

2020年度（第45回）
学術研究振興資金

The Science Research Promotion Fund

学術研究報告

令和4年9月

はじめに

この報告書は、2020年度（第45回）学術研究振興資金を配付した研究課題について、その研究成果を取りまとめたものです。掲載した研究成果には、この年度に初めて資金を受けたもの、前年度から2年目、3年目と継続して資金を受けたものなどがあり、すべての研究が完了しているわけではありません。したがって現在も進行中の研究については、その進捗状況を記してあります。

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

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

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

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

令和4年9月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長 福原 紀彦

目 次

- I 2020 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 2020 年度学術研究振興資金 研究課題一覧
- V 2020 年度（第 45 回）学術研究振興資金 学術研究報告

I 2020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		139	306,400	41	80,400	29.5%	
内	新規・継続別	新 規	114	237,900	21	38,800	18.4%
		継 続 2 年 目	16	45,700	13	30,700	81.3%
		継 続 3 年 目	9	22,800	7	10,900	77.8%
訳	学校種別	大 学	135	303,900	40	79,600	29.6%
		短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	4	2,500	1	800	25.0%
	研究区分別	人 文 ・ 社 会 科 学 系	38	35,200	11	9,600	28.9%
理 工 系 、 農 学 系		39	99,800	11	28,700	28.2%	
生 物 学 系 、 医 学 系		62	171,400	19	42,100	30.6%	

Ⅱ 学術研究振興基金 年度別受領状況

(単位：千円)

年度 区分	1975(昭和50)～ 2014(平成26)年度	2015年度 (平成27年度)	2016年度 (平成28年度)	2017年度 (平成29年度)	2018年度 (平成30年度)	2019年度 (令和元年度)	2020年度 (令和2年度)	合 計
経済団体	2,122,328	5,000	5,000	0	0	0	0	2,132,328
個別会社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学校法人	1,460,833	0	0	0	0	0	0	1,460,833
個人	199,374	213	0	90	0	270	3	199,950
合 計	5,404,535	5,213	5,000	90	0	270	3	5,415,111
基金保有額	5,404,535	5,409,748	5,414,748	5,414,838	5,414,838	5,415,108	5,415,111	-

Ⅲ 学術研究振興資金 研究分野別配付状況

(単位：千円)

年度 研究分野	1976(昭和51)～ 2014(平成26)年度	2015年度 (平成27年度)	2016年度 (平成28年度)	2017年度 (平成29年度)	2018年度 (平成30年度)	2019年度 (令和元年度)	2020年度 (令和2年度)	合 計
医学	2,813,780	36,900	28,400	29,100	27,000	29,100	38,800	3,003,080
環境科学	216,240	1,000	3,000	3,000	4,500	0	0	227,740
理学	892,510	20,700	9,500	13,000	19,800	20,900	11,300	987,710
工学	1,623,360	2,600	4,400	10,700	9,700	12,400	16,300	1,679,460
農学	286,500	11,500	16,100	8,300	6,500	9,900	4,400	343,200
文学	716,160	7,000	11,400	9,500	7,400	4,100	2,500	758,060
法学	104,320	2,300	500	300	0	0	2,500	109,920
経済学	236,580	1,400	900	900	1,900	1,400	2,600	245,680
家政学	214,260	3,000	3,200	3,000	0	0	0	223,460
体育学	26,800	0	1,000	2,000	2,000	0	0	31,800
教育学	185,270	3,400	1,700	800	1,800	3,300	2,000	198,270
小 計	7,315,780	89,800	80,100	80,600	80,600	81,100	80,400	7,808,380
若手研究者 奨励金	82,100	19,400	19,400	18,400	-	-	-	139,300
合 計	7,397,880	109,200	99,500	99,000	80,600	81,100	80,400	7,947,680

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

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

IV 2020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	旭川大学	教育学	看護の学びを動機づけるアーリー・エクスポージャーの検討と実践	300
2	東北工業大学	工学	ヒト脳オルガノイドの多機能同時計測法の開発と薬効評価	1,900
3	埼玉医科大学	医学	ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御	2,300
4	青山学院大学	理学	多種における心臓の発生発達機構の解明	3,300
5	慶應義塾大学	医学	腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明	2,300
6	工学院大学	農学	不活性化酵素, 偽遺伝子からの活性化酵素の作成	3,100
7	東京慈恵会医科大学	医学	がんにおける型破り分泌の機序解明と制御研究	2,300
8	成蹊大学	工学	ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む	1,600
9	成城大学	経済学	経済のデジタル化の加速に向けた金融制度・税制度の対応のあり方	500
10	多摩美術大学	文学	日本とアジアの群島を結ぶ文様研究	700
11	中央大学	工学	ヘモグロビンナノ粒子からなる人工酸素運搬体の開発	4,700
12	帝京大学	理学	スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と先天性代謝異常症への応用	1,500
13	東海大学	医学	がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立	2,300
14	東京歯科大学	医学	マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立	1,500
15	日本大学	医学	アディポネクチンによる体内時計制御機構の解明とその臨床的意義	700
16	武蔵大学	経済学	アジアにおける女性の経済・政治活動への参加拡大とそのインパクト	600
17	星薬科大学	医学	マイクロパーティクルの生体機能解明による血管病治療と創薬応用	4,300
18	明治学院大学	法学	朝鮮戦争の「遺産」と東アジア	1,400
19	文教大学	教育学	ペアレンティングによる親子介入支援の長期的効果検証とマニュアル作成	600
20	自治医科大学	医学	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用	3,100
21	白梅学園大学	教育学	性的問題行動を示す発達障害の青少年と保護者向けySOTSEC-ID支援	1,100
22	北陸大学	医学	閾値下レーザーに反応する網膜色素上皮細胞の分子基盤	1,100
23	光産業創成大学院大学	理学	光活性化タンパク質の活性制御機構の解明と細胞の光制御への応用	1,100
24	愛知大学	文学	蓬左文庫所蔵典籍の調査および史料研究	300
25	愛知工業大学	工学	逆構造ペロブスカイト太陽電池のテクスチャー発電層の製膜技術	1,900
26	藤田医科大学	医学	がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法の開発	4,700
27	名城大学	工学	次世代高容量Liイオン電池実現に向けた新規ナノ複合材料の創製	2,300
28	京都外国語大学	文学	中米の古代パンアメリカンハイウェイがつなぐ南北交流の研究	1,500
29	京都薬科大学	医学	ダウン症候群の出生前および出生後治療法の構築	1,500
30	同志社大学	工学	宇宙生体工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究	3,100

IV 2020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	龍谷大学	経済学	中山間地域(日伊)の農業/農村のソーシャルイノベーション研究	1,500
32	大阪経済大学	法学	外交的非難のジレンマの動態について	1,100
33	摂南大学	理学	男性不妊薬を指向した精子の受精能獲得を惹起する薬剤の創生	700
34	広島国際大学	医学	膝前十字靭帯再建後の効果的なリハビリテーションプロトコル確立	300
35	関西医科大学	医学	弾性線維の再生技術の開発	3,100
36	大阪成蹊短期大学	工学	動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用	800
37	関西学院大学	理学	高性能次世代有機系二次電池の開発	4,700
38	神戸薬科大学	医学	AAアミロイドーシス発症制御因子の解明	1,500
39	兵庫医科大学	医学	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明	3,100
40	福岡大学	医学	iPS細胞由来オータプス培養標本によるシナプス機能評価法開発	4,700
41	南九州大学	農学	高効率な無農薬害虫防除の実現に向けた昆虫ウイルス製剤シーズの探索	1,300
			配付額計	80,400

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

V 2020 年度（第 45 回）

学術研究振興資金 学術研究報告

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	旭 川 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	看護の学びを動機づけるアーリー・エクスポージャーの 検討と実践ー地域共生社会を見据えた看護の知と実践 をつなぐ教育への応用ー		研究分野 教育学
キ ー ワ ー ド	① 学習 ②動機づけ ③知識 ④看護実践 ⑤アーリー・エクスポージャー ⑥地域共生社会		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
泉 澤 真 紀	旭 川 大 学 保健福祉学部保健看護学科	教 授	研究責任者

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
栗 田 克 実	旭 川 大 学 保健福祉学部保健看護学科	准 教 授	調査協力 量的・質的分析協力
升 田 由 美 子	旭 川 医 科 大 学 医 学 部 看 護 学 科	教 授	データ収集
宮 地 普 子	北 海 道 医 療 大 学 看 護 福 祉 学 部 看 護 学 科	准 教 授	データ収集
盛 岡 淳 美	北 海 道 科 学 大 学 保 健 医 療 学 部 看 護 学 科	講 師	データ収集
吉 田 香	日 本 医 療 大 学 保 険 利 用 学 部 看 護 学 科	講 師	データ収集
江 本 千 晴	北 海 道 文 教 大 学 人 間 科 学 部 看 護 学 科	助 教	データ収集
岩 田 直 美	名 寄 市 立 大 学 保 健 福 祉 学 部 看 護 学 科	助 教	データ収集

看護の学びを動機づける アーリー・エクスポージャーの検討と実践 —地域共生社会を見据えた看護の知と実践をつなぐ教育への応用—

1. 研究の目的

本研究は、看護教育における早期体験実習（アーリー・エクスポージャー：以下、EE）の導入が、看護学生の学習の動機づけに有用性があるかどうかを検討し、地域共生社会に対応できる人材の育成ができるよう看護教育への示唆を与えることが目的である。

本研究は、当初3年間で教育への導入予定がコロナの影響を受け実質2年間の研究計画となった。そのため学習困難の実態調査の結果の検討とEEのプレ試験導入を最終的な目的とした。

2. 研究の計画

(1) EE導入を検討するためのプレ試験体験の準備と実施

地域におけるEEを実際に看護学生に体験してもらい、その体験の効果を対象者へのインタビューを通して質的に抽出する。

- ①対象者：EEを体験した看護学生
- ②調査時期：2018年9月～2019年12月
- ③調査方法：フォーカス・インタビューグループ、実体験のナラティブレポート。
- ④調査内容：a. どのような体験をしたか
b. 体験で印象に残っていること
c. 体験前後で考えたイメージの違い
d. 保健医療福祉についての課題、他

(2) 看護教育におけるEEの検討に入る前に、学びの視点から学習上のつまずきや困難さにおける実態を調査する。特に学生の学びに困難性を示す専門基礎科目（解剖生理学や病態学等）が看護に結びつく契機や、学習の動機づけの手がかり、困難さの原因を明らかにする過程を調べる中で、EE導入への糸口を探る。

- ①対象者：北海道11施設の看護系大学に依頼、同意を得られた施設の看護学生約500人程度
- ②調査時期：2020年4月～2021年3月
- ③調査方法：質問紙調査
- ④調査内容：a. 属性（性別、年齢、学年、入学時の状況）
b. 看護師志望理由、看護学実習の体験場所
c. 学習意欲、学習の動機づけ
d. 学習を続けていく中での困難、不安や悩み等

3. 研究の成果

コロナ禍で計画を2021年まで延長した成果は、以下である。

(1) EEに向けてのプレ実践

- ①2018年8月に2年生5名の看護学生を対象に、地方の体験学習をEEとして実施した。フォーカス・グループ・インタビューの結果、【地方は不便で劣ったイメージ】、【不意な契機から地方に興味・関心が突起される】、【地方や地域の実態が見え考えはじめる】、【地方医療の衰退に気づく】、【地方を知ってもらい対策を共に考える】の6つのカテゴリーが抽出された。このようなEEを通して、より積極的に低学年から看護学に関する出来事を、体験を通して関わることを通し、看護に対する興味・関心がさらに深まり、学習意欲を高める結果となった。
- ②2019年8月に2・3年生4名の看護学生を対象にEEを実施した。その後学びの体験をナラティブにまとめることでEEの効果を検証した。「（母性病棟で）赤ちゃんを抱っこさせてもらう経

験は、私にとってものすごく大きな体験でした。実習前にこんなことをさせてもらえるなんて思ってもみなかった。気持ちを楽にして質問もできて、すごくよかったです」「(高校生へのプレゼンテーションを通して) ついこの間まで自分たちもそうだったなと思い出し、こうして身近に感じる分、この子たちに私たちが手助けできることがあるかなと、この子たちが少しでも未来を描けるようなお手伝いができればと思いました」「(卒業生との交流で)手術室で働く先輩から、“手術室が楽しい”と聞いたとき、そう思える日が来るんだと思いました。やっけていて経験を積んだらやりがいが見つけ出せる現場ってすごいなと。私たち教科書で勉強しているだけではイメージがつかないです。現場を見ることはやはり大切です」以上のように、EEは机上の学習にはない体験を通してさらに看護に対する学習意欲を高め、自分のなりたい看護師像に近づき看護を推進していく力になっていることがわかった。

(2) 全道の看護系大学に「看護学生の学習上のつまずきと困難」を知るうえで、学習意欲と学習の動機づけに対する質問紙調査を依頼した。本大学を含めた6大学から回答を得た。6大学におけるまとめはこれからである。

本大学における質問紙調査については、

- ①看護学実習は、医療施設と福祉施設で行われており、実習以外の現場体験はボランティアやサークル等であり、その体験者は全体の2割弱であった。
- ②看護を目指す志望の動機は、経済的安定、社会性・将来性、看護への興味・関心で全体の約8割を占めていた。将来が見えずとりあえず看護に進んだ者も5%いた。
- ③学習の動機づけでは、現役生よりそれ以外の者の方が、外敵調整が有意に低かった。学年別では外敵調整に有意な差はなかったが、1年生は内発的動機づけ、同一化的調整、取入的調整が上級生よりも有意に高かった。
- ④学習意欲は、現役生より現役生以外の者が有意に積極的関与や継続意志が高かった。
- ⑤学習への興味・関心といった内発的動機づけよりも、むしろ職業として学ぶべき内容としての同一化的調整によって高く学習が動機づけされていた。反対に他人に言われて勉強するといった外敵調整は、他の動機づけに比して低かった。

以上の調査は、コロナ禍の影響を多大に受けているため、多くの臨地実習が中止されている中での調査であった。そのことを加味する必要があり結果の一般化には限界がある。

4. 研究の反省・考察

3年間の実施計画であったが、2020～2021年度はコロナの影響を多大に受け、1年間の研究費資金を2年間に切り替え実施した。さらに各大学への質問紙調査の受け入れが進まなかったことと、EEとしての積極的な実践現場体験もコロナ禍では断念せざるをえなく、教育への応用にまでは結びつけることはできなかった。

(1) EEに向けてのプレ実践

EEのプレ実践については、本計画以前より着手していたため、(1)の成果を待たず先進的に進めることができた。それにより対象者のインタビュー調査からEEの効果を検証することができた。しかしながら本研究のこの期間内では、それ以降の教育的導入には至ることはできなかった。今後も継続して検討を重ねる予定である。

(2) EEの検討前の学習意欲や動機づけに関する質問紙調査

2020年からのコロナ拡大により各大学へのアンケート依頼と受け入れが非常に困難になった。一部web調査に切り替えたが、他施設の受け入れのハードルが上がり、結果的に各大学の共同研究者に依頼し、6大学より回答を得ることができた。しかしながら各大学はコロナ対応に追われ、質問紙調査票回収がかなり遅れた。分析においては、本大学における集計にとどまり、6大学による集計はこれからである。今後大学生の学習の困難さとEE導入に向けての示唆を得る予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

泉澤真紀 : Insufficiency of nursing care and education in an aging society with low birth rate—Ethics and education of nursing that supports the OTAGAISAMA power for better living in a community society with symbiosis—、日本看護倫理学会誌、12 (1)、p72-24、日本看護倫理学会誌、2021

(2) 口頭発表

①泉澤真紀 : 看護学生が地域を見て知って体験して—早期体験学習としての地方・過疎地を見て看護に活かそう、日本看護倫理学会第13回年次大会（島根県松江市）、2020（コロナ禍により抄録発表）

②泉澤真紀 : 地域包括ケア時代に看護学生が地方で学ぶ看護の体験—看護カリキュラムにない、知的な好奇心に会う経験を通して、日本看護研究学会第46回学術集会（北海道札幌市）、2020（コロナ禍により抄録発表）

③泉澤真紀 : 看護大学生の学習継続のための学習意欲・動機づけに関する研究、日本看護研究学会第47回学術集会（宮城県仙台市）、2021（コロナ禍でオンライン開催にて示説発表）

④泉澤真紀 : 看護学生が地域をみて聞いて感じて—地域を学ぶ体験学習、日本看護学教育学会第31回学術集会（愛知県名古屋市）、Best Practice Competition参加、2021（コロナ禍でオンライン開催口説発表）

(3) 出版物

①泉澤真紀、山崎陽弘、他3名 : 地域を学ぶアーリー・エクスポージャーの役割—看護学生が過疎地域の道東根室地域をみて聞いて感じたこと、看護教育、61 (8)、p 762-769、2020

②泉澤真紀、栗田克実 : 看護大学生の学習継続のための学習意欲・動機づけに関する研究、旭川大学研究紀要、13、p19-26、2021

③泉澤真紀、栗田克実 : 看護大学生による道東根室圏域の体験学習からの学びと効果—地方・過疎地における医療の課題を見据えて、旭川大学研究紀要、14、p37-43、2022

ヒト脳オルガノイドの多機能同時計測法の開発と薬効評価

1. 研究の目的

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

2. 研究の計画

(1) 疾患 iPSC 由来脳オルガノイドの作製法の確立と脳オルガノイドのオシレーション特性の評価を行う。

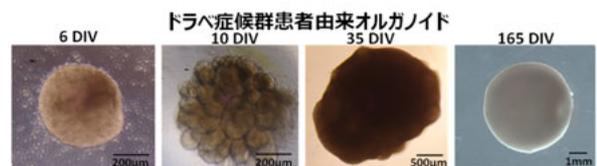
健常者 iPSC でこれまで実施してきた大脳皮質オルガノイドのプロトコルを用いて、疾患 iPSC から疾患脳オルガノイド作製プロトコルを検討する。作製した脳オルガノイドを平面微小電極アレイ（MEA）上にマウントし、電気活動の周波数特性を明らかにする。ウェーブレット変換、FFT等の解析手法で、各周波数成分の強度を定量し、健常者と各疾患脳オルガノイドの周波数特性の差異を明らかにする。

(2) 細胞外電位と同時に主要な神経伝達物質であるグルタミン酸・GABA 放出量を計測可能な酵素電極を開発する。

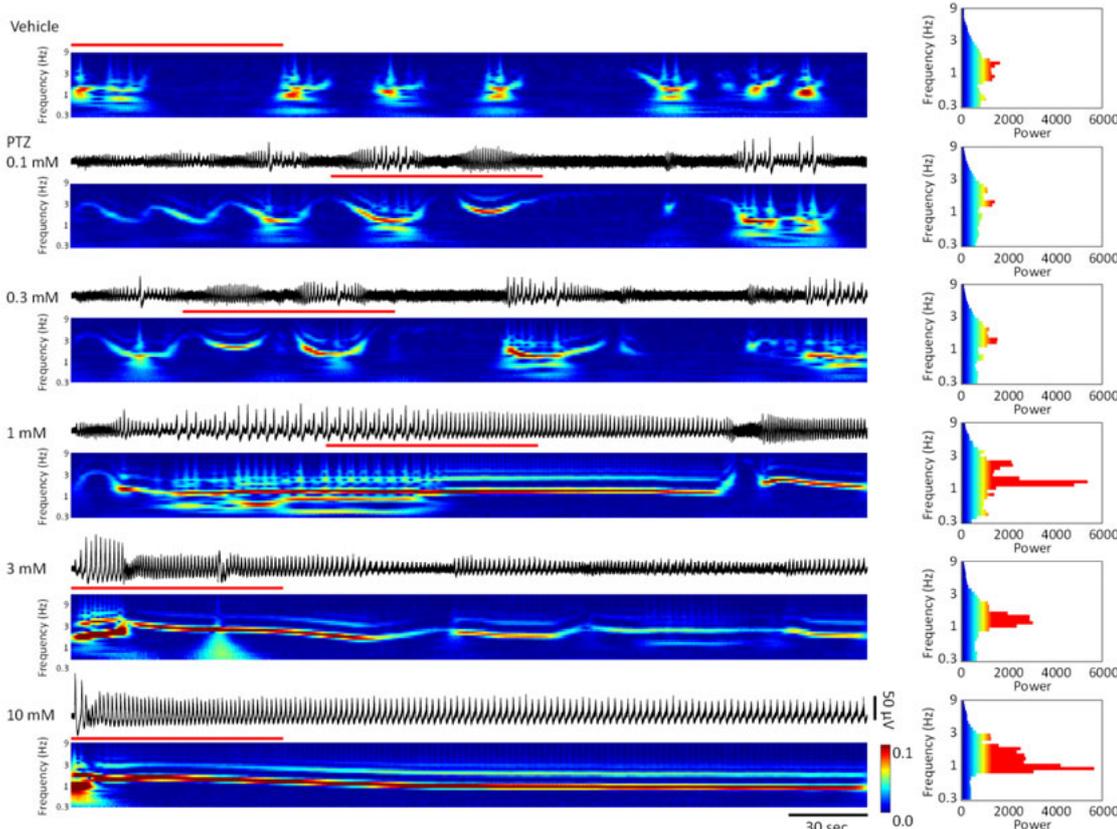
グルタミン酸、GABAを電気化学的に検出する為に、酵素電極を作製する。Glutamate oxidase (GOx) 及びGABA酵素の電極への塗布法を検討し、グルタミン酸及びGABAの検出感度を明らかにする。検出限界濃度100nM以下、線形検出範囲0.1-10 μ Mを達成目標とする。

3. 研究の成果

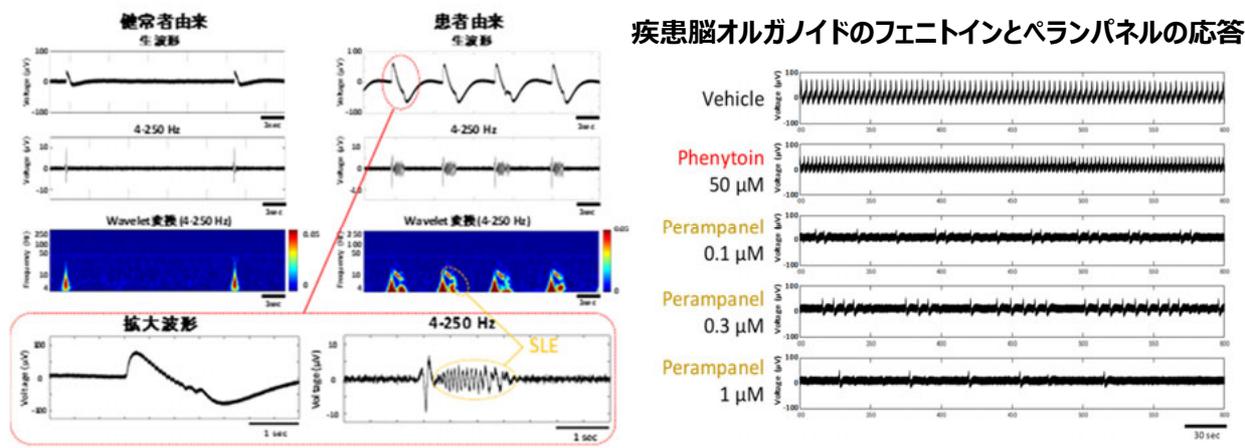
(1) 疾患ヒト iPSC 株、健常者株を用いて、脳オルガノイドの作製を行った。本年度は、初めに脳オルガノイド作製の成功率向上の鍵となる iPSC 細胞の純化プロトコルを検討した。プレートコーティングを Vitronectin XF™、培地を mTeSR Plus、細胞剥離剤を ReLeSR™に変更し、細胞剥離時にスクレーパーを使用しないプロトコルを確立したことで、オルガノイド作製効率が上昇した。但し、株間でオルガノイド作製効率が異なった為、各疾患株から最も成功率の高い株を選定し、優先的に作製することとした。オルガノイド作製過程において、(1)Embryoid Body formation 形成後（24 時間後）、形態が丸くなめらかなエッジであること、(2)Induction（Day5-7）時に外周が半透明かつなめらかなエッジであること、(3)Expansion（Day7-10）時に表面から出芽が観察されることの3つの評価指標を設けた。作製した脳オルガノイドは、大脳皮質関連マーカーである CTIP2, β -tubulinIII, SOX2, PAX6 の発現が免疫染色により確認された。



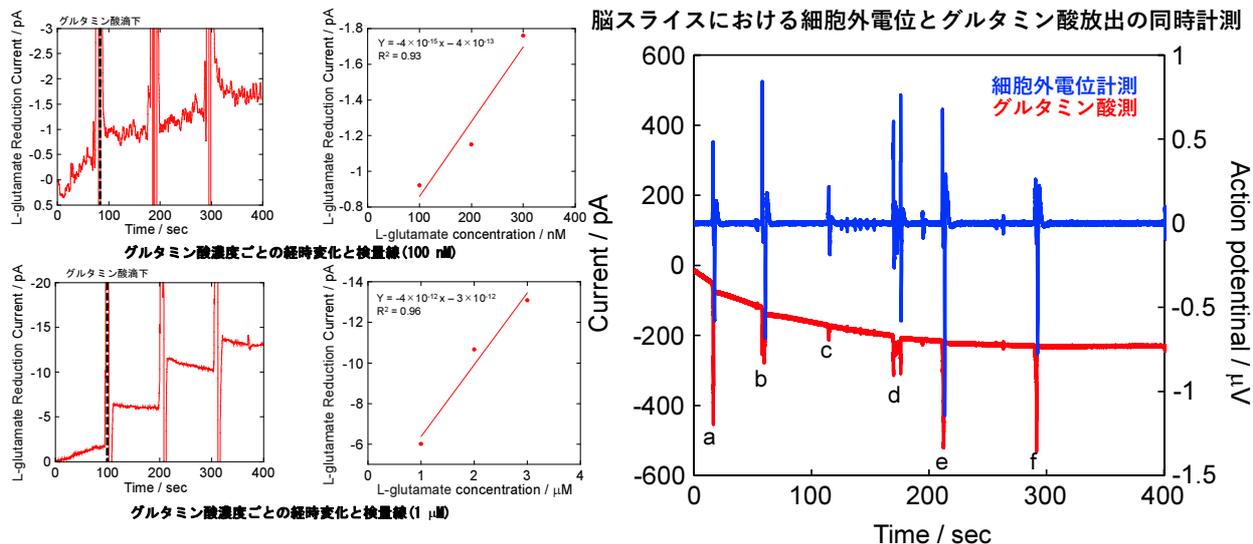
脳オルガノイドの電気活動における周波数解析法を検討した。健常者脳オルガノイドに痙攣陽性化合物であるペンチレンテトラゾール（PTZ）を投与したところ、培養細胞とは異なり、強い同期バースト発火が急激に現れ、持続する *in vivo* に近い応答が検出された。周波数特性の評価として、同期バースト発火のオシレーション特性を低周波数に着目して解析した結果、下図に示すように、1~3Hz のオシレーションが用量依存的に持続し、規則性が高くなる傾向が見られた。下図は、強い同期バースト発火が見られた直後のウェーブレット変換画像である。また、各同期バースト発火における 10Hz~250Hz の強度を解析したところ、用量依存的な強度の上昇が認められた。すなわち、同期バースト発火の発生パターンと同期バースト内の発火強度が変化していることがわかった。更に、周波数解析の結果から、一見ノイズのように見られる波形にも低周波成分に電気活動情報が内在していることがわかった。脳オルガノイドの MEA 計測法を行う上で重要な知見を得られた。これらの成果は、現在、論文投稿中である。



また、疾患脳オルガノイドの電気活動において、250Hz 以下の成分が同期的活動後に持続的に活動する Seizure-like event (SLE) が観察された (下図)。疾患患者由来の特徴の一つとして着目している。疾患脳オルガノイドにおける抗てんかん薬の応答を評価した。Na⁺チャンネルの阻害剤である旧世代の抗てんかん薬フェニトイン投与で、同期的活動が上昇し悪化する現象が観察され、新世代の抗てんかん薬であるペランパネルで同期活動頻度の減少が認められた (下図)。



(2) シナプス機能である神経伝達物質の放出を細胞外電位 (活動電位情報) と同時に計測する為に、カーボンナノチューブ (CNT) を電極材料とした CNT 電極を開発した。本年度は、主要な神経伝達物質であるグルタミン酸を計測する為に、酵素を塗布した CNT 電極を開発した。Glutamate oxidase (GOx)によりグルタミン酸を選択的に酸化し、発生した H₂O₂を西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を用いて高感度に検出する方法である。GOx や HRP を CNT 電極にコーティングする方法を検討した結果、H₂O₂ の検出において、1nM の検出感度と 50nM までの線形性 (R=0.99) を確認できた。50×50μm の微小電極において最も優れた感度特性を有している成果が得られた。また、グルタミン酸の検出限界 100nM 以下、線形性検出範囲 0.1-10μM を達成した (下図)。作製したグルタミン酸計測用 CNT 電極を用いて、脳スライスの海馬領域を計測したところ、グルタミン酸の放出と活動電位の同時計測にも成功した (下図)。



4. 研究の反省・考察

(1) 疾患脳オルガノイドの作製および電気活動特性を検出できた点は、研究が順調に進んでいると言える。作製プロトコルの検討により、作製効率は向上したが、さらに向上させるためには、作製プロトコルの改良は必要である。健常者脳オルガノイドへのPTZ投与で、培養細胞には見られない、強い同期バースト発火の急激な出現、および持続する活動が検出された点は *in vivo* の応答に近く、*in vivo* への外挿性を検討していく上で有効な現象であると考えている。しかしながら、全てのオルガノイドサンプルで同様の現象が見られるとは限らない。脳オルガノイドの作製状態と活動状態の関係性を見出して行くことが信頼性の高い評価系を構築する上で重要であると考えられる。今後の課題としたい。疾患患者由来脳オルガノイドにおいて、抗てんかん薬であるフェニトインは適さず、ペランパネルは効果があることを示す結果が得られた。難治性てんかんでは、薬剤の選択は、医師の経験に頼るところが大きく、薬剤によっては症状を悪化させる為、至適抗てんかん薬を選定する方法が強く求められている。本研究成果は、疾患脳オルガノイドのMEA計測が、至適抗てんかん薬の選定法として有効である可能性を示唆している。同じ疾患の複数のiPS細胞株から作製した脳オルガノイドで共通する特徴が得られるかが今後の課題である。

(2) GOx と HRP の CNT 電極表面への塗布条件を明らかにしたことで、グルタミン酸の検出感度 100nM 以下、線形検出範囲 0.1-10 μ M を実現し、脳スライスからの活動電位とグルタミン酸の同時計測に成功した。脳オルガノイドからのグルタミン酸放出計測へ移行できることが示唆された。しかし、脳スライスの実験から、電極毒性を考慮する必要性も明らかとなり、今後脳オルガノイド計測における条件を検討する予定である。GABA の検出には、GABA 特異的な酵素を使用した。グルタミン酸との明確な選択性が得られなかった。酵素の種類および検出法を再検討する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① R Roberts, S Authier, D Mellon, M Morton, I Suzuki, RB Tjalkens, JP Valentin, JB Pierson, Can We Panelize Seizure?, Toxicological Sciences, 179, 3-13, 2021
doi:10.1093/toxsci /kfaa167.
- ② Yuan X, Schröter M, Obien MEJ, Fiscella M1, Gong W, Kikuchi T, Odawara A, Noji S, Suzuki I, Takahashi J, Hierlemann A, Frey U, Versatile live-cell activity analysis platform for characterization of neuronal dynamics at single-cell and network level, Nature communication, 11, 4854, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18620-4.
- ③ 鈴木郁郎, ヒト iPS 神経の機能を指標とした医薬品の神経毒性予測および薬効評価への取り組み, 日本薬理学会誌, 155, 5, 2020, p289-294

- ④白川誉史, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた痙攣評価系の検討, 日本薬理学会誌, 155, 5, 2020, p284-288
- ⑤鈴木郁郎, 木村剛 第Ⅲ編 第9章 脱細胞化脳, “脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用” シーエムシー出版

(2) 口頭発表

- ①鈴木郁郎, “iPS 神経の電気活動に基づく創薬支援”, New ノーマル ～iPS 細胞由来神経細胞の夢を語る～ニコン・エリクサジェン サイエントフィック社ジョイントセミナー、パネルディスカッション 2020/11/19
- ②鈴木郁郎, “in vitro ヒト神経機能を指標とした創薬利活用”, 第 58 回日本人工臓器学会、特別企画 1 [日本から世界へ発信する人工臓器学] 2020/11/12-14
- ③鈴木郁郎, “神経機能を指標としたインビトロ毒性評価試験と AI”, 第 47 回日本毒性学会学術年, 日本薬理学会合同シンポジウム: 化学物質の神経毒性評価の現状と課題, 2020/6/29～7/1
- ④Shuhei Noji, Yuri Kato, Naoki Matsuda, Tadayuki Taura, Yusuke Oike Ikuro Suzuki . Evoked Responses to Electrical Stimulation in Acute Brain Slice Using a High-Density and Large-Scale CMOS-MEA System. SAFETY PHARMACOLOGY SOCIETY VIRTUAL MEETING, Dynamic presentation, September 14-17, 2020, Virtual. 口頭発表セッション
- ⑤横井 れみ, 石橋 勇人, 松田 直毅, 永福 菜美, 鈴木 郁郎, ”脳オルガノイドの MEA 計測”, 第 94 回日本薬理学会年会, 一般演題(口頭), 2021 年 3 月 8-10 日.

(3) 出版物

なし

ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御 —マウス乾癬モデルを用いて—

1. 研究の目的

(1) 本研究では、ドーパミンとその関連因子によるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、皮膚炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性自己免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供することを目的としている。炎症性自己免疫疾患は、免疫システムが免疫賦活物質（アジュバント）に応答する際に、自己に対して免疫活性化し、自然免疫応答および獲得免疫応答を誘導することで誘発される。自然免疫応答においてアジュバントは、マクロファージや顆粒球に直接作用し、炎症性サイトカインを分泌させることで炎症反応を誘発させる。一方、獲得免疫応答においてアジュバントは、その種類によって未熟 T 細胞を、T helper (Th) 1（細胞内寄生細菌、ウイルス感染に対処）、Th2（抗体産生、寄生虫に対処）、Th17（細胞外細菌、真菌に対処）に分化させる。しかしながら一方で、炎症性自己免疫疾患においてはこれらの Th は炎症性疾患、アレルギー、喘息、好酸球性炎症、自己免疫疾患、および、好中球性炎症を誘発する。このことから Th の分化を制御することで、これらの疾患を抑制できると考えられる。

そこで我々は、獲得免疫応答において、未熟 T 細胞が成熟 T 細胞に分化する際に、Th1, Th2, または Th17 に選択的に分化誘導させる物質をスクリーニングする系を構築した (BBRC, 2008)。この系を利用して、複数の試薬や上市薬をスクリーニングした結果、免疫活性化の際に Th2 および Th17 を誘導する物質としてドーパミンを同定し (Int. Immunol., 2009, J. Immunol., 2011)、Th2 および Th17 を顕著抑制する物質として、ドーパミン D1 受容体アンタゴニストを同定した (J. Immunol., 2011)。Th2 および Th17 が、アレルギー、喘息、自己免疫疾患に関与していることから、ドーパミン D1 受容体アンタゴニストがこれらの疾患の発症を抑制する予防的効果があると期待された。実際、種々の自己免疫病マウスモデルにパーキンソン病の治療薬を予防的に投与すると、病勢を抑制した。

(2) さらに御事業団の第 43, 44 回学術研究振興資金による援助により、ドーパミン D2 受容体アンタゴニストとして新規にタンニン酸を同定し、期待したとおりタンニン酸は、サイトカイン分泌を転調し、大腸炎、乾癬、歯周病の病態を著しく改善させるという結果を取得した (Int. Immunol., in revision) (特許第 6562332 号 (2019 年 8 月 2 日登録))。また、ドーパミン受容体シグナルによる抗炎症作用のメカニズムを解明した (Int. Immunol., 2018)。加えて、アデノシンが高選択的に Th17 への分化を強力に誘導し、アデノシン受容体アンタゴニストがこの分化を抑制することを世界に先駆けて発見した。この効果はマウス乾癬モデルで証明された。アデノシンの原料であるアデノシン 3 リン酸は、ドーパミンを含む分泌小胞と同じ小胞内に大量に含まれていることから、ドーパミンによる Th17 誘導とアデノシンとの関連が示唆される。

(3) 本研究では、共に G タンパク質共役受容体であるドーパミン受容体とアデノシン受容体のシグナル伝達を解析し、ドーパミンおよびアデノシンが好中球性炎症を誘導するメカニズムを解析する。また、これらの受容体を介した好中球性の炎症性自己免疫疾患に対する効能を解析する。これらの解析により、ドーパミンやアデノシンを介した好中球性炎症の新規誘導メカニズムが明らかになると期待される。また、既存のアデノシン受容体アンタゴニストが好中球性自己炎症疾患へ効能があることを示すことで、アデノシン受容体アンタゴニストの用途拡大に繋がり、好中球性自己免疫疾患に対する治療方法が広がることから、社会的にも有益であると考えられる。

2. 研究の計画

(1) アデノシン受容体アンタゴニストによる Th17 抑制機構の解析

ドーパミンは Th2 と Th17、アデノシンは Th17 の分化を誘導し、それらのアンタゴニストは、それらの誘導を抑制することが明らかになっている。しかしながら、分化した Th 細胞からのサイトカイン分泌をこれらのアンタゴニストが抑制するという直接的なデータは得られていない。そこで、マウス混合リンパ球反応中に、これらのアンタゴニストを加えると各 Th 細胞

の分化が抑制されること、および、分化した Th 細胞からのサイトカイン分泌をこれらのアンタゴニストが抑制することを示すために以下の実験を行う。

- ① マウス混合リンパ球反応に、各アンタゴニストを加え、アデノシン受容体アンタゴニストが IL-17 の分泌を抑制することを ELISA 法で解析する。
- ② マウス未熟 T 細胞から、Th17 細胞を誘導し、アデノシン受容体アンタゴニスト存在下、CD3/28 抗体で刺激して、Th17 細胞に特徴的な IL-17 の分泌を ELISA 法で解析する。

(2) アデノシン受容体アンタゴニストの好中球性炎症抑制機構の解析

本研究で、ドーパミン受容体アンタゴニスト、および、アデノシン受容体アンタゴニストが抗原提示細胞からの、アデノシン放出を抑制し、このことが Th17 誘導を抑制するというモデルが示されると期待される。また、これらのアンタゴニストは、既に誘導された Th17 の活性化も抑制するというモデルが示されると期待される。このモデルから、これらのアンタゴニストが好中球性炎症を顕著に抑制する可能性が示唆される。ここでは本研究のまとめとして、好中球性炎症モデルとしてモデル動物を用いて、自己免疫性脳脊髄炎、好中球性気道炎症、乾癬、に対する、これらのアンタゴニストの効能を解析する。このために以下の実験を行う。

- ① 好中球性炎症モデル動物に、アデノシン受容体アンタゴニストを投与し、これらのモデル動物の病態の改善を解析する。
- ② モデル動物の疾患部位の組織切片を作製し、組織染色して、各アンタゴニスト投与により免疫細胞の浸潤が抑制され、好中球性炎症が抑制されることを解析する。

3. 研究の成果

(1) アデノシン受容体アンタゴニストによる Th17 抑制機構の解析、を行い、以下の成果を得た。

- ① マウス混合リンパ球反応にアデノシンを添加すると添加量依存的に IL-17 の分泌が増大することを明らかにした。この増大は 600 μ M のアデノシンを添加した場合に最大となった。
- ② マウス混合リンパ球反応におけるアデノシン依存的 IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体作動薬の添加によっても誘導されることを明らかにした。
- ③ マウス混合リンパ球反応におけるアデノシン依存的 IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体拮抗薬の添加によって抑制されることを明らかにした。
- ④ マウス CD4 陽性 T 細胞をアデノシン存在下で抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激するとマウス混合リンパ球反応と同様に IL-17 の分泌が誘導されることを明らかにした。
- ⑤ 抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激したマウス CD4 陽性 T 細胞におけるアデノシン依存的な IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体作動薬の添加によっても誘導されることを明らかにした。
- ⑥ 抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激したマウス CD4 陽性 T 細胞におけるアデノシン依存的な IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体拮抗薬の添加によって抑制されることを明らかにした。
- ⑦ Th17 細胞のマーカーである CCR6 を指標に単離した CD4 陽性 T 細胞をアデノシン存在下で抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激するとマウス混合リンパ球反応と同様に IL-17 の分泌が誘導されることを明らかにした。その一方で Th1 のマーカーである CCR3、および、Th2 のマーカーである CCR4 を指標に単離した CD4 陽性 T 細胞をアデノシン存在下で抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激すると IL-17 の分泌は誘導されなかった。
- ⑧ マウス未熟 T 細胞から Th17 細胞を誘導した後、抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激すると IL-17 の分泌はアデノシンの添加によってさらに上昇した。

(2) アデノシン受容体アンタゴニストの好中球性炎症抑制機構の解析、を行い、以下の成果を得た。

- ① アデノシン A2a 受容体拮抗薬の経口投与は、実験的マウス脳脊髄炎の症状を改善させた。
- ② アデノシン A2a 受容体拮抗薬の塗布は、マウス乾癬モデルにおける症状を改善させた。
- ③ アデノシン A2a 受容体拮抗薬の経口投与は、マウス好中球性気道炎症モデルにおける症状を改善させた。

④ アデノシンA2a受容体拮抗薬の経口投与による実験的マウス脳脊髄炎の症状の改善において、アデノシンA2a受容体拮抗薬の経口投与はマウス脊髄におけるリンパ球の浸潤が抑制されることを、モデル動物の疾患部位の組織切片を作製し、組織染色することによって解析した。

4. 研究の反省・考察

(1) 本研究では、ドーパミンとその関連因子によるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、脳脊髄炎、乾癬、好中球性気道炎症、アトピー性皮膚炎などの、好中球性の炎症疾患および自己免疫疾患に効果のある新規治療薬を提供することを目的とした。実際、ドーパミンと同様に神経伝達物質であるアデノシンの免疫学的機能を詳細に解析し、アデノシンが CD4 陽性ヘルパーT 細胞に作用し、IL-17 の分泌を誘導することを明らかにした。

(2) 本研究ではさらに、免疫活性化の刺激によって様々な免疫細胞から細胞外にアデノシンが放出されること、また、細胞外アデノシンはアデノシン A2a 受容体を介して CD4 陽性ヘルパーT 細胞に作用し、IL-17 の分泌を誘導することを示した。さらに、このアデノシン特異的 IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体拮抗薬、および、A2a 受容体シグナルの下流に位置するアデニル酸シクラーゼおよびプロテインキナーゼ A の阻害剤の投与によっても阻害された。CD4 陽性ヘルパーT 細胞の小集団の解析によって、アデノシン特異的な IL-17 の分泌を誘導している細胞は、表面に CCR6 を発現している Th17 細胞であることが示唆された。一方、IL-17 は好中球性炎症の主体であり、自己免疫疾患の誘導にも関与していることから、アデノシン特異的 IL-17 の分泌を抑制するアデノシン A2a 受容体の拮抗薬は、自己免疫疾患の抑制に効果がある可能性が示唆された。実際、我々の解析によって、アデノシン A2a 受容体の拮抗薬であるイストラデフィリンの投与により、マウスモデルにおいて、脳脊髄炎、乾癬、好中球性気道炎症、アトピー性皮膚炎の病態が改善することが示唆された。

(3) 一方、アデノシンのアデノシン A2a 受容体へのアゴニスト作用がどのような分子メカニズムで IL-17 の産生・分泌を誘導しているのかは今回の研究では明らかにできなかった。この分子メカニズムを解明することで、好中球性炎症疾患および自己免疫疾患の抑制剤の標的となる新規の分子も明らかになるものと期待されるので、アデノシン A2a 受容体シグナルの活性化による IL-17 の分泌制御の詳細なメカニズムの解析が待たれる。

(4) また、本研究では、生体外からアデノシンやアデノシン A2a 受容体の作動薬である PSB0777 が、アデノシン A2a 受容体を介して Th17 からの IL-17 分泌を誘導し、この分泌をアデノシン A2a 受容体の拮抗薬であるイストラデフィリンの添加で抑制すると、好中球性の自己免疫疾患を含む炎症性疾患に有効であることを解析したが、生体内でも内在性の細胞外放出アデノシンが Th17 に発現しているアデノシン A2a 受容体に作用することで IL-17 の分泌を誘導していることを解析する必要があると思われる。生体内で細胞外にアデノシンを産生する細胞としては、免疫細胞の他に CD39 および CD73 を発現している内皮細胞が候補に挙げられる。細胞外アデノシンの産生は、細胞外に放出された ATP が細胞膜表面に局在する修飾酵素である CD39 と CD73 の働きによってアデノシンに変換される経路が主体であると考えられている。生体内では、Th17 細胞が内皮細胞と相互作用し、その際にアデノシン A2a 受容体を介して内皮細胞から放出されるアデノシンを受容し、これによって Th17 からの IL-17 分泌が誘導される可能性が考えられる。この可能性を示すためには、内皮細胞と Th17 細胞との間の相互作用を解析するための系を構築し、内皮細胞からのアデノシン分泌が Th17 細胞からの IL-17 分泌に利用されていることを解析することが必要だと考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Istradefylline, an adenosine A2a receptor antagonist, ameliorates neutrophilic airway inflammation and psoriasis in mice. M. Tokano, M. Kawano, R. Takagi, S. Matsushita. 2021, biorxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.21.445220>

- ② Extracellular adenosine induces hypersecretion of IL-17A by T-helper 17 cells through the adenosine A2a receptor to promote neutrophilic inflammation. M. Tokano, S. Matsushita, R. Takagi, T. Yamamoto, M Kawano. 2021, biorxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.29.441713>.
- ③ Tannic acid, a dopamine receptor agonist, ameliorates periodontitis, atopic dermatitis and psoriasis in animal models. R. Takagi, M. Kawano, T. Sato, S. Matsushita. Current Trends in Immunology 22:11-17, 2021.
- ④ 特願2020-148336、発明の名称：アデノシンA2A受容体の活性化を抑制する組成物 発明者：川野雅章、松下祥、高木理英、戸叶美枝子
- ⑤ 特願2020-109854、PCT/JP2020/43886、発明の名称：アデノシン産生酵素を標的とする組成物 発明者：川野雅章、松下祥、高木理英、戸叶美枝子
- ⑥ 特願2019-195478、PCT/JP2020/24876、発明の名称：アデノシンA2A受容体を標的とする組成物 発明者：松下祥、川野雅章、高木理英、戸叶美枝子

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

多種における心臓の発生発達機構の解明

—心臓の物理学的形成を定量的に調べる 3D 検出装置の開発—

1. 研究の目的

近年生物の胎児・胚期における発生・発達において、遺伝的以外の環境による各臓器の発生・発達や配置の影響についての興味が高まっている。ヒトで言えば、先天的と言われる出生時の疾患においても、母胎内の環境の影響を否定できない。そこで、我々はモデル生物として、ニワトリとゼブラフィッシュを主に用いて、環境が与える発生への影響について調べる。独創的な点は、生物の発生期の物理・化学的環境をアクティブに制御して、その環境が発生に与える長期的な影響・応答を調べる点である。そのためには装置の創作からスタートする必要がある。ニワトリをモデル生物にする理由は、ニワトリ胚が環境下でバランスを取りながら各臓器のサイズ・配置などが相補的に決定して、わずかな初期段階における環境の差が個体差になるとの推論がある(T. Mikawa, et al., *Seminars in Cell & Developmental Biology* **18**, 90, 2007)。また、ニワトリ胚は、殻外での孵化に成功した田原氏の無殻培養法 (Y. Tahara, et al., *JPSA*. 51, 307-312, 2014)を適用することにより、*in vivo* としての直接観測が可能になった。そこで、環境制御の装置製作と無殻培養法により発生初期における環境が発生に与える影響の直接観測を試みる。特に発生において最重要と思われる心臓を器官として選択する。心臓観測は *in vivo*, *in vitro* そして、拍動のダイナミクスにフォーカスをする。ゼブラフィッシュにおいては、具体的に生命科学的見地から、これらの骨魚類の心臓発生において、Elastin b タンパク質による細胞外環境の粘弾性の変化が心臓を構成する細胞の細胞運命決定に重要な役割を担っていることが示唆されている (Moriyama et al., *Nat Commun* 2016)。そこで本研究では心臓に存在する細胞外マトリックスの粘弾性を測定することにより、心臓の受ける物理的環境と心臓の硬さ、そして心臓の形態変化の相関を見出す。よって、研究の目的を下記の(1) (2)とする。

(1)ニワトリ胚の無殻培養法を行い、ニワトリ胚の心臓の発生期における心臓の 3D 観測をしながら心臓の形状変化、硬さ、拍動 (拍動間隔、血流)を解析する。物理的環境や胎児のサイズを評価して、心臓の形態変化との相関を調べる。ゼブラフィッシュでは、発生期の心臓の硬さの変化を捉える。

(2) **active** に物理的環境を制御するシステムを構築する。そして、**Feedback** 機構の付加により、外的環境を心臓の発生・発達の状況により調整する。

2. 研究の計画

(1)心臓発生の観測

①ニワトリ胚の発生期における心臓の形態変化と拍動を、個々のニワトリ胚の成長と共に時系列で観測する。そのために断層像を含む 3D 観測を行う必要があり、光干渉断層撮影(OCT)を行う。胚自体の観測は、インキュベータ内に光学的観測系を構築して長期的に行う。胎児のサイズを評価して、心臓の形態変化との相関を調べる。光学顕微鏡により、拍動の観測(拍動、拍動間隔、血流)を行う。

②物理的環境の制御により、個体の発生、成長と心臓の形態変化や拍動との相関を観測する。具体的には、すでに **fatal** と知られているエタノールやアセトアルデヒドの添加、次に、低温下(30°C)において、ニワトリ胚とその心臓の観測をする。特に心臓の形態がチューブ状から、ヒトと同様の4つの心房・心室へとドラマティックに変化する E1 から E4 期にフォーカスをする。

③高速画像処理の観測系のテストを兼ねて、組織片(φ300μm 程度)の心房、心室の自律拍動の観測をインキュベータ内で長期的に行い、48h 以上の観測により自律拍動の安定性を観測する。次に組織片を物理的に接触させて、個々の自律拍動の同期化の可能性を調べる。この観測系においては、画像処理から、拍動間隔、オプティカルフローによる拍動モーションなどの生理学的な情報のオートメーションによる定量化のフローも構築する。

④真骨魚類のモデル生物としてゼブラフィッシュを用い、心臓を脱細胞化し細胞外マトリックス

スのみを残すことを試みる。いくつかの先行研究において複数の異なる手法が用いられており、まずはそれらを追試する。脱細胞化したサンプルを原子間力顕微鏡によって測定するために、カンチレバーの先端に直径 5 μ m 程のビーズを付加するなど、生体組織に適した条件を検討する。

(2) Feedback 機構付きの物理的環境制御システムの構築

①active に物理的環境を制御するシステムを構築する。そして、Feedback 機構の付加により、外的環境を心臓の発生・発達の状況により調整する。本年度は、有精卵の注文から実験までの三週間に及ぶ研究サイクルに関して、様々な時間制限を受けたので、リモート・オートメーションでの観測が可能な実験と装置開発に集中した。まずは *in vitro* による心筋+繊維芽細胞の共培養を行い、安定した周期的自律拍動をする心筋細胞に力学的刺激を与える系を構築して、その刺激に、Feedback 機構を付加する。この機構は、リアルタイムで画像処理を行い、拍動の情報を取得して、特に拍動のタイミングと刺激のタイミングの位相制御をゴールとする。

3. 研究の成果

(1) 心臓発生の観測

①, ②ニワトリ胚の発生期における心臓の形態変化、拍動をE4まで、OCTにより観測することに成功した。OCTステージ状に、インキュベータ内と同様の温度を維持する装置を自作した。成果として、個々のニワトリ胚の光学的観測(図1)とOCT像の3D 画像取得(図2)に成功した。下記のコントロールの生存率から、観測によるダメージはなしと判断できた。OCTによる断層像を含む3D像と、インキュベータ内への観測系の構築によるニワトリ胚の長期的な観測により、胚のサイズと、心臓の形態変化との相関を調べることが可能になった。また、現在、光学顕微鏡の解析による血流の流量の見積もりと心臓機能の定量化も行っている。

環境に変化を与えたニワトリ胚のE4までの生存率は、エタノールは67%、アセトアルデヒドは93%、低温下(30 $^{\circ}$ C)は90%で、コントロールは90%だった。nativeの殻内における生存率は90%程度より、エタノール以外の環境変化による生存率への影響はなかった。一方で、エタノール投与の生存率は先行研究と同程度だった。よって、無殻培養とOCT観測によるニワトリ胚の生存への影響はなしと判断できる。エタノール投与では、チューブから4つの部屋に分離する過程において、一時、LOOP状になるが、その際に、その曲率と、チューブの体積にコントロールとは、顕著な違いがみられた(図3)。また、拍動間隔にも不整脈の振る舞いが見られた。拍動間隔の不安定化は、他の環境変化では見られなかった。現在、その違いを統計的に評価するために

