA)の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
9. 松田直毅, 柴田実可子, 韓笑波, 鈴木郁郎, 1細胞単位の DRG ニューロンの発火に基づく化合物の痛みおよび作用機序の予測手法の開発, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
10. 韓笑波, 山中誠, 永福菜美, 松田直毅, 鈴木郁郎, In vitro 末梢神経培養デバイスおよび AI 画像解析を用いた毒性評価の検討, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
11. 岡村愛, 松原孝宜, 植田依子, 白川誉史, 宮本憲優, 小田原あおい, 小島敦子, 小山隆志, 柏崎広美, 佐藤薫, 高橋華奈子, パブラック晶子, 浅野雄哉, 腰塚慎之介, 加賀悠樹, 仲山智明, 石橋勇人, 鈴木郁郎, in vitro 痙攣リスク検出を目的とした Microelectrode array (MEA) データ解析法簡便化の基礎検討, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
12. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化合物の毒性リスク評価法の検討, 第 13 回スクリーニング学研究会, 2022/11/25,
13. 松田直毅, 韓笑波, 柴田実可子, 永福菜美, 石橋勇人, 鈴木郁郎, 長時間分解能を有する電機イメージングによる化合物の神経応答, 第 13 回スクリーニング学研究会, 2022/11/25
14. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動に基づく依存症誘発薬の評価, 第 96 回日本薬理学会学術年会, 2022/11/30-12/3,
15. 松田直毅, 韓笑波, 鈴木郁郎, 236,880 電極 CMOS-MEA を用いたヒト iPS 細胞由来ニューラルネットワークの電気活動のシングル細胞解析, 第 96 回日本薬理学会学術年会, 2022/11/30-12/3
16. 韓笑波, 柴田未可子, 松田直毅, 鈴木郁郎, In vitro assessment of drug-induced peripheral pain in DRG neurons at single cell level using CMOS-MEA, 第 96 回日本薬理学会年会, 2022/11/30-12/3
17. 石橋勇人, 黒田妙子, 松田直毅, 鈴木郁郎, MEA 計測によるアストロサイトのオシレーション検出と痙攣化合物への応答解析, 第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2023/2/17-18
18. 長谷川あい子, 松田直毅, 鈴木郁郎, Responses of compounds by simultaneous measurement of neurotransmitters and field potentials using MEA, 第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2023/2/17-18
19. 松田直毅, 柴田実可子, 韓笑波, 鈴木郁郎, DRG ニューロンの1細胞発火解析に基づく化合物の末梢神経障害評価法の開発, 第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2023/2/17-18
20. 永福菜美, 石橋勇人, 松田直毅, 鈴木郁郎, MEA 計測による疾患脳オルガノイドの電気活動特性の解析, 第 14 回日本安全性薬理研究会, 2023/2/17-18
21. 韓笑波, 松田直毅, 松田和毅, 山中誠, 鈴木郁郎, マイクロ流路培養デバイスおよび AI 画像解析を用いた In vitro 末梢神経毒性評価の検討, 日本安全性薬理研究会第 14 回学術年会, 2023/2/17-18

(2) 口頭発表

1. 鈴木郁郎, in vitro 神経活動に基づいた医薬品評価, シンポジウム「次世代 ICT と未来医療を支える 神経科学・神経工学・脳型コンピューティング」第 83 回応用物理学会, 2022/9/20-23
2. 鈴木郁郎, ヒト iPS 神経の MEA 計測による化合物の毒性リスク予測, 情報計算化学生物学会(CBI 学会) 2022 年大会 2022/10/25-27,
3. 鈴木郁郎, in vitro 神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価, シンポジウム「発達神経毒性の現状と今後の課題」第 35 回日本動物実験代替法学会 2022/11/18-20
4. 鈴木郁郎, Ca-transients を神経活動指標とした化合物の毒性リスク予測, スクリーニング研究会 2022/11/25

(3) 出版物

1. I. Suzuki*, N. Matsuda, X. Han, S. Noji, M. Shibata, N. Nagafuku, Y. Ishibashi, Large-area

field potential imaging having single neuron resolution using 236,880 electrodes CMOS-MEA technology, *Advanced Science*, 2023, 1-23 表紙に採択

2. T. Kuroda, N. Matsuda, Y. Ishibashi, I Suzuki*, Assessment of astrocytic electrophysiological responses to seizurogenic compounds using planner microelectrode array, *Frontiers in Neuroscience*. 16:1050150, 2022, doi: 10.3389/fnins.2022.1050150
3. X Han, N Matsuda, Y Ishibashi, A Odawara; S Takahashi; N Tooi, K Kinoshita, I Suzuki*, “A functional neuron maturation device provides convenient application on microelectrode array for neural network measurement” *Biomaterials Research*, 26, 84, 1-17,2022
4. X Han, N Matsuda, K Matsuda, M Yamanaka, I Suzuki*, “An in vitro microfluidic culture device for peripheral neurotoxicity prediction at low concentrations based on deep learning” *Fundam. Toxicol Sci.*, Vol. 9 No. 7 pp. 203-209, 2022
5. Y. Ishibashi, S. Kimura, I Suzuki*, Responses to antibiotics in human iPSC-derived neurons based on the clinical antibiotic associated encephalopathy classification, 2022, 47(10), p429-437. *The Journal of Toxicological Sciences*.
6. A Odawara, M Shibata, Y Ishibashi, N Nagafukum N matsuda, I Suzuki* *In Vitro* Pain Assay Using Human iPSC-Derived Sensory Neurons and Microelectrode Array. *Toxicological Sciences*. 2022 188(1):131-141. doi: 10.1093/toxsci/kfac045
7. 鈴木郁郎 「ヒト iPS 神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測」 谷本学校 毒性質問箱 第 24 号, 2022, 20-31
8. 鈴木郁郎 『ペランパネルによるてんかん治療のストラテジー:第 2 版』Part 1. 分子病態から探るてんかん原性メカニズム “脳オルガノイドを用いたてんかん原性研究” 2022 年 9 月発行

革新的 T 細胞製剤によるユニバーサル肺炎球菌ワクチンの開発 —新機軸の抗体誘導法による肺炎球菌肺炎のパンデミック対策—

1. 研究の目的

肺炎球菌は現行ワクチンでは排除できない血清型置換菌の市中増加が問題となっており、次世代ワクチンの開発が急務である。本研究はこれまでの研究成果を踏まえ、異系 T 細胞をドラッグデリバリーシステムに用いて、誘導が困難な肺炎球菌タンパク質に対する免疫応答を全身性に引き起こし、感染を予防する抗体の産生法を開発する。具体的には、マウス異系 T 細胞を介して肺炎球菌タンパク質を免疫し、抗体産生機構と免疫記憶の微小環境解析を行い、感染予防効果と治療効果を明らかにする。その上で成果を臨床応用に向けた研究につなげる。

2. 研究の計画

ユニバーサル肺炎球菌ワクチンを開発するにあたり、まず以下の研究を計画した。

- (1) 抗肺炎球菌抗体の誘導と性状解析：T 細胞を伝達体として PspA を免疫し、抗 PspA 抗体産生能を抗原単体投与群と比較する。
 - ① 肺炎球菌株に共通発現する PspA の核酸を人工遺伝子合成により作製し、PspA 発現プラスミドを構築する。
 - ② T 細胞を単離し、プラスミドを遺伝子導入する。
 - ③ PspA 発現 T 細胞に免疫抑制を施し、マウスに静注する。
 - ④ 血清中の抗 PspA 抗体の力価、サブタイプや活性の変化を経時的に測定する。抗原単体投与群と比較して免疫増強強化を定量的に示す。肺炎球菌株に共通発現する PspA 核酸を人工遺伝子合成で作製し、PspA 発現プラスミドを構築する。
- (2) 抗体産生細胞の組織内挙動とフェノタイプ解析：
 - ① 免疫後に経時的にリンパ臓器の組織標本作製する。
 - ② タグで標識した PspA をプローブに抗 PspA 抗体産生細胞を切片上で検出する。多重免疫染色により抗体産生に関わる細胞群、サイトカインや活性化分子、組織構築も染色する。組織 multi spectral imaging system で撮影、組織 cytometry を SpotFire で行い抗体産生に至るまでの免疫応答の推移を切片定量解析し、鍵となる免疫微小環境を見出す。

3. 研究の成果

抗肺炎球菌抗体の誘導と性状解析

- (1) R6株由来のPspA配列を合成し、pUC57プラスミドに挿入して発現プラスミドを作製した。マウスリンパ器官よりT細胞を精製し、ナイーブT細胞のhoming propertyを保持させたまま活性化培養した後、エレクトロポレーション法によりPspA発現プラスミドを導入した。これをレシピエントマウスに免疫後、まず体内動態を免疫組織学的に解析した。ドナーT細胞は活性化や遺伝子導入後もナイーブT細胞の遊走能を保持しており、脾臓PALSやリンパ節のHEV周囲といった抗原提示の場へ深達できることが分かった。次に同遺伝子導入ドナーT細胞を移入7日後の血清を得て抗PspA抗体の誘導を解析した。抗体の検出法として、固層化PspAを標的としたELISA法ならびにPspA発現CHO細胞を標的としたフローサイトメトリーの2つを試みたが産生される抗体量が先行研究で実施したモデルに比べて下回っていた。抗体産生細胞のin situ 解析も並行して行っているが、血清抗体価と同様、十分量の抗体産生を示唆する所見は得られていない。
- (2) (1)の結果の検証と、抗体産生細胞のin situ 解析系を先行して確立すべく、肺炎球菌とは独立したモデル系を並行して解析することにした。本プロジェクトの事前研究としてラットで実施した抗フィコエリスリン (PE) 抗体産生誘導を、(1)と同じマウス組み合わせで試みた。免疫7日目のレシピエント脾臓、リンパ節の凍結切片上にて抗PE抗体産生細胞の検出を認めたものの僅かであった。

4. 研究の反省・考察

(1) 抗肺炎球菌抗体の誘導効率について：

マウスにおける抗肺炎球菌抗体の産生効率は予想を大きく下回っていた。これまでの研究実績により、抗原伝達体であるT細胞の免疫微小環境への遊走能は免疫応答を誘導する上で極めて大きな要因である。T細胞の遊走性は培養条件や遺伝子導入で容易に変動するため、それらを経ても遊走性を保つ条件の確立を本プロジェクトの萌芽期に見出し克服した。実際、PsPAを搭載したT細胞が適切な微小環境に至ることも確認している。それにも関わらず抗体誘導が低い理由としては、PspA発現量の問題や異物への応答性が系統によって異なることが考えられる。後者に関して、我々のラット先行研究である抗ドナーMHC抗体産生機構の解析では、抗体産生応答が起こるための1つの重要な条件として、ナチュラルキラー(NK)細胞媒介性のドナーT細胞傷害があるが、マウスではこの過程にNK細胞の関与が必ずしも必要ではないとする報告もある。実際、今回我々が解析を行った系ではNKの関与が小さいと報告されていた。ドナー、レシピエントを入れ替えた系はNK依存性であるとのことで現在、逆の系を構築して解析中である。

(2) 抗PE抗体誘導モデル系を用いた抗体産生細胞のin situ解析について：

(1)の要因として考えられた抗原発現量の問題を克服するため、ラットで成功した異系T細胞に、表面抗原に対する抗体に蛍光タンパク質(PE)を共役させる系で検討した。本系は遺伝子導入に伴う事前の活性化や導入ストレスを与えることなく、十分量の抗原伝達が達成できるにも関わらず、こちらの系でも切片上に認められる抗PE抗体は予想していたよりも低調だった。この要因としても系統間の反応性の差が結果に大きな影響を与えていると考えられるため、マウス系統を変更した上で解析中である。

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

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	北里大学メディカルセンター	
研 究 課 題	早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略 -KK-LC-1を標的とした前がん診断/がん予防ワクチ ンの検証-		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 腫瘍抗原 ②治療 ③診断 ④予防			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
福 山 隆	北里大学メディカルセンター	上級研究員	研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 岡 有 紀 子	医 学 部	講 師	動物実験
細 田 桂	医 学 部	准 教 授	臨床検体回収
長 塩 亮	医 療 衛 生 学 部	教 授	血中診断開発
小 寺 義 男	理 学 部	教 授	タンパク質解析
小 泉 和 三 郎	医 学 部	名 誉 教 授	免疫組織化学染色
山 崎 等	北里大学メディカルセンター	非 常 勤 医 師	抗体の評価
高 橋 禎 人	医 学 部	診 療 准 教 授	臨床検体回収
草 野 央	医 学 部	教 授	臨床検体回収

早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略 —KK-LC-1 を標的とした前がん診断/がん予防ワクチンの検証—

1. 研究の目的

＜KK-LC-1 を対象とした治療・診断・予防方法の構築＞

Kita-kyushu lung cancer antigen-1 (KK-LC-1)は癌/精巣抗原(CTA)が有する特性の他に、膜抗原かつ前がんから発現しているという特性を備えている。すなわち、KK-LC-1 を標的としたがんワクチンおよび抗体医薬を治療/予防に適用し、がんに対する治癒率、さらには発症率を低下させることが我々の目的である。特に本研究では、KK-LC-1 のユニークな特徴である前がんでの発現に焦点を当てた診断/予防方法を開発することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) がん予防ワクチン効果の証明

- ① KK-LC-1の機能解析のため、我々は未同定であったマウスKk-1c-1を同定した。当該年度は、マウスKk-1c-1の機能解析を行うためノックアウトマウスを作製し、当該分子の機能を明らかにし、ワクチン接種の際の影響を考察する。
- ② BALB/cAJc1マウス(正常マウス)に対して、KK-LC-1ペプチドを免疫する。免疫後の脾臓からリンパ球を回収し、BALB/cAJc1-nu/nu (ヌードマウス)へ静脈投与する。リンパ球移植ヌードマウスに対して腫瘍細胞株を移植し、抗腫瘍効果を観察する。

(2) 発がん予測検証

- ① 独自開発のモノクローナル抗体Kmb34B3を用いた免疫沈降法により培養上清中のKK-LC-1ペプチドを濃縮し、LC-MS/MSによるペプチドのアミノ酸配列を同定する。
- ② 同定された7kDa KK-LC-1ペプチドの組換えタンパク質を標準抗原として、ELISAを構築する。構築できなかった場合、7kDa KK-LC-1に標識酵素付加し、競合法によるKK-LC-1ペプチドの検出を試みる。
- ③ 健常人、萎縮性胃炎患者、胃がん患者の血清および可能な範囲で胃組織を回収し、KK-LC-1の発現について解析する。

3. 研究の成果

(1) がん予防ワクチン効果の証明

- ① 当該年度は、今まで未同定であったマウス(m)Kk-1c-1について、ヒト(hu)KK-LC-1抗体の交差反応を契機に、遺伝子座から *mKk-1c-1* を推定し、当該遺伝子が2つの exon から構成されており、精巣のみに発現を認め、2つの α -helix を有する立体構造であるという huKK-LC-1 との相同性を見出した(図1)。CRISPR/Cas9により作製した *mKk-1c-1* 欠損個体の解析では、mKk-1c-1 が精子の運動能、透明体への浸潤に関与しており、huKK-LC-1 の腫瘍細胞における遊走能・浸潤能に類似していることを明らかにした(図2)。本成果によって、mKk-1c-1 の遺伝子座に huKK-LC-1 を置換した huKK-LC-1 マウスを次年度に作製できる。当該マウスを用いて huKK-LC-1 の予防ワクチンによる薬効、薬物動態、毒性を目指す。



図1 マウス-ヒト間の KK-LC-1 の相同性

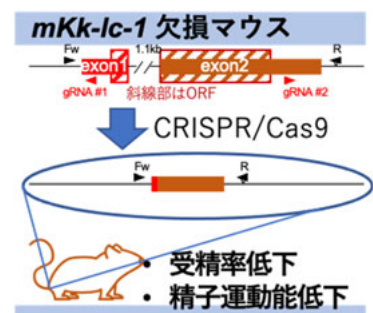


図2 mKk-1c-1 の機能解析

② huKK-LC-1とmKk-1c-1のアミノ酸相同性が20%程度であることから、マウス個体にとってhuKK-LC-1は外来性抗原としての特性が強いため、生体内に存在するタンパク質に対する免疫応答とは異なる免疫応答プロファイルを呈することが想定された。よって、mKk-1c-1 KOマウスにhuKK-LC-1をKnock inしたhuKK-LC-1を自己抗原として保有するマウスを作製し、当該個体におけるhuKK-LC-1のワクチンによる免疫応答を解析する計画に変更した。

(2) 発がん予測検証

① 我々が独自に作製した抗体(Kmab)では、91-113aaをエピトープとする抗体群は7kDのKK-LC-1分泌ペプチドと反応するが、41-65aaをエピトープとする抗体群は反応しないことがわかった。さらに、適用可能なKmab同士のエピトープが近接しているためサンドイッチELISAが困難であることもわかり、61-80aaを認識するKmabの取得が課題として挙げられた。(図3)。

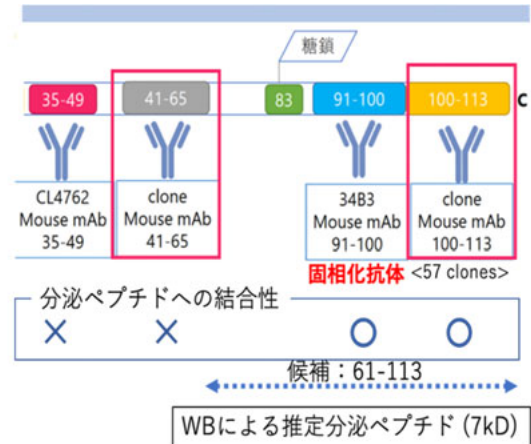


図3 Kmabの結合と分泌ペプチドの推定

② 細胞株培養上清中のKK-LC-1ペプチドについて、LC-MS/MSの解析では検出感度の限界以下の量であり、KK-LC-1のアミノ酸配列の検出ができなかった。

③ 臨床検体として、前年度の胃がん、乳がん患者血清に加え、胃がんではないがそのリスクが一般より高いとされる萎縮性胃炎(Gastric atrophy, GA)患者32例の血清を確保した。GA患者の胃生検ではKK-LC-1の遺伝子発現は13.5%と胃癌患者の非腫瘍胃の76.6%より有意に低く、さらに、KK-LC-1陽性GAの5年累積発癌率は65%(KK-LC-1陰性では2%)と胃癌のリスク因子であるHelicobacter pylori感染の14%よりも高精度に胃癌の予測が可能であることがわかり、当該技術の特許として出願した(図4, 特願2022-140097)。なお、申請者は当該技術の保険収載を目指しており、本研究成果についてはPMDAおよびAMEDの双方から高い評価を得たいっぼう、胃癌発症数の追加した解析の要望が挙げられた。そこで、症例数の追加と観察期間延長を次年度の計画として実施する。

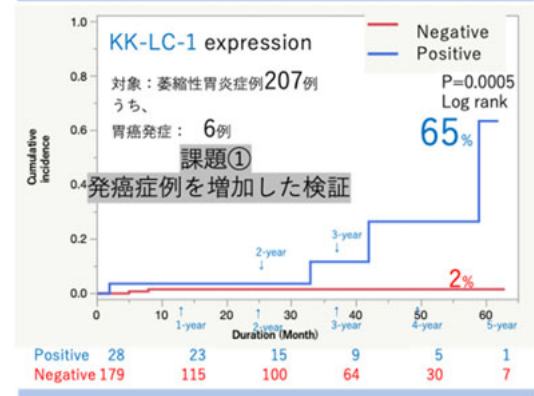


図4 KK-LC-1の発癌予測マーカーの証明

4. 研究の反省・考察

(1) がん予防ワクチン効果の証明

① mKk-1c-1 KOマウスの精子の表現型プロファイルからmKk-1c-1が運動能、浸潤能に関与していることが推察され、がん細胞におけるhuKK-LC-1の機能と類似していた。双方の発現プロファイルも鑑みると、本研究対象となった遺伝子がKK-LC-1のマウスhomologueである可能性が示唆された。

② huKK-LC-1とmKk-1c-1の低い相同性から自己抗原に対する免疫応答とは異なる結果が得られることが想定されたため、mKk-1c-1遺伝子をhuKK-LC-1遺伝子に置き換える計画に変更した。

(2) 発がん予測検証

① サンドイッチELISAに供する新たなKmabの作出が必要であることが明らかとなった。現在新たなKmab 64クローンを作成したため、それらを用いたサンドイッチELISAの構築を試みる。

② 分泌KK-LC-1ペプチドのLC-MS/MSによる検出が難しいことがわかった。今後は大量の培養上清を用い、かつ、Kmabもしくは、糖鎖に反応するレクチンを用いた濃縮を行い、再度LC-MS/MSに供する。

③ KK-LC-1の測定によって将来の胃がんの発症を予知できることを証明した。今後は、症例

数の増加による、データの確からしさを証明する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Yasuoka Y, Izumi Y, Fukuyama T, Omiya H, Pham TD, Inoue H, Oshima T, Yamazaki T, Uematsu T, Kobayashi N, Shimada Y, Nagaba Y, Yamashita T, Mukoyama M, Sato Y, Wall SM, Sands JM, Takahashi N, Kawahara K, Nonoguchi H. Effects of Roxadustat on Erythropoietin Production in the Rat Body. *Molecules* 2022; 27(3): 5399 [PMID: 35164384 PMID: PMC8838165 DOI: 10.3390/molecules27031119]
- ②Otsuka T, Fukuyama T, Futawatari N, Tahara K, Watanabe M, Ichiki Y, Soeno T, Takahashi Y, Yamazaki H, Fujimori Y, Ohshiro T, Kobayashi N, Kida M, Koizumi W, Kusano C. Detection of Kita-Kyushu Lung Cancer Antigen-1, a Cancer/Testis Antigen, in the Stomach Close to a Cancerous Condition. *Journal of Cancer* 2022; 13(14): 3526-3532 [DOI: 10.7150/jca.67534]
- ③Ichiki Y, Fukuyama T, Ueno M, Kanasaki Y, Goto H, Takahashi M, Mikami S, Kobayashi N, Nakanishi K, Hayashi S, Ishida T. Immune profile analysis of peripheral blood and tumors of lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Translational Lung Cancer Research* 2022; 11(11): 2192-2207 [DOI: 10.21037/tlcr-22-421]

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

CLiP 細胞由来の細胞外小胞による新規肝線維化修復治療の開発

1. 研究の目的

(1) 背景

① 肝線維化治療薬開発の重要性

肥満、飲酒、喫煙など生活習慣に起因する臓器の慢性炎症は、慢性腎臓病、慢性閉塞性肺疾患、脂肪性肝炎・肝硬変、慢性膵炎など、罹患臓器の線維化が特徴として挙げられる。人類は未だこの臓器の線維化を制御する効果的な手段を有しておらず、この解決は医療に飛躍的な進歩をもたらすものと期待できる。

② 低分子化合物誘導性肝前駆細胞 (Chemically-induced Liver Progenitors: CLiPs)

我々の研究グループでは、低分子化合物(A-83-01, CHIR99021)を用いたケミカルダイレクトリプログラミングによって、成熟肝細胞から肝前駆細胞(CLiPs)へ誘導しうることを見出した (Cell Stem Cell 20:41, 2017)。CLiPsは自己複製能および肝細胞と胆管細胞のいずれの細胞にも分化しうる多分化能を有する。さらにヒト成熟肝細胞より樹立したhuman CLiPs (hCLiPs)を、急性肝障害モデルマウス (TK-NOGマウス)に経脾的肝移植すると、肝障害によって脱落したマウス肝細胞がhCLiPsより分化したヒト肝細胞に効率よく置換され、マウス血清より高濃度のヒトアルブミンを検出することができた (eLife 8:4, 2019)。

③ human CLiPs (hCLiPs)による肝線維化抑制効果

hCLiPsの肝線維化改善効果の有無を調べるため、四塩化炭素(CCl₄)の少量長期投与による肝線維化モデルマウスに移植したところ、hCLiPsの肝内生着はほとんど起こらないにも関わらず肝線維化改善効果がみられることを見出した。

(2) 細胞外小胞 (extracellular vesicle; EV) 治療の創出

① EV治療の潮流

全身のあらゆる細胞は、エクソソームなど細胞外小胞(extracellular vesicle; EV)と呼ばれる脂質二重膜構造の小胞を分泌している。これには蛋白質やmiRNAなどが内包されており、細胞間情報伝達の役割を担う機能性微粒子である。新潟大学の寺井崇二教授らの研究グループでは肝硬変を対象とした他家脂肪組織由来幹細胞製剤ADR-001の治療を進めており、研究分担者の落谷孝広も分担した共同研究で、脂肪由来間葉系幹細胞が分泌するEVが肝硬変改善活性の本態であることを実証した (NPJ Regen Med 6:19, 2021)。EV治療は、細胞移植治療と異なり、免疫抑制下でなくとも投与可能と想定される点や、ドナー不足の問題が少ない点など多くの利点を有していると考えられ、新たな創薬モダリティとして世界的に研究開発が加速している。

② 3年以内に何をどこまで明らかにしようとするのか

hCLiPsによる肝線維化改善効果もhCLiP由来細胞外小胞 (hCLiP-EV)によって説明できるか評価するため、肝線維化における病態形成の中心を担う肝星細胞 (肝臓の線維芽細胞)とhCLiPsの共培養実験、およびhCLiP-EVの曝露実験を実施したところ、肝星細胞の活性化指標である α SMA (α -smooth muscle actin)の発現抑制がみられることを確認し得た。

そこで本研究では、hCLiP-EV投与によって肝線維化が改善することをin vivoで実証する。hCLiP-EVの内包物の分析から、EVがその標的細胞へ与える影響を説明しうる分子群を同定し、いかにして肝線維化改善に寄与するのか、そのメカニズムを解明する。これにより新たなEV創薬開発に必要なProof of Conceptを取得し、今後の臨床応用へ向けた取り組みを加速させる。

2. 研究の計画

(1) 不死化 hCLiPs の樹立

一定品質のhCLiP-EVを安定的に供給するための戦略のひとつとして、遺伝子導入によるhCLiPsの不死化の有益性を評価する。CDK4, Cyclin D1, TERTが発現することにより不死化したhCLiPsを樹立する。不死化hCLiPとの共培養によっても、標的細胞にhCLiP共培養と同一の変化が生じるか検証することで、EVリソースとしての不死化hCLiPsの機能を評価する。

(2) hCLiP-EV の肝線維化改善効果の実証

hCLiPsの肝線維化改善効果を証明した際と同様に、CCl₄肝線維化モデルマウスを作製し、これにhCLiP-EVを尾静注する。CCl₄肝線維化モデルマウスは、hCLiPs移植の際は、ヒト細胞の生着を得るために免疫不全マウス (NOD-SCID) を用いたが、hCLiP-EVは免疫原性が低いと考えられるため、野生型マウスでの実験もNOD-SCIDマウスと同時に進行させる。CCl₄を週2回・8週間の腹腔内投与の後にhCLiP-EVを投与し、2週後に肝臓を摘出し、肝組織内のコラーゲンを構成するアミノ酸の一種であるヒドロキシプロリン量を定量することにより、線維化の程度を評価する。また肝臓組織標本を作製し、シリウスレッド染色等により病的に肝線維化改善効果が見られるか確認する。

(3) hCLiP-EV の標的細胞に生じる表現型変化を説明する hCLiP-EV 内包分子の同定

EVの生理活性の特徴として欠かせない点がmiRNAの細胞間輸送である。ホルモンやサイトカインなど、蛋白質やペプチドによる細胞間情報伝達は古くから知られていたが、miRNAなど核酸を細胞間輸送することによる情報伝達の実態は未だ十分に明らかになっておらず、これを担うのがEVだと考えられる。hCLiP-EVに含まれるmiRNAを次世代シーケンサー解析 (miRNA-seq) により定量し、そのうち、成熟肝細胞からCLiPs樹立の際に変動するmiRNAを抽出し、線維化抑制や肝細胞再生に寄与することが期待できるmiRNAを複数同定する。in vitro実験系を用いて、標的細胞において当該miRNA下流に存在する分子の発現変化を検証し、特に重要なhCLiP-EV内包miRNAを同定する。さらにin vitroでみられたmiRNA下流の発現変化の妥当性を、マウス検体によって検証する。

3. 研究の成果

(1) 不死化 hCLiPs の樹立

マウスにhCLiP-EVを投与するにあたり、十分量かつ一定品質のhCLiP-EVを安定的に供給するため、CDK4 (R24C), Cyclin D1, TERTの強制発現によるhCLiPの不死化株を作成した。更にオンコスタチンMを用いた肝分化誘導処理を行った際のアルブミン分泌活性とCYP3a4代謝活性を評価したところ、EpCAMのプロモーター活性に応じてCDK4 (R24C), Cyclin D1, TERTを発現させる戦略が最もhCLiPsの肝細胞様形質を保持している事がわかり、hCLiPの機能維持にEpCAMが重要な役割を果たしていることが確認された。

この方法で樹立した細胞集団をフローサイトメトリーによってシングルセルクローン化し、最もアルブミン分泌能の高いクローンを更に選び出した (im-hCLiPc2)。作成したクローンの肝線維化改善効果を評価するため、肝線維化における病態形成の中心を担う肝星細胞 (肝臓の線維芽細胞) とim-hCLiPc2の共培養実験を行い、肝星細胞の活性化指標であるαSMAの発現抑制がみられることを確認できた。

(2) hCLiP-EV の肝線維化改善効果の実証

im-hCLiPc2の培養上清より超遠心法にてEVの取得実験を行い、ウエスタンブロットおよびnanotracking analysisの結果から、EVとして取り扱って差し支えない品質のサンプルが収集できることを確認した。電子顕微鏡観察においても、脂質二重膜で構成された小胞が取得できていることを確認した。そこで、CCl₄肝線維化モデルマウスを作製し、これにim-hCLiPc2を尾静注する実験を実施した。野生型マウスに対しCCl₄投与量の予備検討を行い、NOD-SCIDマウスと同濃度のCCl₄を投与すると強い腹膜炎を発症することが判明したため、希釈率を変更した上での投与を週2回・8週間継続中である。その後にim-hCLiPc2を投与し、更に2週後に肝臓を摘出し、肝線維化の程度を評価した。結果、統計学的に有意な肝線維化改善効果は得られておらず、EVの投与量や投与スケジュールの条件を変更して再検討する

べきと考えられた。またim-hCLiPc2由来のEVの肝星細胞への曝露実験の結果からも、 α SMAの発現抑制効果は濃度依存的に増強されるものではなく、至適濃度の設定が重要であることが明らかになった。

(3) hCLiP-EV の標的細胞に生じる表現型変化を説明する hCLiP-EV 内包分子の同定

成熟肝細胞、不死化前hCLiP、不死化後hCLiP、シングルセルクローニング後hCLiPのそれぞれの培養上清よりEVを収集し、miRNA-seqを実施した。EVに含有されるmiRNAの種類は不死化およびクローン化の過程で大きな変動がないことを確認できた。含有されるmiRNAのうち約80%はWNT pathway, TNF pathway, TGF β pathway, MAPK pathwayのすべてに関与するmiRNAであった。

4. 研究の反省・考察

(1) 不死化 hCLiPs の樹立

従来、肝細胞は2次元培養が困難であり、肝細胞における基礎的研究は主に肝細胞がん細胞株を用いて実施されてきた。2015年にHuchらにより肝細胞のオルガノイド培養法が報告された(*Cell* 160:299, 2015)が、マトリゲル内での培養法は、増殖が活発な細胞を十分に得る際の作業効率面で課題がある。その点、hCLiPを用いることでレンチウイルス導入実験やシングルセルクローニングの簡便さが確認され、今回取得した不死化hCLiP株は、肝細胞のin vitro実験モデルとして様々な用途で活用が可能であると考えられる。実際、本成果は日本消化器関連学会週間の国際シンポジウムで口頭発表に採択され、高い評価を得ることができた。

(2) hCLiP-EV の肝線維化改善効果の実証

創傷治癒作用のみが語られることの多いEV治療であるが、用法・用量の策定は入念に実施する必要があることが確認された。現在、複数のモデルマウスにおいて、複数のEV投与量・スケジュールでの評価をすでに開始しており、治療効果が得られる条件が定まりつつある。さらなる検討を継続する方針である。

(3) hCLiP-EV の標的細胞に生じる表現型変化を説明する hCLiP-EV 内包分子の同定

hCLiP-EVの治療効果を説明しうるmiRNAとして、現在200種類を超えるmiRNA候補が抽出されている。これらより寄与度の高いmiRNAを戦略的に選択し、in vitro実験系を用いて、標的細胞において当該miRNA下流に存在する分子の発現変化を検証する。さらにin vitroでみられたmiRNA下流の発現変化の妥当性を、マウス検体によって検証する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Matsuzaki J**, Kato K, Oono K, Tsuchiya N, Sudo K, Shimomura A et al. Prediction of tissue-of-origin of early-stage cancers using serum miRNomes. *JNCI Cancer Spectr* 7:pkac080 (2023)
- ② Saeki C*, **Matsuzaki J*** (co-first author), Kuroda M*, Fujita K, Ichikawa M, Takizawa S et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for hepatic necroinflammation in patients with autoimmune hepatitis. *BMJ Open Gastroenterol* 9:e000879 (2022)
- ③ Urabe F, **Matsuzaki J**, Takeshita F, Kishida T, **Ochiya T**, Hirai K. Independent verification of circulating miRNA as diagnostic biomarkers for urothelial carcinoma. *Cancer Sci* 113:3510-3517 (2022)
- ④ Urabe F, **Matsuzaki J**, Ito K, Takamori H, Tsuzuki S, Miki J et al. Serum miRNAs as liquid biopsy biomarker for the prediction of oncological outcomes in patients with bladder cancer. *Int J Urol* 29:968-976 (2022)
- ⑤ Takizawa S, **Matsuzaki J**, **Ochiya T**. Circulating microRNAs: challenges with their use as liquid biopsy biomarkers. *Cancer Biomark* 35:1-9 (2022)
- ⑥ Inokuchi K, Mori H, **Matsuzaki J**, Hirata K, Harada Y, Suzuki H et al. Masaoka

T. The efficacy and safety of low-dose rifabutin-based 7-day triple therapy as a third- or later-line *Helicobacter pylori* eradication regimen. *Helicobacter* 27:e12900 (2022)

- ⑦ Takamori H*, Urabe F*, **Matsuzaki J**, Kimura S, Sasaki H, Kimura T et al. Circulating microRNA profiling for prediction of oncological outcomes in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *Prostate* 82:1537-46 (2022)
- ⑧ Miura T, Mitsunaga S, **Matsuzaki J**, Takizawa S, Kato K, Ochiai A et al. Serum microRNAs as new criteria for referral to early palliative care services in treatment-naïve advanced cancer patients. *Oncotarget* 13:1341-49 (2022)

(2) 口頭発表

- ① **松崎 潤太郎**, 加藤 健, **落谷 孝広**. 早期がん診断に重要な血清miRNAの網羅的探索. 第7回リキッドバイオプシー研究会. 東京. 2023年1月
- ② 山口 智子, **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**. Engineering of human liver progenitor-like cells for a new exosomal therapy of liver fibrosis. International Session (Symposium 2) “From basic to clinical research: The strategy for new treatments for liver fibrosis and cirrhosis” 第30回日本消化器関連学会週間. 福岡. 2022年10月
- ③ 及川 千尋, **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**, 齋藤 義正. 膵発がん過程における膵上皮由来EVの形質変化の追跡. Poster Session. 第9回日本細胞外小胞学会学術集会. 東京. 2022年10月
- ④ **松崎 潤太郎**, 加藤 健, **落谷 孝広**. がん部位診断への貢献度の高い血清miRNAの探索. Mini Symposia 「新たながんリキッドバイオプシー技術開発と応用可能性」 第81回日本癌学会学術総会. 横浜. 2022年9月
- ⑤ 葉子祥, **松崎 潤太郎**, 及川 千尋, 金井 弥栄, 齋藤 義正. 誘導性CRISPR/dCas9を用いたC19MCの肝内胆管癌オルガノイドの分化における役割の解明. Japanese Oral Session 「肝がん・胆道がん(2)」 第81回日本癌学会学術総会. 横浜. 2022年9月
- ⑥ 及川 千尋, **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**, 齋藤 義正. 膵がんドライバー遺伝子変異誘導による形質変化の追跡. English Oral Session “Cancer genome/genetics” 第81回日本癌学会学術総会. 横浜. 2022年9月
- ⑦ **松崎 潤太郎**. 血中RNA はどこから来てどこへ行くのか. 第2回反分野的生物医療学会学術集会. 湯布院. 2022年9月

(3) 出版物

- ① **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広**. がん早期診断. テクノロジーロードマップ2023-2032 医療・健康・食農編, 日経BP, 2023年3月
- ② 及川 千尋, **松崎 潤太郎**, 加藤 健, **落谷 孝広**. がんの診断・治療に向けた血中循環miRNA, エクソソーム研究の最前線. 実験医学増刊 臨床実装が進む次世代がんバイオマーカー, 羊土社, 2022年6月
- ③ **松崎 潤太郎**, **落谷 孝広** 編. 疾患バイオマーカーとしてのマイクロRNAと診断応用, シーエムシー出版, 2022年6月

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、世代ごとの重要な金融課題を取り上げ、課題を解決する方策を検討することが求められる。

2021年度の助成研究では、全国1500名の大学生を対象に、奨学金制度に関する理解度と金融リテラシーとの関連に関する研究を行った。そこでは、金融知識得点は貸与型奨学金利用者より、給付型奨学金利用者や奨学金非利用学生の方が有意に高いこと、奨学金返還以外の金融リテラシー調査に比べて「わからない」(do not know)を選択する割合が高いこと、などが明らかになった。

そこで、2022年度の助成研究では、被雇用者社会人を対象に、2001年から開始され金融環境の悪化に伴い導入が増えている企業型確定拠出年金に関する金融リテラシーの実態を検討する。

金融経済教育の在り方は、アクティブラーニングを通じた実践教授型教育が有効と考える。また、同時に、金融経済との関わりはその国独自の文化に影響を受ける面もある。そのため、実態により適合した尺度を開発すること、value-added assessment、matrix puzzleなど最新の評価手法を組み込み信頼性・妥当性の高い調査票を設計して金融リテラシーを測定することが重要と考える。

2. 研究の計画

2022年度の助成研究では、被雇用者社会人を対象に、2001年から導入され、金融環境の悪化に伴い導入が増えている企業型確定拠出年金に関する金融リテラシーの実態を検討した。

具体的には、4年制大学卒業以上(20代:500サンプル、30代:1100サンプル。男女比1:1)、正社員被雇用者かつ勤務先に企業型確定拠出年金が導入されており、利用中の社会人を対象とした。

企業型確定拠出年金に関する先行研究はあまりないため、西村・西田・村上(2011)、NPO 確定拠出年金教育協会(2011)らを参考に、独自に調査票を設計した。

調査項目は、確定拠出年金に関する質問に加え、本助成研究の継続性という観点から2021年度調査で用いた奨学金返還のリ

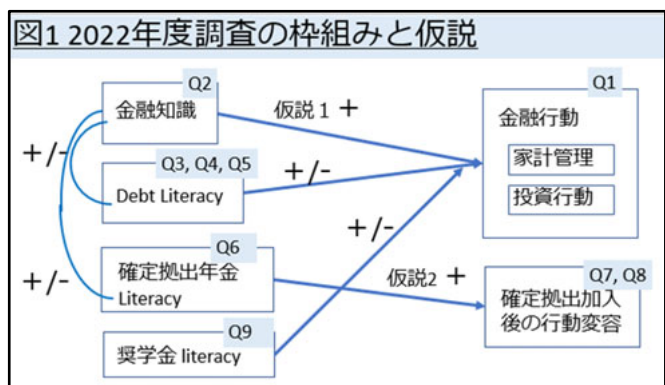
テラシー項目、金融経済リテラシーとしてあまり注目されることはないが、昨今、研究が増えている借金に関するリテラシー(以降、Debt リテラシーと略記)を追加した。

以上の条件設定をもとに、以下仮説を設定した。

仮説1: 金融知識得点が高いほど、健全な家計管理を行うだろう

仮説2: 確定拠出年金に関するリテラシーが高いほど、加入後、経済に関心を持ち、調べ学習など行うことが増えているだろう。

なお、Debt リテラシーの高低と金融行動の関係、Debt リテラシーと金融知識得点や確定拠出年金に関する相関は研究蓄積がほとんどないため、ア prioriにはわからない。本研究はこれら研究蓄積の少ない領域に関する基礎的資料を提供することもできる。



3. 研究の成果

(1) 仮説の検証

相関分析の結果を報告する。

① 仮説1：金融知識得点が高いほど、健全な家計管理を行うだろう

ほぼ、統計的に有意な正の相関を示した。確たる結果を報告するためには、相関分析に加え回帰分析などを行う必要がある。

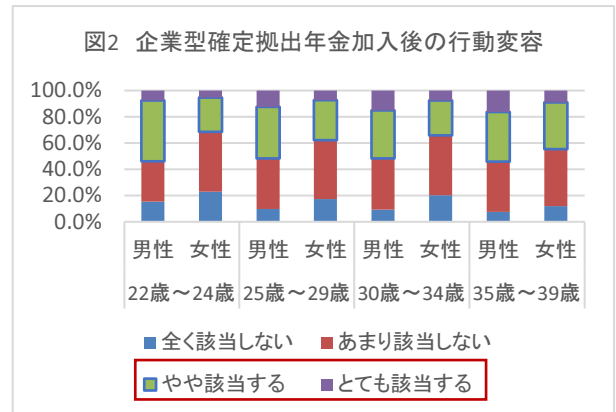
② 仮説2：確定拠出年金に関するリテラシーが高いほど、加入後、経済に関心をもち、調べ学習などを行っているだろう。

こちらも、ほぼ、統計的に有意な正の相関を示した。確たる結果を報告するためには、相関分析に加え回帰分析などを行う必要がある。

(2) 企業型確定拠出年金加入後の行動変容

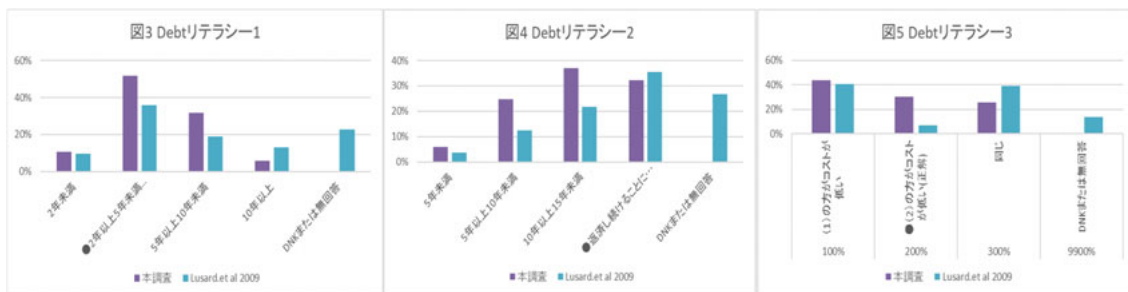
代表事例として質問「新聞やネット記事をよく読むようになった」に対する回答分布をみたものが図2である。

ここから、加入後、望ましい行動変容が観察されるのは、性別では女性より男性、年齢ではどちらかといえば、20代より30代であることがわかる。



(3) Debtリテラシーに関する先行研究との比較

Lusardi & Tufano (2009)は、Debtリテラシーに関する三大Questionsを開発し、1000人を対象に調査した。その結果と本結果を比較したものが図3(複利、72のルール)、図4 (リボルビング払い)、図5 (貨幣の時間的価値) である。



(注) 選択肢冒頭に●がついているものが正解であることを示す。

アメリカ調査ではDNKもしくは無回答の選択肢があるが、図3、図4に関しては日米ともに正解の割合に回答が集中して類似した分布を示した。図5の時間的価値を問う問題は難解であることも手伝ってか、正答率は日米ともに低い。

4. 研究の反省・考察

(1) 調査の実施が2023年2月となったこともあり、分析はまだ途中である。引き続き、分析を行い、精力的に学会発表、論文投稿を行う。

(2) 金融リテラシーに関する研究は、これまで貯蓄行動、収入支出の管理を従属変数とするものが多い。アメリカ「My Money. Gov」の概念図がしめすように、貯める、稼ぐ、使うに加えて、投資する、借りる、自分のオカネは自分で守るといった面のリテラシーを持つことも必要である。金融リテラシーが持つこのような多様な側面からアプローチした研究を継続していく。

5. 研究発表 2022.4-2023.4

(1) 学会誌等

- ① 高橋桂子・笠井直美・倉石智幸・小黒成寛・水瀬正人・長谷川宏之(2023.02). パネルデータを用いた小中学生「資質・能力」育みプロセスの分析、新潟大学教育学部紀要、15(2)、149-159
- ② Takahashi, Keiko, Kuramoto Ayako, & Kasai Naomi. (2023.02), How does father's involvement in child care and household work affect the evaluation of infant children's non-cognitive abilities?: Analyses with three-year pooled data, Proceedings of World Research Forum for advances in Science and Engineering (WRFASE) International Conference in Singapore, Feb' 2023, 38-40.
- ③ 高橋桂子・夏野星奈(2023.02). 奨学金の借入金額の決定に「極端回避性」、「金融自己効力感」と「時間割引率」はどのような影響を与えるか：高校生を対象に、下田歌子記念女性総合研究所年報、9、25-41.
- ④ 高橋桂子・阿部信太郎・猪瀬武則 (2022.09) . 金融知識、金融態度や自己コントロールが金融行動に与える影響：日本、アメリカ、韓国の比較、経済教育、41号、11-17

(2) 口頭発表

- ① Takahashi, Keiko, Kuramoto Ayako, & Kasai Naomi. (2023.03), How does father's involvement in child care and household work affect the evaluation of infant children's non-cognitive abilities?: Analyses with three-year pooled data, Paper presented at the International Conference on Humanities, Social Science and Business Management(Singapore)→ International Virtual Conference (ZOOM).
- ② Takahashi, Keiko. (2023.01), The effect of family communication on financial literacy among university students in Japan, Paper presented at the 21st Hawaii International Conference on Education (U.S.).
- ③ 高橋桂子・阿部信太郎・猪瀬武則(2022.10) 学生は経済問題をどのように解いているか：記述回答からの検討、経済教育学会第38回全国大会(明治大学).
- ④ 阿部信太郎・高橋桂子・猪瀬武則(2022.10) 大学生の金融リテラシーの質的調査、経済教育学会第38回全国大会(明治大学).
- ⑤ 猪瀬武則・高橋桂子・阿部信太郎(2022.10) 金融ケイパビリティを育成するためのPiggy Bankの活用と子どもの意思決定、経済教育学会第38回全国大会(明治大学).
- ⑥ 高橋桂子・倉石智幸・小黒成寛・水瀬正人(2022.05)小中学生の「資質・能力」育みのプロセス：パネルデータによる検討、日本家政学会第74回大会(Web).

