

2023 年度（第 48 回）
学 術 研 究 振 興 資 金
The Science Research Promotion Fund
学 術 研 究 報 告

令和 6 年 10 月

はじめに

この報告書は、2023 年度（第 48 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、高等専門学校の学術研究の振興のために、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 6 年 5 月末までに配付した資金総額は、3,528 件、82 億 7,138 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 6 年 8 月末で、54 億 1,609 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 6 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 2023 年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況
- II 学術研究振興基金 年度別受領状況
- III 学術研究振興資金 研究分野別配付状況
- IV 2023 年度学術研究振興資金 研究課題一覧
- V 2023 年度（第 48 回）学術研究振興資金 学術研究報告

I 2023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			127	295, 130	37	80, 600	29. 1%
内 訳	新規・継続別	新 規	100	222, 330	15	37, 300	15. 0%
		継 続 2 年 目	18	55, 100	16	34, 200	88. 9%
		継 続 3 年 目	9	17, 700	6	9, 100	66. 7%
	学校種別	大 学	125	292, 830	37	80, 600	29. 6%
		短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	2	2, 300	0	0	0. 0%
	研究区分別	人 文 ・ 社 会 科 学 系	33	38, 530	10	9, 500	30. 3%
		理 工 系 、 農 学 系	36	99, 800	10	24, 100	27. 8%
		生 物 学 系 、 医 学 系	58	156, 800	17	47, 000	29. 3%

IV 2023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	北海商科大学	経済学	農産物の安定的輸送力確保にむけたパレット運用方法・制度の設計	700
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	1,400
3	学習院大学	理学(理工系)	典型元素の利活用による先進的有機分子変換法の開発	4,200
4	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	4,200
5	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	4,200
6	東京慈恵会医科大学	医学	多次元分析から観た病態へ至る副甲状腺細胞の立ち居振る舞い	2,100
7	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	400
8	順天堂大学	医学	UFMIシステムが駆動する小胞体ホメオスターシス:その破綻と遺伝性脳症	4,200
9	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
10	成城大学	文学	「山村・海村・離島調査」の創造的継承と発展に向けた基礎的研究	300
11	創価大学	農学	難培養性微細藻類の成長促進物質の特定と新規成長培地の研究開発	4,200
12	東海大学	理学(理工系)	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
13	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
14	東京女子医科大学	医学	関節リウマチ発症高リスク個体の免疫異常の探索	4,200
15	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
16	東京理科大学	理学(理工系)	ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御	1,000
17	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	2,800
18	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
19	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	3,400
20	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
21	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	500
22	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	3,000
23	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
24	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
25	聖マリアンナ医科大学	医学	HTLV-1関連脊髄症発症を決定する宿主-ウイルス因子解明	4,200
26	桐蔭横浜大学	工学	宇宙用途に向けた高効率・高信頼性ペロブスカイト太陽電池の作製	700
27	光産業創成大学院大学	理学(生物学系)	弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージング	800
28	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	400
29	中部大学	理学(生物学系)	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	京都女子大学	文学	認知症予防を目的とした遠隔健康サポートプログラムの構築	2,100

IV 2023年度学術研究振興資金 研究課題一覧

	学校名	研究分野	研 究 課 題	配付額 (千円)
31	大阪工業大学	環境科学	排CO2ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築	2,100
32	関西医科大学	医学	尿路上皮がん間質細胞による新規がん悪性化機構の解明	2,800
33	関西学院大学	理学(理工系)	X線自由電子レーザーによるX線誘起フェムト秒磁気ダイナミクス	2,800
34	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	4,200
35	天理大学	文学	東地中海地域における鉄器時代の始まりと地域社会の変容	1,900
36	福岡歯科大学	医学	DNA損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明	1,400
37	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	400
			配付額計	80,600

(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、原子力科学を、「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 2023 年度（第 48 回）

學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	北 海 商 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	農産物の安定的輸送力確保にむけたパレット運用方法・制度の設計 —パレット一貫輸送が齎す経済価値と各主体の便益・負担の観点から—		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	① パレット化推進、②物流効率化、③地域物流		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
相 浦 宣 徳	北 海 商 科 大 学 大 学 院 商 学 研 究 科	教 授	全体総括、取り纏め、フレームワークの構築、データ分析、パレット運用シミュレーションモデルの構築、各プレイヤの受益と負担意の分析、パレット使用による一貫流通システムの運用方法の検討

○研究分担者

[illegible]

農産物の安定的輸送力確保にむけたパレット運用方法・制度の設計 ーパレット一貫輸送が齎す経済価値と 各主体の便益・負担の観点からー

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

近年の世界情勢の不安定さから、全ての国民が安定的に食料を入手できるよう、食の安全保障の担保が危機感をもって強く報じられている。加えて、深刻化する「トラックドライバー不足」や、2024年4月から発動された「働き方改革による労働時間の制約」等により、ここ数年の間に、農産品輸送に関わる労働力不足がさらに進行し、輸送力低下に起因する農産品供給力の弱まり、ひいては食の安全保障が脅かされる事態となる恐れが非常に強い。

本研究で対象とする「農産物流通におけるパレット輸送の推進」は、輸送力低下に対する最も有力な施策として、2016年の「農産品物流対策関係省庁連絡会議(農林水産省・経済産業省・国土交通省)」を皮切りとして、盛んに議論され、生産者から消費者までを結ぶ「一貫パレチゼーション(荷物をパレットに載せたまま出発地から到着地まで輸送する仕組み)」が目指されている。しかしながら、後述する課題から、農産物流通における一貫パレチゼーションへの転換は他の分野と比べて大きく遅れており、「農産物のパレット先進地域」と称される北海道地域でさえも使用率は約27%に留まっている(ホクレン農業協同組合連合会2019年度実績)。

多くの実証実験等で有効性が確認されているにも関わらず、農産物流通において一貫パレチゼーションが進まない原因・課題は、研究代表者が登壇した「農林水産省シンポジウム・サステナブルな食品輸送の実現へ(2020.11)」での議論によると、以下の3点に帰結される。「運用・マネジメントの困難さ」、「費用負担に対する抵抗」、「危機意識の欠落」である。

(2) 目的

以上から、本研究では「農産物流通における一貫パレチゼーションは、各プレイヤー(生産地の集出荷・農協、農産物の輸送に係る物流事業者、北海道外の卸売市場や食品製造業者など)が単独で成し得るものではなく、サプライチェーン全体(一貫した物流システム全体)でなされるべきである」と考え、次のテーマ1~3を明らかにすることを目的とする。

(テーマ1) 農産物サプライチェーンにおいて、パレットの回収率の向上、運用効率・利便性の向上を達成する運用・マネジメント方法の在り方

(テーマ2) パレット化に伴う費用増分をサプライチェーン全体に係る共通経費と捉えたパレット導入・運用のための支援策・制度の在り方

(テーマ3) プレイヤー間の危機感の共有・連携認識の醸成にむけた啓蒙活動の在り方

2. 研究の計画

(1) アンケート調査の実績

プレイヤーに対するアンケート調査は本研究の基盤となるものであり、本研究(事業)の計画段階において、既に、アンケート調査を学校法人北海学園の助成(2021-22)を受け実施しており、回収結果のデータ化を進めている段階にあった。

(調査の概要)

- ・ 対象としたプレイヤー : (あ)生産地の集出荷・農協等、(い)農産物の輸送に係る物流事業者、(う)北海道外の卸売市場、(え)北海道外の食品製造業者など

- ・ 主な調査内容：(あ)CVM分析に係る項目、(い)一貫パレチゼーションの実現にむけた進捗度合いなど

(2) CVM 調査の実施と一貫パレチゼーションによる経済的価値の推計

仮想的市場評価法（Contingent Valuation Method：以下CVMと称する）により、「パレット使用による一貫流通システム」の導入に対する各プレイヤーの支払意思額を調査し、システム全体としての経済的価値を推計する。推計される経済的価値は、各プレイヤーが得る金銭的な価値および作業負担の軽減や労働環境の改善といった金銭以外の価値の合計として解釈できる。また、プレイヤーごとの支払意思額の比較から「パレット使用による一貫流通システム」導入に対する各プレイヤーの意向を定量的に評価することができる。

3. 研究の成果

(1) CVM 調査の実施と一貫パレチゼーションによる経済的価値の推計

CVM 調査により、プレイヤーごとの支払意思額(Willingness To Pay：以下 WTP という)を推計し「パレット使用による一貫流通システム導入」に対する各プレイヤーの経済的価値を定量的に評価した。なお、ここで推計される WTP は、各プレイヤーが得る直接的なメリット(利用価値)と、作業負担の軽減や労働環境の改善等の間接的なメリット(非利用価値)との総合評価額として解釈できる。

本調査では、「パレット化が 100%実現される場合の負担金として支払ってもよい金額」をパレット 1 枚・回あたり 100 円、200 円、300 円、400 円、500 円、1,000 円、2,000 円の 7 段階で提示してそれぞれについて賛成・反対を質問し、全回答から抵抗回答や無理解回答を除去した正常回答の賛成率曲線をパラメトリック法に基づき推定し、WTP 平均値を求めた。

プレイヤーごとの WTP 推計結果は、(あ)集出荷団体 666 円(N=39)、(い)物流事業者 328 円(N=32)、(う)市場・卸売事業者 198 円(N=23)となった(*1)。サンプル数がいずれも 30 程度と、WTP の統計的精度としては粗い結果と言わざるを得ないが、(あ)集出荷団体の WTP が突出して高く、川下に向かうにつれ、低くなっていることがわかる。これは、先行研究(*2)の「パレット化は川上である生産地と産地側の物流事業者が主導しており、運用に関する費用などの負担も川上に偏在している」という指摘にも合致している。

(2) 追加アンケート調査

本研究(事業)の計画段階において、既に実施していたアンケート調査に加え、より精度の高い分析を行うことを目的に、追加アンケート調査を実施した。現在分析を進めており、次年度(2024年度)も引き続き分析を続ける。なお、追加アンケート調査には、研究計画には含まれていない項目(パレット導入への制度的圧力の影響に関する調査)を加えた。

(*1)「(え)道外の食品製造業者など」については、更にサンプル数が少ないため、分析から除外した。

(*2) 永吉大介、相浦宣徳:北海道農産品輸送のパレット化推進に関する研究～パレットをつなぐ「縦」の連携・共通の道具とする「横」の連携～、日本物流学会誌28号、pp. 173-180、2020

4. 研究の反省・考察

(1) 計画に対する進捗について

2023 年度の研究は、追加アンケート調査の実施など、計画外の調査が発生したものの、おおむね計画通り遂行できた。

(2) 計画以上の成果

追加アンケート調査では、CVM調査に加えて、パレット導入への制度的圧力の影響に関するアンケート調査を行った。これを基に次年度(2024年度)に質的比較分析を行う。これは、計画時には含まれていない調査・分析項目であるが、一貫パレチゼーションの推進におけるモメンタム(推進力)の発生要因を分析する上で非常に有用な成果となることが期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①平出渉、伊藤寛幸、深澤史樹、澤内大輔、相浦宣徳：農産品物流における効率化の進捗と主体別の意識の相違～北海道農産品を対象として～、第40回日本物流学会全国大会研究報告集(2023年9月)、pp. 89-92

(3) 出版物

なし

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	獨 協 医 科 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	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 ー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ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ユニバーサル肺炎球菌ワクチン ②抗原伝達体(ドラッグデリバリーシステム) ③高効率抗体産生誘導 ④免疫記憶の微小環境解析 ⑤off-the-shelf細胞製剤 ⑥脾摘後重症感染症 ⑦パンデミック対策			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
上 田 祐 司	医 学 部	准 教 授	研究代表者・総括

○研究分担者

[illegible]

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開発を推進するにあたり、以下の研究を計画した。

(1) 抗体産生細胞の組織内挙動とフェノタイプ解析

① 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。

(2) 追加免疫の検証と抗体産生増強効果の分子メカニズム解析：初回免疫後に少量の抗原単体、あるいは抗体ラベル T 細胞を移入し、追加免疫効果を検証する

① 血中抗体濃度とクラススイッチを検証する。

② 追加免疫後の抗体産生細胞の組織内挙動を免疫組織学的に追跡し、微小環境を特定する。

(3) 簡便で汎用性の高い抗体産生誘導代替システムの確立：外来遺伝子導入の壁を超え、簡便且つ汎用性の高く外来抗原に対して抗体産生を誘導できるシステムを作る。

① ドナー異系 T 細胞の MHC-I 分子の発現抑制法を確立する。

② T 細胞表面分子を標的に、抗表面分子抗体に外来抗原を共役させてこれを免疫する。

③ 普遍性の検証として、異なる動物種であるラットでの再現性も確かめる。

3. 研究の成果

まず昨年より難航している目的抗体の誘導法の改善を試みた。導入条件の最適化を試みているが、質的水準を保持しつつ高効率に抗原を導入できる条件の模索は続いている。並行して免疫応答の効率上昇を目的に動物種の変更も試みているが、こちらも未だ劇的な改善への途上である。現在、抗原導入法自体を刷新して再度条件の検討を進めている。以降の成果は、(1)進捗状況を踏まえて後発させた抗体誘導代替システム系で得た結果を示す。

(1) 抗体産生細胞の組織内挙動とフェノタイプ解析（計画(3)の結果による）

① 抗体産生細胞は速やかに T 細胞の帰巣先である微小環境に到達した後、局所で抗原をホスト免疫系に伝達した。抗体産生は初回免疫の 1 週間後にはすでに産生されていたが、興味深いことに抗体産生細胞の多くは特定のリンパ器官に集積していた。また同細胞の一部はすでに骨髄組織中に散見された。

(2) 追加免疫の検証と抗体産生増強効果の分子メカニズム解析（計画(3)の結果による）

① (1)の系を発展させて追加免疫後の挙動を解析した。追加免疫は外来抗原のみとしアジュバント非存在下に毎週投与したところ、目的抗体は追加免疫に伴って増加し、IgM 型から IgG サブタイプ型への変換が認められた。

② これらの組織内挙動を解析したところ、追加免疫に伴って初回免疫後に集積の見られた領域から徐々に全身のリンパ器官にも広く分布し始めていた。追加免疫直後の胚中心では旺盛な増殖性反応が認められ、高親和性抗体への産生が認められた。また追加免疫を繰り返した後のリンパ組織では、興味深いことに胚中心とは離れた領域に抗体産生細胞が多く認められたことから記憶B細胞の可能性が示唆された。

(3) 簡便で汎用性の高い抗体産生誘導代替システムの確立

① 本免疫法の効率に関わる大きな要因として、異系T細胞のMHC-I分子に対する抗体産生が目的抗原に対する免疫応答の効率を妨げてしまうことがある。そこで異系MHC-I分子の発現を、分子生物学的手法を用いて抑制することを検証し、簡便且つ安定して抑制できる方法を確認した（具体的な分子や手法は成果未発表のため非公表）。

② T細胞への遺伝子導入は、遺伝子導入によってT細胞遊走性が容易に変化してしまうことが大きなボトルネックとなり、条件の確立が容易ではない。そこで高い遊走性を保持したT細胞に簡便に外来抗原を搭載できる方法として細胞表面分子に対する抗体を介した方法を検討した。ナイーブT細胞に発現し、かつT細胞の遊走性や微小環境での細胞間相互作用に影響を与えないことを指標に検討したところ、分子Xに対する抗体が最適であることを見出した（具体的な分子や手法は成果未発表のため非公表）。①で得た知見を基に、ドナー/レシピエントが完全フルミスマッチの系において、ドナーT細胞のMHC-Iを発現抑制した上で抗X抗体に抗原Yを載せて免疫したところ、抗Y抗体が容易に産生された（投稿準備中）。同様の結果はラットでも再現できたことから、この免疫法は種を超えて再現できる普遍性を有すると考えられた。

4. 研究の反省・考察

抗肺炎球菌抗体の誘導効率がボトルネックとなり免疫応答誘導後の解析が遅れたことは極めて残念であった。その要因としては、a) T細胞への遺伝子導入の難しさ、b) 抗原の性状、c) マウスの特殊性が考えられた。a) 本研究助成以前より条件検討を行い最適化の目処をつけてはいたが、抗原となる分子が大きくなりすぎたため導入効率が低下したことも要因かと考えられる。T細胞、特にいわゆる再循環リンパ球の遊走能を保持させたまま外来遺伝子を高効率に導入することは困難であるため抜本的な導入方法の刷新を現在続けている。b) 抗原の性状としては免疫原性の低さも考えられるため糖鎖付加に関しても注意が必要かもしれない。c) 本研究の背景として、抗体産生応答の最初期にはレシピエントNK細胞が決定的な役割を果たすことを見出していたが、本系のマウスではNKが十分に機能していないと考えられた。これらが複合的に作用することで進捗に影響を与えたと考えられた。一方で、これらを打開すべく本年度途中より進めた代替システムの方では高効率に抗体産生を誘導し、抗体産生細胞の組織内挙動や追加免疫時の分布変化や記憶B細胞への分化などが解析できる段階まで進展させることができた。この系は疾患モデルではないために現時点では臨床的有用性が乏しいが、免疫学的意義は深く、将来的にはワクチン効果の増強や副反応の軽減など、実社会で問題となった予防医療の抱える現状の改善に寄与するものと期待される。今後は、こちらの系で抗原特異的B細胞の挙動解析を先行して行いつつ、改良した肺炎球菌抗体モデル系の解析にも応用して行きたい。

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

学 校 名	学 習 院 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	典型元素の利活用による先進的有機分子変換法の開発	研 究 分 野	理 学 (理工系)
キ ー ワ ー ド	①ケイ素 ②典型元素 ③分子変換 ④超原子価化合物 ⑤アルキニル化 ⑥高配位化合物		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
狩 野 直 和	学 習 院 大 学 理 学 部	教 授	研究統括および典型元素化合物の合成と反応

○研究分担者

[illegible]

典型元素の利活用による先進的有機分子変換法の開発

1. 研究の目的

遷移金属元素は有用であるものの、地球上の存在量や供給量が希少な金属（レアメタル）を使用し続けると、将来的に元素資源が枯渇してしまう危機に直面している。そのため、持続可能な開発目標（SDGs）の達成が世界的に叫ばれている今日において、遷移金属の使用削減に向けた抜本的な解決策が社会的に切望されている。また、昨今の国際的な政情の悪化による供給量の減少と、急激な為替変動による価格上昇のために、レアメタルの入手に関して日本の生産・研究の現場への影響が大きい。そのような社会的背景から、希少な遷移金属元素を使用しない有機合成反応の開発は喫緊の課題とされている。そのため、遷移金属元素を用いていた既存の合成反応開発から脱却して、地球上に豊富に存在する典型元素を利活用する有用な有機反応を開発することが望まれる。遷移元素と対をなす典型元素化合物では、中心典型元素と置換基間の結合が強固なために還元的脱離に相当する段階が容易に進行せず、遷移金属錯体と同様の反応性を示さないという問題がある。解決策として、従来の分子構造の試薬の利用から脱却し、超原子価状態のような通常とは異なる構造を活用する必要がある。本研究の最終的な目的は、典型元素の超原子価高配位状態の反応性を活用することで、有用な炭素-炭素結合形成反応を開発することである。本年度は次の2点を研究の目的として設定した。

- (1) アルキニル部位を置換基として有する安定な超原子価 5 配位 14 族元素化合物の合成
- (2) 穏和な条件で進行する各種求電子剤のアルキニル化反応の開発

2. 研究の計画

本研究では、以下の項目について取り組むものである。

- (1) 安定なアルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物の合成
 - ① 電子求引性二座配位子を活用することにより、アルキニル部位を置換基として有する超原子価5配位14族元素化合物を安定に合成単離する。
 - ② アルキニル置換5配位14族元素化合物の構造をX線結晶構造解析および多核NMRスペクトルにより明らかにする。
 - ③ DFT計算により14族元素, アルキニル基の電荷分布, 分子軌道に関する情報を得る。
- (2) アルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物を用いるアルキニル化反応の開発
 - ① 各種求電子剤に対する求核的アルキニル化反応の反応条件を検討する。
 - ② 適用可能な反応基質の範囲を検討する。
 - ③ 可視光レドックス触媒を用いた光照射条件でのアルキニル化反応を検討する。
 - ④ 遷移金属触媒を用いるアルキニル化反応を検討する。

3. 研究の成果

- (1) 安定なアルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物の合成

電子求引性二座配位子を有するスピロシランおよびスピロゲルマンに対して、リチウムフェニルアセチリドをTHF中で作用させ、続いてEt₄NBrを用いてカチオン交換をすることで、アルキニルシリカートおよびアルキニルゲルマナートを合成した。フルオロスタナートに対してリチウムフェニルアセチリドを作用させ、同様にカチオン交換することで、アルキニルスタナートを合成した。いずれのアルキニル置換5配位14族元素化合物も、空気中で安定な無色結晶として単離できた。

アルキニルシリカートの²⁹Si NMRでは、スピロシランよりも大きく高磁場シフトしたシグナルが観測された。また、アルキニルスタナートの¹¹⁹Sn NMRで観測されたシグナルは、類似のメチルスタナートよりも大きく高磁場シフトしており、アルキン部位の異方性効果を反映していた。合成した3種類のアルキニル置換5配位14族元素化合物についてX線結晶構造解析を行い、いずれも少し歪んだ三方両錐構造であることを明らかにした。アルキニル基はアピカル位を占めていた。また、結晶構造はDFT計算によって求められた最適化構造と良い一致を示した。

(2) アルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物を用いるアルキニル化反応の開発

合成したアルキニルシリカートないしアルキニルゲルマナートをアルキルヨードと反応させたが、アルキル基が第一級、第二級、第三級のいずれの場合も、予期したアルキニル化は進行しなかった。ベンゾフェノンやベンゾイルクロリドを基質として用いたが、その場合もアルキニル化は進行しなかった。それに対して、トロピリウム塩を求電子剤として用いたところ、高収率でアルキニル化が進行した。MS4Aおよび2,6-ルチジンを添加すると、収率が向上した。また、2-ベンジロキシ-1-メチルピリジニウムとの加熱条件での反応では、対応するベンジルアルキンが生成した。電子求引基や電子供与基を芳香環上にもつ基質でも、中程度ないし高い収率で同様に反応が進行した。中心原子がゲルマニウムの場合に最も収率が高いことがわかった。また、対照実験としてリチウムフェニルアセチリドやトリフルオロ（フェニルエチニル）ボラートを用いると、複雑な混合物が得られた。一方、1-フェニル-2-(トリメチルシリル)アセチレンを用いた場合は反応が進行しなかったことから、ケイ素の配位数を4から5に増したことで、求核的アルキニル化の反応性が向上していることが示唆された。

求電子的なアルキニル化に加えて、光触媒を用いるラジカル的アルキニル化が進行するかどうかを検討した。9-メシチル-3,6-ジ-*tert*-ブチル-10-フェニルアクリジニウム塩を光触媒として用いて、アセトン/メタノール混合溶媒中、青色LED光照射条件下でアルキニルシリカートと電子不足アルケンであるメタクリル酸ベンジルとの反応を行った。しかし、期待したアルキニル化体の生成は確認できず、複雑な混合物となった。

次に、合成したアルキニルシリカートが菌頭カップリングに適用できるかどうかを検討した。アルキニルシリカートとヨードベンゼンを触媒量のPd(PPh₃)₄およびヨウ化銅(I)とともにDMF中、60℃で加熱した。ヒドロキシシリカートが回収されたが、予期したジフェニルアセチレンは生成しなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) アルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物の合成

本研究を実施した結果、適切な置換基を使用することで、水や酸に対して安定な初めてのアニオン性アルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物を合成し、単離することができた。ケイ素、ゲルマニウム、スズの 3 種類の 14 族元素化合物の構造や安定性を系統的に比較することで、元素の種類に応じた構造や安定性の差異を見出すことができた。

(2) アルキニル置換 5 配位 14 族元素化合物を用いるアルキニル化反応の開発

合成した 5 配位 14 族元素化合物すべてで求電子剤への求核的なアルキニル化反応が進行した。また、中心元素がゲルマニウムの場合が、アルキニル化反応に最適であることが明らかとなった。しかし、現時点でアルキニル化反応に利用できる基質は、カチオン性炭素求電子剤に限定されている。化合物の安定性は向上したものの、そのトレードオフとしてアルキニル化反応における反応性は低下した。反応性向上のためには 5 配位 14 族元素を安定化するための置換基の検討が必要であると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Shuta Iwabuchi, Tatsuya Morofuji, Naokazu Kano, "Synthesis, structure, and alkynylation reactivity of alkynyl-silicate, -germanate, and -stannate", *Dalton Transactions*, **2024**, DOI: 10.1039/d4dt01688b.

(2) 口頭発表

- ① 岩淵秀太・高橋慎太郎・狩野直和, 6-ジチアン部位を有するシリカートの合成と反応, 第27回ケイ素化学協会シンポジウム, 2023年11月10日~11日, ラフォーレ那須。
② 岩淵秀太・高橋慎太郎・狩野直和, アシル置換基をもつアニオン性 5 配位 14 族元素化合物の合成, 大学連携化学シンポジウム~学習院大・立教大シンポジウム~, 2024年3月7日, 学習院大学。

(3) 出版物

なし

2023年度（第48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
山 崎 大 賀	北里大学メデ ^ィ カルセンター	上級研究員	動物実験
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
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

(1) がん予防ワクチンの検証

我々は抗体医薬候補のモノクローナル抗体を KK-LC-1 の特定領域のペプチドより作製している。同ペプチドをワクチナイズすることで KK-LC-1 に対する有用な抗体が産生されることが考えられる。本研究年限内に、治療開発を推進すると共に、ヒト KK-LC-1 置換マウスの作製およびそれを用いた KK-LC-1 ワクチンのがん予防に対する安全性および有効性を証明する。

(2) 発がん予知検証

現時点で、前がん領域で KK-LC-1 が発現していることは証明されたが、KK-LC-1 陽性症例から発癌することを立証する必要がある。そこで、本研究では、前がん症例を用いた KK-LC-1 の検出と発癌の関連性について検証し、血液診断システムの構築にも着手する。

2. 研究の計画

(1) KK-LC-1 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する。

② さらに、*mKk-1c-1* 遺伝子を *huKK-LC-1* に置換したマウスを作製し、開発中の抗体医薬および予防ワクチン開発における前臨床試験へ供する。

(2) 発がん予知検証

① 保険診療を見据えた発がん予測診断として、KK-LC-1 遺伝子測定キットを作製する。作製するにあたり、検査キット会社との提携体制を整え、薬事承認にかかる品質性能試験を実施する。さらに、臨床性能試験の実施を見据え、キットの仕様に沿った KK-LC-1 遺伝子の測定方法について検証する。

② LC-MS/MS により同定された 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. 研究の成果

(1) KK-LC-1 予防ワクチン効果の証明

① 前年度の *mKk-1c-1* 欠損精子の異常動態を受けて、当該年度は精子運動解析システム CASA を用いて欠損精子の運動性について数値化し受精能低下の原因を精査した。CASA における精子前進速度、尾振幅、尾振回数等の複数のパラメータで欠損精子の数値が減少しており、それらのパラメータから算出した超活性化運動の割合を算出したところ、欠損精子ではその割合が顕著に減少していた。欠損精子では、透明帯通過時に重要な超活性化運動が減弱していることを明らかにした。

② *mKk-1c-1*ノックアウトマウスに対して、CRISPR/Cas9および相同組換え技術を用いて *huKK-LC-1*置換マウスを1個体のみであるが作出することに成功した。ファウンダー個体(F0)についてgenotyping PCRを行い *huKK-LC-1*が *mKk-1c-1*の遺伝子座にノックインされていることを確認した。しかしながら、*huKK-LC-1*の遺伝子発現およびタンパク質発現については確認することができなかった。

(2) 発がん予知検証

① Hp除菌後でも胃がんは発症するが、除菌後の発がんリスク指標がない点に着目し、111例のHp除菌成功症例のKK-LC-1の発現とその後の胃がん発症について解析した。KK-LC-1陽性症例は19例(17%)であり、当該症例の累積胃がん発症率は

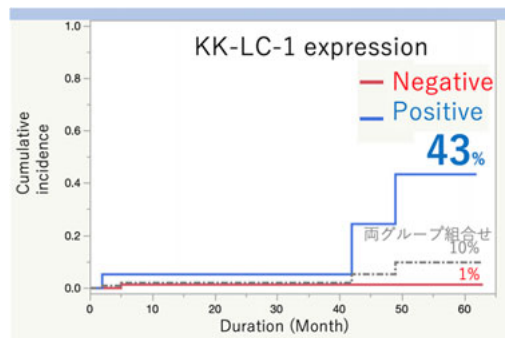


図1 Hp除菌成功者でKK-LC-1陽性症例は発癌率が高い

43%(KK-LC-1陰性では1%)であった(図1)。当該結果は、KK-LC-1がHp除菌後の胃がん発症のリスク指標になりうることを証明した。本成果は、保険収載を目指す計画に加え、代表者の所属する北里大学メディカルセンターの自由診療検査として2023年9月1日に開設するに至った。また本検出技術の海外展開も見据え、PCT出願を行った。

② 当該年度は、固相化抗体が認識するペプチド(91-113)から遠位のペプチド(61-80)を認識するKK-LC-1モノクローナル抗体を新たに作製した。現在追加免疫中であり、今年度中にハイブリドーマの構築およびKmaxのKK-LC-1分泌ペプチドに対する結合を評価する。質量分析計Q-Exactiveを用いて培養上清中のKK-LC-1ペプチド解析を行ったが、検出には至らなかった。KK-LC-1ペプチドには糖鎖が付加されているため、バックアップとして、検出プローブにレクチンを用いることを計画した(図2)。Concanavalin AのKK-LC-1糖鎖に対する強い結合能が確認できた。

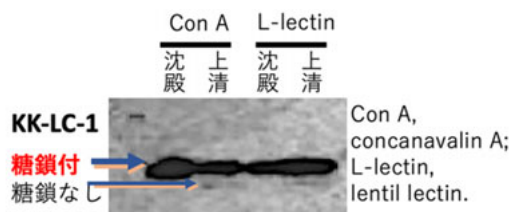


図2 レクチンに対するKK-LC-1の結合

4. 研究の反省・考察

(1) KK-LC-1 予防ワクチン効果の証明

① 本項については、*mKk-1c-1*の生殖細胞における機能を明らかにすることができた。*mKk-1c-1*は新規の遺伝子/タンパク質であり、かつ、がん治療の標的となる*huKK-LC-1*と同様の発現プロファイルを持っており、*huKK-LC-1*の腫瘍細胞における機能と、*mKk-1c-1*の生殖細胞における機能も相同点が見られたことは、今まで未同定であった*mKk-1c-1*を同定しかつ、その機能はヒトマウス種間で保存されていることも類推することができた。

② *huKK-LC-1*ノックインマウスの作出には成功したが、87個の受精卵を用いてわずか1個体のみ成功であった。同じ実験を複数回試行することで*huKK-LC-1*を発現するマウスの作製につなげたい。

(2) 発がん予知検証

① KK-LC-1陽性であれば、Hp除菌が成功しても発がんするリスクが高いことを証明することができた。我々のチーム含め、KK-LC-1を標的とした多くの治療開発現時点で展開されており、これらの治療技術を予防的に投与可能な仕組みを構築することで、本検査のコンパニオン診断としての臨床的意義も確立できると思われる。

② 当初はサンドイッチELISAによるKK-LC-1ペプチドの検出を試みたが、全長113アミノ酸の一部が分泌されることから、サンドイッチELISAの構築は非常に困難であったと考えられた。現在、KK-LC-1のレクチンに対する結合を確認できたため、今後は、レクチンと使用予定のモノクローナル抗体が競合しないことを確認する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Tubular Endogenous Erythropoietin Protects Renal Function against Ischemic

Reperfusion Injury.

Yukiko Yasuoka, Yuichiro Izumi, Takashi Fukuyama, Tomomi Oshima, Taiga Yamazaki, Takayuki Uematsu, Noritada Kobayashi, Masayoshi Nanami, Yoshitaka Shimada, Yasushi Nagaba …

International journal of molecular sciences 25(2) 2024

② Single-cell sequencing on CD8+TILs revealed the nature of exhausted T cells recognizing neoantigen and cancer/testis antigen in non-small cell lung cancer
Hiroyasu Komuro, Shuichi Shinohara, Yasunori Fukushima, Ayako Demachi-Okamura, Daisuke Muraoka, Katsuhiro Masago, Takuya Matsui, Yusuke Sugita, Yusuke Takahashi, Reina Nishida, Takashi Fukuyama …

Journal for ImmunoTherapy of Cancer 11(8) e007180-e007180 2023

(2) 口頭発表

① 北里大学メディカルセンター発胃癌発症予測技術の研究開発と実用化に向けての取り組み (口頭)

福山 隆。 第35回北足立郡市医師会 医学会 2023年。

② KK-LC-1は胃がんの発症を予測する新たなバイオマーカーになりうるか (シンポジウム)

福山 隆、大塚俊和、添野孝文、二渡信江、草野央、比企直樹、小林憲忠。第96回日本胃癌学会総会 2024年。

③ Helicobacter pylori感染胃癌と癌/精巣抗原KK-LC-1発現との関連性 (ワークショップ)

前原 惇治、二渡 信江、秋元 佑介、岡本 陽祐、日原 大輔、横内 幸、高橋 啓、福山 隆、渡邊 学、斉田 芳久。第96回日本胃癌学会総会 2024年。

④ Helicobacter pylori感染とKK-LC-1発現：胃がん発生リスクの新規指標の可能性 (一般口演)

大塚 俊和、福山 隆、小林 憲忠、草野 央。第96回日本胃癌学会総会 2024年。

⑤ 癌精巣抗原KK-LC-1マウスホモログの同定と機能解析 (ポスター)

山崎大賀、安岡有紀子、加藤恵太、中村啓哉、小林憲忠、高橋倫子、河野菜摘子、山下哲郎、福山 隆、田中住明。第46回日本分子生物学会年会 2023年。

⑥ Helicobacter pylori infection and expression of cancer/testis antigen KK-LC-1 in gastric cancer (Oral)

Junji Maehara, Nobue Futawatari, Yusuke Akimoto, Yoshimasa Horie, Daisuke Hihara, Yuki Yokouchi, Kei Takahashi, Takashi Fukuyama, Manabu Watanabe, Yoshihisa Saida. The 78th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterological Surgery 2023.

⑦ 発がん予測技術のキット化 Development of a Kit for carcinogenesis prediction –我々は発癌予測検査の開発に係る協業先を探しています– (医薬品/創薬 presentation)

福山 隆。 Bio Japan 2023。

(3) 出版物

該当なし。

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	慶 應 義 塾 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ケミカルダイレクトリプログラミング ②肝線維化 ③細胞外小胞 ④エクソソーム ⑤マイクロRNA		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 崎 潤 太 郎	慶應義塾大学 薬学部	准 教 授	研究総括、細胞株樹立、動物実験

○研究分担者

[illegible]

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 の治験を進めており、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

前年度までに、hCLiPsの不死化株(im-hCLiPc2)を取得し、肝星細胞との共培養実験より、im-hCLiPc2が分泌する液性因子の中に肝星細胞の活性化を著名に抑制する因子が存在することが明らかになったが、これにどの程度hCLiP-EVが影響しているのかを定量的に把握する。さらに肝星細胞の細胞内RNAプロファイルおよびhCLiP-EV中のmiRNAプロファイルを次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、hCLiP-EV曝露で生じる変化を網羅的に明確化する。これによりhCLiP-EVに含まれる線維化抑制性miRNAの絞り込みも可能になる。得られた候補miRNAのmimicを肝星細胞へトランスフェクションし、 α SMAの減少等の不活化現象が再現されるmiRNAを同定する。またmiRNA下流のシグナル伝達を検討し、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。

3. 研究の成果

hCLiP-EV曝露による肝星細胞の活性化抑制効果(α SMA発現抑制効果)の機序を解明するため、hCLiP-EVよりRNAを抽出し、そのRNAをトランスフェクション試薬を用いて肝星細胞に導入した場合と、EV曝露をした場合とで、肝星細胞における α SMAの発現変化を比較した。結果、RNAの細胞内導入によってEV曝露と同等の効果が得られ、当該in vitroアッセイ系における機能中心はhCLiP-EV内のRNAであることが示された。そこでhCLiP-EVに内包されるsmall RNAを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した(smRNA-seq)。hCLiPの不死化を行う前後で、EVに含まれるmiRNAのプロファイルに目立った変化は生じていなかった。興味深いことに、hCLiP-EVには肝細胞特異的miRNA(miR-X)が顕著に多く含有されていた。肝星細胞にmiR-Xの阻害核酸(antimiR-X)を導入した上でhCLiP-EVに曝露させると、EVによる α SMA発現抑制効果が低減された。すなわちmiR-Xは、hCLiP-EVの肝線維化抑制効果を説明する重要なmiRNAであると推察された。

4. 研究の反省・考察

現在、EVの生理活性に注目して治療薬としての臨床応用を目指す取り組みが世界的に活性化しており、本邦では本年1月に医薬品医療機器総合機構(PMDA)で「エクソソームを含む細胞外小胞(EV)を利用した治療用製剤に関する報告書」が公表され、非臨床試験における考え方が示された。EVは、内包される蛋白質とmiRNAなどの核酸が複合的に標的細胞内で作用することで生理活性を発揮すると考えられ、従来の低分子化合物や抗体製剤といった創薬では成し得なかった治療効果に期待が寄せられている(Nature 621:462, 2023)。

線維化改善効果を有する細胞外小胞の研究は、間葉系幹細胞を用いた研究が先行していたが、我々の研究チームでは、障害臓器の修復には当該臓器に存在する細胞由来のEVを用いたほうが高い活性を得やすいものと考えている。実際、研究分担者の落谷らは最近、肺上皮細胞が分泌するEVを特発性肺線維症マウスに経気道投与することによって、その改善効果が得られることを見出し、更にその効果が間葉系幹細胞由来のEVよりも高かったことを報告している(J Extracell Vesicle 10:e12124, 2021)。この仮説は、2023年度での研究進捗で、hCLiP-EVの主要な有効成分が肝細胞特異的に発現するmiRNAであったことが判明したことで、益々強固なものとなった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Matsuzaki J[#]**, Kurokawa S, Iwamoto C, Miyaho K, Takamiya A, Ishii C, Hirayama A, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T[#], Saito Y. (**#corresponding author**) Intestinal metabolites predict treatment resistance of patients with depression and anxiety. *Gut Pathog* 16:8 (2024)
- ② Yoshida M*, **Matsuzaki J* (co-first author)[#]**, Fujita K, Tokuda N, Yamaguchi T, Kuroda M, **Ochiya T**, Saito Y, Kimura K. (**#corresponding author**) Plasma extracellular vesicle microRNAs reflecting the therapeutic effect of the CBP/ β -catenin inhibitor PRI-724 in patients with liver cirrhosis. *Sci Rep* 14:6266 (2024)

- ③ Kondo N, Kinouchi T, Natsumeda M, **Matsuzaki J**, Hirata E, Sakurai Y, Okada M, Suzuki M. Profile of miRNAs in small extracellular vesicles released from glioblastoma cells treated by boron neutron capture therapy. *J Neurooncol* 168:91-97 (2024)
- ④ Kurokawa S, Nomura K, Sanada K, Miyaho K, Ishii C, Fukuda S, Iwamoto C, Naraoka M, Yoneda S, Imafuku M, **Matsuzaki J**, Saito Y, Mimura M, Kishimoto T. A comparative study on dietary diversity and gut microbial diversity in children with autism spectrum disorder, attention-deficit hyperactivity disorder, their neurotypical siblings, and non-related neurotypical volunteers: a cross-sectional study. *J Child Psychol Psychiatry* 168:91-97 (2024)
- ⑤ Tsugawa H, Ohki T, Tsubaki S, Tanaka R, **Matsuzaki J**, Suzuki H, Hozumi K. Gas6 ameliorates intestinal mucosal immunosenescence to prevent the translocation of a gut pathobiont, *Klebsiella pneumoniae*, to the liver. *PLoS Pathog* 19:e1011139 (2023)
- ⑥ Yokoi A, Ukai M, Yasui T, Inokuma Y, Hyeon-Deuk K, **Matsuzaki J**, Yoshida K, Kitagawa M, Chattrairat K, Iida M, Shimada T, Manabe Y, Chang IY, Asano-Inami E, Koya Y, Nawa A, Nakamura K, Kiyono T, Kato T, Hirakawa A, Yoshioka Y, **Ochiya T**, Hasegawa T, Baba Y, Yamamoto Y, Kajiyama H. Identifying high-grade serous ovarian carcinoma-specific extracellular vesicles by polyketone-coated nanowires. *Sci Adv* 9:eade6958 (2023)
- ⑦ Katsuda T, Sussman J, Li J, Merrell AJ, Vostrejs W, Secreto A, **Matsuzaki J**, **Ochiya T**, Stanger BZ. Evidence for *in vitro* extensive proliferation of adult hepatocytes and biliary epithelial cells. *Stem Cell Rep* 18:1436-1450 (2023)
- ⑧ Araki Y, Asano N, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Igarashi K, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Yonezawa H, Morinaga S, Asano Y, Yoshida T, Hanayama R, **Matsuzaki J**, **Ochiya T**, Kawai A, Tsuchiya H. A validation study for the utility of serum microRNA as a diagnostic and prognostic marker in high-grade osteosarcoma patients. *Oncol Lett* 25:222 (2023)

(2) 口頭発表

- ① 山口智子, **松崎潤太郎**, 勝田毅, 徳田乃唯, 檀裕治, 木村真規, **落谷孝広**, 齋藤義正. ヒト肝細胞由来肝前駆細胞(hCLiP)由来sEVの肝線維化改善効果の検討. Poster Session. 第10回日本細胞外小胞学会学術集会. 札幌. 2023年10月
- ② **松崎 潤太郎**. 細胞外小胞で創薬はできそうなのか. 第3回反分野的生物医療学会学術集会. 金沢. 2023年9月

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 京 慈 恵 会 医 科 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	多次元分析から観た病態へ至る副甲状腺細胞の立ち 居振る舞い ―遺伝子発現プロファイルと細胞系譜解析による細胞 変化の検討―		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①副甲状腺 ②内分泌 ③マウス ④遺伝子発現 ⑤組織構築 ⑥細胞分化 ⑦細胞系譜			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 部 正 隆	東 京 慈 恵 会 医 科 大 学 医 学 部	教 授	研究代表者 統括

○研究分担者

[illegible]

多次元分析から観た病態へ至る副甲状腺細胞の立ち居振る舞い — 遺伝子発現プロファイルと細胞系譜解析による細胞変化の検討 —

1. 研究の目的

(1) 本研究計画は、慢性腎不全モデルマウス (CKD マウス) を用いて、二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) に至る過程でどのように副甲状腺細胞が変遷していくのかを検討するものである。