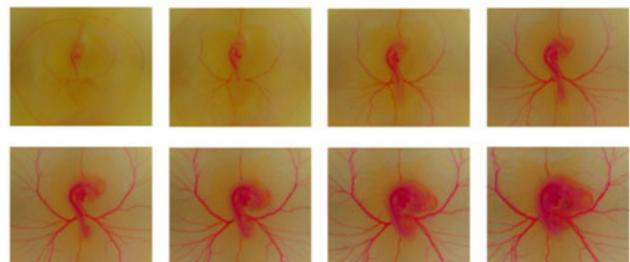


図 1. インキュベータ内のニワトリ胚観測. E1~E4 までの胚のサイズと血管の評価を行う。

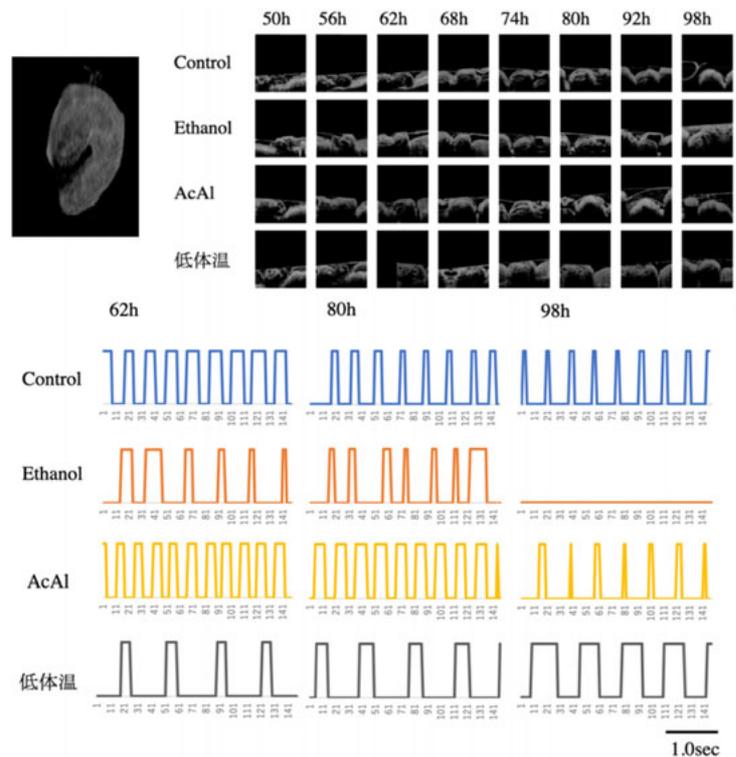


図 2. E2 の心臓の OCT3D 像と 2D 断面図の時系列、そして 2D の連続画像から評価した拍動間隔。

継続して実験を続けている。

③心房と心室の組織片 ($\phi 300\mu\text{m}$)における拍動の長期的観測 (> 40h連続)に成功した。二つの部位の自律拍動の間隔、拍動モーションを実験的に評価した。次に組織片のペアを接触させ、部位による同期の確率を評価した。この同期化の観測は、典型的な倒立顕微鏡の培養ステージ状では、サンプル数に制限があり、また、二日間程度の長期的な撮影期間が必要となるため、複数の高解像度USB顕微鏡をインキュベータ内に設置するなど、観測系を自作した。結果は、ペア種(心室-心房、心房-心房など)によって拍動の同期化時間が異なった。特筆すべき点は、心房はアクティブなクロックの役割を担い、心室は能動的に拍動の伝搬を受け入れていた。また、同期する前の拍動の動きをオプティカルフローにより、時系列で調べた。その結果として、二つの組織片の接触面の動きが同期化に重要であることを発見した。[S. Arai and T. Mitsui, Bioeng. J7(3): 81, 2020]。

④脱細胞化については複数の手法を試みた結果、界面活性剤を用いる手法によって効果的に脱細胞できることを見出した。他の手法としては凍結融解を繰り返すなどがあるが、この手法では組織が破壊されてしまった。原子間力顕微鏡による細胞外マトリックスの粘弾性の測定では、カンチレバーにビーズを付加する手法を確立し、実際に粘弾性の測定をおこなうことができた(図4)。

(2)Feedback 機構付きの物理的環境制御システムの構築

①自律拍動を行う細胞の集合体に対して、リアルタイム画像プロセッシングにより、その自律拍動との位相を制御して、物理的刺激を長時間にわたり与える装置を完成した。つまり、Feedback 機構の付加した刺激系の装置開発に成功した。時定数は100 msecで、自律拍動と逆位相で刺激を与える場合は問題ないが、自律拍動のタイミングで刺激をする場合は、一周分、遅らせて刺激を行うことで、位相差制御による力学的刺激を行うことができた。この100 msecの遅れを短くするために、画像処理の高速化、カメラのアップグレードを検討している。また、先駆的结果として、自律拍動と同位相/逆位相における刺激への応答は、生理学的(拍動間隔とその分散)に違いが観られた。一方で、生物学的(細胞の集合体の形状や、共培養による繊維芽細胞の増量)には、その多くに違いが観られるのだが、刺激開始時(初期条件)の個体差を引きずっている可能性があるため、初期条件の統一が今後の鍵となる。しかし、位相差制御による外部刺激を自律拍動の拍動リズムへの散逸と考えれば、位相による応答の違いが観測ができたことは生理学的・物理的にとても興味深い。

4. 研究の反省・考察

(1)心臓発生の観測

①、②本研究振興資金により購入したOCTの高速波長スイープ用の光源により、心臓の発生の3D観測に成功した。特にチューブから心房・心室の4つの部屋への形状の変化を定量的に捉えることができた。OCTステージ上に培養環境の構築を試みて、安定した拍動を継続的に得られるセルを完成させたが、有精卵の無殻培養による個々の成長と、その環境による発生の違いを統計的に議論するためには、1個体の継続的観測よりも、異なる環境を与えた10個体程度のニワトリ胚の平行観測のほうが望ましい。結果的に、4時間、あるいは6時間ごとに、10個体程度の胚の成長を、マニュアル操作によりOCTによる観測を行った。光学的観測による血流や個体のサイズと心臓の発生との相関の解析に関して、簡易的だが、血管の断面積を定量化する必要があり、今後は、心臓以外の血管等のOCT観測も必要と判断した。

③組織片による同期化の実験は、長期的に安定した観測を続けることにより成功した。特に部

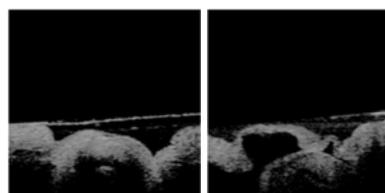


図3. E3.5の心臓のOCT像. 左図は control で右図はエタノール投与の心臓断面で、エタノール投与の心室体積の増加が顕著に表れた。

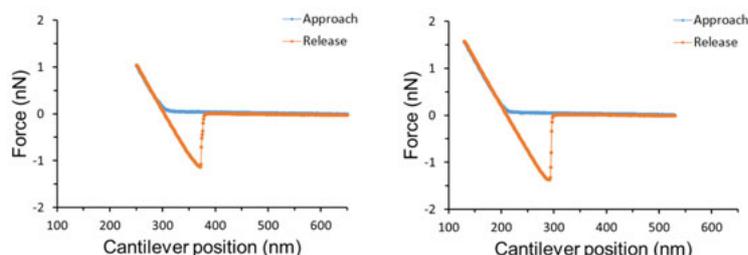


図4. 細胞外マトリックスの粘弾性の測定. ゼブラフィッシュの心臓を脱細胞化し細胞外マトリックスの粘弾性測定に成功した。

位の異なる組織片ペアの同期化の結果において、組織片の接触面の動きが同期化に関係することは興味深く、今後はgap junctionなどの分布を調べるための蛍光観測が必要がある。推測としてmechano-sensing ion channelの密度変化と同期化までの時間に相関があるはずだ。同期化に境界の動きが必要ならば、この境界のmechano-sensing ion channelの不活性化等の薬剤使用による実験も検討する必要がある。一方で、この動きに似せた刺激のパラメータを、(2)①の刺激に適応することにより、心筋細胞の集合体に、“効果的な動き”を与えられる。実際に、メカニカルな刺激に関して、刺激のモーションが速すぎると細胞がダメージを受ける。逆にモーションが遅すぎると、細胞の応答が見られない。そこで、今回の効果的な動きのパラメータが、刺激モーションのレファレンスとして期待できる。

④実験系の確立に時間がかかってしまい、まだ多くのサンプルを測定するに至っていない。今後はゼブラフィッシュ心臓に存在する細胞外マトリックスについて、心臓の各部位(心房、心室、流出路など)の粘弾性を比較すること、またelastin bノックアウトゼブラフィッシュの作成も完了しているので、Elastin bタンパク質非存在下における細胞外マトリックスの粘弾性も測定していく。

(2) Feedback 機構付きの物理的環境制御システムの構築

①in vitroにおいて、自律拍動を行う心筋細胞の集合体にリアルタイム画像プロセッシングにより、自律拍動との位相を制御した刺激を与えることに成功した。時定数の100 msecは、少し遅いので、この時定数を短くするためのドライバーの改良が必要である。実験に個体差の影響が出ないように、刺激開始時の心筋細胞の集合体のサイズや自律拍動の拍動間隔をできるだけ統一できるような培養法の検討も必要である。in vivo (無殻培養下のニワトリ胚)における拍動観測に関しては、リアルタイム観測を継続的に行いながら、心臓に刺激を与える装置の開発に努める必要がある。ただし先駆的に行った力学的刺激の実験において、卵黄に傷をつけると、胚がダメージを受けて、生存率の低下が顕著になる。外部刺激による拍動の励起には、他の手法が必要と考えられる。現在、赤外線パルスによる拍動の励起を検討し、装置を構築中である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Shin Arai, Kento Lloyd, Tomonori Takahashi, Kazuki Mammoto, Takashi Miyazawa, Kei Tamura, Tomoyuki Kaneko, Kentaro Ishida, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, Dynamic Properties of Heart Fragments from Different Regions and Their Synchronization, Bioengineering (Basel) 2020, Jul 29;7(3):E81. doi: 10.3390/bioengineering7030081.

(2) 口頭発表

①渡辺 隆太、守山 裕大、三井 敏之、自己組織化過程における細胞挙動の解析、第68回応用物理学会春季学術講演会 2021年3/16 (火) -19 (金)

ポスター発表

②Shota Nozaki, Kazuki Mammoto, Ryu Kidokoro, Ryuta Watanabe, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, Mechanical stimulus with real-time feedback on beating cardiac cells, America Physics Society March Meeting 2021

③Ryu Kidokoro, Kazuki Mammoto, Yuuta Moriyama, Toshiyuki Mitsui, EFFECTS OF MECHANICAL STIMULUS ON BEAT SEQUENCE OF CARDIOMYOCYTES WITH FEEDBACK CONTROL, 65 th America Biophysical Society Annual Meeting, Feb. 22-26, 2021

④Shota Nozaki, Kazuki Mammoto, Takashi Miyazawa, Ryuta Watanabe, Yuuta Moriyama, Ryu Kidokoro, Toshiyuki Mitsui, Beat sequence of cardiomyocytes affected by to mechanical stimulus with real-time feedback control, The 58th Annual Meeting of the BSJ, 群馬大学 (オンライン) 9/16-18, 2020

⑤野崎 庄太、万本 和輝、城所 龍、渡辺 隆太、守山 裕大、三井 敏之、リアルタイムフィードバック制御による力学的刺激に影響を受けた心筋細胞の拍動、2021年第68回応用物理学会春季学術講演会 3月17日(水) 11:00 ~ 11:50

⑥城所 龍、宮沢 高司、野崎 庄太、渡辺 隆太、万本 和輝、守山 裕大、三井 敏之、心筋細胞と線維芽細胞の共培養におけるダイナミクス, 2021年第68回応用物理学会春季学術講演会 3月17日(水) 11:00 ~ 11:50

(3) 出版物

なし

腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明 —超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御—

1. 研究の目的

(1) 研究背景

- ① 我が国では少子高齢化に伴い、65歳以上の高齢者人口が2025年には約30%、2050年には約40%にも達する超高齢化社会の到来が予想されている。この社会構造や生活習慣の変化により、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど何らかの自己免疫疾患を有する患者の増大が予想されている。このうち、特に慢性関節リウマチは、現時点でも約70万人と国内患者数が多く、毎年1.5万人が新たに患者として認定されている。さらに、「手足の関節が痛む」という疾患予備群は560万人（人口の4.5%）におよび、国民病となりつつある。慢性関節リウマチは、リウマトイド因子をはじめとする自己抗体の産生を特徴とし、関節の滑膜に炎症が生じることで病態が進行する。その病因・病態は未だ十分に解明されたとはいえず、効果的な対症療法はあるものの、根治療法は確立されていないのが現状である。
- ② 近年、腸内細菌の異常が関節リウマチなど自己免疫疾患の発症に関わることが示唆されている。ヒトの大腸には100兆個以上もの腸内細菌が定着しており、消化液では分解できない食物繊維などを腸内発酵により分解し、生体にとって有用な短鎖脂肪酸に作り替える働きをしている。しかし、ひとたび腸内細菌叢のバランスに異常をきたすと、炎症性腸疾患や大腸癌などの消化器疾患に加えて、アレルギーや自己免疫性疾患、さらには精神性疾患や生活習慣病といった全身性の疾患が誘導されることが示唆されている。つまり腸内共生バランス失調は各種疾患の発症に関わる鍵因子であると想定されているが、その病態メカニズムは不明である。

(2) 研究目的

- ① 炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生菌種の減少である。申請者はこれまでの成果として、関節リウマチ患者の便中において実際に酪酸産生量が低下しており、自己免疫性関節炎モデルにおいて、酪酸は関節炎の発症を顕著に抑制することを見出した。さらに、酪酸は、リンパ濾胞内に存在する濾胞制御性T (follicular regulatory T: Tfr) 細胞を誘導することで、自己抗体の産生を抑制していることを明らかにした。
- ② これら一連の研究成果は、『Tfr細胞を増加することで全身性の自己免疫応答を制御することができる』という新たな疾患制御法の同定につながるものであった。その実現に向け、2年目には、Tfr細胞の*in vitro*誘導条件を世界に先駆けて確立するとともに、Tfrレポーターマウスを用いてTfr細胞分化誘導活性のハイスループットスクリーニング系の構築を試みた。3年目以降は本スクリーニング系を用いて、Tfr誘導物質の探索を行うとともに、Tfr細胞の分化誘導メカニズムの解明を試みた。

2. 研究の計画

(1) Tfr 分化誘導活性スクリーニング系の感度の向上

- ① 2019年度に確立した培養条件を元に作出した*in vitro* Tfr細胞（以下iTfr細胞）が生体内のTfr細胞と同様の生理活性を示すかどうかについて機能解析を実施した。
- ② Tfr細胞の分子マーカーのレポーターマウスを導入し、検出方法も変えることで分化誘導活性スクリーニングの検出感度の向上を試みた。

(2) 腸内代謝物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

- ① 腸内代謝物候補を同定するために、無菌マウスに腸内細菌叢を定着させたコンベンショナル化マウスより糞便を経時的に回収し、腸内細菌依存的に増加する代謝物をCE-MS/MS法により一斉解析を実施した。これらの腸内代謝物に関して(1)－②に示した評価系を

用いて、Tfr分化誘導活性スクリーニングを行った。

- ② 既存薬を用いたドラッグリポジショニングは安全性などの面で薬剤開発への障害が少ないことから、既存薬ライブラリーであるSCADs 標準阻害剤キットについて同様にTfr分化誘導活性スクリーニングを実施した。またTfr分化誘導メカニズムについても検討を行った。
- ③ iTfr誘導活性を有する化合物の薬効評価として関節リウマチモデルにおける予防および治療効果を調べた。

3. 研究の成果

(1) Tfr 分化誘導活性スクリーニング系の感度の向上

- ① *in vitro*で誘導したiTfr細胞は、生体内のTfr細胞と同等の自己免疫抑制機能を有することを立証するために、関節リウマチモデルを作出し、iTfr細胞を移植したところ、自己抗体の産生が有意に抑制され、関節炎の症状が緩和することを証明した。これらのデータを元に、学内の知財検討委員会の審査を経て特許を出願した（「濾胞性制御性T細胞の製造方法」特願2019-185826）。
- ② スクリーニング系の感度を高めるために、Bcl-6-tdTomatoレポーターマウス（東京理科大・原田陽介先生より供与）の脾臓よりナイーブT細胞をFACSソーティング後、iTfr分化誘導条件下で培養を行った。その際に、試験化合物を加えて5日間培養を行った後、蛍光蛋白質であるtdTomatoの発現を指標としてTfr細胞を定量した。評価系としての妥当性を評価するために、ポジティブコントロールである酪酸を添加したところ、Bcl-6陽性iTfr細胞の数が增加することを確認した。さらに当初計画していた検出器であるCell Insight CX5 (Thermo Fisher) は、操作性や検出感度が不十分であったことから、代わりにBZ-800Xオールインワン型蛍光顕微鏡 (Keyence, 研究室設備) を用いた。本顕微鏡に付属のイメージサイトメーターモジュール BZ-H4XIを用いてウェルを撮影後に、画像解析機能を利用することでtdTomato陽性細胞数の定量並びに発現量の解析を行うことで簡便かつハイスループットにBcl-6 (iTfr細胞マーカー) 陽性細胞をスクリーニングすることが可能となった。

(2) 腸内代謝物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

- ① 本解析により腸内細菌由来と予想されるアミン類、有機酸、インドール類など多数の代謝物を同定し、このうち、76種については標品を購入し代謝物ライブラリーとして整備した。本ライブラリーを用いて、iTfr細胞誘導活性を評価したところ、酪酸以外にもカダベリンやプトレシンといったポリアミン系代謝物に有意なiTfr誘導活性を見出している。しかしながら、カダベリンやプトレシンをマウスに投与しても、生体内においてTfr細胞の増加は観察されなかった。そこで、②合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングをさらに実施した。
- ② 既存薬ライブラリーであるSCADs標準阻害剤キットについてハイスループットスクリーニングを実施した。SCADs標準阻害剤キットは、文部科学省新学術領域研究・がんの特性等を踏まえた総合支援活動・化学療法基盤支援活動により配布されている既知の阻害剤を集めた化合物ライブラリーである。スクリーニングの結果から、16種類のiTfr細胞誘導活性を持つ化合物を同定した。これらの化合物は主に、①T細胞受容体シグナル伝達に関わる分子群の阻害剤、②エネルギー代謝に関わる分子群の阻害剤、③エピゲノム修飾酵素の阻害剤という3つのカテゴリーに分類された。このうち、①と②に関してはT細胞全般に広く作用しiTfr細胞への特異的な効果を期待できないことから、③に焦点を当てて研究を進めることとした。③には特にヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害剤であるScriptaidとその誘導耐であるVorinostatが含まれていた。HDACにはアイソザイムが11種類 (HDAC1~HDAC11) 存在するが、これらの化合物はクラスIに分類されるHDAC1, 2, 3, 8をいずれも阻害するため特異性は低い。そのため、副作用が強く、皮膚T細胞性リンパ腫の治療薬としてVorinostatが承認されているのみである。そこで、どのHDACアイソザイムを阻害することで、Tfr分化が促進するかを検討した。その結果、新たに合成したHDAC2の選択的阻害剤 (大阪大学産業科学研究所・

鈴木孝禎教授との共同研究)が最も強力なTfr分化誘導活性を示した。

- ③ 本HDAC2選択的阻害剤について薬物動態試験を行った結果、本薬剤は経口吸収性も良好であり、細胞毒性も低いことが判明した。続いて、コラーゲン誘導性関節リウマチモデル (collagen-induced arthritis: CIA) における薬効の検証を行った。実験期間中に本薬剤を経口投与 (3 mg/kg) したところ、関節炎の発症を有意に抑制した。さらに、これらの群では血清中の総IgG量の著明な減少を認めた。続いて、コラーゲン抗体誘導性関節リウマチモデル (collagen antibody-induced arthritis: CAIA) における薬効評価を行った。本モデルでは炎症の最終段階における薬剤の効果を検証することが可能であり、効果が認められた場合には治療薬として期待ができる。HDAC2選択的阻害剤を経口投与した群では、関節炎の発症が抑制された。さらに、関節炎に伴う血清中のTNF- α 濃度の減少も認めた。以上の結果より、本薬剤の関節炎に対する治療効果に関するPOCを得た。

4. 研究の反省・考察

(1) Tfr 分化誘導活性スクリーニング系の感度の向上

- ① これまで *in vitro* におけるTfr細胞の分化誘導系は確立されておらず、本研究によって、生体内のTfr細胞に匹敵する免疫抑制効果を有するiTfr細胞を効率的に誘導する系を初めて構築した。
- ② 当初計画していた野生型マウス由来T細胞を用いる場合には、Bcl-2の染色が必要となり、煩雑な作業が必要とされたが、レポーターマウス由来の細胞を用いる事でスループット性が大幅に改善した。また検出法を変えることでより精確な評価を行うことが可能となった。一方で、画像データの処理にはある程度の時間が必要とされるため、大量に得られたデータの処理方法については今後の課題と言える。

(2) 腸内代謝物ライブラリーを用いたスクリーニングの実施

- ① いくつかの腸内代謝物はiTfr誘導活性を示したものの、生体内では誘導活性が認められなかった。その理由として、各代謝物が分解しやすく、十分な血中濃度が得られない事が示唆された。
- ② Tfr分化誘導のための分子標的として新たにHDAC2を見出した。また従来HDAC2の選択的阻害剤の開発は難しいとされてきたが、幸い共同研究者である鈴木教授が新規に創出された薬剤を用いることができた。HDAC2の選択的阻害はTfr細胞を顕著に誘導することが判明した。
- ③ HDAC2選択的阻害剤はCIAおよびCAIAモデルにおいて関節炎を抑制した。CAIAモデルはコラーゲンに対する抗体を直接注射することで発症するため、HDAC2選択的阻害剤は抗体産生抑制以外の部分でも効果を発揮している可能性が示唆された。その薬効発現メカニズムについては現在検証中である。HDAC2阻害剤の毒性は従来の汎HDAC阻害剤と比較して低いことから、関節リウマチ治療薬としての期待が持てる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kurashima Y, Hase K, Kiyono H. et al. Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation. **Nat Commun.** 2021, 12:1067.
- ② Okawa T, Nagai M, Hase K. Dietary Intervention Impacts Immune Cell Functions and Dynamics by Inducing Metabolic Rewiring. **Front Immunol.** 2021, 11:623989.
- ③ Takahashi D, Hase K. et al. Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells. **EBioMedicine**, 2020, 58: 102913.
- ④ Nakamura A, Hase K. et al. Polyamines polarized Th2/Th9 cell-fate decision by regulating GATA3 expression. **Arch Biochem Biophys.** 2020, 693:108587.
- ⑤ Nakamura A, Hase K. et al., Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon. **Nat Commun.** 2021,

12:2105.

- ⑥ Kinashi Y, Hase K. Partners in Leaky Gut syndrome: intestinal dysbiosis and autoimmunity. **Front Immunol.** 2021 Apr 22;12:673708.
- ⑦ Kurohara T, Tanaka K, Takahashi D, Ueda S, Yamashita Y, Takada Y, Takeshima H, Yu S, Itoh Y, Hase K., Suzuki T. Identification of novel histone deacetylase 6-selective inhibitors bearing 3,3,3-trifluorolactic amide (TFLAM) motif as a Zinc binding group. **Chembiochem.** 2021, 22:3158-3163.
- ⑧ Matsumoto R, Hase K. et al., A Retinoid X Receptor agonist directed to the large intestine ameliorates T-cell-mediated colitis in mice. **Front Pharmacol.** 2021, 12:715752.
- ⑨ Aoki R, Hase K. et al., Commensal microbe-derived acetate suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice. **Microbiome.** 2021, 9:188.
- ⑩ Oya Y, Hase K. et al., Characterization of M Cells in Tear Duct-Associated Lymphoid Tissue of Mice: A Potential Role in Immunosurveillance on the Ocular Surface. **Front Immunol.** 2021, 12:779709.
- ⑪ Li Y, Hase K., Wang JY. et al., Glia maturation factor- γ is involved in S1P-induced marginal zone B-cell chemotaxis and optimal IgM production to type II T-independent antigen. **Int Immunol.** 2022, 34:35-43.

(2) 口頭発表

- ① Koji Hase, Immune surveillance on the mucosal surface: Physiological impact and beyond. Edinburgh Immunology Group Webinar. 2021/3/25, 国外 (ウェビナー), 口頭
- ② Koji Hase, Immune surveillance on the mucosal surface: Physiological impact and beyond. Fudan University Department of Immunology Seminar. 2020/11/27, 国外 (ウェビナー), 口頭
- ③ Koji Hase, Nutritional Signals regulate lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue. The Korean Association of Immunologists (KAI) International Meeting 2020 Virtual. 2020/11/11-13, 国外 (ウェビナー), 口頭
- ④ Koji Hase, Gut microbiota and diet shape the gut immune system. The 7th Cancer Epigenomics Symposium & Seminar on Hematologic Malignancies and Epigenetics. 2020/11/13, 国内, 口頭
- ⑤ 長谷耕二, 腸内微生物による免疫修飾機構. 第23回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 2020/9/12, 国内, 口頭
- ⑥ 長谷耕二. 腸内代謝物による免疫制御. 第95回日本感染症学会 2021年5月7~9日. オンライン開催. 口頭
- ⑦ Koji Hase, Symbiotic polyamine metabolism maintains gut immune homeostasis by regulating macrophage differentiation. The 27th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2020+1). 2021. 6. 16. Osaka. 口頭
- ⑧ Koji Hase, Maternal microbiota during pregnancy facilitates metabolic programming of offspring. International DOHaD Society Webinars for 2021. 2021/ 7/7. オンライン開催. 口頭
- ⑨ 長谷耕二. 腸管免疫系における絶食応答. 第94回日本生化学会. 2021年11月3日. オンライン開催. 口頭
- ⑩ Koji Hase, Maternal gut microbiota in pregnancy influences metabolism. 53rd Annual Meeting of the French Society for Immunology. 2021/12/8. オンライン開催. 口頭

(3) 出版物

なし

不活性化酵素, 偽遺伝子からの活性化酵素の作成

—酸性キチナーゼの構造, 活性と進化—

1. 研究の目的

キチンは、N1-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、昆虫、カニなどの甲殻類、真菌類などの多様な生物 (これらをキチン含有生物と呼ぶ) の主要な構成成分である。これらキチン含有生物は広く生息するので、キチンは、セルロースの次に豊富に存在するバイオマスである。

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

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

最近、申請者らは、マウス、ニワトリ、ブタ、マーモセット (雑食性動物) の胃で、Chia タンパク質が多量に発現し、胃や腸の条件下で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し、キチンを、炭素、窒素そしてエネルギー源である (GlcNAc)₂ へと分解することを報告した (Ohno et al., 2016; Tabata et al., 2017, 2019)。

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

これまでの研究で提示された問題点は以下の 2 点である。

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

申請者らの研究で提示された問題は、「肉食性と草食性動物における Chia の不活性化と偽遺伝子化」である。本研究では、肉食性と草食性動物の不活性化メカニズムの解明と偽遺伝子からの活性化 Chia を作製することを目指す。そして、Chia の不活性化、偽遺伝子化のメカニズムおよび進化的意義を解明する。以下の 2 項目 を研究する。

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

2. 研究の計画

- (1) マウス (雑食性)、イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia の一次構造は、同一性が 79-80% で、良く似ている。しかし、ウシ、イヌ Chia のキチナーゼ活性は、マウスより低く、不活性化している。そこで、活性の高いマウス Chia と活性の低い ①イヌ あるいは ②ウシ Chia 間でキメラ体を作製し、酵素活性低下に関わる領域を絞る。次に、アミノ酸置換体を導入することで活性低下に関わる原因アミノ酸を同定する。そして、肉食性動物、草食性動物全体で、Chia 遺伝子におけるそのアミノ酸の保存性を検討する。
- (2) 活性が高い動物種の Chia の遺伝情報を参考に、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマの Chia 偽遺伝子から活性化 Chia 酵素の作成を試みる。

3. 研究の成果

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

①-1 肉食性動物のイヌ Chia は 2 アミノ酸置換で不活性化していた

マウスとイヌ Chia でキメラ体を作製し、さらに 40 種類以上の変異体を作製し、キチナーゼ活性との関係を調べた。特定の 2 アミノ酸をイヌとマウス Chia 間で置換した結果、イヌ Chia は活性化し、マウス Chia は失活した。イヌ Chia の不活性化の原因は、2 アミノ酸置換であった (図 1)。

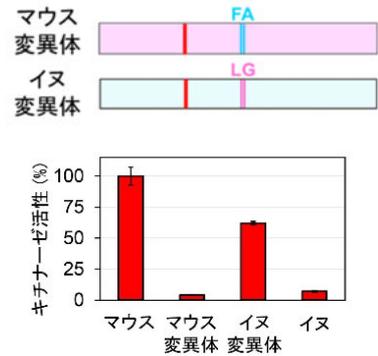


図 1. マウスとイヌの 2 アミノ酸置換のキチナーゼ活性。(上) 変異体の模式図 (右) 縦軸は、マウス Chia の活性を 100% とした、相対活性レベル

①-2 イヌ科以外の肉食性動物の Chia は偽遺伝子化していた

2 アミノ酸置換の進化的意義を解明するため、主に肉食性動物が属している、食肉目 40 種の動物の Chia 遺伝子を塩基配列レベルで解析した。驚いたことに、イヌで同定した 2 アミノ酸は、イヌ科でのみ特異的に保存され、他の大多数の肉食性動物の Chia は偽遺伝子化していた (機能喪失型 Chia)。

①-3 イヌに近種の昆虫を食餌とする動物の Chia は活性型だった

イヌ科以外の食肉目動物で、完全長 Chia を保持していたのは、現代でも昆虫を食餌とするミーアキャットとスカンクのみであった。さらに、ミーアキャット、スカンク Chia は、イヌよりも高いキチナーゼ活性を発現した (図 2)。

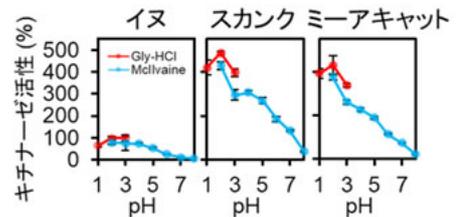


図 2. スカンク、ミーアキャット Chia のキチナーゼ活性はイヌより高かった。縦軸はイヌ Chia の最大活性を 100% とした相対活性

(2) 活性化 Chia の遺伝情報を参考に、Chia の偽遺伝子からキチナーゼを設計し、活性化酵素の作成を試みる

ネコ Chia 偽遺伝子の活性化を試みた。ネコ Chia 偽遺伝子は、タンパク質の読み枠の回復では活性化しなかった (Cre-ネコ Chia、図 3)。さらに、Cys 残基を修正したが活性化しなかった (Cys-ネコ Chia、図 3)。以上の結果から、Chia は、多数の変異の蓄積によって機能喪失していることがわかった。

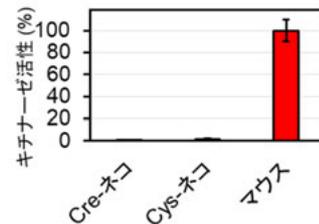


図 3. ネコ Chia 偽遺伝子のキチナーゼ活性測定。縦軸は、マウス Chia の活性 100% とした相対活性

4. 研究の反省・考察

(1)-①について:

太古のほ乳類祖先は、小型で食虫性であったが、恐竜の絶滅後、ほ乳類の食性は多様化したと考えられている(図 4 左)(O'Leary et al., Science 339, 662-667, 2013)。

- 肉食性動物のイヌ Chia は 2 アミノ酸置換で不活性化していた (不活性化型 Chia)。そのマウス Chia のアミノ酸に置換すると活性化することを明らかにした (図 1、図 4 右上)。
- イヌで同定した 2 アミノ酸は、イヌ科でのみ特異的に保存され、他の大多数の肉食性動物の Chia は偽遺伝子化 (機能喪失型 Chia) していた (図 4 右中)。
- 現代でも昆虫を食餌とするミーアキャットとスカンクの Chia は、イヌよりも高いキチナーゼ活性を発現した (活性型 Chia)(図 2、図 4 右下)。

不活性化 Chia の活性化によって、肉食動物が非食虫性食餌に適応したことによる Chia の構造と活性変化を明らかにした (図 4)。

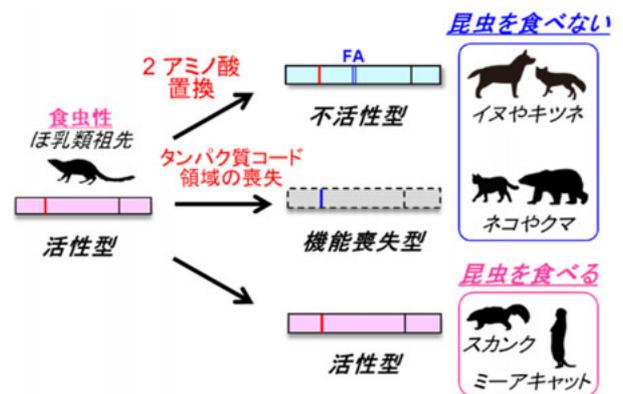


図 4. 食肉目動物における Chia 遺伝子の進化過程の概念図

2021 年度は、②ウシについて、イヌと同様の手法で研究を進める。

(2)について：偽遺伝子から作製したネコ Chia の活性化を試みた。ネコ Chia では、保存されている Cys の位置が変化し、数が増加していた。そこで、Cys の数と位置を修正し、上記のように大腸菌で発現した (Cys-Chia とよぶ)。しかし、Cys-ネコ Chia は、活性が認められなかった (図 3)。これらの結果から、ネコ Chia の偽遺伝子は、遺伝子全体に不活性化の原因が存在すると考えられた。今後、活性の高かったミーアキヤットとのキメラ体および変異体を作製し、ネコ Chia の活性化を試みる。

2021 年度は、引き続き、ネコ Chia 偽遺伝子の活性化を目指す。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kimura, M., Watanabe, T., Sekine, K., Ishizuka, H., Ikejiri, A., **Sakaguchi, M.**, Kamaya, M., Yamanaka, D., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2020) Comparative functional analysis between human and mouse chitotriosidase: Substitution at amino acid 218 modulates the chitinolytic and transglycosylation activity, *Int J Biol Macromol.* **164**, 2895-2902.
- ② Kimura, M., Umeyama, T., Wakita, S., Okawa, K., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2020) Quantification of chitooligosaccharides by FACE method: determination of combinatory effects of mouse chitinases, *MethodsX.* **7**, 100881.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

がんにおける型破り分泌の機序解明と制御研究

ーがんと型破り分泌の関係解明ー

1. 研究の目的

- (1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築
 - ①HiBiTシステムの構築
 - ②最適時間の制定
- (2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定
 - ①オートファジー因子の関与
 - ②阻害剤を用いた検討
- (3) PKC δ の型破り分泌様式の予測
 - ①超遠心法によるプロテクションアッセイ

2. 研究の計画

- (1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築
 - ①HiBiTシステムの構築：promegaのHiBiT配列をPKC δ のC末端側に配置した融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。発現系はTet-on HepG2細胞を用いて、安定細胞株を作製した。クライテリアは、ドキシサイクリンで誘導され、かつ分泌抑制が過去に見つけたPMA処理により分泌が抑制させる株をスクリーニングした。
 - ②最適時間の制定：ドキシサイクリン誘導後の分泌動態の評価をHiBiTアッセイにより検討した。
- (2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定
 - ①オートファジー因子の関与：オートファジー因子に関するsiRNAを購入し、PKC δ の分泌量をHiBiT評価系で確認作業を行った。
 - ②阻害剤を用いた検討：PKC δ の分泌はオートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) やバフィロマイシンA1 (BafA1)で処理した。
- (3) PKC δ の型破り分泌様式の予測
 - ①超遠心法によるプロテクションアッセイ：3Kでの遠心操作で死細胞等を取り除いた後、100Kで超遠心したペレット成分を得た。その後、プロテアーゼKで30分処理し、再度100Kで遠心し、immunoblot解析を行った。その結果、PKC δ の貯留を確認した。このPKC δ の貯留はPMA処理した細胞からは得られなかった。このことから、PKC δ の型破り分泌は膜輸送系が関与していることが示唆された。

3. 研究の成果

- (1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築
 - ①HiBiTシステムの構築：promegaのHiBiTシステムを利用した細胞外PKC δ 測定系の構築を行った。Tet-on誘導用のHepG2細胞を用いて、安定細胞株を作製した。クライテリアは、ドキシサイクリンで誘導され、かつPMA処理により分泌が抑制させる株をスクリーニングした。
 - ②最適時間の制定：ドキシサイクリン誘導後の分泌動態の評価を行った。結果として、6時間から24時間で十分評価可能であることを確認した。
- (2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定
 - ①オートファジー因子の関与：過去にIL-1 β の型破り分泌にオートファジー因子が使用されているという報告があったので、確認実験につきHiBiTシステムを用いて行った。結果として、ATG5をはじめとする因子をノックダウンすることでPKC δ の分泌の有意な抑制が示された。
 - ②阻害剤を用いた検討：PKC δ の分泌はオートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) やバフィロマイシンA1 (BafA1)で処理しても変化なかった。このことから、型破り分泌はオートファジーとは別の機構を利用していることが推察された。
- (3) PKC δ の型破り分泌様式の予測
 - ①超遠心法によるプロテクションアッセイ：3Kでの遠心操作で死細胞等を取り除いた後、

100Kで超遠心したペレット成分を得た。その後、プロテアーゼKで30分処理し、再度100Kで遠心し、immunoblot解析を行った。その結果、PKC δ の貯留を確認した。このPKC δ の貯留はPMA処理した細胞からは得られなかった。このことから、PKC δ の型破り分泌は膜輸送系が関与していることが示唆された。

4. 研究の反省・考察

(1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築

①HiBiTシステムの構築：immunoblot解析に比べてはるかに定量性・再現性のある簡便なデータ取得が可能となった。本HiBiT実験の結果は、当然immunoblot解析でも再現しているため、過剰発現による影響は余り無いと考えられる。加えて、ドキシサイクリンの濃度を調整することで、発現量を制御できることも分かり、システムとしては汎用性が高いものと考えられる。今後はPKC δ 以外に肝がん細胞で型破り分泌されるタンパク質 (importin $\alpha 1$ やヌクレオリン) についても応用展開し、現象の再現に務めていきたいと考える。また本実験は10%FBS条件下で行えるため、型破り分泌研究で度々問題視される、細胞死 (ネクローシス) や物理的刺激などによる細胞膜崩壊による漏出の影響を限りなくなくすことが出来る。

②最適時間の制定：Tet-onの誘導系の動態をモニターできたので、実験の信頼性確保が可能となった。24時間を汎用したが、この理由は、分泌したPKC δ 量が安定的になる時間であることが挙げられる。今回、10%FBS条件下でのアッセイが可能であることから、時間についての配慮は比較的自由であり、24時間は最も適当とも考えられた。逆に、IL-1 β などでよく見られる刺激後2時間という時間では、培地交換の物理的刺激の影響か、分泌量の抗増進傾向がみられた。この点、6時間以上おくことで分泌量が安定することが分かった。今後の実験もなるべく6時間以上後にアッセイすることが望ましいと考えられる。

(2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定

①オートファジー因子の関与：オートファジー因子は分解のみならず分泌にも関与していることは過去の報告からも間違いのない事実かも知れない。今回同定したオートファジー因子は一連のオートファジーの初期のphaseで関係する因子である。つまり、オートファジーに関わるオートファゴソーム形成と分泌に関わる小胞とは別の局在や他の因子を利用している可能性が考えられる。今後は、その差別化を図る実験が必要になると推察される。

②阻害剤を用いた検討：本阻害剤はオートファゴソームとリソソームの融合に関する阻害なので、分泌に依存しないデータが出て矛盾がない。オートファジーとの相違を早急に見出す必要があると考えられる。また、今回試験したオートファジー因子は全てPKC δ 分泌に関与していたが、実際は関与しないものもあるかもしれない。この点で、網羅的な解析を行うことで、差別化にバイアスをかけなくても良い可能性がある。今後の検討に生かしたい。さらに重要な課題として、なぜ、型破り分泌にオートファジー因子が関わるのかを今後明確にする必要がある。共通するのは、細胞内成分を定期的に入れ替える役割があるが、型破り分泌に関しては細胞外機能が明らかに明確でありプログラムされている可能性が高く、更なる考察が必要だと考えられる。

(3) PKC δ の型破り分泌様式の予測

①超遠心法によるプロテクションアッセイ：PKC δ が小胞内に存在することが分かったがその移行機構や具体的な小胞分画の同定は今後の課題となる。スクロース等による密度勾配法を用いて、PKC δ 画存在する分画を同定し、マーカーを当てはめていくことで関連するオルガネラを決定する必要がある。この解析は今後、新規オルガネラを特定するプロテオミクス等の手法に応用する際に必須なので、早々に着手する予定である。オルガネラが特定できれば、蛍光染色法や免疫電子顕微鏡観察などの可視的な解析により、確認作業ができる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Yamada K, Oikawa T, Kizawa R, Motohashi S, Yoshida S, Kumamoto T, Saeki C, Nakagawa C, Shimoyama Y, Aoki K, Tachibana T, Saruta M, Ono M, Yoshida K. Unconventional Secretion of PKC δ Exerts Tumorigenic Function via Stimulation of ERK1/2 Signaling in Liver Cancer. *Cancer Research* 81: 414-425 (2021)

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

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

○研究代表者

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

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
作 間 啓 太	成 蹊 大 学 理 工 学 部	令和3年3月 31日退職	超伝導薄膜の創製
神 原 陽 一	慶 應 義 塾 大 学 理 工 学 部	教 授	キャリア制御技術の開発
Harold Hwang	米 国 ス タ ン フ ォ ー ド 大 学	教 授	新超伝導材料開発
Boris Maiorov	米 国 ロ ス ア ラ モ ス 国 立 研 究 所	研 究 員	超高磁場中特性評価
Serena Eley	米 国 コ ロ ラ ド 鉱 山 大 学	助 教	磁化測定による熱擾乱の評価

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

1. 研究の目的

安価かつ無尽蔵である液体窒素温度下 $\text{REBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ (RE123) 超伝導線材は、発電機、MRI(磁気共鳴画像)、NMR(核磁気共鳴)装置など次世代エネルギー及び医療機器応用に期待されている。これらの応用上最も重要となるのが臨界電流密度(J_c)である。現状の J_c 値は、 J_c の限界値である対破壊電流密度(J_d)の 10%程度であり応用に適さない状況となっている。これは、RE123 超伝導内に侵入したナノサイズの量子化磁束が①ローレンツ力($F_L=J_c \times B$)及び②熱擾乱($S \propto k_B T$ (k_B 及び T は、ボルツマン定数及び温度))により運動し、 J_c が低下するためである。我々は、これまで J_c の低下の原因である量子化磁束運動を抑制するために、非超伝導相をナノサイズ・ナノ間隔に導入することにより量子化磁束の運動を抑制し J_d の 10%程度の世界最高 J_c を得ることに成功してきた。また、我々は、すべての超伝導材料において、ギンツブルグ数(G_i)が小さいほど量子化磁束の熱擾乱(S)を抑制でき、 J_c が向上することを明らかにした。

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

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

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

2. 研究の計画

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

3. 研究の成果

2020年度は、2019年度に得た研究成果をもとに 2. 研究の計画の (4) (5) (6) に関して実施し、以下の結果を得た。

- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加
 - ① 熱的臨界磁場(B_c)は、コヒーレンス長(λ)と磁場侵入長(ξ)を用いて $B_c=1/(\lambda\xi)$ で表される。本研究では、ナノサンドイッチ構造により c 軸方向に圧縮ひずみを印加した $(\text{Y,Gd})123+\text{ナノ}$

粒子薄膜は、従来の(Y,Gd)123薄膜に比べて過剰ドーピング可能であることが明らかになった。ナノサンドイッチ構造(Y,Gd)123+ナノ粒子薄膜の λ と ξ を評価した結果、 λ と ξ が減少することが分かった。その結果、従来の(Y,Gd)123薄膜に比べて約2倍の B_c を得ることに成功した。

② 本研究では、Fe系超伝導体 $\text{BaFe}_2(\text{As}_{1-x}\text{P}_x)_2$ +ナノ粒子薄膜のAs/P組成比を制御し、化学圧力制御技術によるナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の熱的臨界磁場(B_c)を試みた。その結果、最適組成比 $x=0.33$ で $\text{BaFe}_2(\text{As}_{1-x}\text{P}_x)_2$ +ナノ粒子薄膜の λ と ξ を減少させることにより約1.5倍の B_c を得ることに成功した。

(5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価

① ひずみ・高キャリア注入技術によりナノサンドイッチ構造(Y,Gd)123+ナノ粒子薄膜の J_d の約25%まで J_c を向上させることに成功した。この特性は、本研究の目的である未だ誰も実現していない130 MA/cm²(4.2K)以上の J_c を実現したことになる。

② ひずみ・高キャリア注入技術により $\text{BaFe}_2(\text{As}_{1-x}\text{P}_x)_2$ +ナノ粒子薄膜は、 J_d の約10%の $J_c=8$ MA/cm²を達成した。この特性は、鉄系超伝導体中でも世界トップクラスの特性である。

③ ①②で示すように銅酸化物超伝導体だけでなく鉄系超伝導体においても本研究の独自 J_c 向上超伝導材料設計指針が有効であることを示した。また $J_c \propto J_d$ の関係が成り立つことが確認された。

(6) 新超伝導であるニッケル酸化物超伝導薄膜の作製

① RE123 超伝導体の Cu^{2+} と同じ $3d^9$ 電子構造を持つ Ni^{1+} を含むニッケル酸化物 ($\text{Nd}_{1-x}\text{Sr}_x\text{NiO}_2$ (Ni112)薄膜が $T_c \sim 12$ K の超伝導であることを共同研究者のスタンフォード大で発見された(Li et al. Nature2019)。本研究ではNdをPrに変えることで $(\text{Pr}_{1-x}\text{Sr}_x)\text{NiO}_2$ 薄膜が $T_c \sim 15$ K の超伝導を示す事を明らかにした。

4. 研究の反省・考察

2020年度に得られた成果は、2020年度内に行われた国際学会3報、国内学会3報で成果報告した。得ている実験結果としては、3.研究の成果に記したとおり当初の計画以上の成果が得られている。しかし、その一方で、2020年度に得られた研究成果をまとめて投稿した学術論文は、1件掲載、2件査読中、1件再投稿準備中であり掲載済論文が1件であることは反省すべき点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① M. Osada, B. Y. Wang, B. H. Goodge, K. Lee, H. Yoon, K. Sakuma, D. Li, **M. Miura**, L. F. Kourkoutis and H. Y. Hwang “A superconducting praseodymium nickelate with infinite layer structure” *Nano Letters* **20** (2020) 5735–5740

② **M. Miura**, M. Osada, I. Nekrashevich, F. Balakirev, S. Lin, B. Y. Wang, K. Lee, H. Yoon, K. Sakuma, D. Li, R. Yoshida, T. Kato, L. Civale, H. Y. Hwang and B. Maiorov “Nearly isotropic superconductivity in an infinite-layer $\text{Pr}_{1-x}\text{Sr}_x\text{NiO}_2$ films: Not all infinite-layer superconductors are created equal” *Nature Communications* (査読中, NCOMMS-21-07668-T)

③ S.C. Jones, **M. Miura**, R. Yoshida, T. Kato, L. Civale, R. Willa and S. Eley, “Designing high-performance superconductors with nanoparticle inclusions: comparisons to strong pinning theory” *APL Materials* (査読中, APM21-AR-00435)

④ **M. Miura**, G. Tsuchiya, R. Yoshida, T. Kato, T. Harada, K. Nakaoka, T. Izumi, M. Kiuchi, T. Matsushita, L. Civale, and B. Maiorov “Thermodynamic approach to enhance of superconducting critical currents/performance” *Proc. Natl. Acad. Sci.* (再投稿準備中)

(2) 口頭発表

① M. Saito, J. Ohta, K. Sakuma and **M. Miura** “The influence of the introduction of BaZrO₃ nanoparticles on the superconducting properties of TFA-MOD $\text{La}_{2-x}\text{Ba}_x\text{CuO}_4$ films” Applied Superconductivity Conference 2020, June 28-July 3 (Web Conference)

② K. Kobayashi, J. Nishimura, K. Sato, **M. Miura**, M. Kiuchi and T. Matsushita “The effect of BaHfO₃ nanoparticles on J_c in a longitudinal magnetic field for multilayered TFA-MOD ($\text{Y}_{0.77}\text{Gd}_{0.23}$) $\text{Ba}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ Coated Conductors” Applied Superconductivity Conference 2020, June 28-July 3 (Web Conference)

- ③原田工夢, 土屋豪, 三浦正志, 木内勝, 松下照男 “BaZrO₃ナノ粒子導入によるBaFe₂(As_{1-x}P_x)₂薄膜の磁場中超伝導特性向上” 2020年度秋季低温工学・超電導学会, 2020年12月8日~10日, 京都大学 吉田キャンパス, 京都
- ④高橋洸, 宮田健司, 三浦正志, 横江大作, 加藤丈晴, 衣斐顕, 和泉輝郎 “Reel-to-Reel PLD法EuBa₂Cu₃O_y+BaHfO₃線材の磁場中超伝導特性” 2020年度秋季低温工学・超電導学会, 2020年12月8日~10日, 京都大学 吉田キャンパス, 京都
- ⑤齋藤優大, 太田順也, 作間啓太, 三浦正志 “TFA-MOD法を用いたBaZrO₃ナノ粒子導入La_{2-x}Ba_xCuO₄薄膜の作製” 2020年度秋季低温工学・超電導学会, 2020年12月8日~10日, 京都大学 吉田キャンパス, 京都
- ⑥M. Miura, G. Tsuchiya, T. Kato, R. Yoshida, K. Nakaoka, T. Izumi, M. Kiuchi, T. Matsushita “Recent results on flux pinning in nanoparticle-doped TFA-MOD REBa₂Cu₃O_y Coated Conductors” 33th International Symposium on Superconductivity 2020, December 1-3, 2020, Tsukuba, Japan

(3) 出版物

なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

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

○研究代表者

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

○研究分担者

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

経済のデジタル化の加速に向けた金融制度・税制度の対応のあり方

1. 研究の目的

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

2. 研究の計画

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

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

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

3. 研究の成果

- (1) 研究目的の1つめである、AIの発展が中長期的に個人や企業の意味決定や行動にもたらしうる変革を明らかにする研究では、コンピュータの利用、知識・ノウハウ共有、情報システムの利用が賃金や充実感に与える影響について実証分析を行い、知識・ノウハウ共有と賃金の決定メカニズムとの関係が職種によって異なることを明らかにした。この成果は「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ②」として刊行した。
- (2) 研究目的の2つめである、経済のデジタル化への金融制度・税制度の望ましい対応のあり方を明らかにする研究では、各小グループにおいて以下のような研究成果があった。
 - ① 決済サービスの高度化：研究代表者が、経済産業省が実施する「令和2年 地域におけるキャッシュレス導入支援事業」の検討・実施委員会委員に選出されて災害時のキャッシュレス決済実証事業に携わり、課題を明らかにするとともに、店舗向けの導入マニュアルを作成するなど社会貢献を行った。また、交通サービスや地域通貨のキャッシュレス化の分析を進め、それぞれ「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ①」・「5. 研究発表 (3) 出版物 ②」として刊行した。
 - ② デジタル化時代に即した金融教育：デジタル化が進む中での金融リテラシー教育について、2020年度に改定の「新学習指導要領」など文部科学省の資料等の考察・分析を進め、研究成果の一部を「5. 研究発表 (3) 出版物 ①」として刊行した。
 - ③ 雇用形態に中立的な税制 および 企業へのデジタル課税： デジタル・エコノミー進展下における望ましい税制のあり方について分析を進め、研究成果の一部を「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ③」として刊行した。
 - ④ リテール金融の技術革新： 経済主体の心理的な要因の変化が統計指標に及ぼす影響について実証的な分析を行い、その過程で得た知見の一部を「5. 研究発表 (1) 学会誌等 ⑤」として刊行した。
- (3) 研究目的の3つめである、新興国で生じている「リープフロッグ」的な経済のデジタル化の進展に関する研究では、メキシコ国内の4金融機関に訪問調査を行い、明らかになったデジタル化と金融自由化の相互作用を含め、研究成果の一部を「5. 研究発表 (3) 出版物 ③」として刊行した。この他、ベトナムのM Credit（邦銀と現地銀行の合弁会社）を対象にした現地調査を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の世界的な感染拡大の影響によりやむを得ず実施を延期した。ただし、文献・資料調査は既に終わっていたため、ベトナムにおけるリテール金融におけるデジタル化の進展状況の考察を含む研究成果を「5. 研究発表 (3) 出版物 ④」として刊行した。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の反省

3年計画の1年目としては、研究代表者・研究分担者による論文刊行というかたちで多くの成果があったといえる。しかし、本研究課題では国際比較の観点から海外への現地調査を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の感染拡大の影響を受け、2020年度はこれらを全て中止せざるを得なかった。研究分担者のうち1名はメキシコ在住のため、中米の調査研究への影響は抑えられたものの、東南アジアやヨーロッパへの現地調査は実施できなかった。近年はオンラインビデオ会議システムも普及していることから、こうした手段を用いて影響を最小限にとどめるよう努めたが、結果として有効に活用できたとは言い難く、

大きな反省点となっている。この点は研究代表者・研究分担者間の連携に関しても言え、互いの研究について意見交換する機会がコロナ禍以前と比べると減少してしまったことは否定できず、個別の研究成果の連携・結合作業が始まる2021年度以降は研究者間の連携をより密にしていくことが課題となる。

