

2015

平成 27 年度（第 40 回）

学 術 研 究 振 興 資 金

The Science Research Promotion Fund

学 術 研 究 報 告

平成 28 年 10 月

はじめに

この報告書は、平成 27 年度(第 40 回)学術研究振興資金を交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、高等専門学校での学術研究の振興のために、当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 年度に交付を開始して以来、平成 28 年 5 月末までに交付した資金総額は、2,876 件、74 億 8,568 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お礼申しあげる次第でございます。

お蔭をもちまして、当基金の保有額は、平成 28 年 9 月末で、54 億 1,475 万円に達しました。当事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに当基金を充実させたいと考えております。当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。

平成 28 年 10 月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長 河 田 悌 一

目 次

I	平成 27 年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況	1
II	学術研究振興基金 年度別受領状況	2
III	学術研究振興資金 研究分野別交付状況	2
IV	平成 27 年度学術研究振興資金 研究課題一覧	3
V	平成 27 年度（第 40 回）学術研究振興資金 学術研究報告	5

I 平成27年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況

内 訳	区 分	応募		採 択		採択率(%)
		希望額(千円)		交付額(千円)		
		件数(件)		件数(件)		
	合 計	162	374,000	54	89,800	33.3
新規・継続別	新 規	133	293,200	31	50,700	23.3
	継 続 2 年 目	19	46,200	14	22,100	73.7
	継 続 3 年 目	10	34,600	9	17,000	90.0
学校種別	大 学	154	370,000	52	89,200	33.8
	短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	8	4,000	2	600	25.0
研究区分別	人文・社会科学系	53	67,300	18	14,100	34.0
	理工系、農学系	47	129,100	16	29,800	34.0
	生物学系、医学系	62	177,600	20	45,900	32.3

(注) 交付額には、学術研究振興資金の額の確定に伴う過大交付額として平成28年9月に返還された100千円が含まれている。

Ⅱ 学術研究振興基金 年度別受領状況

(単位：千円)

年度 区分	昭和50～ 平成21年度	22年度	23年度	24年度	25年度	26年度	27年度	合 計
経済団体	2,102,328	5,000	0	5,000	5,000	5,000	5,000	2,127,328
個別会社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学校法人	1,453,640	3,109	3,376	708	0	0	0	1,460,833
個人	196,815	201	151	52	1,133	1,022	213	199,587
合 計	5,374,783	8,310	3,527	5,760	6,133	6,022	5,213	5,409,748
基金保有額	5,374,783	5,383,093	5,386,620	5,392,380	5,398,513	5,404,535	5,409,748	-

Ⅲ 学術研究振興資金 研究分野別交付状況

(単位：千円)

年度 研究分野	昭和51～ 平成21年度	22年度	23年度	24年度	25年度	26年度	27年度	合 計
医学	2,560,280	49,200	53,500	53,800	49,400	47,600	36,900	2,850,680
環境科学	181,840	6,500	3,300	13,900	8,700	2,000	1,000	217,240
理学	834,510	5,900	4,100	5,900	22,900	19,200	20,700	913,210
工学	1,584,260	13,500	6,900	8,600	5,000	5,100	2,600	1,625,960
農学	243,100	5,700	15,600	2,800	11,100	8,200	11,500	298,000
文学	653,460	18,800	17,700	9,100	7,100	10,000	7,000	723,160
法学	97,120	2,800	2,400	2,000	0	0	2,300	106,620
経済学	201,380	7,500	8,800	10,700	6,000	2,200	1,400	237,980
家政学	201,460	3,800	2,200	800	2,500	3,500	3,000	217,260
体育学	15,900	4,200	2,200	4,500	0	0	0	26,800
教育学	173,670	1,600	2,800	2,900	2,100	2,200	3,400	188,670
合 計	6,746,980	119,500	119,500	115,000	114,800	100,000	89,800	7,405,580

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

(注) 2. 平成27年度の交付額には、学術研究振興資金の額の確定に伴う過大交付額として平成28年9月に返還された100千円が含まれている。

IV 平成27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	交付額 (千円)	頁
1	北里大学	医学	造血ホルモンとしてのアルドステロン:機能解明と創薬	3,700	6
2	杏林大学	医学	RNA異常をターゲットとした新規抗悪性腫瘍薬の開発	2,600	10
3	東京慈恵会医科大学	医学	植物細胞を用いた安価で安全なライソゾーム蓄積症酵素製剤の開発	1,500	14
4	順天堂大学	医学	蝸牛リンパ液恒常性維持機構の破綻と聴覚神経系の可塑性変化	3,700	18
5	東京医科大学	医学	機能性ナノ磁気微粒子を用いた抗てんかん薬の作用機序の解明	2,500	22
6	日本医科大学	医学	細胞老化による癌発生のメカニズムの解明	3,700	26
7	明治薬科大学	医学	アルツハイマー病創薬のためのヒトミクログリアTREM2シグナル伝達系モデルの樹立	700	30
8	自治医科大学	医学	加齢色素リポフスチン沈着の機序解明と治療薬の開発	2,000	34
9	朝日大学	医学	骨再生に応用する体性幹細胞の分子基盤構築	2,000	38
10	摂南大学	医学	神経変性毒タンパク質の凝集および作用機序の化学的解析	900	42
11	大阪歯科大学	医学	iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究	1,000	46
12	関西医科大学	医学	ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析	1,900	50
13	岡山理科大学	医学	ロイコトリエンB ₄ 受容体の細胞内輸送制御機構の解明	1,500	54
14	川崎医科大学	医学	慢性腎臓病と脳・心血管病との関連機序としての血管内皮機能障害	5,200	58
15	日本薬科大学	医学	ディーゼル排ガス曝露により次世代の神経幹細胞に生じる機能障害	500	63
16	福岡大学	医学	ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定	2,000	67
17	福岡歯科大学	医学	口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの解明	1,500	70
18	広島国際学院大学	環境科学	超高放射能汚染土壌の簡便な除染と食用基準値内の野菜栽培	1,000	74
19	上智大学	理学	有機無機複合型物質によるハイブリッド励起子の生成	1,200	78
20	中央大学	理学	有機元素化学における含ホウ素新奇化合物群の創製と応用	3,700	82
21	東京薬科大学	理学	酸性度評価を指針とする有機酸触媒の合理的な開発	2,000	87
22	日本女子大学	理学	ヒトの染色体DNAにおける複製開始点確立機構の解明	1,200	92
23	光産業創成大学院大学	理学	チャンネル創薬支援に向けた1分子センサーの開発	1,800	96
24	名城大学	理学	先端的有機合成戦略を基盤とする海洋生物活性物質の合成研究	2,400	100
25	関西学院大学	理学	高度な機能が期待される化合物の有機合成による存在実証	2,400	105
26	神戸薬科大学	理学	次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発	6,000	110
27	東洋大学	工学	無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析	1,200	115
28	中部大学	工学	自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発	1,100	119

IV 平成27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	交付額 (千円)	頁
29	大阪成蹊短期大学	工学	廃棄羊毛屑のリサイクルによる高機能再生繊維の作成	300	124
30	東京電機大学	農学	物質生産誘導性ストレスに応答する新奇遺伝子の生理機能解析	900	128
31	東京農業大学	農学	脳栄養学的手法確立による栄養素による脳機能制御機構の解明	4,900	133
32	日本獣医生命科学大学	農学	自然発症性家族性てんかん猫の包括的てんかん研究	1,700	138
33	麻布大学	農学	動物疾患のマイクロバイオーム研究の基盤形成	3,400	142
34	神戸女子大学	農学	再生セルロースの構造設計と親・疎水性の制御	600	147
35	中央学院大学	文学	激甚災害時の文化財保全とその後の整理活用に至る方法論的研究	400	152
36	学習院大学	文学	東アジアの都市における歴史遺産の保護と破壊	1,200	157
37	国土舘大学	文学	ヨルダンの環境と地域構造の変化に関する地理学的研究	1,400	161
38	江戸川大学	文学	大学生のドロップアウト防止のための介入方法の確立	600	166
39	日本福祉大学	文学	福祉社会開発の実践モデルの構築	2,200	171
40	桜花学園大学	文学	暁台・樗良・蕪村における連句手法の総合的研究	300	176
41	京都外国語大学	文学	ニカラグアの考古学及び文献学資料評価と発展への応用	900	180
42	慶應義塾大学	法学	東アジアにおける権威主義国家の議会と選挙	1,400	185
43	龍谷大学	法学	大学におけるシティズンシップ教育の意義と方法に関する研究	900	189
44	成城大学	経済学	環太平洋地域における中小企業支援施策の比較分析	500	193
45	武蔵大学	経済学	保険業の規制に関する総合的研究	400	197
46	立正大学	経済学	国際天然水産資源の総合的フロー分析	500	201
47	大阪青山大学	家政学	インクレチン分泌を促進する食品成分の検索と分泌促進機構の解明	500	205
48	中村学園大学	家政学	乳がんを制御する食因子に関する基礎及び臨床疫学的研究	2,500	209
49	郡山女子大学短期大学部	教育学	微細藻類を利用したバイオテクノロジーの教材開発	300	214
50	国際基督教大学	教育学	私学高等教育の新たな国際化戦略	1,200	218
51	洗足学園音楽大学	教育学	聴覚障害者に対する音楽聴取補助の研究	500	222
52	椛山女学園大学	教育学	小学校教諭および児童への調査に基づく支援体制構築に関する研究	300	227
53	神戸芸術工科大学	教育学	高大連携による理工学系デザイン教育カリキュラムの設計と実践	500	232
54	九州共立大学	教育学	体罰経験が自己肯定意識に与える影響および体罰抑制要因に関する研究	600	237
			交付額計	89,800	

(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. 交付額には、学術研究振興資金の額の確定に伴う過大交付額として平成28年9月に返還された100千円が含まれている。

V 平成 27 年度（第 40 回）

学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	造血ホルモンとしてのアルドステロン:機能解明と創薬		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①アルドステロン ②バソプレシン ③エリスロポエチン ④腎			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
野々口 博史	メデイカルセンター 総合内科	部 長	研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河原 克雅	医 学 部	教 授	光学顕微鏡測定
安岡 有紀子	医 学 部	講 師	In situ hybridization
天羽 康之	医 学 部	教 授	幹細胞培養
三井 純雪	医 学 部	講 師	細胞培養・クローン化
広野 修一	薬 学 部	教 授	In silico 解析
小林 憲忠	メデイカルセンター 研究センター	部 長 補 佐	細胞培養

造血ホルモンとしてのアルドステロン：機能解明と創薬

1. 研究の目的

(1) 腎尿細管でのエリスロポエチン産生の証明

- ① 腎臓は、細胞外液の水電解質組成を制御するだけでなく、生後、造血ホルモン・エリスロポイエチン (Epo) を産生・分泌する唯一の臓器である。腎障害は、Epo 産生能を低下させ貧血を招き、貧血は腎機能を一層低下させるため、腎性貧血の改善は、腎機能維持と心循環系保護に良い影響を与え、生活の質 (QOL) の向上と健康寿命を延長する。しかし、腎臓内での Epo 産生部位、産生機序には不明の点が多く、腎臓の Epo 産生能を維持する保存的治療、薬の開発分野は未開拓である。

私たちは、*In situ* hybridization (ISH) 法を用いて、正常状態のマウス腎皮質部ネフロンで Epo が産生されることを明らかにした (Nagai T et al, Biochem Biophys Res Commun. 2014)。マウスを低酸素あるいは貧血にすることで、尿細管および間質での Epo 産生は増加したが、これまでは腎間質細胞でのみ産生されるとされてきたため、尿細管での Epo 産生機序については全く検討されてこなかった。

副腎皮質ホルモンであるアルドステロンは、容量調節系であるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の最終産物であり、腎集合管のアルドステロン受容体 (Mineralocorticoid receptor, MR) に作用し上皮型 Na チャネル (ENaC) の発現量を増加させ細胞外液量を維持する (Koshimizu TA, Nonoguchi H, et al, Physiol Rev. 2012 ; 92: 1813-64.)。私たちは、アルドステロンが、腎集合管間在細胞 (IC) における酸塩基調節の修飾因子であることを証明した (Izumi Y, Nonoguchi H, et al, J Am Soc Nephrol. 2011;22:673-80)。慢性腎不全進行阻止のための降圧薬では、尿蛋白がある患者においては、ACE-I, ARB といった RA 系阻害薬の有用性が確立している。しかし、RA 系阻害薬投与により代謝性アシドーシスとともに、貧血が生じることも良く知られているが、その原因は明らかでなかった。これらの事を総合的に考慮すると、腎尿細管での Epo 産生は、アルドステロンにより制御されている可能性が高い。この研究の目的は、腎尿細管での Epo 産生を ISH 法以外の方法で確認し、アルドステロンによる Epo 産生調節機構を解明することである。私たちの「アルドステロン=造血ホルモン説」は、この RA 系阻害薬による貧血機序を見事に説明している。アルドステロン産生を低下させる RA 系阻害薬は、Epo 産生も阻害することで、貧血を生じる。RA 系阻害薬による腎性貧血に対する新たな治療的予防法の開発に繋がり、多数の国民を悩ます一般的な貧血に対する治療法の開発も期待される。

- ② アルドステロンによる Epo 産生制御機構の解明

Epo 産生の規定因子としては、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor) 2α が最も重要と考えられてきたが、アルドステロンにより制御されていると言う報告はない。アルドステロンでの Epo 産生制御機構を明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 腎尿細管での Epo 産生部位とその産生機序の解明

- ① 私たちは、マウス腎尿細管 (近位・遠位・集合管) 細胞において、(1) 標準飼育で Epo 遺伝子発現があること、(2) 低酸素環境 (4時間) で、遺伝子発現量が有意に増加することを高感度 Tyramide-ISH 法で証明した。

そこで、単離腎尿細管を用いて、尿細管の部位ごとの Epo 遺伝子発現を real time PCR 法で検討した。まず、尿細管懸濁液を腎皮質、髓質外層、髓質内層の3つの部位に分けて調整する。また、実体顕微鏡下で microdissection にて採取した尿細管を単離採取する。その後、RNA を抽出し、real time PCR を行った。Epo、HIF1 α 、HIF2 α 、PHD2 の尿細管における発現を定量的に測定した。サンプルが極めて微量であるため、RNA 抽出が一番重要であるため、

Dynabeads® mRNA DIRECT Micro Purification Kit (Ambion®)、ArrayPure™ Nano-scale RNA Purification Kit (Epicentre)、RNeasy mini kit (Quiagen)のRNA抽出キットを比較検討した。

さらに、病理学的には、腎性貧血を引き起こしたCd腎症モデルラット腎標本を比較検討した。

3. 研究の成果

(1) 腎尿細管におけるEpo産生部位

- ① まず、RNA抽出法の検討を行った。Dynabeadsh社のキットは、含まれているビーズがreal time PCRに影響していい結果を得られなかった。Epicentre社のキットは、良好であったが、手作業で手間と時間がかかるのが欠点であった。QiagenのRNeasy kitはQiacubeを使用するため30分で抽出が完了し、良好な結果を得ることができ、それを採用した。

腎臓を皮質、髓質外層、髓質内層の3つに分け、尿細管懸濁液(Tubule suspension)を調整し、Epo mRNA発現をまず検討した。内因性コントロールであるGAPDHに対する発現量で比較検討した。Epo mRNA発現量は、皮質、髓質外層において認められ、髓質内層での発現はわずかであった。皮質でのEpo mRNA発現は時間とともに大きく減少し、2時間後には、大きく低下した。そこで、アルドステロンを 10^{-9} M, 10^{-6} Mの濃度で尿細管懸濁液をインキュベートしたところ、皮質及び髓質外層でEpo mRNA発現の増加を認めた。次に、microdissection法で尿細管を単離し、セグメントごとのEpo mRNA発現とアルドステロンの効果を検討した。まず、糸球体から尿流に従って、髓質内層集合管までの部位におけるEpo mRNA発現量を検討した。ほとんどの尿細管セグメントで正常状態においてEpo mRNA発現を認めた。

次にアルドステロンの受容体が発現している遠位部ネフロンでアルドステロンの効果を検討した。アルドステロンは、皮質部及び髓質部ヘンレの太い上行脚(CAL, MAL), 皮質部、髓質外層及び髓質内層集合管(CCD, OMCD, IMCD)のいずれの部位においても、Epo mRNA発現を増加させた。

- ② 次にバソプレシンを用いて、アルドステロンと同様の検討を行った。バソプレシンもアルドステロンと同様に、遠位部ネフロンでのEpo mRNA発現を増加させた。

(2) アルドステロンによるEpo産生制御機構

- ① まず、尿細管懸濁液を用いて、アルドステロンのEpo mRNA発現増加の際のHIF2 α , HIF1 α , PHD2, MR, V2R, V1aRの遺伝子発現の変化を検討した。アルドステロンにより、MR遺伝子発現は増加したが、V2R, V1aR遺伝子発現も増加し、アルドステロンがその核内受容体であるMRのみならずバソプレシン系にも影響していることが明らかとなった。また、アルドステロンはHIF2 α だけでなく、HIF1 α 遺伝子発現も増加させることが明らかとなった。MAL, OMCDを用いて行った同様の検討でも、同じような結果を得た。また、Epo産生を抑制するとされてきたGATA2, GATA3遺伝子発現がアルドステロンにより亢進し、IN-IC細胞において、アルドステロンはGATA2, GATA3の細胞質から核内への移動を促進させることも明らかとなった。以上より、アルドステロンとバソプレシンはHIF2 α の活性化を介して、遠位部ネフロンでのEpo産生を亢進させることが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) 腎尿細管におけるEpo産生部位

- ① 腎尿細管すべての部位において、Epo産生が行われていることが、明らかとなった。
- ② アルドステロンは、髓質部ヘンレの太い上行脚以降の遠位部ネフロンにおいて、Epo mRNA発現を増加させることが明らかとなった。その機序は、HIF2 α の活性化を介するものであることも明らかにした。

(2) 腎近位尿細管でのEpo 産生

- ① 近位尿細管でもEpo産生が行われていることを明らかにしたが、遠位部ネフロンにおけるアルドステロンの様にホルモンでの制御を受けるかどうかについては、今回は検討できなかった。近位尿細管に作用するホルモンを用いての検討を計画している。
- ② IN-IC 細胞を用いての実験は、継代数の増大も有り、十分な検討が行えなかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Yasuoka Y, Sato Y, Healy JM, Nonoguchi H, Kawahara K. pH-sensitive expression of calcium-sensing receptor (CaSR) in type-B intercalated cells of the cortical collecting ducts (CCD) in mouse kidney. Clin Exp Nephrol. 2015; 19:771-782.

(2) 口頭発表

- ① Izumi Y, Yasuoka Y, Nakayama Y, Inoue H, Mukoyama M, Kawahara K, Nonoguchi H. HIF1a and HIF2a-induced erythropoietin production along the nephron. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2015.11.7 San Diego
- ② Yasuoka Y, Oshima T, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Hypercalcemia in mice with high CaP diet co-operatively stimulated renal alpha and beta intercalated cells (IC-A and -B) via basolateral Ca sensing receptor in IC-B. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2015.11.7 San Diego
- ③ Izumi Y, Eguchi K, Nakagawa T, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Nonoguchi H, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH induced gene expressions in the intercalated cells. Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2015.11.7 San Diego
- ④ 泉裕一郎、安岡有紀子、中山裕史、井上秀樹、向山政志、河原克雅、野々口博史。腎尿細管におけるhypoxia-inducible factor 2 α の発現の検討。日本腎臓学会総会。2015.6.5 名古屋
- ⑤ Nonoguchi H, Izumi Y, Yasuoka Y, Nakayama Y, Nagai T, Nanami M, Nakanishi T, Mukoyama M, Kawahara K. Aldosterone and vasopressin are erythropoietic hormones, Annual Meeting of the American Society of Nephrology 2016.11 Chicago (予定)

(3) 出版物

なし

学 校 名	杏 林 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	RNA異常をターゲットとした新規抗悪性腫瘍薬の開発		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①スプライシング ②マイクロRNA ③胆道癌 ④肺癌			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
渡 邊 卓	医 学 部	教 授	研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 西 宏 明	医 学 部	教 授	腫瘍の遺伝子解析、論文の作成
大 塚 弘 毅	医 学 部	助 教	RNAの機能解析
滝 田 順 子	東 京 大 学 医 学 部	准 教 授	ゲノムワイドの解析

RNA異常をターゲットとした新規抗悪性腫瘍薬の開発

1. 研究の目的

我々はこれまで、肺癌や造血器腫瘍の遺伝子異常の解析に精力的に取り組み、特に造血器腫瘍においてRNAのスプライシング異常が深く関与していることを明らかにしてきた。また、肺癌においては分子標的薬の耐性に関与する遺伝子異常に対し、siRNAを用いたRNAターゲティングにより薬剤耐性を克服できる可能性を明らかにしている。これらの知見をもとに、本研究では、各種の悪性腫瘍においてmicroRNAを含むRNAの異常や、その調節機構の破綻の原因となる非翻訳領域の異常について解析を行い、新たな抗悪性腫瘍薬の開発の基礎となる知見を得ることを目指す。これらの研究により、従来の抗癌剤の枠を超えた新規抗腫瘍薬の開発が可能となり、いまだ途上にあるがん征圧に向けた新たな治療戦略の構築に大きく寄与することが期待される。

2. 研究の計画

27年度は、それまでに同定した各種腫瘍に見られるRNA異常およびRNA修飾・調節の異常をターゲットとした治療法の開発を目指した研究を行う予定であったが、これらの異常の検索および解析が遅れているため、以下の項目も引き続き行う。

(1) RNA発現異常の解析

発現アレイを用いて、各種腫瘍におけるRNA発現異常の有無を検索する。

(2) RNAスプライシング異常の同定

① スプライシングアレイを用いて、各種腫瘍におけるスプライシング異常の有無を検索する。

(3) スプライシング関連蛋白の異常の同定

① スプライソソーム等のスプライシング関連蛋白の異常の有無について、エクソーム解析等の手法を用いて検討を行う。

(4) microRNA発現異常の同定

① 上記腫瘍検体から抽出したRNAに対し、アレイを用いたmicroRNA発現解析により、microRNAの発現異常の有無について検索を行う。

3. 研究の成果

(1) RNA異常をターゲットとした治療法の開発

① 胆管癌2株(HuH-28, TKKK)、胆嚢癌5株(TGBC24, TGBC14, TGBC2, NOZ, G415)から抽出した高品質かつ十分量のRNAにて、正常組織のRNAと比較した高精度のスプライシングアレイを完了した。これらの細胞では、癌幹細胞で重要なSLC7A11(xCT)アミノ酸トランスポーターの高発現を認めた。xCTは癌幹細胞のマーカーであるCD44分子のスプライシングバリエントで安定化されることより、CD44のスプライシングバリエントに注目した。その結果、CD44v2-10あるいはCD44v3-10のバリエントを有する細胞株(NOZとG415以外)を同定した。CD44のスプライシング異常はESRP1により引き起されるため、ESRP1の発現を検討したところ、CD44のバリエントタイプを有する細胞のみにESRP1の高発現を認めた。その他のRNA異常として、癌胎児性蛋白分子としても知られるSLC7A5(LAT-1)アミノ酸トランスポーター遺伝子高発現を認めた。SLC7A8(LAT-2)は正常組織にのみ認められるトランスポーターであるが、我々の検討でも同様であった。LAT-1とLAT-2のどちらにもダイマー化する共役分子であるSLC3A2(4F2hC)は腫瘍細胞において比較的高発現していた。悪性度が極めて高い腫瘍において、アルギニン合成酵素の鍵酵素であるASS1が抑制され、その結果腫瘍細胞内のアルギニンが欠乏し、腫瘍細胞内へのアルギニンの取り込みが亢進する腫瘍が存在する。今回の検討でも胆道癌細胞の多くでASS1の低発現が確認された。さらにアルギニンを細胞内に取り込むSLC7A1(CAT-1)アミノ酸トランスポーターの高発現を認めた。非翻訳領域のRNA異常では、胆管癌株TKKKと胆嚢癌株NOZにおいて、乳癌でみられ腫瘍増殖に関与する

Long Noncoding RNA (lncRNA) のCCAT1の高発現を検出した。癌の転移に関わり、乳癌の治療の標的として最近注目されているlncRNAのMALAT1に関しては今回検討した細胞株すべてで発現異常を認めなかった。

- ② 胆道癌14細胞株すべてにおいて、全エクソンシーケンスを施行した。バイオインフォマティクス解析の結果、スプライシング関連遺伝子に変異を認めなかった。主要癌関連遺伝子変異では、胆管癌株HuH-28のRB1、胆嚢癌株G415のARID2の癌抑制遺伝子にsplice site変異を認めた。
- ③ 胆嚢癌株であるTGBC14以外の13株の胆道癌細胞でRNAシーケンスに成功した。その結果、胆管癌株HuH-28およびTFK-1に、我々が知る限り過去に未報告の融合遺伝子異常を検出した。

(2) microRNA発現解析

肺癌患者の血清を用いたcirculating miRNAの定量では、TaqMan法のspike-in controlとして用いる合成cel-miR-39が本解析に応用可能であることを明らかにした。本解析法によるmiR-21とmiR-223の定量において、患者の検体の保存状況が全血室温3時間以内、血清4℃6時間以内であれば、それらの定量の測定値に影響を与えないことを確認した。さらに本解析の測定値に影響する患者因子の検討では、受動喫煙がmiR-21の血中濃度低下に関連することを見出した。

4. 研究の反省・考察

(1) RNA異常をターゲットとした治療法の開発

- ① 胆管癌2株(HuH-28, TKKK)、胆嚢癌5株(TGBC24, TGBC14, TGBC2, NOZ, G415)以外の残りの7胆道癌細胞でも高精度スプライシングアレイで解析中である。それらの細胞株でも今回の検討で明らかにしたRNA異常が高頻度に検出されることが予想される。今後は胆道癌症例の臨床検体でも同様の異常の有無を確認する。システインはSLC7A11(xCT)により細胞内に取り込まれ、抗酸化物質である還元型グルタチオンに変換して、細胞の増殖や様々なストレスからの防御に関与する。xCTによるシステインの細胞内への取り込みは、関節リウマチや潰瘍性大腸炎、クローン病の治療薬として使用されているスルフォサラジンで抑制されることがわかっている。CD44のバリエーションタイプは癌幹細胞のマーカーとして知られ、癌幹細胞の抗癌剤耐性を克服する治療として、スルフォサラジンを使用する胃癌治療の臨床試験が進行中である。我々の胆道癌の検討でもCD44バリエーション異常を高頻度に有し、胆道癌においてもゲムシタピンなどの抗癌剤耐性克服にスルフォサラジンが有効であるかどうかを検証する予定である。SLC7A5(LAT-1)は胆道癌細胞に高発現し、正常細胞においてアミノ酸を取り込むトランスポーターとして主要な働きをするSLC7A8(LAT-2)の発現が極めて低い。このことは胆道癌治療においてLAT-1を標的とする妥当性を与える。このRNA異常を標的にする治療としてLAT-1阻害剤であるJPH203が開発され、前臨床研究も開始されている。本阻害剤のオーファンドラッグ認定のための申請基礎データとして本研究の成果を役立てる予定である。またLAT-1はホウ素中性子捕捉療法(BNCT)のホウ素を取り込むことが知られている。今後は腫瘍組織におけるLAT-1高発現がBNCTの効果予測のバイオマーカーとなるかどうかを検討する。さらによりLAT1に特異的に取り込まれるホウ素製剤の開発を目指す予定である。膵臓癌や肝臓癌、肺癌や悪性胸膜中皮腫など悪性度が極めて高い腫瘍の中には、癌細胞の増殖や生存にアルギニンの必要性が極めて高い腫瘍が存在する。胆道癌でもアルギニン合成酵素であるASS1が低発現でSLC7A1(CAT-1)が高発現しており、胆道癌でもアルギニンの必要性が高いことが予想される。アルギニンの癌細胞内への取り込みを抑制する治療薬としてADI-PEG20が開発され肝臓癌のフェーズ3臨床試験、膵臓癌のフェーズ1試験で好成績を示した。胆道癌でも同じ治療が有効であるかどうかを検討する。非翻訳領域のlncRNA異常では、CCAT1を標的にする治療としてBET阻害剤が応用できることが知られており、乳癌ではその治療が注目されている。CCAT1を高発現した胆道癌でもBET阻害剤が有効であるかどうかを検討する予定である。

- ② RB1、ARID2癌抑制遺伝子のsplice site変異とスプライシング異常との関係を検討する。機能解析により本変異がスプライシング異常を通してがん抑制機能に異常をもたらしていることを確認する。治療薬の開発研究までには至っていないが、今後本変異を標的として、がん抑制機能を回復する治療法を見出したい。
 - ③ 胆道癌症例の臨床検体において今回新たに検出された融合遺伝子異常の有無を確認する。全エクソンシーケンスにより見出された他のドライバー遺伝子異常との比較や本融合遺伝子異常の機能解析にて、本遺伝子異常が腫瘍形成におけるドライバーな異常であることを確認する。治療薬の開発研究までには至っていないが、本融合遺伝子異常が腫瘍の主要なドライバー遺伝子異常であることが確認されれば、本異常をターゲットにした治療法の開発に取り組みたい。
- (2) microRNA発現解析
- 肺癌患者の血清を用いたcirculating miRNAの定量では、安定な測定値を得ることができる解析法を開発した。本解析法によって、現在客観的な評価法を有さない受動喫煙を定量化できる可能性を見出した。本解析法は肺癌特に受動喫煙による肺癌の病態の理解のために大いに貢献できると考えた。現在、肺癌症例におけるmRNAについては検体の収集をほぼ終えており、解析も行っているが、一部手術後の検体の収集が未完結である。今後はプロスペクティブに症例検討を行い、microRNA異常と受動喫煙、発癌との関連性を検証していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yoshiyama A, Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Tajima T, Aoyagi T, Mochizuki K, Satomi K, Ichimura S. Development of Stemness in Cancer Cell Lines Resistant to the Anticancer Effects of Zoledronic Acid. *Anticancer Res.* 2016 Feb;36(2):625-31.
- ② Kobayashi T, Masaki T, Nozaki E, Sugiyama M, Nagashima F, Furuse J, Onishi H, Watanabe T, Ohkura Y. Microarray Analysis of Gene Expression at the Tumor Front of Colon Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Dec;35(12):6577-81.
- ③ 相磯 聡子, 関根 名里子, 高城 靖志, 大西 宏明. Spike-in controlを用いた血中マイクロRNAの測定における検体保存温度および時間についての検討. *臨床病理* 2015 63巻6号 Page688-693.
- ④ 横山 政明, 大西 宏明, 大塚 弘毅, 渡邊 卓, 大倉 康男, 古瀬 純司, 杉山 政則. 胆道癌における増殖シグナル伝達因子の発現と遺伝子変異の多様性 KRAS変異の胆道癌バイオマーカーとしての可能性. *胆と膵* 2015 36巻2号 Page143-151.

(2) 口頭発表

相磯 聡子, 関根 名里子, 高城 靖志, 大西 宏明, 渡邊 卓. 喫煙が健常人血中miR-21レベルに及ぼす影響. 第62回日本臨床検査医学会学術集会平成27年9月19—22日. 岐阜.

(3) 出版物

なし

学 校 名	東京慈恵会医科大学	研究所名等	総合医科学 研究センター
研 究 課 題	植物細胞を用いた安価で安全なライソゾーム蓄積症 酵素製剤の開発 ー酵素製剤に対する免疫寛容導入もめざしてー	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ライソゾーム蓄積症 ②酵素補充療法 ③中和抗体 ④アレルギー反応 ⑤中枢神経障害		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 橋 十 也	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	教 授	研究代表者、総括、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
井 田 博 幸	医 学 部	教 授	研究への助言、データ整理
小 林 博 司	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	准 教 授	動物実験
嶋 田 洋 太	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	助 教	治療効果の生化学的検討
樋 口 孝	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	助 教	抗体の測定、フローサイトメトリーなどの免疫学的 検討
藤 山 和 仁	大 阪 大 学 生物学国際交流センター	教 授	植物細胞を用いた組み換え酵素の作成

植物細胞を用いた安価で安全なライソゾーム蓄積症酵素製剤の開発 —酵素製剤に対する免疫寛容導入もめざして—

1. 研究の目的

ライソゾーム蓄積症はライソゾームに存在する水解酵素の遺伝的欠損により中枢神経障害をはじめとする様々な症状を呈する疾患群である。ライソゾーム酵素は細胞表面上にある受容体により細胞内に局在する性質があり、それを利用して現在、40疾患あるライソゾーム蓄積症の内7疾患に対して欠損する酵素を経静脈的に補充する酵素補充療法が行われているが問題点も多い。その中で重要なものとして、中枢神経系に効果がないこと、中和抗体が出現したりアレルギー反応が出現したりなどの酵素に対する免疫応答が惹起されたりすること、酵素が非常に高価であり費用対効果が低いことなどが挙げられる。本研究の目的は植物細胞の発現系を用いて、これらの問題点を克服することである。今年度は、ムコ多糖症II型、ならびにゴーシェ病を対象に研究を進めた。それぞれの疾患に対する研究目的は以下の通りである。

- (1) ムコ多糖症II型：ムコ多糖症II型は中枢神経障害を呈するため、脳へ酵素を到達させることが治療上重要である。腸管で吸収された蛋白質は効率良く脳内に取り込まれるとの報告がある。植物細胞内で発現している蛋白質は植物細胞の特有の細胞壁のため胃内で分解を受けず、効率良く腸内に到達する。その性質を利用して植物細胞にムコ多糖症II型の欠損酵素であるIduronate 2-sulfatase (IDS)を発現させ経口投与しムコ多糖症II型の中枢神経障害の治療を目指す。もう一つは大量の酵素を経静脈的に投与すると脳内へある一定程度酵素が到達することが知られている。ただ大量の酵素を経静脈的に投与すると酵素に対して免疫応答が起り治療効果の減弱やアレルギー反応が起こることが予測される。それを回避する目的で経口免疫寛容導入を、IDS発現植物細胞で行う。以前我々は酵素を経口投与すると免疫寛容が導入できることを報告したが、大量の酵素が必要であった。最近、酵素を発現している植物細胞を経口投与することにより、先に述べた理由で腸管細胞に効率よく酵素が導入出来て免疫寛容が導入されたという報告がある。よってまずIDS発現植物細胞を経口投与し免疫寛容を導入した後に大量のIDSを経静脈的に投与しムコ多糖症II型の中枢神経病変の治療を目指す。
- (2) ゴーシェ病：ゴーシェ病の欠損酵素 (glucoerebrosidase, GC) の酵素製剤は植物細胞を使用して作成されたものが既にある。この場合ニンジンの細胞を使用している。今回我々はタバコの細胞を使用する。タバコ細胞は様々な変異体があり、ライソゾーム酵素の細胞への取り込みを担う糖鎖の改変が容易である。また植物細胞は動物由来の成分を含まずHIVなどの感染症の危惧が少なくまた培養も安価である。

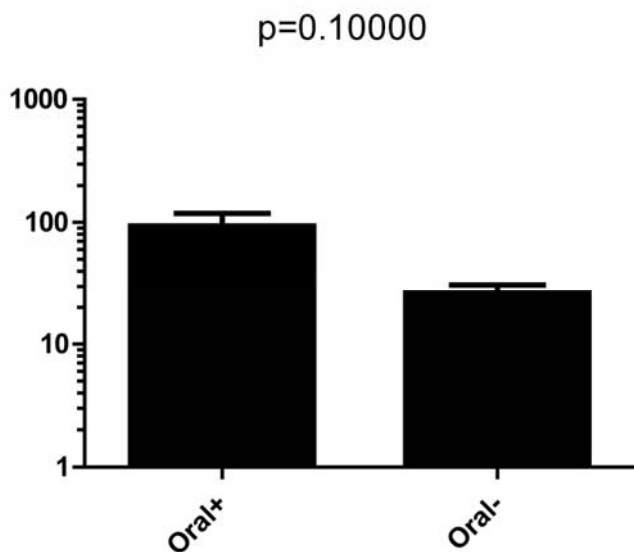
2. 研究の計画

- (1) ムコ多糖症II型：昨年度は植物細胞においてIDSを発現させ組換え酵素の作成を行った。今年度は、IDSを発現させた植物細胞 (カルスの状態) の経口投与による免疫寛容誘導を検討した。ワイルドタイプのC57BK/6マウスを使用し、植物細胞の細胞壁を破壊しないような状態までホモジェネートし、顕微鏡で植物細胞が形態を保っていることを確認後、経口投与した。この植物細胞懸濁液を3日連続経口投与し、その後、既存の酵素補充療法 (エラプレース®) を1 mg/kgを7日ごとに4回マウスに尾静脈投与し、経口投与が抗体産生に与える影響を検討した。4週間後に静脈採血を行い、血液中の酵素に対するIgG抗体価をELISA法により定量した。
- (2) ゴーシェ病：昨年度は植物細胞でRNAiでN-acetylglucosaminyltransferaseをノックアウトし植物特有の糖である、fucose、xloseを減少させたhigh mannose型のGCを作成し、ゴーシェ病の主な罹患細胞であるマクロファージにマンノース受容体を介して取り込まれることが明らかとなった。今年度は、本酵素をマウスに静脈内投与し、各臓器での活性の上昇を検討した。ワイルドタイプのC57BK/6マウスを使用した (三協ラボより購入)。本マウスに90単位

/kgの量の2種類のGC（ワイルドタイプのGCとfucose xloseを減少させたhigh mannose typeのGC、それぞれGC^{WT}とGC^{gnt1}と略す）を尾静脈より投与した。コントロールとしてPBSを同量投与した。投与後60分にマウスをPBSにて還流後、安楽死させ、脾臓、肝臓、肺、腎臓を採取した。採取後20mMリン酸バッファーpH7.2/20mM ascorbic acid/1% Triton X-100でホモジェナイズし酵素源とした。基質は4MU-glycopyranosideを用い活性を測定した。

3. 研究の成果

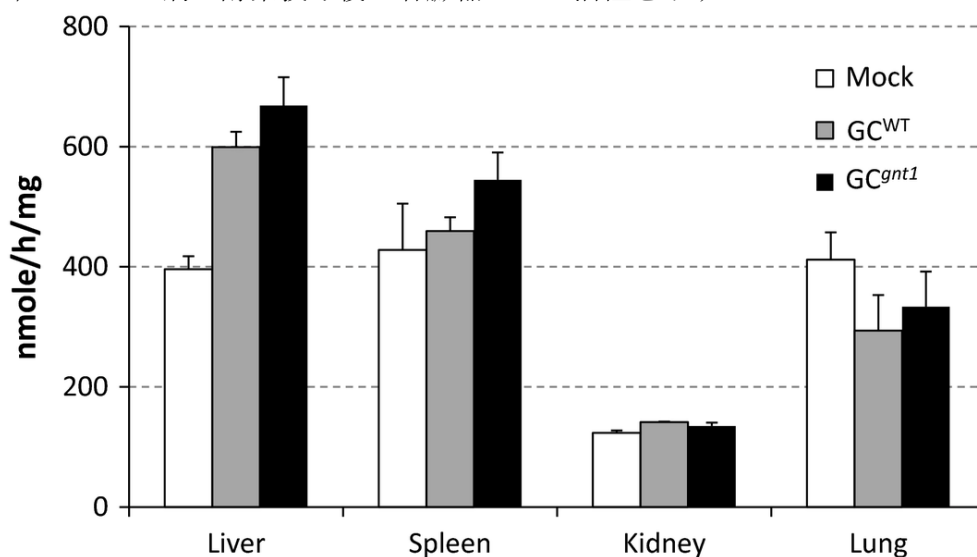
(1) ムコ多糖症II型：ELISA法で定量した酵素に対するIgG抗体価を示す



脚注：Oral+経口投与群 Oral-経口非投与群

IDS発現植物細胞の経口投与によって明らかな抗体産生抑制効果は認められなかった。

(2) ゴーシェ病：酵素投与後の各臓器でのGC活性を示す



脚注：MockはPBSを投与したマウス。

GC^{WT}とGC^{gnet1}ともに肝臓、脾臓で酵素活性が上昇した。一方腎臓、肺では酵素活性の上昇は認められなかった。しかしながらGC^{WT}とGC^{gnet1}の間には肝臓(p=0.267)、脾臓(p=0.171)で差が認められなかったが、GC^{gnet1}の方がGC^{WT}と比べ高い傾向はあった。

4. 研究の反省・考察

- (1) ムコ多糖症II型：IDS発現植物細胞の経口投与によって短期的には抗体産生抑制効果は認められなかった(p=0.0100)。期待していた効果が得られなかった原因としては、投与した植物細胞の量が少なかった、抗体産生に影響するエピトープの発現が不十分だった、観察期間が不十分だったなどの要素が影響していると考えられた。今後は、より多くの植物細胞懸濁液を、より頻回、かつ多くの回数を投与し、長期に観察を行い、抗体価の測定を行う予定である。また、経口投与による免疫寛容誘導ではエピトープの発現が重要であるため、ウエスタンブロットなどによる酵素蛋白の機能評価も必要になると考えられた。さらに、ムコ多糖症II型モデルマウスを使用することによって、より実際の免疫反応現象に近い系での評価検討も必要と考えられた。
- (2) ゴーシェ病：作成された酵素はゴーシェ病の主な罹患臓器である肝臓、脾臓で活性の上昇が認められた。以上よりin vivoにおいても本植物細胞由来の酵素はゴーシェ病に治療薬として有用である事が判明した。しかしながら今回の検討ではゴーシェ病モデルマウスではなくワイルドタイプマウスを使用しているため、酵素のバックグラウンドが高く、正確な活性上昇の評価が困難であった。またそれ以上に、酵素の静脈内投与により蓄積物質であるglucocerebrosidaseが減少させられるかどうかの検討が出来なかった。今後、ゴーシェ病モデルマウスでの検討を予定している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Limkul J, Iizuka S, Sato Y, Misaki R, Ohashi T, Ohashi T, et al. The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Biotechnol J* 2016 Feb 12.

(2) 口頭発表

The Production of Human Glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* Plants. 第57回日本先天代謝異常学会、2015、大阪

(3) 出版物

なし

学 校 名	順 天 堂 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	蝸牛リンパ液恒常性維持機構の破綻と聴覚神経系の可塑性変化 ー内耳イオン環境と聴覚神経の変性・回復機構ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①遺伝性難聴 ②ギャップ結合 ③コネクシン ④細胞治療 ⑤遺伝子治療 ⑥電位依存性Na ⁺ チャネル ⑦聴覚神経回路 ⑧再生医療			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
神 谷 和 作	医 学 部	准 教 授	動物実験の実施・解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
池 田 勝 久	医 学 部	教 授	臨床データとの比較解析・研究の総括
井 下 綾 子	医 学 部	助 教	聴力検査・解析
岡 田 弘 子	医 学 部	助 教	遺伝子解析と臨床データ解析
城 所 淑 信	医 学 部	助 教	分子生物学的解析
飯 塚 崇	医 学 部	非常勤助教	遺伝子治療実験

蝸牛リンパ液恒常性維持機構の破綻と聴覚神経系の可塑性変化 —内耳イオン環境と聴覚神経の変性・回復機構—

1. 研究の目的

遺伝性難聴は約1600出生に一人と高頻度に発生し、近年までに様々な原因遺伝子が同定されている。その中で圧倒的多数を占めるのが、コネキシン等の蝸牛内リンパ液イオン組成の恒常性維持機構に関連した遺伝子群の変異である。この恒常性維持機構は突発性難聴、加齢性難聴にも関わることが知られており、聴覚障害の臨床において最も重要な生理機構であることが明らかとなってきた。最近我々は遺伝性難聴で世界最大の原因であるコネキシン (Cx) 26の変異がギャップ結合複合体の劇的崩壊現象を引き起こし、上記恒常性を破綻させ難聴を発症させることを発見した (Kamiya, *J Clin Invest*, 2014, 時事通信、日経産業新聞2014年3月他)。同遺伝性難聴では脳への聴覚伝達が低下し、神経可塑性による変性を示すことが予測される。一方で有毛細胞感覚毛の配列異常で周波数認識異常を有する新たな聴覚障害も発見した (Kamiya, *PNAS*, 2014, 科学新聞2014年7月他)。この聴覚障害では、内リンパ液の動的恒常性は維持し、脳への周波数特異的な神経情報伝達のみが異常となる。我々は以前、多能性幹細胞の内耳移植により蝸牛リンパ液恒常性を回復させ、聴力改善を導く方法を開発した (Kamiya, *Am. J. Pathol.* 2007, 読売新聞2007年6月他)。

末梢 (内耳) の聴覚入力情報を中枢 (脳) に伝達し、可塑的な神経発達を促すためには神経細胞の電位依存性ナトリウムチャンネル (Nav) による活動電位発生が必須であることが知られている。聴覚系では主に2型 (Nav1.2) と6型 (Nav1.6) が機能しており、可塑的な神経ネットワーク形成に寄与している。我々は以前、難治性てんかん患者からNav1.2変異を同定、これによる脳萎縮と発達障害を示すメカニズムの一端を解明、Nav1.2が発達脳の神経ネットワーク形成に重要な役割を担うことを報告した (Kamiya, *J Neurosci*, 2004, 日経産業新聞、薬事日報、他)。

本研究では蝸牛内リンパ液電位維持機構とその破綻による聴力障害メカニズム、およびそれに対応した可塑的な脳の神経ネットワーク形成変化を解明し、これらを制御する遺伝子、タンパク質、脂質による分子経路、更には聴覚回復に重要な分子制御メカニズムを独自の遺伝子改変難聴モデルにより明らかにする。本研究により将来的な聴覚障害患者に対する内耳治療と、それに並行し聴覚神経賦活を目的とした聴覚リハビリテーション治療を視野に入れた、遺伝性難聴の根本的治療法の開発が期待できる。

2. 研究の計画

(1) 平成27年度

蝸牛内リンパ液恒常性維持機構の破綻による難聴病態の分子経路と悪性化因子の同定

遺伝性難聴で最も頻度の高いCx26変異難聴のモデル動物により、我々はギャップ結合複合体の生化学的崩壊という新しい分子病態が恒常性維持機構を破綻させることを発見した (Kamiya, *J. Clin. Invest.* 2014)。当該年度はこの病態の制御機構を同定する。これまでカベオリン分子の増加やギャップ結合間の脂質集積が発見されたが、既知薬理活性ライブラリを用いて更に詳細な分子病態経路や新たな悪性化因子の特定を行う。

1. 【蝸牛ギャップ結合崩壊の *in vitro* 評価系の作製】 コネキシン遺伝子を可視化するため、Cx26野生型、変異体およびCx30遺伝子にEGFP (緑色蛍光) およびmCherry (赤色蛍光) のタグを付加した発現用プラスミドから難聴患者に対応した様々な安定発現細胞株を作製。これにより遺伝性難聴のギャップ結合を再現する最適条件 (プラスミド、培地組成、観察条件等) を決定する。
2. 【薬理反応による病態分子経路の同定：1. 構造的・生化学的評価】 上記のギャップ結合評価系に既知薬理活性化化合物ライブラリ (1280種、LOPAC@1280, SIGMA-ALDRICH) を添加しギャップ結合プラークの構造安定化に対する有効性を解析。構造安定化に寄与する化合物

の薬理活性情報より生化学的分子経路の絞り込みを行う。

3. 【薬理反応による病態分子経路の同定：2. 生理的評価】上記で選抜された薬剤添加細胞に物質透過能（蛍光色素透過試験）を指標とした薬理活性解析を行い、更なる病態制御機構の絞り込みを行う。

3. 研究の成果

- (1) 蝸牛ギャップ結合崩壊の *in vitro* 評価系の作製

我々はGJB2変異型遺伝性難聴の *in vitro* 評価系としてmCherry、GFP、V5を付加したCX26野生型、R75W変異型およびCX30野生型発現プラスミドを作製し安定発現株を樹立した。全ての細胞が培養細胞において蝸牛同様のギャップ結合プラークの形成パターンを有し薬剤評価用細胞として有用と考えられた。

- (2) 薬理反応による病態分子経路の同定

これらの評価用細胞を用い、GJP形成の評価を行ったところ、既知化合物からGJPの集積安定化に効果のある3種の化合物を選抜した（未発表データ）。化合物情報から悪性化に関与する分子経路の推測が可能となり更に候補化合物を探索している（未発表データ）。選抜された3種の化合物を様々な条件下で難聴モデルマウス内耳への局所投与を行ったところこのうち1種の化合物では20KHzで約25dbの聴力改善が確認された（未発表データ）。現在、同化合物を用い、安定して聴力改善効果が得られる最適投与条件を探索している。今後は同化合物の既知薬理活性情報から更なる候補化合物を探索し、薬剤選抜を進める予定である。

- (3) 遺伝子治療によるギャップ結合プラークの修復と聴力回復

更に我々はギャップ結合プラーク修復のためにアデノ随伴ウイルスによるCx26遺伝子導入を行い有意な聴力回復効果が確認された。

(Iizuka, Kamiya, *Hum Mol Genet*, 2015, 朝日新聞、読売新聞、NHKニュース2015年4月他)

4. 研究の反省・考察

- (1) 蝸牛ギャップ結合崩壊の *in vitro* 評価系

開発した細胞におけるギャップ結合プラークはmCherry、GFP、V5等の融合タグの負荷により細胞膜に局在する効率がタグ負荷のない発現タンパク質に比べて低下していた。これはタグタンパク質不可による分子サイズの増大により、細胞膜への輸送・挿入が困難となり、合成されたタンパク質が細胞質やゴルジ体に蓄積したことによると考えられる。今後は融合タグ付きギャップ結合プラークにおいてもタグ負荷のないギャップ結合プラークと同様の細胞膜発現効率を示す培養条件の検討を検討する。タグ融合ギャップ結合プラークの効率的な発現誘導により、ギャップ結合プラークのライブイメージングが可能となり、病態メカニズムのさらなる解析および効果的な薬剤の有効性判定が可能となることが期待できる。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等

- ① 神谷和作.