① 緑色蛍光タンパク質 (GFP) を副甲状腺特異的に発現する遺伝子組換えマウスを用いて慢性腎不全を誘導し、SHPT の副甲状腺構成細胞の分類と配置を single-cell transcriptome 解析により明らかにする。すでに本研究室で得られている正常副甲状腺の single-cell transcriptome 解析の結果と比較することで、SHPT に至る過程における、副甲状腺を構成する細胞の変遷とその細胞系譜を明らかにする。

② 副甲状腺を構成する細胞の配置や詳細な遺伝子発現を明らかにするためのこれまでにない新たな方法を検証して、解像度の高い組織解析を行う。

(2) 上記の実験結果が副甲状腺培養細胞を用いて再現することが可能であるのかをラット副甲状腺培養細胞 PT-r を用いて検討を行う。

これらにより 正常と SHPT に至る過程における副甲状腺細胞の時間的空間的な変化を解明し、その成果を医学と生物学の双方に還元する ことを本研究計画の目的とした。

2. 研究の計画

(1) SHPT 副甲状腺の基本構造の解析

① これまでの研究から、副甲状腺細胞が非常に整った索構造を示し、その間には血管が存在していることが共焦点レーザー顕微鏡で確認されている。この血管から滲み出た血漿成分のCa⁺の濃度を副甲状腺細胞が感知することで、PTHの分泌を行う。しかし、副甲状腺細胞の分布は血管に近いものと遠いものがあり、血管と副甲状腺細胞の配置が機能にどのような関係するのかについての詳細は明らかではない。SHPTにおける副甲状腺細胞の変化がどのような場所から起こるのかを詳細に知るため、副甲状腺細胞と血管との関係を明らかにする必要がある。そこで、副甲状腺がEGFPで可視化可能なGcm2-EGFPマウスを用いて、動脈にRITCゼラチンを導入して解析を行い、副甲状腺細胞と血管との関連を検証した。

(2) SHPT 副甲状腺の single-cell transcriptome 解析

① Gcm2-EGFPマウスを用いて、アデニン含有試料を与えることにより、CKDを発症させ、SHPT状態になったマウスから副甲状腺を取り出し、Single cell transcriptome解析を行う。この際、CKDマウスの作成方法とSingle cell transcriptome用の細胞調整方法も新たに開発を行う。

(3) 副甲状腺細胞の細胞種特定のための新たな実験手法の検証

① 副甲状腺は主細胞と酸好性細胞の2種類の細胞に分類されるが、我々のこれまでの研究結果から同じ用なマーカー遺伝子を発現する副甲状腺細胞の中でいくつかの異なる細胞クラスターが存在することが明らかとなっている。それら細胞クラスターをより高解像度で分類するために、in situ HCR法の改変方であるin situ HCR法の検証を行った。この方法では1度に3種類の遺伝子をmRNA1分子の解像度で検出することが可能であり、SHPT副甲状腺の解析をする上で非常に有用な情報をもたらす方法となる。

(4) 副甲状腺培養細胞 PT-rを使った再現実験

① SHPTマウスを作成するためには6週間以上の時間を要することから、より簡便にSHPT副甲

甲状腺の状態が再現する方法が必要になると考えられた。そこで現存する唯一の副甲状腺培養細胞であるPT-rを用いて、その細胞がSHPTの解析に使用可能なものであるのかを検証する。

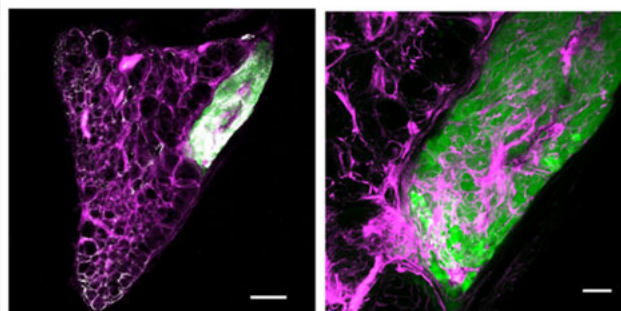
3. 研究の成果

(1) SHPT 副甲状腺の基本構造の解析

①副甲状腺がEGFPで可視化できるGcm2-EGFPマウスにRITCゼラチンを動脈から還流し、甲状腺ごと副甲状腺を取り出して共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。その結果、副甲状腺内の血管が詳細に観察できた。

副甲状腺内を走行する太い血管が甲状腺で認められる太い血管のシャープな像に比べ、ぼやけたような不鮮明な像となっていることが明らかとなった(図1)。これは副甲状腺内の血管でRITCゼラチンが

図1 RITCゼラチンによる副甲状腺を走る血管の可視化の検証実験



左：甲状腺とEGFPで可視化された副甲状腺
右：副甲状腺拡大像

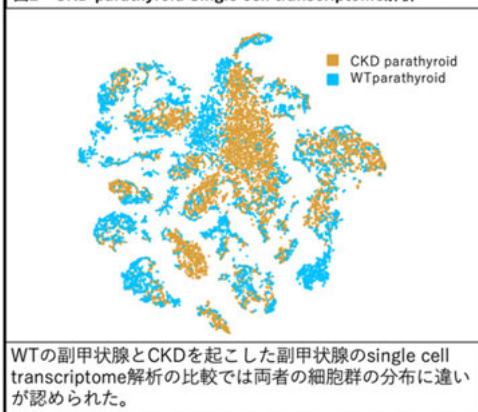
漏出しているためにこのように像が不鮮明になることが明らかとなった。甲状腺内の血管では漏出は観察されないため、副甲状腺の血管は血漿成分を透過しやすい有窓性の特殊な構造を持つ内皮細胞で構成されている可能性が示唆された。このような報告は未だなく、世界で初めて明らかになった研究成果である。

(2) SHPT 副甲状腺の Single-cell transcriptome 解析

①Single-cell transcriptomeを行うためにGcm2-EGFPマウスの生産と細胞の調整法について検証し、これまでよりも非常に効率の良い、細胞調整が可能となった。また、Gcm2-EGFPマウスを用いてCKDマウスを作成し、血清データからCKDになっていることを確認した。この方法でCKDを発症したSHPTの副甲状腺からSingle-cell transcriptome解析用細胞を調整することができた。

②SHPT副甲状腺からSingle-cell transcriptomeを行い、以前に行っていた正常な副甲状腺のSingle-cell transcriptomeと統合解析を行った。結果、CKDを発症したSHPT副甲状腺では正常副甲状腺と比較して副甲状腺細胞の分布が変化していることが明らかとなった(図2)。この結果は本研究が初めて明らかにしたものである。

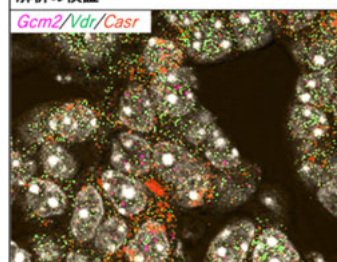
図2 CKD parathyroid Single cell transcriptome解析



(3) 副甲状腺細胞の細胞種特定のための新たな実験手法の検証

①Single-cell transcriptomeは遺伝子発現によって細胞群を分類した解析であり、その詳細を組織切片等で確認、解析する必要がある、今回その方法としてin situ palette(ネッパジーン株)を用いて検証を行った。数種類のプローブを作製して組織での遺伝子発現を確認した結果、非常に高解像度に副甲状腺細胞で発現する遺伝子を可視化することができた(図3)。

図3 in situ paletteを使った発現遺伝子の解析の検証



(4) 副甲状腺培養細胞 PT-rを使った再現実験

①ラット副甲状腺に由来する培養細胞であるPT-rの培養とその性状の確認を行った。PT-rは副甲状腺の様々な遺伝子を発現する一方、副甲状腺に比べGcm2などの遺伝子発現が弱いことが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) 本研究全体は2年計画の研究として立案しており、初年度はCKD 副甲状腺の single-cell transcriptome と組織での解析方法の開発を中心にを行い、一定の成果を得た。各研究内容の反省点を以下に記述する。

①SHPT副甲状腺の基本構造の解析の反省点として

アGcm2-EGFPマウスのジェノタイプに問題があり、使用できるマウスの数に制限があった。
イ技術的な難しさから、さらなる解析方法の検証が必要となった。

現時点ではGcm2-EGFPのジェノタイプ問題は解決されており、CKD発症SHPT副甲状腺の基本構造の解析を行う予定である。

②SHPT 副甲状腺の Single-cell transcriptome 解析の反省点として

ア①と同様にマウスの生産に問題があった。

イ Single-cell transcriptome 解析が年度末になってしまったため、結果の検証が十分にできていない。

CKD 発症 SHPT 副甲状腺と野生型とのデータ解析から存在する細胞の違いが明らかであるため、どの細胞群に違いがあるのかを明らかにする予定である。

③副甲状腺細胞の細胞種特定のための新たな実験手法の検証の反省点として

in situ palette は非常に新しい手法だが、自家蛍光消失装置 (TiY0) の導入もあり問題なく行うことが出来、今後 SHPT 副甲状腺で増加、減少する細胞群の特定をこの方法で行う予定である。

④副甲状腺培養細胞 PT-rを使った再現実験の反省点として

PT-r の培養方法など取り扱いに苦労したが、現在は安定的に行えている。CKD 模倣培地などは試せていないため、検証が必要である。

上記の研究を総合的に判断するとマウスの産生や技術的な検証に時間を費やしたが、必要な研究を遂行できたと考えられる。本年度の結果は非常に重要であり、学会での発表を控えていたため、研究発表の成果が得られていないことが大きな反省点である。

(2) 考察

現在Single-cell transcriptomeを使用した研究はものすごい数が行われており、ヒト組織を用いた解析も多くなっている。副甲状腺についてもヒト組織を使った研究の報告がなされているが、用いられている試料は病状を示した組織である。そのため、それらで得られているデータは必ずしも正常な性状を示さないことが問題になっている。我々はマウスを使い、正常な副甲状腺とCKDを発症させSHPTになった副甲状腺を使用することで、正常から病態への変化を捉えることができる唯一の研究となっている。実際本研究で得られたデータはSHPTでは正常な副甲状腺で存在する細胞群が存在しないことが明らかとなった。このような知見はこれまでになく、正常な副甲状腺で存在する細胞がどのように変遷してしまうのかを明らかにすることが治療への鍵になると考えられる。そのため、今後更に、治療薬の影響のデータを追加することで、病状を示す副甲状腺が正常とどのように異なり、また、薬剤に対する感受性がどのように変化してしまうのかという問いにたいして、医学と生物学の双方に還元できる結果が得られることが期待される。

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

学 校 名	実 践 女 子 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	OECDの枠組みに基づく世代別金融リテラシーの調査研究	研 究 分 野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①金融リテラシー ②OECD ③奨学金貸与者 ④社会人 ⑤高齢者 ⑥インターネット調査		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 橋 桂 子	実践女子大学 生活科学部	教 授	研究代表者・総括、調査票設計(主)、分析、論文執筆(和文・主、英文・副)

○研究分担者

[illegible]

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・全属性に求められる内容もあれば、特定の世代・属性に重点的な強化が必要な内容もある。OECD では若者、成人や中小零細企業家向けの調査を行い、フレームワークを提示している。全世代にわたり金融リテラシーを育成するためには、精査された調査票を用いて大規模サンプルで調査を行い、統計的検討を重ね、頑健な規定要因を明らかにすること、そしてその結果に基づいたオーダーメイド方式による金融経済教育を展開していくことが必要である。このような問題意識のもと、本助成研究では3ヶ年で3つの異なる世代特有の課題（大学生と貸与型奨学金、成人と確定拠出年金、高齢者と特殊詐欺被害）について調査を行い、検討を行うことを目的とした。

2023 年度は高齢者を対象に特殊詐欺被害の規定要因、また金融リテラシーとの関連をテーマに設定した。特殊詐欺とは、被害者に電話をかけるなどして対面することなく信頼させ、指定した預貯金口座への振込みや、その他の方法により不特定多数の者から現金等をだまし取る犯罪（警察庁）のことであり、被害額は1日1億円以上、被害者の8割以上が高齢者でありかつ女性、という特徴を持つ。

この高齢者特殊詐欺に関する先行研究には、「詐欺脆弱性」、「真実デフォルト」(Truth-Default Theory: TDT, Levine (2014))、「認知的節約」(合理的に判断すべき局面で感情的な意思決定が優先されてしまう現象)といった詐欺被害に遭いやすい人の傾向・心理的要因に着目した研究(上野ら 2020; 大工ら 2018; 滝口 2018)が多い。他方で、特殊詐欺に特有の時間的プレッシャーに注目した研究、すなわち、時間的プレッシャーがあると意思決定者はハイレベルのストレスを経験し、疲弊し、熟慮を欠くため、思考がより複雑でない推論ストラテジーを用いる方向にシフトする(Orasanu & Connolly 1993)、といった特殊詐欺の手法の特性に着目した研究はほとんどない。そこで本研究では、「気分が高揚している、激しく動揺しているなど生理的興奮を主観的に経験している状態」(石淵 2013)をさす「感情覚醒」場面に注目し、「感情覚醒」をどう調整するのかという「感情調整」という視点から検討を行う。作業仮説は以下の通りである。

仮説 1: 感情覚醒が高いほど、詐欺に遭いやすい(特殊詐欺脆弱性が高い) だろう。

仮説 2: 感情調節ができない人ほど、詐欺に遭いやすい(特殊詐欺脆弱性が高い) だろう。

2. 研究の計画

図 1 に示す研究枠組みに沿って調査票を独自に設計し、調査を実施した。高齢者の特殊詐欺を主題とする量的調査を実施した経験がなかったため、まず小サンプルで調査を行い、その後、大規模サンプル調査(n=2700)を実施した。なお、実査にあたり、実践女子大学研究倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号 2023 承-22)。

調査の実施概要は以下の通りである。

【調査 1】インターネット調査-1

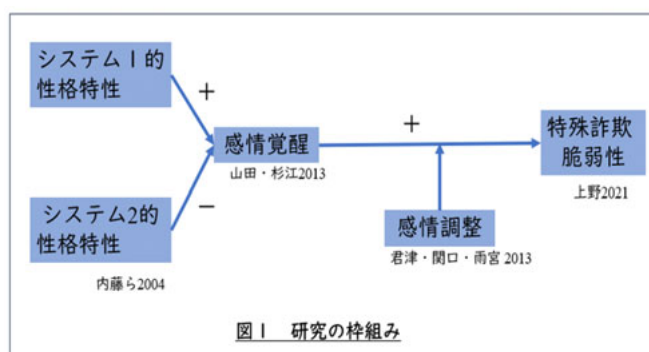
調査対象: 55-64 歳、65-74 歳、75 歳以上男女、各 100 サンプル

調査時期: 2023 年 11 月(女性のみ)→12 月(男性のみ)

調査会社: Freeasy(セルフ型アンケートツール)

調査項目: 意思決定(システム 1、システム 2)、感情覚醒、感情調整、特殊詐欺脆弱性など

特徴: 二重過程理論を基にした性格特性(システム 1 的性格特性(直観型)、システム 2 的性格特性(熟慮型))を組み込んでいる。



【調査2】インターネット調査-2

調査対象：65-69 歳、70-74 歳、75-79 歳男女、各 450 サンプル

調査時期：2024 年 3 月

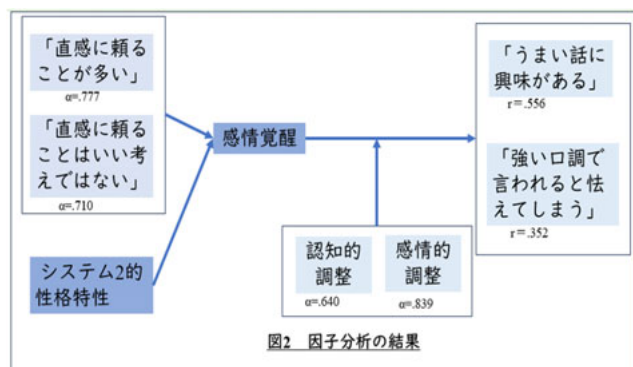
調査会社：メルリンクス

調査項目：【調査1】に加えて、金融リテラシー変数（知識、態度、行動）

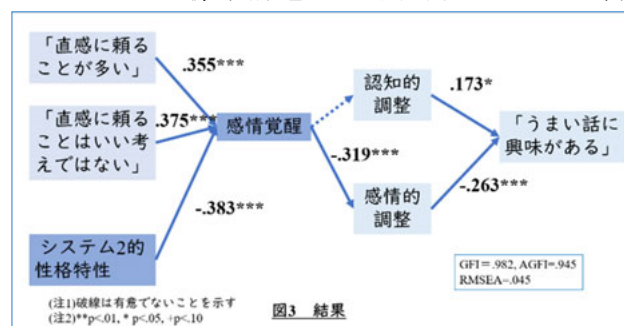
3. 研究の成果

【調査1】の女性に関する結果を記す。

(1) 因子分析の結果、従属変数は「うまい話に興味がある」と「強い口調で言われると怯えてしまう」の2因子が抽出された。独立変数は、システム1的意思決定が2因子、感情調整が2因子となった（図2参照）。因子分析に基づく修正枠組みを用いてパス解析を行った。



(2) 従属変数「うまい話に興味がある」に関するパス解析（図3参照）：モデルの全体的評価を行う適合度指標から、本研究において設定したモデルの実際のデータ適合度は高く、構成されたモデルは標本構造をよく説明していると判断できる。性格特性として「直感に頼ることが多い」直観型では感情覚醒にプラスの影響を与えるが、システム2的性格特性である熟慮型は、感情覚醒に有意にマイナスの影響、つまり、熟慮すると感情覚醒が抑制される結果を示した。感情が覚醒した状態では認知的な調整は有意でなく、感情的な調整が有意であるが、感情的な調整は生じさせにくい状態であることも示された。感情的調整ができると、「うまい話に興味がある」という特殊詐欺脆弱性の1つの因子を抑制することが示唆された。



(3) その他、相関関係から、「感情覚醒」は、毎日の生活に満足しているほど低く ($r=-.160$, $p<.05$)、逆に自分と他者を比べる ($r=.172$, $p<.10$)、または他者から頼られたら何とかしてあげたくなる ($r=.215$, $p<.05$)ほど高い、という結果を示した。

4. 研究の反省・考察

(1) 反省の1点目は「自分がお金を支払えば、息子を救えると思った」という言葉に代表されるような別の経路、具体的には子の窮地を救い、被害が周囲に広がらない最善の策として「ある程度のお金で穏便に解決した」（澁谷 2020）、という点の検証を行うことができなかった点である。これは「限定合理性」の観点から引き続き、検討を重ねていく。

(2) 反省の2点目は、大規模調査の実施時期が大幅に遅くなった点である。【調査1】が11月、【調査2】は3月実査となってしまった。この大規模サンプルを用いた学会発表、論文投稿は2024年度中に行う。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 高橋桂子(2024)経済学を専門としない大学生のための新規講義「実践教養講座c：大学生と金融リテラシー」：概要と履修生の反応、下田歌子記念女性総合研究所年報、10、17-27.
- ② 猪瀬武則(2023)経済的エージェンシーの発揮を企図した中学校社会科の授業開発：ナッジとしてのカフェテリアプランの場合、経済教育、42、94-99.
- ③ 猪瀬武則・高橋桂子(2023)子どもの金融ケイパビリティ保障の意義：ナッジとしての4つのスロットを持つ貯金箱の活用可能性、経済教育、42、159-172.

- ④ 倉元綾子(2024) 乳幼児期の子どもと家族を支援する教育：米国・ミネソタ州の親教育コア・カリキュラムをもとに、家庭生活支援の専門を究める(家政教育部会)、88-97.
- ⑤ 倉元綾子 (2024) 家庭生活支援の基礎理論：米国家族生活支援から学ぶ、家庭生活支援の専門を究める(家政教育部会)、12-27.
- ⑥ 倉元綾子 (2024) 金融に関する知識と生活行動との関連：九州の私立大学生へのインタビュー調査から、西南学院大学人間科学論集、19(2)、1-30.
- ⑦ 倉元綾子・安谷竜輝(2023) 日本におけるLGBTQ+と学校教育の現在、西南学院大学人間科学論集、19(1)、33-68.
- ⑧ 倉元綾子・井元りえ(2023) 「日本の家政学のSDGs ポジション・ステートメント案」作成プロセス、家政学原論研究、57、46-48.
- ⑨ 倉元綾子 (2023) ゴール5 ジェンダー平等を実現し、すべての女性と少女をエンパワーする、家政学原論研究、57、27-31.
- ⑩ 倉元綾子 (2023) 家政学・家政学原論の未来を切り拓く：日本家政学のSDGs ポジション・ステートメント (3&5、11、12) 試案 (公表とパネルディスカッション) 趣旨説明、家政学原論研究、57、20.

(2) 口頭発表

- ① Takahashi Keiko. (2023), Concerns about money can remove by attending a financial economic class: Case study of Women's University in Japan, Paper presented at ERAS International Conference and WERA Focal Meeting 2023, Singapore (11/22-24) .
- ② Takahashi Keiko. (2023), New Course of "An Introduction to Financial Literacy ": Contents and Student Response of Women's University in Japan, Paper presented at the 14th Biennial Conference of Asian Consumer and Family Economics Association (ACFEA), Kitakyushu International Conference Center, Kitakyushu (Japan).
- ③ Takahashi Keiko, & Kuramoto Ayako. (2023), What did university students learn about money management from their parents? A case study of Japanese university students in Tokyo, ZOOM presented at the Family Economics & Resource Management Association (FERMA) 2023 Virtual Conference, ZOOM.
- ④ Inose, Takenori, Takahashi Keiko, & Abe Shintaro. (2023), The Significance and potential of guaranteeing children's financial capability: A financial capability survey using nudge-based teaching materials, Poster presented at the Twelfth Annual AEA Conference on Teaching and Research in Economic Education (CTREE), (U.S.).
- ⑤ Inose Takenori, Abe Shintaro, & Takahashi Keiko. (2023), Classroom development of secondary economic education where students exercise economic agency: the case of the cafeteria plan as a nudge, autonomy and well-being, Paper presented at the 24th AEEE Conference 2023 on European Economics Education, NHL Stnden University, Leeuwarden, The Netherlands (10/13).
- ⑥ 高橋桂子・笠井直美・松田純子(2023) 4-6 歳児にみる社会経済認知：N 大学附属幼稚園の事例、日本家政学会第 75 回大会（東京家政大学）.
- ⑦ 吉村亜紀代・高橋桂子・笠井直美・猪瀬武則(2023) 「4 個の部屋」がある貯金箱：5 歳児はお店屋さんごっこの売上金をどう分けるか、日本家政学会第 75 回大会（東京家政大学）.
- ⑧ 高橋桂子 (2023) 20 代、30 代にみる金融リテラシー、経済教育学会第 39 回全国大会（立命館びわこキャンパス）.
- ⑨ 高橋桂子 (2023) 大学生と金融リテラシー：講義内容、学生の反応、次年度へのインプリケーション、経済教育学会第 39 回全国大会（立命館びわこキャンパス）.

- ⑩ 猪瀬武則・高橋桂子・阿部信太郎 (2023) 生徒エージェンシーの発揮によるケイパビリティ保障は可能か？：ナッジとしてのアスリート・モデル構想を巡って、経済教育学会第39回全国大会（立命館びわこキャンパス）。
- ⑪ 猪瀬武則 (2023) 新たな金融リテラシー：測定、対象、理念、経済教育学会第39回全国大会（立命館びわこキャンパス）。
- ⑫ 阿部信太郎 (2023) 海外の教材を活用した金融リテラシー教育の実践と課題：米国の標準テストを活用した大学生の金融リテラシーの質的調査の試み、経済教育学会第39回全国大会（立命館びわこキャンパス）。
- ⑬ 倉元綾子 (2023) 米国におけるセクシュアリティ教育の動向ー『家族生活教育：人の一生と家族』第4版（2022、ダーリン、キャシディ、バラード；ウェイブランド出版）からー、日本家政学会九州支部第67回大会（大分大学）。
- ⑭ 倉元綾子 (2023) 『家族生活教育：人の一生と家族』第4版（2022、ダーリン、キャシディ、バラード、ウェイブランド出版）にみる米国・家族生活教育の進展、日本家政学会第75回大会（東京家政大学）。
- ⑮ 小川正人 (2023) 国際博覧会とニュージーランド、第30回日本ニュージーランド学会研究大会（東北公益文科大学）。

(3) 出版物

- ① 阿部信太郎 (2024) 小単元別の『会計』の取り扱い方、日本会計士協会編「会計情報の活用 教員のための授業実践ガイドブック」、日本公認会計士協会。

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	順 天 堂 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	UFM1システムが駆動する小胞体ホメオスターシス:その破綻と遺伝性脳症—UFM1システムの包括的研究—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①UFM1 ②小胞体 ③リボソーム関連品質管理 ④オートファジー ⑤遺伝性小児脳症			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 松 雅 明	順 天 堂 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科	主 任 教 授	研究統括、分子細胞生物学の解析、マウス遺伝学の解析

○研究分担者

[illegible]

UFM1 システムが駆動する小胞体ホメオスタシス：その破綻と 遺伝性脳症－UFM1 システムの包括的研究－

1. 研究の目的

(1) 研究代表者は、ゲノム上に残された最後のユビキチン様修飾系 Ubiquitin-Fold Modifier 1 (UFM1) システムの同定に成功した (EMBO J 2004 など)。UFM1 は、合成直後にシステインプロテアーゼである UFSP1, 2 により C 末端を切断されグリシン残基が露出した成熟型となる。成熟型 UFM1 は、UFM1 特異的 E1 酵素である UBA5 と高エネルギーチオエステル結合を形成し、活性化される。活性化 UFM1 は、UFM1 特異的 E2 酵素である UFC1 に転移され、最終的に小胞体に局在する E3 酵素 UFL1-UFBP1-CDK5RAP3 複合体を介して標的タンパク質に共有結合される (UFM1 化)。UFM1 化は可逆的であり、小胞体に局在する UFSP2 により基質と結合した UFM1 は切断される。UFM1 システムは、原生動物から高等動植物に至るまで真核生物に広く保存されており、その生物学的重要性が示唆されてきた。事実、代表者らはマウス遺伝学的解析により世界に先駆けて UFM1 システムが神経発生・脳形成に不可欠であること (Nat Commun 2011, Am J Hum Genet 2016) や、小児てんかん性脳症患者の遺伝子解析から UFM1、UBA5、UFC1 をコードする遺伝子変異が UFM1 化の減弱を伴った遺伝性小児脳症をきたすこと (Am J Hum Genet 2016, Brain 2019 など) を見出した。最近、小胞体上でリボソームタンパク質 RPL26 が UFM1 化されること、そして RPL26 の UFM1 化が小胞体上で合成がストールした新生ペプチドの分解 (小胞体におけるリボソーム関連品質管理機構: ER-RQC) に関与することが判明した (Walczak et al., PNAS 2019, Wang et al., Cell Res 2019, Cell Rep 2023)。しかし、UFM1 システムが小胞体上の異なる細胞機能を制御するメカニズムはほとんど不明であり、UFM1 システムの異常が関与する遺伝性小児脳症発症機構の解明は全くの手付かず状態である。本研究では、以下の課題に取り組む。

- ①人工知能プログラムAlphaFold2による構造予測を基盤にUFM1化、脱UFM1化の分子メカニズムと小胞体におけるUFM1システムの役割を明らかにする。
- ②作製中あるいは作製済みの遺伝子改変マウスを駆使し、UFM1システムの個体における生理機能を明らかにする。
- ③遺伝性脳症発症を引き起こすUFM1システムの遺伝子変異がUFM1システムのER-RQCに影響を与えるか否かを明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 革新的タンパク質構造計算ツール AlphaFold2 (AF2) (Jumper et al., Nature 2021) による複合体予測の結果、UFC1 (E2)、UFL1 (E3 サブユニット)、UFBP1 (E3 サブユニット)、CDK5RAP3 (E3 調整サブユニット)、UFM1 の 5 者複合体の構造が高い信頼性で予測できた。この 5 者複合体予測をもとに、UFM1 E3 酵素反応系の作動原理を明らかにする。

- ①AF2の複合体予測に基づき各UFM1関連タンパク質間の相互作用に重要なアミノ酸に変異を入れた変異体を作製し、免疫沈降法や*in vitro* pull downによる結合実験を行う。
- ②それらの変異が、既存のUFM1の基質RPL26のUFM1化に与える影響を検証するとともにER-RQCにおける意義を調べる。

(2) 個体における UFM1 システムの病態生理的意義を明らかにするため UFM1 関連因子の遺伝子改変マウスを作製し、表現型を解析する。

- ①RPL26のUFM1化される132、134番目のリジンをそれぞれ、あるいは両方をアルギニンに置換した $RPL26^{K132R/K132R}$ 、 $RPL26^{K134R/K134R}$ 、 $RPL26^{K132R/K134R/K132R/K134R}$ ノックインマウスを作製し、表現型を解析する。
- ②タンパク質からの脱UFM1化を担うUFSP2のCREリコンビナーゼ依存的に活性中心変異型に変換する $UFSP2$ $FLEx$ マウス作製し、表現型を解析する。

(3) 遺伝性脳症発症を引き起こす遺伝子変異を持つ患者線維芽細胞より iPS 細胞を作製し、神経細胞への分化能およびER-RQCに異常があるか否かを検証する。

- ①UFC1に変異を有する遺伝性脳症患者皮膚より線維芽細胞を採取し、iPS細胞を作製する。
- ②患者由来iPS細胞と健常者由来のiPS細胞の神経細胞への分化能を検証する。
- ③患者由来と健常者由来iPS細胞から神経細胞に分化させ、ER-RQCに差があるか否かを検証する。

3. 研究の成果

(1) UFM1 E3 酵素反応系の作動原理

- ①各種結合変異体を作製し、AF2による構造予測を免疫沈降、pull-downアッセイにより確認した。
- ②UFM1 E3酵素複合体の意義を解明した。つまり、UFM1 E3酵素であるUFL1と小胞体に局在するUFBP1とが安定に複合体を形成すること、その複合体にCDK5RAP3が結合すると小胞体上で翻訳が停止したリボソームのRPL26にUFM1が連結されることを明らかにした。さらに、このUFM1 E3複合体は、UFBP1に含まれるUFM1結合モチーフを介してUFM1が連結されたRPL26に結合すること、このUFIMを介した結合が小胞体における合成途中のタンパク質分解 (ER-RQC) に必要であることを明らかにした (Sci Adv 2023)。

(2) 個体における UFM1 システムの病態生理的意義

- ①RPL26のUFM1化される132、134番目のリジンをそれぞれ、あるいは両方をアルギニンに置換した *RPL26*^{K132R/K134R}、*RPL26*^{K134R/K134R}、*RPL26*^{K132R K134R/K132R K134R} ノックインマウスを作製した。
- ②UFSP2がCREリコンビナーゼ依存的に活性中心変異型に変換する *UFSP2 FLEx*マウスを作製した。

(3) UFM1 システムの遺伝子変異による遺伝性脳症発症機構の解明

- ①UFC1に変異を有する遺伝性脳症患者皮膚より線維芽細胞を採取し、iPS細胞を作製した。

4. 研究の反省・考察

(1) UFM1 E3 酵素反応系の作動原理

- ①AF2による構造予測により UFM1 E3 酵素複合体と小胞体膜タンパク質との結合を高い精度で予測できた。さらに検証を進める。

(2) 個体における UFM1 システムの病態生理的意義

- ①作製した UFM1 関連遺伝子改変マウスの表現型解析を進める。

(3) UFM1システムの遺伝子変異による遺伝性脳症発症機構

- ①作製したUFC1に変異を持つ遺伝性脳症患者由来iPS細胞を用いた表現型解析を進める。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①該当なし

(2) 口頭発表

- ①小松雅明「UFM1システムによる翻訳品質管理機構」第二回タンパク質シンポジウム
- ②石村 亮輔、伊藤 壮太、Mao Gaoxin、小松 聡子、稲田 利文、野田 展生、小松 雅明「UFM1 E3リガーゼ複合体によるufmylationと翻訳品質管理機構の制御メカニズムの解明」2023年度日本生化学会関東支部例会
- ③石村 亮輔、能代 大輔、植村 武文、和栗 聡、野田 展生、小松 雅明「UFM1システムはCYB5R3のUfmylationを介してER-phagyを制御する」第75回日本細胞生物学会大会

(3) 出版物

- ①Komatsu M*, Inada T*, Noda NN*. The UFM1 system: Working principles, cellular functions, and pathophysiology. Mol Cell. 2024 Jan 4;84(1):156-169.
- ②Ishimura R, Ito S, Mao G, Komatsu-Hirota S, Inada T*, Noda NN*, Komatsu M*. Mechanistic insights into the roles of the UFM1 E3 ligase complex in ufmylation and ribosome-associated protein quality control. Sci Adv. 2023 Aug 18;9(33):eadh3635.

2023年度（第48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所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（トルコのウスキュダル大学スーフィズム研究所、フランス国立社会調査センター宗教社会ライシテ班など）との研究連携を強化する。

2. 研究の計画

- (1) 研究班の連携を緊密にして、各班での研究会等を実施する。
 - ①2022年度に確立した三つの研究班に、より多くの研究協力者の参加を促す。
 - ②各班が研究会を複数回実施し、可能なら研究合宿も行う。
- (2) 新型コロナウイルスの流行を脱しつつあることから、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。
 - ①第6回中東研究世界大会 (World Congress for Middle East Studies, WOCMES 2023) での部会発表を実施する。
 - 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収集資料を学生教職員等の利用に広く供せるよう、本学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ウェブサイトでの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) 現代を生きるムスリムたちの公共性概念を焦点とした地域研究の推進について事例研究を進め議論を深めた。とくに、伝統的な概念と近代に導入された概念の対立と融和の動態の複雑さが注目を集めるとともに、世俗的な公共性もイスラーム的な公共性も、ともするとナショナリズムに絡め取られていく、現代のムスリム諸国の事情が明らかになりつつある。
 - ①大衆イスラームの展開を主題とするA班は、スーフィズムと結びついた穏健派イスラームの台頭をめぐる研究会（6月11日、11月12日）、研究協力者1名（他に別資金により研究分担者2名、研究協力者3名）をフランスに派遣して国際ワークショップを開催（9月）スーフィズムの市民運動的な展開に冠する研究発表を重ねた研究合宿（2024年3月22日～23日）を行い、スーフィズムが試行錯誤しつつも、新たな形をとって現代的公共性を獲得しつつあることを明らかにした。国際ワークショップの成果は2024年度に刊行の予定である。
 - ②経済と社会の面での公共性に着目するB班は、フランスから1名を招聘し（5月）、昨年度から継続のヨルダン等での女性の公共圏進出に関する共同研究を受けた国際セミナー3回を実施し、その成果をSIAS Lecturesの第10号（英文論集、出版物⑧）として刊行した。その他、モロッコ地震を事例として、自然災害対応における公共性の発揮を主題とする研究会（10月10日）を開催し、これを含めて2024年度に共同研究を加速することとした。
 - ③政治面での公共性を論ずるC班は、オランダから1名を招聘し（2024年2月）、クルドを事例に伝統的公共性と近代的公共性の相克と融合をめぐる国際セミナー3回を開催し、その成果はSIAS Lecturesの第13号として2024年度に刊行の予定で準備を進めている。
 - ④研究所経常予算、別外部資金等も援用し、スウェーデン（8月）、トルコ（2名、研究協力者を含め計3名、8月）、フランス（3名、研究協力者を含め計6名、9月）、トルコ（2024年2月）、エジプト（2月）、セネガル（2～3月）、エジプト（2～3月）、フィリピン（2～3月）、カンボジアおよびベトナム（3月）、サウジアラビア（3月）でそれぞれの地域で注目すべきと思われるイスラームの公共性の発揮をめぐる現地調査10件を実施した。2024年度以降に研究成果公開が予定される一方、継続調査については別途資金の手当を行う必要がある。
- (2) イスラーム地域研究の継承と発展については、スウェーデン、フィリピン、カンボジア、ベトナムと行ったムスリムが少数派である地域での調査実施を含め、上述（1）の一部も成果として挙げられるが、研究内容の社会還元に向けた活動として下記が言及に値する。
 - ①SORW 2023の企画として、オンデマンド連続講演会「イスラームにおける聖性の継承：預言者、聖者の血統と聖遺物」を11～12月に開催した。実施講演数は4本であり、総視聴数は450強となった。
 - ②SORW 2023の企画として、上智大学アジア文化研究所との共催により、イスラーム関連の解説付き映画上映会を11月に実施した。参加者数は約90名だった。
 - ③昨年度のSORW 2022の公開シンポジウムの内容をまとめてSIAS Lecturesの第11号（論集、出版物①）として刊行し、また昨年度刊行の第7号および第9号を、大学リポジトリ上で公開した。これらは大学の授業の副読本などとして教材利用されている。
 - ④別資金により研究分担者2名（他に別資金により研究協力者1名）をイスタンブールに派遣し（8月）、専門家以外に広く開かれた国際シンポジウム1回を開催した。一般の来場者数は約100名だった。
- (3) 上智大学を舞台に、諸宗教の調和に向けたイスラーム地域研究所の機能の充実と他機関との連携強化については、下記が成果として挙げられる。
 - ①若手研究者を中心に研究協力者をふやし、共同研究への主立った参画者として共同研究所員1名、名誉所員2名を増員し、2024年度に向けて客員所員1名の採用を手続きした。
 - ②配付申請書に記載の金額により、当該分野の書籍21冊を購入し、大学中央図書館での利用に向けて準備を進め、研究所のウェブサイトなどを介した、日英語による研究情報発信を充実させた。
 - ③学内ではアジア文化研究所とよく連携し、学外では研究協定を結ぶ京都大学ケナン・リファーマー・スーフィズム研究センターとは多くの取組を通して国内外で共催などを行った。国際的には、ウスキュダル大学スーフィズム研究所、フランス国立社会調査セン

ター宗教社会ライシテ班と連携を深めてそれぞれ国際シンポジウムと国際ワークショップ各1件を共催した。その他、京都大学人文科学研究所、京都産業大学国際関係学部、東京大学中東地域研究センター、フランス国立社会調査センター中世イスラーム班、コレージュ・ド・フランス・オスマン研究センターとの連携機会も得た。

4. 研究の反省・考察

- (1) 研究班の連携は緊密で研究会、研究合宿等の実施は前年度と同様でおおむね着実だった。
 - ① 研究班を超えて、全体の研究集会の実施を年度途中から企図したが実施にいたらなかった。
- (2) 現地調査の実施は前年度に比して格段に活発に行われた。
 - ① 夏期にも複数の調査が実施されたが、実施時期が年度末に偏る傾向は前年度と同様だった。
- (3) 予定以上に多数の国際セミナー、ワークショップ、シンポジウム等を実施できた。
 - ① 招聘、派遣双方での実施ができ、連携機関と研究協力協定締結への動きも作り出せた。
- (4) 公開講演会等を開催して研究の周知と成果の還元を行えた。
 - ① SORW 2023で2件の催しを実施でき、本研究とその実施主体である上智大学イスラーム地域研究所の活動を広く周知できた。
- (5) 国際会議での部会発表は果たせなかったが、成果刊行は日英語で行った。
 - ① WOCMES 2023は結局中止となり、年度内に代替の国際会議での部会を組織することはできなかった。WOCMESについては、現在、再開に向けた協議への参加を検討している。
 - ② 論集SIAS Occasional Papersでの成果刊行は2024年度に繰り越された。
 - ③ 講演録SIAS Lecturesは予定を上回って2冊を刊行した。
 - ④ 最終的な成果の刊行については、本研究の2024年度の配布申請が不採択に終わったため、2025年度以降に別途の資金獲得などによって研究継続と併せ、企図することとなった。
- (6) 関連の研究資料の収集は予定通りに行ったが、図書館で広く学生、教職員の利用に供するにはいたらなかった。
 - ① 資料の中央図書館での配架については、2024年度に交渉が繰り越された。
- (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した。
 - ① ウェブサイトでの日英語による発信は安定的に展開された。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
 - ① 赤堀雅幸「中東民族誌の四半世紀を振り返る」『社会人類学年報』49巻、35-57頁、2023年12月
 - ② 井堂有子・岩崎えり奈「エジプトの食糧不安：対外依存と都市の脆弱層、食糧補助金制度を中心に」『アジア・アフリカ研究』63巻3号、2-24頁、2023年7月
 - ③ 久志本裕子「東南アジアのイスラームを通じて偏見・差別の構造を考える：『穏健』で終わらないための概念型の講義設計」『上智アジア学』41号、101-126頁、2023年12月
 - ④ 澤江史子「イスラモフォビアを日本で自分事にする補助線：西洋中心主義的な認識論的三層構造と日仏のポストコロニアルな経験から考える」『上智アジア学』41号、11-39頁、2023年12月
 - ⑤ 辻上奈美江「ビジョン2030とコロナ禍でサウジ女性のビジネスと女性はどう変わったか」『中東協力センターニュース』48巻5号、16-27頁、2023年8月
 - ⑥ 湯浅剛「ウクライナ戦争開始後のロシアによる中央アジアへのアプローチ：変質する『旧宗主国』の役割とリソース」『国際問題』717号、35-43頁、2024年2月
 - ⑦ Kashiwagi Kenichi and Iwasaki Erina, “Industrial Linkage, Vertical Integration and Firm Performance: Evidence from Textile and Garment Industry in Egypt,” *Quality and Quantity* vol. 58 no. 1, DOI: 10.1007/s11135-023-01667-y, February 2024
 - ⑧ Kushimoto Hiroko, “Tackling Prejudice against Islam in Japanese University Education: Identifying Key Concepts,” *International Conference of Languages Education and Tourism 2023 e-Proceedings*, August 2023
- (2) 口頭発表
 - ① 久志本裕子「マレー・ムスリムにとっての心身の癒しとイスラーム：『共にいること』の重要性」日本マレーシア学会第32回研究大会、東京大学、2024年1月21日