(2) 研究の考察

2020年度は個別テーマごとに研究成果があがった。よって、これら個別の研究に「横串」を通し、金融制度・税制度の高質化に資する一体的な政策提言パッケージにまとめていくことが次のステップとなる。具体的には、本年度の研究において、AIのインテリジェンス特性、およびヒューマンインテリジェンスとの補完・代替性については相当程度理解が深まったことから、この成果を金融制度・税制度の再構築に関する研究を担っている各小グループの研究に反映させ、研究の統一感を高めていくことが求められる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①中田 真佐男 「我が国におけるキャッシュレス化の普及加速に向けた課題 ～交通サービスにおけるキャッシュレス化の展望を交えて～」 『運輸と経済』 No. 883 20-25頁 2021年1月
- ②中馬 宏之 「コンピュータの利用、知識・ノウハウ共有、情報システムの利用が賃金や充実感に与える影響に関する実証分析」 東洋大学経済学部 Working Paper Series NO. 27 2021年2月 (久米功一氏との共著)
- ③花井 清人 「個人所得税での税額控除を活用した税・移転システム構築の可能性 — 国際比較のレッスンを通して—」 『経済研究』 (成城大学経済学部 紀要) 第231号 323-353頁 2021年1月
- ④花井 清人 「韓国勤労奨励税制 (EITC 制度) の運営と残された課題」 『経済研究所年報』 第33号 55-73頁 2020年4月 (田近栄治氏との共著)
- ⑤後藤 康雄 “Associations between Japan’s consumer confidence index and emotion-related variables such as depression, anxiety, and positive affect” *Cogent Psychology* 8 (1) March, 2021 [オンライン刊行につき頁数はなし] (co-author: Yoichi Sekizawa, Remi Noguchi, Miral So, Eiji Shimizu)

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

内田真人・福光寛 (編著) 『グローバル化と地域金融』 東信堂 2021年3月

- ①内田 真人 「金融リテラシーの考察：グローバル研究の視点」 (第1章) 4-31頁
- ②中田 真佐男 「グローバルな事象としてのリテール決済のキャッシュレス化」 (第2章) 32-60頁
- ③柿原 智弘 「メキシコの金融自由化のインパクト」 (第5章) 128-172頁
- ④福島 章雄 「ベトナムの金融深化と中小企業進出の現状」 (第5章) 171-219頁

日本とアジアの群島を結ぶ文様研究

—先端メディアによるデザイナーカイヴの構築—

1. 研究の目的

- (1) 日本とアジアの群島で特徴的な文様を収集しアート&デザイン研究のための芸術資源とする。
 - ① 日本の本土から南西諸島、台湾、フィリピン諸島、インドネシア諸島に至る群島に混在する文様の収集を行う。
 - ② 群島から収集した文様に関する情報を整理した上で比較研究を行い、アジアの芸術文化の諸相を文様から考察する。
- (2) 先端的なデザインやアートを含む芸術資源に関する研究拠点を構築する。
 - ① プログラミング技術の進化やAI応用を踏まえたインタラクティブな創造支援ツールを構築し、デザイナーやアーティストのアイデアやインスピレーションの源泉となるアーカイブを制作する。先端的なデザインやアートの展開のために新たな文様を生成する独創的なリソース・システムの構築、公開、教材開発を目指す。
 - ② 文様資源を単なる形としての図案やデザインでなく、人と文化と社会の諸相を具現化したメディアとして捉え、様々な可能性を秘めた芸術資源として美術教育に活用する。

2. 研究の計画

(1)文様収集と調査

- ① 多摩美術大学アートアーカイブセンター（東京都）が所蔵する山名文夫資料の閲覧調査を行う。
- ② 資生堂企業資料館（静岡県）が所蔵する山名文夫資料及び資生堂唐草に関する資料を閲覧する。
- ③ 研究メンバーで、資生堂デザイナーであった山形季央氏に資生堂唐草の系譜についてインタビューし記録映像を撮影する。
- ④ 旧文様研究所所員であった高橋士郎（前学長）の研究成果を再検証するとともに新たな資料を追加してイスラームの文様建築に関する映像作品を制作する。
- ⑤ 平取町立二風谷アイヌ文化博物館（北海道）、萱野茂二風谷アイヌ資料館（北海道）、ウポポイ（北海道）でアイヌの文様収集及び、アイヌ文化継承者の川上裕子氏への聞き取り調査を行う。

(2)研究拠点の構築

- ① これまでの研究成果であるインドネシアにおける文様調査の結果を論文にまとめる。
- ② インドネシアの植物文様を活用した自動生成できる文様デザインアプリケーションの開発を行う。
- ③ 文様研究の手法を大学（学部・大学院）で開講する授業で実験的に活用し、美術教育活動を行う。
- ④ 本研究を含む文様アーカイブ研究の現状を公開シンポジウムなどで報告し意見交換を行う。

3. 研究の成果

(1)文様収集と調査

- ① 旧文様研究所所員であった高橋士郎（前学長）の研究成果を再検証するとともに新たな資料を追加してイスラームの文様建築に関する映像作品を制作した。
- ② 平取町立二風谷アイヌ文化博物館（北海道）、萱野茂二風谷アイヌ資料館（北海道）、ウポポイ（北海道）でアイヌの文様収集及び、アイヌ文化継承者の川上裕子氏への聞き取り調査を行った。

(2)研究拠点の構築

- ① これまでの研究成果であるインドネシアにおける文様調査の結果「熱帯文様論—インドネシア諸島の文様を中心に」を多摩美術大学が発行する研究紀要に投稿した。

- ② インドネシアの植物文様を活用した自動生成できる文様デザインアプリケーションの開発を行い、シンポジウムで発表した。合わせて文様生成アプリ 2021 年度版《Monyo Generator App KARAKUSA 2021 ver.0.9》を公式ホームページで公開した。
- ③ 文様研究の手法を研究代表者が大学（学部・大学院）で開講する授業（染織史2、染色文化特殊研究）で実験的に活用し、美術教育活動を行った。
- ④ 本研究に関連する文様アーカイヴについては、本学で2020年12月5日にオンライン開催された第3回アートアーカイヴシンポジウム「特集 メディウムとしてのアートアーカイヴ」の第2部アートアーカイヴと遠隔教育で、研究代表者の深津が「文様アーカイヴとアート&デザイン教育」として発表した（主催：多摩美術大学アートアーカイヴセンター 協力：多摩美術大学メディアネットワーク推進委員会）。また本シンポジウムの内容は、アートアーカイヴィングの研究誌「軌跡」第3号（2021年11月発行）にも寄稿し、合わせて同誌に代表者が「文様の創造力—多摩美術大学における文様研究の系譜」として寄稿した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 研究成果は論文だけでなく映像作品として提示することができた。繰越年度である本年度に、昨年度の成果である3つの映像作品のうち、資生堂企業資料館との協力により制作した2作品については著作権の関係で学術/教育資料としての活用はできるものの、全てを一般公開できなかった。
- (2) 本研究でのこれまでの成果は、大学研究紀要やシンポジウム、研究誌で発表することができ、外部研究者と今後の文様アプリケーションについて意見交換をすることもできた。
- (3) 北海道でアイヌ文化の文様収集に着手し、アイヌ文化継承者である川上氏からも様々な話をうかがうことができ情報収集することができたが、得られた情報の裏付けや歴史的な背景を十分に検討する必要があるとともに、公開についても慎重に検討すべきことがわかった。

5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① 深津裕子・佐々木成明・伊藤俊治「熱帯織物論—インドネシア諸島の文様を中心に」多摩美術大学研究紀要第35号 149-161 (2021)
- ② 深津裕子「特集 メディウムとしてのアートアーカイヴ」『軌跡』第3号 59-72 (2021)
- ③ 深津裕子「寄稿 文様の創造力—多摩美術大学における文様研究の系譜」『軌跡』第3号 102-103 (2021)

(2)口頭発表

- ① 深津裕子「文様アーカイヴとアート&デザイン教育」第3回アートアンドテキスタイルシンポジウム「特集 メディウムとしてのアートアーカイヴ」第2部アートアーカイヴと遠隔教育 主催：多摩美術大学アートアーカイヴセンター 協力：多摩美術大学メディアネットワーク推進委員会 2020年12月5日 オンライン開催

(3)出版物

なし

(4)映像作品

- ① 文様生成アプリ2021年度版《Monyo Generator App KARAKUSA 2021 ver.0.9》
佐々木成明監修
<https://www.youtube.com/watch?v=Wn90Hwog0JY>

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

1. 研究の目的

(1) 研究背景

現在、日本では輸血用血液製剤の85%が50歳以上の患者に使用されている。少子高齢化が進行し、献血者層人口が減少すると、2027年には“年間約85万人分の血液が不足する”とも予測されている。血液型に関係なく、ウイルス感染の心配もなく、いつでもどこでも誰にでも使用できる人工酸素運搬体(赤血球代替物)の実現が、輸血治療を補完するための医療対策の一環として強く望まれる状況にある。これまでも酸素輸送タンパク質であるヘモグロビン(Hb)を用いた人工酸素運搬体が数多く開発されてきたが、未だ実用化には至っていない。2013年、申請者は Hbを血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)で包み込んだ新しい人工酸素運搬体“(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター”(Hb-HSA₃クラスター)を合成し、それが安全性・有効性に優れた赤血球代替物として機能することを明らかにした(*Biomacromolecules* 2013, 14, 1816 など。新聞掲載、TV報道多数)。現在、実用化に向けた評価試験を医学チームと共同で推進している。

(2) 研究目的

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

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

2. 研究の計画

以下の3項目を実施した。

- (1) 高純度 Hb を重合したナノ粒子の表面に HSA を結合させる方法によりコア-シェル型の HbNP を合成し、その構造を明らかにする。粒径制御が鍵となるので、反応条件を網羅的に検討し、最適条件を絞り込む。
- (2) HbNP の酸素結合パラメーターを精密に測定し、酸素結合能を明らかにする。
- (3) ピキア酵母を宿主とした遺伝子組換え技術により、組換え Hb (rHb) を産生し、赤血球に近い酸素親和性を持つ rHb ナノ粒子 (rHbNP) を合成する。ヘムポケットの最適構造を予測し、得られた rHb の立体構造は X 線結晶構造解析から解明する。

3. 研究の成果

(1) ヘモグロビンナノ粒子(HbNP)の合成と構造解析

高純度ヒト Hb の分子表面に架橋剤(3-マレイミドプロピオン酸-N-スクシンイミジル、SMP)を反応させマレイミド基を導入後、ジチオトレイトールで重合することにより、Hb からなる微粒子を調製した。そこへ HSA を添加し、目的の HbNP を得た。動的光散乱測定により、粒径約 90nm の粒子形成を確認した。最適調製条件は、Hb 濃度(1mM)、架橋剤(20mol/Hb)、反応時間(72 時間)であり、収率は 80%であった。円偏光二色性スペクトル測定から、粒子表面の 90%が HSA で被覆されていることを明らかにした。走査型電子顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察から均一な球状構造(粒径 90nm)を確認した。

(2) HbNP の酸素結合能の解明

HbNP の酸素親和性 (P_{50}) は 8 Torr、Hill 係数 (n : 協同性の指標) は 1.4、自動酸化速度定数 (k_{ox}) は 0.03h^{-1} であり、人工酸素運搬体として十分な機能を有することがわかった。以上の成果について特許出願済。ナノ秒レーザーフラッシュフォトリス分光測定から、酸素結合速度定数を決定し、HSA による被覆がコア Hb 粒子の酸素結合反応に影響しないことを明らかにした。

(3) HbNP の酸素親和性制御

rHb を産生し、組換えヒト血清アルブミン (rHSA) との組み合わせにより rHb ナノ粒子 (rHbNP) を合成した。rHbNP は原料血液を全く必要としない人工酸素運搬体である。rHb の単結晶を国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟内の微小重力下において作成し、X 線結晶構造解析から rHb が Hb と同一構造であることを明らかにした。さらに赤血球と同じ P_{50} 値 (25 Torr) を有する人工酸素運搬体を合成するため、ヘムポケット内 Leu- β 28 を Phe (F) に置換した低酸素親和性の rHb (rHb (F)) を産生し、同様な方法で rHb (F)NP を調製した。しかし、 P_{50} は 12 Torr に留まり (Hill 係数: 1.2)、目標値には及ばなかった。そこで、窒素雰囲気下において HbNP を合成したところ、コア Hb の四次構造が Tense 状態で固定され、低酸素親和性の HbNP (Hb^TNP、 P_{50} 値 56 Torr) が得られた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 時間的制約が多かったものの、実験計画の圧縮や順序組替などの工夫を凝らしながら研究計画に従った実験を遂行し、目標を達成することができた。
- (2) 分子設計通り、Hb、HSA、架橋剤のみを原料として HbNP を合成することに成功した。特殊な試薬、製造装置は一切必要ない。調製工程はわずか 2 段階であり、他の修飾 Hb 製剤に比べ合成は簡便で収率も高いことが実証された。今後、量産も視野に入れたスケールアップを進めていく。
- (3) HbNP の酸素親和性は赤血球に比べると高い。これは架橋剤である SMP が Hb の表面リシン残基や Cys- β 93 に結合するため、Hb の四次構造変化が抑制されることに起因する。しかし、高い酸素親和性は出血ショック状態の蘇生液にはむしろ好ましく、人工酸素運搬体としての機能に問題はない。
- (4) rHbNP は血液に依存しない「完全合成型の人工酸素運搬体」である。また、遺伝子組換え技術によりヘムポケット内アミノ酸に変異を加えることで、酸素親和性を制御することも明らかとなった。
- (5) 通常の条件下で調製した HbNP と窒素雰囲気下で調製した低酸素親和性 Hb^TNP を適切な割合で混合することにより、酸素親和性を 8~56 Torr の範囲で自由に調節できることがわかった。HbNP:Hb^TNP (55:45、v:v) の混合液は、赤血球と同じ酸素親和性 (P_{50} =25 Torr) の製剤となった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Supramolecular Linear Coordination Polymers of Human Serum Albumin and Haemoglobin, R. Adachi, S. Suzuki, T. Mitsuda, Y. Morita, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 15585–15588. (2020.12.25)
- ② Hemoglobin (β K120C)-Albumin Trimer as Artificial O₂ Carrier with Sufficient Hemoglobin Allosterity, Y. Morita, A. Saito, J. Yamaguchi, T. Komatsu, *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1*, 128–136. (2020.8.1) [表紙掲載]
- ③ Lyophilized Hemoglobin-Albumin Cluster with Disaccharides: Long-Term Storable Powder of Artificial O₂ Carrier, R. Funaki, H. Iwasaki, T. Kashima, T. Komatsu, *Polym. Adv. Technol.* **2020**, *31*, 1122–1126. (2020.5.1)

(2) 口頭発表

- ① 小松晃之、蛋白質を用いた機能分子システムの創製と応用、日本化学会第101春季年会 (2021.3.19) (依頼講演)
- ② 吉田瑠佳、齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之、Lys- α 99置換ヘモグロビン変異体の合成と

- 酸素親和性、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 19)
- ③ 森田能次、大熊千夏、小松晃之、酸素結合解離に応答して構造が変化するヘモグロビンオリゴマーの合成、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 20)
 - ④ 小林樹広、岡本 航、長谷川舞、森田能次、小松晃之、組換えヒトヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素結合能、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 21)
 - ⑤ 臼井朝音、岡本 航、森田能次、河野光智、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ブタ血清アルブミンの合成、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 21)
 - ⑥ 高田諒也、森田能次、小松晃之、協同的酸素結合能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 21)
 - ⑦ 小松晃之、修飾ヘモグロビンおよび組換えヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体制剤の開発、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 3) (**依頼講演**)
 - ⑧ 岡本 航、鹿島知周、濱野辰彦、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、出血性ショックラットを用いたHemoActの有効性評価、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 3) (**学生講演賞受賞**)
 - ⑨ 森田能次、高田諒也、齊藤飛鳥、小松晃之、アロステリック効果を有する組換えヘモグロビン-アルブミントリマーの合成、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 3)
 - ⑩ 樋渡侑樹、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、森田能次、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン(Hemoxa)の合成と有効性評価、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 4)
 - ⑪ 長谷川舞、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、ヘモグロビンナノ粒子(HbNP)の合成と有効性評価、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 4)
 - ⑫ 小松晃之、ヒト用および動物用人工酸素運搬体制剤の開発、JACIライフサイエンス技術部会 (2020. 11. 19) (**招待講演**)
 - ⑬ 小松晃之、人工酸素運搬体(赤血球代替物)の開発、CBI学会2020大会 (2020. 10. 27) (**招待講演**)
 - ⑭ 高田諒也、齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之、赤血球と同等の酸素結合能を有する人工酸素運搬体“(ヘモグロビン-アルブミン)トリマー”の合成、第10回CSJ化学フェスタ2020 (2020. 10. 20)
 - ⑮ 岡本 航、樋渡侑樹、森田能次、河野光智、小松晃之、人工酸素運搬体“ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン”の合成と有効性、第10回CSJ化学フェスタ2020 (2020. 10. 21)
 - ⑯ 澤口玲実、森田能次、小松晃之、ビスターピリジン鉄錯体で連結したヘモグロビンナノファイバーの合成、錯体化学会第70回討論会 (2020. 9. 30)
 - ⑰ 齊藤飛鳥、高田諒也、森田能次、小松晃之、赤血球と同じ酸素輸送能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成、錯体化学会第70回討論会 (2020. 9. 30)
 - ⑱ 岡本 航、長谷川舞、森田能次、小松晃之、人工酸素運搬体としてのアルブミン-ヘモグロビンナノ粒子の合成、第69回高分子学会年次大会 (2020. 5. 27)

(3) 出版物

- ① 赤血球代替物となる人工酸素運搬体の開発、森田能次、小松晃之(錯体化学会フロンティア選書)フロンティア機能高分子金属錯体、編著:西原 寛、山元公寿、p. 300-323、三共出版 (2020. 6. 20)

スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と 先天性代謝異常症への応用

1. 研究の目的

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド長鎖塩基、脂肪酸、および極性頭部から構成される。スフィンゴ脂質は、極性頭部にリン酸が結合したスフィンゴミエリン (SM)、糖鎖が結合したスフィンゴ糖脂質 (GSL)、そして、水素が結合したセラミドに大きく分類されるが、脂肪酸と極性頭部の糖鎖構造に多くのバリエーションが有るために、生体には極めて多様なスフィンゴ脂質分子種が存在する。しかし、スフィンゴ脂質各分子種の生物学的機能については不明な点が多い。この原因として、(i)スフィンゴ脂質はゲノムに直接コードされておらず、かつ複雑な代謝系を有する故、特定のスフィンゴ脂質分子種を生体内で増減させてその影響を解析することが難しいこと、(ii)特に GSL は糖鎖構造が複雑であるために各分子種を網羅的に測定する簡便な測定方法が存在しないことが挙げられる。本研究では、(i)の問題点に対して、ゲノム編集技術を用いてスフィンゴ脂質代謝を担う分子機構を明らかにし、(ii)の問題点に対して、高速液体クロマトグラフィー質量分析系 (LC-MS) を用いた GSL の網羅的分析方法を確立することにより、スフィンゴ脂質の新しい生物学的機能を解明する。

①極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：脂肪酸の中でも炭素数24以上の長鎖脂肪酸は特に、極長鎖脂肪酸と呼ばれる。先天代謝異常症の一つである副腎白質ジストロフィー (X-ALD) 患者では、極長鎖脂肪酸の代謝に必須である ATP-Binding Cassette sub-family D1 (ABCD1) の機能が異常である為に、極長鎖脂肪酸が蓄積する。しかし、極長鎖脂肪酸の代謝異常と、X-ALD の主要な臨床所見である中枢神経系の脱髄や、副腎機能不全との因果関係は未だ不明である。申請者は、X-ALD患者由来の組織では、極長鎖脂肪酸の一定量がスフィンゴ脂質の脂肪酸として組み込まれる点に注目し、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質が過剰に蓄積することによって、細胞機能にどのような影響を及ぼすか明らかにする。

②X-ALD 患者の早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：X-ALD の発症頻度は約2万人に1人であり、現時点では早期の造血幹細胞移植が唯一の治療法である。従ってX-ALDの早期診断が極めて重要であるが、現行の診断基準である血中あるいは皮膚由来の線維芽細胞中の極長鎖脂肪酸値を測定する方法は煩雑であるため、新生児マススクリーニングへの適用は困難である。血中において SM は含有量の多いスフィンゴ脂質の一つであり、かつイオン化が容易なホスホリルコリンを有している為に、LC-MS による高感度分析が期待できる。そこで申請者は、自身が開発したスフィンゴ脂質分析系 (*Lipids* (2017)) を応用し、新生児マススクリーニングに適用可能な、極長鎖脂肪酸を含有する SM 分子種の簡便な測定系を開発する

③GSL の網羅的分析方法の確立：申請者は現在までに LC-MS を用いて各種スフィンゴ脂質分子種の網羅的分析方法を開発した (*Lipids* (2017))。本研究では GSL の網羅的分析方法を確立することで、スフィンゴ脂質全体の網羅的定量解析系を完成させる。非常に多様な糖鎖構造を有する GSL は抗原として免疫機能に重要である一方、X-ALD の臨床所見については異常な免疫反応の関与が指摘されている。従って本課題は、X-ALD の病態発症と GSL 代謝異常の関連性を検証する為の基盤技術として重要である。

④SM と GSL の産生振り分け機構の解明：SM と GSL の産生は、共通の基質であるセラミドに、ホスホリルコリンが結合するか、あるいはグルコースを起点とする糖鎖構造が結合するかによって振り分けられる。哺乳類では一般的に、GSLに比べてSMの存在量が多いこと、また、SMとGSLは細胞内の局在部位が異なることから、SMとGSLの両脂質をどの程度の割合で産生するかは、生体の恒常性維持に重要と思われる。申請者はSM と GSL の産生振り分けを担う二つの酵素 (SM合成酵素とセラミドグルコシルトランスフェラーゼ) に注目し、詳細な産生制御機構を解明する。

2. 研究の計画

本研究では以下4つの計画に従って行われた。

① 極長鎖脂肪酸あるいは極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質の産生への関与が示唆

- された各遺伝子とABCD1に関する多重ノックアウト細胞を用いて、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質が脂質代謝系に及ぼす影響を、メタボローム解析により検証する。
- ② 当初予定したインフュージョン法 (1分/サンプルを想定) に比べ、新たに導入したPEEKカラムを用いる方法は測定時間を要する (20分/サンプル)。予備的検討では移動相条件を変更することで、十分な測定感度を保持しつつ、4分/サンプルまで測定時間を短縮できることを確認しており、今後、新生児マススクリーニングに適用可能な条件を詳細に確定する。次に、当初の予定に従い、正常人とX-ALD患者の濾紙血を複数用いて、疑陽性と偽陰性の発生頻度を調べ、カットオフ値を設定する。
 - ③ X-ALD や GSL 蓄積症であるライソゾーム病患者の、血漿及び皮膚線維芽細胞中の各種GSL 分子種を解析し、病態特異的 GSL 分子種を選定する。
 - ④ SMS の近傍に存在する候補分子として見出された、10種類の基質が未解明の輸送担体について欠損細胞を作製し、これらの細胞中の SM, GSL およびセラミドの各分子種をLC-MS を用いて分析する。これによって SMS の調節機構を解明し、ヒト培養細胞における SM と GSL の産生振り分け機構を解明する。

3. 研究の成果

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明： Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) 作動薬であるBezafibrateによって極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質を有意に増加させること、および、アシルCoA合成酵素の発現を顕著に上昇させることを見出した。ABCD1とアシルCoA合成酵素の二重欠損細胞を作出し、極長鎖脂肪酸量および極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質量が減少するか検証したところ、スフィンゴ脂質量には殆ど変化が生じないことが明らかになった。また、極長鎖脂肪酸CoAを有機合成することに成功し、これを用いて酵素学的解析をすることが可能になった。
- ② X-ALD 患者の早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発： 96 well plate を用いて濾紙血から脂質を抽出する方法を検討した。
- ③ GSLの網羅的分析方法の確立： X-ALD患者由来の皮膚線維芽細胞におけるスフィンゴ脂質(GSLおよびスフィンゴミエリン)の分子種解析を行った結果、極長鎖脂肪酸を有するスフィンゴ脂質が蓄積していることが分かった。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：細胞内で効率良く SM を産生するためには、SM 合成の鍵タンパク質である SMS (SMS1, SMS2 の2つのアイソフォームからなる) の近傍にセラミドフロッパーゼが局在すること重要であると考えた。この仮説に基づいて、近位依存性ビオチン標識法でセラミドフロッパーゼの同定を目指した。近位依存性ビオチン標識法で同定したタンパク質の中から、フロッパーゼ活性領域を持つタンパク質を選択した。さらに、ドッキングソフト (AutoDock Vina) を用いてセラミドとのドッキングモデルを構築し、セラミドと結合する可能性の有無を調べ、セラミドフロッパーゼの候補タンパク質を絞り込んだ。

4. 研究の反省・考察

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：当初は、Bezafibrateによって発現が増加するアシルCoA合成酵素とABCD1の二重欠損細胞では、ABCD1単独欠損細胞に比べて、極長鎖脂肪酸CoA体が減少し、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質も減少することを予想した。しかし、アシルCoA合成酵素とABCD1の二重欠損細胞では、極長鎖脂肪酸CoAと極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質ともに、ABCD1単独欠損細胞に比べて有意な変化が見られなかった。このことは、スフィンゴ脂質代謝系では極長鎖脂肪酸の代謝量はある程度一定であり、過剰な極長鎖脂肪酸の代謝は別の脂質代謝系を中心に行われると考えられた。
- ② X-ALD 患者の早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：今後、更に他検体を処理するためには、ロボットアームによる自動処理などの工程が必要になる。なお、本研究課題申請時以降、各国で行われているリゾホスファチジルコリンを

指標とするマススクリーニングに関する報告が発表されており、その有効性が示されている。したがって、本研究で提案しているスフィンゴミエリンを指標とする系の優位性を検証する必要がある。

- ③ GSL の網羅的分析方法の確立：病態特異的なGSL分子種を同定するために、これまでに測定したX-ALD患者由来皮膚線維芽細胞に加え、ライゾゾーム病患者の血漿および皮膚線維芽細胞の分子種解析を行う。その際には多量のリン脂質を除去するための酵素処理などを検討する。また、イオン化効率を考慮した、より正確な定量解析を行うために、内部標準として用いる各脂質の安定同位体の合成を検討する。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：CRISPR/Cas9ゲノム編集システムを用いて、候補遺伝子のノックアウト細胞を樹立した。LC-MS/MSを用いて、SM, GSL量を測定したが、コントロール細胞と比較して顕著な違いは見られなかった。今後は、候補遺伝子のアイソフォーム遺伝子まで幅を広げて、セラミドフロッパーゼの同定に取り組み必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 (*corresponding author)

- ① Hama K*, Fujiwara Y, Hayama T, Ozawa T, Nozawa K, Matsuda K, Hashiguchi Y, and Yokoyama K. Very long-chain fatty acids are accumulated in triacylglycerol and nonesterified forms in colorectal cancer tissues. *Sci. Rep.* 11: 6163, **2021**
- ② Kawaguchi K, Mukai E, Watanabe S, Yamashita A, Morita M, So T, Imanaka T. Acyl-CoA thioesterase activity of peroxisomal ABC protein ABCD1 is required for the transport of very long-chain acyl-CoA into peroxisomes. *Sci. Rep.* 11: 2192, **2021**
- ③ Okino N, Li M, Qu Q, Nakagawa T, Hayashi Y, Matsumoto M, Ishibashi Y, and Ito M. Two bacterial glycosphingolipid synthases responsible for the synthesis of glucuronosylceramide and α -galactosylceramide. *J. Biol. Chem.* 295: 10709–10725, **2020**
- ④ Yamashita A*. Fatty acid remodeling of glycerophospholipids and formation of arachidonic acid-containing bioactive lipid mediators. *ADC Letter for Infectious Disease Control* 7:60–65, **2020**

(2) 口頭発表

- ① 濱弘太郎、藤原優子、横山和明「リピドミクスに基づくALDの脂質代謝異常の解析」第93回日本生化学会大会、オンライン開催、2020年9月
- ② 濱弘太郎 「ホルマリン固定したX-ALD患者脳剖検の脂質解析および血漿中リン脂質産生機構の探索」ペルオキシソーム病研究会、オンライン開催、2020年12月
- ③ 藤原優子、濱弘太郎、横山和明「キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質のLC-MS一斉分析系によるマウス脳におけるセラミド部分の分子種別の定量解析」第62回 日本脂質生化学会、紙上開催、2020年
- ④ 藤原優子 「ALD患者剖検脳、ALD患者線維芽細胞、およびABCD1-KO マウス脳 におけるスフィンゴ糖脂質解析」ペルオキシソーム病研究会、オンライン開催、2020年12月
- ⑤ 林康広、土屋亮人、山本瑞生、佐々木洋子、谷川和也、濱弘太郎、井上純一郎、山下純 「脂質代謝酵素を標的とした新型コロナウイルス感染を抑制する薬剤の探索」第141回日本薬学会、オンライン開催、2021年3月

(3) 出版物

- ① 山下純、ビタミン・バイオフィクター総合事典 (担当:分担執筆、 範囲: イノシトール含有リン脂質) 朝倉書店 2021

がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立

—がん幹細胞の治療高感受性化の実現—

1. 研究の目的

白血病幹細胞はがんの発症起点であり、供給源でもある。抗がん剤は、活動的ながん細胞には作用するが、静止状態にあるがん幹細胞には効果が薄い。つまり、治療によってがん細胞が現在の技術では検出限界以下に至った場合でも、治療抵抗性白血病幹細胞が極僅かに残存してしまうことが再発の原因であり、完治を困難にしている最大の要因である。この幹細胞の静止状態は、ニッチと呼ばれる細胞との緊密な接着により誘導される。したがって、もしがん幹細胞をニッチから離脱させ静止状態を解除できれば、抗がん剤に対する治療抵抗性が減弱し『高感受性化』するので、がん幹細胞の完全な排除を実現する理想的な治療法が確立することが期待出来る。

研究代表者らは、ニッチ因子である TGF- β が幹細胞の PAI-1 発現を強力に誘導すること、そしてその PAI-1 が幹細胞に運動能を付与する因子である膜型メタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の活性を抑制するため、幹細胞の運動能が制限されることを明らかにした。すなわち、ニッチから離脱しないように幹細胞を繋ぎ止めている主要な因子は PAI-1 であることを突き止めた

(Blood, 2017)。本研究は、TGF- β が誘導する PAI-1 によって白血病幹細胞がニッチに留まることが治療抵抗性の根本原因であるという仮説に基づき『ニッチからの離脱によるがん幹細胞の治療高感受性化』によりがんの撲滅を実現する斬新で独創的ながん治療コンセプトの確立を目指す。

2. 研究の計画

これまでの2年間のマウス実験で得られた知見をヒトに応用するためには、ヒトにおいても同様の理論が成り立つことを証明する必要がある。そこで、課題(1)と(2)によりマウス実験によって得られた知見がヒトにおいても再現することの確認を試みた。さらに、PAI-1 阻害剤の新規抗腫瘍作用として、がん免疫活性化効果を見出したので、課題(3)でその機序の解明や治療効果を検討した。

- (1) ヒト白血病マウスでの有効性の検証
- (2) 患者検体を利用した白血病幹細胞解析
- (3) PAI-1 阻害剤によるがん免疫活性化誘導の検討

3. 研究の成果

- (1) ヒト白血病マウスでの有効性の検証
 - ・慢性骨髄性白血病患者の骨髄細胞から白血病幹細胞を回収し、超免疫不全マウスである NOG マウスに移植することによるモデル動物の作製を試みたが、生着率が低く、治療効果の検討には不十分であった。
- (2) 患者検体を利用した白血病幹細胞解析
 - ・慢性骨髄性白血病患者の白血病幹細胞を解析したところ、白血病幹細胞では TGF- β シグナルが亢進し、PAI-1 を高発現していることを見出した。
- (3) PAI-1 阻害剤によるがん免疫活性化誘導の検討
 - ・PAI-1 の新規機能として免疫チェックポイントの発現制御を見出した。悪性黒色腫や大腸癌のモデルマウスに免疫チェックポイント阻害剤とともに PAI-1 阻害剤を併用投与すると著明な腫瘍退縮効果が得られることを見出した。

4. 研究の反省・考察

白血病幹細胞における TGF-β—PAI-1 シグナルの活性化は、マウス白血病幹細胞と同様の現象であり、マウス実験によって得られた知見をヒトに応用できる可能性が高いことを示唆する。白血病モデルマウスの作製は不調であったが、最近新たに開発された免疫不全マウスは、NOG マウスよりも生着効率が良いことが明らかとなっており、今後はそのマウスを用いて引き続き検討を行いたい。PAI-1 阻害剤が免疫チェックポイント阻害剤の効果を増強する知見は重要で、本剤が白血病だけでなく、現在免疫チェックポイント阻害剤が適用されている多くの難治性悪性腫瘍に適応拡大が期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Imai J, Yahata T, Ichikawa H, Ibrahim AA, Yazawa M, Sumiyoshi H, Inagaki Y, Matsushima M, Suzuki T, Mine T, Ando K, Miyata T, Hozumi K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates against intestinal fibrosis in mice. *Intest Res.* 2020; 18: 219-228. IF: 2.17.
- ② Watanabe N, Kidokoro M, Tanaka M, Inoue S, Tsuji T, Akatsuka H, Okada C, Iida H, Okada Y, Sato T, Yahata T, Hirayama N, Nakagawa Y, Inokuchi S. Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial- to-mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells. *Cancer Cell Int.* 2020; 20:263. IF: 2.41.
- ③ Yahata T*, Ibrahim AA, Hirano KI, Muguruma Y, Naka K, Hozumi K, Vaughan DE, Miyata T, Ando K. Targeting of plasminogen activator inhibitor-1 activity promotes elimination of chronic myeloid leukemia stem cells. *Haematologica.* 2021; 106: 483-494. IF: 7.57. *corresponding author.
- ④ Harada K, Yahata T*, Onizuka M, Ibrahim AA, Kikkawa E, Miyata T, Ando K. Plasminogen activator inhibitor type-1 is a negative regulator of hematopoietic regeneration in the adipocyte-rich bone marrow microenvironment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021; 557: 180-186. IF: 2.99. *corresponding author.
- ⑤ Harama D, Yahata T, Kagami K, Abe M, Ando N, Kasai S, Tamai M, Akahane K, Inukai T, Kiyokawa N, Ibrahim AA, Ando K, Sugita K. IMiDs uniquely synergize with TKIs to upregulate apoptosis of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells expressing a dominant-negative IKZF1 isoform. *Cell Death Discov.* 2021; in press.

(2) 口頭発表

- ① 今井 仁、八幡 崇、他7名、Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)制御による腸管線維化抑制の検討、第47回日本潰瘍学会、2021年1月

(3) 出版物

なし

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

1. 研究の目的

- (1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。
 - ①象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定と修復象牙質の形成促進 (Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析) :象牙芽細胞と骨細胞で任意の遺伝子を破壊可能なDmp1-T2A-Creマウスの特性について評価を行った。
 - ②象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定と修復象牙質の形成促進 (メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析) :象牙質損傷に伴って発生すると思われるメカニカルストレスが硬組織の石灰化をどのように促進するのか分子レベルで解明を試みる。
- (2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。
- (3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。
 - ① 遺伝子改変マウスを用いて象牙芽細胞の細胞死誘導モデル系を構築し、象牙芽細胞の細胞死による象牙芽細胞分化および修復象牙質形成に及ぼす作用を調べる。
- (4) 量的/質的な硬組織解析を駆使することで、本研究にて薬物投与および時間的変遷によって新生/吸収した硬組織について定量評価を行う。

2. 研究の計画

- (1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。
 - ① Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析:各組織におけるCreリコンビナーゼの発現をqPCRを用いて詳細に解析を行う。またT2Aによるバイシストロン性の発現が正常に行われているかどうかについてタンパク質レベルで確認を行う。
 - ② メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析:間葉系幹細胞へ伸展刺激を負荷し、その際の遺伝子発現から石灰化促進に関与する分子の同定を試みる。
- (2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。
 - ① 細胞膜センサータンパク質に作用し石灰化を誘導する候補物質を絞り込み、実験的形成窩洞に投与し、その薬理作用の濃度・時間依存性を検討する。
 - ② 象牙質石灰化前線の環境を維持すると考えられるイオン輸送系について検討する。
 - ③ 感覚受容細胞としての象牙芽細胞機能で誘発される象牙質形成を検討する。
- (3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。
 - ①修復象牙質形成促進機構の解析: Col1-Cre; flox-stop-flox-DTRマウスを作製する。ジフテリア毒素投与により象牙芽細胞の細胞死を誘導し、修復象牙質形成への影響を調べる。
- (4) 材料工学的指標を用いた骨質解析および μ CT を用いた硬組織の超微細構造解析は、In vivo/Ex vivo における定量評価に適しており、周囲環境とマイクロ/ナノ構造特性との関連性を高い精度で予測する。

3. 研究の成果

(1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。

① Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析： qPCRの結果、Creリコンビナーゼの硬組織における高発現を確認した。脳および性巣における発現リークが認められたが、本研究の遂行には問題がないレベルであると判断した。また、硬組織においてDmp1およびCreタンパク質が独立した分子として存在していたことから、T2Aを用いたバイシストロン性の遺伝子発現機構が正常に機能している事が確認できた。

② メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析： 間葉系幹細胞に対するメカニカルストレス刺激が線維芽細胞増殖因子の発現を亢進する事を発見した。線維芽細胞増殖因子に対する中和抗体存在下では石灰化が顕著に抑制したことから、メカニカルストレスは線維芽細胞増殖因子の発現亢進を介して石灰化を促進することが明らかとなった。

(2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。

① 細胞膜センサータンパク質に作用する物質を同定した。この物質は濃度依存的に象牙芽細胞による石灰化を促進した。

② 象牙芽細胞の陰イオン輸送を明らかにした。

③ 感覚受容細胞としての象牙芽細胞機能で誘発される象牙質形成を検討したところ、機械刺激誘発石灰機構に独特な調節機構が見出された。

(3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。

① 象牙芽細胞の細胞死を引き金とした修復象牙質形成機構の存在が明らかになった。

② 象牙芽細胞死にともない歯髄細胞の象牙芽細胞様細胞への分化が誘導された。

③ 象牙芽細胞死により誘導された象牙芽細胞様細胞は修復象牙質の形成に寄与した。

④ 象牙芽細胞死により、歯髄細胞における副甲状腺ホルモン(PTH)受容体の発現が上昇した。

⑤ PTHの投与により、象牙芽細胞死にともなう修復象牙質形成が促進した。

(4) 高撮像分解能(0.5 μ m)を有する μ CTを用いた構造解析により、造成/吸収した硬組織の定量解析を順調に進めている。硬組織の質的因子は、生体アパタイト(BAp)結晶配向性とコラーゲン線維の走行異方性を中心に検索を進めている。

4. 研究の反省・考察

(1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。

① Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析： 硬組織特異的Creマウスとして使い勝手の良いマウス系統の開発に成功した事が確認できたため、早急に論文化を進める。また、レポーターマウスとの交配が遅れているが、こちらも早急に進める。

② メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析： 硬組織の再生とメカニカルストレスを結びつける新たな分子メカニズムを発見する事ができた。引き続き本経路の標的分子やその発現制御機構について解析を進める。

(2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。

① 象牙質形成物質の実験的成窩洞への投与方法に苦勞しており、現在、材質などの検討を行っている。

(3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。

① DMP1-Cre ; flox-stop-flox-DTRマウスを用いた象牙芽細胞枯渇実験について： COVID-

19の感染拡大により、動物飼育環境が制限されたために交配・作出が遅れている。

(4) 新生硬組織はいずれも石灰化度が低く、 μ CT画像をもとに二値化したデータのみを用いた解析は困難であり、同一部位あるいは相当部位における薄切切片とのキャリブレーションが最重要事項になると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Watanabe K, Nakamura T, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. A novel GNAS-mutated human induced pluripotent stem cell model for understanding GNAS-mutated tumors. *Tumour Biol.* 2020 Sep;42(9):1010428320962588. doi: 10.1177/1010428320962588.

②Kubo, S., Yamaguchi, A., Matsunaga, S. An Analysis of 949 Cases of Condylar Process Fracture of the Mandible. *IOSR-JDMS*, 19(4):47-53, 2020. (DOI: 10.9790/0853-1904134753)

③Ohno T, Nakamura T, Nakae S, Morita H, Matsumoto K, Saito H, Takeda K, Okumura K, Azuma T. TSLP is a negative regulator of RANKL-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Sep 24;530(3):508-512. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.055. Epub 2020 Jun 26.

④Sato M, Aoki H, Nakamura T, Onodera S, Yamaguchi A, Saito A, Azuma T. Effects of intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) on osteoblastic differentiation and mineralization of mouse induced pluripotent stem cells in a 3D culture model. *J Periodontal Res.* 2020 Oct;55(5):734-743.

⑤Onodera S, Saito A, Hojo H, Nakamura T, Zujur D, Watanabe K, Morita N, Hasegawa D, Masaki H, Nakauchi H, Nomura T, Shibahara T, Yamaguchi A, Chung UI, Azuma T, Ohba S. Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis. *Stem Cell Reports.* 2020 Jul 14;15(1):125-139. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.05.008. Epub 2020 Jun 11.

⑥Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Apr 9;524(3):702-709. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.136. Epub 2020 Feb 5.

⑦Hosoya A, Nazmus S, Takebe H, Fujii S, Seki Y, Mizoguchi T, Shimo T, Iijima M, Irie K. Stem cell properties of Gli1-positive cells in the periodontal ligament

Journal of Oral Biosciences, 62(4):299-305, 2020

⑧Satomi Kamata, Maki Kimura, Sadao Ohyama, Shuichiro Yamashita, Yoshiyuki Shibukawa. Large-conductance Calcium-activated Potassium Channels and Voltage-Dependent Sodium Channels in Human Cementoblasts. *Front. Physiol.* 12: 634846. 2021. doi: 10.3389/fphys.2021.634846.

⑨Ofusa W, Yamada Y, Ishida R, Ohkubo M, Higashikawa A, Kimura M, Shibukawa Y. Use of barometric pressure and electromyography measurement techniques to elucidate the mechanisms by which bolus passes from the oral cavity to the oropharynx during swallowing. *Physiol Behav.* 226:113-115, 2020. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.113115.

⑩溝口利英, 西田大輔, 「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」 13. 歯髄環境による破歯細胞の分化調節メカニズム。 *歯科学報*, 120(04):381-390, 2020

⑪Nango H, Kosuge Y, Sato M, Shibukawa Y, Aono Y, Saigusa T, Ito Y, Ishige K. Highly Efficient Conversion of Motor Neuron-Like NSC-34 Cells into Functional Motor Neurons by Prostaglandin E2 Cells, 9:E1741, 2020. doi: 10.3390/cells9071741.

- ⑫Nakamura-Takahashi, A., Tanase, T., Matsunaga, S., Shintani, S., Abe, S., Nitahata-Kasaharae, Y., Watanabe, A., Hirai, Y., Millánh, JL., Narisawa, S., Okada, T., Shimada, T., Yamaguchi, A., Kasahara, M. High-level expression of bone targeted alkaline phosphatase induced by adeno-associated virus vector ameliorates femur formation and mineralization in hypophosphatasia mice. *Calcif Tissue Int*, 106:665-677, 2020 (doi: 10.1007/s00223-020-00676-5).
- ⑬Kasahara, M., Matsunaga, S., Someya, T., Kitamura, K., Odaka, K., Ishimoto, T., Nakano, T., Abe, S., Hattori, M. Micro- and nano-bone analyses of the human mandible coronoid process and tendon-bone entheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 108(7):2799-2806, 2020 (doi: 10.1002/jbm.b.34609.).
- ⑭Matsunaga, S., Odaka, K., Kasahara, N., Kasahara, M., Kitamura, K., Yamada, M. Structural characteristics of newly formed osteon-like structure in peri-implant bone. *Jpn J Clin Biomech*, 41:393-398, 2020.
- ⑮Odaka, K., Matsunaga, S., Kitamura, K., Kasahara, M., Kasahara, N., Yamada, M. 3-dimensional alignment of biological apatite crystallites around dental implant in beagle maxilla. *Jpn J Clin Biomech*, 41:399-402, 2020.
- ⑯Kasahara, N., Odaka, K., Kitamura, K., Kasahara, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Hashimoto M. Analysis of microstructure in capybara's femur. *Jpn J Clin Biomech*, 41:271-276, 2020.
- ⑰Kitamura, K., Odaka, K., Kasahara, M., Kasahara, N., Yamada, M., Matsunaga, S. Three-dimensional analysis of growth process in embryonic laryngeal cartilage *Jpn J Clin Biomech*, 41:413-418, 2020
- ⑱Sugahara, K., Koyama, Y., Koyachi, M., Matsunaga, S., Odaka, K., Kitamura, K., Nakajima, K., Matsuzaka, K., Abe, S., Katakura, A. Relationship between the immunohistological examination and fluorescence visualization of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 20(3):2153-2160, 2020 (doi: 10.3892/ol.2020.11772).
- ⑲Koyachi, M., Sugahara, K., Odaka, K., Matsunaga, S., Abe, S., Sugimoto, M., Katakura, A. The accuracy of Le Fort I osteotomy combined with CAD/CAM technology and Mixed Reality. *Int J Oral Maxillofac Surg*, S0901-5027(20)30378-7, 2020 (doi: 10.1016/j.ijom.2020.09.026)
- ⑳Nakajima, K., Matsunaga, S., Morioka, T., Nakano, T., Abe, S., Furuya, Y., Yajima, Y. Effects of unloading by tail suspension on biological apatite crystallite alignment in mouse femur. *Dent Mater J*, 39(4):670-677, 2020 (<https://doi.org/10.4012/dmj.2019-187>).
- ㉑Sugahara, S., Koyachi, M., Odaka, K., Matsunaga, S., Katakura, A. A safe, stable, and convenient three-dimensional device for high Le Fort I osteotomy *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 42(1):32, 2020 (doi: 10.1186/s40902-020-00276-1).
- ㉒Sugahara, K., Koyachi, M., Koyama, Y., Sugimoto, M., Matsunaga, S., Odaka, K., Abe, S., Katakura, A. Mixed Reality and 3 Dimensional Printed Models for resection of maxillary tumor. *Quant Imaging Med Surg*, 11(5):2187-2194, 2020. (doi: 10.21037/qims-20-597)
- ㉓Sugahara, K., Matsunaga, S., Yamamoto, M., Odaka, K., Koyachi, M., Koyama, Y., Michiwaki, M., Noguchi, T., Morita, S., Kasahara, N., Abe, S., Katakura, A. Retromandibular vein position and course patterns in relation to the mandible: anatomical morphologies requiring particular vigilance during sagittal split ramus osteotomy. *Anat Cell Biol*, 31; 53(4):444-450, 2020. (doi: 10.5115/acb.20.236)
- ㉔Tasaka, A., Okano, H., Odaka, K., Matsunaga, S., Goto, T., Abe, S., Yamashita S. Comparison of artificial tooth position in dentures fabricated by heat-curing and additive manufacturing. *Aust Dent J*, 2021 (in press). (doi: 10.1111/adj.12817)

(2) 口頭発表

- ① Takashi Nakamura, Molecular mechanisms of craniosynostosis in Apert syndrome. 68th Annual meeting of Japanese association for dental research. 2020年11月8日
- ② 溝口利英, Cre/loxP遺伝子情報改変技術を用いた硬組織研究, 第50回公益社団法人日本口腔インプラント学会記念学術大会、Back To The Basics 2020年, 9月19日-30日
- ③ 溝口利英, Cre/loxP遺伝子情報改変技術を用いた間葉系幹細胞の分化機構の解明, 第62回歯科基礎医学会学術大会, アップデートシンポジウム6, 骨芽細胞・象牙芽細胞分化研究のNew Horizon, 2020年, 9月28日-10月4日
- ④ 溝口利英, In Vivo Dynamics of Dental Tissue Regeneration, 第63回国際歯科研究会 日本部会 総会・学術大会, Symposium III: Pathophysiological approach from oral function to systemic diseases, 2020年, 11月8日
- ⑤ 溝口利英, フェイトマッピング解析から明らかになった骨髄間葉系幹細胞が司る骨代謝調節機構, 第44回長崎骨粗鬆症研究会, 2021年2月25日
- ⑥ 溝口利英, フェイトマッピング解析から明らかになった骨髄間葉系細胞が司る骨代謝調節, 第35回骨代謝セミナー, 2021年5月28日
- ⑦ 西田大輔, 荒井敦, 宇田川信之, 中村美どり, 堀部寛治, 小林泰浩, 高橋直之, 溝口利英, 破歯/破骨細胞形成を負に制御する歯髄環境の解析, 第5回日本骨免疫学会ウインタースクール, 2020年1月24日, 軽井沢(Hotelマロウド), 第5回日本骨免疫学会ウインタースクールプログラム抄録集, 28, WST8, 2020
- ⑧ 溝口利英, 趙麗娟, 荒井敦, 堀部寛治, 細矢明宏, 岡部幸司, 進正史, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之, 象牙芽細胞の枯渇は象牙芽細胞の分化と石灰化を誘導する, 第38回日本骨代謝学会学術集会2020年10月9日-11日
- ⑨ 関有里, 建部廣明, 溝口利英, 飯嶋雅弘, 入江一元, 細矢明宏, Gli1陽性歯根膜細胞は矯正学的歯の移動時における骨形成に寄与する, 第18回日本口腔ケア学会 総会・学術大会, 2021年4月17日-18日、Web開催
- ⑩ Yuri Seki, Hiroaki Takebe, Toshihide Mizoguchi, Masahiro Iijima, Kazuharu Irie, Akihiro Hosoya, Gli1-positive periodontal ligament cells differentiate into osteoblasts during orthodontic tooth movement. 第1回国際口腔ケア学会 総会・学術大会, 2021年4月17日-18日
- ⑪ Toshihide Mizoguchi, Depletion of odontoblasts induces dental tissue regeneration, The 48th annual meeting of the European Calcified Tissue Society (ECTS) 2021, 2021年5月8日、Web開催
- ⑫ 澁川義幸, What we can learn from the textbooks: 下顎運動の末梢性・中枢性神経制御機構と下顎位、シンポジウム6: 欠損歯列における咬合再構成 - 適正な咬合高径をどのように求めるか - 日本補綴歯科学会 第129回学術大会 令和2年6月27日-28日
- ⑬ Shibukawa, Y. Why do we feel a "toothache" with nerve free dentin: Sensory transduction mechanism in dentinal sensitivity based on the special architecture of dentin-pulp complex". Symposium 16: The mouth is the gate of happiness! Common Factors between Oral Senses and Whole Body. the 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Virtual Experience, March 28-30, 2021

(3) 出版物

- ① Kato S., Sawatsubashi S., Yokoyama A., Nakamura T., Kouzmenko A. Mechanisms of Osteoprotective Actions of Estrogens. Encyclopedia of Bone Biology 1st Edition, Academic Press, 18th June, 2020.
- ② 澁川義幸, 新人もベテランも知りたい! SRPで痛みが生じるサイエンス、歯科衛生士、44 (11) : 24-32、2020
- ③ 澁川義幸, 急性炎症時はSRPの痛みを感じやすいのでしょうか。読者が本当に聞きたいこと、全部答えます。歯科衛生士、45 (6) : 84、2021

アディポネクチンによる体内時計制御機構の解明とその臨床的意義

1. 研究の目的

(1) 我が国ではシフトワーカー及び長時間労働者の数が急増しており、これらの労働者の健康問題がクローズアップされている。シフトワークによる肥満、糖尿病などの代謝性疾患の発症メカニズムについては不明な点が多いが、体内時計の変調の関与が示唆されている。体内時計の変調が代謝性疾患の発症に関連していることが明らかにされているが、体内時計の変調による代謝性疾患の発症メカニズムの詳細は不明な点が多い。近年、臓器連関を媒介する液性因子として、脂肪細胞から分泌される”アディポネクチン”が注目を集めている。アディポネクチンはその受容体を介して、糖・脂質代謝促進作用のみならず、抗がん作用などの様々な機能を示す生理活性物質である。申請者は、初代肝細胞を用いた検討より、アディポネクチン受容体作動薬が時計遺伝子の発現量及び振幅を低下させることを見出した。このことは、アディポネクチンシグナルの活性化は肝細胞の体内時計を直接的に制御することを示している。そこで本研究は、体内時計の変調に起因した生活習慣病の発症メカニズムを、代謝調節因子であるアディポネクチンによる体内時計システム制御の観点から明らかにする。

2. 研究の計画

(1) アディポネクチンによる時計遺伝子の発現制御機構(2020年度)

①肝臓の体内時計システムへのアディポネクチンの直接作用を明らかにするため、体内時計を同調させた初代肝細胞に組換えアディポネクチン処理して時計遺伝子の発現量を測定する。

②肝臓のアディポネクチンシグナルは、AdipoR1及びAdipoR2の受容体を介してシグナル伝達される。そこで、これら受容体をRNAi法により発現抑制した初代肝細胞を用いて肝臓の体内時計制御におけるアディポネクチン受容体の関与を明らかにする。

③アディポネクチンはその受容体の下流に存在するAMPキナーゼ(AMPK)及び核内受容体PPAR α の活性化を介してエネルギー代謝を調節している。そこで、AMPK阻害剤あるいはPPAR α アンタゴニストを用いてアディポネクチンによる体内時計制御機構を明らかにする。

(2) シフトワーカー及び長時間労働者におけるアディポネクチン濃度の変動(2020年度)

シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度を解析し、体内時計関連分子としての新たな臨床的意義を検証する。本研究の参加に同意した被験者より、採血(10mL)及び質問紙による生活習慣を含めた社会心理的要因(シフトワーカーの有無、勤務体系、抑うつ症状、ピッツバーグ睡眠質問票、朝型夜型質問紙)について評価を行う。現在集められた採血の検体からDNAのSNP多型(CLOCK、BMAL1)及び血清におけるアディポネクチン濃度、IL-6、TNF α などのサイトカイン濃度を測定する。

(3) アディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析

新型コロナウイルスの蔓延のため、上記の臨床研究の着手が困難であったため、2022年度に予定していたアディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析を本年度に前倒して行った。予備的検討においてVery low density lipoprotein (VLDL)分泌能の時間依存性にアディポネクチンの関与が認められたことから、アディポネクチンは、体内時計システムの調節を介して肝臓のエネルギー代謝に時間依存性を与えていることが推察される。そこで本研究では、アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御及び時間依存的なエネルギー代謝制御についてアディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスを用いて検討する。本研究におけるControlマウスは、同腹より得られたAdn(+/+)マウスを用いる。