【内耳研究最前線1】 蝸牛イオン輸送に不可欠なコネキシンによる新たな生化学機構. *Otology Japan* **25**, 119-122, 2015

- ② 福永一朗, 畠山佳欧里, 池田勝久, 神谷和作.

蝸牛に発現するケモカインおよびその受容体を応用した内耳細胞治療法の開発. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* **33**, 102, 2015

- ③ 神谷和作, 池田勝久.

コネキシンが構成するギャップ結合プラーク形成変化によるGjb2変異型難聴の病態機構. *Audiology Japan* **58**, 615-616, 2015

- ④ 城所淑信, 神谷和作, 美野輪治, 池田勝久.
Brn4-K0マウスにおけるギャップ結合プラークの崩壊. *耳鼻咽喉科ニューロサイエンス* **29**, 14, 2015
- ⑤ 安齋崇, 神谷和作, 池田勝久.
コネキシン26遺伝子改変マウスにおけるカベオリン2の集簇. *Audiology Japan* **58**, 617-618, 2015
- ⑥ 安齋崇, 神谷和作, 池田勝久.
遺伝性難聴における蝸牛コルチ器の変性とカベオリンの集積. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* **33**, 115, 2015
- (2) 口頭発表
- ① Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Ayumi Fujimoto, Atena Nishikawa, Takashi Anzai, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda
Cochlear gap junction plaque, stabilized macromolecular complex composed of specific connexins
52nd Inner Ear Biology Workshop, イタリア・ローマ, 2015年9月13日
- ② 神谷和作, 池田勝久
コネキシンが構成するギャップ結合プラーク形成変化によるGjb2 変異型難聴の病態機構
第60回日本聴覚医学会総会 2015年10月23日
- ③ 神谷和作
GJB2変異遺伝性難聴に対する細胞治療・遺伝子治療法の開発
第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日
- (3) 出版物
- ① Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Kazuma Kobayashi, Asuka Miwa and Katsuhisa Ikeda.
Differentiation of iPS Cells to Cochlear Cells are Regulated Depending on the Part of Co-cultured Organs. *J Otol Rhinol S1*, 34-36, 2015
- ② KamiyaK.
Inner ear cell therapy targeting hereditary deafness by activation of stem cell homing factors. *Frontiers in pharmacology* **6**, 2, 2015
- ③ Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama and Katsuhisa Ikeda.
Connexin26 regulates assembly and maintenance of cochlear gap junction macromolecular complex for normal hearing.
AIP Conference Proceedings **1703**, 30018:30011-30013, 2015
- ④ IizukaT., KamiyaK., GotohS., SugitaniY., SuzukiM., NodaT., MinowaO., and IkedaK.
Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. *Human molecular genetics* **24**, 3651-3661, 2015
- ⑤ Hiroko Okada, Kazusaku Kamiya, Takashi Iizuka and Katsuhisa Ikeda.
Postnatal Development and Maturation of the Vestibular Organ in Dominant-Negative Connexin 26 Transgenic Mouse. . *J Otol Rhinol S1*, 37-40, 2015
- ⑥ AnzaiT., FukunagaI., HatakeyamaK., FujimotoA., KobayashiK., NishikawaA., AokiT., NodaT., MinowaO., IkedaK., and KamiyaK.
Deformation of the Outer Hair Cells and the Accumulation of Caveolin-2 in Connexin 26 Deficient Mice.
PLoS one **10**, e0141258, 2015

学 校 名	東 京 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	機能性ナノ磁気微粒子を用いた抗てんかん薬の作用機序の解明 －抗てんかん薬バルプロ酸の標的分子の探索－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①てんかん ②バルプロ酸 ③機能性ナノ磁気微粒子 ④成体脳のニューロン新生 ⑤海馬			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 龍 徳	医 学 部	主 任 教 授	研究総括および実験計画の立案

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
半 田 宏	医 学 部	特 任 教 授	バルプロ酸結合分子の同定
大 山 恭 司	医 学 部	准 教 授	てんかんモデルマウスの作製
柏 木 太 一	医 学 部	助 教	バルプロ酸結合分子のPC12細胞における解析
篠 原 広 志	医 学 部	助 教	脳におけるバルプロ酸結合分子の発現解析
権 田 裕 子	医 学 部	助 教	てんかんモデルマウスの組織学的解析

機能性ナノ磁気微粒子を用いた抗てんかん薬の作用機序の解明 —抗てんかん薬バルプロ酸の標的分子の探索—

1. 研究の目的

- (1) てんかんの発症率は人口の約1%であり、身近な疾患の1つである。多くの場合、20歳までに発症するが、近年では高齢化に伴い晩発性のてんかんも増加してきている。また、てんかん患者による交通事故など社会的な問題とも密接にかかわっている。現在では、てんかん発作の70~80%は適切な薬剤の投与でコントロール可能であるとされているが、抗てんかん薬の作用機序については明らかになっていない部分が多い。

てんかんを抑制する抗てんかん薬には様々な種類があるが、小発作に大発作が合併する場合の第1選択薬は、バルプロ酸である。バルプロ酸は、抗てんかん薬としての働きに加えて、うつ病等の気分障害の治療薬としても広く用いられている薬物である。抗てんかん薬としてのバルプロ酸の作用は、現在のところ、GABAトランスアミナーゼ阻害効果により、異常興奮を抑制することにあると考えられている。しかし、バルプロ酸が直接結合する標的分子や細胞内で起こる分子カスケードは全く分かっていない。また、最近になってバルプロ酸はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤として働き、遺伝子の転写を抑制することが報告されている。しかし、エピジェネティックな遺伝子の調節機構が抗てんかん作用と関係しているのかはわかっていない。また、バルプロ酸には催奇性があり、妊娠初期の服用には注意が必要であるが、その作用機序も分かっていない。このように、有効な抗てんかん薬であり、その服用には注意が必要であるにもかかわらず、その作用機構が未だに明らかになっていない。その最大の原因は、バルプロ酸の標的分子が解明されていないことにある。

本研究では、機能性ナノ磁気微粒子によるバルプロ酸標的分子の同定と、新規てんかんラットモデルによるバルプロ酸の評価から、バルプロ酸の作用機序を解明することを目的としている。

- ① まず第1に、バルプロ酸の標的分子を、半田宏が開発したナノビーズによる分子探索法を用いて同定する。半田宏は自身が開発した機能性ナノ磁気微粒子である「半田ビーズ」を用いて、催奇性薬物であるサリドマイドの標的タンパク分子セレブロンを発見した業績を持っており、薬物に結合する分子を探索するための高い技術を持っている。本研究ではこの技術を用いる。
- (2) てんかん発作に伴う組織病変に対するバルプロ酸の効果を検討する。正常な海馬歯状回の顆粒細胞層では細胞が密に並んでいるが、てんかん患者では、顆粒細胞が分子層側に分散することが知られている。この分子層側への細胞移動はてんかん患者の海馬の異常な興奮と関係することが推測されるが、いままでラットのてんかんモデルでは、このような現象を引き起こすことができなかった。
- ① この点に関して、研究代表者の石龍徳は、最近海馬歯状回の顆粒細胞に存在する未熟なニューロン (新生ニューロン) が、分子層側に分散するてんかんラットモデルを開発した。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、解析するために、このてんかんモデルラットと同等のモデルをマウスで開発する。
- (3) バルプロ酸結合分子が明らかになったら、その分子に関する遺伝子改変マウスを作製し、てんかん発作におけるバルプロ酸結合分子の機能を明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) バルプロ酸標的分子の探索
- ① 機能性ナノ磁気微粒子にバルプロ酸を結合させる。
- ② マウス脳抽出液とバルプロ酸結合機能性ナノ磁気微粒子を混合し、バルプロ酸に結合する標的分子を機能性ナノ磁気微粒子に結合させる。

- ③ 溶出後SDS-PAGE、銀染色、質量分析によって精製した分子の構造を決定する。
 - ④ バルプロ酸結合分子の海馬における分布を調べる。
 - ⑤ バルプロ酸結合分子の発現をin vitroで調べる系を確立する。
- (2) 新規てんかんマウスモデルを用いたバルプロ酸の抗てんかん作用の解析
- ① ノックアウトマウスで実験するため、新たにマウスを用いててんかんモデルを作製する。
 - ② マウスにアセチルコリン受容体刺激剤のピロカルピンを投与してけいれんを起こさせる。
 - ③ 免疫組織化学法により、神経前駆細胞、未熟ニューロンに特異的な分子を染色し、異常な細胞の有無を検討する。
 - ④ てんかん発作マウスに対するバルプロ酸の影響を調べる。
- (3) バルプロ酸結合分子に関連する遺伝子改変マウスを作製する。

3. 研究の成果

- (1) バルプロ酸標的分子の探索
- ① バルプロ酸標的分子の候補分子を決定することができた。それは、膜輸送関連分子DM73（仮称）であった。
 - ② DM73のマウス海馬における分布を調べたところ、海馬全体で見られたが、とくに錐体細胞の細胞体に強く発現していた。しかし、ニューロン新生が行われる顆粒細胞下帯では発現が低下していた。また、てんかんラットモデルの海馬では、顆粒細胞や錐体細胞に障害が見られる部分では、その発現が低下していた。しかし、顆粒細胞に障害が見られる部分では、NeuNなどの他のタンパクの発現も低下しているので、DM73に特異的な変化ではないと考えられる。PC12細胞において、DM73の発現を調べたところ細胞体に発現が見られたので、in vitroでDM73の動態を解析できる可能性が出てきた。
- (2) 新規てんかんマウスモデルを用いたバルプロ酸の抗てんかん作用の解析
- ① てんかんラットモデルを作製したときと同じ条件でピロカルピンを投与し、マウスにてんかん発作を起こさせる実験を行ったが、同じ条件では全く発作を起こさなかった。そこで、投与量を増加させるなどして、様々な条件を検討したが、43匹中1匹（2.3%）しかけいれん発作を起こさなかった。
 - ② 文献を詳細に検討したところ、我々の用いているC57BL/6はてんかんを起こしにくい系統であることが明らかになった。しかし、多くの遺伝子改変マウスがこのC57BL/6をバックグラウンドに持つため、遺伝子改変マウスでてんかんの研究をするためには、C57BL/6でけいれん発作を起こさせる系を開発することは必須である。さらに多数の文献を検討した結果、若年ラットでのてんかん発作が温度依存性であるとの文献を見出した。そこで、室温31℃の中で実験を行ったところ、25匹中15匹（60%）でけいれん発作を観察した。けいれん発作を起こしたマウスの海馬の形態を解析したところ、神経前駆細胞の形態に異常が見られた。

4. 研究の反省・考察

- (1) バルプロ酸標的分子候補をかなり早い時期に同定できたのは幸運であった。ただし、この分子が真の標的分子であるかどうかを今後は十分に検討する必要がある。
- (2) てんかんモデルラットの系を、マウスに変更するだけの実験から始めたが、ラットとマウスではけいれん発作に対する感受性がかなり異なることが明らかになった。また、文献からC57BL/6は、ピロカルピンによってけいれん発作が誘導されにくい系統であることが明らかになった。しかし、C57BL/6は遺伝子改変マウスが多数作製されているマウスの系統であり、このC57BL/6でけいれん発作を起こさせる系を確立することは、てんかん研究の重要なポイントであると考え、今後は、C57BL/6のけいれん発作に対する温度の影響を解析することを課題の一つとすることを考えている。この系が確立されれば、最終目的である、バルプロ酸標的分子の解析に役立つと同時に、遺伝子改変マウスを用いた総てのてんかん研究に役に立つと考

えている。今後は、より詳細に条件を検討して、ピロカルピンで確実にけいれん発作を誘導できる系を確立したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, Hitoshi S (2015) Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci.* 2015 Nov 17. [Epub ahead of print].

(2) 口頭発表

① Kashiwagi T, Shioda S, Seki T: BMP signaling induce Gfap-expressing NSCs which restrictedly exist in the developing hippocampus. 第38回日本神経科学大会（神戸）プログラム p148 (1P015), 2015. 7. 28.

② Shinohara H, Shioda S, Seki T: Cell-tracing analysis for progenitor cell migration in the embryonic dentate gyrus. 第38回日本神経科学大会（神戸）プログラム p149 (1P022), 2015. 7. 28.

③ 篠原広志, 塩田清二, 石龍徳：細胞移動を基軸とする海馬歯状回形成のメカニズム探索. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会（福島）講演プログラム・抄録集 p153(1P-87), 2016. 3. 28.

④ 柏木太一, 塩田清二, 石龍徳：胎生期海馬歯状回形成過程におけるBMPシグナルの役割. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会（福島）講演プログラム・抄録集 p153(AP-88), 2016. 3. 28.

(3) 出版物

石龍徳（2015）12章 §1 神経系の発生. 所収：「小児脳神経外科学」（改訂2版、山崎麻美、坂本博昭編集）金芳堂, pp927-947.

学 校 名	日 本 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	細胞老化による癌発生メカニズムの解明 ーテロメア長短縮化の発がんへの関与の解明ー		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①加齢 ②細胞老化 ③発癌 ④テロメア長 ⑤先天性角化不全症 ⑥慢性炎症性疾患		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
猪 口 孝 一	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究代表者、研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 口 博 樹	医 学 部	准 教 授	研究分担者、症例蓄積の統括、各分野の研究データの統括、造血器系のテロメア長測定、ゲノム解析
岡 田 尚 巳	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、in vitroウイルススペクター作成
内 田 英 二	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、消化器系症例の蓄積、消化器系のテロメア長測定、ゲノム解析
弦 間 昭 彦	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、呼吸器系症例の蓄積、呼吸器系のテロメア長測定、ゲノム解析
久 保 田 馨	医 学 部	准 教 授	研究分担者、呼吸器系症例の蓄積、呼吸器系のテロメア長測定、ゲノム解析
佐 伯 秀 久	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、皮膚科系症例の蓄積、皮膚科系のテロメア長測定、ゲノム解析
前 田 美 穂	医 学 部	教 授	研究分担者、小児科系症例の蓄積、小児科系のテロメア長測定、ゲノム解析
瀧 澤 俊 広	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、組織学的検体種別、各組織のテロメア長測定
金 田 誠	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、iPS細胞作製、in vitroでのiPS機能実験

細胞老化による癌発生のメカニズムの解明 ーテロメア長短縮化の発がんへの関与の解明ー

1. 研究の目的

老化と癌化には深い相関関係があると想定されるが、その詳細な因果関係は不明である。細胞老化にはテロメア短縮化により細胞分裂が停止するテロメア依存性細胞老化と、活性酸素種、放射線、癌遺伝子発現亢進といったテロメア短縮化に依存しないストレス細胞老化とがある。細胞老化はp53-p21waf1/Cip1経路やp16Ink4a-RB経路といった増殖抑制因子群の活性化を引き起こし不可逆的に細胞分裂が停止しアポトーシスへと誘導をする。このように細胞老化は加齢に伴う個体老化を導く負の側面がある一方で、正常細胞に発癌の危険性が生じた際に作動する癌抑制機構の側面もある。

加齢によって悪性腫瘍の発生率が高くなることから、細胞老化による癌抑制機構の破綻は発癌において最も重要な機序であると考えられる。たとえばテロメアの短縮化した細胞にp53などの変異がはいると、DNA損傷チェックポイントによって染色体末端融合などが引き起こされ染色体不安定性が亢進する。しかし現時点で悪性腫瘍発生における細胞老化による癌抑制機構の活性低下や破綻の機序に関しては不明な点が多い。その理由の一つとしてこれまでの研究が生体とは異なる非生理的な環境でのin vitroでの細胞実験や、ヒトと比較して寿命が短く、ヒトより4-5倍長いテロメア長をもつマウスを用いたin vivoでの解析が多く、ヒト本来の老化と癌化の関係は未だ不明と言って過言ではない。

ヒトのテロメア長短縮化による発癌モデルとして先天性角化不全症(DKC)という先天性疾患がある。DKCはテロメアを制御する遺伝子の変異によってテロメア長の短縮化が通常に加齢よりより早く進行し、細胞老化の過剰促進によって造血器、消化器、皮膚、肺などの幹細胞が枯渇することで様々な臓器障害が発生する。そして高率に多臓器悪性腫瘍を発生することも知られており、テロメア依存性細胞老化と癌化を研究するうえで良いヒトのモデルとなり得る。またテロメア長は生後から加齢に伴いS字カーブを描いて短縮化をするが、60歳以降の短縮化は個人差が大きく、特に炎症性疾患を合併した臓器では他と比較して短縮化の進行が大きいと思われる。実際に慢性炎症性疾患は発癌の高リスク因子であることが知られているが、細胞老化の促進が発癌リスクを高めている可能性が高い。以上より高齢者慢性炎症性疾患患者もテロメア長短縮化による発癌モデルとして良い研究対象であると考えられる。

本研究はDKC症例や高齢者慢性炎症性疾患症例を解析することで、悪性腫瘍発生における細胞老化による癌抑制機構の破たん機序を解明し、ヒトにおける老化と癌化の関係を明らかにすること、癌発生の予想バイオマーカーの抽出、さらには癌発生の予防医療への発展を目的としている。

2. 研究の計画

(1) DKC症例における各臓器のテロメア長短縮化の評価

DKC症例において炎症性消化管粘膜障害から消化器癌、間質性肺炎から肺癌、皮膚炎より皮膚癌、骨髄不全症から造血器腫瘍などを高率に発症する。このことは各臓器における炎症性病変やサイトカイン刺激による細胞増殖がテロメア長の短縮化を促進させて発がんリスクを増加させると予想する。そこでDKC症例において、表皮、肺組織、胃粘膜組織、口腔粘膜組織、骨髄、末梢血などの各組織における正常部位と炎症病変部位、並びに同部位に発生した悪性腫瘍のテロメア長をq-FISH法やq-PCR法などで明らかにする。

(2) テロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の探索

加齢による悪性腫瘍の発生には、p53変異のようなp53-p21waf1/Cip1経路やp16Ink4a-RB経路の変異によって細胞老化による癌抑制機構の破たんがその一つの機序として考えられている。しかし悪性腫瘍におけるこれらの経路の遺伝子変異の検出は半数にも満たない。このことはテ

ロメア長が短縮化した細胞において細胞老化による癌抑制機構の破たんを引き起こす未知の遺伝子変異の存在を示唆する。そこで上述のテロメア長短縮化を評価した同一症例の各組織に対して次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを行い、各組織のテロメア長短縮化とゲノム不安定性のプロファイリング、癌化へ導く新規の遺伝子変異の探索を行う。

3. 研究の成果

(1) DKC症例における各臓器のテロメア長短縮化の評価

テロメア長測定にはサザンブロット法、FlowFISH法、FISH法、q-PCR法などがあるが、骨髄や末梢血以外の微小な組織検体のテロメア長測定にはサザンブロット法やFlowFISH法は向いていない。そこで感度が良いq-PCR法によるテロメア長測定が必要になるが、これまで報告のあるq-PCR法によるテロメア長測定はテロメア長の定量性が不安定で確立されたプロトコールはない。本研究計画ではテロメア長の定量性に対して安定かつ再現性があるq-PCR法の開発が必要であった。まずテロメアリピート配列に対しての間欠的シーケンスを有する特異プライマーの構築を行った。Forwardプライマー(tel1 primer)は3' 端より6、12、18、24、30、32-37塩基が、Reversプライマー(tel2 primer)は6、12、18、24、30、34-39塩基がヒトテロメアTTAGGG繰り返し配列とミスマッチの配列となっている。このミスマッチによってそれぞれのprimerはヒトテロメア配列にannealingすることが可能であるが、tel1 primerとtel2 primerはどのような形でannealingをしても、3' 端の塩基がミスマッチとなりprimer dimmerによる増幅が起こらない様に工夫をしている。この新規primerによるq-PCR法によってテロメア長の定量性に対して安定かつ再現性があるq-PCR法が可能となった。

(2) テロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の探索

DKC症例に対して次世代シーケンサーを用いて各組織のテロメア長短縮化とゲノム不安定性や癌化へ導く新規の遺伝子変異の探索を行った。この結果として①テロメラーゼ複合体遺伝子群の1つである *telomerase-associated protein 1 (TEP1)* 変異、②Shelterin複合体遺伝子群の1つである *adrenocortical dysplasia homolog (ACD(TPPI))* 変異、③DNAヘリカーゼ遺伝子群である *Bloom syndrome, RecQ helicase-like (BLM)* 変異と *BLM 5'-to-3' DNA helicase(PIF1)* 変異との複合ヘテロ変異、*Werner syndrome, RecQ helicase-like (WRN)* 変異と *RecQ protein-like 4(RECQL4)* との複合ヘテロ変異を発見した。

- ① TEP1はそのN端側のp80ホモロジドメインを介してTERCと結合し染色体末端のテロメアにテロメラーゼ複合体をリクルートする作用があるのではないかと推測されているが、テロメア短縮補正に対しての機能は明らかになっていない。またTEP1はmajor vault protein (MVP)、vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPARP)、1種類の非翻訳RNAと共にボルト (vault) と呼ばれる細胞質内で最大の分子量を持ち幅広い真核生物種に存在する核酸-タンパク質複合体を構成する。ボルトの細胞内機能に関しては核-細胞質間物質輸送や多剤耐性がん細胞における抗がん剤の核外排出、細胞内シグナリングや自然免疫反応への関与などが報告されているが、依然として不明な点が多い。今回DKCにて発見した変異は、1症例はnonsense mutationもう1症例はframeshift mutationで、p80 homologyドメインを保存しC末端のWD40リピートドメインなどが欠損する変異であった。
- ② ACD変異は1症例に認められ、すでにDKCの原因遺伝子として同定されているTINF2結合領域の一塩基変異であった。TRF1やTRF2などのShelterin複合体を構成する他のテロメア結合タンパク質は概して、テロメラーゼの作用を活性化せずに、むしろ阻害することが多いが、ACDはPOT1やTINF2と複合体を形成しヒトテロメラーゼコア酵素の活性と伸長能を増大させると考えられている。
- ③ DNAヘリカーゼ遺伝子群はDNA/DNAやDNA/RNAの二本鎖構造あるいはRNAの二次構造を、水素結合を切断することによりときほぐして一本鎖にする機能をもつ。DNAの複製、修復、組み換え、RNAの転写、スプライシング、蛋白への翻訳などに幅広く関与すると考えられているが、RecQタイプのDNAヘリカーゼ遺伝子ファミリーは、ヒトにおいては少なくとも5種類以上

のメンバーからなることが知られている。そのうちの3種類は、高発がん性をともなう遺伝性早老症であるウェルナー症候群、ブルーム症候群、ロスマンド・トムソン症候群の原因遺伝子（WRNヘリカーゼ、BLMヘリカーゼ、RECQ4ヘリカーゼ）として同定され、いずれもDKCと同様に細胞内のテロメア長短縮がその病態に関与していると考えられている。現在新規に発見したこれらの遺伝子変異のin vitroでの機能解析を行っている。

4. 研究の反省・考察

(1) DKC症例における各臓器のテロメア長短縮化の評価

骨髄や末梢血以外の微小な組織検体のテロメア長測定を行うために新規primerによるq-PCR法を開発することに成功した。現在DKC症例において、表皮、肺組織、胃粘膜組織、口腔粘膜組織、骨髄、末梢血などの各組織における正常部位と炎症病変部位のテロメア長測定を行っているが、それぞれの部位における悪性腫瘍の検体の収集や解析が限られた臓器でしか行うことができていない。

(2) テロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の探索

上述のようなテロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の候補を発見することができた。現在これらの遺伝子変異を有するcDNAを作成しレトロウイルスベクターを用いてテロメラーゼ陰性のVA13細胞などに遺伝子導入を試みているが、遺伝子変異導入効率が悪くこれらの遺伝子変異を安定して発現している細胞株を作成することに難渋をしている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Yui S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. *Int J Hematol.* 2015 Nov;102(5):544-52.
- ② Moriya K, Niizuma H, Rikiishi T, Yamaguchi H, Sasahara Y, Kure S. Novel Compound Heterozygous RTEL1 Gene Mutations in a Patient With Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* in press.
- ③ 山口博樹. 骨髄不全症候群におけるテロメア制御異常. *日本医科大学雑誌.* 2015; 11(3): 136-144.

(2) 口頭発表

Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Yui S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. 第77回日本血液学会. 2015年 10月 金沢.

(3) 出版物

山口博樹, 猪口孝一. 再生不良性貧血と骨髄異形性症候群: 汎血球減少の臨床的な鑑別. *血液内科.* In press.

学 校 名	明 治 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	アルツハイマー病創薬のためのヒトミクログリアTREM2 シグナル伝達系モデルの樹立 -ミクログリア創薬モデル系樹立に関する研究-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①アルツハイマー病 ②ミクログリア ③TREM2 ④細胞モデル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐 藤 準 一	薬 学 部	教 授	研究代表者・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
紀 嘉 浩	薬 学 部	講 師	実験・データ解析・論文作成

アルツハイマー病創薬のためのヒトミクログリアTREM2シグナル伝達系モデルの樹立 —ミクログリア創薬モデル系樹立に関する研究—

1. 研究の目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は、中高年期に脳の神経細胞外にアミロイドベータ(amyloid-beta)と神経細胞内にリン酸化タウ(phosphorylated tau)と呼ばれる異常なタンパク質が凝集蓄積し、神経細胞死を来し、進行性の認知機能障害を呈する難病で、根本的な治療薬はない。ADの発症は遺伝的因子(APOE, ABCA7, BIN1, CASS4, CD33, CD2AP, CELF1, CLU, CR1, DSG2, EPHA1, FERMT2, HLS-DRB5-DBR1, INP5D, MS4A, MEF2C, NME8, PICALM, PTK2B, SLC24H-RIN3, SORL1, ZCWPW1)などのリスク遺伝子多型と環境要因(加齢、食事、運動、糖尿病など)の複雑な相互作用で規定されている。ApoE 遺伝子ε4 ホモ接合体の保有者は、AD発症リスクが12倍上昇する。近年、飛躍的に進歩した次世代シーケンサーによる遺伝子解析技術を用いて、全エクソーム解析(Whole exome sequencing; WES)により、triggering receptor expressed on myeloid cells 2(TREM2)遺伝子の多型 rs75932628(R47H)が、AD発症リスクを3倍上昇させることが報告された(Jonsson T et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368: 107-116, 2013)。TREM2は破骨細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球に発現し、脳ではミクログリア限局的に発現し、TREM2(リガンドが結合する受容体)-DAP12(シグナル伝達のアダプター)複合体を形成している。TREM2 遺伝子または DAP12(TYROBP)遺伝子の完全な機能喪失変異では、多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症を特徴とする那須・ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)を発症する。ADとNHDは進行性認知症という点で共通点を有する。

NHDは臨床経過から4つの病期に分類される。第1期は20歳頃までの無症候期(latent stage)である。生まれつきDAP2, TREM2の遺伝子変異が存在しているにも関わらず、小児期の発育発達には異常が見られない。第2期は20歳代に始まる骨症状期(osseous stage)である。この時期には四肢の長管骨の骨端部に、骨嚢胞が多発して病的骨折と骨痛を呈する。軽微な外力でも骨折を反復する。第3期は30歳代に始まる早期精神神経症状期(early neuropsychiatric stage)である。この時期には、脱抑制、多幸症、人格障害、言語障害などの前頭葉症状を主徴とする精神症状が明らかになる。てんかん発作は稀ではない。CTやMRIでは、前頭葉と側頭葉を主座とするび慢性かつ左右対称性の白質病巣、脳萎縮、脳室拡大、基底核石灰化が見られる。SPECTやPETでは、前頭葉、基底核、視床の血流低下と糖代謝低下を認める。第4期は40歳代以降に始まる晩期精神神経症状期(late neuropsychiatric stage)である。この時期には認知機能障害(cognitive impairment)が徐々に進行し、50歳頃までに失外套状態を呈して、嚥下性肺炎などの感染症を契機に死亡する。患者は日本とフィンランドを中心とする北欧に集積しているが、広く世界中から200例以上の報告が蓄積している。

TREM2のリガンドとしては現在まで菌体成分、アニオン脂質、核酸、アポトーシス神経細胞、ミエリンデブリス、HSP60, amyloid-beta, ApoEが報告されている。TREM2のR47Hは exon 2に存在し、細胞外Igドメインのリガンド結合部位に該当する。従ってH47ではミクログリアのTREM2リガンド結合能低下が示唆される。AD脳では活性化ミクログリアの集積を認め、TREM2陽性ミクログリアは老人斑のamyloid-betaやアポトーシスに陥った神経細胞の貪食除去に関与していると考えられる。しかし現在まで(1)ADにおける内在性TREM2特異的リガンド、(2)AD発症におけるTREM2-R47H変異の意義は解明されていない、(3)TREM2-DAP12を標的とするヒトミクログリア創薬モデル系は樹立されていない。本研究ではADおよびNHDの病態の解明のため、①TREM2-DAP12恒常的発現ヒトミクログリアの樹立、②TREM2リガンド候補の同定を目的とする。

2. 研究の計画

- (1) TREM2-DAP12安定発現ヒトミクログリアHMO6の樹立
 - ① 遺伝子導入: Flag-TREM2(R47, H47), DAP12をそれぞれ発現ベクターに組み込み、ヒトミクログリア細胞株HMO6(Cell Mol Neurobiol 31: 1009, 2011; この細胞はTREM2陰性, DAP12陰性である)に導入し、TREM2陽性DAP12陽性の薬剤耐性安定細胞株を樹立する。H47はQuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent)を用いて、変異を導入して作成する。変異はシーケンスで確認する。選択用の薬剤はBlasticidin, Hygromycinを用いる。
 - ② 免疫細胞染色とウエスタンブロットでTREM2, DAP12の発現を確認する。抗体はTREM2 (R & D, AF1828), DAP12(Santa Cruz Biotechnology, FL113)を用いる。
- (2) TREM2リガンド候補の同定
 - ① 組換えヒトTREM2タンパク質の作成: リガンドの同定には純度が高い大量のTREM2タンパク質が必要である。そのためTREM2細胞外ドメイン部分(aa.19-172)に、N末端にシグナルペプチドとFlagタグ、C末端にHisタグを付加してpDESTベクターにクローニングし、カイコBacmidシステム(静岡大学グリーン科学技術研究所所長朴龍洙教授および北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室前仲勝実教授より提供を受けた)を用いてBmNPV-SigFlagTREM2(R47 or H47)Hisを作成する。カイコではヒトに類似したタンパク質の翻訳後修飾が認められる利点がある。両者をおのおのカイコ5令幼虫に感染させ、体液中にFlagTREM2(R47 or H47)Hisを分泌させてHisカラムとFlag抗体ビーズで精製する。
 - ② TREM2リガンド候補との結合実験: 上記のFlagTREM2(R47, H47)Hisとヒト神経細胞膜画分から抽出したTREM2リガンド候補Xと結合させ、Flag抗体ビーズでプルダウンアッセイを行う。

3. 研究の成果

- (1) TREM2-DAP12安定発現ヒトミクログリアHMO6の樹立
 - ① TREM2-R47/DAP12, TREM2-H47/DAP12を発現するHMO6細胞株を各2株樹立出来た。免疫細胞染色とウエスタンブロットでTREM2(細胞膜), DAP12(細胞質)の発現を確認した。現在Flag抗体ビーズで刺激し、DAP12のITAMドメインチロシンリン酸化を確認する実験を計画中である。
- (2) TREM2リガンド候補の同定
 - ① カイコBacmidシステムを用いてBmNPV-SigFlagTREM2(R47 or H47)Hisを作成し、カイコ5令幼虫に注入して組換えタンパク質を得た。ウエスタンブロットでTREM2, Flag, His抗体に対する反応性を確認した。現在TREM2リガンド候補タンパク質を用いて、プルダウン実験を計画中である。

4. 研究の反省・考察

- (1) TREM2-DAP12安定発現ヒトミクログリアHMO6の樹立
 - ① TREM2-R47/DAP12, TREM2-H47/DAP12を発現するHMO6細胞株を各2株樹立出来たが、HMO6の増殖速度が極めて早いため、TREM2の発現が必ずしも安定ではなく、継代培養中に発現レベルが低下するトラブルに直面した。従ってこれらの細胞におけるTREM2-DAP12シグナル伝達系の解析が当初の予定より遅れている。今後、限界希釈法などでクローン化して安定化発現細胞を樹立する予定である。
- (2) TREM2リガンド候補の同定
 - ① カイコBacmidシステムを用いてBmNPV-SigFlagTREM2(R47 or H47)Hisをカイコ5令幼虫で発現させて組換えタンパク質を大量に産生することが出来た(朝比奈直弘, 修士論文)。しかしながらタンパク質を大量に産生させると凝集してしまうトラブルに直面した。今後リコンビナントタンパク質やリガンドの濃度や反応時間など結合条件を至適化する必要がある。

(3) 考察

ミクログリアは脳微細環境(microenvironment)の変化を常時監視しており、傷害神経細胞や不要なシナプス、タンパク質凝集体などを積極的に除去して、中枢神経系組織の恒常性維持に働いている。ミクログリアのTREM2-DAP12シグナル伝達系は、炎症を伴わないアポトーシス神経細胞の貪食受容体として重要な役割をしていると考えられている。TREM2にリガンドが結合すると会合しているDAP12のC末端側に存在するimmunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)部位が、チロシンキナーゼSrcによりリン酸化され、さらにチロシンキナーゼSykが会合して自己リン酸化され、多様なシグナル伝達因子(PI3K, PLC, PKC, MAPK)を經由して、下流にシグナルを伝達する。最近、システムズバイオロジー研究により、DAP12はアルツハイマー病脳遺伝子ネットワークの中心分子として働くことが明らかにされた(Zhang B et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. Cell 153: 707-720, 2013)。さらにTREM2は細胞膜メタロプロテアーゼであるADAM10により切断されて、N末端側がsTREM2として細胞外へ放出され、C末端側は膜内でガンマセクレターゼにより切断される。sTREM2の機能は全くわかっていない。TREM2-DAP12シグナルは樹状細胞やマクロファージでは、Toll様受容体(TLR)を介する炎症反応を抑制する。すなわちDAP12またはTREM2の欠損細胞では、lipopolysaccharide(LPS)やCpG DNAによるTLR刺激を介する炎症性サイトカインやI型インターフェロンの産生が亢進している。TREM2は樹状細胞に発現しているSEMA6D受容体Plexin-A1とも結合し、DAP12はTREM2以外にもTREM1やbeta2インテグリンとも会合し、その場合は刺激強度に依存して活性化シグナルを伝達する。DAP12またはTREM2の欠損マウスではミクログリアの顕著な減少が見られるが、NHDと異なり白質脳症は見られない。TREM2のハプロ不全マウスではamyloid-betaのcompactionが障害されている。このようにTREM2-DAP12シグナル伝達系は非常に複雑であり、TREM2とDAP12の機能障害に関してマウスとヒトで異なる所見があり、ヒトミクログリアでTREM2のリガンドを明らかにすることは非常に重要である。本研究ではTREM2-DAP12を構成的に発現するヒトミクログリアモデルの樹立とリコンビナントTREM2タンパク質の大量産生に成功したが、TREM2の新規リガンドの同定には至っていない。技術的な問題を克服して当初の目標をクリアしたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Satoh J, Kino Y, Niida S. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. Biomarker Insights 10: 21-31, 2015.
- ② Satoh J, Kino Y, Motohashi N, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. Immunohistochemical characterization of CD33 expression on microglia in Nasu-Hakola disease brains. Neuropathology 35: 529-537, 2016.
- ③ Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. Neuropathology 35: 39-49, 2016.
- ④ 佐藤準一: 那須・ハコラ病の脳分子病態. BRAIN and NERVE 68: 543-550, 2016.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	加齢色素リポフスチン沈着の機序解明と治療薬の開発 ー加齢シグナルとその薬物反応を明らかにする研究ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①加齢色素 ②副腎皮質 ③受容体 ④遺伝子改変動物モデル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
興 水 崇 鏡	医 学 部	准 教 授	研究統括、網羅的解析、質量分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
谷 口 淳 一	医 学 部	講 師	責任遺伝子スクリーニング、細胞内情報伝達の解析
土 屋 裕 義	医 学 部	講 師	ゲノム修飾解析、細胞モデル系の確立
藤 原 葉 子	医 学 部	ホ ^ス トドクター	転写因子部位の解析、個体での化合物評価

加齢色素リポフスチン沈着の機序解明と治療薬の開発 —加齢シグナルとその薬物反応を明らかにする研究—

1. 研究の目的

(1) 研究の全体像；老化に伴い生体に起こる器質的变化は多様である。疾患に直接関与する動脈硬化や血管の石灰化などについては多くの研究成果が得られているが、加齢に伴う色素性物質の沈着については、その機序を含め未だ不明な部分が多い。本研究では、正常な加齢現象に伴い非脂肪細胞内に色素性の蓄積が起こる過程について、そのメカニズムを検討する。特に本研究は、副腎に早期より加齢色素が沈着し、ステロイドホルモンの分泌障害が伴うユニークな加齢モデルを利用することを特徴とする。このモデル動物はホルモン受容体をノックアウトしたマウスであることより、受容体を介する細胞内情報伝達系が加齢色素沈着に関わる接点の解明と沈着過程をコントロールする方法の開発を目的とする。

加齢色素の物質的正体は未だ解明されていない。少数ではあるがこれまでの報告によると、脂肪酸を含む脂質や、過酸化脂質成分が多く含まれると予想される。この脂質成分の網羅的な解析により、G蛋白質共役型受容体を介する加齢変化成立機序について世界で初めて明らかにする。さらに本研究により、過酸化脂質が生成された後の細胞内での蓄積と輸送の新たな仕組みを解明し、細胞の加齢に伴う蛍光色素顆粒の蓄積を防ぐ、最初の方法論を提示する。すなわち、細胞機能を維持し、生物学的時間の進行による負の影響を止めるまたは遅らせるという、新たなパラダイムに挑戦する。受容体活性化による多段階的な効果を、個体、細胞、タンパク質、ゲノム修飾の各レベルで研究期間内に明らかにし、包括的脂質蓄積シグナル研究を展開する。

(2) 本研究では、申請者らが作出したユニークな加齢色素沈着モデルとして、V1aバズプレッシン受容体遺伝子改変マウスを用いる。この遺伝子改変マウスの特徴は、副腎皮質と髄質境界部分において、6週齢ではほとんど変化を認めないが約8週齢よりリポフスチン、または加齢色素と呼ばれる沈着物の蛍光が観察される点である。蛍光顕微鏡にて無染色の凍結切片を観察すると、蛍光顆粒の沈着を検出する。さらに、このマウスでは副腎皮質のホルモン分泌能が低下している。8から11週令でV1aノックアウトマウスに見られるリポフスチン蓄積と同程度の蓄積を野生型のマウスで観察するためには、およそ12か月齢の野生型マウスが必要となる。この事実より、V1a受容体ノックアウトマウスが、加齢色素蓄積を解析するための良いモデルであると考えられる。

2. 研究の計画

(1) V1a受容体遺伝子欠損による副腎の加齢色素沈着が、マウスの系統によらず保存されている証明。これまで解析を行ったV1a受容体欠損マウスは、遺伝背景が129/BL6系統であり、マウスの遺伝背景が加齢色素沈着に影響を及ぼす可能性も考えられる。そこで、遺伝背景をBL6に近づけた場合の副腎皮質について加齢色素沈着の程度を評価する。さらに、下垂体機能の低下から引き起こされる二次的副腎皮質機能不全のモデルマウスV1bバズプレッシン受容体欠損マウスを用い、副腎への蛍光物質の沈着の有無を検索する。

(2) V1a受容体シグナルの下流で脂質蓄積変化に関わる機構はこれまで不明である。そこで、培養細胞系においてV1a受容体に特異的な機能の解析を進める。具体的には、V1a受容体とアミノ酸配列が最も近いV1bバズプレッシン受容体とV1a受容体をそれぞれ培養細胞に発現させ、受容体サブタイプに特異的な機能を明らかにする。さらに、副腎皮質由来の細胞株の中でモデルとなる細胞を同定し、V1a受容体のシグナル伝達における役割を解明する。

(3) イメージング質量顕微鏡分析による蛍光物質の網羅的脂質プロファイル解析を行い、蛍光物質の脂質成分を同定する。

3. 研究の成果

- (1) V1a遺伝子欠損により、マウス系統を超えた加齢色素の沈着亢進；マウスの遺伝背景が加齢変化に影響を及ぼす可能性がある。そのため、これまで解析した129/B6系統マウスに加え、BL6の遺伝背景に統一した遺伝子欠損動物を作成し、その副腎皮質を観察した。その結果、BL6の遺伝背景においても、V1a遺伝子欠損の影響は保存され、副腎皮質に加齢色素の沈着が亢進することが明らかになった。よってV1a受容体はマウス系統によらず、細胞の加齢変化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、V1b受容体遺伝子欠損マウスで下垂体機能低下を確認した上で副腎皮質を観察したところ、バゾプレッシン刺激時のACTH分泌が低下しているにもかかわらず、副腎の加齢変化に促進は見られなかった。よってV1a受容体欠損マウスで観察される加齢色素は、下垂体-副腎系の機能低下による二次的影響とは考えにくいことが判明した。
- (2) V1a受容体をV1b受容体と比較した場合の特徴；培養細胞系において、V1a受容体は非刺激時に細胞膜に分布するものの、V1b受容体は主に細胞質内に分布し、細胞膜には分布する割合は低下していることが明らかとなった。さらに、刺激に伴い受容体が細胞膜から内在化する場合、V1a受容体の内在化は、V1b受容体に比べて少ない割合であることが判明した。すなわち、V1a受容体は、細胞膜にあらかじめ存在するが、内在化する割合は低いことが特徴であった。次に、副腎皮質由来の細胞株を検索したところ、マウスY1細胞では、4種類のバゾプレッシン/オキシトシン受容体ファミリーの中でV1a受容体のみを発現していた。さらに、この細胞株は糖質ステロイドホルモンの分泌能を有し、ACTHホルモンの刺激によってホルモン分泌が増加した。よってV1a受容体機能を解析するためのモデル細胞としてY1細胞は最適であることが判明した。Y1細胞におけるバゾプレッシンの機能を解析したところ、ACTHとバゾプレッシンの同時刺激により、ACTH単独よりもコルチコステロンの分泌が増加することが判明した。この際の細胞内シグナルでは、バゾプレッシンがACTHによるcAMPの産生を有意に抑制した。よってバゾプレッシンによるコルチコステロンの分泌増加は、cAMP以外の機構が関与することが予想され、この細胞を用いたさらなる解析が有用と考えられた。
- (3) イメージング質量顕微鏡分析による蛍光物質の網羅的脂質プロファイル解析；これまで実験条件を改善してきたイメージング質量顕微鏡分析により、V1a受容体の蛍光部分と非蛍光部分について脂質プロファイルを取得した。実際には、副腎切片を端から50 μ mの半径で隈なく解析し、蛍光イメージと重ねた上で蛍光部分と非蛍光部分を区別して解析した。アッセイのコントロールとして、これまでリポフスチンの成分として報告のあるステアリン酸を検出することに成功した。

4. 研究の反省・考察

- (1) マウスの複数の系統を解析した結果、V1a受容体欠損の影響が系統を超えて広く及ぶことが明らかになった。加齢変化におけるV1a受容体機能の重要性を示唆しており、副腎皮質並びに髄質のV1a遺伝子発現分布と合わせた解析が有効であった。
- (2) V1a受容体機能の特徴を得ることに成功した。即ち、V1a受容体は細胞表面に局在する傾向がV1b受容体よりも強く、この事実より、一旦刺激された場合、より高度の脱感作を起こす可能性が考えられる。よって今後の薬物開発において有益な情報を得ることに成功した。また、マウスY1副腎皮質由来細胞株は、良いモデル細胞であることが判明した。
- (3) 加齢色素の脂質プロファイルを得ることに成功した。測定方法の改善をさらに重ね、より感度を上げ、脂質以外のタンパク質、核酸、代謝物などの解析に広げられる可能性が示された。本研究で得られた遺伝子発現プロファイルと脂質プロファイルを組み合わせることにより、加齢における代謝マップ上の特徴を明らかにする統合的解析に進むことが可能となった。よって今後は細胞加齢シグナルの全体像の解析に進むことが可能である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Kashiwazaki, A., Fujiwara, Y., Tsuchiya, H., Sakai, N., Shibata, K., Koshimizu, T.A., Subcellular localization and internalization of the vasopressin V1b receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 291-299. 2015, Oct.