- ② Akahori Masayuki, “Reviewing Anthropology of Sufism: Changing Perspectives,” ISS International Symposium, “Bridging Mystical Philosophy and Arts in Sufism: Poetry, Music and Sama’ Ritual,” Uskudar University, Istanbul, August 28, 2023
 - ③ Inaba Nanako, “Resistance of Undocumented Migrants in Immigration Detention Centers in Japan,” 17th International Conference of the European Association for Japanese Studies, Ghent University, August 18, 2023
 - ④ Iwasaki Erina, “Challenges of Water Sustainability in New Valley, Egypt,” Challenges and Solutions for Global Water Scarcity; 1st Workshop (Egypt), Cairo, August 22, 2023
 - ⑤ Iwasaki Erina, “Groundwater Development in Kharga Oasis, Western Desert (Egypt) in the Era of Neoliberalism,” 7th Symposium for the Enhancement of Egypt-Japan Joint Research Projects in Egypt, Cairo, December 27, 2023
 - ⑥ Iwasaki Erina, M. Hagage and S. Elbeih, “The Relationship between Water Resources, Land Use, and Socioeconomic Changes in Kharga Oasis, Western Desert (Egypt),” 2nd International Conference on Water Resources Management and Sustainability, Marriott Hotel Al Jaddaf, Dubai, February 26, 2024
 - ⑦ Kushimoto Hiroko and Noor Azmira binti Amran, “Socio-Cultural Contexts of Reverse Gender Gap in Higher Education in Malaysia,” International Workshop “Better Together: Female Alliance & Empowerment in Contemporary Malaysia,” Kyoto University, July 26, 2023
 - ⑧ Kushimoto Hiroko, “Tackling Prejudice against Islam in Japanese University Education: Identifying Key Concepts,” International Conference on Language, Education and Tourism, International Islamic University Malaysia, Pagoh, August 8, 2023
 - ⑨ Tonaga Yasushi, “Arts of Literature, Music and Rituals in Buddhism,” ISS International Symposium, “Bridging Mystical Philosophy and Arts in Sufism: Poetry, Music and Sama’ Ritual,” Uskudar University, Istanbul, August 28, 2023
 - ⑩ Tsujiigami Namie, “How Haram Becomes Halal: Gendered Impact of Social Change in Saudi Arabia,” Middle East Studies Association, Montréal Convention Centre, November 4, 2023
 - ⑪ Yamaguchi Akihiko, “Urban Evolution in Iranian Kurdistan during the Early Modern Era: Shift from Mountain Strongholds to Flatland Cities,” Online Lecture at the Section of Kurdish Studies of the Jagiellonian University, October 17, 2023
- (3) 出版物
- ① 赤堀雅幸編『スーフィズムにみる音と身体の技法』SIAS Lectures 11、上智大学イスラーム地域研究所、2024年3月
 - ② ハイメ・タカシ・タカハシ、エドゥアルド・アサト、樋口直人、小波津ホセ、オチャンテ・村井・ロサ・メルセデス、稲葉奈々子、オチャンテ・カルロス『ペルーから日本へのデカセギ30年史：Peruanos en Japón, pasado y presente』インパクト出版会、2024年2月
 - ③ 岸見太一、高谷幸、稲葉奈々子『入管を問う：現代日本における移民の収容と抵抗』人文書院、2023年7月
 - ④ 長沢栄治監修、岩崎えり奈、岡戸真幸編『労働の理念と現実』イスラーム・ジェンダー・スタディーズ、明石書店、2024年3月
 - ⑤ 久志本裕子、野中葉編『東南アジアのイスラームを知るための64章』エリア・スタディーズ、明石書店、2023年4月
 - ⑥ 辻上奈美江「イスラームとジェンダー：湾岸地域を中心に」長沢栄治、後藤絵美編『東大塾現代イスラーム講義』東京大学出版会、2023年9月
 - ⑦ 東長靖「神秘体験とその表現：エリートと民衆、個人と組織のあいだ」赤堀雅幸編『スーフィズムにみる音と身体の技法』SIAS Lectures 11、上智大学イスラーム地域研究所、2024年
 - ⑧ Myriam Ababsa, *Land Inheritance, Notability and City Governance in the Middle East: Cases from Raqqa and Amman*, SIAS Lectures 10, Tokyo: Institute of Islamic Area Studies, Sophia University, March, 2024

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	成 城 大 学	研究所名等	成城大学民俗学研究所
研 究 課 題	「山村・海村・離島調査」の創造的継承と発展に向けた基礎的研究 —新たなる0ポイントの構築に向けて—		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①山村調査 ②海村調査 ③離島調査 ④追跡調査 ⑤柳田國男 ⑥採集手帖 ⑦現代民俗学 ⑧『山村生活50年』		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 澤 正 人	文 芸 学 部 成城大学民俗学研究所	教 主 授 事	総括

○研究分担者

[illegible]

「山村・海村・離島調査」の創造的継承と発展に向けた 基礎的研究

ー新たな「0ポイント」の構築に向けてー

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

①これまでの取り組み

民俗学の創始者・柳田國男は1930年代後半に「日本僻陬諸村に於ける郷党生活の資料蒐集調査」（通称「山村調査」）を実施し、日本の民俗学史上はじめての同一規格による組織的全国調査を実現させた。続く「離島及び沿海諸村に於ける郷党生活の調査資料蒐集」（通称「海村調査」）、1950年代の「本邦離島村落の調査研究」（通称「離島調査」）をあわせて、これらの初期民俗学の系統立った調査の成果は、日本における庶民生活の変遷に関する資料として高く評価されている。

成城大学民俗学研究所では以上の調査票である「採集手帖」を収蔵し、DVDとしてデジタル公開しているのみならず、「山村調査」「海村調査」「離島調査」を「0ポイント」としてその追跡調査を実施してきた。すなわち、1980年代には「山村生活50年 その文化変化の研究」、1990年代には「沿海諸地域の文化変化の研究—柳田國男主導『海村調査』『離島調査』の追跡調査研究—」等を実施し、その後も追跡調査をベースとするプロジェクトが継続されてきた。ただし、これらの追跡調査は限定的なものであり、また、未刊行の一次資料が研究所内に多く集積されている。2022年度からは「民俗学研究所による山村・海村・離島調査資料の再整理」を始動させ、資料の再整理を行ないつつ、今後の追跡調査の方向性について検討を進めている。

②問題の所在

以上の蓄積からは、日本の戦後生活のドラスティックな変容が明らかにされてきた。近年の調査から確認されるのは、生活変化の速度の加速である。そのような高速度化する変容に加え、毎年のように襲来する災害やこのたびのコロナ禍は、各種の暴力的断絶を地域生活にもたらしている。来たるべき「山村調査」100周年にむけては、より短いタイムスパンでの定点記録の集積が求められる。他方、インターネット元年から30年近くが経過し、デジタルデバイスは僻陬諸地域の高齢者の手にもわたっている。情報化社会の生活インフラの激変は、「追跡」調査のみならず、新たな焦点を定めたうえでの総合的調査を要請する。すなわち、「追跡」に終始することでは見えない「現在の生活」が厳然としてあるのであり、現代の社会文化動態に見合った視点の確立が急務となっている。2023年を以て開設50周年を迎えた民俗学研究所としては、調査研究のネクストステージに向けて、長期的な調査継続を前提とする新たな「0ポイント」の構築が求められていると言えよう。

(2) なにをどこまで明らかにするか

①長期的定点調査の基礎を構築

本研究では民俗調査および人類学的調査・歴史学的調査の経験をもち、かつ、民俗学の今日の社会状況への対応を重視する現代民俗学の視野をもつ研究所員が連携し、成城大学民俗学研究所の「山村・海村・離島調査」の追跡調査の成果を継承しつつ、今日の地域課題に即応した調査を実施することで、持続可能な長期的定点調査の基礎を構築することを目指す。

②民俗の衰退論をこえる

具体的には「山村・海村・離島調査」の対象地から調査地をピックアップし、当該地域の生活事象の調査研究を3ヶ年にわたって行なうことで「山村調査」以後の生活変容を総括し、あわせて、いわゆる「民俗」に拘泥することなく調査地の暮らしの「いま」を観察することで、次の100年に向けた継続的な定点調査の焦点とすべき論点を明らかにする。これにより、消滅や断絶、崩壊や変容を数え上げる定点調査を乗り越え、地域のクリエイティビティをも考慮した調査を行なうことで新たな「0ポイント」を構築し、民俗学研究所の将来の基幹事業のプロトタイプを構築する。

2. 研究の計画

(1) 2023 年度の計画

①山村調査班の活動

岩手県九戸村・宮城県丸森町・茨城県高萩市・千葉県香取市での調査。

②海村・離島調査班の活動

東京都青ヶ島村・鹿児島県奄美市での調査。

(2) 調査成果の整理と共有

①調査成果の整理

上記調査の成果を速やかに整理し、かつ山村・海村・離島調査およびそれらの追跡調査の成果と照合可能にするための統合作業をアルバイトスタッフに依頼。

②調査成果の共有

上で述べた①の成果はクラウド上に保存し、ネット環境があれば調査地で随時閲覧可能な状態として共有する。これにより、各班の連携的な調査が期待される。

3. 研究の成果

(1) 追跡調査の進展

①山村調査班

岩手県九戸村・宮城県丸森町・茨城県高萩市・千葉県香取市での調査により、既往の調査以降の生活変化の様相を把握する作業を進めた。

②海村・離島調査班

東京都青ヶ島村・八丈町での調査により、既往の調査以降の生活変化の様相を把握する作業を進めた。

(2) 新たな調査地へ

①山村調査班

千葉県香取市での調査に際し、地域社会の変容をモビリティやツーリズムとの関係から把握するため、従来の調査地ではなかった佐原旧市街地での観察と聞き取りを実施した。

②海村・離島調査班

鹿児島県奄美市での調査によって、現代における離島生活の諸課題に照準した新規調査の可能性を模索した。

4. 研究の反省・考察

(1) 2023 年度の反省

①調査者拡充の必要

2023年度は十分な深度の調査を実現させることができたが、複数名のスタッフで実施した香取市佐原調査以外は、調査効率に課題があるといえる。2024年度は研究協力者を増員し、ひとつの調査地に複数名の調査者で臨み、かつ、より広域の調査を平行して実施できる体制を構築することを目指す。

②インテンシブな調査の必要

2023年度調査からだけでも、現代民俗学的視点から追跡調査を行なうことの意義を十分に確認することができたが、それは同時に、個々の地域により深く入り込むべきことを意味する。2024年度以降、調査地は拡大していく計画であるが、2023年度の対象地域にも引き続き通い、調査を継続する必要がある。

(2) 2023 年度調査成果からの考察

①画一化論への疑義

地域生活の近代化・現代化は各地の画一化を惹き起こすという見方が随所でみられる。近代化・現代化の過程に注目する本プロジェクトも、そのようなどこでも同じになってしまった日本を描き出すことになるかもしれないという懸念があったが、交通網の整備、情報化、ツーリズムへの対応、国際化、日常への商業主義の浸透（生活の外部化）といった諸点においても、各地の状況は当該地の歴史的背景や環境、近代化・現代化の経路、そして、私たちと同様に現代人であるところの地域住民による創意工夫とヴァナキュラーな生活の戦術によって、きわめて多様であることが確認できた。民俗の消滅、地域社会の衰退といったビジョンとともに想定されやすい〈画一的現代〉観を批判し、各種の課題を抱えつつもよりよく暮らそうとする人びとの営みを正視することが、本プロジェクトを通して可能に

なるだろう。

②地域を超える試みへ

大規模な地域調査プロジェクトである山村・海村・離島調査の追跡を試みる本プロジェクトも必然的に「地域」を対象とする調査を前提にしている。その一方、生活の動態は「家」や「地域」といった諸集団のみならず、交通網の沿線や災害の被災地などの広域にわたるエリアに関わる現実には作用し、また、一方で、地域社会で特定の人びとが果たしてきた役割・機能の変遷としても把握することができる。すでに、本プロジェクトの前身となるプロジェクトが半島を単位とする広域民俗誌に挑戦したように、メゾレベルの視点とミクロな視点とを往還しつつ、地域社会を横断するような調査が試行される余地があるといえるし、地域ではなく、個人の営みや個人に担われてきた役割の世代交代の過程を追跡していくような調査が構想される余地があるといえる。これにより、イエやムラによる生き方への拘束性が減退し、選択的で流動的な暮らしが可能になった現代社会における生活実態をより適切な深度で捉えることができるだろう。

以上の①②については、以後のプロジェクトにも柔軟に関連づけ、〈新たな0ポイント〉と称すに見合う基礎的情報群の構築を目指していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

調査継続中につき、なし

(2) 口頭発表

調査継続中につき、なし

(3) 出版物

調査継続中につき、なし

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	創 価 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	難培養性微細藻類の成長促進物質の特定と新規成長培地の研究開発	研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①土壌抽出液 ②有価物生産 ③分子量分布 ④有機物画分 ⑤大量培養		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 龍 樹	創 価 大 学 創 理 工 学 部 / プランクトン工学研究所	教 授	研究代表者・総括（実験計画の策定と評価、ならびに新規微細藻類培地の開発）

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
古 谷 研	創 価 大 学 プランクトン工学研究所	教 授	実験計画の策定と有用微細藻類の増殖能・有価物生産能の評価
高 山 佳 樹	創 価 大 学 プランクトン工学研究所	助 教	有用微細藻類の培養と増殖能の測定
清 水 昭 夫	創 価 大 学 創 理 工 学 部	教 授	溶存有機物の分子量・構造特性の推定
関 根 睦 実	創 価 大 学 創 理 工 学 部	助 教	有用微細藻類の培養と増殖能の測定
小 松 一 弘	信 州 大 学 信 工 学 部	教 授	溶存有機物の分子量・化学特性の推定
今 井 章 雄	国 立 環 境 研 究 所	フ ェ ロ ー	実験計画の策定と溶存有機物の化学特性の推定

難培養性微細藻類の成長促進物質の特定と 新規成長培地の研究開発

1. 研究の目的

(1) 微細藻類の大量培養における新規培地開発の必要性

微細藻類は、医薬品や化粧品の原料となる様々な高付加価値物質を有していることから、大量培養の試みが世界各地で行われている。ところが残念なことに、これまでに大量培養され産業利用に至っている微細藻類は、自然界に生息する数十万種もの多様な藻類の中でも、わずか30種（株）程度にすぎない。微細藻類の大量培養には、有価物生産に有用な微細藻類種や各種の最適培養条件の探索が不可欠である。培養条件の最適化は、長年の研究課題であり、中でも増殖のための栄養源となる「培地」の開発が不可欠である。現在の微細藻類の大量培養において主流となっている「人工培地」には、微細藻類の増殖に最低限必要な無機栄養塩やビタミンなどの栄養素が含まれ、世界の藻類生産量のほぼ100%を占めるスピルリナやクロレラの大量培養に使用されている。これらの培地では、未だに多くの微細藻類種の大量培養が困難であり、難培養な微細藻類種に最適な培地の開発が重要な課題となっている。

(2) 土壌抽出液による微細藻類の増殖促進効果

難培養な微細藻類の増殖促進には、必須栄養素だけでなく通常の人工培地に含まれない微量元素や有機物などの微量栄養素の供給が重要であると推察される。元来、降雨による土壌からの浸出水が沿岸域に流れると、赤潮（微細藻類の大増殖）が誘発されることが経験的に知られていることから、ESM培地の添加成分には「土壌抽出液」が含まれている。ラボスケールの藻類培養に土壌抽出液を利用する試みは未だ限定的であるが、微細藻類の増殖が促進されるという知見は1950年代から断片的に報告されている。土壌抽出液は溶存有機物（DOM: Dissolved organic matter）を豊富に含有し、そのキレート作用により形成される金属錯体が微細藻類の必須微量元素の利用能を高める効果や成長ホルモンに類似した作用が報告されている。このことから、土壌抽出液に含まれるDOMは、微細藻類の増殖に深く関与している物質であると考えられ、土壌抽出液の添加は、微細藻類の増殖促進に極めて高い可能性を秘めている。DOMはヒューミン、フミン酸、フルボ酸と呼ばれる物理化学的特性の異なる腐植物質を含有し、個々の腐植物質は藻類の増殖への異なる影響が報告されている。土壌抽出液由来の腐植物質画分とその分子量に着目し、藻類の増殖促進作用との関連性を調べることは、土壌抽出液による増殖促進効果の解明につながる。本研究は難航している微細藻類の大量培養にブレイクスルーをもたらす萌芽性がある。加えて、微細藻類の大量培養を目指す上で、培養環境の制御や微細藻類株の有価物生産性を高めることも重要である。土壌抽出液の添加により微細藻類種の有価物生産性を高めることができれば、土壌抽出液の微細藻類培養への有用性が高まり、新たな有用物質回収システムの構築が期待できる。

(3) 本研究の目的

本研究では、①土壌抽出液中の成長因子である有機物特性を分析し、②その添加が微細藻類の増殖と有価物生産に与える影響を明らかにするとともに、③難培養な微細藻類種の増殖促進のための新規培地の研究開発を行う。土壌抽出液の添加条件下における微細藻類の有価物生産性は、未だフラスコやマイクロプレートによる簡易的な手法での評価に限られている。そこで最終年度には、大量培養への応用に不可欠な長期連続運転下における影響を評価する。初年度にあたる2023年度は、難培養性微細藻類株の増殖に効果的な土壌、溶存有機物抽出法を特定した。

2. 研究の計画

(1) 土壌抽出液の作成

土壌には、沖縄県国頭郡の森林表層部から採取された赤色土（国頭村奥）、暗赤色土（国頭村謝敷）、および黄色土（国頭村与那覇岳付近）を使用した。それぞれ、60℃で乾燥し、

ゴムハンマーで粉砕した後、篩を用い粒径1.0 mm以下に揃えた。土壌成分の抽出には、純水または、微細藻類の培地に使用する海水を用いた。メディウム瓶に土壌と純水（または海水）を1:4の重量比になるように入れ、25℃、105℃、および121℃の3温度条件で1時間抽出した。加熱にはオートクレーブを用いた。溶液を室温まで冷ました後、ガラス繊維フィルター（Whatman GF/F）を用いて上清を濾過した。3種の土壌、3段階の抽出温度による9種のろ液の低分子化を図るため、オートクレーブを用いて121℃で、0、1、および5時間再加熱し、合計27条件の土壌抽出液を作成した。

作成した土壌抽出液は以下の例のように3つのアルファベットおよび数字でラベルした。

（例）R-25-0

ここで、Rは土壌タイプを示し、赤色土をR、暗赤色土をD、黄色土をYとした。25は初めの1時間の抽出温度を示し、続く0はろ液の121℃での再加熱時間を示す。

土壌抽出液の測定項目は、溶存有機炭素(DOC)濃度、溶存態窒素(DTN)濃度、溶存無機栄養塩濃度(NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、 PO_4^{3-} -P)、254 nmにおける吸光度(UVA254)とした。また、土壌中の蛍光腐植物質を定量化するため、Excitation emission matrix-Parallel factor (EEM-PARAFAC) 解析を実施した。

(2) 土壌抽出液の添加による微細藻類の増殖促進効果の評価

上記の抽出法により得られた土壌抽出液を添加した培地にて、難培養性株を含む微細藻類5種(*Isochrysis galbana*、*Oocystis marssonii*、*Oocystis heteromucosa*、*Dunaleilla* sp.、*Chlorogonium* sp.)を培養した。*I. galbana*は、ハプト藻に属し、DHAや抗酸化作用の高いフコキサンチンを蓄積する。本種は難培養性ではないが、他の難培養性種との比較系列として培養した。難培養性の微細藻類には、緑藻の*Oocystis* 2種、*Dunaliella*、*Chlorogonium*を使用した。*Oocystis*はEPAを、*Dunaliella*は抗酸化作用のある β -カロテンを蓄積する。*Chlorogonium*は、アルテミア幼生の生存率を上げるための優れた餌料として報告されている¹⁾。培地は、*Dunaleilla* sp.にはKW-21、*Chlorogonium* sp.にはC培地、その他の種にはConway培地を用いた。土壌抽出液は、DOC濃度が10 mg-C/Lとなるように培地に添加した。培養容器は10 mL試験管を使用し、温度30℃、光強度300 $\mu\text{mol-photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、明暗周期は12時間とした。680 nmにおける吸光度を測定し、各条件における微細藻類の比増殖速度および最大吸光度を比較・評価した。

[引用文献] 1) Nishida et al., *Aquaculture*, 566: 739227, 2023.

3. 研究の成果

(1) 土壌抽出液の作成

① 高温抽出によるDOM溶出の促進

抽出温度25℃、105℃、121℃のそれぞれにおいて、土壌抽出液のDOC濃度は、37～56 mg-C/L、89～121 mg-C/L、127～243 mg-C/Lの範囲、DTN濃度は、3～6 mg-N/L、7～15 mg-N/L、11～25 mg-N/Lの範囲の値となった。DOCおよびDTN濃度は、いずれの土壌種についても、抽出温度の上昇に伴い増加する傾向を示した。再加熱による濃度の変化は見られなかった。無機態窒素について、 NO_3^- は、検出限界以下であった。 NO_2^- および NH_4^+ はそれぞれ0.004～0.048 mg-N/Lおよび1.04～6.15 mg-N/Lの範囲の値となった。 NO_2^- および NH_4^+ から計算される溶存無機窒素(DIN)は1～6 mg-N/Lであるのに対し、DTNとDINの差分にあたる溶存有機態窒素(DON)は最大で22 mg-N/Lであり、高温抽出条件で特に高い値を示した。25℃抽出では昇温にエネルギーがかからないものの、DOMの抽出効率が低い。一方で、105℃および121℃の高温抽出では同量の土壌から高濃度でDOMを抽出することができ、土壌消費量と、抽出液の培地への添加量を約4分の1に抑えることができる。多量の培地を消費する微細藻類の大量培養においては、高温抽出で利便性が高い。

② 抽出液の蛍光腐食物質の特定と効果的な抽出条件の解明

芳香族化合物や不飽和二重結合は紫外外部波長260 nm付近で吸収を示すため、UVA254は芳香族である腐食物質含量の指標となっている。UVA254/DOC比によって、DOC中のフミン質を簡易的に評価することができる。土壌抽出液中のUVA254は、抽出温度25℃、105℃、121℃のそれぞれにおいて、300～576 mAbs/cm、1038～1818 mAbs/cm、1566～3420 mAbs/cmの範囲の値となり、抽出温度の上昇に伴い増加する傾向を示した。UVA254/DOCは5～17 mAbs $\cdot$ cm⁻¹ $\cdot$ mg-C⁻¹ $\cdot$ Lの範囲の値を示した。赤色土、暗赤色土では、抽出温度の上昇に伴

い増加する傾向を示し、黄色土では、低温であってもUVA254/DOCは高く、抽出温度に伴う変化はほとんど見られなかった。

EEM-PARAFAC解析の結果、土壤抽出液に含まれる蛍光腐植物質は4種類 (Component 1~4) あることを確認した。Component 1は低分子かつ芳香族が比較的少ない腐植物質様成分、Component 2は海洋性の植物プランクトン生成物、Component 3は高分子の腐植物質様成分、Component 4はフルボ酸様成分であることが示唆された¹⁻⁶⁾。25℃で抽出した土壤抽出液には、フルボ酸様成分であるComponent 4は検出されず、抽出温度105℃以上で確認できた。土壤の種類にかかわらず、抽出温度の上昇に伴い、4つの蛍光物質の抽出量が増加した。さらに、土壤抽出液を再加熱した条件においても蛍光物質濃度の増加が確認された。特に、低分子の腐植物質様成分Component 1は再加熱によって7~52%増加した。DOC濃度は再加熱によって変化しなかったことから (3. 成果(1)①参照)、再加熱は抽出液中のDOCを変性させ、低分子の腐食物質含量を増加させる効果をもつと考えられた。以上より、土壤の高温抽出・再加熱処理によって特に低分子の腐食物質を効率的に抽出できることが明らかとなった。

(2) 土壤抽出液の添加による高い増殖促進効果を5種の微細藻類種で確認 (図1)

I. galbana, *O. marssonii*, *O. heteromucosa*, *Dunaleilla* sp., *Chlorogonium* sp. の5種について、上述した27条件の土壤抽出液を添加して培養し、比増殖速度と最大吸光度を測定することで土壤抽出液による増殖促進効果を評価した。土壤抽出液の添加により、微細藻類の比増殖速度が向上する場合、最大吸光度が向上する場合、また、比増殖速度及び最大吸光度の両方が向上する場合が見られた。例えば、難培養性の*O. heteromucosa*では、比増殖速度は、黄色土 (Y-121-5) の条件で、対象区の3.1倍高い値となった。同様に、難培養性の*Chlorogonium* sp. では、暗赤色土 (D-121-0) の条件で、対象区の3.9倍高い比増殖速度をもたらした。同時に、本種において、同じ暗赤色土の条件で対象区の3.6倍高い最大吸光度が得られた。易培養性の*I. galbana* においても、暗赤色土 (D-105-0およびD-105-5) の条件で、対象区の1.5倍高い比増殖速度が得られ、黄色土 (Y-105-5) の条件で、対象区の1.9倍高い最大吸光度が得られた。さらに、*O. marssonii*の培養においては、赤色土を121℃で抽出した条件で、対象区における6日間のラグフェーズを、3日間に短縮させることができた。

以上のように、比増殖速度や最大吸光度を顕著に向上させる、微細藻類種および土壤抽出液の複数の組み合わせが見つかり、特に、難培養性の微細藻類の比増殖速度を最大4倍程度、最大吸光度を最大3~4倍程度向上させることができた。難培養性藻類のラグフェーズ・培養期間の短縮効果も確認され、難培養性微細藻類の新規培地の開発に道筋が見えた。

[引用文献] 1) Coble et al., *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(10-11): 2195-2223, 1998. 2) Stedmon et al., *Marine Chemistry*, 82(3-4): 239-254, 2003. 3) 小松ら. *水環境学会誌*, 31, 261-267, 2008. 4) 眞家. *日本土壤肥科学雑誌*, 80: 419-426, 2009. 5) Aiken et al., *Cambridge Environmental Chemistry Series*, 35-74, 2014. 6) Jaffe et al., *ACS Symposium Series*, 1160: 27-73, 2014.

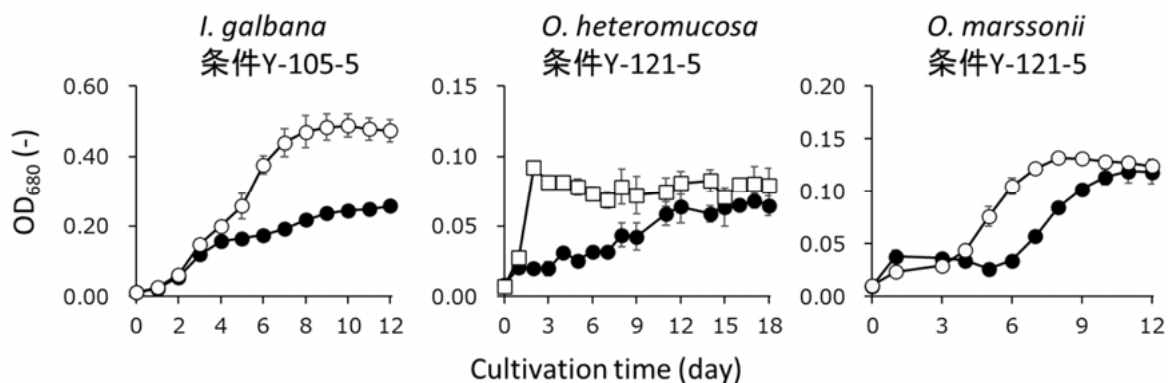


図1. 土壤抽出液による増殖促進効果を示す*I. galbana*, *O. marssonii*, *O. heteromucosa*の代表的な増殖曲線。黒丸は土壤抽出液を添加しない対象区、白丸は添加した実験区。

4. 研究の反省・考察

- (1) 土壌中の腐植物質による微細藻類の増殖の影響を評価するため、EEM-PARAFAC 解析によって分離された 4 つの蛍光物質と、各藻類の比増殖速度および最大吸光度の増加率との関係性を検討したが、予想に反し、効果的な蛍光物質を特定することはできなかった。このため蛍光腐食物質以外のパラメータが増殖に寄与している可能性がでてきた。次年度に実施する土壌抽出液の微量金属含量の測定、固体¹³C-NMR 法による炭素特性（官能基構造）の分析、および創価大学所有のマトリックス支援レーザー脱離イオン化法と（MARDI）と飛行時間型質量分析法（TOFMS）による土壌抽出液の溶存有機物の分子量分布の定量的結果をパラメータに加えることによって微細藻類の成長因子の特定が期待される。
- (2) 研究の当初計画では、土壌成分を純水で抽出する予定であったが、25℃で作成した土壌抽出液中の DOC 濃度は 37~56 mg-C/L と低濃度であったため、海水培地に必要量の淡水土壌抽出液を混合すると培地の塩分が下がるという問題があった。そこで、海水培地に添加する際には純水の代わりに海水で抽出した土壌抽出液を使用した。今年度の研究によって、炭素や窒素の抽出効率と、105℃や 121℃の抽出液でも高い微細藻類の増殖促進効果が得られることが明らかとなった。新規培地の作製には高温での抽出が有利である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Effects of various soil extract fraction types on the growth of marine microalgae, Emi F. Hashim, Kazuhiro Komatsu, Akio Imai, Hidemi Onouchi, Wan Muhammad Ikram Wan Mohd Zamri, Nor Suhaila Yaacob, Masahiro Ohtake, Mutsumi Sekine, Tatsuki Toda. *Journal of Sustainability Science and Management*, 18(7), 167–185, 2023.

(2) 口頭発表

- ① 小島咲、関根睦実、大竹正弘、戸田龍樹. 標準フルボ酸の添加が微細藻類 *Isochrysis galbana* の増殖に与える影響. 日本水環境学会. 2023年3月. 愛媛. (ポスター)
- ② Saki Kojima, Mutsumi Sekine, Masahiro Ohtake and Tatsuki Toda. Growth-promoting Effects of Soil Extracts on Valuable Microalgae. The 6th International Postgraduate Conference on Biotechnology (IPCB). 2023年8月. National University of Singapore.
- ③ 小島咲、関根睦実、大竹正弘、小松一弘、片山智代、Fatimah Md. Yusoff、戸田龍樹. 土壌抽出液添加による有用微細藻類の増殖促進. 日本腐植物質学会. 2023年11月. 東京. (ポスター)

(3) 出版物

なし

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	東 海 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	創薬展開を見据えたリラキシンの化学合成基盤の創出 — セレン化学に立脚したリラキシン製剤開発 —	研 究 分 野	理 学 (理工系)
キ ー ワ ー ド	①リラキシン ②インスリンファミリー ③ペプチド合成 ④ペプチド製剤 ⑤ジセレニド結合 ⑥創薬 ⑦子宮内膜症		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
荒 井 堅 太	東海大学 理学部化学科	講 師	研究の総括 実験の立案・実施 成果報告

○研究分担者

[illegible]

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『ヒトリラキシン 2 (以下リラキシン)』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。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最終目標としている。研究初年度 (2022 年度) において、A 鎖と B 鎖からの直接的なカップリング (二重鎖酸化的 folding) による新たなリラキシンの化学合成経路を開拓し (下記 2. 研究計画を参照)、人工のリラキシンであるセレノリラキシン (図 1; SeRlx- α) の化学合成からその有効性を証明した。初年度の成果を受け、研究 2 年目 (2023 年度) は創薬展開も見据えた下記 2 点を小目的として設定した。

- (1) 新たなセレノリラキシン (図 1; SeRlx- β) を化学合成し、合成効率 (速度・収率) の観点から適切なジセレンド (SeSe) 架橋位置を探索する。
- (2) 合成したリラキシンアナログの子宮内膜症緩和薬としての可能性を探る。

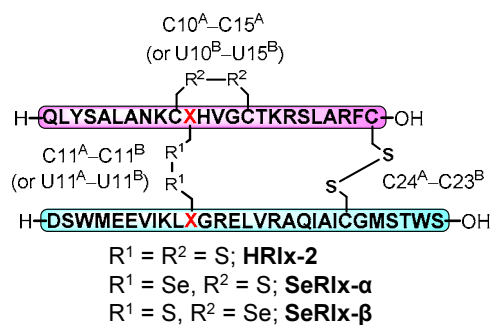


図 1: ヒトリラキシン 2 の一次配列ならびにジスルフィド結合トポロジー。

2. 研究の計画

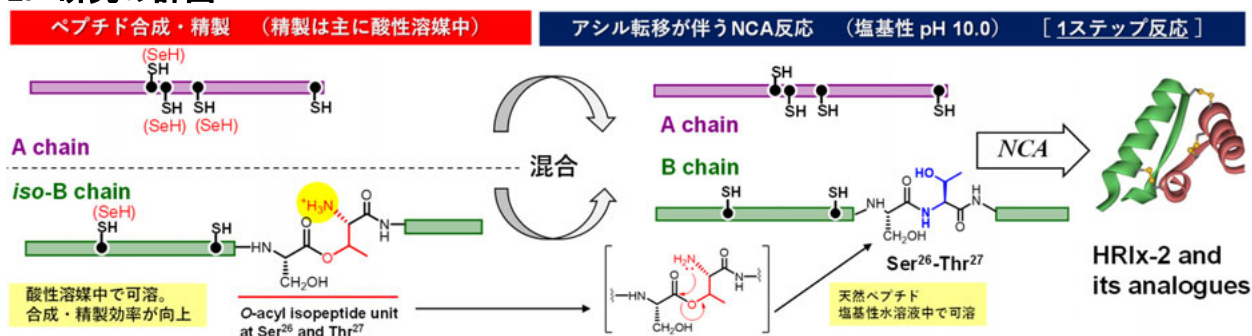


図 2: *O*-アシルイソペプチド (AIP) 法を組み込んだリラキシンアナログの二重鎖酸化的 folding。

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。我々は前年度、リラキシンの構成ペプチド鎖 (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 (二重鎖酸化的 folding) を確立した (図 2)。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) ユニットを組み込んだ。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、最終的には目的のリラキシンを得ることができ

きる (図 2)。さらに、鎖間で形成されるジスルフィド (SS) 結合をより形成速度が速く安定な SeSe 結合に置き換えることで、folding 効率が向上し、野生型のリラキシン (48%) を大幅に上回る収率で目的の SeRlx- α (43%) を得ることに成功した。SeSe 結合の導入位置が folding 効率およびフォールド体の構造にどのような影響を与えるかは興味深い。また、得られたリラキシンアナログの生理機能に関する基礎的知見の蓄積は、今後の創薬展開において重要である。そこで、研究 2 年目は下記 3 点に注力し、リラキシンの新規合成戦略の成熟をはかるとともに、子宮内膜症治療薬としてのリラキシンアナログの有効性に関する基礎データを得ることにした。

- (1) A 鎖内の SS 結合を SeSe 結合に置換した新規アナログ (SeRlx- β) の合成
- (2) 構造特性の評価と化学的安定性試験 (CD と分解実験)
- (3) 合成したセレノリラキシンの子宮内膜症関連因子に対する発現抑制効果の検証。

3. 研究の成果

(1) A 鎖内の SS 結合を SeSe 結合に置換した新規アナログ (SeRlx- β) の合成

SeRlx- β の構成ペプチド鎖となるペプチド **1** および **2** を前年度に確立したペプチド合成法を用いて調製した (図 3a)。ペプチド **1** は 2 個の Pys 基と 1 対の SeSe を有する単一アイソマーとして生成し、単離収率は 1.3% であった。ペプチド **2** は前年度合成済みである。次に、ペプチド **1** と **2** の二重鎖酸化的 folding によって SeRlx- β を得た。ペプチド **1** は Pys 基で保護されているため、DTT^{red} 存在下、好気的環境下で pH 10.0、4 °C で反応を開始した。一定時間後に得られたサンプルのごく一部を HPLC で分析し、反応中間体の変化を追跡した (図 3b)。結果として、反応開始から 24 時間で正しい位置に SS および SeSe 架橋を有するフォールドした SeRlx- β が収率 34% で得られた (図 3b)。SeRlx- β の収率は野生型リラキシンおよび SeRlx- α よりも低下した一方で、その反応は、SeRlx- α よりも速やかに完結した (図 3c)。

(2) 構造特性の評価と化学的安定性試験 (CD と分解実験)

単離されたリラキシンアナログをトリプシンで処理したところ、正しい SS 結合および SeSe 結合パターンを有するフォールド状態から生じる得る妥当なペプチドフラグメントが観測された。リラキシンアナログの構造を特徴づけるために circular dichroism (CD) 測定を行った (図 4a)。合成した SeRlx- α の CD スペクトルは、市販の組み換えリラキシンおよび合成リラキシンのそれと全く同じ形状を示し、SeRlx- α の 2 次構造含有量は野生型のものと同程度であることが示唆された。一方で SeRlx- β は他のアナログ体よりもごくわずかに少ない α -helix 含量を示した。次に、得られたリラキシンアナログの化学的安定性を評価した。

まず、還元因子による分解挙動を調べるために、合成リラキシンを生体内で最も多く遍在している低分子還元剤であるグルタチオン (GSH) で処理した。一定時間後、サンプルの一部を HPLC で分析し、反応進行率を見積もった (図 4b)。SeRlx- β の分解速度は、リラキシンのそれと同等かわずかに遅かった一方で、SeRlx- α は GSH によって、より速やかに還元された。次に、リラキシンを血清処理し、一定時間後におけるリラキシンアナログの残存量を HPLC で分析したところ、す

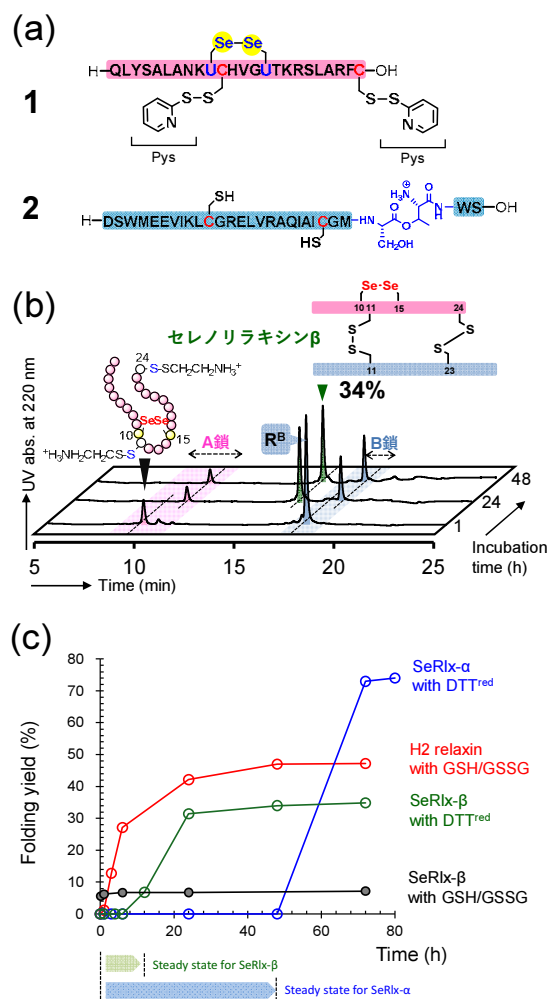


図 3: SeRlx- β の合成。(a) SeRlx- β の構成ポリペプチド鎖 **1** および **2** のアミノ酸配列。U はセレノシステイン残基。(b) ペプチド鎖 **1** および **2** の二重鎖酸化的 folding 実験から得た HPLC クロマトグラム。(c) リラキシンアナログ各種の二重鎖酸化的 folding におけるフォールド体生成量の経時変化。

べてのリラキシナンalogは血清中でほぼ同じ速度で分解された (図4c)。

(3) 合成したセレノリラキシンの子宮内膜症関連因子に対する発現抑制効果の検証。

妊娠可能年齢のおよそ 10%の女性が罹患していると考えられている子宮内膜症は、月経困難症、性交疼痛症、排便障害などを誘発し、女性のクオリティ・オブ・ライフを著しく低下させる。吉野らを筆頭とする本共同研究グループは、リラキシンの、子宮内膜症の緩和効果をもつ可能性を報告しており (O. Yoshino, *et al.*, *Biomedicines*, **2020**, *8*, 467)、SeRlx アナログも同様の効果を示すか否かは興味深い。そこで、合成した SeRlx アナログの子宮内膜症抑制剤としての応用可能性について評価した。子宮内膜症患者由来の子宮内膜間質細胞 (ESCs) にはリラキシンの一次受容体である leucine-rich G protein-coupled receptors 7 (LGR-7) が遍在している。

ここでは、子宮内膜間質細胞に対する合成セレノリラキシンの機能について、プラスミノゲン活性化抑制因子 1 (PAI-1) の発現抑制効果に焦点を当てて検討した。PAI-1 は、組織の線維化において重要な役割を果たし、子宮内膜症患者の腹腔内液中の高濃度の PAI-1 は、腹膜病変の発生に寄与していることが示唆されている。PAI-1 の mRNA の発現量は、合成リラキシン (100 ng/mL) で処理したすべてのグループにおいて、有意な減少が観測された (図 5)。特筆すべきは、2 種のセレノリラキシンの野生型のリラキシンよりも効果的に PAI-1 mRNA の発現を抑制したことである。また、低濃度 (33 ng/mL) におけるセレノリラキシン β は、この測定において最も高い有効性を示した。これらの結果は、PAI-1 の生産抑制という観点からセレノリラキシンの高い子宮内膜症抑制効果の可能性を示唆している。

4. 研究の反省・考察

(1) 新規アナログ (SeRlx- β) の合成に関する考察

反応開始直後、ペプチド **1** はほぼ単一の isomer へと変換され、SeRlx- α の folding 初期事象とは対照的であった。ペプチド **1** に由来する当該フラクションの MS 分析の結果は、熱力学的に最安定な SeSe 結合 (U11^A-U11^B) を 1 対有していることを示唆し、B 鎖と直接カップリング可能な鍵中間体が選択的に生成していることが示唆された (図 3b)。つまり、folding 経路上に存在する中間体を選択的に経由したことが、結果として folding 速度の向上につながったものと考えられる。SeRlx- α および SeRlx- β の folding に関して得られたこれまでの知見を総合的に考慮すると、フォールド状態において溶媒露出した SS 結合 (C11^A-C11^B) および埋没した SS 結合 (C10^A-C15^B) が、リラキシンの二重鎖酸化的 folding 経路において中間体および生成物の熱力学および速度論の強化にそれぞれ強く寄与していることを暗示している。

(2) 構造特性の評価と化学的安定性試験に関する考察

SeRlx- β の CD スペクトルは、他のアナログ体よりもごくわずかに少ない α -helix 含量を示した。このことは SeRlx- β が他のリラキシナンalogとは異なる安定性、生理活性強度を有している可能性を暗示しているかもしれない。分子表面に SeSe 結合をもつ SeRlx- α は、グルタチオ

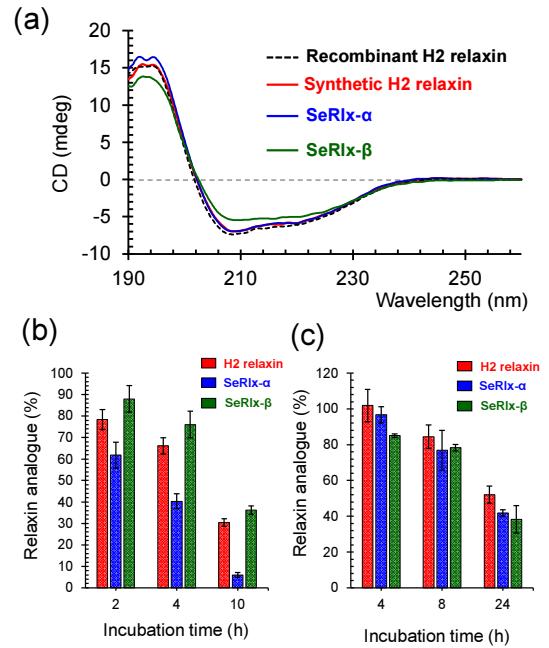


図 4: レラキシン類縁体の構造と化学的安定性の特性評価。(a) 10 mM Tris-HCl 緩衝液中、pH7.5、25°Cにおけるレラキシン類縁体の CD スペクトル。(b)還元グルタチオンによるレラキシンの還元的アンフォールディング (c) ヒト血清中のレラキシンの安定性アッセイ。

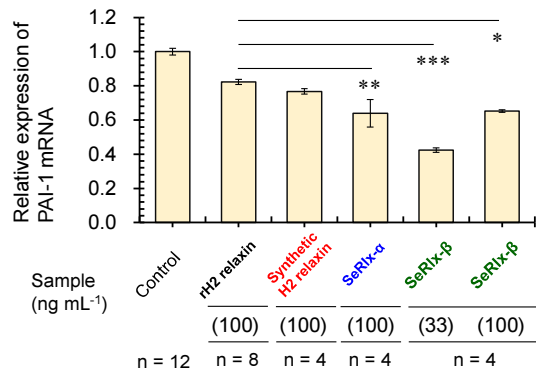


図 5: 子宮内膜間質細胞 (ESCs) に対するレラキシンの効果。ESCs をレラキシン (33 または 100ng/mL) と 8 時間インキュベートし、定量的 PCR を行い、コントロール群とレラキシン処理群における PAI-1 の mRNA 発現量を測定した。

ン共存下において他のリラキシンアナログよりも速やかに分解された。SeSe 結合はSS 結合よりも熱力学的に安定である一方で、速度論的には不安定な性質を有することから、SeR1x- α における溶媒露出した SeSe 結合 (U11^A-U11^B) が GSH によって速やかに開裂されたことで、協同的な unfolding を引き起こしたものと考えられる。一方で、血清中での各種リラキシンアナログの安定性には有意な差は観測されなかった。リラキシンの血中での不安定さは、その製剤化における懸念点の一つとしてフォーカスされるが、リラキシンがすでに臨床試験が実施されていることを考慮すれば、SeSe 結合の挿入が血中安定性に影響を及ぼさないという事実は、SeR1x の製剤応用の観点からは好都合である。

(3) セレノリラキシンの子宮内膜症関連因子に対する発現抑制効果の検証に関する考察

合成した 2 種のセレノリラキシンが高い PAI-1 発現抑制能を有することが明らかとなった。一方で、その分子メカニズムについてはより詳細な解析が必要である。今後は、セレノリラキシンと LGR-7 との複合体形成に関する構造学的、物理化学的研究を進めることで、セレノリラキシンの PAI-1 発現抑制能をさらに高めることができるものと期待できる。また、セレノリラキシンを子宮内膜症治療薬として実用化するため、セレノリラキシンの他の子宮内膜症関連因子の発現抑制効果を総合的に検討するとともに、疾患モデル動物を用いた薬力学的、薬物動態学的検討を行う必要があるものと考えられる。加えて、セレノリラキシンの薬剤応用を目指すうえで、前臨床試験における慎重な安全性評価も必要である。

(本研究成果は、論文としてまとめ受理・掲載済みである。下記(1)-①参照)

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yuri Satoh, Yosuke Ono, Rikana Takahashi, Hidekazu Katayama, Michio Iwaoka, Osamu Yoshino and Kenta Arai*, Seleno-relaxin analogues: Effect of internal and external diselenide bonds on the foldability and a fibrosis-related factor of endometriotic stromal cells, *RSC. Chem. Biol.*, **2024**, in press. (DOI: 10.1039/D4CB00095A)
- ② Kenta Arai,^{*†} Masaki Okumura,[†] Young-Ho Lee,[†] Hidekazu Katayama, Kenji Mizutani, Yuxi Lin, Sam-Yong Park, Kaichiro Sawada, Masao Toyoda, Hironobu Hojo, Kenji Inaba, Michio Iwaoka*, Diselenide-bond replacement of the external disulfide bond of insulin increases its oligomerization leading to sustained activity, *Commun. Chem.*, **2023**, *6*, Article number: 258 ([†]equal contribution) (DOI: 10.1038/s42004-023-01056-4)
- ③ Yuya Nishizawa,[†] Yuri Satoh,[†] Osamu Kanie and Kenta Arai*, Resin-supported cyclic telluride as a heterogeneous promoter of disulfide formation under solid-liquid biphasic conditions, *New J. Chem.* **2023**, *47*, 18537-18546 ([†]equal contribution) (DOI: 10.1039/D3NJ02646A) (Selected as front cover picture).