①Adn(-/-)及びControlマウスの肝臓における時計遺伝子の発現量を測定する(4時間毎)。

②アディポネクチンによるエネルギー基礎代謝(酸素消費量、二酸化炭素排出量、エネルギー消費量)について呼吸代謝装置を用いて解析する。

③Adn(-/-)マウスの随時血糖値及びインスリン値を測定する。また、時間依存的な糖新生能、耐糖能、インスリン感受性へのアディポネクチンの影響についても解析する。

④アディポネクチンによる時間依存的な血液生化学的パラメーター及び肝臓脂質含量を検討する。

3. 研究の成果

(1)アディポネクチンによる時計遺伝子の発現制御機構

アディポネクチンはその受容体の下流に存在するAMPキナーゼ(AMPK)及び核内受容体PPAR α の活性化を介してエネルギー代謝を調節している。そこで、AMPK阻害剤あるいはPPAR α アンタゴニストを用いてアディポネクチンシグナルによる時計遺伝子発現制御機構を検討した。アディポネクチンシグナルの活性化による時計遺伝子発現量の低下は、AMPK及びPPAR α のいずれかあるいは両方の阻害剤処理によって回復が見られた。

(2)シフトワーカー及び長時間労働者におけるアディポネクチン濃度の変動

日本大学医学部附属板橋病院の看護職員及び受診患者を被験者としてシフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度の解析を予定していた。しかしながら、新型コロナウイルスの蔓延により、感染指定病院である本院での臨床研究の実施が困難な状況下が続いたため、被験者からのサンプル採取が2020年12月まで時間を要した。合計97名(夜勤(当直)あり:52名、夜勤(当直)なし:45名)が募集し、本研究の参加に同意した。参加同意した後、午前中に病院の指定場所で採血(10mL)及び質問紙による生活習慣を含めた社会心理的要因(シフトワーカーの有無、勤務体系、抑うつ症状、ピッツバーグ睡眠質問票、朝型夜型質問紙)について評価を行った。[解析]現在集められた採血の検体からDNAのSNP多型(CLOCK、BMAL1)及び血清におけるアディポネクチン濃度、IL-6、TNF α などのサイトカイン濃度については解析中である。

(3)アディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析

①アディポネクチンによる肝臓の体内時計システム制御について、まずAdn(-/-)マウスの肝臓の時計遺伝子発現量の概日リズムの観点から解析を行った。その結果、Adn(-/-)マウスの肝臓における時計遺伝子発現量の概日リズムの変調が認められ、特にCircadian Time (CT)22におけるCry1及びCry2の発現量に著しい低下が示された。一方、Adn(-/-)マウスの骨格筋(腓腹筋)および精巣上体周囲の脂肪組織において時計遺伝子の発現量の概日リズムに違いは認められなかった。

②アディポネクチンによる脂質代謝の時間依存性を明らかにするために、Adn(-/-)マウスにおける血中脂質濃度を測定した。Adn(-/-)マウスにおいて血清トリグリセリド濃度、血清コレステロール濃度の増加及び概日リズムが認められたが、Controlマウスにおけるこれらの濃度は一日を通してほぼ一定の値を示した。そこで、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量を解析したところ、Adn(-/-)マウスにおいて脂質合成のマスターレギュレーターであるSrebp1c、その標的遺伝子であるFas発現量の増加及び概日リズムの異常が認められた。また、SREBP1タンパク質は小胞体からゴルジ体へ輸送され、そこでプロセッシングを受け、転写因子として作用するが、近年、SREBP1のプロセッシングを抑制する膜タンパク質として同定されたInsig2a遺伝子の発現量がAdn(-/-)マウスにおいて著しく減少していた。これらの結果から、アディポネクチンはSREBP活性を介したde novoの脂肪酸合成の時間依存的な制御を通じて、血清トリグリセリドの恒常性維持に関与していることが示された。また、Adn(-/-)マウスにおいてコレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA reductase、肝臓からのコレステロールの流出に関与するAbca1発現量の増加、そしてコレステロールの肝臓への取り込みに関与するSr-b1発現量の低下が見られた。

予備的検討で見られたAdn(-/-)マウスにおけるVLDL分泌能の日内変動の消失の分子メカニズムを明らかにする目的で、肝臓におけるVLDL分泌関連遺伝子の発現量を検討した。Controlマウスでは、ApoB100及びMtp発現量は、CT22に発現ピークを持つ概日リズムを示したが、Adn(-/-)マウスにおいてはこれらの概日リズムは消失していた。さらに、Adn(-/-)マウスにおいて、これら遺伝子の転写調節因子であるPPAR α 遺伝子の発現量においても、Adn(-/-)マウスでは概日リズムの消失が確認された。以上の結果より、アディポネクチンは時間依存的なPPAR α 遺伝子の発現制御を介してVLDL分泌を調節していることを明らかにした。

4. 研究の反省・考察

(1) アディポネクチンによる時計遺伝子の発現制御機構

①本研究により、アディポネクチンシグナルによる肝臓の体内時計システム制御には、AMPK活性および核内受容体PPAR α の関与が示唆された。

②肝臓のアディポネクチンシグナルは、AdipoR1及びAdipoR2の受容体を介してシグナル伝達される。そこで、これら受容体をRNAi法により発現抑制した初代肝細胞を用いて肝臓の体内時計制御におけるアディポネクチン受容体の関与を検討したが、初代肝細胞におけるAdipoR1及びAdipoR2の発現量を減少させる遺伝子導入法が本年度内で確立できなかったことが今後の課題である。

(2) シフトワーカー及び長時間労働者におけるアディポネクチン濃度の変動

昨年新型コロナウイルスの蔓延により、感染指定病院である日本大学医学部附属板橋病院での検体採取が困難な状況下にあったため、関連病院でのサンプル収集も試みたが、スタッフの感染があり、臨床サンプルの収集が予定通りに進まなかった。新型コロナウイルスの蔓延が完全には収束していないが、シフトワーカーの血液サンプルを採取し、現在、アディポネクチン濃度の解析を行うところまで進んでいる。本研究より得られるシフトワーカーや長時間労働者と血中アディポネクチン濃度との関係に関する臨床的な知見は、体内時計分子マーカーとしての新たな可能性を示すとともに、「働き方」が問われている我が国において、社会問題の解決の一助となるものである。

(3) アディポネクチン欠損(Adn(-/-))マウスの肝臓における体内時計システムの解析

Adn(-/-)マウスの肝臓における体内時計システムの変調が認められたが、脂肪や筋肉では観察されなかったことから、アディポネクチンによる時計遺伝子発現制御は肝臓特異的であることが示された。アディポネクチンによる脂質代謝制御には時計遺伝子発現制御を介した新たなメカニズムが存在することを強く示唆している。今後、糖代謝への時間依存的な制御についての研究も進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	武 蔵 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	アジアにおける女性の経済・政治活動への参加拡大とそのインパクト	研究分野	経 済 学
キ ー ワ ー ド	①女性のエンパワメント、②女性起業家、③政治参加、④アフーマティブ・アクション、⑤経済実験、⑥テキストマイニング、⑦アジア、⑧インド		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
二 階 堂 有 子	経 済 学 部	教 授	研究の総括、アンケート調査やフィールド実験の準備と実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 健 太	経 済 学 部	教 授	フィールド実験の実施、データ分析
高 橋 徳 行	経 済 学 部	教 授	GEM調査を用いた女性起業家の動向の国際比較
海 老 原 崇	経 済 学 部	教 授	上場企業の経営財務データを用いた分析
根 元 邦 朗	経 済 学 部	教 授	政治家の発言のテキストマイニング、政治計量分析
赤 塚 尚 之	滋 賀 大 学 経 済 学 部	准 教 授	アジア諸国のコーポレート・ガバナンス関連法体系の比較

アジアにおける女性の経済・政治活動への参加拡大と そのインパクト

1. 研究の目的

ジェンダー平等（女性のエンパワメント）と経済発展とに強い正の関係があることが多くの研究で明らかになっている（Pande and Ford 2011; Duflo 2012）。アジアでは過去半世紀に渡り、女性に対する教育の普及や参政権の拡大において大きな改善・進歩がみられた。しかし、ビジネスや政治の分野において、代表的な立場にある女性はいまだに少ない。そのため、日本を含む多くの国が女性の登用・活躍推進に向けて、様々な施策を導入するか、導入に向けて検討を始めている。

女性の登用・活躍推進に向けて、積極的にクォータ制を導入してきたのは欧州諸国である。会社役員や議員などの女性の割合をあらかじめ一定数に定めることを通じて、女性の社会進出を後押しするものである。ただし、欧州諸国のクォータ制に関する研究では、管理職としての経験や適性を有する女性の蓄積が十分でない状況でクォータ制を導入すると、むしろ女性役員の存在が企業の業績に負の影響を与えるという研究（Denzo and Ross 2011; Smith 2014）もあり、クォータ制のデザインやセレクションプロセスが重要であることが示唆されている。他方、政治分野のクォータ制については、女性議員は社会サービスや福祉により多くの財源を割く傾向にあることや、女性の政治家の方が男性よりも汚職が少ない傾向がある、といった正の影響を示している研究も多い（Chen 2011; Brollo and Troianob 2016）。

このように、欧州諸国における女性登用・推進政策やその効果については研究が蓄積してきているが、アジア諸国についての研究はいまだ乏しい。特にアジア諸国の人材不足は深刻化しているにも拘わらず、女性の活用が進んでいない。日本のように高齢化に向かっている国では、女性の労働参加の拡大により労働力減少の影響を緩和することを通じて、インドのように男児選好が強い国では、女性が社会で活躍することを通じて、経済成長ばかりか社会変革をももたらす可能性がある。アジアの女性の登用・活躍を阻んでいる要因としては、家事・育児負担が良く指摘されているが、フォーマルな制度（例えば、女性への相続不平等）や慣習の影響で、女性の行動が制限されている場合もある。また、女性の能力に対する固定概念が女性のビジネスや政治への参加拡大を妨げている可能性がある。

他方、アジア諸国にもクォータ制をすでに導入している国々がある。例えば、韓国では、2004年以降、国政・地方議会の議員候補者に占める女性割合を定めている。インドでも、上場企業の取締役会に少なくとも一人の女性を登用すること（2013年会社法）や地方議会の議席数の三分の一を女性とすること（1993年第73次憲法改正）を義務付けており、政策のデザインやその影響について分析可能である。

本研究の目的は、インドや日本、韓国などアジア諸国において、ビジネスや政治分野における女性のエンパワメントが個人や社会にもたらす影響について、経済的側面と政治的側面から分析を行うことである。経済的側面では、(1) 上場企業の経営財務データを用いて、女性経営者・管理職の存在が企業の業績に与える影響を明らかにする。また、(2) Global Entrepreneurship Monitor (GEM 調査) を用いて、女性を取り巻く環境（制度や規制、市場）が女性の起業活動や経済に与える影響について国際比較を行う。さらに、(3) 実際にインドの小規模企業経営者を対象に、リスクや信頼、競争心といった各種選好の男女差に焦点をあてた経済実験を行う。そして、それを質問票調査のデータと結合させることにより、女性起業家の増加や企業の成長を促す要因を明らかにする。政治的側面として、(4) 国政・地方議会議員がソーシャル・ネットワークなどを通じて発信したメッセージのテキストマイニングや計量政治分析を通じて、政策的嗜好の男女差やアフーマティブ・アクション導入の影響について明らかにしていく。こうした研究を通じ、日本におけるアフーマティブ・アクションの在り方に一定の知見を得ることができるとともに、アジアにおいて、今後の持続可能な開発の鍵となる女性の活用促進に向けて政策的インプリケーションを提示することができると思われる。

2. 研究の計画

- (1) 赤塚は、インドにおいて CSR 活動に関する支出や女性取締役の登用を義務付けた「2013年会社法」について、その後の改正など制度的な枠組みを引き続き整理する。海老原と二階堂は、インドの上場企業のパフォーマンスに、女性の取締役登用義務付けがいかに影響を与

- えているかについて実証分析を行う。海老原は、日本の文脈でも実証分析を検討する。
- (2) 高橋は、日本を中心としたアジアにおいて、女性を取り巻く環境や女性の起業活動が経済に与える影響について論文をまとめる。
 - (3) 田中・二階堂は、南インドのカルナータカ州・マイソールでの潜在的企業家や小規模企業家を対象に実施した経済実験とアンケート調査のデータを用いて論文を完成させる。また、当該地域でその後のフォローアップ調査も継続する。
 - (4) 根元は、アジアにおける政治制度ならびに政治分野における女性の登用とその影響について論文をまとめる。

3. 研究の成果

具体的な研究成果は「5. 研究発表」を参照のこと。研究計画に基づいて、内容を整理すると下記の通りである。

- (1) 赤塚は、コロナ渦で改正された会社法の概要を整理した。海老原と二階堂は Prowess データベースを用いて、差分の差分法 (difference in differences) を用い、制度変化が企業パフォーマンスに与える影響を分析している。
- (2) 高橋は、近年の日本における創業支援策の概要について論文をまとめたほか、GEM 調査のデータやフィールド調査を通じ、日本とトルコにおける女性の起業活動における障害を分析した。特に、トルコの文脈では、社会資本 (social capital) が女性の起業活動に重要であることがわかった。
- (3) 田中と二階堂は、南インド・カルナータカ州 (マイソール) で潜在的企業を対象に実施した、競争選好を測る経済実験と属性情報が含まれる質問票調査のデータを接合し、分析を行った。そして、その分析結果の一端を神戸大学経済経営研究所の兼松セミナーで発表した。特筆すべき分析結果として、南インドにおいて女性は競争的環境を避ける傾向にあることや、女性の属するカースト・カテゴリーによって競争選好に差があることがわかった。こうした結果は、女性だけの訓練やカースト・カテゴリー別の訓練の実施が有効である可能性を示唆している。また二階堂は、インドで女性の労働参加が低い要因について分析した先行研究や、女性の労働参加やエンパワメントを高めるために政府が実施している雇用・企業政策をまとめた。
- (4) 根元は、日本の議会・政党制度の変遷について論文にまとめた。

4. 研究の反省・考察

- (1) コロナウイルス感染拡大とロックダウンの影響をもっとも受けたのは女性といわれる。日本やインドでは、女性の家事負担が増加したほか、サービス業に従事する女性の失業などが報告されている。今回のような対外的ショックが起こった際の影響や対応も今後は研究に考慮していきたい。
- (2) コロナウイルス感染拡大とロックダウンの影響で、海外での調査や学会発表を延期せざるを得なくなり、研究計画を予定通りに進めることができなかった。インド・デリーの共同研究者も州をまたいで調査地への移動が難しかったため、フォローアップ調査も実施できなかった。学術研究振興資金の助成期間は終了したが、科学研究費補助金を利用し、経済が正常化したら調査を再開したい。
- (3) その一方で、Zoom などのオンラインツールを活用して研究打ち合わせやセミナー・学会発表を行うことができた。今後も、海外渡航や共同研究者の日本招聘が難しい場合は、オンラインを活用して、研究を進めていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 高橋 德行 (2020) 「新しい創業支援策の誕生とその背景」『武蔵論集』武蔵大学経済学会第67巻 第1・2・3・4号 pp. 9-19
- ② Hiroko Kawamorita, Noriyuki Takahashi, Kürşat Demiryürek (2020) “Media Literacy and Rural Women Entrepreneurship: Experience from Japan and Turkey” *Nordic Journal of Media Management*, 1(3), pp.361-383, Aalborg University Press.
- ③ 赤塚 尚之 (2020) 「インド2013年会社法第135条 (CSR) 及び関連法規 (2020年8月24日最

終改正) 』『滋賀大学経済学部研究年報』 第27号 pp.41-65.

- ④ 高橋 徳行 (2021) 「創業支援における基本法改正の効果とその限界」『商工金融』商工総合研究所 2021年7月号 pp.5-20.
- ⑤ Kawamorita, Hiroko, Yashar Salamzadeh, Ali Kahramanoğlu, Kürşat Demiryürek, Nur İlkay Abacı and Noriyuki Takahashi (2021) “Gendered Social Capital in Developing Countries: The Case of Turkey” in *The Emerald Handbook of Women and Entrepreneurship in Developing Economies*, Emerald Publishing Limited.
- ⑥ 赤塚 尚之 (2021) 「インド勅許会計士協会Technical Guide「CSR活動に対する支出の会計処理」, 滋賀大学経済学部 Working Paper No.303 pp.1-20.
- ⑦ 赤塚 尚之 (2021) 「インド会社法第135条に基づくCSR活動の会計処理—インド勅許会計士協会(ICAI)「Technical Guide」を手がかりとした仕訳方法の考察—」『彦根論叢』第429号 pp.42-61.
- ⑧ 赤塚 尚之 (2021) 「インド2014年CSR方針規則の2021年1月改正について—新旧比較をまじえて—」『彦根論叢』第428号 pp.42-61.
- ⑨ 二階堂 有子 (2021) 「インドにおける女性の経済参加と包摂成長」『福岡大学商学論叢』第66巻 第2・3号 pp.331-357.

(2) 口頭発表

- ① 竹原 均・海老原 崇 「同族企業のブランド戦略：商標権 ポートフォリオデータを用いた実証分析」2020年度日本ファイナンス学会 第2回秋季研究大会（オンライン）2020年12月5日.
- ② Tanaka, K., Higashida, K., Higuchi, Y., Takahashi, R., Hossain, M. M., Sujauddin, M. (2021) “Factors affecting collusion and cheating behavior among community leaders: A lab-in-the-field experiment in Bangladeshi mountain regions”, The 91st International Atlantic Economic European Conference (Online) 19 May, 2021.
- ③ 赤塚 尚之 「インドのMandatory CSR—法と会計—」 武蔵経済セミナー 2022年03月18日.
- ④ 二階堂 有子・田中 健太 “Female Entrepreneurship, Caste and Competitiveness in South India” 兼松セミナー（科研基盤研究（A）「南アジアの産業発展と日系企業のグローバル生産ネットワーク」／TINDAS 共催）神戸大学経済経営研究所（オンライン）2022年3月28日.

(3) 出版物

- ① Nemoto, Kuniaki. (2021). “Japan's Unusual but Interesting Parliamentary Committees: An Arena and Transformative Model?” in Siefken, Sven T., and Hilmar Rommetvedt. *Parliamentary Committees in the Policy Process*. New York: Routledge.
- ② Nemoto, Kuniaki. (2021). “Japan’s Liberal Democratic Party: Changes in Party Organization under Shinzō Abe.” in Pekkanen, Robert J., and Saadia Pekkanen (eds). *The Oxford Handbook of Japanese Politics*. Oxford: Oxford University Press.
- ③ 二階堂 有子 (2021) 「デジタル金融サービスを通じた課題解決」堀本武功・村山真弓・三輪博樹（編）『これからのインド—変貌する現代世界とモディ政権』東京大学出版会
- ④ Nikaido, Yuko and Pais, Jesim. (2021). “Religion, Caste, Ethnicity, and Firm Growth: Evidence from Women-Owned Small Firms in India,” in Maura McAdam and James A. Cunningham (eds.) *Women and Global Entrepreneurship: Contextualising Everyday Experiences*, Routledge.

2020年度（第45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	マイクロパーティクルの生体機能解明による 血管病治療と創薬応用 —膜小胞の動的臓器間ネットワーク解明と 薬物送達システムへの応用—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①マイクロパーティクル ②血管病 ③生体機能			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 林 恒 雄	星薬科大学・薬学部 / 医薬品化学研究所	教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 田 博 史	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	教 授	研究立案・論文作成
高 橋 典 子	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	教 授	研究立案・論文作成
東 伸 昭	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	教 授	研究立案・実験・データ整理・論文作成
松 本 貴 之	星薬科大学・薬学部 / 医薬品化学研究所	准 教 授	研究立案・実験・データ整理・論文作成
金 田 利 夫	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	准 教 授	研究立案・実験・データ整理・論文作成
奥 輝 明	星 薬 科 大 学 ・ 薬 学 部	講 師	研究立案・実験・データ整理・論文作成
田 口 久 美 子	星薬科大学・医薬品化学研究所	講 師	研究立案・実験・データ整理・論文作成

マイクロパーティクルの生体機能解明による血管病治療と創薬応用 —膜小胞の動的臓器間ネットワーク解明と薬物送達システムへの応用—

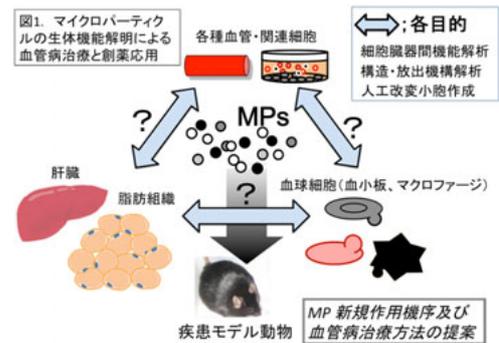
1. 研究の目的

国民病化している糖尿病や脂質異常症等は、様々な臓器の代謝性機能不全の重積によって生じ、その結果生じる血管合併症は、患者の quality of life (QOL) を著しく低下するばかりでなく、医療費の増加の一因ともなっている。特に、糖尿病や脂質異常症から生じる血管病時に、適切な病期・病態の新規治療薬の開発、予防方法の確立、血管障害・臓器機能不全の重症度を把握するバイオマーカーの開発が望まれている。

マイクロパーティクル(microparticle:MP)は、細胞外小胞(Extracellular vesicles: EVs, MP; 0.1~1.0 μ m, エクソソーム;30~100nm)のひとつで、様々な種類の細胞から放出される細胞膜粒子である。特に EVs の中で最も大きい粒子である MP は、大きいもので直径 1.0 μ m あり、これは血小板(直径 2.0 μ m)の半分程度である。すなわち、MP は新しい血球系細胞とも捉えられ、血小板のような種々の血管病に重要な役割をしている可能性が高い。このように MP は重要な生理機能を有しているが、生体内での放出機能・役割については、その抽出方法、量的問題から、ほとんど明らかにされておらず、MP の生体内における臓器間の機能的役割の解明が急務である。

そこで、MP の生体内の機能について、肝臓、がん細胞、血球系細胞、内皮細胞由来の MP と血管等の各臓器機能に焦点を絞り(図 1)、

- (1) 疾患モデル動物を中心に、MP と各種細胞臓器機能の相関性解析を進め、
- (2) 各種培養細胞を用いた MP の糖鎖構造・内容物解析を中心に、その放出・接着分子機序について臓器間作用を合わせて解明する。
- (3) (1) (2) の実験を統合し、血管疾患モデル動物を使用した MP、小胞の人為的改変、分布制御による各種臓器間の同時機能解析、新規治療予防方法を開発、ターゲットについて情報提供する。



2. 研究の計画

- (1) MP と血管・臓器機能における生体内相関性解析

糖尿病マウスや高血圧ラット、アセトアセチル CoA 遺伝子欠損マウス、p57Kip2 遺伝子(上皮細胞周期抑制因子)欠損マウスから、MP 分取の条件設定の検討、抽出を進め、フローサイトメトリーにより、各々の抗原(脂肪細胞; CD9, CD63 等、血小板; CD42a, CD61 等)を用いて起源細胞、構造異常を検討する。更に、申請者が確立している抽出方法とセルソーター等も用いて、ウエスタンブロット、顕微鏡等を用いて、内容物、糖鎖構造、接着浸潤メカニズムを解明する。

- (2) 培養細胞を用いた MP 放出機構、膜構造、細胞間シグナルの解明

疾患モデル動物由来 MP を用い、血管平滑筋内皮細胞、脂肪細胞、肝細胞、単球、血小板とのタンパク質相互作用、機能解析を検討する。特に、血管内皮細胞において機能的役割をしている NO 合成酵素、Akt、GRK2、MAP-kinase、arrestin などを中心として、免疫沈降-ウエスタンブロット法、二次元電気泳動を用いて明らかにする。また、各種培養細胞によって産生された MP 構造解析、血管内皮細胞表面の糖タンパク質解析、放出機構と細胞間相互作用の検討実験についても、これらの細胞組織などを血管細胞との共培養実験、阻害薬、抗体薬、遺伝子導入等を用いて比較検討する。更に、白血病細胞の分化時に放出される MP とレチノイン酸、レチノイン酸受容体などの核内受容体の関係が報告されており、がん細胞や脂肪細胞の分化増殖研究からも、臓器間の MP の役割として解明する。

3. 研究の成果

(1) 血管病モデルにおける血管機能解析と MP の関係について

- ① MP 誘発物質であるメチルグリオキサール (MGO)、インドキシル硫酸は、PKC を介する UDP 誘発収縮反応や ET-1 誘発収縮反応を増大させ、NO/cGMP シグナルの障害が関与する可能性が示唆された。
- ② 慢性 2 型糖尿病ラットにおける MP に含まれる細胞外核酸誘発収縮反応について検討したところ、OLETF 群において、ATP 誘発収縮反応の増大、UTP 誘発-収縮反応の減弱を認めた。慢性高血圧症ラットにおけるウリジンヌクレオチド誘発収縮反応について検討したところ、SHR 群において WKY 群と比較し、UDP 及び UTP 誘発収縮反応の増大が認められた。
- ③ 酸化ストレス刺激を受けた MP は、Toll-like receptor 4 (TLR4) を介し、炎症を誘発する事が報告されている。そこで、糖尿病ラット、マウスの各部位の血管機能不全における、抗酸化ポリフェノール、TLR4 阻害薬慢性投与の検討を行ったところ、ポリフェノールは大動脈において、TLR4 阻害薬は腸間膜動脈において、内皮機能を改善することを明らかにした。

(2) MP 放出機構、膜構造、細胞間シグナルの解明

- ① ヒト血漿由来 MP が単球・マクロファージ、内皮細胞に与える影響を検討するため、ヒト血漿に含まれる MP の精製を行った。ExoIntact2 Exosome isolation kit 及び exoEASY Maxi kit を用いて MPs の精製を行い、抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。精製 MP を種々培養細胞を用いて解析を進めた結果、MP と共培養した MM6-NFκB 細胞を PGN で刺激した後、レポーター解析において、MP と共培養した細胞では応答性が低下していた。
- ② 糖尿病マウス血中において、CD42a 血小板由来 MP の内容物スクリーニングにおいて、血管内皮機能に影響を及ぼす ERK タンパク、G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) タンパク質や酸化リン脂質が多く含まれている事を明らかにした。
- ③ マウス結腸がん細胞株について、糖鎖切断酵素ヘパラーゼ存在下で培養することにより、MP を含む細胞外小胞の分泌量が数倍に上昇することを新たに見出した。更に、非存在下で分泌された通常の細胞外小胞に比べ、CD63 の含有量が非常に高い、粒径が小さい、不安定である、ゼータ電位の負の値が大きい、という特徴を有していることを明らかにした。
- ④ レチノイン酸 (RA) は血管病時の血液凝固障害を改善する作用も有している。そこで、HL60 細胞に RA を処理した時に放出される MP の精製実験を進め、MP の回収に成功した。更に、RA 処置により、経時的に量が上昇する MP 種があること及び、 α -アクチニンの量も経時的に増加していることから、細胞の増殖・分化時、あるいは、細胞死の際に、 α -アクチニンを初めとする MP が放出されていると考えられた。
- ⑤ マウスメラノーマ細胞株 B16F10 において、フォスファチジルセリン結合タンパクを用いて MP を精製し、CD63 の発現により MP の存在を確認した。CD63 の発現を指標に、この放出を増減する天然物/生薬エキスを探したが、現在までに詳細に検討すべき天然物は見つかっていない。
- ⑥ MP の分泌過程を可視化するプローブの作成を行うため、MP のマーカータンパク質として頻用される CD63 の発現ベクターの下流に、蛍光タンパク質の中でも非常に明るいといわれる venus の遺伝子を挿入した融合遺伝子を作製した。これをもとに結腸がん細胞株 colon 26 細胞において、venus の蛍光を発する細胞の構築に成功した。

(3) 血管病モデルにおける MPs 作用機序および血管障害治療薬の検討

糖尿病時の MP 放出増加、質的变化、ERK1/2 活性が内皮機能障害に関係していることが明らかとなったので、その阻害薬を糖尿病マウスに慢性投与し、血管病治療効果の検討を行った。ERK1/2 阻害剤である PD98059 (PD) を *in vivo* 処置した糖尿病動物においては、血管障害が改善された。更にその動物から抽出した MP 中のタンパクを測定したところ、正常動物の MP と同程度の ERK1/2 活性および eNOS 発現を示すと共に、その MP においては、内皮機能障害は認められなかった。以上のことから糖尿病時、MP に含まれる ERK1/2 が血管

内皮障害を惹起させることが示唆され、更に ERK 阻害薬の投与は、糖尿病性血管内皮障害、MP の含有量、質的变化を改善し、糖尿病性血管障害の治療ターゲットとなることを提案した。

4. 研究の反省・考察

以上より、糖尿病、高血圧性血管病と血小板由来 MP は密接に関係し、特に大動脈、腸間膜動脈の内皮細胞機能において顕著作用することが明らかになった。また MP 放出や接着機構として、ヒト血漿由来 MP の抽出精製、ヘパラーゼ、 α -アクチニン等の分子種の同定も進み血管病時やがん細胞との関連性について更に検討を進めている。特に、糖尿病時の血管病において、MP に含まれる ERK1/2 が血管内皮障害を惹起させることを明らかにし、ERK 阻害薬の投与、MP の質的改変は糖尿病性血管障害の治療ターゲットとなることを発表した。本成果は、論文発表 13 報、学会発表 20 回行う事ができ、今後の MP 研究、血管病の新規治療展開に期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Taguchi K, Kaneko N, Okudaira K, Matsumoto T, Kobayashi T. GLP-1 modulates insulin-induced relaxation response through β -arrestin2 regulation in diabetic mice aortas. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021;231(3):e13573.
- ② Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Toll-Like Receptor 4 Inhibitor TAK-242 Augments Acetylcholine-Induced Relaxation in Superior Mesenteric Arteries of the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(8):1283-1287.
- ③ Matsumoto T, Kojima M, Takayanagi K, Katome T, Taguchi K, Kobayashi T. Impaired UTP-induced relaxation in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats. *Purinergic Signal*. 2020;16(3):453-461.
- ④ Matsumoto T, Katome T, Kojima M, Takayanagi K, Taguchi K, Kobayashi T. Methylglyoxal augments uridine diphosphate-induced contraction via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat carotid artery. *Eur J Pharmacol*. 2021; 904:174155.
- ⑤ Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Indoxyl sulfate enhances endothelin-1-induced contraction via impairment of NO/cGMP signaling in rat aorta. *Pflugers Arch*. 2021;22. doi: 10.1007/s00424-021-02581-8.
- ⑥ Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Differential Contractile Reactivity to Nucleotides in Femoral Arteries of OLETF and LETO Rats. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(12):1987-1992.
- ⑦ Matsumoto T, Takayanagi K, Katome T, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Extracellular uridine nucleotides-induced contractions were increased in femoral arteries of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*. 2021. In press.
- ⑧ Izumisawa T, Wakui N, Kaneko T, Soma M, Imai M, Saito D, Hasegawa H, Horino T, Takahashi N. Increased Vancomycin Clearance in Patients with Solid Malignancies. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(7):1081-1087.
- ⑨ Saito D, Imai M, Yamada C, Takahashi N. Changes in the levels of α -actinin-4 in differentiating human myeloid leukemia cells induced by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021;1868(6):118968.
- ⑩ Yamasaki M, Hasegawa S, Imai M, Fukui T, Takahashi N. Browning Effect of Brominated Flame Retardant, TBBP-A, on Undifferentiated Adipocytes. *BPB Reports*, 2021; 4 :41-46.
- ⑪ Takahashi N, Saito D, Hasegawa S, Yamasaki M, and Imai M. Vitamin A in health care: Suppression of growth and induction of differentiation in cancer cells by vitamin A and its derivatives and their mechanisms of action. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021 in press.
- ⑫ Higashi N. Mast Cell-derived Granular Complex: A Naturally-generated Delivery System with the Aid of Carbohydrates. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology (TIGG)*. 2021; 33(192):E27-E32..
- ⑬ Higashi N. マスト細胞の顆粒複合体：糖鎖の助けによる天然の送達システム *Trends in Glycoscience and Glycotechnology (TIGG)*. 2021; 33(192):J27-E32.

(2) 口頭発表

- ① 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;Diabetic mice-derived microparticles (MPs) induced endothelial dysfunction;第43回日本分子生物学会年会. 2020年, 12月
- ② 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;糖尿病マウスの血小板由来マイクロパーティクルによる血管弛緩反応減弱機構;第62回日本平滑筋学会総会. 2020年, 12月
- ③ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;MPs に着目した糖尿病性血管内皮機能障害に対するERK1/2 阻害剤の効果;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ④ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;GLP-1 は β -arrestin2 を誘導することで糖尿病時のInsulin 誘発血管弛緩反応を改善する;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑤ 松本 貴之、田口 久美子、小林 恒雄;Spontaneously hypertensive rat 頸動脈におけるuridine triphosphate 誘発弛緩反応;第30回日本循環薬理学会 2020年, 11月
- ⑥ 松本 貴之、田口 久美子、小林 恒雄;ラット頸動脈の uridine diphosphate 誘発収縮反応に対する終末糖化産物の増大機序;第62回日本平滑筋学会総会 2020年, 12月
- ⑦ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;ラット摘出胸部大動脈におけるエンドセリン-1 誘発収縮に対するインドキシル硫酸の影響;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑧ 松本貴之、田口 久美子、小林 恒雄;ラット胸部大動脈におけるTRPV4 アゴニスト並びにアデニル酸シクラーゼ活性化薬誘発弛緩反応に対するインドキシル硫酸急性暴露の影響;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑨ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;自然発症高血圧ラット上腸間膜動脈におけるアデニンによる弛緩反応;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑩ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;慢性2型糖尿病ラット大腿動脈における細胞外核酸およびウリジンアデノシンテトラフォスフェート誘発収縮反応;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑪ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄;ラット頸動脈、腎動脈、大腿動脈のノルアドレナリン誘発収縮に対するメチルグリオキサール急性暴露の影響;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑫ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;MPs に着目した糖尿病性血管内皮機能障害に対するERK1/2 阻害剤の効果;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑬ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄;GLP-1 は b-arrestin2 を誘導することで糖尿病時のInsulin 誘発血管弛緩反応を改善する;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑭ 高橋典子;HL60 細胞分化誘導時の α -アクチニンタンパク質の変化;第93回日本生化学会大会 2020年, 9月
- ⑮ 高橋典子;脳組織におけるケトン体代謝の役割;第31回日本レチノイド研究会学術集会 2020年, 10月
- ⑯ 高橋典子;悪性腫瘍におけるビタミンA の変化と作用;第31回日本レチノイド研究会学術集会 2020年, 10月
- ⑰ 高橋典子;PKA によりリン酸化される RA 処理 HL60 細胞のタンパク質;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑱ 高橋典子;臭化難燃剤 (TBBP-A) が前駆脂肪細胞の脂質-ケトン体代謝経路へ与える影響の検討;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑲ 高橋典子; β -カロテンとその代謝物の作用と疾病予防・治療への応用;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月
- ⑳ 浜田真美加、山本陽香、高橋勝彦、小林恒雄、中島元夫、入村達郎、東 伸昭;ヘパラーゼは結腸癌細胞によるエクソソーム分泌を調節する;日本薬学会第141年会. 2021年, 3月

(3) 出版物

なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	明 治 学 院 大 学	研究所名等	国 際 平 和 研 究 所
研 究 課 題	朝鮮戦争の「遺産」と東アジア — 停戦協定体制から恒久平和体制への移行のための 課題—	研 究 分 野	法 学
キ ー ワ ー ド	①東アジア、②冷戦、③朝鮮戦争停戦協定、④戦争の記憶、⑤パブリック・ヒストリー		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 原 孝 生	国 際 平 和 研 究 所 国 際 研 究 学 部	所 教 長 教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鄭 栄 桓	国 際 平 和 研 究 所 教 養 教 育 セ ン タ ー	主 教 任 教 授	朝鮮戦争期における日本の社会運動に関する論文の執筆
張 宏 波	教 養 教 育 セ ン タ ー 国 際 平 和 研 究 所	教 所 授 員	朝鮮戦争と在中日本人の研究についての論文の執筆
石 田 隆 至	国 際 平 和 研 究 所	研 究 員	朝鮮戦争と在中日本人の研究についての論文の執筆
梅 林 宏 道	国 際 平 和 研 究 所	研 究 員	北アジア非核兵器地帯のもつ地域の平和への貢献可能性についての論文の執筆
根 本 雅 也	松 山 大 学 人 文 学 部 国 際 平 和 研 究 所	准 教 授 客 員 所 員	被爆の記憶、就中、朝鮮戦争が継承に及ぼした影響に関わる論文の執筆
秋 山 道 宏	沖 縄 国 際 大 学 総 合 文 化 学 部 国 際 平 和 研 究 所	准 教 授 客 員 所 員	朝鮮戦争が戦後沖縄における基地社会の形成に与えた影響に関する論文の執筆
嶽 本 新 奈	国 際 平 和 研 究 所	助 手	朝鮮戦争と九州地域における米軍基地の記憶についての論文執筆

朝鮮戦争の「遺産」と東アジア

— 停戦協定体制から恒久平和体制への移行のための課題 —

1. 研究の目的

東アジアの国際環境は今日、転換期を迎えつつある。朝鮮半島では2018年4月27日に南北首脳会談が板門店で開催され、同年6月12日には史上初の朝米首脳会談がシンガポールで開かれた。これらの会談で示された宣言及び文書は、いずれも朝鮮戦争の終結と平和体制の構築のための協力をうたっている。これは、東アジアにおける平和の最大の障害が、60年以上も停戦状態のままになっている朝鮮戦争の継続にあることを考えれば、当然であろう。だが、朝鮮戦争を克服する方法を明らかにすることは容易ではなく、この課題を解くためには、この戦争が東アジア地域に及ぼした影響を及ぼし、また及ぼし続けているか、すなわち「戦争の遺産」を多角的に検討することが不可欠である。

本研究は、以上の問題意識に基づき、朝鮮戦争が同地域に残した「遺産」の検討を通して、東アジアにおける恒久平和の条件を探ることを目的とする。具体的な研究課題は以下の通りである。

- (1) 朝鮮戦争により形成された停戦協定体制の研究：朝鮮戦争停戦協定は、米国（朝鮮国連軍）、中国人民志願軍、朝鮮人民軍の三者間で締結された。同協定は「最終的な平和解決が成立するまで朝鮮における戦争行為とあらゆる武力行使の完全な停止を保証する」と規定したものの、今日においても「最終的な平和解決」には至っていない。本来なら暫定的な協定であるはずであった同協定は「継続」という事態、すなわち「停戦協定体制」がなぜ生じたのか、また、アジアに及ぼした影響を与えることになったのかを検討する必要がある。停戦協定体制の成立は、朝鮮戦争のために召集された朝鮮国連軍司令部のアジアにおける継続的な進駐という事態も生み出した。朝鮮国連軍司令部並びに後方司令部の存在は、1970年前半の米中・日中関係の改善の際には、その解体が国連総会にて本格的に論議されたが、結果的に今日まで存続している。なぜ朝鮮国連軍は存続することになったのかを検討することは、朝鮮戦争の「遺産」に注目する本研究の目的を達成するうえで不可避の課題といえるだろう。
- (2) 朝鮮戦争が東アジアの「社会」に及ぼした影響に関する研究：朝鮮戦争前後の各地域における反戦運動が朝鮮国連軍をめぐる問題をいかに把握し、実践上の課題へと反映させたかを明らかにする。また、近年、韓国においては朝鮮戦争のもたらしたインパクトを社会史・文化史・ジェンダー史的観点から分析する研究が数々の成果を生み出しており、狭義の歴史学者たちのみならず、社会が戦争を記憶する方法への関心も高まっていることをふまえ、本研究では戦争の記憶の実態を検討し、朝鮮戦争に関する「パブリック・ヒストリー」の具体像を明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) 2020年度：朝鮮戦争停戦協定体制の形成過程についての一次史料を用いた実証的研究を方法の基軸とし、あわせて関連する地域において戦争がいかに記憶されているかをパブリック・ヒストリーの形成という観点より検討する。
 - ①米国・韓国・日本における先行研究の調査・整理
 - ②朝鮮戦争期の資料状況の把握と関連資料（インタビュー含む）の収集
 - ③米国・韓国・日本における朝鮮戦争関連の記念施設の調査
 - ④年度末に研究成果を総括・発信する国際シンポジウムを開催
- (2) 2021年度：前年度に行った調査をもとに、米国及び東アジア各地域における朝鮮戦争関連の記念施設の調査を行う。
 - ①朝鮮戦争停戦後における各地域における米軍基地及び朝鮮国連軍基地と周辺社会に対する調査研究に着手する。
 - ②中華人民共和国・朝鮮民主主義人民共和国・台湾における朝鮮戦争関連の資料調査及び記念施設の調査を行うことで、東アジアにおける朝鮮戦争の記憶の形成の検討に本格的に着手する。
 - ③研究成果を総括・発信する国際シンポジウムを開催する。

※ただし上記の当初の研究計画は新型コロナウイルス感染拡大により大幅な変更を余儀なく

された。

3. 研究の成果

(1) 朝鮮戦争関連資料の収集

- ①2020 年度は先行研究の調査・整理及び資料収集を中心に研究を進めた。特に朝鮮解放から朝鮮戦争停戦前後の時期にかけての朝鮮民主主義人民共和国発行の資料を収集した。具体的には 1945 年から現在に至る時期の朝鮮民主主義人民共和国発行の新聞・雑誌等から重要文書を抜粋した資料集として韓国で刊行中の『北朝鮮実録』を収集した。本資料集は韓国の国家機関、研究者たちが収集した一次資料を集大成した決定版ともいえる資料集であり、朝鮮戦争期の朝鮮民主主義人民共和国の動向や日本、在日朝鮮人に関する認識を分析するための貴重な資料を多数含んでいる。新型コロナウイルス感染拡大により海外での資料調査等の当初の研究計画遂行が困難となった状況のもと、研究計画の修正を余儀なくされたため、本資料集の収集と分析に注力した。
- ②2021 年度は前年度に引き続き、朝鮮戦争前後の朝鮮民主主義人民共和国関連資料の収集に加えて、同時期における九州地域で発行された、ゴードン・プランゲ文庫所蔵の新聞資料（マイクロフィルムを国立国会図書館が所蔵）を中心に収集した。

(2) 朝鮮戦争の「遺産」が東アジアに及ぼした影響を考察するため、Zoom ウェビナーを活用して、下記の研究会及び国際シンポジウムを開催した。

①研究会

- ・鄭栄桓（明治学院大学国際平和研究所主任）「在日朝鮮人史における朝鮮戦争の経験」（2021 年 6 月 21 日）
- ・米津篤八（翻訳家、朝鮮近現代史研究、一橋大学大学院社会学研究科博士課程）「朝鮮戦争報道に見る米国の検閲と心理戦—日本人従軍記者の事例を中心に」（2021 年 7 月 9 日）
- ・金泰佑（韓国外国語大学韓国学科教員）「朝鮮戦争とフェミニストたちの平和運動」（2021 年 11 月 26 日）

以上の研究会を通して、『北朝鮮実録』所収資料の意義と朝鮮戦争期に形成された在日朝鮮人及び朝鮮半島に関する認識が「遺産」として 1950 年代以降の日本社会の朝鮮観を規定したことが明らかになった。また、朝鮮戦争期における国際民主女性連盟（Women's International Democratic Federation, WIDF）朝鮮戦争調査委員会の朝鮮北部における戦争被害の調査活動の実態が明らかになった。なお、研究会の記録は『PRIME Occasional Papers』第 7 号として刊行した。

②シンポジウム：朝鮮戦争の「遺産」と克服の課題（2022 年 3 月 5 日）

【第一部】朝鮮戦争停戦体制の変動と沖縄返還問題

報告：成田千尋（立命館大学衣笠総合研究機構専門研究員）

コメンテーター：吉澤文寿（新潟国際情報大学教授）

秋山道宏（沖縄国際大学准教授）

【第二部】朝鮮戦争「終戦」は可能か：韓国の新大統領就任を中心に

報告：吉倫亨（韓国ハンギョレ新聞 国際部長）

コメンテーター：梅林宏道（NPO 法人ピースデポ特別顧問）

石田隆至（上海交通大学副研究員）

第一部では朝鮮戦争を契機とした南北対立と台湾海峡の両岸の対立の固定化の連関について検討し、1970 年代初頭の米中接近の際に停戦体制がいかなる影響を受けたかを討議した。1972 年の沖縄の施政権返還の際にも沖縄を軍事的な要とする構造に変化は生じず、韓国・中華民国がそれぞれの安全保障を沖縄の米軍基地に委ねる体制は継続し、沖縄の基地負担が持続する一方、日韓国交正常化及び米中接近により、反共意識を媒介とした韓国・中華民国の提携が瓦解していったことも明らかになった。

第二部では朝鮮戦争終結をめぐる近年の国際政治の動向を検討した。2018 年 1 月の平昌冬季五輪を機に「朝鮮半島平和プロセス」と呼ばれる南北・朝米対話の進展がみられ、朝鮮戦争の終戦宣言が議題となったが、2019 年 2 月の第 2 回朝米首脳会談（ハノイ）の決裂により、終戦宣言は発せられなかった。報告では、朝鮮戦争の終戦をめぐる今後の展望として、韓国における保守政権への政権交代、朝鮮民主主義人民共和国のミサイル発射

実験、米国の中国・ロシアとの対立などの不安定要素が存在することが指摘されたほか、朝鮮戦争をめぐる非対称な国際関係是正の必要性と、朝鮮半島のみならず地域レベルでの北東アジア非核兵器地帯の創設が議論された。

(3) その他個別の研究成果は下記の通りである。

- ①北東アジアにおける核問題と核兵器禁止条約の意義について検討した（高原）
- ②『北朝鮮実録』所収の日本及び在日朝鮮人関連の記事を分析し、朝鮮戦争期の在日朝鮮人の法的地位と送還問題の連関を明らかにした（鄭）
- ③中華人民共和国に収容された日本人戦犯等に朝鮮戦争が与えた「期待」を明らかにした（張）
- ④「梅汝璈日誌」の入手と分析により、中華人民共和国において朝鮮戦争の勃発がどのように経験されていたのかを明らかにした（石田）
- ⑤1960年代の沖縄の「基地社会」の動向について明らかにした（秋山）
- ⑥朝鮮民主主義人民共和国の核兵器とミサイル解決に関する事実を整理・分析し、それを巡る国際政治の歴史と現状を分析した（梅林）

4. 研究の反省・考察

- (1) 新型コロナウイルス感染拡大により、海外での資料調査やインタビューなどを含む当初の研究計画の遂行が困難となり、当初の研究計画の大幅な修正を余儀なくされた。このため、資料収集の対象は日本・韓国に留まった。
- (2) 朝鮮戦争の「遺産」と東アジアを研究課題としたが、具体的な分析としては1950～60年代の日本、沖縄、中国を対象とするに留まり、時期としては1970年代以降、地域としては米国や南北朝鮮に関する検討が残され、シンポジウムを通して研究課題を共有するに留まったため、今後の研究では上記の時期・地域の検討を行う必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①高原孝生（2022. 3）「あらためて核兵器禁止条約発効の意義を考える」『創大平和研究』36：15-28
- ②鄭榮桓（2022. 3）「1947년 아시아관계회의와 재일아시아민족회의」『역사비평』149：251-278
- ③秋山道宏・那波泰輔・韓昇熹（2021）「社会運動とメディアの連環：1960年代～70年代の新左翼系雑誌と編集者に着目して」『社会運動史研究 特集メディアがひらく運動史』3：137-157
- ④石田隆至（2021）「国際戦犯裁判との比較の中の新中国戦犯裁判：＜認識の変化や反省＞を求めるアプローチをめぐって」『PRIME』44：106-118
- ⑤根本雅也（2021）「被爆ナショナリズムの政治力学—自民党政権と核兵器・被爆者問題」、『社会学評論』287：276-293.