(2) 口頭発表

① 奥水崇鏡、V1bバゾプレッシン受容体複合体の機能解析、バゾプレッシン研究会、平成28年1月7日

② 奥水崇鏡、バゾプレッシンV1b受容体の新知見と応用、下垂体研究会、平成27年8月7日

(3) 出版物

なし

学 校 名	朝 日 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	骨再生に応用する体性幹細胞の分子基盤構築 —分化動態解明からエピジェネティック解析へ—		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①骨再生 ②細胞移植療法 ③エピジェネティクス ④骨髄由来幹細胞 ⑤脂肪組織由来幹細胞 ⑥歯髄由来幹細胞 ⑦骨芽細胞分化 ⑧破骨細胞分化		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 木 晴 美	歯 学 部	講 師	研究の総括 動物実験 細胞培養実験 データ整理

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
近 藤 信 夫	歯 学 部	教 授	遺伝子発現解析実験 データ整理
高 山 英 次	歯 学 部	准 教 授	分子生物学的実験 データ整理
神 谷 真 子	経 営 学 部	准 教 授	培養細胞の染色、増殖、分化評価等細胞生物学的実験 RNA試料の調整 データ整理
永 原 國 央	歯 学 部	教 授	実験動物への移植実験 標本作製 染色、画像データ取得 データ整理
吉 田 隆 一	歯 学 部	教 授	移植実験後組織の分子生物学的実験 マイクロCT解析 SEMによる観察及び解析 データ整理
玉 置 幸 道	歯 学 部	教 授	骨補填材料の作製 XRD解析 データ整理

骨再生に応用する体性幹細胞の分子基盤構築 —分化動態解明からエピジェネティック解析へ—

1. 研究の目的

超高齢社会となった我が国では、加齢による骨量減少や骨修復能の減弱などに起因する国民のQOL低下は必至である。これを防ぐために、造骨細胞の供給等、骨再生や骨代謝系を人工的に導入し、組織工学的にコントロールする骨再生テクノロジーの確立が急務である。

近年、造骨過程でのエピジェネティック因子の関与が明らかとなってきている。由来組織の異なる移植幹細胞の造骨過程におけるクロマチン構造の変化を解析することは、骨再生の人為的コントロールによる治療や創薬につながると期待できる。そこで、細胞移植療法による骨再生での細胞の運命と分化過程における調節機構の詳細を担体の有無を区別して解明し、その分子基盤の確立を目指す。

- (1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価
- (2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価
- (3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

上記より、由来組織の異なる幹細胞の担体の有無による分化動態、移植後動態を解析し、それらの調節に関わるエピジェネティック因子の解析を行うことにより、骨再生における幹細胞移植の分子基盤を構築することを目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価
 - ① 骨補填材上で幹細胞を分化誘導あるいは増殖培地で培養し、骨芽細胞分化マーカーの発現変化を経時的に解析し、分化へ移行する時期、由来組織による差、分化誘導因子への応答性を解析する。
 - ② 骨芽細胞分化に必須の*osterix*, *Runx2*およびその共役因子である*cbfb*他、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現変化を、エピジェネティック解析の試料回収指標とするため詳細に追う。
 - ③ アルカリフォスファターゼ活性や石灰化の度合いを検討し、mRNA発現変化との相関性を確認する。
- (2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価
 - ① ノードマウス皮下に骨補填材のみ、あるいは骨補填材と幹細胞を共に移植し、移植後の組織を経時的に取り出し組織化学的解析を行って、骨補填材そのものの異所性骨誘導および、幹細胞の有無による組織応答の違いを検討する。
 - ② 由来組織の異なる幹細胞の移植後の動態を免疫組織化学的に解析する。
- (3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価
 - ① ラット大腿骨骨欠損部へ骨補填材のみ、あるいは骨補填材と幹細胞を共に移植し、移植後の組織を経時的に取り出しパラフィン包埋切片を作製する。
 - ② 由来組織の異なる幹細胞について①と同様に切片を作製する。

3. 研究の成果

- (1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価
 - ① 3種の骨補填材、炭酸含有アパタイト (CA)、水酸化アパタイト (HA)、 β -リン酸三カルシウム (β -TCP) を用いて骨髄由来、脂肪組織由来、歯髄由来の幹細胞を骨補填材と共に、骨芽細胞分化誘導培地を用いることなく、幹細胞増殖培地で培養し、アルカリホスファターゼ (ALP) の活性を指標に骨芽細胞への分化を検討した結果、骨髄由来幹細胞が最も早く骨芽細胞へと分化し、次いで脂肪組織由来幹細胞、歯髄由来幹細胞も培養2週間でALP活性の

上昇をみとめた。骨髄由来幹細胞および脂肪組織由来幹細胞はアリザリンレッドに濃染するカルシウムの沈着をみとめたが、歯髄由来幹細胞では石灰化の度合いが低く、*in vitro*の条件下で、骨芽細胞分化誘導因子を使用しない条件では硬組織への分化能が比較に用いた2種の幹細胞よりもやや弱い傾向にあると考えられた。

② 骨芽細胞分化マーカーの発現変化は、HA、CA、 β -TCPの順に I型コラーゲン、ALPの経時的発現量増加がみられた。幹細胞移植の効果と分化調節におけるエピジェネティック因子の関与についての評価の指標となるRunx2他、転写因子の発現レベル上昇に関しては現在も発現パターン変化等の詳細を検討中である。

③ I型コラーゲン、ALP、オステオカルシンなど一部の骨芽細胞分化マーカーではALP活性や石灰化の度合いと相関して発現上昇する結果が得られている。

(2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価

① ノードマウス皮下への骨補填材の移植実験ではCAでコラーゲン性の線維組織の増生が顕著であり材料周囲に一層の硬組織様組織形成をみとめた。骨髄由来幹細胞を共に移植した場合、骨補填材単体では硬組織様組織形成のみられなかった β -TCP移植群でもわずかに硬組織様組織の形成がみとめられ、異所性骨誘導に貢献していることが示唆された。また、ヒト由来の細胞を同定するため、抗ヒト細胞核抗原抗体と抗骨芽細胞分化マーカー抗体を用いて蛍光免疫染色を行った結果、移植した細胞が骨芽細胞様へ分化していることが示唆された。

② 脂肪組織由来幹細胞、歯髄由来幹細胞では硬組織様組織形成の促進効果はみとめられなかったが、歯髄由来幹細胞は移植後も増殖細胞のマーカーであるKi-67陽性細胞として検出されるなど、移植後の組織で生存していることがわかった。

(3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

ラット大腿骨骨欠損部への移植実験後の切片を経時的に作製し、ノードマウスへの移植実験後の結果との比較を行いながら解析を継続中である。

4. 研究の反省・考察

(1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価

① 3種の骨補填材の作用を検討するため、骨芽細胞分化誘導培地を用いることなく検討した結果、CAで特に顕著な差がみられたことから、分化誘導因子として添加するリン酸の供給が他の2種の骨補填材に比べて有利な点と考えられた。この点をふまえて、培地中のリン酸およびカルシウム濃度の経時的測定を追加して行っている。

② 骨芽細胞分化マーカーの発現変化では、人工骨補填材上での*in vitro*の培養条件では転写因子の発現レベルが安定しないことから、ラット頭蓋骨から作製した骨片を比較対照として追加することとし、発現パターン変化等の詳細を検討中である。

③ ALP活性変化や石灰化ではCA、HAで特に顕著であり骨の無機成分の主要成分であるHAを本体とする2種の骨補填材が β -TCPと比較して有利であると考えられる。

(2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価

① ノードマウス皮下移植実験から、CA移植群でコラーゲン性線維組織の増生と硬組織様組織の形成がみとめられるなど骨補填材周囲での骨芽細胞分化と骨形成に関連する所見が得られ、*in vitro*実験の結果を補強することができた。動物実験と*in vitro*実験を並行して行ってきたため、エピジェネティック解析の試料回収の指標となる骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現変化の検討についてやや遅れ気味であることが反省点として挙げられるが、これらの結果からRunx2やOsterix等の骨芽細胞マーカーの出現時期の同定を行っている。

② 歯髄由来幹細胞は*in vitro*では骨芽細胞への分化能が骨髄由来細胞よりも弱いと考えられたが移植後も宿主内で生存し増殖している所見が得られたことから、何らかの作用を有するものと考えられ、さらに長期間の移植後の生体内での動態を追う必要があると考えられた。

(3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

培養系の評価で十分な検討を重ねるため、そして、*in vivo*での結果と照合しつつ解析を進めるために、当初次年度に予定していた移植実験と切片作製を本年度中に進めることができ、現在、培養系での評価と並行して解析を進めるべく、骨芽細胞分化マーカーに加え、MAPK等の分化に関与する情報伝達系分子について免疫染色による検討を進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Murase Y, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Maeda-Uematsu A, Kawaki H, Lyons KM, Sasaki A, Takigawa M, Kubota S. Role of CCN2 in Amino Acid Metabolism of Chondrocytes. *J Cell Biochem.* 117:927-937. 2016.
- ② Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Western blotting analyses of CCN proteins. *Methods Mol Biol.* 2015. (in press)
- ③ Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Immunohistochemical analyses of CCN proteins. *Methods Mol Biol.* 2015. (in press)
- ④ Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Analyses of signaling pathways activated by CCN proteins. *Methods Mol Biol.* 2015. (in press)

(2) 口頭発表

- ① 近藤雄三, 川木晴美, 高橋 潤, 田辺俊一郎, 近藤信夫, 永原國央. 炭酸含有アパタイトを足場材料とした骨芽細胞分化の特性解析. 第69回 NPO法人日本口腔科学会学術集会. 2015年 5月13日~15日. 福岡.
- ② 竹下信郎, 佐々木紀代, 星 健治, 川木晴美, 長谷川正和, 山本照子. CCN2/CTGFは *in vivo*の機械的刺激に対する初期反応において縫合細胞の血管内皮細胞分化と骨細胞のアポトーシスを誘導する. 第7回日本CCN研究会. 2015年 8月29日. 岡山.
- ③ 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 小栗健策, 森 春菜, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質顆粒と幹細胞を組み合わせたハイブリッド骨補填材の生体内での評価. 第11回日本歯内療法学会中部支部会. 2015年 9月27日. 名古屋.
- ④ 高橋 潤, 川木晴美, 近藤雄三, 山田尚子, 長谷川ユカ, 近藤信夫, 永原國央. 炭酸含有アパタイトの骨補填材として評価と破骨細胞分化に対する機能解析. 第19回日本顎顔面インプラント学会. 2015年11月28日~29日. 横須賀.

(3) 出版物

なし

学 校 名	摂 南 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	神経変性毒タンパク質の凝集および作用機序の化学的解析 ータンパク質変性疾患の発症機序の化学的解析ー		研究分野 医学
キ ー ワ ー ド	①神経変性毒タンパク質 ②プリオンタンパク質 ③ α -シヌクレイン ④SOD1 ⑤凝集		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
秋 澤 俊 史	薬 学 部	教 授	総括、ペプチド合成、金属結合性の検討、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 西 元 美	薬 学 部	准 教 授	立体構造解析(CD、NMR測定)論文作成
谷 口 将 济	薬 学 部	特 任 助 教	凝集性の確認、酵素による分解点の解析、論文作成

神経変性毒タンパク質の凝集および作用機序の化学的解析 —タンパク質変性疾患の発症機序の化学的解析—

1. 研究の目的

- (1) 本研究は、プリオン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの発症原因と言われている神経変性を誘発する凝集性タンパク質の凝集メカニズムを α -シヌクレイン (α -Syn: パーキンソン病) と SOD1 (ALS) タンパク質のフラグメントペプチドを用いて化学的に明らかにすることを目的とするものである。

2. 研究の計画

- (1) 平成27年度は主として既に合成・精製しているプリオンタンパク質 (PrP) のフラグメントペプチドを用いた結合性の検討を行う。加えて、平成28年度以降に使用する合成ペプチドを準備する。
 - ① カラムスイッチ法によるペプチド間の結合性の検討: C-末端のフラグメントペプチドを HPLC 用担体に固定化し、HPLC 用カラムに充填したアフィニティカラムを作成する。それを第一カラムに用いたカラムスイッチ HPLC 法により、各フラグメントペプチドとの結合性と銅イオンの影響を検討する。
 - ② ペプチド間の会合性の検討: 分子間相互作用測定装置 (AFFINIX QN) を用いてペプチド間の会合性を検討する。
 - ③ 神経細胞への影響: iPS 細胞を神経細胞に分化誘導後、各フラグメントペプチドの共存した培養を行い、神経細胞に対する作用を観察する。
 - ④ 立体構造解析: 上記1) と2) の結果より、プリオンタンパク質の凝集に関与するフラグメントペプチドを特定し、NMR 測定を行うことで立体構造に必要なデータを収集する。
 - ⑤ α -シヌクレインと SOD1 由来のフラグメントペプチドの合成・精製を行う。

3. 研究の成果

- (1) 全体的に研究計画通り進行し、当初の目的は十分達成できていると判断している。さらに、 α -シヌクレインと SOD1 に関しては計画以上の成果が得られたと考えている。
 - ① ペプチド間の結合性に関しては、実験方法をカラムスイッチ HPLC 法から Pull down 法に変更して行ったが、目的とした結果を得ることができた。変更した理由は、C-末端のフラグメントペプチドが HPLC 用担体に非特異的に吸着を示し、完全に除去することが困難なため連続測定ができないことと、そのため定量性に問題が生じることである。Pull down 法を行うためのペプチド固定化レジンの作成は当初の予定通り行った。hPrP175-189 および hPrP180-192 をそれぞれ TOYOPEARL AF-Formyl-650 レジン (東ソー) に化学的に固定化した。固定化量は一定量のレジンを減圧下、6 規定塩酸で24 時間加水分解した後、ダブル誘導体化したアミノ酸を逆相 HPLC 法によるアミノ酸分析により算出した。hPrP175-189 を固定化したレジンは163.8 pmol/mL、hPrP180-192 を固定化したレジンは142.7 pmol/mL のペプチドが固定化されていると算出した。これらのレジンと hPrP-FP を用いて Pull down 法により各 hPrP-FP の結合量をアミノ酸分析法により算出した。その結果、R180-192 には hPrP175-189 および hPrP169-192 が、R175-189 には hPrP169-192 が結合していることが明らかとなった。同時に、反応液を HPLC 分析し、結合していない遊離の hPrP-FP 量を算出して結合量を求めたところ、アミノ酸分析と HPLC 分析の結果は一致した。これらの検討は、C-末端側の hPrP-FP がプリオンタンパク質の凝集の核となり得ることを強く示唆している。
「合成フラグメントペプチドを用いたヒトプリオンタンパク質 (PrP) C-末端領域の性質解

析：第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム（長崎）において口頭発表」

- ② hPrP180-192 をAFFINIX QN μ のセンサーセルに固定化し、hPrP169-192, 169-183, 175-183, および180-192 との結合性を検討した結果、hPrP169-192 および hPrP180-192 が強く結合していることが明らかとなった。このことより、ヒトプリオンタンパク質の C-末端側の相互作用により凝集が起こることが示唆された。

「ヒトプリオンタンパク質 (hPrP) C-末端領域由来フラグメントペプチドの構造変化と分子間相互作用の検討：日本薬学会第136回年会（横浜）においてポスター発表」

- ③ iPS 細胞を用いる前に、取り扱いの易しいヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 株を用いて hPrP180-192 を含むC-末端領域のhPrP 由来フラグメントペプチド (hPrP-FP) の影響を検討した。その結果、hPrP-FP の添加時に凝集体が観察され、hPrP169-189 の添加による小胞様の SH-SY5Y 細胞の形態変化が認められた。また、hPrP-FP の添加による細胞増殖能の低下がみられ、特に hPrP169-189 では有意な増殖抑制作用が認められた。さらに、hPrP169-189 を添加した SH-SY5Y 細胞において Caspase-3 の活性化が認められ、hPrP169-189 が SH-SY5Y 細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

「ヒトプリオンタンパク質由来フラグメントペプチドの SH-SY5Y 細胞への影響：日本薬学会第136回年会（横浜）においてポスター発表」

- ④ hPrP169-183 を含む、C-末端由来のフラグメントペプチドの立体構造に及ぼす銅イオンの影響をCD測定により検討した結果、hPrP169-192 とhPrP169-183 は銅イオン添加により β シート構造に、hPrP175-183 はランダムコイル構造から α -ヘリックス構造に変化するが、hPrP180-192 は銅イオンにより影響されないことが明らかとなった。

「ヒトプリオンタンパク質 (hPrP) C-末端領域由来フラグメントペプチドの構造変化と分子間相互作用の検討：日本薬学会第136回年会（東京）においてポスター発表」

現在、順次、NMR 測定を行っており、今後詳細な立体構造の解析を行う予定である。

- ⑤ SOD1 と α -Syn の全長をカバーするため、SOD1 は7種類、 α -Syn は4種類のフラグメントペプチドを合成・精製ができた。そこで、銅イオンおよび亜鉛イオンとの結合性をカラムスイッチ HPLC 法で、また、CD 測定により立体構造変化を検討した。

まず、SOD1 について検討した。亜鉛結合性に関しては、分子中にヒスチジンを含む SOD1/39-52、SOD1/53-86、およびSOD1/104-124 は結合性を示したが、その他のSOD1/2-38、82-94、94-103、および124-154 は結合性を示さなかった。これらのペプチドの亜鉛存在下での CD 測定を行ったが顕著な構造変化は認められなかった。

一方、銅イオンの結合性に関しては亜鉛とは異なった結果が得られた。ヒスチジンを含み銅結合部位との報告のあるSOD1/39-52、SOD1/53-86、およびSOD1/104-124 は亜鉛と同様に高い結合性を示した。さらに亜鉛には結合しなかったSOD1/2-38、94-103、および 124-154 も弱いながら結合性を示した。これらのペプチドの銅存在下での CD 測定を行った結果、SOD1/124-154 でランダムコイル構造から α -ヘリックス構造へと変化する傾向が観察された。このような変化は亜鉛では認められておらず、銅との結合によりペプチドの立体構造が変化すると考えられる。他のフラグメントペプチドでは顕著な構造変化は認められなかった。

「SOD1 由来フラグメントペプチドの亜鉛結合性：第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム（長崎）においてポスター発表」

「SOD1 由来フラグメントペプチドの銅結合性：第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム（長崎）においてポスター発表」

次に、 α -Syn1-36、36-68、69-106、および101-140 の銅結合性を検討した。その結果、 α -Syn101-140 に弱い結合性が認められたが、他のフラグメントペプチドではほとんど結合が認められなかった。また、CD 測定の結果でも銅イオン添加による構造変化は認められなかった。 α -Syn には SOD1 の様な銅や亜鉛などの結合性の高いヒスチジンは含まれておらず、金属による立体構造の変化は少ないと判断しているが、現在、亜鉛の影響と細胞毒性を検討中である。

4. 研究の反省・考察

- (1) 全体的に実験においては予定以上の成果が出せていると考えており、かつ論文作成に必要なデータは得られていると判断している。しかしながら、論文作成は遅れており、早急に準備にかかる必要がある。
 - ① C-末端側フラグメントペプチドの性質により、カラムスイッチ HPLC 法での解析はできなかったが、Pull down 法を用いることで当初の目的は達成できた。
 - ② 分子間相互作用測定の結果は、①の結果とよい相関を示したことより、C-末端領域がプリオンタンパク質の凝集の核となると判断した。しかしながら、分子間相互作用が認められた、hPrP169-192 と認められなかったPrP169-183 はともに銅イオンの添加により β シート構造に変化することより、銅イオン存在下での検討を行う必要がある。
 - ③ 現在、hPrP-FP の添加による SH-SY5Y 細胞への影響に関して暴露時間や濃度の詳細な検討を行うとともに、hPrP-FP の凝集体の細胞内取り込みに関して検討を行っている。これらの検討が終了した後、iPS 細胞を用いた検討を行う予定である。
 - ④ C-末端側のフラグメントペプチドは銅イオンや pH により立体構造が変化するので、NMR 測定条件をかえて測定する必要がある。そのため、立体構造解析には時間を要することが予想されるが、凝集メカニズムの解析には必須であり、詳細な検討を行う予定である。
 - ⑤ 当初の研究計画ではフラグメントペプチドの合成・精製だけを行う予定であったが、金属結合性と立体構造変化の検討まで進むことができた。今後、プリオンタンパク質研究と同じ方法を用いて、SOD1 および α -Syn の凝集の核となる領域の同定を行う予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
Aya Kojima, Yuko Sakaguchi, Hidenao Toyoda, Masanari Taniguchi, Motomi Konishi, and Toshifumi Akizawa, C-terminal Region of the hPrP Can Be the Core for the Structure Conversion and Aggregation, *Peptide Science* 2015, 217-220 (2016)
- (2) 口頭発表
小嶋絢、坂口裕子、永井裕子、豊田英尚、谷口将済、小西元美、秋澤俊史、合成フラグメントペプチドを用いたヒトプリオンタンパク質 (PrP) C-末端領域の性質解析、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2015)、2015年8月21日~22日 (長崎大学)
- (3) 出版物
なし

学 校 名	大 阪 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	① iPS細胞 ②間葉系前駆細胞 ③広域顎口腔組織再生 ④再生医療 ⑤幹細胞 ⑥3次元織担体 ⑦歯学		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
馬 場 俊 輔	歯 学 部	教 授	研究代表者・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 伊 記	歯 学 部	准 教 授	動物実験・論文作成
橋 本 典 也	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
本 田 義 知	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
上 村 直 也	歯 学 部	平成28年3月 31日退職	動物実験・データ整理

iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究

1. 研究の目的

口腔癌や顎骨骨折等によって生じた広域顎口腔組織欠損は、患者に大きな手術的および、精神的負担を生じさせる。これまでこの治療に対しては、欠損補綴や顎補綴治療が広く用いられてきたものの、利用される補綴物は恒久的な発音障害・審美障害・咀嚼障害を生じさせ、患者の生活の質を大きく損ねている。特に、咀嚼障害は寿命と直結する事が知られている (Takada et al. *Ann Jpn Prosthodont Soc*, 2012)。天然歯と同様に利用可能なインプラントは、潜在的に本課題を改善しうる力を持つものの、土台となる顎骨の広域欠如が本治療の遂行を妨げてきた。これらの背景から、再生医療を用いた顎骨再生法に期待が向けられ、自家骨移植や、骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療等が広く試みられている。しかし、広域を満たす程の試料の調達は困難を極め、未だ大きな発展が見られていない。もし、これらの課題を克服する優れたオーダーメイド顎骨組織再生治療が実現すれば、次世代に残された課題と言われる広域顎骨組織欠損治療を著しく前進させ、患者の生活の質を大きく向上させる可能性を持つ。

本研究は、独自開発を進めてきた①癌化し難いiPS細胞と、②生体高分子を任意な形状に織り込む担体合成技術を用い、オーダーメイド広域骨再生治療の具現化を図っている点に最大の特色を持つ。顔貌に応じた形状再建を可能とするオーダーメイド再生治療としては、東京大学が3Dプリンターを用いた人工骨を報告している (Chung et al., *Int J Automation Technology*, 2009)。しかしながら、人工骨は靱性に乏しく、骨置換に数年の年月を要し、大型人工骨では破折が危惧される。一方、吸収性生体高分子は高い靱性をもつものの、低い骨伝導能ゆえに自家骨や骨髄間葉系幹細胞と複合化し研究が進められてきた (Kinoshita et al., *Tissue Eng*, 2007)。しかし、自家骨は採取量に、骨髄由来間葉系幹細胞は細胞数の確保に課題を残し、広域骨再建は大きく進展してこなかった。

申請者らが着目したiPS細胞は、①無限に増殖し細胞数の問題を克服し得る、②ドナーの年齢に依存しない調製が可能、③血管前駆細胞への分化誘導も報告されており、血管網を含んだ骨組織の迅速再生を実現しうる、等の利点を有す。更に申請者らは、独自にプラスミドベクターを用いた癌化し難いiPS細胞の樹立に成功しており、安全性の高いiPS細胞の調達が可能である。また、生体高分子を紡糸し、織ることで任意の3次元形状へと整形する特殊技術を保持しており、迅速に本研究への着手が可能な状態にある。

以上の点から、本申請内容は既存の広域骨欠損治療と一線を画す革新的な治療法と成り得る事が期待出来る。本研究の着想は自ら蓄積した知見に基づき、“癌化しにくいiPS細胞と3次元織担体を用いたオーダーメイド広域顎骨再生”に着目して研究を進めているグループは国内外無く、極めて新規性が高い研究であると言える。

本申請は、申請者らが独自に樹立した、癌化を起こしにくい口腔軟組織由来iPS細胞と、任意な3次元構造に生体高分子を織り込む特殊技術で作成した顎骨形状担体を最適に複合化し、次世代のオーダーメイド広域顎口腔組織欠損再生治療を可能とする新規技術創生の基盤を築く事を目的とする。

2. 研究の計画

(1) 樹立したiPS細胞からのiPS細胞由来間葉系幹細胞様細胞 (MSLC)の誘導

HGF-iPSCsをフィーダーフリーの状態で成長因子を除いたマトリゲル上にて3日間mTeSR1で培養した。培地をDMEM low glucoseに10%FBSと10 ng/mL bFGFを含んだものに置換し、2日ごとに交換した。2週間培養後、細胞は0.025%トリプシンを用いて継代し、ゼラチンコートしたdish状で同様の培地に播種した。4回の継代後、細胞の形態は線維芽細胞様の形態に変化した。継代は、3~5日ごとに、3倍で0.025%トリプシンを使用して行った。

(2) MSLCの表面抗原解析

0.025%トリプシン処理後、細胞 (5×10^5) を得た。細胞表面抗原染色は、2%ヒト血清アルブミンを含んだPBSで行った。細胞懸濁液は特異抗体を標識し、30分間4°Cにてインキュベートした。マウス-アンチヒト抗体は適正濃度で使用した。染色した細胞は、FACS Aria IIで解析し、データは、FlowJo softwareで解析した。

(3) MSLCのin vitroでの分化

三系統への分化は、過去の報告をもとに行った。骨分化誘導は、DMEM high glucoseに10% FBS、290 nMアスコルビン酸-2フォスフェート、5 mM β グリセロフォスフェート、100nMデキサメタゾンを添加したもので行った。脂肪分化誘導は、DMEM high glucoseに15%馬血清、100nMデキサメタゾンを添加したもので行った。軟骨分化誘導は、遠心分離にて細胞を1.5mLチューブに集め、DMEM high glucoseに50 mg/mLアスコルビン酸、100 nMデキサメタゾン、1:100 ITS premix、40 μ g/mL L-プロリン、10 ng/mL ヒト組み換えTGF β を添加したもので行った。すべての分化誘導において、培地は3日ごとに交換し、21日後分化の評価は、アリザリンレッド染色、オイルレッド染色、トルイジンブルー染色で行った。

3. 研究の成果

(1) MSLCの誘導

HGF-iPSCsがMSLCに分化するかどうか検討した。まず、初めに、HGF-iPSCs1-1(継代33、37、45)と1-2(継代23)をフィーダーフリーの状態にて3日間培養し、2週間直接分化誘導を行った。分化したiPSCは4継代後に完全に線維芽細胞様形態に変化した。我々は、iPSCから分化した線維芽細胞様細胞がMSLCかどうか検討した。これらの細胞と骨髄由来のMSCをCD44、CD73、CD90、CD105のようなヒト間葉系マーカー、CD34、CD45のような血管内皮、造血細胞マーカー、SSEA-3、TRA-1-60のような多能性マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。HGF-iPSC由来の細胞とMSCはすべての継代における検査でCD44、CD73、CD90、CD105を発現し、CD34、CD45は発現していなかった。CD34は血管内皮マーカーで、CD45は造血細胞マーカーであり、両方ともMSCでは発現しない。したがって、MSLCを血管内皮もしくは造血細胞と区別するために使用した。加えて、HGF-iPSC由来の細胞とMSCはSSEA-3、TRA-1-60といったHGF-iPSCsで発現していた多能性マーカーは発現していない。我々は、15継代まで増殖することを確認した。さらに、細胞はBMSCよりも相対的に高い増殖能を示した。

(2) MSLCのin vitroでの分化

MSLCの分化能を試験した。骨分化においては、細胞は骨分化誘導培地にて培養し、カルシウム沈着は、アリザリンレッドにて検出した。対照的に、基質の石灰化はコントロール培地(DMEMに10%FBS)で骨芽細胞に分化していないMSLCでは起こらなかった。脂肪分化においては、細胞は脂肪分化誘導培地で培養し、細胞質内の小さな脂肪滴はオイルレッド染色で観察した。軟骨分化においては、軟骨分化誘導培地でペレットを培養し、高プロテオグリカン細胞外基質はトルイジンブルー染色で赤紫色に染色された。これらのデータは、MSLCが形態、表面マーカー、3系統への分化を含んだいくつかの側面でMSCに類似していることを示唆した。

4. 研究の反省・考察

以前より、ESやiPS細胞からのMSLCへの分化誘導の研究は行われてきた。我々はiPS細胞をいったんフィーダーフリーの状況でマトリゲルをコート材として培養を行い、その後、トリプシン処理を行い、一般的なDMEMに10%血清とFGFを含む培養液で培養することで、MSLCに誘導することを可能にした。マトリゲルでなくVitronectin-Nでも可能であったが、MSLCへの誘導は遅かった。

細胞播種密度、培養液組成(血清、成長因子)、細胞外マトリックス等をアレンジすることでiPS細胞からiPSMSLCの樹立効率が高くなる。また、現在、理化学研究所等で提供されるプラ

スミドベクターを用いて樹立された歯髄や皮膚由来のiPS細胞株からもiPSMSLCの作製が可能となることが予想される。平成27年9月より再生医療用iPS細胞ストックプロジェクトが立ち上がり、血液から作製されたHLAホモのiPS細胞が提供されることとなり、これら細胞のiPSMSLCのストックを作製することで臨床応用への展開も可能である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ito T, Hashimoto Y, Baba S, Iseki T, Morita S. Bone regeneration with a collagen model polypeptides/ α -tricalcium phosphate sponge in a canine tibia defect model. *Implant Dent* 2015; 24: 197-203.
- ② Umezaki Y, Hashimoto Y, Nishishita N, Kawamata S, Baba S. Human Gingival Integration-Free iPSCs; a Source for MSC-Like Cells. *Int J Mol Sci* 2015;16:13633-13648.
- ③ Honda Y, Tanaka T, Tokuda T, Kashiwagi T, Kaida K, Hieda A, Umezaki Y, Hashimoto Y, Imai K, Matsumoto N, Baba S, Shimizutani K. Local controlled release of polyphenol conjugated with gelatin facilitates bone formation. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 14143-14157.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 ーヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立ー	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ヒト化マウス ②ヒト免疫 ③疾患モデルマウス ④胸腺内分化		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
木 梨 達 雄	医 学 部	教 授	研究の統括と推進

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 崎 和 一	医 学 部	教 授	疾患モデルの確立と解析
藤 澤 順 一	医 学 部	教 授	臍帯血移植によるヒト化マウスの作製
李 成 一	医 学 部	准 教 授	ヒト化マウスの解析と改良

ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 —ヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立—

1. 研究の目的

- (1) 免疫学はマウスを中心とした動物実験や培養細胞による実験系より知見を集積してきたが、医学研究に応用される際には種差に基づく差異が問題となってきた。ヒトを対象とした研究手法は倫理的側面から制限がありヒト特有の免疫現象を解明する手法の確立が待望されてきた。ヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞を超免疫不全マウスに移植し生着させる「ヒト化マウス」は、*in vivo* 環境でヒト由来免疫系細胞の分化や動態が観察でき、ヒトの免疫を解明する有力なツールである。我々は、ヒト免疫細胞の抗原応答や免疫寛容の成立と維持およびその破綻における動態調節に着目し、ヒト化マウスの免疫学的解析および2光子顕微鏡を用いた組織イメージング解析系樹立を目標とした。
- (2) 研究計画の前半においてなされた免疫学的解析を通し、以下の項目を主な検討課題とするにいたった。
 - ① 造血幹細胞から成熟免疫細胞への分化や組織間のおよび組織内への移動、胸腺の選択過程や炎症部位へ集積を調べ、動態制御分子の重要性を明らかにする。
 - ② よりヒトの疾患に近い免疫関連疾患モデルマウスとして、病態形成や新規治療手法の確立について検討する。

2. 研究の計画

- (1) 系としてのヒト化マウスは確立しているが、より効率のよい作成方法を樹立した。計画の前半では、免疫学的解析を主にすすめた。
 - ① 文書による同意により無記名で提供されたヒト臍帯血よりCD133陽性細胞を単離し、超免疫不全マウス（NOGもしくはNSGマウス）の骨髄内に注入する。ヒト由来細胞の生着を確認し、各種免疫細胞の出現状況をフローサイトメトリー法や蛍光免疫組織法にて解析する。免疫グロブリンをELISA法にて測定し抗原抗体反応に基づく抗体産生が行われているかを確認する。
 - ② アジュバンドを添加したタンパク抗原を投与し免疫反応を惹起させる。共同研究者が行ってきたウイルス感染実験と比較し、免疫反応成立に必要な因子の同定につなげる。
- (2) イメージング解析系樹立や遺伝子導入、shRNAによる遺伝子の発現抑制を目的とし、高効率の遺伝子導入手法を確立する。
 - ① レンチウイルスベクターを用いて蛍光タンパクを導入する系を確立する。移植されるヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞に蛍光タンパクを導入した上で、マウスに生着させ2光子励起顕微鏡にて各組織を観察する。
 - ② 免疫系細胞の分化や免疫反応の際の動態を生体内もしくは組織の薄片を*ex vivo*で直接観察することにより、生体内での免疫系細胞通しの相互作用について画像情報を得る。

3. 研究の成果

- (1) ① ヒト臍帯血からCD133陽性細胞を単離し移植するのは、他の研究グループで広く行われているCD34陽性細胞を用いた方法よりより幹細胞に近い前駆細胞を導入できる。また移植場所も経静脈的におこなう方法や肝臓内に移植する方法もあるが、骨髄内骨髄移植による直接注入する方法はすみやかに移植細胞が生着部位に達することができる利点がある。これらの手法を組み合わせ、最高で90%のヒト由来細胞生着率を認めた。生着率の向上は、作成個体数の限られるヒト化マウスの解析をすすめる上で非常な利点となった。末梢血、胸腺、脾臓、リンパ節をフローサイトメトリー法にて解析すると分化したリン

パ球はB細胞、T細胞ともに確認でき幹細胞より分化が起こっていることは確認できたが、とくにT細胞の成熟度は健常人コントロールと比べ悪かった。抗体産生は、健常人末梢血と比較しIgMは約1/4の濃度で認められたものの、IgGは1/60、IgAは1/500程度と低く、免疫グロブリンのクラススイッチの効率が悪いことが示唆された。胸腺は認められるものの低形成であり、リンパ節は頸部、腋窩には認められるものの鼠径や膝下には欠損していた。このリンパ節形成の分布の異常はリンパ節形成に重要なケモカインBLCおよびその受容体CXCR5欠損マウスに似ていることからBLCシグナルの欠乏が示唆された。

- ② Bリンパ球のクラススイッチが行われる胚中心の形成を確認するため、完全フロイドアジュバンドを添加した卵白アルブミン (OVA/CFA) を皮下投与し免疫反応を惹起させた。免疫組織法で組織構築を検討したところ、リンパ節には胚中心様の組織像は認められなかったが、活性化Tリンパ球が瀰漫性に増殖していた。もともとリンパ節が欠損している部位に新たにリンパ節の出現を認めることはなかった。意外なことに低形成であった胸腺は免疫刺激により増大した。機能的に髄質に相当するCD4またはCD8陽性胸腺細胞の集積が島状に分布していたが、免疫刺激後、髄質相当部位がとくに増大していることが確認できた。これらよりT細胞の胸腺内分化はほぼ正常に行われていると結論した。次にT細胞の胸腺内分化に必要な胸腺上皮細胞、胸腺内の樹状細胞について検討した。フローサイトメトリ法、免疫組織法ともに皮質胸腺上皮細胞 (cTEC) は検出したが、髄質胸腺上皮細胞 (mTEC) はほとんど検出できなかった。樹状細胞はおもな3亜群のうち、CD11c陽性の従来型樹状細胞 (cDC) とCD303陽性の形質細胞様樹状細胞 (pDC) を未免疫状態で認めた。免疫されるとSIRP α 陽性の移住性樹状細胞 (migratory DC) 出現を認めた。髄質胸腺上皮細胞が未発達な状態でT細胞の分化が行われていることから、樹状細胞が抗原提示などの役割を代替していることが示唆された。
- (2) ① レンチウイルスによる血球系幹細胞への外来遺伝子導入の系を確立した。骨髄移植では移植後の遺伝子発現の低下がよく起こるが、種々のプロモーターを調べた結果、ユビキチンCプロモーターを用いた場合、安定発現することがわかり、第3世代レンチウイルスベクターに組み込み導入遺伝子を発現させる系とした。ヒト臍帯血由来血球系幹細胞/前駆細胞にレンチウイルスベクターにて蛍光タンパクVenus遺伝子を導入し蛍光観察できることを蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで確認できた。この蛍光タンパク導入幹細胞を超免疫不全マウス骨髄に移植し、イメージング可能なヒト化マウスを樹立する予定である。
- ② 免疫反応を惹起させる方法として、アジュバンド加卵白アルブミン皮下投与以外に、TNF α 単独もしくはインターロイキン1 β との投与やデキストランサルフェイト (DSS) 経口投与を検討した。いずれもタンパク抗原を皮下投与したときと異なる反応であった。サイトカインの動態やイメージングにより免疫反応に動員される細胞群を特定し現象の解析へとつなげていく。

4. 研究の反省・考察

- (1) 今年度の研究成果で重要な点は、骨髄移植のみではヒト免疫系の発達は充分ではなく、免疫刺激をすることにより胸腺が発達することがわかった点である。特に免疫刺激によってヒト樹状細胞の末梢からの胸腺移動がおこっているため、同じヒト由来のMHCにより胸腺細胞が分化・成熟し、胸腺の肥大に至った推察される。これまでHLA遺伝子導入などMHCの不一致を克服する方法が報告されていたが、この系を用いるとことによってHLAを選ばず容易に胸腺発達が誘導できることが考えられ、さらに改良をしていく予定である。ヒト胸腺細胞の成熟過程を可視化する方法としてレンチウイルスによる蛍光蛋白質導入により、ヒト胸腺細胞の胸腺内移動や樹状細胞との相互作用を2光子イメージング等を用いて詳細に調べることができる見通しとなった。また、マウスでは胸腺スライス培養を用いた胸腺細胞の動態・分化・選択過程のイメージング系を確立しており、その応用が可能になった。この方法の利点はサイ

トカインや抗体などを直接胸腺内に導入でき、その効果を2光子イメージング、FACSなどを用いて調べることが可能な点である。この系を用いてマウス制御性T細胞の分化誘導にすでに成功している。制御性T細胞の不全は自己免疫疾患、慢性アレルギー等の難治性免疫疾患発症に重要であり、今後、骨髄移植後免疫刺激によって発達した胸腺とこの系を用いてヒト制御性T細胞の効率的誘導に展開していく予定である。これが実現できれば、制御性T細胞の分化促進による新たな免疫治療に展開できることが期待される。

- (2) ヒト疾患モデルとして、DSS誘発性腸炎を検討している。この系は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患と類似した腸炎を起こすことが知られている。腸炎にヒト由来免疫細胞が参加しているのなら、その動員を阻害することにより炎症を改善できる。 $\alpha 4\beta 7$ インテグリンに対する抗体は治験中であり、近い将来に臨床応用される見込みである。イメージングでヒトリンパ球の動態を解析し制御分子の阻害方法を確立することは、新たな治療法開発のシードとなりうる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ueda Y., Kondo N., Ozawa M., Tomiyama T., Yasuda K., Kinashi T., Sema3e/plexin D1 modulates immunological synapse and migration of thymocytes by Rap1 inhibition *J Immunol*. 2016 Apr 1;196(7):3019-31. doi: 10.4049/jimmunol.1502121. Epub 2016 Feb 26.
- ② Yasuda K., Ueda Y., Ozawa M., Matsuda T., Kinashi T., Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. *FEBS Letter* 590(1):68-75. (2016) doi: 10.1002/1873-3468.12045.
- ③ Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, Nomura S, Uchida K, Okazaki K, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):968-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.043. Epub 2015 Jun 6.
- ④ Ishibashi M, Miyanaga Y, Matsuoka S, Kozuka J, Togashi Y, Kinashi T, Ueda M. Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 21;464(2):459-66. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.155. Epub 2015 Jul 2.

(2) 口頭発表

- ① Kinashi T. Roles of Rap1 signaling in immune synapse formation and self-tolerance. The 6th Xiamen Winter Symposium, Xiamen China 2015 Dec.5-7,
- ② Ueda Y., Establishment of thymic organ culture system for regulatory T cell development, The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hokkaido, Nov. 20 2015
- ③ Kondo N., Regulation of high-affinity LFA-1/ICAM-1 binding and immunological synapse formation, The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hokkaido Nov. 20 2015

(3) 出版物

なし

学 校 名	岡 山 理 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ロイコトリエンB ₄ 受容体の細胞内輸送制御機構の解明 －新規抗炎症薬開発のための基盤研究－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ロイコトリエンB ₄ ②新規抗炎症薬 ③BLT1 ④細胞内輸送制御 ⑤表在量調節 ⑥GPCR			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 村 元 直	理 学 部	教 授	研究代表 総括および 分子生物学、生化学、細胞生物学的な実験全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 極 秀 次	理 学 部	教 授	特定遺伝子のノックダウン・ゲノム編集実験、定量PCRによる遺伝子発現解析
橋 川 成 美	理 学 部	准 教 授	酵母2-ハイブリッド法によるBLT1結合蛋白質の探索、及び、蛍光標識受容体の培養細胞内での挙動解析(顕微鏡解析)

ロイコトリエンB₄受容体の細胞内輸送制御機構の解明 —新規抗炎症薬開発のための基盤研究—

1. 研究の目的

本研究の目的は、ロイコトリエンB₄の第一受容体であるBLT1の表在量調節をコンセプトとした阻害剤開発を進めるため、リサイクル/分解の制御機構を含む、受容体の細胞内輸送調節を解明することにある。こうした受容体の細胞内輸送には活性化に伴う受容体の修飾や結合タンパク質の存在が不可欠である。本課題では、細胞表面に局在するBLT1の活性化前後における修飾変化(特にリン酸化とユビキチン修飾)や結合タンパク質に注目し、これらがBLT1のシグナリングや細胞内輸送(細胞内取込み、リサイクル/分解制御)にどう関わるかを解明することで、BLT1の細胞内輸送調節(表在量抑制)という新しいBLT1標的創薬を確立する。

2. 研究の計画

BLT1が受けるリン酸化修飾やユビキチン修飾とその責任酵素、また、細胞内輸送に関わる結合タンパク質を同定する。活性化後の受容体の細胞内取込み、リサイクル/分解過程におけるこれらの意義を明らかにし、細胞表面に局在するBLT1の量的制御に役立てる。本課題では、アスパラギン残基の点変異でN型糖鎖修飾を欠失させた変異BLT1を利用する。この変異体はヘテロな糖鎖修飾がないためにSDS-PAGE解析でシャープなバンドを示し、リン酸化やユビキチン修飾で起こるバンドシフトが明確に判断出来る。なお、BLT1は例外的にN型糖鎖修飾を欠損させても小胞体に貯留せずに細胞膜に発現することを我々は確認している。

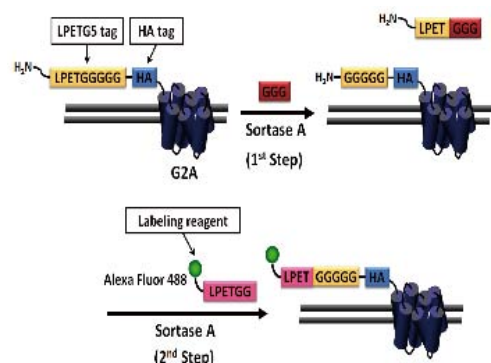
3. 研究の成果

(1) LTB₄の刺激濃度が低濃度から高濃度に徐々に変化することでBLT1を介するシグナル伝達に変換すること(リガンド濃度依存的なシグナル変換機構)を見出しつつある。

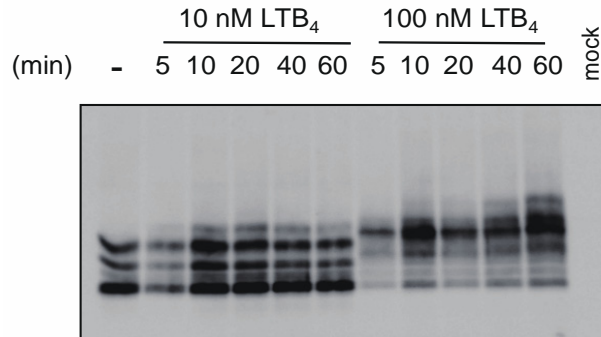
① 仮説が正しいならばBLT1は低濃度LTB₄で活性化後も細胞表面に留まることになる(細胞内取込みがない)。活性化BLT1が細胞内移行しないことを示す論文は既にあるが(Aratake et al. *FASEB J.* 2012)、これを独自の新技术で検証中である。本課題の協同研究者である東京大学大学院工学研究科の長棟輝行教授が開発した表在蛋白質の蛍光標識法(下図)を活用し、解析に必要な受容体発現コンストラクトを作製し、現在共焦点蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス解析を実施中である。

右図説明: Sortase-Aを利用したGPCRの蛍光標識法(Lan et al. *FASEB J.* 2014)。

2ステップ(1st & 2nd steps)からなる方法で、Sortase-Aは細胞外のみ作用するため、この技術では、Sortase-Aが認識する特定配列(図中の黄色タグ)をN末端(細胞外側)に有し、且つ、細胞表面に局在するGPCRだけが蛍光標識される。



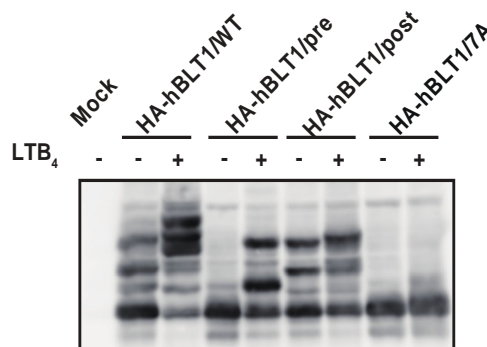
- ② BLT1のカルボキシ末端領域のリン酸化修飾がリガンド濃度依存的に亢進することを見出した(下図)。Phos-tag SDS-PAGE法を活用し、低濃度と高濃度刺激時の比較解析に加え、細胞周辺の環境を低濃度から高濃度へ連続的にシフトさせるなど、生体内環境を意識したLTB₄濃度変化でのBLT1リン酸化変化を観察中である。



上図説明： 仮説を立証する予備的データ (Phos-tag SDS-PAGE解析)。

N型糖鎖修飾を欠失させたBLT1 (バンドがシャープ故に移動度変化が分かりやすい) をHeLa細胞に発現させ、低濃度 (10nM、遊走可能濃度) と高濃度 (100nM) のLTB₄で刺激すると、高濃度刺激ではリン酸化が亢進した。なお、BLT1は無刺激状態でもリン酸化されていることがこのデータから分かった (最左レーン)。

- ③ BLT1のリン酸化の度合いが濃度依存的なシグナル変換に重要であることを証明する。まず、BLT1の全リン酸化部位を決定し、その欠損体を作製する。BLT1のリン酸化には恒常的なものが5カ所 (preリン酸化と命名) とリガンド刺激依存的なものが2カ所 (postリン酸化と命名) あることを明らかにし、恒常的、誘導的部位のそれぞれの欠損体と全リン酸化部位の欠損体 (7A変異体) を作製した (Phos-tag SDS-PAGEにてpre、post部位のリン酸化欠損も確認済み。下図参照)。これらリン酸化部位欠損BLT1を用いてシグナル伝達の変化 (cAMP産生、細胞内カルシウムイオン応答、ERK活性化、Aktキナーゼ活性化、脱顆粒、活性酸素産生など) を正常型と比較解析中である。



上図説明： 作製したリン酸化欠損BLT1の確認。Phos-tag SDS-PAGE法はリン酸化の有無をゲル上移動度の違いで判断する。正常型及び変異型BLT1をこの方法で解析した結果、LTB₄刺激前のリン酸化 (バンドシフト) はpre部位欠損型 (HA-hBLT1/pre) で、LTB₄刺激後のリン酸化はpost部位欠損型 (HA-hBLT1/post) で消失し、全部位欠損型 (HA-hBLT1/7A) では刺激の有無に関わらずバンドシフトが認められなかった。以上の結果から、目的とおりにBLT1のリン酸化部位を全て決定できたと判断した。

- (2) BLT1に対し高濃度LTB₄刺激と同じシグナルを惹起する脂質メディエーターの探索に着手した。BLT1に作用させた際に高濃度LTB₄で刺激した場合と同様のリン酸化パターンを起こす脂

質を脂質ライブラリーから探索中である。この実験に関しては期待するものが簡単には見つからない場合も想定されるが、脂質研究者の協力を得ながら議論を重ねて脂質ライブラリーの質を色々変えて進めると同時に、炎症部位から抽出、分離した新規脂質類も探索候補として評価する。ライブラリーからの探索の際の評価は、高濃度LTB₄でBLT1を刺激した場合のリン酸化パターンやシグナル伝達との比較で行う。ここで見出した新規脂質リガンドをBLT1創薬のためのツールとして活用する。

4. 研究の反省・考察

本課題研究でBLT1がLTB₄の刺激濃度の上昇に伴いリン酸化修飾を亢進させる現象を発見した。これは、1つのメディエーターが量的に変化することでシグナルを変換させることを予測させ、新しい概念の提唱に繋がるかもしれない。例えば、周辺のリガンド濃度が低濃度から高濃度に変わることでBLT1がシグナル変換を起こすことを確証して詳細なメカニズムを解析し、さらに、高濃度下での応答（低親和性状態）を代替できる新規脂質メディエーターを見出すことができればこの物質を新たなBLT1拮抗剤の開発ツールとして創薬現場に提供することができる。1つのGPCRが低濃度リガンドの感受から徐々に構造状態を変え、親和性が低下する構造へと変化し、高濃度下で別のシグナル伝達を起こすという作業仮説は全く新しく独創的である（情報伝達研究の新展開）。このように、BLT1のリン酸化修飾テーマは予想外の興味深い展開に進展し、創薬的に有用な情報でもあったことから、この1年はリン酸化修飾研究に多くの労力を注いだ。結果的にユビキチン修飾研究が計画通りに進まなかったことが反省点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Daisuke Yasuda, Yuki Imura, Satoshi Ishii, Takao Shimizu, Motonao Nakamura, "Atypical N-glycosylation motif of human GPR109A required for surface expression and intracellular signaling" *The FASEB J.*, Vol. 29(2015)2412-2422.
- ② Tetsuya Hori, Motonao Nakamura, Takehiko Yokomizo, Takao Shimizu, Masashi Miyano, "The leukotriene B4 receptor BLT1 is stabilized by transmembrane helical capping mutations" *Biochemistry and Biophysics Reports*, Vol. 4(2015)243-249.
- ③ Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu, Yoshitsugu Yamada "The absence of the leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinalnociceptive processing following intraplantar formalin injury" *The Molecular Pain*, Dec;11(1) (2015)doi:10.1186/s12990-015-0010-9.