(2) 口頭発表

- ① 高橋莉奏, 荒井堅太, 易化学修飾インスリンを鍵前駆体とした新規持効型インスリン製剤の化学合成, 2024年3月22日, 日本化学会第104春季年会 (2024) (日本大学理工学部 船橋キャンパス)。
- ② Allosteric selenopeptides as a model of selenoenzymes, The 9th International Selenium Conference, focused on Selenium in Chemistry, Biology and Medicine (Se2023). Jun. 2023 (Daejeon, South Korea) Invited lecture.
- ③ 佐藤有里, 荒井堅太, セレノシステインを挿入したヒトリラキシンアナログの化学合成法と機能評価, 2023年3月22日, 第23回日本再生医療学会 (朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンターホテル日航新潟)。

(3) 出版物

- ① Michio Iwaoka*, Chalcogen-containing protein and nucleic acid derivatives - synthesis and applications, 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.

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 歯 学 部	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 歯 学 部	教 授	遺伝子情報解析
澁 川 義 幸	東 京 歯 科 大 学 歯 学 部	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 歯 学 部	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 歯 学 部	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 歯 学 部	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) レプチン受容体(LepR)-cre で標識される歯根膜幹細胞画分の亜集団の解析

これまでRunx2プロモーターの下流でGFPを発現するマウス(Runx2-GFP)の歯根膜を解析し、様々な発現レベルのRunx2-GFP細胞を確認している。そこで、LepR-cre; flox-stop-flox; tdTomato (LepR-cre; floxed-Tom); Runx2-GFPマウスを作製し、歯根膜におけるLepR陽性細胞画分に含まれる亜集団を解析した。解析方法は、凍結切片を用いた共焦点顕微鏡によるイメージング解析、またはフローサイトメーターを用いて解析した。

(2) LepR 陽性歯根膜細胞クラスターの遺伝子プロファイリング解析

2022年度に実施したLepR-cre; floxed-Tomマウスの歯根膜を用いた1細胞解析から得られたデータを活用した情報解析をさらに進め、歯根膜でLepRを発現するクラスターおよびその他のクラスターにおける特徴的な遺伝子発現を調べた。

3. 研究の成果

(1) レプチン受容体(LepR)-cre で標識される歯根膜幹細胞画分の亜集団の解析

LepR-cre; floxed-Tom; Runx2-GFP マウスの上顎第一臼歯におけるイメージング解析の結果、歯根膜にRunx2-GFP発現が陽性および陰性のLepR-Tom⁺細胞が存在することが明らかになった。上顎第一臼歯を抜去し、コラゲナーゼにより歯根膜細胞を回収後、フローサイトメーターを用いた定量解析を行った。その結果、LepR-Tom⁺細胞の約半分(55.0 ± 6.8%)がRunx2-GFP陽性画分であることが明らかになった。以上より、歯根膜のLepR-Tom⁺細胞画分中には、Runx2-GFPが陽性および陰性の亜集団が存在することが示された。

(2) LepR 陽性歯根膜細胞クラスターの遺伝子プロファイリング解析

2022年度に実施したLepR-cre; floxed-Tomの歯根膜を用いた1細胞解析では、歯根膜細胞は、6つのクラスター(PDL1~6)に分類され、その内2つのクラスター(PDL3と5)においてLepRの発現が高いことを明らかにしている。今年度は、歯根膜幹細胞のマーカー遺伝子として知られているGli1とAxin2の分布を調べたが、これらが顕著に発現する歯根膜クラスターは認められなかった。一方、これまで、歯根膜幹細胞のマーカーとして報告されている分子であるThy1、Mfap5、Cygb(*Stem cells* 39:92-102, 2021)の発現は、LepR陽性のPDL3および5のクラスターで高いことが明らかになった。また、破骨細胞分化誘導因子(RANKL: Receptor activator of NF-kappaB ligand)の発現が高いPDLクラスターも見出され、今後はPDL誘導性の破骨細胞分化誘導機構についても解析を進める。

4. 研究の反省・考察

(1) レプチン受容体(LepR)-cre で標識される歯根膜幹細胞画分の亜集団の解析

LepR陽性歯根膜幹細胞画分における亜集団を見出したが、これら各クラスターの性状等については、マイクロダイセクションを活用して今後解析を進める。

(2) LepR陽性歯根膜細胞クラスターの遺伝子プロファイリング解析

今後は、破骨細胞分化誘導因子RANKLの発現をPDLクラスターで特異的に欠損する遺伝子改変マウスを作製し、解析を進めることにより、歯根膜の骨代謝制御機構を明らかにする。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Mizoguchi T. In vivo dynamics of hard tissue-forming cell origins: Insights from Cre/loxP-based cell lineage tracing studies. *The Japanese Dental Science Review*, 60:109–119, 2024 doi: 10.1016/j.jdsr.2024.01.003
- ② Nishijima T, Okuyama K, Shibata S, Kimura H, Shinozaki M, Ouchi T, Mabuchi Y, Ohno T, Nakayama J, Hayatsu M, Uchiyama K, Shindo T, Niiyama E, Toita S, Kawada J, Iwamoto T, Nakamura M, Okano H, Nagoshi N: Novel artificial nerve transplantation of human iPSC-derived neurite bundles enhanced nerve regeneration after peripheral nerve injury. *Inflamm Regen*. 2024, 44(1):6. doi: 10.1186/s41232-024-00319-4.
- ③ Nishimura S., Kariya H., Gakiya Y., Shinohara R., Nakamura Y., Mizoguchi T., Ohashi A., Motoyoshi M., Ninomiya T: LRP1-deficient leptin receptor-positive cells in periodontal ligament tissue reduce alveolar bone mass by inhibiting bone formation. *Archives of Oral Biology*, 158:105853, 2024 doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105853.
- ④ Li B, Lyu P, Tang J, Li J, Ouchi T, Fan Y, Zhao Z, Li L: The Potential Role and Therapeutic Relevance of Cellular Senescence in Skeletal Pathophysiology. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2024, 79(4):glae037. doi: 10.1093/gerona/glae037.
- ⑤ Watanabe G., Yamamoto M., Taniguchi S., Sugiyama Y., Hirouchi H., Ishizuka S., Kitamura K., Mizoguchi T., Takayama T., Hayashi K., Abe S: Chronological Changes in the Expression and Localization of Sox9 between Achilles Tendon Injury and Functional Recovery in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14):11305, 2023 doi:10.3390/ijms241411305.
- ⑥ Fujii S., Takebe H., Mizoguchi T., Nakamura H., Shimo T., Hosoya A: Bone formation ability of Gli1+ cells in the periodontal ligament after tooth extraction. *Bone*, 173:116786, 2023 doi: 10.1016/j.bone.2023.116786.
- ⑦ Nakamura T., Honda S., Ito S., Mizoguchi T., Yamamoto T., Kasahara M., Kabe Y., Matsuo K., Suematsu M: Generation of bicistronic Dmpl-Cre knock-in mice using a self-cleaving 2A peptide. *Journal of Bone Mineral Metabolism*, 41(4):470–480, 2023 doi: 10.1007/s00774-023-01425-y.
- ⑧ Li B, Li J, Li B, Ouchi T, Li L, Li Y, Zhao Z: A single-cell transcriptomic atlas characterizes age-related changes of murine cranial stem cell niches. *Aging Cell*. 2023, e13980. doi: 10.1111/accel.13980.
- ⑨ Kunioku Y, Kimura M, Ouchi T, Fukuda K, Shibukawa Y: Intracellular cAMP Signaling Pathway via Gs Protein-Coupled Receptor Activation in Rat Primary Cultured Trigeminal Ganglion Cells. *Biomedicines*. 2023, 11(9):2347. doi.org/10.3390/biomedicines11092347.
- ⑩ Kitayama E, Kimura M, Ouchi T, Furusawa M, Shibukawa Y: Functional Expression of IP, 5-HT4, D1, A2A, and VIP Receptors in Human Odontoblast Cell Line. *Biomolecules*. 2023, 13, 879. doi: 10.3390/biom13060879.
- ⑪ Nagai S, Kitamura K, Kimura M, Yamamoto H, Katakura A, Shibukawa Y: Functional Expression of Mechanosensitive Piezo1/TRPV4 Channels in Mouse Osteoblasts. *The Bulletin of Tokyo Dental College*. 2023, 64(1):1–11, 2023. doi: 10.2209/tdcpublication.2022-0015.
- ⑫ Kuroda H, Katagiri N, Kagawa K, Imaizumi U, Ishikawa N, Shibukawa Y, Morimoto Y, Sanuki Y: Comparison of Lidocaine and Mepivacaine for Variation in Regional Tissue Oxygenation in Stellate Ganglion Block: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. *Cureus*. 2023, 15(10): e47938. doi: 10.7759/cureus.47938.
- ⑬ Hasegawa T, Ouchi T, Shibukawa Y, Asoda S, Nakagawa T: Etiology of Oral Potentially Malignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma Based on Cellular

Stress Regulation and Matrix Stiffness. *Front. Biosci.* (Landmark Ed). 2023, 28(10), 265. doi: 10.31083/j.fbl2810265.

- ⑭Ouchi T, Nakagawa T: Cellular Signaling for Dental Physiological Functions. *Biomolecules*. 2023, 13(8):1177. doi: 10.3390/biom13081177.
- ⑮Li B, Li J, Fan Y, Zhao Z, Li L, Okano H, Ouchi T: Dissecting calvarial bones and sutures at single-cell resolution. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2023, 98(5):1749–1767. doi: 10.1111/brv.12975
- ⑯Ouchi T, Orsini G, Kajiya M, George A: Editorial: Stem cells in oral cavity: from development to regeneration, Volume II. *Front Cell Dev Biol*. 2023, 11:1207744. doi: 10.3389/fcell.2023.1207744.
- ⑰Onodera S, Azuma T: Hedgehog-Related Mutation Causes Bone Malformations with or without Hereditary Gene Mutations. *Int J Mol Sci*. 2023 17;24(16):12903. doi: 10.3390/ijms241612903.
- ⑱Aida N, Saito A, Azuma T: Current Status of Next-Generation Sequencing in Bone Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023 7;24(18):13802. doi: 10.3390/ijms241813802.
- ⑲Shigematsu M, Takeda K, Matsunaga S, Sendai Y, Matsuura N, Suzuki R, Azuma T, Sasaki H, Okumura K, Sekine H, Yajima Y, Ohno T: Subgingival titanium wire implantation induces weak inflammatory responses but does not promote substantial T cell activation. *Dent Mater J*. 2023 29;42(5):633–640. doi: 10.4012/dmj.2022-258.
- ⑳Hoshino T, Onodera S, Kimura M, Suematsu M, Ichinohe T, Azuma T: FGF4 and FGF9 have synergistic effects on odontoblast differentiation. *Med Mol Morphol*. 2023;56(3):159–176. doi: 10.1007/s00795-023-00351-2.
- ㉑Ogura H, Nakamura T, Ishii T, Saito A, Onodera S, Yamaguchi A, Nishii Y, Azuma T: Mechanical stress-induced FGF-2 promotes proliferation and consequently induces osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 3;684:149145. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.149145.
- ㉒Aida N, Takeda K, Nakae S, Saito H, Okumura K, Azuma T, Ohno T: IL-33 deficiency suppresses alveolar bone loss in a ligature-induced periodontitis model. *Biomed Res*. 2023;44(1):9–16. doi: 10.2220/biomedres.44.9.
- ㉓Koyachi M, Sugahara K, Tachizawa K, Nishiyama A, Odaka K, Matsunaga S, Sugimoto M, Tachiki C, Nishii Y, Katakura A: Enhanced precision in genioplasty: a novel intraoperative spatial repositioning using Computer-aided design and manufacturing technology and a holographic mixed reality application. *J Clin Med*. 12(23):7408, 2023 (doi: 10.3390/jcm12237408).
- ㉔Hayashi Y, Tachiki C, Morikawa T, Aihara Y, Matsunaga S, Sugahara K, Watanabe A, Kawamata T, Nishii Y: Three-dimensional analysis of cranial base structure in patients with facial asymmetry. *Diagnostics*. 14(1):24, 2023 (doi: 10.3390/diagnostics14010024.).

(2) 口頭発表

(特別講演・シンポジウム)

- ①澁川義幸：歯の侵害受容機構と組織再生誘導：歯髄/象牙質疾患への分子創薬戦略，第101回日本生理学会大会、痛みのグループディナー，2024年3月28日（北九州市）
- ②澁川義幸：口腔粘膜の機能：Revisiting 東京歯科大学 リカレント教育セミナー，今どきの目で口腔粘膜を見直そう-口腔粘膜から見る医科との診療連携と歯科診療，2024年3月3日（千代田区）
- ③溝口利英：細胞系譜解析が紐解く硬組織形成細胞の供給システム 第8回骨免疫学会ウィンタースクール 2024年1月31日 長野県（朝日屋旅館）
- ④溝口利英：硬組織の維持および修復を司るレプチン受容体陽性細胞の動態解析 第23回日本再生医療学会 シンポジウム：間葉系組織の維持・再生を支える組織幹細胞の理解とその深化 2024年3月22日 新潟（朱鷺メッセ）
- ⑤溝口利英：細胞系譜解析が紐解く硬組織形成機構のダイナミズム 第4回信州骨代謝多職

種セミナー 2023年5月27日 松本市 (深志神社 梅風閣)

- ⑥ 澁川義幸: 感覚情報-組織形成機能連関における象牙芽細胞機能制御系の解明,
第315回 東京歯科大学学会 例会、特別講演4、2023年6月3日 (千代田区)
(一般講演)

- ① 徳山 彰秀、伊藤慎一郎、笠原 正貴、溝口 利英: 抜歯窩修復骨に寄与する幹細胞画分の同定 第41回日本骨代謝学会学術集会、2023年、7月28日 東京 (都市センターホテル)
- ② 伊藤慎一郎、徳山 彰秀、笠原 正貴、溝口 利英: 歯根膜のレプチン受容体陽性細胞は硬組織形成に寄与する 第41回日本骨代謝学会学術集会、2023年、7月28日 東京 (都市センターホテル)
- ③ Shinichirou Ito, Masataka Kasahara, Toshihide Mizoguchi: Identification of metaphyseal Nestin-GFPbright stromal cells as a skeletal stem cell subpopulation in growing trabecular bone
ASBMR 2023 Annual Meeting, October 15, 2023. Vancouver, BC, Canada (Vancouver Convention Center)
- ④ Shibukawa Y., Kurashima R., Kimura M., Ouchi T.: Piezo1 down-streaming TRP activation in odontoblasts, FAOPS2023, November 1-4th, 2023, Daegu, Korea, Program book p174
- ⑤ Kimura M., Nomura S., Ouchi T., Kurashima R., Kuroda H., Shibukawa Y.: Intracellular cAMP-induced Ca²⁺ Influx via Activation of Protein Kinase A in Odontoblasts, FAOPS2023, November 1-4th, 2023, Daegu, Korea, Program book p175
- ⑥ 黄地健仁, 倉島竜哉, 木村麻記, 澁川義幸: Piezo1陽性象牙芽細胞の発生起源と小胞体ストレス制御機構, 第77回 NPO法人 日本口腔科学学会学術集会, 2023年5月11日-13日, 岡山市, 第77回 NPO法人 日本口腔科学学会学術集会 プログラム・抄録集, p277
- ⑦ Kurashima R., Kimura M., Ouchi T., Shibukawa Y.: Functional Coupling Among Piezo1, TRPV1, and TRPA1 in Rat Odontoblasts, 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition, Abstract ID#: 3822325, March 15-18, 2023, Portland, USA
- ⑧ Kimura M., Ouchi T., Kurashima R., Kuroda H., Shibukawa Y.: Cyclic-AMP signaling activates Zn²⁺/Gd³⁺-sensitive Ca²⁺ channels in odontoblasts, 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition, Abstract ID#: 3822357, March 15-18, 2023, Portland, USA
- ⑨ Shibukawa Y., Kimura M., Ouchi T., Kurashima R., Kuroda H.: Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in odontoblasts mediates dentinogenesis, 2023 AADOCR/CADR Annual Meeting & Exhibition, Abstract ID# 3822350, March 15-18, 2023, Portland, USA
- ⑩ Iwasaki R., Ouchi T., Kimura M., Nishiyama A., Kuroda H., Shibukawa Y., Katakura A.: Intercellular communication between trigeminal ganglion neurons and vascular endothelial cells via Gs coupled receptor axis, 日本生理学会第100回記念大会, 2023年3月14日-16日, 京都市, 日本生理学会第100回記念大会プログラム集, 189, 2023
- ⑪ 小野寺 晶子, 齋藤 暁子, 間 奈津子, 東 俊文: Long-ncRNA, RP11-399K21.11 はWnt依存性に骨芽細胞分化を制御する、第41回日本骨代謝学会学術集会 2023年 7月9日 (土)、都市センターホテル
- ⑫ 東 俊文, 齋藤 暁子, 長山 和亮, 小野寺 晶子, 間 奈津子, 岡田 寛之, 北條 宏徳, 加藤 茂明, Runx 2 によるLamina-LINC タンパク質発現の調節は、アクチンフィラメントによって発生する細胞内張力を介して骨芽細胞の機械的ストレス応答を調節する。ラミノパチー骨病態との関係解明、第41回日本骨代謝学会学術集会 2023年 7月9日 (土)、都市センターホテル
- ⑬ 松永智, 野口拓, 森田純晴, 小川雄大, 鈴木龍, 大津雄人, 頼岡廣明, 阿部伸一 マウス抜歯窩治癒過程における新生骨形成に寄与する血管の局在性, 第53回日本口腔インプラント学会学術大会, 2023年9月16日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑭ 松永智, 笠原典夫, 北村啓, 小川雄大, 山本仁, 阿部伸一, マウス抜歯窩の治癒過程におけるType H血管の局在性, 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会講演抄録集

学 校 名	東 京 女 子 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	関節リウマチ発症高リスク個体の免疫異常の探索 －関節炎発症に対する遺伝的要因とDysbiosisの関与－	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①関節リウマチ ②Pre-clinical ③Shared epitope ④Dysbiosis		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 本 祐 子	東京女子医科大学 医学部	講 師	研究の統括、臨床検体の収集、測定、解析の実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
針 谷 正 祥	東京女子医科大学 医学部	教授・基幹分野 長	臨床検体の収集
猪 狩 勝 則	東京女子医科大学 医学部	特 任 教 授	臨床検体の収集、遺伝解析の実施
大 坂 利 文	東京女子医科大学 医学部	准 教 授	唾液と糞便の細菌叢解析の実施
中 村 昌 平	東京女子医科大学 医学部	助 教	臨床検体の収集、測定、解析
本 山 亮	東京女子医科大学 医学部	後期臨床研 修 医	臨床検体の収集、測定、解析

関節リウマチ発症高リスク個体の免疫異常の探索 ー関節炎発症に対する遺伝的要因と Dysbiosis の関与ー

1. 研究の目的

抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体は、シトルリン化抗原を認識する自己抗体である。全人口の約 1%が罹患する関節リウマチ (RA) 患者においては、関節炎を発症する 5 年以上前から血中に抗 CCP 抗体が検出される前関節炎期を経て、関節炎が発症する。欧米では、抗 CCP 抗体陽性だが関節炎のない将来的な RA 発症高リスク者 (At-risk 者) を対象に、抗リウマチ薬を用いて、RA 発症予防を目的とする介入試験が行われているが、抗 CCP 抗体が産生される過程と、関節痛、関節炎発症に至る過程では、免疫学的メカニズムは異なる可能性が考えられる。現時点で前関節炎期の免疫異常を特異的に制御し発症予防を成功した研究はなく、安全性が高い新規の発症予防方法の開発が望まれている。

本研究では介入研究の前段階として、RA 発症高リスク個体の免疫異常の探索を目的とする。抗 CCP 抗体陽性 At-risk 者の観察開始時における唾液と糞便の細菌叢と赤血球膜の ω -3/ ω -6 脂肪酸バランスが、At-risk 者の免疫機能と、その後の関節炎発症に関連し、その関連は遺伝背景により異なると仮説を立て、以下の 2 つの目的を設定した。

(1) 関節リウマチ発症ハイリスク者における、関節炎発症予防方法開発の前段階として、抗 CCP 抗体陽性関節炎未発症に特異的な免疫異常の解明を目的とする。特に関節リウマチ発症との関連が考えられる、遺伝背景、口腔と腸管の細菌叢、末梢血リンパ球のフェノタイプと、T 細胞受容体レパトアに注目して解析を実施する。

(2) 関節リウマチ発症ハイリスク者における、関節リウマチ発症予測モデルを構築する。

2. 研究の計画

(1) 患者の登録と検体収集

①当施設で実施中の関節リウマチ発症ハイリスク者 (抗 CCP 抗体陽性関節炎未発症者) の前向き観察研究に同意した At-risk 者、対照群として、抗 CCP 抗体陽性早期関節リウマチ患者、健常人 (各群 50 人) から、臨床情報と検体の収集を実施する。

②末梢血リンパ球、血清、血漿、DNA、糞便と唾液を、研究用検体とする。

(2) 収集した検体を用いて以下の測定を実施する。

①遺伝解析 (HLA の同定、Polygenic risk score の算定)

②唾液と糞便の 16S rRNA 遺伝子解析

③赤血球膜と血漿の ω -3/ ω -6 脂肪酸測定

④末梢血リンパ球のフェノタイプと T 細胞受容体レパトア解析

⑤血清サイトカインと可溶性免疫チェックポイント分子の測定

(3) 臨床情報と測定結果の統合解析を実施する。

3. 研究の成果

(1) 当施設における At-risk 者の同定し、予後その後のフォローアップ方法の確立し、2023 年度末までに 44 名を登録、検体収集を完了した。At-risk 者のその後の RA 発症率は 38%であった。RA 発症と自己抗体の関連につき、学会発表を行った (5. 研究発表 (2) ①)。

①当科外来を受診した抗 CCP 抗体陽性関節リウマチ未発症者を登録した。

②学内検診時にボランティアを募り抗 CCP 抗体測定を実施することで、無症状抗 CCP 抗体陽性者を同定、登録した。

(2) 末梢血リンパ球のマスサイトメトリー解析の結果、At-risk 者の末梢血中において、B 細胞による抗体産生をヘルプすると報告されている、末梢ヘルパー T 細胞が増加し活性化していることを同定し、学会発表を行い (5. (2) ②)、論文投稿した (5. (1) ①)。

(3) 登録患者の糞便の 16S rRNA 遺伝子解析を実施完了し、解析中である。

(4) 血清中のサイトカインと可溶性免疫チェックポイント分子を測定し解析実施中である。

4. 研究の反省・考察

- (1) 2023 年度は計画通りに対象者の登録と検体収集を実施した。
- (2) 計画した測定は、概ね予定通りに実施できており、2024 年度も引き続き対象者の登録と検体収集を進める。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Expansion of HLA-DR Positive Peripheral Helper T and Naive B cells in Anticitrullinated Protein Antibody-Positive Individuals At Risk for Rheumatoid Arthritis. Takada H, Demoruelle MK, Deane KD, Nakamura S, Katsumata Y, Ikari K, Buckner JH, Robinson WH, Seifert JA, Feser ML, Moss L, Norris JM, Harigai M, Hsieh EWY, Holers VM, Okamoto Y. Arthritis Rheumatol. 2024 Feb 27. doi: 10.1002/art.42839. Online ahead of print.

(2) 口頭発表

- ① 「抗CCP抗体陽性関節リウマチ発症ハイリスク者における、自己抗体と関節リウマチ発症の関連の前向き検討」 本山亮、岡本祐子、中村昌平、勝又康弘、針谷正祥
第66回 日本リウマチ学会総会・学術集会、W86-3、福岡、2023年4月26日
- ② 「Expansion of circulating HLA-DR⁺ peripheral helper T cells and CXCR5⁺CD38⁺ mature naïve B cells in ACPA-positive individuals at-risk for and with classified RA」 H. Takada, M. Kristen Demoruelle, Kevin D. Deane, Shohei Nakamura, Yasuhiro Katsumata, Katsunori Ikari, Jane H. Buckner, William H. Robinson, Jennifer A. Seifert, Marie L. Feser, LauraKay Moss, Jill M. Norris, Masayoshi Harigai, Elena W.Y. Hsieh, V. Michael Holers, Yuko Okamoto 2023年11月15日、米国リウマチ学会総会、San Diego, USA

(3) 出版物

なし

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	東 京 農 業 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	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		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①ストリゴラクトン ②根寄生雑草 ③アフリカ農業支援 ④生合成工学 ⑤光合成			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
渡 辺 智	生 命 科 学 部	准 教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

[illegible]

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生産の場合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ルラクトン（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法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

- (1) SL生産システム効率化
 - ① CL生産ホスト藍藻の検討：昨年度に引き続き、CL生産に適した藍藻ホストを検討した。広島大学との共同研究により見出した補色を回避できる伸長変異株（特願2021-148599）にCL合成酵素発現プラスミドを導入しCLの生産量を野生株と比較した。
 - 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の活性の強化を目指して研究を実施した。昨年度見出した藍藻由来D27をCL合成酵素発現プラスミドに導入し、これを形質転換した藍藻株を用いてCLおよびSLの生産量を解析した。
 - ③ SL生産量の最適化：藍藻と酵母を共培養する際の培地について検討した。
- (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。(1) -②で作成した藍藻株が生産したCLの生理活性について、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に

より評価した。

- 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。新たに4種類のMAX1ホモログの発現酵母を作製した。
- (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
東アフリカのジブチにおける根寄生植物の分布を調べるため、根寄生植物に感受性を示すイネやソルガムを用いて圃場の汚染状況を調査した。

3. 研究の成果

(1) SL生産システム効率化

- ① CL生産ホスト藍藻の検討：細胞が伸長した藍藻変異株においてもCLを合成可能かどうか検討した。CL合成酵素発現プラスミドを伸長変異株へと導入し、CL生産量を野生株と比較したが、細胞伸長変異株ではCL生産量が1/10程度まで減少した。
- ② 藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除：シアノバクテリアのアカリオクロリス種およびサーモシネココッカス種より見出したD27相同遺伝子を、それぞれCL合成酵素発現プラスミドに組み込み、CLとSLの生産量を比較した。その結果、アカリオクロリス由来D27はこれまで使用してきた緑藻由来D27の約2倍のCL生産量であることが示された。SLの生産量は緑藻由来D27とほぼ同等であった。一方、サーモシネココッカスのD27を用いた場合では、CLは全く合成されなくなった。

上記①、②と関連して、藍藻を用いた1,8-cineole生産系および、藍藻物質生産系に利用できる新規発現ベクターの開発について、成果を論文としてまとめ、発表した（学会誌等①⑥、出版物①）。

- ③ SL生産量の最適化：藍藻と酵母を共培養する際に培地について検討した結果、栄養が豊富に含まれているYPD培地よりも貧栄養のSG培地を用いた場合においてSL生産量が約5倍に増加することがわかった。

(2) 新規SL類似体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：アカリオクロリスD27を使用した生産系において取得されたCLに、生理活性（根寄生植物の発芽促進活性）があるかどうかについて解析した。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。その結果、アカリオクロリスD27を使用した場合においても、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：これまで研究に用いてきたイネ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ホモログに加え、タルウマゴヤシのMAX1ホモログを発現する酵母を取得した。また得られたSL様物質を特定できるよう、LC-MS-MSの解析ソフト（SCIEX社、スペクトルライブラリ）を新たに導入した。

(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

ジブチ市のドゥダ農場の圃場の土を用いて根寄生植物の試験を実施した。栽培試験ではイネは育たなかった。これは圃場の土がアルカリ性であったことが原因と考えられた。一方、ソルガムは十分な成長を示し、根寄生植物の寄生も確認されなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) SL生産システム効率化

- ① CL生産ホスト藍藻の検討：藍藻伸長変異株はCL生産には適さないことがわかった。今後は増殖の早い藍藻種を中心に、CL生産に適した藍藻ホストの検討を続ける。2022年度に作成した海洋性藍藻についても検討する。
- ② 藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除：アカリオクロリスD27はイネD27と比べ、高い活性を持つことが示された。一方で、サーモシネココッカスD27はCLを合成しないことが分かった。藍藻由来D27が有用であることが示されたことから、今後は他の藍藻由来D27を使用してCL合成活性を比較する。活性に違いが確認できた場合、それぞれのD27の構造を比較し、活性に必要な領域を同定する。また、新たに開発した新規発現ベクターについても検討を進める。
- ③ SL生産量の最適化：SG培地を用いることでSL生産量が増加したことから、今後はSG培地を生産試験に使用する。アカリオクロリスD27を利用して従来の2倍の効率でCLが生産で

きたにも関わらずSL生産量は同程度であった。酵母との共培養段階がSL生産の律速であると考えられたため、藍藻-酵母の共培養条件を検討する。

(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：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を進める。
- 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、タルウマゴヤシのMAX1の効果について研究を進める。また他のMAX1についても遺伝子をデザインして酵母株を構築する。

(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

試験に用いたドゥダ農場の圃場の土は根寄生植物が育たない土壌環境であり、寄生植物による汚染度も低いと考えられた。アフリカにおいても地域によって根寄生植物の汚染度が異なることがわかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Y. Sakamaki, M. Ono, N. Shigenari, T. Chibazakura, K. Shimomura, S. Watanabe, Photosynthetic 1,8-cineole production using cyanobacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* **87** (5)563-568 (2023).
- ② K. Dayarathne, T. Ishikawa, S. Watanabe, Y. Ishikawa, K. Aikeranmu, H. Kitagawaa, N. Komatsubara, M. Yamaguchi, M. Kawai-Yamada. Heterologous expression of mtf and mtc genes of *Pseudanabaena foetida* var. *intermedia* is sufficient to produce 2-methylisoborneol in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* **11** (5)e0256123 (2023)
- ③ H. Hasegawa, Y. Kanesaki, S. Watanabe, K. Tanaka, A high-temperature sensitivity of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 due to a tRNA-Leu mutation. *J Gen Appl Microbiol.* **69**(3):167-174 (2023)
- ④ A. Hishida, R. Shirai, A. Higo, M. Matsutani, K. Nimura-Matsune, T. Takahashi, S. Watanabe, S. Ehira, Y. Hihara. CRISPRi knockdown of the *cyabrB1* gene induces the divergently transcribed *icfG* and *sll1783* operons related to carbon metabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Gen Appl Microbiol.* (2024) in press.
- ⑤ H. Hasegawa, I. Kobayashi, N. Bairagi, S. Watanabe, K. Tanaka. DnaK2 Mediates a Negative Feedback Regulation of the Heat Shock Responsive Hik2-Rre1 Two-component System in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **65**(1):120-127 (2024)
- ⑥ K. Ohdate, M. Sakata, K. Maeda, Y. Sakamaki, K. Nimura-Matsune, R. Ohbayashi, W. R. Hess, S. Watanabe. Discovery of novel replication proteins for large plasmids in cyanobacteria and their potential applications in genetic engineering. *Front Microbiol.* **15**:1311290 (2024)

(2) 口頭発表

- ① 坂田 実乃里、青柳 智大、荷村(松根) かおり、Alena Kaltenbrunner、Wolfgang Hess、渡辺 智、藍藻*Synechocystis* sp. PCC 6803の巨大プラスミドpSYSAの複製メカニズム解明とベクターの開発、2023年度日本農芸化学会関東支部大会 (2023年9月)
- ② 田中 基貴、坂巻 裕、前田 海成、高市 真一、梅野 大輔、伊藤 晋作、渡辺 智、ストリゴラクトン生産強化に向けた新規D27の活性評価、2023年度日本農芸化学会関東支部大会 (2023年9月)
- ③ 大舘 和真、前田 海成、渡辺 智、藍藻*Synechocystis* sp. PCC 6803の細胞外硫酸多糖 シネカンの大量生産系の確立、2023年度日本農芸化学会関東支部大会 (2023年9月)
- ④ 小野 美月、坂巻 裕、重成 希、千葉櫻 拓、下村 健司、渡辺 智、シアノバクテリアを用いた光合成による1,8-シネオール生産、第67回TEAC (2023年10月)
- ⑤ 駒形 遥、坂巻 裕、内田 小百合、浦井 誠、兼崎 友、朝井 計、渡辺 智、スピルリナ強光培養後に出現するアルカリバチルス出現メカニズム解析、The 36th JSME and The

13 th ASME (2023年11月)

- ⑥ 坂田 実乃里、青柳 智大、荷村(松根) かおり、Alena Kaltenbrunner、Wolfgang Hess、渡辺 智、シアノバクテリアのプラスミド複製メカニズムとCyRepA1タンパク質の保存性に関する研究、The 36th JSME and The 13 th ASME (2023年11月)
- ⑦ 大館 和真、坂田 みのり、前田 海成、坂巻 裕、荷村-松根 かおり、大林 龍胆、渡辺 智、シアノバクテリアの巨大プラスミドDNA複製に関わる新規Repタンパク質の同定と発現ベクター系への利用、第46回日本分子生物学会年会 (2023年12月)
- ⑧ 大串航世、末崎裕寛、荷村-松根かおり、大林龍胆、渡辺 智、藍藻におけるDNAヘリカーゼDnaBとヘリカーゼローダーDciAの相互作用解析、第46回日本分子生物学会年会 (2023年12月)
- ⑨ 嘉数 健太、町田 颯太郎、渡辺 智、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803におけるRNA結合タンパク質Rbpの機能解析、第46回日本分子生物学会年会 (2023年12月)

(3) 出版物

- ① 坂巻 裕、坂田実乃里、前田海成、渡辺 智、シアノバクテリアによる物質生産に有用な広宿主域発現ベクターの開発、バイオサイエンスとインダストリー (B&I)、Vol.2 (2024)

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	東 京 理 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御		理 学 (理 工 系)
キ ー ワ ー ド	①ロタキサン ②分子マシン ③配座解析 ④動的挙動 ⑤触媒反応		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
齋 藤 慎 一	理 学 部 第 一 部	教 授	研究代表者 統括・インターロック化合物の合成

○研究分担者

[illegible]

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もの例としては、共有結合の生成と開裂、あるいは光エネルギーによる異性化反応を利用した分子運動が実現している。しかしながら、アクトミオシンやATPアーゼのように触媒反応により駆動する人工分子マシンの例は未だ存在しない。

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

(2) 具体的な研究目標

①触媒部位を有するロタキサン型分子マシンの合成

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

②ロタキサン型分子マシンの配座、ならびにその動的挙動の解明

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

③ロタキサン型分子マシンにおける動的挙動の制御

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

2. 研究の計画

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

3. 研究の成果

(1) スピロ骨格を有するロタキサンの合成

研究計画に沿ってロタキサンの合成を進めた結果、重要な合成中間体である大環状フェナントロリン-銅錯体、およびダンベル構造とジフルオロフェノール構造を組み込んだ末端アルキンの合成に成功した。大環状錯体については環構造を構成するメチレン鎖の長さを変更すること、あるいは芳香環を導入することにより様々な環サイズの化合物を得た。さらに、大環状錯体と末端アルキンを炭酸カリウムとヨウ素の存在下反応させ、引き続きアンモニアを用いて銅イオンを除去することにより目的とするロタキサンの合成に成功した。さらにアルキル鎖の長さを変更する、あるいは芳香環を導入することにより環構造のサイズを変更したロタキサン、軸構造のアルキル基の長さを変更したロタキサンを合成した。

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

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

(3) 分子マシンに適した構造を有するロタキサンの開発

(2)の結果から当初想定していたジイン構造を有するロタキサンは分子マシンとして機能するかどうか疑問が持たれた。そこでロタキサン分子の構造を改変し、分子マシンに適した構造を有するロタキサンを見いだした。

4. 研究の反省・考察

研究開始当初は今回合成したロタキサンにおいて環構造と軸構造はその構造にかかわらずそれらの相互作用は小さく、比較的自由に運動しているものと予想していた。ところが、実際に合成した化合物の一部においては環構造が局在化していることは意外であった。しかしながらロタキサン分子の構造を改変し、分子マシンに適した構造を有するロタキサンを見いだすことに成功した。本研究でこれまでに得られたロタキサンの構造と配座に関する情報を今後の研究に活用していきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Ohta, M.; Okuda, A.; Hosoya, S.; Yoshigoe, Y.; Saito, S. Synthesis of Interlocked and Non-Interlocked Deca(para-phenylene) Derivatives by Ni-mediated Biaryl Coupling. *Chem. Eur. J.* **2024**, *30* (16), e202304309. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.202304309> (2024年1月).