(2) 口頭発表

- ①TAKAHARA, Takao, SUZUKI, Tatsujiro “Japanese Responses to Nuclear Threats in Northeast Asia: Possible Nuclear Weapon Option for Japan?” paper delivered at the International Joint Seminar “Assessing Northeast Asia Nuclear Domino: North Korean Nuclear Threat and Japanese Responses” Co-hosted by: Asia Pacific Leadership Network for Nuclear Non-proliferation and Disarmament (APLN), The Sejong Institute, Pugwash Japan, in cooperation with: International Peace Research Institute, Meiji Gakuin University (PRIME), Research Center for Nuclear Weapons Abolition, Nagasaki University (RECNA) (Jul. 2, 2021)
- ②鄭榮桓「조선전쟁 하 재일조선인과 국적문제: ‘강제송환·강제격리’ 반대운동을 중심으로」、연세대학교 국학연구원 국제학술대회 “1940-60년대 동아시아의 수용소와 난민”、연세대학교 국학연구원、2020年10月3日
- ③秋山道宏「「沖縄問題」をつきくずす地域研究：60年代沖縄の基地社会の動きに着目して」、2021年度協定校間国際学術交流講演会「東アジアと横断地域性」（沖縄国際大学、全南大

学)、2021年5月

- ④石田隆至「如何評価侵華日本戦犯供述書：以帰国後開展証言活動的某戦犯為題材」、戦争罪行与戦犯裁判学術討論会(上海交通大学)、2020年11月14日
- ⑤嶽本新奈「苓北火電建設反対運動における連帯と模索——天草環境会議という「場」」、東アジアと同時代日本文学フォーラム・第9回オンライン大会、2021年10月16日

(3) 出版物

- ①高原孝生(2021)「世界はどこへ行く」を聞いて：南原繁の「国際政治組織」論、南原繁研究会編『南原繁と戦後教育改革：意義と継承』(横濱大気堂、2021) pp. 230-55
- ②鄭栄桓(2022.1)『歴史のなかの朝鮮籍』以文社
- ③高江洲晶哉・平良好利編、秋山道宏他著(2022.1)『戦後沖縄の政治と社会：「保守」と「革新」の歴史的位相』(共著)、吉田書店
- ④石田隆至(2021)「口述史中的感情：排除抑或考察的对象?」、林卉・胡楊主編『口述歴史在中国(第三輯)：記憶的建構与社会伝承』広西師範大学出版社、pp. 55-72
- ⑤張宏波(2021)「第4章 新中国で戦犯となった日本人の加害認識—供述書と回想録との落差を通じて」吉田裕編『戦争と軍隊の政治社会史』大月書店、pp. 98-135
- ⑥梅林宏道(2021)『北朝鮮の核兵器—世界を映す鏡』高文研
- ⑦根本雅也(2021)「原爆の災禍から何を学ぶのか—広島平和記念資料館」、蘭信三・小倉康嗣・今野日出晴編『なぜ戦争体験を継承するのか—ポスト体験時代の歴史実践』みずき書林、pp. 288-297
- ⑧根本雅也(2020)「日本とアメリカのはざま—在米原爆被爆者の運動史の解明に向けて」『広島平和記念資料館資料調査研究会研究報告』第16号、pp. 107-116

ペアレンティングによる親子介入支援の 長期的効果検証とマニュアル作成

1. 研究の目的

(1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

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

②新規参加家族と長期継続家族の比較検討や同一家族での経時的変化の検討

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

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

②蓄積データと個々の事例検討による独自のマニュアル作成

2. 研究の計画

(1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

①家庭におけるペアレンティング（親などが子どもに与える生活・養育環境）の質が、遺伝素因以上に子どもの思春期以降の心身機能と行動・情緒に大きく影響するという科学的根拠をもとに、2019年8月より開始している親子介入支援を継続して行う。

②上記継続支援により2019年8月～2020年3月までに2回以上採取した子の発達障害関連評価、親子の生理学的評価、心理学的評価、及び脳科学的評価の測定結果の解析を行い、個人データの前後比較と、集団としての比較、また新規参加家族と長期継続家族の比較検討や同一家族での経時的変化の検討を行う。

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

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

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

3. 研究の成果

(1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

①2019年8月より開始している親子介入支援を継続して行う予定であったが、2020年1月より蔓延したCOVID19感染拡大の影響のため、対面での介入・データ採取がほぼ不可能となった。そのため、2020年度は、4月に質問紙送付による限定的なデータ採取を行うのみとなった。また、対面での介入がCOVID19感染拡大の影響により不可能になった親子に対して継続的にかかわり続けるために、オンライン面接の機能を導入する目的で、計画の時点では入っていなかった、モバイルコンピューター等の機器の購入を行った。

②介入支援前後のデータ採取は、2017年8月、2018年2月、2018年8月、2019年8月、2020年4月（質問紙送付による限定的なデータ採取）の計5回行われた。親子介入支援は2017年8月～2018年8月に定期的に行い、いったん中断したのちに2019年8月～2020年2月に再び定期的に行われた。全期間継続して参加した親子9組のうち、データがすべて採取できた3組（いずれも子の自閉症スペクトラムの診断あり）について検討を行った。採取・解析したデータはTK式親子関係テスト、S-HTP描画テスト、STAI不安尺度、ストループテスト、PARS自閉症尺度等である。TK式診断的新親子関係検査（親→子、子→親）の下位項目「不満」と「干渉」において危険・中間領域に入ったのは、2017年8月には3家族分のデータ中40%であったが、介入支援を経た2018年8月には10%に減少した。しかし、親子介入支援の休止期間を経た2019年8月には、3家族分のデータの50%に危険・中間領域が増加した。これが、介入支援を経た2020年4月には33%に再び減少した（図）。同様に、子におけるS-HTP描画テストの評価も休止期間に増悪し、介入支援の再開で改善が見られた。

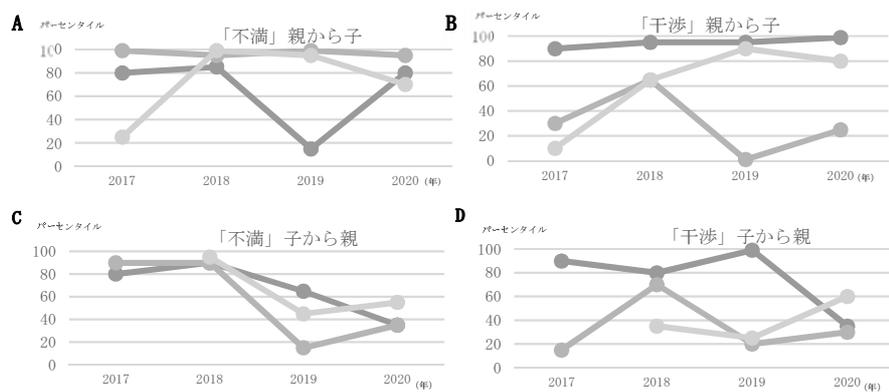


図 TK 式診断的新親子関係検査「不満」「干渉」の 3 事例比較
凡例：事例 1 ● 事例 2 ■ 事例 3 ▲

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

- ①2020年度当初は複数の学会や大会での発表・招待講演を予定していたが、COVID19感染拡大の影響により多くが中止延期など変更となり、計画通り遂行できなかった。
- ②多くの得られた蓄積データから獲得した親子介入支援の実際を、ワーク形式にまとめたうえで、親子支援マニュアルとして文章に起こす作業を行った。現在、出版社と交渉中である。

4. 研究の反省・考察

(1) 考察

- ①親子介入支援を継続することで、全体として親子関係は親子双方とも段階的に改善し、長期効果があることが考察された。親子相互作用も存在した。しかしながら、介入支援が途絶えた休止期間を挟むことで親子関係が平均的に一時悪化することも観察された。このことより、ペアレンティングを用いた親子同時介入支援は親子相互作用をもたらす有効であるが、あくまで、専門家による親子同時介入支援が存在し続けることが必要であると考えられる。
- ②子の描画から推察された認知機能に関しても、親子同時介入支援により改善が認められ、効果があることが示唆された。親子介入支援が中断することにより、親子関係や子の認知機能等に変化がみられたことより、継続的なペアレンティング・トレーニングを用いた介入支援を親子同時に行うことは、特に自閉症スペクトラム等発達障害のある児の養育家庭において、良好なペアレンティングの維持に有効であることが示唆された。

(2) 反省

- ①上述のように2020年2月よりCOVID19感染拡大の影響を受け、脳機能測定等の最終測定が延期となっている。現時点でも対面の介入支援を回避する意向の被験者がほとんどであるため、再開が見通せない状況である。実質的には再度の実験休止期間となっており、コロナ禍による家庭生活環境の変化による影響も出ていると思われるが、実測できない状況である。TK式親子関係検査等、質問紙での検査データについては今後も郵送して配布・収集の方法を用いて継続して採取していき、状況を見ながら他の生理機能検査や親子同時介入支援を再開したい。
- ②特に小児被験者からの協力が得られず、欠損値となるデータが散見されるため、データ数が統計学的検討に値しないものがある。COVID19感染拡大の終息後は、被験者を増やすことも考慮に入れ、研究を継続したい。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

①成田奈緒子

ペアレンティングを知り、明日からの対応を考える
巡回拠点にしうき専門研修 招待講師2020. 11. 7東京

②成田奈緒子

幼児期の子供達の現状と今後必要な事

㈱アイルデンタル主催「6歳までに優先すべきことセミナー」招待講師 2020. 11. 8東京

③成田奈緒子

乳幼児期の睡眠・覚醒生活リズムの育成について

日本眠育推進協議会眠育シンポジウム 招待講師2020. 12. 26オンライン

(3) 出版物

①成田奈緒子・石原新菜

子どもにいいこと大全

2020. 8. 31 主婦の友社

②成田奈緒子

子どもの自己肯定感は親のひと言で決まる！

2021. 1. 21 PHP研究所

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究振興資金

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 —深層学習による中枢神経薬の効果判定—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①深層学習 ②薬物依存 ③バズプレシン受容体		

○研究代表者

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

○研究分担者

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

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

1. 研究の目的

- (1) 本研究では、麻薬の娯楽目的の使用で起きる「依存症」の典型例を軸に、薬物や行為の習慣性が過度となる場合の治療について、コンピューター科学の力を最大限に取り入れて開発することを目的としている。具体的には、コンピュータービジョンによる画像取り込みと認識に加えて、物体認識の進んだ学習能力を世界に先駆けて依存症の理解に導入し、対処法を開発する。
- (2) そのための解析対象として、申請者らが独自に開発したユニークな麻薬感受性を示す遺伝子改変マウスを利用する。このマウスを通じた依存症の病態の理解に加えて、麻薬鎮痛薬を含む中枢神経薬を、依存を避けながら鎮痛効果を安全に得るための投与方法を開発し、この過程の依存の状態を信頼度高く評価できる方法を確立する。
- (3) この研究がもたらすと考えられる社会貢献は、依存を取り巻く医学的、社会的問題の解決に寄与することである。米国では、連日 100 人に及ぶ命がオピオイド依存による過量投与で失われている。この数は、米国の銃と交通事故による死者を合わせた数よりも多く、米国大統領令により危機的状況クライシスが宣言され、英国でも同様にプレクライシスとされる。新型コロナウイルスによる感染症は、依存症の患者を直撃し、依存症患者の死亡率を平時よりもさらに高めることに繋がっている。よって、麻薬を含む物質依存症は、鎮痛治療に伴う現代の世界的難題と言える。この難題への突破口と、安全で先進的痛み治療の確立が我が国でも求められている。

2. 研究の計画

- (1) 前年度までの成果を踏まえて 2020 年度の進展を計画した。前年度までに、依存症を判定できる深層学習の初期数式モデルの作出を達成しておりその評価と改善を進める。実験手技としては、モルヒネを 10 日間連日投与し、野生型および V1b 遺伝子欠損マウスについて依存症動物モデルを作成する。この過程をビデオ記録し、動画を連続画像として 1 秒間に 5 枚の精緻な切り出しを行う。続いて深層学習のための OS を Ubuntu 16.04 から 18.04 へバージョンアップして計算速度と効率の上昇を達成する。Tensorflow はバージョンが 1.x から 2.x へ向上しており、最新のソフトウェアに更新して Keras ソフトウェアと一体で解析を進める。複数の GPU 用グラフィックボードは、Nvidia 社のドライバーソフト CUDA9 を導入し、並列計算環境を構築する。続いて画像内の物体の教師付き深層学習の環境を構築する。そのために、Google が提供する物体検出アプリケーションを改変し、マウスの行動パターンを 5D テンソルデータとして学習させる。その際、190 万枚の最新画像データベース ImageNetV4 からも訓練画像を取得する。また、すでに深層学習を終えたりカレントニューラルネットワークモデルを転用し学習効果を向上させる。得られた計算結果を用い、新たな依存マウスを検出できるか検証する。以上より、信頼度が高く依存状態を検出する計算モデルを作成する。
- (2) 細胞系において V1b 受容体に作用を示す化合物の検索手段を確立する。V1b 受容体と β アレスチンの相互作用は、オピオイドシグナルに重要な役割を果たすと考えられるが、この相互作用を評価する方法が存在せず、医療分野への応用が阻まれていた。これまでに我々は、多くの条件検討を重ねることにより、精緻に V1b 受容体と β アレスチンの相互作用を検出する手技を確立しつつあり、本年度もこの方法の改善を押し進める。

3. 研究の成果

- (1) 画像分類の段階で「何が」写っているかについては、直列的な深層学習モデルにて 95% 以上の高確率で正答可能となる学習条件を見出した。さらに進んで「何処に」どのような「状態（コンテキスト）」で存在するかを学習により判断可能となった。すなわち、マウスを物体として検知しラベル化することで意味づけを行うことが可能であった。計算環境としては、オープンソース主導で革新を続けるコンピュータサイエンスの成果を、直ちに本研究に応用す

るため、トライアンドエラーが可能で柔軟な深層学習計算環境を昨年度の成果から引き続いて構築、使用した。これまで OS 更新時には、全ソフトウェアバージョンの整合性を見直し、ソースからビルドして動作確認する時間と労力を要した。そこで、OS に依存しない仮想環境に変更した。パッケージマネージャの Miniconda は、数日かけていた計算環境構築を数分で終了する。このため、挑戦的なプログラムも素早く試行可能であった。特に Tensorflow バージョンが 2.x に進化した際には、他のプログラムとの整合性を整える必要性から環境の試作的構築と改善が必要であった。さらに、中央演算子 CPU に加えて複数の GPU を加えた強力な並列計算が可能となった。仮想環境は機械学習のために R プログラムを利用する際にも有用可能であった。その上で、深層学習後の特徴抽出について、大きなデータを対象に効率良く解析を実施した。

(2) 物体認識されて XY 座標を付与したマウスのオープンフィールドにおける行動から、薬剤非投与のコントロール記録において V1bKO マウスの運動量が低下することを発見している。この事実自体、新しい知見でありその機序を明らかにすることが不安行動と V1b 受容体の関係性を明らかにできると考える。本研究の依存モデルに関しては、モルヒネ投与時には行動量の全体的な増加が見られることは知られるため、自発的運動量に影響する脳部分に V1b 受容体が働くことが考えられ、今後の実験結果を考察する上で重要な知見と考えられる。

(3) 脳内の依存状態を細胞系において再構築し、V1b とオピオイド受容体の相互作用に新たな計測法を見出して、リアルタイムモニタリングの感受性を向上させた。V1b 受容体は、無刺激時にも細胞内に局在し、 μ オピオイド受容体や β アレスチン 2 と恒常的な複合体を形成する特異な性質を持つ。これら 3 分子の相互作用を検出し、V1b 受容体拮抗作用から、依存のシグナルを抑制する化合物をスクリーニングする方法を開発した。これによりこれまで不可能だった薬物スクリーニングが可能となり、既存の他の受容体の薬物スクリーニングにおいても、感度を従来よりも 100 倍高めることができることが判明した。

(4) V1b- μ 受容体- β アレスチン 2 複合体の検出のために、新しい NanoBit-NanoBRET 測定法を世界で最初に G タンパク質受容体に応用することに成功した (論文投稿中)。受容体同士の相互作用をさらに詳細に解析した結果、相互作用の様子を頭打ちとなる曲線 (hyperbolic curve) 上に近似させることが可能であり、V1b- μ 受容体複合体で特異的な相互作用が起こっていることを証明した。この成果は、受容体複合体の存在が単に非選択的な発現系の影響によるものでなく、生物学的に意味を持つことを示唆しており、我々の実験系の理論的基盤に値すると考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) 幾つかの実験は現在も進行中である。我々は、複合体形成に必須である V1b 受容体カルボキシル基末端のロイシンリッチセグメントを、ゲノム編集により欠失させた点変異マウスの作出に成功した。この部位は、細胞を用いた実験系で依存形成に重要と判明しており、V1b-アレスチン相互作用の重要性を明らかにすることが可能となる。また、鎮痛に関わる G タンパク質シグナルを保持した状態で、アレスチンを介する ERK リン酸化酵素経路シグナルで新たな治療の標的を探索することが可能である。

(2) マウスを物体として深層学習モデルで認識する場合、当初 3000 枚を学習に用いてモデルを作成した。90%台の正確性で認識が可能であったが、学習に用いる画像を増やしたところ、正確性は上昇することが判明した。使用の用途によるが、今後も深層学習モデルのさらなる改善を試みることが可能である。

(3) 部位特異的 V1b 欠損動物作成のための loxP 配列挿入マウスの作成に成功し解析を進めている。脳内の部位特異的受容体欠損を作成し、チャンネルロドプシン発現マウスの開発を進めている。以上の如く、研究の進行は着実であり、最終年度にはこれまでの結果と合わせて大きな成果が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Critical role of V1a vasopressin receptor in murine parturition. Tsuchiya H, Fujimura S, Fujiwara Y, Koshimizu TA. *Biol Reprod.* 2020 Apr 15;102(4):923-934. doi: 10.1093/biolre/ioz220.

(2) 口頭発表

- ① Sensitive detection of agonist-dependent interaction between heteromeric m-opioid and V1b vasopressin receptors and β -arrestin 2. Ngamlertwong N., Tsuchiya H., Azuma M. and Koshimizu T. 第94回日本薬理学会年会 シンポジウム 2021年3月
- ② Distribution of mammal-like melanin concentrating hormone type 1 and 2 receptor expressing neurons in the brain of a basal actinopterygian fish, *Polypterus senegalus*. Azuma, M. Koshimizu T. 第94回日本薬理学会年会 一般演題 2021年3月
- ③ Deep neural network approach for understanding water-taking behavior after Tolvaptan. Kaminaga, H. Mochimaru, Y. Azuma, M. Tsuchiya, H. Koshimizu, T. 第94回日本薬理学会年会 一般演題 2021年3月
- ④ Successful detection of agonist-induced interactions between receptor dimers and β -arrestin Ngamlertwong, N. Tsuchiya H. and Koshimizu, T. 第142回日本薬理学会関東部会 一般演題 2020年 6月
- ⑤ V1bバゾプレシン- μ オピオイドヘテロ受容体と β アレスチン2の相互作用解析 興水 崇鏡、Nuttawadee Ngamlertwong、土屋 裕義 日本生化学会年会

(3) 出版物

- ① なし

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

1. 研究の目的

(1) 「ySOTSEC-ID “Keep Safe”」日本版マニュアルのストーリー・教材の妥当性の検討

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

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

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

(2) “Keep Safe”日本版のストーリー・教材の妥当性の検討

① “Keep Safe”日本版の妥当性を検討するために、ストーリー・教材の妥当性の検討を行うこととした。モデル実践を実施し、対象者の障害特性、リスクアセスメント、触法・非行分析に合わせて、使用するストーリーと教材を複数作成し、適宜、適用して妥当性を検討した。

2. 研究の計画

(1) “Keep Safe”日本版マニュアルのストーリー・教材の妥当性の検討

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

(2) “Keep Safe”日本版のモデル実践とストーリー・教材の妥当性の検討

① “Keep Safe”日本版マニュアルのプログラム効果を測定するために、A地区およびB地区、C地区の3地区においてモデル実践を行い、ストーリー・教材の妥当性の検討を行った。プログラム本体は週1回～隔週1回、2時間、全23回～38回セッションであった。

②事前にリスクアセスメント、知的能力、自閉スペクトラム症の特徴把握、環境状況のアセスメント等を行った。対象者は、知的障害・発達障害のある9人の青年であった。年齢は12歳～40歳代、知的能力はIQ50台～80台、9人とも自閉スペクトラム症の特徴を有し、1人はADHD特徴が顕著であった。9人はほぼ全セッションに参加した。

3. 研究の成果

(1) “Keep Safe”日本版マニュアルの作成とストーリー・教材の妥当性の検討

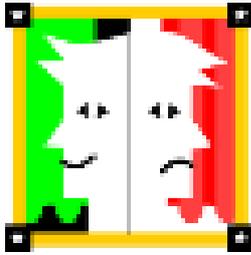
知的障害・発達障害のある青少年とその家族に向けた“Keep Safe”の日本版マニュアルのうち、対象者に合わせたストーリー・教材の妥当性の検討をした。

① “Keep Safe”日本版マニュアルの目的は次の2つに焦点を当てた。

A；ウェルビーイングの向上（ニーズを、社会に適応した方法で満たす）

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

② “Keep Safe”日本版マニュアルのモジュール構成（当事者6モジュール38セッション、保護者モジュール7：16セッション）と主要教材は2019年度に作成した日本の思春期・青年期の当事者に合わせたイラストやアニメも合わせて、複数のストーリーやイラストなどの視覚教材を作成した。対象者にあわせて妥当性を検討した。



(2) “Keep Safe” 日本版のモデル実践とストーリー・教材の妥当性の検討

① “Keep Safe” 日本版のプログラム内容のストーリー・教材の妥当性を検討するために、全国の3か所でモデル実践を行った。その際、知的障害・発達障害のある思春期青年期の当事者に合わせ、理解しやすいような視覚的教材や演習方法などを導入し、より効果的な認知行動療法になるようプログラムを改良した。

A地区グループは児童相談所と知的障害児支援施設が把握する性問題行動を有する当事者4人、B地区グループは発達障害者支援センターがコアになって把握していた性問題行動を有する当事者3人が対象であった。C地区グループは市基幹相談支援センターと地域生活定着支援センター、相談支援事業所のスタッフがチームを組んで実施した。生活年齢は12歳～40歳代、知的能力はほぼ軽度であり、認知行動療法が求める情報の共有やコミュニケーションを取ることが可能であった。リスクアセスメントはARMIDILO-S (The Assessment of Risk and Manageability for Individuals with Developmental and Intellectual Limitations who Offend Sexually) により行った。

② “Keep Safe” プログラム実践と対象者に合わせたストーリー・教材の妥当性の検討の検討

“Keep Safe” プログラム実践において、どのような対象者に対し、どのようなストーリー及び教材が妥当であるかを検討した。対象者の知的能力、生育歴、トラブル事例、リスクアセスメント等に合わせ、複数の教材を準備した。対象者に合わせて使い分けることが有効であり、その基本的なルールも作成した。

4. 研究の反省・考察

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

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

② 日本語版マニュアルの検討と同時に、“Keep Safe” セッションを実施するインストラクター養成を行った。理論的研修を2日間、オンライン研修にて行い、その後1日間対面演習において、各セッションの模擬演習を含めて実施方法の実務研修を行った。全国2か所で順調に実施でき、全国で100人の正規インストラクターが養成された。

(2) “Keep Safe” 日本版のモデル実践と効果測定

① 今回、“Keep Safe” 日本版のプログラム内容の妥当性を検証するために、全国の3か所でモデル実践を行った。A地区、B地区、C地区とも毎週1回～隔週1回、2時間行った。プログラム構成や実施方法の一定の安定性を確認することができた。今回、本プログラム全セッション38回をC地区で行ったことにより、知的障害・発達障害のある性問題行動や性加害行為を起こした本人たちへのプログラムとして総合的に妥当であることが確認できた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 堀江まゆみ (2021) 性的問題行動を示す知的障害・発達障害の青少年と保護者向け KeepSafe プログラム. 自閉スペクトラム症と性加害を考えるー予防と再教育におけるソーシャルストーリーTMの可能性ー、自閉スペクトラム学会、自主シンポジウム

(3) 出版物
なし

閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子基盤

—糖尿病黄斑浮腫治療に向けた光刺激の実証—

1. 研究の目的

糖尿病黄斑浮腫は視覚情報の中心を担う黄斑部に出現するむくみで、糖尿病を契機に、病期にかかわりなく発症し、患者の視力を奪うことで健康寿命を著しく害する。近年、糖尿病黄斑浮腫の治療には、分子標的薬が積極的に導入されているが、繰り返し注射を頻回する施術は、患者の肉体的、精神的な負担だけでなく、高額な医療費による経済的な負担という点で、問題を内包している。

閾値下レーザー光凝固は、網膜組織に凝固斑(瘢痕)を生じさせないように設定した強度で、眼内の浮腫に向けてレーザーを照射する手法で、旧来のように破壊的でない安全性と治療効果を両立している。しかし、レーザー光がどのような分子機序で浮腫に作用するかは不明であるために、最適な施術法の確立には至っていない。そこで私たちは、自作のレーザー照射実験系を駆使した細胞レベルの研究によって、浮腫を軽減する分子機序を理解することで、治療効果を最大限に発揮する非侵襲的な閾値下レーザー療法を提案を目指している。

眼内へと照射したレーザー光は網膜色素上皮層に選択的に吸収される。これまでに私たちは、生体内と同等の細胞極性を獲得した単層細胞への光エネルギーの負荷に成功している。閾値下レーザーに対する網膜色素上皮層の反応として、3つの標的分子を明らかにした。

本研究では、標的分子の生理活性から予想される細胞機能を踏まえて、光エネルギーが負荷された網膜色素上皮細胞で、最初期に起こる変化を、(1)Hsp70とDNAJB1、BAG3が担う恒常性の維持について、タンパク凝集とアポトーシスに着目して、分子細胞生物学的に調べるとともに、(2)CXCL8とZO-1が担う接着装置の改変について、傍細胞輸送にかかわる溶質透過・経上皮電気抵抗・膜電位に着目して、生物物理学的に調べる。

以上より、閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子作用機序というテーマの解明を達成して、糖尿病黄斑浮腫に対抗する新たな学術的基盤の創出につなげる。

2. 研究の計画

光刺激と“恒常性の維持”や“接着装置の改変”との相互関係を明らかにして、傷害がなく治療を有効とする最適解の分子基盤を確立するために、有孔膜の表面にコンフルエントな単層として60日間培養した天然あるいはiPS人工多能性細胞に由来するヒト網膜色素上皮細胞に、一様にレーザーを照射して、経時的に実験に供する。

(1) 恒常性を維持する仕組みの解析

①ここまでの実験結果は、オートファジー体系のHsp70・DNAJB1・BAG3、加えてLC3、p62、CHIPが恒常性の維持に重要なことを示している。そこで、オートファジー体系の定量実験によって、種々のレーザー出力で発現増強するオートファジー体系のタンパク質分子全体をPy-Tag誘導体で安定同位体標識し、液体クロマトグラフ質量分析計の多重反応モニタリングによる相対定量法で調べる。

(2) 接着装置を改変する仕組みの解析

①CXCL8は好中球を特異的に強力に誘引することが明らかになっている。そこで、好中球の遊走実験によって、光刺激した網膜色素上皮層の培養液に対して、末梢血から調製した好中球が移動することをボイデンチャンバーの化学走化性アッセイで調べる。

②CXCL8はタイト結合を緩和させる。また、過去の動物モデルの実験結果は、好中球が網膜色素上皮層の細胞間隙を往来していることを示している。そこで、タイト結合の開閉実験によって、生細胞間での脂質二重膜の張力をリアルタイムに観測できるFlipper-TRプローブを利用して、細胞間隙の変化を光寿命顕微鏡法で調べる。

③アクチンはZO-1を介して接着装置OccludinとClaudinを繋ぎ止めるが、ここまでの実験結果は光刺激でアクチンが脱重合していることを示している。そこで、アクチンの再構築実験によって、生細胞中でのアクチン重合体をリアルタイムに観測できるSpirochromeプローブを利用して、アクチン線維の変化を多点共焦点顕微鏡法で調べる。

3. 研究の成果

治療の奏効機序を解明するための糸口として、閾値下レーザー照射後の網膜色素上皮細胞内

で、最初期に発現誘導される分子を同定することが必須であると予想し、以下の項目を、実行してきた。

(1) レーザーが、なぜ糖尿病黄斑浮腫の治療に有効なのか？

- ① 網膜光凝固と閾値下レーザーの相違について、網膜光凝固の概念では、レーザー照射部位を焼き固めて、酸素の消費を制限することが、浮腫軽減の機構として定説であるが、一方、閾値下レーザーは、細胞組織を傷害しないのが前提である。
- ② ヒト網膜色素上皮について、iPS細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞を、透過膜上で、集密的に40日間培養し、細胞体の形態と色相が、敷石状で黒褐色となる単層のシートを調製した。
- ③ レーザー照射系について、網膜色素上皮シートに対し、垂直に落射する経路を設計し、1箇所 (0.7 mm²) あたり49点のレーザーを78箇所 (112 mm²) に、TxCell-IQ577発振器によって、自動照射した。
- ④ 閾値下レーザーの設定について、臨床に準じ、レーザー出力のみを増減させ、細胞層のCalceinシグナルを共焦点顕微鏡観察することで、傷害のない強度を特定した。
- ⑤ 包括的な遺伝子解析について、照射直後の時間経過において、23種類の遺伝子発現が上方制御されることがわかった。
- ⑥ 標的分子の経時的発現について、CXCL8とHSP70B' とが、mRNAだけでなく、タンパク質としても、一過性のピークとして発現することがわかった。
- ⑦ 標的分子の生物活性について、CXCL8は、網膜色素上皮内の代謝活性化にかかわり、免疫細胞を誘引し、免疫細胞間のパラ分泌シグナルを亢進する、他方、HSP70B' は、網膜色素上皮内の恒常性維持にかかわり、オートファジーを誘導し、オートファジーのタンパク質分解を促進する、という2つの分子メカニズムを考案した。

4. 研究の反省・考察

本研究において、閾値下レーザーに応答した、iPS細胞由来ヒト網膜色素上皮シートが、ケモカイン分子CXCL8とシャペロン分子HSP70B' とを、一過性のピーク (mRNAでは3時間、タンパク質では12時間までに最大) に発現することをゲノムワイドな解析から見出した。

この研究成果は、CXCL8とHSP70B' の経時的な発現パターンと同調する細胞外液性因子を、網膜色素上皮が分泌する代謝物質やタンパク質の全体 (精密質量データベースを活用した高分解能質量分析) から、閾値下レーザー治療の有効性をモニタリングできる分子マーカーの発見と、その臨床検査への応用を目指すことを可能とする。

現状の閾値下レーザー治療は、施術条件の設定方法が統一されておらず、患者の個々人に対して至適とはいえず、治療有効性の評価は、施術から1ヶ月もの時間経過を必要としている。

本研究の結果を基礎として、閾値下レーザーが照射された糖尿病モデルヒト網膜色素上皮のセクレトームを、メタボロミクス法およびプロテオミクス法で測定し、閾値下レーザーの標的分子CXCL8とHSP70B' の発現パターンを経時的に比較するという、先例のない方法論を展開することで、糖尿病黄斑浮腫の治療を保証するモニタリングマーカーとなる、細胞外液性因子を選定する全く新しい取り組みに発展している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Takuya Fujimaru、Takuya Shuo、Masahiko Nagahama、Fumika Taki、Masaaki Nakayama、Yasuhiro Komatsu
Assessing Urine Ammonium Concentration by Urine Osmolal Gap in Chronic Kidney Disease Assessing Urine Ammonium Concentration by Urine Osmolal Gap in Chronic Kidney Disease
Nephrology 26 809–812 2021年7月
- ② Eri Shishido、Takuya Shuo、Kazuyuki Shinohara、Shigeko Horiuchi
Effects of epidural anesthesia on postpartum maternity blues and fatigue and its relation to changes in oxytocin
Japan Journal of Nursing Science 18(3) e12406 2021年1月
- ③ 宍戸恵理、周尾卓也、堀内成子

(2) 口頭発表

- ① 高畑香織、宮内愛、仲丸律子、田所由利子、周尾卓也、堀内成子
分娩時の医療介入による乳汁分泌量と母乳育児率および唾液オキシトシン値への影響
第36回日本助産学会学術集会 2022年3月
- ② 高畑香織、宮内愛、仲丸律子、田所由利子、周尾卓也、堀内成子
高度生殖補助医療 ART 後の妊娠における乳汁分泌量と母乳育児率
第35回神奈川母性衛生学会学術集会 2022年2月

(3) 出版物

なし

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

1. 研究の目的

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

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

(1) OaPAC の光依存的な構造変化の可視化

- ① 蛍光分子による OaPAC の標識
- ② 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光強度変化の測定 (多分子計測)
- ③ 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光特性の測定 (1分子計測)

(2) OaPAC の活性に関与するアミノ酸の同定

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

2. 研究の計画

(1) OaPAC の光依存的な構造変化の可視化

① 蛍光分子による OaPAC の標識

OaPAC の活性に関与するアデニル酸シクラーゼドメインの ATP 結合部位の構造変化を光学的に調べるため、ATP 結合部位の特定のアミノ酸を特異的に蛍光分子で標識する。具体的には、内在性の 5 つのシステインのうち、ATP 結合部位付近にある 201 番目のシステイン (C201) 以外の 4 つをアラニンに置換した変異体を作製する。作製した変異体をシステイン残基に特異的に結合するマレイミド基を持つ蛍光色素と反応させ、C201 を特異的に標識する。蛍光色素は、疎水度が高い環境下ほど蛍光強度が高いという特性を持つテトラメチルローダミン (TMR) または、Cy3 (ドナー) と Cy5 (アクセプター) を混合したものを使用する。

② 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光強度変化の測定 (多分子計測)

蛍光分光光度計を用いて標識した OaPAC の蛍光強度を測定し、光照射に伴う変化を捉える。具体的には、青色光照射オンからオフの過程の蛍光強度の変化を捉え、光で活性化された状態から暗所で不活性化された状態へ移行する際の ATP 結合部位の構造変化を捉える。また、様々な ATP 濃度下での光依存的な蛍光強度変化を測定し、構造変化の ATP 依存性を調べる。

③ 蛍光標識 OaPAC の青色光依存的な蛍光特性の測定 (1分子計測)

全反射蛍光顕微鏡を用いて、蛍光標識した OaPAC を 1 分子イメージングし、青色光照射オン・オフ時の蛍光強度の変化を捉えることで、構造変化を可視化する。Cy3 と Cy5 の 2 色で標識した OaPAC については、2 量体を形成する OaPAC が Cy3 と Cy5 の両方で標識されているものを確認し、その光依存的な構造変化を測定する。

(2) OaPAC の活性に関与するアミノ酸の同定

① C末端アミノ酸変異体の作製

OaPAC の C 末端は活性に影響を与えることが知られており、疎水性アミノ酸が多いという特徴を有している。C 末端のアミノ酸のうち活性に影響を与えるアミノ酸を絞り込むため、C 末端の 12 残基をすべて疎水性アミノ酸に置換した変異体と、親水性アミノ酸に置換した変異体を作製する。

② 酵母を利用した変異体の cAMP 産生能の測定

以前の研究により、OaPAC を酵母に発現させた場合、cAMP 活性が高い OaPAC では酵母の増

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

3. 研究の成果

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

① 蛍光分子によるOaPACの標識

内在性の5つのシステインのうち、ATP結合部位付近にあるC201以外の4つをアラニンに置換した変異体を作製し、マレイミド基を持つTMRまたは、Cy3とCy5でC201を特異的に標識した。それらの標識率を測定した結果、OaPAC:TMR = 1:0.5、OaPAC: Cy3: Cy5 = 1:1.1:1.3であった。

② 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光強度変化の測定（多分子計測）

TMR標識OaPACを用い、青色光照射によるATP結合部位付近の活性状態から不活性化状態への構造変化を蛍光強度の変化として捉えた。TMR標識OaPACへ青色光を照射し、照射直後の蛍光強度の変化を蛍光分光光度計で測定した。その結果、暗所時と比べ光照射終了直後の蛍光強度は低く、約5secで暗所時の蛍光強度に戻った。また、光照射終了直後の蛍光強度の低下と暗所時の蛍光強度に戻る時定数はATP濃度に依存しており、ATPの濃度が高いほど低下が小さく、暗所時の強度に戻るまで時間がかかることがわかった。TMRは疎水度が高い環境下ほど蛍光強度が高いという特性を持つので、得られた結果は光照射によりOaPACが活性化された状態では、ATP結合部位は不活性化状態と比べて親水性環境に存在し、ATP濃度依存的に活性状態から不活性化状態へ移行することを示している。

また、Cy3とCy5で標識したOaPAC変異体については、2量体間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を観察した。多分子の蛍光分光測定により、Cy3の励起波長でCy5の蛍光が観察されたことから、FRETが起こることを確認した。

③ 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光特性の測定（1分子計測）

全反射顕微鏡を用い、TMR標識OaPACを1分子レベルでイメージングし、暗所で15s後、青色光照射を20s行い、再び暗所で1min静置した時の蛍光画像を200ms毎に取得した。また、Cy3とCy5で標識したOaPACについても同様に1分子イメージングし、FRETが1分子レベルで起こっていることを確認した。

(2) OaPACの活性に関与するアミノ酸の同定

① C末端アミノ酸変異体の作製

OaPACのC末端の12残基のうち4つの親水性のアミノ酸を疎水性アミノ酸に置換した変異体（疎水性OaPAC）と、8つの疎水性アミノ酸に親水性アミノ酸に置換した変異体（親水性OaPAC）を作製した。

② 酵母を利用した変異体のcAMP産生能の測定

作製した変異体2種と、野生型OaPAC、活性が高いことが知られているC末端を18アミノ酸残基欠失した変異体（OaPAC348）をそれぞれ酵母に形質転換し、発現誘導処理によりOaPAC変異体を酵母に発現させ、10 μ Wから60 μ Wの様々な強度の青色光照射下または暗所で増殖能の違いを調べた。その結果、青色光照射下と暗所でこれらのOaPAC間に増殖能の違いが見られた。暗所ではすべてのOaPACが増殖した一方、青色光照射下では、OaPAC（WT）はすべての光強度下で増殖したが、OaPAC（348）とOaPAC（親水性）は20 μ W以上の光強度の照射下ではほとんどしなかった。以前の研究によりcAMP活性が高いOaPACが発現した酵母は増殖能が低下することが報告されているので、この結果はC末端の疎水度が弱まるとOaPACの活性が高まることを示唆していると考えられる。しかしながら、疎水度を高めたOaPAC（疎水性）では青色光照射下でWTほどの増殖が見られなかったことから、単純にC末端の疎水度が高まっても活性が低くなるわけではないことが分かった。

4. 研究の反省・考察

(1) OaPACの光依存的な構造変化の可視化

① 蛍光分子によるOaPACの標識

OaPACのATP結合部位に蛍光分子を標識した変異体を作製することができた。しかしなが

ら、Cy3とCy5で標識した変異体については、これらの蛍光色素の量がタンパク量を上回っており、非特異的な部位も標識されている可能性がある。今後は、非特異的に結合している蛍光分子を分離する操作を加え、特異的に標識されているOaPACを作製する必要がある。

② 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光強度変化の測定（多分子計測）

TMR標識OaPACの蛍光特性を調べることで、青色光による活性化時と不活性化時のATP結合部位の構造状態の違いを捉えることができた。活性化時にATP結合部位が不活性化時と比べて親水的な環境に存在したことから、ATP結合部位は光照射によりタンパク内部の疎水性環境から外部に晒された親水性環境に移動し、ATPが結合しやすい状態に位置すると考えられる。また、TMRの特性を利用して捉えた活性状態から不活性化状態へのATP結合部位の構造変化の時定数約5secは、青色光を感受するBLUFドメインの光依存的な構造変化の時定数とほぼ同じであることから、BLUFドメインで捉えられた光の情報が構造変化としてATP結合部位が含まれるアデニル酸シクラーゼドメインまで伝わっていると考えられる。

③ 蛍光標識OaPACの青色光依存的な蛍光特性の測定（1分子計測）

全反射顕微鏡を用い、TMR標識OaPACとCy3・Cy5標識OaPACの1分子イメージングを行い、蛍光特性の変化を捉えた。今後データを解析し、光照射有無での蛍光特性の違いから構造状態の違いを明らかにすることと、光照射オン・オフ時の蛍光特性の変化から構造変化を捉えることを行う。

(2) OaPACの活性に関与するアミノ酸の同定

酵母を利用してC末端のアミノ酸の一部を置換した変異体のcAMP産生能を測定し、C末端の疎水度が活性に影響を与えていることがわかった。C末端のアミノ酸を親水性アミノ酸に置換して疎水度を弱めると活性が高まったことから、C末端はOaPACのある部位と相互作用してcAMPの産生を妨げているのではないだろうか。しかしながら、C末端の疎水度を強めても活性が弱まらず、逆にWTより若干活性が高まったことから、単純にC末端の疎水度のみが活性に影響を与えているのではなく、別の要因、例えば電荷など、も影響を与えているのではないかと考えられる。今後はアミノ酸の他の特性も考慮し、活性に影響を与えるアミノ酸を絞り込む。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 公益財団法人新世代研究所2020年度第1回バイオ単分子研究会 “イオンチャネルの基礎研究から生まれた新たな研究・開発” オンライン 2021/3/30

(3) 出版物

なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	愛 知 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	蓬左文庫所蔵典籍の調査および史料研究 －古代を中心に－		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①名古屋市蓬左文庫 ②駿河御譲本 ③データベース ④日次記		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
廣 瀬 憲 雄	愛 知 大 学 文 学 部	教 授	研究代表者、全体の統括、 古代関係典籍の写本系統の調査

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
浅 岡 悦 子	愛 知 大 学 文 学 部	非 常 勤 講 師	古代関係典籍の基本情報の整理
吉 田 一 彦	名 古 屋 市 立 大 学 大 学 院 人 間 文 化 研 究 科	教 授	古代関係典籍の写本系統の調査
丸 山 裕 美 子	愛 知 県 立 大 学 日 本 文 化 学 部	教 授	古代関係典籍の写本系統の調査
松 菌 斉	愛 知 学 院 大 学 文 学 部	教 授	古代関係典籍の写本系統の調査
鳥 居 和 之	名 古 屋 市 蓬 左 文 庫	文 庫 長	蓬左文庫所蔵典籍の伝来
木 村 慎 平	名 古 屋 城 調 査 研 究 セ ン タ ー	学 芸 員	蓬左文庫所蔵典籍の伝来
手 嶋 大 侑	名 古 屋 市 立 大 学 大 学 院 人 間 文 化 研 究 科	研 究 員	古代関係典籍の基本情報の整理
芝 田 早 希	名 古 屋 大 学 大 学 院 人 文 学 研 究 科	大 学 院 生	古代関係典籍の基本情報の整理
稲 垣 竣 亮	名 古 屋 大 学 大 学 院 人 文 学 研 究 科	大 学 院 生	古代関係典籍の基本情報の整理

蓬左文庫所蔵典籍の調査および史料研究

—古代を中心に—

1. 研究の目的

(1) 研究の内容と目的

- ① 本研究では、名古屋市蓬左文庫（以下、「蓬左文庫」と略称）が所蔵する日本古代史関係の典籍約120件の基礎的な学術調査を行う。
- ② 本研究の最終的な目標は、1：調査の成果を新たな目録・解題として出版すること、2：特に重要なものについては、写本系統の分析や他機関所蔵の関係写本との比較検討等を実施すること、3：調査結果に基づいて蓬左文庫ウェブサイト上のデータベースの内容を修正・増補し、可能ならば各典籍の画像を検索可能な形で公開することである。

(2) 研究の背景と特徴

- ① 蓬左文庫には、徳川家康の没後に分与された「駿河御譲本」や、初代尾張藩主義直が収集した蔵書類など、学問的・文化的に価値のある典籍が豊富に所蔵されている。しかし従来は、金沢文庫本『続日本紀』や『侍中群要』以外の古代史関係典籍の調査はほとんど行われておらず、蓬左文庫所蔵の典籍は十分に活用されているとは言い難い状況であった。
- ② そこで本研究では、蓬左文庫が所蔵する日本古代史関係の典籍を悉皆調査することで、その全貌を明らかにするとともに、蓬左文庫蔵書の形成過程を追究していく。最終的には、これらの成果を書籍として刊行し、あわせて蓬左文庫ウェブサイト上のデータベースを充実させることで、蓬左文庫所蔵の典籍が容易に活用できるようにすることを目指す。

2. 研究の計画

(1) 2020年度の調査対象

- ① 2020年度は、当初古記録類の調査を実施する予定であった。しかし幸いにも、2019年度にシキシマ学術・文化振興財団からも研究助成金を得て、同年度中に古記録類の調査を行うことができたため、2020年度には、朝儀や政務の史料として重要な、『江次第抄』・『禁秘御抄』・『雲図抄』等の儀式書など21件を、繰り上げて扱う予定であった。
- ② このうち、計画立案時において詳細な調査が必要と考えられていた写本は、「御本」（初代藩主義直の蔵書）の印記を持つ、江戸初期に遡る写本である『江次第抄』・『禁秘御抄』、江戸初期写とされている『雲図抄』や『朝野群載』であった。

(2) 2020年度の講演会・シンポジウム

- ① 本研究では、研究成果の社会還元を図るため、一般向けに講座やシンポジウムを開催し、研究成果の公表を行うとともに、蓬左文庫が所蔵する典籍の重要性を周知させるための活動も進めることを特徴としている。
- ② ただし、新型コロナウイルス感染症流行のため、2020年度には講演会・シンポジウムの開催は見合わせ、2021年度に流行状況を見計らい実施することにした。

3. 研究の成果

(1) 調査成果

- ① 新型コロナウイルス感染症流行の影響により、2019年度末から蓬左文庫が閲覧を停止したため、当初は調査の続行そのものが危ぶまれていた。しかし、人数などを制限した上で蓬左文庫が閲覧を再開したことと、計画の1年間の延長（繰り越し）が認められたことにより、2019年度分のうち未了であった5件と、2020年度分の21件のうち、『雲図抄』3件『侍中群要』1件の合計4件を除く、17件の調査を終えることができた。調査にあたっては、助成金を活用して一部の対象典籍の撮影を行い、流行状況に左右されることなく調査を実施できるように配慮した。
- ② 既存の調査対象である典籍に対する検討も引き続き進められた。2019年度に実施したシンポジウムでの報告は、5. (1) ③として論文化した。また、2019年度の実績報告時点では江戸時代初期に遡る写本が見いだせなかった『類聚国史』に関しては、江戸時代後期に書写された写本群の中に、初代藩主義直と二代藩主光友が収集した写本が混じっていることが判明した。蓬左文庫の蔵書形成とも関係する徳川家康の収書活動については、富士見亭

文庫創設以前の天正14年（1586）から行われていたこと、その過程で重視されたのはもっぱら古代関係の典籍であったことが明らかになった。

(2) 講演会・シンポジウム

① 新型コロナウイルス感染症流行の影響により、これまでのような遠方から講師を招く形での講演会は開催することができなかった。その代わりに、研究代表者の廣瀬が勤務校のオープンカレッジで「古代日本の歴史文化と蓬左文庫・徳川美術館 — 『万葉集』をとりまく世界 —」と題する講演（2021年11月）を行い、普及活動に勤めた。

② 同様にシンポジウムも、遠方から講師を招くことはできなかったが、研究会のメンバーを中心に、2021年12月にシンポジウム「江戸幕府の書物と蓬左文庫」を開催することができた。当日の報告者・報告内容については、5. (2)を参照していただきたい。なお、5. (2)のうち①の報告は、5. (1)の④という形で論文化されている。

4. 研究の反省・考察

(1) 外部調査・内部調査

① 本研究では、蓬左文庫所蔵の典籍のうち特に重要なものについては、写本系統の分析や他機関所蔵の関係写本との比較検討等を実施することにしていたが、新型コロナウイルス感染症の流行により、他機関に出向いての調査はほとんど行うことができなかった。この点は、2022年度以降流行状況を鑑みながら進めていきたい。

② 蓬左文庫所蔵典籍の調査は、3. (1)①のようにおおむね終えることができたが、未了のものもあるので、今後遅れを取り戻していきたい。また、新型コロナウイルス感染症の流行により、従来のようにメンバーが一堂に会して調査を行う方式から、各自が調査をする方式に切り替えたのだが、全員が集まる機会が少なくなった分、情報の共有や意思疎通に難が出てきた部分もある。今後はZoomなども利用しながら、研究活動ができるだけ円滑に進むようにしていきたい。

(2) 講演会・シンポジウムなど

① 講演会・シンポジウムに関しては、3. (2)①②のように、従来のような形での講演会は実施できなかったが、シンポジウムは無事実施することができた。ただし、その際に痛感したのは、新型コロナウイルス感染症対策の知識・経験がある蓬左文庫職員や名古屋市博物館（シンポジウムの会場。蓬左文庫は名古屋市博物館の分館である）関係者の協力がなければ、このような催しを開くことは極めて難しいということである。本研究では幸い、流行以前からの実績があったため、両機関の協力を得ることができたのだが、今後も調査・研究を進めていくにあたっては、より一層の協力関係の構築が必要となってくるのではないかと考える。

② 蓬左文庫典籍研究会の活動（本研究の2019年度活動分）が、『名古屋市博物館年報 令和元年度』31頁の「4 調査研究(3)共同研究活動」で紹介された。①とも重複するが、今後も蓬左文庫側と協力しながら研究を進めていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① 廣瀬憲雄「蓬左文庫本『日次記』の調査」（『蓬左』第99号、名古屋市蓬左文庫、2020年6月）

② 廣瀬憲雄「名古屋市蓬左文庫所蔵『日次記』の紹介」（『日本歴史』第873号、日本歴史学会、2021年2月）

③ 廣瀬憲雄・芝田早希「二条家本系『日次記』諸写本の比較と写本系統」（『愛大史学 — 日本史学・世界史学・地理学 —』第30号、愛知大学文学部人文社会学科歴史・地理学コース、2021年3月）

④ 丸山裕美子「徳川家康による古典籍の蒐集 — 「富士見亭文庫」成立以前 —」（『愛知県立大学日本文化学部論集』第13号、愛知県立大学日本文化学部、2022年3月）

(2) 口頭発表

① 丸山裕美子「徳川家康の典籍蒐集 — 古代史料を中心に —」（シンポジウム「江戸幕府

の書物と蓬左文庫」名古屋市蓬左文庫・蓬左文庫典籍研究会主催、2021年12月)

②浅岡悦子「蓬左本『积日本紀』の写本系統 一前田家本・紅葉山文庫本との比較一」(同上)

③廣瀬憲雄「尾張藩と江戸幕府の『類聚国史』蒐集」(同上)

(3) 出版物

なし

逆構造ペロブスカイト太陽電池のテクスチャー発電層の製膜技術 —新たな高効率な太陽電池の創出で脱炭素社会の一端を担う—

1. 研究の目的

本研究の目的は、市販の材料を用いて、新しく提案するガスフローアシスト型インクジェット印刷でフレキシブル基板に逆構造型のペロブスカイト太陽電池を製作し、さらなる高発電効率に挑戦するものである。ペロブスカイトの前駆体となる $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ をインクジェット印刷した直後に、ガスフローするとペロブスカイト結晶のグレインサイズが大きくなり、より高い発電効率が得られることを期待している。光吸収層となるペロブスカイト層をピラミッド形状のナノテクスチャー構造にすることで、「①表面のピラミッド構造により、表面で一度反射した光を再び入射させる多重反射」や「②表面のピラミッド構造による光行路長が増大」「③内部残反射による光閉じ込め」などの効果から発電効率を向上させることができる。また同様の効果を狙って、誘電ミラーをペロブスカイト層上に製膜し、かつ基板にテクスチャー構造を精密加工する。そして2022年度にこれらの技術を組み合わせて高発電効率大面積の逆構造ペロブスカイト太陽電池を試作する。

2. 研究の計画

(1) ガスフローアシスト型インクジェット製膜装置の試作とノズルの最適化形状の探索

試作した装置を用いて、ガスフローアシスト型インクジェット印刷装置の改造とノズルの最適化を実施する。インクジェットヘッドはピエゾ素子駆動で吐出液量50~300pL/滴の市販品を採用し、発電層の下地となる正孔輸送層を製膜しているが、膜厚ナノオーダーでテクスチャー構造を形成するには、さらなる微小口径のインクジェットノズルを製作する必要があることが分かってきた。しかし取り扱いが難しいため、ノズルの最適化形状を探索する。またガスフローアシストを行うと良好なペロブスカイト発電層を形成できることが、我々の研究で分かっており、インクジェットと同時にガスを吹き付ける構造とする。研究では1pL/滴吐出できるノズルヘッドを購入し、これにガスフローアシストを設置する。

(2) ナノテクスチャー構造を有する逆構造ペロブスカイト製膜技術の確立

試作した装置で、ITO膜付きガラス基板を用いて、テクスチャー構造の発電層を有する逆構造ペロブスカイト発電層を製膜する。従来の順構造ペロブスカイト太陽電池は、発電層の下地になるコンパクト層に酸化チタン (TiO_2) を用いるため、500°C以上での製膜プロセスを要し、使用できる基板に限られる。一方、逆構造ペロブスカイト太陽電池は電子輸送層に導電性ポリマー (PEDOT:PSS) を用いるので、120°C以下での低温作製が可能であるため、PETフィルムなどの基材を使用することができ、フレキシブル化に適している。提案する研究ではこの正孔輸送層上にガスフローアシスト型インクジェット印刷でペロブスカイト発電層を製膜する。製膜はペロブスカイトの前駆体である $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ を溶媒で薄め、1ステップ法で行う。我々は、製膜後、エアを吹き付けるとペロブスカイト結晶が大きくなり、発電効率が向上することを確認しており、インクジェット印刷後ガスを吹き付けることによって、同じ効果を期待している。また最終金属電極に関しては発電効率に依存するため、すでに研究室に設置済の真空蒸着装置を改造して使用する。

(3) テクスチャー構造ペロブスカイト太陽電池の特性評価技術の確立

ペロブスカイト太陽電池の評価は、AFM, TEM, XRD等の機器を用いたペロブスカイト層の特性解析やソーラシミュレータを用いた太陽電池特性を測定し、膜の物性特性を評価する。特にテクスチャー構造ペロブスカイト太陽電池の特性を知るためには電気特性 (JV特性) は非常に重要であり、本研究では既存の太陽電池シミュレータに偏光板を付加させて測定をする新たな方法を試みる。

(4) ナノテクスチャー構造のペロブスカイト層内の光挙動の解明

ナノテクスチャー構造のペロブスカイト層内に光を入射させた場合の、光反射や光路長など光の挙動を解明する。また従来本研究室で作製しているペロブスカイト太陽電池と発電効率等を比べ、ナノテクスチャー構造の効果を確認する。

3. 研究の成果

(1) ガスフローアシスト型インクジェット製膜装置の試作とノズルの最適化形状の探索

図1に試作したガスフロー型インクジェット成膜装置を示す。今回はガスフローアシストノズルをインクジェットノズルの横に取り付け、さらにインクジェットからの噴霧様子とノズルから滴下した材料が着弾する様子を観測するために、高速度ビデオカメラを設置した。さらにペロブスカイト結晶の前駆体 $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ は鉛を含むため、ダクトファンを設置した。

インクジェットのノズル形状の最適化は、ノズル先端の孔径が大きな要因となる。今回は孔径 $40\mu\text{m}$ で実験を行った。テクスチャー幅をさらに細くするために、孔径の小さなノズルもトライしたが、ノズル先端の濁りやノズル取り扱い易さを考慮して $40\mu\text{m}$ が最適と判断した。

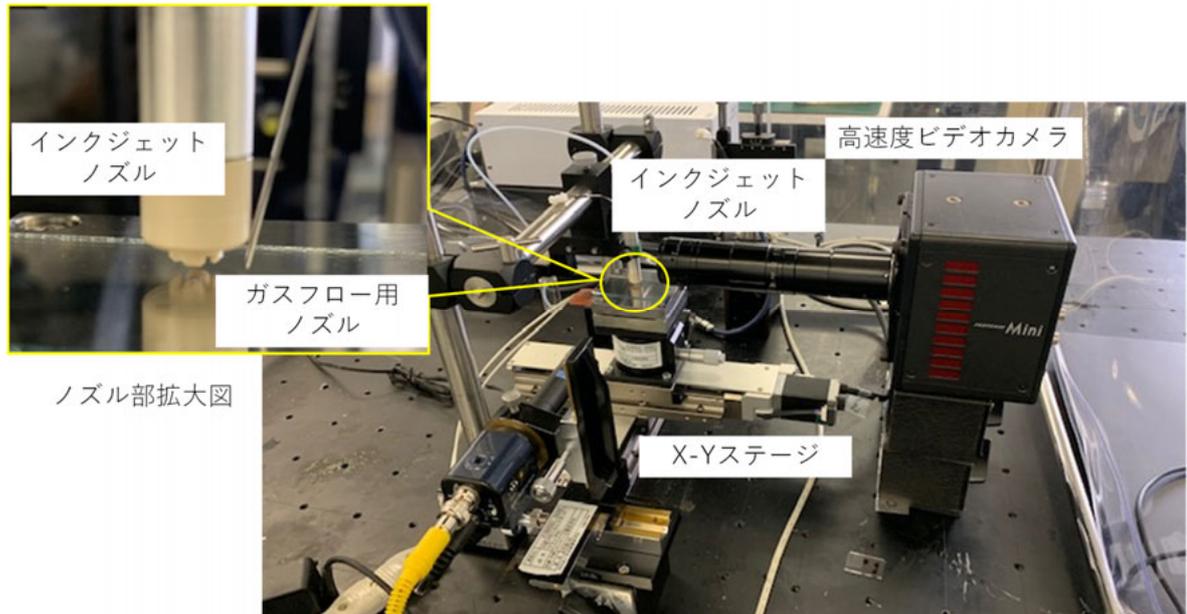


図1 試作したガスフロー型インクジェット成膜装置

(2) ナノテクスチャー構造を有する逆構造ペロブスカイト製膜技術の確立

発電層となるペロブスカイト層の下地になる正孔輸送層にポリ(4-スチレンスルホン酸)をドーパしたポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン)(PEDOT:PSS)をインクジェット印刷で製膜した。図2は先端孔径 $40\mu\text{m}$ のインクジェットノズルから吐出させたPEDOT:PSS液滴をカメラ撮影した像である。液滴径は $30\mu\text{m}$ であった。この液滴はピエゾ電圧で液滴の速度を、周波数で単位時間あたりの液滴数を調整し、最適な膜厚や形状を得る。

図3はインクジェットで印刷したPEDOT:PSS層の表面とその上からペロブスカイトの前駆体をスピコートで製膜して、ペロブスカイト結晶を成長させた表面である。図3(a)より線上のPEDOT:PSSが堆積されていることが分かる。その線幅は約 $60\mu\text{m}$ から $80\mu\text{m}$ であった。また図3(b)のように下地表面にペロブスカイト層を製膜しても、PEDOT:PSSの形状が維持され、テクスチャー構造になっていることが分かる。PEDOT:PSSをテクスチャー形状でインクジェット印刷をし、その上からペロブスカイト結晶($\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$)を1ステップ法で成長させ

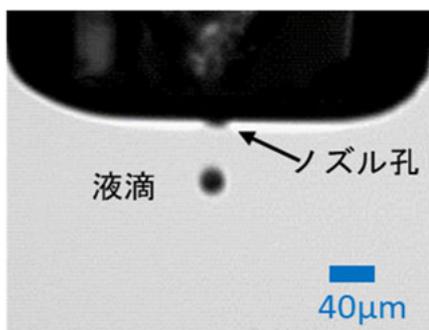


図2 インクジェットの吐出の様子

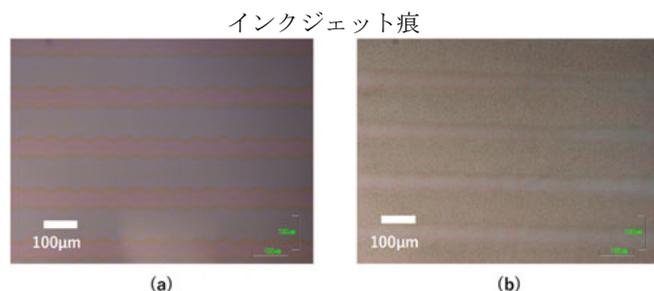


図3 インクジェット印刷した基板表面の光学顕微鏡画像 (a) PEDOT:PSS層 (b) ペロブスカイト層

て、その後、電子輸送層となるフェニルC₆₁酪酸メチルエステル (PC₆₁PB) をスピンコートで製膜し、銀電極を真空蒸着して、デバイス化した。

(3) テクスチャー構造ペロブスカイト太陽電池の特性評価技術の確立

図4に製作したペロブスカイト太陽電池の電流密度電圧特性を示す。発電効率はヒステリシスが確認され、行きで4.35%、戻りで3.70%であった。リファレンスとしてのPEDOT:PSSをスピンコートで製膜した場合の発電効率が9.33%であったので、インクジェット印刷でテクスチャー構造に製膜した場合よりも5.36%減少した。当初目論んでいた、テクスチャー構造による発電効率向上までには至らなかったが、今後原因を明らかにして発電効率向上を目指す。

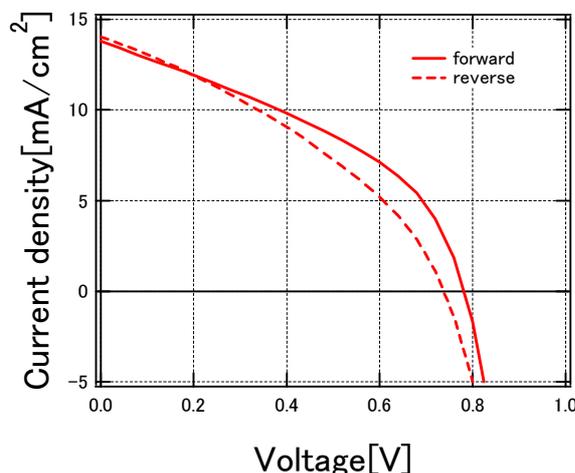


図4 インクジェット印刷で製膜した電流密度電圧特性

(4) ナノテクスチャー構造のペロブスカイト層内の光挙動の解明

今回の実験では、PEDOT:PSS層のテクスチャー構造の有無で特性の大きな差異は見られなかった。そのため、光挙動の解明には至らなかった。

4. 研究の反省・考察

今回の研究の反省としては、ペロブスカイト層の下地層のテクスチャー構造の製膜までであったことである。しかしながらテクスチャー構造製膜の目途はたったため、今後ペロブスカイト層のテクスチャー構造の製膜と評価を行っていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Vincent Obiozo Eze, Yoshiyuki Seike, and Tatsuo Mori; “Synergistic Effect of Additive and Solvent Vapor Annealing on the Enhancement of MAPbI₃ Perovskite Solar Cells Fabricated in Ambient Air”, ACS Applied Materials & Interfaces, 12(41) pp. 46387-46845, (2020).