(3) 出版物

なし

2022年度（第47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	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
小 西 博 応	大学院医学研究科	准 教 授	オミックス解析
清 水 逸 平	大学院医学研究科	准 教 授	マウスの解析
吉 田 陽 子	大学院医学研究科	特任准教授	マウスの解析
須 田 将 吉	大学院医学研究科	非常勤助教	マウスの解析
勝 海 悟 郎	大学院医学研究科	特 任 助 教	オミックス解析
降 旗 高 明	大学院医学研究科	助 教	マウスの解析

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、健康寿命の短縮に関与している。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・進展に関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 secretary 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・進展に関与していること（*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関与しており、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 secretary 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・組織特異的な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 secretory phenotype (SASP) の多様性を明らかにする

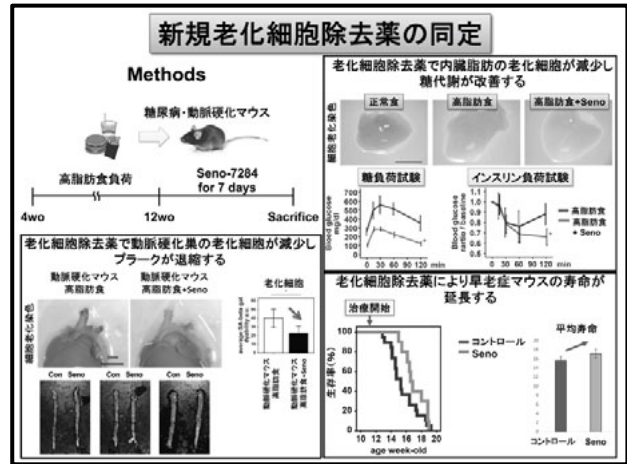
蓄積した老化細胞は NF- κ B 依存的に SASP 因子の発現を増加させることで、組織の慢性炎症を惹起し、病的老化形質の発現に寄与することが知られている。培養老化細胞を用いた研究において、SASP 因子は細胞の種類によって多様であることが知られているが、個体の組織における SASP 因子の多様性やそれぞれの SASP 因子の病的役割については明らかでない。そこでまず、p16-stop-tTA KI ; TetO-Tomato ; 組織特異的 Cre マウスから、細胞・組織特異的に蓄積した老化細胞を分離し、オミックス解析を行うことで、細胞・組織特異的な SASP 因子を同定する。次に、p16-stop-tTA 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。

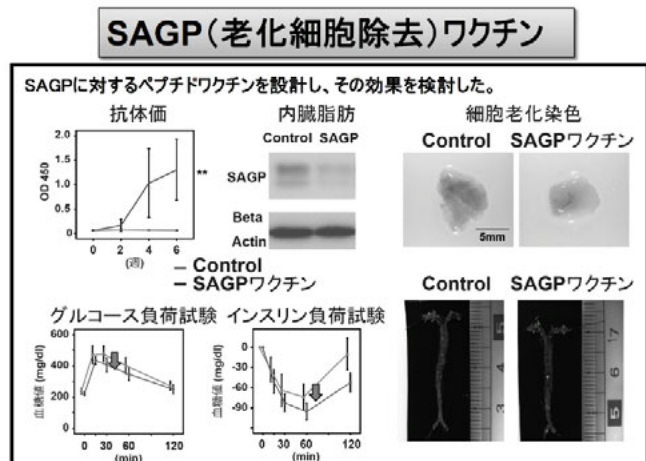
3. 研究の成果

2022年度は計画1-3で得られた知見に基づいて、新規抗老化治療の開発を行なった。その中で我々は新規の老化細胞除去薬のスクリーニングを行い、候補薬剤 Seno-7284 を同定した。その効果を病態モデルで確認したところ、高脂肪食負荷によって内臓脂肪組織に蓄積した老化細胞は、短期間の Seno-7284 投与により減少し、その結果、高脂肪食負荷による糖代謝異常やインスリン抵抗性が改善していた。動脈硬化マウスモデルに対する短期間の Seno-7284 投与によっても、動脈硬化巣に蓄積した老化細胞は減少し、可逆的に動脈硬化プラークの退縮が認められた。さらに、早老症モデルマウスに対する効果を検証したところ、Seno-7284 を中年期から投与したにもかかわらず、その寿命の有意な延長を認めた。Seno-7284 による治療前後の高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪から老化細胞を FACS で単離し、RNA-seq を行ってみると、治療直後に NK/CD8T 細胞に対するケモカインの発現が老化細胞特異的に増加していたこと、その阻害により Seno-7284 の老化細胞除去効果が減弱したことから、Seno-7284 は内因性の Senolysis 機構を増強することで、老化細胞除去に働いていることが示唆された。



オミックスデータから得られた老化抗原である SAGP 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。特に加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 V_o 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



抗体価

内臓脂肪

細胞老化染色

グルコース負荷試験

インスリン負荷試験

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。

4. 研究の反省・考察

計画 2 と計画 3 の進捗がやや遅れたが、全体的にはおおむね計画通りに進めることができた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

1. Furuuchi R, Minamino T. Endothelial SIRT-1 has a critical role in the maintenance of capillarization in brown adipose tissue. **iScience**. 2022 Oct 20;25(11):105424. doi: 10.1016/j.isci.2022.105424.
2. Yoshida Y, Minamino T. Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism. **Sci Rep**. 2022 Sep 1;12(1):14883. doi: 10.1038/s41598-022-19245-x.
3. Hayashi Y, Minamino T. Coagulation factors promote brown adipose tissue dysfunction and abnormal systemic metabolism in obesity. **iScience** 2022; 25(7): 104547. doi: 10.1016/j.isci.2022.104547.
4. Yoshida Y, Minamino T. Differing impact of phosphoglycerate mutase 1-deficiency on brown and white adipose tissue. **iScience** 2022; 25(5): 104268. doi: 10.1016/j.isci.2022.104268.
5. Suda M, Minamino T. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B regulates lysosomal integrity and lifespan of senescent cells. **Sci Rep** 2022; 12(1): 6522. doi: 10.1038/s41598-022-10522-3.
6. Iwata H, Minamino T. Identification of a novel therapeutic target in vascular dysfunction: A showcase of reverse and forward translational research linking between bench and bedside. **Eur Heart J**. 2022; 43(6): 501-503. doi: 10.1093/eurheartj/ehab263.

(2) 口頭発表

全て招聘講演

1. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. 23rd Northeastern Asian Symposium, "Cellular senescence: from pathophysiology to treatment" 2022/9/1, Hilton Tokyo
2. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for lifestyle-related disease. 7th Taiwan-Japan Academic Research Organization Workshop, 2022/9/15, Web
3. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for lifestyle-related disease. The 11th International Congress on Lipid & Atherosclerosis with Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease. Symposium 14 Impact of aging of vascular cells on atherosclerosis & its protection. 2022/9/16, Seoul
4. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for age-associated disease. The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2022/9/16 Kyoto
5. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of cardiovascular disease. 22nd International Vascular Biology Meeting Vascular Aging 2022/10/14 San Francisco Bay Area at the Oakland Marriott City Center

(3) 出版物

なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	上 智 大 学	研究所名等	イスラーム地域研究所
研 究 課 題	現代イスラームにおける公共性再構築をめぐる 動態の研究		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①イスラーム ②諸宗教 ③地域研究 ④公共性 ⑤融和 ⑥対立 ⑦共生 ⑧多元性		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 堀 雅 幸	上 智 大 学 総 合 グ ロ ー バ ル 学 部	教 授	総括、人類学

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阿 部 る り	上 智 大 学 文 学 部	教 授	ドイツ、トルコ担当、メディア研究
稲 葉 奈 々 子	上 智 大 学 総 合 グ ロ ー バ ル 学 部	教 授	フランス、日本担当、社会学
岩 崎 え り 奈	上 智 大 学 外 国 語 学 部	教 授	マグリブ担当、社会経済学
久 志 本 裕 子	上 智 大 学 総 合 グ ロ ー バ ル 学 部	准 教 授	マレー世界担当、人類学
澤 江 史 子	上 智 大 学 総 合 グ ロ ー バ ル 学 部	教 授	トルコ担当、政治学
辻 上 奈 美 江	上 智 大 学 総 合 グ ロ ー バ ル 学 部	教 授	マシュリク担当、社会学
東 長 靖	京都大学大学院 アジア・ アフリカ地域研究研究科	教 授	トルコ他担当、思想研究
山 口 昭 彦	上 智 大 学 総 合 グ ロ ー バ ル 学 部	教 授	イラン担当、歴史学
湯 浅 剛	上 智 大 学 外 国 語 学 部	教 授	中央アジア担当、政治学

現代イスラームにおける公共性再構築をめぐる動態の研究

1. 研究の目的

- (1) 近代市民社会を構成する大きな要素の一つである「公共性」を鍵概念として、イスラームと現代社会の双方について理解を深める地域研究の実践を目指す。
 - ①イスラームに伝統的に別種の公共性が備わっていたのかを問う。
 - ②ヨーロッパ的な公共性の受容の過程を問う。
 - ③現代においてイスラームの公共性はどのように再構成されつつあるのかを問う。
- (2) 1990年代後半に柔軟な地域研究として構想され、国内研究機関の連携によって継続されてきたイスラーム地域研究を継承し、新たに展開する。
 - ①ムスリムが少数派として生きる地域にも目を向け、各地域の事情を精査しつつ、同時代を生きるムスリムたちの共通性と多様性を総体として理解するよう努める。
 - ②グローバル化の波のなかを生きるムスリムたちの間に、私たちと同じように内なる葛藤や多様な方向性があることを認め、彼らの公共性再構築への動きと、私たち自身のそれとを相互に参照し連動させ活かす方策を検討する。
- (3) カトリック大学でイスラームについて研究することを自覚し、研究を宗教理解促進や宗教宗派関係の調和的展開に活かせるよう、他の研究機関と連携した活動を展開する。
 - ①2022年度新設の上智大学イスラーム地域研究所 (Institute of Islamic Area Studies, SIAS) の最初の共同研究として本研究課題に取り組み、併せて研究所の機能の充実を図る。
 - ②本研究の各種取り組みについて、他の学内11研究所との積極的な協働を図る。
 - ③イスラーム地域研究以外に存続する唯一のイスラーム地域研究拠点である京都大学イスラーム地域研究センター (および同大学ケナン・リファーイー・スーフィズム研究センター) とこれまで以上に積極的に連携する。
 - ④これまでも連携してきた海外研究機関 (フランス国立社会調査センター宗教社会ライシテ班、フランス経済法社会研究資料センターなど) との研究連携を強化する。

2. 研究の計画

- (1) 研究班の立ち上げと各班の研究目的の明確化を行い、各班での研究会等を実施する。
 - ①中東、中央アジア、東南アジア、ヨーロッパの専門家からなる研究代表者、研究分担者に加え、研究協力者に北米、アフリカなどの専門家を迎え、対象地域を世界大に広げる。
 - ②大衆イスラームの作り出す公共性 (A班)、水などの資源配分をめぐる公共性 (B班)、政治的急進派に対抗する公共性をめぐる動き (C班) の3班を当面は設定する。
- (2) 2020年以來、新型コロナウイルスの流行により停滞していた現地調査の活発化を図る。
 - ①各班で研究分担者等の個別調査を実施する。
 - ②いずれか1班による共同調査を実施する。
- (3) 学内外、国内外研究機関との連携によりワークショップ等を実施する。
 - ①海外研究機関と連携して国際ワークショップを1件以上開催する。
 - ②学内外研究機関とも連携してワークショップ等を開催する。
- (4) 公開講演会等を開催して研究の周知と成果の還元を図る。
 - ①上智大学が研究成果を広く公開する機会であるSophia Open Research Weeks (SORW) に積極的に参加する。
 - ②その他、講演会、解説付き映画上映会などを実施する。
- (5) 研究成果の国際会議での発表や成果物の刊行を積極的に進める。
 - ①2023年度に開催予定の第6回中東研究世界大会 (World Congress for Middle East Studies, WOCMES 2023) での部会発表に向けて準備をする。
 - ②論集SIAS Occasional Papersを刊行し、本研究の成果をここで発表する。
 - ③講演録SIAS Lecturesを刊行する。
- (6) 本研究に関連の研究資料を収集する。
 - ①各班が予算内で資料の購入を計画し、実施する。
 - ②収集資料を一般の利用に供せるよう、中央図書館と交渉する。

- (7) 研究所のウェブサイトなどを介した、研究情報発信を充実する。
- ① ウェブサイトの更新体制を確立し、日英語による発信を推進する。
 - ② 実施した講演などのオンデマンドでの配信を積極的に行う。

3. 研究の成果

- (1) 研究班を立ち上げ、研究打ち合わせ、研究会、研究合宿を実施した。
- ① 研究代表者1名、研究分担者8名に加え、若手研究者等が共同研究所員2名、準所員1名、PD研究員1名として参加し、本学他の博士後期課程学生も積極的に関与した。
 - ② 全体会議1回（7月）により大きな方針を定め、各班で適宜に研究打ち合わせを実施した。
 - ③ 研究会3回（12月、2023年2月、同月）、研究合宿1回（2月）を実施した。
- (2) 現地調査4件を実施した。
- ① エジプト（10月）、モロッコ（2023年2月）、トルコ（3月）で個別の調査を実施した。
 - ② 3名による共同調査1回を2023年3月にヨルダンで実施した。
- (3) 研究連携を伴うワークショップ3回を実施した。
- ① フランス国立社会調査センター宗教社会ライシテ班、京都大学イスラーム地域研究センター、ケナン・リファーイー・スーフィズム研究センターと連携して国際ワークショップを7月にオンライン、2023年2月に2名をパリから招聘して対面で実施した。
 - ② 科学研究費補助金助成研究との共催により、7月に国際ワークショップを対面で開催した。
- (4) 学生などを対象としたイスラーム地域研究の周知と成果還元を4回実施した。
- ① SORW 2022の企画として、オンラインシンポジウム「スーフィズムにみる音と身体の技法」を11月に開催した。
 - ② イスラーム関連の解説付き映画上映会3回（5月、6月、11月）実施した。
- (5) 研究成果を2件刊行した。
- ① SIAS Occasional Papersの第44号（訳書、出版物②）を刊行した。
 - ② SORW 2021で実施したオンライン連続講演会の内容をSIAS Lectures第9号（講演録、出版物①）として刊行した。
- (6) 本研究に関連の研究資料を収集した。
- ① 予定していた欧文図書約30件に加えて、国内所蔵が乏しい貴重資料である*Records of the Kurds: Territory, Revolt and Nationalism, 1831-1979* (A. L. P. Burdett ed., 13vols., Cambridge Archive Editions, British Documentary Sources)を購入した。
- (7) 研究所のウェブサイトなどを介した、研究情報発信を充実させた。
- ① 日英語による研究情報の公開を継続した。
 - ② SORW 2021で実施したオンライン連続講演会（上述）の一斉再配信を4月に実施した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 全体としては活発に研究を推進したと思われるが、初年度でもあり、また新型コロナウイルスの影響も受けて、年度下半期に活動が偏る形になった。また研究全体の収斂の方向も現時点ではあまり見えておらず、これも2023年度の課題となる。
- (2) 研究体制整備と研究会等実施
- ① 予定ではさらに多くの研究協力者の参画を呼びかける予定であったが及ばなかった。
 - ② 研究会等実施も2022年度の上半期には出足が鈍かった。
- (3) 現地調査実施
- ① 年度末に集中して実施する形になり、2023年度には夏期の実施に努めたい。
- (4) 学術連携を伴うワークショップ等実施
- ① 年度下半期には対面で行えるようになり、支出はかさんだが、効果はより大きくなった。
- (5) 講演会等の研究成果還元
- ① 年度初めから学内での催しを中心に着実に実施を積み重ねることができた。
- (6) 国際会議および刊行物による成果発表
- ① WOCMES 2023の開催の目処が立っておらず、国際会議部会組織については見直す必要がある。
 - ② 刊行物については初年度としては充分だが、今後、成果論集の刊行を行い、市販書刊行を目指す。

(7) 研究資料の収集

- ①C班が予定していた海外招聘が実施できなかったため、*Records of the Kurds*の購入を決断した。今年度、日本国内外のクルドに関係した催しが多かったこともあり、来年度以降に当該資料を有効に活用するとともに、予定の招聘を実施できるよう努める。
- ②中央図書館を介して、収集資料を学生、研究者の用に供するための手続きは十分に進まなかったため、2023年度に対応を完了させる。

(8) 研究広報の充実

- ①SORW 2022でのオンラインシンポジウムの各個の講演を、年度内にオンライン配信する予定であったが、果たせなかった。2023年度中に速やかに公開する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①赤堀雅幸「石原美奈子（編）『愛と共生のイスラーム——現代エチオピアのスーフィズムと聖者崇拜』」『年報人類学研究』13号、150–155頁、2022年6月
- ②稲葉奈々子「コロナ禍の非正規滞在外国人と貧困」『社会福祉研究』143号、2–11頁、2022年4月
- ③久志本裕子「障害をめぐるイスラームの言説と共生の文化への可能性：マレーシアにおけるイスラーム解釈の狭小化の問題から」『文化人類学』87巻4号、674–684頁、2023年3月
- ④湯浅剛「上海協力機構（SCO）の展開からみたウクライナ侵攻と中央アジア国際関係」『東亜』664号、2–9号、2022年10月
- ⑤Iwasaki Erina et al., “Quantifying Water Consumption through the Satellite Estimation of Land Use/Land Cover and Groundwater Storage Changes in a Hyper-Arid Region of Egypt,” *Remote Sensing* vol. 14 no. 11, DOI: 10.3390/rs14112608, May 2022
- ⑥Yamaguchi Akihiko, “Mediating between the Royal Court and the Periphery: The Zangana Family’s Brokerage in Safavid Iran (1501–1722),” *Iran: Journal of the British Institute of Persian Studies*, DOI: 10.1080/05786967.2023.2170814, February, 2023

(2) 口頭発表

- ①岩崎えり奈、井堂有子「エジプトにおける食糧「危機」が直撃する脆弱層の台所：家計調査データにみる」国際開発学会第33回全国大会企画セッション「ウクライナ紛争と中東・北アフリカ地域の食糧不安・危機：レバノン・エジプト・チュニジアの事例より」明治大学、2022年12月3日
- ②岩崎えり奈「エジプトにおける食糧『危機』が直撃する脆弱層」上智大学イスラーム地域研究所公開ワークショップ「今日の中東・北アフリカの食糧問題：チュニジア・レバノン・エジプトの事例より」上智大学、2023年2月10日
- ③東長靖「愛の言葉、愛の音、愛の踊り」上智大学イスラーム地域研究所、京都大学イスラーム地域研究センター主催オンラインシンポジウム「スーフィズムにみる音と身体の技法」上智大学、2022年11月12日（オンライン）
- ④Inaba Nanako, “Resistance of Detainees and Colonialist Rule in Immigration Detention Centers,” IMISCOE Spring Conference, Université Côte d’Azur, Nice, March 17, 2023
- ⑤Inaba Nanako, “Radical Left Movements as Infrastructure for Anti-Poverty Movements and Creation of Alternative Spaces in Japan,” 10th East Asian Regional Conference in Alternative Geography, National Taiwan University, Taiwan, December 9, 2022
- ⑥Tonaga Yasushi, “Toward the Moderate Islam Based on Sufism,” 4th International Intensive Summer School of Sufi Studies, Institute for Sufi Studies at Üsküdar University, Turkey, July 26, 2022 (Hybrid)
- ⑦Yamaguchi Akihiko, “From Mountains to Plains: Urban Transformation in Early Modern Kurdistan,” C01-Research Group 05 Conference on “Historic Cities of Afro-Eurasia, Comparing Tunisian and Mashriq Cities: Establishment, Characteristics and Urban Society/Inhabitants,” [MEXT KAKENHI JP23H05413], EPI Polytechnique, Sousse, Tunisia, December 26, 2022

(3) 出版物

- ①赤堀雅幸編『今日のスーフィズム：神秘主義の諸相を知る』SIAS Lectures 9、上智大学イスラーム地域研究所、2023年3月（「序 今日のスーフィズム：神秘主義の諸相を知る」執筆、1–14頁

- ②アルマンジョン、ピエール『エジプトのムスリム諸大学における教育、教義および生活』
赤堀雅幸監訳、内山智絵訳・解題、SIAS Occasional Paper Series 44、上智大学イスラーム
地域研究所、全iv+192頁、2023年3月（「監訳者あとがき」執筆、189-192頁）
- ③稲葉奈々子、樋口直人編『ニューカマーの世代交代：日本における移民2世の時代』明石
書店、2023年3月
- ④岩崎えり奈「社会運動としてのエジプト『1月25日革命』のその後」『エジプト』ミネル
ヴァ書房、61-86頁、2023年2月
- ⑤岩崎えり奈「出生率低下があらわす家族のかたち：チュニジア南部タタウィーン地域の
事例」長沢栄治監修、竹村和朗編『うつりゆく家族』明石書店、2023年3月
- ⑥東長靖「スーフィズムとは何か：神秘主義・道徳・民間信仰」『今日のスーフィズム：神
秘主義の諸相を知る』SIAS Lectures 9、上智大学イスラーム地域研究所、15-32頁、2023
年3月

2022年度（第47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
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味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施策を提言
 - ① 決済サービスの高度化：日本でのキャッシュレス化推進に向けて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：日本での個人による証券投資の促進に資する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・東南アジアで進展する経済の急速なデジタル化の特徴を把握
 - 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 新興国で急速に進む金融面でのデジタル化を考察し、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) 中長期的に経済・社会に大きなインパクトを及ぼすと期待される「脳模倣型 AI」について、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そのインテリジェンス特性を明らかにし、人的資本との補完・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、4つの小グループに分かれて分析を進め、成果をもとに有意義な政策提言を行うことを目指す。
 - 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、理論・実証分析により、日本で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。今後、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、日本の家計で証券投資が普及しない要因を理論的に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、理論分析により、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、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。
- (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する。

3. 研究の成果

- (1) 研究目的の1つめである、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変革を明らかにする研究に関しては、計画通り2020年度に研究が完了し、成果

が論文として刊行されている。(2020年度実績報告を参照)

- (2) 研究目的の2つめである、経済のデジタル化への金融制度・税制度の望ましい対応のあり方を明らかにする研究では、各小グループで既に2020年度・2021年度の実績報告に明記した成果があがっているが、2022年度には新たに以下のような研究成果があった。
- ① 決済サービスの高度化：キャッシュレス化のさらなる推進のためにはセキュリティ面に対して利用者が抱く不安の払拭が欠かせないことから、クレジットカードを主な対象としてキャッシュレス支払手段の不正利用対策の現況を分析し、取り組むべき課題の明確化を試みた。近年は不正の手口も高度化しており、官民は今後も連携してセキュリティ対策の強化を図ることが求められる。ただ、セキュリティ確保に必要な手順が増え、消費者や店舗の負担が増加するとかえってキャッシュレス化が停滞しかねない。この点をふまえると、ICTの活用等を通じて安全性と利便性の両立を実現していくことが今後の課題となる。この研究成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ①」として刊行された。
 - ② デジタル化時代に即した金融教育：COVID-19という不測の事態に直面した大学がどのような対応をとったか、また、デジタル・ツールの活用を今後どう考えればよいかについて、学生対象のアンケート調査も用いて分析・考察した。この研究成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ③」として刊行された。
 - 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：岸田内閣が掲げる「成長と分配の好循環の構築」に資する税制のあり方について分析した。現在の個人所得税制は効率性・公平性の両面で課題が多く、今日の多様化する働く環境に対応し、各人の働き方の選択にかかわらず税負担が中立的となるような制度形成を目指すべきである。その点では、税額控除制度や給付付き勤労税額控除制度の導入は「成長と分配の好循環」を形成する上での有効な切り札となりうるが、制度変革と併せて財政・税務行政のデジタル化といったオペレーショナルなインフラの整備が欠かせない。この研究成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ④」として刊行された。
 - ④ リテール金融の技術革新：リテール金融のうち特に中小企業向け与信に焦点を当て、個票データを用いた実証分析を行った。分析からは、2000年代以降の財投改革等を経て、中小企業向けの公的金融は信用保証に軸足を移してきたが、これまでのところ特にオーバープレゼンスを示唆する統計的エビデンスは得られなかった。今後はデジタル技術の導入による公的金融制度のさらなる高質化が期待される。なお、中小企業部門における重債務企業のウェイトの高さは、リテール金融を通じた公的支援による新陳代謝の停滞の可能性を示しており、そのあり方の検討は今後長期的な課題になる。さらに、政策転換のスピード感という側面に着目し、フランスの経済政策が1982～83年になぜ自国優先の国家主導型からヨーロッパ重視に大きく転換したか、経済データとフランス公文書館所蔵ヤルモンド紙等のアーカイブの諸資料から、政策転換の根拠について考察した。そして、フランス同様に自国優先でグローバルの変化への政策対応スピードが遅い日本へのインプリケーションも併せて考察した。これらの研究成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等⑤・②」として刊行された。
- (3) 研究目的の3つめである、新興国における急速な経済のデジタル化の進展に関する研究では、2021年度にメキシコで商業銀行を中心とした調査を実施したことに続き、2022年度はデジタル化の影響が大きいと推測されるクレジットカード決済に着目し、メキシコの信用保証協会へのインタビュー調査を実施した。コロナ禍では、対面方式の困難さから、オンラインによる手続きが強化され、インターネット上での契約の締結システムの強化の実施がみられた。また、商業部門ではクレジットカード、デビットカードの使用が拡大し、コロナ禍での対面式の経済活動の縮小を補うことに貢献していることが確認された。
- (4) この他、金融リテラシー教育および東南アジア経済の専門家を招き、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、専門知識を聴取するとともに、各メンバーの研究成果を統合した政策提言をまとめるうえでの有意義な意見交換が行われた。

第1回シンポジウム

【日 時】 2022年4月26(火) 18:00～19:30

【報 告】 関田静香氏(京都産業大学経済学部准教授)

【テーマ】 「金融リテラシーと資産蓄積」

第2回シンポジウム

【日時】 2023年1月31日(火) 17:30~19:00

【報告】 藤倉 孝行 氏 (独立行政法人中小企業基盤整備機構)

【テーマ】 「インドネシアの経済発展とその課題」

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の考察

3年間にわたる研究から、①効率性の高いリテール金融仲介、②利便性の高いリテール決済、③公平性・中立性の高い税制を実現していくうえで、デジタル化、すなわち、AIやICTの発展が大きな役割を果たすことがあらためて認識された。また、諸外国に比して遅れているとされる日本の金融教育に関しても、デジタル・ツールの活用がその推進に資することが確認された。これらはある意味では当然の結論とも言えるが、本研究課題からはさらに、金融制度・税制度の双方にあてはまるデジタル化の横断的な課題として、(1)新たに生じるセキュリティ・リスクへの万全な対応が求められること、(2)ハード面のデジタル化だけでは不十分であり、組織運営などのソフト面での対応が不可欠であることが明らかになり、有意義な政策提言ができたと言える。

(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、全研究期間にわたって新型コロナウイルス感染症の感染拡大の影響を大きく受けた。研究分担者のうち1名はメキシコ在住のため、中米の調査研究への影響は抑えられたが、東南アジアへの現地調査は実施できなかった。ビデオ会議システムの活用などの手立てを講じたものの研究推進の制約になったことは否定しがたく、この点が反省点である。

また、2023年に入って生成系AIが経済・社会に及ぼす影響が急速に注目を集めるようになったが、3年間の研究期間の最終盤であったこともあり、分析対象として含めることを断念せざるを得なかった。この点は反省点であり、本研究課題を発展させた次の研究プロジェクトにおいて精力的に分析していきたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①中田 真佐男 「リテール向けキャッシュレス決済における不正利用の現状と課題」、『個人金融』、Vol. 17 No. 2、36-48頁、2022年8月
- ②内田 真人 「ミッテラン政権における経済政策のグローバル化への転換 ～ 経済実態での限界の視点から～」、成城大学 経済研究所研究報告 第98号、1-36頁、2023年3月
- ③内田 真人 「ポストコロナにおける学びの質向上に関する一考察 ～新型コロナウイルスでのオンライン授業の経験を踏まえて～」、『社会イノベーション研究』、第18巻2号、1-14頁、2023年3月
- ④花井 清人 「個人所得税での税額控除制度を活用した成長・分配戦略」、『東京税理士界』、第784号、10頁、2022年5月
- ⑤後藤 康雄 “Economic and Financial Effects of Credit Guarantee as Means of Policy-Based Finance”, Public Policy Review, Vol.18 No.2, pp.1-26, January 2023
- ⑥福島 章雄 “Can Depreciation of the Currency Cause Rise in Domestic Prices? Recent Japanese Case” (co-author: Yutaka Kurihara, Hideo Fujiwara, Ken-ichiro Oohama), Journal of Business & Economic Policy, Vol.9 No.3, pp.22-28, September 2022

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

2022年度（第47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タンパク質 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酸素結合能 ⑦酵素 ⑧血中半減期		

○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)、ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)の合成と血中滞留性評価、有効性評価、安全性評価、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微細構造の量子化学計算
加 藤 遼	中央大学理工学部	助 教	安定酸素錯体のメカニズム解析
木 平 清 人	宇宙航空研究開発機構 (JAXA)	研 究 員	rHbのX線結晶構造解析
岩 崎 正 之	東海大学医学部	教 授	SFHbNPの安全性評価
河 野 光 智	埼玉医科大学 総合医療センター	教 授	SFHbNPの有効性評価、安全性評価

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、それが安全性と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、粒径はもう少し大きいほうが好ましい。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-シェル型のヘモグロビンナノ粒子(HbNP、粒径90nmまたは30nm)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た。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

第3年次である2022年度は以下の4項目を実施した。

- (1) 2021年度に確立した手法に従い、赤血球から赤血球膜のみを除去して得たストロマフリーHb(SFHb)を用いてSFHbナノ粒子(SFHbNP)を合成する。粒子内に残存する酵素の活性を定量し、SFHbNPの高い酸素錯体安定性のメカニズムを解明する。
- (2) シアニン色素(Cy5.5)で蛍光ラベル標識したSFHbNPをラットに静脈内投与し、血中半減期(t_{50})を算出する。
- (3) ラット50%脱血ショックモデルを作成し、SFHbNP溶液を静脈内投与することにより蘇生する。2時間後までの呼吸循環器系パラメーター、血液ガスパラメーターなどの観測から、SFHbNPの有効性を明らかにする。実験終了後、血液生化学検査を行う。
- (4) 上記(3)のラット50%脱血ショックモデルにおいて、投与7日後に血液生化学検査、臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)の病理検査を行い、SFHbNPの安全性を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 高い酸素錯体安定性のメカニズム解明

SFHbには微量のカタラーゼ(Cat、過酸化水素の不均化酵素)が残存するため、SFHbNPは安定な酸素錯体を形成する(2022年度成果)。SFHbNPのカタラーゼ活性は200units/mgであり、原料SFHb(198units/mg)と同等であった。一方、SFHbにはスーパーオキシドディスム

ターゼ(SOD、スーパーオキシドアニオンラジカルの不均化酵素)も微量残存する。SFHbNPのSOD活性は0.06units/mgであり、原料SFHbの8%まで低下していた。SFHbNPの抗酸化能はCat活性に由来することが明らかとなった。

(2) 血中半減期の測定

麻酔下のラットにCy5.5ラベル化SFHbNPを投与し、経時的に採血を行った。得られた血清の蛍光強度の減衰から算出したSFHbNPの t_{50} は20.7時間であり、Hb(0.7時間)の約30倍に延長していることがわかった。実験終了後、血液生化学検査を行ったところ、肝機能の指標[ALT(Alanine transaminase)、AST(Aspartate Aminotransferase)]が高値であることが判明した。粒径と肝臓への取り込みに着目し、粒径30nmのSFHbNPを同様な手法で合成した。酸素親和性($P_{50}=8\text{Torr}$)、酸素錯体安定性、酵素活性、血液適合性が粒径90nmのSFHbNPと変わらないことを確認した後、血中半減期測定を行った。 t_{50} は17.3時間と長く、実験後のALT、ASTは正常値を示した。これ以降、粒径30nmのSFHbNPを用いて動物実験を進めることとした。

(3) 有効性評価

SFHbNP溶液を用いて蘇生したラットは全例が2時間後まで生存した。一方、乳酸リンゲル液投与群(対照群)では、2時間以内に60%が死亡した。50%脱血後に低下した平均動脈圧(MAP)、心拍数(HR)、動脈血二酸化炭素分圧(PaCO_2)、pHは、SFHbNPの投与により脱血前値(基準値)まで回復し、その効果は返血群と同等であった。しかし、乳酸リンゲル液投与群では、各パラメーターの十分な回復は見られなかった。実験後のALT、ASTは、乳酸リンゲル液投与群では高値となったのに対し、SFHbNP群では脱血前値と変わらなかった。

(4) 安全性評価

SFHbNP溶液投与7日後におけるALT、ASTに変化はなかった。SFHbNP溶液は血球成分を含まないため、蘇生直後に赤血球数やヘマトクリット値は低下するが、7日後には基準値に回復していた。7日後の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓の病理検査に異常は認められなかった。

4. 研究の反省・考察

- (1) SFHbNPの高い酸素錯体安定性はCatの抗酸化能によることが明らかとなった。さらにSFHbNPのCat活性は6ヶ月間変化しないこともわかった(4°C保存)。SODは分子量が32kDaと小さいため、重合時の化学修飾、または精製(限外ろ過)時の濃度減少により活性が低下したものと考えられる。残存するCatの抗酸化能だけで十分に安定な酸素錯体が得られることがわかった。
- (2) SFHbNP(90nm)は血中滞留性に優れた人工酸素運搬体であることが明らかとなった。しかし、実験後にALT、ASTが上昇することもわかった。血中濃度推移において、初期分布相が多かったことから、SFHbNP(90nm)の多くは臓器の食細胞により代謝されていると考えられる。肝臓においても組織マクロファージ(クッパー細胞)にSFHbNPが捕捉され、負荷がかかったものと推察される。そこで、粒径を30nmに小さくしたSFHbNP(30nm)を合成し、同実験を行ったところ、長い血中半減期は保たれたまま、ALT、ASTは正常値を維持した。SFHbNPの粒径を適切に制御することにより、肝臓への負荷を抑制できることが明らかとなった。
- (3) SFHbNP溶液がラット50%脱血ショックモデルの蘇生にきわめて有効であることが実証された。今後、末梢組織の酸素分圧測定、血流中におけるSFHbNPの自動酸化速度の測定なども必要と考えられる。
- (4) 投与7日後の血液生化学検査から、肝機能に異常はなく、赤血球数やヘマトクリット値が基準値に戻っていたことから、造血機能にも問題ないことが示された。SFHbNPが安全性と有効性を兼ね備えた人工酸素運搬体として機能することが明らかとなった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Zinc Substituted Myoglobin-Albumin Fusion Protein: A Photosensitizer for Cancer Therapy, T. Yamada, Y. Morita, R. Takada, M. Funamoto, W. Okamoto, M. Kohno, T. Komatsu, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202203952:1-7.
- ② Core-Shell Structured Hemoglobin Nanoparticles as Artificial O_2 Carriers, W.

Okamoto, M. Hasegawa, N. Kohyama, T. Kobayashi, T. Usui, H. Onozawa, R. Hashimoto, M. Iwazaki, M. Kohno, R. Georgieva, H. Bäuml, T. Komatsu, *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, *5*, 5844-5853. (イメージ図が当該号の表紙として掲載)

- ③ (ヘモグロビン-アルブミン)クラスター型人工酸素運搬体の開発, 小松晃之, *膜* **2022**, *47*, 252-256.
- ④ Catalase-Albumin Cluster Incorporating Protoporphyrin IX: O₂ Generating Photosensitizer for Enhanced Photodynamic Therapy, T. Yamada, M. Katsumi, Y. Yagisawa, M. Ichihara, T. Komatsu, *Mater. Adv.* **2022**, *3*, 6451-6457.
- ⑤ Hemoglobin-Albumin Clusters as an Artificial O₂ Carrier: Physicochemical Properties and Resuscitation from Hemorrhagic Shock in Rats, W. Okamoto, M. Hasegawa, T. Usui, T. Kashima, S. Sakata, T. Hamano, H. Onozawa, R. Hashimoto, M. Iwazaki, M. Kohno, T. Komatsu, *J. Biomed. Mater. Res.* **2022**, *110*, 1827-1838.

(2) 口頭発表

- ① 高峯晃生、岡本 航、高山夏実、小松晃之、コア-シェル型構造のストロマフリーヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素結合能、日本化学会第103春季年会
- ② 藤澤隼矢、臼井朝音、岡本 航、小松晃之、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)結合アルブミンの合成と構造、日本化学会第103春季年会
- ③ 藤田真悠花、岡本 航、吉田瑠佳、小松晃之、表面にポリオキサゾリンを結合した赤血球の合成、日本化学会第103春季年会
- ④ 臼井朝音、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、岩崎正之、河野光智、田口和明、小松晃之、動物用人工血漿増量剤“Aloxa”の安全性および有効性評価、第29回日本血液代替物学会年次大会
- ⑤ 小林樹広、岡本 航、加藤 遼、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa”の合成と酸素結合能、第29回日本血液代替物学会年次大会
- ⑥ 高山夏実、岡本 航、小松晃之、抗酸化能を有する人工酸素運搬体“ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)”の開発、第29回日本血液代替物学会年次大会【**学生講演賞受賞**】
- ⑦ 吉田瑠佳、岡本 航、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾赤血球の開発、第29回日本血液代替物学会年次大会【**学生講演賞受賞**】
- ⑧ 岡本 航、臼井朝音、橋本 諒、小野沢博登、岩崎正之、河野光智、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa”の有効性評価(50%出血性ショックラットの蘇生試験)、第29回日本血液代替物学会年次大会 (**依頼講演**)
- ⑨ 山田大雅、勝見真帆、小松晃之、プロトポルフィリン結合HemoAct製剤の合成と光線力学療法への応用、第29回日本血液代替物学会年次大会 (**依頼講演**)【**最優秀学生講演賞受賞**】
- ⑩ 小松晃之、ヘモアクト型人工酸素運搬体製剤の最新動向、第29回日本血液代替物学会年次大会 (**依頼講演**)
- ⑪ T. Komatsu, Hemoglobin-Based O₂ Carriers as Red Blood Cell Substitutes Prepared using Maleimide-Thiol Conjugates, 10th Asia Biological Inorganic Chemistry (AsBIC10) (**招待講演**)
- ⑫ 臼井朝音、岡本 航、河野光智、田口和明、小松晃之、動物用人工血漿増量剤“ポリオキサゾリン修飾アルブミン”の合成と有効性、第12回CSJ化学フェスタ2022
- ⑬ 石井幸太、勝見真帆、山田大雅、小松晃之、(亜鉛置換ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第12回CSJ化学フェスタ2022
- ⑭ 山田大雅、勝見真帆、小松晃之、がん治療光増感剤としての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、錯体化学会第72回討論会
- ⑮ 勝見真帆、山田大雅、小松晃之、(亜鉛ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成と光線力学活性、錯体化学会第72回討論会
- ⑯ 小松晃之、(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター型人工酸素運搬体の開発、日本膜学会第44年会 (**招待講演**)
- ⑰ 山田大雅、勝見真帆、小松晃之、プロトポルフィリン結合(カタラーゼ-アルブミン)クラスターの光線力学活性、第71回高分子学会年次大会

(3) 出版物

- ① ヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体(赤血球代替物)の開発、小松晃之、ヘムタンパク質の科学、生理機能の理解とその展開に向けて、監修：城 宜嗣、青野重利、齋藤正男、p. 407-413、エヌ・ティー・エス出版

創薬展開を見据えたリラキシンの化学合成基盤の創出 ーセレン化学に立脚したリラキシン製剤開発ー

1. 研究の目的

妊娠期の女性の黄体および胎盤から分泌される『リラキシン』は、異なる2本のポリペプチド鎖（A鎖・B鎖）が、システイン（Cys）残基間で形成される2組のジスルフィド（S-S）結合によってリンクした構造をもつ（図1）。リラキシンは本来、妊娠女性の産道を拡張するために分泌されるホルモンであるが、近年ではその心不全緩和、抗繊維化、抗炎症などの作用が見いだされ、製剤としての臨床応用が期待されている。一方で、一般試薬として販売されているリラキシンは極めて高額であり、その希少性から基礎研究の遂行すらままならない。また、リラキシンは投与後すぐにプロテアーゼの影響を受けて速やかに分解することから、製剤応用を見据えては血中における分子の長寿命化が課題である。現状のリラキシン製造では、遺伝子組換え技術を利用した生物依存的な合成法が採用されており、人工アミノ酸の導入による機能改変は困難である。本研究では、化学合成に立脚したリラキシンの効率的な製造基盤を確立し、分子デザインの自由度を拡張するとともに、具体的な高機能リラキシンを提案することを本研究の全体の目的とする。

化学合成基盤確立の足掛かりを得るために、初年度は、下記2点を小目的として設定した。

- (1) 新たなリラキシンの化学合成経路を提案するとともに、その有効性を実証する。
- (2) 人工リラキシンとしてセレノリラキシン（図1; SeRlx- α ）の合成を検討し、合成効率の向上と構造・機能特性を理解する。

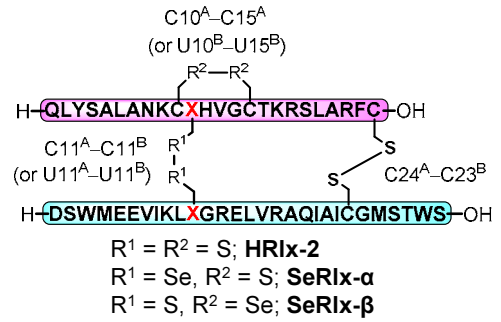


図1: ヒトリラキシン2の一次配列ならびにジスルフィド結合トポロジー。

2. 研究の計画

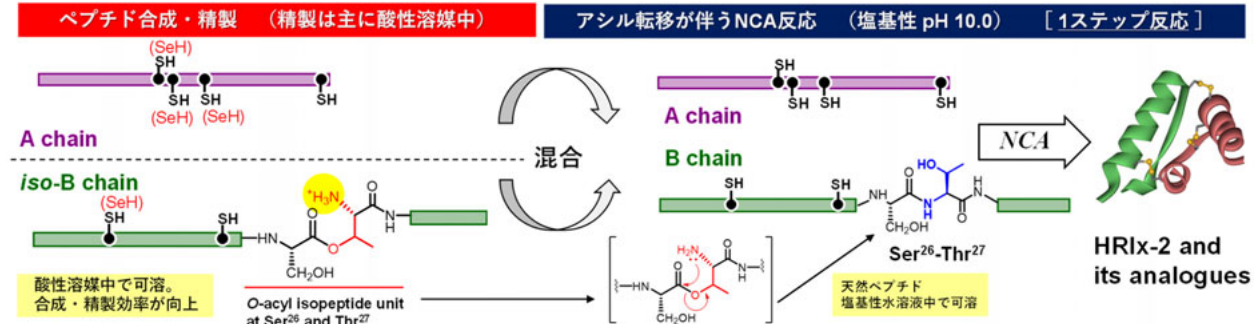


図2: O-アシルイソペプチド（AIP）法を利用したリラキシンアナログの合成戦略。

リラキシンは、A鎖とB鎖がS-S結合で架橋されたヘテロダイマー型の構造を有し、分離した各構成ペプチド鎖から適切な鎖間カップリングを介して高次構造を形成させることは難しい。加えて、B鎖は中性以下の水溶液中では難溶であり、ペプチド合成において必須である酸性水溶液中でのペプチド精製工程を極めて困難なものとする。我々は以前に、リラキシンと同様の構造を有するペプチドホルモン、「インスリン」について、構成ペプチド鎖（A・B鎖）を1:1のモル比で混合するだけで、目的の高次構造体を得ることができる手法を確立した。この天然鎖アセンブリ法（Native chain assembly; NCA）を新規化学合成技術の創出基盤とする。さらに、酸性水溶液中での溶解性を克服するため、B鎖の配列上にO-アシルイソペプチド（O-AIP）ユニットを組み込む戦略を考案した。当該ユニットは、構造上、酸性溶液中でイオン化したアミノ基が遊離した形で存在するため、ペプチド鎖の溶解性の向上が期待できる（図2）。NCA反応は、塩基性条件下で行われるため、O-AIPユニットはアシル転移によって天然ペプチド結合へと迅速に変化し、最終的には目的のヒトリラキシン2（HRlx-2）が得られるはずである（図2）。この戦略は、SerまたはThrとそのN末端側の隣接アミノ酸部分にのみ適応できるため、この研究ではSer26-

Thr27 を *O*-AIP 部位として選定した。初年度は、下記 3 点を具体的な実施項目として設けた。

- (1) 固相ペプチド合成法による *O*-AIP ユニットの組み込んだリラキシン B 鎖 (*iso*-HR1x-2B) の化学合成。
- (2) 構成ペプチド鎖を用いた NCA 法による高次構造形成。
- (3) 人工リラキシンであるセレノリラキシン合成への応用。

これらの遂行により、本戦略の妥当性とリラキシンアナログへの汎用性について明らかにする。

3. 研究の成果

(1) *iso*-HR1x-2B の化学合成

本研究は、荒井（代表者）と片山（分担者）が主導して実験に取り組んだ。*O*-AIP ユニットの既報 (*Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1720) に従い容易に得ることができ、固相ペプチド合成 (SPPS) 法によって *O*-AIP ユニットの組み込んだリラキシン B 鎖 (*iso*-HR1x-2B) を合成した。樹脂上で伸長させたターゲットペプチドは、トリフルオロ酢酸 (TFA) を主成分とする脱樹脂剤と反応させ、樹脂からペプチド鎖を切り出す必要がある。一般的な TFA 系脱樹脂剤を用いて B 鎖の脱樹脂を行ったが、メチオニン側鎖のスルフィドがスルホキドに酸化された副生成物が大量に得られた。そこで、脱樹脂における反応条件を検討し、少量の還元剤を添加した混合試薬を脱樹脂剤として用いたところ、目的の *iso*-HR1x-2B が主生成物として得られた。重要なことに、脱樹脂後に得られた粗ペプチドは酸性水溶液 (pH 4.0) に溶解することができ、逆相 HPLC による精製工程が格段に効率化された。精製後の *iso*-HR1x-2B は、酸性緩衝溶液だけでなく塩基性緩衝溶液 (pH 10.0) にも容易に溶け、さらに塩基性条件下では直ちに *O*-AIP ユニットの分子内アシル転移反応が進行し、目的の天然ペプチド鎖に変換されることが明らかとなった (図 3a)。

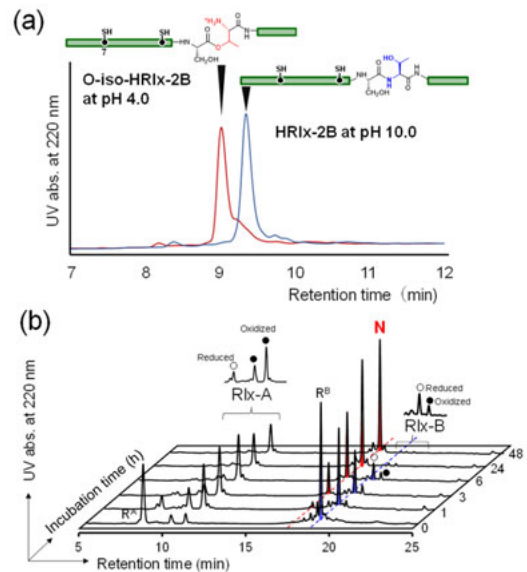


図 3. *iso*-HR1x-2B の合成とそれを用いた A 鎖とのカップリング (NCA) 反応。(a) *iso*-HR1x-2B の天然ペプチド B 鎖への変換。(b) リラキシンの NCA 実験から得られた HPLC 分析結果。

(2) NCA 反応によるリラキシン (HR1x-2 [図 1 R¹=R²=S]) の調製

続けて、NCA 反応に必要なリラキシンの A 鎖も同様の固相ペプチド合成法によって調製した。A 鎖は従来の方法によって滞りなく合成できた。得られた A 鎖および B 鎖 (*iso*-HR1x-2B) を用いて、各鎖を直接的にカップリングさせることで、目的の HR1x-2 を合成した。反応条件は、インスリンの化学合成にて我々が以前に確立した NCA 反応条件のそれと同様のものを適用し、A 鎖および B 鎖をグルタチオン (GSH/GSSG) 存在下、一定の pH・温度条件下で反応を行った。時間の経過に伴って、A 鎖と B 鎖の間で徐々にカップリングが進行し、天然のフォールド構造を有する HR1x-2 (N) が、HPLC 収率にして 48% で得られた (図 3b)。

(3) セレノリラキシン (SeR1x- α [図 1 R¹=Se, R²=S]) の合成

HR1x-2 の合成に関して、想定よりも短い期間で合成方法が確立された。当初、SeR1x- α の合成は、2023 年度より実施する予定であったが、HR1x-2 の合成ノウハウを応用して SeR1x- α の合成に着手した。ジセレニド (Se-Se) 結合は、S-S 結合よりも熱力学的に安定である。故に、Se-Se 結合への置換が分子全体の安定性、生理活性ならびに薬物動態へどのような効果を与えるか興味深い。SeR1x- α の合成に必要なセレノシステイン誘導体 (Sec) の化学合成は、岩岡 (分担者) が主導して行った。*iso*-HR1x-2B と同様の手法によって、B 鎖の 11 番目の Cys 残基を Sec 残基に置換したペプチド鎖 (*iso*-SeR1x- α B) を SPPS 法によって合成した。同様に SeR1x- α の構成ペプチドとして、A 鎖の 11 番目の Cys 残基を Sec 残基に置換したペプチド鎖 (SeR1x- α A) の合成にも成功した。フォールド構造を有する SeR1x- α を調製するために、構成ペプチド鎖の直

接的なカップリング反応を試みた。SeR1x- α A と *iso*-SeR1x- α B を適切な濃度条件下で、グルタチオン酸化還元溶液中で混合し、至適 pH・温度条件下で反応を行った。反応溶液の一部を HPLC で分析したところ、フォールドした SeR1x- α に相当するピークが観測された (HPLC 収率: 73%)。精製後の SeR1x- α の純度は、市販の HR1x-2 と同等であることが HPLC 分析から明らかになった (図 4a)。また、HPLC 保持時間が野生型とほぼ同じであり、SeR1x- α の立体構造が HR1x-2 のそれと類似していることを示唆した。さらに ELISA によって、SeR1x- α が HR1x-2 と同程度のリラキシン受容体会合能を有することがわかった (図 4b)。このことは、SeR1x- α がリラキシン受容体と会合し得る HR1x-2 様の構造を有していること、さらに SeR1x- α が野生型のそれと同様の生理活性を発揮し得ることを示唆している。また、SeR1x- α のトリプシンによる酵素分解実験から、適切な架橋位置に Se-Se および S-S 結合を有する目的物が得られたものと考えられる。現在、吉野 (分担者) らが子宮内膜症に対する SeR1x- α の薬理効果に関する検討を行っている。

4. 研究の反省・考察

(1) *iso*-HR1x-2B の化学合成に関する反省と考察

Ser26-Thr27 を対応する *o*-AIP ユニットに置換した B 鎖アナログ (*iso*-HR1x-2B) の化学合成に成功した。酸性溶媒における溶解性の向上も見られ、塩基性条件下における分子内アシル転移による天然型ペプチド鎖への迅速な変換反応も確認できた。合成戦略が良好に機能し、B 鎖の合成効率の向上が図れた。一方で、B 鎖単離収率は 3% であり、改善の余地を残した。粗ペプチドの HPLC チャートは、目的ペプチド鎖を主生成物として得られたことを示唆したものの、多くの不純物が含まれていることも確認された。特に脱樹脂工程の反応スケールをあげることで、副反応の進行が著しく、脱樹脂剤の組成をはじめ温度・時間などの精緻な検討を行う必要がある。

(2) NCA 反応による HR1x-2 の調製に関する反省と考察

合成した *iso*-HR1x-2B は、SPPS 法によって合成した HR1x-2A と適切にカップリングし、フォールド構造を有した HR1x-2 が妥当な収率で得られた (48%)。 *iso*-HR1x- α B は NCA に適した塩基性条件下 (pH 10.0) にて天然型ペプチド結合を生成する特性があることから (図 3a)、得られた HR1x-2 は野生型と同様のペプチド主鎖骨格を有しているものと考えられる。細かな条件検討は行っていないため収率の更なる向上を見据えては、至適 pH/温度の検証ならびに添加剤を検討する余地を残している。

(3) セレノリラキシン (SeR1x- α [図 1 R¹=Se, R²=S]) の合成に関する反省と考察

HR1x-2 の合成ノウハウを応用することで、SeR1x- α を合成することができた。 *iso*-SeR1x- α B および SeR1x-2A の各ペプチド鎖の合成収率には検討の余地があるが、NCA 反応によるカップリング反応は 70% を上回った。これは、生体内のプロリラキシンのフォールディングに匹敵し、ペプチド鎖間 Se-Se 結合の速度論的、熱力学的優位性がこの高収率に至った理由であると考えられる。SeR1x- α は分子表面に Se-Se 結合を有するが、分子内部に Se-Se 結合 (U10^A-U15^A) を有するセレノリラキシンアナログ (SeR1x- β [図 1, R¹=S, R²=Se]) がどのようなフォールディング挙動を示すか興味深い。さらに、得られたセレノリラキシン各種の構造、物性、反応性に関する研究を進めるとともにその生理活性に関する知見を収集する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Kenta Arai***, Haruka Toba, Nozomi Yamamoto, Mao Ito, Rumi Mikami, Modeling

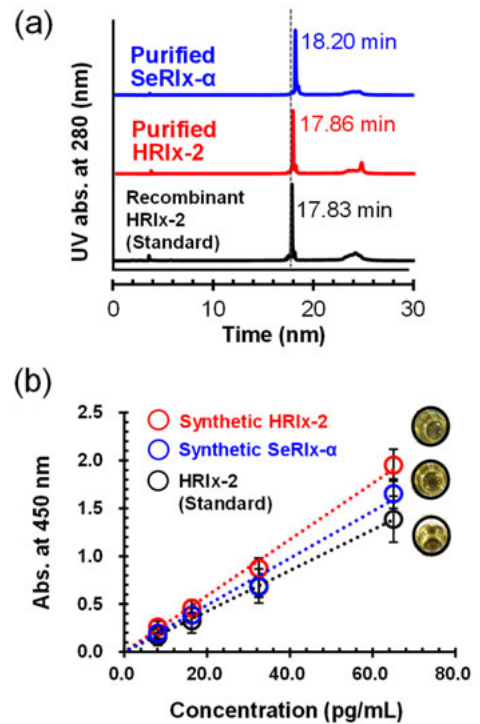


図 4: HR1x-2 と SeR1x- α の HPLC 保持時間の比較と ELISA による抗体会合特性評価。

Type-1 Iodothyronine Deiodinase with Peptide-Based Aliphatic Diselenides: Potential Role of Highly Conserved His and Cys Residues as a General Acid Catalyst. *Chem. Eur. J.*, **2023**, 29, e202202387 (DOI: [10.1002/chem.202202387](https://doi.org/10.1002/chem.202202387)) (Selected as Hot Paper) IF = 5.020

- ② **Kenta Arai***, Rumi Mikami, Redox Chemistry of Selenols and Diselenides as Potential Manipulators for Structural Maturation of Peptides and Proteins, *Metallomics Res.*, **2022**, 2, rev1-17. (Invited, Open Access)
- ③ Kazuyuki Kato, Yasutake Mukawa, Shoichi Uemura, Masataka Okayama, Zentaro Kadota, Chika Hosozawa, Sayaka Kumamoto, Shun Furuta, **Michio Iwaoka**, Tomohiro Araki, Hiroshi Yamaguchi. A protein identification method for proteomics using amino acid composition analysis with IoT-based remote control. *Anal. Biochem.*, **2022**, 657, 114904. (DOI: [10.1016/j.ab.2022.114904](https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114904)). (Open Access) IF = 3.191
- ④ **Hidekazu Katayama***, Kenji Toyota, Haruna Tanaka, Tsuyoshi Ohira. Chemical synthesis and functional evaluation of the crayfish insulin-like androgenic gland factor. *Bioorg. Chem.*, **2022**, 122, 105738 (DOI: [10.1016/j.bioorg.2022.105738](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105738)) IF = 5.307
- ⑤ **Hidekazu Katayama**, Masatoshi Mita*. The C-terminally amidated relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Astropecten scoparius*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2023**, 334, 114226 (DOI: [10.1016/j.ygcn.2023.114226](https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2023.114226)) IF = 3.255
- ⑥ Yosuke Ono, Kyoko Furumura, **Osamu Yoshino***, Hajime Ota, Yasushi Sasaki, Takao Hidaka, Yoshiyuki Fukushi, Shuji Hirata, Hideto Yamada, Shinichiro Wada, Influence of laparoscopic surgery for endometriosis and its recurrence on perinatal outcomes. *Reprod. Med. Biol.* **2022**, 21, e12456.