(2) 口頭発表

- ① 談莫東、山口哲志、山平真也、中村元直、長棟輝行；一細胞アレイを用いたpH応答性GPCRの細胞内動態解析、第67回（2015年度）日本生物工学会大会、2015年10月26～28日（発表10/26）、城山観光ホテル、鹿児島県 鹿児島市
- ② Modong Tan, Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune；Development of the image cytometry method to analyze g-protein coupled receptor kinetics in the cell. The international chemical congress of Pacific Basin Societies 2015, Dec.15～20, Honolulu, Hawaii, USA

(3) 出版物

- ① 安田大恭, 中村元直, “薬理学的シャペロン - 小胞体蓄積GPCRを形質膜へ発現させる特異的リガンド” 特集「GPCR研究の最前線2016」, 医学のあゆみ, 第256巻(2016)385-392. 2016年1月30日出版
- ② 栗原裕基, 中村元直, “Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)” 生体の科学, 第66 (5) 巻 (2015) 2-3. 2015年10月15日出版

学 校 名	川 崎 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	慢性腎臓病と脳・心血管病との連関機序としての血管内皮機能障害 —分子機序の解明と新規治療法開発—	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①慢性腎臓病 ②内皮機能障害 ③バイオイメージング ④酸化ストレス ⑤心血管病 ⑥脳卒中 ⑦認知機能障害		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
柏 原 直 樹	医 学 部	教 授	研究統括および論文の作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐 藤 稔	医 学 部	准 教 授	分子生物実験、細胞培養実験、結果解析
桑 原 篤 憲	医 学 部	講 師	バイオイメージング実験
八 木 田 佳 樹	医 学 部	教 授	脳組織を用いた遺伝子発現解析、組織学的解析
山 内 明	医 学 部	准 教 授	生化学・分子生物学的解析
長 洲 一	医 学 部	講 師	バイオイメージング実験

慢性腎臓病と脳・心血管病との連関機序としての血管内皮機能障害 —分子機序の解明と新規治療法開発—

1. 研究の目的

- (1) CKDにおける腎内微小血管のECDの分子機序を解明する
 - ① 病態腎微小血管における活性酸素種 (ROS), 一酸化窒素 (NO) 産生変化の解析
 - ② 糸球体内皮障害のアルブミン尿出現における役割の解明と分子機序の解析
 - ③ 内皮 (機能) 機能障害と微小炎症との連関機序の解析
- (2) CKDにおける脳内小血管の血行動態異常、血管機能異常の解析

2. 研究の計画

- (1) CKDにおける腎内微小血管のECDの分子機序を解明する
 - ① 病態腎微小血管におけるROS, NO産生変化の解析

ROS と NO は両義的存在であり、また緊密な相互関係を有するため、役割同定のためには両者を同時に検討する必要がある。ROS、NO の実体を蛍光指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用いて組織において直接可視化し検出する方法「in situ 可視化法」を確立している。糖尿病、高血圧では腎内微小血管系に eNOS uncoupling と ROS 産生亢進、鏡像的 NO 低下認めた (ROS/NO 不均衡)。また eNOS の補酵素である BH4 の組織濃度の低下を認めた。BH4 産生の律速酵素が GTP-cyclohydrolase I (GTPCH-1) である。本酵素を内皮特異的に高発現するトランスジェニックマウス (Tie2-GTPCH-1 Tg) に糖尿病モデルを作成し、ROS/NO 発現変化を検討する。
 - ② 糸球体内皮障害のアルブミン尿出現における役割の解明と分子機序の解析

アルブミン尿出現メカニズムにおける内皮障害の病因的役割を端的に証明するために、2 つの遺伝子改変動物を利用する。①NOX2 (NAD(P)H oxidase主要要素)を内皮特異的に高発現するtie2-NOX2 transgenic mouse (Tg)、及び②BH4 (eNOS機能維持に必須補酵素)の産生律速酵素であるGTPCH-1を内皮特異的に高発現するtie2-GTPCH-1Tgである。①は内皮特異的酸化ストレス負荷モデルであり、②はeNOS uncoupling抑制によるROS/NO不均衡を改善する内皮障害抑制モデルと位置づけることが可能である。①、②に腎障害モデルを作成しアルブミン尿出現の増悪あるいは抑制効果を検証する。腎障害モデルとして糖尿病自然発症マウスAkitaマウスとの交配、及びSTZ糖尿病モデルを作成する。
 - ③ 内皮 (機能) 機能障害と微小炎症との連関機序の解析

尿病性腎症などの多くの障害腎では、糸球体における (微小) 炎症を付随することが示されている。CKDではROS/NO不均衡状態であることを前述した。炎症形成に中心的役割を果たす転写因子NF- κ Bは酸化ストレスによって活性化される。その上流で制御するI κ B kinase (IKK) の活性化とROS/NO不均衡との関連を解明する。上述したCKDモデルにおいてROS/NO不均衡とNF- κ B依存性に発現制御されるICAM-1, VCAM-1炎症サイトカイン (MCP-1, IL-1等) 発現との関連を検討する。
- (2) CKDにおける脳内小血管の血行動態異常、血管機能異常の解析
 - 2 光子レーザー顕微鏡と蛍光色素を用いることでマウス脳皮質部微小血流を可視化できることを確認している。蛍光標識小分子プローブを用いて脳内血管透過性変化、blood brain barrier (BBB)機能変化を解析する方法を確立する。

GFR 低下及びアルブミン尿が血管性認知障害及びアルツハイマー型の発症リスクであることが示されている。CKD モデルを用い脳内微小血行動態変化、透過性変化、BBB 機能変化と認知機能変化を解析する。さらに CKD モデルマウスに脳梗塞/局所脳虚血モデルを作成する。梗塞部及び周辺のペナンプラ部の血行動態変化、透過性変化、認知機能変化を評価する。

3. 研究の成果

(1) CKDにおける腎内微小血管のECDの分子機序を解明する

① 病態腎微小血管における活性酸素種 (ROS) , 一酸化窒素 (NO) 産生変化の解析

Diaminorhodamine (DAR-4M : NO 指示薬) 、 Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA : ROS 指示薬) と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、生成 NO (bioavailable NO) を ROS と同時に組織上で可視化検出する in situ 可視化法を確立した。

本法を活用して病態モデル腎糸球体における NO (赤色蛍光で検出可能) , ROS (緑色蛍光で検出可能) 変化を検討し、病態腎における糸球体内皮細胞の形態的かつ、機能的変化の解析が可能となった。糖尿病、高血圧性腎障害、加齢腎では共通して酸化ストレスが亢進し、NO が減少 (ROS/NO 不均衡) が生じていることが判明した。

② 糸球体内皮障害のアルブミン尿出現における役割の解明と分子機序の解析

GTPCH-1 は proteasome 依存性経路により分解調節されており、糖尿病腎組織において減少することが判明した。AMPK は proteasome 抑制活性を有しており、AMPK 活性化は GTPCH-1 の分解抑制を介して GTPCH-1 発現を維持しうるということが判明した。Metformin は LKB1 依存性に AMPK をリン酸化・活性化する。糖尿病モデル (Akita, STZ) に metformin を投与し、AMPK 活性化を介した GTPCH-1 発現亢進によってアルブミン尿の抑制効果を認めた。

GTPCH-1 は eNOS 機能発現に必須であり、内皮機能調節において中心的役割を果たしている。糖尿病 (Akita DM) 糸球体内皮では (Fenestrae の消失、Glycocalyx 層の減少) 、機能的 (NO 産生能低下、eNOS uncoupling) が生じている (図 3-1, 2) 。一連の変化は GTP-CH1Tg マウスを Akita マウスとの交配により抑制された。

糖尿病腎では eNOS 機能発現に必須の補酵素 BH4 が低下する。BH4 不足を起因として eNOS uncoupling が生じる。BH4 産生の律速酵素が GTPCH1 であり、糖尿病では AMPK 活性低下によりプロテアソーム系亢進により分解が亢進している (図 3-4) 。GTPCH1 は腎症の治療標的となりうるということが判明した。

③ 内皮 (機能) 機能障害と微小炎症との関連機序の解析

CKD モデルにおいて ROS/NO 不均衡と NF- κ B 依存性に発現制御される ICAM-1, VCAM-1 炎症サイトカイン (MCP-1, IL-1 等) 発現との間に関連があることを明らかにした。

(2) CKDにおける脳内微小血管の血行動態異常、血管機能異常の解析

2 光子励起方式レーザー走査型顕微鏡 (2-photon 顕微鏡) を利用する。生体臓器の深部まで、蛍光標識小分子の生体内挙動を 3 次元的に検出でき、長時間観察、動画で記録可能である。すでに各種分子量の蛍光標識 probe を用いてラット、マウスの糸球体血流の可視化、アルブミン等の macromolecule の糸球体係蹄壁からの漏出状態を直接個々の糸球体で可視化する方法を確立している。この技術を応用し、大脳皮質の微小循環動態や透過性変化を可視化、解析し、病態における変化を検討した。CKD モデルにおける脳内微小血管内皮障害、透過性変化を解析する。同時に脳内小動脈における NO, ROS 産生変化を解析した。

血管内皮を可視化するために、Tie2-GFP マウスを用いる。同マウス頭蓋骨に観察窓の形成手術 (骨を薄削する thin skull 法、または頭蓋骨一部を削除する cranial window 法) を施行し、同部より観察した。FITC 標識大分子量デキストランをプローブとして用いて、脳皮質部の微小血行動態を可視化できることを既に確認している。Tie2-GFP マウスに一側頸動脈結紮と解除による虚血・再灌流モデル、あるいは糖尿病自然発症マウスである Akita マウスと交配することで糖尿病モデルを作成した。これらの病態モデルにおける脳内微小血管の血行動態変化、血管透過性変化を解析する。分子量 3000~10000 の Texas Red 標識デキストランを尾静脈より投与し、透過性変化を検討している。

4. 研究の反省・考察

糖尿病、高血圧等の生活習慣病を基盤とする CKD は①腎内血行動態異常（糸球体高血圧）、②諸種の代謝異常を 2 大基盤病態として発症、進展する。糸球体高血圧と内皮（機能）障害が重複すると、アルブミン尿が出現する。さらに蛋白尿へ移行し腎不全へと至る。

内皮機能障害はアルブミン尿出現に関与し、糖尿病、高血圧、加齢腎に共通した基盤病態であり、CKD と CVD の連関機序である。内皮機能障害は線維化にも関与しており、CKD/CVD の有望な治療標的病態であることが判明した。

脳内微小血管の血行動態を可視化する方法の確立に成功した。病態モデルにおける検討は現在も進行中である。鋭意、研究を続け成果をあげたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Deficiency of endothelial nitric oxide signaling pathway exacerbates peritoneal fibrosis in mice.
Kadoya H, Satoh M, Nagasu H, Sasaki T, Kashihara N. Clin Exp Nephrol. 19(4): 567-75, 2015
- ② Relationship between vascular function indexes, renal arteriolosclerosis, and renal clinical outcomes in chronic kidney disease. Namikoshi T, Fujimoto S, Yorimitsu D, Ihoriya C, Fujimoto Y, Komai N, Sasaki T, Kashihara N. Nephrology (Carlton). 20(9): 585-90, 2015
- ③ Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Taniguchi S, Takahashi M, Kashihara N. FASEB J. 29(9):3899-910, 2015
- ④ Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice. Nagasu H, Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N. Lab Invest. 96(1):25-36, 2016
- ⑤ Combination Irbesartan/Amlodipine versus Irbesartan/Cilnidipine for attenuation of albuminuria in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Satoh M, Nishi Y, Kadoya H, Itano S, Komai N, Sasaki T, Kashihara N. Pharmaceutica Analytica Acta. 6:5, 2015
- ⑥ Increased total homocysteine levels predict the risk of incident dementia independent of cerebral small-vessel diseases and vascular risk factors. Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, Yagita Y, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K. J Alzheimers Dis. 49(2):503-13, 2015
- ⑦ Comparison of arteriosclerotic indicators in patients with ischemic stroke: ankle-brachial index, brachial-ankle pulse wave velocity and cardio-ankle vascular index. Saji N, Kimura K, Yagita Y, Kawarai T, Shimizu H, Kita Y. Hypertens Res. 38(5):323-8, 2015
- ⑧ Chronic elevation of tumor necrosis factor- α mediates the impairment of leptomeningeal arteriogenesis in db/db mice. Yukami T, Yagita Y, Sugiyama Y, Oyama N, Watanabe A, Sasaki T, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K. Stroke. 46(6):1657-63, 2015
- ⑨ Deep cerebral microbleeds and renal dysfunction in patients with acute lacunar infarcts. Saji N, Kimura K, Yagita Y, Uemura J, Aoki J, Sato T, Sakurai T. J Stroke Cerebrovasc Dis. 24(11):2572-9, 2015

⑩ Increase in activated Treg in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Treg by ADCC using an antihuman CCR4 mAb (KM2760). Kurose K, Ohue Y, Sato E, Yamauchi A, Eikawa S, Isobe M, Nishio Y, Uenaka A, Oka M, Nakayama E. J Thorac Oncol. 10(1):74-83, 2015

(2) 口頭発表

① 5-Aminolevulinic Acid Attenuates Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury in Mice. Atsushi Uchida, Minoru Satoh, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. ASN KIDNEY WEEK 2015. Nov. 7, 2015. San Diego USA

② Effects of Lanthanum Carbonate on Intestinal Bacterial Flora in Chronic Renal Failure Mice. Minoru Satoh, Hiroyuki Kadoya, Seiji Itano, Atsushi Uchida, Yuji Sogawa, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. ASN KIDNEY WEEK 2015 Nov. 6, 2015. San Diego USA

③ Possible Implication of Xanthine Oxidase Activation on the Pathogenesis Diabetic Nephropathy. Seiji Itano, Minoru Satoh, Atsushi Uchida, Hiroyuki Kadoya, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. ASN KIDNEY WEEK 2015 Nov. 5, 2015. San Diego USA

④ Visualization of in vivo renin activity and its application to study the pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. Minoru Satoh, Kengo Kidokoro, Seiji Itano, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. 10th World Congress for Microcirculation Sep. 25, 2015 Kyoto

⑤ Possible implication of xanthine oxidase activation on the pathogenesis diabetic nephropathy. Seiji Itano, Minoru Satoh, Yuji Sogawa, Atsushi Uchida, Hiroyuki Kadoya, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara. 10th World Congress for Microcirculation Sep. 25, 2015 Kyoto

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ディーゼル排ガス曝露により次世代の神経幹細胞に生じる機能障害 ーマイクロRNAの変化と増殖・分化制御異常ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①胎児期 ②ディーゼル排ガス ③粒子状物質 ④神経幹細胞 ⑤マイクロRNA			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
立 花 研	薬 学 部	講 師	研究総括、実験、データ解析、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
武 田 健	東 京 理 科 大 学 研究推進機構 総合研究院	教 授	データ解析、論文作成
樋 口 敏 幸	薬 学 部	教 授	データ解析、論文作成

ディーゼル排ガス曝露により次世代の神経幹細胞に生じる機能障害 —マイクロRNAの変化と増殖・分化制御異常—

1. 研究の目的

(1) 背景

近年、転写産物の網羅的な解析が行われた結果、膨大な転写産物の多くがタンパク質をコードしないRNA（ノンコーディングRNA）であることが明らかになり、なかでも、マイクロRNAは生命の陰のプログラムではないかと注目を浴びている。マイクロRNAは対応する遺伝子（mRNA）に作用することでタンパク質の合成を抑制する。アポトーシス、細胞増殖、血球・神経・筋など組織の分化といった基本的な生体機能を制御していることが知られ、生物が生命を維持する上で重要な役割を果たす。特に、マイクロRNAの中には臓器特異的に発現するものが知られており、個体の発生・分化に不可欠な要素と考えられている。また、種々のがんや糖尿病などの病態に応じて特異的なマイクロRNA発現パターンを示すことが明らかとなっている。以上より、マイクロRNAは生体の正常な発達や健康状態と密接な関係があると考えられる。

我々はこれまでにディーゼル排ガス（DE）の生体影響について、マウスを用いて胎仔期曝露の影響を検討した。その過程で、脳血管周囲細胞の変性、血管内皮やアストロサイトなどへの影響などを世界に先駆けて明らかにした。加えて、脳内モノアミン濃度の変動、記憶学習能力の低下などの機能的変化が認められたことから、脳神経疾患との関連に注目した。これらの影響はDE中の粒子状成分の除去によって軽減されることから、粒子状成分が特に重要であると考えられる。

器官形成段階である胎児期に受けた影響が不可逆的な変化として表れる場合、一度受けた影響が出生後も残り、疾病の発症につながる恐れがある。これまでに我々が行った研究では、DEの曝露を胎仔期に限定して行っている。したがって、これまでに認められた障害は器官形成段階における発生や分化に生じた異常に起因する可能性が高い。また、近年、マウスにおいて胎仔期における親の食餌が産仔のマイクロRNA発現に影響を及ぼすことが報告されている。これらの報告から、胎仔期のDE曝露によって次世代に生じる脳神経系の健康影響にマイクロRNAの発現変動が関与する可能性が考えられる。

胎仔期は個体の形成に向けて細胞の分化や淘汰、機能獲得といった発達が盛んに生じる期間であることから、脳神経系の正常な発達の要となる神経幹細胞の遺伝的・機能的変化に注目した。これらの神経幹細胞に生じるマイクロRNA発現異常は各種神経細胞の正常な増殖・分化や機能獲得を攪乱し、脳神経系の組織やネットワークの形成に影響を及ぼす可能性が高い。

(2) 目的

本研究では、以下の項目について明らかにすることを目的として実験を行った。

- ① 妊娠マウスにDEを曝露し、胎仔あるいは新生仔の脳から神経幹細胞を得る。得られた神経幹細胞のマイクロRNA発現量を網羅的に解析し、DE胎仔期曝露により発現変動するマイクロRNAを明らかにする。
- ② ①で得られた神経幹細胞の増殖能を調べるとともに、人工的にニューロン、グリア細胞等の各種神経系細胞への分化を誘導し、分化のされやすさに変化が生じているか検討する。また、分化した細胞について遺伝的・機能的解析を行い、その性状の変化を明らかにする。
- ③ ①、②から、DEによる脳機能障害に関与するマイクロRNAを見出す。特にDE曝露により脳組織に生じる病変部位とマイクロRNA発現部位の相関から脳機能障害への関与を検討する。

2. 研究の計画

(1) 概要

妊娠マウスにDEを曝露し、胎仔・新生仔から神経幹細胞を得た。得られた神経幹細胞のマイクロRNA発現レベルを網羅的に解析した。変動が見出されたマイクロRNAについては、バイオイ

ンフォマティクスを用いた*in silico*での検討により、その標的となる遺伝子（mRNA）を抽出した。さらに、見いだされた標的候補遺伝子を機能的に分類した。また、神経幹細胞の増殖能に及ぼす影響について検討を行った。本研究では、環境基準値に近い都市部重汚染地区の大気汚染粒子濃度、すなわち、実際に起こりうる汚染状況の条件で実験を行った。

(2) 実験動物及びDE曝露

実験動物として妊娠マウス（C57BL/6J）を用いた。曝露時期は、妊娠期に実施し、胎仔・新生仔から試料を採取した。曝露装置は共同研究を行う東京理科大学 研究推進機構 総合研究院環境次世代健康科学研究センター内に設置された設備を用いて行った。曝露装置の運転、管理および実験動物の飼育・管理は当該センターの武田健教授の協力を得て行った。なお、動物実験に関しては学内の倫理委員会における審査・承認を得た後に開始し、動物実験倫理に関する規定を遵守して行った。

(3) 神経幹細胞の培養および増殖能についての検討

DEの曝露後、胎仔あるいは新生仔から脳を採取し、専用の培地を用いて神経幹細胞を特異的に培養し、神経幹細胞を得た。得られた神経幹細胞を3日間培養し、DE曝露群、非曝露群における増殖能の変化の有無について検討を行った。

(4) マイクロRNA発現の網羅的解析および標的遺伝子の同定

得られた神経幹細胞からtotal RNAを抽出・精製した後、マイクロアレイを用いて網羅的に発現量の解析を行い、DE曝露により発現変動するマイクロRNAを同定した。

マイクロRNAの遺伝子を実験的に同定する優れた手法は現在のところ十分には確立されていない。その一方で、バイオインフォマティクスを用いたマイクロRNAの標的遺伝子候補の推定手法が開発され、多くのツールが無償で利用可能となっている。このことから、解析原理が異なる複数のツール（主に、塩基配列、結合エネルギー、立体構造の安定性に基づく解析を行う）を用いて標的候補遺伝子の探索を行った。特に、複数の解析ツールにおいて共通して抽出された遺伝子はマイクロRNAの標的となる可能性が高いため、GO termを用いて機能的に分類することで、どのような機能に影響が及ぶか検討を行った。

3. 研究の成果

(1) 実験動物及びDE曝露

C57BL/6Jマウスを用い、妊娠期（仔の器官が急速に発達する妊娠10日目から18日目）にDEの曝露を実施し、新生仔から試料を採取した。DEは、粒子濃度として100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ となるように調整して1日8時間曝露した。この条件を用いることで、環境基準で定められた基準値（1日平均値）と同等の粒子濃度での曝露となる。

(2) マイクロRNA発現の網羅的解析および標的遺伝子の同定

① DEの曝露後、新生仔（1日齢）から脳を採取し、専用の培地を用いて神経幹細胞を特異的に培養し、神経幹細胞を得た。

② 得られた神経幹細胞からtotal RNAを抽出・精製した後、マイクロアレイを用いて網羅的に発現量の解析を行い、DE曝露により発現変動するマイクロRNAを同定した。その結果、雄性産仔の神経幹細胞では18分子、雌性産仔の神経幹細胞では15分子のマイクロRNAに発現変動が認められた。中でも1分子のマイクロRNAは雌雄で共通して発現が変動しており、DE曝露による神経幹細胞の性質の変化に大きく関与することが示唆された。

③ バイオインフォマティクスを用いてマイクロRNAの標的遺伝子候補の推定を行った。解析原理が異なる複数の解析ツールを用いて、発現変動が認められたマイクロRNAの標的候補遺伝子の探索を行った。その結果、400の標的候補遺伝子を見出した。これらの標的候補遺伝子についてGO termを用いてそれぞれの遺伝子が司る機能を分類した結果、“nervous system development” “apoptotic process” “cell cycle”といった機能が抽出された。この結果は、妊娠期のディーゼル排ガス曝露が産仔の神経幹細胞の増殖や分化に影響を及ぼすという本研究の仮説を支持している。実際に、予備的な実験を行ったところ、DE曝露群の神経幹細胞

胞では非曝露群に比べて増殖能が低下する傾向が認められた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究では、胎仔期が個体の形成に向けて細胞の分化や淘汰、機能獲得といった発達が盛んに生じる期間であることから、脳神経系の正常な発達の要となる神経幹細胞の遺伝的・機能的変化に注目した。神経幹細胞に生じるマイクロRNA発現異常は各種神経細胞の正常な増殖・分化や機能獲得を攪乱し、脳神経系の組織やネットワークの形成に影響を及ぼすと仮説を立て、検証を行った。発現変動が認められたマイクロRNAの標的遺伝子を推定し、その機能をGO termを用いて*in silico*で解析したところ、増殖や分化に関与することが報告されている遺伝子が多く抽出された。この結果は、DE胎仔期曝露がマイクロRNAの発現変動をひき起こし、神経幹細胞の増殖や分化に影響を及ぼすことを示唆しており、重要な結果である。引き続き、神経幹細胞の機能的な変化について詳細な分子メカニズムを明らかにすることが、DE胎仔期曝露による脳神経系への影響を理解し、またその回避に向けた対策を検討する上で重要であると考えられる。
- (2) 研究の経過については、当初の予定よりやや遅れたものの計画に沿って進行することができた。引き続き、詳細な分子メカニズムの解明に向け検討を継続する予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
 - ① Ken Tachibana、Kohei Takayanagi、Ayame Akimoto、Kouji Ueda、Shotaro Kawazoe、Yusuke Shinkai、Masakazu Umezawa、Ken Takeda : Disruption of epigenetic regulation and the health effect caused by prenatal nano-sized particle exposure、4th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2016 (iPoPS2016)、Chiba、Japan (2016年2月)
 - ② 梅澤雅和、小野田淳人、川副翔太郎、立花研、武田健 : ナノ粒子曝露が脳の発達に及ぼす影響—鋭敏なマーカーと毒性学的意義、第42回日本毒性学会学術年会、金沢 (2015年6月)
- (3) 出版物
なし

学 校 名	福 岡 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 －HB-EGF発現に関与する分子群の解析－		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①がん治療 ②標的分子 ③創薬開発 ④HB-EGF ⑤コンパニオン診断薬		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 本 新 吾	医 学 部	教 授	研究代表者 統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
四 元 房 典	医 学 部	講 師	実験・論文作成
宮 田 康 平	医 学 部	助 教	実験・データ整理
深 川 怜 史	医 学 部	大 学 院 生	実験・データ整理

ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 —HB-EGF発現に関与する分子群の解析—

1. 研究の目的

本研究の目的は、造腫瘍能のない卵巣癌、乳癌、胃癌のがん前駆細胞を用いて、種々の遺伝子発現ライブラリーを導入し、HB-EGFの発現亢進にともない造腫瘍能の獲得に寄与する分子群を探索・同定する。HB-EGFは上皮系増殖因子ファミリーに属する細胞増殖因子であり、近年、申請者らはHB-EGFが卵巣癌・乳癌・胃癌などの悪性腫瘍の治療の標的分子であること明らかにしている。これまでの研究成果より、血中HB-EGF値や組織中HB-EGF発現量が高い症例が予後が不良であり、HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)投与により血中や組織中のHB-EGF発現が抑制されることは、申請者らにより明らかにされている。本研究の成果による治療診断検査法の開発とBK-UM創薬開発を併行して成果をあげることで、臨床的予後の改善と医療費の削減を同時に目指した医療イノベーションを達成でき、さらなる創薬開発が進むことが期待できる。

- ① 代表的な癌抑制遺伝子p53およびBRCAを欠失させた細胞株を用いて、遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーによる癌・増殖に関わる遺伝子を同定する。また、HB-EGFの発現に寄与する遺伝子の同定のため、HB-EGFの3'UTR側にIRES配列に続くGFP遺伝子配列を挿入し、HB-EGFとGFPの発現が相関する細胞に遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーを感染させ、HB-EGFの発現を制御する遺伝子を同定する。
- ② HB-EGF特異的阻害剤であるBK-UMの医師主導型臨床試験において、HB-EGF値を臨床試験参加の基準のひとつとして参加症例の選別していた。その場合、患者血清をELISA法によりHB-EGF値を測定し、高値症例にはBK-UMの効果が期待できると期待していた。しかし、ELISA法による測定では遊離したHB-EGFを測定していない可能性があり、測定方法を見直す必要があった。また、BK-UM投与症例のなかに、HB-EGFが低いにも関わらずBK-UMが効果があるなどの問題点があった。以上より、HB-EGF以外または併用でのコンパニオン診断薬の開発が必要であった。

一方でnon-codingRNAといわれるmicroRNAは近年の研究により、癌の増殖、転移に関わることが多数報告されている。さらに、RNAのため血液中では容易に壊れてしまうと考えられていたが、エクソソームに内包されることで、血液中においても安定し存在することが報告された。そこで、我々はmicroRNAに着目しコンパニオン診断薬の開発を開始した。BK-UMの臨床試験参加症例や卵巣癌患者、正常卵巣患者、良性卵巣腫瘍患者の血液を対象にマイクロアレイ解析を実施し、HB-EGFの発現に関わるmicroRNAを検索するとともに、BK-UMのコンパニオン診断薬を開発する。

2. 研究の計画

- ① HEK293細胞を用いて、HB-EGF3' UTR側にIRESに続くGFP遺伝子配列を挿入させた細胞を樹立する。樹立したレポーター細胞を用いて、HB-EGFの発現に寄与する遺伝子をshRNAライブラリーおよびcDNAライブラリーを併用することで、スクリーニングする。同様の検討をがん細胞株、正常乳腺および正常卵巣上皮より樹立した細胞株を用いて試みる。さらに、3種類の乳がん細胞株を用いて、二次元培養サンプルとマウスの皮下に移植したxenograft modelを作製し、CGHアレイを行う。
- ② 臨床試験の参加症例や卵巣癌、良性卵巣腫瘍患者の血清をマイクロアレイ解析する。検出されたmicroRNAを検討し、BK-UMの効果が期待できる症例を診断するmicroRNAを同定している。さらに、HB-EGFとともに変動するmicroRNAを同定し、卵巣癌患者血清を用いてreal-time PCR法で臨床的意義を検証していく。

3. 研究の成果

- ① CGHアレイによるスクリーニングやウィルスベクターライブラリーを用いたHB-EGFの制御に関わる遺伝子の探索を行った結果、Y-14 protein(RNA binding motif 8A)を含む3つの遺伝子を同定した。さらに、リポフェクション法によるsiRNAの導入でそれらの遺伝子を抑制すると、HB-EGFを含むEGFR ligandの発現が抑制された。なかでもY-14が最も抑制される結果となった。また、RBM8aを安定し過剰発現または抑制した細胞株をマウスに皮下移植したxenograft modelによる腫瘍増殖能の検討では、Y-14の抑制では腫瘍増殖が抑制され、Y-14の過剰発現では腫瘍増殖が亢進した。
- ② マイクロアレイ解析の結果、予後不良な卵巣癌患者で優位に発現が上昇するmicroRNA、低下するmicroRNAを同定した。さらに、それらのmicroRNAを用いてRT-PCR法で臨床的意義を確認したところ、卵巣癌患者の予後不良群で優位に発現が上昇しバイオマーカーとなりうる3つのmicroRNAを同定した。さらに3つのmicroRNAを用いて、正常卵巣や良性卵巣腫瘍患者および卵巣癌患者の血液を対象にRT-PCR法で発現解析を行った結果、卵巣癌患者で優位に高く、さらに治療後6ヶ月以内に再発した予後不良症例で優位に発現が上昇するmicroRNAを同定した。

4. 研究の反省・考察

- ① Y-14はヒトでは、RNA binding motif 8Aとよばれ、mRNAのスプライシングや輸送、翻訳や調節に関わるエクソジャンクソン複合体の一つである。MAGOH、PYMなどの分子との相互作用により翻訳調節を行うことがわかっている。今回の研究では、Y-14はHB-EGFの発現を調節することを証明した。さらに、HB-EGF発現の低下において、転写後発現調節機構が関与しているかを検討するため、RBM8Aをノックダウンした細胞により得られたRNAで、HB-EGFの全長を増幅させるようなRT-PCRを行った。その結果、RBM8Aをノックダウンした細胞で、全長のPCR産物は減少し、短いフラグメントが増幅され、スプライシング異常が起こっていることが判明した。
- ② microRNAの機能の特性として、ひとつの遺伝子を制御するために複数のmicroRNAが関連すると考えられている。反対に複数の標的遺伝子は複数のmicroRNAに制御されている。今回の解析で同定されたmicroRNAは1種類であり、さらに解析を進めることでコンパニオン診断薬の候補として数種類のmicroRNAを同定する必要がある。そのためには、マイクロアレイ解析の結果を再検討し、候補microRNAを検出し、RT-PCR法での臨床的意義の確認を行う必要がある。さらには、同定されたmicroRNAを用いて、卵巣癌細胞株へ遺伝子導入し細胞増殖試験や薬物感受性試験などを行っていく予定である。さらにそれらのmicroRNAを安定的に過剰発現した細胞株をウィルスベクターを用いて作成する。その細胞をマウスの皮下に移植し、xenograft modelでの腫瘍増殖能の検討などを行う必要がある。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
「翻訳調節分子によるHB-EGFとがん増殖能の制御」 宮田 康平
第14回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 平成27年7月17日 松本
- (3) 出版物
なし

学 校 名	福 岡 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの 解明 －真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①口腔細菌学 ②微生物学 ③歯学 ④免疫 ⑤感染 ⑥炎症 ⑦細胞分化 ⑧シグナル伝達			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 芳 彦	口 腔 歯 学 部	教 授	総括、主な研究の遂行

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 環	口 腔 歯 学 部	准 教 授	真菌を用いた実験

口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの解明 — 真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発 —

1. 研究の目的

口腔真菌感染症は、カンジダ菌などの口腔内常在菌が原因で発症する難治性の口腔感染症である。その病態には免疫応答が関与しているが、その制御機構については未だに解明されていない。高齢化が進む中で、義歯の使用と相まって患者数が増加傾向にある。再発を繰り返す抗真菌薬療法には限界があるために新しい予防法と治療法の開発が待たれているが、真菌に特異的な免疫応答を誘導する治療法の開発は進んでいない。

Candida albicans (*C. albicans*)は、口腔真菌感染症の病原菌として最も頻度が高く、その病原因子や生体防御との関係が特に研究されており、獲得免疫系が疾患と深く関与していることが知られている。なかでもインターロイキン-17 (IL-17) 産生を特徴とするヘルパーT細胞Th17が口腔真菌感染症において重要な役割をはたしており、Th17細胞欠損マウスでは口腔真菌感染症が重篤化する。真菌そのものがヘルパーT細胞を分化させる抗原と示唆されているが、T細胞受容体を介した真菌の抗原性に着目してTh17細胞の分化や遊走への影響を包括的に解析した報告は認められない。また、これらのTh17細胞の生体内における主たる分化の「場」が、小腸であることが明らかにされてきたことにより、口腔真菌感染症の研究は口腔から全身を対象とした解析へ移行するパラダイムの転換の必要性が生じてきたと考えられる。

本研究は、病原微生物と宿主免疫応答の両側面からのアプローチによって、研究代表者がこれまで明らかにしてきた免疫系細胞の分化と遊走に焦点をあて、口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークを解明するとともに、抗原特異的なT細胞エピトープを同定することで、口腔真菌感染症を選択的にターゲットとする新しい予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) ヘルパーT細胞の分化と遊走を司る真菌のT細胞エピトープの同定

- ① ヘルパーT細胞の分化・遊走を司る真菌コンポーネントの同定：ヘルパーT細胞の分化能について、IL-17産生を指標として評価する。具体的には、野生型マウスの骨髄を採取し、骨髄細胞をGM-CSFと7日間共培養することで骨髄細胞由来樹状細胞(BM-mDC)を誘導する。BM-mDCを抗原提示細胞とし、抗原として全ゲノムシークエンスが判明している真菌*C. albicans* SC5314株を用いて、野生型マウスから単離したナイーブT細胞を*in vitro*で分化誘導させて検証する。分化誘導されたヘルパーT細胞を再刺激してサイトカインを産生させた後に、細胞内サイトカイン染色をしたサンプルをFlowcytometryで解析してIL-17産生を評価する。その際に、酵母形、菌糸形、バイオフィームといった各種形態で培養した真菌について、全菌体抽出液、可溶性画分、不溶性画分や細胞壁画分といった各種分画成分に分離したものを抗原として用いる。これらを順次、評価することで主要な抗原部位を絞り込む。
- ② 網羅的解析によるカンジダ菌のT細胞エピトープの同定：さらに、候補となった分画成分を、逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相HPLC)、二次元SDS-PAGE、プロテオミクスの手法により順次解析を進めることで、T細胞エピトープを同定する。プロテオミクス解析は共同研究拠点である九州大学生体防御医学研究所 プロテオミクスセンターの支援を受ける。

(2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析

- ① 腸管粘膜内への真菌の取り込み：真菌の全身における免疫応答の影響を解析するために、蛍光標識された真菌の実験系を構築する。FITCで蛍光標識した真菌を野生型マウスへ胃ゾンデにて投与し、腸管粘膜内への取込みを組織学的あるいはFlowcytometryを用いて観察する。

- ② 生体における口腔内樹状細胞の細胞遊走の解析：FITCで蛍光標識した真菌を作製の上、このFITCで蛍光標識された真菌をBM-mDCと共培養することで、真菌を取り込んだ抗原提示細胞を可視化できるか蛍光顕微鏡で検証する。さらに、BM-mDCをPE-CD11cで染色することで、樹状細胞がFITCで蛍光標識された真菌を取り込んでいることをFlowcytometryによって確認する。T細胞エпитープ抗原をパルスした樹状細胞を蛍光標識し、野生型マウスの口腔粘膜下に移入した後、蛍光顕微鏡ならびにFACSを用いて所属リンパ節および全身への遊走を解析する。

3. 研究の成果

- (1) ヘルパーT細胞の分化と遊走を司る真菌のT細胞エピトープの同定
- ① ヘルパーT細胞の分化・遊走を司る真菌コンポーネントの同定：ヘルパーT細胞の分化能についてIL-17産生を指標として評価した。具体的には、骨髄細胞由来樹状細胞(BM-mDC)を抗原提示細胞とし、抗原として全ゲノムシーケンスが判明している真菌*C. albicans* SC5314株を用いて、IL-17-GFPレポーターマウスから単離したナイーブT細胞をin vitroで分化誘導させて検証した。その際に、酵母形、菌糸形、バイオフィルムといった各種形態で培養した真菌について、全菌体抽出液、可溶性画分、不溶性画分や細胞壁画分といった各種分画成分に分離したものを評価した。可溶性画分ならびに細胞壁画分を主要な抗原部位の候補として絞り込むことに成功した。
- ② 網羅的解析によるカンジダ菌のT細胞エピトープの同定：候補となったこれらの分画成分に対して、逆相HPLCの手法を用いて抗原を複数のフラクションとして分離した。この逆相HPLC解析によりいくつかのピークが検出されており、画分成分が分離されていることが確認された。これらフラクションを用いて、同様のIL-17産生を指標とした評価方法によって解析したところ、IL-17の産生を高く誘導する主要なフラクションが存在していることを見出した。以上の成果は、平成27年9月歯科基礎医学会（新潟）にて共同研究者とともに2演題「*C. albicans*の新規T細胞分化誘導抗原の探索」「口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明」として発表した。その後、IL-17の産生を高く誘導する主要なフラクションと周辺のフラクションをSDS-PAGEにて電気泳動分離を行い、銀染色法にてタンパク質を可視化したところ、幅広い分子量において多数のバンドが存在していることが確認された。主要なフラクションには周辺のフラクションには存在しないバンドが複数存在していることが確認されたものの、候補となるバンドを絞り込むことは困難であることが予想された。そこで、二次元SDS-PAGEを用いて、主要なフラクションサンプルを二次元に展開して周辺のフラクションと比較検討した。その結果、複数の特異的なスポットがあることが確認され、これらのスポットに対してプロテオミクス解析を進めている。
- (2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析
- ① 腸管粘膜内への真菌の取り込み：真菌の全身における免疫応答の影響を解析するために、蛍光標識された真菌の実験系を構築した。FITCで蛍光標識した真菌を野生型マウスへ胃ゾンデにて投与し、腸管粘膜内への取込みを組織学的あるいはFlowcytometryを用いて観察した。全身において真菌への生体防御を獲得する可能性が示唆された。
- ② 生体における口腔内樹状細胞の細胞遊走の解析：FITCで蛍光標識した真菌を作製の上、このFITCで蛍光標識された真菌をBM-mDCとin vitroで共培養したところ、多数のBM-mDCが真菌を取り込んでいる様子が蛍光顕微鏡的に観察された。さらに、BM-mDCをPE-CD11cで蛍光染色してFlowcytometryにて解析したところ、ほとんど全てのカンジダ菌がBM-mDCに取り込まれていることが確認された。

4. 研究の反省・考察

抗原特異的なT細胞の解析、特にT細胞受容体を介して認識する真菌特異的な抗原部位につい

での解析は国内外を問わず進んでおらず、Th17細胞を誘導するT細胞エピトープは未だに明らかになっていない。また、Th17細胞そのものは歯周病などでは増悪因子となるため、口腔真菌感染症に対するワクチンの開発において、抗原と無関係に単にTh17細胞の免疫応答を誘導するだけでは不十分であり、T細胞受容体を介した真菌特異的な抗原部位の同定は不可欠であると言える。本研究では、我々が取り組んできた「宿主免疫応答」と「病原微生物*C. albicans*」の両側面からのアプローチにより、Th17細胞を誘導する真菌特異的な抗原部位の同定を進めており、候補となる抗原の絞り込みを経てプロテオミクス解析を進めている。本研究によって得られた研究成果により病原微生物を選択的にターゲットとする口腔真菌感染症の予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目指していく。

さらに、従来の研究は、*in vitro*あるいは口腔内局所に限局された解析によって進められてきたが、歯科口腔領域の疾患を全身の健康と密接に関連した疾患としてとらえる「口腔医学」という新しい概念でとらえる必要があると考えられる。今後、「口腔医学」という新しい領域の発展を念頭に研究を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

- ① 長 環、田崎園子、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、田中芳彦。*Candida albicans*の新規T細胞分化誘導抗原の探索。第57回歯科基礎医学会学術大会・総会。新潟、9月12-13日（13日）、2015。
- ② 田崎園子、長 環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、小島 寛、田中芳彦。口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明。第57回歯科基礎医学会学術大会・総会。新潟、9月12-13日（12日）、2015。

(3) 出版物

なし

学 校 名	広 島 国 際 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	超高放射能汚染土壌の簡便な除染と食用基準値内の野菜栽培 －光合成細菌による実用的除染及び農業復興－	研究分野	環 境 科 学
キ ー ワ ー ド	①放射能汚染土壌 ②土壌浄化 ③光合成細菌 ④農業復興		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐々木 健	工 学 部	教 授	研究統括、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
新 川 英 典	工 学 部	教 授	光合成細菌の培養、放射能分析
竹 野 健 次	工 学 部	教 授	光合成細菌による土壌除染、データ整理、論文作成
佐々木 慧	工 学 部	講 師	光合成細菌による土壌除染、データ整理、野菜栽培

超高放射能汚染土壌の簡便な除染と食用基準値内の野菜栽培 — 光合成細菌による実用的除染及び農業復興 —

1. 研究の目的

- (1) 光合成細菌による放射能汚染土壌除染技術の実地における試験
 - ① 福島第一原発事故により放射能汚染された土壌のうち、超高汚染土壌（約10-50万Bq/kg）の土の除染を、光合成細菌法を用いて行い、除染後、各種野菜栽培を行って、食用基準値内の野菜栽培が可能かを試験する。光合成細菌の量や培養方法（栄養塩添加、通気量調整等）を変化させ、除染効果を高めるとともに、野菜への放射性セシウムの移行を抑え、どの程度の超高汚染土壌なら農業復興が可能かどうかを明らかにする。
 - ② 福島では、黒ボク土、褐色森林土、褐色低地土等多種類の土壌が存在しているが、どのタイプの土壌で、どの程度の汚染ならば、本技術で農業復興が可能かを明らかにする
 - ③ 土壌放射能の、光合成細菌や野菜への移行を定量的に把握し、光合成細菌の保有する強力なカリウムポンプによる現象である仮説（佐々木仮説）を証明する。

2. 研究の計画

- (1) 福島県浪江町での除染実験
 - ① 前年度に引き続き、福島県浪江町の福島第一原発から約20km地点から採取した高濃度に汚染された土壌（20-50万Bq/Kg）で除染試験を行う
 - ② 従来の光合成細菌ビーズを用いる方式だけでなく光合成細菌の培養液を直接用いて回収する方法を試みる。
 - ③ 除染した土壌で、食用基準範囲を満たす（100Bq/Kg以下）野菜の栽培を実現する。

3. 研究の成果

- (1) 高濃度汚染土壌の除染

実験地域は前年度20万Bq/Kg以上を確認したエリアだが、実験開始前に土壌の放射線濃度を計測した際は最大で12万Bq/Kgほどの土壌しか見いだせなかった。放射能の自然減衰や雨水による放射性物質の地下への浸透が原因と考えられた。当初は20～50万Bq/Kg程の黒ボク土、褐色森林土、褐色低地土のような様々な土壌で試験をする予定であったが、目的の放射能濃度の土壌試料が得られなかったため、計測したエリア内で最も高かった森林内の腐葉土のみで試験を行った。

60L容量のコンテナボックスに汚染土壌30kgと井戸水20Lを入れ、乳酸菌を10L添加し37℃で3日間嫌気条件で乳酸菌処理を行った。その後、ネットに入れた光合成細菌ビーズを2000個投入し、栄養源を添加した後10日間好気処理を行った。好気処理中は温度を30℃とし、毎日pHを7前後に調節した。好気処理が終わると土壌を水で洗浄して菌体などを洗い流し、除染処理後の土壌とした。

結果除染処理前は123,064 Bq/kgdwであった土壌は、除染後は35,191 Bq/kgdwとなり、除去率は75.2%となった。これはこれまでに土壌で行ってきた除染では最高の除去率である。
- (2) 水による洗浄との比較

この除染処理技術では、土壌に入り込んだ光合成細菌を洗い流すため、光合成細菌処理後に土壌を水で洗浄している。この土壌の洗浄が除染に与えている影響を確かめるため、乳酸菌処理と光合成細菌処理を行わない水洗浄と光合成細菌による除染処理との比較を行った。その結果、水洗浄の洗浄後の土壌は89,453 Bq/kgdw（除去率27.3%）となり、光合成細菌による除染の35,191 Bq/kgdw（除去率は75.2%）となった（図1）。

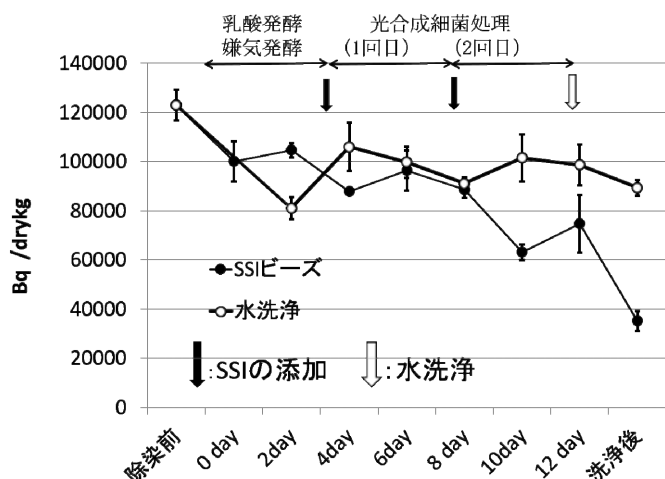


図1 光合成細菌処理 (●) と水洗浄 (○) の土壌の放射線量の挙動

(3) 除染土壌を用いた野菜栽培

除染を行う前の土をコントロールとし、光合成細菌ビーズによる除染後の土と水洗浄後の土を用いて小松菜とチンゲン菜の栽培を行った。それぞれの土をプランターに詰め、市販の小松菜とチンゲン菜の種を植え、約40日間栽培した。肥料は、種まき時に石灰、配合肥料（ハイポネックス）を添加し、一日1回水やりを行った。収穫後の野菜は（株）福島同位体研究所（郡山市、横浜市）に依頼して放射線量を測定した。測定装置は、半導体ゲルマニウム計測器CANBERRA GC2020/SEIKO-EG&G SEG-EMS (GEM 20-70)で行なった。

測定の結果、処理前の土で栽培した野菜は小松菜が609.6Bq/kgfw、チンゲン菜が835.6Bq/kgfwであったが、光合成細菌ビーズで除染した土で栽培した野菜は小松菜が328.8Bq/kgfw、チンゲン菜が242.1Bq/kgfwとなった。また水洗浄後の土壌で栽培した野菜は小松菜が249.5Bq/kgfw、チンゲン菜が187.3Bq/kgfwとなった（表1）。このように土壌の除染では過去最高の放射線量の除去率を達成できたものの、野菜の栽培では食用基準値である100Bq/kg以下の値を達成することができなかった。また、水洗浄では土壌の放射線量は89,453 Bq/kgdwと光合成細菌ビーズにより除染した土の35,191 Bq/kgdwに比べ2.5倍以上高いにも関わらず、栽培した野菜の放射線濃度では大きく変わらなかった（表1）。

表1 除染後土壌での野菜の放射線量

土壌	除染方式	野菜放射線量 (Bq/kgfw)							
		コマツナ				チンゲン菜			
		I ₁₃₁	Cs ₁₃₄	Cs ₁₃₇	合計	I ₁₃₁	Cs ₁₃₄	Cs ₁₃₇	合計
腐葉土	対照	ND	104.7	504.9	609.6	ND	163.4	672.2	835.6
腐葉土	水洗浄	ND	56.0	193.5	249.5	ND	28.0	159.3	187.3
腐葉土	光合成細菌	ND	42.0	286.8	328.8	ND	53.8	188.3	242.1

(4) 光合成細菌のカリウムポンプがセシウム吸着に及ぼす影響

光合成細菌を培養する際にカリウム濃度を調整した培養液で培養した菌体を用いてセシウムの吸着量を測定した。実験には7L規模のエアリフト式のバイオリアクターを用い、非放射性の塩化セシウムを添加して試料液中のセシウム濃度を原子吸光計で測定した。その結果、通常のGM培地で培養した菌体より、培地のカリウム成分（リン酸水素2カリウム、リン酸2水素カリウムなど）の濃度を半分にした培地で培養した菌体の方がセシウム吸着能が顕著に高いこと確認した。これらの結果から、今回の除染実験では光合成細菌はカリウム濃度を調整した培地で培養したものをを用いた。

4. 研究の反省・考察

(1) 目的

前年度の実験の際に測定した時点では牧場敷地内の森林、牧草地、畑土壌など様々なエリアで20万Bq/kg以上の放射線量を確認していた。しかしながら今年度の実験では、同じ牧場の敷地内では当初予定していた20万Bq/kg以上の高放射線濃度の土壌を得られなかった。これは放射性セシウムの雨水による漏出や放射線量の自然減衰が想定を超えていたためである。また同じ理由から、黒ボク土、褐色森林土、褐色低地土等様々な種類の土壌を用いた試験を行うこともできなかった。これらの実験を行うには、より放射線濃度が高く多様な土壌が採取できる新たな実験場を見出す必要があった。しかしながら、今回実験した地域より福島第一原子力発電所に近いエリアは立ち入りが制限されており、新たな土壌採取は困難であった。以上の理由から目的のサンプルが得られないと分かった時点では実験場所を柔軟に変更することができなかった。

(2) 高濃度汚染土壌の除染

除去率が過去の実験より高くなった理由として、用いた土壌が腐葉土であったことが考えられた。腐葉土は有機質を多く含み、この有機質は乳酸菌処理によってよく分解されるため、土壌からの放射性セシウムの遊離が効率よく進んだためと考えられた。

(3) 水による洗浄との比較

光合成細菌による除染は放射線量の除去率が75.2%と水洗浄の27.3%と比べ顕著な差が見られた。このことは水による洗浄に対して本技術の有用性を示した。一方で水による洗浄でも放射線量は低下したことから、雨水による放射性セシウムの漏出が少なからずあることが考えられた。これは水による洗浄の際に放射性セシウムを比較的多く含む細かい土壌粒子が泥として流されているためと考えられた。光合成細菌の除去率が高くなったのは乳酸菌処理の際に今回の試験土壌に多く含まれる腐葉土が分解され、そこから放射性セシウムがよく水中に溶出したためと考えられた。