(2) 口頭発表

①「オリゴパラフェニレン構造を有する[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、第20回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム、東京都立大学、2023年6月

②「対称性の低下した[2]ロタキサンの合成および[1]ロタキサンへの変換」保坂 力稀, Rashid Showkat, 小金澤 寛, 吉越 裕介, 斎藤 慎一、第20回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム、東京都立大学、2023年6月

(3) 出版物

なし

2023年度（第48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] 適正な腸内細菌叢の維持は、腸管での宿主防御や栄養素の供給だけでなく、免疫系をはじめとする全身の生体応答に重要である。腸管の中で最も外界近くに位置する腸上皮細胞が腸内細菌叢の調節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細菌種を保ちつつ、感染症や免疫異常の原因となる菌種を排除する仕組みについては不明な点が多い。特に、腸上皮細胞の機能は、粘膜固有層に存在するリンパ球などの免疫細胞から放出されるサイトカインによって重要な調節を受けることが示唆されてきているが、その調節についての理解は十分でない。研究代表者らは以前、NF- κ B と結合する新規核内因子 I κ B ζ (マウス遺伝子名 *Nfkbiz*) を同定し、I κ B ζ が自然免疫応答時の遺伝子発現調節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細胞に次いで小腸の腸上皮組織で高く発現していることを見出したため、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) を作成し、表現型解析をおこなった。I κ B ζ は転写調節因子であることから、はじめに回腸組織を対象とした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関連因子 (*Duox2*, *Nos2* など) の発現がコントロールマウスと比較して顕著に低下していた。また、小腸における抗菌タンパク質産生に中心的な役割を担うパネート細胞に関連した遺伝子 (*Lyz1*, α -ディフェンシン遺伝子群) の発現が低下していた。また、このマウスの小腸では、齧歯類の回腸に常在するセグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria, SFB) がコントロールマウスと比較して有意に多く認められ、粘膜固有層では Th17 細胞が増多していた。さらに、Th17 細胞を主要な責任細胞とする自己免疫疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) をこのマウスに誘導したところ、増悪化が認められた。したがって、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスでは、腸上皮細胞での抗菌関連因子の産生不全によって腸内細菌叢のアンバランスが生じ、Th17 細胞が増え、この細胞を介した免疫応答が異常になったと考えられた。本研究では、I κ B ζ を介した腸上皮細胞の機能調節が、腸内細菌叢や全身性の免疫応答で担っている役割を明らかにする。次の3点に着目して解析を進める。

- (1) 腸上皮細胞における抗菌関連遺伝子の発現調節
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
- (3) 炎症性疾患の病態形成における役割

2. 研究の計画

- (1) 腸上皮細胞における抗菌関連遺伝子の発現調節
 - ① 腸管の3箇所 (空腸、回腸、大腸) についてトランスクリプトーム解析をおこない、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスで発現が変動している遺伝子を同定する。
 - ② *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの小腸組織から上皮オルガノイド培養系を確立し、IL-17やIL-22による遺伝子発現調節におけるI κ B ζ の役割を明らかにする。
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
 - ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの腸管の2箇所 (空腸と回腸) および糞便サンプルを用いたメタゲノム解析をおこない、腸内細菌叢の変化を明らかにする。
 - ② 粘膜固有層細胞を調製し、各細胞タイプの組成変化を明らかにする。
- (3) 炎症性疾患の病態形成における役割
 - ① TCR に対するアゴニスト抗体の投与により誘導される小腸炎モデルを用いて、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vill-Cre* マウスの病態形成や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抗菌関連遺伝子の発現調節

- ① *Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの回腸では、IgAの生合成に関与する遺伝子のほか、抗菌ラジカル産生酵素の遺伝子、パネート細胞関連遺伝子の発現がコントロールマウスと比べて低下していた。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの大腸組織についてもトランスクリプトーム解析をおこなったところ、ラジカリ産生関連遺伝子の発現低下が目立った。また、小腸粘膜固有層でのTh17細胞の増多と一致して、大腸でもTh17関連サイトカインであるIL-17A, IL-17F, IL-22をコードする遺伝子の発現が増大していた。また、IL-22応答遺伝子であり、上皮細胞傷害のマーカー遺伝子としても知られる*Reg3b*や*Reg3g*の発現増大が認められた。さらに、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの空腸領域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、回腸の解析で認められた抗菌関連遺伝子の発現低下に加えて、一群のIFN- γ 応答性遺伝子の発現亢進が認められた。現時点で発現細胞や発現亢進の機序は不明だが、IFN- γ をコードする遺伝子 (*Ifng*) の発現もコントロールマウスと比べて有意に増大していた。以前、小腸上皮オルガノイドをIFN- γ で刺激すると、パネート細胞などが選択的に傷害されることが報告されていたので、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス的小腸で認められたパネート細胞の減少は、IFN- γ の恒常的な過剰産生によるものと考えられた。
- ② コントロールマウスおよび*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス的小腸から上皮オルガノイドを調製し、IL-17AおよびIL-22に応答した遺伝子発現応答を検討した。コントロールマウス由来の上皮オルガノイドをIL-17Aで刺激するとI κ B ζ の発現が誘導された。また、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス由来の上皮オルガノイドでは、IL-17に応答性の遺伝子発現応答がほぼ完全に障害されていた。興味深いことに、複数のラジカル産生酵素関連遺伝子の発現は、IL-17AとIL-22の同時刺激により相乗的に増大し、その相乗効果はI κ B ζ 依存的であった。オルガノイドからの活性酸素種の産生誘導能はIL-22の方がIL-17よりも高かった。パネート細胞関連遺伝子のいくつかはIL-22に応答性であり、IL-22の存在下ではIFN- γ によるパネート細胞障害の抑制が認められた。
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
- ① ローテーションを組んで一定期間同じケージ内に同居飼育したコントロールマウスと*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスの回腸、空腸、糞便からDNAサンプルを調製し、メタゲノム解析をおこなった。腸上皮細胞におけるI κ B ζ の欠損は、細菌叢の α -多様性にはほとんど影響を及ぼさなかったが、空腸と回腸領域に接着している細菌叢に関して β -多様性に有意差を認めた。特異的なプライマーを用いた解析から、小腸および糞便中のいずれにおいてもSFBの増加が認められた。
- ② 小腸の粘膜固有層に存在する細胞を解析した結果、*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウスではTh17細胞の増多が観察された。粘膜固有層では、Th1細胞を初めとするIFN- γ 産生細胞の数には影響がなかったが、上述のように*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre*マウス的小腸でIFN- γ やIFN- γ 応答性遺伝子の発現亢進が認められた。腸管上皮細胞間リンパ球からのIFN- γ 産生が報告されているが、この細胞タイプの活性化機構については不明である。
- (3) 炎症性疾患の病態形成における役割
- ① TCR に対するアゴニスト抗体の投与により誘導される小腸炎モデルでは、特に小腸の上流部での炎症が顕著である。*Nfkbiz^{f1/f1} Vill-Cre* マウスでは抗体未投与のマウスにおいても恒常的に Th17 細胞の増多のために IL-17 シグナルと IL-22 シグナルが亢進しているが、抗体投与によりその傾向が助長され、上皮障害が促進された。

4. 研究の反省・考察

(1) 腸上皮細胞における抗菌関連遺伝子の発現調節

- ① 腸上皮細胞におけるI κ B ζ の主要な役割はIL-17応答性の遺伝子発現調節であったが、腸上皮オルガノイドを用いて、もう一つの重要なサイトカインであるIL-22の作用について検討したことにより、腸上皮細胞の機能変化について理解を進めることができた。IL-17とIL-22の同時刺激によって相乗的に発現が増大する遺伝子があることを見出したほか、IFN- γ による上皮障害がIL-22によって抑制されることを明らかにした。IL-17とIL-22は、粘膜固有層のTh17細胞やILC3から放出されると考えられるが、IFN- γ の産生細胞については特定に至っていない。オルガノイドを用いたin vitroの系にとどまらず、生体内ではどのような状況で種々のサイトカイン産生細胞の構成が変化するかについて

検討を進める必要がある。

- ② 腸上皮オルガノイド培養系については、IFN- γ によるパネート細胞傷害を観察する系として非常に優れているので、細胞死関連の遺伝子を欠損するマウスの小腸から調製したオルガノイドを用いる実験のほか、種々のシグナル伝達因子の阻害薬を用いた実験が有用だと思われる。さらに、IL-22による抑制効果を検討することにより、IFN- γ シグナリングとIL-22シグナリングのクロストークについて新たな知見が期待される。
- (2) 腸内細菌叢を介した免疫応答の調節
 - ① *Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスの小腸ではSFBの増多とTh17細胞の増多が顕著である。SFBによってTh17細胞の分化が促進する機構として、上皮細胞でのSAA因子群の放出が報告されているが、*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスの小腸組織ではSAAの発現はむしろ障害されているため、他の機構が主にはたらくと考えられる。*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスの小腸サンプルを用いたメタボローム解析などをおこなうことにより、腸内細菌叢によるTh17細胞の分化調節について新しい機構が明らかになる可能性がある。
 - ② 今回見出されたIFN- γ 産生の促進が、腸内細菌叢の変化とどのような関係にあるかについては未だ不明である。IFN- γ 産生の促進がSFBやTh17の増多と同時に起きることが他のグループから報告されているので、我々の*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスとの共通点を検討することにより、IFN- γ 産生促進の機構を明らかにしたい。*Nfkbiz*^{f1/f1} *Vil1-Cre*マウスへの抗IFN- γ 抗体投与の実験により、IFN- γ シグナルを抑制すれば腸上皮細胞の障害が部分的には抑制できることを見出しているため、腸内細菌叢を調節することにより腸上皮細胞を保護する方法論を探りたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Nature Communications 14, 6304 (2023) 「Fibroblast growth factor 18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis」 Tsuchiya Y, Seki T, Kobayashi K, Komazawa-Sakon S, Shichino S, Nishina T, Fukuhara K, Ikejima K, Nagai H, Igarashi Y, Ueha S, Oikawa A, Tsurusaki S, Yamazaki S, Nishiyama C, Mikami T, Yagita H, Okumura K, Kido T, Miyajima A, Matsushima K, Imasaka M, Arai K, Imamura T, Ohmuraya M, Tanaka M, Nakano H
- ② Inflammation doi.org/10.1007/s10753-024-01986-8 (2024) 「Relationship between the lipidome profile and disease activity in patients with rheumatoid arthritis」 Masuoka S, Nishio J, Yamada S, Saito K, Kaneko K, Kaburaki M, Tanaka N, Sato H, Muraoka S, Kawazoe M, Mizutani S, Furukawa K, Ishii-Watabe A, Kawai S, Saito Y, Nanki T
- ③ European Journal of Internal Medicine 16, S0953-S6205 (2023) 「Safety of SARS-CoV-2 mRNA vaccines and effects of immunosuppressive drugs on adverse reactions in patients with rheumatic diseases」 Kawazoe M, Nishio J, Hirose W, Furukawa K, Nanki T
- ④ Journal of Immunology 211, 209-218 (2023) 「Crucial roles of SATB1 in regulation of thymocyte migration after positive selection」 Naito T, Ise M, Tanaka Y, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M
- ⑤ Journal of Immunological research 2023, 9969079 (2023) 「Irradiation attenuates systemic lupus erythematosus-like morbidity in NZBWF1 mice: Focusing on CD180-negative cells」 Fujita K, Kuwabara T, Wang B, Tanaka K, Ito K, Akishima-Fukasawa Y, Mikami T, Akasaka Y, Ishii T

(2) 口頭発表

- ① 第96回日本生化学会（福岡） 2023年10月31日-11月2日 「腸上皮細胞におけるIkB ζ の役割：IL-17応答性の遺伝子発現を介した腸内細菌叢の調節と自己免疫疾患の抑制」 山崎創，猪原直弘，大村谷昌樹，恒岡洋右，八木田秀雄，片桐翔治，仁科隆史，三上哲夫，中野裕康
- ② 第52回日本免疫学会学術集会（千葉） 2024年1月17日-19日 「Fibroblast growth factor

18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis] Seki T, Tsuchiya Y, Shichino S, Nishina T, Yamazaki S, Matsushima K, Yagita H, Okumura K, Tanaka M, Nakano H

- ③第10回JCRベーシックリサーチカンファレンス（東京）2023年11月24日-25日「関節リウマチ患者の気道細菌叢の解析」小柴慶子，西尾純子，増岡正太郎，金地美和，川添麻衣，渡邊萌理，村岡成，金子開知，古川果林，南木敏宏
- ④第67回日本リウマチ学会総会（福岡）2023年4月24日-26日「モデルマウスを用いた関節リウマチ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，山田善登，南木敏宏
- ⑤第32回Kyoto T Cell Conference（京都）2023年6月16日-17日「自己免疫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，有田通恒，近藤元就
- ⑥第52回日本免疫学会学術集会（千葉）2024年1月17日-19日「The role of IL-7 in formation of the medullary microenvironment in the thymus」Ise M, Tanaka Y, Kuwabara T, Naito T, Kondo M
- ⑦第52回日本免疫学会学術集会（千葉）2024年1月17日-19日「Role of SATB1 in regulation of thymocyte migration after positive selection」Naito T, Ise M, Tanaka Y, Kuwabara T, Kohwi-Shigematsu T, Kondo M
- ⑧第52回日本免疫学会学術集会（千葉）2024年1月17日-19日「Elimination mechanism of B16 melanoma cells in autoimmune prone mice」Tanaka Y, Ise M, Naito T, Kuwabara T, Mashimo S, Inoue A, Kondo M

(3) 出版物

- ① 臨床免疫・アレルギー科 81(2), 149-157 (2024)「腸上皮細胞における転写調節因子 IκBζの役割」科学評論社

学 校 名	日 本 獣 医 生 命 科 学 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	獣医てんかん外科の発展に資する包括研究 ー臨床に則した基礎的研究とてんかん外科症例の予 後調査ー	研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①てんかん ②てんかん外科 ③犬 ④猫 ⑤脳波 ⑥MRI		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 谷 川 大 輔	日 本 獣 医 生 命 科 学 大 学 部 獣 医 学	教 授	総括、実験、成果発表

○研究分担者

[illegible]

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

2023 年度は以下 4 つの研究課題について研究計画を立てた。

- (1) 高周波帯域脳波測定によるてんかん原性領域（EZ）の同定
 - ①家族性側頭葉てんかんネコ（FSEC）2頭に対し、海馬／扁桃体へ深部電極および外側側頭葉皮質に皮質電図を慢性留置し、長時間ビデオ頭蓋内脳波モニタリングを実施。
 - ②得られた頭蓋内脳波記録から高周波帯域脳波解析を行い、てんかん原性領域を同定する。
- (2) 上記（1）の結果に基づく FSEC の海馬切除術の実施および発作転帰、合併症の検討
- (3) 非侵襲的てんかん原性領域同定のための脳波-fMRI 同時計測法（EEG-fMRI）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) 高周波帯域脳波測定によるてんかん原性領域（EZ）の同定
本年度長時間ビデオ脳波モニタリングを行った2頭および前年度に行った2頭の合計4頭について、高周波帯域脳波解析として高周波律動（HF0）の検出およびその分布からの焦点同定を実施した。その結果、海馬／扁桃体からの深部脳波では4頭全てで発作間欠期棘波上にHF0（ripple, fast ripple）が認められ、側頭葉皮質の皮質電図ではrippleは4頭で認められたものの、fast rippleは3頭でのみ認められた。これらの出現数から3頭では片側の海馬／扁桃体にてんかん原性領域があるものと推測されたが、1頭は明確な左右差や部位差がなく、同定不能だった。
- (2) 上記（1）の結果に基づく FSEC の海馬切除術の実施および発作転帰、合併症の検討
上記（1）にて本年度長時間ビデオ脳波モニタリングを行ったFSEC2頭中1頭に対し、片側の海馬切除術を実施し、現在経過観察中である。途中経過として1頭は中大脳動脈が閉塞し、大きな脳梗塞巣ができてしまい、それにより発作が増加している。別の1頭は海馬切除手術を計画していたが、電極抜去の際、頭蓋内電極およびその周辺組織に感染が認められ、手術を中止し、感染症の治療を行う事となった。
- (3) 前年度～本年度にかけて進めてきたMRI装置内でも利用可能な犬猫用脳波電極が完成し、健康な犬および猫でMRI撮像中の脳波測定およびfMRI撮像を実施し、犬猫でのEEG-fMRIの撮像方法を確立することができた。またその過程において、鎮静下のてんかん猫（FSEC）で効率よく安定したてんかん性異常波を賦活化できないかということで、ケタミンによる鎮静あるいはメドミジン鎮静下でのケタミンによるてんかん性異常波の賦活化を試みた所、当初の目的（鎮静下で効率よく安定したてんかん性異常波を得る）は果たせなかったものの、てんかん猫におけるケタミンの発作誘発性を見いだしたため、学術論文として公表した。
- (4) 新たに重度の薬剤抵抗性全般てんかんを示すゴールデン・レトリバーの1例で脳梁離断術を実施し、その後の追跡調査を行っている。加えてこれまで脳梁離断術を実施した犬猫症例の追跡調査を年単位で行い、その結果を学会にて公表した。

4. 研究の反省・考察

本年度は計画通りの研究が遂行できたと考えている。(1) では当初目的としていた高周波帯域脳波解析が行えるようになったことは大きい。結果的に 3/4 例でてんかん原性領域を同定

することができた。1 頭は両側性で、左右いずれかを判定できなかったが、もともと FSEC は遺伝性てんかんであり、両側焦点であることも大いに想定されていたため問題ではない。一方 (2) では手術を行った 1 頭では医原性と考えられる脳梗塞が、1 頭では慢性電極留置による感染症が発生し、いずれも満足な結果を得ることができなかった。それぞれの問題について対策を講じ、次年度も引き続き研究する所存である。(3) EEG-fMRI については、おそらく世界で初めての犬猫での研究になるだろう。現在実際のてんかん猫でのデータを取得中であり、次年度には一定の成果が出せるものと思われる。(4) の臨床研究についても引き続き新患者の組み入れと既手術患者の追跡調査を行っており、順調に進んでいる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Mizuno S, Asada R, Yu Y, Hamamoto Y, Hasegawa D. Investigation of the effect and availability of ketamine on electroencephalography in cats with temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Veterinary Science* 10: 1236275, 2023.

(2) 口頭発表

- ① 浅田李佳子, 水野聡, 重吉彩乃, 湯祥彦, 濱本裕二, 小畠結, 長谷川大輔. 脳梁離断術を実施した薬剤抵抗性てんかんの犬猫の追跡調査. 獣医神経病学会2023 (2023. 6. 24-25. 藤沢) .
- ② Asada R, Hasegawa D, Yu Y, Mizuno S, Shigeyoshi A, Hamamoto Y, Kobatake Y. Follow-up study of corpus callosotomy in dogs with medication-resistant epilepsy. 35th ESVN-ECVN Symposium 2023 (2023. 9. 21-23. Venice, Italy) .
- ③ 長谷川大輔. 痙攣-治療. 第41回日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (2023. 12. 2. 神戸) .
- ④ 浅田李佳子, 濱本裕二, 長谷川大輔. 薬剤抵抗性てんかんの犬に対する脳梁離断術の効果. 第47回日本てんかん外科学会 (2024. 2. 2. 札幌) .

(3) 出版物

なし

2023年度（第48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
村 井 保 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 いずみ	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 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 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
岩部 真人	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
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) などの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7,500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51,370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) 再収集した検体のゲノム解析データを用いたゲノム変化の解析

「ゲノム研究バイオバンク事業」にて収集した検体と今回「橋桜プロジェクト」で収集した検体のペア検体として、全ゲノムシーケンスを開始する。

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

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月に生命科学研究センター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月より付属病院、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。2024年3月31日時点で、付属病院 2,585 検体、千葉北総病院 1,087 検体、武蔵小杉病院 933 検体、多摩永山病院 201 検体の合計 4,806 検体(目標 6,000 検体の約 80%)が収集できた。

(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51,370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)、すべての症例の臨床情報の更新が終了した。

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Blood adv 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)

19,702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を行い、男性の虚血性脳卒中患者は有意に悪性腫瘍の発症が多いことや(現在Stroke 投稿中)、日本人脳梗塞症例においてMEGASTROKEで特定された32の脳卒中関連遺伝子セットのうち19の有意な関連遺伝子を使用して作成したポリジェニックリスクスコアは心房細動、心原性脳塞栓症、脳卒中および心血管死亡と有意に関連をしていることを明らかにした(現在JAMA 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を行っている。

(3) 再収集した検体のゲノム解析データを用いたゲノム変化の解析

「ゲノム研究バイオバンク事業」にて収集した検体と今回「橘桜プロジェクト」で収集した検体をペアー検体として、ゲノム研究バイオバンク事業との共同研究として血清も含めたオミックス解析を開始した(AMED 令和5年度「ゲノム医療実現バイオバンク利活用プログラム(ゲノム研究バイオバンク)」利活用を目的とした日本疾患バイオバンクの運営・管理(令和5年度～令和9年度)研究分担者)。

収集したペアー検体に関して、血清解析で成果が見込まれるNASH/NAFLD、自己免疫・アレルギー疾患、認知症、心血管疾患、感染症の1,000症例を解析対象としてオミックス解析を行っている。また自己免疫疾患100症例に関してはシングルセルマルチオーム解析を行っている。

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

検体の再収集に関しては、2022年度は検体収集が目標に比べて遅れていたが、その後順調に検体収集が行われ2024年3月時点で目標の80%まで到達をしている。

(2) 登録時のゲノム解析データを用いたゲノム疫学研究

日本医科大学グループから登録をした51,370人に関して、順調に臨床情報をすすめ終了させることができた。しかし先行して研究結果が出ていた血液内科や脳神経内科の論文acceptが遅れている。また上述④であげた多くの研究において、すでに行われたSNPアレイで解析されていない頻度が低い遺伝子多型も解析する必要性が判明した。このため現在連鎖解析法にてこれらの遺伝子多型の判定を行っており、今後研究の進捗が期待されている。

(3) 再収集した検体のゲノム解析データを用いたゲノム変化の解析

本研究で収集した凍結細胞検体に関してシングルセル解析を行ったところ、一部の検体において生細胞が少なく解析に不適格であることが判明した。そこで検体採取後の保存を室温にする、採血後の処理時間の短縮、凍結保存剤の変更など細胞凍結保存のプロトコルを変更することで凍結細胞検体の生細胞の割合の増加が認められた。現在新たな細胞凍結保存プロトコルで保存された検体をシングルセル解析することをすすめている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Takashi Shimoyama, Koichi Matsuda, Yoichiro Kamatani, Hiroki Yamaguchi, Kazumi Kimura. Genetic risk impacts stroke mortality and pathogenesis in patients with ischaemic stroke: a cohort study of BioBank Japan participants. Stroke投稿中.
- ② Takashi Shimoyama, Koichi Matsuda, Yoichiro Kamatani, Yasunobu Nagata, Hiroki Yamaguchi, Kazumi Kimura. Sex differences in subtypes and risk profile for cancer among 19,702 Japanese patients with ischemic stroke: a cohort of the BioBank Japan. JAMA Neurology投稿中.

(2) 口頭発表

- ① 下山隆、松田浩一、鎌谷洋一郎、山口博樹、木村和美：日本人脳梗塞患者におけるポリジェニックリスクスコアと危険因子および脳梗塞病型に関する検討。STROKE 2024.
- ② 下山隆、松田浩一、鎌谷洋一郎、山口博樹、木村和美：日本人脳梗塞患者におけるPITX2遺伝子と心房細動および心原性脳塞栓症との関連性。第65回日本神経学会学術大会. 2024年
- ③ Takashi Shimoyama, Koichi Matsuda, Yoichiro Kamatani, Yasunobu Nagata, Hiroki Yamaguchi, Kazumi Kimura. Association of comorbidities, stroke etiology, and polygenic risk score in Japanese ischemic stroke patients. A cohort study of Biobank Japan participants. International Stroke Conference 2024.

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 体 育 大 学	研究所名等	保 健 医 療 学 部 ・ 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2④アクチニン3⑤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 保 健 医 療 学 部	教 授	研究統括

○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 保 健 医 療 学 部 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 体 育 学 部 体 育 研 究 所	教 授	世田谷・青葉コホート研究の統括
小 林 正 利	日 本 体 育 大 学 体 育 学 部 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 体 育 学 部 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 体 育 学 部 体 育 研 究 所	准 教 授	アジア人サルコペニアモデル実験の統括
鴻 崎 香 里 奈	日 本 体 育 大 学 保 健 医 療 学 部 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

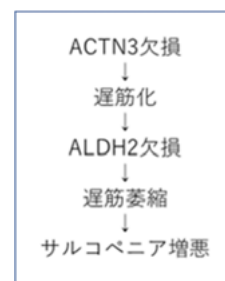
1. 研究の目的

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。

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)。さらに複数の状況証拠から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た。我々は ALDH2 ノックアウトマウスの骨格筋ミトコンドリアにおいて活性酸素種産生亢進を確認しており (Am J Physiol, 2020)、2021年度より本学術振興資金の援助を得て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、高齢者のそれぞれで低値を示すこと (Biol Sport, 2022, J Physiol Anthropol, 2022) などを見出し、報告した。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が明らかとなった。

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。さら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て 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) を仮定し研究を進めてきた。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。2022年度までに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た検討の結果、骨格筋量、筋線維タイプ、ミトコンドリア量などについて従来の報告と全く異なる結果を得た。ただし昨年度の予備的検討は2ヶ月齢のマウスであった。2ヶ月週は成長段階として若齢ないしは成長期にあり個体差が大きかった。そこで2023年度は体重、筋量が安定する成長期後の5ヶ月齢の Actn3 ノックアウトマウスの特徴を詳細に解析し、2022年度に予備的に観察された骨格筋量と筋線維の特徴について確固たる結論を得ることを目指した。本基礎実験で得た結果をヒトにおいて確認するために新規に骨格筋量に関するメタ分析を実施することとした。

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研究のそれぞれにわけて研究計画を示す。

(1) Actn3 ノックアウトマウスの骨格筋量の野生型マウスとの特徴の差

5ヶ月齢のC57BL6Jマウスを対象とし、本研究室にて確立したACTN3KOマウスおよび同腹の野生型マウスを用いた。麻酔下にて解剖し下腿骨格筋群を得た。重量測定ののち、筋線維タイプ別に断面積の測定を行った。

(2) ACTN3 タンパク質欠失がヒト骨格筋に与える影響

Actn3ノックアウトマウスの骨格筋量が野生型と差がないとする基礎研究の結果は先行研究と著しく異なっており、結論を出すにはさらなる解析が必要であろうと考えた。ヒトACTN3遺伝子R577X多型と骨格筋量の関係は多数の報告がなされている。ただしその結果は必ずしも一致しておらず、定量的に文献を評価する必要があると考えた。そこで今回我々はヒトにおけるACTN3遺伝子多型と骨格筋量の関係をより明確に結論づけるためにヒトにおけるACTN3遺伝子多型と骨格筋量について、メタ分析を実施することにした。

文献はPubmedデータベースを用い、検索用語は(ACTN3 or actinin3 or "alpha actinin3") AND ("muscle mass" or "lean body mass" or "muscle volume" or "cross sectional area" or "Muscular Atrophy" or "Sarcopenia")を用いた。本研究では骨格筋量として、除脂肪量 (FFM)、筋横断面積 (CSA)、筋重量 (MV) の項目について検討した。以上の基準を用いてACTN3遺伝子R577X多型と骨格筋量の関係を検討している論文を、PubMedデータベースの検索により抽出した。

3. 研究の成果

(1) Actn3 ノックアウトマウスの骨格筋量の野生型マウスとの特徴の差

α -アクチニン 3 の欠失は野生型と比較して腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋の筋湿重量を有意に増加させた。ただし筋線維横断面積には影響を与えなかった。今回の成長期以降の動物を用いた検討より、「 α -アクチニン 3 欠失は筋量の低値をもたらす」という従来の ACTN3 遺伝子ノックアウト動物を用いた結論は、今回作製した C57BL/6J 系統を背景とした Actn3 KO マウスでは再現されることが明らかになった。従来 Actn3 ノックアウトマウスとして用いられていたマウスの系統 (C57BL/10) は今回用いた C57BL/6J とは異なることから、 α -アクチニン 3 欠失の表現型は、Actn3 KO マウスの背景系統の違いによって変化することが示唆された。

(2) ACTN3 タンパク質欠失がヒト骨格筋に与える影響

取得された全論文を用いてメタ分析を行ったところ、遺伝子型と骨格筋量に有意な関連は認められなかった。また、若齢と老齢に分けて分析を行ったが、両集団共に遺伝子型と骨格筋量に有意な関連は認められなかった。老齢集団を欧米人集団とアジア人集団に分け分析を行うと、アジア人集団でのみXX型における骨格筋量の有意な低値が認められた。これらのことより、 α -アクチニン3の欠失は骨格筋量に対し普遍的な影響を与えず、アジア人特異的に筋量の低値を導くことが示唆された。この結果は本申請の仮説を支持するものである。

4. 研究の反省・考察

(1) Actn3 ノックアウトマウス骨格筋量の野生型マウスとの特徴の差

2022 年度より従来基礎研究で主張されてきた Actn3 ノックアウトマウスでの骨格筋の低値とは本研究では全く異なる結果が得られた。週齢が骨格筋量に影響を与える可能性があったため、今回成長期以降の骨格筋量が安定した時期での比較を試みた。結果的に 2022 年度に得られた観察と同様の結果を得るに至った。先行研究と結果が異なる理由として我々は背景となるマウス系統の違いをあげているが、逆に先行研究で用いられている系統 (C57BL/10) を用いて追試を行うべきである。

(2) ACTN3タンパク質欠失がヒト骨格筋に与える影響

基礎研究で得られた結果をより強固にするために今回は先行研究をもちいたメタ分析を実施した。結果的にACTNタンパク質欠失は普遍的に骨格筋量を減少させることはなかった。さらに我々が本申請において仮説としていたアジア人高齢者集団において α アクチニンタンパク質を欠失することで骨格筋が低値になることを見出した。この結果はアジア人の遺伝的背景がACTN3欠失に伴って生じる骨格筋の特徴に影響を与えることを示唆すると言え、大変重要な発見をすることができた。

特筆すべき点として、本内容の一部は2023年度に開催された第31回日本運動生理学会にて大会奨励賞を受賞した。本発表は従来の結論を覆す重要な知見であるため現在本内容の投稿にむ

けて入念に準備中である。

(3) ACTN3、ALDH2ダブルノックアウトマウスについて

2023年度申請書でも記載のとおり、ACTN3およびALDH2ダブルノックアウトマウスは現在本施設にて飼育中であり、本実験期間内での解析には間に合わなかった。ただし今年度末には解析を終了する予定であり、結果が判明したら速やかに外部公表する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

服部桜、田村優樹、鴻崎香里奈、木下涼雅、中里浩一、Actn3遺伝子欠損がマウス骨格筋量に与える影響、第31回日本運動生理学会大会、2023年9月、筑波大学（大会奨励賞受賞）

(3) 出版物

なし

2023年度（第48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	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 科 日 文 学 部 史 学 科	教 授	女性知識人、平塚らいてうに関する研究の推進
北 口 由 望	法 政 大 学 学 科 H O S E I ミ ュ ー ジ ア 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 科 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
ファヨル入江容子	甲 南 大 学 学 科 文 学 部 人 間 科 学 科	講 師	女性間の階級問題に関する日仏比較研究
古 俣 達 郎	明治大学学術・社会連携部 博 物 館 事 務 室	特 別 嘱 託	デジタルアーカイブ、展示に関する研究担当

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と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) 大原社会問題研究所「平塚らいてう資料」の目録整備

①らいてう執筆記事の切り抜きやらいてう宛書簡などの取扱いについて、著作権者が確定できない場合やプライバシーにかかわる問題について検討し、公開の可否を見極める。

②目録データを研究所ウェブサイトで公開するとともに、紙媒体でも印刷し、関係機関等に配布する。公開を前提に、資料の保存体制を整える。

(2) 研究会の開催とデジタルアーカイブの公開準備

- ①撮影済みの画像データを用いた分析・研究を進める。
- ②女性と社会運動に関する内外の研究蓄積を検討するため、必要な文献調査を行うとともに、専門家を招聘して研究会を開催する。
- ③デジタルアーカイブの構築を進める。

3. 研究の成果

(1) 大原社会問題研究所所蔵「平塚らいてう関係資料」について

- ①予算の都合上、前年度に撮影を終えることができなかった資料について、資料撮影を終えることができたため、撮影したデジタルデータを共有して研究を進めることができた。
- ②デジタルアーカイブの構築については、その専門家であるRAにパイロット版を作成していただき、それをもとに研究会メンバーで検討を行った（2023年9月2日）。
- ③法政大学大原社会問題研究所ワーキングペーパーNo.60として、「平塚らいてう関係資料目録」（2024年3月）を刊行し、関係各所に配布することができた。

(2) 近代日本女性史をめぐる研究蓄積の検討

- ①平塚らいてう資料研究会のメンバーを増員することによって、日仏比較など国際比較の視点を取り入れて共同研究の可能性を広げることができた。
- ②近年、従来の女性史の枠組みにとらわれない研究が進展しているため、その成果を確認するとともに、北海道大学法学研究科博士後期課程の山中仁吉さんに「戦前日本における女性参政権運動の対議会戦略 ―新婦人協会再考」（2024年2月27日）と題してご報告いただき、研究会メンバーとともに議論を深めることができた。

4. 研究の反省・考察

(1) 「平塚らいてう関係資料目録」の刊行

- ①「平塚らいてう資料」の目録を編成する過程で、らいてう以外の関係者による資料群が一定程度含まれていることから、「平塚らいてう関係資料」と名称を変更することにした。
- ②受贈した資料のうち戸籍関係の資料など公開に制限をかけるべきものを精査し、奥村家と相談の上、一部「非公開」とした。
- ③目録は2024年3月末に刊行予定で予算の都合上、研究所予算を充当することとしたが、印刷所の都合上、納品が4月にずれ込み、関係機関への配布も4月になってしまった。またウェブサイト上での公開も2023年度中に完了することができなかった。現状では、刊行された目録のみの限定公開となっているが、閲覧希望者には個別に対応する方針である。

(2) 共同研究の進め方とデジタルアーカイブについて

- ①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、資料のデジタル化を実現し、共同研究者間で利用可能としたことで、遠隔地のメンバーとも共同研究を進めることができた。しかしながら、研究会はオンラインで開催しているため、全員が一堂に会し、現物の資料をみながら議論する機会がなかった。次年度は、研究成果を展示会やシンポジウム等で発表し、対面かつ公開の場で議論する機会を増やしたい。
- ②デジタルアーカイブの構築については、パイロット版の検討を行ったものの、サーバーの問題など実現に向けた課題が残されている。次年度に着実に公開できるよう準備したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

差波亜紀子「平塚らいてうと新婦人協会」（2024年3月2日、於日本女子大学総合研究会）

(3) 出版物

法政大学大原社会問題研究所ワーキングペーパーNo.60「平塚らいてう関係資料目録」2024年3月

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	星 薬 科 大 学	研究所名等	医 薬 品 化 学 研 究 所	
研 究 課 題	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		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 標的タンパク質分解誘導薬、② PROTAC、③ 作用機序、④ 複合分子			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
叶 直 樹	星薬科大学・薬学部、 医薬品化学研究所	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
大 竹 史 明	星薬科大学・薬学部、 先端生命科学研究所	特任准教授	細胞生物学実験・データ整理・論文作成
横 江 弘 雅	星薬科大学・薬学部、 医薬品化学研究所	助 教	有機合成化学実験・データ整理・論文作成
成 田 年	星薬科大学・薬学部、 先端生命科学研究所	教 授	薬剤評価実験・データ整理・論文作成
森 田 博 史	星薬科大学・薬学部	教 授	新規複合分子の分離精製・データ整理・論文作成
平 澤 祐 介	星薬科大学・薬学部	講 師	新規複合分子の分離精製・データ整理・論文作成

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

(1) 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

- ① PROTAC 特有の細胞内への送達過程と作用機序の解明：本研究の第一の目的は、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である。PROTAC は中分子（従来型の低分子医薬と比べて分子量が大きい分子）であることから、PROTAC 特有の細胞内への送達過程と、タンパク質分解誘導活性の相関を明らかにする。
- ② PROTAC の作用機序に関わる未同定重要因子の探索とその役割の解明：PROTAC の作用機序にはまだ不明な点が残されている。我々は2021年に、ある種の PROTAC が介するユビキチン鎖の伸長には、PROTAC 分子の設計時に想定した E3 ユビキチンリガーゼとは異なる、別の E3 ユビキチンリガーゼの働きが重要であることを報告した。更なる未同定重要因子の存在も考えられるため、これら未同定重要因子を探索し、その役割の解明を行う。

(2) 新規重要因子を制御する原理や PROTAC 特有の作用機序を組み込んだ新規複合分子の創製

- ① PROTAC 特有の作用機序を考慮した分子設計法の確立：本研究の第二の目的は、上記の研究で解明した重要因子や作用機序を制御する原理を薬剤設計に応用し、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。そこでまず、中分子である PROTAC 特有の作用機序を考慮した分子設計手法を確立する。
- ② 重要因子の活性を制御する機能を組み込んだ複合分子の創製：前述の通り、我々は既に標的タンパク質分解誘導を亢進する重要因子と、その重要因子の分解を担う因子（分解因子）を同定しているため、これらの活性を制御する機能を組み込んだ複合分子を創製する。また、上記の目的（1）②項で新たな重要因子が同定できた場合にも、これらの活性を制御する機能を組み込んだ複合分子を創製する。
- ③ E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製：近年、がん治療領域で標的タンパク質と共有結合を形成する医薬品が注目を集めている。そこで、このコンセプトを本研究に応用したE3ユビキチンリガーゼ結合型コバレントPROTACを創製する。

2. 研究の計画

(1) 三価 PROTAC テンプレートを用いた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

- ① PROTAC の細胞内への送達過程と作用機序の解析：既に我々は、各種官能基の導入が可能な三価 PROTAC テンプレート（4種の3置換ベンゼン異性体）を創出しているため、このテンプレートを用いて標的タンパク質分解誘導に関わる未同定因子の探索と、PROTAC 特有の細胞内への送達過程と作用機序を明らかにする。まず、三価 PROTAC テンプレートに長さや性質の異なるリンカーを介して多様な官能基や原子団を導入した PROTAC プローブを合成し、その溶解性、脂質二重膜透過性、標的タンパク質分解誘導活性を精査する。
- ② PROTAC テンプレートと標的タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼからなる三者複合体の評価：4種の PROTAC テンプレートと標的タンパク質および E3 ユビキチンリガーゼとの三者複合体の安定性を精査する。

- ③ PROTAC 分子設計手法の確立：以上の結果を踏まえて、中分子である PROTAC 特有の細胞内への送達過程および作用機序を考慮した分子設計手法を確立する。
- ④ 三価 PROTAC 由来複合型プローブを用いた重要因子の探索と同定：三価 PROTAC テンプレートに、近接すると標識を転移する官能基（近接駆動型標識転移基）を連結した複合型プローブを合成し、これ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、および役割の解明を行う。

(2) PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製

- ① PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を三価 PROTAC テンプレートに組み込んだ複合分子の創製：上記の計画 (1) ①～③項で確立した分子設計の方針を用いて、④項で解明した重要因子の制御法を三価 PROTAC テンプレートに組み込んだ複合分子を創製する。
- ② 重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製：上記の計画 (1) ④項で解明した重要因子の活性を制御する分子を三価 PROTAC テンプレートを用いずに別に創製し、PROTAC との同時投与で PROTAC の機能を向上させる複合分子を創製する。
- ③ E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製：三価 PROTAC テンプレートに E3 ユビキチンリガーゼとの共有結合を形成するような仕組みを組み込んだ複合分子を創製する。

3. 研究の成果

(1) 三価 PROTAC テンプレートを用いた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

- ① PROTAC の細胞内への送達過程と作用機序の解析：三価 PROTAC テンプレートを用いてこれまでに創製した約30種類の PROTAC 群について、バッファー中への溶解性試験、人工膜を用いた膜透過性試験 (Parallel artificial membrane permeability assay : PAMPA)、および標的タンパク質分解誘導活性試験を、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (AMED-BINDS) の支援を受けて実施した。その結果、(a) PROTAC 群の標的タンパク質分解誘導活性と膜透過性には直接的な相関が見られないこと、(b) 4種の三価 PROTAC テンプレート間でもバッファー溶解性と膜透過性は大きく異なること、(c) PROTAC 中の1原子の置換や1箇所の立体化学反転が PROTAC のバッファー溶解性と膜透過性に大きな影響を与えること、(d) 極性官能基の導入は PROTAC の標的タンパク質分解誘導活性に負の影響を与えるが中性官能基の導入は許容されること、が明らかとなった。
- ② PROTAC テンプレートと標的タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼからなる三者複合体の評価：これまでに4種の PROTAC テンプレート間で標的タンパク質分解誘導活性の違いが見られていたが (*Bioconjugate Chem.* **2022**, 33, 142)、成果 (1) ①項 a, b の結果から、この違いが PROTAC テンプレートの物理化学的性質の違いによるものなのか、または細胞内での働きの違いによるものなのかを総合的に精査する必要性が生じた。この精査は PROTAC の分子設計に大変重要である。そこで、PROTAC テンプレートの三者複合体形成能の評価を文献 (Bartoschik, T. *et al. Method Mol. Biol.*, **2021**, 2365, 115) の報告例に基づき、マイクロスケール熱泳動 (MST) アッセイを用いて実施した。市販の標的タンパク質 (Brd4^{BD2}) およびE3ユビキチンリガーゼ複合体 (VCB)、更には国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (AMED-BINDS) の支援により供給いただいた標的タンパク質 (Brd4^{BD2}) を用いて詳細に検討したが、残念ながら、上記の材料はおろか、文献に報告されているものと同じ標準化合物およびタンパク質を用いても文献の結果を再現することができなかった。その理由は不明であるが、この解析に多大な時間と労力を要したため、計画 (1)

③項と④項、および計画 (2) ①項と②項を十分実施することができなかった。

(2) PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製

- ③ E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製：三価 PROTAC テンプレートを用いて E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC を創製するため、VHL 中の共有結合形成が可能なアミノ酸残基と、それと反応する官能基のペアを探索したところ、VHL タンパク質の Glu146 と Asp144 に存在するカルボン酸と、光反応により活性化してカルボン酸と選択的に反応する 2-aryl-5-carboxytetrazole (*J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14609) が使える可能性が示唆された。そこで、この文献を参考に、数種の 2-aryl-5-carboxytetrazole と、E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の合成中間体を合成した。

4. 研究の反省・考察

(1) 三価 PROTAC テンプレートを用いた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

- ① 三価PROTACテンプレートから作成した PROTAC 群を用いて、溶解性や膜透過性などの詳細な情報が得られたことは、最終年度の PROTAC 設計のためにも重要な前進であったと考えられる。
- ② 一方、三者複合体解析に関する論文の実験を再現できないというのは予期せぬ結果であった。この検討に時間を費やしたにも関わらず、十分な成果が得られなかったのは大変歯痒く、かつ残念であったが、PROTAC 設計のための重要な知見を得るための努力としては仕方がなかったと考える。マイクロスケール熱泳動 (MST) アッセイを用いた三者複合体解析は興味深い手法ではあるが、当該論文 (Bartoschik, T. *et al. Method Mol. Biol.*, **2021**, 2365, 115) 以外には報告例がないため、現在、報告例がより豊富な表面プラズモン共鳴法を用いた解析や、ビオチン体を用いたプルダウン実験などを計画している。このような別の方向からPROTAC テンプレートの三者複合体形成能の評価を実施し、計画 (1) ③項と④項、および計画 (2) ①項と②項の実施に繋げたい。

(2) PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製

- ① 研究計画 (2) ①項と②項の実施に関しては前述の通りであり、③項で述べた E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製も進める予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

- ① 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (明治薬科大学、2023 年 9 月 16 日)
Brd4 分解誘導薬 MZ-1 を基盤とした三価 PROTAC 群の合成と評価
三瓶 茉莉菜, 黄 一帆, 横江 弘雅, 白葉 賢太郎, 平塚 彩水, 成田 年,
大竹 史明, 叶 直樹
- ② 日本薬学会第 144 年会 (横浜、2024 年 3 月 28-31 日)
Brd4 分解誘導薬 MZ1 を基盤とした三価 PROTAC 群の物理化学的性質とタンパク質分解活性との相関関係
黄 一帆, 三瓶 茉莉奈, 横江 弘雅, 大竹 史明, 叶 直樹

(3) 出版物
なし

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	立 正 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	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－		研 究 分 野	経 済 学
キ ー ワ ー ド	①社会的ジレンマ ②新型コロナウイルス ③行動変容 ④パネル調査			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 本 仁 志	立 正 大 学 学 部 立 経 正 営	教 授	研究統括・論文作成・調査実施

○研究分担者

[illegible]

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 ー沈黙の螺旋と社会的ジレンマの枠組みを用いた分析ー

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に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。同様に 2022 年 4 月、2023 年 4 月にもパネル調査を実施した。

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的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。2023 年調査からはワクチン陰謀論を規定する要因の調査も開始し、コロナ禍における偏った情報接触が陰謀論信念の形成に与える影響を調査した。

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、互惠性は第 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に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。

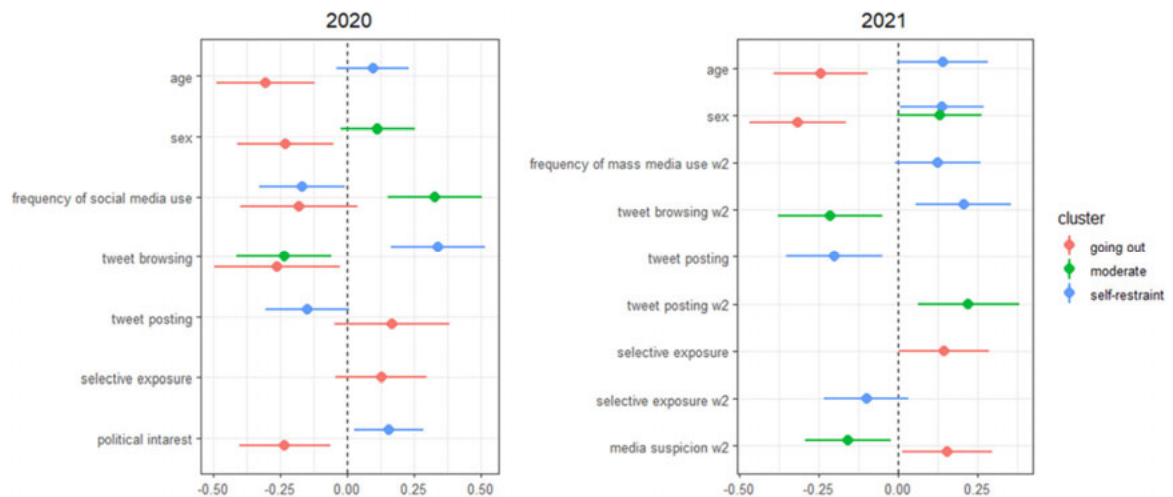


図 1: 2 時点での予防行動クラスタごとのメディア接触の特徴 (Suzuki et al., 2023 より)

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。本研究課題終了後も、2024 年に第5波調査を実施しており、コロナ禍からアフターコロナへ移行する社会において人々の行動規範や価値観がどのように変容したのかを引き続き分析する予定である。また今後の課題としてワクチン陰謀論を形成する要因を詳細に分析することを試みている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Suzuki, 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>
- ②Yamamoto, H., Suzuki, T., Ogawa, Y., & Umetani, R. (2023). The effects of psychological attitudes on voluntary cooperation against COVID-19: an analysis using a social dilemma framework. *Journal of Socio-Informatics*, 16(1), 17-31. https://doi.org/10.14836/jsi.16.1_17
- ③Yamamoto, 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>
- ④Umetani, R., Yamamoto, H., Goto, A., Okada, I., & Akiyama, E. (2023). Individuals reciprocate negative actions revealing negative upstream reciprocity. *PLOS ONE*, 18(7), e0288019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288019>
- ⑤Sasaki, T., Uchida, S., Okada, I., & Yamamoto, H. (2024). The Evolution of Cooperation and Diversity under Integrated Indirect Reciprocity. *Games*, 15(2), 15. <https://doi.org/10.3390/g15020015>
- ⑥Uchida, S., Sasaki, T., Yamamoto, H., & Okada, I. (2024). Evolution of “Pay-It-Forward” in the Presence of the Temptation to Free-Ride. *Games*, 15(3), 16. <https://doi.org/10.3390/g15030016>

(2) 口頭発表

- ①Suzuki, 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)
- ②Yamamoto, 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
- ⑤鈴木貴久, 鳥海不二夫, 山本仁志, 小川祐樹, 梅谷凌平, コロナ禍における外出自粛とTwitter: テキストデータの感情分析による検討, 日本社会心理学会第64回大会 2023年9月8日
- ⑥阿閉凜, 小川祐樹, 高史明, 高野雅典, 森下壮一郎: インターネットテレビのニュース番組に投稿されるコメントの内容分析, 2023年度人工知能学会全国大会 (第37回), 1B3-GS-2-01, 2023.