(2) 口頭発表

- ① **Kenta Arai**, Structural Control of Proteins by Utilizing Selenium Chemistry, Group 16 elements in Chemical Biology, **May 2022** (On the internet), *Invited lecture*.
- ② **Michio Iwaoka**, Design and Synthesis of Selenopeptide, *The 10th Workshop of SeS Redox and Catalysis (WSeS-10)*, Nov. 2022 (Niteroi, Brazil) *Invited lecture*.
- ③ **Kenta Arai**, Aliphatic Diselenides as a Potential Manipulator for Proteostasis, *15th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium (ICCST-15)*, **Dec. 2022** (Florianópolis, Brazil) *Invited lecture*.
- ④ 佐藤有里, **片山秀和**, **岩岡道夫**, **荒井堅太**, 化学合成法によるヒトリラキシンの開発, 2023年3月22日, 第22回日本再生医療学会 (京都国際会館)。
- ⑤ **Michio Iwaoka**, Selenium Analogs of Nucleosides and Proteins, Jan. 2023 (Tokyo, Japan) *Keynote lecture*.

(3) 出版物

- ① Small Organoselenium Catalysts as a Potential Manipulator for Redox Homeostasis and Proteostasis. **Kenta Arai***, in *Chalcogen Chemistry: Fundamentals and Applications*, edited by V. Lippolis, C. Santi, Eder J. L. and A. L. Braga. The Royal Society of Chemistry, **2023**, Chapter 25, pp. 648-665.
- ② Chalcogen-Containing Protein and Nucleic Acid Derivatives - Synthesis and Application. **Michio Iwaoka***, in *Chalcogen Chemistry: Fundamentals and Applications*, edited by V. Lippolis, C. Santi, Eder J. L. and A. L. Braga. The Royal Society of Chemistry, **2023**, Chapter 24, pp. 625-647.
- ③ **Michio Iwaoka***, Shingo Shimodaira. Synthesis and catalytic functions of selenopeptides, in *Organochalcogen Compounds: Synthesis, Catalysis, and New Protocols with Greener Perspectives*, edited by E. J. Lenardao, C. Santi, G. Perin, D. Alves, Elsevier, 2022, Chapter 6, pp. 195-218.

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	東 京 歯 科 大 学	研究所名等	口腔科学研究センター
研究課題	新規の歯根膜幹細胞を活用した顎骨修復治療法の開発 －健康寿命を支える新たなインプラント治療法の確立－	研究分野	医 学
キーワード	①歯根膜幹細胞②抜歯窩③顎骨修復④インプラント治療⑤健康寿命⑥遺伝子改変マウス⑦細胞系譜解析⑧1細胞解析		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
溝 口 利 英	東 京 歯 科 大 学 口腔科学研究センター	准 教 授	研究の総括、セルソーティング実験、1細胞解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
東 俊 文	東 京 歯 科 大 学 生 化 学 講 座	教 授	遺伝子情報解析
澁 川 義 幸	東 京 歯 科 大 学 生 理 学 講 座	教 授	新規歯根膜幹細胞の組織学的解析
松 永 智	東 京 歯 科 大 学 解 剖 学 講 座	准 教 授	新規歯根膜幹細胞の組織学的解析
木 村 麻 記	東 京 歯 科 大 学 生 理 学 講 座	講 師	新規歯根膜幹細胞の組織学的解析
黄 地 健 仁	東 京 歯 科 大 学 生 理 学 講 座	助 教	セルソーティング実験、1細胞解析

新規の歯根膜幹細胞を活用した顎骨修復治療法の開発 ー健康寿命を支える新たなインプラント治療法の確立ー

1. 研究の目的

「インプラント治療に適した抜歯窩の石灰化修復を促進する新規技術の開発」

抜歯窩の修復には、歯根膜に局在する幹細胞が寄与することが明らかとなり、その幹細胞の性状に関する報告が散見される。しかし我々は、抜歯窩の硬組織形成には、既報の細胞ではなく、新たな幹細胞画分が寄与することを示す所見を得ている。

本申請研究では、生体内で標識した細胞の系譜を追うことを可能にする細胞系譜解析法、および1細胞レベルのRNAシーケンス解析を活用することにより、新規の歯根膜細胞画分を同定し、硬組織修復機構を包括的に理解する。さらに、得られた知見を基に、新規幹細胞の活用を基盤とした抜歯窩の修復法を適用した新たなインプラント治療法の提案に繋げる事を究極的な研究目標として掲げる。

2. 研究の計画

(1) 歯根膜細胞に含まれる亜集団の解明

レプチン受容体(LepR)陽性の歯根膜(PDL)幹細胞を色素標識するために、LepR-Cre/flox-stop-flox-tdTomato(LepR;floxed-Tom)マウスを作製した。このマウスからPDLを回収し、1細胞RNA-seq解析を行った。1細胞ごとの遺伝子プロファイル情報をもとに細胞をクラスタリングし、PDLに含まれる細胞を解析した。

(2) 擬時間解析によるPDL細胞における分化ヒエラルキーの解析

上記で得られた遺伝子プロファイル情報をもとに、擬時間軸に各クラスターを配置し、PDLに含まれる細胞の分化ヒエラルキーを解析した。

3. 研究の成果

(1) 歯根膜細胞に含まれる亜集団の解明

LepR;floxed-Tomマウスにおける、PDL細胞の1細胞解析の結果、PDLには、PDL細胞の他、骨芽細胞/セメント芽細胞、上皮系細胞、および血管内皮細胞が存在することが示された。PDL細胞と骨芽細胞/セメント芽細胞の再クラスタリング解析の結果、PDLは5つの異なる遺伝子プロファイルを有する1-5のクラスター、および骨芽細胞/セメント芽細胞のクラスターに分類された。また、PDL3と5にLepR陽性PDL幹細胞が含まれることが明らかになった。

(2) 擬時間解析によるPDL細胞における分化ヒエラルキーの解析

PDL細胞と骨芽細胞/セメント芽細胞の再クラスタリング解析により得られた5つのPDLクラスターと骨芽細胞/セメント芽細胞のクラスターを用いて擬時間解析を実施した。その結果、LepR陽性PDL細胞を含むクラスターPDL5を開始点として、PDL3を介して骨芽細胞/セメント芽細胞に分化することが示された。

4. 研究の反省・考察

(1) 歯根膜細胞に含まれる亜集団の解明

① マウスの交配が予定通りに進まずに、やや計画に遅れが生じた。今後は効率的な交配計画を立て直す必要がある。

② PDLの1細胞解析から、これまで報告されたPDL幹細胞画分は完全には重複していないことが示唆された。

(2) 擬時間解析によるPDL細胞における分化ヒエラルキーの解析

これまでLepR陽性のPDL幹細胞が、骨芽細胞やセメント芽細胞に分化することが、細胞系譜解析で示されていたが、今回、遺伝子情報解析によっても確認された。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Oka H, Ito S., Kawakami M, Sasaki H, Abe S, Matsunaga S, Morita S, Noguchi T, Kasahara N, Tokuyama A, Kasahara M, Katakura A, Yajima Y, Mizoguchi T.: Subset of the periodontal ligament expressed leptin receptor contributes to part of hard tissue-forming cells. *Sci Rep*, 13(1):3442, 2023 doi: 10.1038/s41598-023-30446-w.
- ② Seki Y, Takebe H, Mizoguchi T, Nakamura H, Iijima M, Irie K, Hosoya A.: Differentiation ability of Gli1+ cells during orthodontic tooth movement. *Bone*, 166:116609, 2023 doi: 10.1016/j.bone.2022.116609.
- ③ Shin M, Mori S, Mizoguchi T, Arai A, Kajiya H, Okamoto F, Bartlett JD, Matsushita M, Udagawa N, Okabe K.: Mesenchymal cell TRPM7 expression is required for bone formation via the regulation of chondrogenesis. *Bone*, 166:116579, 2023 doi: 10.1016/j.bone.2022.116579.
- ④ Nazmus S, Seki Y, Takebe H, Fujii S, Mizoguchi T, Nakamura H, Yoshida N, Yoshida K, Iijima M, Shimo T, Irie K, Hosoya A.: Gli1⁺-PDL cells contribute to alveolar bone homeostasis and regeneration. *J Dent Res*, 101(12):1537, 2022 doi: 10.1177/00220345221106921.
- ⑤ Ohyama S, Ouchi T, Kimura M, Kurashima R, Yasumatsu K, Nishida D, Hitomi S, Ubaidus S, Kuroda H, Ito S, Takano M, Ono K, Mizoguchi T, Katakura A, Shibukawa Y. Piezo1-pannexin-1 P2X3 axis in odontoblasts and neurons mediates sensory transduction in dentinal sensitivity. *Front Physiol*, 13:891759. doi:10.3389/fphys.2022.891759
- ⑥ Saito N, Kimura M, Ouchi T, Ichinohe T, Shibukawa Y. Gα_s-Coupled CGRP Receptor Signaling Axis from the Trigeminal Ganglion Neuron to Odontoblast Negatively Regulates Dentin Mineralization. *Biomolecules*, 2022; 12(12):1747. doi.org/10.3390/biom12121747
- ⑦ Koresawa K, Matsunaga S, Hikita A, Okudera H, Yamaguchi A, Yajima Y, Abe S. Micro/nano structural properties in peri-implant jaw bone of human cadaver. *Int J Implant Dent*, 8:17, 2022. doi: 10.1186/s40729-022-00417-3.
- ⑧ Matsunaga S, Yamada M, Kasahara N, Noguchi T, Morita S, Kitamura K, Suzuki M, Tamiya Y, Yamamoto H, Abe S, Furusawa M. Japanese Maxillary First Molar Root Canal Morphology: An Ultrastructural Study Using Micro-Computed Tomography. *J Hard Tissue Biol*, 31:1-6, 2022. <https://doi.org/10.2485/jhtb.31.109>.
- ⑨ Oomura Y, Matsunaga S, Okamura M, Suzuki T, Kasahara N, Abe S, Nomura T. Effect of zoledronic acid on bone quality of the mandible in ovariectomized mice. *J Hard Tissue Biol*, 31:207-214, 2022. <https://doi.org/10.2485/jhtb.31.207>.
- ⑩ 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 Maxillofac Surg*, 2022 Nov;51(11):1431-1444. doi: 10.1016/j.ijom.2022.03.054.
- ⑪ 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 homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation. *Med Mol Morphol*, 2022 Sep;55(3):174-186. doi: 10.1007/s00795-022-00317-w.
- ⑫ Takada K, Odashima A, Onodera S, Saito A, Aida N, Furusawa M, Azuma T. The effect of BMP4, FGF8 and WNT3a on mouse iPS cells differentiating to odontoblast-like cells. *Med Mol Morphol*, 2022 Sep;55(3):199-209. doi: 10.1007/s00795-022-00318-9.
- ⑬ Furukawa Y, Odashima A, Hoshino T, Onodera S, Saito A, Ichinohe T, Azuma T. Effects of KnockOut Serum Replacement on Differentiation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells into Odontoblasts. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2022 Jun 15;63(2):75-83. doi: 10.2209/tdcpublication.2021-0042.
- ⑭ Hojo H, Saito T, He X, Guo Q, Onodera S, Azuma T, Koebis M, Nakao K, Aiba A, Seki M, Suzuki Y, Okada H, Tanaka S, Chung UI, McMahon AP, Ohba S. Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep*, 2022 Sep 6;40(10):111315. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111315.
- ⑮ Natsuko Aida, Tatsukuni Ohno, Toshifumi Azuma. Progress and current status in Hajdu-Cheney syndrome with focus on novel genetic research. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 23(19), 11374; doi.org/10.3390/ijms231911374.

(2) 口頭発表

(特別講演、シンポジウム)

- ①溝口利英：硬組織形成細胞の供給システム、第7回日本骨免疫学会ウインタースクール BONE シンポジウム、2023年1月31日 飯山市(斑尾高原ホテル)
- ②溝口利英：生体内における骨芽細胞供給システムの多様性、広島大学セミナー、2022年11月8日、広島市(広島大学歯学部)
- ③溝口利英：硬組織形成を司る幹細胞の in vivo 解析、第64回歯科基礎医学会学術大会 メインシンポジウム 2022年9月17日 徳島(徳島大学)
- ④溝口利英：The origin of hard tissue-forming cells: history of research and recent findings、公益法人ときわ会 先端医学研究センター (RIIM) 5周年シンポジウム、2022年6月5日 いわき市(公益財団法人ときわ会 常磐病院)
- ⑤溝口利英：骨と歯を調節する間葉系細胞のお話、九州臨床再生歯科研究会、2022年5月11日、(Web開催)
(一般講演)
- ⑥高濱暁、関有里、佐藤幸平、建部廣明、溝口利英、八若保孝、細矢明宏：Gli1陽性歯髓細胞の象牙質再生過程における機能解析、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日 徳島(徳島大学)
- ⑦伊藤慎一郎、笠原典夫、北村啓、松永智、溝口利英、笠原正貴、山口朗：抜歯窩と大腿骨骨欠損の骨治癒過程における病理学的差異、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日 徳島(徳島大学)
- ⑧Zhifeng H, Mizoguchi T, Hiraga T, Nakamichi Y, Yamashita T, Koide M, Udagawa N, Kobayashi Y.: Macrophages promote bone regeneration through the activation of LepR (+) cells、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日 徳島(徳島大学)
- ⑨平賀 徹、溝口利英：顆粒球コロニー刺激因子は乳がん骨転移の開始と進展に対し相反する作用を示す、第40回日本骨代謝学会学術集会、2022年、7月22-23日 岐阜市(岐阜都ホテル)
- ⑩溝口利英：象牙芽細胞の細胞死は未分化前駆細胞の象牙芽細胞分化と石灰化を誘導する、第74回日本細胞生物学会 2022年6月28-30日 東京都(タワーホール船堀)
- ⑪山本悠太郎、渡辺 元次、高木 貴博、廣内英智、山本将仁、松永 智、阿部 伸一：コラゲナーゼ注入による筋腱接合部の再生・形態変化と筋機能への影響、第64回歯科基礎医学会学術大会、2022年9月17-19日、徳島県徳島市
- ⑫角田 航、松永 智、大津雄人、北村 啓、佐々木穂高、阿部伸一、関根秀志、矢島安朝：抜歯窩および歯槽骨周辺における知覚神経枝の再生、第52回日本口腔インプラント学会、2022年9月23-25日、愛知県名古屋市
- ⑬松永 智、野口 拓、森田純晴、廣内英智、小川雄大、北村 啓、笠原典夫、山本 仁、阿部伸一：口腔隔膜として機能する顎舌骨筋の構造解析および位置分類、第128回日本解剖学会総会・学術大会、2023年3月20日、東北大学川内北キャンパス
第128回日本解剖学会総会・全国学術集会講演抄録集p207
- ⑭Yoshiaki Furusawa, Maki Kimura, Isao Okunishi, Takehito Ouchi, Tomoe Kato-Yamada, Ryuya Kurashima, Makoto Sugita, Yoshiyuki Shibukawa, Masahiro Furusawa: Mineralization-Promoting Ability of Hexaraphane® in Human Odontoblasts. 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition. March 15-18, 2023, Portland, USA. Abstract ID#: 3824195
- ⑮Seijin Kwon, Takehito Ouchi, Maki Kimura, Shiro Nakamura, Tomio Inoue, Yoshiyuki Shibukawa, Tatsuya Ichinohe: Expression of mechanosensitive ion channels in mesencephalic trigeminal nucleus neurons. 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition. March 15-18, 2023, Portland, USA. Abstract ID# 3824158
- ⑯間 奈津子、大野 建州、中村 貴、齋藤 暁子、小野寺 晶子、加藤 宏、青木 栄人、東 俊文：Hajdu-Cheney症候群疾患特異的iPS 細胞を用いた破骨細胞分化誘導、第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2022年11月4-5日
- ⑰秀島 樹、中村ゆり子、小野寺晶子、野村武史、高野正行、片倉 朗、東 俊文：歯原性角化嚢胞における分子遺伝学的検討 第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会2022年11月4-5日
- ⑱齋藤暁子、中村 貴、小野寺晶子、間 奈津子、岡田 寛之、北條 宏徳、長山 和亮、東俊文：

RUNX2による核膜関連タンパク質の発現調節を介した骨芽細胞分化制御機構. 第95回日本生化学会大会 2022年11月9-11日

- ⑱齋藤暁子、中村 貴、小野寺晶子、間 奈津子、岡田 寛之、北條 宏徳、長山 和亮、東俊文：RUNX2による核膜関連タンパク質の発現調節を介した骨芽細胞分化制御機構. 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30-12月2日

(3) 出版物

- ①松永 智, 阿部伸一 他 (分担執筆)

Crosslink言語聴覚療法学テキスト『発声発語・摂食嚥下の解剖・生理学』
第1章 発声発語と摂食嚥下に関わる器官 3. 鼻腔・咽頭 4. 喉頭 5. 食道
メジカルレビュー社, 東京, 2022

- ②溝口利英 (分担執筆)

骨髄間葉系細胞から骨芽細胞への分化
日本臨牀増刊 最新の骨粗鬆症学 (第2版)-骨粗鬆症の最新知見-
日本臨牀社, 東京, 2023

アフリカの農業を救うストリゴラクトン高活性類縁体の創出

1. 研究の目的

根寄生雑草ストライガは、アフリカ全域で主要作物に寄生し、生育不良、収量の減少を引き起こす。被害額は100億ドルと試算されており、エイズやマラリアと並ぶアフリカの重要問題として認識されている。植物ホルモンであるストリゴラクトン (SL) はストライガの自殺発芽誘導物質として知られており、スーダンでは圃場試験でストライガ駆除に一定の効果が認められている (Kountche, 2019)。一方、気候や土壌条件も多様なアフリカでは地域により天然 SL の安定性や効果にばらつきがあり駆除効果が認められない場合も多い。加えて、実験室レベルでも天然 SL は分解されやすく、土壌散布するには合成コストが高いという問題も挙げられる。広大なアフリカにおいて SL による根寄生雑草の防除を実装するには安価かつ大量に SL を生産する系の確立及び、地域特性に適合した活性と安定性を有する SL を創出する必要がある。

申請者らは、SL 化合物を大量に生産するためのホストとして光合成微生物「藍藻」と真核微生物「酵母」に着目した。植物における SL 生産の場は葉緑体と細胞質であり β カロテンを出発物質として前駆体カーラクトン (CL) まで葉緑体で生産され、細胞質に局在する P450 酵素 MAX1 により合成される (Zhang, 2014)。葉緑体の起源生物である藍藻は β カロテンを豊富に含み葉緑体と同様の代謝活性を有する。一方、酵母の細胞内環境は植物細胞質と類似しており MAX1 を機能的に発現させることができる。これまでに藍藻シネココッカス種において植物由来 SL 代謝系遺伝子 (D27、CCD7、CCD8) を導入し、CL を高生産することに成功した (特願 2020-22999)。さらにこれをイネの MAX1 ホモログを導入した酵母と共培養することで、作物の 5000 倍以上の高効率での SL 生産を達成した (特願 2021-164871)。

本研究では、これまでに構築した藍藻-酵母による SL 生産系を改良し、SL 生産システムの更なる効率化を図るとともに、多様な根寄生雑草に高い活性を持ち、アフリカ土壌においても安定な SL 類縁体 (High active- and stable-SL: H-SL) を創製する。アフリカにおける SL の社会実装に向けて、スーダンとは異なる気候、土壌条件の地域を対象としてストライガ被害および分布状況、土壌環境の調査を行うと共にアフリカでの SL によるストライガ防除の実装可能性を検討する。主な研究実施項目は以下の通りである。

- (1) SL 生産システム効率化
- (2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング
- (3) アフリカにおけるストライガ汚染状況、土壌性質の調査
- (4) H-SL の性能評価と構造決定
- (5) H-SL のアフリカ土壌での安定性、ストライガ防除効果の検証

2. 研究の計画

2022 年度は研究項目 (1)、(2) に注力して実施した。

- (1) SL 生産システム効率化
 - ① CL 生産ホスト藍藻の検討: CL 生産に適した藍藻ホストを検討した。遺伝子導入は独自開発した接合伝達法 (特願 2020-076701) を利用し研究を実施した。
 - ② 藍藻 CL 生産株の代謝ボトルネック解除: 藍藻 CL 生産系の代謝ボトルネックであると考えられる初発酵素 D27 の発現と活性の強化を目指して研究を実施した。
 - ③ 藍藻 CL 生産株における CL の輸送強化: CL 生産株は CL 生産量の半分が細胞内に蓄積しているため、CL 輸送体候補である ORF1570 に着目し CL 排出への効果を調べることを計画した。
 - ④ 酵母 SL 排出強化: SL 生産酵母において、植物で報告されている SL 輸送体を発現させ SL の細胞外への排出を促すことを計画した。
- (2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング
 - ① MAX1 変異ライブラリーの構築とスクリーニング: SL の構造変化を誘起することで新規性質を持つ SL 類縁体の取得を目指す。最初のステップとして根寄生雑草オロバンキ (*Orobancha minor*) の種子を用いたバイオアッセイ系の予備実験を計画した。

- ②多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング:自然界に存在する多様なMAX1ホモログを酵母に導入しSL構造への影響を調べる。2022年度は材料となるMAX1発現酵母を作製した。

3. 研究の成果

(1) SL 生産システム効率化

- ①CL 生産ホスト藍藻の検討:接合伝達法を用いることで SL 代謝系遺伝子を海洋性藍藻 *Synechococcus* 種へ導入することに成功した。上記と関連して、SL 生産に使用する発現ベクターを開発し、成果を論文としてまとめ発表した (5. 研究発表(1)学会誌等①、②)。また藍藻からの試料調製のため細胞破碎装置を新たに導入した。
- ②藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除:D27に特異的な配列情報を探索し、一部の藍藻がD27に相同な遺伝子を持つことを発見した。さらに、この藍藻由来新規D27の活性は現在採用している緑藻由来D27遺伝子よりも高い活性を持つことを確認した。
- ③藍藻CL生産株におけるCLの輸送強化:ORF1570変異株を構築しCLの生産量や排出を解析したが、変異株のCL排出量は野生株と同程度であり、当該遺伝子は無関係であると考えられた。
- ④酵母SL排出強化:藍藻-酵母培養液中のCL, SL存在量を比較すると、酵母細胞内にはCLは存在せず、SLは培養上清中にのみ検出された。この結果より、藍藻で生産されたすべてのCLはSLへと変換され細胞外に排出されていると考えられた。

(2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング

- ①MAX1変異ライブラリーの構築とスクリーニング:藍藻-酵母培養系の上清に含まれるSL活性を直接評価するために、オロバンキを用いたバイオアッセイ系の準備を進めた。CLを含むシアノバクテリア培養液を用いて寒天培地を作製し、この上にオロバンキ種子を播種して効果を調べた結果、オロバンキの発芽が促進されることが確認できた。
- ②多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング:試験の大規模化と効率化のため、人工気象器とプレートリーダーを導入した。また、従来研究に用いているイネMAX1と異なる反応を触媒するアスパラガスとラッカセイのMAX1ホモログ遺伝子を発現する酵母を取得した。

4. 研究の反省・考察

(1) SL 生産システム効率化

- ①CL 生産ホスト藍藻の検討:CL 生産に適した藍藻ホストとして海洋性藍藻を検討した。海洋性藍藻は生育が早く、海水が利用できることから CL 生産の効率化、大規模化が期待できる。さらに、接合伝達法を利用することで、自然形質転換能を持たない非モデルの藍藻にもベクター導入できることも示された。今後、様々な藍藻種での CL 生産が期待できる。
- ②藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除:大腸菌を用いた試験系において、イネD27と比べ、藍藻由来の新規D27は高い活性を持つことが示された。今後は藍藻内で活性試験を実施し有用性を検討する。
- ③藍藻CL生産株におけるCLの輸送強化:ORF1570を欠損した場合においてもCLの排出量に差が認められなかったことから、ORF1570が唯一の輸送体ではないことが示唆された。CLは藍藻細胞外に十分に輸送されていると判断し、本実験項目は一旦、止めることとした。
- ④酵母SL排出強化:酵母で生産された全てのSLが細胞外に排出されていることが示されたため、本項目に関しても一旦、止めることとする。一方、藍藻-酵母共培養時の培地を検討した結果、栄養を制限した合成培地においてSL生産量は5倍以上増加することが示されたため、今後は培養条件の検討を中心に進める予定である。

(2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング

- ①MAX1変異ライブラリーの構築とスクリーニング:スクリーニングのための条件検討を更に進める。またMAX1に変異を導入したライブラリー作製に着手する。
- ②多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング:ラッカセイとアスパラガスのMAX1の効果について、研究を進めると同時に他のMAX1についても遺伝子をデザインして酵母株を構築する。またSL関連分子を効率的に検出するため、LC-MS/MSの代謝産物ライブラリーを検出装置にインストールし、以後の研究に用いる予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①A. Kaltenbrunner, (他 6 名), S. Watanabe, C. Steglich, A. Wilde, WR. Hess, Regulation of pSYSa defense plasmid copy number in *Synechocystis* through RNase E and a highly transcribed asRNA. *front Microbiol.* **14**, 1112307 (2023).
- ②Y. Sakamaki, (他 4 名), S. Watanabe, Characterization of a cyanobacterial rep protein with broad-host range and its utilization for expression vectors. *front Microbiol.* **14**, 1111979 (2023)

(2) 口頭発表

坂巻裕、前田海成、荷村-松根かおり、千葉櫻拓、渡辺智、シアノバクテリアにおける自律複製領域の探索とそれを利用した高発現ベクターの構築、日本農芸化学会2023年度広島大会・オンライン開催 (2023年3月)

(3) 出版物

なし

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。今年度は1,3-ジイン構造を有するロタキサンを合成し、その配座の解析を中心に検討を進めた。

3. 研究の成果

- (1) スピロ骨格を有し、対称性が低下したロタキサンの合成と ¹H NMR, ¹⁹F NMR スペクトルを用いた配座解析環構造にスピロ構造を導入した大環状フェナントロリン誘導体-銅錯体を合成し、

かさ高い置換基を有するアルキンを用いる酸化的二量化反応を行うことにより、環構造にスピロ構造が導入されたロタキサンを合成した。ロタキサンの構造は高分解能質量分析を含む各種スペクトルデータにより決定した。

対称性の高いロタキサン、対称性が低下したロタキサン誘導体を合わせて合成し、¹H NMR、¹⁹F NMR を用いて詳細な検討を行ったところ、このロタキサンにおいては環構造は軸分子に沿って自由に運動し均一な分布を示しているのではなく、軸構造に存在する1, 3-ジイン部位に局在化していることを明らかにした。本成果は学術論文として公表した(学会誌等①)。

(2) 小さな環構造を有するロタキサンの合成とその配座解析

剛直な軸状構造と小さな環構造を持つロタキサンの合成に成功した。このロタキサンにおいて環構造はレゾルシノール由来の29員環構造、軸状構造は、ダンベル構造が比較的短いジフェニルブタジイン構造によって接続された構造を持つ。合成したロタキサンの結晶構造を明らかにすることができた。この分子はダンベル部位水素と環状構造炭素の間に相互作用が生じるほど接近した配座をとることを明らかにした。さらに、軸構造に様々な置換基を導入したロタキサンを合成し、軸構造と環構造の相互作用について検討した。¹H NMR スペクトルを用いた詳細な検討を行った結果、環構造のフェナントロリン部位に含まれる窒素原子は酸性度の高い水素原子を含む置換基との間で水素結合を形成していることを明らかにした。水素結合が存在する化合物において、低温下では軸構造に沿った環構造の移動速度が低下していることを明らかにした。本成果は学術論文として公表した(学会誌等②)。

4. 研究の反省・考察

研究を進めた結果、ロタキサンにおける環構造と軸構造における相互作用を解明することに成功した。このような相互作用はロタキサン構造を有する分子において初めて確認されたものである。今後はこの知見を活用し、ロタキサン型分子マシンの合成を進めその動的挙動について検討する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Rashid, S.; Murakami, T.; Koganezawa, H.; Yoshigoe, Y.; Hosoya, S.; Saito, S. Fluorinated [2]rotaxanes with spirofluorene motifs: a non-symmetric distribution of the ring component along the axle component. *New J. Chem.* **2023**, 47 (2), 900-909, DOI: 10.1039/D2NJ05021H. 2022年11月

② Kawasaki, Y.; Rashid, S.; Ikeyatsu, K.; Mutoh, Y.; Yoshigoe, Y.; Kikkawa, S.; Azumaya, I.; Hosoya, S.; Saito, S. Conformational Control of [2]Rotaxane by Hydrogen Bond. *J. Org. Chem.* **2022**, 87 (9), 5744-5759, DOI: 10.1021/acs.joc.2c00086. 2022年4月

(2) 口頭発表

① 対称性の低下したピロール含有[2]ロタキサンの合成およびジアステレオマーの分離、保坂 力稀、Rashid Showkat、吉越 裕介、斎藤 慎一、日本化学会第103春季年会、2023年3月

② 大環状ジベンゾフェナントロリン-ニッケル錯体の触媒活性を利用した[2]ロタキサンの合成、太田 美寿々、奥田 綾乃、吉越 裕介、斎藤 慎一、日本化学会第103春季年会、2023年3月

③ ¹⁹F NMR スペクトルを利用した[2]ロタキサンのコンフォメーション解析、斎藤 慎一、Rashid Showkat、村上 隆史、小金澤 寛、武藤 雄一郎、吉越 裕介、第19回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム、2022年6月

(3) 出版物

なし

ミトコンドリア断片化に伴う血液がん病態形成の分子基盤解明

1. 研究の目的

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic Syndrome, MDS) は加齢とともに増加する難治性血液がんである。進行性の貧血や血小板減少に伴う輸血依存、白血球減少や免疫異常に伴う易感染状態、全身臓器の機能障害など多彩な症状を特徴とし、生命予後は総じて不良である。大規模な遺伝子変異解析研究により全容が明らかになりつつある一方、その病態発症機序の解明は十分には進んでいない。

腫瘍クローン拡大と細胞死の共存に伴う骨髄不全症は、MDS 病態の本質である。半数近くの MDS 症例で急性白血病移行がみられることから、単に前白血病状態と言われてきた。しかし、我々の研究成果も含め、MDS の病態が単に幹細胞レベルの異常、芽球の増減のみから説明できず、異常クローン由来の免疫細胞や間葉系細胞なども巻き込んだ、より複雑なものであることがわかってきた。とりわけ、自然免疫系の制御異常に伴う非感染性慢性炎症は病態形成における中心的機構として注目されている。自然免疫系制御異常に伴う炎症性シグナル経路の活性化や、それによって引き起こされるパイロトーシスなどの炎症性細胞死が生じていることが明らかになった。細胞死に伴って細胞外に放出される細胞内成分は DAMPs となり、自然免疫系シグナル経路の活性化を加速させる。さらに、自然免疫系の制御異常が腫瘍細胞のクローン優位性獲得にも寄与することが明らかとなり、MDS 病態における慢性炎症と無効造血のポジティブフィードバック機構の存在とその分子基盤が明らかになりつつある。しかし、こうした持続的な非感染性炎症がどのような機序を介して生じているかについては明らかにされていない。

我々は、MDS 病態における慢性炎症と骨髄不全発症に関わる分子基盤を解明するために、新規に樹立した MDS モデルマウスおよび多数例の血液がん患者検体の解析から、MDS 幹細胞・前駆細胞において過剰なミトコンドリアの断片化が生じていることを世界で初めて見出した (Aoyagi, et al. Cancer Discovery 2022)。過剰なミトコンドリア断片化を伴う細胞は、MDS 患者全般で遺伝子変異プロファイルの違いによらず高頻度でみられた。ミトコンドリア分裂の選択的阻害により、炎症性シグナル経路の活性化、無効造血、異形成の病態が著しく改善されたことから、過剰なミトコンドリア断片化が MDS 病態形成の引き金となる細胞現象であることが示唆された。すなわち、ミトコンドリアの断片化が、多様かつ疾患特異性のない複雑な遺伝子型に関わらず、多くの MDS 患者において共通の治療標的となり得ることがわかった。

本研究は、過剰なミトコンドリアの断片化が炎症性シグナル経路の活性化を誘導する分子基盤を明らかにし、それらを標的とする新規治療戦略の構築を目指す。

2. 研究の計画

(1) ミトコンドリア断片化機序の全容解明

ミトコンドリアの分裂過程で中心的な役割を果たす分子として DRP1 が知られている。これまでに、MDS モデルマウスおよび患者細胞で DRP1 の発現レベルおよび S616 リン酸化 (活性型) レベルの亢進を確認している。また、S616 リン酸化には mTOR シグナル経路の活性化が部分的に関与していることを明らかにしている。DRP1 は様々な翻訳後修飾によりその活性が制御され、それぞれの修飾機序には複数のシグナル経路の関与が報告されている。その他にも、DRP1 制御に関わる様々な他のシグナル経路 (Toll-like 受容体、Wnt/ β カテニン、HIF1A シグナルなど) の活性化が MDS 患者で報告されている。そこで、MDS マウスの腫瘍クローン細胞と種々のシグナル経路阻害を用いて、DRP1 翻訳後修飾に関わるタンパクの定量とミトコンドリア動態の変化、腫瘍クローンにおける遺伝子発現変化を調べる。これにより、ミトコンドリア断片化機序の分子基盤解明を明らかにする。

(2) ミトコンドリア断片化に伴って生じる炎症性シグナル誘導因子の同定

断片化を含めミトコンドリアに生じる異常に伴って、ミトコンドリア内の様々な成分が細胞質内に放出される。電子伝達系で産生される ROS の他に、mtDNA や RNA、ATP などはいずれも DAMPs として自然免疫系シグナル経路の活性化に寄与する。そこで、ミトコンドリアの過剰な断片化に伴う炎症性シグナル経路活性化の機序を明らかにするため、MDS クローンの細胞質中で増加しているミトコンドリア由来成分を以下の方法で調べる。さらに、ミトコン

ドリア分裂阻害剤 (mdivi-1 など) 投与後でもこれらのレベルを測定し、過剰な断片化との関連性を明らかにする。

- ① **ROS** : 全般的な酸化ストレス、ミトコンドリア内部のスーパーオキシドを検出する蛍光発色プローブを用いて、フローサイトメトリーにより測定する。
 - ② **DNA/RNA** : MDS クローン細胞質中のミトコンドリア由来の核酸を、特異的なプローブを用いた *in situ hybridization* により検出・定量する。
 - ③ **ATP** : 骨髄細胞から抽出した ATP をルシフェラーゼ発光法で定量する。
- (3) **ミトコンドリア断片化に伴う細胞および細胞外への影響**

ミトコンドリア断片化と炎症性シグナル経路活性化に伴い、MDSクローンは骨髄内で優位性を獲得する一方、分化成熟過程では細胞死の亢進がみられることがわかっている。細胞死に伴って全身循環中に放出されるROSやミトコンドリア由来DAMPs、細胞由来DAMPsは、細胞膜表面に発現するTLRsのリガンドとなり、TLRsシグナル経路の活性化を促し得る。そこで、断片化の結果生じる炎症性細胞死の種類、細胞死が顕著におこる細胞系統と分化ステージ、細胞死に伴って循環中に放出されるミトコンドリア由来DAMPsをはじめとする細胞内成分を調べ、MDSクローンにおけるミトコンドリア異常が細胞外に及ぼす影響を明らかにする。さらに、ミトコンドリア分裂阻害剤投与後のMDSマウスからも同様にサンプルを回収して測定し、過剰な断片化との関連性を明らかにする。

- ① **細胞死の解析** : 様々な系統・分化段階の骨髄細胞を用いて、種々の細胞死に関わるタンパクの発現を調べる。また、各細胞死に対する選択的阻害剤を添加して培養し、死細胞割合の変化を観察する。
- ② **Cell-free DNA/RNAの解析** : 血漿からcell-free DNA/RNAを抽出・精製し定量する。

(4) **患者サンプルでの検証**

MDSモデルマウスで得たミトコンドリアの断片化は、多数例の患者検体でも確認され、MDS症例に特徴的な所見であることがわかっている。そこで、患者検体を用いて検証する。マウスモデルと同様の手法により、DRP1の翻訳後修飾関連タンパクの定量、細胞質内のROSおよびミトコンドリア由来DAMPsの測定を行う。

(5) **MDSモデルマウスにおける前臨床試験**

- ①モデルマウスの解析および患者サンプルでの検証によって得た知見に基づき、非感染性慢性炎症の原因となるミトコンドリア由来成分の *in vivo* 阻害実験を行う。炎症性シグナル経路の活性化や無効造血、血球減少、異形成などのMDS表現型に及ぼす影響を調べる。
- ②炎症性シグナル経路の活性化に引き続いて生じる細胞死に伴って、様々な細胞内成分が細胞外に放出される。各細胞死機序の *in vivo* 阻害実験を行い、過剰な細胞死の抑制に伴う影響を検討する。

3. 研究の成果

(1) **ミトコンドリア断片化機序の全容解明**

- ①**TLRシグナル経路の阻害** : MDSでは、TLR2/4を介してその下流のMyd88やIRAKが活性化することが知られている。TLR2阻害剤とTLR4阻害剤の併用投与を行ったが、MDSマウスに断片化の改善はみられなかった。この結果から、この経路の活性化がDRP1の活性化、それに続く断片化には寄与していないことがわかった。
- ②**Wnt-βカテニンシグナルの阻害** : Wnt-βカテニンシグナルもMDS患者で活性化していることが知られている。Wnt-βカテニンシグナル阻害剤を投与したところ、断片化の改善が認められた。DRP1S616のリン酸化レベルは、阻害剤の投与により抑制されていた。Wnt-βカテニンシグナルの活性化がDRP1活性化機序の1つであることを示唆された。

(2) **ミトコンドリア断片化に伴って生じる炎症性シグナル誘導因子の同定**

- ①**ROSの定量** : c-Kit+細胞の細胞質中およびミトコンドリア中のROSが有意に増加していた。さらに、断片化をMdivi-1の投与によって阻害すると、細胞質中のROS量が有意に減少した。一方で、ミトコンドリア内のROS産生量はMdivi-1の投与によって変化しなかった。これらの結果は、ミトコンドリア中のROSが断片化に伴って細胞質中に放出されていることが示唆された。
- ②**ミトコンドリア由来核酸の定量** : 細胞質中に存在するミトコンドリア由来核酸を検出するために、c-Kit+細胞を回収し、膜透過処理と遠心分離を組み合わせると核とミトコンドリア

を除去したのち、得られた細胞質画分から DNA を精製し、mtDNA 量を評価した。MDS マウスの細胞質中では mtDNA 量が増加していた。また、Mdivi-1 を投与によって、細胞質中のミトコンドリア DNA 量は正常マウスと同程度まで減少した。ミトコンドリアの分裂に伴って mtDNA が放出されていることがわかった。細胞質中の遊離 DNA は、cGAS によって認識されると STING の局在変化が生じ、TBK1 がリン酸化・活性化し、最終的にインターフェロン刺激遺伝子の発現が亢進して炎症性細胞死が誘導される。c-Kit⁺細胞における TBK1 のリン酸化レベルは亢進しており、Mdivi-1 を投与によりリン酸化レベルが正常マウスと同程度まで抑制された。以上の結果から、断片化に伴って mtDNA が細胞質中に遊離し、自然免疫シグナルの活性化が誘導されると考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) ミトコンドリア断片化機序の全容解明

TLR シグナル経路の活性化が、DRP1 の活性化とそれに続くミトコンドリアの断片化に寄与しないことがわかった。しかし、下流の IRAK や MyD88 が恒常的に活性化していた場合、両剤の併用では TLR シグナル経路の活性化は阻害できない。IRAK および MyD88 の恒常的活性化も視野に入れ、今後それらに対する選択的阻害剤の投与も検討していく必要がある。一方で、Wnt- β カテニンシグナル経路の活性化は、DRP1 の活性化およびミトコンドリア断片化に寄与していることが明らかになった。

(2) ミトコンドリア断片化に伴って生じる炎症性シグナル誘導因子の同定

断片化に伴って ROS や mtDNA が細胞質中に放出されていることが明らかになった。また、DNA センシング経路の活性化が認められたことから、mtDNA が炎症性シグナル経路の活性化に寄与している。一方で、mtDNA がミトコンドリアから放出される機序はまだわかっていない。mtDNA がミトコンドリア外に放出される機序の 1 つとして、DRP1 と BAX の相互作用によってミトコンドリア膜に形成される孔を介した機序が知られている。MDS クローンでは DRP1 が活性化しており、BAX の遺伝子発現亢進していることから、この相互作用による孔形成がミトコンドリアで生じているかについて検証する。また、Mdivi-1 は活性化 DRP1 のミトコンドリア膜上への集積を防ぐため、単に断片化阻害効果だけではなくミトコンドリア膜上の放出孔の形成を抑制している可能性も考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hayashi Y, Harada Y, Harada H. Myeloid neoplasms and clonal hematopoiesis from the RUNX1 perspective. *Leukemia*. 2022 May;36(5):1203-1214.
- ② Miyazaki Y, Kiguchi T, Sato S, Usuki K, Ishiyama K, Ito Y, Suzuki T, Taguchi J, Chiba S, Dobashi N, Tomita A, Harada H, Handa H, Horiike S, Maeda T, Matsuda M, Ichikawa M, Hata T, Honda S, Iyama S, Suzushima H, Moriuchi Y, Kurokawa T, Yokota K, Ohtake S, Yamauchi T, Matsumura I, Kiyoi H, Naoe T. Japan Adult Leukemia Study Group. Prospective comparison of 5- and 7-day administration of azacitidine for myelodysplastic syndromes: a JALSG MDS212 trial. *Int J Hematol*. 2022 Aug;116(2):228-238.
- ③ Toya T, Harada H, Harada Y, Doki N. Adult-onset hereditary myeloid malignancy and allogeneic stem cell transplantation. *Front Oncol*. 2022 Sep 16; 12:997530.
- ④ Takase S, Hiroshima T, Shirai F, Maemoto Y, Nakata A, Arata M, Matsuoka S, Sonoda T, Niwa H, Sato S, Umehara T, Shirouzu M, Nishigaya Y, Sumiya T, Hashimoto N, Namie R, Usui M, Ohishi T, Ohba SI, Kawada M, Hayashi Y, Harada H, Yamaguchi T, Shinkai Y, Nakamura Y, Yoshida M, Ito A. A specific G9a inhibitor unveils BGLT3 lncRNA as a universal mediator of chemically induced fetal globin gene expression. *Nat Commun*. 2023 Jan 12;14(1):23.
- ⑤ Konishi T, Sadato D, Toya T, Hirama C, Kishida Y, Nagata A, Yamada Y, Shingai N, Shimizu H, Najima Y, Kobayashi T, Haraguchi K, Okuyama Y, Harada H, Ohashi K, Harada Y, Doki N. Impact of gene alterations on clinical outcome in young adults with myelodysplastic syndromes. *Sci Rep*. 2023 Feb 14;13(1):2641.