(2) 口頭発表

① Ryoma Hayashi, Tatsuo Mori and Yoshiyuki Seike: Fabrication of concavoconvex PEDOT:PSS layer by inkjet-printing in inverted perovskite solar cell, 11th International Symposium on Organic Molecular Electronics (ISOME2020), P18, (Aichi Japan). 2020/8/6

② Tatsuya Kato, Tatsuo Mori and Yoshiyuki Seike: Influence of potassium ions on the fabrication of inverted organic perovskite solar cells Influence of potassium ions on the fabrication of inverted organic perovskite solar cells, 11th International Symposium on Organic Molecular Electronics (ISOME2020), P-22, (Aichi Japan). 2020/8/6

(3) 出版物

① 清家善之: エレクトロスプレー/スピニング法とその応用—材料合成・成形・加工技術—、第15章 「有機EL/有機薄膜太陽電池」、シーエムシー出版、2020年3月

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

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

○研究代表者

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

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
喜 島 祐 子	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
内 海 俊 明	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
河 田 健 司	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
林 孝 典	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の分子生物学的解析
渡 辺 崇	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の画像解析
前 田 真 男	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	転移モデルの解析
柳 久 乃	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	助 教	臨床特性との関連の解析

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

1. 研究の目的

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

2. 研究の計画

2020 年度および翌年の新型コロナウイルス感染症蔓延に伴う繰越期間には、GGCT ががん幹細胞性の制御に働く分子機構、乳がんの臨床的特性と GGCT 発現量の関連、がん細胞代謝における GGCT の役割を解明するため、乳がん患者検体、乳がん異種移植マウス腫瘍 (PDX)、およびがん細胞株を用いた解析を行う。

(1) GGCT 阻害による腫瘍進展抑制能

① GGCT 阻害によるがん幹細胞性抑制

オルガノイドアッセイをはじめとした三次元培養法では、患者がん組織の組織分化を反映した形でがん幹細胞機能を評価することが出来る (Shimono Y et al. *Methods Molecular Biology*, 2019)。そこで、GGCT の特異的競合阻害剤として報告されている Pro-GA を用いて乳がん細胞のオルガノイド形成能やスフェロイド形成能を解析する。つぎに、GGCT 阻害効果をより特異的に解析するため、shGGCT 発現ウイルスにて GGCT の発現をノックダウン (発現抑制) した乳がん細胞株や乳がん患者由来異種移植腫瘍 (PDX) 細胞を樹立して同様の解析を行う。

② GGCT 発現阻害による腫瘍形成抑制効果

上記で作製した GGCT ノックダウン乳がん PDX 細胞を用いて、GGCT 発現抑制に伴う腫瘍形成抑制効果を、高度免疫不全マウスを用いた異種移植モデルにて検証する。

(2) GGCT 発現量とがんの臨床的特性との関連

① 乳がん患者検体の GGCT バリエーション別発現量と乳がん臨床的特性との関連

書面で同意が得られた藤田医科大学乳腺外科乳がん患者の手術検体の腫瘍組織部分の GGCT 発現量を GGCT バリエーション別に解析し、乳がんサブタイプ、がん進行度などとの関連を解析する。

(3) GGCT による乳がん細胞の代謝制御機構の解析

① 質量分析法による GGCT 代謝産物の測定

shGGCT 発現ウイルスにて GGCT 発現をノックダウンした乳がん細胞株の代謝産物を質量分析法にて測定することで、GGCT 依存性のがん代謝機構を解析する。

② GGCT と活性酸素種除去能との関連

活性酸素種の除去能はがん幹細胞維持の根幹にある重要な性質である (Diehn M et al. *Nature*, 2009; Yagi H et al. *Cancer Cell*, 2011)。GGCT は活性酸素種除去に働くグルタチオン生合成に関わる酵素であることから、GGCT およびその酵素活性変異体を用いて、乳がん細胞や乳がん幹細胞の活性酸素種量を活性酸素種反応性 DCFDA/H₂DCFDA プロブを用いて解析する。

3. 研究の成果

(1) GGCT 阻害による腫瘍進展抑制能

① GGCT 阻害によるがん幹細胞性抑制

GGCTの特異的競合阻害剤 (Pro-GA) により乳がん細胞株および乳がんPDX細胞のオルガノイド形成能は強力に抑制された。つぎに、shGGCT発現ウイルスにてGGCTの発現をノックダウンした乳がん細胞株や乳がんPDX細胞を樹立した。これらの細胞でも同様にGGCTノックダウンによりオルガノイド形成能は抑制された。

② GGCT 発現阻害による腫瘍形成抑制効果

乳がん細胞株を移植したマウスの腫瘍形成能および肺などへの遠隔転移能は、GGCT ノックダウンにより抑制された。さらに、乳がん PDX 細胞を用いた高度免疫不全マウスへのがん移植実験では、GGCT ノックダウンにより同様に腫瘍増殖能が抑制された。

(2) GGCT 発現量とがんの臨床的特性との相関

① 乳がん患者検体のGGCTバリエント別発現量と乳がんの臨床的特性との関連

乳がん手術検体の腫瘍およびセンチネルリンパ節の解析から、GGCT の 4 つのバリエント (多様体) のうち酵素活性部位を欠くバリエント 2 と 4 が閉経前症例、Ki-67 発現の高い症例で高値である傾向が示された。この結果から、GGCT には γ -グルタミルシクロ転移酵素活性を介さないがん促進機能がある可能性も考えられた。

(3) GGCT による乳がん細胞の代謝制御機構の解析

① 質量分析法による GGCT 代謝産物の測定

GGCT 発現およびノックダウン細胞を用いてメタボローム解析を行った (慶應義塾大学曾我教授との共同研究)。その結果、GGCT の発現低下が糖および脂質代謝の鍵となるカルニチンの発現上昇と相関することが判明した。

② GGCT と活性酸素種除去能との関連

GGCT 発現およびノックダウン乳がん細胞を用いて、フローサイトメトリーにて活性酸素種反応性 DCFDA/H2DCFDA プローブを用いた発色強度の測定を行った。通説と異なり GGCT ノックダウンと活性酸素種除去能との関連は明らかではなかった。次年度以降は酵素活性に依存しない GGCT の腫瘍促進能の解明を進める。

4. 研究の反省・考察

(1) GGCT 特異的阻害剤 Pro-GA と shRNA のがん抑制効果の比較

Pro-GAはGGCTがもつ γ -グルタミルシクロ転移活性を競合阻害する特異的阻害剤として開発された。今回、オルガノイドアッセイやメタボローム解析などにて乳がん細胞に対するPro-GAとshRNAの効果解析をしたところ、両者の働きに種々の違いを認めた。したがって、GGCTによるがんおよびがん幹細胞性の促進機構には、酵素活性に依存しない新機構も関与すると考えられた。

(2) がん幹細胞制御におけるカルニチンの役割

代謝制御はがん細胞機能を制御する重要な因子である。今回のメタボローム解析の結果から、カルニチンの代謝ががん幹細胞性の制御と関連する可能性を見出した。カルニチンの添加により乳がんPDX細胞のオルガノイドが変化する可能性も見出されたことから、本件に関しても引き続き検討を続けていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shibuya N, Kakeji Y, Shimono Y. miR-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer. *Cancer Science*. 2020;111:2093-2103. doi: 10.1111/cas.14423.
- ② Nishio E, Hayashi T, Akaza M, Hisatomi Y, Hikichi M, Fujii T, Utsumi T, Harada N, Shimono Y. Upregulation of CIP2A in estrogen depletion-resistant breast cancer cells treated with low-dose everolimus. *FEBS Open Bio*. 2020;10:2072-

2080. doi:10.1002/2211-5463.12956.

- ③ Yanagi H, Watanabe T, Nishimura T, Hayashi T, Kono S, Tsuchida H, Hirata M, Kijima Y, Takao S, Okada S, Suzuki M, Imaizumi K, Kawada K, Minami H, Gotoh N, Shimono Y. Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells. *Cancer Science*. 2020;111(12):4359-4370. doi: 10.1111/cas.14659.

(2) 口頭発表

- ① Shimono Y, Shibuya N, Nishimura T, Gotoh N, Kakeji Y. MicroRNA profiling of latently metastasized human breast cancer stem cells 第79回日本癌学会学術総会 (International Session)、2020年
- ② Shimono Y, Gotoh N. 脂肪細胞によるがん幹細胞性制御能の解析 令和2年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点研究成果報告会、2021年

(3) 出版物

なし

次世代高容量Liイオン電池実現に向けた 新規ナノ複合材料の創製

1. 研究の目的

本研究の目的は、従来のカーボン材料を大きく凌駕するリチウム(Li)イオン電池電極材に適した物性値を有するナノ複合材料を新規プロセスで実現し、次世代高容量Liイオン電池をブレイクスルーすることにある。1回の充電で500 km以上の長距離走行を可能とする電気自動車の本格的な普及には、現行の2倍以上のエネルギー密度を有する革新的Liイオン電池の開発が必要不可欠であり、電極材料の高容量化は最優先研究課題である。IV族半導体のシリコン材料(Si)は、 $\text{Li}_{1.4}\text{Si}$ の合金を形成しLiを4個以上吸蔵することができるため、従来のカーボン(グラファイト)負極容量372 mAh/gの10倍以上の高容量化が可能である。しかしながらSiは、Liイオン取込時の体積膨張率が420%とカーボンの112%に比べ極めて高く、充電と放電の繰り返しにより、合金が微粉化し、そのため寿命が極めて短いという課題がある。このような課題に対し、本研究では、カーボンナノ材料を基軸に、高容量化が期待できるSiナノ材料を複合化することにより、Liイオン電池の高容量化と長寿命化を両立できる新規ナノ複合材料を開発することを研究目的とする。

2. 研究の計画

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

(1) 高密度Siナノ粒子含有カーボンナノウォールの合成(図1(a)参照) 本研究グループで開発した独自のプラズマプロセスで作製する超高密度カーボンナノウォール材料(グラフェンが基板の垂直方向に自立した構造)は高い比表面積を有している。カーボンナノウォールとSiナノ粒子を組み合わせた新たなカーボン/Siナノ複合材料を新規プラズマプロセスで創製する。

(2) Siナノ粒子接合カーボン複合膜材料の創製(図1(b)参照) 高容量が期待できるSiナノ粒子間を、プラズマで生成した分子サイズの活性ラジカルで強力に接合し、さらにカーボン系バッファ材をその周辺に配置した新規構造の複合材料を創製する。

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

3. 研究の成果

(1) 粉体グラフェン/Siナノ粒子複合膜を負極とするLiイオン電池の実証

粉体カーボン材料グラフェンで負極を作製し、Liイオン電池の特性を評価した。グラフ中に示すSEM像から1辺が4.2 μm 程度のグラフェンであり、また、ラマン分光計測から2,700 cm^{-1} 近辺に大きな2Dバンドのピークが観測され、数層のグラフェン層である。この活物質グラフェンに、導電材カーボンブラックとバインダーを80 : 5 : 20の重量割合で混合し、負極膜を作製した。図2にグラフェンを負極としたLiイオン

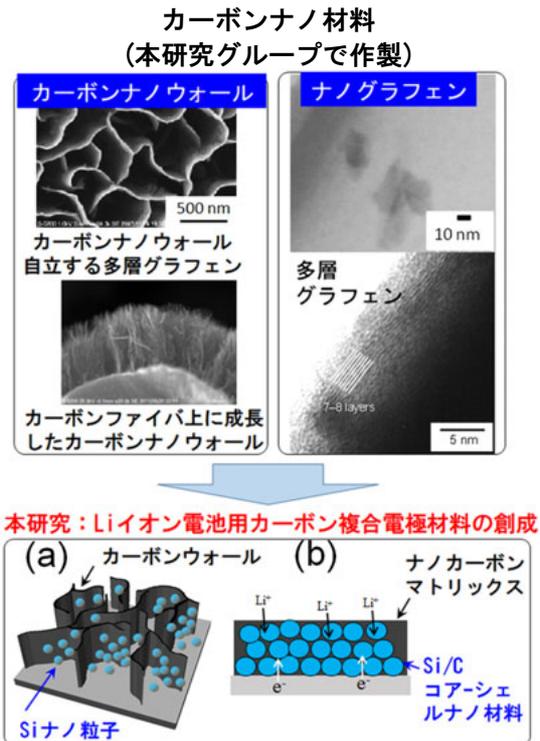


図1：様々なカーボンナノ材料をSi材料と複合化し、Liイオン電池の高出力化と長寿命化を実現する。

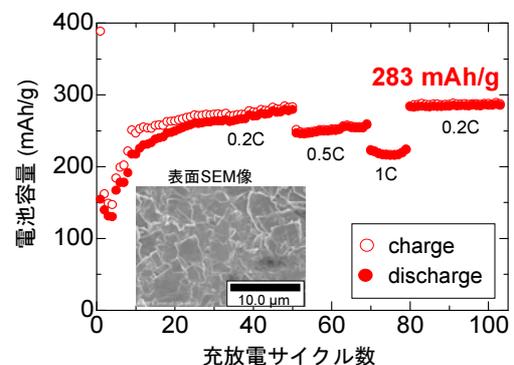


図2：グラフェン膜を負極とするLiイオン電池の充放電サイクル特性。

電池の充放電サイクル特性を示す。カーボンの理論容量 372 mAh/g は下回るものの安定した充放電特性を示し、100 サイクル後の容量は 283 mAh/g となった。また比較的高速の 1 時間充電のため充電電流設定(1C)においても、219 mAh/g の容量を示した。

グラフェンペーストに粒径 90 nm の結晶 Si ナノ粒子を混合してペースト化し、その後、塗布と焼成プロセスによりグラフェン/Si ナノ粒子複合膜を作製した。図 3 にその複合膜の断面 SEM 像を示す。グラフェンの周辺にナノ Si ナノ粒子が満遍なく担持されている様子が観測され、さらに空隙を多くもつポーラス構造となっている様子が観察できた。この空隙構造は Si の堆積膨張を吸収するバッファー空間としての機能が期待できる。グラフェンが空隙構造形成に有効な材料であることが明らかになった。図 4 にグラフェン/Si ナノ粒子複合材料を負極とした Li イオン電池の充放電サイクル特性を示す。4 サイクル目で 1,000 mAh/g 以上の高い容量を観測した。その後、容量は緩やかに低下し、20 サイクル後で 892 mAh/g、70 サイクル後で 658 mAh/g となった。高容量ナノ Si 材料を混合することにより、グラフェンのみの容量 283 mAh/g の 2.3 倍の高容量 688 mAh/g を実現した。

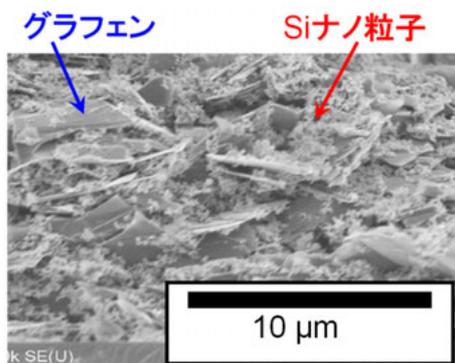


図 3：グラフェン/Si ナノ粒子複合膜の断面 SEM 像。

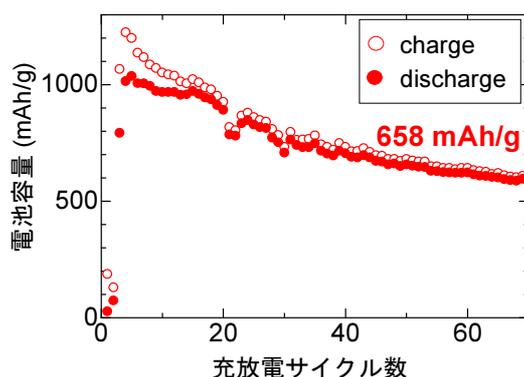


図 4：グラフェン/Si ナノ粒子複合膜を負極とした Li イオン電池容量の充放電サイクル特性。

(2) カーボンナノウォール膜の創製と Li イオン電池の実証

独自の低温プラズマプロセスを用いて、カーボンナノウォール膜を堆積し、Li イオン電池の負極へと応用展開した。Ar ガスに反応性 CH₄ ガスを添加した放電プラズマ CVD プロセスにより、カーボンナノウォールを 6 μm 程度堆積させた。図 5 に膜表面の SEM 像を示す。基板に垂直方向に数層のグラフェン層が成長している様子が観測された。図 6 にこのカーボンナノウォール膜を負極とした Li イオン電池の充放電サイクル特性を示す。200 サイクル以上安定に継続して 200 mAh/g 以上の容量が得られ、最終的に 238 サイクル後の容量は 221 mAh/g となった。また 1 時間充電のための充電電流設定(1C)においては 111 mAh/g の容量となり、グラフェン負極電池の約半分程度の値となった。

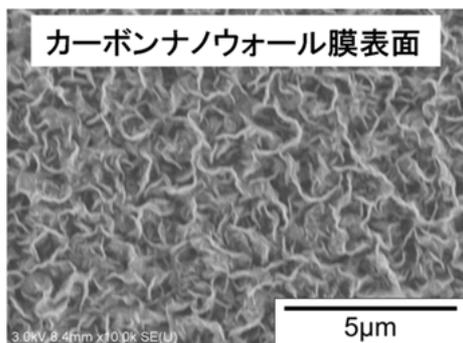


図 5：独自のプラズマ CVD プロセスで作製したカーボンナノウォールの表面 SEM 像。

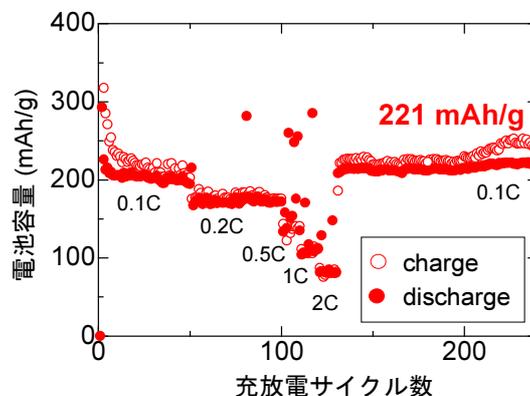


図 6：カーボンナノウォールを負極とした Li イオン電池容量の充放電サイクル特性。

(3) Si ナノ粒子接合膜の創製と Li イオン電池の実証

1 Torrの比較的高いガス圧力下でのプラズマスパッタリング法を新たに開発し、Siナノ構造膜の堆積を実現した。図7にSiナノ構造膜表面のAFM像を示す。放電ガス種をArからHeに変えることにより、ナノ構造に大きな変化が見られた。Ar放電ガスの場合、粒径20 nm程度のナノ粒子が凝集した凝集体膜となった。一方、He放電ガスでは粒径60 nmのナノ粒子が凝集することなく空間に均一に分散したナノ粒子の均一分散膜となった。プラズマプロセス条件を適切に選択することにより、バインダー無しでナノ粒子均一分散膜をシングルステップで作製することに成功した。このSiナノ構造膜を負極とするLiイオン電池を作製し評価したところ、特に均一分散膜で高い容量を得た。図8にSiナノ粒子均一分散膜電池の充放電サイクル特性を示す。5サイクル目で最高容量2,815 mAh/gを観測した。最終的に34回の充放電サイクル数であるが、従来のグラファイト負極電池の約5倍の1,621 mAh/gを観測した。

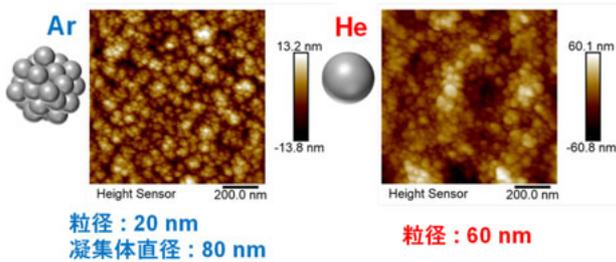


図7：独自のプラズマスパッタリングプロセスで作製した Si ナノ構造膜の表面 AFM 像。

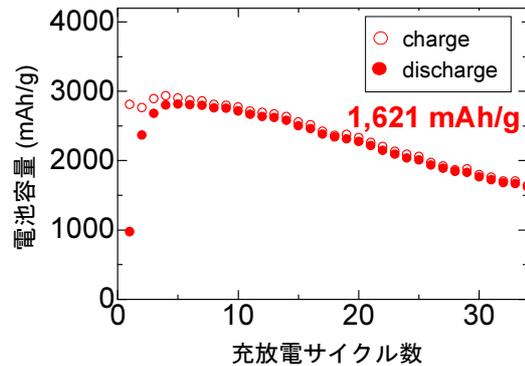


図8：He スパッタリングで作製した Si ナノ粒子均一分散膜を負極とする Li イオン電池の充放電特性。

(4) カーボンナノウォール/Si ナノ構造複合膜を負極とする Li イオン電池の実証

図9の断面SEM像に示すように、独自のプラズマCVDプロセスでカーボンナノウォールを8 μm程度形成後、その上に独自のHeプラズマスパッタリングプロセスで高容量Siナノ構造膜を2 μm程度堆積した。図9にそのカーボンナノウォール/Siナノ構造複合膜を負極とするLiイオン電池の電圧-容量特性を示す。初期の放電サイクルで531 mAh/gの容量を観測し、カーボンナノウォール単層膜電池の初期容量292 mAh/gと比べ1.8倍の容量を示した。今後、充放電サイクル特性の詳細を評価予定である。

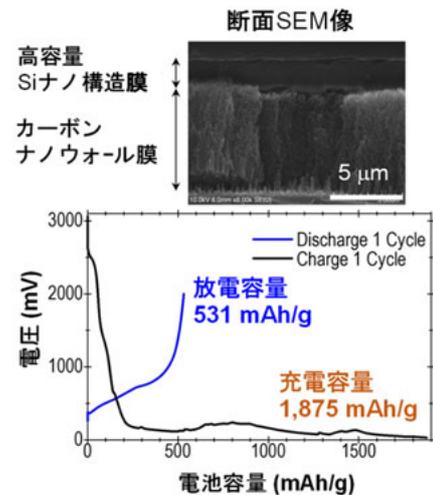


図9：カーボンナノウォール/Si ナノ構造複合膜を負極としたLiイオン電池の電圧-容量特性。

4. 研究の反省・考察

カーボン材料に関して、粉体グラフェンと独自のプラズマ CVD プロセスで作製したカーボンナノウォールを負極とする Li イオン電池を評価した。その結果、両電池において容量 200 mAh/g 以上を維持した安定な充放電サイクル特性を観測し、Li イオン電池の電極材料として優れた特性を示すことを実証した。また、高容量 Si 材料に関して、独自のプラズマスパッタリングプロセスにより作製した Si ナノ構造負極の Li イオン電池を試作し、1,500 mAh/g 以上の高い電池容量を実証した。さらにカーボンナノ材料と高容量 Si ナノ材料を複合化した新たな電極材料を作製し、Li イオン電池の評価を行った。その結果、Si 材料の利点である高容量をある程度維持したまま、安定に電池駆動できる可能性を示唆する結果が得られた。今後は、カーボンナノウォール膜と Si ナノ構造膜の積層構造に加え、カーボンナノウォールの空隙に緻密に Si ナノ構造膜を配置する構造を新規プラズマプロセスで実現し、高容量かつ高安定な Li イオン電池を実証する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① K. Morita, B. Tsuchiya, H. Tsuchida, T. Majima, "In-situ Total Li Depth Profiling of Solid State Li Ion Batteries Under Charging and Discharging by Means of Transmission Elastic Recoil Detection Analysis with 5 MeV He²⁺ Ions", Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res., B 479, 249-253 (2020)。【査読有り】
- ② R. Sakai, T. Ichikawa, H. Kondo, K. Ishikawa, N. Shimizu, T. Ohta, M. Hiramatsu, M. Hori, "Effects of Carbon Nanowalls (CNWs) Substrates on Soft Ionization of Low-Molecular-Weight Organic Compounds in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS)", Nanomaterials, Vol. 11, No. 2, pp. 262 (2021)。【査読有り】

(2) 口頭発表

- ① 羽生侑真、永富刀夢、林純希、永井健太、内田儀一郎「スパッタSi系薄膜を負極材としたLiイオン電池の特性評価」第81回応用物理学会秋期学術講演会、2020年9月8-11日。
- ② 林純希、永井健太、羽生侑真、内田儀一郎「ArスパッタGe薄膜のナノ構造制御とLiイオン電池への応用」第81回応用物理学会秋期学術講演会、2020年9月8日-11日。
- ③ 永井健太、羽生侑真、林純希、内田儀一郎「Heプラズマスパッタリング法によるGe系薄膜堆積とLiイオン電池への応用」第81回応用物理学会秋期学術講演会、2020年9月8-11日。
- ④ 永井健太、高田瑛叶、林純希、羽生侑真、内田儀一郎「プラズマスパッタリング法を用いたGeSnナノ構造膜の堆積とLiイオン電池への応用」第68回応用物理学会春季学術講演会、2021年3月16-19日。
- ⑤ G. Uchida, "Morphological control of nanostructured Ge films in plasma sputtering process for Li ion batteries", 3rd Global Plasma Forum, 2020年11月10日。【招待講演】
- ⑥ G. Uchida, "Application of plasma sputtering nanoparticle films to negative electrode of Li ion battery", 4th Asia Pacific Conference on Plasma Physics, 2020年10月26-31日。【招待講演】
- ⑦ G. Uchida, J. Hayashi, K. Nagai, Y. Habu "Nannostructure control of Ge films in high gas-pressure plasma sputtering process", 13th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, 2021年3月7-11日。
- ⑧ 松島丈、村上祐一、小田昭紀、上坂裕之、太田貴之「DLC成膜用HiPIMSプラズマにおけるターゲット電圧パルスの影響」表面技術協会 第142回講演大会、2020年9月10-11日。
- ⑨ 太田貴之、小田昭紀、上坂裕之「大電力パルススパッタを用いた硬質アモルファスカーボン成膜」第38回プラズマプロセッシング研究会/第33回プラズマ材料科学シンポジウム(SPP-38/SPSM33)、2021年1月27-29日。【招待講演】
- ⑩ J. Matsushima, A. Oda, H. Kousaka, T. Ohta, "Plasma diagnostics on high power impulse magnetron sputtering for deposition of diamond-like carbon thin films", 13th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, 2021年3月7-11日。
- ⑪ 太田貴之、松島丈、小田昭紀、上坂裕之「DLC成膜用カーボンHiPIMSのプラズマ診断(2)～パルス幅の効果」第68回応用物理学会春季学術講演会、2021年3月16-19日。
- ⑫ 土屋文、宇佐見太毅、加藤僚、鈴木耕拓、佐々木知子「飛行時間型反跳粒子検出法を用いたリチウム電池内のリチウムイオン移動その場観察」第68回応用物理学会春季大会、2021年3月17日。【招待講演】
- ⑬ 加藤僚、宇佐見太毅、土屋文、鈴木耕拓、佐々木知子「常温水分解により吸収されたLiCoO₂中の水素同位体その場分析」日本金属学会春期(第168回)講演大会、2021年3月16-19日。
- ⑭ R. Kato, T. Usami, B. Tsuchiya, T. Sasaki, K. Suzuki "In-Situ Hydrogen Analysis in Lithium-Cobalt Oxides by Water Uptake at Room Temperature Using Air-Elastic Recoil Detection"イオンビームによる表面・界面の解析と改質 特別研究会, 2020年11月4-5日。
- ⑮ T. Usami, R. Kato, B. Tsuchiya, T. Sasaki, "In-Situ Direct Measurement of Lithium Transfer at Interface between LiCoO₂ Positive Electrode and LATP Solid Electrolyte by Ion-Beam Analysis"イオンビームによる表面・界面の解析と改質 特別研究会, 2020年11月4-5日。
- ⑯ 加藤僚、宇佐見太毅、土屋文、鈴木耕拓、佐々木知子「リチウムコバルト酸化物の水素吸収特性」日本金属学会秋期(第167回)講演大会、2020年9月15-18日。
- ⑰ 宇佐見太毅、加藤僚、土屋文、佐々木知子「反跳粒子検出法を用いたLiCoO₂正極/LATP固体電解質界面におけるLi+イオン移動量その場測」日本金属学会秋季(第167回)講演大会、2020年9月15-18日。

- ⑮ 久住一誠、竹田圭吾、平松美根男「プラズマ合成されたナノグラフェン材料への生体分子修飾」、第68回応用物理学会春季学術講演会、2021年3月9-16日。
 - ⑯ 酒井勇佑、竹田圭吾、平松美根男「大気圧リモートプラズマCVDを用いたグラフェンの成長過程」、第68回応用物理学会春季学術講演会、2021年3月9-16日。
 - ⑰ 竹内皓紀、竹田圭吾、平松美根男「カーボンナノウォールの電気二重層キャパシタ電極への応用」、第68回応用物理学会春季学術講演会、2021年3月9-16日。
 - ⑱ K. Takeda, M. Ishikawa, M. Hiramatsu, H. Kondo, M. Hori, "Structure control of self-supporting graphene nanowalls synthesized by plasma enhanced chemical vapor deposition", 73th Annual Gaseous Electronics Virtual Conference, Virtual Conference, 2020年10月7日。
 - ㉒ Y. Sakai, K. Takeda, M. Hiramatsu, "Graphene growth in microwave-excited atmospheric pressure remote plasma enhanced chemical vapor deposition" 13th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, 2021年3月7-11日。
 - ㉓ K. Takeda, T. Sato, M. Hiramatsu, "Control of Wall Interspaces of CVD-Grown Carbon Nanowalls by Solution Posttreatment", 13th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials, 2021年3月7-11日。
- (3) 出版物
なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	京 都 外 国 語 大 学	研究所名等	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所
研 究 課 題	中米の古代パンアメリカンハイウェイがつなぐ 南北交流の研究 —交流の道・足・物を考古学から読み解き 地域社会へ還元する—		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①中米太平洋側地域 ②古代パンアメリカンハイウェイ ③新大陸南北古代文明の交流 ④土器編年 ⑤金とヒスイ ⑥岩刻画 ⑦考古学と博物館 ⑧フィールドミュージアム		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 博 史	国際貢献学部 京都外国語大学ラテンアメリカ 研究所	教授 研究員	研究代表者、研究統括、考古学調査・分析、フィールド ミュージアム構想の提案・実施

○研究分担者

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

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

1. 研究の目的

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

①「道→何のために＝目的」：エルサルバドルタマニケ地方サンイシドロ地区、およびチャルチュアパ地方カサブランカ遺跡、コスタリカのオサ半島カンタレロ遺跡において、現地研究機関の考古学調査に協働し、当該遺跡の各地域における歴史的文化的位置づけを明らかにし、土器の移動を中心に研究を試みる。エルサルバドルは古代メソアメリカ地域に直接つながる地域として土器の編年研究も重要となる。また、岩刻画の位置と分布情報を収集する。

②「足→どのように＝方法」：ヒスイと金製品は両文明の威信財として運ばれており、コスタリカ国立博物館、ヒスイ博物館と協働してその再現に取り組む。とくにカンタレロ遺跡およびその周辺は砂金の産出地であり、考古学調査によって関連資料の収集が可能となる。

③「物→何を＝運ばれるもの」：土器、土偶、金、ヒスイ、石彫を対象とする。とくに小原コレクションのコスタリカおよびエクアドルの土器と土偶を用いて、他地域との比較研究を行う。当該地域は古代アンデス文明に繋がる地域として重要である。

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

①コスタリカ・オサ半島におけるフィールドミュージアム活動

②エルサルバドル・太平洋側におけるフィールドミュージアム活動

2. 研究の計画

(1) 国内調査（国際文化資料館）

①小原コレクション遺物調査：研究代表者、研究分担者（嘉幡茂）

活動：コスタリカ、エクアドルの考古資料の確認、遺物カード、データベースの作成

②整理作業：夏期調査の整理および2020年次報告準備国内調査

活動：学会発表 研究代表者、研究分担者（嘉幡）、研究協力者

(2) 海外調査Ⅰ期【2020年8-9月】

①エルサルバドル：2週間程度／代表者、研究分担者（ミリアム・メンデス）、研究協力者
調査地：タマニケ地方サンイシドロ地区

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

②エルサルバドル：1週間程度／研究分担者（柴田潮音、村野正景、市川彰）

調査地：チャルチュアパ地区カサブランカ遺跡公園

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

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

調査地：オサ半島カンタレロ遺跡

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

(3) 海外調査Ⅱ期【2021年2-3月】

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

調査地：チャルチュアパ地区カサブランカ遺跡公園

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

②ニカラグア：1週間程度／代表者、研究分担者（嘉幡）、研究協力者

調査地：ニカラグア国立博物館

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

③ コスタリカ：2週間程度／代表者、研究分担者（コラレス）、研究協力者

調査地：オサ半島カンタレロ遺跡

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

3. 研究の成果

(1) 「物→何を＝運ばれるもの」：土器、土偶、金、ヒスイ、石彫を対象とする。とくに小原コレクションのコスタリカおよびエクアドルの土器と土偶を用いて、他地域との比較研究を行う。

① 小原コレクション「コスタリカおよびエクアドルの土器と土偶」の研究

新型コロナウイルス感染拡大によって、小原コレクションを収蔵している国際文化資料館での活動が制限されたが、年度末までにコスタリカ、エクアドルの土器と土偶109点を抽出できた。

② 資料の記録化作業

コスタリカ、エクアドルの考古資料の確認作業と並行し、順次資料の記録作業を開始した。

(2) 「足→どのように＝方法」および「道→何のため＝目的」の研究

① 新型コロナウイルス感染拡大のため、予定していた海外調査は実施できなかった。海外研究協力者も自国の行動制限により、調査を実施できなかった。

② 同じく、ニカラグア国立博物館で予定していた収蔵品の登録作業にかかる遺物研究も進めることができなかった。

③ この中、2020年3月に実施したニカラグアのカリブ海側における岩刻画分布調査による資料の整理・分析を実施した。その成果および先住民集落における博物館活動の可能性についてまとめた。

④ 一方、カリブ海側ウルワにおいて歴史地理学からフィールドワークを実施している横浜国立大学池口明子氏より、南北両自治区の境界を流れるリオグランデ・マタガルパ川の中・下流域に分布する岩刻画の情報の提供を受けた。

(3) フィールドミュージアム研究

① ニカラグアのカリブ海側およびエルサルバドル太平洋側、コスタリカのオサ半島での考古学と博物館を仲介者とした実践的地域研究については、海外調査が実施できず、現地コミュニティとの活動は停止している状況である。

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

4. 研究の反省・考察

(1) 小原コレクションのコスタリカ、エクアドル考古資料の研究

① 今回の調査によって、小原コレクション約2000点中109点の土偶・土器を確認することができた。全点の写真撮影および採寸は終了した。京都外国語大学国際文化資料館収蔵資料であるが、やはり新型コロナウイルス感染拡大により作業が制限されたため、予定していたデータベース作成は未了である。2021年度に継続する。

② 一方、コスタリカなど関連諸国の博物館などに収蔵されている当該資料との比較研究は実施できなかった。

(2) ニカラグア岩刻画の研究

① 今年度現地調査は実施できなかったが、2021年3月に実施した現地調査で得たカリブ海北自治区シウナ周辺の岩刻画の文様と立地からの分析を実施した。その結果、その在り方に2つのパターンがあることがわかった。

② これをもとにした南自治区のソンプレロネグロ遺跡での調査は実施できなかった。

③ 岩刻画の情報の提供を受けたリオグランデ・マタガルパ川は、継続して調査を実施しているマタガルパ県マティグアス郡ラスベガス遺跡の所在するキラグア山西麓に水源の一つ

をもつ。ラスベガス遺跡出土遺物の研究から、カリブ海側との交流の可能性について指摘してきた。提供を受けた岩刻画には位置データが記録されており、2021年はこの岩刻画の分析を進めることで、カリブ海側と内陸部の交流の解明を目指す。

(3) フィールドミュージアム研究

① ニカラグアカリブ海自治区大学、エルサルバドル文化省文化自然遺産局、コスタリカ国立博物館それぞれの研究協力者を通して、現地の様子などを確認しているが、現地もまた行動が制限されているため十分なやりとりはできていない。Withコロナを考えると、今後は現地の生活環境、経済状態などを考慮したオンラインでの調査、交流方法を整えていく必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① 深谷岬、南博史、嘉幡茂、川嶋まどか「ニカラグアのカリブ海側における岩刻画の考古学調査およびコミュニティ・ミュージアム活動に向けた研究」『京都外国語大学ラテンアメリカ研究所紀要』20号、191-212頁、京都外国語大学ラテンアメリカ研究所、2020年12月

(2) 口頭発表

① 南博史・深谷岬『ニカラグアカリブ海地域における岩刻画調査』古代アメリカ学会第25回研究大会(オンライン)、2020年12月5日

(3) 出版物

① 大越翼編「先スペイン期アメリカ地中海の交流に関する考古学的研究」『京都外国語大学ラテンアメリカ研究所の現在』デジタル版、5-19頁、京都外国語大学ラテンアメリカ研究所、2021年3月

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

1. 研究の目的

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

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

2. 研究の計画

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

- ① **Erg 遺伝子のみ正常数に戻した Ts1Cje マウスの記憶学習能力の検討:** トリソミー遺伝子 *Erg* のみを正常に戻した Ts1Cje マウスで胎生期脳発達遅滞が改善されたことから、本マウスの記憶学習障害や成体神経新生など Ts1Cje マウスの生後に見られる異常について検証し、胎生期脳発達遅滞と生後の記憶学習障害の連関について明らかにする。
- ② **ミクログリア補充療法検討:** Ts1Cje マウス胎仔脳でのミクログリア数減少を移植により補完し表現型の改善を試みる。ミクログリアは野生型マウス ES 細胞を分化誘導し準備する。

(2) 生後の治療を目指した研究

- ① **複数の DS モデルマウスを用いた銅蓄積責任遺伝子の絞り込み:** Ts1Cje よりも短いトリソミー領域をもつ Ts1Rhr マウスや新規に作製する DS モデルマウスの脳内での銅濃度を定量し、銅蓄積の原因となっているトリソミー領域を絞り込む。
- ② **Ts1Cje マウスへのキレート剤投与による脳内銅蓄積抑制効果とその意義に関する検討:** Ts1Cje マウスに銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム塩を投与し、網羅的遺伝子発現変動解析を行うことで、銅蓄積を分子レベルで理解する。また、恐怖条件付け行動試験を行う。

3. 研究の成果

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

① *Erg*遺伝子のみ正常数に戻したTs1Cjeマウスの記憶学習能力の検討

トリソミー領域遺伝子の*Erg*のみを正常コピー数に戻すと、Ts1Cjeマウスの胎仔大脳皮質での神経新生減少が改善されたことから (Ishihara et al., 2020 *Brain Pathol.*)、この*Erg*遺伝子の正常化Ts1Cjeマウス (Ts1Cje-*Erg*^{+/+/mld2}マウス) における生後の記憶学習障害についてモリス水迷路試験を行った。しかしながら、図1Aに示すように、Ts1Cjeマウスの記憶学習障害は改善されなかった。また、記憶学習に重要とされる成体神経新生がTs1Cjeマウス海馬歯状回において減少していることも見いだしており (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*)、今回の行動試験に加え、Ts1Cje-*Erg*^{+/+/mld2}マウスの海馬歯状回での神経新生の改善についてもBrdU標識による増殖細胞の検出により検討したが、*Erg*遺伝子のコピー数が正常となったTs1Cjeマウスでも依然成体神経新生の減少が検出された (図1B、1C)。

② Ts1Cjeマウスへのミクログリア前駆細胞移植実験 (ミクログリア補充療法検討)

Ts1Cjeマウスの胎生期脳ではミクログリアを含む脳免疫細胞数の減少がみられたことから (Ishihara et al., 2020 *Brain Pathol.*)、胎内治療を想定してミクログリア前駆細胞を胎仔脳室に移植し、Ts1Cjeマウスの神経新生減少を伴う脳発達遅滞が改善されるか検討する。新型コロナの流行による休校措置により、ES細胞を維持することができず、ミクログリア前駆細胞の供給が一時途絶えたが、現在では復旧している。また、移植のステージを決定するためにE10~E14までで細胞移植を試みたところ、E14より前のステージでは、胎児の大きさから脳室内投与が不可能であることがわかった。そこで、今後はE14で移植を行い、E16での神経新生について検証することとした。

(2) 生後の治療を目指した研究

① 複数のDSモデルマウスを用いた銅蓄積責任遺伝子の絞り込み

これまでに銅蓄積を明らかとしたTs1Cjeマウスのトリソミー領域よりも短い領域を3コピーもつTs1Rhrマウスでの脳内銅蓄積を検討したところ、本モデルマウスでも脳での銅蓄積が検出されたことから、Ts1Rhrマウスのトリソミー領域に銅蓄積の責任遺伝子が存在することがわかった。また、同時に新規DSモデルマウスもトランス位にCreを導入する領域選定型DSモデル作製法によって作製しており、第1世代の新規DSモデルマウス作製まで完了した。加えて、Ts1Rhrトリソミー領域の一部を欠失した新規マウスの作製をゲノム編集により試み、一部を欠失したマウスを樹立することができた。

② Ts1Cjeマウスへのキレート剤投与による脳内銅蓄積抑制効果とその意義に関する検討

銅蓄積遺伝病であるウィルソン病治療薬のDSへの適応を目指して、Ts1Cjeマウスに銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム塩を2週間投与し

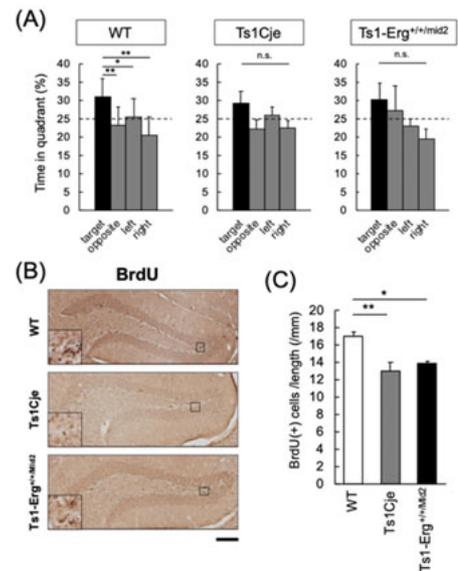


図1 *Erg* 遺伝子のみ正常数に戻した Ts1Cje マウスの記憶学習能力。(A) モリス水迷路試験における記憶学習能力の検討。WT, n = 10; Ts1Cje, n = 9; Ts1Cje-*Erg*^{+/+/mld2}, n = 4。(B) BrdU in vivo 標識による幹細胞の検出。(C) BrdU 陽性細胞数の定量結果。

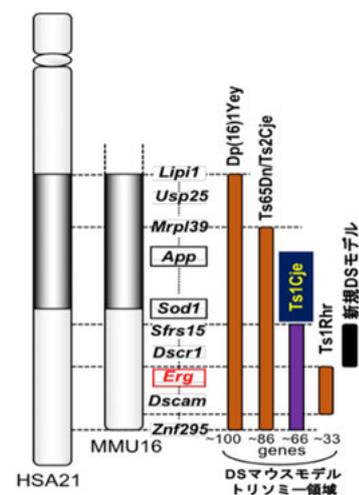


図2 ダウン症モデルマウスのトリソミー領域。申請者は主に Ts1Cje マウスを用いてDS病態を解析しているが、最近 Dp16 および Ts1Rhr を導入し、病態に重要なトリソミー領域の絞り込みを行う。HSA21: ヒト21番染色体、MMU16: マウス16番染色体。App: アミロイド前駆タンパク質、sod1: スーパーオキシドジスムターゼ1。

た。本法は、脳での銅濃度低下が確認された既報の方法に従ったが、小脳での銅蓄積改善は認められなかった。キレート剤の投与はもう少し工夫が必要であると考えられた。そこで、既に銅蓄積改善が認められている低銅含有食を2ヶ月間与えることとした。本法での銅蓄積低下を確認後、海馬で発現する遺伝子をRNA-seq解析により網羅的に検出することで、Ts1Cjeマウス海馬にて発現変動する転写産物の銅蓄積改善後の発現変動について調べたところ、およそ1/3の遺伝子群の発現変動が低銅含有食投与により改善していることを明らかにした。

4. 研究の反省・考察

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

DSの胎生期での治療の実現化を目指し、胎内治療の意義を示すために、我々は今年度、Ts1Cje-Erg^{+/+/m1d2}マウスの成体期での記憶学習障害について検証した。Ts1Cje-Erg^{+/+/m1d2}マウス胎仔の脳発達は野生型マウスと同レベルまで改善されていたことから、胎生期脳の発達遅滞が知的障害の基盤となっている仮説から、本マウスでの記憶学習障害の改善が期待されたが、予想に反した結果であった。今後は、胎生期の神経新生の減少を伴う脳発達遅滞が、生後のどのような異常に関与しているか調べる必要がある。また、我々は、脳マクロファージの減少を見出し、これを補充することで胎内治療を行う計画であるが、COVID-19感染症流行によって、当初の予定より遅れが生じた。ようやく最近、iPS細胞から脳内マクロファージ前駆細胞への分化の供給量が、感染症流行前に戻ったことから、来年度は移植実験を行い、脳内マクロファージの供給による神経新生の回復について明らかにする予定である。また、実際に脳内マクロファージのうち、ミクログリア数の減少であるのか、髄膜関連マクロファージや血管関連マクロファージ数の減少であるのかについて、新たなマーカーを用いたフローサイトメトリー解析を行う必要があると考えられる。

(2) 生後の治療を目指した研究

今回の研究によって、生後脳の銅蓄積の責任遺伝子をTs1Cjeトリソミー領域の70遺伝子からTs1Rhrトリソミー遺伝子の30遺伝子に絞り込むことができた。今回、さらにここから絞り込みを行うための新規染色体操作済マウスの作製が完了したことから、次年度はさらに絞り込める予定である。また、新規作製したマウスは全て、遺伝子のコピー数を網羅的にマイクロアレイにて解析し、確認していく予定である。

銅キレート剤投与は、すでにその効果がマウスで確認されている方法に従ったが、Ts1Cjeマウスでの銅蓄積は改善されなかった。野生型マウスでも全く脳内の銅濃度の減少は認められなかったことから、今後は、投与量の検討を行いたいと考えている。また、Ts1Cjeマウスでの銅蓄積改善を低銅含有食2ヶ月間投与で達成した海馬での発現遺伝子の網羅的な解析により、Ts1Cjeマウスで認められる多くの発現変動遺伝子が銅蓄積改善にて発現量の改善が認められたことは、DSでの銅蓄積の意義の分子基盤を理解する上で非常に重要な知見であると考えられる。今後は、これらの遺伝子発現量の変化の一部を定量RT-PCRで確認する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Keiichi Ishihara, Ken-ichi Mizutani: Brain development coordinated by interactions between neurons, glial cells and central vascular system, and disease caused by its disturbance. *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021 **141**, 333-334.
- ② Keiichi Ishihara: Is neuron-vascular communication disturbed in the delayed prenatal brain development of a mouse model of Down syndrome? *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021 **141**, 369-373.