(3) 出版物

なし

2023年度（第48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	自治医科大学医学部	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
石 下 洋 平	自治医科大学医学部	准 教 授	手術・実験・論文作成
井 林 賢 志	自治医科大学医学部	講 師	手術・実験・論文作成
大 谷 啓 介	自治医科大学医学部	講 師	手術・実験・論文作成
佐 藤 信	自治医科大学医学部	助 教	手術・実験・論文作成
大 貫 良 幸	自治医科大学医学部	講 師	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する際、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)の発展により、他者から得られる共感の数(例:「いいね」やリツイート数)は社会的な報酬と等価であり、著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。昨年度に実施した視床下核の共感性・情動情報処理の関与の検証を今年度も継続して実施し、さらに今年度予定した「情動・共感性の変容を引き起こす電気刺激の検証実験」も実施した。

2. 研究の計画

(1) 共感性を反映する視床下核活動解析

①視床下核の共感性・情動情報処理の関与を調査した。昨年度に引き続き、他者の痛みへの共感性に焦点を当てた認知課題時の視床下核活動計測を実施し、データの解析を行った。
②他者の痛みに対する共感性の情報処理時に視床下核活動と同期している脳領域を調べるため、パーキンソン病患者と同年代の健常成人に対して、同一の認知機能課題を実施している時の脳活動を非侵襲的脳活動計測法である機能的磁気画像共鳴法(functional Magnetic Resonance Imaging)で計測した。

(2) 電気刺激法と taVNS による神経活動の変調による情動・共感性の変容の検証

①硬膜下電極を留置した患者に対して、昨年度検証した「他者の痛み」に対する共感性を検証する認知課題を課した。課題中、情動と共感性に対応する神経活動の周波数帯域に基づく電気刺激を提示し、一時的に神経活動を変調させ、行動の一時的な変異の有無を検証した。
②情報記憶の強化効果(Ventura-Bort et al. 2021, The Journal of Neuroscience)など情動情報処理への効果が報告されている経皮的耳介迷走刺激装置(taVNS)を健常成人に適用し、他者の痛み推定課題における他者の痛みへの共感度の変化を比較した。

3. 研究の成果

(1) 共感性を反映する視床下核活動から他者の痛みの推定

①2022 年度に取得した視床下核活動データを用いて、他者の痛みへの共感性を反映する神経符号化を検証した。機械学習の一つであるサポートベクターマシンを使用し、腹側および背側領域の中-高ベータ帯域(16-30Hz)の活動から他者の手の痛みを知覚した状態を判別することが可能であることを示した。しかし、他者の顔の表情から痛みを知覚した状態については、視床下核の活動から判別することは出来なかった。さらに、この中-高ベータ帯域のパワーと患者評価した他者の痛み度合いに相関が認められたが、個人や電極位置でばらつきも観察された。

②パーキンソン病患者と同様に、他者の痛み推定課題時に視床下核と同期して賦活する大脳皮質・大脳基底核領域を検証するため、健常者を被験者としたfMRI計測も実施した。まだ目標サンプル数には達していないものの、他者の痛みを認識している時に視床下核と島皮質前部との間に同期的な活動が認められた。

(2) 侵襲的脳電気刺激による共感性を反映する視床下核活動の変調

①昨年、他者の痛みの共感性を検証するのに使用した「他者の痛み推定課題」を用いて、電気刺激による共感性の変化を検証した。脳深部刺激療法のために視床下核へ深部電極を

埋め込んだパーキンソン病患者群に対して、130Hzもしくは30Hzの周波数の電気刺激を視床下核へ提示した。その結果、目標サンプル数までにはまだ達していないものの、30Hzの周波数で電気刺激を提示した患者群では、他者の手の痛みに対する共感性の度合いが低下する傾向が認められた。また、この検査のため、電気刺激提示の際に最大16chまで電極を組み合わせて、電気刺激の提示が可能な電極選択装置を作成した。

②パーキンソン病患者と同年代の健常成人を対象に、他者の痛み推定課題を実施した。実験は2日にわたり行い、1回目と2回目の実験日の間には1日を空けてウォッシュアウト期間を設けた。2日間のいずれかの日に、taVNSを使用した状態で同一の課題を行い、他者の手の痛みおよび他者の痛みの表情に対する共感度を測定した。その結果、目標サンプル数には達していないものの、taVNS使用中は他者の痛みの表情が強いほど共感度が低下する傾向が認められた。

4. 研究の反省・考察

(1) 共感性を反映する視床下核活動から他者の痛みの推定

①昨年度は、他者が痛みを感じ始めた時に視床下核の β 帯域の活動が上昇することを示すことが出来た。今年度はさらに機械学習により視床下核の β 帯域活動から他者の手の痛みを知覚した状態を判別することが出来た。これは、視床下核が他者の痛みに対する共感性を客観的に評価する指標となる脳領域の候補となる可能性を示唆する。来年度は本研究成果の論文化を目指す。

②視床下核は島皮質から投射を受けているだけでなく (Emmi et al. 2020, *Frontier in Neuroanatomy*)、島皮質が他者の痛みを符号化していることから (Soyman et al. 2022, *eLife*, 研究分担者・大貫も共著者)、他者の痛み推定課題時に視床下核と島皮質の同期活動を示した本研究結果は、島皮質と共に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予想した昨年の考察結果を支持している。

(2) 侵襲的脳電気刺激による共感性を反映する視床下核活動の変調

①目標サンプル数には達していないため、結果の一般性はまだ担保されていない点に注意が必要であるが、本研究結果は視床下核の神経活動、特に30Hzの周波数帯域において、他者の手の痛みに対する共感性を符号化している可能性が示唆される。これは、上記に記載した腹側・背側領域の中-高ベータ帯域(16-30Hz)の活動から、他者の手の痛みを生じるタイミングを判別出来た結果からも支持される。この結果をもとに、来年度は共感情報がソーシャルネットワークで見られる情報拡散行動を促すか検証を行う予定である。

②迷走神経刺激は、痛みの調整・抑制機能を持つ縫線核や青斑核を賦活させることが知られており (久保 & 角田, 2022, *The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine*; Suárez-Pereira, Irene, et al. 2022, *Biological Psychiatry*; Wang & Nakai, 1994, *Brain Research Bulletin*)、他者の痛みに対する共感度にも抑制効果が生じる可能性がある。本研究では、他者の痛みの表情が強いほど共感度が低下する傾向が見られ、この結果は上記のメカニズムと一致している。ただし、上記の結果と同様、目標サンプル数には達していないため、結果の一般性はまだ担保されていない点に注意が必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

Yoshiyuki Onuki, Lkhagvasuren Amarsanaa, Keisuke Otani, Takeshi Nakajima, Efe Soyman, Rune Bruls, Valeria Gazzola, Christian Keyzers, Kensuke Kawai. Association of beta activity in the human subthalamic nucleus with the pain perception of others. Asian-Australasian Society of Stereotactic and Functional Neurosurgery (AASSFN 2023), Osaka, April 24, 2023. (ポスター発表)

(3) 出版物

なし

学 校 名	聖マリアンナ医科大学	研究所名等		
研 究 課 題	HTLV-1関連脊髄症発症を決定する宿主-ウイルス因子解明 ―疾患発症・重症化リスクを規定する動的ゲノム因子解明に向けて―		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①HTLV-1関連疾患、②レトロウイルス、③ゲノム配列解析、④ロングリードシーケンサー			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 橋 里 美	聖マリアンナ医科大学	特 任 教 授	研究総括

○研究分担者

[illegible]

HTLV-1 関連脊髄症発症を決定する宿主-ウイルス因子解明 ー疾患発症・重症化リスクを規定する動的ゲノム因子解明に向けてー

1. 研究の目的

ナノポア・ロングリードシーケンサー(ナノポア LRS)を用いたゲノム内のウイルス挿入配列のターゲット解析系の構築によるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染者の末梢血単核細胞(PBMC)の解析

本研究では、宿主ゲノムのウイルス挿入部位、ウイルスゲノム全長配列、周辺のヒトゲノム配列と DNA メチル化を、1 つの実験系・解析システムにより検出し、1 人の人間の体内で動的に変化するウイルス・宿主ゲノムの違いに注目し、難病である HTLV-1 関連脊髄症(HAM)の発症に至る病態の解明を目指す。HTLV-1 は、ヒトに感染すると 95%は無症候性キャリア(AC)として生涯持続感染するが、5%では成人 T 細胞白血病(ATL)を、0.3%では HTLV-1 関連脊髄症(HAM)を発症する。しかし、なぜ同じウイルスの感染が異なる疾患発症へと運命づけられるのかは最大の謎である。HAM 患者の感染細胞では、ATL とはトランスクリプトームが異なり、HAM 特異的に免疫応答を引き起こす遺伝子が発現することが知られているが、なぜこれらの遺伝子発現の違いが生じるのか不明である。数十年にわたって感染が持続する間に、HTLV-1 プロウイルスのゲノム配列には欠失や点変異が見られる。しかし、長年にわたって引き起こされる HTLV-1 プロウイルスゲノムの動的な変化が、疾患発症にどう関わるのかについては不明である。ATL 細胞においては、感染 T 細胞はクローナルな増殖をきたすため、プロウイルスゲノム配列は同一であるが、HAM 患者のウイルス感染細胞はポリクローナルであることが知られており、プロウイルスゲノム配列が異なっている可能性がある。また、宿主ゲノム内に挿入されたプロウイルス内の機能性配列や宿主ゲノム構造の破壊により、宿主の遺伝子発現に関わるゲノム・エピゲノム機能を変化させる可能性があり、宿主ゲノムが動的に変化することも重要な因子と考えられる。このように、ウイルス・宿主のゲノム配列の変化が、疾患発症の上流となり、感染 T 細胞の機能的な変化の引き金となる可能性があるにもかかわらず、1 つの感染細胞レベルにおいてのゲノム変化が細胞に与える影響は、これまで調べられていない。申請者らが、本邦で先駆けて医学研究への応用の道を開いてきた技術であるナノポア LRS は 1 分子シーケンシングであり、人工膜に埋め込まれたポアタンパク質を DNA 分子が通過する際に引き起こされる電流の変化から、ディープラーニングによって通過した配列を解析するものである。よって、5-メチルシトシン(5-mC)や 5-ハイドロキシメチルシトシン(5-hmC)等の DNA 分子のメチル化修飾も検出可能である。さらに従来のショートリード型の次世代シーケンサーではたった 150bp 程度を読むだけなのに対して、20kbp 以上もの長い DNA 分子を連続して読むことができる。本研究では、20kbp 以上もの長鎖 DNA を解読できるナノポア LRS を用いて 9kbp の長さのウイルスおよび周辺のヒトゲノム配列を読み、1 細胞レベルで全長 HTLV-1 プロウイルスゲノム配列と、宿主への挿入部位を 1 細胞レベルで解析することで、HAM 発症に至る原因を探る。ナノポア LRS は DNA 塩基の修飾を検出することが可能であり、エピゲノム変化としての DNA 修飾を検出し宿主ゲノム機能へ与える影響を明らかにする。希少疾患である HAM は多数の臨床検体を得ることが困難であるが、本研究は長年 HTLV-1 関連疾患患者の臨床研究に携わってきた医師・研究者との連携による患者レジストリに蓄積された 600 人以上の検体を利用可能である。これにより、宿主および HTLV-1 プロウイルスゲノム配列の動的な変化を細胞ごとに HTLV-1 の発症ハイリスク系統を明らかにし、HAM 疾患に至る過程を解明する。

2. 研究の計画

(1) ナノポア LRS 解析系の構築と感染細胞株における解析評価

- ① PromethION P2soloシーケンサーを設置し、GPUコンピューターを用いたシーケンシング解析系を構築する
- ② 最適なガイドRNA配列を決定し、HTLV-1感染細胞株であるTL-0m1及びMT2を用いたCas9エンリッチメント実験の最適化を行う。

(2) ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-1)感染者の末梢血単核細胞(PBMC)の解析

- ① HAM患者5例のPBMC由来DNAを用いたロングリードデータを取得し、ウイルス挿入部位の解析を行う
- ② HAM患者の感染細胞をFACSにより濃縮し、Cas9エンリッチメント解析を行う。

3. 研究の成果

(1) ナノポア LRS 解析系の構築と感染細胞株における解析評価

① HAM特異点機な一塩基多型を3種類、ATL特異点機な一塩基多型を5種類見出ししており、これらを評価しながら、データベース内で多型の見られる箇所を含まないようにガイドRNAを作成し、Cas9の切断効率を比較し、最も効率の良いガイドRNA配列を決定した。配列は特許申請を行う予定である。P2solo PromethIONシークエンサーの設置を行い、感染細胞株による予備実験では十分なデータ量が取得できることを示した。特に、ナノポアLRSでは2023年にこれまでのR9.4タイプのシークエンスポアタンパク質からR10.4への完全移行が決定し、R9.4が販売中止となるため、R10.4でのCas9エンリッチメント実験を初めて構築することになったが、試薬や実験系の最適化を行うことで、遜色なくデータを取得することができることを示した（2024年8月22日のナノポアユーザーミーティングで発表予定）。

(2) ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染者の末梢血単核細胞(PBMC)の解析

① HTLV-1プロウイルスゲノム配列の挿入部位同定のため、比較的感染細胞の多いHAM患者5例のPBMC由来DNAを用いたロングリードデータの解析を行った。プロウイルスゲノム内部の塩基配列はクローン間でよく保たれており、新規の変異はほとんど認めなかったにも関わらず、構造多型は多様性に富み、検出されたうちの26%がdefectiveなタイプであった。しかも、宿主ゲノムを巻き込む複雑な構造多形も見られ、これまでに考えられてきた以上に複雑なゲノム構造をとっていると考えられた。また、ターゲットサイト重複は従来6塩基と考えられてきたが、26%で6塩基以外であり、中には100塩基を超える重複や欠失も見られた。

②(1)で構築したターゲット手法によりHTLV-1プロウイルスゲノム配列の濃縮手法の構築を行なったところ、挿入部位におけるメチル化の違いや配列の違いを検出することが可能であった。ショートリードシークエンサーを用いたRAISING-NGS法により取得したデータとの比較を行い、セントロメア配列のような繰り返し配列へのウイルスゲノム挿入でも同定することが可能であることを示した。現在、検体を増やして解析を進めている。

4. 研究の反省・考察

(1) ナノポア LRS 解析系の構築と感染細胞株における解析評価

① 概ね計画通りに解析系の構築ができた。感染株では考えられていたよりも多様な構造多型がみられることがわかり、ヒトにおける感染について新たな知見が得られる可能性を示していると考えられた。

(2) ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)感染者の末梢血単核細胞(PBMC)の解析

①患者細胞株の解析には感染細胞が必要であり、FACSによるソーティングを必要とした。長年にわたり、HTLV-1患者レポジトリに登録されている約600例のAC(200例)、HAM(300例)から感染細胞数の多いものを選定し解析を行っているが、すべての検体を解析するためにはエンリッチメントのさらなる効率化を目指す必要があると考えられた。

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

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	桐 蔭 横 浜 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	宇宙用途に向けた高効率・高信頼性ペロブスカイト太陽電池の作製		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①太陽電池、②結晶工学、③デバイス工学			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
柴 山 直 之	桐 蔭 横 浜 大 学 医 用 工 学 部	専 任 講 師	研究代表

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
池 上 和 志	桐 蔭 横 浜 大 学 医 用 工 学 部	教 授	論文作成
宮 坂 力	桐 蔭 横 浜 大 学 医 用 工 学 部	特 任 教 授	研究に対する助言
中 村 唯 我	高輝度光科学研究センター	研 究 員	放射線実験
宮 澤 優	宇宙航空研究開発機構	研 究 員	宇宙太陽電池に対する助言
金 谷 周 朔	宇宙航空研究開発機構	研 究 員	宇宙太陽電池に対する助言

宇宙用途に向けた高効率・高信頼性ペロブスカイト太陽電池の作製

1. 研究の目的

- (1) 人工衛星に向けた高信頼性、高効率な宇宙用ペロブスカイト太陽電池を開発する。
 - ①ペロブスカイト太陽電池を宇宙用に再開発し、宇宙空間での太陽光スペクトル下において、変換効率20%を達成する。
 - ②放射線耐久性試験および熱衝撃試験を行い、変換効率維持率 95%を達成する。
 - ③高耐久性かつ高効率なペロブスカイト太陽電池モジュールを実現する。

2. 研究の計画

- (1) ペロブスカイト太陽電池モジュールを作製し、高効率化を図ることが目的である。

最終的な目標としては、モジュール向けに開放端電圧等のパラメータを最適化し、モジュール変換効率 18%を達成することである。これを達成するための現状の課題として、今期は以下の2点に取り組んだ。特に、①に関して研究を行い、宇宙用ペロブスカイト太陽電池の実現に向けて、高効率化の指針を策定することを目指した。

①ラボサイズの面積において、ペロブスカイト太陽電池の変換効率を向上させる必要がある。そのために、ペロブスカイト結晶の材料組成の再探索を行う必要があり、今年度は、Aサイトに用いる1価の陽イオンであるCs、FA (Formamidinium) カチオンおよびXサイトに用いるハロゲンアニオンであるIとBrアニオンの比率を調整し、地上用よりも吸収端が短波長化した状態で、高効率なペロブスカイト太陽電池の作製を目指した。ここでは、Xサイトの比率がバンドギャップを大きく変化させるため、重要である。特に、Brの比率を増やすことで短波長化が可能となるものの、特定のI/Brの比率を用いた場合、ペロブスカイト太陽電池の特性が大きく低下することが報告されている (Seok et al., *Nano Letters*, 2013)。これは光照射により、ペロブスカイト結晶が複数の相に光相分離することが原因とされている (Hoke et al., *Chemical Science*, 2015)。そのため、I:Brの比率は85:15よりもIの比率を増やすことができないことが知られている。本計画では、光相分離を生じないIの比率を90:10に固定し、CsとFAカチオンの比率や結晶化のプロセスを最適化することで、高効率なペロブスカイト太陽電池の作製を目指した。

②デバイス内の作製と抵抗値の低減が必要である。現状では、デバイス内のペロブスカイト結晶層の面内均一性が悪いために内部抵抗が高くなり、電圧の低下が大きいと考えられる。そのため、デバイス形状の改善によって、デバイス内の内部抵抗を低減し、モジュール変換効率の向上を目指すことが目標である。

3. 研究の成果

- (1) 宇宙空間の太陽光スペクトルを模したソーラーシミュレータと同様の光量において、ペロブスカイト太陽電池 (面積: ラボサイズ) を測定し、変換効率 20.5%を達成した。ここでは、カチオン比率 (CsとFA) およびハロゲン比 (IとBr) の調整を行い、地上用太陽電池と比べ、吸収領域を短波長化させたペロブスカイト発電層 $\text{Cs}_{0.10}\text{FA}_{0.90}\text{Pb}(\text{I}_{0.90}\text{Br}_{0.10})_3$ の作製を行い、2023年度の目標であった変換効率20% (宇宙空間の太陽光スペクトル条件下と同等の光量) を計画前倒しで達成した。作製したペロブスカイト太陽電池には、耐久性の低下の原因となるMA (Methylamine) を含まず、高い耐久性が得られると見込まれる。我々は、作製したペロブスカイト太陽電池を用いて高温耐久性の調査を実施した。その結果、80℃までは変換効率が維持されることが明らかになった。一方で、目標である100℃では変換効率が大きく低下することが分かった。この原因としては、正孔輸送層に用いている低分子p型有機半導体 spiro-OmeTAD の影響であると考えられる。これらの結果は、論文投稿を行っており、査読中である。また、2024年度の計画である耐久性試験を先行して行っている。作製したペロ

ブスカイト太陽電池を封止し、X線照射放射線試験などに取り組んでいる。

- (2) 宇宙放射線に対する予備調査として、大型放射光施設 SPring-8 においてペロブスカイト太陽電池に放射線の照射試験を行った。その結果、X線に対して、組成を最適化したペロブスカイト結晶は耐久性があることが分かった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 計画よりも研究の進捗が早く、2024 年度に取り組む予定であった耐久性などの試験に先行して着手することができた。正孔輸送材料が課題であることが明らかになった。耐久性試験をクリアするために、ポリマー系の正孔輸送材料等の検討を行い、耐久性の確保を目指す。それにより、2024 年度の計画を早期に達成することを目指す。

一方で、課題としては、多数の査読付き論文を発表する予定であったが、現在 2 報の出版にとどまっている。現在、本助成の支援を受けた 4 報の論文が査読中であるため、これらの対応を行うことで、研究成果を学界にも認められた形で対外的にもアピールしていくことを目指す。

本年度の成果として、キヤノン株式会社との共同発表を行うことができた。この成果は、日経新聞 1 面（2024 年 6 月 17 日）に取り上げられた。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等

① Tatsuya Ohsawa*, Naoyuki Shibayama*, Nobuhiro Nakamura, Shigeto Tamura, Ai Hayakawa, Yohei Murayama, Kohei Makisumi, Michitaka Kitahara, Mizuki Takayama, Takashi Matsui, Atsushi Okuda, Yuiga Nakamura, Masashi Ikegami, Tsutomu Miyasaka, “A Phthalocyanine-Based Polycrystalline Interlayer Simultaneously Realizing Charge Collection and Ion Defect Passivation for Perovskite Solar Cells” Journal of Materials Chemistry A, Advance Article, <https://doi.org/10.1039/D4TA02491E>

② 柴山直之” ペロブスカイト太陽電池の最新動向 “，光技術コンタクト，2024，62，pp4-11.

- (2) 口頭発表

① Naoyuki Shibayama, The 11th International Conference on Molecular Electronics & Bioelectronics (M&BE11), Shimane, 2024. June 21. (ポスター発表)

- (3) 出版物

なし

学 校 名	光 産 業 創 成 大 学 院 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングー生体分子間相互作用の解明に立脚したタンパク質機能の理解ー		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①蛍光1分子イメージング ②生体分子間相互作用 ③反応速度論パラメーター ④全反射照明蛍光顕微鏡法 ⑤ゼロモード導波路 ⑥DNA修復タンパク質 ⑦DNA組換えタンパク質 ⑧イオンチャネル		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
横 田 浩 章	光産業創成大学院大学・ 光 産 業 創 成 研 究 科	准 教 授	研究代表者 総括・実験・データ処理・論文作成

○研究分担者

[illegible]

弱い生体分子間相互作用の蛍光 1 分子イメージング ー生体分子間相互作用の解明に立脚したタンパク質機能の理解ー

1. 研究の目的

(1) 本研究の背景

生命科学の研究現場において生体分子を生きたままイメージングできる蛍光顕微鏡はなくはないツールとなっている。とりわけ、蛍光標識した生体分子 1 分子を直視できる蛍光 1 分子イメージングは、個々の生体分子の運動・相互作用・多量体形成・構造変化などのダイナミクスを集団平均することなく実時間で観察できる強力な蛍光顕微鏡法である。

多くの生体分子間相互作用の蛍光 1 分子イメージングでは、あらかじめガラス基板にまばらに固定した生体分子 (DNA やタンパク質) と、溶液として後から導入した別の生体分子 (タンパク質やリガンド) の間の結合や解離などの相互作用を、後者の生体分子の輝点の蛍光強度変化の時系列として観察できる。

(2) 本研究の目的

本研究では、高濃度 (数 μM) の生体分子溶液存在下で蛍光 1 分子イメージングできる直径 100 nm のナノ開口アレイからなるゼロモード導波路の溶液貫流系や、弱い生体分子間相互作用の蛍光 1 分子イメージングをガラス基板に固定する生体分子の表面固定密度を高くすることで全反射照明蛍光顕微鏡法で可能とする系を確立し、DNA 修復や DNA 組換えに関わる DNA 結合タンパク質と DNA 間、および膜タンパク質であるイオンチャネルとそのリガンド間の 1 分子間相互作用を実時間観察して、その時系列から相互作用の基本的な反応速度論パラメータである結合速度定数 k_{on} 、解離速度定数 k_{off} 、解離定数 K_{d} や、何分子の生体分子が相互作用に関わっているのかを 1 分子数定量し、解明されていない相互作用とタンパク質機能発現の関係に迫ることを目的としている。

2. 研究の計画

本年度の研究計画を以下に示す。

(1) 蛍光 1 分子イメージング系の構築

①ゼロモード導波路溶液貫流系の構築

我々はゼロモード導波路を用いて、高濃度のタンパク質やリガンド溶液存在下で蛍光 1 分子イメージングを行ってきた。しかし、溶液交換はゼロモード導波路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。そこで、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、溶液貫流が可能なゼロモード導波路基板が一体となった試料セルを構築する。

②弱い生体分子間相互作用の蛍光 1 分子イメージングが可能な全反射照明蛍光顕微鏡法の構築

希薄濃度条件では結合イベントがほとんど起こらない弱い生体分子間相互作用の全反射照明蛍光顕微鏡法での観察を可能にする系を、ゼロモード導波路溶液貫流系の相補的な系として構築する。この系では、溶液中の生体分子の濃度を高くする代わりに、基板に固定する生体分子の表面密度を高くし相互作用の頻度を上げ、基板に固定した生体分子に結合解離する溶液中の生体分子の輝点のみを観察する戦略をとる。

(2) DNA 修復タンパク質の蛍光 1 分子イメージング

非六量体型スーパーファミリー 1 ヘリカーゼ UvrD は、大腸菌の DNA 修復で損傷やミスマッチ部位を切り出す役割を果たす。ほかの非六量体型ヘリカーゼと同様に DNA 巻き戻しの機能単位に関して相反する単量体モデルと多量体モデルが提唱されてきた。

本研究では、UvrD 希薄溶液条件では頻度が多くなかった多量体形成を、生体内の濃度に近い高濃度条件で明らかにする。また UvrD の DNA 巻き戻しを促進する MutL の蛍光 1 分子イメージングを、高濃度の MutL 存在下で行う。

①UvrD の高濃度条件下観察・MutL の蛍光標識

2023年度は、高濃度条件下でUvrDのDNAへの結合解離とDNA巻き戻しの観察を行う。また

MutLの発現・精製・蛍光標識を行う。

(3) DNA 相同組換えタンパク質の蛍光 1 分子イメージング

本研究では、大腸菌の相同組換えの中間体であるホリデイジャンクション DNA を成熟した組換え DNA にする過程に関与している RuvA、RuvB、RuvC の 3 つのタンパク質の DNA への結合解離と結合分子数定量的観察を行い、これらのタンパク質の相互作用と機能発現の関係を明らかにする。

①RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察・RuvAの蛍光標識

2023年度は、RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合を観察する。また、RuvAの蛍光標識を行う。

(4) 膜タンパク質イオンチャネル KcsA-リガンド間相互作用の蛍光 1 分子イメージング

本研究では膜タンパク質として、細菌由来の K⁺チャネルである KcsA チャネルを取り上げ、サソリ毒であるアジトキシン-2 との相互作用を観察する。X 線結晶構造が得られている KcsA チャネルは K⁺チャネルのモデルチャネルであり、毒素や薬との相互作用を 1 分子レベルで明らかにすることは生理的に重要な K⁺チャネルの特性を理解する上で重要である。

①KcsA 観察系の構築・KcsA 変異体の蛍光標識

2023 年度は、(1)で構築した系に脂質二重膜を導入し、KcsA 観察系の構築を行う。また、野生型 KcsA チャネルとアジトキシン-2 の相互作用はかなり弱いため、K_d 値が野生型よりは高いという報告がある 3 つの変異をもつ KcsA 変異体の発現・精製・蛍光標識を行う。

3. 研究の成果

(1) 蛍光 1 分子イメージング系の構築

①ゼロモード導波路溶液貫流系の構築

ゼロモード導波路を用いて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、溶液貫流が可能なゼロモード導波路基板が一体となった試料セルを構築した。具体的には、全反射照明蛍光顕微鏡法の溶液貫流系で用いている試料セルの対物レンズに接する底面のカバーガラスの代わりに、レーザー加工で直径5 mmの穴をあけたガラス基板や、直径5 mmの穴があいたシム板（機械製作などにおいて隙間などを埋めたりする高さ調整のために用いられる金属製のプレート）を用い、その穴にドーナツ型の両面テープでゼロモード導波路基板を固定して構築した。

②弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングが可能な全反射照明蛍光顕微鏡法の構築

ゼロモード導波路溶液貫流系の相補的な系として、希薄濃度条件では結合イベントがほとんど起こらない弱い生体分子間相互作用の全反射照明蛍光顕微鏡法での観察を可能にする系を、以下の(4)-②で述べるイオンチャネルとリガンドとの1分子間相互作用の観察系で実証した。この系では、溶液中の生体分子の濃度を高くする代わりに、基板に固定する生体分子（イオンチャネル）の表面密度を高くし相互作用の頻度を上げた。

(2) DNA 修復タンパク質の蛍光 1 分子イメージング

①UvrDの高濃度条件下観察・MutLの蛍光標識

ゼロモード導波路を用いて全反射照明蛍光顕微鏡法では観察が難しい数10 nMのUvrD存在下でのUvrD-DNA間相互作用とDNA巻き戻し完了を蛍光1分子イメージングした。またUvrDのDNA巻き戻しを促進するMutLの蛍光1分子イメージングを行うことを目的に、MutLの発現・精製・蛍光標識を行った。

(3) DNA 相同組換えタンパク質の蛍光 1 分子イメージング

①RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察・RuvAの蛍光標識

RuvAとRuvBの発現・精製・蛍光標識とRuvCの発現、ホリデイジャンクションDNAの作製を行った。野生型RuvAにはCys残基を1つもつが蛍光標識されないため、N末に別のCys残基を挿入した。野生型RuvBにはCys残基がないため、S39Cの変異やN末にCys残基を挿入した。精製したRuvAとRuvBのDNA結合やDNA巻き戻し活性はゲルシフトアッセイによって確認した。そして、RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察をゼロモード導波路を用いて行った。

②RuvAのホリデイジャンクションDNAとの相互作用の観察

当初の計画に先んじて、蛍光標識したRuvAの希薄溶液条件下（数nM）にて全反射照明蛍

光顕微鏡法を用いて、RuvAとガラス基板にまばらに固定したホリデイジャンクションDNAとの結合解離を蛍光1分子イメージングした。

(4) 膜タンパク質イオンチャネル KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

① KcsA観察系の構築・KcsA変異体の蛍光標識

チャネルのポア領域にあるアミノ酸のうちアジトキシン-2との親和性を上昇させる3つの変異をもつKcsA変異体の発現・精製・蛍光標識を行った。この変異体にはビオチン化タグも挿入しており、基板表面固定のためのビオチン化も行っている。

② KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

このKcsA変異体をアビジン-ビオチン相互作用によって脂質二重膜に包囲された状態でガラス基板上に固定し、蛍光標識したリガンドとの相互作用を観察できる系の構築を行った。さらに、ガラス基板表面にKcsA変異体を大量に固定した全反射照明蛍光顕微鏡法の系（(1)-(2)で先述）とゼロモード導波路の系で、蛍光標識アジトキシン-2との相互作用の蛍光1分子イメージングに当初の計画に先んじて取り組んだ。

4. 研究の反省・考察

(1) 蛍光1分子イメージング系の構築

① ゼロモード導波路溶液貫流系の構築

ゼロモード導波路の試料セルに用いるために行ったガラス基板の穴あけはレーザー加工で行ったが、ガラス基板はクラックが入りやすく割れやすい。また穴をあけたガラス基板にはタンパク質の非特異吸着を抑制するために表面修飾が必要である。一方、シム板は金属製のため強度が強く、DNAやタンパク質が非特異吸着しないことを見出した。これらの2つの特性から、シム板のほうが使い勝手がよいことがわかった。

② 弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージングが可能な全反射照明蛍光顕微鏡法の構築

弱い生体分子間相互作用の全反射照明蛍光顕微鏡法での観察を実証したが、効率的な定量解析に向けて、画像解析プログラムが必要である。

(2) DNA 修復タンパク質の蛍光1分子イメージング

① UvrDの高濃度条件下観察・MutLの蛍光標識

ゼロモード導波路を用いて、より高濃度条件下でUvrD-DNA間相互作用の観察を行える道筋がついた。MutLの発現・精製・蛍光標識を行ったが、MutLに複数あるCys残基のどれに標識されているのかは不明である。より精度の高い定量的な解析に向けて、単一の特異的標識を進める必要がある。

(3) DNA 相同組換えタンパク質の蛍光1分子イメージング

① RuvA-ホリデイジャンクションDNAへのRuvBの結合の観察・RuvAの蛍光標識

RuvAとRuvBの活性のある状態での蛍光標識を行ったが、蛍光標識率が20%程度と高くなかった。RuvAとRuvBの多量体の解析のためには、より高い蛍光標識率を達成する条件検討が必要であると考えている。

② RuvAのホリデイジャンクションDNAとの相互作用の観察

当初の予想通り、蛍光標識したRuvAの希薄溶液条件下にて全反射照明蛍光顕微鏡法を用いて、RuvAとホリデイジャンクションDNAへの結合を観察することができたことから、RuvAのホリデイジャンクションDNAへのアフィニティがかなり高いことがわかった。

(4) 膜タンパク質イオンチャネル KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

① KcsA観察系の構築・KcsA変異体の蛍光標識

全反射照明蛍光顕微鏡法およびゼロモード導波路を用いた系で脂質膜が基板上に存在していることは、蛍光標識脂質を少量混合した系で確認できた。一方、固定したKcsAの多量体の状態は未確認のため、KcsAに標識した蛍光1分子の褪色の段階数を定量するなどして確認していく必要がある。

② KcsA-リガンド間相互作用の蛍光1分子イメージング

全反射照明蛍光顕微鏡法系において、KcsAとアジトキシン-2の相互作用を蛍光1分子イメージングできたが、表面に固定する生体分子の適度な濃度条件の絞り込みが必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①横田浩章：弱い生体分子間相互作用の蛍光1分子イメージング 第19回バイオオプティクス研究会 大濱信泉記念館（石垣市）・オンライン併催 2024年3月（招待講演）

(3) 出版物

なし

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公共心 ②ソーシャル・キャピタル ③仮想評価 ④NIMBY ⑤戦略的な不均衡発展理論		

○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
渋 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）から令和 3 年（第 11 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) 2023 年度は、2022 年度に引き続き、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、打田委千弘、洪澤博幸氏が中心になり議論の整理を行う。また、アンケート調査地点（沖縄県伊平屋村）に関する事前調査を行う。
- 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。上山仁恵氏、島袋伊津子氏が中心に進める。

3. 研究の成果

(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議論を進めており、Jackson(2020)においてソーシャル・キャピタルをネットワーク位相図として分類した方法が有効であることを確認している。また、2023 年 11 月に開催した鹿児島ワークショップ（愛知大学経営総合科学研究所等が共催）において、竹田陽介氏、小巻泰之氏とも報告を行った。また、鹿児島ワークショップ開催期間中には情報共有を行った。沖縄県系移民を中心としたソーシャル・キャピタルの規定要因についても継続的に議論を行った。

(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、打田委千弘、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、2023 年 11 月に開催した鹿児島ワークショップでも情報共有を行った。また、沖縄県伊平屋村でアンケート調査を実施すべく準備を行った。

(3) 個票データ班：『沖縄県民意識調査』の個票データの整理、住民の居住地域に関する『国勢調査』等の町丁目毎のデータ整理を行った。また、2023 年 11 月に開催した鹿児島ワークショップにおいて、打田委千弘、竹田陽介氏、島袋伊津子氏、上山仁恵氏の連名で最新の『沖縄県民意識調査』（令和 3 年：第 11 回調査）を用いた分析結果を報告した。

(4) その他：沖縄のソーシャル・キャピタルと公共心との関係について『沖縄県民意識調査』個票データを用いた暫定的な分析結果を、2023 年 11 月に開催された沖縄県事業承継啓発月間「地域の活動をつなぐ事業承継ー地域課題の解決と企業の成長に繋げる M&Aー」トークセッションにおいて紹介した。また、登壇者である有限会社池田食品瑞慶覧宏至氏（代表取締役社長）、上原酒造株式会社上原長榮氏（現顧問、元代表取締役社長）、株式会社レイメイコンピュータ比嘉徹氏（代表取締役会長）からもソーシャル・キャピタルの重要性について、ヒアリングを行った。

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・キャピタルと公共心に関するヒアリング調査は、沖縄県系移民に関する調査や中小企業の現経営者・後継者に対して継続的に実施した。
- ② 最新（令和 3 年：第 11 回調査）の『沖縄県民意識調査』個票データを用いたソーシャル・キャピタルと公共心との関係については、暫定的ではあるが一定の結果を導くことが出来た。（2023 年 11 月の鹿児島ワークショップで報告）
- ③ ソーシャル・キャピタルの規定要因等に関する理論モデルと実証モデルとの接合については、2024 年度中の中心的な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、沖縄県伊平屋村で実施に向けて調査を進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Yasuyuki Komaki, “Why is the forecast error of quarterly GDP in Japan so large? - From an international comparison of quarterly GDP forecast situation” ***Japan and the World Economy***, 66, issue C, 2023年6月

(2) 口頭発表

- ①打田委千弘、竹田陽介、島袋伊津子、上山仁恵、「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』を用いた実証」、鹿児島ワークショップ（愛知大学経営総合科学研究所他）、2023年11月5日
- ②竹田陽介、“How fair this spot? Evidence from structural estimates of the wage Phillips relation” (with Shingo Umino)、鹿児島ワークショップ（愛知大学経営総合科学研究所他）、2023年11月4日
- ③小巻泰之、「市町村の定住・移住施策における政策評価とその課題」、鹿児島ワークショップ（愛知大学経営総合科学研究所他）、2023年11月5日