(4) 除染土壌を用いた野菜栽培

光合成細菌ビーズで除染した土で栽培した野菜は処理前の土で栽培した野菜に比べて放射線量は46.1~72.1%減少したが、それでも食用基準値である100Bq/kg以下の値を達成することができなかった。これは野菜の種を植えてから収穫するまでの時間が40日間と長すぎたため、土壌の放射性セシウムを野菜が多く吸収、蓄積したためと考えられた。再度栽培実験を行い、より短い日数で収穫する必要がある。

(5) 光合成細菌のカリウムポンプがセシウム吸着に及ぼす影響

実験室内の実験で、カリウム濃度を半分にした培地で育てた菌体の方がセシウム吸着能が強いことを見出すことができた。しかしながら、現象面での確認はできたが、具体的なカリウムポンプの機能の証明まではできなかった。今後はカリウム濃度の異なる様々な種類の土壌を用いた除染試験や実験室内でカリウムポンプの細胞内局在を確かめるなどの実験を行う予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

2016年農芸化学学会大会発表（札幌）題目：放射能汚染土壌の光合成細菌による除染と食用基準内の野菜栽培 発表者：佐々木 慧

(3) 出版物

佐々木 健、佐々木 慧：「光合成細菌—採る・増やす・とことん使う—農業、医療、健康から除染まで」農文協 2015年12月20日発行 ISBN978-4-540-13150-9

学 校 名	上 智 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	有機無機複合型物質によるハイブリッド励起子の生成		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機無機ハイブリッド ②光学材料 ③量子閉じ込め材料			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
竹 岡 裕 子	理 工 学 部	准 教 授	試料作製、基本物性評価、太陽電池素子作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
樺 田 英 之	理 工 学 部	准 教 授	光学物性評価(レーザー物性等)、量子計算

有機無機複合型物質によるハイブリッド励起子の生成

1. 研究の目的

1990年代後半から、無機有機複合型物質の研究が盛んになり、無機半導体中の励起子と有機物質の励起子を相互作用の実現や、無機と有機の間の効率良いエネルギー移動や電荷移動を利用して、新規な光デバイスを実現させることに注目が集まっている。本研究では、ハロゲン化鉛と有機アンモニウムから構成される有機無機ペロブスカイト型化合物に着目し、 $[\text{PbX}_6]^{4-}$ から形成される無機半導体層内における励起子の解析と有機層中に機能性有機分子を導入することによる物性への効果を検討することを目的とした。一方で、近年ペロブスカイト型化合物を活性層に用いたハイブリッド型太陽電池が急速に発展し、注目を集めている。太陽電池における励起子物性を明らかにすることで、異種励起子間の相互作用を利用したデバイスの創製に結びつくと考え、機能性配位子を有機層に導入したペロブスカイト型化合物の太陽電池への応用を検討した。具体的な項目を下記に示す。

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の太陽電池評価

無機 - 有機層間の励起子相互作用を研究するため、有機・無機層状ペロブスカイト化合物 $(\text{RNH}_3)_2\text{PbX}_4$ に導入する種々のフラーレン化合物を有機無機ペロブスカイト型化合物に導入し、太陽電池をツールとして、導入効果を検討する。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

三次元有機無機複合型物質 $(\text{CH}_3\text{NH}_3)\text{PbX}_3$ は新規太陽電池材料として急速に研究が進んでおり、20パーセントを超える変換効率が達成されている。しかし、この物質が高い性能を示す理由については議論がなされており、特に光励起後のキャリアの状態については未だに理解されているとはいえない。例えば、少なくとも低温下ではキャリアは励起子を形成することが従来から分かっているが、いくつかの研究グループにより、励起子はそれほど安定ではないとの主張がなされている。そこで本研究では三次元ペロブスカイト物質を対象に精密な発光観測を行い、光励起後のキャリアの状態、およびその緩和過程の解明を行った。これにより、将来的に機能性有機配位子を導入したペロブスカイト化合物の物性評価に結び付くと考えられる。

2. 研究の計画

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の太陽電池評価

2014年度までにフラーレンを有機層に導入した有機無機ペロブスカイトにおいて、光伝導性が発現することが明らかとなっており、この化合物の特性をさらに明らかにするために、フラーレン系有機配位子の多様化と、これらを太陽電池の活性層に導入した際の特性評価を検討した。ここ数年、ペロブスカイト型化合物が太陽電池材料として急激に注目を集めており、高い効率が報告されているが、材料はメチルアミン (CH_3NH_2) とハロゲン化鉛 (PbX_2) から合成されるペロブスカイト化合物に限定されており、有機 - 無機ペロブスカイト化合物の多様性を活かしていない。本研究では、有機薄膜太陽電池のn型材料として注目されているフラーレン化合物を有機層に導入したペロブスカイト化合物を用いた際の特徴を見出し、今後の特性向上の施策を得ることを目的とした。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

不純物や欠陥による影響が少ない単結晶試料を用いて、発光スペクトルおよび時間分解発光を測定した。励起光強度依存性を調べることにより、光励起キャリア間の多体効果に由来する信号を抽出し、それらがキャリアのどのような状態に対応するかを考察することによって、光励起後のキャリアの状態の解明を試みた。

3. 研究の成果

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の太陽電池評価

前年度までの研究により、フラーレン誘導体[ethyl-3-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl (1, 2-methanofullereneC₆₀)]-61,61-dicboxylate iodide (EAF-I) を含む有機無機層状ペロブスカイト化合物(EAF)₂PbI₄が有機薄膜太陽電池の活性層として利用可能であることが明らかとなった(特願2014-190422)ている。その性能が低く、機能性有機配位子を導入した効果を判別することが難しいため、本年度は(EAF)₂PbI₄を導入した太陽電池の性能を向上させることを検討した。FTO / compact TiO₂ / mesoporous TiO₂ / (EAF)₂PbI₄ / HTM(ホール輸送層) / Auの構造からなる太陽電池を作製し、TiO₂層作製条件、(EAF)₂PbI₄のスピンコート条件、アニール温度を変化させ、太陽電池性能への影響を詳細に調べた。その結果、スピンコート回転数、アニール温度を変化させることにより、ペロブスカイト薄膜の結晶性と結晶サイズが変化し、性能に影響を及ぼすことが分かった。また、光電子分光測定等を利用することにより、本化合物のバンドエネルギーを算出し、最適なHTMを選択した。フラーレンに修飾された構造が異なる*N*-Methyl-2-(4-ammoniumphenyl)-fulleropyrrolidine iodide (AmPF-I)を有機層に導入したペロブスカイト化合物の薄膜も同様に作製し、太陽電池の活性層への導入が可能であることがわかった。また、層状ペロブスカイト化合物は湿度に対して安定であるため、従来のペロブスカイト太陽電池にある割合で添加することにより、耐湿性が向上することも分かった。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

臭素系三次元ペロブスカイトCH₃NH₃PbBr₃単結晶に対して低温・強励起のもとで発光観測を行った。その結果、これまで報告例のない新たな信号がみられた。さらに、励起光強度に対して非線形な立ち上がりが見られ、時間分解発光測定で極めて短い寿命であることが観測されたことから、この信号は励起子-励起子散乱に対応することが判明した。これらは、この物質における光発電過程には電子-正孔分離機構が働いていることを示唆しており、より励起子が安定とされる低次元系ペロブスカイト物質でも、適切な構造によって分離機構を組み込むことにより、高効率発電が期待できる。

4. 研究の反省・考察

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の作製

フラーレンを導入したペロブスカイト化合物において、励起後の各層への電荷分離や光導電性等の発現が示唆され、太陽電池性能も徐々に上がってきつつあるが、異種励起子を利用したメリットが生かされる構造が未だ構築できていない。具体的には、現状では基盤に対する層状ペロブスカイト化合物の配向性が太陽電池の電荷分離に不利な方向に働いており、基盤に垂直な配向へと変化させることができれば、よりメリットを生かすことができると期待できる。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

本研究では単結晶試料を用いており、上記で述べた電荷分離過程の観測には至っていない。本研究の成果を生かし、実際のペロブスカイト太陽電池構造に対して同様な測定をするための光学系を構築する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

H. Kunugita, Y. Kiyota, Y. Udagawa, Y. Takeoka, Y. Nakamura, J. Sano, T. Matsushita, T. Kondo, K. Ema
“Exciton-exciton scattering in perovskite CH₃NH₃PbBr₃ single crystal”
Japanese Journal of Applied Physics 55 060304 (2016)

(2) 口頭発表

- ① 今田真央, 藤田正博, 竹岡裕子, 陸川政弘 「機能性配位子を用いたペロブスカイト太陽電池(I)-アルキルアミンユニットを導入したフラレンの合成 -」第64回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター, 2015年5月27日.
- ② 清田祐貴, 宇田川洋祐, 中村唯我, 佐野惇郎, 松下智紀, 櫻田英之, 竹岡裕子, 近藤高志, 江馬一弘 「有機無機ペロブスカイト化合物の励起子物性」, 日本物理学会, 関西大学, 2015年9月18日.
- ③ 今田真央, 藤田正博, 竹岡裕子, 陸川政弘 「機能性配位子を用いたペロブスカイト太陽電池(III)-フラレン誘導体を有するペロブスカイト薄膜の評価 -」第64回高分子学会討論会, 東北大学, 2015年9月17日.
- ④ 今田真央, 藤田正博, 竹岡裕子, 陸川政弘 「機能性配位子を用いたペロブスカイト太陽電池(IV)-フラレン誘導体を有する太陽電池作製の条件検討 -」第5回CSJ化学フェスタ, タワーホール船堀, 2015年10月13日 - 15日.
- ⑤ Y. Kiyota, Y. Udagawa, H. Kunugita, Y. Takeoka, Y. Nakamura, T. Matsushita, T. Kondo, T. Miyasaka, and K. Ema “Excitonic Properties and Carrier Dynamics of $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ Single Crystals”, 1st International Conference on Perovskite Solar Cells and Optoelectronics, Lausanne, 27-29 September 2015.
- ⑥ Y. Takeoka, M. Imada, M. Yoshizawa-Fujita, and M. Rikukawa, “Control of Perovskite Structures using Various Organic Amines”, 1st International Conference on Perovskite Solar Cells and Optoelectronics, Lausanne, 27-29 September 2015.
- ⑦ M. Imada, M. Yoshizawa-Fujita, Y. Takeoka, and M. Rikukawa, “Hybrid perovskite solar cells using functional ligand (II)- Optical properties of perovskites containing fullerene derivatives-”, Pacificchem2015, Hawaii, 15-20, December 2015.

(3) 出版物

なし

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	理 工 学 研 究 所
研 究 課 題	有機元素化学における含ホウ素新奇化合物群の創製と応用		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①ホウ素 ②求核種 ③小分子活性化 ④ルイス酸 ⑤有機合成化学 ⑥低酸化状態		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 下 誠	理 工 学 部	教 授	研究代表者:ホウ素求核種の化学全般・データ収集

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 克 規	理 工 学 部	助 教	含ホウ素高周期典型元素の化学・データ収集

有機元素化学における含ホウ素新奇化合物群の創製と応用

1. 研究の目的

【研究背景】有機化学において含ホウ素化合物は有機合成化学・材料化学・医薬品合成・触媒反応など、多岐にわたって使用されており、鈴木・宮浦クロスカップリングがノーベル賞を受賞したことは記憶に新しい。一般にこれらの有機ホウ素化学においては、ホウ素原子がルイス酸として働くことで sp^2 および sp^3 混成軌道を有する状態間で相互変換することが全ての反応の鍵となっている。このような背景の中、申請者は最近、ルイス塩基として振る舞う新規アニオン性 sp^2 ホウ素化合物、ボリルリチウムを発見し、この希少な化学種を中心にボリルアニオン類の性質の解明を行うことで元素化学基礎研究を推進してきた。

【研究目的】平成 27 年度には、平成 26 年度前半までに得られた実験結果に合わせて研究目的を組み直した上で、未発表の研究成果を論文として仕上げると共に、以下 4 課題を進めることとした。

(i) 非対称 diborane(4)化合物の構造多様化

既にその特異な反応性を明らかにした非対称 diborane(4)の誘導体ライブラリを構築し、その立体および電子効果が酸化還元特性へ与える影響を明らかにする。1 電子還元が可逆プロセスとなる場合には、電池への応用も視野に入れる。また、未知の炭素置換ボリルアニオン等価体としての応用も試みる。

(ii) 非対称 diborane(4)を用いた金属フリー三重結合切断反応の展開

非対称 diborane(4)の三重結合との反応性を活かして、ジアゾニウム塩の $N \equiv N$ 三重結合の切断への応用を試みる。ここでは(i)で構築する化合物ライブラリを最大限に活用する。また、反応性が非常に低い窒素分子の $N \equiv N$ 三重結合の直接切断、遷移金属窒素錯体を併用する間接切断を高難度の目標として設定する。

(iii) ボリルアニオン炭化水素溶液を用いたホウ素置換典型元素化合物の合成

平成 26 年度までにその調製条件を確立したボリルアニオン炭化水素溶液を用いて、典型元素ハロゲン化物に対して求核的にボリル置換基を導入し、ホウ素置換低配位典型元素化合物群を得る。従来のボリルアニオン THF 溶液では電子移動やハロゲンへの求核攻撃が優先していたため、この課題は達成不可能であった。得られる化合物群は光電子物性に注目して性質の解明を行う。

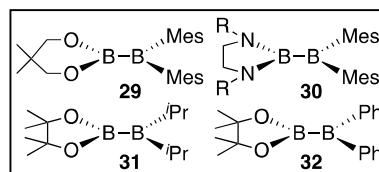
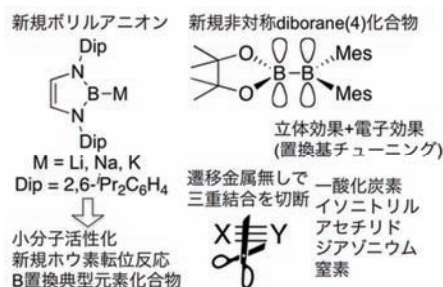
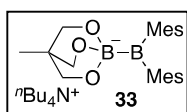
(iv) ボリルアニオン類による新形式有機反応探索

ここではボリルアニオンに特異な有機反応探索を行う。具体的には(a)ボリルアニオンによる炭化水素の直接脱プロトン化、(b)ボリルアニオンと各種小分子の反応、の 2 項目を目標とする。特に(a)はカルボアニオンでは達成できない反応であり、ボリルアニオンの塩基性の限界を見極めることで、最強の塩基としての位置づけを明確にする。

2. 研究の計画

(i) 非対称 diborane(4)化合物の構造多様化

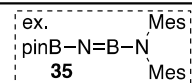
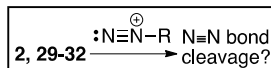
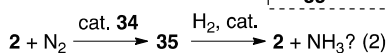
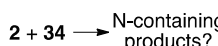
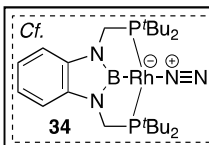
2 の反応性に対する置換基効果を見積もるため、ピナコール部位を換えた **29,30**、Mes 基を換えた **31,32** を合成し、電子受容性の違いについて **2** との比較を行う。また、分子内アルコキシ配位子を持つ **33** を合成し、初めての炭素置換ボリルアニオン Mes_2B^- 等価体としての利用を目指す。



(ii) 非対称 diborane(4)を用いた金属フリー三重結合切断反応の展開

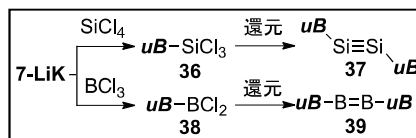
(i) で構築する誘導体群と CO・イソニトリル・アルキンとの反応を行い、

2 との比較を行う。**2, 29-32** とジアゾニウム塩との反応も検討し、N≡N 三重結合の切断の可否を判定する。また、申請者らが報告した Rh 錯体 **34** (ACIE 2012, 51, 6956.) における配位 N₂ の末端窒素を **2** と反応させる(式 1, **35** の生成を期待)。**37** の量を触媒量に減じ(式 2 の 1 段階目)、続く加水素分解により触媒的窒素固定反応へと展開する。併せて既知の他の N₂ 錯体も検討する。



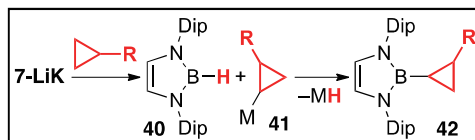
(iii) ポリルアニオン炭化水素溶液を用いたホウ素置換典型元素化合物の合成

7-LiK の溶液に SiCl₄ を作用させて **36** とし、続く還元によりホウ素置換ジシリン **37** を得る。**37** は **17** と構造の比較を行い、Si および P のπ軌道とホウ素の空の p 軌道との相互作用を、光化学および酸化還元特性にて比較する。同様に **7-LiK** に対して BCl₃ を作用させて **38** とし、続く還元により未知の化学種ジボレン **39** を得る。HB=BH は基底三重項で不安定だとされる(JACS 1975, 97, 3402.)が、ポリル置換基の導入で安定化が期待できる。



(iv) ポリルアニオン類による新形式有機反応探索

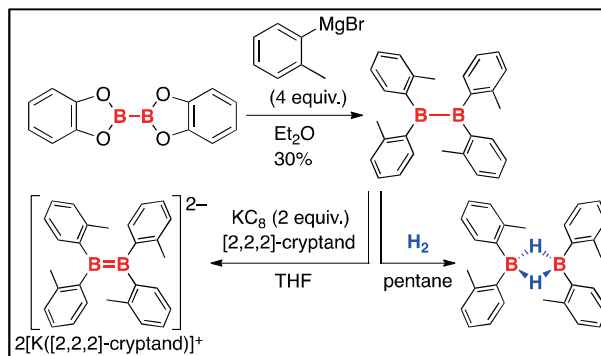
7-LiK とアルカンの反応による C(sp³)-H 結合の直接ホウ素化反応を検討する。シクロプロパンと反応することを予備的に見いだしており、**40** と **41** の反応で **42** が生成することを期待する(**22** の生成を参照)。また CO, N₂ などの気体小分子との反応を検討し、ボラケテン **29** やポリルヒドラジド **30** の生成を期待する(THF 溶媒を用いた際はいずれも反応しない)。



3. 研究の成果

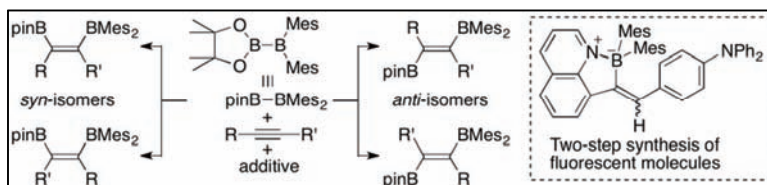
(a) 新規対称型 diborane(4) の合成と性質の解明

(i) の検討中に o-tol 基を 4 つ有する対称型 diborane(4) が得られ、これが **2** よりも容易に還元を受けること、**1** または **2** 電子還元を受けてホウ素間に多重結合性を有するラジカルアニオンまたはジアニオンを与えること、B-B 結合の切断を伴いながら水素分子と直接反応して水素架橋型 diborane(6) を与えることを見出した。反応機構解明のための DFT 計算を行った後に論文投稿予定。



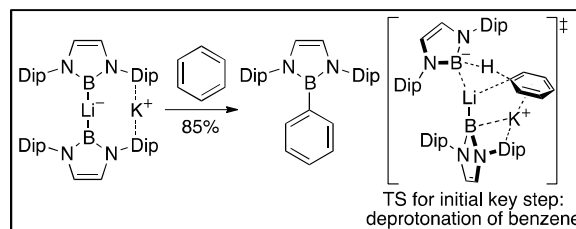
(b) 非対称 diborane(4) **2** とアルキンの反応によるジボリルアルケンの合成法開発

非対称 diborane(4), pinB-BMes₂ が遷移金属触媒の非存在下で末端および内部アルキンと直接反応して、ジボリルアルケンを与えることを明らかにした。反応条件により異性体を作り分けられることを明らかにすると共に、中間体として sp²-sp³ 型ジボランおよびボラタアレンの単離にも成功した。また、材料化学への応用として固体蛍光発光を示す分子の短工程合成経路の確立も行った。論文②発表済。



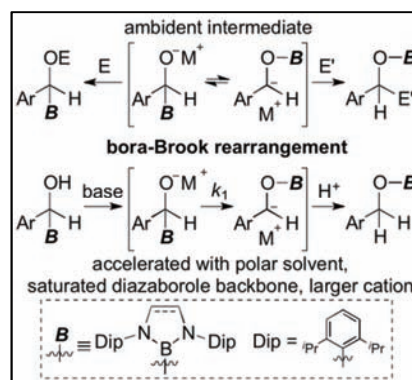
(c) ボリルアニオン7-LiKの塩基性の解明

溶媒和の無い混合ボリルアニオン塩がベンゼンを脱プロトン化できることを明らかにした。強塩基のⁿBuLi単独ではベンゼンの脱プロトン化はできないが、**7-LiK**はベンゼン溶液中で徐々にヒドロボラン**9**とフェニルボラン**22**を与えることがわかった。すなわち、炭素より電気陰性度の低いホウ素原子に負電荷を持つボリルアニオンが、カルボアニオンよりも高い塩基性を持つことを発見した。また、DFT計算により脱プロトン化段階の反応機構においてカリウムがルイス酸として働くことでベンゼンのC-H結合の酸性度を向上させていることも合わせて明らかとした。論文投稿中。



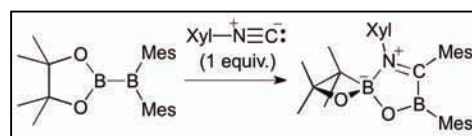
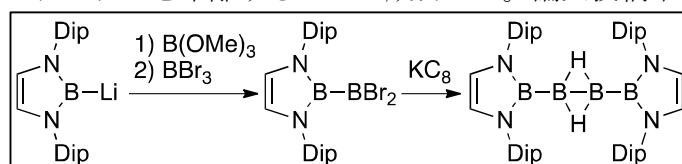
(d) bora-Brook転位の反応速度解析

ボリルベンジルアルコール誘導体**23**に触媒量の塩基を添加すると bora-Brook 転位が進行するため¹⁹F NMRによる反応速度解析を行った。極性溶媒・大きな対カチオンを持つ塩基・含C-C単結合の5員環を用いると反応が加速されること、負に大きな ΔS^\ddagger を持つこと、を明らかにした。論文①発表済。



(e) 水素架橋型テトラボランの合成と性質の解明

ボリルリチウムとB(OMe)₃, BBr₃を順次反応させて得られたジアミノジブロボランを還元することで水素架橋型テトラボランを単離することに成功した。論文投稿準備中。



(f) 含ホウ素5員環の環縮小反応の発見

非対称diborane(4), pinB-BMes₂に2,6-dimethylphenylisocyanideを反応させると、通常は反応不活性なピナコラートボリル基の5員環が環縮小反応を起こし、4員環オキサボレタンを形成すると共にスピロ型の化合物に変換されることを明らかにした。論文投稿中。

4. 研究の反省・考察

反省は特にありません。考察は研究成果の項に含めてあります。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kisu, H.; Sakaino, H.; Ito, F.; Yamashita, M.; Nozaki, K., A Qualitative Analysis of a “Bora-Brook Rearrangement”: The Ambident Reactivity of Boryl-Substituted Alkoxide Including the Carbon-to-Oxygen Migration of a Boryl Group *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3548-3552.
- ② Kojima, C.; Lee, K.-H.; Lin, Z.; Yamashita, M., Direct and Base-Catalyzed Diboration of Alkynes Using the Unsymmetrical Diborane(4), pinB-BMes₂ *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6662-6669.

(2) 口頭発表

- ① Bora-Brook rearrangement reaction and the effects of solvent polarity, the backbone of boryl group, and counter cation of base. Haruki Kisu, Makoto Yamashita, Fumihiro Ito, Hirotohi Sakaino, Kyoko Nozaki 第10回有機元素化学セミナー 京都大学化学研究所 京都 2015年6月8日 P-02
- ② Regioselective diboration using unsymmetrical diborane(4) in the absence of transition metal catalyst. Chiemi Kojima, Makoto Yamashita 第10回有機元素化学セミナー 京都大学化学研究所 京都 2015年6月8日 P-03

- ③ Syntheses and Properties of diboryldiphosphene and diboryldiphosphene radical anion. Shun-suke Asami, Masafumi Okamoto, Katsunori Suzuki, Makoto Yamashita 第10回有機元素化学セミナー 京都大学化学研究所 京都 2015年6月8日 P-05
- ④ Syntheses and Properties of diboryldiphosphene and diboryldiphosphene radical anion Shun-suke Asami, Masafumi Okamoto, Katsunori Suzuki, Makoto Yamashita ICHAC-11th Caen, FRANCE 2015年6月16日 Poster-28
- ⑤ SYNTHESIS AND PROPERTIES OF REACTIVE DIBORANE(4) COMPOUNDS. Makoto YAMASHITA ICHAC-11th Caen, FRANCE 2015年6月18日 IL6 - 75
- ⑥ 非対称ジボラン(4)を用いたピリジンのオルト位C-H 結合切断反応 勝間雄平・浅川博祈・山下誠 第26回基礎有機化学討論会 愛媛大学 愛媛県松山市 2015年9月24日 1P089
- ⑦ 溶媒和の無いボリルアニオンの発生とその塩基性 大里拓人・奥野友里・石田真太郎・岩本武明・山下誠・野崎京子 第26回基礎有機化学討論会 愛媛大学 愛媛県松山市 2015年9月25日 2P024
- ⑧ ボリルリチウムを用いた新規非対称ジボラン化合物の合成 木須遥規・山下誠 第42回有機典型元素化学討論会 名古屋大学 野依記念学術交流館 愛知県名古屋市 2015年12月4日 P-03
- ⑨ ホウ素置換ジホスフェンとn-BuLiの反応 浅見 俊介・山下誠 第42回有機典型元素化学討論会 名古屋大学 野依記念学術交流館 愛知県名古屋市 2015年12月4日 P-11
- ⑩ Basicity of non-solvated boryl anion: Deprotonation of benzene. Takuto Osato, Yuri Okuno, Shintaro Ishida, Takeaki Iwamoto, Makoto Yamashita, Kyoko Nozaki. The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.15and17 INOR 56 and INOR 460
- ⑪ Base catalyzed bora-Brook rearrangement: the effects of solvent polarity, the backbone of boryl group, and counter cation of base toward reaction rate. Haruki Kisu, Makoto Yamashita, Fumihito Ito, Hiroto Sakaino, Kyouko Nozaki The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.16 ORGN 812
- ⑫ Regioselective diboration using unsymmetrical diborane(4) in the absence of transition metal catalyst. Chiemi Kojima, Makoto Yamashita The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.16 ORGN 814
- ⑬ Synthesis, structure, photophysical property, and one-electron reduction of boryl-substituted diphosphene. Shunsuke ASAMI, Masafumi OKAMOTO, Katsunori SUZUKI, Makoto YAMASHITA The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.17 Inorganic 489
- ⑭ ホウ素置換ホスフィノホスフィドの合成と性質 浅見俊介・岡本匡史・鈴木克規・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.25. 2F7-53
- ⑮ 非対称ジボラン(4)とイソシアニドの反応による含窒素複素環化合物のオルト位官能基化反応 勝間雄平・浅川博祈・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.26. 3F7-11
- ⑯ ボリルリチウムを用いた新規非対称ジボランの合成と性質 木須遥規・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.26. 3F7-51
- ⑰ ボリルアニオンによる炭化水素の脱プロトン化 大里拓人・奥野友里・石田真太郎・岩本武明・山下誠・野崎京子 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.26. 3F7-52
- ⑱ テトラアリアルジボラン(4)の簡便合成と還元反応 塚原菜那・浅川博祈・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.27.4F7-18
- (3) 出版物
Yamashita, M.; Nozaki, K., Boryl Anions. In *Synthesis and Application of Organoboron Compounds*, Fernández, E.; Whiting, A., Eds. Springer International Publishing: 2015; pp 1-37.

学 校 名	東 京 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	酸性度評価を指針とする有機酸触媒の合理的な開発		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機化学 ②酸触媒 ③酸性度 ④軸不斉			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 本 隆 司	薬 学 部	教 授	研究総括・軸不斉ビフェニルの合成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
矢 内 光	薬 学 部	准 教 授	各種酸性化合物の合成と構造化学、触媒性能評価
袴 田 秀 樹	薬 学 部	教 授	各種触媒の酸性度測定
小 谷 明	薬 学 部	准 教 授	酸性度測定法の適用対象の拡張と測定条件の最適化

酸性度評価を指針とする有機酸触媒の合理的な開発

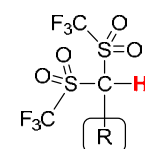
1. 研究の目的

ビス（トリフルオロメチルスルホニル）メタン Tf_2CH_2 **1a** ($\text{Tf} = \text{CF}_3\text{SO}_2$)は、1950年代に合成され、古くから硫酸に匹敵する強酸性炭素酸として知られている。しかしながら、こうした強酸性化合物を自在に合成することは依然として難しい。研究代表者の松本と矢内は、炭素酸合成手法の欠如が様々な分野への応用を阻んでいると考え、その効率的な合成手法の開発と触媒利用に関する研究を推進してきた。その中で、簡便な有機酸の酸性度測定を開発していた袴田、小谷らのグループと学内共同研究を進めてきた。本研究は、この共同研究を強力に支援していただいたものである。主たる目的は、強酸性炭素酸の化学構造と酸性度の相関を明らかにすると同時に、酸触媒としての性能評価を行い、新しい酸触媒を開発する際の設計指針を得ることにある。また、炭素酸に固有の触媒作用を発掘することや、各種有機溶媒中で簡便に酸性度を測定する手法の確立も期待した。

2. 研究の計画

(1) 新しい超強酸性炭素酸の合成試薬の開発

二つのトリフルリル基で*gem*-二置換された炭素酸 Tf_2CHR では、酸性C-H構造と酸に何らかの機能を付与する置換基Rとを同一構造中に配置することが可能である。このことは炭素酸構造が機能性強酸を開発する上で魅力的な構造単位となることを示唆している（右図）。ただし、硫酸並みの有機強酸を自在に合成することは長らく困難であった。この問題に対して、申請者らは「求電子性に富む1,1-ビス（トリフルリル）エチレン $\text{Tf}_2\text{C}=\text{CH}_2$ を反応系内で発生させ、これを共存する求核種で捕捉する」方法を開発してきた。しかし、既存の方法では、プロトン源となる化学種が反応系に共存するため、塩基性求核種への適用が出来なかった。また、種々のペルフルオロアルキル (R_f) 基をもつ炭素酸 $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{CHR}$ にも興味をもたれたが、これらの合成も叶わなかった。



↑
多彩な分子構造の導入

そこで、1,1-ビス（ペルフルオロアルキルスルホニル）エチレン $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{C}=\text{CH}_2$ の系内発生試薬を開発することで、新たな炭素酸を合成し、酸性度と利用法を検討することとした。

(2) $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{CHR}$ の溶液中における酸性度測定法の開発と触媒利用

一方で、袴田、小谷は電気化学検出に基づく酸性度評価法の改良を計画した。本手法は、ビタミンK3の還元電位が添加した酸の酸性度に応じて正側にシフトすることを応用したもので、これまで生体関連カルボン酸などの水中における酸性度測定に威力を発揮していた。本研究で得られる酸は、主として有機溶媒中で触媒作用を発揮することから、種々の有機溶媒中における酸性度測定へと改良する必要があった。さらに、改良測定法を用いて合成された炭素酸の酸性度を評価することとした。また、酸性度測定の結果を踏まえて、松本、矢内はその触媒利用を図ることとした。

3. 研究の成果

(1) 新しい超強酸性炭素酸の合成試薬の開発

炭素酸合成試薬として優れた反応剤を見いだすべく、 Tf_2CH **1a**₂、パラホルムアルデヒドおよび種々の置換ピリジンの三成分反応によって種々の双性イオンを合成した。NMRを用いた解析から、中でも2-フルオロピリジンから得た双性イオン**2a**が目的に適うことが示唆された。なお、同様の条件下、 Nf_2CH_2 **1b** ($\text{Nf} = \text{C}_4\text{F}_9\text{SO}_2$) や環状炭素酸**1c**からも対応する2-フルオロピリジニウム塩が得られた。これらの双性イオンにGrignard反応剤やDIBAL-Hといった有機金属反応剤を作用させると、対応する*C*-アルキル化炭素酸 **3, 4** が首尾よく得られた（図1）。また、広範囲に亘る求核剤の適用も可能であった。

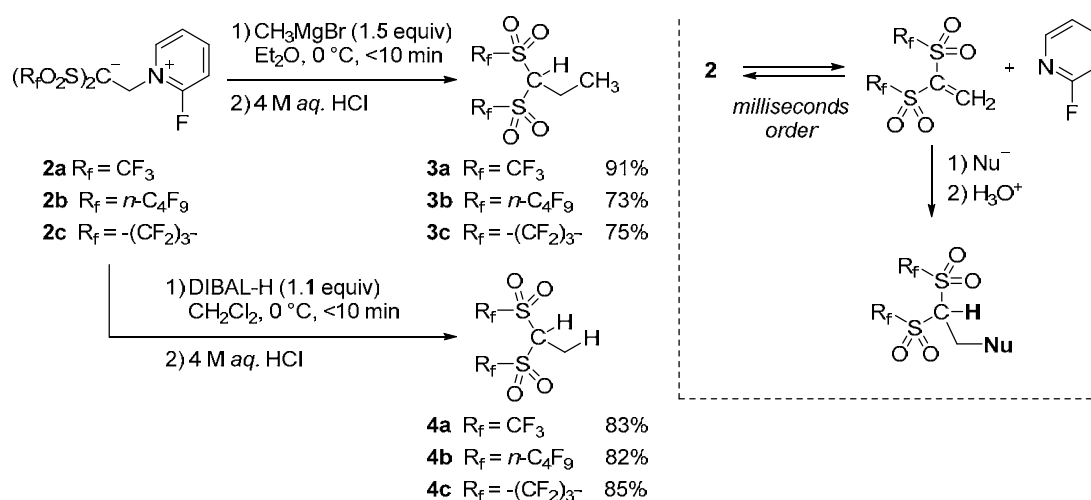


図1. Synthesis of strongly acidic carbon acids

(2) $(\text{R}_f\text{SO}_2)_2\text{CHR}$ の溶液中における酸性度測定法の開発と触媒利用

① 有機溶媒に適用可能な酸性度測定手法の開発

合成された酸の有機溶媒中での酸性度を明らかにするため、まずDMSO溶媒中での酸性度測定を検討した。その結果、袴田、小谷らの方法がDMSO溶液にも適用可能であることを明らかにしたが、炭素酸の $\text{p}K_a$ 値は化学構造とは無関係に1-3の間の値であった。これは、測定対象となる酸の強酸性ゆえに、DMSOが塩基として振る舞うことで、酸分子の大部分が電離してしまうためと考えられた。そこで、検討を進め、アセトニトリル中での値が信頼できることを明らかにした(図2)。 Tf_2CHR 型炭素酸の置換基Rは酸性度に決定的な影響を及ぼし、Rがフェニル基、水素、メチル基となるに従って、およそ3 $\text{p}K_a$ ユニットずつ酸性度が減弱した。また、 C_4F_9 基をもつ酸が CF_3 基や環状構造をもつものよりも100倍程度強酸であることを示した。

Structure	R	$\text{p}K_a$ (AN)
$\text{F}_3\text{C-SO}_2\text{-C(=O)-SO}_2\text{-R}$	$\text{R} = \text{Ph}$	7.85
$\text{F}_3\text{C-SO}_2\text{-C(=O)-SO}_2\text{-R}$	$\text{R} = \text{H}$	10.8
$\text{F}_3\text{C-SO}_2\text{-C(=O)-SO}_2\text{-R}$	$\text{R} = \text{Me}$	14.0
$\text{R}_f\text{-SO}_2\text{-C(=O)-SO}_2\text{-R}_f$	$\text{R}_f = n\text{-C}_4\text{F}_9$	12.1
$\text{R}_f\text{-SO}_2\text{-C(=O)-SO}_2\text{-R}_f$	$\text{R}_f = \text{CF}_3$	14.0
$\text{R}_f\text{-SO}_2\text{-C(=O)-SO}_2\text{-R}_f$	$\text{R}_f = \text{-(CF}_2\text{)}_3^-$	14.2

図2. $\text{p}K_a$ values of thus obtained carbon acids in acetonitrile

② 炭素酸誘導体を用いる触媒反応の開発

酸性度の精緻な評価から、我々が以前に開発した強酸性炭素酸触媒5 ($\text{p}K_a$ in AN = 6.8) と、温和な酸触媒6 ($\text{p}K_a$ in AN = 16.1) の触媒作用の違いを酸性度の観点から説明することもできた。さらに、5を用いると異なった2種のMichael受容体を用いる逐次的Mukaiyama-Michael反応が起こることを見いだした(図3)。こうした反応では、一般にオリゴマーやポリマーが主として得られるとされ、炭素酸の特異な触媒作用を示す好例である。さらに、酸ではない双性イオン2aも優れた触媒作用をもつことを明らかにした。面白いことに、ピリジン環上にフッ素をもたない2dは触媒作用を示さなかった。

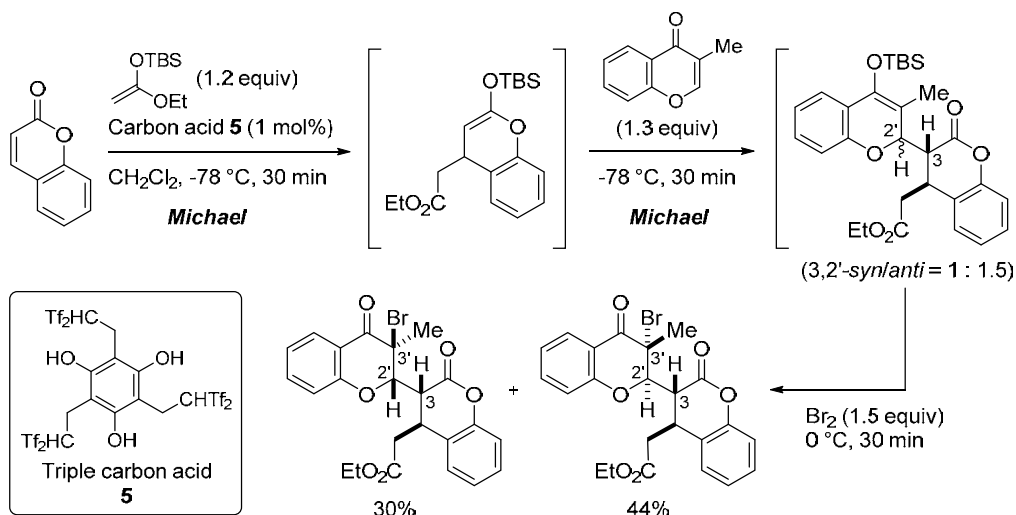


図3. Synthetic reactions catalyzed by carbon acid 5

(3) Push-pullアルケン ($R_fSO_2)_2C=C(NHR)_2$ の化学

同時期に、松本、矢内は $(R_fSO_2)_2CH_2$ **1** とカルボジイミドの反応によって push-pull アルケン **7** が得られることを見いだした。さらに、NMR や X線結晶構造解析などの結果から、これらが通常の「アルケン形」ではなく、電荷分離した「イリド形」として存在することを明らかにした (図4)。こうした化合物は、尿素やチオ尿素といった強力な水素結合供与体のアナログと考えられる。 R_f 基の違いに基づく酸性度の差を評価したところ、 Tf_2CH_2 **1a** から合成したものよりも環状炭素酸 **1c** より合成した **7c** が強酸 (安息香酸と同程度) であることが明らかとなった。現在、この新しい酸の触媒利用に関する研究を進めている。

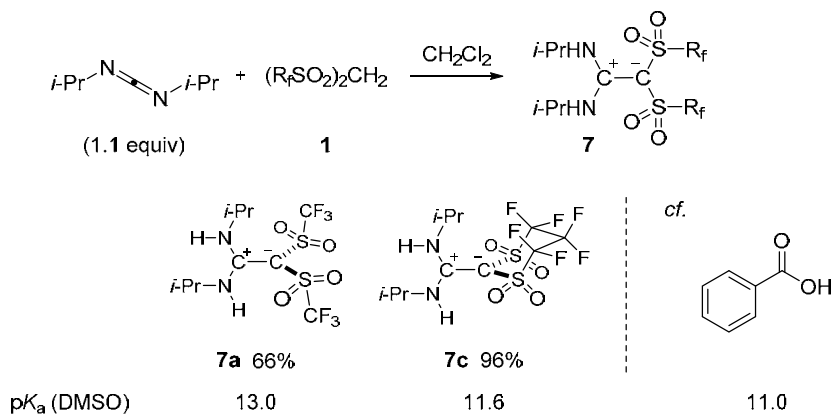


図4. Synthesis of compound **7** and pK_a values in DMSO

4. 研究の反省・考察

本研究では、当初想定した炭素酸の一般性ある合成手法の開発と、化学構造と酸性度の相関を明らかにするという大目標を達成することができた。また、push-pullアルケンの化学という想定外の成果を挙げることもできた。一方で、より穏やかな炭素酸についても研究を進めたが、酸性度測定が適用できないケースが多く、満足な触媒作用を見いだすことも出来なかった。この点については継続的な研究が必要だと考えている。また、軸不斉ビフェニルに対する炭素酸構造の導入は可能であったが、その不斉触媒としての利用には更なる検討を要する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hikaru Yanai, Yuichi Sasaki, Yuki Yamamoto, Takashi Matsumoto, Chemoselective two-directional reaction of bifunctionalized substrates: formal ketal-selective Mukaiyama aldol type reaction, *Synlett* **2015**, 26, 2457.
- ② Hikaru Yanai, Osamu Kobayashi, Kenji Takada, Takuya Isono, Toshifumi Satoh, Takashi Matsumoto, Sequential Mukaiyama–Michael reaction induced by carbon acids, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 3280. (掲載号の表表紙に採用)
- ③ Yuyama, Daisuke; Sugiyama, Nanami; Maeda, Takuya; Dobashi, Yasuo; Yokojima, Satoshi; Fujimoto, Yuuki; Yanai, Hikaru; Matsumoto, Takashi, A New Approach to Axially Chiral Biaryls via the Atrop-Diastereoselective Formation of Medium-Sized Lactone Bridge, *Synlett*, in press.
- ④ 中島美優, 小谷 明, 楠 文代, 袴田 秀樹, ボルタンメトリーによる油脂酸価の簡易計測, *分析化学*, **2015**, 64, 631.
- ⑤ Akira Kotani, Mizuki Watanabe, Kazuhiro Yamamoto, Fumiyo Kusu, Hideki Hakamata, Determination of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and arachidonic acids in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Sci.*, in press.