- ⑥Ikeda N, Kubota H, Suzuki R, Morita M, Yoshimura A, Osada Y, Kishida K, Kitamura D, Iwata A, Yotsumoto S, Kurotaki D, Nishimura K, Nishiyama A, Tamura T, Kamatani T, Tsunoda T, Murakawa M, Asahina Y, Hayashi Y, Harada H, Harada Y, Yokota A, Hirai H, Seki T, Kuwahara M, Yamashita M, Shichino S, Tanaka M, Asano K. The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis. *Cell Rep.* 2023 Mar 28;42(3):112165.
- ⑦Ito N, Takahashi T, Shiiba I, Nagashima S, Inatome R, Yanagi S. MITOL regulates phosphatidic acid-binding activity of RMDN3/PTPIP51. *J Biochem.* 2022 May 11;171(5):529-541
- ⑧Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S. Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drpl regulation. *iScience.* 2022 Jun 11;25(7):104582.
- ⑨Zecchini V, Paupe V, Herranz-Montoya I, Janssen J, Wortel IMN, Morris JL, Ferguson A, Chowdury SR, Segarra-Mondejar M, Costa ASH, Pereira GC, Tronci L, Young T, Nikitopoulou E, Yang M, Bihary D, Caicci F, Nagashima S, Speed A, Bokea K, Baig Z, Samarajiwa S, Tran M, Mitchell T, Johnson M, Prudent J, Frezza C. Fumarate induces vesicular release of mtDNA to drive innate immunity. *Nature.* 2023 Mar;615(7952):499-506.
- (2) 口頭発表
- ①松沼菜摘, 林 嘉宏, 青柳泰成, 新谷直樹, 原田結花, 原田浩徳. HMGA2 promotes the platelet-neutrophil complexes formation and causes organizing pneumonia in myelodysplastic syndromes. 第81回日本癌学会学術総会, 2022/9/29, 横浜.
- ②林 嘉宏, 松沼菜摘, 青柳泰成, 新谷直樹, 原田結花, 原田浩徳. HMGA2-mediated platelet activation promotes neutrophil death and causes organizing pneumonia in MDS. 第84回日本血液学会学術集会, 2022/10/14, 福岡.
- ③青柳泰成, 林 嘉宏, 松沼菜摘, 小林大貴, 原田結花, 原田浩徳. ミトコンドリア動態異常に着目したクローン性造血およびMDSの新規診断法開発. 第27回造血器腫瘍研究会, 2023/1/20, 広島.
- ④林 嘉宏, 原田浩徳. 骨髄異形成症候群におけるミトコンドリア動態異常. 第21回日本ミトコンドリア学会年会, 2023/03/17, 東京.
- ⑤長島 駿. ミトコンドリアダイナミクスの制御機構と生体内における役割. 第740回北里医学会招待学術講演会, 2023/3/29, 東京.
- (3) 出版物
- ①原田浩徳. 骨髄異形成症候群. 血液疾患診療ハンドブック. 神田善伸編, pp243-249, 中外医学社, 東京, 2022.
- ②原田結花, 原田浩徳. 加齢とクローン性造血. EBM血液疾患の治療. 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸, 大森司, 山崎宏人, pp95-97, 中外医学社, 東京, 2022.
- ③原田結花, 原田浩徳. 薬剤による血球異常. 日本医師会雑誌特集号「血液疾患のすべて」151(特別号1):89-91, 2022.
- ④原田結花, 原田浩徳. DLBCLや寛解期AMLに対する経口azacitidineの効果. 血液内科85(5):740-746, 2022.
- ⑤林嘉宏, 原田浩徳. ミトコンドリア異常による骨髄異形成症候群発症機構. 実験医学41(5):132-137, 2023.

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	東 邦 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①腸上皮, ②腸内細菌, ③免疫制御, ④SFB, ⑤Th17細胞, ⑥自己免疫疾患, ⑦NF- κ B		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 崎 創	東邦大学医学部 医学科生化学講座	准 教 授	研究の実施全般・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 野 裕 康	東邦大学医学部 医学科生化学講座	教 授	トランスクリプトーム解析
森 脇 健 太	東邦大学医学部 医学科生化学講座	准 教 授	腸上皮細胞培養系を用いたin vitro解析
西 尾 純 子	東邦大学医学部 免疫疾患病態制御学 (寄 附 講 座)	教 授	腸内細菌叢のメタゲノム解析
近 藤 元 就	東邦大学医学部 医学科免疫学講座	教 授	動物を用いた疾患モデルの誘導
桑 原 卓	東邦大学医学部 医学科免疫学講座	准 教 授	動物疾患モデルにおける免疫応答の解析

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] 適正な腸内細菌叢は、腸管の局所的な恒常性維持だけでなく、免疫系をはじめとする全身性の生体応答の制御に重要である。腸管で生体の内と外を隔てる腸上皮細胞が、抗菌タンパク質などの放出を介して腸内細菌叢の維持に重要な役割を果たしていることは明らかだが、宿主に恩恵をもたらす菌種を保持しつつ、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、転写調節因子 I κ B ζ (遺伝子名: *Nfkbiz*) を新規に同定し、この因子が自然免疫応答時のサイトカイン産生などに重要であることを明らかにしてきた (*Nature* 2004; *J. Biol. Chem.* 2001, 2005a, 2005b, 2008, 2016 など)。研究代表者は、I κ B ζ が、活性化した自然免疫系細胞だけでなく、腸管で恒常的に発現していることに着目し、腸管を EDTA で処理して上皮と粘膜固有層に分離したところ、上皮画分に I κ B ζ の発現が認められた。そこで、腸上皮細胞における I κ B ζ の役割を明らかにするために、腸上皮細胞で特異的に 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。その結果、この変異マウスの小腸では、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 は種々の自己免疫疾患に関与する Th17 細胞の分化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、ヒト多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) の症状の増悪化が観察された。これらのことから、この変異マウスでは、腸上皮細胞の機能変化によって腸内細菌叢のアンバランスが生じ、免疫細胞の分化異常を介して全身性の免疫応答の亢進が起きている可能性が予想された。本研究では、I κ B ζ を介した腸上皮細胞の機能調節が、腸内細菌叢や免疫応答の制御にどのような役割を担っているかを明らかにする目的で、以下の3点について解析を実施する。

- (1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節
- (2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御
- (3) 炎症性疾患の病態形成への関与

2. 研究の計画

- (1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節
 - ① 腸管組織を対象としたトランスクリプトーム解析により、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスで発現が変動している遺伝子を同定し、その機能や発現制御機構を明らかにする。
 - ② マウス小腸から上皮オルガノイド培養系を調製し、サイトカインによる遺伝子発現調節や標的遺伝子の発現における I κ B ζ の役割を明らかにする。
- (2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御
 - ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの糞便および小腸組織を対象にしたメタゲノム解析により、細菌叢の変化を明らかにする。
 - ② 小腸組織内で、胃から盲腸へ方向に沿った各部位について、腸内細菌の棲息を検討し、腸内細菌制御遺伝子の発現との対応を検討する。
 - ③ 粘膜固有層からリンパ球を調製し、各種細胞の構成の変化を解析するほか、サイトカイン遺伝子の発現変化を検討する。
- (3) 炎症性疾患の病態形成への関与
 - ① 腸疾患モデル (抗 CD3 ϵ アゴニスト抗体投与により誘導される小腸炎、デキストラン硫酸ナトリウム dextran sulfate sodium (DSS) 誘導性大腸炎) を誘導し、臨床スコア、病理学的所見、免疫応答レベルを検討する。
 - ② 全身性の炎症性疾患モデル (実験的自己免疫性脳脊髄炎, experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) を誘導し、腸や標的部位での免疫応答を検討する。

3. 研究の成果

(1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節

- ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの回腸組織についてトランスクリプトーム解析をおこなったところ、粘膜免疫で重要なIgAの産生に関わる遺伝子群 (*Pigr*, *Ccl28*)や、抗菌活性を持つラジカル産生酵素遺伝子 (*Duox2*, *Nos2*など)の発現が同腹コントロールマウスと比較して低下していた。また、小腸における抗菌タンパク質産生で中心的な役割を担うパネート細胞のマーカー遺伝子 (*Lyz1*, α -ディフェンシン遺伝子群)の発現が著明に低下していた。
- ② *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの回腸で発現が低下していた遺伝子の多くは、IL-17によって発現が誘導されることが報告されていたため、マウス小腸から上皮オルガノイド培養系を調製し、サイトカインによる遺伝子発現応答を検討した。その結果、I κ B ζ をコードする*Nfkbiz*遺伝子自体もIL-17刺激に応答して発現が誘導されることが明らかになった。マクロファージをリポ多糖で刺激するような自然免疫応答では、*Nfkbiz*の発現は一過的に誘導された後に速やかに減弱するが、小腸オルガノイドをIL-17で刺激する系では、刺激後48時間後でも高い発現が維持されていた。*Pigr*や*Ccl28*の発現はIL-17刺激で増大し、I κ B ζ を欠損するオルガノイドではその増大が認められなかったことから、これらの遺伝子はIL-17刺激に応答してI κ B ζ によって直接転写レベルが調節されると考えられた。一方、パネート細胞のマーカー遺伝子の発現は、IL-17刺激やI κ B ζ 欠損によって影響されなかった。*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの小腸組織を観察したところ、パネート細胞数が著減していたことから、I κ B ζ はパネート細胞の恒常性維持に重要であることが示唆された。後述のように、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの空腸組織ではIFN- γ の産生が亢進しており、IFN- γ はオルガノイド培養系においてパネート細胞を選択的に傷害して細胞死を誘導することから、I κ B ζ を介した腸上皮でのIL-17シグナリングは、IFN- γ の産生が亢進しているような炎症の状況下でパネート細胞の維持に重要であると考えられた。そこで、オルガノイドをIFN- γ で刺激した後に、よく洗浄し、IFN- γ を含まない条件下で再培養したところ、パネート細胞の再生が認められ、さらにその再生過程はI κ B ζ に依存してIL-17刺激により促進された。また、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスに抗IFN- γ 抗体の投与によりパネート細胞の減少が抑制された。

(2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御

- ① 同腹のコントロールマウスと同じケージ内で飼育している*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの糞便および小腸組織を対象にしたメタゲノム解析を実施したところ、細菌叢の α -多様性には影響がなかったが、空腸領域と回腸上部において β -多様性に有意差が認められた。いずれのサンプルについても*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスにおけるSFBの増加が最も著明な特徴であり、小腸組織ではSFBの増加により科・目レベルでの細菌叢の変動が認められた。
- ② SFBを中心に、小腸内の胃から盲腸への方向に沿った各部位における棲息を検討したところ、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの小腸全域でSFBの増加が認められた。特に興味深いことに、通常の野生型マウスでは棲息しない上流域でもSFBが検出された。腸上皮細胞でI κ B ζ を欠損することにより、特に小腸上流域で抗菌活性が低下したと考えられたため、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの空腸領域を対象にトランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、回腸とよく似た遺伝子セットの発現が低下していたことに加え、一連のIFN- γ 標的遺伝子の発現が増強されていた。IFN- γ の発現が亢進する機構については現在検討中である。
- ③ *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの粘膜固有層からリンパ球を調製し、CD4陽性のT細胞について検討したところ、IL-17Aを産生するTh17細胞の割合が増大していた。一方、IFN- γ を産生するTh1細胞の割合に大きな変化はなかった。最近、IFN- γ の産生増加が腸上皮内に存在する腸管上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocytes, IELs)で起きている例が報告されているので、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスの空腸で産生が亢進しているIFN- γ がこのタイプの細胞に由来する可能性が示唆される。

(3) 炎症性疾患の病態形成への関与

- ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre*マウスに抗CD3 ϵ アゴニスト抗体を投与したところ、同腹のコントロールマウスと比較して体重減少が顕著であったことから、小腸炎の増悪化が予想された。

そこで、体重が最も減少する投与4日後に小腸組織の切片を作成し絨毛の長さを測定したところ、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスで有意に短小化が認められた。さらに、組織レベルでの遺伝子発現を検討したところ、*Ill17a*や*Ifng*の発現増加が認められたことから、小腸炎を誘導する前から亢進しているこれらのサイトカイン遺伝子の発現がさらに増強されたと考えられた。一方、この変異マウスにデキストラン硫酸ナトリウム dextran sulfate sodium (DSS)を投与して大腸炎を誘導しても同腹コントロールマウスと比較して病態の程度に変化は見られなかった。この疾患モデルでは大腸上皮組織の傷害に伴って自然免疫系が病態形成に重要な役割を担うことが示されているので、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスで観察されている獲得免疫細胞の異常の影響は受けにくいのかかもしれない。

- ② ヒトの多発性硬化症の動物モデルであり、Th17細胞が病態形成に重要な役割を担う実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)を *Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスに誘導したところ、有意な臨床スコアの増悪化が認められた。髄鞘の組織切片をルクソールブルーで染色すると、脱髄の亢進が認められた。腸管で増加しているTh17細胞が中枢神経系に浸潤して病態の増悪化を招いている可能性を想定したが、脊髄での *Ill17a*や*Ifng*の発現亢進は認められなかった。EAEの病態の増悪化に関与する因子は他にも複数報告されているので、検討する必要がある。

4. 研究の反省・考察

(1) 腸上皮細胞における腸内細菌制御遺伝子の発現調節

トランスクリプトーム解析により、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの小腸組織で発現が低下する遺伝子の多くが、細菌の制御に関与するものであることが明らかになり、オルガノイドを用いた解析から、それらがIL-17によって発現誘導されることが明らかになった。さらに、IL-17シグナリングによってパネート細胞の恒常性が維持されていることも判明し、一連の矛盾のない遺伝子調節機構を明らかにすることができた。パネート細胞の再生過程については、既に報告されているパネート細胞の分化機構との共通点を探りながら今後全容を明らかにしていきたいと考えている。また、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの小腸で見られるIFN- γ の産生亢進については、今後産生細胞の同定と機構の解明を進めたい。フローサイトメトリーを用いた解析だけでなく、single cell RNA-seqの技術が有用だと考えられる。

(2) 腸内細菌叢による免疫応答の制御

16S rRNA遺伝子領域を標的としたメタゲノム解析により、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの消化管や糞便中ではコントロールマウスと比較して細菌叢が大きく変化していることが明らかになった。特に小腸の常在菌であるSFBの増加が著しく、野生型マウスでは通常棲息しない小腸の上流部にも検出された。このことをきっかけに上流部の遺伝子発現解析をおこない、IFN- γ シグナリングの亢進を明らかにできた。腸管では、サイトカインによる腸上皮細胞の調節と、腸内細菌による免疫細胞の調節が共存するため、マウスに抗菌薬を投与することにより後者の調節を除いた際に生じる変化についても解析する必要がある。また、SFB以外にも免疫細胞の分化に影響を与える菌種がこれまでに複数同定されているので、それらについて *Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスでの変動を検討する。

(3) 炎症性疾患の病態形成への関与

3種類の炎症性疾患モデルを用いて *Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの病態を解析し、IL-17やIFN- γ が病態に影響しているモデルではこの変異マウスでの増悪化が認められた。しかし、サイトカイン産生と臨床スコアの関係については、上述のように未解明な点も残されている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① iScience 26, 105934 (2023) 「Interleukin 11 confers resistance to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice」 Nishina T, Deguchi Y, Kawauchi M, Xiyu C, Yamazaki S, Mikami T, Nakano H
- ② Mucosal Immunology 15, 1321-1337 (2022) 「IkB ζ controls IL-17-triggered gene

expression program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents Th17-associated pathologies] Yamazaki S, Inohara N, Ohmuraya M, Tsuneoka Y, Yagita H, Katagiri T, Nishina T, Mikami T, Funato H, Araki K, Nakano H

- ③ Frontiers in Immunology 13, 935114 [Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease] Yamada Z, Nishio J, Motomura K, Mizutani S, Yamada S, Mikami T, Nanki T

(2) 口頭発表

- ① 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [Cell death-deficient mice develop T cell exhaustion] Seki T, Miyoshi S, Moriwaki K, Yamazaki S, Nakano H
- ② 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [I κ B ζ regulates IL-17-triggered gene program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents autoimmune disorders] Yamazaki S, Inohara N, Tsuneoka Y, Yagita H, Katagiri T, Nishina T, Mikami T, Nakano H
- ③ 第30回日本Cell Death学会学術集会（東京）2022年6月25-26日 [Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia] 関崇生, 三好嗣臣, 森脇健太, 山崎創, 米原伸, 中野裕康
- ④ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease] Nishio J, Yamada Z, Motomura K, Mizutani S, Yamada S, Mikami T, Nanki T
- ⑤ 第9回JCRベーシックリサーチカンファレンス（熊本）2022年11月18-19日 [RAに併発する間質性肺炎に関する細胞老化機構の解明] 渡邊萌理, 西尾純子, 本村香織, 山田善登, 南木敏宏
- ⑥ 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会（ハイブリッド・横浜）2022年4月25-27日 [間質性肺炎における細胞老化機構の関与] 山田善登, 西尾純子, 南木敏宏
- ⑦ 第31回 Kyoto T Cell Conference (Zoom開催) 2022年5月27-28日 [T細胞活性調節におけるミトコンドリアの役割解析] 桑原卓, 近藤元就
- ⑧ 第30回日本シェーグレン症候群学会学術集会（金沢）2022年9月16-17日 [シェーグレン症候群疾患モデルマウスにおけるB細胞活性化機構の解析] 田中ゆり子, 井上彰子, 近藤元就
- ⑨ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [IL-7 regulates the expression of CD69 and CD103 on TRM cells in skin] Ise M, Kuwabara T, Tanaka Y, Naito T, Kondo M
- ⑩ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [Functional analyses of pathogenic T cells in autoimmune prone mice] Tanaka Y Inoue A, Naito T, Kuwabara T, Ise M, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M
- ⑪ 第51回日本免疫学会学術集会（熊本）2022年12月7-9日 [SATB1-dependent mitochondrial ROS production controls TCR signaling in CD4⁺ T cells] Kuwabara T, Ise M, Naito T, Tanaka Y, Kondo M

(3) 出版物

なし

獣医てんかん外科の発展に資する包括研究 —臨床に則した基礎的研究とてんかん外科症例の予後調査—

1. 研究の目的

申請者が過去 20 年に渡る長期の研究実績の果てに、遂に実現可能となった難治性てんかんの犬および猫に対するてんかん外科をさらに発展、そして獣医臨床に定着化させるため、下記 2. の研究計画に基づくより精度の高い基礎実験と、実際の臨床例におけるてんかん外科手術およびその長期的予後調査を遂行する。

2. 研究の計画

当初は以下の研究内容を計画し、準備が整い次第適宜開始する予定であった。

- (1) 高周波帯域脳波測定によるてんかん原性領域の同定
- (2) 家族性側頭葉てんかん猫を用いた海馬切除術の確立と発作転帰、合併症の検討
- (3) 犬深部脳刺激法 (DBS) の確立
- (4) 獣医臨床例における実践的なてんかん外科および予後調査

3. 研究の成果

- (1) 当研究室が系統維持している家族性側頭葉てんかん猫 2 頭において、頭蓋内電極を慢性留置し、長時間 (1 週間以上) ビデオ同時記録広域周波数帯域脳波測定を行った。現在 (2023 年度実施例も含めて) 高周波律動 (HF0) および直流電位偏位 (DC shift) の解析を行っている。またてんかん外科を実施した臨床例においても術中に測定した皮質電図を用いて、HF0 および DC shift の解析を行っている。加えて効率よくてんかん性異常波および発作時脳波を記録するため、ケタミンの有用性について、家族性側頭葉てんかん猫を用いて調査した。その結果、ケタミンがてんかん猫の脳波測定時における発作誘発剤として有効である可能性が示された (2023 年度に発表予定)。
- (2) 上述した 1 頭の家族性側頭葉てんかん猫において (別の 1 頭は両側焦点と判定したために片側海馬切除の適応外となった)、片側海馬切除術を実施し、現在その個体の発作転帰および合併症について追跡調査を行っている。途中経過として、海馬扁桃体の切除自体は成功したものの、おそらく医原性の脳梗塞を生じており、発作頻度は減少したものの、幾つかの神経学的欠損が認められている。
- (3) 犬の深部脳刺激法 (DBS) を実施予定であったが、海外の別グループより、我々の計画よりも高度な犬 DBS 研究報告がなされたため本研究計画の実施を中止した。一方で、本年度末に当大学に新しい 3T MRI 装置が設備されたため、新しい撮像技術を用いたてんかん原性領域の同定に関する研究計画に変更した (2023 年度実施中)。
- (4) 過去のとてんかん外科実施例の追跡調査および 2022 年度てんかん外科実施例の発作転帰および合併症についての調査を継続的に実施し、5. で示す研究発表を行っている。加えて、てんかん外科適応症例を検討していく中で、犬における新たなてんかん症候群 (ポメラニアン の焦点性運動発作) を見出すことができ、学術論文として報告した。

4. 研究の反省・考察

(1) (2) について実験のスケジュール調整困難や研究スタッフの途中欠員等のトラブル、12 月から 3 月まで MRI の更新による実験不能期間があり、また (3) 犬の DBS については他の研究グループから公表があるなどして、実験系の研究実施が順調に進んだとは言いがたい (予定の 2/3 の進行程度)。(4) の臨床例における追跡調査や新たなてんかん外科症例の獲得については滞りなく進行していると考えている。これまでの臨床例におけるてんかん外科の成果は世界的に高く評価されており、またその長期予後についての報告が期待されている。2023 年度はその成果報告を行う予定である。加えて、実験不能期間があったものの、新しい MRI が導入されたことにより、これまで実施不可能だった撮像法が利用になったことで、新たな研究計画を立案する事ができ、2023 年度の本研究課題は新たな体制で望む事になる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hasegawa D, Saito M, Kitagawa M. Neurosurgery in canine epilepsy. *The Veterinary Journal* 285:105852, 2022. DOI:10.1016/j.tvjl.2022.105852
- ② Hasegawa D, Kanazono S, Chambers JK, Uchida K. Neurosurgery in feline epilepsy, including clinicopathology of feline epilepsy syndrome. *The Veterinary Journal* 290:105928, 2022. DOI:10.1016/j.tvjl.2022.105928
- ③ Yu Y, Hasegawa D, Kanazono S, Saito M. Clinical characterization of epileptic seizures in Pomeranians with idiopathic epilepsy or epilepsy of unknown cause. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 36:2113-2122, 2022. DOI:10.1111/jvim.16578
- ④ 長谷川大輔. 犬猫のてんかん. 日本医科大学医学会雑誌 18(4):354-359, 2022.

(2) 口頭発表

- ① 長谷川大輔. 犬と猫のてんかん発作：人の発作型分類との比較. 第55回日本てんかん学会（2022年9月20-22日，仙台）.
- ② 長谷川大輔. 欧米の抗てんかん発作薬コンセンサスステイトメントと日本の現状. 第24回臨床獣医学フォーラム（2022年9月22日～12月9日，オンライン）.
- ③ 長谷川大輔. もう迷わない発作への対応. 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会（2023年2月17日～3月21日，オンライン）

(3) 出版物

- ① Hasegawa D. Advanced diagnostic imaging in epilepsy (Chapter 6). In: De Risio L, Munana K, eds. *A Practical Guide to Seizure Disorders in Dogs and Cats*, pp. 115-152, Edra Publisher, Italia.
- ② Hasegawa D, Saito M. Zonisamide (Chapter 14). In: Risio L, Munana K, eds. *A Practical Guide to Seizure Disorders in Dogs and Cats*, pp. 265-276, Edra Publisher, Italia.

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	日 本 医 科 大 学	研究所名等	
研究課題	新規バイオバンクによる老化実態解明のための疾患横断的基盤研究 ーゲノム疫学研究を用いた老化による疾患発症機序の解明ー	研究分野	医 学
キーワード	①老化、②ゲノム解析、③疫学研究、④疾患関連遺伝子多型、⑤遺伝子変異		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 口 博 樹	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究代表者・研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
桑 名 正 隆	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
木 村 和 美	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
岩 切 勝 彦	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
清 家 正 博	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
岩 崎 雄 樹	日本医科大学医学部	准 教 授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
酒 井 行 直	日本医科大学医学部	准 教 授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
長 尾 元 嗣	日本医科大学医学部	講 師	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
安 武 正 弘	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
舘 野 周	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
森 田 明 夫	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
吉 田 寛	日本医科大学大学院 医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
山 田 岳 史	日本医科大学医学部	准 教 授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者

小川 令	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
武井 寛幸	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
高橋 浩	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
眞島 任史	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
佐伯 秀久	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
近藤 幸尋	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
杉谷 巖	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
臼田 実男	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
大久保 公裕	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
鈴木 俊治	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
仁藤 智香子	日本医科大学医学部	教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
森田 林平	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
大石 由美子	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
本田 一文	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
福田 いづみ	日本医科大学医学部	教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
石井 庸介	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
汲田 伸一郎	日本医科大学大学院 日医学研究科	大学院教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者
林 宏光	日本医科大学医学部	教授	研究分担者・臨床情報収集
松田 浩一	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	教授	研究分担者・検体収集・個別研究責任者

新規バイオバンクによる老化実態解明のための疾患横断的基盤研究 ーゲノム疫学研究を用いた老化による疾患発症機序の解明ー

1. 研究の目的

我が国の高齢化は、先進国の中でもっとも進んでおり、世界一の健康長寿国である。この世界一の健康長寿国であることを生かして医療や介護の分野の革新、いわゆる「ライフ・イノベーション」を強力に推し進めることで「高齢化の先進モデル」を構築していく必要がある。「高齢化の先進モデル」を構築するためには「老化」の実態を解明する必要があるが、この解明には疫学とゲノム研究が融合したゲノム疫学は大きな役割を果たしてきた。例えば Genome-Wide Association Studies (GWAS) などによって高血圧などの加齢によって発症する疾患の危険因子が同定され、これらは「老化」の遺伝因子の一つの要因であることも明らかにされつつある。

しかしこうしたゲノム疫学研究の成果は、1回の検体採取の解析結果より得られたものがほとんどで、体細胞変異の蓄積やエピゲノム変化、ミトコンドリアの機能不全などといった後天的な因子を解析するには、同一研究対象者において経時的な検体採取によるゲノム疫学研究を行う必要がある。

我々は、2003年より「ゲノム研究バイオバンク事業-利活用を目的とした日本疾患バイオバンクの運営・管理-」の共同研究施設として検体バンキングを行ってきた。これまでに日本医科大学グループ全体で2003年からの第一コホートでは47疾患33,081人を、2013年からの第二コホートでは38疾患18,289人を登録し収集した。そこで、本研究は、以下の4つのことを目的としている。

- (1) 疾患横断的な同一研究対象者からの5-20年の間隔で検体と臨床情報を再収集し、「老化」の実態を解明する新たなバイオバンクを構築する。
- (2) ゲノム研究バイオバンク事業などで明らかになった疾患関連遺伝的変異を有する研究対象者が5-20年の経過でそれぞれの疾患をどの程度発症するのかを明らかにする。
- (3) 「老化」によって体細胞モザイクや後天性遺伝子変異などのゲノム変化がどのように発生しているのかを明らかにする。
- (4) 「老化」が「がん」「自己免疫疾患」「生活習慣病」の発症にどのようにかかわっているのかを明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) 「老化」の実態を解明する新たなバイオバンクを構築
ゲノム研究バイオバンク事業に登録をして現在も日本医科大学グループの4病院を受診している約7500人の研究対象者に関して、経時的な検体採取を目的に検体の再収集を行う。
- (2) 登録時のゲノム解析データを用いたゲノム疫学研究
ゲノム研究バイオバンク事業では2018年度を最後に臨床情報の更新が行われていない。そこで日本医科大学グループから登録をした51370人に関しては2022年3月31日までの臨床情報の更新を行う。
ゲノム研究バイオバンク事業に日本医科大学が登録をした51,370症例に関しては、全症例でSNP解析が、約35%程度の症例で全ゲノム解析が終了している。現在通院をしていない症例の臨床情報の更新をおこない下記研究をすすめる。
 - ① 体細胞モザイクと白血病の病的特徴に関わる研究(血液内科)
 - ② 新たな遺伝学的異常を用いた造血器腫瘍発症メカニズムの探索(血液内科)
 - ③ 日本人脳梗塞関連遺伝子座と臨床的意義(脳神経内科)
 - ④ 家族性大腸腫瘍症の遺伝子変異解析(消化器外科)
 - ⑤ 糖尿病合併症における発症リスク遺伝子変異の探索(糖尿病内分泌代謝内科)

3. 研究の成果

- (1) 「老化」の実態を解明する新たなバイオバンクを構築
 - ① 2022年7月に日本医科大学中央倫理審査委員会にて日本医科大学グループ4病院での検体の再収集の承認が得られた(M-2022-046)。8月に生命科学センターBF1に検体再収集の

核酸抽出や細胞保存のための実験室と学術振興資金にて超低温冷凍庫と液体窒素タンク2台を購入し整備をした。各病院の診療科の検体再収集の研究対象者の抽出や、電子カルテによるオーダーシステムも構築が終了し、2022年11月より附属病院、2023年2月より千葉北総病院、3月より武蔵小杉病院、5月より多摩永山病院にて検体の再収集が開始された。2023年5月31日時点で、2831症例(目標の37%)の検体再収集を行った。

(2) 登録時のゲノム解析データを用いたゲノム疫学研究

①日本医科大学グループから登録をした51370人に関しての臨床情報の更新をすることに関して倫理審査の承認が得られ(日本医科大学大学倫理審査委員会 A-2019-017)、附属病院の27,234症例、千葉北総病院での登録された10,922症例、武蔵小杉病院の8009症例の臨床情報の更新が終了した。現在多摩永山病院の臨床情報の更新を行っている。これらの更新した臨床情報をゲノム研究バイオバンク事業に登録をすることで共同研究者である東京大学大学院 新領域創成科学研究科松田浩一教授が悪性リンパ腫や腎細胞がんのリスク遺伝子多型の同定、BRCA1 and BRCA2変異を有する症例の発癌プロファイリングなどの論文発表を行った。

②新たな遺伝学的異常を用いた造血器腫瘍発症メカニズムの探索(血液内科)

日本医科大学グループから登録され全exon解析を行った11,090症例を対象に、これまでに造血器腫瘍の発症に関与をしている胚細胞由来変異25遺伝子に関して、症例登録時からの造血器関連腫瘍の発症割合、化学療法の奏功性、予後の解析を行った。25遺伝子の中でも遺伝子AとBは他の遺伝子と比較して、若年で高率に造血器関連腫瘍を発症させ、予後不良であることが明らかになった(現在Leukemia投稿中)。

③日本人脳梗塞関連遺伝子座と臨床的意義(脳神経内科)

脳梗塞21404症例の生存分析と脳梗塞関連遺伝子のゲノタイプ情報を基盤として、全死亡および心血管死に関するweighted genetic risk score(wGRS)を作成して5分位に分けたところwGRSが上昇するにつれて累積死亡率が上昇することを明らかにした(現在Lancet Neurology投稿中)。

④体細胞モザイクと白血病の病的特徴に関わる研究(血液内科)、家族性大腸腫瘍症の遺伝子変異解析(消化器外科)、糖尿病合併症における発症リスク遺伝子変異の探索(糖尿病内分泌代謝内科)に関しては現在解析を行っている。これらの研究以外にもALDH2遺伝子多型による飲酒と心房細動との関連(循環器内科)、心房細動リスク遺伝子と心房細動発症および持続化との関係(循環器内科)、循環器疾患罹患者の遺伝子型と表現型との相関に関する研究(循環器内科)、HCV排除後のC型慢性肝炎患者におけるTLL1 SNPのリスクアレル別の肝発癌の検討(消化器内科)、消化器癌リスク遺伝子多型とその発症率(消化器内科)、骨粗しょう症における発症リスクSNPの探索(整形外科)、変形性膝関節症の発症および人工膝関節手術後の静脈血栓塞栓症発生の大規模疫学調査(整形外科)、脳動脈瘤と甲状腺機能障害におけるRNF213の機能解析(脳神経外科)、放射線画像検査による発がんリスクSNPの探索(放射線科)、薬疹発症に関与するリスクSNPの探索(皮膚科)など20の個別研究が立案され解析が開始された。

4. 研究の反省・考察

(1) 「老化」の実態を解明する新たなバイオバンクを構築

①検体の再収集に関しては、収集を開始して約7カ月時点で目標の37%の収集となっており若干収集が遅れているようにも思える。しかし本研究では、研究対象者が外来受診時にまず同意を取得し、次回来院時に実臨床で必要な採血に合わせて検体を再収集することが多い。このため検体再収集を開始してから1-3カ月後くらいから実際の検体の再収集が行われているようである。そのことを考慮すると2024年3月には目標の90%近くまで検体の収集ができるのではないかと予想している。

(2) 登録時のゲノム解析データを用いたゲノム疫学研究

①日本医科大学グループから登録をした51370人に関しての臨床情報の更新に関しては、多摩永山病院以外は順調に終了をした。多摩永山病院に関しては、電子カルテの運用が2022年12月となったため臨床情報を抽出する基盤構築が遅れたためと考えている。現在順調に臨床情報の更新作業が行われており8月までには終了を予定している。

②個別のゲノム疫学研究に関しては、新たな遺伝学的異常を用いた造血器腫瘍発症メカニ

ズムの探索(血液内科)と日本人脳梗塞関連遺伝子座と臨床的意義(脳神経内科)に関しては解析結果を論文投稿中であり順調の解析が進んでいる。一方で立案された研究の中には、解析は開始されているが、担当する研究者においてのゲノム解析に関する知識や経験に差があるため、解析に難渋をしている研究もある。現在日本医科大学内にゲノム解析研究の解析手法などを解説するオンデマンド講義の開講や、共同研究者である東京大学大学院新領域創成科学研究科松田浩一教授に解析に関しての講義やアドバイスをを行い、研究の進捗を早めるように工夫をしている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yoshiaki Usui, Yusuke Iwasaki, Keitaro Matsuo, Mikiko Endo, Yoichiro Kamatani, Makoto Hirata, Kokichi Sugano, Teruhiko Yoshida, Koichi Matsuda, Yoshinori Murakami, Yoshinobu Maeda, Hidewaki Nakagawa, Yukihide Momozawa, Association between germline pathogenic variants in cancer-predisposing genes and lymphoma risk., *Cancer science*, 2022, 113, 11, 3972- 3979, 10.1111/cas.15522
- ② Yuya Sekine, Yusuke Iwasaki, Tomomi Aoi, Mikiko Endo, Makoto Hirata, Yoichiro Kamatani, Koichi Matsuda, Kokichi Sugano, Teruhiko Yoshida, Yoshinori Murakami, Tomohiro Fukui, Shusuke Akamatsu, Osamu Ogawa, Hidewaki Nakagawa, Kazuyuki Numakura, Shintaro Narita, Tomonori Habuchi, Yukihide Momozawa, Different risk genes contribute to clear cell and non-clear cell renal cell carcinoma in 1532 Japanese patients and 5996 controls., *Human molecular genetics*, 2022, 31, 12, 1962- 1969, 10.1093/hmg/ddab345
- ③ Yukihide Momozawa, Rumi Sasai, Yoshiaki Usui, Kouya Shiraishi, Yusuke Iwasaki, Yukari Taniyama, Michael T Parsons, Keijiro Mizukami, Yuya Sekine, Makoto Hirata, Yoichiro Kamatani, Mikiko Endo, Chihiro Inai, Sadaaki Takata, Hidemi Ito, Takashi Kohno, Koichi Matsuda, Seigo Nakamura, Kokichi Sugano, Teruhiko Yoshida, Hidewaki Nakagawa, Keitaro Matsuo, Yoshinori Murakami, Amanda B Spurdle, Michiaki Kubo, Expansion of Cancer Risk Profile for BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants., *JAMA oncology*, 2022, 8, 6, 871- 878, 10.1001/jamaoncol.2022.0476

(2) 口頭発表

- ① 下山 隆、松田浩一、鎌谷洋一郎、永田安伸、山口博樹、木村和美：脳梗塞患者におけるゲノムワイド解析と臨床的特徴に関する検討 - バイオバンク・ジャパン研究事業-STROKE2022 Web liveシンポジウム～脳卒中のゲノム解析～
- ② 下山 隆、松田浩一、鎌谷洋一郎、永田安伸、山口博樹、木村和美：19702人の日本人虚血性脳卒中患者における悪性腫瘍の危険因子と性特異的相違に関する検討：バイオバンク・ジャパン研究事業 STROKE 2023 ポスター発表 (STROKE 2023優秀ポスター賞受賞)
- ③ Takashi Shimoyama, Koichi Matsuda, Yoichiro Kamatani, Yasunobu Nagata, Hiroki Yamaguchi, Kazumi Kimura. Sex-specific differences in risk profiles for cancer among 19702 Japanese patients with ischemic stroke: The BioBank Japan project. International Stroke Conference 2023

(3) 出版物

なし

2022年度（第47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実施
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

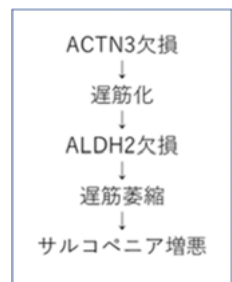
1. 研究の目的

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視視されつつある。

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(Nature communication 2019)。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。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いた(Am J Physiol, 2020)。さらに我々は2021年度より本学術振興資金の援助を得ながら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こと(Am J Physiol, 2022)、ヒトにおいてALDH2遺伝子変異保有者が若年、アスリート、高齢者のそれぞれにおいて低値を示すこと(Biol Sport, 2022, J Physiol Anthrope, 2022)を見出した。すなわちアジア人の遺伝的特性であるALDH2遺伝子の変異はミトコンドリアを介して筋力や筋量の低値に影響を与えることを見出してきた。

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。本学術振興資金を得ることで2021年度までにACTN3遺伝子多型モデルとして遺伝子編集を用いてACTN3遺伝子ノックアウトマウスの作出に成功している。

さらにALDH2およびACTN3遺伝子多型の両方がアジア人サルコペニア発生に関与するメカニズムとして、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)およびALDH2KOマウスでミトコンドリアの活性酸素産生能亢進により遅筋が萎縮することの組み合わせから、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)が仮定してきた。本学術振興資金の支援を得てすでにALDH2およびACTN3ダブルノックアウトマウスの作出にも成功している。



以上のような背景をもとに本研究の目的はALDH2遺伝子およびACTN3遺伝子多型が筋力および筋量に与える影響を検討することとする。動物を対象とした基礎研究においては本学術振興資金の支援を得て作成したACTN3遺伝子ノックアウトマウスを用いて骨格筋量などの特徴を検討することとした。ヒトを対象とした臨床研究においては横断研究においてすでに本学術振興資金の援助を得てALDH2遺伝子多型が筋力低下に影響を与えることがわかっていることから、筋力の縦断的変化に対してACTN3およびALDH2遺伝子多型が与える影響を調査することとした。

2. 研究の計画

以下、動物を対象とした基礎研究とヒトを対象とした臨床研究のそれぞれに分けて研究計画を示す。

(1)ACTN3 遺伝子ノックアウトマウスの骨格筋量の特徴

本研究において遺伝子編集を用いて確立したACTN3ノックアウトマウス(5匹)および同腹より得た野生型(10匹)を2ヶ月齢にて解剖し下腿骨格筋を得た。重量測定の後、その後の測定のために液体窒素にて急速凍結した。

(2)ヒト ALDH2 遺伝子多型および ACTN3 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）。本年度は、3 年間の追跡調査が可能な高齢者の筋力低下に対しての ALDH 2 遺伝子多型 (rs671) および ACTN3 遺伝子多型 (rs1815739) の影響について検討した。

3. 研究の成果

(1)ACTN3 遺伝子ノックアウトマウスの骨格筋量の特徴

先行研究において ACTN3 ノックアウトマウスは低体重および低筋量の傾向を示すと報告されている。我々が確立した ACTN3 ノックアウトマウスについては体重に統計的な有意差はなかったが、握力においてノックアウトマウスが有意な高値を示した。さらに腓腹筋、足底筋、前脛骨筋が統計的に有意な高値を示し、先行研究と異なる結果となった。

ウエスタンブロッティングにより ACTN3 タンパク質が完全に欠失していることが確認できたため我々のマウスにおける遺伝子編集は問題なく行われていることが確認できた。近重量が高値を示したため病理組織化学染色を用いて筋繊維断面積を計測したところ、速筋の中でもミトコンドリア含量が多いタイプ 2A の断面積がノックアウトマウスにおいて高値を示した。

先行研究において ACTN3 ノックアウトマウスではミトコンドリア含量が増加しているとされている。我々が確立したマウスで分析を行ったところミトコンドリア含量の指標である COX 2 量はノックアウトマウスで低値を示す結果となり先行研究と一致しなかった。酸化的リン酸化に関する酵素もノックアウトマウスで低値を示し、先行研究とは一致しなかった。

以上まとめると我々が確立した ACTN3 ノックアウトマウスは先行研究において報告されている形質とは全く異なる形質を示すことが明らかになった。

(2)ヒト ALDH2 遺伝子多型および ACTN3 遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

我々がこれまでおこなってきた大規模研究では、ALDH2 の AA タイプは特に高齢の対象者において筋力が低値であることを報告している。今回の研究では高齢者における 3 年間の筋力低下を検討したものの遺伝子多型による影響は認められなかった。今後、追跡期間の延長および被験者数の追加を予定している。

4. 研究の反省・考察

(1)ACTN3 遺伝子ノックアウトマウスの骨格筋量の特徴

今回我々が確立したノックアウトマウスはウエスタンブロッティングの結果から確かに ACTN3 タンパク質を欠失していたが、その表現形は先行研究とは全く異なる結果となった。先行研究における低体重、低筋重量、遅筋化などの特徴は低週齢において見られる特徴であり、高い週齢において同様の傾向が見られるかは検討されていない。さらに言えばマウスノックアウトに対応するヒト ACTN3XX 型において低体重、筋量の低値、遅筋化などは報告されておらず、ACTN3XX 型が持久的競技に有利とする報告は少なく現在では懐疑的である。詳細な検討はさらに必要ではあるが今回の結果は ACTN3 ノックアウトが骨格筋に与える影響について全くの新知見を得た可能性が強く示唆される。

(2)ヒト ALDH2 遺伝子多型および ACTN3 遺伝子多型が加齢性筋力低下に与える影響

横断研究において明らかにされてきた ALDH2 多型と低筋力の関係は縦断研究においては必ずしも確認されないとの結果を得た。ただし今回は被験者が少なかったこともあり、最終年度においてさらなる例数の追加を持って最終的な結論を得たいと考える。

5. 研究発表

(1)学会誌等

①Jee E, Tamura Y, Kouzaki K, Kotani T, Nakazato K, Effect of different types of muscle activity on the gene and protein expression of ALDH family members in C57BL/6J mouse skeletal muscle., Appl Physiol Nutr Metab (IF: 2.67; Q3). 2022 Jul 1;47(7):775-786

②De Almeida KY, Saito M, Homma H, Mochizuki Y, Saito A, Deguchi M, Kozuma A, Okamoto T, Nakazato K, Kikuchi N., ALDH2 gene polymorphism is associated with fitness in the elderly Japanese population., J Physiol Anthropol, 2022 Nov 5;41(1):38.

(2) 口頭発表

①中里浩一、骨格筋形態・代謝適応制御の分子運動生理学 その黎明期から未来へ、遺伝子多型研究が分子運動生理学に果たす役割、第77回日本体力医学会大会、2022年、招待講演

②服部桜、田村優樹、鴻崎香理奈、小谷鷹哉、木下涼雅、中里浩一、iGONAD法を用いたC57BL/6J系統のActn3ノックアウトマウス作成と形質解析、第70回日本実験動物学会、つくば市

アスベスト使用における先進国の消費者責任

－国際産業連関分析によるアスベスト・フローの推計－

1. 研究の目的

アスベストは1960年代より健康被害が明らかになっているにも関わらず、中進国・発展途上国約153カ国で採掘・使用がつついている。これらの国々では、アスベストのリスクが一般に浸透しておらず、健康被害の実態調査も不十分である。本研究の目的は、グローバル・サプライチェーンを考慮した経済的なアプローチによって、アスベストの健康リスクに晒される国別産業別労働人口を推計し、アスベスト使用国のみならずアスベスト禁止国の消費者責任を明らかにすることである。

(1)

①付加価値貿易やサプライチェーンの分析に適した国際産業連関分析を適用するため、アスベストに関して拡張した国際産業連関表(Asbestos extended multi-regional input-output table, AMRIOT)を推計する。

②推計したAMRIOTによりアスベストの国際フローを明らかにする。

(2)

①AMRIOTを拡張し、アスベストの健康リスクへの暴露が危惧される国別産業別労働人口を推計する。

②AMRIOTによる国際産業連関分析により波及効果を推計し、アスベスト採掘国における労働者数の誘発を推計する。

2. 研究の計画

(1) アスベスト拡張国際産業連関表の推計

①国際産業連関表(OECD- Inter-Country Input-Output (ICIO) Tables)を、鉱物アスベストの国別生産量重量と国際貿易の重量ベースのフローを統計データ(UN Comtrade Database, The United States Geological Survey(USGS))から入手し、拡張し、AMRIOTを推計する。

②推計されたAMRIOTのアスベスト採掘部門に関して、国別労働者数を推計する。

(2) 国際産業連関分析による国別のアスベスト採掘・使用の誘発の推計

①AMRIOTによる国際産業連関分析による波及効果の推計により、アスベスト採掘・使用の国別産業別の寄与を推計する。

②AMRIOTによる国際産業連関分析による波及効果の推計により、アスベスト採掘部門の労働者数への国別産業別の寄与を推計する。

3. 研究の成果

(1) アスベスト拡張国際産業連関表の推計

①本研究では、従来は医学的な健康リスクや労働災害といった観点から論じられてきたアスベスト問題に対し、国際経済におけるサプライチェーンという新たな観点からの分析を試みた。まず、基準年を2014年とし、AMRIOTの推計を行った。AMRIOTでは、ベースとなったOECDが推計している国際産業連関表(OECD-ICIO)の産業部門分類において、鉱業と製造業でアスベストと関連する産業(鉱業1部門、製造業4部門)をアスベストと関連する産業とそれ以外の産業に金額ベースで分割し、OECD-ICIOをアスベストについて拡張した。アスベストの重量ベースでの生産フローと、原材料として製造業に投入されるアスベストの国際フローを推計した。なお、基準年を2014年とした理由はいくつかあるが、その一つとしてアスベストの健康リスクの潜伏期間が10年から数十年と長い点を考慮した。

②AMRIOT 2014で拡張して新たに推計したアスベスト採掘部門の経済的なアクティビティを下に労働者数を推計した。産業別の労働者数はブラジルの国内産業連関表(IBGE, 2023)のように各国政府が詳細な産業分類に基づいて公表している例もあるが、中国をはじめとする多くの中進国・発展途上国では、部門分類が粗く推計は容易ではなかった。本研究では、既存研究(Timmer et. Al, 2015; Wu et al., 2015)や国際機関による統計データベース(ILO, KLEMS, United Nations Statistics Division)を活用することにより、推計を可能

とし、採掘部門以外の製造業部門でも推計できる手法を確立した。

(2) 国際産業連関分析による国別のアスベスト採掘・使用の誘発の推計

①AMRIOT 2014を用いて産業連関分析により各国の最終需要がどのようにアスベストの採掘や製造業における原材料使用を誘発してきたかを明らかにした。基準年においてアスベスト採掘を行っている国は、ロシア、中国、カザフスタン、ブラジルの4カ国と考えられる(USGS, 2015)が、これらの国々における採掘を誘発しているのはインド、インドネシア、タイといった国々である。また、EUをはじめとするアスベスト禁止国は、鉱物アスベストの採掘、輸入、アスベスト含有製品の生産・輸入を行っていないにも関わらず、少なからずアスベストの採掘を誘発していることが明らかになった。研究の成果としてはTsukui (2022)で発表している。

②鉱物アスベスト生産部門で働く労働者数は、中国、ロシア、カザフスタン、ブラジルの順に多く、特に中国が突出して大きかった。また、中国の場合は、アスベスト含有製品を生産する国内の製造業の寄与が大きかったが、他の三か国では、中国、米国、ドイツ、日本といった国々が誘発する労働者数が大きかった。研究の成果としてはTsukui (2023)で発表している。

本研究の結果からアスベストの採掘・使用は、グローバル・サプライチェーンを通じてアスベスト禁止国からも誘発されており、アスベストの禁止問題がアスベスト禁止国も含む国際協力が必要な課題であることが経済的なアプローチからも明らかになった。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究成果に関する反省・考察

①AMRIOT 2014の推計において、鉱物アスベストのフローについては貿易データの輸入ベースを按分比として採用し、アスベスト含有製品については輸出ベースを按分比として採用した点が反省点として挙げられる。貿易データ(UN Comtrade Database)の輸入ベースのデータと輸出ベースのデータは、物量としては輸出国から見ても輸入国から見ても本来は一致すべきであるが、一般的には様々な理由により一致していないのが現状である(小坂, 2012)。本研究では、鉱物アスベストのフローとしては、輸入データの方が信頼性が高いと考えた。また、アスベスト含有製品については、OECD-ICIOが基本価格で推計されていることから、FOBによる輸出データの方が、CIFによる輸入データより按分比の推計に適していると考えたからである。しかし、研究分担者の専門である国際貿易論的な見地からやはり貿易データを輸出ベースに統一して推計を行った方が、整合性の取れたより良い推計となるのではないかとのことである。報告時点において、輸出ベースでのAMRIOT 2014の推計を行っており、貿易データの輸出ベース/輸入ベースの採用の影響を比較する必要性が生じている。

②労働者数の推計については、鉱物アスベスト採掘部門のみに留まった。ただ、手法的には他の産業部門における労働者数も推計する方法を確立することができたので、今後はアスベスト含有製品製造部門における労働者数も推計し、労働環境においてアスベストの暴露の対象となる労働者数を推計し、誘発に関連する国や産業部門を推計していきたい。

(2) 研究成果の発表に関する反省

別紙の理由書にも記載したように、予想よりオンライン開催を継続する学会が多く、対面でフラットに意見を交換し、関連研究者とのネットワーキングを行う機会がやや少なかった。また、2022年度中に成果を論文を投稿する予定であったが、前述のように比較のためAMRIOTの推計において貿易データを輸出ベースとした場合の推計を行っているため、投稿に至ることができなかった点が非常に残念である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① Makiko Tsukui, What countries induce the world asbestos flow? : A multi-

regional input-output approach, The 15th Biennial International Conference on EcoBalance at Fukuoka International Congress Center, Japan (国際学会), 2022年11月2日

② Makiko Tsukui, Extended multi-regional input-output analysis for global mineral asbestos flows, PAPAIOS-ICES 2020 at Hotel Plum, Yokohama, Kanagawa, Japan (国際学会), 2023年3月19日

(3) 出版物

なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	法 政 大 学	研究所名等	大原社会問題研究所	
研究課題	日本資本主義と女性の社会的環境に関する総合的研究 －「平塚らいてう資料」のデジタルアーカイブ構築を中心に－		研究分野	文 学
キーワード	①デジタルアーカイブズ ②ジェンダー ③史料研究 ④近現代史 ⑤社会運動			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
榎 一 江	法 政 大 学 学 部 大原社会問題研究所	教 授	近代日本の女性労働に関する実証研究の推進