(3) 出版物

なし

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	中 部 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①ゲノム編集 ②染色体再編成 ③染色体逆位 ④遺伝子改変マウス ⑤相同組み換え ⑥がん ⑦RecQヘリカーゼ		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 田 悟	実験動物教育研究センター	講 師	研究の総括・マウスの系統維持および解析

○研究分担者

[illegible]

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。

本計画では、これまでの成果 (*Cell Rep* 2018, *Sci Rep* 2019) をもとに、

(1) 相同組換え効率が向上する目的でゲノム安定性制御分子を遺伝的に改変した *Recq15^{em1Cu}* を用いたゲノム編集により複雑な染色体再編成 (CCRs) の誘導と解析を進め、本手法が有効に機能することを確認する。

(2) 本手法をベースとした高精度に染色体再編成を誘導する新手法の確立に取り組み、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}* を用いたクロモソ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 を高精度かつ効率良く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。

① CCRs を誘導する CRISPR/Cas9 系の設計

本研究では DNA 修復の過程で

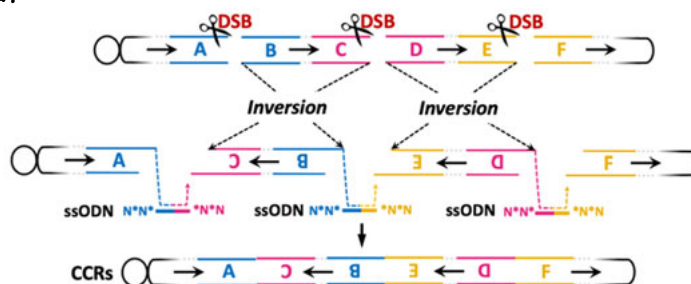
Rad51 (HDR 因子) を分解する

Recq15 に変異を導入した *Recq15*

em1Cu に対して高精度に意図した 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 (一本鎖オリゴ)

を 3 つ設計、受精卵に対して電気穿孔法を用いて狙った位置に CCRs を誘導する。



② CCRs の遺伝子型検査と解析

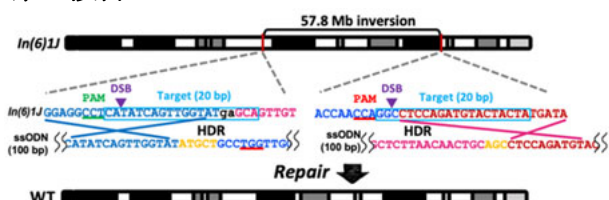
胚盤胞、産仔 (F0 世代) の遺伝子型検査は、① PCR 法、② サンガーシーケンスにより検証する。また、複数の DSB はゲノム不安定性を誘導し細胞死をもたらすため、胚盤胞までの発生率を観察する。

(2) *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 *In(6)1J* を修復する CRISPR/Cas 系の設計

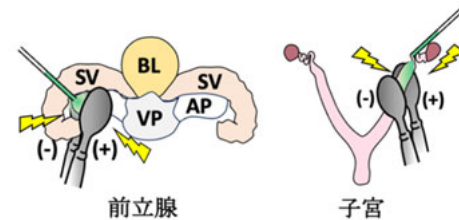
正確かつ高効率に染色体再編成を誘導する新手法を確立するために、本計画では従来報告にない長さとなる 57.8 Mb の巨大な逆位 *In(6)1J* の修復を標的とする。この様な広範囲な人工逆位修復が可能になれば、染色体異常によって発症する多様な癌疾患を修復する基盤を構築できる。標的 guide RNA (gRNA) 設計のために、Double-strand break (DSB) により生じた 2 箇所のゲノム断端が HDR を介して互いに反対方向に連結するように、必要なのり付け配列である ssODN を DNA 配列編集ソフト (ApE) で設計する。

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

23年度は遺伝子操作する対象を受精卵に加えてマウス生獣の前立腺および子宮に広げる。右図のようにマウスの前立腺（AP: anterior prostate）および子宮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}*マウスに施術し、*Recq15*の抑制による長い染色体領域の正確な修復を実施する。前立腺がんと子宮がんは頻繁に見られる病態であり、これらの症例では転座や逆位などの染色体異常がしばしば確認される。そのため、これら染色体異常を修復するプロトコルを開発することは、新たな治療法を開発する上で重要である。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。

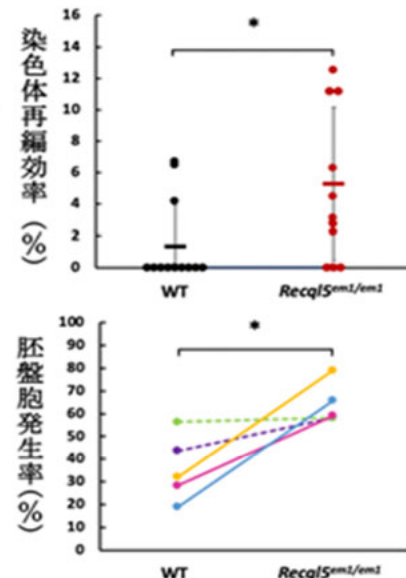


3. 研究の成果

(1) *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

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 CCR マウスにおける *Hmga2-Wif1* 融合タンパク質の影響を昨年度より長期観察したが、腫瘍の発生は確認されていない。この融合タンパク質が腫瘍促進に寄与していない理由として、マウスの系統に依存する生理的特性や遺伝的背景が考えられる。さらに、様々なゲノム遺伝子座における標的遺伝子改変の効率を評価した結果、*Recq15^{em1Cu}* マウスでは WT 対照群と比較して遺伝子改変の全体的な効率が顕著に向上していることが実証された（右図）。さらに、遺伝子改変時の *Recq15^{em1Cu}* マウスの胚盤胞期までの発生率が有意に増加していることが明らかになった。

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 “染色体断片化後再合成（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。本研究成果は米国遺伝学会（GSA: Genetics Society of America）が発行する国際誌「GENETICS」の 6 月号に掲載された。さらに、Featured Article として紹介され、カバーアートが表紙を飾った（右図）。



Iwata et al. *Genetics*, 2024 より改変引用



(2) *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

*Recq15^{em1Cu}*マウスを使用することで、前立腺および子宮組織における57.8 Mbに及ぶ染色体逆位*In(6)1J*を元のゲノム座位に戻すことに成功した。配列解析によって、修復後の染色体は元のゲノム座位と一致し、*Recq15*を用いた染色体再編成の有効性が確認された。その際、興味深いことに、下図のように一般的なindelは認められたが受精卵でしばしば観察されたchromoanasythesisのような現象は、本プロトコルでは観察されなかった。この結果は、前

立腺および子宮組織において染色体再編成の特異性が高いことを示唆しており、治療応用における安全性の観点から重要な意味を持つ。また、論文未発表であるため詳細なゲノム領域は割愛するが、大規模な逆位だけでなく、特定の転座の誘導にも成功している。

逆位修復後のゲノム配列

上流側

ssODN TTTAATATATGTGTGTTGGAGGCCTCATATCAGTTGGTATATGCTGCCTGGTTGGTGGTCCAGCGCCTGAGAGATCTTGGGGTTC
系統#L1 (子宮) TTTAATATATGTGTGTTGGAGGCCTCATA-----GCCTGGTTGGTGGTCCAGCGCCTGAGAGATCTTGGGGTTC

下流側

ssODN ACAGGTCCTCGAGAAGAAGAAGAGGCTCTTAACAACCTGCAGCCTCCAGATGTACTACTATGATAATCCAATCCTTAGTAGAG
系統#L1 (子宮) ACAGGTCCTCGAGAAGAAGAAGAGGCTCTTAACAACCTGC---CTCCAGATGTACTACTATGATAATCCAATCCTTAGTAGAG

TCATACCAACTG(insertion)

4. 研究の反省・考察

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

Recq15^{em1Cu} マウスを用いた新しいゲノム編集技術を開発し、マウスの受精卵で CCR や逆位を含むさまざまな種類の染色体再編成を効率的に誘導できることを示した。この技術には大きな可能性があるが、FoSTeS/MMBIR などの予期せぬ DSB 修復メカニズムも伴った。これらの問題を克服し、より高精度なゲノム編集を実現するためには、*Recq15* の変異改良が必要である。特に、転写ストレスを調節する *Recq15* KIX 変異 (Islam et al., 2010) や、RAD51 フィラメントを破壊しない *Recq15^{Δ652-674}* および *Recq15^{F666A}* 変異 (Schwendener et al., 2010) は、DSB 修復時の精度を向上させることで、染色体再編成の正確性と効率をさらに強化する可能性がある。

(2) *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

前立腺および子宮組織における 57.8 Mb に及ぶ染色体再編成の誘導に成功した。本技術のさらなる効率化に向けて、さまざまなゲノム領域を標的とした実験、その結果に基づく条件検討が必要である。本研究で開発された技術を使用することにより、簡便かつ迅速に特定の染色体異常を持つがん疾患モデルの作成も可能であることが示唆され、がん研究の効率と精度が飛躍的に向上することも期待される。

また、この技術のさらなる応用に向けて、開発が順調に進めば、次に染色体異常を修復する臨床応用への基盤形成へ発展させる。そのためには *Recq15* 遺伝子の機能低下の生体への影響を極力抑える必要がある。そこで染色体レベルの *Recq15* の改変を避けて、(i) 合成 siRNA を用いた *Recq15* 遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) により Rad51 の分解を制御、または (ii) *Recq15* 遺伝子の Dominant-negative 変異型 mRNA を導入して *Recq15* の機能を一過性に抑制する事により、染色体異常の正確な修復を試みる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Iwata S, Nagahara M, Iwamoto T. A *Recq15* mutant facilitates complex CRISPR/Cas9-mediated chromosomal engineering in mouse zygotes. *Genetics*, iyae054, 2024

(2) 口頭発表

① **岩田 悟**、長原美樹、岩本隆司、ゲノム安定性制御による複雑な染色体再編成 (Complex Chromosome Rearrangements: CCRs) の効率的誘導、第70回 日本実験動物学会総会、2023年5月24日

② **岩田 悟**、長原美樹、岩本隆司、*Recq15* mutantを用いた複雑な染色体再編成 (CCRs) の効率的誘導、日本遺伝学会 第95回大会、2023年9月7日

ポスター発表

① **岩田 悟**、長原美樹、岩本隆司、*Recq15*変異体はマウス受精卵における複雑な染色体改変を可能にする、日本ゲノム編集学会 第8回大会、2023年6月7日

(3) 出版物

なし

学 校 名	京 都 女 子 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	認知症予防を目的とした遠隔健康サポートプログラムの構築 ー京都・東山研究にポジティブヘルス理論を活用してー	研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①認知症予防 ②ポジティブ心理学的介入 ③社会的つながり ④人生の目的・意味 ⑤加齢の自己知覚 ⑥行動変容		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 原 昭 彦	京 都 女 子 大 学 学 部 京 都 女 子 大 学 学 部	教 授	研究の統括、心理社会的指標の測定、介入手法の開発

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 山 玲 子	京 都 女 子 大 学	副 学 長	生活習慣の測定、介入手法の開発
宮 脇 尚 志	京 都 女 子 大 学 学 部 京 都 女 子 大 学 学 部	教 授	医学的指標の測定、介入手法の開発
坂 手 誠 治	京 都 女 子 大 学 学 部 京 都 女 子 大 学 学 部	教 授	運動機能の測定
下 津 咲 絵	京 都 女 子 大 学 学 部 京 都 女 子 大 学 学 部	教 授	介入手法の開発
八 田 武 俊	京 都 女 子 大 学 学 部 京 都 女 子 大 学 学 部	教 授	心理社会的指標の測定、ウェルビーイングの測定
須 賀 英 道	龍 谷 大 学 短 期 大 学 部 科 龍 谷 大 学 短 期 大 学 部 科	教 授	ポジティブ心理学的介入法の開発
藤 原 和 美	東 邦 大 学 学 部 東 邦 大 学 学 部	教 授	心理社会的指標の測定、アドヒアランスの測定
重 森 健 太	関 西 福 祉 科 学 大 学 学 部 関 西 福 祉 科 学 大 学 学 部	教 授	生活習慣の測定、医学的指標の測定

認知症予防を目的とした遠隔健康サポートプログラムの構築 ー京都・東山研究にポジティブヘルス理論を活用してー

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

高齢社会に伴う認知症の増大によって、加齢に伴う認知機能の低下を予防するための方法を求める研究は多方面で取り組まれている。疫学研究で得られた数多くのエビデンスが示していることは、教育歴や複雑な仕事への従事だけでなく、知的活動や身体的活動が、加齢や病気と関連した神経病理学上の進行に対抗する予備力を与え、認知症を予防ということである。また、高血圧、糖尿病、肥満などの心血管危険因子を効果的に管理することで、軽度認知障害や認知症のリスクを低減することができ、特に、食事と栄養に関しては、地中海風の食事を定期的に摂取することが、アルツハイマー病のリスクを34～40%低減することが明らかにされている。また、社会的活動や社会的つながりが脳の健康を考えるうえで重要な要因であることが再認識されつつある。社会的活動に従事することやソーシャルネットワークの規模が、認知症の発症リスクを低下させたり、認知機能の低下を防止したりすることが明らかにされている。

しかし、運動習慣や食習慣が認知症の発症と関連すると分かっているにもかかわらず、運動習慣を確立したり、食習慣を改善したりすることは容易ではない。同様に、知的な活動に従事することや社会的な活動に参加することに積極的に関与したいと思っても、なかなか重い腰が上がらない高齢者も多数存在するのが現状である。これまでに、ポジティブな心理特性が、認知症や脳卒中の発症リスクを低減すること、虚血性心疾患の発症・死亡リスクを軽減させることや血糖値を低下させることが明らかにされてきた。病気に関する正しい知識を伝えるとともに、認知機能の健康増進に人々が前向きに取り組めるような態度を形成することを目的とした健康教育が求められている。このような取り組みの必要性はポジティブヘルスあるいはポジティブ疫学として議論されているものの、本邦では十分に検討されていない。

(2) 本研究の目的と意義

本研究では、ポジティブ心理学的な観点から、新たな認知症予防のあり方について検証することを目的として、以下のことを明らかにする。①ポジティブな心理特性を強化することにより、健康増進行動が変容しやすくなるのかを検証する。②他者との交流が制限されている状況下において、情報通信技術を活用した介入が認知機能の低下を防止するのかを検証する。身体的活動や知的活動には他者の存在が重要な役割を果たしており、個々人の活動に対する動機づけを高めるだけでなく、ソーシャルサポートとしても機能している。超高齢社会においては、独居の高齢者や、歩行機能の障害によって外出することを断念せざるを得ない高齢者が増加することが予測される。オンライン上で他者と種々の活動を実践できるしくみを本邦でも早急に構築しなければならない。他者との交流が制限されている状況下において、健康増進行動の変容に寄与する介入方法を開発することが本研究の最終的な目標である。

2. 研究の計画

(1) 研究方法

本研究は、オンラインをベースとした高齢者の認知機能の維持を目的とした介入手法の有効性を検証することを目的としている。第一段階としては、これらの生活習慣要因および心理社会的要因を調整したうえでも、ポジティブ心理学的要因が健康行動や認知機能と関連するかを検証する。第二段階では第一段階で関連性が認められたポジティブ心理学的要因を従来型の対面式の健康教育に組み込むことで介入効果を検証する。第三段階として、情報通信機器を用いたオンライン介入でも効果が得られるかを検証する。

<令和5年度>

【住民健診】

生活習慣（食習慣・運動習慣）、医学的要因（動脈硬化・サルコペニア・フレイル）、心理

社会的要因（知的活動、社会的つながり、ポジティブ心理学的要因）と認知機能との関連を横断的に検証すること、および、介入研究の対象者をスクリーニングすることを目的として住民健診を実施する。

＜対象者＞

地域在住の高齢者（65～85歳）150名

＜認知機能の測定＞

全般的認知機能（S-MMSE）、記憶（論理的記憶検査）、注意（D-CAT）、遂行機能（ストループ検査）に関する個別検査（NU-CAB）を実施した。

＜生活習慣・医学的指標の測定＞

①動脈硬化リスク因子およびMCIリスク因子に関わるマーカーを血液検査によって測定した。また、骨格筋量や健脚度といった筋骨格因子を測定した。

②食事摂取調査および運動習慣調査を実施した。

＜心理社会的指標の測定＞

①社会的つながりの範囲と程度に関する質問紙調査を実施した。

②ポジティブ心理学的要因として、欧米の先行研究で関連性が報告されている「人生の意味」「加齢の自己知覚」について標準化された尺度を用いて測定した。

③知的活動の程度を測定し調整変数として使用した。

【介入研究の準備】

＜介入プログラムの作成＞

申請者らがこれまでに実施してきた研究および国内外の先行研究の成果に基づいて認知機能の低下防止に寄与する健康教育プログラムを次の基準に沿って開発した。

＜オンライン介入プログラムの作成＞

タブレット型端末やスマートフォンで利用できるアプリケーションのβ版を作成した。

(2) 令和5年度の研究計画の履行状況

本研究の目的を達成するためには介入研究に参加する対象者を厳密に選定することが重要となる。令和5年度は、令和6年度に実施する介入研究に向けた準備段階であることは研究計画申請書に記載した通りである。介入研究の参加者をプールすることとベースライン時の測定を厳密かつ多角的に行うことを目的として住民健診を実施する計画を立てていた。令和5年5月8日に新型コロナウイルス感染症が5類感染症に移行した後に、具体的な研究の実施についての打ち合わせを京都市および東山区社会福祉協議会と行った経緯もあり、住民健診の実施時期が当初計画よりも遅くはなったが、ほぼ予定通りの内容を実施した。また、MCIを検出する簡易血液マーカーを解析の対象として加えることで、介入研究の精度を高めることとした。アミロイドβ等の蓄積を推定する血液成分を分析することで、神経病理学的リスク（高低）×認知機能状態（高低）の4群に分割できるようなる。このようなサブグループに対象者を分割することで、将来的には（本研究の3年目の介入研究において）、神経病理学的な徴候を調整したうえで、介入効果の検証を実施できるようになると考えている。

3. 研究の成果

(1) 社会的つながりと認知機能との関連性

高齢者の社会的つながりの高さや認知機能の維持とが関連する背景には認知予備力要因が関与しているのかを明らかにすることを目的としてデータの解析を行った。認知機能を測定するために、s-MMSE、論理的記憶検査、Money 道路図検査、言語流暢性検査、ストループ検査、D-CAT を行った。心理社会的変数として、認知予備力の指標として現代高齢者版余暇活動尺、社会的つながり指標として地域単位の健康関連ソーシャル・キャピタル指標を使用した。論理的記憶検査の遂行成績を目的変数、余暇活動を説明変数、性別、年齢、教育歴を調整変数にした重回帰分析を行ったところ、余暇活動のみに有意な関連が認められた（ $\beta = .290, p < .01$ ）。ソーシャル・キャピタル得点と論理的記憶検査の遂行成績との相関係数が有意であった（ $r = .231, p < .05$ ）ことと上述した重回帰分析の結果を踏まえ、論理的記憶検査とソーシャル・キャピタルとの関連性に余暇活動が媒介しているか検証した。Sobel 検定の結果、間接効果が有意であるとともに（ $Z = 3.683, p = .000$ ）、総合効果（ $\beta = .23, p < .01$ ）のみが有意であ

った。

(2) 加齢の自己知覚と認知機能との関連性

優秀な高齢者の認知機能の高さとポジティブな加齢の自己知覚が関連していることを検証することを目的とした。参加者の認知機能の遂行成績を各検査の標準値を基準として、1SD以上の成績高群とそれ以外の低群とに分割した。認知機能の成績群（高群／低群）を目的変数、加齢の自己知覚得点、社会的つながり得点を説明変数、年齢、性別、教育歴を調整変数としたロジスティック回帰分析を行ったところ、論理的記憶検査を目的変数とした場合に、加齢の自己知覚および社会的つながりが有意に正の関連のある変数であることが明らかとなった。加齢の自己知覚がポジティブな高齢者とそうでない高齢者とで、社会的なつながりが認知機能に関連する程度が異なるかを検証するために、加齢の自己知覚得点の中央値を基に高群（ポジティブな自己知覚群）と低群（ネガティブな自己知覚群）に層化し、それぞれの群ごとに、論理的記憶検査の成績群（高群／低群）を目的変数、社会的つながり得点を説明変数、年齢、性別、教育歴を調整変数としたロジスティック回帰分析を行ったところ、ネガティブな加齢の自己知覚群においてのみ、社会的つながりが論理的記憶の成績群と正の関連のある変数であることが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) 令和5年度に実施した研究における考察

- ① ソーシャル・キャピタルと論理的記憶検査との関連性が余暇活動によって完全に媒介されることが明らかになったことは、社会的につながることで自身が記憶機能を維持しているのではないと推察される。本研究の結果からは、社会的につながることで余暇活動の頻度が高くなり、その結果として記憶機能が維持されていたことが示唆される。社会的つながりが認知機能を高めるメカニズムとして、心理的要因が媒介していることが示唆されたことは本研究の進展に大きく貢献するものである。
- ② 論理的記憶検査が優秀な高齢者（スーパー・エイジャー）においても、加齢の自己知覚が肯定的であることや社会的なつながりが高いことが明らかにされた点は、本邦初の成果であり、学術的価値も高いと考えられる。また、加齢の自己知覚がポジティブでない高齢者においてのみ社会的つながりが関連していたことは興味深い。

(2) 研究実施における反省

本研究の当初計画では、集団健診だけでなく個別訪問による健診を実施することでサンプリングの幅を広げることを目標とし、集団健診に参加できない対象者については、保健センターや社会福祉協議会と連携して、家庭を訪問して健診を実施するとしていた。しかしながら、新型コロナウイルス感染症の5類感染症移行がなされた直後であったこともあり、令和5年度の研究では、研究対象者を大きく広げることが不可能であった。コロナ問題があったとはいえ、集団健診に参加できない対象者を標本に加えることができなかったことについては反省している。サンプリングの幅を広げることは科学的実証の価値を高めるためには重要なことであるため、令和6年度では、個別訪問等も実施できるような段取りを考えていきたい。

また、住民健診の開始時期が当初計画の9月から2月にずれてしまった点も反省しなければならない。計画通り住民健診を実施できていれば、研究成果の公表も実現できていたと思われる。しかしながら、京都市東山地域をフィールドとした本研究は、京都市や東山区社会福祉協議会の協力があってこそ実現できるものであり、当該自治体や団体の意向を無視して研究を進めることは難しいため、計画が遅延することはやむをえないものであった。

5. 研究発表

昨年度（令和6年2月29日と3月1日）に実施した住民健診等のデータ解析については、令和6年度中に学会で口頭発表をしたり、学会誌に論文として掲載したりする予定である。したがって、令和5年度については本研究によって得られたデータを研究発表としては公表できていない。

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

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	大 阪 工 業 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	排CO2ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築		研 究 分 野 環 境 科 学
キ ー ワ ー ド	①バイオ燃料、②微生物、③低炭素技術、④リサイクル、⑤微細藻類、⑥メタン発酵		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河 村 耕 史	大阪工業大学 工学部	准 教 授	研究総括・微細藻類の実験

○研究分担者

[illegible]

排 CO2 ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築

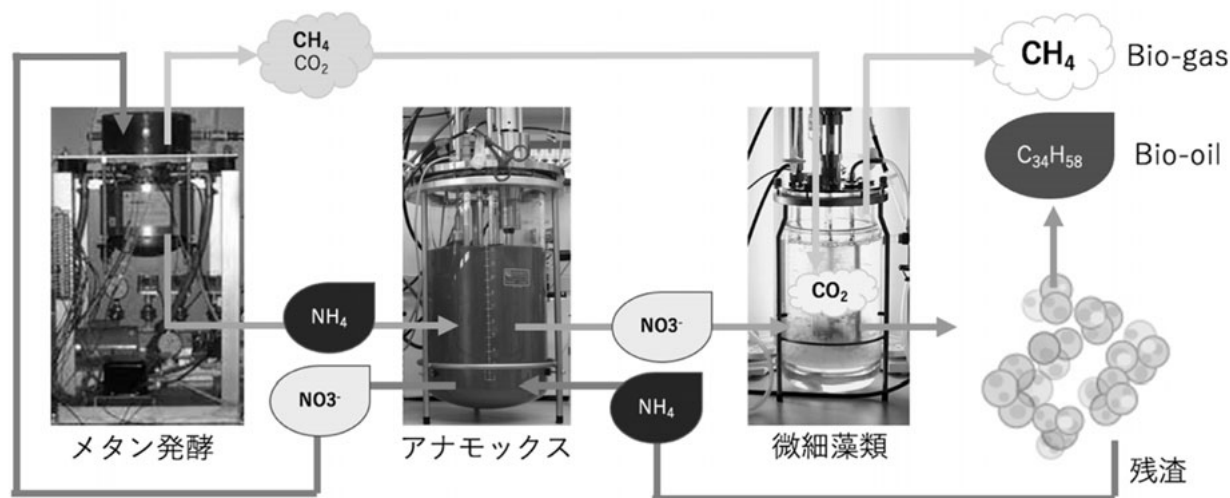
1. 研究の目的

日本の岸田総理は、2021 年 11 月にグラスゴーで開催された COP26（国連気候変動枠組条約第 26 回締約国会合）において、これから 2030 年までの期間を「勝負の 10 年」と位置づけ、全ての国に野心的な気候変動対策を呼びかけた。2050 年までに CO2 排出量を実質ゼロとする「チャレンジ・ゼロ」構想を国際公約として発表、2030 年までの数値目標として、CO2 排出量を 2013 年度比で 46%削減するとした。コロナ禍が収束した後の世界経済において、CO2 の排出削減技術はこれまで以上に大きな期待と役割を担うことが予測される。

本研究は、「藻類バイオ燃料」、「メタン発酵」、「アナモックス」という 3 つの環境バイオ技術を統合し、CO2 排出量ゼロのバイオエネルギー生産システムの構築を目指す。「藻類バイオ燃料」とは、微細藻類の光合成を利用し、CO2 を Bio-oil（油脂や炭化水素など）に変換する技術である。電気や水素に比べ、エネルギー密度が高く、輸送・貯蔵性に優れた液体燃料を創りだす点で優れている。しかしながら、藻類バイオ燃料の単位土地面積あたりのオイル生産性は、陸上植物に比べれば一桁高いものの、化石燃料の代替資源として利用するためには、さらに 5-10 倍程度の生産性向上が必要とされている（Energies 2019, 12: 1920）。

一方、「メタン発酵」技術はすでに実用化された技術であり、廃棄物からのエネルギー回収や減容化ができる技術として、社会的なニーズも年々高まっている（環境バイオテクノロジー学会誌 2022, 22: 53-59）。しかしながら、メタン発酵によって生じる Bio-gas には、約 60% を占めるメタンの他に約 40% の CO2 が含まれる。Bio-gas を天然ガスの代替燃料として利用するためには、メタン濃度を 90-95% まで精製する必要がある。薬品を利用した化学吸収法やアルカリ性水溶液による湿式吸着法が導入されているが、高温高压が必要であることや、大量の水が必要であることから、エネルギーコストの増大、設備の大型化が避けられない（J. Renew. Energy Smart Grid Tech. 2022, 17: 29-38.）。

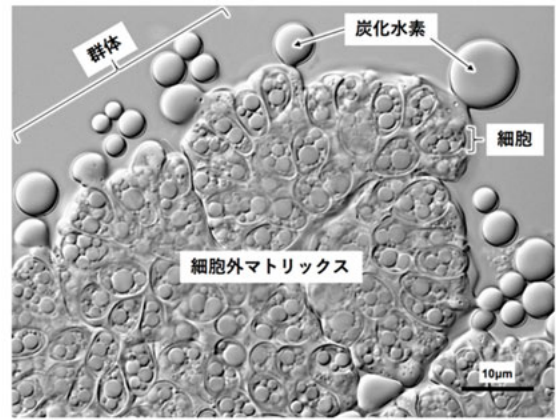
本研究は、「メタン発酵」によって生じる Bio-gas を「藻類バイオ燃料」を生産する培養槽に通気する方法で、CO2 を除去すると同時に Bio-oil に変換するシステムの構築を目標とした研究を行う。このシステムでは、Bio-oil 抽出後の残渣をメタン発酵槽に返送するループ構造を作る。これにより、理論的には全てのバイオマスをもしくは Bio-oil に変換できる。さらに、実施設の運営コスト削減と廃棄物の減容化を念頭に、メタン消化液で微細藻類を培養する技術の開発を並行して行う。このとき、有害なアンモニア態窒素を、無毒な硝酸態窒素に変換する「変換プラグ」として「アナモックス（嫌気性アンモニア酸化）」プロセスを利用する。これにより、異質な培養槽（メタン発酵＋藻類培養）を機能的に連結し、全体システムの物質循環構造を構築することを目指す。



2. 研究の計画

(1) 微細藻類株の選抜と育種、集積培養化

メタン発酵ガスと消化液の処理に適した微細藻類株の選抜と育種、集積培養化を行う。微細藻類は重油相当の炭化水素（C₃₄H₅₈）を高蓄積する緑藻 *Botryococcus braunii* を使う。*B. braunii* は他のオイル産生藻類には見られないユニークな特質を持つ微細藻類である：（１）炭化水素は、発熱量が高く、既存の石油精製施設を使って燃料化できる、（２）群体を形成し、細胞内ではなく細胞外に炭化水素を蓄積する（右図）、（３）対数増殖期に炭化水素の生産速度が最大化する（河村 2021 アグリバイオ 5: 49-52）。



B. braunii 顕微鏡画像. 群体をカバーガラスで押しつぶすと、細胞外マトリックスに蓄積していた炭化水素がしみだす様子

特質（２）は、牛からミルクを絞るように、微生物を生かしたままオイルだけ回収する「milking」を可能にしている（J. Appl. Phycol. 2021, 33: 785）。このような特質から、バイオ燃料の生産者として、*B. braunii* は最も有望な生物種の１つであり他に類をみない特質を持つ微生物といえる。しかしながら、自然環境中では生息数が少なく発見が難しい。これに対し、研究代表者である河村は、*B. braunii* を特異的に検出する環境 DNA 分析によって生息地を解明（Hirano, Kawamura et al. 2019. Sci. Rep. 9: 16974）、オイル蓄積によって浮上する性質を利用した野生株の簡易濃縮単離法を開発（Kawamura et al. 2020. J. Ecosyst. Ecogra. 10: 274）、それを用いて、これまで 800 株以上の野生株を国内外の自然湖沼から単離収集してきた。そして、前例のない規模で野生株のスクリーニングを行い、これまでの増殖速度の世界最速記録を更新する株（OIT-678 株）を発見した（Kawamura et al. 2021；業績欄）。本研究はこの野生株の大規模コレクションと高増殖株 OIT-678 株を使い、以下の方法で研究を行う。

①野生株のスクリーニングと集積培養

メタン発酵ガスを模した高濃度 CO₂（40%）条件下でスクリーニングを行い、適応した野生株を選抜、高濃度 CO₂ 条件下で集積培養を行い、高密度化させる（乾燥藻重 10g/L 以上）。その後、実際にメタン発酵槽から出るガスを通気しながら培養を行い、CO₂ の吸収速度、藻バイオマス生産速度、オイル生産速度を測定し、有用性を評価する。同様に、メタン消化液によるスクリーニング、選抜、集積培養、性能評価を行う。

②突然変異育種

高増殖株 OIT-678 株を使った突然変異育種を行い、メタン発酵ガスや消化液に適応した変異株の作出を行う。変異誘導法として、若狭湾エネルギー研究センターにおいて、重イオンビームを照射する方法を使う。重イオンビームを OIT-678 株に照射した後に、高濃度 CO₂ もしくはメタン消化液を使って耐性変異株を選抜する。選抜の際に、大量の変異細胞塊から有用変異細胞をスクリーニングするため、多検体の蛍光測定が可能なマルチプレートリーダーを予算計上した。

(2) メタン発酵

藻類バイオの抽出残渣をメタン発酵槽で高速に処理するため、発酵槽の小型化と高濃度メタン化を可能にする気相部構成を検討した。具体的には、泡沫充填による気相部混合特性をシミュレーションで検討しながら滞留時間確保と押し出し流れを両立できる装置構成を検討する。

(3) アナモックス

藻類バイオ残渣やメタン発酵消化液のアンモニア態窒素を硝酸態窒素に変換するためのアナモックスリアクターの高効率化を目的に、微量金属の添加効果を調べる。

3. 研究の成果

(1) 微細藻類株の選抜と育種、集積培養化

①野生株のスクリーニングと集積培養：メタン発酵ガスを模した高濃度 CO₂ (40%) 条件下でスクリーニングを行った結果、高増殖株 OIT-678 株を含む熱帯産株から高い耐性を持つ株が見つかった。これらの株は、未分解性有機物によって pH4 前後になるインドネシア熱帯泥炭湿地に由来する株であり、40%CO₂ 曝気条件で起こる培地酸性化に耐性があった。集積培養を試みた結果、1L 以上スケールでは世界で初めて 10g/L を超える高密度化に成功し、0.5g/L/day のバイオマス生産速度を達成した（業績 2-⑤）。さらに、京都の高層湿原から単離した株 OIT-1001 は、高密度化に必要な強光/高水温 38℃条件に耐性があることも発見した（業績 2-②）。

②突然変異育種：高増殖株 OIT-678 株と耐性株 OIT-1001 株を使った突然変異育種を行った。イオンビーム（従来の化学薬品や放射線に比べ、生体へのダメージが少なく、DNA に局所的に大きな変異を引き起こすため、有用な変異体を得られやすい）を照射し、変異を誘導した（若狭湾エネルギー研究センター）。その後、高濃度 CO₂ 条件、メタン消化液等のストレス条件下にて耐性変異株の選抜と集積化を進めている。さらに、2023 年度に購入した蛍光プレートリーダーを使い、低クロロフィル含量、巨大群体形成などの有用変異株を 200 株以上単離した。また、群体を単細胞化したうえで変異細胞を選抜するため、培地に糖類を高濃度に添加し浸透圧で単細胞を遊離させる手法を開発した（業績 2-④）。高頻度に転移する内在性トランスポゾン进行を特定し、生物学的変異誘導法としての有用性を示した（業績 2-①）。

(2) メタン発酵

気相部を泡沫で充填する新奇リアクタを設計、性能を評価した。泡沫を安定保持してガス循環を減らすことで、リアクタを押出し流れとし、出口メタン濃度の向上を実現した（業績 3-①②）。今後は、シミュレーションにより運転条件の最適化をはかりつつ、水素吸着ナノ材料の探索・検証を行う。また、最新の CO₂ 削減技術に関する国内外の知見をレビューした著書を複数執筆、本研究プロジェクトの新規性や社会実装の可能性についての知見を深めた（業績 1-①②③）。

(3) アナモックス

異なるカリウム濃度において連続運転を行い、窒素除去速度などのリアクター性能を評価した結果、カリウムの添加によって菌体が増加し、窒素除去速度が高まることが示された（業績 3-④）。

4. 研究の反省・考察

2023 年度の成果から、10g/L の高密度状態で、これまで微細藻類で報告された中でもトップクラスの高いオイル生産性 (250mg/L/day) を実現できることがわかった。2024 年度は高密度状態を維持しながら連続培養するためのリアクタ（送液ポンプ、外部水循環装置、pH モニター等から構成）を製作し、培養槽の安定化とさらなる性能向上を目指す。そして、メタン発酵槽からのバイオガス供給速度と、藻類培養槽による CO₂ の除去速度とのバランスを定量的に評価する。また、高密度状態では光が増殖を制限する要因になっているため、2023 年度に作出した低クロロフィル変異株や巨大群体形成変異株がさらなる高密度化に有用であるとの仮説を検証する。

今後は、2023 年度に集積培養した *B. braunii* を使い、オイル抽出後の残渣をメタン発酵させてバイオガスを創る方法を検討する。このとき、研究分担者である古崎が開発した「エタノール化前処理」による高負荷運転を実施し、それを実現する生物学的なメカニズムの解明を行う。さらに、藻類バイオマス残渣のメタン発酵と、メタン消化液による藻類培養において、それぞれ高濃度の NH₄⁺がメタン発酵あるいは藻類培養を阻害する可能性が指摘されている (Water Sci. Technol., 2020, 82: 1070)。高濃度 NH₄⁺は培地のアルカリ化を引き起こし、微生物反応を阻害するためである。そこで、この NH₄⁺を NO₃⁻に変換して無毒化するための「変換プラグ」として、アナモックスプロセスを利用する研究を進める必要がある。

5. 研究発表

(1) 出版物

- ① 新井博之, 古崎康哲, 他 30 名 : 独立栄養微生物による CO₂ 資源化技術, シーエムシー出版, pp. 109-123 (2023. 12. 13) ISBN978-4-7813-1756-4
- ② 関根泰, 古崎康哲, 他 39 名 : メタネーションとグリーン水素の最新動向, シーエムシー出版, pp. 105-117 (2023. 10. 31) ISBN978-4-7813-1754-0
- ③ 橋崎克雄, 古崎康哲, 他 83 名 : CO₂ の有効利用技術の開発, 技術情報協会, pp. 366-375 (2023. 7) ISBN978-4-86104-972-9

(2) 国際学会発表

- ① Koji Kawamura, Naoya Komatsubara, Shigeru Okada. BoTIPseq: Transposon-insertion polymorphism sequencing technique for *Botryococcus braunii*. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA 01A. 02
- ② Shotaro Omae, Shogo Imai, Ryota Sueyoshi, Koji Kawamura. Bioprospecting of the oil-producing microalga *Botryococcus braunii*: Isolation of high temperature stress tolerant strains. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P1. 039
- ③ Ryusei Miyako, Koji Kawamura. Antibiotics and their optimal concentrations for axenic culture of freshwater microalga *Botryococcus braunii*. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P1. 060
- ④ Sho Matsubara, Keito Yasuda, Koji Kawamura. Survivorship and regrowth potential of single cells released from a colony of *Botryococcus braunii*. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 12 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P1. 040
- ⑤ Masaya Hashimoto, Sho Matsubara, Haruki Fujisaki, Koji Kawamura. High-density continuous culture of *Botryococcus braunii* under strong light conditions. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts 2023. 6. 13 Waikoloa Beach, Hawaii, USA P2. 045

(3) 国内学会発表

- ① 丁含含、古崎康哲 : 泡沫充填型リアクタを用いた高負荷バイオメタネーションの連続運転, 第 58 回日本水環境学会年会講演プログラム, p. 240 (2024. 3. 7)
- ② 丁含含、古崎康哲 : 泡沫充填型リアクタを用いたバイオメタネーション, 2023 年度関西土木工学交流発表会, 口頭発表 (2023. 11. 2)
- ③ 守岡歩、笠原伸介、栗田貴宣 : 窒素固定菌の活性に及ぼす pH の影響. 第 58 回日本水環境学会 P-E-03 (2024. 3. 7)
- ④ 飯田陽、栗田貴宣、笠原伸介、金田一智規 : 海洋性アナモックス細菌の連続培養における微量元素制限の影響第 58 回日本水環境学会 2-E-10-1 (2024. 3. 7)

(4)

学会誌など

なし

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	関 西 医 科 大 学	研究所名等	附属生命医学研究所	
研 究 課 題	尿路上皮がん間質細胞による新規がん悪性化機構の 解明		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①尿路上皮がん ②間質細胞 ③発癌モデルマウス ④一細胞解析			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 本 毅 治	附 属 生 命 医 学 研 究 所	学長特命教授	研究の統括、動物実験

○研究分担者

[illegible]

尿路上皮がん間質細胞による新規がん悪性化機構の解明

1. 研究の目的

膀胱がんは泌尿器系で最もよく見られるがんであり、2020年には世界で57万3千人が新規に膀胱がんと診断され、21万人が膀胱がんで亡くなっている。膀胱がんの90%以上が尿路上皮がんの組織型を示し、治療にはシスプラチン・ゲムシタビンなどの細胞傷害性抗がん剤が長らく使用されてきたが、治療成績は芳しくなかった。近年、免疫制御薬や分子標的治療薬が尿路上皮がんに対して適用され、一部には治療成績の改善がみられたが、特定の変異を持つ一部の患者にしか使用出来ないこと、がんの分子サブタイプによっては効果が限られること、一部の薬剤では細胞傷害性抗がん剤と同頻度で有害事象が報告されるなど、未だに多くの制限があるため、既存治療薬とは作用機序の異なる新たな治療標的が切望されている。

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は細胞の低酸素応答に関わる主要な転写因子であり、尿路上皮がんの悪性化にも関わるが、HIF-1自身を標的としたがん治療薬は正常細胞にも影響を及ぼすため開発が困難と考えられている。研究代表者の坂本は、浸潤性のがん細胞、腫瘍関連線維芽細胞、活性化マクロファージなど限られた細胞でのみでHIF-1を活性化させる分子としてMint3を同定した(Sakamoto T et al., JBC, 2009)。Mint3の尿路上皮がんでの役割を明らかにするため、研究代表者の坂本および研究分担者の木下、蔦、田中らは、先行研究において膀胱がん117例、上部尿路上皮がん207例の2つの尿路上皮がんコホートの組織マイクロアレイを用いて、Mint3の発現と臨床病理スコアとの解析を行った。その結果、尿路上皮がんのがん細胞におけるMint3は予後不良因子であることが明らかとなり、さらに細胞株を用いた機能解析から、Mint3が尿路上皮がんの分子サブタイプによらず治療標的となり得ることを明らかとした(Ikeda J et al., Clin Trans Discov, 2023)。この先行研究では、尿路上皮がんの組織マイクロアレイでMint3のがん細胞における発現と予後の相関解析を行ったが、一部のがんではがん細胞だけでなく、間質細胞においてもMint3の高発現が認められた。そこで、がん間質細胞でのMint3の発現と予後の相関解析を行ったところ、間質細胞でのMint3発現も膀胱がん、尿路上皮がんの予後不良と相関することを見出した。組織切片での細胞の形態から、少なくともがん間質の線維芽細胞の一部でMint3が発現していると推察されるが、他の間質細胞でMint3が発現するかなど詳細は不明であり、また尿路上皮がんのがん間質での役割や治療標的としての有用性は不明である。

そこで本研究では、間質細胞の複雑な細胞間相互作用を理解するため新たに情報解析の専門家の日笠を研究分担者に加え、新たな尿路上皮がん治療薬開発のため、3年間の研究期間で、尿路上皮がんのがん間質細胞におけるMint3の役割と治療標的としてのMint3の有用性の解明を目指す。