(2) 口頭発表

- ① 矢内 光、高橋流太、小野純平、松本隆司、フルオロピリジニウム型双性イオンを用いる触媒の分子変換、第8回 有機触媒シンポジウム、沖縄、2015年5月10日
- ② 高橋流太、矢内 光、小谷 明、袴田秀樹、松本隆司、ペルフルオロアルキルスルホニル基で安定化されたカルボアニオン含有双性イオンの合成と利用、第38回 フッ素化学討論会、東京、2015年9月17日
- ③ 矢内 光、小林 穰、高田健司、磯野拓也、佐藤敏文、Maurice Médebielle、松本隆司、フッ素で置換された炭素酸触媒を用いる逐次反応の開発、第38回 フッ素化学討論会、東京、2015年9月17日
- ④ 前田拓哉、湯山大輔、鶴田英利奈、山口 悟、矢内 光、鈴木啓介、松本隆司、アトロブ選択的ラクトン架橋形成反応を利用した軸不斉ビフェニルの合成、日本化学会 第96回 春季年会、京都、2016年3月24日
- ⑤ 高橋流太、矢内 光、松本隆司、ビス (ペルフルオロアルキルスルホニル) メチル基をもつ強酸性炭素酸の新しい合成法の開発、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑥ 山本悠貴、佐々木優一、橋詰真緒、矢内 光、松本隆司、溶媒効果に基づくMukaiyamaアルドール型反応の化学選択性のスイッチング、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑦ 矢内 光、鈴木琢己、土橋保夫、阿久津裕士、中島康介、三浦 剛、松本隆司、高度に分極したpush-pullアルケンの構造化学、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑧ 阿久津裕士、山本智之、中島康介、矢内 光、高橋流太、小谷 明、平島真一、古石裕治、袴田秀樹、松本隆司、三浦 剛、新規水素結合供与型有機分子触媒の設計と不斉アルドール反応への適用、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑨ 鶴田英利奈、湯山大輔、杉山奈々美、山口 悟、矢内 光、鈴木啓介、松本隆司、ラクトン架橋の形成を利用した軸不斉ビフェニルの立体選択的合成法、日本薬学会 第136年会、横浜、2016年3月26日
- ⑩ 小谷 明、日本酒の酸度とアミノ酸度のセンサ開発、第87回化学センサ研究会、東京、2016年1月21日

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヒトの染色体DNAにおける複製開始点確立機構の解明 －複製開始因子ORCとグアニン配列との関係－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①DNA複製 ②複製開始点 ③ORC ④グアニン四重鎖 ⑤Rループ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
和 賀 祥	理 学 部	教 授	総括・実験・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
菅 野 靖 史	理 学 部	教 授	実験(主にタンパク質の結晶作成および解析)

ヒトの染色体DNAにおける複製開始点確立機構の解明 —複製開始因子ORCとグアニン配列との関係—

1. 研究の目的

複製開始点とは、DNA複製が開始する地点であり、ゲノム上の特定の位置に存在する。ヒトにおいては、多数の複製開始点が存在するが、未だに複製開始点を規定する共通配列は見つかっておらず、複製開始点がゲノムの特定の位置に確立するしくみは分かっていない。一方、DNA複製の開始の際、複製開始点に最初に結合して複製開始を引き起こすタンパク質として、ORCがすでに同定されている。ヒトORCはDNAに結合する活性をもち、細胞内でも複製開始点に結合していることが確かめられている。しかし、そのDNA結合には塩基配列特異性はなく、どのようなしくみでヒトORCが複製開始点に集積するかは未だ明らかではない。

私らは近年、ヒトORCはグアニン四重鎖 (G4) を形成し得るG-richな配列 (G4モチーフ配列) をもつ一本鎖DNAやRNAに選択的に結合するという新規の活性を見いだした。この知見と関連して、他のグループより、ヒト複製開始点の近傍にG4モチーフ配列が存在するという報告がなされた。そこで本研究では、ヒトORCのG4モチーフ一本鎖DNA (RNA) 結合が複製開始点の認識に関わるのではという仮説をたてて、その検証をすすめて、ヒト複製開始点の確立機構の解明を目指した。

2. 研究の計画

- (1) G4モチーフに結合しない変異ORCの作製とその機能解析
G4モチーフ結合活性を失った変異ORC1サブユニットを作製する。その変異ORC1を内在性ORC1ノックダウン細胞へ導入し、変異ORC1の発現に伴って、細胞のDNA複製活性ならびにORCの複製開始点への結合がどう変化するかを調べる。
- (2) Rループ形成がORCのDNA結合に及ぼす影響の解析
ORCが結合するターゲットはG4モチーフをもつ領域で形成されたRループであるという仮説をたて、その検証をin vitroとin vivoでの解析から進める。

3. 研究の成果

- (1) G-rich RNA/ssDNA結合ドメインとG4モチーフをもつssDNAとの複合体の結晶構造解析へ向けて
ヒトORC1サブユニットのN末側半分の領域に2つのG-rich RNA/ssDNA結合ドメイン (AおよびB) が存在する。両ドメインを含むアミノ酸1-539の領域の構造決定を目指し、その組換えタンパク質の調製に着手した。N末側にヒスチジンタグを、さらにC末側にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合させた組換えタンパク質を発現するベクターを構築し、大腸菌を用いて発現させ、両方のタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにて精製、ならびに配列特異的なプロテアーゼによるタグの除去を試みた。その結果、HisタグおよびGSTがついた全長タンパクの精製は確認されたが、GSTを除去すると目的のタンパク質が可溶性画分に回収できなくなるトラブルに直面した。そこで、ドメインAおよびドメインBそれぞれを分けて、構造解析を行うことを並行して進めた。両ドメインともにGST融合タンパク質として大腸菌で発現させ、GSTを除去したものについて可溶性画分として調製することができた。現在は、結晶作成に着手する前に、NMRを用いた解析を進めている。
- (2) G4モチーフに結合しない変異ORCの作製とその活性解析
ドメインAおよびドメインBのそれぞれについて、G4モチーフ結合の活性を低下させるアミノ酸置換変異は同定済みである。その置換変異を導入した全長 ORC1 の構築も完了し、現在その活性を解析中である。一方、ドメインAおよびBのほとんどを削除した変異ORC1も作製し、この変異ORC1は他のORCサブユニットと複合体を形成することを確認した。バキュロウイルス・昆虫

虫細胞発現系で変異ORC1を含む6量体複合体の精製にも成功し、現在その性状解析を進めている。

(3) 変異ORCのin vivo解析

全長ORC1のアミノ酸置換変異体で、G4モチーフ結合活性を失った変異ORC1の作出にはまだ至っていない。そこで、ドメインAとBを含むORC1のN末側領域だけを蛍光タンパク質融合タンパク質の形でヒト培養細胞で発現させ、その細胞内での局在について全長ORC1と比較解析を行った。さらに、G4モチーフ結合活性を低下させたアミノ酸置換変異体についても同様に解析を進めた。その結果、ORC1のN末側領域のポリペプチドの細胞内局在は、全長ORC1とよく一致した。特にヘテロクロマチン領域での局在で高い一致性が見られた。一方、変異を導入したN末側領域では細胞核内でのドット状の局在はみられたが、全長ORC1との局在の一致性はあまりみられなかった。この結果は、ORC1のN末側領域がORC1の核内局在に重要であること、そしてORC複合体の核内局在に重要である可能性を示唆する。

(4) Rループ形成がORCのDNA結合に及ぼす影響のin vitro解析

ヒトの複製開始点の多くがプロモーター領域にある。また、一般的にプロモーターからは双方向に転写が開始し、しばしば短鎖の非コードRNAがつくられる。さらに重要なことは、転写によってG-richなRNAがつくられる場合、安定なRループ（DNA-RNA三重鎖）が形成される点である。このRループでは、G4モチーフをもつ非鋳型鎖が1本鎖に解離してG4構造を形成する可能性があり、そして、この状態がORCの格好の結合ターゲットではないかと考えた。そこで、ヒトlamin B2遺伝子、ヒトmcm4遺伝子およびニワトリglobin遺伝子近傍に存在する複製開始点に着目した。そして、各複製開始点を含むDNAを組み込んだ環状プラスミドを固定化したビーズを鋳型として用い、T7プロモーターによる転写を行った時のORCのプラスミド固定化ビーズへの結合を調べた。その結果、調べたいいくつかのビーズにおいて、転写後にORCを加えた場合、転写をしない場合に比べてプラスミド固定化ビーズへの結合量が顕著に増加した。さらに、プラスミドの制限酵素に対する感受性を調べた結果、転写を行ったプラスミドでは、転写後にRNAを除くためにプラスミド固定化ビーズを洗浄したにもかかわらず、制限酵素に対し抵抗性を示した。この抵抗性はRループ構造の形成の可能性を暗示するものであることから、in vitroの条件下であるが、RループがORCの局所的な集積を引き起こしている可能性が考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) ヒトORC1のR-rich RNA/ssDNA結合ドメインの構造決定に向けて

上記のように組換えタンパク質の可溶性に関するトラブルに直面している。これを打開するために、GST融合の状態での構造決定も検討したい。さらに、ORC1のN末側領域の大腸菌での発現量は低く、また途中で翻訳が止まったために生じたと考えられる短鎖のポリペプチドの生成も目立った。そこで、コドンの最適化やバキュロウイルス/昆虫細胞発現系を利用して、発現量の増加を目指したい。一方、予備的な解析ではあるが、解析対象としているORC1の領域は元々決まった構造をとらない可能性も示唆されている。今後は、結晶作成だけでなく、NMR解析も勢力的に進めていく。

(2) 変異ORCを用いた解析

今後は、ヒトORC1のN末側領域の役割を解明することに集中的に取り組みたい。同領域には、ヒストンとの結合に関わるBAHドメインやヘテロクロマチン形成に関わるHP1との結合ドメインもある。これらの相互作用も含めながら、G-rich RNA/ssDNA結合活性のもつ生理的な役割を細胞を用いた解析を通じて追求する予定である。

(3) RループとORCとの関係

上記のように本研究でのin vitro解析からRループがORCを呼び込む可能性が示唆された。しかし、本解析条件下でのRループ形成を示す直接的な証拠はまだなく、さらに転写依存的なORC結合量の増加についてもその増加レベルのばらつきが大きい。そこで、解析対象をプロモーター

ターだけでなく、Rループが形成しやすいと示されている第1エクソンから第1イントロンにかけての領域に広げて解析をしていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Magda Budzowska, Thomas G.W. Graham, Alexandra Sobeck, Shou Waga, and Johannes C. Walter. Regulation of the Rev1-Pol zeta complex during bypass of a DNA interstrand crosslink. *EMBO J.*, 34, 1971-1985 (2015)

(2) 口頭発表

第38回日本分子生物学会年会 (2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド)

和賀 祥、山崎 翠、塚澤真衣、鈴木香菜、女部田寛子、寺西帆奈美、太田黒恵美、弓井絵利夏、由良 敬、保科祥子. 動物細胞のDNA複製開始点の確立機構の解明に向けて

(3) 出版物

なし

学 校 名	光 産 業 創 成 大 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	チャンネル創薬支援に向けた1分子センサーの開発	研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①バイオセンサー ②チャンネルタンパク ③1分子計測 ④創薬支援		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 野 美 奈 子	光 産 業 創 成 研 究 科	講 師	総括・実験・データ処理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
横 田 浩 章	光 産 業 創 成 研 究 科	准 教 授	実験・データ処理・論文作成
井 出 徹	岡 山 大 学 学 科 自 然 科 学 研 究 科	教 授	実験・論文作成

チャネル創薬支援に向けた1分子センサーの開発

1. 研究の目的

生体機能解析に用いられるバイオセンサーは、生体分子認識と信号変換を組み合わせたハイブリッド・デバイスであり、次代のバイオセンサー、特に臨床検査や創薬スクリーニングのためのセンサーに要求される条件は、高感度で選択性が高いことである。チャネルタンパクはこのような要件を満たしている理想的な分子である。チャネルタンパクを人工的な細胞膜（脂質二重層膜）に組み込み、さらに認識情報を電子デバイスで物理信号に変換できれば、理想的なバイオセンサーが実現する。本研究の目的は、これまでに開発したチャネル1分子計測装置を応用して、高感度・高効率のバイオ計測装置（センサー）を作ることである。そこで、以下の2点を目的とし、本年度は各項目に記載した事項について検討を行った。

- (1) チャネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用
 - ① 1分子計測系の改良－複数チャネル活性同時計測による測定の高効率化
 - ② 1分子計測系によるP2X₄チャネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）
- (2) チャネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャネル開閉）」の分子メカニズムの解明
 - ① K⁺チャネル(KcsAチャネル)の新たな構造機能相関の解明

2. 研究の計画

- (1) チャネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用
 - ① 1分子計測系の改良－複数チャネル活性同時計測による測定の高効率化
平成26年度に改良した金探針を用いた高感度・高効率なチャネル活性計測系をさらに高効率化するため、親水層を保持した金探針を2本用いて脂質層をそれぞれ二重層化させ、脂質二重層膜を複数同時に作製する系を作る。さらに、K⁺チャネル（KcsAチャネル）を固定した2本の金探針で同時に脂質二重層膜を作製するとともにKcsAチャネルを脂質二重層膜にそれぞれ組み込む。各金探針からのKcsAチャネル電流を計測し、複数の活性計測が可能な系を確立する。
 - ② 1分子計測系によるP2X₄チャネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）
金探針を用いたチャネル1分子活性計測系を用いて、ヒトP2X₄チャネルの活性を測定する。P2X₄チャネルを精製する系を確立し、精製したP2X₄チャネルの活性を金探針を用いたチャネル活性測定系で計測する。ヒトP2X₄チャネルは神経障害性疼痛に関わっており、P2X₄チャネルの活性を抑制する薬剤は疼痛の治療薬となりうるため、この系は疼痛薬のスクリーニング系となりうる。また、P2X₄チャネルはATPによって活性が制御されるため、ATPセンサーとしての発展も考えられる。
- (2) チャネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャネル開閉）」の分子メカニズムの解明
 - ① K⁺チャネル(KcsAチャネル)の新たな構造機能相関の解明
センサーとなるK⁺チャネルのモデルチャネルであるKcsAチャネルの細胞内領域による活性制御機構について知見を得るため、細胞内領域を刺激（プロトン）を感受した状態を模倣した変異体を数個作製し、その機能と構造の状態を調べる。機能についてはチャネル活性を測定し、活性特性（コンダクタンス、開確率）とイオン選択性への影響を調べる。構造については、それらの変異体の細胞内領域の膜方向への構造状態の変化を、環境依存的に蛍光強度が変化する蛍光色素を用いて調べる。

3. 研究の成果

(1) チャンネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用

① 1分子計測系の改良－複数チャンネル活性同時計測による測定の高効率化

平成26年度に改良した金探針を用いたチャンネル活性計測系を並列に複数同時に計測する系を作製し、チャンネル活性測定効率を上げることができた。具体的には、親水層を保持した2本の金探針の先端の高さを合わせ、水層上に重層した脂質層に上方から押し付けることで、脂質二重層膜を形成した。水層からグラミシジンチャンネルを脂質二重層膜に取り込ませると、2つの金探針から同時にグラミシジンチャンネルによるチャンネル電流を測定することができた。また、KcsAチャンネルを固定した2本の金探針を用いると、脂質二重層膜に組み込まれたKcsAチャンネルによる電流を測定することができた。これらのチャンネルのコンダクタンスは約20 pSと約60 pSであり、報告されているコンダクタンスに近い値であった。

② 1分子計測系によるP2X₄チャンネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）

金探針を用いたチャンネル1分子活性計測系を用いて、ヒトP2X₄チャンネルの活性測定に成功した。ヒトP2X₄チャンネルは昆虫細胞で発現させ、アフィニティタグを用いて高い純度で単離することができた。単離したP2X₄の活性を金探針を用いたチャンネル活性計測系で測定すると、約30 pSのコンダクタンスを持つチャンネル活性が捉えられた。

(2) チャンネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャンネル開閉）」の分子メカニズムの解明

① K⁺チャンネル（KcsAチャンネル）の新たな構造機能相関の解明

センサーとなるチャンネルタンパクの分子実体を理解するため、KcsAチャンネルの刺激感受に重要な細胞内領域の荷電状態が活性（機能）に与える影響を調べた。その結果、細胞内領域の荷電状態が不活性化へ移行する速さとイオン選択性の両方に影響を与えることが明らかとなった。具体的には、KcsAチャンネルの細胞内領域の8つの負電荷のアミノ酸をすべて中性化した変異体と2つのアミノ酸を中性化した変異体は不活性化が起こらない上、K⁺選択性も低下した。一方、E146のみを中性化した変異体の特性は野生型と変わらなかった。これらのことから、D149の荷電状態は選択性フィルター部位の機能である不活性化とイオン選択性に大きな影響を与えていることがわかった。また、これらの変異体の細胞内領域の膜方向への構造状態を蛍光色素を用いて調べたところ、機能が野生型と異なる（不活性化が起こらずK⁺選択性が低下した）変異体でも膜方向への構造状態の変化は野生型とは同様であるものもあった。このことから、細胞内領域の膜方向以外への構造変化によって機能の変化が生じていると考えられる。

4. 研究の反省・考察

(1) チャンネルの1分子計測を組み込んだ高感度・高効率センサーの開発、及びセンサーデバイスへの応用

① 1分子計測系の改良－複数チャンネル活性同時計測による測定の高効率化

金探針を用いた計測系を用いて、2つのチャンネル活性測定を同時に測定することができた。しかしながら、この系ではそれぞれの金探針の高さを合わせる必要であるため、さらに多くの金探針を扱うのは難しいと思われる。今後は、剣山型で先端の長さが揃っている担体を検討することを考えている。

② 1分子計測系によるP2X₄チャンネルの活性計測（薬剤評価、ATPセンサー）

金探針を用いた計測系で、ヒトの神経障害性疼痛にも関わるP2X₄チャンネルの活性を効率よく測定することができた。さらに、計測された電流がこのチャンネルに由来するものであることを裏付けるため、ATPで活性化が制御されることを確かめる必要がある。

(2) チャンネルタンパクの刺激感度や選択性に関わる「ゲーティング（チャンネル開閉）」の分子

メカニズムの解明

① K⁺チャンネル(KcsAチャンネル)の新たな構造機能相関の解明

今回の結果から、KcsAチャンネルの細胞内領域の荷電状態がイオン選択性フィルター部位に影響を与え、機能に関与していることが明らかとなった。さらに、細胞内領域の膜方向への構造変化ではない変化によってイオン選択性フィルターの状態の変化が引き起こされているようだ。KcsAチャンネルの構造状態の情報は、蛍光色素を用いた細胞内領域の膜方向への変化の測定で得ることができるとこれまで考えていたが、膜方向以外への変化も捉える必要があることがわかった。今後は、FRET法などを用いて細胞内領域のねじれなどの変化も捉える必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

平野美奈子, チャンネルタンパクの構造機能相関研究 1 (巨視的計測), 公益財団法人新世代研究所2015年度第1回バイオ単分子研究会 (平成27年8月)

(3) 出版物

なし

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	先端的有機合成戦略を基盤とする海洋生物活性物質の合成研究 ーポリ環状エーテル海産毒ギムノシンの合成ー		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①収束合成 ②オキシラニルアニオン ③ポリ環状エーテル ④海洋天然物 ⑤ギムノシン ⑥渦鞭毛藻 ⑦赤潮		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 裕 二	薬 学 部	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 井 健 男	薬 学 部	准 教 授	実験・論文作成

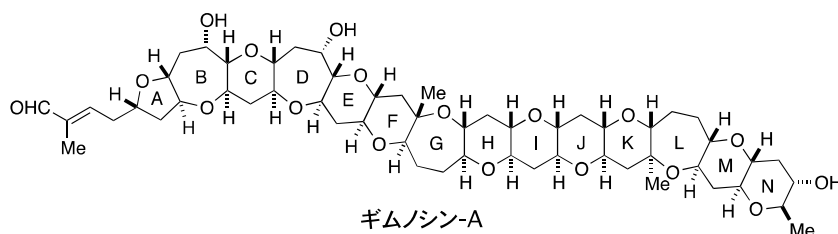
先端的有機合成戦略を基盤とする海洋生物活性物質の合成研究 —ポリ環状エーテル海産毒ギムノシンの合成—

1. 研究の目的

(1) 海洋生物から発見された巨大構造を有するポリ環状エーテル天然物は、神経イオンチャネルの活性化や腫瘍細胞に対する細胞毒性、抗菌性など多彩な活性を示す。これらは創薬シーズとして期待される活性を有しながらも天然からは極微量しか得られないため、さらなる研究の推進には合成化学による研究試料の供給が切望されている。

ギムノシン類は、瀬戸内海を中心として西日本で赤潮を形成し、魚介類の大量斃死を引き起こす代表的な有毒渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* から単離されたポリ環状エーテルである。ギムノシンAはマウスリンパ腫細胞に対して細胞毒性 (IC₅₀ = 1.3 μg/mL) を示し、構造的には14個のエーテル環が連続的に縮環した巨大構造を持つことから合成化学的に興味を持たれている。

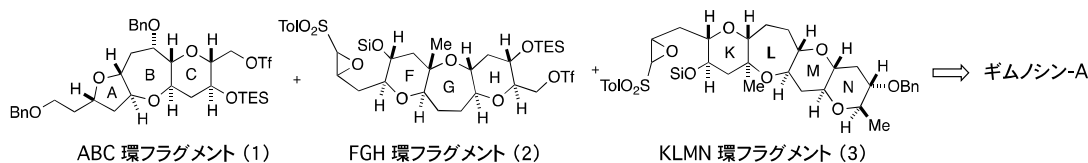
① 本研究では、14環性赤潮毒ギムノシン-Aの全合成研究を行う。



2. 研究の計画

(1) これまでに開発したオキシラニルアニオン戦略を基盤とする[X+2+Y]型新規収束合成法を繰り返し用いる合成戦略によって縮環システム構築の一元化を図り、ギムノシン-A効率的全合成を目指す。

- ① ギムノシン-Aのフラグメント合成：全合成に必要な3種類のABC環、FGH環、KLMN環フラグメントの大量合成を実施する。
- ② ギムノシン-A全合成：はじめにFGH環フラグメントとKLMN環フラグメントをオキシラニルアニオン法で連結して9環性のFGHIJKLMN環システムを構築し、ついでABC環フラグメントを結合してギムノシン-Aの全合成を達成する。

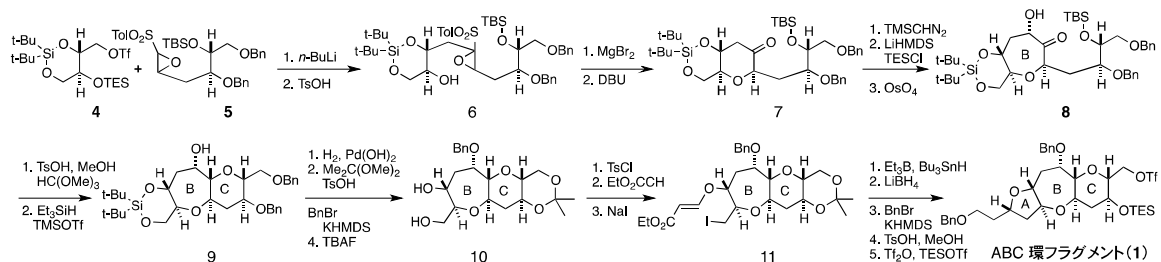


3. 研究の成果

(1) ギムノシン-Aのフラグメント合成

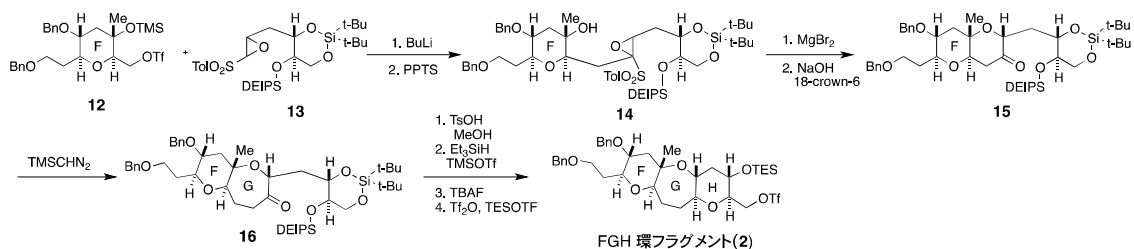
① ABCフラグメントの合成

トリフレート**4**とエポキシスルホン**5**をカップリングして**6**を合成し、MgBr₂との反応によって得られるプロモケトンを経由してDBUで環化して6員環ケトン**7**を得た。これを環拡大して7員環ケトンとし、シリルエノールエーテルに誘導後OsO₄で酸化してヒドロキシケトン**8**を合成した。アセタール環化と還元的エーテル化によりC環を構築して**9**とし、保護基を変換して**10**としたのち不飽和エステル-ヨウ素誘導体**11**に変換し、ラジカル環化反応、エステルの還元、ベンジル化、脱アセトニド化反応、トリフレート化してABC環フラグメント**(1)**を合成した。



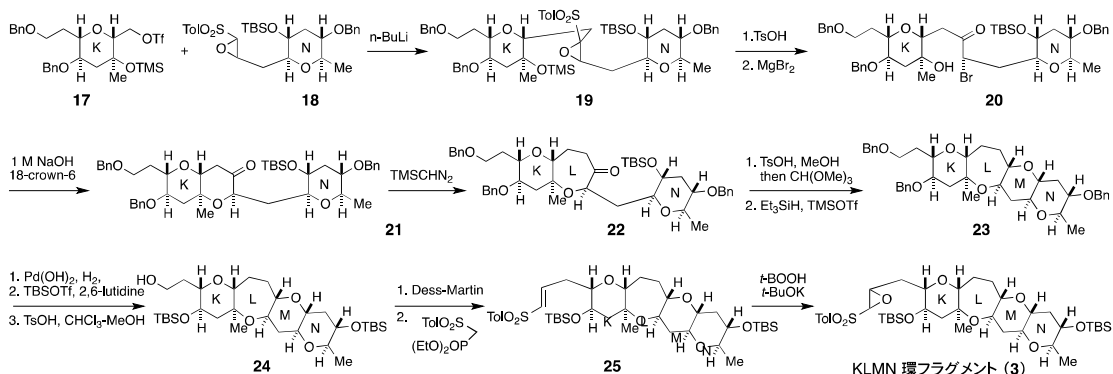
② FGH環フラグメントの合成

F環トリフラート**12**とエポキシスルホン**13**をオキシラニルアニオン法でカップリングして**14**を合成した。MgBr₂を作用させてブロモケトンとし、NaOHによるWilliamsonエーテル合成で6員環ケトン**15**を構築した。トリメチルシリルジアンズメタンで7員環に環拡大してG環ケトン**16**を合成した。ついで、環状アセタール化と還元的エーテル化、脱シリレン化、トリフラート化反応によりFGH環フラグメント(**2**)を合成した。



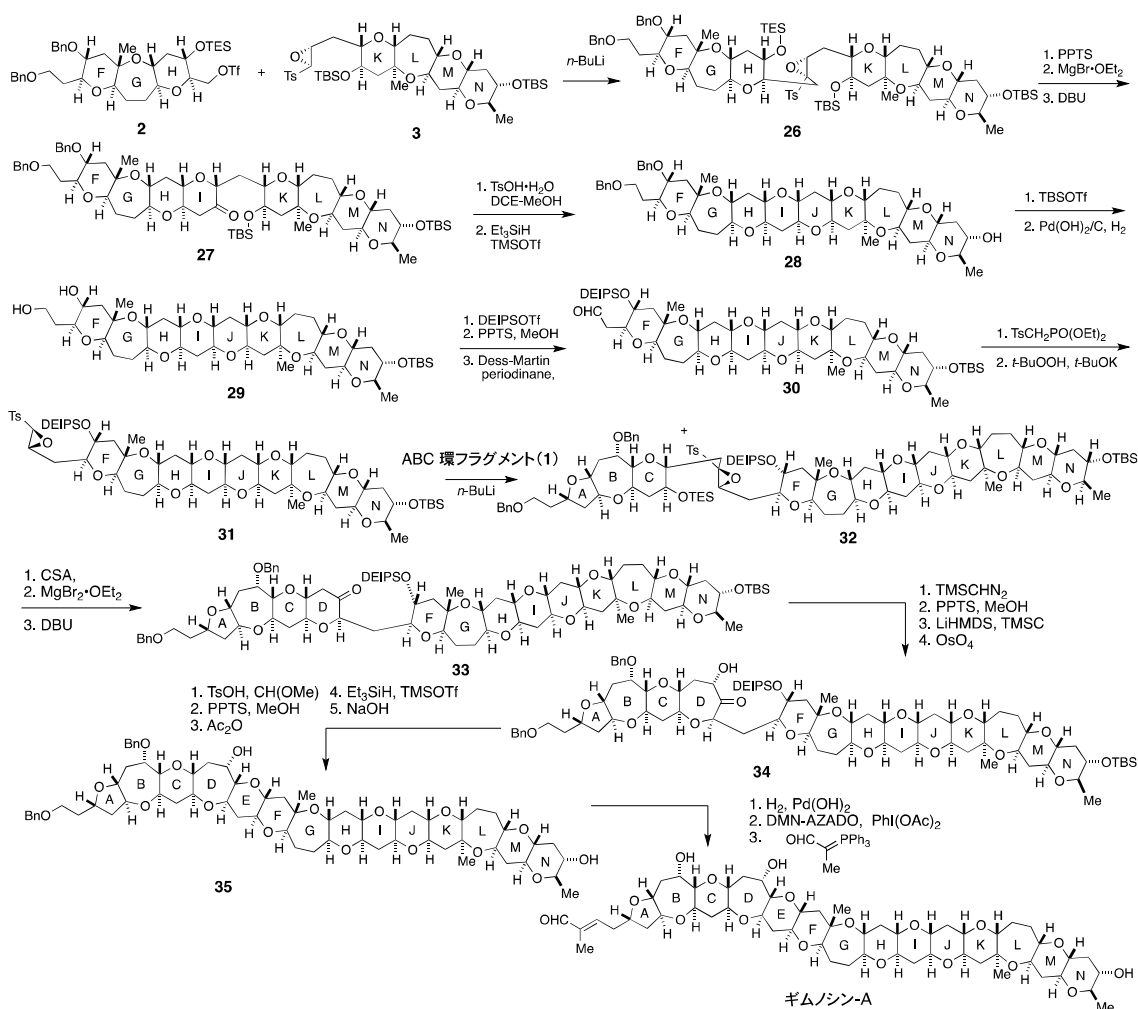
③ KLMN環フラグメントの合成

17と**18**をカップリングして**19**としたのち、ブロモケトン化して**20**とし、クラウンエーテル存在下aq. NaOHを用いて分子内環化反応を行って6員環ケトン**21**を合成した。ついで、トリメチルシリルジアンズメタンで環拡大して7員環エーテルケトン**22**に誘導した。脱TBS化と生成したヒドロキシケトンの分子内アセタール化を一挙に行い、さらに還元的エーテル化してKLMN骨格**23**を構築した。**23**の3つのベンジル基を除去したあとトリオールをTBS基で保護し、一級アルコールのTBS基のみを選択的に除去してアルコール**24**を得た。水酸基をアルデヒドに酸化後、HWE反応でビニルスルホン**25**を合成した。塩基性条件下*t*-ブチルヒドロペルオキシドでビニルスルホンをエポキシ化して、KLMN環フラグメント(**3**)の合成を達成した。



(2) ギムノシン-Aの全合成

FGH環トリフラート**2**とKLMN環エポキシスルホン**3**を連結して**26**とし、3工程でI環を構築した後、**27**のメチルアセタール化、還元により9環性エーテル**28**を合成した。N環水酸基のTBS化、脱ベンジル化してジオール**29**を得た。水酸基の保護、選択的脱保護により第1級アルコールを再生し、Dess-Martin酸化してアルデヒド**30**に変換した。HWE反応で合成したビニルスルホンに酸化して、9環性エポキシスルホン**31**を合成した。この**31**とABC環フラグメント**(1)**をカップリング後、3工程でD環を構築して**33**とし、環拡大、エノールシリル化、酸化によりD環に水酸基を導入して**34**を合成した。酸処理によるDEIPS基の脱保護とアセタール化を行い、水酸基のアセチル化、還元的エーテル化、脱アセチル化して**35**を得た。最後に、ベンジル基を接触還元で脱保護し、第1級アルコールのみを選択的に酸化してアルデヒドに変換後、Wittig反応で共役アルデヒド側鎖を構築し、ギムノシン-Aの全合成を達成した。



4. 研究の反省・考察

(1) 本研究ではオキシラニルアニオン法を基盤とする収束合成法を5回繰り返して、3種のフラグメントの合成とそれらの連結縮環を行い、極めて効率的な全合成を達成することに成功した。フラグメントの合成までは時間を要したが、カップリング反応以降の合成研究は順調に進行し、研究期間内に研究目的を達成することができた。この統一的合成戦略による巨大ポリ環状エーテル天然物の全合成は、優れた合成研究として最新の有機化学研究を紹介する国際誌SYNFACTSに紹介され、また本研究分担者が第57回天然有機化合物討論会奨励賞を受賞するなど、国内外より高い評価を受けた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

T. Sakai, S. Matsushita, S. Arakawa, K. Mori, M. Tanimoto, A. Tokumasu, T. Yoshida, and Y. Mori:
Total Synthesis of Gymnocin-A. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 14513–14516 (2015). 平成27年11月

(2) 口頭発表

① 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
オキシラニルアニオン法を基盤としたGymnocin-Aの全合成研究

第107回有機合成シンポジウム2015（東京）平成27年6月

② 石原 葵、青山佳代、坂井健男、森 裕二：

Gymnocin-AのFGH環およびKLMN環フラグメントのダイバジェント合成に向けて

第61回日本薬学会東海支部総会・大会（名古屋）平成27年7月

③ 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
Gymnocin-Aの収束的合成研究

第61回日本薬学会東海支部総会・大会（名古屋）平成27年7月

④ 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
Gymnocin-Aの収束的全合成

第57回天然有機化合物討論会（横浜）平成27年9月

⑤ 坂井健男、松下真吾、荒川正悟、森 巧一、谷本美樹、徳升晃大、吉田達司、森 裕二：
Gymnocin-A の全合成

第41回反応と合成の進歩シンポジウム（大阪）平成27年10月

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高度な機能が期待される化合物の有機合成による 存在実証 －大環状繰り返し構造化合物の化学合成－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機合成化学 ②大環状化合物 ③繰り返し構造 ④存在実証			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 田 英 俊	理 工 学 部	教 授	研究代表者 統括、 および糖による大環状繰り返し構造化合物の 合成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
羽 村 季 之	理 工 学 部	教 授	芳香環による大環状繰り返し構造化合物の合成
山 口 宏	理 工 学 部	教 授	X線解析による合成中間体、最終合成物の構造 決定

高度な機能が期待される化合物の有機合成による存在実証 —大環状繰り返し構造化合物の化学合成—

1. 研究の目的

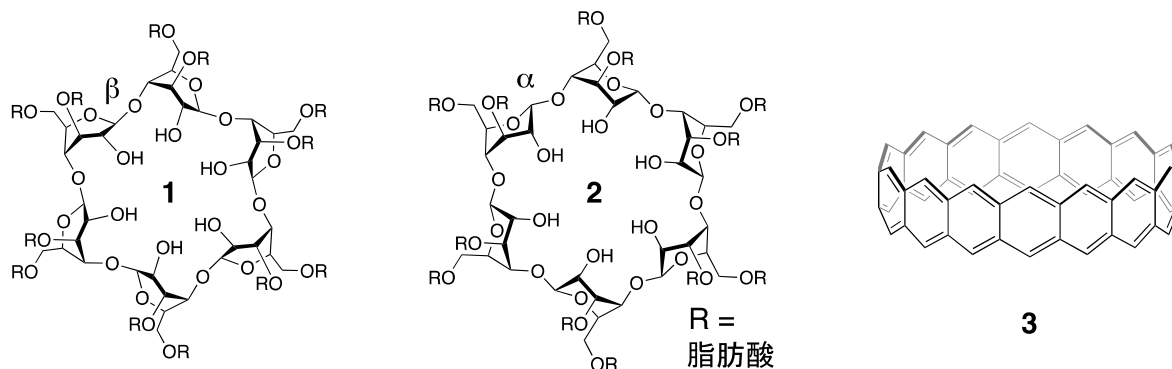
糖あるいは芳香環を繋いだ新規大環状繰り返し構造化合物の創製を目的とする。

繰り返し構造を有する大環状の有機化合物は、独特の機能をその分子に持たせることができる。例えば、D-グルコースが環状に連結した化合物シクロデキストリンは、分子内部が親油性、外部が親水性であり、分子内部に脂溶性化合物を包摂したまま水に溶ける。この機能を利用して、食品、医薬、化粧品などの成分として広く利用されている。一方、ベンゼン環がつながって筒を構成した化合物はカーボンナノチューブと呼ばれ、その長く丈夫な構造、制御可能な伝導性から、構造材料、電子材料としての革新的な応用が期待される。

本研究では、シクロデキストリンとは逆の性質、すなわち、内部が親水性で外部が疎水性となる反転シクロデキストリン（β型：**1**、α型：**2**）の合成を目指す。この性質を持たせるには、構成単糖をアキシアル・リッチな立体配座に固定する必要がある。また、カーボンナノチューブの最小環状単位であり、非平面性π共役構造に基づく興味深い化学的性質を秘めているシクラセン（**3**）の合成を標的とする。どちらの化合物も、多くの機能が期待されながらも未だ合成されていない。その最大の要因は、高ひずみ構造であるアキシアル・リッチ糖あるいは非平面性のベンゼン骨格を構築する合成方法が欠如しているためである。

本研究では、これらタイプの異なる大環状繰り返し構造化合物を合成できる方法を開拓し、これらの存在実証を目的とする。その過程で、「糖」「ベンゼン環」という全く異なった基本単位を大環状化させる研究を共有し、大環状繰り返し構造化合物の合成指針を得る。

存在が実証された場合、実際にその分子を用いた応用展開が可能になる。現存のシクロデキストリンやカーボンナノチューブの非常に幅広い応用性を考えると、本研究で合成された大環状繰り返し構造化合物は、新たな機能性分子として医薬品、化粧品、化学センサー、エレクトロニクス分野等に貢献できる。

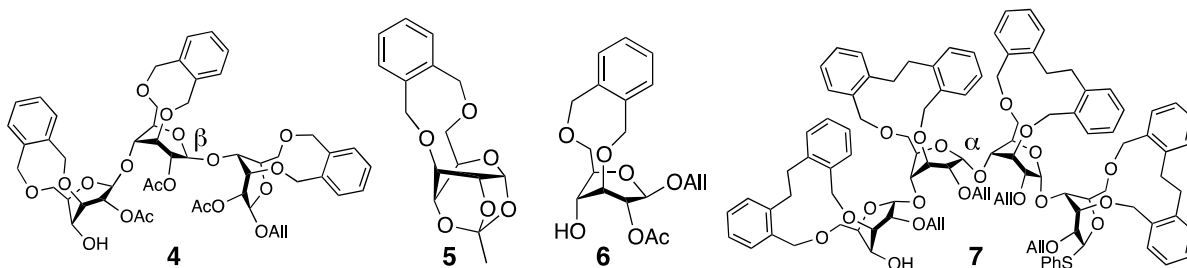


2. 研究の計画

本研究は、平成25年度からの継続である。従って、27年度の計画は、25、26年度に得た成果を踏まえ立案した。26年度の成果は、

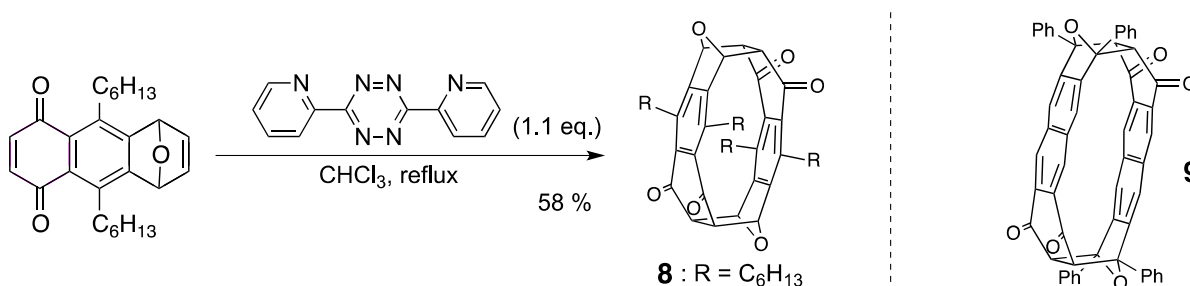
(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① β型反転シクロデキストリン**1**の合成に関して、低収率であった三量体**4**の合成法を合理化する過程で、これまで**5**から**6**段階で合成していた原料単糖**6**の、短段階合成法を発見した。
- ② α型反転シクロデキストリン**2**の合成に関して、三量体とする計画を変更し、二量体を結合させて四量体**7**とする経路を確立した。



(2) 「シクラセン」の合成

- ① ベンザインとイソベンゾフランの連続的な環付加反応による多環式芳香族化合物のワンポット合成法を開発した。また、環選択的にイソベンゾフランを発生させる手法の開発にも成功し、これらを利用した置換ペンタセンライブラリーの構築に成功した。
- ② 電子受容部位を持つイソベンゾフランの自己環形成反応を基盤として、幾つかのベルト状分子（例えば、**8**や**9**）を効率良く構築できることを明らかにした。これらの構造はX線結晶構造解析により明らかにした。



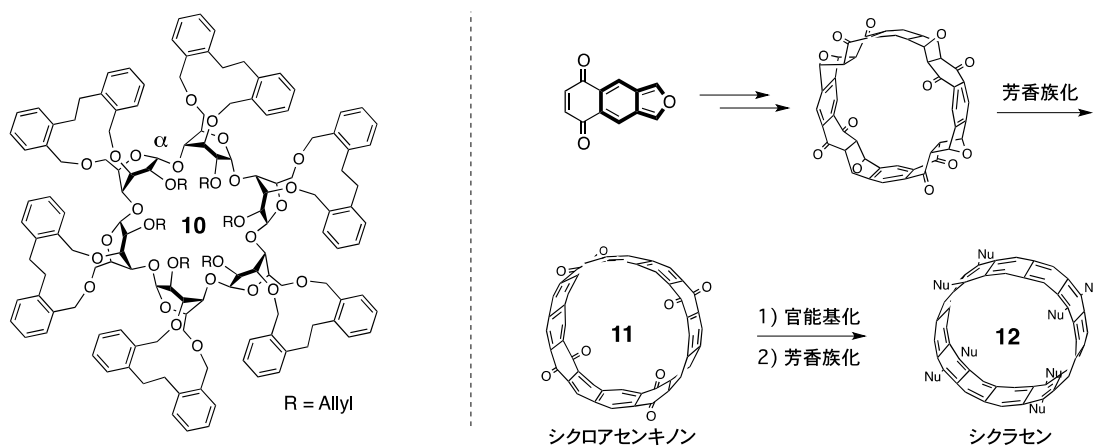
これらの成果を踏まえ、以下のように平成27年度の研究を計画した。

(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① β 型、及び α 型反転シクロデキストリンの合成に分けて研究を進行する。
- ② α 型、 β 型双方について、前年度に確立した反転糖四量体（ α 型）、三量体（ β 型）の合成法を合理化し、化合物**10**のような骨格合成を経て目的化合物への誘導を試みる。

(2) 「シクラセン」の合成

- ① 種々のリング状分子を網羅的に合成し、これらの分子の芳香族化によるシクラセンキノンへの誘導化を試みる。
- ② シクラセンキノン (**11**) のカルボニル基への求核付加を鍵とする適切な官能基の導入と芳香族化を経て、未だにその合成が達成されていないシクラセン (**12**) の世界初の合成を試みる。



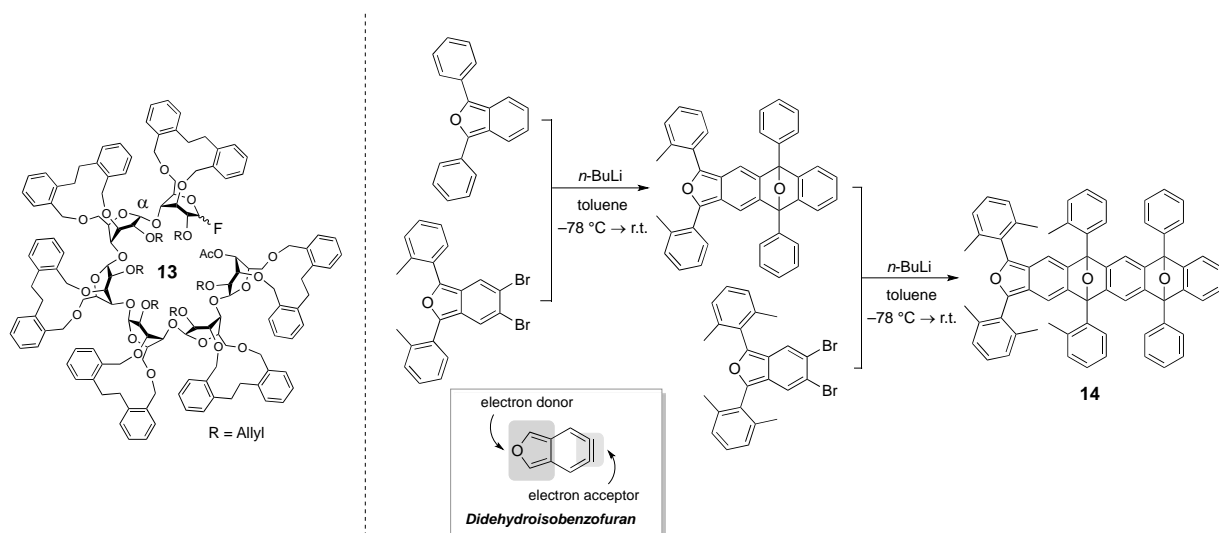
3. 研究の成果

(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① α 型反転シクロデキストリンの合成については、直鎖六量体**13**の合成を達成した。
- ② 上記の合成研究過程で、決定が難しい全アノマー位の立体化学を演繹的に決定した。すなわち、立体化学の不明位置が異なる様に工夫した二つの経路で直鎖六量体をそれぞれ合成し、両経路を経て合成した化合物が完全に一致することを確認した。そのため、両者のアノマー位立体化学の照合が可能となり、未決定であった全てのグリコシド結合が α 配置であると決定した。

(2) 「シクラセン」の合成

- ① エポキシアントラセンをコアとする連続的な環付加反応を駆使して、ベルト状分子**8**及び**9**よりも縮環数の大きな分子骨格を構築することができた。
- ② 縮環数の異なるベルト状構造を網羅的に合成するための新たなアプローチとして、新規高反応性分子であるジデヒドロイソベンゾフランの効率的発生法の開発に成功し、これを適切な捕捉剤の共存下で連続的に環を伸長することによって、対応する環付加体（例えば、**14**）をワンポットで合成することができた。



4. 研究の反省・考察

(1) 「反転シクロデキストリン」の合成

- ① β 型反転シクロデキストリンの合成では、反転糖三量体以降の合成が困難であった。 β 型の合成に用いたキシリレン架橋を施したグルコースは、多糖体合成の途中でグリコシド結合が切断する性質を有することが明らかになったためである。今後、 α 型の合成に用いたビベンジルビスメチレン架橋を施したグルコース誘導体を用いて、再挑戦する。
- ② α 型反転シクロデキストリンの合成において達成した直鎖六量体の環状化は、非常に低収率ながら進行した。しかし、単離できるほどの化合物量が無く、存在実証のため合成量を増やして現在再検討している。近い将来、目的化合物の合成に至ると考えている。

(2) 「シクラセン」の合成

- ① ベルト状分子**9**及び**10**の酸性条件での芳香族化によるシクラセンキノンへの変換は困難であることが分かった。これは、芳香族化に伴い、生成物が非常に大きな歪みエネルギーを蓄積することに起因している。今後、より縮環数の大きな前駆体を合成し、芳香族化を改めて検討する。
- ② イソベンゾフランの自己環形成反応に加えて、ジデヒドロイソベンゾフランの連続的環付

加反応によって高次構造の構築が可能であることが明らかとなった。今後、これらの反応を駆使して得られる多様なベルト状構造の変換を重層的に検討することによって、シクラセンの合成を達成できるものと期待している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Total Syntheses of Laevigatins A and E. Hirokane, T.; Ikeuchi, K.; Yamada, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 7352–7359.
- ② Direct thiophenylation accompanying orthoester-cleavage of 1,2,4-O-orthoacetyl-3,6-O-(*o*-xylylene)glucopyranose. Uchino, T.; Tomabechi, Y.; Fukumoto, A.; Yamada, H. *Carbohydr. Res.* **2015**, *402*, 118–123.
- ③ Selective Halogen–Lithium Exchange of 1,2-dihaloarenes for Successive [2+4] Cycloadditions of Arynes and Isobenzofurans. Eda, S.; Hamura, T. *Molecules.* **2015**, 19449–19462. (*Special Issue in Development and Application of Aryne Chemistry*).
- ④ Ring Selective Generation of Isobenzofuran for Divergent Access to Polycyclic Aromatic Compounds. Akita, R.; Kawanishi, K.; Hamura, T. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3094–3097.
- ⑤ New Synthetic Route to Substituted Tetracenes and Pentacenes via Stereoselective [4+2] Cycloadditions of 1,4-dihydro-1,4-epoxynaphthalene and Isobenzofuran. Eda, S.; Eguchi, F.; Haneda, H.; Hamura, T. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5963.
- ⑥ Probing the Catalytic Mechanism of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis* with Halide Ions. Murakawa, T.; Hamaguchi, A.; Nakanishi, S.; Kataoka, M.; Nakai, T.; Kawano, Y.; Yamaguchi, H.; Hayashi, H.; Tanizawa, K.; Okajima, T. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 23094–23109.

(2) 口頭発表

- ① Yamada Hidetoshi, Glycosylation Using 3,6-O-(*o*-Xylylene)-Bridged Glucosyl Donor, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月18日, Honolulu (招待講演) .
- ② 山田英俊, 立体配座反転糖：意外な遠隔立体制御とエラジタンニン合成, GlycoTOKYO 2015, 2015年10月24日, 慶応大学矢上キャンパス. (招待講演)
- ③ 新井智貴, 内野拓耶, 池内和忠, 山田英俊, 3,6位酸素を*o*-キシリレン架橋したグルコースの効率的誘導化, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月25日, 同志社大学京田辺キャンパス.
- ④ 生田大喜, 苫米地裕輔, 池内和忠, 山田英俊, 3,6-O-[ビベンジルビス-2,2'-(メチレン)]架橋を持つシクロデキストリンの合成研究, 日本化学会第96春季年会, 2016年3月24日, 同志社大学京田辺キャンパス.
- ⑤ 羽村季之, 高反応性分子を駆使した高次縮環 π 電子系分子の創製、第31回若手化学者のための化学道場、兵庫県・淡路市、2015年8月27日 (招待講演) .
- ⑥ 羽村季之, イソベンゾフランを活用する新規 π 共役系分子の合成研究、日本化学会第96回春季年会、同志社大学(京田辺)、2016年3月25日 (招待講演) .

(3) 出版物

なし

学 校 名	神 戸 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発 －発色団による長波長光応答モデルの構築－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①チャンネルロドプシン ②発色団 ③長波長光応答 ④オプトジェネティクス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
和 田 昭 盛	薬 学 部	教 授	研究代表者 研究計画・実施計画

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
七 田 芳 則	京 都 大 学 大 学 院 理 学 研 究 科	教 授	タンパク質オプシンの作成と結合実験
山 野 由 美 子	薬 学 部	准 教 授	発色団の合成・構造解析
沖 津 貴 志	薬 学 部	講 師	発色団の合成・モデリング解析

次世代型チャンネルロドプシンモデルの開発 —発色団による長波長光応答モデルの構築—

1. 研究の目的

- (1) レチナールを発色団とするチャンネルロドプシン (ChR) を脳のニューロンに発現させ、ニューロンを光で操作する技術が開発されてオプトジェネティクスと呼ばれている。この方法は、従来からある電極を用いた電気刺激による方法に対して、光を用いて神経細胞をコントロールするため、他の細胞への影響が極めて小さく、革命的な方法となっている。しかしながら、これまでのオプトジェネティクスには、Ch1とCh2が用いられ、励起波長として青色光および緑色光が使用されている。青色光や緑色光は、組織中の神経細胞に光が到達しにくく、光に対する応答が小さくなるという欠点がある。そこで、レチナールの共役系に更に二重結合を導入し、より長波長に吸収極大を持つ発色団を設計し、従来より長波長光で制御可能な新規ChRモデルを構築することを目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 和田グループは、より長波長での吸収極大を有するレチナール部分の共役系に二重結合を導入した発色団を設計・合成する。また、タンパク質との結合についてコンピューターを用いたドッキングシュミレーションを行い、発色団とタンパク質アミノ酸残基との相互作用について解析し、この結果をもとに更なる発色団の設計・合成を行う。
 - ① レチナールそのものの共役系を伸ばす方法として、まず、A1アルデヒドのシクロヘキセン環の4位から二重結合を数個伸長させたアナログ化合物を作成する。
 - ② レチナールの3,4位に二重結合を入れたA2アルデヒドを用い、3位に二重結合を数個導入したアナログ化合物を合成する。
 - ③ タンパク質オプシンとのコンピューターによるドッキングシュミレーションを実施する。
- (2) 七田グループは、ChR のタンパク質オプシンを作成し、これまで合成したアナログ化合物の結合実験を試み、タンパク質オプシン中に取り込まれるかどうかを確認する。結合したアナログ化合物については、ChRとしての光挙動を検討し、イオンチャネルとしての機能を持つかどうかを確認する。

3. 研究の成果

- (1) 共役系の長い発色団の合成
 - ① α -ヨノンから4位に二重結合を2個伸長した β -ヨノン体へと誘導後、エチルトリメチルシリルアセテートとのPeterson反応後、エステルをアルデヒドへと変換、続いてC5ホスホネートとのHorner-Emmons反応で側鎖を延長した。最後にエステルをアルデヒドへ変換し、A1アルデヒドの4位へ二重結合を2個導入したアナログ化合物を合成することができた。この化合物のUV吸収スペクトルでは、A1アルデヒドより二重結合が2個伸びたものの吸収極大波長はほとんど変わらないことが判明した。
 - ② アクチノールより3,4位に二重結合と3位にビニル基を導入した β -シクロシトラールへと変換後、C5シアノホスホネートで側鎖を延長し、シアノ基をアルデヒドへと変換した。続いてC5シアノホスホネートで更に側鎖を延長し、最後にシアノ基をアルデヒドへと変換し、A2アルデヒドの3位から二重結合を1個伸ばしたアナログ化合物を合成することができた。この化合物のUV吸収スペクトルでは、A2アルデヒドより二重結合が1個伸びたものであり吸収極大波長は、A2アルデヒドより30 nm長波長シフトしていることが判明した。
 - ③ β -ヨノンを出発原料としてC5ホスホネートとC3ホスホネートによるHorner-Emmons反応の組み合わせ順序を変更することによりビタミンA1アルデヒドの側鎖部分のC12位およびC14位

の後に二重結合を一つ挿入した化合物 2 種類を合成した。

(2) オプシンの作成ならびに発色団との結合

① 前年度サフラナルより合成したビタミンA2アルデヒドの側鎖部分のC8位、C12位およびC14位の後に二重結合を一つ挿入した化合物 3 種類 (I, II, III) について、タンパク質オプシンとの結合実験をしたところ、いずれの発色団もタンパク質中に取り込まれ新たなChRアナログが生成した。

② 3 種の新規ChRの吸収極大は、天然のChRの吸収極大 (λ_{\max}) に比べてわずかに10~20 nm長波長シフトしているだけであったが、 $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長を比較すると40~80 nmと大きく長波長シフトしていることが判明した。

(3) コンピューターを用いたドッキングシュミレーション

ビタミンA2アルデヒドの側鎖部分に二重結合を一つ挿入した化合物 3 種類 (I, II, III) について、X線結晶構造が明らかにされているC1C2を用いてドッキングシュミレーションを行い発色団のコンホメーション解析を行った。それぞれの最安定コンホメーションにおけるE値は、 $I=1.5138$ Kcal/mol, $II=-13.1696$ Kcal/mol, $III=-2.4567$ Kcal/mol となった。これらの値を比較するとより安定な発色団ほど $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長のシフト値が大きく ($II > III > I$ の順) になっており、二重結合を導入する位置としては側鎖C12位の後に入れるのが最も効果的であることが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

(1) A1アルデヒドの側鎖に二重結合を入れた発色団とCh1Ch2チャンネルロドプシンオプシンとの結合実験を実施するまでには至っていないので、早急に実施し新たなチャンネルロドプシンアナログを形成するかを検討する。また、アナログを与えた場合にはその吸収極大がA2アルデヒドの時と同様に、 $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長のシフト値が大きくなるかどうかを確認する。

(2) コンピューターによるドッキングシュミレーションの安定コンホメーションが、実際の吸収極大特に、 $1/2 \lambda_{\max}$ のシフト状況とよく一致することが判明したので、今後の発色団の設計においてどのように活用していくかを検討する。

(3) 長波長での吸収極大を持たせる次の方法として、レチナールのシクロヘキセン環を複素環に変え、かつ共役系を長くしたアナログ化合物の効率のよい合成法を確立する。できたアナログでは、天然のオプシンと結合するかどうかを検討する。

(4) さらにコンピューターを用いた発色団のコンホメーション解析を実施するとともに、より長波長に吸収極大をもつ発色団の設計と合成を行なう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① 和田昭盛

ビタミンA誘導体を用いたケミカルバイオロジー研究
ファルマシア **2015**, *51*, 193-195.