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
差 波 亜 紀 子	日 本 女 子 大 学 学 部 日 文 学 部 史 学 学 科	教 授	女性知識人、平塚らいてうに関する研究の推進
古 俣 達 郎	法 政 大 学 学 部 HOSEI ミ ュ ー ジ ャ ム	准 教 授	デジタルアーカイブ、展示に関する研究担当
堀 川 祐 里	新 潟 国 際 情 報 大 学 学 部 国 際 学 部 国 際 文 化 学 科	講 師	女性労働をめぐる運動と思想に関する研究担当
堀 内 暢 行	法 政 大 学 学 部 大原社会問題研究所	RA	資料目録・デジタルアーカイブの構築担当
井 上 直 子	法 政 大 学 学 部 大原社会問題研究所	RA	近代日本女性史をめぐる研究蓄積の調査担当

日本資本主義と女性の社会的環境に関する総合的研究

－「平塚らいてう資料」のデジタルアーカイブ構築を中心に－

1. 研究の目的

(1) 本研究は、近代日本における女性の社会的環境を総合的に把握することを目的とする。具体的には、女性解放・平和運動など社会運動に邁進した平塚らいてう（奥村明 1886-1971）に焦点を当て、没後 50 年を機として 2021 年度に法政大学大原社会問題研究所が受贈した「平塚らいてう資料」デジタルアーカイブの構築・公開を通して、実証研究を推進する。

(2) 本研究の課題

① 「平塚らいてう資料」デジタルアーカイブの構築

「平塚らいてう資料」とは、NPO法人「平塚らいてうの会」所蔵資料と孫の奥村直史家所蔵資料を統合したものである。前者はらいてう自伝の編纂に従事した小林登美枝が保管していた資料を会が引き継いだものであり、もともと奥村家にあったものをらいてうの了解をえて帯出したものと推定される。会では『平塚らいてうの会紀要』などでその一部を紹介してきたが、十分な研究がなされてきたわけではない。後者は、奥村家に残された資料で、奥村直史は孫の立場から『平塚らいてう——その思想と孫から見た素顔』平凡社、2021 年を刊行し、らいてう研究を行ってきたが、一般には公開されていない。もともと一体であったこれらの資料をあわせて整理・公開し、広く学術研究の基盤を整備することが本研究の課題である。

② 日本資本主義の成り立ちが女性の社会的環境に与えた影響についての研究

そのうえで本研究が追究するのは、日本資本主義の成り立ちが女性の社会的環境にどのような影響を与えたのかという問題である。従来、近代日本の女性史は女性解放運動の担い手に焦点を当て、平塚ら知識人の論考を分析対象としてきた。一方、日本資本主義の発展を底辺で支えた女性労働者は、ほとんど資料を残さず、ストライキ等の行動が記録されるのみであった。しかしながら、平塚らが女性だけの手による文芸誌『青鞥』を創刊したのは女性工場労働者の保護を目的とする工場法が公布された1911年であり、国家による母性保護は両者に共通する重要なテーマであった。この知識人層と労働者層との関係に焦点を当てるのが、本研究の特徴である。

1918年から19年にかけて、国家による母性保護を訴えたらいてうに対し、女性の経済的自立を主張する与謝野晶子が批判し、のちに山川菊栄らも加わって「母性保護論争」が展開されたことはよく知られている。実際、らいてうは、1919年に名古屋の紡績工場を視察し、その「悲惨な光景」に直面して「これが地獄でなくて何であろう」と記し、また、市川房枝らと新婦人協会を1920年に設立して婦人参政権運動を展開する際、その機関誌『女性同盟』の創刊にあたって、「将来母となるべき多くの娘たちが工場において資本家の利己心の犠牲となって、彼女の若々しさと愛情の豊かさと彼女にとって何より大切な母性を破壊されねばなりません」と嘆き、女性の地位向上を訴えた。このように、女性解放を目指す女性知識人の多くは、悲惨な境遇にある女性として工場労働者に言及し、彼女らの言説が女性の声として流布するとともに政策に一定の影響を与えたと考えられる。こうした女性知識人の言説と女性労働者の現実とを切り結び、近代日本の知識人層と労働者層とを包括した女性の社会的環境に関する学術的な研究を推進するのが本研究の目的である。

2. 研究の計画

(1) リサーチアシスタント（RA）による目録編成等の基礎作業の推進

① 本年度は、移管資料の全体像を把握し、大原社会問題研究所所蔵「平塚らいてう資料」の目録データを完成させるとともに、デジタルアーカイブ構築の準備をすすめる。

② 平塚らいてうを含む近代日本女性史をめぐる先行研究の検討をすすめる。

(2) 研究会の開催

① 目録の編成、デジタルアーカイブ構築に向けた資料研究会を開催する。

② 近現代日本における女性の社会的環境に関する研究会を開催し、メンバーの増員を図る。

3. 研究の成果

(1) 大原社会問題研究所所蔵「平塚らいてう資料」目録データの完成と資料撮影

①2022年3月、本研究の基礎となる「平塚らいてう資料」が平塚らいてうの会および奥村家より法政大学大原社会問題研究所に正式に寄贈された。そのため、22年度より大原社会問題研究所の研究プロジェクトとして「平塚らいてう資料研究会」を発足させ、従来のメンバーに加え資料寄贈者の参加を得ながら資料整理方針の確認を行った。

②デジタルアーカイブの専門家をRAとして採用し、資料の再整理から目録データの作成までを進めていただいた。8月末で約2700件の目録データの作成にめどがついたため、9月にオンライン研究会を開催し、一般公開およびデジタルアーカイブ構築に向けた今後の方針を確認した。この目録データに基づき、資料撮影の正確な見積もりを取り、撮影を発注することができた。

(2) 近代日本女性史をめぐる研究蓄積の検討

①女性史を専門とするRAに平塚らいてう研究の網羅的なリストを作成してもらい、それを共有しながら先行研究の成果と課題を確認する研究会を3月に実施した。本研究は、これまで異なる文脈で研究されてきた知識人層と労働者層との関係に焦点を当て、日本資本主義の成り立ちが女性の社会的環境に与えた影響を実証的に追究する点に特徴がある。この点について、近年進展が著しい女性労働に関する実証研究を踏まえ、労働者層の現実と広く社会に発信されたいらいてうらの言説との乖離を描出することによって、「母性保護」をめぐって女性を特殊な労働力とした日本独自のメカニズムを探ることができるとの着想を得ることができた。

②「平塚らいてう資料」に関心を持つ研究者のうち、女性間の階級問題に関する日仏比較研究を推進するため、23年度よりメンバーの増員を図ることを決めた。新メンバーは、フランス在住ではあるが、来日した際に「平塚らいてう資料」の概要を確認しており、今後はオンライン研究会やデジタルデータの活用によって共同研究が可能となるだろう。日本史研究者のみならず、国際比較の視点を取り入れることで共同研究の可能性がさらに広がることを期待できる。

4. 研究の反省・考察

(1) 大原社会問題研究所所蔵「平塚らいてう資料」について

①本年度は、目録データの完成とそれに基づく資料撮影を予定していたが、撮影費用が大幅に膨らみ、申請した予算が減額されたこともあり、すべての資料撮影を終えることができなかった。資料の状態に鑑み、撮影したデジタルデータを共有して研究を進める予定であったため、資料を読み込む作業については少し遅れることになった。

②本研究は、まず目録作成と資料のデジタル化を優先したが、デジタルアーカイブ構築後も貴重な原資料を適切に管理・保存し、後世に残していく必要がある。デジタル化作業が終了した時点で、それぞれの資料に必要な処置を施し、保存体制を整える必要がある点を認識した。次年度以降の課題としたい。

(2) 共同研究の進め方について

平塚らいてうに関しては、著作集が編まれ、自伝も刊行されており、それらを活用した研究蓄積も厚い。これに対し、本研究はらいてう自身が記した原稿、日記、メモ、書簡等を含む貴重な一次資料を学術資源として活用する点に特徴があるが、これを共同研究者間で利用可能なものにするための基礎作業に多くの時間を要した。しかしながら、資料のデジタル化が完了すれば、今後の研究活動は極めて円滑に進めることができるであろう。

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

標的タンパク質分解誘導を促進・高効率化する 新規複合分子の創製

1. 研究の目的

本研究の目的は、標的タンパク質分解誘導薬に係る未知の作用機序の解明と、そこで得られた知見を活用して、標的タンパク質分解を促進・高効率化する新規複合分子を創製することである。

- (1) 我々はこれまでに、標的タンパク質分解誘導活性を保持しながら各種官能基の導入・連結が可能な PROTAC テンプレートの合成に成功している。そこで、
 - ① このテンプレートに、近接すると標識を転移する官能基を連結した複合型プローブ（未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブ）を合成し、活性評価を実施する。
 - ② 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブを活用して、三者複合体にリクルートされる重要因子の探索と同定、およびその役割の解明を行う。
- (2) 次に、得られた知見を標的タンパク質分解誘導法の高効率化に応用するため、新規因子の活性制御法をテンプレートに組み込んだ複合分子を創製する。我々は既に、標的タンパク質分解誘導を亢進する TRIP12 と、その分解を担う因子 UBR5 を同定しているため、
 - ① まずは、TRIP12 分解因子である UBR5 の活性を調節する化合物を組み込んだ複合分子を創製する。
 - ② 本研究にて新しく同定する因子に関しても同様に、その活性制御法を組み込んだ複合分子を創製する。

2. 研究の計画

(1) 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブの合成と活性評価

- ① 我々はこれまでに、E3 リガーゼ VHL のリガンド (*(S, R, S)*-AHPC) と、癌治療標的タンパク質 Brd4 に対するリガンド (JQ1) から構成された、Brd4 分解誘導薬 MZ-1 を独自に構造展開し、Brd4 分解誘導活性を保持した4種の PROTAC テンプレート群を合成している。テンプレート群は、4種の三置換ベンゼン異性体からなっており、それぞれ親化合物である MZ-1 からの極端な活性低下無しに機能性官能基の導入が可能である。そこで、機能性官能基として、袖岡らにより報告された発蛍光性基 *o*-ニトロベンゾオキサジアゾールや、浜地らにより報告されたビオチン基を有する近接駆動型標識転移基を組み込んだ未同定因子探索用の新規複合型 PROTAC プローブ群を合成する。理化学研究所・袖岡らにより開発された *o*-ニトロベンゾオキサジアゾールは、近接するタンパク質のリジン残基に転移すると蛍光性の *N*-ニトロベンゾオキサジアゾールとなる近接駆動型発蛍光基であり、また、京都大学・浜地らにより開発された近接駆動型標識転移基は、近接するタンパク質の求核性アミノ酸残基にビオチンを転移させることができる。よって、PROTAC 特有の三者複合体形成時に、三者複合体にリクルートされる因子は、複合体成分と共に、蛍光基やビオチンで標識されると期待される。
- ② 合成したプローブ群の Brd4 タンパク質分解誘導活性を、HT-1080 などのヒト培養細胞を用いて評価し、これらが PROTAC テンプレートと同等の活性を保持することを確認する。万一、活性の大幅な低下が見られた場合には、テンプレートと *o*-ニトロベンゾキ

サジアゾールや近接駆動型標識転移基を繋ぐリンカーの鎖長と性質（親水性、疎水性）を改変し、最適化する。この過程を経て、未同定因子探索に有用なプローブを創製する。

(2) プローブを利用した未同定因子候補の探索

- ① 活性を保持したプローブを、ヒト培養細胞に一定時間処理した後、回収した細胞の抽出液から蛍光性の *N*-ニトロベンゾオキサジアゾール基やビオチン基が転移したタンパク質を検出する。検出には Western blot 法や質量分析法を用いる。検出されたタンパク質のうち、既知の三者複合体構成因子以外のタンパク質を、未同定重要因子候補として選別する。

3. 研究の成果

(1) 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブの合成と活性評価

- ① 申請計画に従い、活性テンプレート群から、未同定因子探索用複合型プローブの合成を検討した。前回申請後の詳細な解析により、1,2,5-三置換ベンゼンを有する活性テンプレートの標的タンパク質分解誘導に係る時間と速度が、元の PROTAC とほぼ同じであったことから（本研究の成果: Bioconjugate Chem. 2022, 33, 142）、最初に 1,2,5-三置換ベンゼンを有する活性テンプレートからのプローブ合成を実施した。これまでに、蛍光性プローブの合成を完了しており、未同定因子探索用複合型プローブの合成も最終工程を残すのみである。
- ② これまでに合成した誘導体およびプローブ群（15種類）の Brd4 タンパク質分解誘導活性を、ヒト培養細胞 HT-1080 を用いて評価した。この際、予想に反して分解活性を失った誘導体およびプローブが数種類確認された。

(2) プローブを利用した未同定因子候補の探索

- ① 合成した蛍光プローブをヒト培養細胞 HT-1080 に処理して、蛍光顕微鏡を用いて経時的に細胞内局在の観察を実施した結果、細胞内器官に蛍光の蓄積が見られた。

4. 研究の反省・考察

(1) 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブの合成と活性評価

- ① PROTAC テンプレートの量的供給とプローブへの変換の検討にやや時間を要したが、2023年度より本研究課題の研究分担者として参画頂く研究者の協力により、これらの問題は解決された。
- ② 我々の予想に反して、分解活性を失った誘導体およびプローブが数種類確認されたことから、化合物の溶解性や細胞膜透過性を改めて検討する必要がある。既に、バッファー（緩衝液）への溶解性と細胞膜透過性を評価する術は得ており、これらのパラメータを考慮しながら分子構造の最適化を実施する予定である。

(2) プローブを利用した未同定因子候補の探索

- ① 蛍光プローブを用いて細胞内局在の観察を実施したが、まだ未同定因子探索にまでは至っていない。引き続き、溶解性や細胞膜透過性を加味した上で、高い活性を保持したプローブの設計と創製を行う必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 第66回日本薬学会関東支部大会 有機化学系シンポジウム「薬学の未来を拓く有機化学」
(横浜薬科大学、9月17日)
「標的タンパク質分解誘導剤と人工多能性幹分子創製への取り組み」 (招待講演)
叶 直樹

(3) 出版物

なし

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

新型コロナウイルス (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。新型コロナウイルス (COVID-19) の大流行では、さまざまな対策を実施する必要があった。感染拡大を防ぐには、ワクチンなどの医薬品による対策に加え、医薬品以外の個人の予防に関する行動変容が不可欠であった。様々な対策の中でも、社会的距離を保ち、接触を減らすことが予防に有効となることは繰り返し示されている。特に、日本では法的な強制力を持つロックダウンなどは行われず、人々の自発的な行動に委ねられる部分が大きかった。

コロナ禍における行動変容や買い占め行動に関する分析はいくつか報告されているが (Columbus, 2020; Lunn et al., 2020; Van Bavel et al., 2000)、この状況を社会的ジレンマとして捉えた分析はまだ報告されていない。そこで本研究では感染拡大下において人々の行動の規定因として社会的ジレンマにおける向社会的行動を促進する要因がどのような影響を与えていたのかを分析する。また、パンデミックのような不確実な状況で個人を意思決定に導くためには、メディアが情報源として重要となる。本研究では、予防行動として外出自粛に着目し、コロナ禍における外出自粛に及ぼすメディア利用の影響を検討した。上記 2 点の課題についてパネル調査データを用いて検討した。

2. 研究の計画

国内大手クラウドソーシング「Yahoo!クラウドソーシング」に登録しているモニター 2,000 人を対象に、2020 年 4 月 3 日に第 1 波調査を実施 (女性 38.3%、平均年齢 46.5 歳)。第 2 波調査は 2021 年 4 月 13 日～24 日に実施し、987 名 (女性 33.4%、平均年齢 49.0 歳) の有効回答を得た。第 1 ウェーブと第 2 ウェーブの両方に回答した参加者と、第 2 ウェーブで離脱した参加者を比較したところ、年齢に違いが見られた (前者は平均 47.95 歳、後者は平均 45.05 歳、 $p < .001$)。性別と以下の分析で使用した心理的態度には有意差はなかった。予防行動と規範は以下のように設定した。まず、行動については、第 1 波調査の前週である 2020 年 3 月 28 日、29 日の週末に「遊びに行った」「食事に行った」の 2 項目の回答を用い、2 項目のどちらかを行った人を “非協力”、どちらも行わなかった人を “協力” とするダミー変数を設定した。そして、第 2 波調査では、2021 年 4 月 10 日、11 日の週末についても同様の操作でダミー変数を設定した。

行動意図については、5 段階評価の 2 項目を採用した：行動意向は、“現状が続くと仮定した場合、今週末の外出を控えますか？”と “現状が続くと仮定した場合、今後 1 ヶ月間の週末の外出をどの程度控える予定ですか？”の 2 項目を 5 段階評価で採用した。行動意向のスコアは、2 つの項目の単純加算で求めた。

社会的ジレンマにおける向社会性を測定する指標として以下のものに着目した。我々は、向社会的行動に影響を与えるよく知られた心理的態度の代表的なセットを採用した。一つ目は、一般化された互惠性と一般化された信頼である (山岸・山岸, 1994; 山岸・清成, 2000)。この 2 つのレベルが高い人ほど、向社会的行動をとりやすいことが知られている。一般化された信頼を測定するために、被験者は 2 つの項目を評価するよう求められた：「ほとんどの人は信頼できる」と「ほとんどの人は他人を信頼している」である。一般化された信頼に関する被験者のスコアは、2 つの項目のスコアを単純に加算することで得られた。被験者の互惠性のレベルを測定するために、質問票の 2 つの文が用いられた。その総合得点は、2 つの記述に対する回答の得点を単純に加算することによって得られた。互惠性の計算に使われた 2 つの項目は以下の通りである：“誰かが私を助けてくれたら、私も他の誰かを助ける”、そして “他人に親切にすると、やがて良いことが自分に返ってくると信じている” である。

メディア接触については、8 つの変数を主な独立変数とし、外出を控える意識を予測した。SNS 利用に関する設問は、日本では Twitter 利用者が多いことから Twitter に絞った。質問項目には、メディア利用頻度のほか、政治的関心 (ハードニュースの利用度を示す)、選択的露出の程

度、メディア疑惑、主観的メディアリテラシーなど、メディア利用に関連する指標が含まれている。

3. 研究の成果

社会的ジレンマに関する分析では、COVID-19 パンデミックの初期と1年後の2つの時点で同じ対象者を調査し、パンデミック時の行動と規範の決定要因の変化を分析した。特に本稿では、外出自粛を向社会的行動とみなし、社会的ジレンマの枠組みで分析を試みた。一般化された信頼と互酬性は、多くの研究で向社会的行動にプラスの効果をもたらすことが知られている。しかし、本研究では、互酬性は第1波では向社会的行動、向社会的行動意図、罰規範に正の効果を示したが、第2波ではこれらの効果は消失した。一方、公正な世界に対する信念や正義感といった公正に対する心理的態度は、一貫して人々の行動や規範に影響を及ぼしていた。公正な世界に対する信念に関しては、BIJは向社会的行動と処罰規範に正の効果を示した。公正な世界に対する信念は、被害者を非難することにつながっており (Correia et al., 2007)、本研究の結果も、感染者を不当に非難するリスクを示唆している。正義感については、加害者感性が高い人ほど外出を控え、被害者感性が高い人ほど罰規範が高いという直感と一致する結果が得られた。これらの成果は Yamamoto et al. (2023) として出版が決定している。

メディア接触の影響としては、SNS 閲覧が外出自粛を促す効果は2020年には確認されたが、2021年には限定的となっていた。2021年は、外出を自粛する人はSNS閲覧している傾向があるが、外出をする人とSNS閲覧の関連は見られない。その代わりに、選択的接触やメディア猜疑心などの認知的要因の効果が強くなっていた。各時点で流通していた情報の違いや、人々の意見分布が異なっているために、パンデミック初期の頃と一定期間後ではSNS閲覧の効果が異なる結果となったと考えられる。継続的な予防行動の促進と維持に対するメディアの効果について洞察を得るためには、時系列的な変化を考慮した分析が不可欠であることを示している。図1は予防行動に対する態度によってクラスタリングされた人々のメディア接触の程度を2時点で比較したものである (Suzuki et al., 2023 より転載)。これらの成果は Suzuki et al. (2023) として出版された。

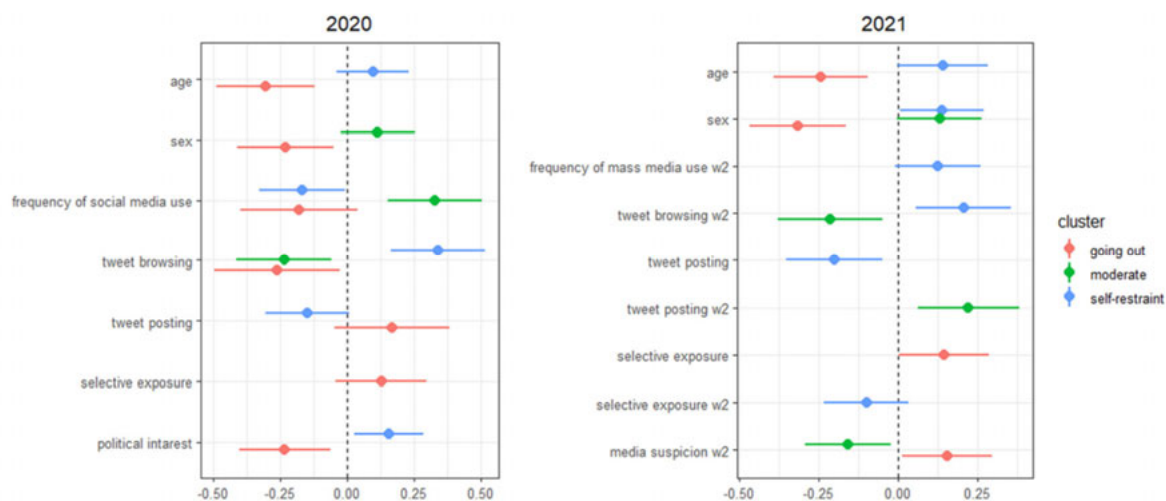


図1:2時点での予防行動クラスタごとのメディア接触の特徴 (Suzuki et al., 2023 より)

4. 研究の反省・考察

この調査に限界がなかったわけではない。第一に、調査だけでは、メディアから発信された具体的な情報、その時系列の変化、回答者が接した内容を明らかにすることはできない。したがって、内容分析も行う必要がある。また、本研究は2波にわたるパネル調査を用いたが、長期的な変化についてのさらなる分析も必要である。

今後の展望としては以下の点があげられる。新型コロナウイルスに対する社会の対応、一般市民の態度は時系列で大きく変動している。特にワクチンに対する態度は分散が大きく、積極的にワクチン接種を呼びかける医療界と一部のワクチン忌避者たちとの分断など大きな社会問題にも発展している。こうしたワクチン忌避者たちによる医師たちへの誹謗中傷が裁判に発展した事例なども観察されている。こうしたワクチン忌避者の特徴を明らかにし分断の解消に向けた社会科学的知見を提供することが今後の重要な課題となる。我々は2022年に第3波調査を実施

し、2023年には第4波調査を実施した。4波における時系列的な動向を把握していることは学術的にも社会的にも貴重なデータであると言える。我々はワクチン忌避者たちの特徴を明らかにするためのモデルを2023年度に構築する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Suzuki, T., Yamamoto, H., Ogawa, and Umetani, R. (2023). Effects of media on preventive behaviour during the COVID-19 pandemic. *Humanities and social sciences communications*, 10, 58. <https://doi.org/10.1057/s41599-023-01554-9>
- ② Yamamoto, H., Okada, I., Uchida, S., & Sasaki, T. (2022). Exploring norms indispensable for both emergence and maintenance of cooperation in indirect reciprocity. *Frontiers in Physics*, 10(September), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fphy.2022.1019422>

(2) 口頭発表

- ① Suzuki, T., Yamamoto, H., & Umetani, R., How is justified defection assessed? Experimental study of the distribution of assessment rules in indirect reciprocity, The 19th International Conference on Social Dilemmas. (2022)
- ② Yamamoto, H., Hackel, J., Okada, I., Goto, A., & Taudes, A., Effect of two types of incentives on cooperation: a real effort based public goods game, The 19th International Conference on Social Dilemmas. (2022)
- ③ 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
- 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

(3) 出版物

なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	侵襲的脳活動計測・介入によるヒト情動・共感の神経機序の解明 －ECoG・DBSを駆使し「いいね」を生み出す脳の仕組みに迫る－	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①情動、②共感、③侵襲的脳活動計測、④電気刺激、⑤脳深部刺激療法		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 合 謙 介	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	教 授	研究代表者・総括・手術

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 嶋 剛	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	講 師	手術・実験・論文作成
石 下 洋 平	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	講 師	手術・実験・論文作成
井 林 賢 志	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	講 師	手術・実験・論文作成
大 谷 啓 介	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	講 師	手術・実験・論文作成
佐 藤 信	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	助 教	手術・実験・論文作成
大 貫 良 幸	自 治 医 科 大 学 脳 神 経 外 科 学 講 座	助 教	実験・論文作成・データ整理

侵襲的脳活動計測・介入によるヒト情動・共感の神経機序の解明 — ECoG・DBS を駆使し「いいね」を生み出す脳の仕組みに迫る —

1. 研究の目的

- (1) 私達は映画や小説を鑑賞している時、登場人物の情動を理解し、自分も同じ情動が生じることがある(共感性)。また、ソーシャル・ネットワーキング・サービス(SNS)の発展から、他者から得られる共感の数(例:Facebookの「いいね」の数やTwitterのリツイート数)は社会的な報酬と等価であり、有名人の社会的地位の指標としても機能している。近年、情動や共感性が引き金となって、「いいね」やリツイートなど他者へ情報を拡散する行動(information sharing behavior)がもたらす社会的な価値が高まっている。本研究は情動や共感性による情報拡散行動を生み出す神経機序の解明を目的とする。今年度は様々な情動・共感課題を使用し、視床下核の共感性・情動情報処理の関与を調査し、2023年に計画している「情動・共感性の変容を引き起こす電気刺激の検証実験」で使用される電気刺激の変数候補を検討した。

2. 研究の計画

(1) 研究方法 1. 情動と共感性を担う脳領域と特定の神経活動の同定

①課題効果と課題中に賦活する脳領域を同定するため、情動を喚起させる感覚刺激課題(映像、音声、匂いを提示)、他者への共感性を評価する課題(動画、他者の情動の評価課題、SNSを模した社会的報酬課題)を作成する。今年度は共同研究者のKeyzersらが作成した痛覚認知課題および感情的な表情の動画を使用した。この課題を利用して、健常者に対してfMRI計測を実施する。また、治療のために硬膜下電極や脳深部電極を留置したてんかん患者やパーキンソン病患者に対して同様の認知課題を課し、電極から神経活動(局所電位)を計測する。情動的な反応や共感の発生時の神経活動を抽出し、多変量解析や機械学習を用いて解析することにより、ヒトの情動と共感性に関与する脳領域と特定の神経活動(例:ベータ波などの周波数帯域)の同定を行う。

3. 研究の成果

(1) 共感性を反映する視床下核活動の発見

①共同研究者のKeyzersらが作成した痛覚認知課題を用いて、脳深部刺激療法用の電極を視床下核に留置したパーキンソン病患者の視床下核活動を計測した。その結果、他者が痛みを感じ始めた時、視床下核の β 帯域の活動が上昇することを示した。同じ課題を使用して、Keyzersらは島皮質も同様の活動を示すことを明らかにしており(Soyman et al. 2022, *eLife*, 研究分担者・大貫も共著者)、視床下核は島皮質から投射を受けていることから(Emmi et al. 2020, *Front. Neuroanat*)、本研究結果は視床下核が他者の痛みの共感の情報表現を担う可能性を示唆している。

②視床下核による共感情報処理を調べるため、Keyzersらが作成した感情的な表情の動画を呈示した時の視床下核活動を計測し、各表情間の視床下核活動の類似度(相関係数)を算出した。比較のため、表情の動きから感情情報の推定結果を出力する(例:動画のフレーム毎に怒り80%、悲しみ30%と判定)ニューラルネットワークを使用し、動画の感情推定の時系列結果から各表情の動画間での類似度を算出した。その結果、感情を表す前の無感情な表情の時点では、視床下核活動もCNNと同様に表情のカテゴリー間で類似する活動を示す一方、感情的な表情が現れた時は、視床下核活動はCNNと同様に表情のカテゴリー間で異なる活動を示した(カテゴリー間の類似度が低下)。この結果は、視床下核が他者の情動の符号化(共感性)の機能を担う可能性を支持する。

(2) 解剖学的結合性に基づいた電極の自動抽出方法の開発

①視床下核活動から情動情報の推定も試みた。本研究では13種類の情動を喚起させる音楽刺激(Cowen et al. 2020, *PNAS*)を呈示した時の視床下核活動を計測し、機械学習の一種であるサポートベクターマシンを使用して推定を試みた。その結果、患者によっては4-32Hz

帯域(θ α β 帯域)で最大78%の精度で呈示した情動喚起音の種類を視床下活動から分類することが出来た。しかし、電極留置位置にバラツキがあるため、患者によっては安定した推定結果が得ることが出来なかった。上記の結果を受けて、機械学習の推定結果を高めるため、MRIとCT画像から視床下核の電極位置を同定した後、拡散テンソル画像解析による皮質・皮質下領域との結合性に基づく電極の自動選択手法を開発した。

(3) 情動喚起情報を反映する神経活動のリアルタイム処理・電気刺激提示システムの作成

①先行研究 (Scangos et al. 2021, *Nature Medicine*) から、電気刺激による情動への効果は、周波数だけでなく覚醒度(Arousal)にも依存することが指摘されている。このため、電気刺激の安定した効果を得るためには、神経活動の逐次的解析を行い脳の状態を逐次観測し、適切なタイミングで電気刺激が必須となる。本研究では、研究分担者の大貫が開発した「機械学習による睡眠自動判定・触覚刺激装置」(Onuki et al. 2022, *J. Neurosci*) を応用して、ヒトの皮質・皮質下領域活動のリアルタイム解析・電気刺激装置のシステムを開発した。

4. 研究の反省・考察

(1) 共感性を反映する視床下核活動の発見

①本研究では、脳深部刺激療法用の電極を視床下核に留置したパーキンソン病患者の視床下核活動を計測した。その結果、他者が痛みを感じ始めた時、視床下核の β 帯域の活動が上昇することを示した。同一課題を用いて、Keysersらは島皮質も同様の活動を示すことを明らかにしており(Soyman et al. 2022, *eLife*, 研究分担者・大貫も共著者)、今後、同一課題を患者と同年齢の高齢者を対象としたfMRIで実施し、島皮質と視床下核とのコネクティビティ解析を行う予定である。また、今回の成果は6th human Single-Neuron Meeting 2022にてポスター発表を行ったが、参加者から実際の痛覚を与えた場合との結果の比較を指摘された。今年度は痛みを与えることなく電流知覚閾値を測定する臨床機器「PainVision」の使用する臨床研究計画書の承認が遅延してしまったことから、一部の患者のみで結果を得ることが出来た。ただし、電気刺激のタイミングが同期出来る仕様ではないため、機器の改変を行い、刺激タイミングを同期させた時の視床下核の活動の解析を実施することを検討している。

②感情的な表情間の視床下核活動の類似度の結果とニューラルネットワークの結果を比較し、視床下核活動はニューラルネットワークと同様に表情のカテゴリー間で異なる活動を示し、視床下核が他者の情動への共感性の機能を担う可能性を支持する結果を得た。今回は表情に基づく感情認識を検出する既存のアルゴリズムを持つニューラルネットワークを利用したが、今後は他の勘定認識ソフトウェアを適用して、どのアルゴリズムが視床下核と酷似した表情の検出パターンを持つのかも検証したい。また、視床下核は線条体同様、皮質領域と直接結合している大脳基底核領域であることが知られており、ミラーニューロンがあるとされる一次体性感覚野や運動全皮質からの信号の投射も受けている。視床下核単体においても表情のミラーニューロンがあるのか、もしくは大脳皮質からの投射が単純に反映しているだけなのかを検証するため、同一課題を実施している時の全脳の活動をfMRIで計測し、representational similarity analysis (RSA)を用いて、感情の符号化の活動を反映する視床下核活動と類似した活動がどの大脳皮質領域で認められるのかを検証する。

(2) 解剖学的結合性に基づいた電極の自動抽出方法の開発

①MRIとCT画像から視床下核の電極位置を同定した後、拡散テンソル画像解析による皮質・皮質下領域との結合性に基づく電極の自動選択手法を開発した。今回の結果は12軸のDTI画像を用いている点から大まかな皮質・皮質下領域との結合性に基づいて電極を抽出した。昨年10月に120軸のDTI画像を用いた高速DTI画像計測法のMRIシーケンスの導入が完了できたため、今後は高解像度の皮質・皮質下領域との結合性を用いて電極の抽出を行う。

(3) **情動喚起情報を反映する神経活動のリアルタイム処理・電気刺激提示システムの作成**

①ヒトの皮質・皮質下領域活動の前処理、機械学習による特徴的な脳波の判定、刺激の可否の決定をリアルタイムで自動化したシステムを構築することが出来た。研究分担者の大貫が開発した「機械学習による睡眠自動判定・触覚刺激装置」(Onuki et al. 2022, *J. Neurosci*)を応用したことが開発のハードルを下げ、迅速な開発に繋がった。このシステムでは最大 256ch の脳波をリアルタイム処理することが出来るが、サンプリングサイズの大きさや解析に使用する脳波電極数によって、前処理に時間が掛かることから 300ms 程度の遅延が生じることがわかった。対策として、解析に使用する脳波データを一時的に保存するハードディスクドライブの速度を上げるため、データの書き込み速度が高速であるソリッドステートドライブに変更したり、脳波解析処理を行う MATLAB プログラムの冗長な部分を変更したり、解析対象の周波数を絞む等の解析処理速度を高める修正を検討している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①大貫良幸. 視床下核への脳深部刺激療法による他者の痛みの抑制効果. 第62回日本定位・機能外科学会, Web開催, 2023年1月27-28日.

(3) 出版物

なし

多発性骨髄腫治療用 sgRNA 薬候補の作用機構の解明

1. 研究の目的

多発性骨髄腫は難治性血液がんであり、全世界で年間15万人程の患者がこれにより死亡していると見積もられている。我々は、遺伝子発現抑制技術であるTRUE gene silencing (tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing)法を骨髄腫に応用し、患者を寛解・治癒に導くsgRNA薬を発見することを長期目標としている。

tRNA前駆体切断酵素tRNase ZLを利用するこの技術は、がんなどの疾病に対する治療法としての可能性を秘めている。この技術の基盤は、この酵素がtRNA前駆体やmicro-tRNA前駆体に類似したRNA複合体を認識し切断することができ、7-30ヌクレオチドのsmall guide RNA (sgRNA、※CRISPR/Cas法のものとは異なる)を用いてあらゆるRNAを任意の部位で特異的に切断することができる特性にある。

これまでに、sgRNA薬H15540とH15603が培養細胞系でヒト骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導すること、sgRNA薬H12960がマクロファージの性質をM1状態の方向に遷移させヒト骨髄腫細胞を移植した免疫不全マウス局所投与実験において腫瘍の増殖を抑えることを示した。

本研究では、これらのsgRNA薬について、細胞内標的RNAを特定し作用機構を明らかにすること及びマウス全身投与実験における腫瘍増殖抑制効果を確認することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) transcriptome 解析

骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導するsgRNA薬H15540とH15603、およびマクロファージをM1状態に遷移させることが示されたsgRNA薬H12960の細胞内標的RNAをDNAマイクロアレイによるtranscriptome解析により探索する。

(2) マウス xenograft 実験

骨髄腫細胞標的sgRNA薬H15540の静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を解析するために、ヒト骨髄腫細胞株(KMM-1)を皮下に移植したマウスxenograft実験を実施する。sgRNA薬には、2'-Oメチル修飾、2'-メトキシエチル修飾、ホスホロチオエート修飾、LNA修飾などを施したものを使用する。

3. 研究の成果

(1) transcriptome 解析

- ① sgRNA薬H15540あるいはH15603（それぞれ2'-Oメチル修飾、あるいは2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾を施した化学合成RNA）を、ヒト骨髄腫細胞株RPMI-8226を培養している培地中に裸のまま添加し、36時間後に細胞から全RNAを抽出した。この全RNAを用いてDNAマイクロアレイによるtranscriptome解析を行った（各サンプル群の数は2）。

sgRNA薬を添加しない対照細胞と遺伝子発現レベルを比較した結果、sgRNA薬H15540（2'-Oメチル修飾RNA）を添加した細胞では28個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、31個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。また、sgRNA薬H15540（2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA）を添加した細胞では247個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、71個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。

同様に、sgRNA薬H15603（2'-Oメチル修飾RNA）を添加した細胞では59個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、145個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。また、sgRNA薬H15603（2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA）を添加した細胞では27個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、99個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。

- ② DNAマイクロアレイによるtranscriptome解析により、骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導するsgRNA薬H15540の細胞内標的mRNAの有効候補の1つとしてND6 mRNAが見出されている。このmRNAに関して、qRT-PCR解析を実施し、実際に、ヒト骨髄腫細胞株RPMI-8226のND6

mRNAレベルを40%程減少させることを確認した。また、化学合成されたこのmRNAの部分配列を持つRNAが、sgRNA薬H15540の存在下においてtRNase ZLにより予想部位で切断されることも確認できた。これらの成果は、本研究の目的であるsgRNA薬の作用機構解明に向けての大きな前進である。

(2) マウス xenograft 実験

SCID/NODマウスに移植するためのヒト骨髄腫細胞株KMM-1の大量培養が困難を極めたことと、これに関連してSCID/NODマウス皮下への生着が成立しなかったことが原因で、sgRNA薬H15540の静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を解析することができなかった。KMM-1細胞の代わりに、大量培養が比較的容易なヒト骨髄腫細胞株RPMI-8226を用いてSCID/NODマウスの皮下への生着を試みたが、これも成立しなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) transcriptome 解析

sgRNA薬H15540 (2'-Oメチル修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補が31個、sgRNA薬H15540 (2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補が71個見いだされた。また、sgRNA薬H15603 (2'-Oメチル修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補は145個、sgRNA薬H15603 (2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補は99個見いだされた。sgRNA薬の化学修飾の違いにより、発現が減少する遺伝子の数が変動するという結果は興味深く、sgRNA薬の作用機構の解明につながることを期待される。今回の結果を踏まえて、今後、sgRNA薬の作用機構の全体像を明らかにしていきたいと思う。

(2) マウス xenograft 実験

① 当研究室にて10年以上研究に用いていたヒト骨髄腫細胞株KMM-1の増殖速度が著しく減少したため、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンクより新たにKMM-1細胞を取得したが、この細胞株も安定に増殖しなかった。そこで、理化学研究所バイオリソース研究センターより別のKMM-1細胞株を取り寄せて、5種類の異なるロットのウシ胎児血清を用いて培養試験をしたところ、1つのロットのウシ胎児血清で良好な細胞増殖が観察された。しかしながら、少数のSCID/NODマウスを用いてこのKMM-1細胞の生着試験を行ったが生着は成立しなかった。当研究室ではこれまでに同様のマウスxenograft実験で生着が成立しており、今回の不生着の原因は未だに不明である。

② また、SCID/NODマウスにヒト骨髄腫細胞を移植するために必須な米国コーニング社の試薬マトリゲルの入手が様々な世界情勢のために遅れて、マウスxenograft実験の実施が遅れたことも、研究実施期間内にsgRNA薬H15540の静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を解析することができなかった理由の1つである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Nashimoto M. (2022) TRUE Gene Silencing. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 5387.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

GIS を用いた災害福祉教育プログラムの開発と実践 ー演習-実習の連動による新たな福祉人材育成手法の検討ー

1. 研究の目的

(1) 自然災害の多いわが国において、災害時の社会福祉とその具体的な援助行動の形態としてのソーシャルワークは、災害医療や災害看護と同様に研究が強化されるべき分野であり、それを担う人材の育成は平常時から促進して取り組むべき課題となっている。

本研究では、このようなソーシャルワーカー養成教育における今日的課題を背景として、GIS(地理情報システム)を用いた「災害福祉教育プログラム」と「学習支援コンテンツ」の開発、実践研究を行うことを目的とした。

2. 研究の計画

(1) 研究初年である 2022 年度は、災害時ソーシャルワークにおけるコンピテンシーモデル開発に向けた基礎資料を得るため、①災害福祉関連文献・資料の検討、②インタビュー調査を行った。

①災害福祉関連文献・資料の検討

災害ソーシャルワークに関連する研究論文や実践報告、各職能団体の活動報告書などの資料を精読した上で、災害時特有のソーシャルワーク活動に関する記述を抽出し、【情報】【判断】【行為】に分類し、整理した。

②インタビュー調査

災害被災地で福祉的支援の活動経験からとらえた災害時に必要な社会福祉専門職のコンピテンシーモデルの開発に向けた基礎資料を得ることを目的とし、下記2点の条件を満たす対象者3名を対象にインタビュー調査を行った。

- ・ 災害被災地における福祉的支援活動のリーダー経験を有していること。
- ・ 災害支援活動者を対象とした研修など人材育成に従事していること。

調査方法は90分程度の半構造化面接で、調査内容は、下記4項目について聞き取りを行った。

- 1) 災害時の福祉的支援活動の実際について
 - ・ どのような課題が生じていたか？
 - ・ 課題の解決に向けてどのような活動（取り組み）をしたか？
- 2) 災害時の社会福祉の役割や機能について
 - ・ 責任や役割を果たすためにどのようなことを心がけて行動したか？
 - ・ その活動を行っていく上で阻害要因となっていたことは？
- 3) 被災者支援、被災地支援の効率をあげるための工夫や実践について
 - ・ 被災者に対する働きかけなど支援活動の成果をあげるための戦略や方策は？
 - ・ 災害時福祉的支援に必要な情報を収集し活用、発信するために工夫したことは？
 - ・ 被災地の混沌とした状況の整理や解決のために工夫したことは？
 - ・ 災害支援チームによるアプローチのためにどのような工夫や実践を行ったか？
- 4) 災害支援に携わる人材の育成、教育について
 - ・ どのような人材が災害時に必要と考えているか？
 - ・ どのような価値観を持ってほしいか？
 - ・ どのような知識を習得させたいか？
 - ・ どのような技術を身につけさせたいか？
 - ・ そのためにどのような教育実践を展開しているか？
 - ・ 教育実践上の課題は何か？

3. 研究の成果

(1) 災害福祉関連文献・資料の検討結果

実際の経験に基づいた具体的な災害時の社会福祉専門職の役割や機能など災害時の社会福祉専門職のあり方を提言するとともに、災害福祉に関する教育プログラムを構築に資する基礎資料を得ることができた。

①災害時ソーシャルワークの展開に関する要素として下記一覧のように整理できた。

【情報】	支援活動を阻害した要因 所属先包括および関連施設の被災状況 要援護者の状況 ソーシャルワーカーが介入した（している）状況や対象者 災害時要援護者に関する情報の不足 被災者の心理的ストレスに関する状況把握 複雑化・長期化する支援困難ケース
【判断】	事業所が直面した課題と対応 専門職の支援活動基盤 専門性・価値・思い ソーシャルワーク援助技術・支援方法 震災及び原発事故に伴い生じた新たな課題 ソーシャルワークの視点や方法 多職種協働で支援を展開していたが職種間で支援方針の相違
【行動】	原発避難者の受け入れ 安否確認と避難誘導支援 多機関との連携・協働による支援 共助による要援護者支援 多機関・多職種連携・チームアプローチ 心のケア 災害への備え 災害ボランティアとの協働 地震直後は所属する事業所の職員として活動 相談支援専門職チームの一員としての活動を継続

②インタビュー調査結果

面接は、対象者の同意を得た上で、ICレコーダーで録音、逐語化し、テキストマイニングの手法で分析し、下記一覧のように重要語句を抽出できた。

抽出語	出現回数	抽出語	出現回数	抽出語	出現回数
災害	93	科目	18	派遣	12
学生	50	ボランティア	16	報告	12
地域	48	人材	16	社会	11
状況	41	仕事	15	団体	11
課題	37	機能	14	日常	11
自分	37	施設	14	理解	11
大事	35	取り組み	14	ニーズ	10
活動	33	調整	14	学部	10
一緒	30	コミュニティ	13	関係	10
意味	29	プロジェクト	13	子供	10
福祉	29	現地	13	大学	10
感じ	28	考え方	13	知識	10
生活	27	東日本大震	13	防災	10
対応	24	意識	12	様々	10
必要	19	行政	12		

4. 研究の反省・考察

(1) 研究初年度である今年度は、分析対象とする言語データの収集が主目標であったが、おおむねデータ収集を終えることができた。一方で、収集データの分析には着手できなかった点が反省点である。2023年度は、2022年度調査で収集できたデータを対象として、下記2点の方向性で分析を進めていくこととする。

また、今後の研究全体の推進方策としては、収集データについて質的研究を通じて分析し、災害時ソーシャルワークの理論と実践の体系化を試み、災害福祉教育に含むべき事項を明らかにし、災害福祉教育プログラム開発へと発展させていく。

①【情報】－【判断】－【行動】の構造化

3つの主要概念に基づいてカテゴリー化されたデータは、行動に至る思考プロセスを明確にするために、【行動】につながる【判断】内容と、活用した【情報】に関する要素間の関係性を明らかにするとともに構造化を図る。

②災害時ソーシャルワークの体系化

得られた言語データは、より精細な内容分析およびデータに密着した分析から独自の理論を生成することに適している点から、質的統合法やグラウンデッド・セオリー・アプローチなど方法を採用し、質的分析を促進する。

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

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 の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

① 青色光依存的な 0aPAC の構造変化の解明

② 青色光依存的な 0aPAC の活性変化 (cAMP 産生活性) の可視化

(2) 特性 (cAMP 産生量・光応答性) が異なる 0aPAC 改変体群の作製

2. 研究の計画

(1) 0aPAC の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

① 青色光依存的な 0aPAC の構造変化の解明

2020年度の成果①、2021年度の成果①をさらに推し進め、巨視的な多分子計測と1分子計測で、0aPACの青色光依存的な構造変化の詳細に明らかにする。具体的には、0aPACの特定のアミノ酸に環境依存性の蛍光色素であるテトラメチルローダミン (TMR) を標識し、青色光の照射のオン・オフに伴う蛍光強度の変化を多分子または1分子レベルで測定し、構造変化の詳細を解明する。

② 青色光依存的な 0aPAC の活性変化 (cAMP 産生活性) の可視化

蛍光性ATPの0aPACへの結合・解離を1分子イメージングし、0aPACのcAMP産生活性を調べる。具体的には、ATPが0aPACへ結合し、触媒反応によりcAMPに変換される過程を、全反射顕微鏡や2021年度の成果②で作製したナノ開口基板を用いて捉える。

(2) 特性 (cAMP 産生量・光応答性) が異なる 0aPAC 改変体群の作製

2021年度の成果③と計画1、2で明らかとなった情報をもとに、活性調節に重要な部位に変異を導入し、光応答性やcAMP産生能が異なる0aPAC変異体を作製する。最終的に、様々な種類の細胞で、作製した改変体がオプトジェネティクスのツールとして働くことを示す。

3. 研究の成果

(1) 0aPAC の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

① 青色光依存的な 0aPAC の構造変化の解明

0aPACのアデニル酸シクラーゼドメイン (ACドメイン) の特定の1アミノを環境依存性蛍光色素であるテトラメチルローダミン (TMR) で標識し、青色光刺激前後の蛍光強度を蛍光分光光度計 (多分子系) で測定した。TMRには疎水性環境下で蛍光強度が高く、親水性環境下で低いといった特性がある。測定の結果、ACドメインのタンパク質表面に位置するV350とT309に標識した変異体は、青色光照射によって蛍光強度が低下し、照射オフ後20秒以内に暗所時の蛍光強度に戻る様子が確認された。これは以前ACドメインのATP結合領域への

TMR標識で観察された結果と同様の結果であり、光に順応した活性化状態から暗所に順応した不活性化状態に変化する際に、ACドメインの標識部位の周辺環境が親水性環境下から疎水性環境下へ変化したことを示している。これらのことから、ACドメインは活性化状態から不活性化状態へ約20秒かけて構造変化すると考えられ、この結果をもとにOaPACのコンフォメーション変化に関するモデルを提案した。

また、この蛍光強度変化を1分子のOaPACで検出することを目指して、OaPACの6×Hisタグ経由でのまばらなガラス基板への固定と、蛍光1分子顕微鏡への青色光刺激系の導入、青色光刺激前・中・後のTMR-OaPACの1分子蛍光強度のシームレスなイメージングを行った。

OaPACの6×Hisタグ経由でのまばらなガラス基板への固定に対しては、HisタグのNi-NTAへのアフィニティがそれほど高くないため (> μM)、Ni-ニトリロ三酢酸 (NTA) を修飾したガラス基板には効率よくOaPACを固定できないことがわかった。そこで、従来のNi-NTAに比べ6×Hisタグに対して10,000倍高い親和性 (1 nM) をもつ3つのNTA基の複合体であるTris-NTA-ビオチンを、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用でガラス基板に固定した系を用いたところ、効率よくまばらにOaPACを固定できた。また、ストレプトアビジンコートしたガラス基板へOaPACを特異的に結合させるため、Avi-tagを導入して大腸菌内でビオチン化リガーゼと共発現させることによってビオチン化したOaPAC変異体も作製した。