(2) 口頭発表

- ① 石原慶一: ダウン症モデルマウスと病態研究について
第2回日本ダウン症学会学術集会(招待講演)2020年11月1日 [オンライン開催]

- ② 石原慶一：メタロミクス解析により明らかとなったダウン症モデルマウス脳での銅蓄積とその意義
フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー シンポジウム 2020年9月5日 [オンライン開催]
- ③ 石原慶一、河下映里、山川和弘、左合治彦、秋葉 聡：ダウン症モデルマウスの脳および肝臓を用いたメタロミクス解析
生命金属に関する合同年会、2020年11月6日 [オンライン開催]

(3) 出版物

なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

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

○研究代表者

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

○研究分担者

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

宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究

1. 研究の目的

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

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

2. 研究の計画

(1) ①②③の動物実験による基礎研究での検証と④での歩行解析などによるヒトの活動状況の研究により新規の運動療法や装置の開発を目指す。

①生理学：成熟期オスWistar Hannoverラットにおける16日間の後肢懸垂中、毎日MnSODを腹腔内投与する群としない群、およびケージ内飼育群におけるヒラメ筋や脳の特徴を比較して、抗重力筋の機械的張力発揮抑制に伴う筋線維萎縮や速筋化等における活性酸素産生およびその除去効果を追求する。

②生化学：2020年度はADSCの分化に及ぼす重力の影響に焦点を定めるため、微小重力環境下におけるADSCの分化調節機構の解明と、分化した脂肪細胞から分泌される新規候補アディポカイン（ノンコーディングRNAを含む）の探索を行う。さらに、身体活動・微小重力環境下で得た結果と対比させながら、身体不活動（①で作製した後肢懸垂ラット）がADSCの分化に及ぼす影響を明確にする。

③神経科学：ラットに自発的運動を一定時間行わせ、運動中と運動前後の身体方向や動作速度を精密に計測する。その際の抗重力筋の変化をリアルタイムで測定すると同時に運動野と大脳基底核の神経細胞の活動も測定し、それらの結果から、実験システムを最終的に確立する。

④生体医工学：歩行運動解析を表面筋電位も含めて実施し、下肢運動データと足底圧中心点におけるピーク値と発生時間、荷重の積分値、各関節の消費エネルギーを求め、歩行評価指標についてさらにデータを蓄積する。進行方向1軸重力免荷能動制御システムを開発する。また、反重力トレッドミルを用い、同志社大学で実施可能な宇宙環境模擬実験結果と「ARGOS」による実験結果を比較することで、両者の相違点を明らかにする。

①②③では、模擬低重力環境下でラットの細胞と脳に及ぼす影響を明らかにし、運動時の脳活動を計測可能なシステムを開発する。このシステムをヒトの運動時のデータ計測に応用することで、④の反重力トレッドミルと「ARGOS」実験の相違点をより明確に分析することが可能となる。

3. 研究の成果

(1) ①生理学、②生化学、③神経科学、④生体医工学の4つの研究テーマ毎に、個々の成果を導出した。

①生理学：オランダ・ノールトウェイク市に設置されたヨーロッパ宇宙技術研究センター（ESTEC）における動物用遠心機を用いたマウスの30日間にわたる3-G負荷実験は、COVID-19感染拡大の影響により延期となった。オスWistar Hannoverラットにおける老化および身体活動減少に伴う活性酸素産生増大による生体諸機能への悪影響の抑制が、骨格筋等の特性に及ぼす影響を追求する実験を実施し、骨格筋の分析に着手している。ラット後肢の遅筋（ヒラメ筋）と速筋（足底筋）のアキレス腱を交互に接続した場合の筋の反応を追求した実験の分析も実施した。

②生化学：微小重力（simulated microgravity、SMG）環境下におけるADSC分化実験は概ね順調に進み、次のような新規知見を得た。9週間の運動トレーニングを実施したラットの皮下脂肪組織由来ADSCはSMG環境に暴露すると1G環境下に比べ脂肪分化が促進し、RNA-seqに対応したGOエンリッチメント解析ならびにKEEGパスウェイ解析の結果、運動トレーニングは細胞骨格や細胞接着パスウェイに関連する遺伝子の発現を強く修飾することが明らかになった。とりわけ、インテグリンやその下流の分子群の発現が運動トレーニングによって有意に増加し、これらの分子群が運動の「標的分子」に含まれている可能性が浮き彫りにされた。しかしながら、内臓脂肪組織由来ADSCと皮下脂肪組織由来ADSCの分化能の違いを明らかにするには至らなかった。

脂肪組織-骨格筋のメタボリックネットワークを仲介する新規アディポカイン探索については、皮下脂肪組織由来ADSCから放出されるエクソソームのmiRNAマイクロアレイ解析を行い、miRN-325-5pが運動トレーニングによって有意に増加することを発見した。このエクソソーム内miRN-325-5pを抽出し、マウス由来筋芽細胞株C2C12と共培養したところ、インスリン刺激によるインスリンシグナルの有意な増強が起こることを明らかにした。ADSCの分化能に及ぼす老化・運動・薬理的介入の影響を検討予定であった、老齡ラットのメラトニン投与または自発運動の介入実験には至らなかった。しかし、前年度から引き続き実施された研究、「運動トレーニングや肥満がADSCの多分化能や細胞内代謝プロファイルに及ぼす影響」、「小脳における炎症性サイトカイン発現変化などの解明」、「Hox遺伝子と褐色脂肪細胞の脱共役タンパク質発現」、「運動トレーニングによる脂肪分解反応増強機構と時計遺伝子発現リズムとの関係」などの成果は誌上発表に結びついた。

- ③神経科学：ラットの運動・筋活動・神経細胞活動を精細に同時計測するシステムを開発した。小型の3D深度カメラを改良し、加速度センサー、ジャイロセンサー、ヘッドアンプを一体化した超小型の集積回路を作製した。そのシステムを活用し、ラットの微細な運動と運動野・大脳基底核の神経細胞活動の対応について解析を進め、特に抗重力筋の活動抑制や活動促進が脳活動に及ぼす影響についても解析を開始した。運動-筋活動-神経細胞活動の関係を明らかにしながら、脳機能を活性化するためのトレーニング法やリハビリテーション法についても検討を開始した。これらの実験システムの開発には生体医工学グループから助言があり、実験も連携しながら進めている。
- ④生体医工学：重力免荷能動制御システムの第1次試作を完了し、重力制御アルゴリズムとして「速度ベース型出力フィードバック制御」を開発して搭載した。60kgのダミーウェイトを搭載してシステムの動特性を計測し、振幅依存性が生じるものの歩行制御が可能であることを確認した。安全性を向上するためフェールセーフ機構の改造を実施するとともに、ヒトの懸架をサポートするためのジンバル装置に第1次試作を実施しており、年度末に納入される。本装置を用いれば、空間的な制約を受けることなく負荷状態や関節角度、表面筋電位に基づく下腿骨格筋群の筋活動量を計測し、反重力トレッドミルの解析結果との比較が可能となる。
開発したシングルベルト式の負荷制御型トレッドミルに一定負荷を与えることで、下肢三頭筋の筋活性度が向上できることを確認し国際学会で成果を公表した。リハビリテーションに適した負荷制御アルゴリズムを開発するため、歩行周期に対して様々な負荷パターンで実験を行い、疲労負荷が少なく筋活動度が向上できる負荷パターンが有ることを確認した。今後、被験者の数を増やすことで、最適な負荷パターンを探索する。
臥床状態で歩行状態を模擬し、アクチュエータをモータとし、ベルト駆動を導入することで足関節をアクティブに動作可能なリハビリテーション装具の仕様検討を完了した。
③のマウス用運動負荷装置を用いて得られた抗重力筋と神経活動の相互関係の実験結果に基づき、重力免荷能動制御システムを用いてヒトの運動負荷を計測することで、例えばリン酸化低下を筋収縮による機械的刺激で防ぐために必要な張力発揮量や神経細胞の活動などの定量的な結果を有効に活用する。

4. 研究の反省・考察

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

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

また、NASA-JSCとの共同研究についても、上述の状況により、当初計画から研究の遅れが懸念されるが、NASA-JSCでの実験に替えて、国内での負荷制御の実験に対応する重力免荷能動

制御システムの開発へ計画を見直し、試作を完了した。

海外研究機関に出向いて実験する方法は、次年度も厳しい状況が続くことが懸念されるため、国内での研究に重点を置き、プロジェクト内の成果の導出に繋げる予定である。

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

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kawano, F., T. Ohira, K. Goto, and Y. Ohira. Role(s) of gravitational loading on the growth and development of neuromuscular properties. *Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia)*, 2020, V. 54, No 6, p. 73-79. DOI: 10.21687/0233-528X-2020-54-6-73-79.
- ② Osawa, S., Kato, H., Maeda, Y., Takakura, H., Ogasawara, J., and Izawa, T. Metabolomic profiles in adipocytes differentiated from adipose-derived stem cells following exercise training or high-fat diet. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(2):966, 2020.
Kato, H., Ogasawara, J., Takakura, H., Shirato, K., Sakurai, T., Kizaki, T., and Izawa, T. Exercise training-enhanced lipolytic potency to catecholamine depends on the time of the day. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(18):6920, 2020.
Kato, H., Ario, T., Kishida, T., Tadano, M., Osawa, S., Maeda, Y., Takakura, H., and Izawa, T. Homeobox A5 and C10 genes modulate adaptation of brown adipose tissue during exercise training in juvenile rats. *Exp. Physiol.*, 106(2):463-474, 2020.
Sugiyama, A., Kato, H., Takakura, H., Osawa, S., Maeda, Y., and Izawa, T. Effects of physical activity and melatonin on brain-derived neurotrophic factor and cytokine expression in the cerebellum of high-fat diet-fed rats. *Neuropsychopharmacol. Rep.* 40(3):291-296, 2020.
- ③ Shiotani, K., Tanisumi, Y., Murata, K., Hirokawa, J., Sakurai, Y. and Manabe, H. (2020) Tuning of olfactory cortex ventral tenia tecta neurons to distinct task elements of goal-directed behavior. *eLife*, 9, e57268.
Ohnuki T., Osako Y., Manabe H., Sakurai Y., Hirokawa J. (2020) Dynamic coordination of the perirhinal cortical neurons supports coherent representations between task epochs. *Communications Biology*, 3, article 464.
Sakaguchi, Y. and Sakurai, Y. (2020) Left-right functional difference of the rat dorsal hippocampus for short-term memory and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 382, 112478.
Ishikawa, J., Sakurai, Y., Ishikawa, A. and Mitsushima, D. (2020) Contribution of the prefrontal cortex and basolateral amygdala to behavioral decision making under reward/punishment conflict. *Psychopharmacology*, 237,639-654.
Song, K., Takahashi, S. and Sakurai, Y. (2020) Reinforcement schedules differentially affect learning in neuronal operant conditioning in rats. *Neuroscience Research*, 153, 62-67.
Takamiya, S., Yuki, S., Hirokawa, J., Manabe, H. and Sakurai Y. (2020) Dynamics of memory engrams. *Neuroscience Research*, 153, 22-26.
- ④ Y. Nakamichi, N. Tsujiuchi, A. Ito, K. Hirose and A. Kondo. Dynamic motion analysis using a wearable sensor system in a stabilometer installed with generation function of disturbance from a floor. *Proceedings 2020*, 49, 164, ISEA 2020 [DOI: 10.3390/proceedings2020049164] (2020)
Y. Ouchi, N. Tsujiuchi, A. Ito and K. Hirose. Gait Analysis Using Load-Controlled Single- and Split-Belt Treadmills. *Proceedings 2020*, 49, 48, ISEA 2020 [DOI: 10.3390/proceedings2020049048] (2020)
A. Kondo, K. Hirose, N. Tsujiuchi and A. Ito. Motion and Force Analysis in Load Control Type Treadmill Using Wearable Sensor System. *Proceedings 2020*, 49, 14, ISEA 2020, [DOI: 10.3390/proceedings2020049014] (2020)
H. Okabe, Tak Ohira, F. Kawano, L. Ohira, Tomo Ohira, K. Kamibayashi, K. Goto, H. Naito, and Y. Ohira. Role of active plantar-flexion and/or passive dorsi-flexion of ankle joints as the countermeasure for unloading-related effects in human soleus. *Acta Astronautica* 175 174 – 178, 2020年10月
J. Zhang, H. Murai, A. Ito, N. Tsujiuchi, T. Inoue, K. Murakami, F. Hanzawa, K. Kishimoto, and J. Ozawa. Assist Timing Decision Method for Wire Type Walking Assist Suit by Hip Joint Angular Acceleration. *Proceedings of 2020 IEEE 9th Global Conference on Consumer Electronics (GCCE) (1570656570.pdf)*, (2020), pp.795~798

(2) 口頭発表

- ① 大平充宣 「抗重力筋や脳の特異調節における筋活動由来の感覚神経の関与」 体力科学 70 (1)、第75回日本体力医学会・特別講演。(誌上発表)
- ② 加藤久詞、井澤鉄也 「脂肪由来間葉系幹細胞の分化機構に及ぼす運動トレーニングの影響」第

98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術大会合同大会シンポジウム（肥満症の病態整理とエネルギー代謝機構）、名古屋、2021年3月28日、（WEB開催）

大澤晴太、加藤久詞、前田優希、只野愛実、井澤鉄也 「ラット脂肪由来幹細胞の脂肪細胞への分化に及ぼすL-leucineの影響：高脂肪食摂取および運動トレーニングの影響」、第74回日本栄養・食糧学会大会（宮城，仙台）（誌上開催）

高倉久志、高橋和也、須藤みず紀、安藤創一、加藤久詞、大澤晴太、井澤鉄也 「持久的運動後に短時間低酸素曝露を行うトレーニングプロトコルが骨格筋有酸素性代謝能力に及ぼす影響について」、第75回日本体力医学会大会（鹿児島）（WEB開催）

高倉久志、井澤鉄也 「低酸素環境と運動トレーニングの様々な組み合わせが筋組織での酸素供給系及び利用系に及ぼす影響について」、第28回日本運動生理学会大会（沖縄）

③ 大迫優真、大貫朋哉、眞部寛之、櫻井芳雄、廣川純也（2020）ラット視覚皮質における内的な感覚状態のポピュレーション表現 第43回日本神経科学大会（動画配信方式）、2020年7月29日－8月1日

大貫朋哉、大迫優真、櫻井芳雄、廣川純也（2020）選択方向の神経表象は嗅周皮質における神経細胞の動的協調によってイベント間で保持される 第43回日本神経科学大会（動画配信方式）、2020年7月29日－8月1日

谷隅勇太、塩谷和基、廣川純也、櫻井芳雄、眞部寛之（2020）嗅皮質亜領域ごとに異なる、匂い－行動シーン応答 第43回日本神経科学大会（動画配信方式）、2020年7月29日－8月1日

塩谷和基、谷隅勇太、廣川純也、櫻井芳雄、眞部寛之（2020）風味弁別に内側前頭前野が重要な役割を果たす 第43回日本神経科学大会（動画配信方式）、2020年7月29日－8月1日

④ 張浚源、村井大海、辻内伸好、伊藤彰人、井上剛（産業技術総合研究所）、小澤順（産業技術総合研究所）、村上健太（パナソニック）、半沢文也（ATOUN）、岸本一昭（ATOUN）股関節角度に基づくワイヤ型アシストスーツのアシストタイミング決定手法の提案、[日本機械学会Dynamics and Design Conference 2020（2020.9）]

伊藤和朗、廣瀬圭（テック技販）、伊藤彰人、辻内伸好、近藤亜希子（テック技販）、仲道泰洋 ウェアラブルセンサシステムを用いた関節トルク推定の歩行解析への適用に関する研究、[日本機械学会シンポジウム：スポーツ工学・ヒューマンダイナミクス2020（2020.11）]

辻裕志、辻内伸好、伊藤彰人、太平充宣、上林清孝 荷重免除時の歩行動作が筋活動に与える影響、[日本機械学会2020年度年次大会（2020.9）]

吉見恭平、廣瀬圭（テック技販）、辻内伸好、伊藤彰人、仲道泰洋 帯状慣性センサを用いたカーブ時の座面形状推定、[日本機械学会シンポジウム：スポーツ工学・ヒューマンダイナミクス2020（2020.11）]

北野敬祐、竹田正樹（同志社大学スポーツ健康科学部）、友野一希（同志社大学スポーツ健康科学部）、近藤亜希子（テック技販）、辻内伸好、廣瀬圭（テック技販）慣性センサを用いたフィギュアスケート・ジャンプの回転軸推定と解析に関する研究、[日本機械学会シンポジウム：スポーツ工学・ヒューマンダイナミクス2020（2020.11）]

廣瀬圭（テック技販）、友野一希（同志社大学スポーツ健康科学部）、近藤亜希子（テック技販）、辻内伸好、北野敬祐、竹田正樹（同志社大学スポーツ健康科学部）慣性センサ・地磁気センサを用いたIEKF・クォータニオンによるフィギュアスケート・ジャンプにおける回転軸推定の3次元化に関する研究、[日本機械学会シンポジウム：スポーツ工学・ヒューマンダイナミクス2020（2020.11）]

西片雄斗、辻内伸好、伊藤彰人、廣瀬圭（テック技販）、平野貴司 低重力環境模擬のための吊り上げ式免荷重装置の開発、[日本機械学会関西支部第96期定時総会講演会（2021.3）]

大島惇史、村井大海、若原卓、辻内伸好、上林清孝 「スプリット型トレッドミル歩行による筋間コヒーレンスの変化」、第2回碁ひろば2020年6月13日

(3) 出版物

①

大平宇志、太平充宣 宇宙医学を地球上の健康増進に活かそう - 抗重力筋線維の反応 医学のあゆみ 276 (No. 13): 21603-21604、医歯薬出版、2021

②なし

③

櫻井芳雄（2021）第12章 脳と機械をつないだときに－脳エンハンスメントの未来 同志社大学良心学研究センター（編）良心から科学を考える 岩波書店（東京）、pp. 147-158

④なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	龍 谷 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	中山間地域(日伊)の農業/農村のソーシャルイノベーション研究 —国際的・学際的な研究組織でイタリアの先進事例に学ぶ—	研究分野	経 済 学
キ ー ワ ー ド	①中山間地域 ②ソーシャルイノベーション ③若者 ④イタリア農村地域 ⑤EU政策		

○研究代表者

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

○研究分担者

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

中山間地域（日伊）の農業／農村の ソーシャルイノベーション研究

－国際的・学際的な研究組織でイタリアの先進事例に学ぶ－

1. 研究の目的

- (1) 目的概要：日本の国土の70%を占める中山間地域は存続の危機にあり、その原因は農業とその基盤を支える農村コミュニティの衰退にある。そこで本研究では、日伊の農業・農村政策を比較してその相違を明らかにし、中山間地域の農業／農村にソーシャルイノベーション（以下SI）を醸成するためのエコシステムを明らかにする。
- (2) イタリアの先進性に学ぶ：日伊は地理的類似性（条件不利地域が多い）を有し戦後の農村衰退を同じく経験するが、イタリアでは昨今農村再生の動きが活発である。大胆な若手起業家支援政策等によって若者の地方移住を促進し農村にSIをもたらしている。EU政策や国家地方政策、独創的な民間活動のシナジー効果によると考えられる。
- (3) 研究方法と着目点：
 - ① 両国の農村革新の動きを、ミクロ(事例)/マクロ(国家・EU政策)の視点から分析する。
 - ② 事例研究では、外部人材(若者/外国人)に着目し、流入と定着の条件や、外部人材が引き起こすSIのプロセスと引き起こされる社会システムの変容、に着目する。

2. 研究の計画

- (1) 研究会の開催（8回程度）
 - ① 伊研究者によるこれまでのSIにかかる研究（理論研究/ネットワーク分析）の成果と調査方法を共有し、日伊共通の研究調査方法を確定する。
 - ② 日伊研究者のチーム編成と役割分担を共有し、各チームの研究計画を立てる。
 - ③ 文献調査報告：マクロ視点での日伊条件不利地域の振興政策と成果課題の整理を行う。
- (2) 日伊の調査対象地の地域研究を進めると同時に、実践者と共に、外部人材が関わる革新的事例をリスト化、選定し、現地調査スケジュールを立てる。
- (3) 後半では、具体的な国内外現地調査にとりかかる。国内調査には、伊研究者・実践者を招聘し、共同調査を行う。調査結果は、SI評価指標の開発に生かす。

3. 研究の成果

- (1) 新型コロナウイルスの影響により、予定していたイタリア現地訪問調査を実施することはできなかったが、オンラインによるイタリア人研究者との国際研究会を複数回実施し、各メンバーの研究分野と調査テーマのマッチング、役割分担を行い、研究体制を整えた。また、各担当者の調査先の選定を行った。研究成果としては、欧州、特にイタリアの条件不利地域再生政策の現状や課題について、以下の通り把握することができた。
 - ① EUにおける結束政策の変遷の中で、地域政策が地方ベースから場所ベースに移行し、より条件不利地域にフォーカスした地域政策に移行していること、また、そのリーディングプロジェクトをイタリアが教育研究事業として、若手研究者・学生を巻き込みながら展開されている。
 - ② EU事業として展開されている条件不利地域におけるソーシャルイノベーション研究の成果を共有し、ソーシャルイノベーション概念の整理とイタリア、日本における農業農村の課題共有と、求められるソーシャルイノベーションについて検討した。EUの基本戦略と国家・地方政策と研究政策の関連性をつかむことができた。
 - ③ 日本からは地方創生と若者のIターン推進事業、地域ごとのフードポリシー策定にかかる取り組み等を紹介した。日欧ともに、移住者による地域再生の取り組みがソーシャル・イノベーションのシーズとして展開されていることがわかった。
- (2) イタリア南部の農村・農業におけるソーシャル・イノベーションモデルの日本での社会実験に向けた取り組みとして、以下の成果を上げることができた。
 - ① イタリアで農業に縁のない若者集団が農業イノベーションを推進すべく活動している一つのモデルを、日本で実施するための基盤づくりを行った。具体的には、京都府の地域づ

くり事業への申請・採択により、イタリアのSIモデル事業の実施を、地元組織や亀岡市との協働体制の基礎を築くことができた。

②龍谷大学政策学部のPBL科目「政策実践・探究演習」は、地域との連携により学生が実際に地域と協働し、課題解決のための活動を通じて学びを深める科目であるが、この地域連携の活動の一環として、イタリアの研究者と共同し、オンラインツールを使ってイタリア側と繋ぎ、イタリアのSIモデル「Contadinner」の疑似体験を行い、Contadinnerの目的や意義について、学生に共有し、次年度の試行に向けての準備をすることができた。

- (3) 日本における農業・農村のソーシャル・イノベーションの実態について、ミクロのローカルな事例についての調査と、マクロ（地方・国家政策）についてのヒアリング調査を行い、そのリンケージと効果の検証を行った。

①マクロの視点から、地域おこし協力隊事業の実績と効果、今後の展開について総務省へのヒアリングを行った。国はこの事業を通じて、地方における新たな事業創造を目標にしており、その具現化として、ポスト資本主義を掲げて社会的起業を促進するNext Commons Lab (NCL) という民間の取り組みから生まれた仕組みが全国各地で展開されている。ミクロの視点として、全国3箇所のNCLに訪問ヒアリング調査を行い、日本における条件不利地域における新たな価値想像の可能性を探ることができた。

②調査結果は、イタリア研究者との国際セミナーにて共有し、イタリアにおいても類似した取り組みがあることが判明し、次年度の現地調査に向けた情報収集を行うことができた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 農業・農村におけるソーシャル・イノベーションの理論研究について

①日伊の農業・農村におけるソーシャル・イノベーションと言える事例調査や地方・国レベルの具体的政策については把握できたものの、それらを俯瞰し、理論的な考察には至っていない。次年度に向けては、EUの文献を中心として、理論的分析と考察を進めていく必要がある。

②国際セミナーを開催し、日伊のSIに関わるトピックについて共同研究者間で共有はできたものの、それぞれの研究分野においてどのように意味づけができるのか等、学際的見地から、農業・農村におけるSIの議論を進めていく必要がある。

- (2) 研究組織とスタッフの配置について

①研究会の開催の準備や国際セミナーの企画実施について、準備不足の時があり、十分な議論ができないままに終了することもあるため、研究スタッフとの打ち合わせや共同研究者とより頻りにコミュニケーションをとっておく必要がある。

②研究をサポートするリサーチアシスタントへの研究調査の役割分担、指導について、定期的なミーティングを行うなど、スタッフの育成とプロジェクトの促進に向けての体制づくりを注いでいく必要がある。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等

①石倉研「オーストリア・チロル州における住民参加を通じた農山村再生の取り組み：ローカル・アジェンダ21を中心に」（『龍谷政策学論集』10(1)、2020年、pp. 25-42）

②石倉研「オーストリアにおけるバイオエネルギーとバイオエコノミーの動向」（『農中総研情報』82、2021年、pp. 30-31）

③坊安恵、中村貴子「農林漁業体験民宿の開業時における開業者の意向と特徴の分析：一規制緩和前と子ども農山漁村交流プロジェクト後を比較して－」農林業問題研究, 56(4), 135-142, 2020, 地域農林経済学会

④Ryohei Sato, Azusa Sasaki, Yuko Mori, Mio Komai, Shogo Kamo, Mai Onuki, Takafumi Seki, Zen Kawabe, Shu Miyajima, Shusuke Tomoshige,

Tsuneomi Kawasaki, Shuichi Sato, Takako Nakamura, Nakao Kubo, Seiji Takeda, Shuichi Date, Shigehisa Okamoto, Panida Boonyaritthongchai,

Krit Thirapanmethee, Mullika Traidej Chomnawang, Bhanubong Bongcheewin, Thuy Linh

Nguyen,Huong Lan Thi Nguyen,Huong Thi Le,Yasushi Nakamura,
Kouji Kuramochi "Investigation on the Epoxidation of Piperitenone, and Structure-activity
Relationships of Piperitenone Oxide for Differentiation-inducing
Activity", *Journal of Oleo Science*, 69(8), 951-958, 2020, Japan Oil Chemists' Society
• Azusa SASAKI, Yasushi NAKAMURA, Yukiko KOBAYASHI, Wataru AOI, Takako NAKAMURA,

(2) 口頭発表

①大石尚子「食農を起点としたソーシャル・イノベーション：マルチチュード的起業家精神の醸成を展望して」日本質的心理学会第17回大会（企画シンポジウム「ポスト質的心理学とこれからのアクションリサーチ-世界的危機の恒常化時代を迎えて」）口頭発表、2020年10月25日

(3) 出版物

- ①矢作弘編著『コロナで都市は変わるかー欧米からの報告』学芸出版社、2020年、p. 282（1, 2, 3, 4, 5, 6章担当）
②矢作弘『都市危機のアメリカー凋落と再生の現場を歩く』（岩波書店、2020年、p. 302）

外交的非難のジレンマの動態について

—政治学実験アプローチによる説明—

1. 研究の目的

(1) 外交的非難の動態の解明

本研究課題は、安全保障政策に対する外交的非難が標的国の世論の選好に与える効果について政治学実験アプローチを用いて分析し、その効果が当該二国間の関係性に与える影響を考察する試みである。

近年、東アジアでは、国家が近隣諸国に対して外交的非難を行い、国家間の関係性を急速に悪化させている。しかしながら、外交的非難が必ずしも関係性を急速に悪化させたわけではない。なぜ外交的非難は国家間の関係性を悪化させるのであろうか。本研究は、以下の問いに答える形で外交的非難の動態を明らかにすることを目的とする。

(2) 外交的非難と標的国における選好の変化についての疑問

①外交的非難は標的国における愛国心を喚起し、世論の選好をハト派からタカ派へと変化させるのではないかと。それゆえ、外交的非難は標的国の強硬政策を招き、二国間関係を悪化させるのではないかと。

②この愛国心効果は、当該国と標的国の二国間関係の文脈（政治的問題を抱える宿敵関係、アメリカの同盟国同士）によって左右されるのではないかと。

(3) 外交的非難の愛国心効果の動態についての疑問

①当該国から外交的非難を受けた後に他国から外交的非難を受けた場合と他国から外交的支持を受けた場合では、標的国における選好の変化はどのような差を生み出すのであろうか？

2. 研究の計画

(1) 外交的非難と標的国における選好の変化について

①東アジアにおける米国による軍事的保護の対象となる日本、韓国、台湾の三カ国に絞り、各国毎に2,400~3,000人規模のオンライン・サーベイ実験を行うことにした。日本の軍事予算拡大、韓国の北朝鮮に対する宥和政策、台湾のアメリカ製戦闘機の購入といった各国特有の政策争点を取り上げ、他国による外交的非難の文言を被験者に見せ、政策や政府への支持態度を尋ねる。この文言を無作為に見せた処置群と見せなかった対照群を比較することによって外交的非難の効果の吟味することにした。

②政治的問題を抱える宿敵関係、アメリカの同盟国同士といった二国間関係の文脈を吟味するために、外交的非難の同じ文言を発する報道官の国名を無作為に変化させることによって、それらの効果を吟味することにした。

(2) 外交的非難の愛国心効果の動態について

外交的非難のジレンマがもたらす信頼崩壊の連鎖を緩和する解決策を探るものとして、再び日本、韓国、台湾の三カ国の各国毎に2,400~3,000人規模の二段階のオンライン・サーベイ実験を行うことにした。先の実験を行った直後に、アメリカが当該国の政策を支持または非難する文言を無作為に各被験者に見せ、政策や政府への支持態度を再度尋ねる。もしアメリカによる当該国の政策への支持または非難が外交的非難の愛国心効果を抑制するのであれば、外交的非難のジレンマを緩和する解決策を見出すことになる。

3. 研究の成果

(1) 外交的非難と標的国における選好の変化について

①日本と台湾のサーベイ実験によれば、同様の結果を確認することができた。外交的非難の文言そのものには、国民が感情的な反応を示さなかった。他方、外国的非難が発せられた国が自国と政治的な紛争を抱えている宿敵関係にある場合、国民は愛国心を喚起し、リーダーへの支持を高め、より強硬な政策を好むようになった。

②韓国は2022年の大統領選挙前に調査を行ったところ、日本や台湾とは異なる結果を確認することができた。大統領選挙前になると、与野党が政策を巡り論戦を繰り広げるため、国民は政策に関する情報を十分に保持していることになる。この場合、国民は感情的な反応を示すことはなく、宿敵国や疑似同盟国から外交的非難を受けると、政策に対する支持を大幅に減らすことが確認された。また、リーダーへの支持や政策変更を変化させることはなかった。

(2) 外交的非難の愛国心効果の動態について

①軍事同盟の在り方に従えば、同盟国であるアメリカが支持をすれば、国民は強気に出て愛国心を喚起し、強硬な政策を好むようになると考えられる。他方、同盟国であるアメリカが不支持であれば、国民は弱気になり感情的な反応を緩和させ、強硬な政策を好まなくなるはずである。日本においては、アメリカの支持の効果を確認することができた一方で、アメリカの不支持が外交的非難と取り上げられて愛国心をさらに喚起することが確認された。

②韓国においては、大統領選挙前ということで、外交的非難は韓国の安全保障政策への支持を低下させた。しかしながら、アメリカの支持は低下の程度を和らげ、アメリカの不支持も低下の程度を和らげた。これは、日本と同様に感情的な反応が発生することで、発生したものと考えられる。

4. 研究の反省・考察

(1) 外交的非難と標的国における選好の変化について

日本で実験を行う際、回答者たちは日本の軍事力増強について具体例を用いて説明しても十分に理解していないことが分かった。そこで、防衛費の増加という形で示すと軍事力増強の意味合いが十分に認識されるため、文言の修正を行うことによって対処した。

(2) 外交的非難の愛国心効果の動態について

当初、2段階のサーベイ実験を用いて、アメリカによる支持・不支持の世論に対する影響を吟味しようとした。しかしながら、非常に短い時間に同じ質問を尋ねると、回答者がこちらの望んでいない回答をしたと思込み態度を一様に弱めることがパイロットサーベイから発見され、2段階のサーベイを用いて検証することを取りやめることにした。そこで、外交的非難の文言だけを見た群、外交的非難とアメリカからの支持の文言を見た群、外交的非難とアメリカからの不支持の文言を見た群を比較することによってアメリカによる支持・不支持の効果の吟味することにした。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Kagotani, Koji, and Wen-Chin Wu. forthcoming. “When Do Diplomatic Protests Boomerang? Foreign Protests against US Arms Sales and Domestic Public Support in Taiwan.” *International Studies Quarterly*. (査読有)

(2) 口頭発表

① Kagotani Koji. 2020.9. Diplomatic Protests and Patriotism in Japan, South Korea, and Taiwan. At the Pacific International Politics Conference Online Speaker Series.

② Kagotani, Koji, and Yoshikuni Ono, 2021.4. “Diplomatic Protest and Patriotism: The Effect of Foreign Voices on Japanese Public Opinion.” At the Annual Meeting of Midwest Political Science Association.

③ Kagotani, Koji. 2021.4. “U.S. Sale of Fighter Jets, Diplomatic Protests, and Patriotism in Taiwan.” At the Annual Meeting of Midwest Political Science Association.

(3) 出版物

- ① Kagotani, Koji. 2020.5. “Diplomatic Protest and Patriotism: The Effect of Foreign Voices on Japanese Public Opinion.” RIETI Discussion Paper Series, 20-E-046: 1-27. (査読有)

男性不妊薬を指向した精子の受精能獲得を惹起する薬剤の創生

1. 研究の目的

DDI-4 は、当研究室によるスクリーニングで見出された線虫精細胞の活性化化合物である。本研究では、マウス精子の雄性生殖における DDI-4 の効果を検討すると共に、DDI-4 の標的タンパク質あるいはその関連因子を上述の線虫変異体を使って明らかにする。また、生化学的にオス線虫やマウス精子から標的タンパク質を精製してアミノ酸配列を調べる。さらに、線虫やマウスの精子に存在する DDI-4 の標的タンパク質について、DDI-4 との結合をコンピューターでシミュレーションし、標的タンパク質との結合に最適な化合物の構造を予測する（ドラッグデザイン）。構造が予測された化合物は実際に合成して、それらの活性を検証する。

2. 研究の計画

- (1) マウス精子の活性化およびマウスの体外受精における DDI-4 の添加効果の検討 (担当: 井尻)
- (2) DDI-4 の標的タンパク質（線虫とマウス）の同定 (担当: 西村、井尻)
- (3) DDI-4 の標的タンパク質（線虫とマウス）をコードしている遺伝子を破壊した変異体の作製・解析 (担当: 西村、井尻)
- (4) DDI-4 とその標的タンパク質との結合シミュレーションによる最適化合物の予測 (担当: 河合、表)

3. 研究の成果

- (1) まず、マウスの精巣上体尾部から採取した精子を使い、ジメチルスルホキシド（溶媒コントロール）、カルシウムイオノフォア A23187（陽性コントロール）、DDI-4 を添加して先体反応が惹起されるか否かを調べたところ、DDI-4 は A23187 と同等かそれ以上の活性を示した。さらに、マウス精子の先体反応について、DDI-4 の濃度およびインキュベーション時間依存性を調べた結果、DDI-4 の濃度が 100 μM 、インキュベーション時間が 30 分で反応速度が最大に達した。さらに、マウス精子の capacitation（精子活性化反応の一つ）を精子タンパク質のチロシンリン酸化を指標に調べると、DDI-4 は capacitation を惹起することが明らかとなった。一方、マウスの体外受精における DDI-4 の影響も調べたが、この実験では陽性コントロール実験でも長時間のインキュベーションを必要とすることから、陰性コントロールとの差が明確にはわかりづらい結果となった（陰性コントロール実験でも、体外受精がある程度起こってしまう）。
- (2) まず、DDI-4 により活性化されない精細胞を産生する線虫変異体について、SNP マッピングおよび次世代シーケンズ解析によって原因遺伝子を調べたところ、RNA メチル基転移酵素をコードしている nsun-2 が変異していることがわかった。一方、標的タンパク質を生化学的に同定するため、DDI-4 の活性に影響を与えない官能基を導入した化合物の合成をいくつか試みたが、成功には至っていない。
- (3) (2) で同定された線虫の nsun-2 遺伝子について、CRISPR/Cas9 法でも変異体を作製した。その結果、エチルメタンサルホン酸を使って作製した線虫変異体と類似した表現型が示された。
- (4) DDI-4 の構造類似体を 6 種類合成したが、いずれも活性が大きく低下した。基本的に、DDI-4 は分子量が約 200 の低分子化合物であるため、改変が難しい可能性が高い。

4. 研究の反省・考察

- (1) マウス精子の活性化反応における DDI-4 の影響については、capacitation を含めて、期待どおりの結果を得ることができた。現在、横浜市立大学医学部との共同研究により、DDI-4 がヒト精子を活性化するか否かについても検討中である。体外受精の実験については、標準の条件下では、陰性コントロール実験でも比較的高い受精率を示してしまうことがわかった。今後は、透明帯除去卵子を使った受精実験など、精子と卵子のインキュベーション時間が短時間で済む実験系も検討予定である。
- (2) すでに得られていた線虫変異体の原因遺伝子の同定は順調であったが、生化学的な手法による標的タンパク質の同定については、ビーズとの結合に使用する DDI-4 誘導体の合成に成功

しておらず、今後も合成を継続する。

- (3) 順遺伝学的方法と逆遺伝学的方法で作製した線虫 nsun-2 遺伝子の変異体が類似した表現型を示した。ただ、この遺伝子がコードしているタンパク質の機能を考えると、NUSUN-2 タンパクが DDI-4 の標的である可能性は低く、NSUN-2 により転写後調節を受けている遺伝子が、真の標的タンパク質をコードしている可能性が考えられた。今後は、nsun-2 変異体を使った RNA シークエンス解析を行い、精細胞で発現している遺伝子から DDI-4 の標的タンパク質を絞り込んでいく予定である。
- (4) 今の所、オリジナルの DDI-4 の活性を上回る誘導体の合成には成功していないが、今後も継続していく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Identification and Synthesis of DDI-6, a Quinololinol Analog Capable of Activating Both *Caenorhabditis elegans* and Mouse Spermatozoa.
Yukiko Karuo, Riona Shiraki, Ayaka Yoshida, Ryo Tsunokawa, Mayuko Nakahara-Yamada, Atsushi Tarui, Kazuyuki Sato, Kentaro Kawai, Masaaki Omote, Hitoshi Nishimura
Chemical & pharmaceutical bulletin 69(6) 557 - 563 2021年

(2) 口頭発表

- ① 「DDI-4は線虫精子とマウス精子を活性化する化合物である」
白木梨央奈、島田幸祐、山中美貴子、金子真弓、大倉光平、橋場優喜、橋本正陽、
軽尾友紀子、表 雅章、西村 仁
第43回日本分子生物学会年会 2020年12月
- ② 「化合物DDI-4は線虫およびマウス精子を活性化する」
白木梨央奈、島田幸祐、金子真弓、山中美貴子、大倉光平、橋場優喜、橋本正陽、
軽尾友紀子、表 雅章、西村 仁
2021年度日本動物学会近畿支部研究発表会 2021年5月
- ③ 「線虫精子を活性化する化合物DDI-4は マウス精子における先体反応を惹起する」
白木梨央奈、島田幸祐、金子真弓、山中美貴子、大倉光平、橋場優喜、橋本正陽、
軽尾友紀子、表 雅章、西村 仁
第67回日本生化学会近畿支部例会 2021年5月

(3) 出版物

なし

膝前十字靭帯再建後の効果的な リハビリテーションプロトコル確立 — 抗炎症薬と運動の併用効果 —

1. 研究の目的

前十字靭帯 (Anterior Cruciate Ligament ; ACL) 損傷は代表的なスポーツ外傷の一つであり、スポーツ復帰レベルの回復には靭帯再建術が必須である。靭帯再建術は膝の安定性を回復させる一方で、関節構成体の線維化 (関節線維症) による関節拘縮 (関節可動域制限) や筋萎縮に伴う筋力低下を引き起こす。ACL 再建後の関節可動域や筋力の回復はスポーツ復帰の基準とされていることから、関節拘縮や筋萎縮の予防・改善はリハビリテーションにおける重要な課題である。しかし、術後の関節拘縮や筋萎縮に対する効果的なリハビリテーションプロトコルは確立されておらず、これらの予防・改善にはしばしば難渋する。

ACL 再建後のステロイド系抗炎症薬投与は、関節拘縮に対して著効示すと報告されている (Rue 2008 Arthroscopy)。ステロイド系抗炎症薬は、関節固定解除後の炎症や線維化を抑制して関節拘縮進行を予防することも報告されている (Kaneguchi 2018 Inflammation) 一方で、副作用として筋萎縮を引き起こすことが知られている (Schakman 2013 Int J Biochem Cell Biol)。そのため、ACL 再建後のステロイド系抗炎症薬の投与は筋萎縮を助長する可能性がある。

運動はステロイド系抗炎症薬による筋萎縮を抑制する (LaPier 1997 J Cardiopulm Rehabil) ことから、我々は ACL 再建後の運動とステロイド系抗炎症薬を組み合わせた治療は、術後の筋萎縮を助長することなく、関節拘縮形成を軽減すると仮説を立てた。そこで、本研究の目的は以下の2点とした。

- (1) ACL 再建後の関節拘縮に対する運動とステロイド系抗炎症薬の併用効果を調査すること。
- (2) ACL 再建後の筋萎縮に対する運動とステロイド系抗炎症薬の併用効果を調査すること。

2. 研究の計画

実験には8週齢の雄性 Wistar ラットを66匹使用し、以下の5群に分けた：対照群、ACL 再建 (ACLR) 群、ACL 再建後にステロイド系抗炎症薬であるデキサメタゾン投与する (ACLR + D) 群、ACL 再建後にトレッドミル歩行を行う (ACL + T) 群および ACL 再建後にデキサメタゾン投与とトレッドミル歩行の両方を行う (ACLR + DT) 群。さらに、それぞれの群を10日と30日群に分けた。対照群以外の動物の右膝には、ACL を切断した後、尾腱を用いて再建術を行った。対照群の膝は無処置とした。術後、ACLR + D 群と ACLR + DT 群には、デキサメタゾン (0.25 mg/kg) を術直後、術後1、2、3、4、5、7および9日に皮下投与した。ACLR + T 群と ACLR + DT 群には、手術の3日後より低速でのトレッドミル歩行 (12 m/分、60分/日) を週6日行った。対照群と ACLR 群には術後の介入は行わなかった。実験期間終了後、以下の方法で関節拘縮と筋萎縮を評価した。

(1) 関節拘縮の評価

麻酔下で皮膚および膝屈筋を切除し、14.6 Nmm の膝伸展モーメントを加えた状態で、膝伸展可動域を測定することで関節拘縮を評価した。さらに、膝関節を摘出、固定、脱灰した後、パラフィン包埋した。矢状断切片を作製し、アルデヒドフクシンマッソンゴールドナー染色した。後方関節包の滑膜長と面積を測定することで、線維化を評価した。

(2) 筋萎縮の評価

大腿直筋および腓腹筋から凍結横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った後、筋線維横断面積を測定した。相対筋線維横断面積 (筋線維横断面積/体重) を算出し、筋萎縮の指標とした。

3. 研究の成果

(1) 関節拘縮

術後 10 日の膝伸展可動域は、対照群と比較して、ACLR、ACLR + D および ACLR + T 群で有意に減少した一方で、ACLR + DT 群では対照群と有意差のないレベルに維持された。ACL 再建を受けた群間では、ACLR および ACLR + T 群と比較して、ACLR + D および ACLR + DT 群の可動域は有意に大きかった。術後 30 日の膝伸展可動域は、対照群と比較して、ACLR、ACLR + T および ACLR + DT 群で有意に減少した一方で、ACLR + D 群では対照群と有意差のないレベルに回復した。ACL 再建を受けた群間では、ACLR 群と比較して、ACLR + D および ACLR + DT 群の可動域は有意に大きかった。

膝後方関節包の滑膜長は、対照群と比較して、ACLR および ACLR + T 群で有意に減少した。ACLR + D および ACLR + DT 群の滑膜長は、ACLR および ACLR + T 群と比較して有意に長く、対照群と違いが無かった。

術後 10 日の後方関節包の面積は、対照群と比較して、ACLR、ACLR + D および ACLR + T 群で有意に増加した一方で、ACLR + DT 群では対照群と有意差のないレベルに維持された。ACL 再建を受けた群間では、ACLR 群と比較して、ACLR + T 群の関節包面積は有意に大きかった一方で、ACLR + D および ACLR + DT 群の関節包面積は有意に小さかった。術後 30 日の後方関節包の面積は、対照群と比較して、ACLR および ACLR + T 群では有意に増加したままであった一方で、ACLR + D および ACLR + DT 群では対照群と有意差が無かった。

(2) 筋萎縮

術後 10 日の大腿直筋の相対筋線維横断面積は、対照群と比較して、ACLR、ACLR + D、ACLR + T および ACLR + DT 群の全てで有意に減少した。ACL 再建を受けた群間に差は無かった。術後 30 日の大腿直筋の相対筋線維横断面積は、ACLR、ACLR + T および ACLR + DT 群では対照群と有意差の無いレベルに回復した一方で、ACLR + D 群では対照群と比較して有意に減少したままであった。ACLR + T 群の大腿直筋の相対筋線維横断面積は、ACLR + D 群と比較して有意に大きかった。

腓腹筋の相対筋線維横断面積は、対照群と比較して、ACLR および ACLR + D 群で有意に減少した一方で、ACLR + T および ACLR + DT 群では対照群と有意差の無いレベルに維持された。

4. 研究の反省・考察

(1) 関節拘縮

ACLR 群では膝伸展可動域が有意に減少し、ACL 再建により関節拘縮が誘導されたことが確認できた。ヒトの先行研究 (Rue 2008 Arthroscopy) と同様に、ラット ACL 再建後のステロイド系抗炎症薬投与は関節拘縮を改善した。ACL 再建後の関節拘縮の主要な原因は関節線維症と考えられている (Mayr 2004 Arch Orthop Trauma Surg)。それに一致して、ACLR 群では、関節拘縮形成と並行して膝後方関節包の肥厚 (面積の増加) と滑膜の短縮に特徴づけられる線維化が観察された。ステロイド系抗炎症薬投与は、関節包の肥厚や滑膜の短縮を軽減した。この関節包の線維化の軽減が、関節拘縮の改善に寄与したらしい。ACLR + D 群と ACLR + DT 群間で、可動域、関節包面積および滑膜長に有意な違いは無かった。この結果は、トレッドミル運動は、ステロイド系抗炎症薬の関節拘縮に対する有益な効果を阻害しなかったことを示す。

(2) 筋萎縮

ACLR 群では、大腿直筋と腓腹筋の両方で相対筋線維横断面積が減少し、ACL 再建により筋萎縮が誘導されたことが確認できた。ACLR + T 群の腓腹筋の相対筋線維横断面積は対照群と差のないレベルに維持されたことから、トレッドミル運動は腓腹筋の萎縮を軽減したことが示唆される。また、ACLR 群の大腿直筋の相対筋線維横断面積は、術後 30 日で対照群と有意差のないレベルに回復した一方で、ACLR + D 群では対照群と比較して有意に小さいままであり、ステロイド系抗炎症薬が筋萎縮の回復を阻害したことを示唆する。しかし、ACLR + T と ACLR + DT 群間で筋萎縮のパラメータに差はなく、ステロイド系抗炎症薬の投与は筋萎縮に対する運動の有益な効果を打ち消さなかった。

結論として、ACL 再建後のステロイド系抗炎症薬投与は、関節拘縮を改善したが、大腿直筋の筋萎縮からの回復を遅らせた。トレッドミル運動とステロイド系抗炎症薬投与を組み合

わせると、筋萎縮に悪影響を及ぼすことなく、関節拘縮を改善した。したがって、運動療法とステロイド系抗炎症薬の併用は、ACL 再建後の関節拘縮と筋萎縮に対する新しい治療戦略となる可能性がある。今後は、適切なステロイド系抗炎症薬の投与量や運動量を検討する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kaneguchi A, Umehara T, Yamaoka K, Ozawa J. Bilateral muscle atrophy after anterior cruciate ligament reconstruction in rats: Protective effects of anti-inflammatory drug celecoxib. *Knee*. 2022;35:201-212.
- ② Kaneguchi A, Ozawa J, Umehara T, Yamaoka K. Marrow adipose tissue accumulation and dysgenesis of the trabecular bone after anterior cruciate ligament transection and reconstruction in the rat proximal tibial epiphysis. *Acta Histochem*. 2022;124(4):151891.
- ③ Kaneguchi A, Ozawa J, Minamimoto K, Yamaoka K. Effects of Each Phase of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Surgery on Joint Contracture in Rats. *J Invest Surg*. 2022;35(5):984-995.
- ④ Kaneguchi A, Ozawa J, Minamimoto K, Yamaoka K. The Natural History of Medial Meniscal Tears in the ACL Deficient and ACL Reconstructed Rat Knee. *Cartilage*. 2021;13(2_suppl):1570S-1582S.
- ⑤ Kaneguchi A, Ozawa J, Minamimoto K, Yamaoka K. Formation process of joint contracture after anterior cruciate ligament reconstruction in rats. *J Orthop Res*. 2021;39(5):1082-1092.

(2) 口頭発表

- ① 金口 瑛典、小澤 淳也、下江 淳寛、高橋 明良、早川 桃伽、ラット膝前十字靭帯再建後の荷重量の違いが後肢筋の萎縮に及ぼす影響、第26回日本基礎理学療法学会学術大会、2021年10月

(3) 出版物

なし

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

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

○研究代表者

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

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 間 智 也	医 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウスの作成と解析
平 井 希 俊	医 学 部	講 師	培養細胞の遺伝子改変と解析
三 木 貴 雄	医 学 部	講 師	リコンビナントタンパク質の作成と解析
楠 本 健 司	医 学 部	教 授	皮膚組織の採集
塩 島 一 朗	医 学 部	教 授	培養組織弾性線維の解析

弾性線維の再生技術の開発

1. 研究の目的

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

弾性線維形成には、①マイクロフィブリル線維束形成 ②エラスチンの凝集 ③エラスチンのマイクロフィブリルへの沈着 ④エラスチン同士の架橋 といったプロセスがあることがわかりつつある。研究代表者らは、②③のプロセスに必須の分泌タンパク質 **Fibulin-5** を同定した (*Nature* 2002, *J Cell Biol* 2007) のを皮切りに、**LTBP-2** (プロセス①)、**LTBP-4** (プロセス③)、**Fibulin-4** (プロセス④) といった弾性線維形成因子を同定・機能解明してきた (*EMBO J* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 2013, *Hum Mol Genet* 2014, *Sci Rep* 2017 など)。ここにきてこれらがつながり、弾性線維形成機構の全容が姿を現しつつある。

本研究では、これら弾性線維形成因子の中で加齢組織において不足するものを見出し、弾性線維の再生に必要な条件を明らかにすることを目指す。本年度は、エラスチンの架橋とコラーゲンの架橋を行う重要な酵素であるリシルオキシダーゼ (LOX) の活性に Fibulin-4 がどのように関わるのかを研究した。LOX 欠損マウスと Fibulin-4 欠損マウスはともに弾性線維形成不全・膠原線維脆弱化のために生後すぐ大動脈破裂、横隔膜破裂をおこして死亡することから、Fibulin-4 は LOX の機能に関わることが想定されていたが、その分子メカニズムはわかっていなかった。我々は Fibulin-4 欠損マウスや Fibulin-4 欠損細胞が作る LOX 分子は SDS-PAGE での流れ方がやや遅くかつ活性が著しく低いこと、それが翻訳後修飾の差によることを見出していた。それがどのような翻訳後修飾であるのか、またその差が Fibulin-4 の有無で生じるメカニズムの解明を目指した。

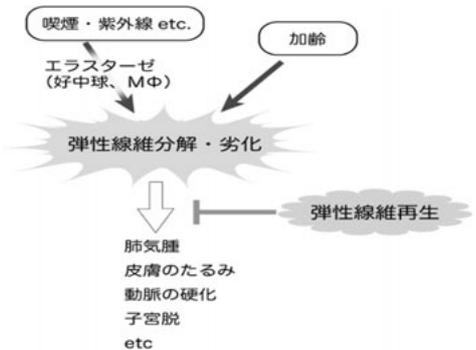


図1. 弾性線維の分解と劣化が多くの老化関連疾患の直接原因となる。

2. 研究の計画

(1) LOX の LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone) 形成における Fibulin-4 の役割

LOX前駆体は銅イオン依存的に細胞内架橋LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone)を形成し、これが活性中心となる。Fibulin-4がLTQ形成に必要なかどうかを検証した。

①精製LOXのニトロブルーテトラゾリウム(NBT)染色：野生型MEF細胞、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXを精製し、SDS-PAGEの後メンブレンに転写し、キノン構造を持つタンパク質を染めるNBTで染色した。

②精製LOXの質量分析によるLTQ含有ペプチドの定量：野生型MEF細胞、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXを精製し、フェニルヒドラジンでラベルしたものをtrypsin/Lys-C, AspNで分解し、オービトラップ質量分析機でLTQ含有ペプチドの定量を行った。

(2) LOX 前駆体への銅イオン取り込みにおける Fibulin-4 の役割

①精製LOXに含まれる銅イオンの定量：野生型MEF細胞、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXを精製し、含有する銅イオンをICP-MSにより定量した。

②銅イオントランスポーターATP7AとFibulin-4の相互作用：ATP7AとFibulin-4を293T細胞

に発現させ、これらが結合するかどうかを免疫沈降実験により確認した。

(3) 分泌されたFibulin-4が細胞内でLOXを活性化できるしくみの解明

同じ細胞の小胞体内に作られたLOX前駆体とFibulin-4がゴルジ体で会合すると当初より想定していたが、意外なことに細胞外のFibulin-4もLOX活性化 (LTQ形成) に寄与できることが判明した。そのしくみを解明するため、ラベルした細胞外Fibulin-4がエンドサイトーシスされてゴルジ体に逆輸送されるかどうかを観察する。

3. 研究の成果

(1) LOX の LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone) 形成における Fibulin-4 の役割

① Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXはNBTで染まらず、キノン構造を持たない、すなわちLTQの形成がないことが示唆された。

② 質量分析により、Fbln4 KO MEF細胞が分泌するLOXはLTQをほとんど含有していないことが定量的に示された。すなわち、Fibulin-4はLOX前駆体がLTQを形成するために必須であることが明らかとなった。

(2) LOX 前駆体への銅イオン取り込みにおける Fibulin-4 の役割

① ICP-MSにより精製LOXに含まれる銅イオンを定量したところ、Fbln4 KO MEF細胞由来LOXは銅イオンの含量が著しく低かった。LOX前駆体がLTQを形成するためには銅イオンを取り込む必要があるが、Fibulin-4はLOX前駆体の銅イオン取り込みに必須であることが示された。

② LOX前駆体の銅イオン取り込みとLTQ形成はゴルジ体でおこなうことが知られている。ゴルジ体での銅イオントランスポーターATP7AとFibulin-4が結合し、またFibulin-4とLOX前駆体が結合したことから、Fibulin-4がATP7AとLOX前駆体の橋渡しをしていることが示唆された。

(3) 分泌されたFibulin-4が細胞内でLOXを活性化できるしくみの解明

細胞外Fibulin-4がエンドサイトーシスされてゴルジ体に逆輸送され、ゴルジ体でLOX前駆体のLTQ形成を促進することを明らかにした。

4. 研究の反省・考察

弾性線維の形成にはFibulin-4が必須であることはFbln4 KO マウスの表現型などから明らかであったが、その機能はこれまで謎であった。本研究課題では弾性線維の再生を本来の目的とするが、そのためにFibulin-4の機能解明は避けて通ることができない問題であり、今回の研究成果の意義は大きい。

今回の研究結果から、Fibulin-4はゴルジ体においてLOX前駆体と銅イオントランスポーターATP7Aに結合し、ATP7AからLOX前駆体への銅イオン受け渡しを促進していることが明らかとなった(図2)。Fbln4 KO マウスとLOX KO マウスの表現型がほぼ同じであること、いずれのマウスにおいてもエラスチンの架橋だけでなくコラーゲンの架橋も低下することから、これが生体内におけるFibulin-4の主要な機能であると考えられる。

同じ細胞で作られたFibulin-4とLOX前駆体を含む小胞体がゴルジ体で会合(図2A)とすると、分泌タンパク質であるFibulin-4が分泌される前にその主な働きを終えていることになり、意外性のある機構である。しかし一旦分泌されたFibulin-4がエンドサイトーシスによってとりこまれ、ゴルジ体まで逆輸送されるという知見(図2B)はさらに意外性が高い。酵素の活性化を調節する機構としてはこれまでに例のないものである。LOX活性化に必要な細胞外Fibulin-4濃度は非常に低く、血清で検出されるFibulin-

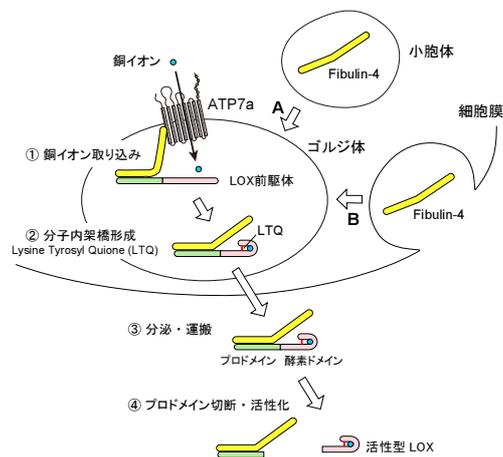


図2. Fibulin-4によるLOX活性化機構。Fibulin-4はゴルジ体の中でLOX前駆体と結合し、銅イオンがトランスポーターATP7aからLOX前駆体に受け渡されるようにする。銅イオンが結合したLOXは活性中心となる分子内架橋Lysine Tyrosyl Quinone (LTQ)を形成する。外部から加えたFibulin-4でもLOX活性化をおこせるため、Fibulin-4は同じ細胞の小胞体(A)のみならず細胞外から(B)も供給されると考えられる。

4 濃度に近いことから、血中を循環する Fibulin-4 が全身で LOX 活性化に利用されている可能性もある。これまでに我々は Fibulin-5 が高濃度で血中循環していることを見出しているが、「弾性線維（を含む細胞外マトリックス）はこれらのような血中を循環する分子ツールによって組み立てられている」という新たなパラダイムに発展することも考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Noda K, Kitagawa K, Miki T, Horiguchi M, Akama TO, Taniguchi T, Taniguchi H, Takahashi K, Ogra Y, Mecham RP, Terajima M, Yamauchi Y, Nakamura T: A matricellular protein fibulin-4 is essential for the activation of lysyl oxidase. *Science Advances* 6(48):eabc1404, 2020.