② Maoka, T.; Yamano, Y.; Wada, A.; Etho, T.; Terada, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H.
Oxidative Metabolites of Lycopene and γ -Carotene in Gac (*Momordica cochinchinensis*)
J. Agric. Food Chem. **2015**, *63*(5), 1622-1630.

③ Yamano, Y.; Ematsu, K.; Kurimoto, H.; Maoka, T.; Wada, A.
Total synthesis of gobiusxanthin stereoisomers and their application to determination of absolute configurations of natural products: revision of reported absolute configuration of epigobiusxanthin
Mar. Drugs **2015**, *13*(1), 159-172.

- ④ Yamano, Y.; Eno, K.; Hikita, Y.; Kurimoto, H.; Wada, A.
Stereocontrolled First Total Syntheses of Salmoxanthin and Deepoxysalmoxanthin
Curr. Org. Synth. **2015**, *12*(2), 180–188.
- ⑤ Katayama, K.; Okitsu, T.; Imai, H.; Wada, A.; Kandori, H.
Identical Hydrogen-Bonding Strength of the Retinal Schiff Base between Primate Green- and Red-Sensitive Pigments: New Insight into Color Tuning Mechanism
J. Phys. Chem. Lett. **2015**, *6*(7), 1130–1133.
- ⑥ Oshima, K.; Shigeta, A.; Makino, Y.; Kawamura, I.; Okitsu, T.; Wada, A.; Tuzi, S.; Iwasa, T.; Naito, A.
Characterization of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of a bacterio-rhodopsin Y185F mutant using *in situ* photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy
Photochem. Photobiol. Sci. **2015**, *14*(9), 1694–1702
- ⑦ Yanagawa, M.; Kojima, K.; Yamashita, T.; Iwamoto, Y.; Matsuyama, T.; Nakanishi, K.; Yamano, Y.; Wada, A.; Sako, Y.; Shichida, Y.
Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore
Sci. Rep. **2015**, *5*, 11081.
- ⑧ Imamoto, Y.; Kojima, K.; Oka, T.; Maeda, R.; Shichida, Y.
Helical rearrangement of photoactivated rhodopsin in monomeric and dimeric forms probed by high-angle X-ray scattering.
Photochem Photobiol Sci. **2015**, *14*, 1965.
- ⑨ Koyanagi, M.; Wada, S.; Kawano-Yamashita, E.; Hara, Y.; Kuraku, S.; Kosaka, S.; Kawakami, K.; Tamotsu, S.; Tsukamoto, H.; Shichida, Y.; Terakita, A.
Diversification of non-visual photopigment paraporphyropsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions.
BMC Biol. **2015**, *13*, 73.
- ⑩ Sakai, K.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.
Diversity of Active States in TMT Opsins.
PLoS One. **2015**, *10*, e0141238.
- (2) 口頭発表
- ① 山野由美子、西山裕也、青木敦志、和田昭盛、眞岡孝至
ガックより単離されたlycopene-5,6-diolおよび γ -carotene-5',6'-diolの立体異性体の合成とHPLC分離条件の確立
第29回カロテノイド研究談話会 (2015.09.04 八王子)
- ② 佐藤恵太、山下高廣、大内淑代、友成さゆり、酒井佳寿美、今元泰、和田昭盛、七田芳則
Opn5L1は光サイクル性の反応で制御されるGタンパク質共役型受容体である
第53回日本生物物理学会年会 (2015.9.13. 金沢)
- ③ 小島慧一、柳川正隆、山下高廣、松谷優樹、今元泰、松山オジョス武、中西香爾、山野由美子、和田昭盛、佐甲靖志、七田芳則
視物質の低い熱活性化頻度をもたらす分子メカニズム
日本生物物理学会第53回年会 (2015.9.13. 金沢)
- ④ 松谷優樹、小島慧一、柳川正隆、山下高廣、今元泰、山野由美子、和田昭盛、七田芳則
両生類の緑桿体に含まれる青色錐体視物質の熱活性化頻度
日本動物学会第86回大会 (2015.9.19. 新潟)
- ⑤ Wada, A.; Okitsu, T.; Yamano, Y.; Kobayashi, Y.; Ishizuka, T.; Yawo, H.; Matsuyama, T.; Yamashiya, T.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.
Preparation of New ChR with One Double Bond-elongated 3,4-Dehydroretinals

The 3rd International Conference on Retinoids (2015. 10. 21, Gifu/Japan)

⑥ 山野由美子、西山裕也、青木敦志、和田昭盛

Lycopeneの新規酸化代謝物、lycopene-5, 6-diol立体異性体の全合成
第41回反応と合成の進歩シンポジウム (2015. 10. 26 東大阪)

⑦ 沖津貴志、森澤祐介、本村映人、和田昭盛

イナミドの求電子性が促進する6-*endo-dig*環化：ピリダジン類の制御合成
第41回反応と合成の進歩シンポジウム (2015. 10. 26 東大阪)

⑧ Shichida, Y.

Molecular evolution of the low thermal isomerization rate of rhodopsin
chromophore 7th AOCF (2015. 11. 18. Taipei/Taiwan)

⑨ Okitsu, T.; Murai, C.; Wada, A.

Iodonium-mediated dearomative cyclization/Diels-Alder tandem of a chiral ynamide
toward diastereoselective construction of bridgehead-spiro system
Pacifichem 2015 (2015. 12. 19, Honolulu/USA)

⑩ Shichida, Y.

Thermal isomerization of chromophore in rod and cone visual pigments
Pacifichem 2015 (2015. 12. 19. Honolulu/USA)

(3) 出版物

山野由美子、都出千里、和田昭盛

カロテノイドの有機合成、「カロテノイドの化学と最新応用技術 普及版第1版」宮下 和夫
監修、pp27-37 (2015)、シーエムシー出版

学 校 名	東 洋 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①マイクロ流体デバイス ②ナノ薬剤 ③血管			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐々木直樹	理 工 学 部	准 教 授	研究代表者 総括 実験・データ整理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐藤香枝	日 本 女 子 大 学 部 理 学	准 教 授	実験・データ整理・論文作成

無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析

1. 研究の目的

厚生労働省の平成26年人口動態統計によれば、日本人の死因の第1位はがん（悪性新生物）であり、全体の28.9%を占める。かつては結核や脳卒中が第1位であったが、医療の発展に伴い、これらの病気で亡くなる人が減ったため、結果としてがんで亡くなる人が増えていると考えられている。従って、さらなる長寿健康社会を実現するには、従来法に比べて優れたがんの診断・治療法を開発し、超早期診断や低侵襲治療へと展開していく必要がある。

これまでのがんの診断・治療では、主に低分子の薬剤を血管に投与するため、これらが体内の腫瘍組織のみならず正常組織においても血管外に漏出する。このため、造影剤で患部を効果的に造影できない、或いは抗腫瘍剤が正常組織を攻撃し重篤な副作用が避けられない、などの問題が起こる。これを解決するために、ナノメートルサイズの粒子に薬物を封入した「ナノ薬剤」を血管に投与し、患部にピンポイントに送り届け薬効を発揮させる技術が盛んに研究されている。

ナノ薬剤を用いた患部選択的な薬物送達の原理は、Enhanced permeability and retention effect (EPR効果)として知られている。すなわち、癌周囲の腫瘍血管は正常血管に比べて血管壁の構造が疎であり物質透過性が高い。よって、ナノ薬剤は正常血管からは漏出せず、腫瘍血管からのみ効果的に漏出すると考えられている。従って、このような血管透過性を調べる技術は、有効なナノ薬剤の設計・開発に不可欠である。

これまでのナノ薬剤開発では、培養細胞や実験動物を用いてその効果を検証していた。しかし、培養皿などセンチメートルサイズの空間で静置培養される細胞は、マイクロメートルサイズの空間で血流にさらされている血管の細胞と大きく環境が異なる。また実験動物はブラックボックスであり、一般に体内の深部で起こるナノ薬剤の血管からの漏出を観察できず、薬剤が集積したか否かの結果でしか判断できない。加えて、ナノ薬剤が透過する血管壁の孔は形状・サイズが不均一であり、これらの物理的パラメータが透過性に与える影響を評価できない。すなわち、ナノ薬剤の血管透過性を精密評価する方法は現在のところ存在しない。

申請者は微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用い、細胞を組み込んだ新たな血管モデルを構築すると共に (Electrophoresis, 33, 1729 (2012); PLOS ONE, 10, e0137301 (2015))、細胞を用いずに構築した擬似血管構造からのナノ粒子の漏出を評価してきた (Proc. MicroTAS 2013, 1818 (2013); Anal. Biochem., 458, 72 (2014))。細胞を用いないことで、血管壁の孔のサイズを始めとする物理的パラメータが透過性に与える影響を評価可能となる。そこで、これらの研究を更に推し進めることで、現在は不明であるナノ薬剤の血管透過性を生体外で明らかにするための新たな実験系が構築できると考えた。

2. 研究の計画

本研究ではマイクロ流体デバイスを用い、ナノ薬剤の血管透過性を評価するための無細胞生体モデルを開発する。マイクロメートルサイズの流路内に腫瘍血管構造を再現し、血流を模擬する流れの存在下でナノ薬剤の透過性を評価する。具体的に以下の3点を検討する。

(1) 多孔膜を有するデバイスでの無細胞系ナノ薬剤透過試験

漏出性のある血管壁を模倣した多孔膜をデバイスに組み込み、ナノ薬剤に見立てた蛍光標識ナノ粒子の透過性を評価する。孔のサイズや粒子のサイズと透過性の関係を明らかにする。

(2) 小型ポンプを組み込んだデバイスでのナノ薬剤透過試験

小型ポンプをデバイスに組み込み、ナノ薬剤の透過性を評価している。本ポンプを用い、微量の溶液を循環させながら透過試験を行うことで、血管透過性に加えてナノ薬剤の血中滞在性も評価可能となる。このような血中滞在性の評価は、生体内でナノ薬剤を長期にわたって血中に存在させ、患部での薬剤濃度を維持する上で極めて重要である。項目1と同様に透過試験

を行い、血管透過のみを調べた結果と比較考察する。

(3) 血球や血清との共存系でのナノ薬剤透過試験

血球は血液の約半分を占めナノ薬剤の血管内分布に影響するほか、血清中に含まれる様々なタンパク質は吸着によりナノ薬剤の表面電荷に影響する。そこでこれらの共存下で上記の実験を行い、ナノ薬剤の透過性を評価し、生体内でナノ薬剤が効率的に血管を透過するための要素を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 多孔膜を有するデバイスの作製

申請者の過去の研究(Proc. MicroTAS 2013)では、マイクロ流路のパターンを有する基板で多孔膜を挟みこんでデバイスを作製していた。この場合、膜が顕微鏡の観察面に対して平行に位置するため、ナノ粒子が膜を透過する際には観察面に対して垂直に移動することとなる。よって、通常の蛍光顕微鏡では深さ方向の分解能が高くないため、ナノ粒子が膜を透過する様子を直接観察することは困難であった。そこで本研究では、膜を観察面に対して垂直に配置する新たな作製法を開発した。

具体的にはまず、民生用のレーザー加工機を用いてマイクロ流体デバイスの鋳型を作製した。厚みや素材の異なる数種のシート材を切断し、基板に貼りつけて鋳型とした。いずれのシート材を用いた場合も、おおよそ設計通りに鋳型を作製できた。流路パターンの幅は最小100 μm 程度まで加工できることがわかった。この鋳型をシリコンゴム的一种であるポリジメチルシロキサン(PDMS)でかたどりのち、別のシリコンゴム基板と貼り合わせた。貼り合わせ後の基板の一部に顕微鏡下で切り込みを入れ、デバイス上の流路を仕切るように多孔膜を挟み込んで接合して多孔膜を有するデバイスを作製した。デバイスの作製手順や実験条件を検討し、再現性良くデバイスを作製する手順を確立した。

(2) ナノ粒子透過試験

はじめに試料としてウラニンを用い、これを作製したデバイス上のマイクロ流路にシリンジポンプで導入して顕微鏡観察した。上記(1)で作製したいずれのデバイスにおいても、溶液の漏れがないこと、試料が膜を透過することを確認でき、透過試験に利用可能なデバイスの作製に成功した。次に蛍光標識デキストランを用いて同様の実験を行い、試料が膜を透過すること、および分子量に応じた膜透過が起こることを確認した。分子量の違いは粒子のサイズの違いに相当するため、粒子サイズが透過性に与える影響を評価できたと言える。これらの結果を細胞系の結果と比較するために、孔径1 μm の多孔膜を挟みこんだデバイスに細胞を培養し透過試験を行った。血管内皮細胞を膜の上部に培養し、ウラニン、ルシファーイエローおよび蛍光標識デキストランを血管内皮細胞が培養されている流路へ導入して透過試験を行った。ウラニンは細胞質に取り込まれてしまったため、細胞を用いた場合の透過試験に用いることはできなかったことがわかった。一方細胞膜不透過性色素であるルシファーイエローを用いた場合は、時間経過とともに多孔膜を抜け下部のチャンネルへの移行が観察された。蛍光標識デキストランはルシファーイエローと比較して透過量が少なく、細胞を用いた系での分子量に応じた膜透過を確認した。

4. 研究の反省・考察

(1) 多孔膜を有するデバイスの作製

本研究で開発したデバイスの作製法は、クリーンルームや半導体の微細加工装置など、高価で大掛かりな設備・装置を必要としない。加えて、フォトレジストなどの高価な試薬も用いないため、微細加工技術になじみのない生化学・医工学分野の研究者にも使いやすい手法を開発できたと考えている。

(2) ナノ粒子透過試験

上記(1)で作製したデバイスを用いた透過試験の原理を実証できたため、この成果を基に次年度以降の検討を進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 演繹的及び構成的アプローチに基づくマイクロバイオ分析デバイスの開発、○佐々木直樹、日本分析化学会第64年会、福岡、平成27年9月

② “Cell-free microfluidic vascular models for nanoDDS”、○Naoki Sasaki、第2回アジア分析科学シンポジウム (2nd Asian Symposium for Analytical Sciences)、日本分析化学会第64年会、福岡、平成27年9月

(3) 出版物

なし

学 校 名	中 部 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発 －新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究－		研 究 分 野 工 学
キ ー ワ ー ド	①鳥インフルエンザ ②ヒト適応性変異株の選択的検出 ③パンデミック監視 ④ナノカーボン素子 ⑤低次元系物性 ⑥超高感度センサー ⑦特異的結合分子設計 ⑧素子プロセス開発		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河 原 敏 男	工 学 部	教 授	全体の統括、デバイスの創製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 康 夫	生 命 健 康 科 学 部	客 員 教 授	インフルエンザおよびウイルス受容体糖鎖関連研究
玉 田 敦 子	人 文 学 部	准 教 授	データの統計学的解析
上 村 和 秀	生 命 健 康 科 学 部	准 教 授	糖鎖およびウイルス関連研究の遂行
Nongluk Sriwilaijaroen	Thammasat University Faculty of Medicine	講 師	インフルエンザおよび糖鎖関連研究の遂行
中 北 慎 一	香 川 大 学 総合生命科学研究センター	准 教 授	シアロ糖鎖の化学合成および天然素材からの調製と応用

自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による高感度センサーの開発 — 新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究 —

1. 研究の目的

インフルエンザは世界で最も広く分布する人獣共通感染症であり、その病原体インフルエンザウイルスは完全制圧不可能な最強ウイルスの一つである。そして、ヒトへの感染性を獲得したヒト型インフルエンザの脅威がWHO (世界保健機関) より発信されている。次期パンデミックが危惧される高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1亜型、以下H5N1) は、既に世界63ヶ国以上に広がり、16ヶ国でヒトへ伝播している。ヒトにおける致死率は約60%で、極めて高い。しかも、そのウイルスは、極めて変異しやすく、且つ渡り鳥やブタなどの中間宿主を介して、飛沫感染などにより、速やかな地球規模の伝播能力を持つ。これが、ヒト世界で流行可能なヒト適応変異を遂げた場合、数千万人規模の死者が出る可能性がある。そこで、ヒト適応変異を十分な検出感度で検出可能な、感染防疫体制構築のための実用的監視技術の世界展開が切望されている。

ヒト適応性変異は、現行の遺伝子や抗原変異監視では決して検出できず、唯一、ヒト喉の受容体シアロ糖鎖結合性で検出出来ることを我々は明らかにしてきた。そこで、ウイルス受容体シアロ糖鎖を用いたセンサーを開発し、その感度向上により世界規模の迅速監視が可能な実用的監視体制を築くことを目的に研究を行う。特に、H5N1のヒトへの適応性獲得変異シグナルをウイルスヘマグルチニン分子とその受容体シアロ糖鎖との特異的分子間相互作用で検出する。

センサーとしては、ナノカーボン材料による電子デバイス構造を用いる。ナノカーボン材料の一つであるグラフェンでは、その2次元性に起因する特異な電子構造、及び、ナノカーボンの高電子移動度や巨大な表面積を活用することにより、従来の感度を凌駕する高感度で、非標識かつ簡便に標的を電気的に検出できるセンサー系の構築が可能である。我々は、グラフェンを用いた電界効果トランジスタのデバイスプロセスを研究開発してきたが、グラフェンをセンサー素子とすることでシアロ糖鎖の特異的相互作用を検出する。特に、電気的検出のため電場の遮蔽距離を考慮した短い糖鎖分子系を用いたセンサープロセスの研究開発を行う。

本研究では、原理的に超高感度化が可能であるナノカーボン材料 (グラフェン) とウイルス受容体シアロ糖鎖疑似分子の研究開発を進展させることで、これらを組み合わせた電子デバイスを開発する。そして、ウイルス感染の際に反応しやすい糖鎖の構造や分布を明らかにすることで、鳥ウイルスのヒト適応性獲得を短時間に目視的に捉える世界初の高精度、高感度検出技術の開発とその国際的な実用化の達成を目指す。特に、鳥ウイルスのヒト適応性変異を事前に超高感度 (ウイルス粒子数10個以下)、安価 (開発途上国で使用可)、軽量 (5グラム以下)、高速 (5分以内)、高性能 (鳥ウイルス、そのヒト適応変異株を分別可) に検出・監視出来る電子デバイス開発を行う。そして、超高感度センサーによる事前診断・検出で世界流行阻止の感染防疫基盤の創製を目的としている。

2. 研究の計画

本課題では、鳥、ヒト型インフルエンザウイルスを超高感度で識別出来る新しいグラフェン構造体を創製する。そのためには、自然界の鳥及びヒト型インフルエンザウイルス受容体を解明し、単離又は化学合成する。それをグラフェン上に化学的に結合させた世界初の鳥およびヒト型インフルエンザウイルス受容体担持グラフェンを創製することでデバイス化、超高感度センサーを開発する。さらに、世界規模の防疫体制を目指す。そこで、平成27年度は次の2つの課題を実施した。

(1) 温度変調プロセスによる数層グラフェンの電気伝導率向上

平成26年度の成長条件は、成長を抑える方向の制御であったため、成長速度や成長密度が

低下する。これらはデバイスプロセスを考える際に、プロセス時間や集積度に影響を与えるため不利となる。そこで、ナノカーボン系の成長モードが初期成長により規定され、その後の成長が優先成長方向に制限されることを利用することにした。つまり、初期成長を低温ないし低密度成長のグラフォエピタキシーで行い、その後、温度を変調させることで成長モードを変更し、成長速度を向上させプロセス最適化を図る。さらに、初期成長後は温度やガス比等の成長条件も自由に設定できるため、温度変調制御による多段成長をグラフェン素子プロセスとして開発する。また、透過電子顕微鏡による回折像から温度条件により結晶性が変化することもわかっており、単結晶でグレインサイズが拡大し、また、グレインが配列したグラフェン相を成長させることで、ひずみの効果を制御すること及び移動度の向上を目指すことにした。以上の結果、生産性と高電気伝導率を両立させたプロセスの開発に繋がる。

(2) 数層グラフェンFET用糖鎖分子の開発・デバイス化

平成26年度から継続して自己組織化数層グラフェンの成長プロセスを開発しているが、グラフェン電界効果トランジスタを用いて、選択的にウイルスを検出する為には、グラフェンを糖鎖アレイで修飾する必要がある。修飾のための結合にはアミド結合を用いる。結合による修飾分子の観察を、走査型プローブ顕微鏡で行うことで、センサーの反応系を電氣的に有効な距離内に構築できるかの可否、及び、反応系分子の結合強度等を評価する。同時に、糖鎖とウイルスの組み合わせの探索をクロマトグラフィーで行うことで、最適な反応系の探索を行う。さらに、実際に自然界で分離された鳥およびヒトインフルエンザウイルス天然および臨床分離株（日本国内分離株、実際に鳥からヒトへ伝播している国、エジプト、ベトナムなど、の分離株）の反応特異性を様々な視点（反応時間、感度、鳥およびヒト型受容体識別能力、利便性、反応コストなど）から評価し、改良を加える研究を行った。

3. 研究の成果

(1) 温度変調プロセスによる数層グラフェンの電気伝導率向上

電気抵抗の主要因が、配列化プロセスによるひずみでグレイン境界での散乱がエンハンスされるためなので、バッファ層を用いて基板との相互作用を弱めること、及び、電気特性の時間変化の解析を行った。400°C成長の数層グラフェンをバッファ層(LTバッファ層)にし、メインの成長温度を変化させてラマン測定により評価した。その結果、LTバッファ層の導入によるG/D比の向上が観測された。電気特性は比較的低温の500°C成長でもすべての素子が金属特性を示すようになりシート抵抗が45 k Ω 程度以下となった。また、ドレイン-ソース電流の時間変化をノイズスペクトルとして解析し、LTバッファ層の導入によるノイズ強度の減少、成長温度の向上によるノイズの減少(図1)を明らかにした。これは、グレイン界面での散乱過程がノイズの主要因であり、その散乱が減少したことによるため、ノイズ解析による品質評価にも成功した([T. Kawahara et al.; IEEE Conf. Proc.: 23rd ICNF, 108 \(2015\)](#))。

さらに、デバイスノイズの減少はセンサーとしての分解能向上にも有用である。

(2) 数層グラフェンFET用糖鎖分子の開発・デバイス化

平成26年度にシアロ糖鎖の大きさを評価したので、次に、クロマトグラフィーでウイルスとの反応性を評価した。その結果、ヒト型、鳥型ウイルスの選択性が確認できたので、デバイスを作製した。糖鎖分子修飾デバイスでの選択性を

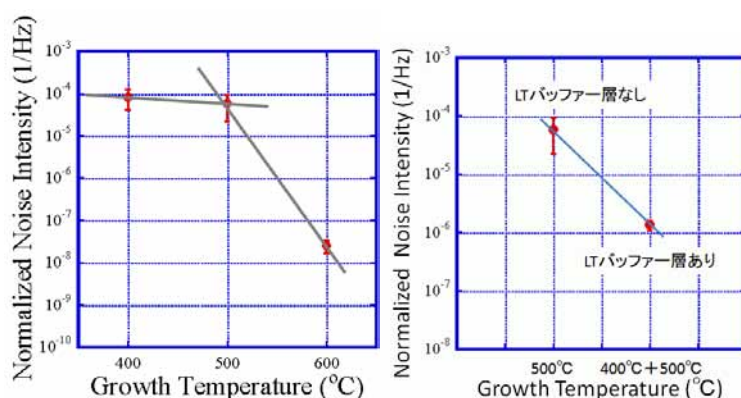


図1:成長温度によるノイズの変化(a) とLTバッファによるノイズの変化(b)

ソースドレイン電流の変化で調べ(図2)、濃縮技術を用いない検出技術として最高感度の 10^5 個/0.1mLのウイルス検出が可能であることが分かった。さらに糖鎖構造の最適化を継続する予定である。

次に、自然界で分離された鳥およびヒトインフルエンザウイルス天然および臨床分離株（日本国内分離株、及び、実際に鳥からヒトへ伝播している国での分離株）の反応特異性を評価した。その過程で、エジプトで分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の中に、ヒト型、鳥型レセプターシアロ糖鎖の両方へ結合性をもつ変異ウイルス株を世界で初めて見いだした(**T. Kawahara, Y. Suzuki, A. Tamada et al.**; 5th AASEF (招待講演), つくば, 2015)。最近2年間のエジプトでの鳥からヒトへのH5N1ウイルスの伝播例は世界最多であり、死者も急増している。高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異がエジプトで進みつつある可能性を強く示唆する結果が得られた。

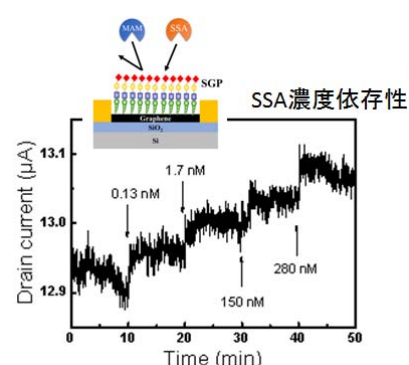


図2:ヒト型レクチンでの電流変化

4. 研究の反省・考察

(1) 温度変調プロセスによる数層グラフェンの電気伝導率向上

自己組織化プロセスに対して、バッファ層プロセス等の開発を行い、電気的特性の改善には成功した。しかし、まだ、グレインサイズが小さいため、デバイスサイズが大きくなると電気伝導特性が低下して感度が低下する。今後、劈開等のプロセスも併用してデバイス化を行うと共に、リーク電流の改善等のデバイスプロセスとしての完成を目指したプロセス開発を行っていく予定である。

(2) 数層グラフェンFET用糖鎖分子の開発・デバイス化

糖鎖分子のサイズ評価、及び、反応性の評価を行い、選択的にウイルスを検出できることを示した。また、ウイルスの変異等の検出も可能であった。しかし、高感度化のためには短い長さの糖鎖分子が必要であり、分散状態にまだ改良の余地があることが原子間力顕微鏡像から分かってきた。そこで、凝集などの効果を調べると共に、分布制御の方策を検討することで、糖鎖プローブの高性能化を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **河原敏男, 玉田敦子**, “直接成長グラフェンによる自己組織化デバイスプロセス開発-自己組織化プロセスのデバイス特性への影響-,” 総合工学, **27** (2015) 28-35.
- ② **Toshio Kawahara, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kazumasa Okamoto, Risa Utsunomiya, Teruaki Matsuba**, “Noise Spectroscopy of Self-aligned Carbon Nanowalls,” IEEE Conf. Proc.: 2015 23rd Int. Conf. Noise and Fluctuations (ICNF)(2015) 108-111.
- ③ Guohua Deng, Jianzhong Shi, Jing Wang, Huihui Kong, Pengfei Cui, Fang Zhang, Dan Tan, **Yasuo Suzuki**, Liling Liu, Yongping Jiang, Yuntao Guan, Hualan Chen, “Genetics, receptor binding, and virulence in mice of H10N8 influenza viruses isolated from ducks and chickens in live poultry markets in China,” Journal of Virology, **89** (2015) 6506-6510.
- ④ **鈴木康夫**, “インフルエンザウイルスのシアロ糖鎖生物学-鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異の分子基盤-,” 生化学 (日本生化学会), **87** (2015) 348-361.
- ⑤ **Nongluk Sriwilajjaroen, Katsuhiko Suzuki, Emi Takashita, Hiroaki Hiramatsu, Osamu Kanie, Yasuo Suzuki**, “6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential,” J. Antimicrobial Chemother, **70** (2015) 2797-2809.
- ⑥ **玉田敦子**, “18世紀フランスにおけるミソジニーとナショナリズム,” 一橋大学社会科学古典

資料センターStudy Series, **72** (2016) 1-44.

(2) 口頭発表

- ① **Toshio Kawahara, Yasuo Suzuki, Atsuko Tamada, Nongluk Sriwilaijaroen, Kazuhiko Matsumoto**, “Spreading of Influenza Virus in North Africa and Southeast Asia,” 30th Anniversary Hall, University of Tsukuba, Japan, 2015年5月10日～13日, 11p-S4-4 (2015年5月11日).(招待講演)
- ② **Toshio Kawahara, Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kazumasa Okamoto, Risa Utsunomiya, Teruaki Matsuba**, “Noise Spectroscopy of Self-aligned Carbon Nanowalls,” 23rd International Conference on Noise and Fluctuations(ICNF), Xidian University, Xi’an, China, 2015年6月2日～5日, We-D-4 (2015年6月3日).
- ③ 林亮太, 小野堯生, 生田昂, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, **河原敏男, 鈴木康夫, 中北慎一**, 松本和彦, “糖鎖機能化グラフェンFETを用いたインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンの検出,” 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 2015年9月13日～16日, 15P-2B-6 (2015年9月15日).
- ④ **河原敏男**, 川際智聖, 中川幸紀, 大野泰秀, 前橋兼三, 松本和彦, 岡本一将, 宇都宮里佐, 松葉晃明, 吉村雅満, 松岡佑樹, “低温バッファ層を用いたCNW-FETのノイズ解析,” 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 2015年9月13日～16日, 16a-PA2-32 (2015年9月16日).
- ⑤ **河原敏男, 玉田敦子, 中北慎一**, “シアロ糖鎖修飾による数層グラフェンインフルエンザバイオセンサーの研究開発,” 平成27年度 総合工学研究所研究発表会, 中部大学 521講義室(2016年3月7日).
- ⑥ 林亮太, 小野堯生, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, **河原敏男, 鈴木康夫, 中北慎一**, 松本和彦, “ウイルス検出のための糖鎖機能化グラフェンFET の修飾糖鎖の検討,” 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2016年3月19日～22日, 20p-P12-26 (2016年3月20日).
- ⑦ 鎌田果歩, 小野堯生, 金井康, 大野恭秀, 前橋兼三, 井上恒一, 渡邊洋平, **河原敏男, 鈴木康夫, 中北慎一**, 松本和彦, “糖鎖機能化グラフェンFETを用いたノイラミニダーゼ反応計測,” 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2016年3月19日～22日, 21p-S011-10 (2016年3月21日).
- ⑧ **鈴木康夫**, “鳥インフルエンザウイルスのヒト間伝播能獲得の仕組み,” 第29回日本医学会総会2015関西, 国立京都国際会館, 2015年4月11日～13日(2015年4月11日).
- ⑨ **玉田敦子**, “テキストデータベースを用いた研究の現状と課題,” 日本18世紀学会, 東京大学駒場キャンパス, 2015年6月20日～21日(2015年6月20日).
- ⑩ **Atsuko Tamada**, “L'éloge de la virilité au cours du renouvellement de la vertu civique,” 14th International Congress for Eighteenth-Century Studies, Erasmus University, Rotterdam, Netherlands, 2015年7月27日～31日(2015年7月28日).
- ⑪ **Atsuko Tamada**, “The Peculiar Promotion of French E-Data Resources and the New Research Possibility in the Research on Rhetoric,” The Workshop on the Promotion of Digital Humanities and the New Possibility of “Analogue” Humanities, National Institute of Informatics, Tokyo, 2016年2月10日.(招待講演)

(3) 出版物

- ① **鈴木康夫**, “インフルエンザウイルスヘマグルチニンの糖鎖ウイルス学,” 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック—創薬・医療から食品開発まで, 監修: 秋吉一成, 編集: 津本浩平, 加藤晃一, 鷹羽武史, 深瀬浩一, 古川鋼一, 株式会社エヌ・ティー・エス, (2015) 総ページ数/678.
- ② 長島昭, **玉田敦子**, “中部高等学術研究所共同研究「寿命 — 無限か再生か」第3回研究会報告書 Studies Forum Series,” 中部高等学術研究所, **95** (2016) 総ページ数/28.

学 校 名	大 阪 成 蹊 短 期 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	廃棄羊毛屑のリサイクルによる高機能再生繊維の作成 ー再生羊毛のナノファイバーシート化ー		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①羊毛 ②ケラチンタンパク質 ③再生繊維 ④リサイクル ⑤ナノファイバー			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澤 田 和 也	総 合 生 活 学 科	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 里 俊 哉	大 阪 工 業 大 学 大 学 院 部 工 学	教 授	実験(ケラチン再生繊維化)
吉 村 由 里 香	地 方 独 立 行 政 法 人 大 阪 市 立 工 業 研 究 所 生 物 ・ 生 活 材 料 研 究 部 機 能 性 色 材 研 究 室	室 長	実験(再生ケラチンの物性評価)

廃棄羊毛屑のリサイクルによる高機能再生繊維の作成 ー再生羊毛のナノファイバーシート化ー

1. 研究の目的

(1) <研究背景その1>

再生繊維の実用は、セルロースを材料として既に古くからおこなわれている。また、近年ではナノファイバー化に関する研究も進み、その応用分野も広範にわたっている。一方、セルロースと同じく天然由来素材である動物繊維のタンパク質については、一部で研究例があるものの再生繊維化は進んでいない。特に、我々にとって最も身近な羊毛については再生繊維化された例は見当たらない。

また、羊毛については、その紡績過程において繊維屑が大量に発生し、それらの多くは廃棄処分されている。もし、これらの繊維屑を利用してそれらから再生繊維を作成することが可能であれば、資源のリサイクルにも繋がる。

<研究背景その2>

近年注目されている組織再生による再生医療の発展には、細胞が増殖するための足場となるスキャフォールドの開発が不可欠である。また、スキャフォールドを含み生体内で使用することを前提としたバイオマテリアルに応用するための材料には、「適切な力学特性」および「生体親和性」という両面の特性が要求される。一般に、合成高分子は前者に優れ、天然高分子は後者に優れているが、両者を満足する材料は未だ開発されていない。現在のところ、最も一般的に用いられている材料は、コラーゲンである。コラーゲンは生体を構成している構造タンパク質であり、優れた特性を有しているが、牛海綿状脳症（BSE）の問題が浮上して以降、その安全性が危惧されている。そして、現在もその代替品の開発が待たれている。

(2) 以上のような背景をもとに、本研究では二つの観点から表題の研究テーマに着想した。

第一点目は、動物由来のタンパク質繊維の再生繊維化であり、上記の通り廃棄羊毛のリサイクルに繋げることを目的としている。更には、下記記述の第二点目とも関連するが、バイオマテリアルへの応用をターゲットとした場合、廃棄羊毛のみならずヒト毛髪に適用することも可能である。ヒト毛髪は、廃棄羊毛屑と比べ、毎日大量に産業廃棄物として処分されている。廃棄される羊毛屑だけでなく、従来まで全く利用価値の無かった廃棄毛髪を利用することが出来れば、究極のリサイクルにつながる。さらに、その資源はヒトが生存する限り永久的に、安定かつ大量に、そして安価に入手可能なバイオマスの活用と言える。

第二点目は、生体内に移植することを前提とした材料として、病原性因子を排除した非血管性由来の構造タンパク質を活用することを目的としている。この点において、毛や爪等の主成分を構成しているケラチンはその材料として適しており、さらに細胞接着性タンパク質として知られているフィブロネクチンと同様に、細胞の接着に関与するアミノ酸配列（RGD、LDV等）がケラチン分子内に存在することから、バイオマテリアルとして応用できる可能性を十分に有している。もし、羊毛由来ケラチンの基礎検討を終えた後、その原材料を同じ動物由来毛であるヒト毛髪に適用することが可能であれば、バイオマテリアルとして異種由来動物ではなく、同種由来が利用できることになり、さらに安全性は高まる。そして、究極には自分自身の毛髪を利用することが可能であれば、自家由来材料による移植組織の作成が可能となり、最も理想的な素材と成り得る可能性を有している。

以上の経緯と最終達成目標を総合的に勘案し、本申請課題では、研究実施計画期間内に、以下の4項目を達成することを到達目標とする。

- ① 紡糸原液組成と生成するナノファイバーとの関連性を評価する
- ② ナノファイバーシート内の孔径をコントロールするための操作パラメータの評価
- ③ 生成ナノファイバーシートの物性評価
- ④ 高機能化するためのコンポジット化評価

現段階で、羊毛繊維を単独でナノファイバー化した例は見当たらない。本研究は最終目的としてバイオマテリアルをターゲットとしているが、動物繊維の再生繊維化そのものが達成されていない。従って、本申請課題であるナノファイバーシート作成技術は、最終応用目的のバイオマテリアル応用のみならず、衣料用繊維はもちろん、化粧品関連や産業材料、医療材料等、セルロース再生繊維と比較して幅広い分野への応用化が可能である。

2. 研究の計画

研究期間2年目の当該年度においては、上記③に記載の“ナノファイバーの物性評価”に着手する。また、昨年度の継続申請時に記載した通り、将来のバイオマテリアル応用におけるケラチンナノファイバー上での細胞増殖性を考慮し、ナノファイバーの配向性制御を追加項目に挙げ、検討に着手する。尚、③のナノファイバーの物性評価については、(バイオマテリアル応用への観点から)以下の点を重要項目として挙げ、検討を実施する。(一部実施中)

- 1) 作成したナノファイバーシートの精製(不純物除去)度の評価
- 2) 親水性度の評価
- 3) 力学強度の評価(引張り試験)
- 4) In vitroにおける生分解性評価

3. 研究の成果

上記記載の1)については、紡糸時に増粘剤として添加したPEGの除去および残存について評価した。具体的に、ナノファイバーを塩素系有機溶媒とリン酸緩衝溶液中に浸漬することで、PEGの選択的溶解抽出を行い、抽出液およびナノファイバーの両者をFT-IRにより評価した。その結果、浸漬時間の経過と共にナノファイバー中のPEG量は減少し、機器分析における測定では最終的にPEGの残存は確認されなかった。2)においては接触角測定および吸水性試験を行い、表面が極めて高い疎水性であることが示された。これは、ケラチンそのものの性質由来ではなく、表面のナノ構造に起因する物理的構造と関連していることも判明し、細孔サイズを調整することで表面親水性をある程度任意にコントロールできることも明らかとなった。3)においては引張り試験による強度評価を実施し、紡糸時の各種パラメータを変化させた際のナノファイバーシートの破断限界強度、伸び率、ヤング率を系統的に調べた。そして、ナノファイバーの組成と強度に関する有益な知見を得ることが出来た。4)においては、プロテアーゼ(セリンプロテアーゼ)を用い、in vitroでのケラチンナノファイバーの生分解性評価を行った。架橋度の差により分解速度に差はあるものの、その速度を制御できることから、その詳細を現在検討中である。

次に、昨年度に追加項目としたナノファイバーの配向性については、現在予備検討を行っている。配向性制御には、コレクターの回転を工夫することが重要であると予測される。しかし、本年度は当初計画の研究予算に変更が生じたため、回転コレクターの導入を最終年度に延期し、一般的な攪拌装置を改良することで代用し、導入的な検討を始めた。その結果、コレクター面積や回転速度の調整により、配向性に変化が生じる傾向にある、という知見が得られた。現時点では、コレクター回転数や径の不足、および回転により生じる風圧等、装置的要因により明確なデータは得られていない。しかし、これらの予備検討データから、最終年度の装置導入により、任意の配向性制御が期待される。尚、前記③ナノファイバーの物性評価は、無配向状態の結果であるが、今後配向制御されたナノファイバーの評価も随時実施する予定である。

4. 研究の反省・考察

添加剤(PEG)を含む系においてのみ、ケラチンナノファイバーが形成されており、その残存についても評価を行った。本来、PEGは生体親和性が高く、残存があっても生体への影響は無視できると考えられる。今回実施した分析の範囲では、その残存は確認されていないが、完全に除去されているかは判定できない。この点において、今後細胞や生体との親和性を評価する際に、PEGの優れた生体親和性の効果か、ケラチンの効果かを判断することが困難となる。現在、溶媒や

スピニング条件を変えて、ケラチン単独でのスピニングを試みており、その手段確立は今後の詳細な検討のために不可欠である。

生分解性の評価において、一部のプロテアーゼのみによる評価に止まっており、説得力のある議論とは言えない。少なくとも作用機構の異なるプロテアーゼそれぞれを用いて、至適条件での速度論的追跡を加えた評価が今後必要である。

また、配向性制御においては、細胞の分化誘導に極めて大きな影響を与えると考えられることから、今後その制御を着実に行うことが課題である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Kazuya Sawada, Toshiya Fujisato, Preparation of Keratin Nanofibers for Biomedical Application, TISSUE ENGINEERING: Part A, 21, S-39, 2015

(2) 口頭発表

Kazuya Sawada, Toshiya Fujisato, Application of regenerated animal fibers for scaffold preparation, Asian Textile Conference -13 (Geelong, Australia), 2015. 11.3-6.