蛍光1分子顕微鏡への青色光刺激系の導入は、青色LEDを蛍光1分子倒立顕微鏡の直上に設定し、スイッチのオン・オフによって多分子系で行ったのと同じ青色光刺激が可能な系を構築した。

そして、この系を用いて、青色光刺激前・中・後のTMR-OaPACの1分子蛍光強度のシームレスなイメージングを行い、多分子系で検出した青色光照射による蛍光強度の低下や照射オフ後の蛍光強度回復の検出を試みた。

②青色光依存的なOaPACの活性変化 (cAMP産生活性) の可視化

無標識のOaPACあるいはTMR-OaPACを6×Hisタグ経由のガラス基板に固定し、そこに蛍光性のATPを加えて全反射顕微鏡で蛍光1分子イメージングして蛍光性ATPのOaPACへの結合・解離の1分子イメージングを試みたほか、ナノ開口基板についてもOaPACの固定を目指した表面修飾と蛍光性ATPのOaPACへの結合・解離の1分子イメージングを試みた。

(2) 特性 (cAMP 産生量・光応答性) が異なる OaPAC 改変体群の作製

昨年度明らかにした OaPAC の C 末端領域と活性の関係をさらに詳細に調べ、C 末端領域の特定のアミノ酸残基の疎水度と電荷が活性に影響を与えていることを明らかにした。具体的には、356 と 356 番目の 2 つの親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸へ、もしくは 358～361 番目の 4 つの疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸へ置換した変異体は、野生型と比べて cAMP 産生能が約 100 倍高くなった。また、362 番目の正電荷を持ったリジン残基を中性化すると、野生型と比べて数 10 倍 cAMP 産生能が高くなった。これらのことにより、C 末端領域の 356 番目～362 番目のアミノ酸が大きく活性に影響を与える部位であることがわかった。このことにより、上記のアミノ酸残基に数個の変異を導入することで、cAMP 産生量が大きく異なる変異体を創製することができた。

4. 研究の反省・考察

(1) OaPAC の青色光依存的な構造変化と活性変化の可視化による活性化機構の解明

①青色光依存的なOaPACの構造変化の解明

ACドメインをTMRで標識した変異体の青色光照射オン・オフによる蛍光強度の変化を調べることで、ACドメインの活性化状態から不活性化状態への構造変化をとらえることができた。これまで、光を感受するBLUFドメインの二量体間の構造変化をCy3とCy5のFRETで捉え、活性化状態から不活性化状態へのBLUFドメインの構造変化は約5秒以内に行われることがわかってきた。一方、今回捉えた活性化状態から不活性化状態へのACドメインの構造変化は約20秒要していた。このことから、光を受けるBLUFドメインの構造変化とACドメインの構造変化は一体ではないことが示唆された。BLUFドメインの動きがACドメインの変化を引き起こすきっかけになっているが、その後のACドメインの動きはBLUFドメインとは独立して起こっているのであろう。今後、1分子レベルでそれぞれの動きを同時に捉えることができれば、さらに詳細な情報が得られると考えられる。

これらのOaPACの構造変化をTMR-OaPACの1分子の蛍光強度変化として検出することを目

指して、青色光刺激前・中・後のシームレスな蛍光1分子イメージングを行ったが、取得した蛍光強度の変化には、高強度のレーザー光による蛍光色素励起に起因する蛍光褪色の影響が含まれていた。今後はこの影響を最小化するような条件を見だし、多分子系で検出した蛍光強度の変化を検出することに引き続き取り組む。また、新たに作製したビオチン化OaPAC変異体もこの系に導入する。

②青色光依存的なOaPACの活性変化（cAMP産生活性）の可視化

これまで、ナノ開口の溶液交換はナノ開口基板上でピペットチップを用いて直接行ってきたため、溶液交換直後の観察が困難であった。今後は溶液交換直後の結合解離イベントの観察を可能にするため、溶液貫流が可能な試料セルを開発して、研究の効率化をはかる予定である。また、溶液中の蛍光性ATPの濃度を高くする代わりに、基板に固定するOaPACの表面密度を高くして結合の頻度を上げ、基板に固定したOaPACに結合解離する蛍光性ATPの輝点のみを観察する戦略によって、全反射顕微鏡での観察を可能にする系の構築に取り組んでいる。ナノ開口の相補的な系としてこの系も活用し、青色光依存的なOaPACの活性変化の1分子可視化にアプローチしていく。

(2)特性（cAMP 産生量・光応答性）が異なる OaPAC 改変体群の作製

本年度絞り込んだ活性に影響を与えるアミノ酸残基について、疎水度と電荷の影響をさらに調べ、今までとは特性が異なる新規 OaPAC 変異体を作製するとともに、それらの変異体を培養細胞に導入し、オプトジェネティクスツールとしての有用性を示す予定である。

また、今年度他機関より譲り受けて設置したストップフロー装置（複数種類の溶液を混合チャンバー内へ押し出すことで高速に混合させ、その混合直後の溶液の蛍光強度や蛍光偏光などの光学パラメーターの時間変化を高時間分解能で計測できる装置）を用いて、これまでcAMP産生活性・光応答性の時定数パラメーターを効率よく取得し、有用な特性をもつOaPAC改変体群の作製につなげる。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

①平野美奈子、建部益美、北村有希、三好佑奈、井出徹 “光活性化アデニル酸シクラーゼの活性制御機構の理解に向けた研究・開発” 第45回日本分子生物学会（2022/12/2）

(3)出版物

なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	愛 知 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	公共心を通じたソーシャル・キャピタルの誘発効果 －『沖縄県民意識調査』の個票データに基づく公共政策の仮想評価－	研究分野	経 済 学
キ ー ワ ー ド	① ソーシャルキャピタル ② 公共心 ③ 個票データ ④ 仮想評価法		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
打 田 委 千 弘	愛 知 大 学 経 済 学 部	教 授	研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
竹 田 陽 介	上 智 大 学 経 済 学 部	教 授	公共政策理論班
小 卷 泰 之	大 阪 経 済 大 学 経 済 学 部	教 授	公共政策理論班
洪 澤 博 幸	豊橋技術科学大学工学研 究 科	教 授	仮想評価法班
上 山 仁 恵	名 古 屋 学 院 大 学 経 済 学 部	教 授	個票データ班
島 袋 伊 津 子	沖 縄 国 際 大 学 経 済 学 部	教 授	個票データ班

公共心を通じたソーシャル・キャピタルの誘発効果

ー 『沖縄県民意識調査』の個票データに基づく公共政策の 仮想評価ー

1. 研究の目的

(1) 学校・病院・教会・慈善団体など巨大なネットワークをもつ社会関係資本に対する信頼（以下、ソーシャル・キャピタル）に基づく社会では、ネットワークに蓄積された知識・ノウハウを活かし、プロフェッショナルに運営される企業が経済発展を担う。一方、自分の家族を深く信頼する家族主義的社会では、親族間のベンチャー企業・零細企業が主たる経済活動を行う（Fukuyama, 1995）。本研究では、ソーシャル・キャピタルを醸成する理論的なメカニズムとして、公共心（Mansbridge, 1994 他）を通じた誘発効果（Hirschman, 1958）に着目する。本研究の目的は、上記の経済理論に基づきながら、ソーシャル・キャピタルの醸成を目指す公共政策について仮想評価（Diamond and Hausman, 1994 他）を行うことにある。アンケート調査を用いた実証分析の対象は、NIMBY（Not-in-My-Backyard）である米軍基地の集中、子どもの相対的貧困、低い大学進学率、コロナ禍の逼迫した医療キャパシティなど、ソーシャル・キャピタルが欠乏し、家族主義的社会にある沖縄である。

本研究では、ソーシャル・キャピタルを醸成する理論的なメカニズムとして、公共心（Mansbridge, 1994; Banfield, 1967）を通じた誘発効果（Hirschman, 1958）に着目する。ある地域の学校・病院に対する投資は、不足する後発の地域からキャッチアップの誘因を引き起こし、経済全体の不均衡発展を誘発する。協調的な誘発効果の如何は、NIMBY（Not-in-My-Backyard）問題の解決における住民のイニシアティブ（Frey and Oberholzer-Gee, 1997）と同様、社会関係資本への投資から派生する私的な金銭的利便のみならず、社会関係資本の公共的利便への市民的協力義務を反映する住民の公共心に依存する。保育園へのお迎えの遅刻に対する罰金制度の事例（Gneezy and Rustichini, 2000）から示唆されるように、派生する私的利便の高まりが住民の公共心を毀損する場合には、社会資本投資への住民の協調的な働きかけが生じ難くなる可能性がある。

本研究の目的は、上記の経済理論に基づきながら、ソーシャル・キャピタルの醸成を目指す公共政策について仮想評価（Diamond and Hausman, 1994）を行うことにある。アンケート調査を用いた実証分析の対象は、NIMBY である米軍基地の集中・子どもの相対的貧困・低い大学進学率・コロナ禍の逼迫した医療キャパシティなどに見られるように、ソーシャル・キャピタルが欠乏し、家族主義的社会にある沖縄である。平成 16 年（第 6 回）から平成 30 年（第 10 回）までの『沖縄県民意識調査（旧県民選好度調査）』『くらしについてのアンケート』の個票データ（標本数 2000）を用い、毎回無作為抽出される 200 の調査地点をいくつかの地域コミュニティに分類する。各コミュニティにおいて、「住民の地域活動への参加態度」を代理指標とするソーシャル・キャピタルへの働きかけによって、「地域交流に対する考え」を代理指標とする公共心、および育児・教育や医療・介護に関する公共政策の「重要度・充足度」から計測される「達成度・改善度」が、どのように変化したかについて、離散選択データを用いる構造推定を行う。その際、住民の居住地域に関する『国勢調査』等の町丁目毎のデータ（家族構成・同居世代・定住期間など拡大家族の繋がりを表わす代理属性、収入・貯蓄高・消費支出・持ち家の有無など私的な金銭的便益の代理指標）をコントロールする。推定の結果、ソーシャル・キャピタルが住民の公共心を通じてどのように誘発、醸成されるかについて定量的に明らかになり、本研究は、経済発展に資する教育や医療に関する公共政策の立案のためのエビデンスを供することができる。

本研究プロジェクトは、地域経済の発展に資するソーシャル・キャピタルの規定要因である公共心という概念に関連する理論について分析する「公共政策理論班」、ソーシャル・キャピタルに関して仮想評価法を適用する「仮想評価法班」、『沖縄県民意識調査』の個票データの整理、住民の居住地域に関する『国勢調査』等の町丁目毎のデータとの統合を行う「個票データ班」に分かれて研究を行う。以上の協力の下で、沖縄におけるソーシャル・キャピタルの醸成メカニズムの理論モデルの提示、『沖縄県民意識調査』を用いた仮想評価による定量化が可能となり、教育・医療の公共投資に科学的根拠を与えることが可能となる。

2. 研究の計画

(1)2022年度は、沖縄のソーシャル・キャピタルを規定する公共心の醸成・地域経済の発展に関する基礎調査として、以下のような研究計画としている。

- ①公共政策理論班：地域経済の発展に資するソーシャル・キャピタルの規定要因である公共心という概念に関連する理論について分析する。担当は、竹田陽介氏、小巻泰之氏を中心に議論を進める。
- ②仮想評価法班：ソーシャル・キャピタルに関して仮想評価法を適用した先行研究を調査する。担当は、洪澤博幸氏が中心になり議論の整理を行う。
- ③個票データ班：『沖縄県民意識調査』の個票データの整理、住民の居住地に関する『国勢調査』等の町丁目毎のデータとの統合を行う。

3. 研究の成果

(1)各研究グループに関して、以下のような進捗状況となっている。

- ①公共政策理論班：地域経済の発展に資するソーシャル・キャピタルの規定要因である公共心という概念に関連する理論の整理について、竹田陽介氏、小巻泰之氏を中心にオンライン等で議論を進めており、2022年9月に沖縄県と琉球文化の側面では近似性がある一方で、行政区域が異なる鹿児島県奄美大島で実地調査（ヒアリング調査）、第25回WUB沖縄世界大会参加を通じて情報共有を行った。
- ②仮想評価法班：ソーシャル・キャピタルに関する仮想評価法を適用した先行研究の整理について、洪澤博幸氏が中心になり議論の整理を行った。研究成果の一部は、2022年9月の奄美大島での実施調査、第25回WUB沖縄世界大会参加を通じて情報共有した。
- ③個票データ班：『沖縄県民意識調査』の個票データの整理、住民の居住地に関する『国勢調査』等の町丁目毎のデータ整理を行った。島袋伊津子氏は、沖縄県事業承継啓発月間の一環で公共心の一部と考えられる「地域のつながり」について、県民意識調査の個票データを用いた分析結果の報告を行っており、第25回WUB沖縄世界大会参加を通じて研究メンバー相互で情報共有を行った。
- ④その他：沖縄のソーシャル・キャピタルの規定要因である公共心の醸成に関して、沖縄県系移民に関するヒアリング調査を実施した。具体的には、2022年10月30日～11月1日に実施された世界各国から沖縄県系移民が集う第7回世界ウチナンチュ大会（沖縄県主催）・WUB沖縄（Worldwide Uchinanchu Business Association OKINAWA）第25回世界大会でシンポジウムに関連する主要なイベントを共同で実施した（研究分担者である竹田陽介氏が基調講演、研究代表者である打田委千弘氏がパネルディスカッションのファシリテーターを務めた）。また、沖縄における事業承継支援におけるソーシャル・キャピタル及び公共心のあり方について、女性経営者へのヒアリングを行い沖縄県事業承継啓発月間（2022年8月開催）において、研究代表者である打田委千弘氏がコラムの執筆、女性経営者と事業承継におけるパネルディスカッションのファシリテーターを務めた（2022年8月24日開催）。

4. 研究の反省・考察

(1)各研究成果に関する反省・考察は、以下の通りである。

- ①沖縄におけるソーシャル・キャピタルを規定する公共心に関するヒアリング調査は、沖縄県系移民のアイデンティティのあり方や中小企業の後継者問題をベースとした女性経営者の育成問題として捉えることが可能となった点、大きな成果と考えている。
- ②今後、『沖縄県民意識調査』個票データと沖縄県系移民に関する個票データ、中小企業の経済活動等に関連する町丁目・市町村データとのマッチングが重要になると考えている。
- ③ソーシャル・キャピタルの規定要因になっている公共心の理論モデルと実証モデルとの接合については、2023年から2024年にかけての課題になると考えている。
- ④仮想評価法を用いたアンケート調査については、現在、沖縄県下の離島（現在、伊平屋村）で実施可能かの調査を進めている。アンケート調査が実施可能となった場合、大変興味深い結果となることが期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①打田委千弘、「事業承継と支援機関のサポート活動について—沖縄県の経営指導員意識調査アンケート結果から—」、『年報・中部の経済と社会 2022』（愛知大学中部地方産業研究所）、2023年3月、pp 49-63

②Yosuke Takeda, “Nurturing Strength of Extended Family: Toward longtermism as good ancestors.”、『経営総合科学』（愛知大学経営総合科学研究所）、118号、2023年3月、pp147-153

(2) 口頭発表

①竹田陽介、「拡大家族のつむぐ力「よき祖先」の系譜」、第25回WUB (Wordwide Uchinanchu Business Association OKINAWA) 世界大会基調講演、2022年11月1日

②打田委千弘、「経営者事業承継フォーラム「M&Aはじめの一步」」、那覇商工会議所・愛知大学経営総合科学研究所、2023年2月24日

(3) 出版物

なし

2022年度（第47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 ⑤ 脂肪酸代謝		

○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 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
喜 島 祐 子	藤田医科大学 医学部	教 授	検体の収集および解析
河 田 健 司	藤田医科大学 医学部	教 授	検体の収集および解析
浅 井 直 也	藤田医科大学 医学部	教 授	検体の病理解析
林 孝 典	藤田医科大学 医学部	講 師	検体の分子生物学的解析・ 細胞生物学的解析
前 田 真 男	藤田医科大学 医学部	講 師	腫瘍移植実験 網羅的データ解析
平 田 宗 嗣	藤田医科大学 医学部	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。さらに、これまでの成果を踏まえ、GGCT バリエーション 2 (GGCTv2) によるがんの浸潤・転移機構の解明にも取り組む。

(1) GGCT バリエーション依存性がん細胞制御機構

① 乳がん組織の GGCT バリエーション発現量

収集した乳がん手術検体より RNA を抽出し、GGCT バリエーションの発現量を測定する。あわせてがん幹細胞性やがんの進展に関わる遺伝子の発現量を測定し、それらとの相関関係を解析する。

② GGCTv2 の細胞内局在の解析

GGCTv2 に対する特異抗体を作製し、その特異性をウエスタンブロットなどにて検証する。つぎに GGCT バリエーション 1 (GGCTv1) と GGCTv2 の細胞内局在を免疫細胞染色法および細胞分画法により解析する。

③ GGCT バリエーションによるがん細胞制御能

GGCTv2 強制発現乳がん細胞株を作製し、がん細胞の浸潤能を解析する。さらに GGCTv2 強制発現細胞を用いて次世代シーケンサー解析を行い、がんの浸潤・転移などの制御に関わるシグナルや標的分子を同定する。

(2) GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構

① GGCT による脂質代謝制御機構

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。GGCT 抑制により脂肪酸合成酵素 FASN の発現低下を認めたことを踏まえ、FASN 抑制や脂質代謝阻害剤を用いてがん細胞のオルガノイド形成能に及ぼす影響を解析する。

(3) GGCT による腫瘍転移促進機構

① GGCTv2 による腫瘍転移促進能

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、GGCTv1 および GGCTv2 を強制発現した乳がん細胞を用いて、腫瘍形成能および転移能を評価するとともに、マウスの脾臓に注入してがん転移能を評価する。

3. 研究の成果

(1) GGCT バリエーション依存性がん細胞制御機構

① 乳がん組織の GGCT バリエーション発現量

GGCT には複数のバリエーションがあり GGCTv1 のみが酵素活性を有する。乳がん手術検体を用いて GGCT の四つのバリエーションと遺伝子発現の関連を解析したところ、GGCTv1 と GGCTv2 の乳がん組織における発現レベルには相関がなく、GGCTv2 発現のみががんの浸潤・転移と関係する転写因子 Twist と Snail の発現レベルと強く相関した。一方、GGCTv1 の発現はがん幹細胞遺伝子 CD44 の発現と相関した。酵素活性をもたない GGCT バリエーションががんの促進に関わる可能性を示唆する本結果は、これまで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 GGCTv2 の細胞内局在の解析

GGCTv2 が GGCTv1 と異なる機能を持つ可能性が示されたことから、GGCTv2 に対する特異抗体を作製し解析した。免疫細胞染色にて、内因性および強制発現 GGCTv2 は共に核に局在を認めた。一方、GGCTv1 は細胞質に局在した。つぎに、細胞を分画して細胞内局在を解析した。GGCTv1 タンパク質は細胞質分画に検出されたが、GGCTv2 タンパク質は核分画に強く検出された。GGCTv1 と GGCTv2 の局在の違いからも両者は機能が異なる可能性が示唆された。

③ GGCT バリエントによるがん細胞制御能

GGCTv2 によりがん細胞の浸潤能は有意に亢進し、その抑制はがんの浸潤能を有意に低下させた。一方、GGCTv1 によりがん幹細胞性を反映するスフェア形成能は亢進したが、がん細胞の浸潤能は低下した。また、GGCTv2 強制発現細胞を用いて次世代シーケンサー解析を行ったが、がんの浸潤・転移と関わるパスウェイや遺伝子発現の変化は検出できなかった。

(2) GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構

① GGCT による脂質代謝制御機構

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 FASN の転写およびタンパク質発現が抑制された。また、FASN ノックダウンあるいはその阻害剤は乳がん PDX 細胞のオルガノイド形成能を有意に抑制した。しかし、脂肪酸の添加によりこれらの抑制を回復させることは出来なかった。

(3) GGCT による腫瘍転移促進機構

① GGCTv2 による腫瘍転移促進能

GGCTv1 発現細胞は GGCTv2 発現細胞より腫瘍形成能が有意に高かった。つぎに、乳がん検体において GGCTv2 の発現ががんの浸潤・転移を促進する Twist 遺伝子などの発現と相関したことを踏まえ、GGCTv2 発現がん細胞の転移能を解析した。マウスの脾臓に注入したがん細胞の肝臓転移能は、GGCTv2 細胞が GGCTv1 細胞よりも有意に高かった。

4. 研究の反省・考察

(1) GGCT バリエント依存性がん細胞制御機構

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。私たちの検討でも、酵素活性をもつ GGCTv1 の発現により活性酸素種の除去能は亢進し、GGCT の酵素活性抑制剤 Pro-GA により活性酸素種が蓄積した。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。本研究を通じて酵素活性をもたない GGCTv2 にも当初想定しなかったがん浸潤・転移促進機能があることが明らかになった。主としてがん幹細胞性を亢進させる GGCTv1 と、がんの浸潤・転移を促進する GGCTv2 それぞれの機能および発現制御機構の解析を通じて活性酸素種除去能以外の GGCT の未知の機能を明らかにすることが、乳がんに対する有効な GGCT 阻害治療法確立のために求められる。

(2) GGCT による脂質代謝制御機構

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)。本研究では、乳がん幹細胞の制御因子 GGCT が脂肪酸合成酵素 FASN の発現制御を介して脂質代謝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検討をすすめた。GGCT ノックダウンおよび GGCT 阻害剤 Pro-GA により乳がん細胞における脂質代謝酵素 FAS の転写およびタンパク質発現の抑制、および乳がん PDX 細胞のオルガノイド形成能の抑制を認めたが、予想に反して脂肪酸の添加によりこれらの抑制を回復させることは出来なかった。これらの問題点を克服するために、脂肪酸の添加方法、解析に使用するモデルの検討などをさらに進める必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Toriuchi K, Kihara T, Aoki H, Kakita H, Takeshita S, Ueda H, Inoue Y, Hayashi H, Shimono Y, Yamada Y, Aoyama M. Monocyte-Derived miRNA-1914-5p Attenuates IL-1 β -Induced Monocyte Adhesion and Transmigration. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2829. doi:10.3390/ijms24032829. PMID: 36769149; PMCID: PMC9917334.

(2) 口頭発表

- ① Shimono Y, Hayashi T, Kono S, Shibuya N, Hisamori S, Mukohyama J, Yanagi H, Watanabe T, Maeda M, Hirata M, Kakeji Y, Kawada K, Asai N, Okada S, Suzuki M, Takao S, Minami H, Kijima Y, Gotoh N, Dalerba P. Distantly metastasized cancer stem cells in human breast cancer xenograft mouse. The 6th International Workshop on Humanized Mice、2022年。招待講演
- ② Shimono Y, Hisamori S, Mukohyama J, Isobe T, Kakeji Y, Dalerba P. Analyses of terminally differentiated normal cells guide the identification of cancer stem cell-suppressor microRNAs. 第81回日本癌学会学術総会（ミニシンポジウム）、2022年。
- ③ Shimono Y, Hisamori S, Mukohyama J, Isobe T, Kakeji Y, Dalerba P. MicroRNA-mediated suppression of colon cancer stemness by the induction of terminal differentiation. 第33回日本消化器癌発生学会（シンポジウム）、2022年。優秀演題賞

染色体異常の高精度な修復を目指した新規ゲノム編集法の開発

1. 研究の目的

がんや先天性疾患の原因となる染色体再編成を正確に誘導する技術開発は、疾患モデル動物の作製だけでなく、染色体異常の治療に展開するうえでも社会的ニーズが見こまれる。しかしながら、従来のゲノム編集技術による染色体再編成マウスの誘導法では、予期せぬ構造をとるケースがあり、多くは胎生致死となることが課題であった。

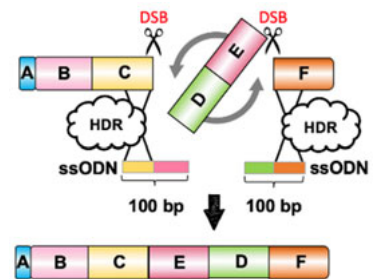
本研究では、これまでの成果 (*Cell Rep* 2018, *Sci Rep* 2019) をもとに、相同組換え効率が向上するようゲノム安定性制御分子を遺伝的に改変したマウス系統を用いることで、正確に染色体再編成を誘導する新規ゲノム編集法の確立と応用に挑戦する。さらに、将来的には本手法をベースとした染色体異常の正確な修復に取り組み、臨床応用への展開も見据えた汎用型プロトコルを開発する。

2. 研究の計画

(1) *Recq15^{em1Cu}*を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

①染色体逆位*HMG2:NR2C1*を誘導するCRISPR/Cas系の設計

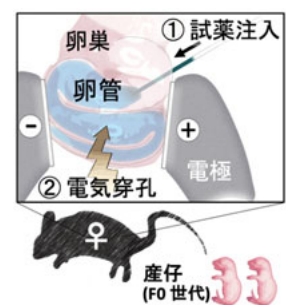
正確かつ高効率に染色体再編成を誘導する新手法を確立するために、本計画では従来報告の5倍以上の長さとなる30Mbの巨大な逆位*HMG2:NR2C1*を標的とする。この逆位遺伝子はヒトの唾液腺腫瘍や乳腺筋上皮腫のドライバー遺伝子として知られているが (Unachukwu et al. *Int J Mol Sci.* 2020 ;21(9):3151.)、それを再現したモデル動物は確立されておらず、このような広範囲な人工逆位誘導が可能になれば、有意義な癌疾患モデルマウスとなると考える。標的guide RNA (gRNA) 設計のために、融合遺伝子データベース



FusionGDB(ccsm.uth.edu/FusionGDB/)より*HMG2:NR2C1*の配列情報を入手し、Double-strand break (DSB)により生じた2箇所のゲノム断端がHDRを介して互いに反対方向に連結するように、必要なり付け配列であるssODN (一本鎖オリゴ) をDNA配列編集ソフト (ApE) で設計する (右図)。更に、ssODNの各末端をS化 (硫黄化) することで細胞内に存在する核酸分解酵素への耐性を付与する実験条件も加え、染色体再編効率への影響を調べる。

②*in vivo*電気穿孔法によるゲノム編集

右図のように妊娠雌マウスの卵管にガラスピペットを用いてゲノム編集試薬を注入し、ピンセット型電極により電気穿孔することで卵管内に存在する受精卵にゲノム編集を行う。本研究ではDNA修復の過程でRad51 (HDR因子) を分解する*Recq15*に変異を導入した*Recq15^{em1Cu}*マウスおよびコントロールの野生型マウスに施術し、*Recq15*の抑制による長い染色体領域の正確なHDRへの寄与を比較検討する。



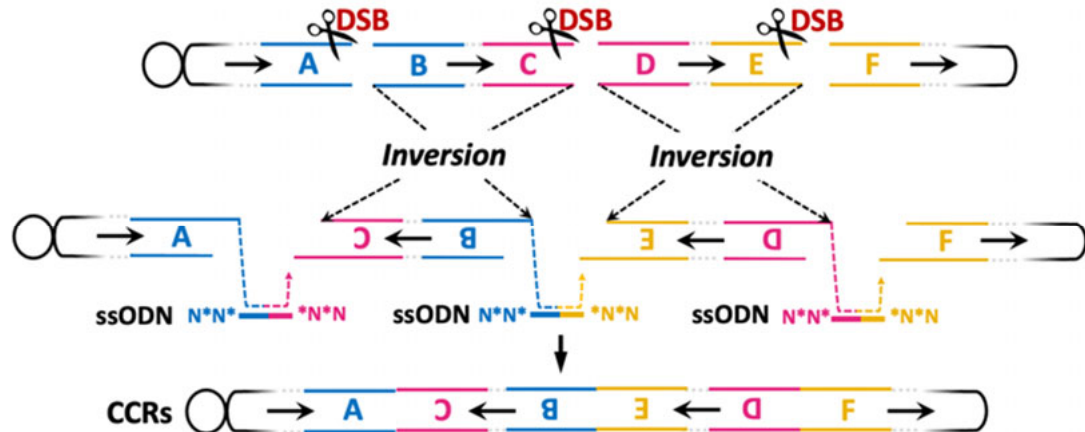
産仔 (F0世代) の遺伝子型検査は、①PCR法、②サンガーシーケンスにより検証する。また、F1世代への染色体再編成の伝達を確認し、予期せぬ構造がないか次世代シーケンサーによる解析も行う。以上の解析から正確かつ高効率に染色体再編成を誘導する最適条件を見出す。

(2) *Recq15^{em1Cu}*を用いたクロモスリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

近年の次世代シーケンス技術の進歩により、2つ以上の染色体、または3つ以上の染色体断端からなる複雑な染色体再編成 (CCRs) が、がんや先天性疾患の患者のゲノムで相次いで検出されている。しかしながら、現時点では臨床検体においてCCRsが生じているというゲノム解析の結果論にとどまっており、疾患発症メカニズムは殆ど不明である。それ故、CCRsを高効率かつ効率的に誘導する事を可能にする実験系を構築することが急務である。

①CCRsを誘導するCRISPR/Cas9系の設計

上記(1)で樹立した手法を応用し高精度に意図したCCRsが誘導できるか試みる。それぞれgRNA及び染色体断端が再度連結するために必要なssODNを3つ設計、(1)-②の*in vivo*電気穿孔法を用いて狙った位置にCCRsを誘導する。



②CCRsの遺伝子型検査と解析

得られた産仔 (F0世代) の遺伝子型検査は、①PCR法、②サンガーシーケンスにより検証する。また、CCRsは染色体断端の位置によらず不妊を呈する事実が示唆されているため (Kim et al. *Fertil Steril.* 2011;95(1):349-52, 352.), CCRsによる癌や妊孕(よう)性への影響を解析 (交配試験、精巣・卵巣の病理形態解析) する。

3. 研究の成果

(1) *Recq15^{em1Cu}*を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

これまでに、我々が以前報告した約 7.67 Mb に及ぶ染色体逆位 (Iwata et al. *Sci Rep* 2019) を、DNA 修復の過程で Rad51 (HDR 因子) を分解する *Recq15* に変異を導入した *Recq15^{em1Cu}* マウスを用いる事により、indel を含まない正確な結合部位で再現する事に成功し、更に *Recq15^{em1Cu}* マウスを用いて indel を含まない結合部位を持つ 0.9 Mb の逆位からなるがん融合遺伝子 *HMG2:WIF1* (Persson et al. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009; 48, 69-82) マウスの樹立にも成功している。しかしながら、本報告書作成時点で、30 Mb の巨大な逆位 *HMG2:NR2C1* は得られていない。gRNA/ssODN の再設計や電気穿孔の条件、試薬濃度等を再検討しており、CRISPR/Cpf1 によるマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) も 2023 年度に検討する予定である。また、効率を上げるために、ストレプトアビジン Cas9 とビオチン DNA を用いる計画をしており、2023 年度内に作製を目指す。

(2) *Recq15^{em1Cu}*を用いたクロモスリプシス様の染色体再編成の誘導と解析

採卵・移植が不要なゲノム編集技術 *i-GONAD* 法を用いた染色体逆位マウスの作製法 (Iwata et al., *Sci Rep* 2019) を基盤とし、*Recq15^{em1Cu}* マウスに対してクロモスリプシス様の染色体再編成を誘導した。標的は、がんや発生異常を起こす変異が集中する領域に焦点を絞り、3ヶ所のゲノム領域が同時に二本鎖切断 (DSB) するように guide RNA を設計した。さらに、3ヶ所の DSB により生じた2つの染色体断片が HDR を介して互いに反対方向に連結するように、必要のり付け配列である一本鎖オリゴ (ssODN) を DNA 配列編集ソフト ApE で設計した。ssODN は HDR 効率を向上させるため、両末端に2つのホスホロチオエート (PS) 結合を施した。

野生型マウスを用いた実験では CCRs の誘導が困難な一方、*Recq15^{em1Cu}* マウスではメガベース (100 万塩基対) 単位の染色体逆位や、*Hmga2-Wif1*, *Hmga2-Rassf3*, *Wif1-Rassf3* という3つの融合遺伝子を発現する CCRs モデルマウスが高効率に作製できた。ホモ接合型 CCRs は *Hmga2* 遺伝子の変異により重度の成長遅延と不妊症を呈したが、解析期間内に腫瘍の発生は観察されなかった。これらの所見は、*Hmga2-Wif1* 融合タンパク質の発現がマウスにおいて必ずしも腫瘍促進の役割を果たしていないことを示唆しているが、この可能性を評価するには長期間にわたる観察が必要である。また、次世代シーケンス解析により、いくつかの CCRs 系統ではマイクロホモロジーを介した鋳型交換機構 (fork stalling and template switching: FoSTeS/microhomology-mediated break-induced replication: MMBIR) という特殊な DNA 修復メカニズムの関与が確認された。この染色体構造異常は、新たに提唱された

ゲノム現象 “染色体再構成 (chromoanasythesis)” を彷彿とさせる。このように *Recq15^{em1Cu}* は CCRs モデルマウスを効率的に作製できる可能性を示しただけでなく、chromoanasythesis というメカニズムがよく分かっていない現象を解析するための新しい強力なツールとなることが示された。本研究成果はプレプリント論文として *bioRxiv* で公開した (<https://doi.org/10.1101/2023.04.06.535871>)。

4. 研究の反省・考察

(1) *Recq15^{em1Cu}* を用いた高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立

巨大な染色体逆位の誘導を試みると逆位領域に含まれる essential 遺伝子が欠失するリスクが増し、生存や発生に深刻な影響を及ぼすことが予想される。したがって、ゲノム編集技術で巨大な染色体逆位を誘導する際、逆位が essential 遺伝子に影響を与えないよう遺伝子の配置や機能、調節領域などに考慮した gRNA の設計が必要である。

(2) *Recq15^{em1Cu}* を用いたクロモスリプシ様の染色体再編成の誘導と解析

本研究では *Recq15^{em1Cu}* マウスを用いた新たなゲノム編集法を開発し、マウス接合体において CCRs を効率的に誘導できることを示した。この手法には大きな可能性があるが、FoSTeS/MMBIR のような予期せぬ DSB 修復機構も伴った。FoSTeS や MMBIR モデルでは、HDR の際に相同テンプレートが存在しないため、よりエラーを起こしやすい DNA 修復が行われる可能性がある。したがって、このような技術をゲノム治療に応用する際には、これらの要因を注意深く考慮する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、マウス胚における chromoanasythesis 様(よう)の複雑な染色体再編成の効率的誘導、日本遺伝学会 第94回大会、2022年9月14日

② **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、ゲノム安定性制御による染色体再構成 (chromoanasythesis) の効果的誘導、日本宇宙生物科学会 第36回大会、2022年9月17日、
★優秀発表賞

ポスター発表

① **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、ゲノム安定性制御によるマウス胚の多重染色体編集法の開発、第69回 日本実験動物学会総会、2022年5月18日

② **岩田悟**、長原美樹、岩本隆司、マウス受精卵における複雑な染色体再編成 (Complex Chromosome Rearrangements: CCRs) 誘導法の開発、日本ゲノム編集学会 第7回大会、2022年6月7日

(3) 出版物

なし

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多岐にわたる特徴を示す。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。しかしながら、知的障害をはじめ多くの DS 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、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* 遺伝子をトリソミー領域に含まないにもかかわらず、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 治療標的の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 DSマウス由来ES細胞のミクログリア前駆細胞への分化についての研究:

昨年度の研究結果から Ts1Cje マウスの胎生期での脳でのミクログリア数の減少が明らかとなった。そこで、なぜミクログリア数が減少するのかについて明らかにすることを目的として、Ts1Cje マウスから樹立した ES 細胞を *in vitro* でミクログリア前駆細胞に分化誘導し解析することを試みた。

② 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、昨年の研究からミクログリアの数的減少が明らかとなったことから、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 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(昨年から継続):

一部のトリソミー領域をヘテロで欠失したマウスを作製し、Ts1Rhr マウスとの結果を合わせることで、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。

② Dp(16)1YeyマウスおよびTs1Rhr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:

最も長いトリソミー領域が3コピーとなったDp(16)1Yeyマウスと最も短いトリソミー領域を3コピーもつTs1Rhrマウスは銅蓄積が認められることから、これらの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。

③ ヒトDS患者での銅代謝異常に関する検討:

DS患者の血清における銅濃度を検証することでヒトDS患者での銅代謝異常について明らかにするための研究を開始する。

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 DSマウス由来ES細胞のミクログリア前駆細胞への分化についての研究:

雄性Ts1Cjeマウスと雌性C57BL/6Jマウスを交配しプラグ確認後、着床前の受精卵を採取し、ES細胞の樹立を常法に従って行なった(山形大学 若山教授らとの共同研究)。遺伝型を調べ、WT型とTs1Cje型ES細胞を各々1ラインずつ使用して、研究分担者である高田教授が開発した方法に従ってミクログリア前駆細胞への分化誘導を行なった(Takata et al., 2017 *Immunity*)。その結果、Ts1Cjeマウス由来ES細胞では、ミクログリア前駆細胞への分化率が非常に低いことが明らかとなった(図1A)。少ないながらもTs1Cje由来ミクログリア前駆細胞から全RNAを抽出し、RNA-seq解析により網羅的な発現遺伝子を解析したところ、野生型マウスに比べて発現変動している遺伝子を同定した(図1B)。

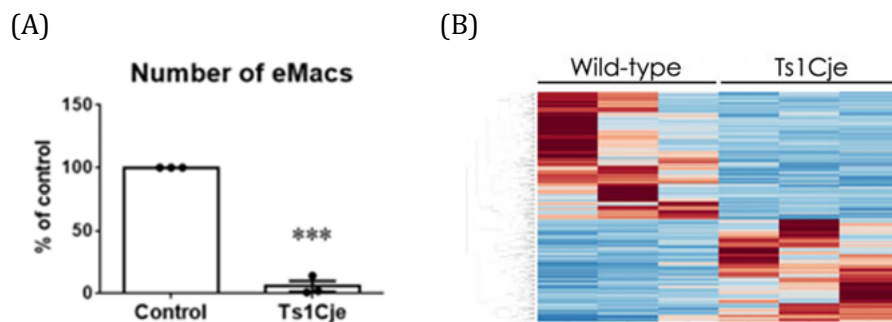


図1. Ts1Cjeマウス由来ES細胞のミクログリア前駆細胞 (eMacs) への低分化能 (A) とRNA-seq解析

② 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ミクログリア数の減少を見出していることから、本マウスの胎仔脳へのミクログリア前駆細胞移植実験を行うことを計画しているが、現在のところ移植細胞の生着が認められていない。脳室への移植を行なっているが、この手技の改善が必要であり、現在、*in Utero*での移植経験を有する研究者から技術を教授してもらっている。

(2) 生後の治療を目指した研究

① 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:

昨年度までにDSモデルマウス脳での銅蓄積に対する責任遺伝子座を17遺伝子がコードされる領域にまで絞り込んだ(図2)。本年度は、12遺伝子がコードされる#3-#4の領域がヘテロ欠失したマウスを作製し、Ts1Rhrマウスとの交配により得られる#3#4-Rhrマウスの脳での銅蓄積を検討した。結果、Rhrで見られた高い銅濃度は、#3-#4の領域を2コピーとしても依然高いままであったことから、本領域にコードされる12遺伝子以外のトリソミー遺伝子による銅蓄積が示唆された。現在、#1-#2および#2-#3の作製を行なっており、両マウスとも樹立できた。これらのマウスを解析することで銅蓄積遺伝子の同定を行っていく。

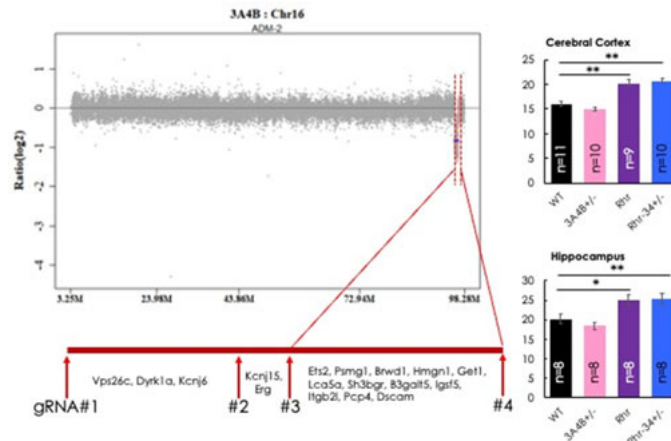


図2. 銅責任遺伝子の絞り込み。新たに#3#4ヘテロ欠損マウスを作製し、銅蓄積を検討した。

② **Dp(16)1YeyマウスおよびTs1Rhr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:**

最も長トリソミー領域をもつDp(16)1Yeyマウスと最も短いトリソミー領域をもつTs1Rhrマウスの情動記憶障害の検証と、その障害に及ぼす低銅含有食の影響について検証した (SPF飼育エリア内での解析にMacbook proを使用)。その結果、両マウスともに記憶学習障害が認められるが、Dp(16)1Yeyマウスの方が重度の記憶学習障害が検出されること、またDp(16)1Yeyマウスの記憶学習障害は低銅含有食投与によって一部ではあるが改善されることを見出した。一方、Ts1Rhrマウスの記憶学習障害は軽度ではあったが、低銅含有食投与でほぼ完全に改善できることを明らかとした。このように、Ts1Rhrマウスのトリソミー領域の3コピー化は、銅蓄積が起因する記憶学習障害を呈することが明らかとなった。

③ **ヒトDS患者での銅代謝異常に関する検討:**

本助成金の申請書に対して審査員より頂いたコメントにおいて、ヒト患者での銅蓄積の検証が重要であるご指摘を頂いた。ヒト患者脳の入手は困難を極めることから、我々は、血清中の銅濃度を測定することでDS患者の銅代謝異常に迫ることを計画した。3つの医療機関と共同しDSおよび健常人対照者の血清採取を行う計画に対する倫理承認を受けた。現在、血清採取を行なっている。

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。我々は、ミクログリアの減少こそがDSの発達遅滞の原因である仮説をたて、この仮説の証明をミクログリアの補充による脳発達遅滞の改善について検証することを行なっている。昨年に引き続き、胎生期脳へのミクログリア前駆細胞の移植作業を行なっているが、思い通りの移植が行えていないのが現状である。In Uteroでの移植経験をもつ研究者からの技術教示を行うことで解決を図りたいと考えている。一方、DSモデルマウスからES細胞を樹立し、ミクログリア前駆細胞への分化について検証した。Ts1Cjeマウス由来ES細胞の表現型は、in vivoでの表現型よりも明瞭なミクログリア前駆細胞への分化障害が認められた。これは、非常に興味深い現象であり、網羅的な遺伝子発現解析によって幾つかの有望な異常シグナル経路を想定するに至った。今後は、これらの異常を明らかとし、in vivoでの異常の証明、さらにはヒトiPS細胞を用いた検討を通じて、DSの病態におけるミクログリア異常の重要性を提示したいと考えている。

(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5遺伝子にまで絞り込むことができた。当初は、今年度に同定し終える予定であったが、幾つかの欠損マウスの作製が予定通りに進まず、遅れが生じた点が反省点である。また、昨年度、銅動態に影響を及ぼす可能性のある候補トリソミー遺伝子としてDscr3に注目し、Dscr3欠損マウスの作製を試みたが、作製したヘテロ欠損マウスでのDscr3 mRNA発現量の減少が認められなかったことから、再度作製し直している。この遺伝子の3コピー化による銅蓄積に関しては今後の検討により明らかにしたいと考えている。

また、我々は、銅蓄積に必要なトリソミー領域としてTs1Rhrマウスのトリソミー領域を同定した。さらに、本年度の検討によって、このTs1Rhrマウスで見られる記憶学習障害は低銅含有食投与によってほぼ完全に改善されたことから、DSモデルマウスで認められる記憶学習障害の1つの基盤として銅蓄積があり、その原因遺伝子がTs1Rhrマウスのトリソミー領域にコードされることを明らかとした。かつて、Ts1Rhrマウスのトリソミー領域は、DS患者の部分トリソミー患者の遺伝子解析から同定されたDown syndrome critical region (DSCR) と認識されていたことから（現在はこの限りではないとされているが）、この結果がヒト患者でも共通していることが期待される。今後は、ヒトDS患者での銅代謝異常を明らかにすることを目的として、トランスレーショナルリサーチを行いたいと考えている。未だないDS治療薬を開発することを目標として引き続き研究を推進していく所存である。この度は助成金を頂きましたこと心より感謝申し上げます。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Ishihara K.***(Corresponding), Takata K., Mizutani KI., Involvement of an Aberrant Vascular System in Neurodevelopmental, Neuropsychiatric, and Neuro-Degenerative Diseases. *Life (Basel)* 13:1, 22 (2023).
- ② 石原慶一(Corresponding)、ダウン症候群の認知機能障害と生命金属恒常性破綻. *ファルマシア* 59:3, 206-211 (2023).
- ③ **Ishihara K.***(Corresponding), The accumulation of copper in the brain of Down syndrome promotes oxidative stress: possible mechanism underlying cognitive impairment. *J Clin Biochem Nutr.* 71:1, 16-21 (2022).
- ④ 石原慶一(Corresponding), 左合治彦、Erg遺伝子とDown症候群に対する胎児治療の可能性. *周産期医学* 52:7, 1001-1003 (2022).