2. 研究の計画

(1) Mint3発現間質細胞の同定と、Mint3により発現制御される遺伝子の解明

①尿路上皮がん臨床検体における間質Mint3の発現と病理スコア、マーカー分子の発現、臨床情報との相関解析

尿路上皮がん組織マイクロアレイを用いてMint3およびがん関連分子の免疫染色を行い、各マーカーの発現と臨床情報について統計解析を行う。

②間質細胞マーカーを用いた、尿路上皮がん臨床検体での間質Mint3発現細胞の同定
尿路上皮がん組織切片でMint3および間質細胞マーカー分子の免疫染色を行い、間質におけるMint3発現細胞を同定する。

③尿路上皮がん手術検体からのMint3発現間質細胞の単離・培養法の確立

上述の実験で同定した間質細胞について、尿路上皮がんの腫瘍検体から細胞を単離し、培養する実験系を確立する。

④手術検体から単離したMint3発現間質細胞に対するMint3ノックダウン後のトランスクリプトーム解析

手術検体から単離したMint3発現間質細胞を培養し、siRNAを用いてMint3の発現をノックダウンさせ、RNAを抽出し、RNA-seqを行い、トランスクリプトームデータを取得する。

(2) 膀胱癌発癌マウスモデルで、全身での Mint3 欠損が膀胱癌進展に及ぼす影響の解明と、間質細胞特異的 Mint3 欠損マウスの作製

① ヒト尿路上皮がん病理検体で同定したMint3を発現する間質細胞 (e. g. 線維芽細胞) に特異的にMint3を欠損させたマウスの作製

同定したMint3発現間質細胞特異的にCreを発現するマウスを購入し、Mint3 floxマウスと交配を行い、間質細胞特異的Mint3欠損マウスを作製する。

② conventional Mint3欠損マウスに対するN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 誘導膀胱がん発癌モデル解析

野生型およびMint3欠損マウスに対し自由飲水で0.05% BBNを12週間投与し、BBN投与後8週間後に膀胱がんを回収し、組織学解析を行う。

3. 研究の成果

(1) Mint3 発現間質細胞の同定と、Mint3 により発現制御される遺伝子の解明

① 尿路上皮がん臨床検体における間質Mint3の発現と病理スコア、マーカー分子の発現、臨床情報との相関解析

組織マイクロアレイを用いて膀胱がん207例の間質におけるMint3発現と病理スコアとの相関を解析した結果、Mint3発現は悪性度ならびにpTステージと有意に正の相関を示した。また、間質Mint3発現は、上皮のCk14, FGFR, GATA3, Mint3と正に相関する一方、PD-L1発現とは相関を示さなかった。

② 間質細胞マーカーを用いた、尿路上皮がん臨床検体での間質Mint3発現細胞の同定

尿路上皮がん臨床検体を用いてMint3と細胞マーカーに対する免疫染色を行った結果、ほとんどの間質Mint3陽性細胞は平滑筋マーカーsmooth muscle actin (SMA)陽性であり、ごく一部に白血球マーカーCD45陽性細胞が存在した。これらの結果から、主なMint3発現間質細胞は腫瘍関連線維芽細胞(CAF)であることが明らかになった。

③ 尿路上皮がん手術検体からのMint3発現間質細胞の単離・培養法の確立

腫瘍組織分散のための酵素の反応条件、単離した細胞の細胞培養条件を検討し、尿路上皮がん手術検体から主なMint3発現間質細胞であるCAFの単離・培養法を確立した。

④ 手術検体から単離したMint3発現間質細胞に対するMint3ノックダウン後のトランスクリプトーム解析

手術検体からCAFの単離培養・バイオバンクへのストックを4例完了した。ストックしたCAFを用いてMint3に対するsiRNAを用いたノックダウンを行い、RNA-seqでトランスクリプトーム解析を行った結果、Mint3ノックダウンにより多数の遺伝子に有意な発現変動が観察された。変動遺伝子についてオントロジー解析を行ったが、直接病態と関わるようなパスウェイは抽出されなかった。

(2) 膀胱癌発癌マウスモデルで、全身での Mint3 欠損が膀胱癌進展に及ぼす影響の解明と、間質細胞特異的 Mint3 欠損マウスの作製

① ヒト尿路上皮がん病理検体で同定したMint3を発現する間質細胞 (e. g. 線維芽細胞) に特異的にMint3を欠損させたマウスの作製

CAFのマーカーであるSMAプロモーター下でCreを発現するマウスを入手し、Mint3 floxマウスと交配し、SMA-Cre⁺;Mint3 fl/flマウスを作製し、発がん実験のために繁殖を進めた。

② conventional Mint3欠損マウスに対するN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 誘導膀胱がん発癌モデル解析

Mint3 KOマウスを用いたBBN誘導膀胱がん発癌モデル実験を行い、野生型マウスに比べてMint3 KOマウスでは膀胱がんの浸潤度が有意に低下していた。

4. 研究の反省・考察

(1) Mint3 発現間質細胞の同定と、Mint3 により発現制御される遺伝子の解明

尿路上皮がん臨床検体を用いた解析から、間質のMint3がCAFに発現しており、その発現が

悪性度ならびに pT ステージと有意に正の相関を示したことから、間質 Mint3 は尿路上皮がんの悪性化を促進する可能性が示唆された。臨床検体では間質 Mint3 の発現が上皮の Ck14, FGFR, GATA3 と相関したが、臨床検体から単離した CAF の Mint3 ノックダウン実験では特定のパスウェイの異常は検出出来なかったことから、CAF における Mint3 の役割は現時点では不明のままである。RNA レベルでの絞り込みが出来なかったことから、機能との関連が解析しやすいシグナルパスウェイやサイトカインのタンパクアレイを用いて、Mint3 の発現がタンパクレベルで CAF にどのような影響を与えているかについて解析を進める予定である。

(2) 膀胱癌発癌マウスモデルで、全身での Mint3 欠損が膀胱癌進展に及ぼす影響の解明と、間質細胞特異的 Mint3 欠損マウスの作製

全身性 Mint3 KO マウスでは BBN 誘導膀胱がんの進展が野生型マウスに比べて抑制されていたことから、Mint3 が膀胱がん進展を促進していることが示された。全身性 Mint3 KO マウスの結果は、がん細胞および全ての間質細胞での Mint3 の機能喪失の結果であるため、CAF での Mint3 が本当に膀胱がん進展に関わるかについては、作製した CAF 特異的 Mint3 KO マウスを用いた発がん実験によって明らかになることが期待される。

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

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	X線自由電子レーザーによるX線誘起フェムト秒磁気ダイナミクス	研 究 分 野	理学(理工系)
キ ー ワ ー ド	①X線自由電子レーザー ②放射光 ③磁気ダイナミクス ④円偏光X線 ⑤光誘起磁化 ⑥逆ファラデー効果		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 基 寛	工 学 部	教 授	総括・手法開発・実験

○研究分担者

[illegible]

X線自由電子レーザーによるX線誘起フェムト秒磁気ダイナミクス

1. 研究の目的

本研究では、新たな原理に基づくスピン制御技術の構築を目指し、フェムト秒からピコ秒での元素選択的なスピンドYNAMIKSの観測、および超高速スピン制御原理の探求を目的とする。

- (1) 円偏光した超短パルスX線自由電子レーザー (XFEL) を磁性体試料に照射することによるスピン偏極した励起状態、すなわち「X線誘起磁化」を瞬間的に生成し、その動的現象をフェムト秒の時間分解能で解析するための計測手法を開発する。
- (2) 開発した測定手法をフェリ磁性体 GdFeCo 薄膜に適用し、フェムト秒からピコ秒の時間スケールでのスピン選択的な内殻励起状態とその緩和過程を観測する。得られた結果を解析することで、超高速スピン制御に関わる磁気素過程を元素選択的に解明する。これにより従来の 100 倍以上高速なデバイスのためのスピン制御原理を提示する。

2. 研究の計画

本研究では、円偏光XFELパルスを励起光とし、可視光パルスレーザーを検出光とするポンプ・プローブ法を用いる。XFELパルスを試料に照射することで瞬間的な磁性変化を誘起し、高精度の可視光領域の磁気ファラデー効果により磁性変化の時間分解計測を行う。このような実験は過去に例がないため、新たな実験配置および光学系の開発が研究の重要な要素となる。そのために、2023年度は実験装置および光学系の開発と性能評価を行う。また、測定試料として用いるGdFeCo薄膜の磁性を評価するための計測系を構築するとともに、磁気光学特性の測定を行う。

- (1) 磁性変化検出のための磁気顕微光学系とパルス磁場印加装置の開発
 - ① 高感度CMOSカメラによる磁気光学信号の検出感度の向上と性能評価
 - ② XFELパルス周波数(30 Hz)に同期して磁場を印加するための、パルス電磁石の開発
- (2) GdFeCo フェリ磁性合金試料の磁気光学特性の評価
 - ① 高感度磁気ファラデー回転角計測装置の構築
 - ② GdFeCoフェリ磁性合金薄膜の磁気光学特性の組成・膜厚依存性の測定

3. 研究の成果

- (1) 磁性変化検出のための磁気顕微光学系パルス磁場印加装置の開発
 - ① XFELパルスが照射される微小領域の磁性変化をワンショットで観察するために用いる、顕微磁気光学系の開発を行った。本装置は面積 $300 \times 450 \text{ mm}^2$ の光学ブレッドボード上に、50倍の顕微鏡対物レンズ、ウォラストン偏光プリズム、高感度冷却CMOSカメラ2台を配置することで構築された。偏光プリズムで試料透過光の垂直、水平偏光成分を分離し、各カメラで測定した画像を演算することで、ファラデー回転角の計測を行う。ヘリウムネオンレーザーを用いて、開発した顕微磁気光学系の空間分解能およびファラデー回転角計測精度の評価を行った。テストチャートの観察により、空間分解能は $0.9 \text{ }\mu\text{m}$ と評価された。対物レンズの光学的性能から妥当な値であり、直径数ミクロンのXFEL照射スポットを十分に解像することができる。また、測定に用いるGdFeCo薄膜の磁区画像の取得に成功した。測定された画像では、正負の磁区に対して良好なコントラストが得られており、ファラデー回転角の検出精度は 0.1° と評価された。以上の結果から、開発した偏光顕微光学系は、XFELによる磁性変化検出に適用可能な性能を有すると結論した。さらに、開発した光学系をTiサファイアパルスレーザー光源と組み合わせることで、可視光励起・近赤外検出によるポンプ・プローブ時間分解実験を行った。GdFeCo薄膜に対して本装置を用いることで、 400 nm のパルスレーザーを照射することによる 1 ps 以内の超高速磁性変化を検出できることを実証した。
 - ② XFELパルス周波数(30 Hz)に同期して磁場を印加するため、パルス電磁石の製作を行った。通常の一体型の鉄芯を用いた電磁石では、電磁石鉄心の渦電流による交流損失のために、30 Hz において目的の磁場強度 ($> 50 \text{ mT}$)を得ることは難しい。この問題を解決するため、積層した珪素鋼板を鉄芯とする構造を採用した。市販の交流電源トランスを

分解し、鉄芯として使われている珪素鋼板を取り出し、電磁石に適したU字型の形状に切断し、再び積層して絶縁テープで固定したものを鉄心とした。直径 0.8 mm のポリウレタン線を正負の磁極に対してそれぞれ90回巻き、電磁石として組み上げた。ガウスメータによる磁場パルス波形の計測結果から、SACLA のパルス繰り返し周波数の2倍の周波数である60 Hzにおいて、パルス幅 4 ms、磁場強度80 mTのパルス磁場が得られることが示された。

(2) GdFeCo フェリ磁性合金試料の磁気光学特性の評価

- ① XFEL誘起磁気ダイナミクス実験に用いるGdFeCo合金試料は、窒化シリコン基板上に成膜された厚さ20~30 nmの薄膜である。膜厚およびGdとFeの組成比によって、試料の磁気特性や磁気光学特性が変化することが知られている。SACLAでのビームタイムは限られるため、XFEL実験に適した性質をもつGdFeCo試料を前もって特定しておく必要がある。この目的を実現すべく、磁性薄膜試料の磁性評価のための磁気ファラデー回転角計測装置を構築した。試料のファラデー回転角は 1° 以下であり、高い計測精度が要求される。そこで、われわれはウォラストン偏光プリズムとバランス型光検出器を組み合わせた光学系を採用することで、 $\pm 0.03^\circ$ のファラデー回転角の計測精度を達成した。光源にはヘリウムネオンレーザーを用い、試料への磁場印加には電磁石を用いた。
- ② Gd組成および膜厚の異なる数種類のGdFeCo薄膜試料について、上記の装置を用いて磁気ファラデー回転角の磁場依存性を測定した。Gd組成 23%~26% (対応する補償温度 230~400 K)、膜厚 20 nmおよび30 nmの試料について、計測した磁気ヒステリシスループから飽和磁化状態でのファラデー回転角、および保磁力を決定した。

4. 研究の反省・考察

(1) 磁性変化検出のための磁気顕微光学系パルス磁場印加装置の開発

- ① 開発した磁気顕微光学系について、空間分解能0.9 μm 、磁気ファラデー回転角検出精度 0.1° 以下という性能が得られた。XFEL照射スポット径が2~3 μm 、測定対象とするGdFeCoのファラデー回転角が 0.5° 程度であることから、XFEL誘起磁気ダイナミクスの検出に利用可能な装置の開発が行えた結論できる。
- ② 作製したパルス電磁石では、繰り返し周波数 60 Hz、最大磁場 800 Oe、パルス幅4 msの性能が得られており、パルス磁場自体の性能に関してはSACLAでの実験において使用可能な仕様を満たしている。一方で、上記の性能での運転時には電磁石本体が発熱し、運転開始後数分間で手で触ることが難しいほど温度が上昇した。実用化のためには適切な冷却機構を付加する必要がある、今後の課題として残った。

(2) GdFeCo フェリ磁性合金試料の磁気光学特性の評価

- ① 厚さ数10 nm の磁性薄膜の磁気特性評価を行うための、高精度磁気ファラデー回転角計測系を構築した。 $\pm 0.03^\circ$ のファラデー回転角の計測精度が得られており、本研究で対象とするGdFeCo薄膜試料の評価に十分な性能であると結論できる。
- ② 数種類のGdFeCo薄膜について、ファラデー回転角による磁気ヒステリシスループから、試料間での飽和磁化や保磁力を決定した。膜厚依存性や組成依存性を議論するに足る精度のデータが得られた。一試料の測定時間は10分程度であり、今後新たな試料が追加された場合にも迅速に試料の物性評価を行える環境が整備された。今後、ヘリウムネオンレーザー以外のレーザー光源や白色光源を用いることで、ファラデー回転角の波長依存性計測が可能なシステムへと発展させる計画である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 小林玲、山田貴大、吉川大貴、小幡竜世、後長葵、金島圭佑、富樫格、久保田雄也、塚本新、田中義人、鈴木基寛、日本物理学会第78回年次大会、2023年9月16日~19日、東北大学
- ② M. Suzuki, A. Izumi, K. T. Yamada, K. Kaneshima, R. Kobayashi, Y. Kubota, T. Togashi, T. Ohkochi, I. Matsuda, Y. Tanaka, MRM2023/IUMRS2023 Grand Meeting,

11-16 December 2023, Kyoto.

- ③ 小林玲、山田貴大、吉川大貴、小幡竜世、後長葵、笹倉颯太、秋山裕輔、竹村海輝、金島圭佑、富樫格、久保田雄也、塚本新、田中義人、鈴木基寛、第37回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2024年1月10日～12日、アクリエひめじ

(3) 出版物

なし

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	①MHC class II ②制御性T細胞 ③CD103陽性樹状細胞 ④E3ユビキチンリガーゼ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医学部 病原微生物学	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 学 部 病 原 微 生 物 学	講 師	免疫細胞解析、動物実験
林 周 平	医 学 部 国 際 観 光 医 療 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 学 部 消 化 器 外 科 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 学 部 消 化 器 外 科 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 学 部 病 原 微 生 物 学	講 師	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

(1)腸管の CDXX⁺ dendritic cell (DC)の MHC class II 発現が亢進していること、(2)CDXX⁺ DCにおいて、MARCH-I の発現抑制と、MARCH-I 関連分子である YYY の発現が認められること、(3)CDXX⁺ DCにおけるユビキチン化抑制による MHC II 発現亢進を、MARCH-I ホモログである c-MIR を恒常的に発現させることによってキャンセルすると、Th17 細胞依存性大腸炎が出現すること、(4)MARCH-I の発現抑制は NF-κB に一部依存していること、(5)IBD 患者の腸間膜リンパ節 CDXX⁺ DC の MHC II 発現が低下しており、腸間膜リンパ節の iTreg の活性化が低下していることを見出した。

これらのことから、昨年度に提唱した仮説にさらに YYY の関与の仮説を追加し検証をおこなう。すなわち、CDXX⁺ DC は、MARCH-I の発現抑制のみではなく、YYY が発現することによって MHC II のユビキチン化を抑制させ、MHC II による抗原提示を安定化させることによって、iTreg を誘導し、腸管恒常性の維持を行っており、その破綻によって、IBD が発症するとの仮説である。したがって、MARCH-I と YYY の発現制御の観点から、MHC II 制御異常による炎症性腸疾患発症メカニズムの探索を目的とした。

2. 研究の計画

(1)YYY 発現による MARCH-I 抑制を介した MHC II ユビキチン化抑制の iTreg 分化・維持への関与とその破綻による腸炎発症の可能性の検討：

DC にて YYY が欠損しているマウスにて、iTreg の異常、Th17 依存性腸炎の発症を検討する。さらに、CD11c-Cre:XX flox/flox マウスとの mixed chimera を作成し、CDXX⁺ DC 特異的に YYY を欠損させ同様の検討を行う。

(2)MARCH-I 発現制御における NF-κB の関与の検討：

MARCH-I promoter の NF-κB 結合候補領域の情報を基に Chip-qPCR あるいは Chip-seq による結合領域の同定、さらには、NF-κB シグナル関連分子に関する遺伝子改変マウスを用いて検討する。

(3)マウス粘膜固有層と腸間膜リンパ節における CDXX⁺ DC の single cell RNAseq(sc-RNAseq)による NF-κB 活性化機構の解明：

リンパ節への遊走に関連する NF-κB 活性化の確認を single cell レベルにて行い、その pathway の詳細を明らかにする。

(4)IBD 患者における腸管 CDXX⁺ DC の single cell RNAseq による MHC II 制御関連因子に関する解析：

IBD 患者の CDXX⁺ DC と早期大腸がん患者を、(3)と同様の手法にて解析し、MARCH-I を含む MHC II 制御関連分子の異常の同定を試みる。

3. 研究の成果

(1)YYY 発現による MARCH-I 抑制を介した MHC II ユビキチン化抑制の iTreg 分化・維持への関与とその破綻による腸炎発症の可能性の検討：

DC にて YYY が欠損し、MARCH-I 機能亢進による MHC II 異常が認められる CD11c-Cre:YYY flox/flox にて、iTreg の異常について検討を通常の 8 週齢マウスにて検討を行った。しかしながら、iTreg の減少が認められなかった。この検討を行なっている中で、Nature にて、新たに発見された RORγt⁺ CD11c⁺ DC が離乳において iTreg を誘導しているとの報告がなされた。そこで、8 週齢ではなく 4 週齢において、YYY 欠損の影響を検討した。しかしながら、8 週齢での検討と同様に、iTreg の減少はみとめられなかった。

(2)MARCH-I 発現制御における NF-κB の関与の検討：

2022 年度に得られた抑制剤による検討結果を検証するため、TNF-α と Z (NF-κB シグナル

の根幹分子) の double 欠損マウスを導入した。Z のみの欠損であると DC が TNF- α の過剰発現によってアポトーシスをおこし、検討する事が困難であると考えられたため、double 欠損マウスのコロニーを現在作製中である。

(3) マウス粘膜固有層と腸間膜リンパ節における CDXX+ DC の single cell RNAseq(scRNAseq) による NF- κ B 活性化機構の解明、および(4) IBD 患者における腸管 CDXX+ DC の scRNAseq による MHC II 制御関連因子に関する解析：

本解析を行うにあたって、2022 年 Nature 誌に腸管での iTreg 誘導 DC として RORgt+ CD11c+ Itgb8+ DC であり、CDXX+ CD11c+ DC ではないとの報告がなされた (Nature 2022 Oct;610(7933):752-760)。さらに、RORgt+ DC の MHC II の抑制が IBD のひとつである、若年性 Crohn's disease にてみとめられるとの報告がなされた (Nature 2022 Oct;610(7933):752-760)。したがって、我々が持つ成人 IBD 患者の腸間膜リンパ節の DC における MHC II の発現を検討した。その結果、RORgt+ DC では MHC II の抑制はみとめられず、RORgt- CD11c high DC にて MHC II の抑制をみとめた。Nature での報告は、離乳期における iTreg の誘導に RORgt+ DC が関わっており、CDXX+ DC は adult においても関与していないとの報告であることから、adult にておいて、CDXX+ DC とは異なる DC が腸管 iTreg の誘導に関与している可能性があると考えられた。

4. 研究の反省・考察

我々は、本 grant のサポートを受け、遺伝子改変マウスの解析から、CD11c+ Itgb8+ DC の MHC II の発現制御異常によって病原性 Th17 細胞が出現し、腸炎が発症することを見出したことから、IBD 発症に MHC II の発現異常が関与している可能性を見出している。さらに、研究開始当初、腸管において iTreg (末梢にて誘導される制御性 T 細胞) を誘導すると考えられていた CDXX+ CD11c+ Itgb8+ DCs において MHC II のユビキチンリガーゼである MARCH-I の発現が抑制されていることをマウスにて見出したことから、CDXX+ CD11c+ Itgb8+ DCs での MARCH-I 抑制による MHC II の安定化によって iTreg が誘導・維持され、腸管での免疫異常活性化を制御しているのではと考えていた。事実、IBD 患者の腸間膜リンパ節における CDXX+ DC では MHC II の発現が抑制されていることを見出していた。

しかしながら、2022 年に Nature において、我々が検討している Itgb8+ CDXX+ CD11c+ DC ではなく、RORgt+ Itgb8+ CD11c+ DC が iTreg の誘導に関与しており、さらにその MHC II の異常によって IBD が発症している可能性についての報告がなされた (Nature 2022 Oct;610(7933):752-760)。また、RORgt+ Itgb8+ CD11c+ DC は離乳期に出現することによって、iTreg の誘導による免疫寛容は成長初期に確立するとの報告がなされた。しかしながら、我々の検討では、RORgt+ CD11c+ DC ではなく、Itgb+ DC を含む CD11c high RORgt- DC にて MHC II 発現抑制を見出した。Nature の報告では、RORgt- CD11c+ DC の詳細な検討がなされていないこと、Itgb は様々な DC に発現している iTreg の誘導因子であることから、CDXX+ DC 以外の CD11c high DC の中で Itgb を発現している DC における MHC II 発現抑制が IBD 発症に関与している可能性が挙げられた。これらの細胞集団をさらに検討することによって、MHC II 異常による炎症性腸疾患発症機構の提唱を進めたいと考えている。

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

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	天 理 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	東地中海地域における鉄器時代の始まりと地域社会の変容 ―イスラエル、テル・レヘシュの調査を軸とした考古学的研究―	研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①東地中海、②イスラエル、③考古学、④都市、⑤青銅器時代、⑥鉄器時代、⑦国際関係、⑧テル・レヘシュ		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
クワバラヒサオ 桑 原 久 男	天 理 大 学 文 学 部	教 授	研究総括 都市遺跡の比較研究

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
ハシモトヒデマサ 橋 本 英 将	天 理 大 学 文 学 部	教 授	後期青銅器時代における金属器生産の研究
オダギハルタロウ 小 田 木 治 太 郎	天 理 大 学 文 学 部	教 授	ユーラシア金属器文化の比較研究
ハセガワシュウイチ 長 谷 川 修 一	立 教 大 学 文 学 部	教 授	考古学研究結果を踏まえた旧約聖書形成研究
オノヅカタクゾウ 小 野 塚 拓 造	東京国立博物館学術研究部	主任 研究 員	土器からみた地域間交流の研究
ツモトヒデトシ 津 本 英 利	古代オリエント博物館研究部	研 究 部 長	古代西アジア金属文化の研究
カンシャヒロオ 間 舎 裕 生	立 教 大 学 文 学 部	リサーチアシ ス タ ン ト	後期青銅器時代～鉄器時代の都市遺跡の比較研究
マスブチマリヤ 増 渕 麻 里 耶	京都芸術大学芸術学部	准 教 授	金属製品の考古理化学的研究

東地中海地域における鉄器時代の始まりと地域社会の変容 ーイスラエル、テル・レヘシュの調査を軸とした考古学的研究ー

1. 研究の目的

(1) テル・レヘシュにおける発掘調査の推進

- ①テル・レヘシュの「下の町」の発掘調査を通して、考古学的なデータから、青銅器・鉄器時代移行期についてどのような社会状況を読み取れるのかを探ること。
- ②土器や金属器など外来系遺物の分析を通して、後期青銅器時代のテル・レヘシュが地中海世界の国際ネットワークにどのように組み込まれていたのかを探ること。

(2) 青銅器・鉄器時代移行期の社会変容

- ①青銅器・鉄器時代移行期における国際的環境の激変に、テル・レヘシュを含む南レヴァントの地域社会がどのように対応したのか、その実態を探ること。
- ②当該期の文化を担った集団のアイデンティティに対する理解を深めること。
- ③青銅器から鉄器への移行という人類史上の大きな変化を、南レヴァントにおける「移行期」の社会状況の中に位置づけ直すこと。

2. 研究の計画

(1) 東地中海地域の諸遺跡における青銅器時代・鉄器時代の様相に関する比較検討

- ①研究論文・発掘調査報告書などを通して、各地域の遺跡の様相を把握する。
- ②ASORなどの学会に参加し、情報収集を進める。

(2) 現地調査の実施

- ①現地協力者のイツハク・パズ博士と連携しながら、現地調査の準備を進める。
- ②現地調査を実施し、青銅器・鉄器時代移行期のテル・レヘシュの様相の把握を行う。
- ③当該期のセトルメントシステムを把握するため、関連遺跡の踏査を行う

(3) 調査成果の検討と報告

- ①テル・レヘシュの調査成果の検討を行い、データの情報化を進める。
- ②テル・レヘシュ出土資料の比較検討を行い、歴史的な理解を深める。
- ③日本西アジア考古学会において調査研究成果の報告を行う。

3. 研究の成果

(1) 東地中海地域の諸遺跡における青銅器時代・鉄器時代の様相に関する比較検討

- ①年間を通して、研究論文、発掘調査報告書の検討をオンライン・ツールを利用しながら進め、イスラエルとその周辺地域の遺跡について、青銅器時代・鉄器時代の様相を把握、比較検討する取り組みを進めた。
- ②5月に開催された ICAANE（国際近東考古学会議）に研究分担者が参加し、最新の研究成果の摂取に努めた。

(2) テル・レヘシュ遺跡発掘調査の準備と実施

- ①2019年以来4年ぶりとなるテル・レヘシュの発掘調査（第13次）を8月に実施するため、研究代表者の桑原を団長とする発掘調査団を組織し、研究分担者、現地協力者のイツハク・パズ博士（イスラエル考古局）と連携しながら、発掘調査ライセンスの申請、宿舎やその他のロジステック等の準備を進め、体制を整えた。
- ②円安、諸経費の高騰に苦慮しながらも、8月に約1ヶ月間、現地に渡航し、テル・レヘシュの発掘調査（第13次）を実施し、「下の町」の調査区では、初期鉄器時代の建築遺構の様相の一端を明らかにすることができた。

(3) 発掘調査の事後作業と調査成果の検討

- ①日誌や図面・写真などの調査記録は調査終了後、直ちにイスラエル考古局に提出した。
- ②秋以降は、研究チームのメンバーが緊密に連絡を取りつつ、テル・レヘシュ遺跡の発掘調査の事後作業、調査記録の検討や分析を進めた。

(4) 調査成果の報告

- ①テル・レヘシュ発掘調査成果については、イスラエル考古局の発掘調査概報集 (Hadashot Archeolgiyot) に出版するため、概要報告の原稿を提出した。
- ②イスラエル考古学研究会、西アジア考古学会において、調査成果について発表を行った。

4. 研究の反省・考察

(1) オンラインツールを活用した研究の推進

Covid-19による制限時の経験を生かし、報告書の作成作業や専門書の読書会、その他の情報交換などをオンラインの各種ツールを利用しながら日常的に進める新たな研究スタイルが定着し、現地スタッフともメールに加えて、Zoomで普通にコミュニケーションができるようになったことは重要である。

(2) テル・レヘシュの発掘調査

- ①まず何よりも、Covid-19 のパンデミックによる渡航制限が撤廃され、現地調査を再開できたこと自体が重要な成果であった。
- ②注目されるのは取瓶、ふいごの羽口といった鑄造関連遺物が出土したことであった。補年研究のテーマに関連する大変重要な成果であり、今後の詳細な調査が期待される。
- ③後期青銅器時代における防御施設 (城壁) の有無を確認するために調査範囲を斜面方向に細長く拡大し、発掘調査を実施する予定であったが、諸制約から次年度以降に延期となった。
- ④地表面の観察により、発掘調査区の南方約 50m の地点にモニュメンタルな建造物の可能性があるウォールの石列が存在することが明らかとなり、同様に、次年度以降の調査課題とすることになった。

(3) 調査経費の高騰とCovid-19

- ①燃料費の高騰に伴う航空運賃の上昇、現地の物価上昇、急速な円安といった要因から、現地調査を実施するための実質的な経費がCovid-19以前の1.5倍ほどに増加したことは、研究遂行にあたって大きな痛手であった。少なくとも円安要因が改善されることが望まれる。
- ②現地調査に際しては、十分な注意を払っていたものの、渡航メンバーにCovid-19の感染者が発生し、一時は調査の遂行が危ぶまれたが、なんとか持ちこたえ、予定通りに現地調査を遂行することができたのは幸いであった。

(4) 現地の情勢と交流再開の必要性

- ①2023年9月はじめに現地から帰国し、1ヶ月が過ぎた10月7日、ガザ地区を実効支配するハマスがイスラエル南部のキブツ・ベエリを襲撃し、多数の住民を人質に取る事件が発生した。これに対して、イスラエル軍がパレスチナ自治区ガザ地区で大規模な地上作戦を現在に至るまで続けている。停戦が実現して現地の情勢が回復することを願うばかりである。
- ②本研究による日本隊のテル・レヘシュ調査プロジェクトは、文化的な交流という側面があり、日本人・イスラエル人の研究者や協力者のほか、近くに所在するアラブの村の人々の協力が得られている。現地の情勢については思うところが多々あるが、これまで培ってきた地道な文化的交流が今後も継続することの重要性を最後に記しておきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Hasegawa Shuichi, Kuwabara Hisao and Paz, Yitzhak. 'Tel Rekhes- 2019: Preliminary report, *Israel Antiquities Authority "Hadashot Arkheologiyot :Excavations and Surveys in Israel 135, 2023*
- ②桑原久男・間舎裕生・橋本英将・山野貴彦「初期鉄器時代とローマ時代のテル・レヘシュ—イスラエル、テル・レヘシュ第13次発掘調査 (2023年) —」『第31回西アジア発掘調査報告会報告集』日本西アジア考古学会、2024年
- ③津本英利「収蔵品紹介：銅剣とその再現品」古代オリエント博物館情報誌『ORIENTE』66号、2023年

- ④津本英利「西アジア考古学事情ーシリア、トルコを中心にー」『月刊 考古学ジャーナル』792号、2023年

(2) 口頭発表

- ①橋本英将「テル・レヘシュ2023年度発掘調査報告」、第30回イスラエル考古学研究会、立教大学、2023年12月23日
②津本英利「カマン・カレホックⅡa層出土（2004年度調査）の鉄製短剣について」第30回トルコ調査研究会、東京国立博物館、2024年3月4日

(3) 出版物

- ①Hidemasa Hashimoto, Hisao Kuwabara, Takuzo Onozuka and Shuichi Hasegawa,
Excavating at the Lower Shelf of Tel Rekhes. *Nicolò Marchetti et al. (eds.),
Proceedings of the 12th International Congress on the Archaeology of the Ancient
Near East, Volume 2, 2023*
②津本英利『ヒッタイト帝国 「鉄の王国」の実像』PHP新書、2023年

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	福 岡 歯 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	DNA損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①DNA損傷 ②細胞死 ③ミスマッチ修復(MMR) ④クロマチン動態 ⑤ATR/CHK1 ⑥細胞周期チェックポイント ⑦ゲノム安定化 ⑧口腔扁平上皮癌細胞		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
日 高 真 純	口 腔 歯 学 部	教 授	実験の総括・論文作成

○研究分担者

[illegible]

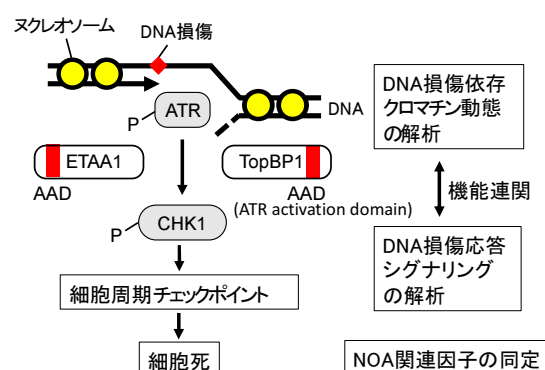
DNA 損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明

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



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

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。

(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。また、クロマチン制御因子SMARCAD1との機能的相互作用が報告されたCENP-A (セントロメア領域のヌクレオソームを構成因子するヒストンH3バリエーション) のDNA損傷が引き起こす細胞死誘導における新規機能の検討を行う。

(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。また、別の手法として、Flagタグを付加したTopBP1とETAA1を恒常的に発現する細胞を構築し、抗Flag抗体アガロースビーズを用いた免疫沈降法により、相互作用するタンパク質を同定する。

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

細胞死誘導において機能するSMARCD1はセントロメア領域のヌクレオソームの構成因子CENP-Aのクロマチンへの取り込みと維持に必要であることが報告されている (Mitra *et al.*, Nature Com., 2020)。そこで、CENP-Aの細胞死誘導における新規機能の可能性を検討するために、CENP-Aのノックダウン細胞 (図1) とCENP-A過剰発現細胞を構築したところ、正常細胞に比べて前者はアルキル化剤に耐性 (図2) となり、後者は感受性となることがわかった。このことから、SMARCD1とCENP-Aの機能的な相互作用がDNA損傷により引き起こされる細胞死誘導に関与していることを新規に明らかにすることができた。

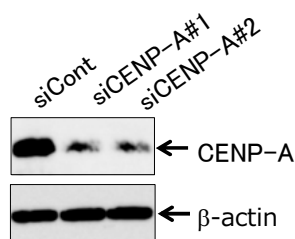


図1. CENP-Aノックダウン細胞の構築

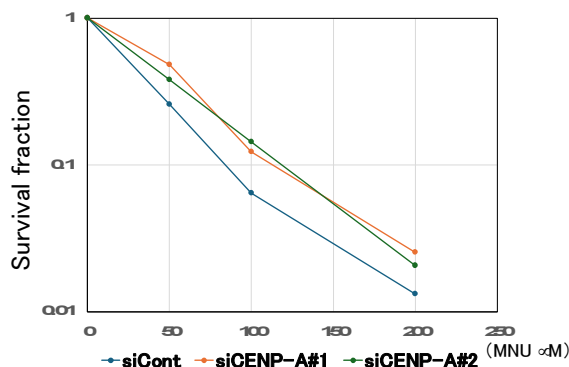


図2. CENP-Aノックダウン細胞のアルキル化剤耐性

(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

ETAA1ノックダウン細胞がアルキル化剤に対して感受性を示すという前年度の解析結果を受けて、今年度はETAA1ノックアウト細胞とETAA1過剰発現細胞を構築した。それぞれの細胞のアルキル化剤に対する感受性を解析したところ、ETAA1ノックアウト細胞はより顕著に感受性を示すのに対し、ETAA1過剰発現細胞は予備的ではあるが僅かに耐性を示すことが明らかとなった。ETAA1発現量の違いによるATR/CHK1シグナル経路の活性化への影響は現在解析中である。

AADの機能解析においては、その機能に必須なアミノ酸に変異を導入した変異型AAD (W107RとF198Aの2種類) を有するFlag-ETAA1発現プラスミドを正常型とともに構築した。現在、ETAA1ノックアウト細胞にこれらの発現プラスミドを導入し、その安定発現細胞を樹立しているところである。これらの細胞を用いて抗Flag抗体アガロースビーズによる免疫沈降を行い、細胞死誘導時にAADと相互作用する因子の同定を進める。

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

ATAC法を用いたDNA損傷領域特異的に集積している関連タンパク質の単離実験に関しては、昨年度から引き続きTn5の導入効率を上げる条件検討を行ったが、その効率を目的達成のために必要なレベルまで押し上げることが出来なかった。そこでこの手法による解析を中断し、セントロメア領域特異的なヒストンバリエントCENP-Aの機能解析に着手した。その結果、DNA損傷が引き起こす細胞死誘導に関わる新たなクロマチン制御因子としてCENP-

Aを見出すことができた。今後は、CENP-AのDNA損傷領域への集積を可視化し、SMARCAD1とどのように協働しながら細胞死誘導において機能するかを分子レベルで明らかにしていく予定である。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

①ATR activation domain (AAD)の機能解析

本研究において、TopBP1とETAA1がATR/CHK1シグナル経路の活性化を制御することで、DNA損傷が引き起こす細胞死の誘導を調節していることが明らかとなった。また、その制御にはAADが必須であることも明らかとなった。ただし、当初予定していたAADと相互作用する細胞死誘導制御因子の同定までは達成出来なかった。今後は、Flag-ETAA1(正常)、Flag-ETAA1(W107R)、Flag-ETAA1(F198A)発現細胞を用いた解析を継続し、TopBP1とETAA1がともに有するAADの機能上での共通点と相違点を明らかにし、その細胞死誘導における分子機能を明らかにする予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Morita S., Fujikane R., Uechi Y., Matsuura T., Hidaka M. FANCD2 counteracts O⁶-methylguanine-induced mismatch repair-dependent apoptosis. *Molecular Biology Reports*, in press
- ②Uechi Y., Fujikane R., Morita S., Tamaoki S., Hidaka M. Bloom syndrome DNA helicase mitigates mismatch repair-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press

(2) 口頭発表

- ①井口晃太郎、藤兼亮輔、日高真純. セントロメアタンパク質CENP-Aのアポトーシス誘導における新規機能. 第50回福岡歯科大学学会総会、2023年12月10日
- ②藤兼亮輔、倉岡功、日高真純. 蛍光プラスミドを用いたミスマッチ修復効率の定量的解析. 第52回日本環境変異原ゲノム学会、2023年11月11日
- ③白川知樹、竹立新人、松石英莉那、水崎彰治、長澤知樹、藤兼亮輔、日高真純、石井成憲、倉岡功. 生細胞のDNAミスマッチ修復能を評価する新規レポータープラスミドの構築と評価. 第52回日本環境変異原ゲノム学会、2023年11月11日
- ④Fujikane R., Morita S., Rikitake M., Uechi Y., Hidaka M. Mechanism of mismatch repair-dependent apoptosis and its regulation by DNA damage response and DNA repair systems. 第96回日本生化学会大会、2023年11月1日
- ⑤井口晃太郎、藤兼亮輔、日高真純. アルキル化DNA損傷応答におけるセントロメアタンパク質CENP-Aの役割. 第65回歯科基礎医学会学術大会、2023年9月16日
- ⑥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FANCD2の役割. 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2023年6月6日

(3) 出版物

なし

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	九 州 看 護 福 祉 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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 —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—	研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①産後うつ ②WRAP ③ピアサポーター		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 橋 知 子	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	講 師	研究統括・進捗管理・質問紙調査 インタビュー調査分析・WRAPファシリテーター

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
上 田 智 之	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	准 教 授	WRAPファシリテーター・質問紙調査 インタビュー分析
緒 方 浩 志	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	講 師	WRAPファシリテーター・質問紙調査 インタビュー分析
齊 藤 圭 子	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	助 教	質問紙調査
巖 桂 子	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	助 教	質問紙調査
森 雄 太	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	講 師	質問紙調査
木 村 涼 平	日 本 赤 十 字 九 州 国 際 看 護 大 学 部 看 護 学 部	講 師	インタビュー調査
北 原 崇 靖	九 州 看 護 福 祉 大 学 部 九 看 護 福 祉 大 学 部	助 教	インタビュー調査

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) 研究デザイン：質的記述的研究

- (2) 参加者

遠隔会議システムを利用したグループプログラム開催については、ホームページ上に子育て中の両親を対象とした WRAP を開催することを掲載し、参加者を募る。対面でのグループプログラムに関しては、研究協力者である熊本県内の助産院院長を通じて参加者を募る。

- (3) WRAP の運営方法

遠隔会議システムを利用した 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 20:30 から 8 名を募集する。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（元気に役立つ道具箱、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。セッションは、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。

対面でのセッションは 3 時間とし、1 クールは 4 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 2 ヶ月かけて開催する。開催は、金曜日 9:30 から 8 名を募集する。内容や運営スタッフは ZOOM でのセッションに準ずる。

- (4) データ収集方法

インタビューはグループインタビューで、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 60 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 点である。対象者の同意を得て IC レコーダーに録音する。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。遠隔 WEB 会議システム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、個人情報保護の保護、結果の公表などについて文書と口頭で研究者から説明し、同意書を交わす。インタビューの日時及び方法は、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。

3. 研究の成果

ZOOM を利用した WRAP 定期クラスの参加者は 1 回目が 5 名、2 回目が 3 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 2 名であった。2 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。対面でのクラスは、3 クール行い各回参加者は 5-6 名であった。最終的に 3 回の調査及びインタビュー調査を実施できたのは 12 名であった。質問紙調査については、2024 年度母性衛生学会にて発表予定である。インタビュー調査では、セミナーに参加することで気分の落ち込みが改善した、同じ年齢の子どもを持つ母親同士の絆ができたという肯定的な意見があった。

4. 研究の反省・考察

参加者へのインタビューから、WRAP の効果は確認できた。一方で子どもの体調不良やコロナ感染のために全セミナーに参加できなかった対象者がいた。子どもの体調不良などで、参加できなかった場合の代替え方法の検討が必要であると考えた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

Tomoko Ohashi etc.: TO DETERMINE THE EFFECTIVENESS AND CHALLENGES OF THE WRAP WORKSHOP AMONG WOMEN WHO EXPERIENCED A MISCARRIAGE, the ICN 2023, 1-5 July 2023 in Montreal, Canada.

(3) 出版物

なし

2023 年度(第 48 回)学術研究振興資金 学術研究報告

令和 6 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・7316・7319

FAX 03 (3230) 8223

禁無断転載