② Kinoshita Y, Ikeda T, Kushima H, Fujita M, Nakamura T, Nabeshima K, Ishii H: Serum latent transforming growth factor- β binding protein 4 as a novel biomarker for idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis. *Respiratory Medicine* 171:106077, 2020.

③ Koyama S, Horie T, Nishino T, Baba O, Sowa N, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Xu S, Yamasaki T, Otani C, Watanabe T, Nakamura T, Hasegawa K, Kimura T, Ono K. Identification of Differential Roles of MicroRNA-33a and -33b During Atherosclerosis Progression With Genetically Modified Mice. *Journal of American Heart Association* 8(13):e012609, 2019.

(2) 口頭発表

① 中邨智之：「循環器病学基礎研究の歴史をたどる ～ 生理学から分子生物学へ～」第84回日本循環器学会学術集会 会長特別企画 基礎研究のすすめ（オンライン、2020年7月30日）

(3) 出版物

① Nakamura T, Bornstein P: Matricellular Proteins. Book Chapter in *Reference Module in Biomedical Sciences* 2020. doi: 10.1016/b978-0-08-102723-3.00009-3.

動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用

1. 研究の目的

(1) 研究背景

レーヨンに代表される再生繊維は、構成成分が原材料と同じため、その構成成分に由来する特性を活かしつつ、さらに種々の付加価値を付与することが可能となる。従って、天然繊維そのものに比べて応用価値は高い。現在のところ再生繊維としての実用化は、上に述べたレーヨンやテンセル等、植物由来のセルロースを利用したものが中心である。

それに対し、動物由来タンパク質は、ミルクカゼインやシルクフィブロイン等、一部で研究例があるものの、実用的な応用には至っていない。そのような中、本研究では動物毛を構成する構造たんぱく質であるケラチンに着目している。ケラチンを主成分とする動物毛の中でも、特に(紡績・製織時の)羊毛屑や毛髪は大量に廃棄されており、殆どリサイクルされていない。本申請者らは、以前の研究においてそれらの有効活用を目指し、動物繊維である“羊毛”から構成タンパク質のケラチンを抽出し、エレクトロスピンニング法によりナノファイバーとして再生繊維化する検討を実施した。また、抽出ケラチンをフィルムや多孔質スポンジへと加工し、ナノファイバーと共に、バイオマテリアル応用化を検討することも実施した。

一連の研究により得られた成果は、既に国内外の学術論文および学会にて報告を終えている。本申請者が、一連の当該研究テーマに着想した経緯には、廃棄される動物繊維タンパク質のリサイクルという意味合い以外に、バイオマテリアル応用した際の、汎用素材(コラーゲン)と比較した場合の生体に対する高い安全性が挙げられる。コラーゲンは生体を構成する構造タンパク質であり、優れた生体親和性を示す反面、BSE等による安全性の危惧、複雑な精製工程、高コスト等の課題を有する。

一方、同じく構造タンパク質であるケラチンを成分とする動物毛は、非血管性由来でありBSEの危険性が無い。さらに、ケラチンは細胞接着性因子として知られるアミノ酸配列を分子内に複数セグメント含んでおり、細胞との高い親和性も有する。加えて、安価で大量に安定入手が可能ということも特筆すべき利点である。

(2) 先行研究と比較した本研究の特徴

このようなケラチンたんぱく質の特性を活かし、本研究では本申請者の先行研究成果を発展させる。即ち、まず原材料の点において原素材を“羊毛”から“ヒト毛髪”へと応用すること、及び抽出手段を“酸化的”から“還元的”へと応用展開する。原素材にヒト毛髪を用いることで得られる利点は、異種(羊)由来から同種(ヒト)由来の材料となることで移植時の生体への安全性が飛躍的に高まることである。さらに、“酸化抽出ケラチン”が天然構造から変性しているのに対し、“還元抽出ケラチン”は天然構造に近い。その結果、生理学的特性の維持や、化学架橋を施すことなく力学的特性を再現できる利点も有する。一方、解決すべき課題も生じる。羊毛とヒト毛髪では含有アミノ酸組成差も大きく、色素含有の有無も異なる。また、年齢・性別・人種等による相違も想定され、それらは溶媒への溶解性や物性への影響とも深く関わっていると想定される。従って、上記利点を得るためには、それらの影響を幅広くスクリーニングすることが必要となる。尚、本研究では応用対象がバイオマテリアルであることを勘案し、生体構造と同じくナノスケールで構造制御が可能な、ナノファイバー作成に焦点を絞った検討を実施する。

2. 研究の計画

(1) 達成目標

本研究は「ヒト毛髪由来還元抽出ケラチンのナノファイバー化技術を確立し、それらの生体親和性を評価する」ことである。そのため、基礎段階の研究過程では、ケラチン抽出プロセスの確立および成型加工を行う。そして、応用化過程においては、基礎段階で得られたケラチンの特性を活かし、バイオマテリアル応用の例として、癒着防止膜への応用化を視野に入れ、その可能性を評価する。

(2) 研究項目

上記の基礎段階に相当する項目では、

- (1) ヒト毛髪ケラチンの精製抽出と、エレクトロスピンニングにおける条件パラメータ設定。
- (2) ナノファイバーの物性評価とそれを受けた改善検討。

に項目を絞って検討を行う。この工程を行う趣旨は、従来の“羊毛”を用いた検討に比べて“ヒト毛髪”から得られるケラチンは抽出や加工において多くの相違と工夫が必要であることから、得られるケラチンの精製と成型加工における再現性あるエレクトロスピンニング化技術を確立する。また、メラニン色素の影響をも評価するため、“黒髪”と“白髪”の異種類の毛髪を用いた検討も併せて進める。

また、後半の応用化過程においては、

- (3) ナノファイバー層やフィルム層による多積層構造化
- (4) 多積層構造の物性変化や効果を評価し生体反応を調べる
- (5) ナノファイバーの生体親和性評価 (in vivo および in vitro)

について検討を行う。

これらの検討により、癒着防止膜としての可能性についての基礎事項を評価する。

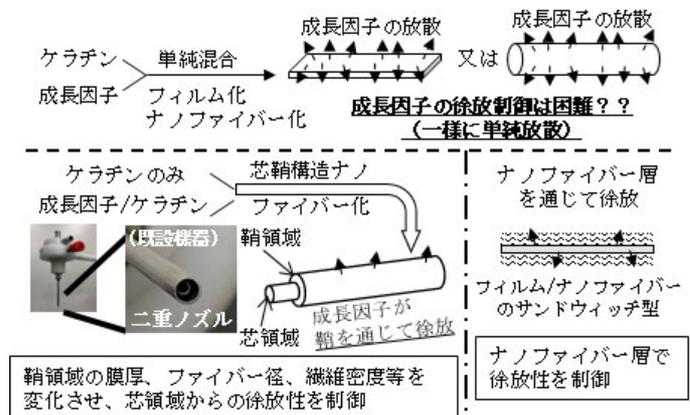
3. 研究の成果

2020 および 2021 年度においては、上記の応用化過程に相当する (3)～(5) の評価を行った。

右図は、積層化の概念を示しており、2020 年度には、このうち上段の通常ナノファイバーシートによる効果、2021 年度には下段右側のサンドウィッチ型について検証を行うことまで実施出来た。下段左側の芯鞘構造によるナノファイバーシートの検証は、その製造に想定以上の時間を要し、現在も継続して検証を実施している。

現時点までの成果では、右図上段の通常ナノファイバーシートと比較して、下段右側のサンドウィッチ構造でも成長因子の明らかな効果は認められなかった。

これは、ファイバー内からの成長因子の徐放性がコントロール出来ていないことを示唆しており、ナノファイバー層という物理的バリアのみによる徐放コントロールが困難であることを示している。一方、これらのシートをラット子宮管の擦過傷モデルに対して貼付け、その効果を評価したところ、上図のサンドウィッチ型のシートを用いた場合はコントロール群と比較して明らかな有意差が確認されたのに対し、ナノファイバー層のみの場合はコントロール群と比較して有意差は無かった。これらの結果は、創傷患部からの滲出液をブロックして保持できる機能の有無に依ることが考えられ、今後この系において、さらに成長因子の徐放性による漿膜早期再生の価値を高める検討を行う。



4. 研究の反省・考察

本研究は、毛髪を有効な再生材料資源と捉え、生体材料として応用化することを目標にその基礎項目について検討を行った。その結果、本研究代表者の先行研究から継続して進めてきた『ケラチンの抽出』については、毛髪を原料として純度高く、再溶解して成型加工が可能な抽出法を確立することが出来た。特に、比較的 low molecular weight のケラチンを単独でナノファイバー化した例はなく、今までは補助高分子と共に検討されてきたが、その壁を突破する成果である。精製における残された課題としては次の事項を挙げることが出来る。即ち、抽出したケラチンにはその特性により大きく α 、 β 、 γ 型に分類され、さらに細かく細分化できるが、現時点ではそれらの分画分離までは達成できておらず、クルードな状態での検討に止まった。今後、それらの分画を達成し、その効果をさらに詳細に検討する必要がある。

一方、後半の癒着防止膜への応用化においては、フィルム及びナノファイバーの多層構造化を図り、一定の成果を挙げることが出来た。また、多層構造としての当初計画の芯鞘構造化は、そ

の制作に時間を要し、助成期間が終了した現在も継続して検討を行っている。これらの材料を用いた検討成果は、ケラチン材料による多層構造化を用いることで『癒着防止膜としての可能性有り』というYesかNoの結果を出す範囲に留まった。即ち、癒着防止のメカニズム解明や、免疫組織学的検討は未着手の状態であり、今後はこの点においてさらに詳細に検討を進める必要がある。

5. 研究発表

<学会口頭発表>

- ・平井彩香、澤田和也、藤里俊哉、動物毛由来ケラチンタンパクを用いた癒着防止膜、ライフサポート学会 第30回フロンティア講演会(令和3年3月9～10日開催の予定であったが、新型コロナウイルスの影響で要旨集の発刊のみ)
- ・園原壮騎、澤田和也、藤里俊哉、血液適合性材料への応用を目指した毛髪由来ケラチンタンパク質の改質、ライフサポート学会 第31回フロンティア講演会、令和4年3月7～8日
- ・古賀野悟士、澤田和也、藤里俊哉、新規な足場材料を用いた人工筋組織の創生、ライフサポート学会 第31回フロンティア講演会、令和4年3月7～8日

高性能次世代有機系二次電池の開発

—有機 π 電子系物質を基盤とする正極材料創製—

1. 研究の目的

(1) 近年、資源問題やエネルギー問題などから、環境にやさしい高性能なエネルギーデバイスの開発が求められている。とりわけ、携帯型電子機器、電気自動車、大容量スマートグリッドなどへの需要から、クリーンなエネルギーデバイスとしての二次電池の高性能化は重要な研究課題の一つである。現在汎用的な二次電池であるLiイオン電池は、その正極材料にリチウムコバルト酸などの遷移金属酸化物が用いられているが、希少元素の利用や構造が分解するために理論容量の半分程度しか容量を得ることができないといった問題を有しており、代替の正極材料の探索・創製および新しい原理・現象の開拓が必要不可欠である。

(2) このような状況の下、2000年代以降、環境や資源問題、低コスト、ファブリケーションのし易さといった観点から、有機ラジカル電池や分子スピン電池といった酸化還元活性な有機分子・高分子を正極活物質とした有機系二次電池が数多く報告されるとともに注目を集めてきた。しかしながら、これらは容量およびサイクル特性といった面で必ずしも現状のLiイオン電池に対して優位性を持つものではなかった。

(3) これまでに我々のグループでは、高容量と急速充電の両方を可能にする新しい正極材料として、多電子レドックス特性を示す多核金属錯体分子（分子クラスター）を手始めに、クラスターと酸化還元活性な π 電子系有機配位子（キノンなど）から成る多電子レドックスアクティブ金属有機構造体（Metal-Organic Framework: MOF）を創製し、これを正極材料とすることで、有機配位子と金属イオン両方の酸化還元による高容量とMOFの強固な空孔構造に由来した安定なサイクル特性が実現可能なことを提示した。

(4) また、このような酸化還元活性な π 電子系分子が集積したMOF電池の研究を行うだけでなく、上述の有機ラジカル電池や分子スピン電池とは異なる観点で、特異な構造や多電子の酸化還元能を有する π 電子系有機分子の蓄電特性開拓を進め、例えば、ホウ素ドーピングナノグラフェン分子や反芳香族性ノルコロール分子について検討したところ、高容量や全有機電極電池といった各分子に特徴的な興味深い電池特性を見出した。このことは、高性能な有機電池を実現するうえで様々な π 電子系有機物質の検討が今なお重要なことを意味する。

(5) 以上より、酸化還元活性な π 電子系分子は、次世代蓄電材料として非常に魅力的な物質群であり、本研究では、これまでの研究を基に、様々な酸化還元活性な π 電子系有機分子及び集積体を基盤とした実用化に向けた高性能な蓄電特性の開拓を目的とする。

2. 研究の計画

(1) 酸化還元活性 π 電子系有機分子に特異な電池特性開拓

① 初年度のポリキノン系分子について、より重量当たりの電池容量を大きくするために、周縁部のアルキル鎖長が短い分子を合成し、その電池特性を検討する。

② 初年度にすでに研究開始済みであるが、グラフェンのモデルとして注目を集めているナノグラフェン分子として、特にヘテロ原子がドーピングされたグラフェン様分子の創製と、その電池特性をさらに検討する。

ア 応募者のこれまでの研究により、ホウ素がドーピングされたナノグラフェン分子の電気化学特性が良いことが分かっていることから、ここでは、初年度の分子に加え、図3のような様々なヘテロ原子ドーピンググラフェン様分子を開発・合成し、これを正極とするリチウム電池を作製して、その充放電特性を測定する。

イ 上記の結果を基に、ヘテロ原子の導入による電気化学特性への影響などを検討する。DFT計算などによりHOMO-LUMOレベルなどを解析し、その本質を解明して分子設計へのフィードバックを行う。

③ 上述のような系に加え、還元電位の上昇に伴う高い起電力の実現を目的に、キノンよりもアクセプター性の強いTCNQ系分子の電池特性を調べる。具体的には、図4のようなTCNQ系分子を合成し、キノン系の場合と同じく、酸化還元活性部位が多く含まれる分子に特異な蓄電特性を検討する。

④このように新しい π 電子系有機分子の電極特性を検討する一方で、有機系電極の問題点である伝導度の低さや有機系電解質溶液への溶解を、薄膜電極作成や固体電解質の利用により克服する。

ア 薄膜電極作製については、ドクターブレード法を用いて正極活物質、導電性炭素、バインダーからなる薄膜電極を作製し、有機材料が正極中濃度 70 wt%でも良い電池特性を得られるようにする。

イ 固体電解質として様々なゲル高分子電解質を用いた電池を作製し、電極活物質の溶解による容量およびサイクル特性の悪化を防ぎ、物質由来の蓄電特性を計測できるようにする。

(2) 多孔性を有する酸化還元活性 π 電子系有機分子集合体の電池特性開拓

①初年度に引き続き、様々な酸化還元活性配位子を用いた MOF の作製と蓄電特性の検討を行うが、その際、より多電子の酸化還元能を有し、かつ酸化還元電位の高い π 電子系有機部位を含む配位子を合成し、それを用いた MOF の作製によって、安定かつ高容量を有する二次電池を実現する。

②多孔性有機分子集合体として、酸化還元活性な COF やアクセプター分子とドナー分子からなる電荷移動錯体結晶も対象とし、それらの合成及びその電池特性の検討を行う。

3. 研究の成果

(1) 酸化還元活性 π 電子系有機分子に特異な電池特性を開拓した。

①ポリキノ系分子について、より重量当たりの電池容量を大きくするために、周縁部のアルキル鎖長が短い分子を合成し、その電池特性を検討したところ、より大きな容量が得られることが分かった。

②次に、ヘテロ原子ドーピンググラフェンについて、様々な合成法を検討するとともに、得られた物質に関して、そのリチウムイオン電池負極特性を検討した。

ア まず、リンや硫黄を含む前駆体と炭素源を混合して、500°Cで焼成することにより、様々なヘテロ原子ドーピンググラフェンを作製し、XPS, IR, TEM などによりそれらの同定を行った。

イ 次に、これらを負極とするリチウムイオン電池を作製し、その充放電特性を検討したところ、従来の負極である単純なグラフェンよりも大きな容量を示すことを見出した。

ウ このように、ヘテロ原子ドーピンググラフェンが次世代二次電池の電極として有望であることを初めて示した。

③上述のような系に加え、還元電位の上昇に伴う高い起電力の実現を目的に、キノンよりもアクセプター性の強い分子の電池特性を検討した。

ア 具体的には、テトラチアフルバレン (TTF) 骨格を含む分子について検討し、起電力の上昇を見出すことに成功した。

イ さらに、TTF をフタロシアニンに組み込むことでも、正極として安定な容量を示す電池となることを見出した。

(2) 多孔性を有する酸化還元活性 π 電子系有機分子集合体の電池特性開拓

①酸化還元活性なアゾ部位を含有する有機配位子が集積した多電子レドックス MOF の作製と電池特性の開拓に取り組んだ。

ア アゾ含有配位子を有する、様々な次元と空孔サイズを持つ MOF (AZ-MOF) を複数作製し、その基礎物性の探索とこれらを正極材料とするリチウムおよびナトリウム電池を作製し、その充放電特性を計測した。

イ その結果、リチウム電池としてはあまり良い性能を示さないが、ナトリウム電池としては良い性能を示すことが明らかとなった。

②多孔性有機分子集合体として、酸化還元活性な COF やアクセプター分子とドナー分子からなる電荷移動錯体結晶を多数合成し、それらの電池正極特性を検討した。

4. 研究の反省・考察

(1) 上述したように、2 つのテーマにおいて、様々な有機分子及び集積体の電池特性を明らかにするとともに、その反応機構や、次年度に計画していたホウ素含有分子の電池特性も調べることができており、論文発表までを達成した。よって、「当初の計画以上に進展している」といえる。

(2) 一方で、真に実用化するうえでは、さらなる改善が必要である。

①現状、正極中の活物質濃度は、30wt%程度であるが、これを80wt%程度まで上げる。

②負極をLiとしているが、これを炭素材料などの安全なものに取り換える必要がある。

(3) 上述のような反省点を生かして、次年度以降に、実用化につながるような有機二次電池の開発を実現したい。

(4) また、どのような有機分子や有機分子集合体が良いかを包括的に明らかにする研究へと展開したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Takeshi Shimizu,* Heng Wang,* Daiju Matsumura, Kei Mitsuhashi, Toshiaki Ohta, and Hirofumi Yoshikawa,* Porous Metal Organic Frameworks Containing Reversible Disulfide Linkages as Cathode Materials for Li-Ion Batteries, *ChemSusChem* (2020) 13(9), 2256–2263 (DOI: 10.1002/cssc.201903471)

② Haruka Omachi,* Tsukasa Inoue, Shuya Hatao, Hisanori Shinohara, Alejandro Criado, Hirofumi Yoshikawa,* Zois Syrgiannis,* and Maurizio Prato,* Concise, Single-Step Synthesis of Sulfur-Enriched Graphene: Immobilization of Molecular Clusters and Battery Applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2020) 59(20), 7836–7841 (DOI: 10.1002/anie.201913578 and 10.1002/ange.201913578)

③ Yoshinobu Kamakura, Arata Hikawa, Hirofumi Yoshikawa, Wataru Kosaka, Hitoshi Miyasaka, and Daisuke Tanaka, Coordination Distortion Induced Water Adsorption in Hydrophobic Flexible Metal-Organic Frameworks, *Chem. Commun.* (2020), 59, 9106–9109 (DOI:10.1039/d0cc03772a)

(2) 口頭発表

① 吉川浩史、分子ナノ材料の特異な蓄電機能、ナノ学会主催 ナノ構造・物性－ナノ機能・応用部会 合同シンポジウム、金沢勤労者プラザ、金沢、石川県、2020年12月19日、招待講演

② 吉川浩史、分子および分子集積体の蓄電機能、錯体化学会若手の会 第7回ウェブ勉強会 (ZOOM)、2020年12月8日、招待講演

(3) 出版物

なし

AA アミロイドーシス発症制御因子の解明

ーアミロイドーシスの病態に関わる糖鎖合成制御因子と翻訳後修飾ー

1. 研究の目的

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

2. 研究の計画

- (1) AA アミロイドーシスの進展に関わる GAG 鎖を調べる。
 - ①GAG合成異常を起こした遺伝子改変マウスを用いて、アミロイドーシスの進展に関連する GAGの詳細な情報を得る。
 - ②アミロイドーシスの進展に関わるプロテオグリカンを同定する。
- (2) GAG の作用点が既存薬の標的と異なることを確認する。
 - ①GAG は SAA の発現亢進には影響を与えないことを確認する。
- (3) SAA 分子の翻訳後修飾が GAG 鎖によるアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べる。
 - ①GAGの添加によるアミロイド線維の形成過程を経時的に追跡するとともに、円二色性 (CD) 分散計などを利用した二次構造評価を行う。
 - ②線維の形成、とりわけ二次構造の差異が認められた試料について、凝集体の立体構造評価、凝集体の形態観察を行う。

3. 研究の成果

- (1) 糖鎖合成制御因子について
 - ① アミロイド線維の沈着部位にヘパラン硫酸が共局在していることを確認した。GAGを過剰に合成する遺伝子改変マウスでは、アミロイド線維の沈着が増加し、アミロイド線維に共沈着したヘパラン硫酸が増えていた。
アミロイド沈着が起きた臓器及び起きていない臓器からGAGを粗精製し、HPLC分析を行った。アミロイドが沈着した肝臓のGAGでは、ヘパラン硫酸の硫酸化の程度が上昇していた。
 - ② 腹腔マクロファージやマクロファージ細胞株を用いて、炎症時に発現上昇が見られるプロテオグリカン調べたところ、スモール・ロイシンリッチ・プロテオグリカンの発現が誘導されることがわかった。
 - ③ アミロイド線維の沈着亢進が認められた GAG を過剰に合成する遺伝子改変マウスにおいても、AA アミロイドーシスを誘発した時、SAA の発現上昇は野生型と同程度であったことから、GAG の作用点が既存薬の標的と異なることが確認された。
- (2) 翻訳後修飾の影響について
 - ①過酸化水素により SAA タンパク質の酸化処理を行った。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) を用いて質量の変化を調べたところ、酸化を受けやすいアミノ酸として知られるメチオニン 3 残基に対応する酸素 3 原子分の質量の増加を確認した。さらに、酸化処理した SAA タンパク質に酵素 (Asp-N) 消化を施すことにより断片化し MS/MS 解析を行ったところ、少なくともメチオニン 2 残基がメチオニンスルホキシドへ酸化されていること、および SAA 分子 105 残基のうちで MASCOT (タンパク質同定に用いるデータベース) により検出されなかったメチオニンを含む 10 残基中に酸素原子が結合していることを明らかにした。
 - ②チオフラビン T の蛍光測定や CD 測定により、アミロイド線維の形成を評価した。その結果、線維の形成促進因子であるヘパラン硫酸 (HS) を添加しない場合に、SAA 分子の酸化がアミロイド線維の形成を遅延させることを明らかにした。しかし、この結果は、主にリジン残基が修飾を受けるカルバモイル化に比べると、その影響は大きなものではなかった。

③コンフォメーション特異的抗体 (A11, 0C) を用いた解析では凝集体の立体構造の差異を識別することはできていないが、電子顕微鏡像では酸化やカルバモイル化によって異なる線維形態を示す結果となった。

4. 研究の反省・考察

(1) 糖鎖合成制御因子について

①本研究では、*EXTL2* ノックアウトマウスを用いて、*EXTL2* の発現低下によりアミロイドの沈着が促進する現象を見出している。ヒトにおいても、*EXTL2* の発現低下がアミロイドの沈着に関連するかどうかを調べるために、ヒトの臨床検体を用いて *EXTL2* の発現を調べる。

②野生型マウス由来マクロファージと比較し、*EXTL2* ノックアウトマウス由来マクロファージで SAA のアミロイド線維の形成が促進することは調べたが、細胞死に違いがあるかないかは検討中であるため、これを明らかにする。また、SAA のアミロイド線維の形成促進の分子機構を調べる。研究代表者らは、最近、非アルコール性脂肪性肝炎モデルを用いて、*Ext12* 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも早い段階で肝細胞がんが発生することを明らかにしたが、この現象の原因は、*Ext12* 欠損下で合成される GAG 鎖が炎症性サイトカインの産生に関わるマクロファージの Toll-like receptor 4-NF κ B 経路を直接活性化することである可能性を考えている (Nadanaka, S., et al. (2020) *FASEB J.* 34(6), 8385-8401)。Toll-like receptor 4 が刺激されることによって、炎症誘発性サイトカインや SAA のプロセッシングに関わるインフラマソームの活性化がプライミングされることが報告されているため (Zhong, Z., et al. (2018) *Nature* 560, 198-203; Babelova, A. et al. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 24035-24048)、この点に着目し研究を進めようと考えている。

(2) 翻訳後修飾の影響について

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

②今回用いた大腸菌発現系により得たリコンビナントの SAA 分子には、生体内の SAA 分子には存在しない余分なメチオニン残基が N 末端に存在する。そこで、化学的処理 (グリオキシル酸によるアミノ基転移反応とジアミンによる除去) によりメチオニンを取り除くことを検討しており、現在までにグリオキシル酸による反応条件を確立した。今後、ジアミンによる除去を行い、N 末端に存在するメチオニン残基の翻訳後修飾が、アミロイド線維の形成に及ぼす影響を調べる。

③これまでの結果より、翻訳後修飾により異なる線維の形態が示唆されており、これらの細胞に対する毒性評価を開始している。しかしながら、MTT アッセイを用いてヒト胎児腎細胞 (HEK293) に対する毒性を評価したところ、バッファー成分などの添加物が毒性を示す結果となった。今後、毒性評価に用いるアッセイや細胞種をかえて同様の実験を行うことで、アミロイド線維自身の毒性に及ぼす翻訳後修飾の影響を調べる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①灘中 里美¹、田中 将史²、中山 尋量²、北川 裕之¹ (¹神薬大・生化、²神薬大・機能性分子)

「グリコサミノグリカンの合成異常に着目したAAアミロイドーシス発症制御因子の解明」
第39回日本糖質学会 (会期: 2020 年 11 月 21-23 日、誌上開催)

学会HP: <http://www.jscr.gr.jp/?p=contents&id=11>

(3) 出版物

なし

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

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医 学 部	主 任 教 授	研究統括、細菌叢解析、細菌数解析、動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	医 学 部	講 師	細菌叢解析、細菌数解析、動物実験
池 内 浩 基	医 学 部	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
内 野 基	医 学 部	准 教 授	臨床データの収集・解析
大 野 博 司	理 化 学 研 究 所 生命医科学研究センター	チ ー ム リ ー ダ ー	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析の指導
加 藤 完	理 化 学 研 究 所 生命医科学研究センター	研 究 員	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析
中 西 裕 美 子	理 化 学 研 究 所 生命医科学研究センター	研 究 員	臨床サンプルの代謝産物解析

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

1. 研究の目的

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

2. 研究の計画

(1) 回腸囊炎患者の糞便における細菌叢解析

- ① 回腸囊炎患者の糞便におけるMiseqによる細菌叢解析をおこなう。
- ② 回腸囊炎患者の臨床スコア (mPDAI) と細菌叢との関連を調べる。

(2) 病因と関連する可能性のある細菌の培養分離

- ① (1) にて変化が認められた細菌群からpathobiontあるいはsymbiontと考えられる細菌を選択し、MinIONを用いて同定単離培養する。

(3) マウスを用いた細菌叢、および単離細菌の病理学的検討

- ① (1) にて得られた疾患スコアの高い患者糞便サンプル、あるいは、(2) にて得られた病因に関連する可能性のある単離細菌を、予め抗菌剤にて常在細菌叢を欠失させたマウスに投与し、それらの炎症誘起作用について検討する。

3. 研究の成果

(1) 回腸囊炎患者の糞便における細菌叢解析

- ① Enterobacteriaceaeが回腸囊炎 (臨床スコア (mPDAI) が5以上) にて優位に増加しており、mPDAIスコアとの正の相関を認め、最大90%を占めている回腸囊炎患者を認めた (図1)
- ② 抗菌剤治療が著効した患者において、治療前に約40%を占めていたFusobacteriaceaeがほぼ消失した例を3例認めた。
- ③ Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceaeが回腸囊炎にて優位に減少しており、それぞれmPDAIスコアと負の相関を認めた。

(2) 病因を関連する可能性のある細菌の分離

- ① 炎症あるいは病原性常在細菌 (Pathobiont) として、Fusobacteriaceae、Pasteurellaceae、Enterobacteriaceae、Erysipelotrichaceaeを上げることが出来、一部の細菌を単離培養し保存した。
- ② 恒常性維持に関わる細菌群 (Symbiont) として、Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceae、Bacteroidaceae、Clostridiaceaeを上げることが出来、一部の細菌を単離分離し、保存した。

(3) マウスを用いた細菌叢、及び単離細菌の病理学的検討 (図 2)

- ① mPDAI high scoreサンプルは、low scoreサンプルに比べて、マウス大腸において炎症細胞を優位に増加させた。
- ② (1) ②にて示した症例から得られた細菌は、マウス大腸にて炎症細胞を優位に増加させた。
- ③ これらの結果から、①mPDAI highの患者サンプルには、炎症を引き起こしうる細菌が存在することが示され、その候補として、Fusobacteriaceae、Enterobacteriaceaeを上げることが出来た。さらに、②mPDAI lowの患者サンプルには、可能性として炎症を抑制する細菌が存在することを示し、その候補として、Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceaeを上げることが出来た。

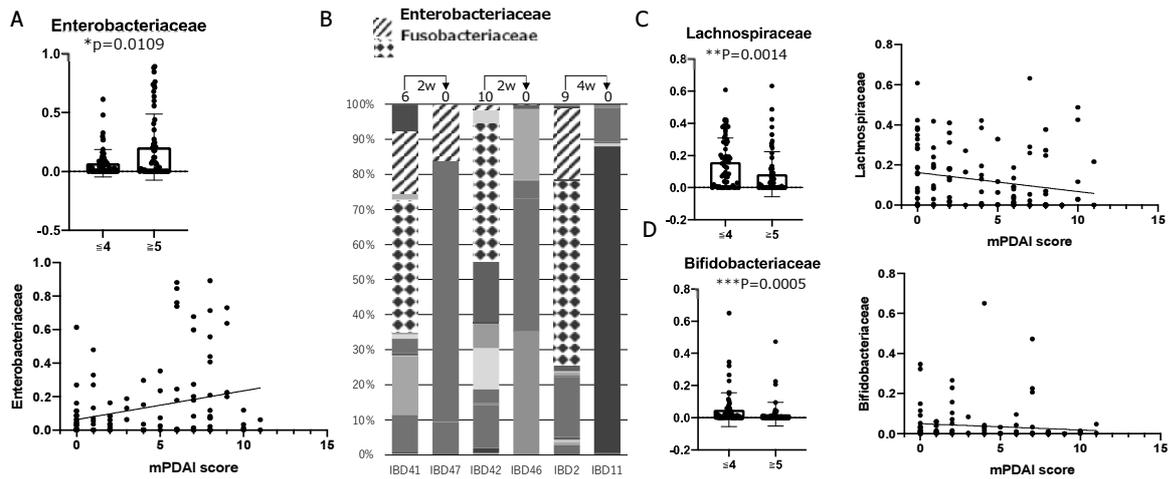


図1. 回腸囊における Pathobiont と Symbiont の候補
 (A) 回腸囊炎患者 (mPDAI が 5 以上: 上グラフの二番目のカラム) にて Enterobacteriaceae が優位に増加しており (上)、その細菌叢における割合と mPDAI score との間には優位な正の相関を認めた ($R=0.2628$, $P=0.0032$) (下)。(B) IBD41-47、IBD42-46、IBD2-11 の 3 人の患者のシプロキササン治療による細菌叢変化を示す。上の矢印 (治療経過を示している) が示すように、mPDAI スコアが 2-4 週間の間に顕著に改善しており、その間に Fusobacteriaceae が消失している。(C, D) 回腸囊を持つが回腸囊炎ではない患者では、Lactospiraceae と Bifidobacteriaceae が優位に増加している。それぞれの割合と mPDAI スコアとの間に、優位な負の相関を認めた (Lactospiraceae: $R=-0.2708$, $P=0.0024$, Bifidobacteriaceae: $R=-0.259$, $P=0.0037$)。

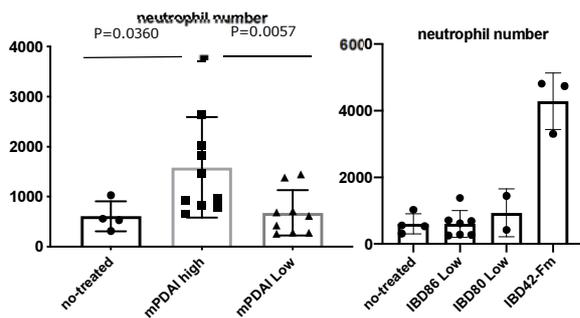


図2. mPDAI high のサンプル (糞便) と Fusol による炎症
 (左) mPDAI スコアが高い患者 (mPDAI high)、低い患者のサンプル (mPDAI Low) をマウスに移植し、移植しなかったマウス (no-treated) と比較した。大腸粘膜固有層における neutrophil が、スコアの高い患者由来サンプルの移植によって優位に増加した。(右) Fusobacteriaceae が優位で抗生剤治療にて完全に消失し、寛解となった患者 (IBD42) から嫌気培養にて Fusol を分離し、マウスに移植した。その結果、スコアの低い患者サンプル (IBD86, 80) に比較し、顕著に neutrophil を増加させた。

4. 研究の反省・考察

現在まで、概ね計画通り研究を遂行することが出来ている。すでに、病因に関連する可能性のある細菌の単離が行われ、マウスへの投与による検討実験が進められている。マウスへの投与実験は、予め抗生剤によるマウス常在細菌の除去をもとに行っているため、マウスの水分摂取が落ち (抗生剤入の水をマウスが嫌うため)、細菌投与前にやや脱水状態となる。これらの影響、さらに、常在細菌叢の除去率などを考慮して、実験結果を考える必要がある。したがって、細菌叢によるマウスへの病原性に関する検討に、無菌マウスを用いた検討も視野に入れて今後の検討を進める予定である。さらに、細菌を種レベルまで決定する必要があるため、さらに deep sequence を行うことも視野に入れて検討を行っていく予定である。

5. 研究発表

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

iPS 細胞由来オータプス培養標本によるシナプス機能評価法開発 ーシナプス対象の神経疾患治療薬創製法開発ー

1. 研究の目的

(1) 目的

本研究の目的はシナプス機能の詳細な解析に適した培養標本であるオータプス培養標本をヒト iPS 細胞より調製し、ハイスループットでニューロンの電氣的活動を評価できる次世代微小電極アレイシステムを用いてシナプス機能のスクリーニング法を開発することにある。具体的には微小孔アレイデバイスを用いてオータプス培養標本を作製する技術を構築するとともに、デバイス上の微小電極アレイを用いてオータプス培養標本の電気活動を計測する技術を構築する。

(2) 背景

アストロサイトがシナプス機能を制御することは既に分かっている。しかし、アストロサイトの密度が変化した場合のシナプス動態は、未知な部分が多い。例えば、1) ニューロンがシナプスを投射する場所(位置)は影響を受けるのか、2) 個々のシナプスにおける開口放出メカニズムの変化はどうなっているのか、3) その生理的意義は何か、などである。本研究で用いた培養標本は、従来の神経生理学研究で用いられる脳スライス標本や分散培養標本とも異なる、全く新しいコンセプトに基づいた再構築型単一ニューロン培養モデルである。この特徴を活かした解析的研究の成果を基に、共存するアストロサイトの密度環境とシナプス動態の相関関係を理論的にモデル化することによって、アストロサイトの密度依存的な環境変化を基軸として高次脳機能の獲得原理を理解することが必要であった。

2. 研究の計画

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

半導体加工技術を利用して、窒化シリコン製の自立膜に微小孔をアレイ状に形成した培養膜を製作する。この培養膜の裏面にアストロサイトを、膜のオモテ面にニューロンを培養することで、微小孔アレイを通じたアストロサイトとニューロンの細胞間コミュニケーションを実現し、オータプス培養標本を作製し得る培養環境を構築する。次に、微小孔アレイを有する窒化シリコン製培養膜のオモテ面に微小電極アレイを形成する。培養膜の裏面にアストロサイトを、オモテ面の微小電極アレイ上にニューロンを播種して共培養を行いながら、微小電極アレイによりニューロンの細胞外電位を計測する技術を構築する。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

まず初めに自己にシナプスを投射する海馬オータプス初代培養標本の作製を行う。続いてこの海馬オータプス初代培養標本を用いてパッチクランプ法を用いたシナプス伝達の解析を行う。さらに、蛍光イメージング法によるシナプス数の解析を行うことで、シナプス数の解析を実施する。

3. 研究の成果

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

直径 $3\mu\text{m}$ の多数の微小孔を形成した厚さ $1\mu\text{m}$ の窒化シリコン製多孔膜と、直径 $300\mu\text{m}$ の円筒状貫通孔を 8×8 個のアレイ状に形成したシリコン樹脂シートを貼り合わせることで、底面に多孔膜を有するマイクロウェルアレイを製作した。このウェル内の膜表面に単一ニューロンを、膜裏面に多数のアストロサイトを共培養することで、オータプス培養標本を構築した。ニューロンとシナプスを免疫染色することで、神経突起に沿って多数のシナプスが形成されていることを確認した。次に、窒化シリコン膜表面の中央部に一辺 $50\mu\text{m}$ の微小電極を 8×8 個のアレイ状に形成するとともに、直径 $5\mu\text{m}$ の多数の微小孔を形成した。膜裏面にアストロサイトを、膜表面にニューロンをそれぞれ培養し、4週間以上に渡り安定してニューロンの細胞外電位を計測することに成功した。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

アストロサイトが高密度になるほど、単一ニューロンにおける興奮性シナプス伝達は大きくなった。形態学的に同定されたグルタミン酸作動性シナプスの数は両者で有意な差は認めな

ったが、伝達物質を放出できる興奮性シナプス（アクティブシナプス）の比率はアストロサイト高密度群では増加しており、逆にシナプス前サイレントシナプスの比率は低い結果であった。これらの結果を踏まえて、健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトを樹立し、マウス海馬ニューロンと組み合わせた単一ニューロン培養標本を作製した。結果、従来のマウス由来のアストロサイトを用いた単一ニューロン培養標本に類似した興奮性シナプス伝達を確認できた (Uchino et al., iScience, 2022)。健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトを除去するとシナプス伝達はほぼ皆無になったことから、健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトは機能的にも重要な役割を果たしていることが分かった。しかし従来のマウスアストロサイトは2週間培養でシナプス伝達を構築できるが、iPS 細胞由来のアストロサイトでは4週間培養を有することも明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

本研究の窒化シリコン多孔膜を用いることでオータプス培養標本を構築できることは確認したが、歩留まりが低いいため、それを改善するデバイス構成とニューロン播種方法の検討が必要である。また、微小電極によるオータプス培養標本の電位計測を実現するために、微小電極上でオータプス培養標本を構築する技術の確立が必要である。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトとマウス海馬ニューロンと組み合わせた単一ニューロン培養標本を作製することに成功したものの、ニューロンはヒト iPS 細胞由来ではない。今後はアストロサイトだけでなく、ニューロンも iPS 細胞由来にした単一ニューロン培養標本を開発する必要がある。ただし、アストロサイトとニューロンで培養期間が全く異なることから、培養時期のタイミングを上手にずらす工夫が必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

【廣瀬伸一】

① Takeda K, Miyamoto Y, Yamamoto H, Ishii A, Hirose S, Yamamoto H.

Clinical features of early myoclonic encephalopathy caused by aCDKL5 mutation. Brain & Development 42 (2020) 73-76 doi:10.1016/j.braindev.2019.08.003

② Suzuki T, Suzuki T, Raveau M, Miyake N, Sudo G, Hirose S, et al.

A recurrent PJA1 variant in trigonocephaly and neurodevelopmental disorders. Ann Clin Transl Neurol 2020; 7(7): 1117-1131 doi: 10.1002/acn3.51093

③ Shibata A, Kasai M, Terashima H, Hoshino A, Miyagawa T, Kikuchi K, Ishii A, Matsumoto H, Kubota M, Hirose S, Oka A, Mizuguchi M. Case-control association study of rare nonsynonymous variants of *SCN1A* and *KCNQ2* in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. J Neurol Sci, 414 (2020) 116808 doi: 10.1016/j.jns.2020.116808

④ Kobow K, Reid C, A, van Vliet E, A, Becker A, J, Carvill G, L, Goldman A, M,

Hirose S, Lopes-Cendes I, Khiari H, M, Poduri A, Johnson M, R, Henshall D, C. Epigenetics explained: a topic "primer" for the epilepsy community by the ILAE Genetics/Epigenetics Task Force. Epileptic Disord Vol. 22, No. 2, 127-141 doi: 10.1684/epd.2020.1143

⑤ Kimura Y, Tanaka Y, Shirasu N, Yasunaga S, Higurashi N, Hirose S.

Establishment of human induced pluripotent stem cells derived from skin cells of a patient with Dravet syndrome. Stem Cell Research 47 (2020) 101857 doi: 10.1016/j.scr.2020.101857

⑥ Hirose S, Tanaka Y, Shibata M, Kimura Y, Ishikawa M, Higurashi N, Yamamoto T,

Ichise E, Chiyonobu T. Application of induced pluripotent stem cells in epilepsy. Mol Cell Neurosci 108 (2020) 103535 doi: 10.1016/j.mcn.2020.103535

⑦ Shibata M, Ishii A, Goto A, Hirose S. Comparative characterization of PCDH19 missense and truncating variants in PCDH19-related epilepsy. J Hum Genet.

2021;66(6):569-78, doi: 10.1038/s10038-020-00880-z

⑧ Uchino K, Kawano H, Tanaka Y, Adaniya Y, Asahara A, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S. Inhibitory synaptic transmission is impaired at higher extracellular Ca²⁺ concentrations in Scn1a(+/-) mouse model of Dravet syndrome. *Sci Rep*. 2021;11(1):10634, doi :10.1038/s41598-021-90224-4

⑨ Uchino K, Ikezawa W, Tanaka Y, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S. Astrocyte Ca²⁺ Signaling is Facilitated in an Scn1a+/- Mouse Model of Dravet Syndrome. *bioRxiv*. 2021;05(18):444602

⑩ Ichise E, Chiyonobu T, Ishikawa M, Tanaka Y, Shibata M, Tozawa T, Taura Y, Yamashita S, Yoshida M, Morimoto M, Higurashi N, Yamamoto T, Okano H, Hirose S. Impaired neuronal activity and differential gene expression in STXBP1 ncephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons. *Hum Mol Genet*. 2021;30(14):1337-48., doi :10.1093/hmg/ddab113

⑪ Higurashi N, Broccoli V, Hirose S. Genetics and gene therapy in Dravet syndrome. *Epilepsy & Behavior Case Reports*. 2021:108043, doi :10.1016/j.yebeh.2021.108043

⑫ Yoshitomi S, Hamano SI, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, Kato M, Kawai K, Kawakami T, Kobayashi K, Matsuishi T, Matsuo T, Nabatame S, Okamoto N, Ito S, Okumura A, Saito A, Shiraishi H, Shirozu H, Saito T, Sugano H, Takahashi Y, Yamamoto H, Fukuyama T, Kuki I, Inoue Y. Current medico-psycho-social conditions of patients with West syndrome in Japan. *Epileptic Disord*. 2021;23(4):579-89, doi:10.1684/epd.2021.1301

⑬ Epi25 Collaborative. Electronic address jcce, Epi C. Sub-genic intolerance, ClinVar, and the epilepsies: A whole-exome sequencing study of 29,165 individuals. *Am J Hum Genet*. 2021;108(10):2024, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.08.008

【桂林秀太郎】

① Uchino K, Ikezawa W, Tanaka Y, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S, Astrocyte Ca²⁺ Signaling is Facilitated in an Scn1a^{+/-} Mouse Model of Dravet Syndrome, **bioRxiv** preprint, DOI : 2021.05.18.444602, 2021

② Uchino K, Kawano H, Tanaka Y, Adaniya Y, Asahara A, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S, Inhibitory synaptic transmission is impaired at higher extracellular Ca²⁺ concentrations in Scn1a^{+/-} mouse model of Dravet syndrome, **SCIENTIFIC REPORTS**, 0634, 2021

【安田隆】

① 吉田悟志, 安田隆, ニューロン細胞外電位の安定的計測を目的とするSiN多孔膜を介した階層型共培養, 電気学会論文誌E, 141(7), 215-221, 2021.

② Yoshida S, Yasuda T. Microelectrode Array with Back-to-back Layered Co-culture of Neurons and Astrocytes, Proceedings of the 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life. Sciences (μ TAS 2021), 707-708, 2021.

③ Nakama A, Yasuda T. Co-culture Device for Single Neuron Analysis Using a Microporous SiN Membrane, Proceedings of the 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021), 587-588, 2021.

④ Iwai S, Yasuda T. Capture and Release of Single Cells Using Microholes for High Throughput Analysis of Single Neurons, Proceedings of the 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021), 263-264, 2021.

(2) 口頭発表

【廣瀬伸一】

- ① Hirose S. Studies on the pathomechanisms of developmental and epileptic encephalopathy using induced pluripotent stem cells. —The 21st Annual Meeting of the Infantile Seizure Society International Symposium on the Pathophysiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy (2020.6.19-21, Okayama Web)
- ② Goto A, Ishii A, shibata M, Ihara Y, Hirose S. Capability of different prediction algorithms to classify phenotype as benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy. — The 21st Annual Meeting of the Infantile Seizure Society International Symposium on the Pathophysiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy (2020.6.19-21, Okayama Web)
- ③ 木許恭宏、前田謙一、池田俊郎、石井敦士、廣瀬伸一、盛武浩、 遺伝子変異を持つ発達性てんかん性脳症の1例—第15回日本てんかん学会九州地方会(2020.7.11 web 配信)
- ④ Hirose S. Application of induced pluripotent stem cells in epilepsy: An overview. 5th Azalea Festival symposium in Pediatric Neurology (Taiwan 2021.3.27-28 ハイブリッド開催)
- ⑤ Hirose S. Drug discovery based on the etiologies of epilepsy using induced pluripotent stem cells— 5th Azalea Festival symposium in Pediatric Neurology (Taiwan 2021.3.27-28 ハイブリッド開催)
- ⑥ 廣瀬伸一、難治希少疾患からの脱皮—ファブリー病から学んだこと 全国ファブリー病患者と家族の会 ウェビナー2021@福岡(2021.3.21) (Web セミナー)
- ⑦ 廣瀬伸一、福岡大学医学部小児科でのてんかんの分子病態研究の歩み 第512回日本小児科学会福岡地方会 (2021.4.10) 福岡
- ⑧ 廣瀬伸一、臨床科でもここまでできた！～福岡大学小児科でのてんかん分子病態研究～ 第88回さが小児科地方会 第212回日本小児科学会長崎地方会合同地方会 (ハイブリッド開催) (2021.7.4.) 佐賀 (web)
- ⑨ 廣瀬伸一、福岡大学でのてんかんの分子病態研究-遺伝子から創薬への道 第44回 日本小児遺伝学会学術集会、第3回 日本ダウン症学会学術集会、第3回 日本ダウン症学会 (2021.11.12-14)
- ⑩ 廣瀬伸一、分子病態に基づくてんかんの根治を目指して 発達生涯研究所 公開セミナー (2021.12.10) 愛知 (Web 開催)

【桂林秀太郎】

- ① 内野 鈺也、田中泰圭、渡辺拓也、窪田香織、桂林秀太郎、廣瀬伸一、岩崎克典、iP 胞由来アストロサイトを実装したオータプス培養標本の確立 第73回日本薬理学会西南部会、2020年11月オンライン
- ② 内野 鈺也、河野洋幸、田中泰圭、安谷屋友菜、朝原愛、弟子丸正伸、渡辺拓也、窪田香織、桂林秀太郎、廣瀬伸一、岩崎克典、Dravet症候群モデルマウスであるScn1a+/-マウスは細胞外Ca²⁺濃度が増加するとシナプス伝達の興奮性と抑制性のバランスが崩壊する、日本薬学会第142年会、2022年3月オンライン

【安田隆】

- ① 吉田悟志、安田隆、SiN多孔膜を介した階層型共培養によるニューロン細胞外電位の安定的計測 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2020年10月27日 オンライン
- ② 安田隆 バイオMEMSの応用による細胞解析デバイスの創製 ～医薬・創薬分野への貢献を目指して～ 情報機構セミナー 2021年9月28日 オンライン
- ③ 安田隆 バイオMEMSを用いた細胞解析技術 R&D支援センターセミナー 2022年3月29日 オンライン

(3) 出版物

無

高効率な無農薬害虫防除に向けた昆虫ウイルス製剤シーズの探索

1. 研究の目的

- (1) 常在性昆虫ウイルスを網羅的に探索・スクリーニング
 - ① 昆虫に感染するウイルスには宿主に顕著な影響を及ぼさないウイルス（常在性昆虫ウイルス）が存在するが、今までほとんど注目されてこなかった。常在性昆虫ウイルスの中には、宿主に対しては無害だが、非宿主に感染すると高い病原性を示すものがある。本研究の目的は、最先端の核酸解析技術を駆使することにより、非宿主害虫に対して高い病原性を示す常在性昆虫ウイルスを網羅的に探索・スクリーニングし、その多様性を俯瞰する。
- (2) 常在性昆虫ウイルスを利用した害虫防除
 - ① 害虫防除資材として有用なウイルスが見つかり次第、製剤化に向けた特許取得、製薬会社への協力要請に取り掛かるなど、無農薬害虫防除資材のシーズとして提示することにある。

2. 研究の計画

- (1) サンプルの昆虫の採集
 - ① ライトトラップを用いるなどして採集を行う。
 - ② どのような昆虫を対象にするかを検討する。
- (2) ウイルスの探索
 - ① 次世代シーケンサーによる解析を行う。得られた核酸配列からDNAウイルスを探索し、昆虫種ごとの常在性昆虫DNAウイルス叢を明らかにする。

3. 研究の成果

- (1) 多種類の昆虫の多個体の採集
 - ① ある昆虫の目の特定の分類群に絞り、約42種について30個体以上の採集に成功した。
- (2) 常在ウイルスと思われるウイルスの発見
 - ① 偶然、南九州大学周辺で採集したハスモンヨトウというガの一種から、イフラウイルス科に属するウイルスと相同の配列が得られた。この配列は滅菌処理した体液の注射により水平伝播することから、ウイルスゲノムであることが示唆され、*Spodoptera litura* Iflavirus (SIV)と命名した。また、蛹の磨砕液を清澄し、密度勾配遠心法を行うことにより、SIVの分離に成功した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 多種類の昆虫の多個体の採集
 - ① どの程度の種数について、どの程度の個体数が必要かは要検討事項であると考えられる。
- (2) ウイルスの探索
 - ① 次世代シーケンサーによる解析は、(1)が終了しないと進めないものであるが、方法を確立するなど予備的な実験を行うべきであった。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
 - ① ハスモンヨトウから発見されたイフラウイルス様配列の系統解析。○佐藤 嘉紀（東京農大・院）・長峯 啓佑（農研機構・生物研）・新谷 喜紀・菅野 善明（南九州大・環境園芸）・足達 太郎（東京農大） 関東昆虫学研究会第4回大会 2021年2月20日

②ハスモンヨトウからみつかったIflaviridae ウイルスの系統解析および伝播性の解明
○佐藤 嘉紀¹・長峯 啓佑²・新谷 喜紀³・菅野 善明³・足達太郎⁴（¹東京農大院・農、²農
研機構・生物研、³南九州大・環境園芸、⁴東京農大院・農）
日本応用動物昆虫学会第65回大会 2021年3月23日～26日 松江

(3) 出版物

なし

2020年度(第45回)学術研究振興資金 学術研究報告

令和4年9月発行

編集 日本私立学校振興・共済事業団
助成部 寄付金課

発行所 日本私立学校振興・共済事業団
〒102-8145 東京都千代田区富士見 1-10-12

TEL 03 (3230) 7315・7319・7320

FAX 03 (3230) 8223

禁無断転載