(2) 口頭発表

- ① **Ishihara K.**, Brain copper accumulation-associated cognitive impairment in mouse models of Down syndrome. 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (シンポジウム 招待講演) 2022.11 [Kobe]
- ② **Ishihara K.**, Kawashita E., Katsuda M., Saito M., Sago H., Yamakawa K., Akiba S., Takata K., Suppressive effects of Down syndrome genes on amyloid- β aggregation and mortality in a mouse model of Alzheimer's disease. 人類遺伝学会第67回大会2022年12月[横浜]

(3) 出版物

なし

イネいもち病菌での Cas9 スクリーニング系の確立とその応用 ー農薬フェリムゾンの作用機作に関する機能・構造解析ー

1. 研究の目的

(1) 本研究の1つめの目的は、「イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにすること」である。フェリムゾンを含む農薬は以前から使われているが、圃場でフェリムゾン耐性糸状菌が発生したという報告は無い。非常に優れた農薬である一方、作用点が不明であることから、その解明が期待されている。我々の先行研究の結果から、培地上においてフェリムゾン耐性となるイネいもち病菌の変異体が単離された。原因遺伝子を決定したところ、銅の輸送に関与する MoICT1 と MoCcc2 という遺伝子がフェリムゾン感受性に重要であることが明らかとなった (iScience 2020, 23, 101660)。これらの結果から、フェリムゾンが MoICT1 と MoCcc2 を標的分子とする可能性が示唆されたが、直接的な証拠は得られていない。本研究では、生化学的な解析および構造解析を通して、フェリムゾンがイネいもち病菌内の銅イオンの受け渡しを直接阻害するかどうかを検証する。

(2) 本研究の2つめの目的は、「イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を確立すること」である。Cas9 を用いたゲノム編集は、現代の生命科学の必須ツールの一つである。Cas9 を用いたゲノム編集は、単に一つの遺伝子を破壊するだけでなく、特定の生命現象に関与する遺伝子の順遺伝学的なスクリーニングにも応用可能である。培養細胞を用いたヒトの研究では、レンチウイルスを用いた発現系を利用することで、Cas9 を用いた遺伝子スクリーニング系が確立されている。実際に、SARS-CoV2 が増殖する際に必要な宿主因子の同定などで、威力を発揮している。他方、糸状菌研究における Cas9 の応用は進んでいない。先行研究において、イネいもち病菌で Cas9 を発現させると、毒性を示すことが明らかとなった (Sci Rep, 2018, 8, 14355)。この報告以降、植物病原糸状菌での Cas9 を用いた応用研究は停滞したままである。そこで、本研究では、将来的にフェリムゾンの標的遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを行うことを視野に入れつつ、イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を確立することを試みる。

2. 研究の計画

(1) イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするために、以下の研究を行うことを計画した。

①MoICT1およびMoCcc2の異種発現と精製法の確立

1年目にフェリムゾンの標的分子候補として同定されたイネいもち病菌の MoICT1 と MoCcc2 を大腸菌内で発現させ、精製することを試みる。

②MoICT1およびMoCcc2とフェリムゾンとの相互作用に関する解析

2年目には、精製した MoICT1 と MoCcc2 がフェリムゾンと結合するかどうかについて、等温滴定カロリーメーターを用いて検証する。

③MoICT1およびMoCcc2の結晶構造解析

3年目には、銅イオン存在下および非存在下での MoICT1 と MoCcc2 の結晶構造解析を試みつつ、銅イオン存在下および非存在下でのフェリムゾンと MoICT1/MoCcc2 の共結晶構造の解析も試みる。

上記の生化学的な解析と構造解析を通して、3年以内にフェリムゾンが MoICT1 と MoCcc2 を標的分子とするかどうかを明らかにし、フェリムゾンの作用機作の一端を明らかにする計画である。MoICT1 と MoCcc2 のオルソログは、ヒトや酵母にも存在する。フェリムゾンの作用点が MoICT1 と MoCcc2 だった場合、構造的な視点から、ヒトや酵母の銅輸送にフェリムゾンが及ぼしうる影響を評価・検証する計画である。

(2) イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を確立するために、以下の研究を行うことを計画した。

①イネいもち病菌におけるマーカーリサイクリングシステムの構築

1年目には、複数の遺伝子を何度でもイネいもち病菌に導入可能なマーカーリサイクリングシステムを構築する。

②イネいもち病菌におけるCas9の毒性発現機構の解明

2年目には、様々なCas9変異体やgRNA発現カセットを複数回に分けてイネいもち病菌に導入することで、Cas9システムのどの部分がイネいもち病菌に毒性をもたらすのかを明らかにする。

③イネいもち病菌で利用可能なCas9系の構築

②の結果を踏まえてCas9システムを改良することで、イネいもち病菌で毒性を示さないように発現させることが可能なCas9変異体を開発する。そして、3年目には、実際に少数の遺伝子群を対象とした順遺伝学スクリーニングを行う計画である。最終的には、イネいもち病菌における全遺伝子スケールのCas9スクリーニング系を確立し、フェリムゾンの標的遺伝子の順遺伝学的なスクリーニングへの利用を目指す。

3. 研究の成果

(1) イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするための研究を行い、以下の研究成果を得た。

①MoICT1およびMoCcc2の異種発現と精製法の確立に関して

大腸菌を用いてMoICT1およびMoCcc2を発現させるために、低温発現用のpColDベクターに、全長のMoICT1およびMoCcc2の銅結合ドメインのクローニングを完了した。BL21 (DE3)株を用いてこれらの発現を誘導した結果、目的のサイズのタンパク質の発現が確認された。また、MoICT1に関しては、12 Lの培地を用いて大量発現を行い、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることで、高濃度のタンパク質を精製する系を確立した。SDS-PAGEで精製状況を確認したところ、単一バンドが確認できた。想定以上の進捗でMoICT1の精製に成功したため、当初3年目に行うことを計画していた結晶化条件の検討を行った。

②MoICT1の結晶構造解析に関して

①で精製に成功したMoICT1タンパク質溶液を用いて結晶化条件を検討した。モスキートを用いた微量結晶化スクリーニングを行った結果、亜鉛イオンを含む溶液条件において、結晶化が確認された。ハンギングドロップ法を用いて、PEG濃度、pH、亜鉛イオン濃度などの条件をより詳細に検討した結果、Spring-8で解析可能と思われる結晶化が起こる条件の同定に成功した。

(2) イネいもち病菌におけるCas9スクリーニング系を構築するための研究を行い、以下の研究成果を得た。

①イネいもち病菌におけるマーカーリサイクリングシステムの構築に関して

イネいもち病菌P2株のゲノムDNAよりウラシル合成遺伝子(MoURA3)の配列を増幅し、シーケンス解析を行うことでMoURA3遺伝子のコード領域の配列を決定した。また、MoURA3遺伝子のプロモーターとターミネーターの断片をクローニングし、塩基配列を確認した。MoURA3遺伝子のプロモーターとターミネーターの間にハイグロマイシン耐性遺伝子カセットをクローニングし、MoURA3遺伝子破壊用のコンストラクトを作製した。他方、MoURA3遺伝子を標的とするgRNAを設計した。このgRNAを*in vitro*転写で合成し、Cas9タンパク質とgRNAの複合体を形成させた後でMoURA3遺伝子中の標的部位を切断する活性があることを確認した。

4. 研究の反省・考察

(1) コロナウイルス感染に伴う研究遅延に関して

全般的には、当初想定していたペースで研究が進展した。しかし、2022年度の期中に研究代表者がコロナウイルスに感染し、その後椎骨動脈解離を発症して入院するアクシデントに見舞われてしまったため、研究の進展にブレーキがかかってしまったのは残念であった。

(2) イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするための

の研究に関して

イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするための研究に関しては、当初の予定以上に研究が進展した。

①MoICT1に関しては結晶構造解析の目処がたった。2023年度の7月に Spring-8にサンプルを送付する予定である。結晶構造解析が完了したら、学会発表と論文投稿を行う計画である。また、MoICT1とフェリムゾンの共結晶化条件のスクリーニングを開始し、銅と結合した状態のMoICT1の発現・精製条件の検討にも着手し始めた。

②MoCcc2に関しては、精製条件の確立には至らなかった。引き続き、生化学的解析と結晶構造解析に必要な質のタンパク質を十分量精製するための精製条件を検討していく。

(3) イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を構築するための研究に関して

イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を構築するための研究に関しては、1年目の当初予定よりは少々遅れ気味であるが、一定程度研究が進展した。イネいもち病菌におけるマーカリサイクリングシステムの構築に関して、イネいもち病菌のプロトプラストに、MoURA3 を標的とする Cas9-gRNA 複合体と MoURA3 遺伝子破壊用のコンストラクトを同時にトランスフェクションしたが、現時点では MoURA3 破壊株の単離には至っていない。引き続き実験を反復するとともに、gRNA を新たに設計し直すなどの対策を講じていく計画である。

上記の通り、初年度の申請内容時の計画通り、おおよそ順調に研究が推移している。2年目の継続申請が不採択になってしまったのは非常に残念であるが、1年間のご支援のおかげで実施できた研究の成果を今後さらに発展させ、学会発表と論文発表に繋げていきたいと考えている。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	龍 谷 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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—	研究分野	経 済 学
キ ー ワ ー ド	①ソーシャルイノベーション ②中山間地域 ③イタリア ④若者起業・起農 ⑤欧州政策		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 石 尚 子	龍 谷 策 大 学 学 部	准 教 授	研究代表者、総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
秋 津 元 樹	京 都 大 学 学 部 農 学 研 究 科	教 授	農村社会システム(理論)
石 倉 研	龍 谷 策 大 学 学 部	講 師	地域経済政策(農林業)
坂 梨 健 太	京 都 大 学 学 部 農 学	講 師	地域経済政(農業分野の雇用・人材育成)
白 石 克 孝	龍 谷 策 大 学 学 部	教 授	EU政策(地域・教育政策)
藤 岡 章 子	龍 谷 策 大 学 学 部 営 業	教 授	地域経済振興(6次産業化・起業)
矢 作 弘	龍 谷 策 大 学 学 部 人 間 ・ 科 学 ・ 宗 教 一 総 合 研 究 セ ン タ ー	研 究 員	地域政策(地域づくり)
Mariarosaria Lombardi	Foggia 大 学 学 部 経 済	助 教 授	ソーシャルイノベーション理論・伊事例調査
Maurizio Prospero	Foggia 大 学 学 部 農 学	助 教 授	調査分析方法(事例調査、ソーシャルネットワーク分析)
Francesco Defilippis	Bari 工 科 大 学 学 部 建 築 工 学	准 教 授	地域づくり計画(事例研究)
Mariangela Turchiaulo	Bari 工 科 大 学 学 部 建 築 工 学	准 教 授	地域づくり計画(事例研究)伊研究者コーディネーター

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

- (1) **日伊の比較調査研究**: 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/農村にソーシャル・イノベーション（以下SI）を醸成するためのエコシステムを明らかにする。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) **イタリアのSI醸成モデルの社会実験とその効果の検証**: 南イタリアで成果を上げている農業におけるSI醸成モデルを、日本の農村で社会実験として実施し、その有用性を検証する。特に、SI醸成に求められるのは、多様な関係性の構築である。このSIモデルは、孤立化する農業者を繋ぎ、農業者同士がお互いの農法への理解や共感、直面する課題を共有し、そこから協働や連携の動きを作り、持続可能な新しい農業の形を創出するものである。

2. 研究の計画

- (1) 2021年度の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・能力を明らかにするとともに、文献分析によって抽出された農村におけるSI醸成の要件について整理する。
 - ①共同研究者による文献調査（4月～12月）
 - ②日本の共同研究者研究会・イタリア共同研究者とのオンライン会議
- (2) イタリア南部・北部の農村におけるSI事例の調査を行いその相違を分析する。また、欧州連合・MUFPPへ訪問し、マクロレベルの農業・農村におけるSI醸成の政策についてのヒアリング調査を行う。
 - ①8月～9月イタリア南部・北部現地調査
 - ②3月欧州連合・国際スローフード協会・MUFPPへの訪問
- (3) イタリア農村におけるSI醸成モデルの社会実験の実施、日本における有用性を検証。
2月 亀岡市との協働によるVazzapのSIキット「コンタディナー」の実施
- (4) 成果取りまとめ、
 - ①龍谷大学紀要への投稿（3月）、
 - ②国際成果発表会開催（2月）
 - ③叢書出版（2024年3月予定）、イタリア共同研究者との書籍出版（2024年6月予定）

3. 研究の成果

- (1) 学際的アプローチによる農業・農村におけるSIについての文献調査と研究会の開催
 - ①共同研究者の各分野から農村におけるSIについて文献調査を実施と研究会の結果、農村におけるSI醸成の要素について抽出することができた。（移民や社会的弱者の社会的包摂、都市から若者移住を促進する欧州・国家・自治体レベルの公共事業、農村・農業の担い手として変容を遂げている社会的協同組合の役割、農村・農業の新たな担い手としての女性起業家の育成、市民参加による総合的ローカル・フード・ポリシー策定を通じたSIの醸成）
 - ②農村におけるSIの定義付けについて、文献分析に基づく論文執筆により、考察を深めることができた。また、イタリア共同研究者との研究会での議論も踏まえ、上記要素に加えて、農業・農村のSIを牽引する要素として、日本よりもイタリア・ヨーロッパで発達しているのは、ソーシャル・ファーミング、再生可能エネルギー、景観保護政策であった。特にソーシャル・ファーミングは、日本においても農福連携として注目されているが、イタリアではより幅の広い社会的課題を解決し、農業・農村のSI醸成エコシステムの中心となり

得るテーマであることがわかった。

③研究会開催は以下のとおり。

日時	場所	内容
2022年7月12日	オンライン	各共同研究者による現地調査に向けた文献調査進捗状況報告
2022年7月19日	オンライン	Prosperi氏「移民問題と南イタリア農業について」報告
2022年12月27日	龍谷大学	8, 9月イタリア調査報告、2月亀岡市での社会実験の打ち合わせ 叢書執筆についての役割分担について協議
2023年2月6日	龍谷大学	龍谷大学地域公共人材・政策開発リサーチセンターとの共催により・日伊農業・農村SI国際会議を実施、日伊の共同研究者が出席し、本プロジェクトの成果・課題について日伊双方で意見交換し、今後の共同研究の方向性について協議。
2023年3月2日	オンライン	日伊共同執筆についての検討会

(2) イタリアへの農村SI事例調査及び欧州連合への農村開発政策に関するヒアリング調査を通じた仮説検証

①イタリアへの調査については、上記のSI醸成の要素を調査テーマとして、共同研究者による現地調査を実施し、それぞれの実態を掴むことができ、実際にSI醸成の牽引となっていることを把握することができた。

②欧州連合機関である欧州社会環境経済委員会の食料社会環境ユニットへの訪問調査では、持続可能な農村に求められる重要要素としてエネルギー自給の議論がなされており、農業・農村のSIには、地域資源を活用した再生可能エネルギーは不可欠であった。また、欧州連合は、国際NGO、NPO、協同組合、自治体連合等、多様なステークホルダーが一同に会し、熟議の場を設定し、政策提言につなげている。各団体は、アドボカシー機能を強化させていることがわかった。また農村開発政策においても、中山間地域の一地域のローカル団体が、欧州レベルの協議会に参加し活動報告・情報交換をするなど、ローカルレベルのネットワークを形成し、成果の共有と欧州政策へのアプローチの機会を得ている。

(3) 日本地域におけるイタリアのルーラル・ハブVazzapの農業SIモデル「コンタディナー」の実施とその効果の検証

南イタリアの若手農業者が立ち上げた、農業・農村にSIをもたらす多様な活動を展開しており、その一つの農家同士の関係性の構築による新しい営農モデルの開発・発展を目的としたワークショップ「コンタディナー」を実施した。イタリアからVazzapの創設者、メンバーと共同研究者を招聘し、京都市左京区大原、亀岡市、小豆島を訪問し、それぞれ、IUTターン者による有機農業や自然農、循環型農法等の新しい農業の推進事例を調査した。日伊の農村地域の課題の共通性が明らかになったと同時に、日伊の農業者がお互いの取り組みの中に、新たに取入れられる要素を発見することができた。

ワークショップは2023年2月5日に亀岡市との協働で実施した。定員50名のところ53名の参加となり、内農業者は22名であった。アンケート調査の結果から、ワークショップの有用性が明らかとなった。またこのワークショップをきっかけに、参加した農業者の間でネットワークと新たな農業モデルの試行が始まることとなった。本社会実験の結果、一定の成果が認められ、このSIモデルが日本においても有効に機能し、また、多様な場面で応用可能であることが示唆された。

(4) 研究成果の取りまとめ

①国際会議の実施-2月にイタリア共同研究者を招聘し、これまでの活動を振り返り、その成果を確認することができた。また、トリノ工科大学とは、これまでの共同研究の実績から、2023年7月には新たに京都市にJapan Hubを立ち上げることとなり、さらに発展させることができる環境を整えることができた。

②龍谷大学紀要への論文投稿を行い、農村・農業に求められるSIの要素と、亀岡市における「コンタディナー」の社会実験結果とその成果をまとめることができた。

③本研究プロジェクトの成果は、日伊共同研究者の執筆による叢書（2024年3月出版予定）し、広く社会に発信する。またイタリア共同研究者とは、さらに、ヨーロッパ、アジア圏の研究者を新たに加えて、英書の共同執筆を進め、来年度に出版する予定である。

4. 研究の反省・考察

(1) ヒアリング調査・社会実験におけるアンケート調査のデータ分析

①Covid19の影響で現地調査が遅れたこともあり、現地ヒアリング調査のインタビュー内容の質的データ分析が不十分である。今後叢書執筆の際に精緻な分析結果を示す。

②社会実験において、ソーシャル・ネットワーク分析(SNA)が不十分である。具体的事象として、成果は提示できるが、SNAを実施するにはサンプル数が不十分であることと、もう少し経過観察が必要である。自治体との連携関係にあり、継続調査は可能であり、今後も日伊共同で追跡調査を行っていく。

(2) 日伊の条件不利地域における SI の要素はある程度抽出できたが、それぞれの要素の相関関係や農村政策のマクロからミクロ、ミクロからマクロへと展開するプロセスや条件については明らかにできなかった。上記の質的データの精緻な分析と追加取材によって、明らかにしていきたい。また、農村地域の SI の議論には、日伊以外のアジア・欧米諸国の SI についても研究する必要があり、今後の課題としたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Kanang Kantamaturapoj, Steven R. McGreevy, Natapol Thongplew, Motoki Akitsu, Joost Vervoort, Astrid Mangnus, Kazuhiko Ota, Christoph D.D. Rupprecht, Norie Tamura, Maximillian Spiegelberg, Mai Kobayashi, Sittidaj Pongkijvorasin, Suwit Wibulpolprasert, 2022, Constructing practice-oriented futures for sustainable urban food policy in Bangkok. *Futures*, Volume 139, 102949, ISSN 0016-3287,

②秋津元輝「重層化する農山村社会のイノベーション『脱成長』にむけた社会編成原理の転換」『季刊 農業と経済』2022年夏号、2022年8月、pp.11-23)

③秋津元輝「21世紀農山村社会のイノベーションは周縁部から芽生える」『地域と農業』(一般社団法人 北海道地域農業研究所)、第127号、2022年10月、pp.4-11)

④秋津元輝、【書評論文】「ガバナンス・アプローチの遠近法に向けてー帯谷博明『水環境ガバナンスの社会学ー開発・災害・市民参加』(昭和堂、2021年)を読むー」『環境社会学研究』28、2022年、pp.156-159)

⑤矢作弘「都市空間の変容とジェンとリフィケーションーディープ大阪(新今宮)に進出した星野リゾートをめぐるー」(『おおさかの住民と自治』2022年9月pp.12-17)

⑥坂梨健太「生業の複合性と多様性」杉村和彦・鶴田格・末原達郎編『アフリカから農を問い直すー自然社会の農学を求めて』(京都大学学術出版会、2023年2月pp.149-177)

⑦中村貴子「シビック・アグリカルチャーを農業経営の視点から捉える」『協同組合研究』42(2)、2022年

⑧中村貴子「女性農業委員を増やすための私論ーまずは女性経営者を増やすことー」(『週刊農林』第2492号、2022年8月5日)

⑨中村貴子「農業委員に女性と登用し地域と農業界を変えよう！」(『週刊農林』第2492号、2022年9月25日)

⑩大石尚子・江 欣樺「農村におけるソーシャル・イノベーションの要素と特徴ーWeb of Science Core Collectionの文献分析から」(『龍谷大学社会科学研究所年報』第52号、2022年10月)

(2) 口頭発表

①Sakanashi, K. 2022 “Debt and Living well in the Forest—A Case Study of Cocoa Growing Region in Southern Cameroon”, CHAGS13, University College Dublin, 27 June-1 July.

②Sakanashi, K. 2022 “Comparative Study on Eating Blue Alga in Japan”, IRSA 2022 XV World Congress of Rural Sociology, Cairns, Australia 19-22 July.

③中村貴子「共通テーマ：地域づくりの新段階と協同組合へのコメント」日本協同組合学会 第40回春季大会、2022.5.28

(3) 出版物

①秋津元輝「共感する農村と都市ーツーリズムからの響き合い」河村律子・中村均司・中村貴子・高田晋史編『共感の農村ツーリズムー人の流動・経済循環を創りたい』(晃洋書

房、2023年1月、pp. 6-15

- ②河村律子・中村均司・中村貴子・高田晋史編著 『共感の農村ツーリズム—人の流動・経済循環を創りたい—』晃洋書房 2023年（中村貴子執筆「6次産業化と都市型マルシェ」）
- ③大石尚子「第13章 多様な関係性構築による農村システムの変容」（村田和代・阿部大輔編『対話を通じたレジリエントな地域社会のデザイン』）日本評論社、2022年8月、pp208-224)

血小板ヒッチハイキング型ドラッグデリバリーシステムの創生 －炎症部位での薬物放出に向けた オンデマンド薬物放出機能の搭載－

1. 研究の目的

ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、必要な時に、必要な場所で、必要な量の薬剤を放出させることで、最大限の薬効と最小限の副作用とを両立する未来医療として活発に研究されている。既報のDDSでは、薬剤運搬体 (DDSキャリア) として高分子ミセルやリポソーム、高分子微粒子などが検討されてきた。しかし、これらは生体から異物として認識され血中から排出されるために、薬効の長期化や患部のみでの薬効発現には未だ大きな障壁がある。そこで近年、自己の細胞や小胞などをDDSキャリアとして応用する試みがなされている。これらは異物として認識されず、長期間安定に体内を循環できることに加え、特定の部位に集積する機能を備えている。申請者らは、自己由来の細胞のひとつである血小板に着目した。血小板は血液中に大量に含まれる2~4 μmの無核の細胞であり、その寿命は約10日である。また、血小板は炎症部位に集積して活性化され、顆粒内容物を放出することにより、炎症の沈静化にも関与する。このような長期にわたる血中滞留と、特定の炎症部位への集積、および内容物の放出という血小板の機能は、極めて高機能なDDSキャリアと見なすことができる (表1)。そこで本研究では、自己の血小板を抗炎症薬剤の運搬体として利用する“血小板ヒッチハイキング”型DDSの確立を目標とする (図1)。血小板は、がんや動脈硬化、関節リウマチといった炎症部位に能動的に集積する機能を有していることから、血小板に運搬させる薬剤の選択により、これらの炎症性疾患に対する効果的な治療が可能になる。

表 1. 血小板と従来型 DDS キャリアとの比較

	従来型 DDS キャリア (リポソーム、ミセルなど)	血小板
サイズ	10~200 nm	2~4 μm
血中滞留性 (長期が好ましい)	数時間~数日	約 10 日
標的指向性	腫瘍部位 (受動的・EPR 効果)	炎症部位 (能動的)
新たな標的 指向性の付与	可能	可能
内容物の放出 する環境条件	温度や pH、生分解など	活性化因子 (主にタンパク質)

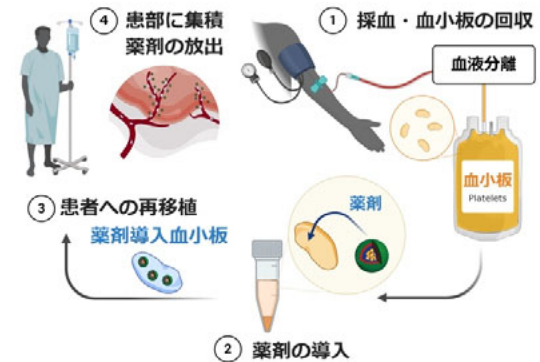


図 1. 血小板ヒッチハイキング型 DDS の概要

2. 研究の計画

血小板を薬物デリバリーキャリアとして用いるためには、血小板の機能を損なうことなく効率良く内部へ薬剤を導入し、疾患部位において薬効を発現させる必要がある。本研究では、高い薬物内封効率を可能にする高分子ベシクル調製法を確立し、さらにこの高分子ベシクルに時空間制御型の薬剤放出機能を組み込む。また、抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析も並行して進める。本研究では、以下の研究課題に取り組む

(1) 光応答性高分子ベシクル調製法の確立

- ① 両親媒性ブロック共重合体の合成
- ② 水和法による両親媒性ブロック共重合体のナノ構造体形成
- ③ Inverted Emulsion法による高分子ベシクルの調製
- ④ 光応答性モノマーの合成

(2) 抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析

- ① 抗炎症剤メトトレキサート (MTX) への蛍光標識
- ② MTXの血小板への取り込み挙動の解析

3. 研究の成果

(1) 光応答性高分子ベシクル調製法の確立

① 両親媒性ブロック共重合体の合成

可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) を合成した。

核磁気共鳴分光法ならびにゲル浸透クロマトグラフィーによりPMPCの分子量と重合度とを測定した結果、数平均分子量16900、重量平均分子量19500、多分散度1.15、重合度28であることがわかった。続いて、PMPCをmacroRAFT剤として用い、RAFT重合によりbutylmethacrylate (BMA) を

PMPCから伸長させることによりPMPC-*b*-PBMAを得た。今回、高分子ベシクルを得るために、3種類の疎水性ブロック (PBMA) の鎖長を有するブロック共重合体を合成した。合成した結果を表2に示した。以上の結果より、高分子ベシクルを調製するための両親媒性ブロック共重合体の合成に成功した。

表2. PMPC-*b*-PBMAの合成結果

	$D_p^{a)}$	$M_n^{b)}$ ($\times 10^4$)		
Run 1	35	1.64	2.32	1.10
Run 2	68	2.64		
Run 3	93	1.85	2.54	1.37

^{a)} Calculated from ¹H NMR spectra. ^{b)} Calculated from GPC curves using near-mono disperse poly(methyl methacrylate) calibration standards.

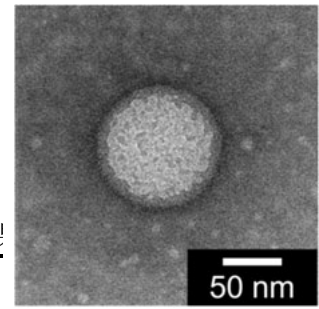


図3. Inverted Emulsion法により得られた高分子ベシクルのTEM画像

② 水和法による両親媒性ブロック共重合体のナノ構造体形成

得られた両親媒性ブロック共重合体を用いて、ベシクル形成可能な両親媒性ブロック共重合体の組成を検討した。まず、PMPC-*b*-PBMA60 mgをエタノール60 mLに溶解させ、減圧留去することによりPMPC-*b*-PBMA膜を調製した。次に、250 mMスクロース水溶液50 mLを加え、マグネティックスターラーを用いて一晩攪拌した。その後、プローブ

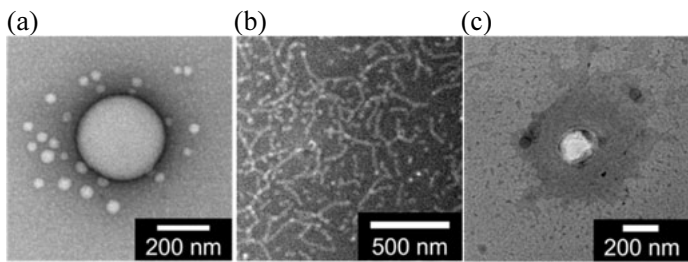


図2. 水和法により調製した両親媒性ブロック共重合体の透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像。PBMA ブロックの重合度 : (a) 35, (b) 68, (c) 93。

型超音波照射機を用いて超音波照射した。分散液中の高分子集合体を直接観察するために、得られた分散液を乾燥させ、ネガティブ染色によりTEM観察を行った。図2には得られたTEM画像を示した。PBMAブロックの重合度が35のものにおいては、ベシクル様の構造体が観察された (図2(a))。一方、PBMAブロックの重合度が68のものにおいては、ワームライクミセル様構造が確認されたが (図2(b))、PBMAブロックの重合度が93のものにおいては、明確な構造体は確認されなかった (図2(c))。臨界充填パラメーターに従うと、両親媒性分子の親水部と疎水部との体積比がほぼ等しいときにベシクルが形成される。ベシクル様構造体が観察されたブロック共重合体は、親水性のPMPCブロックの重合度が28であり、疎水性のPBMAブロックの重合度が35である。重合度がほぼ等しいことから、親疎水部の体積比がほぼ同等となったために、ベシクル様構造体は形成できたと考えられる。以上の結果から、PMPC₂₈-*b*-PBMA₃₅がベシクル形成に適したブロック共重合体であることが明らかになった。

③ Inverted Emulsion法による高分子ベシクルの調製

水和法によるベシクル形成について検討し、PMPC₂₈-*b*-PBMA₃₅がベシクル形成に適したブロック共重合体であることがわかった。そこで、Inverted emulsion法によるベシクル形成について検討した。まず、280 mgのPMPC₂₈-*b*-PBMA₃₅を7.0 mLのトルエンに分散させ、そこに0.5 mLの250 mMスクロース水溶液を添加した。次に、プローブ型の超音波照射機を用い、超音波照射し、W/Oエマルジョンを調製した。続いて、30 mgのPMPC₂₈-*b*-PBMA₃₅を分散させた250 mMスクロース水溶液とトルエンの二相系に調製したW/Oエマルジョン

を0.5 mL添加した。この溶液に遠心分離機を用いて5分間5750 gの遠心力を加えることにより高分子ベシクルを調製した。動的光散乱法により、得られたベシクルの粒径を測定したところ、127 nmであることがわかった。図3には、Inverted Emulsion法により調製した高分子ベシクルのTEMの画像を示した。図より、100 nm程度のベシクル様構造体が形成していることがわかった。また、TEMの画像よりベシクル様構造体の膜厚を測定すると16 nmであった。これはPMPC-*b*-PBMAが二重膜を形成する上で十分に考えられる長さである。したがって、Inverted emulsion法により、高分子ベシクルが形成できたことが示唆された。

④ 光応答性モノマーの合成

紫外線照射により崩壊する光応答性高分子ベシクルを調製するために2-nitrobenzyl methacrylateの合成を行った。まず、3.06 gの2-nitrobenzyl alcoholと3.07 gのTriethylamineを15 mLのジクロロメタンに溶解させ、氷浴下で30分間攪拌した。その後、2.70 gのmethacryloyl chlorideが溶解したジクロロメタン10 mLを滴下し、25 °Cで一晩攪拌した。生成した沈殿物をろ過で除き、減圧留去した。その後、得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチル/ヘキサン = 15 / 85 (v/v)）により精製したのち減圧流去し、黄色液体を得た。図4には得られた黄色液体の核磁気共鳴分光スペクトルを示した。図より、ケミカルシフトおよび積分値が理論値と一致していることから、光応答性モノマーである2-nitrobenzyl methacrylateの合成に成功したことがわかった。

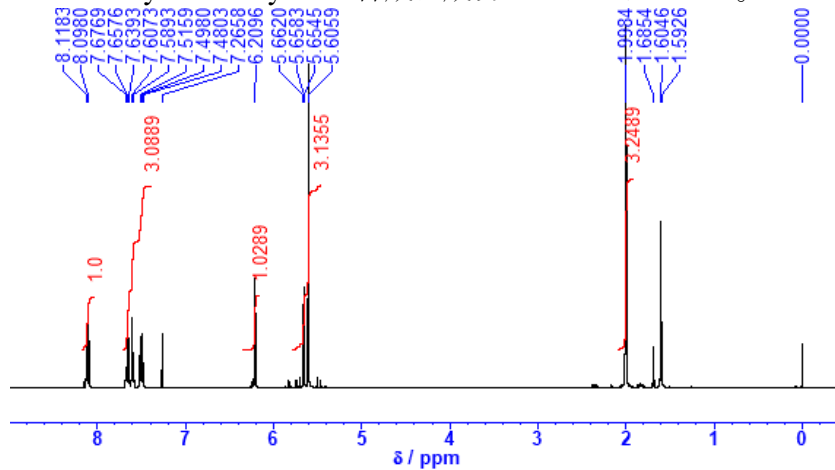


図4. 光応答性モノマー2-nitrobenzyl methacrylateの¹H NMRスペクトル

(2) 抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析

① 抗炎症剤メトトレキサート (MTX) への蛍光標識

MTXの蛍光標識と血小板への取り込み挙動の定量評価を試みた。まず、MTXに蛍光試薬である4-Acetamido-7-mercapto-2,1,3-benzoxasiazole (AABD-SH)をトリフェニルホスフィンおよび2,2'-ジピリジルジスルフィドを用いて縮合した。AABD-SHはカルボキシ基と反応してチオエステルを形成すると強い蛍光を発するが、得られた複合体 (MTX-AABD) はMTXもしくはAABD-SHには見られない強い蛍光 ($\lambda_{ex}=368$ nm, $\lambda_{em}=542$ nm) が検出された。以上の結果から、蛍光ラベル化MTX (MTX-AABD) が得られたことがわかった。

② MTXの血小板への取り込み挙動の解析

ラット全血から調製した血小板懸濁液 (1.0×10^9 cells / ml : HEPES緩衝液) と濃度の異なるMTX-AABD溶液 (0.5, 0.25, 0.05 mM : HEPES緩衝液) を体積比1:9で混合し、遮光下、37 °Cで所定時間インキュベートした。その後、遠心分離で回収した血小板をRIPA緩衝液で溶解し、血小板溶解液中のMTX-AABDの蛍光強度 ($\lambda_{ex}=368$ nm, $\lambda_{em}=542$ nm) を測定したところ、MTX-AABDの濃度およびインキュベーション時間に応じてMTX-AABDの血小板への導入量が増加する傾向が認められ、最大で 0.5×10^6 mM程度のMTX-AABDが血小板内へ移行していることが示唆された。MTX-AABD導入血小板をリン酸緩衝液 (PBS) に分散 (2.0×10^8 platelets/mL) し、PBSへ溶出するMTX-AABDの定量を試みたところ、ごく初期の溶出のみ検出され、経時的な溶出挙動の評価には至らなかった。これらの結果から、MTX導入量の向上とMTX徐放能の付与が、血小板ヒッチハイキングによるMTXの運

搬を実現するための重要な因子になることが分かった。

4. 研究の反省・考察

(1) 光応答性高分子ベシクル調製法の確立

検討を重ねた結果、高分子ベシクルを調製可能なブロック共重合体の組成を見出すことができた。この組成を基本にして、光応答性モノマーをもちいて疎水性ブロックを合成することにより、光応答性高分子ベシクルを調製できると考えられる。高分子ベシクルを調製可能なブロック共重合体の組成を見出すことに時間がかかり、研究期間内に光応答性部位を導入した高分子ベシクルの調製に至らなかったが、引き続き検討を進めていく。

(2) 抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析

血小板へのMTXの導入量が当初の予想より低くなく、改善が必要であることがわかった。そこで、MTX導入量の向上を図り、MTX-ポリリジン複合体の合成とその血小板への移行挙動の評価を進めていく。

5. 研究発表

(1) 口頭発表

- ① 柿木佐知朗, ペプチドを利用した医療材料表面の生理的活性化と非活性化, 第5回 日本金属学会 第7分野講演会, 2022年12月11日, 大阪 (招待講演) .
- ② 河村 暁文, 双性イオンポリマーの特性を利用したソフト(ナノ)マテリアルの創出, 2022年度関西接着ワークショップ第2回研究会, 2022年11月28日, オンライン (招待講演)
- ③ Akifumi Kawamura, "Emulsion-templated Synthesis of Smart Nanocapsules and Core-shell Microgels", International Congress on Pure and Applied Chemistry 2022, 2022年11月25日, マレーシア (招待講演)
- ④ 柿木佐知朗, 松下夕真, 埜口友里, Aldona Myzk, 上田正人, 岩崎泰彦, Roman Major, コラーゲン骨格模倣ペプチド固定表面のアンチファウリング特性, 第44回日本バイオマテリアル学会大会, 2022年11月21日, 東京.
- ⑤ 柿木佐知朗, 松下夕真, 埜口友里, Aldona Myzk, 上田正人, 岩崎泰彦, Roman Major, コラーゲン骨格構造様オリゴペプチド固定表面のin vitro動的環境下における血液適合性の評価, 第60回日本人工臓器学会大会, 2022年11月4日, 愛媛.
- ⑥ 河村 暁文, 川口 真穂, 成瀬 一希, Emrick Todd, 宮田 隆志, 水溶性ブロック共重合体を用いた還元環境応答性ナノカプセルの設計, 第51回医用高分子シンポジウム, 2022年7月25日, 東京.

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。本研究において、2021 年度には、実際に SNO-GPx7 を調製し、光刺激で分子内ジスルフィド結合を形成させることに成功した。さらに、光誘起赤外差スペクトル測定が可能な測定系の構築を行った。

これを踏まえて、2022 年度では、以下の (1) (2) を目的に定めて研究を進めた。

(1) GPx7 の酸化的構造変化の赤外スペクトルを用いた解明

NO を付加した SNO-GPx7 は、光刺激で分子内ジスルフィド結合形成を実際に起こすことを確認している。これを用いて、光照射前後での赤外差スペクトルの取得・解析を行うことで、GPx7 の分子内ジスルフィド結合形成で起こる構造変化を明らかにする。

(2) GPx7 の酸化的構造変化ダイナミクスの解明

SNO-GPx7 を用いて、(1) では光照射前後の赤外差スペクトルの定常測定を行うが、ここでは更に光照射直後からの赤外差スペクトルを時々刻々と追跡することで、GPx7 が分子内ジスルフィド結合を形成した後に起こす構造変化のダイナミクスを明らかにする。

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する。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) の研究計画を述べる。

SNO-GPx7 の試料溶液について、乾燥させてフィルム状にしていた物をフッ化カルシウム製の窓材に貼り付けて測定を行った。試料励起光として、紫外光スポット光源からの紫外光 (約 140 mW) または、本年度予算で購入を行った半導体レーザー (波長 375 nm) を用いた。両者の光源で検討を行ったところ、紫外光スポット光源の方が効率よく試料励起できていることが分かり、以降これを光源として用いた。(なお、レーザー励起の場合、光学系を改良して集光傾

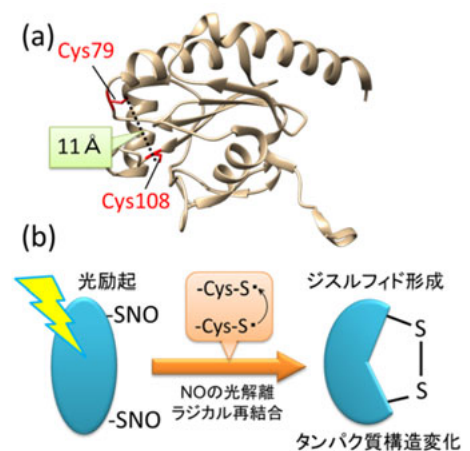


図 1 (a) GPx8 の立体構造、分子内システイン残基の位置と距離も示す。(b) NO の光解離を用いたジスルフィド結合の形成。

域を可能な限り小さくするなどの改良の余地は残されている。) (1)の赤外差スペクトル測定では、10分間の紫外光照射をして、十分な時間経過の後に赤外スペクトル測定を行う。(2)の時間分解測定では、30秒間の光照射後、4秒時点から10秒間隔で赤外スペクトル測定を行った。

3. 研究の成果

(1) SNO-GPx7の光誘起赤外差スペクトル

紫外線照射光源を用いて、SNO-GPx7の光誘起赤外差スペクトルの測定を行った。まず、図2にSNO-GPx7の赤外吸収スペクトルを示す。図中の1649 cm^{-1} と1543 cm^{-1} のバンドはamide I, amide IIバンドと呼ばれるタンパク質分子に特徴的なバンドであり、このうちamide Iバンドは2次構造を反映したピーク位置を示す。1649 cm^{-1} は α -helix構造を反映したピーク位置であり、図1(a)に示すように、GPx7が主に α -helixから構成されることと符合している。

図3は、SNO-GPx7の光照射後から光照射前の状態を引いた赤外差スペクトルである。負に出ているピークは構造変化によって失われた構造、正に出ているピークは構造変化の結果生じた構造に由来する。この結果は分子内ジスルフィド結合形成により生じるGPx7の構造変化を反映している。図中のamide I領域(1700-1600 cm^{-1})の信号から、 α -helix(1653 cm^{-1} (-)), β -sheet(1626, 1637 cm^{-1} (-))が部分的に崩壊してturn構(1674 cm^{-1} (+))に変わるような2次構造変化の可能性が示唆される。また、1705(+), 1408(-) cm^{-1} のシグナルから酸性アミノ酸残基のプロトン化も示唆された。

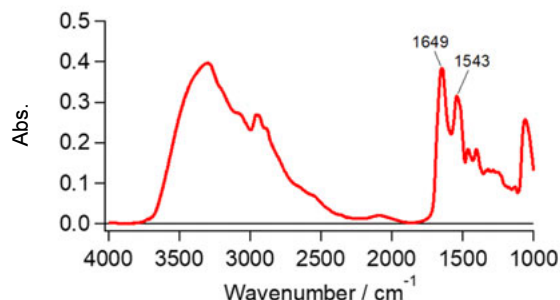


図2 SNO-GPx7の定常赤外スペクトル。

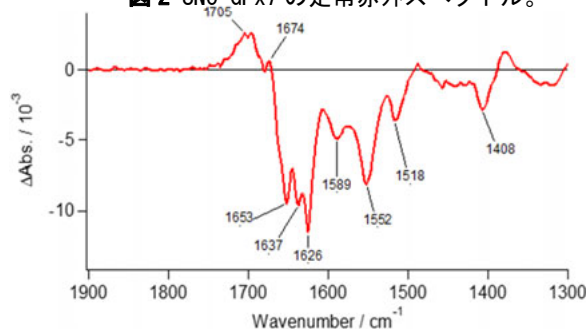


図3 SNO-GPx7の光誘起赤外差スペクトル。

(2) 時間分解赤外差スペクトル取得

図4にSNO-GPx7の時間分解赤外差スペクトルを示す。光励起には1.で示した結果と同様に紫外線照射光源を用いた。30秒の光照射後、各時間での赤外差スペクトルを示している。光照射後、3.94秒の赤外差スペクトル形状と比較すると、1600-1700 cm^{-1} のamide I領域において、1676 cm^{-1} の強度は減少し、逆に1633, 1626 cm^{-1} の負のバンド強度が時間とともに増大していることが分かる。Amide I領域における変化は、GPx7の2次構造変化を反映しており、図中に示した時間領域でのGPx7の骨格構造変化のダイナミクスが観測できたとと言える。

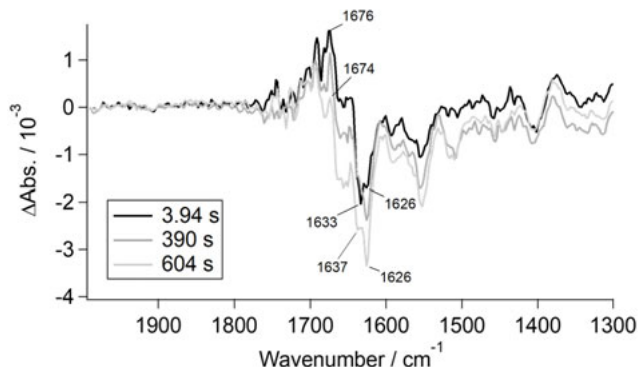


図4 SNO-GPx7の時間分解赤外差スペクトル。30秒間の紫外光照射後からの経過時間を示す。

4. 研究の反省・考察

(考察)

GPx7/8の酸化的構造変化についての知見は、申請者の知る限り殆どない。図3の赤外差スペクトルは、GPx7が起こす酸化的構造変化の情報を与える有益な情報である。図1で示したように、GPx7/8の持つシステイン残基の対は離れており、ジスルフィド結合形成には分子構造変化を伴う必要があると推察された。ここで見えた2次構造変化(α -helix, β -sheetの崩壊およびturn構造の増大)により、システイン残基間の距離が近づきジスルフィド結合が形成されたと考えられる。ここで、興味深いのは図1(a)に示したように、GPx7は全体として β -sheetよりも α -helixが多く含まれるのにもかかわらず、図3の赤外差スペクトルでは β -sheet構造の消失(1626, 1637 cm^{-1} (-))が、 α -helixの消失(1653 cm^{-1} (-))よりも優位に起きている点である。GPx7のシステイン残基(Cys79, Cys108)の対は、ともに β -strandに直結したループ

上に位置しており、ジスルフィド結合形成に誘起されて、これらの β -strandが崩壊してシステイン残基間距離を10Åよりも近い位置に保持するのかもしれない。

図4の時間分解赤外差スペクトルについても、GPx7の酸化的構造変化が起こる時間領域について初めて示す物である。本研究の分担者である金村氏の報告では、酸化剤と反応させた際の酸化型GPx7の生成は、分スケールで起こっており、これは酸化剤濃度に依存する物ではあるが、本研究の結果と矛盾しない。また、申請者は、以前に糖結合タンパク質ガレクチンにおいて、ジスルフィド結合生成に伴う構造変化の時間分解計測を行っており、その結果によれば構造変化は分から時間スケールの遅いダイナミクスであった。タンパク質分子のフォールディングはミリ秒単位で進行する物も珍しくないが、ジスルフィド結合形成に伴うタンパク質構造変化は比較的遅い現象なのかもしれない。

(反省)

本研究ではGPx7について検討を行ったが、GPx8における検討までは至らなかった。GPx7と8は性質の類似した分子であり、本研究で示した方法論でGPx7と同様に酸化的構造変化を明らかにできると期待される。また、GPx7/8とPDIとの結合についても検討には至らなかった。こちらの方も、今後の課題としたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

① 金村 進吾, 黒井 邦巧, 岡田 莉奈, 松崎 元紀, 山口 宏, 伊藤 大, 李 映昊, 稲葉 謙次, 齋尾 智英, 中林 孝和, 奥村 正樹 「ヒトガレクチン1の酸化還元依存的な機能制御における分子構造基盤」 日本生化学大会 (名古屋 2022年11月11日)

(3) 出版物
なし

AA アミロイドーシス発症制御因子の解明

ー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ー

1. 研究の目的

アミロイドーシスは、原因となる前駆タンパク質が線維状の構造をもつアミロイドとして組織に沈着し、細胞や組織の機能を障害することで起こる疾患の総称である。代表的な全身性アミロイドーシスである AA アミロイドーシスは炎症性疾患の合併症として発症するケースが多く、抗炎症作用を示す生物製剤の開発により発症頻度は低下傾向を示しているが、炎症性疾患をもっているにもかかわらず AA アミロイドーシスを発症すると人とならない人がおり、この違いを引き起こす原因は明らかでない。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血清アミロイド A (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) SAA 由来アミロイド線維の細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響

前年度において、SAA由来アミロイド線維のヒト胎児腎細胞 (HEK293) に対する毒性を評価したところ、細胞内の脱水素酵素活性を測定するMTTアッセイでは化学修飾の有無によらず同様の濃度依存的な毒性を示したのに対して、細胞膜損傷に伴う細胞内物質の漏出を検出するLDHアッセイではいずれの試料も毒性を示さない結果となった。また、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試薬の添加により細胞外にその代謝物と思われる突起状の結晶が出現した。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たが、「細胞死」のような明確なものではないことが示された。以上の結果を踏まえ、アミロイド線維がもたらす細胞への異常現象を、その根底にあるメカニズムとともに明らかにすることを計画した。

(2) GAGによるアミロイド線維形成促進機構とヒト臨床検体におけるEXTL2遺伝子の発現変化に関する解析

- ① これまでの解析から、EXTL2欠損マクロファージではカテプシンの活性化の亢進によりSAAのプロセッシング能が上昇している可能性が示唆されている。SAAはインフラマソームの一種である NLRP3 の活性化を介してプロカスパーゼ1からカスパーゼ1への変換を引き起こすことが知られているため、野生型マウス及びEXTL2遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージを単離し、SAAで刺激した後、カスパーゼ1の活性化レベルを測定した。
- ② ヒトの臨床検体を用いてEXTL2遺伝子の発現を調べた。また、抗EXTL2抗体を用いて組織染色を行い、タンパク質レベルでのEXTL2の発現を調べた。

3. 研究の成果

(1) SAA 由来アミロイド線維の細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響

MTT アッセイと同様に脱水素酵素活性を測定するが、MTT アッセイとは異なり発色色素が細胞内に取り込まれない WST-8 アッセイによる毒性評価を行った結果、SAA 由来アミロイド線維を添加しても酵素活性がほとんど低下しないことが認められた。このことは、SAA 由来アミロイド線維が酵素活性に直接作用するのではなく、細胞内に取り込まれた後、細胞内での発色色素の代謝過程に関与することを示唆している。実際に、MTT アッセイにおいて認められる“毒性”は、単に生成した物質のエキソサイトーシスがアミロイド線維によって促進された結果を反映しているに過ぎないという指摘もある。そこで、MTT 代謝物のエキソサイトーシスに関与することが示唆されている Sigma-2 受容体 (J. Neurosci. Res. 2021; 99: 1161-1176.) の阻害剤存在下において MTT アッセイを行った。その結果、阻害剤非存在下と同様の挙動が認められ、Sigma-2 受容体を介した MTT 代謝物のエキソサ

イトーシス促進が細胞への異常現象をもたらしている可能性は低いと考えられた。

(2) GAGによるアミロイド線維形成促進機構とヒト臨床検体におけるEXTL2遺伝子の発現変化に関する解析

- ① 野生型マウス及びEXTL2遺伝子欠損マウスから腹腔マクロファージを単離し、SAAで刺激した後、SAAのプロセッシングに関与するカテプシンの活性化に関わるカスパーゼ1の活性化レベルを測定した。予想通り、野生型マクロファージと比較して、EXTL2欠損マクロファージでカスパーゼ1の活性が高かった。
- ② ヒトの臨床検体(腎臓・大腸)を用いて、AAアミロイドーシス患者でEXTL2遺伝子の発現が劇的に低下していることが明らかになった。EXTL2遺伝子と同じファミリーに属するEXTI1遺伝子の発現は、AAアミロイドーシス患者においてもコントロール検体とほぼ同じレベルの発現を示した。抗EXTL2抗体を用いて組織染色を行うことで、タンパク質レベルでもEXTL2の発現が低下していることが示された。

4. 研究の反省・考察

(1) SAA由来アミロイド線維の細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響

SAA由来アミロイド線維が細胞内での発色色素の代謝過程に関与すると考えられたことから、まずはどのようにSAA由来アミロイド線維が細胞へ取り込まれるかを調査する必要がある。具体的には、Aβペプチド由来アミロイド線維の細胞内取り込みにおいて関与が指摘されているヘパラン硫酸プロテオグリカンや細胞表面受容体を介した取り込み機構を解明する。また、SAAの翻訳後修飾に伴う線維形態の差異が示唆されていることから、今後、細胞への取り込みや細胞毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響についても調べる。

(2) GAGによるアミロイド線維形成促進機構とヒト臨床検体におけるEXTL2遺伝子の発現変化に関する解析

- ① EXTL2遺伝子の欠損により、SAAのプロセッシングに関与するカテプシンの活性化に関わるカスパーゼ1の活性化が起きていることが明らかとなった。SAA受容体としてP2X7受容体が知られており、この受容体の活性化によりインフラマソームが活性化し、カスパーゼ1の活性化を促進することが知られている。EXTL2遺伝子の欠損により合成される疾患関連GAGがどのような機序でP2X7受容体の活性化に関与するかについて調べる必要がある。
- ② AAアミロイドーシス患者の検体を可能な限り入手し、EXTL2遺伝子の発現をRNAレベル及びタンパク質レベルで調べたが、ポピュラーな疾患でないため入手できた検体数に限りがああり、調べた検体数は10例に満たなかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 田中将史、寶田徹、山田俊幸、灘中里美、北川裕之
血清アミロイドAの化学修飾が構造特性やアミロイド線維形成に及ぼす影響
日本薬学会 第143年会、札幌、2023年3月 (ポスター)

(3) 出版物

なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	MHC class II制御異常による炎症性疾患の探索 —新たな炎症性腸疾患発症メカニズムの探索—	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①炎症性腸疾患 ②MHC class II ③制御性T細胞		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医 病 原 微 生 物 学 部 学	主 任 教 授	研 究 統 括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	医 病 原 微 生 物 学 部 学	講 師	免 疫 細 胞 解 析、動 物 実 験
林 周 平	医 国 際 観 光 医 療 学 部 学	准 教 授	臨 床 サンプル 収 集 の マネージメント・統 括
池 内 浩 基	医 消 化 器 外 科 学 部 学 (炎 症 性 腸 疾 患 外 科)	主 任 教 授	臨 床 サンプル 収 集 の マネージメント・統 括
池 田 正 孝	医 消 化 器 外 科 学 部 学 (下 部 消 化 管 外 科)	主 任 教 授	臨 床 サンプル 収 集 の マネージメント・統 括
孫 安 生	医 病 原 微 生 物 学 部 学	助 教	免 疫 細 胞 解 析、動 物 実 験

MHC class II 制御異常による炎症性疾患の探索

— 新たな炎症性腸疾患発症メカニズムの探索 —

1. 研究の目的

炎症性腸疾患 (IBD) に代表される炎症性疾患の原因に T 細胞の異常活性化が注目されており、その観点からの治療法開発が進められている。発症原因として、CD4⁺T 細胞のサブセットのひとつである Th17 細胞が異常分化した病原性 Th17 細胞の出現に注目が集まっている。Th17 細胞の分化は、腸管に存在する CD XX⁺DC の MHC class II (MHC II) を介した抗原提示によって分化誘導・維持される iTreg により制御されていることから、CD XX⁺DC における MHC II の発現異常による iTreg の分化・維持の異常が病原性 Th17 細胞の出現に関与すると考えられる。我々は、MHC II の発現をユビキチン化によって制御する MARCH-I を見出し、その生理学的機能の解析を行っている中で、(1) 腸管にて iTreg を誘導する CD XX⁺DC (粘膜固有層にて抗原を取り込み腸間膜リンパ節に運ぶ樹状細胞) において、MHC II の発現をユビキチン化により抑制する MARCH-I の発現が、CD XX⁺DC と比較して抑制されており、MHC II の発現が亢進していることを見出した。(2) CD XX⁺DC を含むすべての抗原提示細胞の MHC II の発現低下によって、病原性 Th17 細胞が出現し、炎症性腸疾患が起こることを見出した。(3) IBD 患者腸間膜リンパ節の CD XX⁺DC の MHC II の発現が抑制されていた。これらの結果をもとに、CD XX⁺DC の MHC II 発現亢進の異常による病原性 Th17 細胞依存性大腸炎の発症を提唱するに至った。したがって、IBD 発症機構に関する新たな仮説を検証し、治療戦略への道を開くことを本研究の目的とする。具体的には次の 3 つの目的をもって進める。

- ① CD XX⁺ DC の MHC II 発現亢進による腸内環境維持への関与を明らかにする。
- ② CD XX⁺ DC における MARCH-I の発現抑制機構の解明と、抑制機構のブロックによる iTreg の異常および病原性 T 細胞依存性大腸炎発症に関する検討をする。
- ③ IBD 患者の腸間膜リンパ節の CD XX⁺ DC での MHC II 発現異常の分子機構を解明する。

2. 研究の計画

- (1) CD XX⁺ DC の MHC II 発現亢進による腸管環境維持への関与の検討
 - ① CD11c-cre:Y floxマウスとc-MIR Tgの骨髄キメラマウスを作製することで、腸管における CD XX⁺ DC のみにて、MHC II 亢進が抑制されているマウスを作製する。本骨髄キメラマウスを用いて、腸間膜リンパ節での iTreg の異常、腸管炎症を検討する。
- (2) CD XX⁺ DC における MARCH-I の発現抑制機構の解明と、抑制機構のブロックによる iTreg の異常および病原性 T 細胞依存性大腸炎の発症に関する検討
 - ① MARCH-I 発現制御機構の解明
GM-CSFにて骨髄細胞から作製した樹状細胞を用いて、LPS、IL-10の刺激により MARCH-I の発現を検討する。それをもとに、シグナル抑制剤を用いて発現制御機構の推測を行う。
- (3) IBD 患者の腸間膜リンパ節の CD XX⁺ DC での MHC II 発現異常の分子機構の検討
 - ① IBD 患者の腸間膜リンパ節と早期大腸がん患者の腸間膜リンパ節を採取し、CD XX⁺ DC における MHC II の異常に関連する T 細胞の異常について詳細に検討する。

3. 研究の成果

- (1) CD XX⁺ DC の MHC II 発現亢進による腸管環境維持への関与の検討
c-MIR TgとCD11c Cre:Y flox/floxマウスとの骨髄mixed chimeraマウスを作製し、樹状細胞の中でCD XX⁺DCのみにてc-MIRによってMHC IIのユビキチン化の抑制がキャンセルされているマウスを作製した。作製した骨髄キメラマウスの腸間膜リンパ節において、iTregが減少し、病原性Th17細胞の増加を伴う炎症性腸疾患が発症した。これらのことから、CD XX⁺DCにおけるMARCH-Iの発現抑制によるMHC II安定化がiTregを腸管内にて誘導し恒常性の維持に関与している可能性が強く示唆された。
さらに、マウス腸間膜リンパ節でのCD XX⁺DCにてMARCH-Iの拮抗分子であるCDZZの発現が顕著に亢進していることを見出した。これらのことから、CD XX⁺DCにおいて、MARCH-Iの転写レベルにて抑制されていることと、CDZZの発現亢進によるMARCH-Iの機能抑制（すなわち

MHCIIのユビキチン化機能) の2つの抑制によって、MHC IIによる抗原提示が安定化され、iTregが誘導されていると考えられた。そこで、CDZZをDCのみにて欠損するマウスを作製し、MHC IIの発現を検討した。予想通りに、CDZZを発現しているCD XX⁺ DCにのみにてMHC IIの発現抑制が認められた。

(2) CD XX⁺ DCにおける MARCH-I の発現抑制機構の解明と、抑制機構のブロックによる iTreg の異常および病原性 T 細胞依存性大腸炎の発症に関する検討

①MARCH-I発現抑制機構の解明

LPSとIL-10によるMARCH-Iの発現制御による仮説（LPSによるNF-κB, IL-10によるSTAT3がMARCH-Iの発現制御の観点にて拮抗しているとの仮説）を検証するために、それぞれの刺激によるMHC II発現変化を観察し、予想通りの結果を得た。さらに、IL-10の下流であるSTAT3の関与を検討するために、同じSTAT3が関与するIL-6がLPSによるMHC II亢進作用を抑制できるかを検討した。その結果、IL-6は抑制することが出来なかった。したがって、LPSによるMARCH-Iの発現制御に焦点を絞り、LPSの下流であるNF-κBの関与をIKKγ (NEMO) のblockerであるMG132あるいはIKKi VIIの前処理によって検討した。その結果、LPSによるMARCH-Iの抑制が部分的に解除された。これらのことから、NF-κBがMARCH-Iの抑制に関与しており、STAT3は制御に関与していない可能性が示された。

(3) IBD 患者腸間膜リンパ節の CD XX⁺ DC での MHC II 発現異常の分子機構の検討の解析

IBD患者での腸間膜リンパ節におけるCD XX⁺DCの機能が低下している（MHC II発現低下による抗原提示機能の低下）ことが推測されることから、IBD患者の腸間膜リンパ節におけるiTregの検討を行った。その結果、機能的マーカーであるFoxp3の発現が低下傾向にあることを見出した。

4. 研究の反省・考察

(1) CDXX103⁺ DC の MHC II 発現亢進による腸管環境維持への関与の検討

2023年6月の段階において、腸管恒常性において、新たな抗原提示細胞がNatureに報告された。この細胞は現在我々が注目している細胞とは異なっている。したがって、現在の方向性に加えて、新規に発見された細胞についてのMHC II発現制御、そして、MARCH-Iの発現状況についての検討も合わせて行っていくことを念頭に入れる必要がある。さらに、現在注目している細胞が、いくつかのグループから腸管におけるiTregの誘導に関連していない可能性についても報告がなされている。このように、現在、かなりホットな研究領域となっており、最新の情報を掴みながら、研究を進める必要がある。

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

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	安 田 女 子 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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—	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①歯周病、②アルツハイマー型認知症、③ジンジパイン、④脳・腸管バリア機能		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 西 博	安田女子大学薬学部	教 授	実験計画の立案・総括、免疫組織化学的解析、データ解析、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
野 中 さ お り	安田女子大学薬学部	講 師	ジンジバリス菌ならびにマウスの維持・管理、マウス認知機能の解析、腸内細菌叢のメタゲノム解析
北 澤 健 生	安田女子大学薬学部	准 教 授	脳・腸バリア機能に関する培養細胞ならびにマウス個体レベルでの解析
羽 鳥 勇 太	安田女子大学薬学部	講 師	脳血管内皮細胞ならびに腸管上皮細胞におけるジンジパイン—PAR2シグナリングの解析、酸化ストレスの時空間的解析

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

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1:①全身循環を介したルート)。二つ目は唾液経路で、唾液と共に飲み込まれたジンジバリス菌が腸内フローラの変容が生じ、変容した腸内細菌代謝産物や免疫シグナルが認知機能を低下させる(図1:②唾液を介したルート)。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。

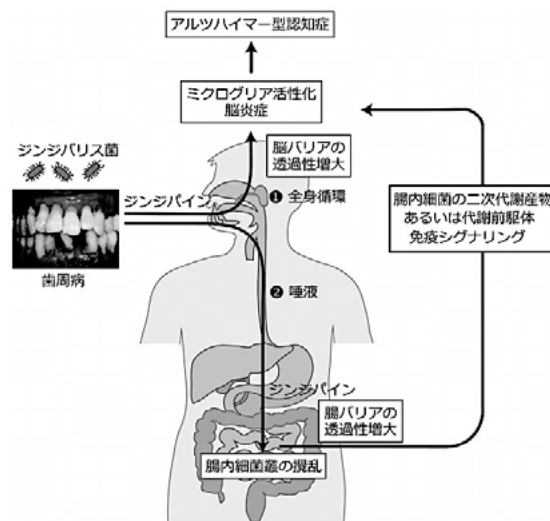


図1: 想定されるジンジパイン作用経路の模式図

本研究では、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ことを目的に以下の研究を行った。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。研究の過程でOMVsがジンジパインを脳・腸に運ぶキャリアとして働くという新知見が得られたため、OMVsに関する研究項目を追加した。

2. 研究の計画

- 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
 - ヒト脳血管内皮細胞(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
 - 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
- 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
 - 脳・腸バリア機能の解析
 - ステップスルー受動回避試験を用いた認知機能の解析

3. 研究の成果

- 脳バリア機能変容メカニズムの解明: 「細胞レベル」での *in vitro* 解析
 - 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。
 - 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ZO-1ならびに

オクルディン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、ZO-1 ならびにオクルディン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。

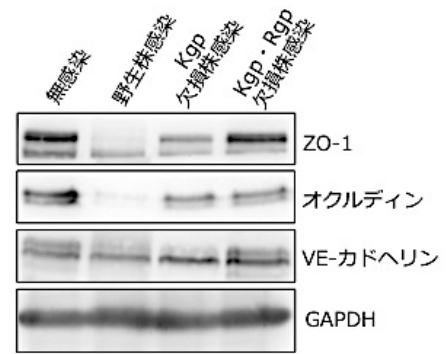


図2 ジンジバリス菌感染によるhCMEC/D3細胞の密着結合タンパク質分解

- 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 ZO-1 ならびにオクルディン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 ZO-1 ならびにオクルディン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 抗ジンジパイン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) 脳バリア機能変容メカニズムの解明：「マウス個体レベル」での *in vivo* 解析

ジンジバリス菌野生株から調整した OMVs を尾静脈内投与したマウスにエバンスブルーを腹腔内投与した。24 時間後、エバンスブルーは脳実質内にもわずかに浸潤が認められた。

以上の結果より、「ジンジバリス菌から分泌された OMVs により全身循環ルートで脳に運ばれた Kgp ならびに Rgp は脳血管内皮細胞内に取り込まれ、ZO-1 ならびにオクルディンを直接分解し、脳バリア透過性を増大させる」ことが明らかになった。

(3) 腸バリア機能変容メカニズムの解明：「細胞レベル」での *in vitro* 解析

① 経上皮電気抵抗測定による透過性の解析

Caco2の単層培養系を用い、経上皮電気抵抗の測定により膜透過性を解析した。野生株から調整したOMVsの管腔側 (apical側) への添加により透過性は有意に増大したが、基底膜側 (basal側) からの添加では変化はなかった (図3)。一方、Kgp/Rgp 欠損株から調整したOMVsの管腔側 (apical側) への添加では透過性増大は認められなかった。

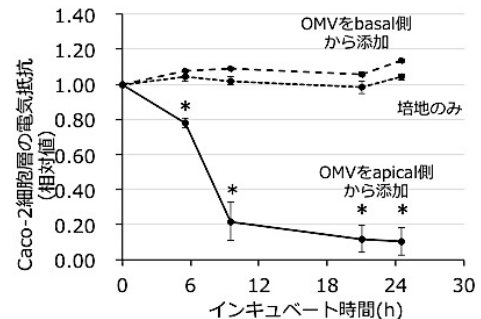


図3 OMV添加時のCaco-2細胞層の電気抵抗値の経時変化

② 腸バリア機能の「細胞レベル」での *in vitro* 解析：密着結合タンパク質の分解

OMVs添加後、Caco-2細胞のZO-1ならびにオクルディンのタンパク質量は有意に減少した。Kgp/Rgp欠損株から調整したOMVsでは、有意な変化は認められなかった (図4)。

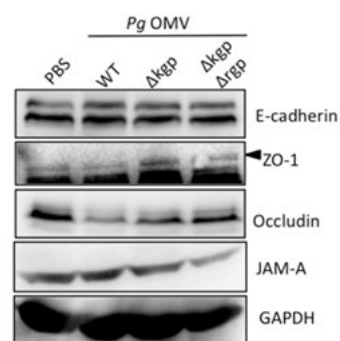


図4 ジンジバリス菌由来OMVsによるCaco2細胞の密着結合タンパク質に分解

③ Cy5 で蛍光標識した OMVs を用いた解析により、OMV はエンドサイトーシスにより Caco-2 細胞に取り込まれ、Kgp ならびに Rgp は初期エンドソームから細胞質に移行することが明らかとなった。

(4) 腸バリア機能変容メカニズムの解明：「マウス個体レベル」での *in vivo* 解析

① 若年 (2ヶ月齢) ならびに中年 (14ヶ月齢) マウスに、野生株または Kgp/Rgp 欠損株由来 OMVs を経口ゾンデにより一日おきに8週間経口投与した。経口的に、若年ならびに中年

マウスに FITC-デキストランを経口投与し、尾静脈から採取した血液中の FITC-デキストラン由来の蛍光を計測することで腸バリア機能透過性の変化を解析した。その結果、若年ならびに中年マウスにおいて、野生株由来 OMVs の経口投与により腸バリアの透過性の増大傾向が認められたが、Kgp/Rgp 欠損株由来 OMVs では透過性の増大傾向は認められなかった。

- ② 腸バリア透過性増大が認められる野生株から調整した OMVs の経口投与により、若年ならびに中年マウスの腸管を摘出し、調整した可溶性分画について密着結合タンパク質に対する抗体を用いたウェスタン解析を行った。その結果、ZO-1 ならびにオクルディンのタンパク質量の有意な低下が認められたが、Kgp/Rgp 欠損株由来 OMVs では認められなかった。

以上の結果より、「ジンジバリス菌から分泌された OMVs により唾液ルートで腸に運ばれた Kgp ならびに Rgp は腸管上皮細胞に取り込まれ、ZO-1 ならびにオクルディンを直接分解し、腸バリア透過性を増大させる」ことが明らかになった。また、若齢ならびに中年マウスにおいて同程度の腸バリアの透過性増大が生じることが明らかとなった。

(5) ステップスルー受動回避試験を用いた学習・記憶機能の解析

野生株から調整した OMVs の経口投与により、1週間目に中年マウスでは学習・記憶機能の有意な低下が認められたが、若齢マウスでは認められなかった。腸バリアの透過性増大は若齢ならびに中年マウスで認められた。この結果より、「腸バリアよりも脳バリア障害が中年マウスにおける学習・記憶機能低下の要因となる」可能性が示唆された。現在、脳バリアの透過性増大、学習・記憶機能ならびに脳炎症の関係を解析中である。

4. 研究の反省・考察

(1) 「ジンジパインが 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。ジンジパ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パイン依存的に増大することが確認できた。しかし、「ジンジパインによる hCMEC/D3 細胞の PAR2 活性化は透過性増大には関与しておらず、ジンジパインによる直接的な密着結合タンパク質 (ZO-1 ならびにオクルディン) 分解で透過性が増大する」ことを突き止めた (*Neurochem Int.* 154:105282, 2022)。
- ② Caco-2 細胞の透過性もジンジパイン依存的に増大することが確認でき、ジンジパインによる直接的な密着結合タンパク質 (ZO-1 ならびにオクルディン) の分解が認められた。一方、透過性の増大に PAR2 は関与しないことが明らかとなった (論文準備中)。

(2) 学習・記憶機能の低下が認められる中年マウスでは低下の認められない若年マウスと比較してジンジパインによるバリア障害が強く表れると予想し解析を行った。しかし、若齢ならびに中年マウスで同程度の腸バリア透過性増大が認められた。一方、マウスを用いた脳バリア機能に関する実験では、実験手技的な問題により脳バリア機能を定量化するまでに至らなかった。この結果より、「腸バリアよりも脳バリア障害が中年マウスにおける学習・記憶機能低下の要因となる」可能性が示唆された。今後、この可能性について検証する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 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.
- ② 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.

- ③ 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.
- ④ Hatori Y, Kanda Y, Nonaka S, Nakanishi H, Kitazawa T: ATP13A2 modifies mitochondrial localization of overexpressed TOM20 to autolysosomal pathway. *PLoS One*, 17:e0276823, 2022.
- ⑤ Inoue E, Minatozaki S, Katsuta Y, Nonaka S, Nakanishi H: Human β -defensin 3 inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced oxidative and inflammatory responses of microglia by suppression of cathepsins B and L. *Int J Mol Sci*, **23**:15099, 2022.
- ⑥ Matsumoto A, Kitazawa T, Hatori Y, Nakanishi H, Watanabe C, Takashima T, Murakami M: Targeting cellular gaps using Janus nanoparticles containing cationic polymers and surfactant lipids. *Drug Discov Ther*, 17:104–113, 2023.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

栄養によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の研究 ーリン酸化がHP1の機能変化に与える効果の研究ー

1. 研究の目的

私たちの体は、摂取する栄養により影響を受け変化するものの、その制御詳細については明らかでない。しかし、その可逆的な性質から、その機構にはエピジェネティクスが関与すると考えられる。エピジェネティクス制御機構には、主に2つの機構（DNAメチル化とヒストン修飾）がある。早い反応には、一般的にヒストン修飾の制御が寄与するため、本研究では、ヒストン修飾を認識し、エピジェネティクス制御の鍵蛋白質であるHP1について、栄養による制御を明らかにする。つまり、本研究は、栄養によるエピジェネティクス制御の分子機構を明らかにすることが目的である。

2. 研究の計画

(1) ゲノムDNAを核内でコンパクトにしまうのに必要なタンパク質として、ヒストン（4種（H2A, H2B, H3, H4））がある。ヒストン分子に、多種多様の化学修飾が導入されると、遺伝子発現やクロマチン形成に影響を与える。本研究では、抑制系のエピジェネティクス制御の「ヒストンH3の9番目のトリメチル化（H3K9me3）」を認識するヘテロクロマチンタンパク質（HP1）に注目する。HP1は、研究代表者が長年研究を続けていたタンパク質であり、転写因子などが近づけないようにクロマチンを固い構造（ヘテロクロマチン）に変化させ、転写抑制に関与する。そのため、HP1の制御研究は、栄養と遺伝子発現とを結びつけうる重要な研究となる。

HP1は2つのドメイン（クロモドメイン（CD）とクロモシヤドウドメイン（CSD））をもち、CDでH3K9me3を認識し、CSDで2量体形成する。CDとCSDを繋ぐHR、CDのN末端側にN-tail、CSDのC側にC-tailがあり（右図）、それらは、立体構造を持たないIntrinsic disorder領域である。HP1上には、多数のリン酸化部位がある。試験管内で、N-tailはカゼインキナーゼII（CKII）によりリン酸化され、CDのH3K9me3への結合活性が10倍程度に促進され（Shimojo et al., Sci Rep 2016）、ゲノム上のターゲット部位へのリクルートが促進されると考えられている。またそのリン酸化は、多量体形成を伴った構造変化を促し、相液相分離が誘導される（Larson et al., Nature 2017）。本計画では、HP1の機能変化、並びにCKIIといった上流の制御との関連性を明らかにし、栄養とエピジェネティックな遺伝子発現制御の一部分を分子レベルで明らかにする。

HP1 α



(2) 細胞内のグルコース濃度、アミノ酸濃度、脂肪酸濃度の栄養条件変化の上昇に伴い、ヘキソサミン生合成経路の最終産物で、栄養センサーと言われているUDP-N-アセチルグルコサミン（UDP-GlcNAc）レベルは上昇する（Bond and Hanover, 2013; Hart et al., 2011; Vaidyanathan et al., 2014）。UDP-GlcNAc濃度上昇に伴い、N-アセチルグルコサミン転移酵素（OGT）活性が上昇する。また、CKIIがO-GlcNAc化されると、その基質特異性が変化する。これらのことから、栄養がエピジェネティクス制御に深く影響していることが推測される。本計画では、栄養によりHP1のリン酸化が変化するか、そのリン酸化部位はどこか、それにより物性に变化があるか、さらにはリン酸化によりゲノム上の特定の領域に集まるか、それに伴いクロマチン構造が変化するか、最終的にエピジェネティックな遺伝子発現制御にどのように関わるかを明らかにする。

細胞がどのように栄養に応答するかという分子メカニズムを調べるために、複数の栄養条件（アミノ酸、ピルビン酸等の含有量を変化させる）で培養細胞を培養し、CKII上のGlcNAc修飾の変化については免疫沈降後質量分析、並びに遺伝子発現抑制に関与するとされるHP1の発現変化についてはウエスタン、リアルタイムPCR等により確認する。同時に、HP1分子上の化学修飾がどのように変化するかを、質量分析により解析して、その変化を明らかにす

る。また、動物肝でも変化が見えるか検討する。

3. 研究の成果

(1) HP1 α の機能について

本研究では、HP1 α の機能変化、並びにCKIIといった上流の制御との関連性を明らかにし、栄養とエピジェネティックな遺伝子発現制御の一部分を、分子レベルで明らかにするのの一つの目的とした。HP1 α の生化学的性質や、遺伝学的性質は、よく知られているものの、それらだけでは、その生理的意義や制御が十分に理解できていない。それらについて、理解を深めることができれば、基礎的分野だけでなく、応用分野にも活かせると考え研究を進めた。

HP1の制御をより深く理解するために、その物性について検討した結果、研究発表(学会誌①)にあるように、これまで明らかにされていない分子運動性について報告できた。具体的には、HP1分子は、2つのドメインとそれを取り囲むように、Intrinsically disordered region (IDR)がある。

これまで、ケミカルクロスリンク法を用いて、HP1のN末端IDRがリン酸化されると、その部分は、正確な結合部位は明らかにされていないものの、分子中央にあってIDRとして知られるヒンジ領域 (HR) に結合するとされている。なお、HRはDNAやRNAにも配列非依存的に結合する。この重要なHR領域は、NMR解析などにより、非常に運動性の高い領域とされていた。私は、まず非リン酸化HP1 α の運動性について、右図に示す位置のアミノ酸にそれぞれ、電子スピンを導入し、その運動性について電子スピン共鳴法を使って詳細に調べた。

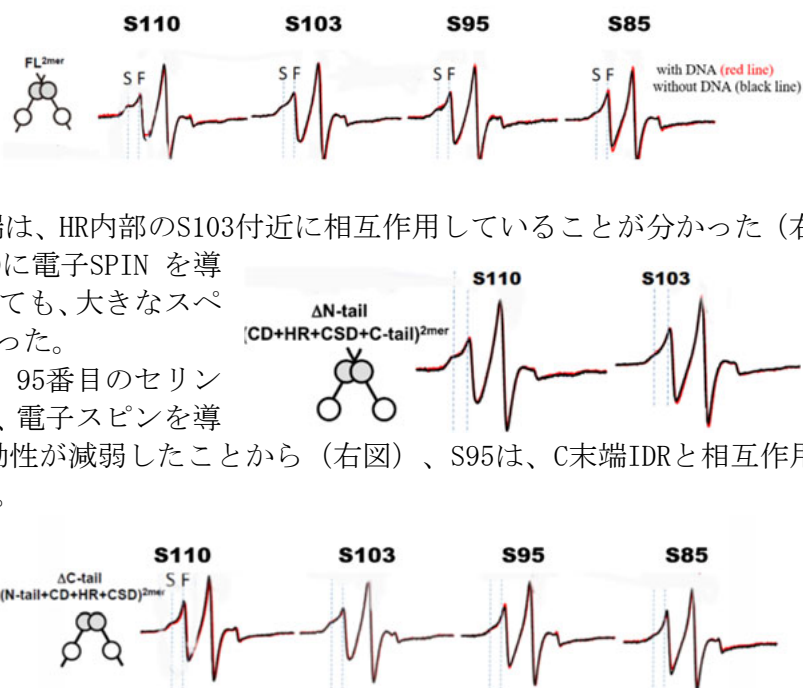
その結果、HR内部では、予想通り運動性が高いスペクトルを示すものの、遅い運動性を示すピーク (SLOW (S)) が現れた。その現れ方は、電子スピン導入部位によって異なることが分かったため、HR領域は均一に運動性が高いわけではなく、部位依存的な運動性を示すことが分かった(右図)。

そこで、103番目のセリン残基 (S103) をシステインに置換し電子SPINを導入し、かつN末端を削除すると、遅い運動性を示すピークが大きく減弱化し、N末端は、HR内部のS103付近に相互作用していることが分かった(右図)。なお、対照として、S110に電子SPINを導入した場合は、N末端を削除しても、大きなスペクトルの変化は認められなかった。

一方、C末端IDRの除去では、95番目のセリン残基をシステインに置換して、電子スピンを導入した場合 (S95)、遅い運動性が減弱したことから(右図)、S95は、C末端IDRと相互作用している可能性が示唆された。

さらに、HP1 α は、2量体を形成するので、この相互作用が2量体間で生じるかを、2量体形成変異体を用いて調べたところ、C末端とHRの相互作用は分子内、一方、N末端とHRの相互作用は2量体間(分子間)で生じていることが示唆された。なお、これらスペクトル測定時に、HRに結合するとされるDNAを加えても、スペクトルに大きな変化が見いだせなかったため、DNAはHRとFuzzyな結合をしているものと考えている。驚いたことに、HRでなく、CDの運動性が、DNAを添加することで抑制されることを見出し、同時に報告した。

以上これらは、非リン酸化HP1 α を用いた研究であるが、今後、N末端がリン酸化されたときのHP1 α の制御を理解するうえで、重要な発見になると考えている。



(2) 細胞の栄養応答性について

この領域の研究は、まず細胞内での HP1 α や CKII 分子上の GlcNAc 修飾を市販の抗体（所有していた分もあるが）を用いて検討しようと様々試みたが、非常に難航し、研究が進展していない。つまり、GlcNAc 修飾が、安定に検出できなかったため、さらなる検討が要される。同時に、糖化修飾を行う酵素の発現は終わっているが、安定的に活性を得ていないため、それに関する研究も遅延している。

HP1 α のリン酸化については、リン酸化酵素である CKII 発現ベクターを入手したが、リン酸化 HP1 α を安定に発現精製するには至っていないが、近日中に可能になる見込みである。なお、すでに、複数の培養細胞を安定に培養する準備、リアルタイム PCR、ウエスタンなどの SETUP は整えることを終了した。抗体で簡便に検出する系が立ち上がり次第、より詳細な質量分析解析を、共同研究者と共に進める準備を整えている。

4. 研究の反省・考察

(1) HP1 α の機能について

研究をスタートして、HP1 α の分子ダイナミクスを検討すると、リン酸化される前の対照となる「非リン酸化 HP1 α の分子ダイナミクス」も、十分に理解されていないため、その解析に時間を要した。与えられた研究期間のため、非リン酸化の HP1 α について先行して研究・発表した（学会誌①(Suetake et al., 2023)）。

リン酸化部位の確定はできないものの、大腸菌内で主に HP1 α の N 末端がリン酸化されるといわれる実験条件を整えた。早急に研究成果を得るため、同時並行してリン酸化 MIMIC の変異体による研究を進めてきた。現在、preliminary ではあるが、驚いたことに、N 末端にリン酸化 MIMIC の変異を入れ、HR に結合するとされる条件にしても、その変異近傍のアミノ酸の運動性は低下せず、隣にある CD ドメインの運動性が低下することを見出した（未発表）。現在のところ、このリン酸化は、安定した生化学的結合を促進するのではなく、分子間・分子内で Fuzzy な結合を担っていると考えている。その点について、さらに研究を進めている。将来、詳細解析に必要な「半合成リン酸化 HP1 α 」について、NMR 解析により、タンパク質の変性・再生がうまく行きそうな部位を検討し、その部位を利用してリン酸化合成ペプチドと連結して用意する準備を整えている。

このように、栄養の分子機構を詳細に理解するため、物性の理解を進めている。今後、この課題領域については、進展があると考えている。

(2) 細胞の栄養応答性について

① GlcNAc 修飾抗体の反応性について

いくつかの抗体を使って検討したが、現在では信号が不安定であり、安定検出に至っていない。もちろん、脱糖鎖化阻害剤の検討も行ってきた。安定検出できていないため、培養細胞や動物肝を用いた実験が進行していない。研究計画時には、複数の市販抗体や論文があるため、容易に検出できると踏んだが問題である。

② OGT について

OGT は大腸菌で発現する準備がすでにできており、タグを複数変更すると共に、タグを除去する作業も行った。しかしながら、組換え体には、安定な糖化活性が認められなかった。そのため、本来であれば、全長の分子を使って解析する必要があるが、活性条件を検討するため、市販酵素の発現領域に絞り込んだ発現ベクターを作り終えたところである。この部分領域の組換え体には、安定に活性が認められ、全長酵素に活性が得られることになれば、すみやかに CKII などを処理して、酵素活性に影響を与えられるかを調べることができる。なお、OGT は、分子量が大きいため、経験的に大腸菌で安定精製ができるか心配があったが、研究計画時に調べた際、大腸菌発現による酵素を用いての活性やその構造の報告があるため、当方でも比較的容易に活性を手に入れることができると思ったのが問題である。

結論として、最も大きな反省点としてあげられるのは、タンパク質糖鎖（GlcNAc 修飾、OGT）に関して、多大な時間を要してしまい、計画通りに、研究が進んでいないことである。しかしながら、その過程で、順調であれば得られなかった想定外の経験を積むことにより、近い

うちに、何らかの業績として発表しうる研究の基盤を得た。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① **Suetake I***, Sato K, Sugishita T, Mishima Y, Takei T, Fujiwara T, Mutoh R, Shinohara A, Takui T, Miyata M, Hojo H, Arata T*. (2023) Dynamics of the HP1 Hinge Region with DNA Measured by Site-directed Spin Labeling-EPR Spectroscopy, *Appl Magn Reson.* **54**, 119–141. (*; corresponding) doi; 10.1007/s00723-022-01519-2

(2) 口頭発表

① **末武勲** ヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) の動的理解、2023年3月3日、大阪大学蛋白質研究所セミナー タンパク質に挑戦する化学

(3) 出版物

① **Suetake I**, Mutoh R, Mishima Y, So M, Hojo H, Biological application of EPR. in Analytical techniques for the elucidation of protein function, pp. 13-38, **Suetake I**, Sharma RK, Hojo H, eds. Wiley. 2023

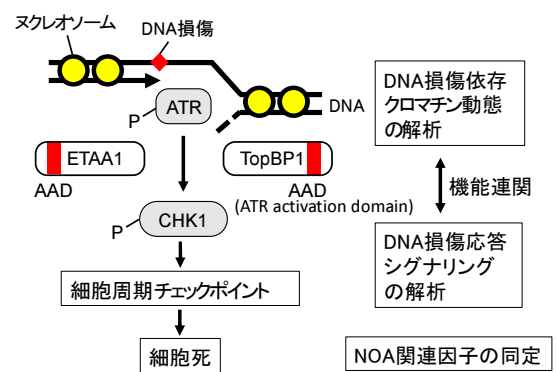
DNA 損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明

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、その鍵となる 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。同定した因子についてはノックダウン/ノックアウト細胞を樹立し、細胞死誘導制御における機能を検証する。本研究で得られた知見をもとに、癌細胞固有な特徴である non-oncogene addiction (NOA) を標的とした新しい化学療法への展開を図る。



クロマチン動態とDNA損傷応答に依存した細胞死機構の解明

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷クロマチン動態の可視化とそこに集積するタンパク質の同定

損傷クロマチンには細胞死誘導の制御に関わる多くのタンパク質が経時的に集積すると考えられる。ビオチン標識したオリゴDNAをATAC法にて挿入し、DNA損傷領域特異的に集積している関連タンパク質をストレプトアビジンビーズとの親和性を利用して単離する。単離したタンパク質を質量分析し、細胞死関連因子として同定する。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① ATR activation domain (AAD) の機能解析

TopBP1とETAA1はともにAAD(約162アミノ酸配列)を持つが、それらがどのようにATR/CHK1経路の活性化に関与するのかは未だ明らかになっていない。RouxらのBio-ID法 (Roux et al., J. Cell Biol., 2012) を応用して、それぞれの因子のAADと相互作用するタンパク質を同定する。具体的には、ビオチンリガーゼBirAとAAD (TopBP1あるいはETAA1由来) の融合タ

ンパク質を細胞内で発現させることで、BirA融合AADとの相互作用因子はビオチン化され、親和性ビーズを用いて特異的に精製できる。精製タンパク質の質量分析を行い、新規の損傷応答シグナリング因子として同定する。

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 損傷クロマチン動態の可視化とそこに集積するタンパク質の同定

精製した Tn5 タンパクと標識オリゴ DNA を混合後に細胞に導入することで、DNA のアルキル化損傷に応答したオープンクロマチン領域と思われるシグナルを顕微鏡下で確認することができた。ただし、その効率が期待したほど高くなかったため、現在、Tn5 の導入効率を上げる条件の検討を行なっている。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① ATR activation domain (AAD) の機能解析

前年度のTopBP1-KD細胞の解析に続けてETAA1-KD細胞の解析を進めたところ、TopBP1/ETAA1-double KD細胞は、それぞれのsingle KD細胞に比べてアルキル化剤に対する感受性が亢進することが明らかとなった。single KD細胞とdouble KD細胞のDNA損傷応答を比較解析したところ、アルキル化剤処理に応答してTopBP1-single KD細胞ではCHK1 (S317) のリン酸化の低下と一本鎖DNA結合タンパクであるRPA2(S8) のリン酸化の亢進が観察された。それに対して、ETAA1-single KD細胞ではCHK1のリン酸化の亢進とRPA2のリン酸化の低下が観察された。TopBP1/ETAA1-double KD細胞では、予備的ではあるがTopBP1-single KD細胞とほぼ同様な結果が得られた。

TopBP1とETAA1が共に有するAADの機能解析においては、それぞれのAADに保存されており、その機能に必須なアミノ酸に変異を導入した変異型AAD (AAD領域のみ) の発現プラスミドを構築した。そのプラスミドを細胞内に導入し変異型AADペプチドを発現させたところ、細胞の化学療法剤に対する感受性への影響を確認することはできなかった。現在は変異型TopBP1 (全長) の発現プラスミドを構築し、影響を及ぼすのに必要な領域の同定をすすめている。

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 損傷クロマチン動態の可視化とそこに集積するタンパク質の同定

DNA損傷に応答したオープンクロマチンの形成は確認することはできたが、その効率は損傷クロマチンに集積してくるタンパク質の単離同定のためには未だ不十分であると考えられる。そこで現在、Tn5の導入効率を上げる条件の検討を行っており、至適条件確立後に、ビオチン標識したオリゴDNAとストレプトアビジンビーズとの親和性を利用して集積タンパク質を単離する。単離したタンパク質を質量分析し、細胞死関連因子として同定する。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① ATR activation domain (AAD) の機能解析

TopBP1とETAA1が共に有するAADがどのようにDNA損傷応答の活性化に関与するのかは未だ明らかになっていない。TopBP1のAADにおいて、1071番目のPheと1145番目のTrpがその活性に必須であるが、この2つのアミノ酸はETAA1のAADにおいても保存されている。そこで、この部位にアミノ酸置換を導入した変異型AADを細胞内で発現させ、細胞の化学療法剤に対する感受性への影響を解析した。その結果、変異型AADペプチドのみではその影響を確認することはできなかった。ただし、TopBP1とETAA1はそれぞれホモ二量体を形成して機能している (Thada & Cortez, J. Biol. Chem., 2020)、導入した変異タンパク質がドミナントネガティブとして機能するためには、二量体の形成に必要なドメインも必要であると考えられる。今後は二量体形成ドメインを同定し、それと融合したAAD (機能性AAD) を構築し解析することで、AADのDNA損傷応答と細胞死誘導における機能を明らかにする。さらに、この機能性AADをbaitとしたBio-ID法による解析を行い、機能性AADの近傍に位置するタンパク質を新規の損傷応答シグナリング因子として同定する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Takedachi A., Matsuishi E., Mizusaki S., Nagasawa T., Fujikane R., Hidaka M., Iwai S., Kuraoka I. Novel plasmids for the fluorescence-based evaluation of DNA mismatch repair in human cells. *Mutat. Res.*, 2022 Apr 9;824:111779. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2022.111779.
- ② Oka S., Tsuzuki T., Hidaka M., Ohno M., Nakatsu Y., Sekiguchi M. Endogenous ROS production in early differentiation state suppresses endoderm differentiation via transient FOXC1 expression. *Cell Death Discov.* Apr 1;8(1):150. 2022, <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00961-2>

(2) 口頭発表

- ① 藤兼亮輔、上地有香、森田祥、得居果乃、日高真純. アルキル化損傷応答におけるミスマッチ修復因子PMS1の機能. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日
- ② 森田祥、藤兼亮輔、上地有香、松浦尚志、日高真純. アルキル化損傷応答におけるミスマッチ修復因子FANCD2の役割. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日
- ③ 上地有香、藤兼亮輔、森田祥、玉置幸雄、日高真純. アポトーシス誘導におけるミBLM-スマッチ修復タンパク質複合体の機能解析. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日
- ④ 竹立新人、白川知樹、松石英莉那、水崎彰治、長澤知樹、藤兼亮輔、日高真純、岩井成憲、倉岡功. 生細胞のミスマッチ修復能をリアルタイムで評価できるプラスミドの構築と評価. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日

(3) 出版物

なし

産後うつ病予防に対する WRAP を用いたピアサポーターの効果検証 ー産後うつ病および虐待予防のためのピアサポート体制構築ー

1. 研究の目的

本研究では、インターネットやサークル等を利用したピアサポートを強化することが産後うつ病予防につながると考え、Wellness Recovery Action Plan (以下、WRAP) に着目した。

「WRAP」とは日本では「元気回復行動プラン」と翻訳され、治療や療法ではなく、よりよい精神的健康、維持および回復のために自分自身の状態を把握し、その状態に応じて、対処行動を作成する「自分の取り扱い技法」と呼ばれている。WRAP のグループ介入は 2010 年アメリカ連邦政府から Evidence based Practice として認証され、その効果について明らかにされてきた。日本においては自己肯定意識尺度が向上し、日本語版 POMS の「疲労」が低下することが明らかにされている。

本研究では、子育てピアサポーターのメンタルヘルスに対する WRAP を活用したグループプログラムの効果と、周産期における当事者主体のサポートネットワークの構築の可能性と課題を明らかにすることを目的とする。初年度は子育てピアサポーターを対象者とした WRAP および WRAP ファシリテーター養成講座を開催し、参加した子育てピアサポーターにインタビューを実施する。その結果をもとに、WRAP の活用や WRAP 参加による自分自身の変化、WRAP 導入による効果及び障壁、障壁を解消するための方策を明らかにする。

本研究の最終目的は以下の通りである。

- (1) ピアサポーターによる WRAP を用いた産後うつ病および児童虐待予防の効果の検証
- (2) 産後うつ病および虐待予防のためのピアサポート体制構築

2. 研究の計画

(1) WRAP の活用や WRAP 参加による自分自身の変化、WRAP 導入による効果及び障壁、障壁を解消するための方策についての検証

①研究デザイン：質的記述的研究

②参加者

ホームページを作成し、ホームページ上に子育て中の両親及びその方々をサポートする立場にある方を対象とした WRAP を開催することを掲載し、募集する。さらに、熊本県内の子育て支援センターや保健所にチラシを配布し、募集する。

③WRAP の運営方法

1 回のセッションは 1 時間 30 分とし、1 クールは 8 セッションとする。1 セッションを原則 2 週間毎に行い、1 クールを約 3 ヶ月かけて開催する。開催は、金曜日 10 時からの昼間コースと、22 時からの夜コースとし、各 8 名ずつの計 16 名を募集する。セッションはコロナ禍であることも踏まえ、WEB 会議システム ZOOM を使用し、WRAP の 5 つのキーコンセプト（希望、主体性、学ぶこと、権利擁護、サポート）と各パートのエッセンス（元気に役立つ工具箱、いい感じの自分、日常生活プラン、注意サイン、引き金、深刻な乱れ、クライシス、クライシス後のプラン）それぞれのサインと行動プランを 8 回に分けて実施する。ファシリテーター 1 名とサポーター 1~2 名の計 2~3 名で運営し、運営スタッフも参加者の一員となり、WRAP を作成する。

④データ収集方法

インタビューは研究者 1 名と対象者 1 名で、インタビューガイドを用いて実施する。インタビューの回数は 1 回とし、時間は約 20~40 分で実施する。インタビューの内容は「WRAP の集中クラスの研修内容についての理解」「WRAP の周産期の母親及び家族のメンタルヘルスに与える効果」「WRAP の活用・運用方法について」「WRAP に参加したことによる自分自身の変化」の 4 点で、同意を得て IC レコーダーに録音し、対面で行う場合はプライバシーが確保できる場所を使用する。ZOOM を利用した場合についても、対面と同様に、研究者および対象者ともにプライバシーが確保できる場所を使用する。

⑤データ分析方法

IC レコーダーに録音した音声を逐語録に起こし、コード化した後、類似したコード内容

を集め、サブカテゴリー化する。分析は「WRAP の効果と課題」を焦点とし、関連のあるデータに着目する。分析過程においては、メンタルヘルスケアおよび母性看護学の経験を有する研究者3名で討議を重ね、信頼性の担保に努める。

⑥倫理的配慮

本研究は、九州看護福祉大学倫理委員会の承認を得て実施する。WRAP クラス資料送付時に説明書を送付し、承諾を得られた研究参加者に対して、研究の目的と概要、調査協力の任意性、拒否・撤回の自由、研究参加に伴い生じうる不利益、個人情報保護、結果の公表などについて、研究者が文書と口頭で説明し、同意書を交わす。インタビューの日時及び方法（対面またはZOOM利用）は、研究参加者の希望に合わせて設定する。対象者の表情や話し方にも目を配り実施する。

(2) WRAP ファシリテーター養成講座の開催と、参加者がファシリテーターとして WRAP を導入することによる効果及び障壁についての検証

①研究デザイン：質的記述的研究

②参加者：WRAP のセッション参加者に、WRAP クラスの際に募集する。

③WRAP ファシリテーター養成講座の運営方法

セッションは1日7時間、2023年3月17日から21日の5日間、熊本市内にて開催する。コーブランドセンターから認定されたアドバンスファシリテーターが規定のプログラムを実施し、アドバンスファシリテーター2名とサポーター3~4名の計5~6名で運営する。

④データ収集方法

(1)の研究と同様に実施する。

インタビュー内容は「WRAP ファシリテーター養成講座についての理解」「WRAP ファシリテーター養成講座に参加したことによる自分自身の変化」である。

⑤倫理的配慮

(1)の研究と同様の手順にて実施する。

3. 研究の成果

(1) 子育てピアサポーター及び子育て中の父母を対象者とした WRAP の開催と効果検証

ZOOM を利用した WRAP 定期クラスの参加者は1回目が15名、2回目が12名であった。その中で5回以上の出席があった研究対象者は5名であった。5名全員より研究参加の同意が得られたため、インタビュー調査を行った。

質問紙調査については、3回とも適切な時期に回答があった参加者がいなかった。対面での WRAP 集中クラスは申し込みが3名、参加者が2名であったが、研究参加の同意を得られなかったため、調査を行うことができなかった。現在、投稿に向けて調査結果を分析している。

(2) ファシリテーター養成講座

ファシリテーター養成講座参加者は15名であった。そのうち、妊娠中の参加者1名を除いた14名が、今後 WRAP ファシリテーターとして活動する意志を示している。2023年度7月以降の参加者に対して、WRAP ファシリテーター養成講座後の心身への効果とピアサポーターとして活動する際の課題についてインタビュー調査を行う。

4. 研究の反省・考察

(1) 子育てピアサポーター及び子育て中の父母を対象者とした WRAP の開催と効果検証

参加者へのインタビューから、WRAP の効果は確認できたが、一方で参加者が目標数に達しなかった。ホームページへの掲載や子育て支援センターへのチラシの配布等を行ったが、チラシを見て参加する者はいなかった。参加動機を尋ねると、「口コミ」や「知り合いの Facebook」など近い人からの誘いであった。今後はファシリテーター養成講座を受講した参加者を通じて募集を行うか、もしくは WRAP について詳しく記載した独自のパンフレット（出版物）などを作成し、参加への障壁を軽減する必要があると考えた。

(2) ファシリテーター養成講座

参加者数は目標を達成した。2023年度に調査を行い、効果を検証していく。

5. 研究発表

なし

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	沖繩科学技術大学院大学	研究所名等	サイエンス・テクノロジー・グループ
研 究 課 題	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-	研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①量子技術, ②量子デバイス, ③量子情報科学, ④スピン共鳴, ⑤ハイブリッド量子系, ⑥量子コンピュータ, ⑦極低温物性		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
久 保 結 丸	サイエンス・テクノロジー・グループ	サイエンス・テクノロジー・アソシエイト	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
バ ッ タ チ ャ ラ ル パ ッ ク	沖繩科学技術大学院大学 サイエンス・テクノロジー・グループ	博士研究員	デバイス作成・測定・データ解析
太 田 守 洋	沖繩科学技術大学院大学 量子情報物理実験ユニット	博士課程生	デバイス作成・測定・データ解析
寺 井 弘 高	国立研究開発法人 情報通信研究機構 未来 ICT 研究所	上席研究員	デバイス作成補助
濱 元 樹	沖繩科学技術大学院大学 量子情報物理実験ユニット	博士課程生	デバイス作成・測定・データ解析
高 橋 優 樹	沖繩科学技術大学院大学 量子情報物理実験ユニット	准 教 授	データ解析補助

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) 量子情報技術

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、第4次産業革命及びSociety 5.0時代の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、開発研究が世界中で繰り広げられている。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ている。

(2) 極低温マイクロ波量子技術

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10 mK)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0.1 pW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。

(3) スピンメーザー増幅

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

(1) 微小な導波路の作成

①初年度の成果で述べたように、超伝導導波路の幅を1-数ミクロン程度に狭める。このために、研究代表者の所属機関に存在する電子線描画装置、もしくは研究分担者(寺井)の所属機関(NICT)に存在するマスクレス高精度光学描画装置を使用する。

(2) 強磁性体薄膜による局所磁場の印加

①初年度で見出した最適動作点の磁場が導波路付近に印加されるように強磁性体薄膜の位置と形状を設計して試作する。強磁性体薄膜はルビー上、もしくは導波路がパターンされている超伝導回路上にスパッタして堆積させる。

(3) パッケージ化

上記の強磁性体を組み込んだデバイスの形状が出来上がり次第、導波路、ルビー結晶を内蔵し、外側を磁気シールドで覆ったパッケージデバイスを試作し、極低温において動作確認する。この際、磁気シールドの素材として磁性を持った軟鋼を使用する。

3. 研究の成果

(1) 微小な導波路の作成

①微小導波路デバイスの作製を開始した。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設計及び試作した。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た。

②設計を進めていく過程で、強度が強いポンプマイクロ波によって信号線に熱雑音が発生してしまう恐れがあるため、微弱なマイクロ波信号とは別の経路でメーザー増幅導波路に送ることが望ましいことを理論的に見出した。このため、ダイプレキサ(低周波と高周波の結合器または分流器)を超伝導体でチップ上に作り込むことが必要になった。これを実

現するために企業（オリエントマイクロウェーブ）と共同研究を開始し、電磁界シミュレータを用いての試作品の設計をした。

(2) 強磁性体薄膜による局所磁場の印加

①強磁性体薄膜をデバイスに追加する前に超伝導薄膜上に堆積させるには特殊な装置をノウハウが必要なことが判明し、また上記のダイプレキサの設計・試作が研究の工程に新たに加わったためにこの項目は延期した。

(3) パッケージ化

(1)-②のオンチップのダイプレキサ設計と同時にパッケージデザインも終え、試作にとりかかった。この項目に関しては少し遅れている。

4. 研究の反省・考察

(1) 微小な導波路の作成

②に関して、常伝導体を用いることに起因する発熱量を見積もっておくべきであった。これによりオンチップのダイプレキサデバイスの作製に早くから着手することが可能になったはずであり、計画がより早く進展していただろう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

特になし

(2) 口頭発表

① Yuimaru Kubo, “A “masing” Spin Ensemble: Maser for Quantum Information Technologies”, 招待講演, On-line Colloquium at City University of Hong Kong, 2022/10/19

② Yuimaru Kubo, “Thermally Induced Negative Temperature in Diamond,” OIST Center for Quantum Technologies Mini Symposium, OIST, 2022/11/9

③ Yuimaru Kubo, “Towards Thermally Pumped Maser Oscillation in Diamond,” Spins in London, University College London, 2022/11/24

④ Yuimaru Kubo, “Towards Thermally Driven Maser Oscillation,” 招待講演, NanoFrontier Materials Conference 2022 (NFM2022), NIMS Tsukuba, 2022/12/28

(3) 出版物

特になし

2022年度(第47回)学術研究振興資金 学術研究報告

令和5年10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