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 京 電 機 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	物質生産誘導性ストレスに応答する新奇遺伝子の生理機能解析 －有用物質生産の新技术開発に向けた基盤構築－		研究分野 農 学
キーワード	①コリネ型細菌 ②グルタミン酸発酵 ③ストレス応答 ④代謝制御 ⑤有用物質生産 ⑥機能未知遺伝子		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 崎 寿	工 学 部	教 授	研究総括、コリネ型細菌の遺伝子組換え実験、代謝産物解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
夏 目 亮	工 学 部	教 授	遺伝子破壊株、相補株、増幅株の培養、代謝酵素の生化学的解析

物質生産誘導性ストレスに応答する新奇遺伝子の生理機能解析 —有用物質生産の新技术開発に向けた基盤構築—

1. 研究の目的

- (1) 工業的なアミノ酸生産に用いられている *Corynebacterium glutamicum* においてL-Glu過剰生成を誘導するストレスに応答して転写量が増大する新奇遺伝子（合計7種類、uk1～uk7と表記する）の生理的機能について、遺伝子破壊株および増幅株を用いた遺伝学的解析、代謝酵素の生化学的解析、代謝産物解析を通じて明らかにする。
- (2) (1)で得られた知見を基に、微生物の有用物質生産能力を利用あるいは強化する技術の基盤を確立する。

2. 研究の計画

(1) 遺伝子破壊株の構築

- ① 昨年度破壊効果が認められたuk1とuk2の2重遺伝子破壊株の構築

既に作製済みであるuk1遺伝子破壊株を親株に、既に作製済みであるuk2遺伝子破壊用プラスミドを導入し、uk1、uk2二重遺伝子破壊株を構築する。

(2) 遺伝子破壊株のグルタミン酸生産培養解析

- ① 昨年度破壊効果が認められたuk2遺伝子—遺伝子相補株、遺伝子増幅株の解析—

昨年度、uk2遺伝子破壊株は2つのグルタミン酸生産誘導条件、すなわち、ペニシリン添加条件とTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められた。そこで、本年度は、昨年度認められた差異がuk2遺伝子の破壊に由来することを確実にするために遺伝子相補株および遺伝子増幅株の培養評価を行う。尚、遺伝子相補株は、遺伝子破壊株にuk2遺伝子およびそのプロモーターを含むと推定されるuk2遺伝子上流域を搭載したプラスミドを導入した株であり、遺伝子増幅株は、野生株に前記プラスミドを導入した株である。

- ② 昨年度破壊効果が認められたuk4, 5, 6—破壊株の培養解析—

昨年度、uk4, 5, 6三重遺伝子破壊株はグルタミン酸生産誘導条件であるTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められたが、有意であるか確証が持てないレベルであった。そこで、本年度は、当該遺伝子破壊株の培養評価を繰り返し実施し、破壊効果について確証を得る。

尚、昨年度の報告書にも記した通り、uk4, 5, 6遺伝子については3つのORFが同じ向きで連続して隣接していることに加えコードするアミノ酸配列の相同性が高いため、遺伝子破壊・遺伝子増幅・遺伝子相補いずれの場合もこれら3つのORFをまとめて扱っている。

- ③ uk3遺伝子破壊株の培養解析

昨年度新たに構築したuk3遺伝子破壊株について、培養評価を実施する。

(3) 遺伝子破壊株の代謝解析

- ① uk2破壊株、遺伝子相補株、遺伝子増幅株の代謝解析

上記(2)①のuk2遺伝子破壊株、相補株、増幅株の培養評価を踏まえ、グルタミン酸以外の代謝産物の解析や酵素活性測定などの解析を行う。

3. 研究の成果

(1) 遺伝子破壊株の構築

- ① 昨年度破壊効果が認められたuk1とuk2の2重遺伝子破壊株の構築

既に作製済みであるuk1遺伝子破壊株を親株に、既に作製済みであるuk2遺伝子破壊用プラスミドを導入し、uk1、uk2二重遺伝子破壊株の構築を試みた。1回組換え株の取得には成功

したが、2回組換え株の取得には至らなかった。uk1, uk2二重遺伝子破壊は*C. glutamicum*の生育に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。今後、今年度とは逆に、uk2遺伝子破壊株を親株に、既に作製済みであるuk1遺伝子破壊用プラスミドを導入し、uk1, uk2二重遺伝子破壊株の構築を試みる。

(2) 遺伝子破壊株のグルタミン酸生産培養解析

① 昨年度破壊効果が認められたuk2-遺伝子破壊株、遺伝子相補株、遺伝子増幅株の解析-

昨年度の培養評価では、2つのグルタミン酸生産誘導条件、すなわち、ペニシリン添加条件とTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められた。今年度の培養評価は、効果が大きかったペニシリン添加条件に絞って行った。研究の計画に記したように、遺伝子相補株は、遺伝子破壊株にuk2遺伝子およびそのプロモーターを含むと推定されるuk2遺伝子上流域を搭載したプラスミドを導入した株であり、遺伝子増幅株は、野生株に前記プラスミドを導入した株である。対照株として空ベクターを導入した株を用いた。

培養解析の結果、ペニシリン添加条件において、uk2遺伝子破壊株のグルタミン酸生産量は対照株と比べ減少する傾向がみられ、糖消費量は増加する傾向が見られた。従って、uk2遺伝子破壊株消費糖当たりのグルタミン酸生産量は対照株と比べ大きく低下した。遺伝子相補株においては野生株と類似した表現型を示す傾向が見られたことから、遺伝子破壊株で見られた表現型はuk2遺伝子破壊に由来するものであると考えられた。uk2遺伝子増幅株は、ペニシリン添加条件において、対照株に比べグルタミン酸生産量が増加する傾向、すなわち破壊株と逆の傾向が認められた。一方、糖消費量については、消費量が増加する傾向、すなわち破壊株と同様の傾向が認められたことから、uk2が糖消費に与える影響については今後更なる解析が必要と考えられた（下記(3)にて実施）。

興味深いことに、このuk2遺伝子破壊株および増幅株は、グルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件においても明確な表現型を示した。すなわち、通常の培養条件において、uk2遺伝子破壊株は野生株と比べて多くのグルタミン酸を培養液に蓄積した。このグルタミン酸蓄積量は、もちろん、グルタミン酸生産誘導時と比較すると非常に少なく1 g/L程度であるものの、野生株の約2倍と明確な違いが認められた。また、増幅株のグルタミン酸蓄積量は野生株と比較して低下する傾向が認められた。上記のペニシリン添加によるグルタミン酸生産誘導時とは逆の表現型であるが、非常に興味深い結果であり、今後さらに検討を進めることで、uk2遺伝子の興味深い機能が明らかとなれば、大変有意義な成果に繋がることと期待される。

② 破壊効果が認められたuk2-当該ORFにコードされるタンパク質が機能しているかの解析-

前記①に示したように、ペニシリン添加条件において、uk2遺伝子破壊株のグルタミン酸生産量は対照株と比べ減少する傾向がみられ、糖消費量は増加する傾向が見られた。一方、uk2遺伝子は、ゲノム解析の結果、機能未知タンパク質をコードするORFと推定されているのみであり、機能解析の報告は無い。①に記した表現型が当該ORFのタンパク質による作用であるかどうかを調べるために、①で用いた遺伝子相補用プラスミドに搭載したuk2に変異を導入し、そのプラスミドによって相補できるかどうかを検討した。uk2の変異としては、N末端から2番目のアミノ酸に対応するコドン以降10番目のコドンまで、アミノ酸の置換を伴わないサイレント変異を導入した変異遺伝子を作製した。また、これとは別に開始コドンから1塩基フレームをシフトさせ、更に最初のコドンを終止コドンに変更した変異遺伝子を作製した。これら変異型uk2遺伝子をuk2遺伝子破壊株にプラスミドを用いて導入し、培養評価を行った。

その結果、消費糖当たりのグルタミン酸生産量を指標にした場合、サイレント変異遺伝子の導入は野生型遺伝子と同程度の相補が認められたが、フレームシフト変異遺伝子の導入は相補が認められなかった。従って、uk2は実際にタンパク質をコードし、そのタンパク質が機能しているものと推定された。

③ 昨年度破壊効果が認められたuk4, 5, 6—破壊株の培養解析—

昨年度、uk4, 5, 6三重遺伝子破壊株はグルタミン酸生産誘導条件であるTween 40添加条件において、野生株と比較してグルタミン酸生産量および糖消費量に差異が認められたが、有意であるか確証が持てないレベルであったため、当該遺伝子破壊株の培養評価を繰り返し実施した。グルタミン酸生産誘導条件としては、昨年度破壊の効果が認められたTween 40添加条件を用いた。

その結果、uk4, 5, 6三重遺伝子破壊株は野生株と比較して、生育にはほとんど差異が認められなかったが、グルタミン酸生産量と糖消費量は共に減少した。

④ uk3破壊株の培養解析

昨年度作製し直したuk3破壊株について、典型的な3種のグルタミン酸生産誘導条件、すなわち、ビオチン制限、Tween 40添加、ペニシリン添加にて培養を行った。

その結果、前記3種のグルタミン酸生産誘導条件全てにおいて、uk3遺伝子破壊株のグルタミン酸生産量は野生株よりも多かった。いずれの条件においても、uk3遺伝子破壊株の糖消費量は野生株よりも多い傾向がみられたが、グルタミン酸生産量の差異ほどは大きくなく、uk3遺伝子破壊株の消費糖当たりのグルタミン酸生産量は野生株よりも高かった。生育には大きな差異が認められなかったことから、uk3遺伝子破壊株においては、細胞当たりの糖消費の亢進とグルタミン酸生産方向への代謝フラックスの変換の両方が生じていると考えられた。

(3) 代謝解析

① uk2遺伝子増幅株の培養再解析と代謝解析

(2)①に記したように、uk2遺伝子増幅株は、ペニシリン添加でのグルタミン酸生産誘導条件で興味深い表現型を示したが、評価が定まらず、更なる評価が必要であった（上記(2)①参照）。更に、グルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件においても興味深い表現型を示した。そこで、uk2遺伝子増幅株について、ペニシリン添加条件とグルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件における更なる評価を行った。

その結果、ペニシリン添加によるグルタミン酸生産誘導条件において、uk2遺伝子増幅株は対照株と比較してグルタミン酸生産量が増加、糖消費量が増加する傾向が認められた。培養中期においては、uk2遺伝子増幅株は対照株と比較してより多くの酢酸を蓄積した。これは当該株の糖消費亢進と対応しており、グルタミン酸生産量の増大も糖消費亢進に起因するものと推定された。

また、グルタミン酸生産誘導条件ではない通常の培養条件においては、uk2遺伝子増幅株の培養液中のグルタミン酸蓄積量は対照株と比較して低いものであった。この時、糖消費量はuk2遺伝子増幅株と対照株で大きな違いは認められなかったが、酢酸蓄積量は、uk2遺伝子増幅株は対照株と比較して高い傾向が認められた。

以上より、uk2遺伝子は糖中枢代謝の制御に関与することが考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) 遺伝子破壊株の構築

① 目的の破壊株を構築するに至らなかった。uk1, uk2二重遺伝子破壊は*C. glutamicum*の生育に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。

(2) 遺伝子破壊株のグルタミン酸生産培養解析および代謝解析

① uk2遺伝子破壊株に加え、相補株、増幅株について解析した結果、破壊株が示した興味深い表現型は目的遺伝子の破壊に起因するものであることが確定した。

② 機能未知ORFであるuk2は実際にタンパク質をコードし、そのタンパク質が機能しているものと推定された。

③ uk2遺伝子は糖中枢代謝の制御に関与することが考えられた。

- ④ uk3遺伝子破壊株においては、細胞当たりの糖消費の亢進とグルタミン酸生産方向への代謝フラックスの変換の両方が生じていると考えられた。
- ⑤ 培養解析を再現性よく実施するためには、実験者に精緻な実験技術と忍耐が必要であるため、当初の計画よりも多くの時間を費やした。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表（学会発表（ポスター発表））

竹内 孝志、山内 健太郎、夏目 亮、川崎 寿

*Corynebacterium glutamicum*機能未知短鎖ORF *NCg10917*はTCA回路鍵酵素の調節因子をコードしている。

2015年度日本放線菌学会大会（2015年9月8日、富山国際会議場）

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 京 農 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	脳栄養学的手法確立による栄養素による脳機能制御機構の解明		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①脳機能 ②神経科学 ③栄養素 ④不飽和脂肪酸 ⑤ビタミンA ⑥ビタミンB1 ⑦精神疾患			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
喜 田 聡	応 用 生 物 科 学 部	教 授	研究全般の実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
上 原 万 里 子	応 用 生 物 科 学 部	教 授	ミネラルを中心とした栄養素欠乏動物の作製と栄養生化学的解析の実施
大 石 祐 一	応 用 生 物 科 学 部	教 授	不飽和脂肪酸やビタミン類を中心とした栄養素欠乏あるいは過剰摂取動物の作製と栄養生化学的解析の実施
福 島 穂 高	応 用 生 物 科 学 部	助 教	神経科学的実験、行動学的解析、生理学的解析の実施

脳栄養学的手法確立による栄養素による脳機能制御機構の解明

1. 研究の目的

現在、脳機能に対する栄養素の役割が網羅的に解析され、実験・科学的事実に基づいた「脳栄養学」的知識が社会に提供される必要に迫られている。また、環境要因としての栄養素と精神疾患発症との関連性も不明であり、栄養素が精神疾患の病態に与える影響は解明されていない。一方、遺伝子操作マウスを解析する最新の神経科学的手法を活用すれば、脳機能に対する種々の栄養素の機能を明らかにすることも可能である。そこで、本課題では、最新の神経科学的手法と栄養学的手法を組み合わせた脳栄養学的手法を用いて、遺伝子レベルから行動レベルまでの4段階で解析を進め、脳機能に対する栄養素の役割を統合的に解明する。さらに、精神疾患モデルマウスに対する栄養素摂取の効果を解析し、研究成果の応用を試みる。

2. 研究の計画

研究代表者が解析を続けてきたビタミンA及びB1を中心に、その脳機能に対する役割を遺伝子、細胞、行動レベルで解析し、回路レベルの解析にも着手する。

(1) 研究方針

① 遺伝子レベルの解析（次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析）

次世代シーケンサーを用いて、海馬及び前脳領域を中心とした発現プロファイルの詳細解析を行い、この結果に基づき各種栄養素が作用を及ぼす細胞内情報伝達経路を同定し、各栄養素の摂取不足及び過剰摂取が及ぼす影響を分子レベルで明らかにする。

② 細胞レベルの解析（イメージングによるニューロン機能・性状解析）

発現解析で栄養素の標的として同定された脳部位あるいはニューロンを主として解析する。Arc発現のレポーターマウスあるいはThy1レポーター等マウスの脳を透明化し、(1)で同定されたニューロンを3次的に解析し、各種マーカーを用いてニューロンを形態解析する。

③ 回路レベルの解析（海馬を中心とした電気生理学的解析）

in vivoユニット記録解析法を用いて、海馬を中心としたニューロンの電気生理学的解析を実施し、シナプス伝達、さらには、回路制御に対する栄養素の役割を理解する。

④ 行動レベルの解析（行動バッテリー解析）

モリス水迷路課題、恐怖条件付け文脈学習課題、社会食物伝達課題、受動的回避学習課題、社会的認知記憶課題、新規物体認識課題等などの海馬依存性記憶学習課題、また、音恐怖条件付け学習課題、味覚嫌悪条件付け学習課題などの扁桃体依存性学習記憶課題、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、明暗テストなどの不安行動解析課題、強制水泳テストや尾懸垂テストなどのうつ様行動解析課題、社会的攻撃性テスト、社会的優性度測定課題などの社会行動・攻撃性評価課題、ローターロードテストの運動能力評価課題、また、サーカディアンリズム等を評価して、栄養素の役割を行動レベルで評価する。

(2) 実験系の説明

⑤ ビタミンAのマウス解析系の説明

研究代表者は、ビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸の核内受容体のドミナントネガティブ型RAR α 変異体(dnRAR)あるいは野生型RARを成体期においてのみ前脳領域特異的に発現誘導させたコンディショナル変異マウス(dnRARマウス)を作製している。これらの遺伝子操作マウスを用いて解析を進めることで、ビタミンA情報伝達経路のgain of functionあるいはloss of functionの影響を詳細に明らかにする。さらに、これら変異型マウスにレチノイン酸を投与した効果も解析し、脳機能に対するビタミンAの役割を総合的に理解する。

⑥ ビタミンB1のマウス解析系の説明

ビタミンB1の欠乏症として有名であるウェルニッケ・コルサコフ症候群は中枢神経系の疾患である。この疾患では、健忘や記憶力障害などの学習記憶能力の障害が観察されるものの、

ビタミンB1欠乏により記憶障害に陥るメカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究では、ビタミンB1欠乏食を10日間給餌し、この間チアミン拮抗剤ピリチアミン (0.5mg/kg) を毎日投与してビタミンB1欠乏を進行させて、その後、11日目に塩酸チアミン (100mg/kg) を投与し、通常食で欠乏状態から回復させることでビタミンB1欠乏回復マウスを作製する。このビタミンB1欠乏回復マウスを用いて、脳機能に対するビタミンB1の機能的役割を解析する。

3. 研究の成果

(1) 脳機能に対するビタミンAの役割の解析

① 行動レベルの解析 (行動バッテリー解析)

申請者が作製したレチノイン酸受容体のドミナントネガティブ型RAR α 変異体(dnRAR)あるいは野生型RARを前脳領域特異的に発現誘導させたコンディショナル変異マウス群、及びこれら変異型マウスにレチノイン酸を投与したマウス群の情動行動を評価した。その結果、dnRARを前脳領域特異的に過剰発現させ続けたマウスでは、新規環境では、不安様行動の増加、探索行動の減少が観察されたものの、環境に慣れると高い行動活性を示すようになり、躁様の行動を示すことが示唆された。従って、ビタミンA情報伝達系の不活性化が長期に渡ると、情動行動に異常を示すようになることが強く示唆された。

② 遺伝子レベルの解析 (次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析)

ビタミンAによる記憶制御の分子機構を明らかにするために、ビタミンA情報伝達経路のgain of functionあるいはloss of functionの影響の解析を進めた。次世代シーケンサーを用いて、海馬及び前脳領域を中心とした発現プロファイルの詳細解析を行った。その結果、ビタミンA情報伝達経路活性化に伴い発現変動する遺伝子群が明らかとなった。野生型RARを前脳領域特異的に発現誘導させたコンディショナル変異マウスでは1923個の遺伝子群が上方制御、一方、953個の遺伝子群が下方制御をそれぞれ受けることが示された。また、ビタミンAの代謝物であるレチノイン酸を投与した場合には、14個の遺伝子群が上方制御、一方、1個の遺伝子群が下方制御をそれぞれ受けることが示された。これら遺伝子群の中では、RARの過剰発現のみでも変動する遺伝子群、レチノイン酸投与により変動する遺伝子群、一方で、RAR発現マウスにレチノイン酸を投与した際により顕著に発現変動を示す遺伝子群などに分類された。特に、ビタミンA情報伝達経路の活性化により、ムスカリン受容体の発現が顕著な上方制御を受けることが初めて明らかとなり、ビタミンA情報伝達経路活性化により観察される記憶能力向上にムスカリン受容体の発現上昇が貢献している可能性が示された。

(2) 脳機能に対するビタミンB1の役割の解析

① 行動レベルの解析 (行動バッテリー解析)

前年度に引き続き、B1欠乏から回復させたマウスの海馬依存的記憶能力の解析を行った。B1欠乏回復マウスにおいて観察された海馬依存的記憶形成能力の障害はB1欠乏から回復した6ヶ月後にも観察され、B1欠乏が引き起こす記憶能力の障害は不可逆的であることが強く示唆された。

② 細胞レベルの解析 (イメージングによるニューロン機能・性状解析)

前年度の解析から、B1欠乏により海馬の萎縮が導かれることが示されたため、ニューロンのマーカーであるNeuN発現を指標にして、海馬のニューロン数を測定した。その結果、海馬においては、B1欠乏により海馬のニューロン数が減少し、B1欠乏から回復しても、このニューロン数の減少は回復しないことが明らかとなった。さらに、ニューロン特異的にGFPを発現するトランスジェニックマウスにB1欠乏を誘導し、その影響を解析した。海馬歯状回のスパイン数とスパインの形状を解析した結果、B1欠乏によりニューロンの樹状突起スパインの密度が低下し、B1欠乏から回復しても、このスパイン密度の低下は回復しないことが明らかとなった。さらに、このスパイン密度の低下は大型スパインの減少によることも明

らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) 脳機能に対するビタミンAの役割の解析

- ① ビタミンA情報伝達経路が情動行動を制御することが明らかとなり、長期的なビタミンA伝達経路の不活性化は情動行動に異常を導くことが示された。従って、今後、ヒトにおいてもビタミンA欠乏と精神疾患等の関連に注視すべきであると考えられた。
- ② ビタミンA情報伝達経路制御によるトランスクリプトーム解析から、ビタミンA情報伝達経路の下流に存在する遺伝子群の同定が進んだ。特に、ムスカリン受容体は記憶制御に関わることから、ビタミンA情報伝達経路がムスカリン受容体の発現制御を介して記憶能力を正に制御する分子機構の存在が強く示唆された。

(2) 脳機能に対するビタミンB1の役割の解析

- ① ビタミンB1欠乏から回復させたマウスでは、ビタミンB1欠乏によるウエルニッケルサコフ症候群と同様に不可逆的な海馬依存的記憶形成能力の顕著な障害が観察されたことから、B1欠乏回復マウスはウエルニッケルサコフ症候群モデルとなるものと考えられた。
- ② B1欠乏回復マウスでは、海馬の萎縮、海馬ニューロン数の減少、さらに、海馬ニューロンのスパイン密度の低下が観察され、B1欠乏により海馬が変性することが明らかとなった。この海馬の変性はB1欠乏回復マウスが示す海馬依存性記憶の障害の原因となることが強く示唆された。従って、海馬の変性がウエルニッケルサコフ症候群の症状の一つである記憶障害を導くマイクロ病態である可能性が示された。今後、ビタミンB1欠乏と認知症との関連など、ビタミンB1 摂取と記憶障害を示す疾患との関係性が解析されるべきであると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Morishita, Y., Miura, D., Kida, S. PI3K Regulates BMAL1/CLOCK-mediated Circadian Transcription from the *Dbp* Promoter, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80** : 1131-1140. 2016
doi: 10.1080/09168451.2015.1136885.
- ② Inaba, H., Tsukagoshi, A., Kida, S. PARP-1 activity is required for the reconsolidation and extinction of contextual fear memory *Mol. Brain* **8**:63, 2015
doi: 10.1186/s13041-015-0153-7.
- ③ Kida, S., Sawa, A., Ikeda, K. Elucidating mechanisms for mental disorders: from specific molecules to pathology. *Current Molecular Medicine*. **15**:191-2. 2015
DOI: 10.2174/1566524015666150330142548
- ④ Sawa A, Kida S, Ikeda K. Microphenotypes of mental disorders: a systematic approach to study disease mechanisms. *Current Molecular Medicine*. **15**(2):109-10. 2015
Doi: 10.2174/156652401566615033001535
- ⑤ Kida, S. & Kato, T. Microendophenotypes of psychiatric disorders -Phenotypes of psychiatric disorders at the level of molecular dynamics, synapses, neurons, and neural circuits-. *Current Molecular Medicine*. **15**:111-118, 2015
doi: 10.2174/156652401566615033002128
- ⑥ 喜田 聡「恐怖記憶の制御基盤とその制御に対する海馬の役割-トラウマ記憶を原因とするPTSD治療への応用を考える-」 *トラウマティック・ストレス***13** , 37-47. 2015

(2) 口頭発表

- ① 喜田 聡「脳機能に対する栄養素の役割」第23回 植物油栄養懇話会, 2015年11月13日、東

京

- ② 喜田 聡「海馬時計機能による記憶想起制御」記憶回路研究会「異なる動物種間での記憶回路制御機構の統合的理解による記憶回路原理の解明」2015年10月8-9日, 生理学研究所
 - ③ S. KIDA “Active Transition of Memory Phases from Fear to Safety, Symposium on Memory and Mind, Tohoku Forum for Creativity Thematic Program” 2015 (9月28-29日、仙台)
 - ④ S. KIDA “Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis” . (The 7th meeting of MCCS-Asia Sep 19-20, 2015, Wuzhen, China)
 - ⑤ S. KIDA Erasure of Recent and Remote Fear Memory by Enhancing Forgetting (Symposium “Synaptic Plasticity in Healthy and Disease” 2015 Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences (KSBNS), Korea, Daegu on Sep 11~12, 2015.)
 - ⑥ 喜田 聡「Regulation of memory retrieval by forebrain circadian clock」(シンポジウム 生物の適応能を飛躍的に高めたリズム制御分子と高次中枢システムの世界、第58回日本神経化学会大会 理事会企画シンポジウム、平成27年9月11日大宮)
 - ⑦ 喜田 聡「前脳時計機能による記憶想起のサーカディアン制御機構の解析」(シンポジウム「記憶貯蔵と想起制御研究の最前線」第38回日本神経科学大会、平成27年7月28日(火)～31日(金)、神戸)
 - ⑧ S. KIDA Erasure of recent and remote fear memory by enhancing adult hippocampal neurogenesis (10th International Conference for Neurons and Brain Disease, Xian, China, June 22-24, 2015)
 - ⑨ S. KIDA Erasure of recent and remote fear memory by enhancing forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis (Symposium “New insights into classical memory issues” . 9th Annual Canadian Neuroscience Meeting - May 24 -27, 2015, Vancouver)
 - ⑩ S. KIDA, T. Kishimoto, S. Ohishi, K. Nagata, T. Watanabe, S. Hasegawa. Thiamine deficiency impairs hippocampus-dependent memory and spine density of hippocampal neurons (12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN), scheduled on May 14-18 of 2015 at Pacifico Yokohama, Japan. 第69回日本栄養食糧 平成27年5月14-18日, 横浜)
- (3) 出版物
なし

学 校 名	日 本 獣 医 生 命 学 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	自然発症性家族性てんかん猫の包括的てんかん研究 -原因遺伝子の同定とてんかん外科の基礎研究-		研究分野	農 学
キ ー ワ ー ド	①てんかん ②自然発症性疾患モデル ③遺伝子解析 ④てんかん外科			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 谷 川 大 輔	獣 医 学 部	准 教 授	研究統括・成果発表

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
盆 子 原 誠	獣 医 学 部	教 授	遺伝子解析
松 木 直 章	東 京 大 学 大学院農学生命科学研究科	教 授	遺伝子解析
大 和 修	鹿 児 島 大 学 共同獣医学部	教 授	遺伝子解析
内 田 和 幸	東 京 大 学 大学院農学生命科学研究科	教 授	病理解析
太 組 一 朗	日 本 医 科 大 学 日 医 学 部	講 師	てんかん外科(外科技術)
川 上 康 彦	日 本 医 科 大 学 日 医 学 部	准 教 授	てんかん外科(脳波解析)

自然発症性家族性てんかん猫の包括的てんかん研究 —原因遺伝子の同定とてんかん外科の基礎研究—

1. 研究の目的

(1) 自然発症性家族性てんかん猫 (FSEC) の原因遺伝子の同定

FSECは世界で初めての猫の家族性てんかんであり、ヒトおよび動物の家族性側頭葉てんかんモデルとして期待されている。これまでの所、我々は家系図解析や自家繁殖の結果より常染色体性劣性遺伝を疑っている。しかしながら、原因遺伝子は未だ同定されていない。本研究は以下の方法にて、FSECの原因遺伝子の同定を試みる。

① ヒトの家族性側頭葉てんかんで既知となっている遺伝子変異（主としてleucine-rich glioma-inactivated (LGI) 蛋白) について、猫での相同遺伝子を同定、機能的クローニングを行い、変異解析を行う。猫のLGIファミリーについては未だ遺伝子配列が決定されていない。

② 上記①のような機能的クローニングで原因遺伝子が同定できない可能性も高く、より広範囲な解析が行えるよう、次世代シーケンサー (NGS) を用いた全ゲノム解析への着手する。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

FSECのてんかん原性領域はこれまでの我々の研究結果（発作症候学、脳波解析および構造的MRI）から扁桃体-海馬領域に存在するものと推察されている。最終的に、ヒトの難治性側頭葉てんかんと同様、この領域を外科的切除（てんかん外科）することで発作抑制が得られるのであれば、将来的な獣医療における難治性てんかんに対する外科治療の導入に貢献することができる。それ故、本研究では以下の方法によりてんかん外科導入に向けた基礎研究を行う。

① FSECのてんかん原性領域を特定するための画像解析法を確立する。

② ヒトの側頭葉てんかん手術の一法である扁桃体海馬切除術を猫において行えるよう術式を確立する。

2. 研究の計画

(1) FSECの原因遺伝子の同定

① ヒトや犬の家族性側頭葉てんかんの原因・関連遺伝子として挙げられるLGI蛋白の相同遺伝子を猫で同定する（これまで猫のLGIファミリーの遺伝子配列は未同定であるため）。その後、その遺伝子配列を基に、FSEC個体群の末梢血DNAを用いて変異解析を行う。

② NGSは高額であることから、NGS解析を行う適当な個体およびその組み合わせを、家系図および発作型から選別する。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

① 発作間欠期および発作直後の機能的MRI（拡散強調画像 DWI, 拡散テンソル画像 DTI, 灌流画像 PWI, MRスペクトロスコピー MRS）の変化を観察し、てんかん原性領域を同定する。

② 猫における扁桃体海馬切除術の術式を考案するため、入手が容易なイヌを用いて検討する。

3. 研究の成果

(1) FSECの原因遺伝子の同定

① 過去に本研究と関連のない他の研究のために安楽死処分された正常猫の凍結脳組織より、ゲノム抽出を行い、正常猫におけるLGI1, LGI2, LGI3およびLGI4の遺伝子配列を同定した。次いでFSEC家系内でてんかん発作が確認されている発症個体10頭およびFSEC家系とは血縁関係のない正常猫6頭の末梢血を用いて、これらの遺伝子解析を行った。多数の一塩基多型は認められたものの、その多くは正常猫でも認められており、またFSECのみに認められた多型はすべて非翻訳領域に存在していたことから、今回クローニングおよび検証を行ったLGI

ファミリーにおいて、病原遺伝子として明らかな変異は認められなかった。

- ② 家系図解析および表現型（発作徴候の有無および発作型）から適当な4個体（同腹の発症個体2；未発症個体2）を選別し、ゲノムサンプルを抽出し、解析を始めた。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

- ① 発作間欠期におけるDWI, DTIおよびPWIにおいてFSECは正常コントロールに対し、海馬の拡散係数（ADC）が有意に高く（すなわち高拡散性）、また血流量CBF・血液量CBVが有意に低かった（すなわち低灌流）。この所見はヒト側頭葉てんかん患者の発作間欠期におけるてんかん原性領域にも認められており、FSECがこれらのモデルとして成立しうることを示している。またFSECにおける発作間欠期と発作後の比較において、海馬のADCは発作後有意に低下し、扁桃体と大脳皮質のCBF・CBVが有意に増加した。これは発作活性により海馬内のニューロンやその他の細胞における一過性の細胞性浮腫による拡散性の低下を示唆し、また扁桃体や大脳皮質への発作活性の伝播（誘発発作は全般発作である）を表現するものと考えられた。発作間欠期での高拡散／低灌流から、発作後期での低拡散／高灌流へ変化する様子から、FSECのてんかん原性領域は、これまでの我々の研究結果に一致して、海馬-扁桃核にあると考えられた。
- ② 1頭のイヌを用いてヒトで行われるような選択的扁桃体-海馬切除術を施行したが、手術顕微鏡を利用しても、犬の脳組織は非常に小さく、術野も極めて制限されることから、扁桃体および海馬のみを選択的に摘出するのが困難であった。このため、2頭目は、これもヒトでも行われるより広範囲な前側頭葉切除術に術式を変更して行ったところ、前側頭葉、扁桃体および頭側海馬の切除が可能であり、術後一過性の旋回運動を示したものの徐々に回復した。このことからイヌ（およびそれよりも脳サイズの小さい猫）では、前側頭葉切除術が適しているものと考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) FSECの原因遺伝子の同定

- ① 我々の期待では、FSECの原因・関連遺伝子が*LGI1*あるいは*LGI2*にあることを期待していたが、残念ながら明らかな異常は認められなかった。しかしながら、これまで猫のLGIファミリーの遺伝子配列は未同定であったため、これらを同定したことは将来的に猫のゲノム解析に貢献できるものであろう。またLGIファミリーに変異が認められなかったことから、H28年度はLGIと密接な関連をもつADAM22およびADAM23（これらもヒトおよび犬のてんかんで認められている）の解析を行うこととした。
- ② 現在、上述した4頭のゲノムサンプルについて、NGSを用いてシーケンス解析中であり、結果が出次第、変異の有無について確認を行う。反省点として、本年度は①の研究を優先的に行ったため、研究の進行に多少遅れがでていることである。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

- ① 本年度はFSECで無作為な複数頭で、脳波など他の検査とは関係なくMRIに特化して研究を行ったため、各個体での正確な（左、右あるいは両側、あるいは海馬か扁桃核かなど）の解析はできていないので、H28年度以降は1頭1頭、総合的に解析し、てんかん外科手術適応個体の選別を行う。また現在、今年度のDWIやPWIと同様に試験したMRSの解析を行っている最中であり、H28年度には報告する予定である。
- ② 実験猫の入手が困難であることから（我々の施設ではFSECはコロニーで管理しているが、貴重であるため予備実験には使えない）、供試動物をイヌに変更して実験を行った。イヌにおける前側頭葉切除術が1頭でのみ成功したので、H28年度は例数を増やし、確実なものにした後、猫での実施を検討する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Pakodzy A, Patzl M, Zimmermann L, Jokinen TS, Glantschnigg U, Kelemen A, Hasegawa D. LGI proteins and epilepsy in human and animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29:997-1005, 2015.

(2) 口頭発表

Hasegawa D, Mizoguchi S, Hamamoto Y, Kuwabara T, Yu Y, Fujiwara A, Fujita M. Changes in interictal vs. postictal diffusion and perfusion MR parameters in familial spontaneous epileptic cats. 28th Annual Symposium of the ESVN-ECVN (European Society of Veterinary Neurology and European College of Veterinary Neurology), Amsterdam 2015, 18-19 September 2015.

(3) 出版物

なし

学 校 名	麻 布 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	動物疾患のマイクロバイーム研究の基盤形成 －細菌叢研究を基盤とする病態解析と治療戦略－		研究分野 農 学
キ ー ワ ー ド	①犬 ②獣医医療 ③マイクロバイーム ④細菌叢解析 ⑤ストレス誘発性細菌叢 ⑥腸内環境改善薬 ⑦無菌マウス		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
菊 水 健 史	獣 医 学 部	教 授	研究代表者 総括 疾患による動物のストレスと細菌叢の関係解明・無菌マウスを用いた実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 原 井 晋 平	附 属 動 物 病 院	講 師	犬の皮膚疾患と細菌叢の研究 検体の保管とゲノムの抽出
青 木 卓 磨	獣 医 学 部	講 師	犬の循環器疾患と細菌叢の研究
伊 藤 哲 郎	附 属 動 物 病 院	助 教	犬の消化管疾患と細菌叢の研究
圓 尾 拓 也	附 属 動 物 病 院	講 師	犬の腫瘍疾患と細菌叢の研究
印 牧 信 行	附 属 動 物 病 院	教 授	犬の眼疾患と細菌叢の研究
上 家 潤 一	獣 医 学 部	准 教 授	組織細菌叢と病理組織像の関係解明
森 田 英 利	岡 山 大 学 環 境 生 命 科 学 研 究 科	教 授	組織細菌叢の解析・個別菌の解析
服 部 正 平	早 稲 田 大 学 大 学 院 先 進 理 工 学 研 究 科	教 授	宿主－細菌叢相互作用の分子機構の解明・ 菌組成比に基づく主成分分析

動物疾患のマイクロバイーム研究の基盤形成 —細菌叢研究を基盤とする病態解析と治療戦略—

1. 研究の目的

(1) 細菌叢共生システムの探求

- ① 健常個体（宿主）の恒常性機能における細菌叢の果たす役割を調べること。
進化の過程で常在細菌叢（マイクロバイーム）とその宿主動物は共生システムを形成し、このバランスは免疫機能、肥満、心身の発達などに大きく関与する。そこで、健常個体の分娩様式、発育成長および宿主の遺伝的背景による細菌叢の変化を解明する。
- ② 細菌叢の変化が及ぼす疾患への影響と治療法を確立すること。
宿主側からの要因（食事や生活様式等）は、常在細菌叢の破綻（ディスビオシス）を生じさせ、宿主の健康状態に影響することで、疾病の発症と環境との関わりを過敏化させる可能性がある。帝王切開により出生した無菌個体は、腸内細菌叢の定着が遅く、免疫系が自然分娩より未成熟といわれる。自然分娩時の母体からの腸内細菌叢の垂直伝播と、幼少期の親からの腸内細菌叢との接触は、成熟後の疾患、生理機能を大きく変化させることが知られる（Oiszak, et al., Science, 2012）。そこで、犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定を目指す。

2. 研究の計画

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定

- ① 人との共通性が高い犬の疾病（アレルギー性皮膚炎、白内障、心筋症、炎症性腸疾患、末期癌等）を対象とする。疾患ストレスのある罹患犬と心理ストレスのある健常犬から、糞便、皮膚、涙液、唾液など細菌叢サンプルおよび血清、尿など生体試料を採取する。これらを用いて各常在細菌叢の治療前後の変化を経時的に解析する。
- ② 血清ACTH、血清および尿中コルチゾールを測定し、各ストレスの程度を把握する。
- ③ 採取した細菌叢サンプルから細菌叢のゲノムDNAを精製する。Ion PGM™システム（Life Technologies社）を用いて、既に確立されている網羅的細菌叢解析（16S解析）を実施する。UniFrac解析（群集解析）等により、疾病関連あるいは心理ストレス前後における細菌叢の構造とその変化を解明する。

(2) 分娩様式および環境要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイーム）に及ぼす影響

- ① 分娩様式が帝王切開と自然分娩である産子（出産後3か月）と母体から糞便を採取し、16S解析を行い、細菌叢に違いが生じるか明らかとする。
- ② 犬種ごとに糞便を採取し、16S解析を実施し、宿主側の要因（遺伝的背景）による細菌叢の変化を解明する。
- ③ 菌株の機能を明らかにするため、ディスバイオシスを再現するマウスモデルを作出し、その効果を分子レベルで実証する。

3. 研究の成果

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定

- ① これまでに皮膚疾患を中心に、おもに犬アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの症例からアレルギー曝露時、回避時、再負荷時に延べ260検体（うち60検体は治療による経時的変化検体）、他にも内分泌疾患10検体、歯周病20検体、健常60検体を採材した。白内障、心筋症、炎症性腸疾患、末期癌等の疾患犬と、心的ストレス犬からも糞便、皮膚と眼の拭き取りサンプルおよび血清、尿の採取を継続している（川原井、青木、伊藤、印牧、圓尾、菊水）。
- ② 哺乳類で唯一自然発症のアミロイド斑を示すチーターをはじめ、ライオンなど猫科動物の

糞便の採材を行った。家庭猫との比較で、肉食猫科動物の細菌叢進化と食環境の関連性の解析を進めている（印牧、川原井）。

- ③ 歯周病20検体から細菌叢ゲノムDNAを精製し、既に確立されている網羅的細菌叢解析（16S解析）（Yoshimoto, Morita, Hattori, et al., Nature, 2013）を実施した。UniFrac解析（群集解析）により、歯周病における口腔内細菌叢の破綻（ディスバイオシス）を明らかにした（森田、菊水、服部）。
 - ④ 食物アレルギーのスタンダードプードルからアレルゲン暴露時、回避時、再負荷時の治療から再燃に至るすべての過程を採材した検体をもとに、細菌叢ゲノムDNAの精製を終えた。網羅的細菌叢解析（16S解析）を実施してUniFrac解析（群集解析）により、食物アレルギーに関連する細菌叢の構造変化を統計学処理により明らかにしつつある。（川原井、菊水、森田、服部）。
 - ⑤ ヒト中枢疾患の新規実験動物として重要視されているマーモセットの過度ストレスが原因とされる慢性消化器疾患個体の腸内細菌叢を調べたところ、ビフィズス菌の新菌種を同定した（Genome Announc. 2015）（森田）。慢性消化器疾患のマーモセットに対して糞便細菌叢移植（FMT）を試験的に実施し、3頭中1頭において症状の改善を認めた（BMC Veterinary Research, in submission）（川原井、菊水）。
- (2) 分娩様式および環境要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイーム）に及ぼす影響
- ① 妊娠したスタンダードプードル1頭より7頭を自然分娩により、3頭を帝王切開により作出した。この胎子から幼若発達変化を観察するための160検体の皮膚スワブと糞便を採材した。この検体をもとに細菌叢ゲノムDNAを精製した。今後、網羅的細菌叢解析（16S解析）を実施してUniFrac解析（群集解析）により、ストレス応答性や免疫系との関与が知られる細菌叢の構造変化を見出しつつある（川原井、菊水、森田、服部）。
 - ② 本年度先行して無菌マウスを用いた発達期環境における細菌叢の重要性を明らかにした。まず腸内細菌叢の存在がストレス応答性の発達にどのような影響をもつかを調べた。無菌マウスは正常SPFマウスに比較し、ストレス負荷後のコルチコステロン値が300%にも増加した。成長過程における腸内細菌叢の機能を調べるため、3.5週齢の未成熟マウスに正常SPFマウスから採取した細菌叢を定着させたが、この効果は認められず、**成長後のストレス応答性の破綻が観察された**。またGFマウスは社会性の低下を示し、個体間距離が延長すること、それと平行して前頭前野のBDNF発現の低下、さらにはストレス分子のFosBの上昇を認めた。これらの変化は生後3週からのSPFとの混飼育で改善されたことから、HPA軸とはことなる制御を受けている可能性を示した（菊水、森田 in preparation）。
 - ③ 疾患ノトバイオオートマウスの作出を実施した。昨年に続き、社会的に価値の高いヒト疾患であるアルツハイマー型認知症に着目した。患者様から採取した糞便を生後5週齢のマウスに生着させ、認知行動課題を継続的に実施し、認知機能障害を見出した。興味深いことにこの認知障害マウスを自然分娩させた場合、その子マウスも同様の障害を示し、またそれと同居したSPFマウスでも障害が観察され、**ディスバイオシスの水平伝播と垂直伝播の両者が観察された**。これまでマウスにおけるアルツハイマー型認知症のモデルが限られていたことから、今回の研究結果は、モデルとしての価値が高いのみでなく、アルツハイマー型認知症の原因の一つに腸内細菌叢の破綻が関与することが示唆された（菊水、森田、in preparation）。

4. 研究の反省・考察

- (1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢（ストレス誘発性細菌叢）の同定
 - ① 動物の皮膚疾患を中心に採材しているが、白内障、心筋症、炎症性腸疾患、末期癌等の疾患犬について、検体数が不十分であり、継続して収集にあたる。
 - ② 家庭猫と野生ネコ科動物の中間に位置する動物からの採材が必要であり、ヤマネコ等を考えている。
- (2) 分娩様式および環境要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイーム）に及ぼす影響

- ① 現在得られたデータを統計数理的に処理し、特異的变化を示す細菌種を選抜する必要性がある。
- ② 発達期における細菌叢の役割を無菌マウスを用いて明らかにしてきた。上記(2)①で明らかにした細菌種を用いた無菌マウス実験を実施予定である。順調に進んでいる。
- ③ ディスバイオシスノトバイオートマウスの作出に成功した。さらにそのディスバイオシスの世代間における垂直伝播ならびに同居による水平伝播を確認した。今後課題(1)で明らかになった細菌叢においても同様の実験を随時実施予定である。順調に進んでいる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Tonoike A, Hori Y, Inoue-Murayama M, Konno A, Fujita K, Miyado M, Fukami M, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. Copy number variations in the amylase gene (AMY2B) in Japanese native dog breeds. *Anim Genet*. 2015 Oct;46(5):580-3.
- ② Nagasawa M, Mitsui S, En S, Ohtani N, Ohta M, Sakuma Y, Onaka T, Mogi K, Kikusui T. Social evolution. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science*. 2015 Apr 17;348(6232):333-6.
- ③ Takano H, Kokubu A, Sugimoto K, Sunahara H, Aoki T, Fujii Y. Left ventricular structural and functional abnormalities in dogs with hyperadrenocorticism. *J Vet Cardiol*. 17:173-81, 2015
- ④ Aoki T, Fujii Y, Sunahara H, Sugimoto K, Wakao Y. Morphological Investigations of the Anterior Leaflet and its Chordae Tendineae in Canine Mitral Valves. *J. Appl. Res. Vet. Med*. 13:159-163, 2015
- ⑤ Aoki T, Sunahara H, Sugimoto K, Ito T, Kanai E, Neo S, Fujii Y, Wakao Y. Dynamic left ventricular outflow tract obstruction secondary to hypovolemia in a German Shepard dog with splenic hemangiosarcoma. *J Vet Med Sci*. 77:1187-90. 2015.
- ⑥ Sugimoto K, Fujii Y, Sunahara H, Aoki T. Assessment of Left Ventricular Longitudinal Function in Cats with Subclinical Hypertrophic Cardiomyopathy Using Tissue Doppler Imaging and Speckle Tracking Echocardiography. *J Vet Med Sci*. 77:1101-8.
- ⑦ Aoki T, Sunahara H, Sugimoto K, Fujii Y. A modified Kay-Reed Method for Mitral Annuloplasty in Dogs. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med*. 13: 31-35. 2015
- ⑧ Aoki T, Sunahara H, Sugimoto K, Ito T, Kanai E, Fujii Y. Peripheral pulmonary artery stenosis in three cats. *J. Vet. Med. Sci*. 77:487-91, 2015.
- ⑨ Aoki T, Sunahara H, Sugimoto K, Ito T, Kanai E, Fujii Y. Infective endocarditis of the aortic valve in a Border collie dog with patent ductus arteriosus. *J. Vet. Med. Sci*. 77: 331-336, 2015
- ⑩ Aoki T, Madarame H, Sugimoto K, Sunahara H, Fujii Y, Kanai E, Ito T. Diode laser coagulation for the treatment of epistaxis in a Scottish fold cat. *Can Vet J*. 2015 Jul;56(7):745-8.
- ⑪ Nemoto Y, Maruo T, Fukuyama Y, Kawarai S, Shida T, Nakayama T. A NOVEL SUPPORT DEVICE FOR HEAD IMMOBILIZATION DURING RADIATION THERAPY THAT IS APPLICABLE TO BOTH CATS AND DOGS. *Vet Radiol Ultrasound*. 2015 Nov-Dec;56(6):680-6.
- ⑫ Kanemaki N, Fukiage C, Ichikawa Y, Shearer TR, Azuma M. Serum antibodies against β H-crystallins in the American Cocker Spaniel. *Vet Ophthalmol*. 2015 Mar;18(2):109-15.
- ⑬ Mineshige T, Kamiie J, Sugahara G, Yasuno K, Aihara N, Kawarai S, Yamagishi K, Shirota M, Shirota K. Expression of Periostin in Normal, Atopic, and Nonatopic Chronically Inflamed Canine Skin. *Vet Pathol*. 2015 Nov;52(6):1118-26.
- ⑭ Aihara N, Kamiie J, Yamada M, Shirota K. The development of mixed cryoglobulinemia in Capillaria hepatica-infected mice is associated with the capillaria antigen-induced selective proliferation of splenic B-1a cells in response to interleukin-5 stimulation. *Am J Pathol*. 2015 Jan;185(1):172-84.
- ⑮ Tsuda A, Suda W, Morita H, Takanashi K, Takagi A, Koga Y, Hattori M. Influence of Proton-Pump Inhibitors on the Luminal Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015 Jun 11;6:e89.
- ⑯ Morita H, Toh H, Oshima K, Nakano A, Shindo C, Komiya K, Arakawa K, Suda W, Honda K,

Hattori M. Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* JCM1255(T) isolated from feces of a breast-fed infant. *J Biotechnol.* 2015 Sep20;210:66-7.

- ⑰ Maruo T, Nagata K, Fukuyama Y, Nemoto Y, Kawarai S, Fujita Y, Nakayama T. Intraoperative acridine orange photodynamic therapy and cribriform electron-beam irradiation for canine intranasal tumors: A pilot study. *Can Vet J.* 2015 Dec;56(12):1232-8.
 - ⑱ Toh H, Yamazaki Y, Tashiro K, Kawarai S, Oshima K, Nakano A, Kim CN, Mimura I, Arakawa K, Iriki A, Kikusui T, Morita H. Draft Genome Sequence of *Bifidobacterium aesculapii* DSM 26737T, Isolated from Feces of Baby Common Marmoset. *Genome Announc.* 2015 Dec 10;3(6). pii: e01463-15.
 - ⑲ Takagi M, Nakano A, Toh H, Oshima K, Arakawa K, Nakajima F, Tashiro K, Kikusui T, Yanagida F, Morita H. Draft genome sequence of *Streptococcus orisasini* SH06 isolated from a healthy thoroughbred gastrointestinal tract. *Genome Announcements (genomeA)* 2016 Jan 14;4(1). pii: e01566-15.
 - ⑳ Fukuyama Y, Kawarai S, Tezuka T, Kawabata A, Maruo T. The palliative efficacy of modified Mohs paste for controlling canine and feline malignant skin wounds. *Vet Q.* 2016 Feb 1:1-7.
- (2) 口頭発表
- ① 清水里保、永島怜美、太田了介、山内寛之、川原井晋平、圓尾拓也、印牧信行、大谷伸代、太田光明、コマンドによる犬における抗ヒスタミン剤の中枢作用の評価、第158回日本獣医学会学術集会、青森県十和田市、2015年9月
 - ② 小林春奈、伊藤哲郎、根尾櫻子、久末正晴、過粘稠度症候群および腎不全を呈した多発性骨髄腫に対して血漿交感を行った犬の1例、平成27年度関東・東京合同地区獣医師大会、神奈川県横浜市、2015年9月
 - ③ 伊藤哲郎、化学療法中の皮下補液部位に膿瘍を発生した犬の1例、第14回日本獣医がん学会、大阪府大阪市、2016年1月
 - ④ 岡本拓也、瀬川和仁、伊藤哲郎、茅沼秀樹、動脈血栓症を発症した下垂体性副腎皮質機能亢進症の犬の1例、平成27年度神奈川県獣医師会学術大会、神奈川県伊勢原市、2016年3月
 - ⑤ 青木卓磨、日本獣医循環器学会シンポジウム『これって心疾患？呼吸と神経と心臓』「循環器領域からみた発作」、第103回 日本獣医循環器学会、北海道札幌市、2015年12月
 - ⑥ 青木卓磨、講座36「猫の心筋症（各論1）」、第102回 日本獣医循環器学会、埼玉県大宮市、2015年6月
 - ⑦ 青木卓磨、講座37「猫の心筋症（各論2）」、第102回 日本獣医循環器学会、埼玉県大宮市、2015年6月
- (3) 出版物
- ① 川原井晋平、淡色被毛脱毛症、p754-756、犬と猫の治療ガイド2015私はこうしている、辻本元、小山秀一、大草潔、兼島孝編集、第2版、インターズー、東京、2015
 - ② 伊藤哲郎、犬と猫のリンパ腫 Part 1 総論・診断編：犬と猫のリンパ腫の分類と発生。Companion Animal Practice. 2015年9月号：12-21.
 - ③ 青木卓磨、体高血圧症、pp130-133、犬と猫の治療ガイド2015私はこうしている、辻本元、小山秀一、大草潔、兼島孝編集、第2版、インターズー、東京、2015
 - ④ 青木卓磨、猫の房室中隔欠損症、pp150-155、犬と猫の治療ガイド2015私はこうしている、辻本元、小山秀一、大草潔、兼島孝編集、第2版、インターズー、東京、2015
 - ⑤ 青木卓磨、僧帽弁閉鎖不全症が引き起こす肺高血圧症の診断と治療、pp63-70、伴侶動物治療指針 臓器・疾患別 最新の治療法33 Vol.6、石田卓夫編集、緑書房、東京、2015
 - ⑥ 青木卓磨（翻訳）、うっ血性心不全、pp237-282、猫の心臓病 臨床とエビデンスにもとづく診断と治療、インターズー、東京、2015

学 校 名	神 戸 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	再生セルロースの構造設計と親・疎水性の制御		研 究 分 野 農 学
キ ー ワ ー ド	①再生セルロース ②分子動力学計算 ③親・疎水性 ④構造形成 ⑤レーヨン ⑥コットン ⑦高輝度放射光		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 根 千 弘	大 家 政 学 院 学 院 科	教 授	研究代表者 総括 親水性分子シートの構造評価, 親・疎水性の制御

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
湯 口 宜 明	大 阪 電 気 通 信 大 学 大 学 院 工 学 研 究 科	准 教 授	親水性分子シートの構造評価(高輝度X線による評価)
上 田 一 義	横 浜 国 立 大 学 大 学 院 工 学 研 究 院	教 授	親水性分子シートの構造評価(分子動力学による評価)

再生セルロースの構造設計と親・疎水性の制御

1. 研究の目的

繊維素材に関する中長期的な課題として、コットンギャップというものがある。コットンギャップとは近い将来発生するコットンの需要と供給の大きなギャップのことである。世界人口の増加と経済発展によりコットンへの需要は年々高まっているが、コットンの生産能力はもう限界にきている。これは人口増加に対応するため穀物畑がまず優先されることや都市化の影響で畑そのものが減少していること、大量の農薬が必要なので周辺環境的に不利なことなどによる。コットンへの需要と生産能力との膨大なギャップを埋める可能性を持つのはポリエステルではなく、再生セルロース繊維である。なぜなら再生セルロース繊維はコットンと同じ物質（セルロース）から構成されており、コットンと同じ機能が期待できるからである。ここで、再生セルロースとは、木質パルプなどの天然セルロースを一旦溶剤に溶かして、フィルムや繊維などの用途に応じた形態に沈殿させて得たものである。ところが現在の再生セルロース繊維（レーヨン、キュプラ、リヨセル）は水洗いすると、しわ、収縮、著しいフィブリル化が起き、基本的にドライクリーニングするしかない。家庭で洗濯できないものが、コットンの代わりを務められるわけがない。申請者は今まで、再生セルロースの構造的特徴とその形成メカニズムを提案し、新しい食品領域を開拓してきた。本研究の目的は、これらの知見を生かし、コットンギャップを埋めることのできる再生セルロースの構造設計とその制御をおこなうことである。もしこれが出来れば、莫大な量の市場が開け、日本が再び世界の繊維生産国になることも夢ではない。

再生セルロースの最も大きな特徴は、高分子素材中で最も水に濡れやすいことである。これは、図1に示す分子シートが構造形成初期に形成してしまうからといわれる。この分子シートの表面には水酸基が露出しており極めて親水性が高い。逆にシート内部は、 $-C-H$ の水素原子が存在し疎水性である。そもそもグルコピラノースリングにエクソトリアルな方向（リングの側面）に水酸基が結合しておりこの方向は親水性であるが（図2下）、一方アキシアル方向には水素原子が結合しているためリング平面は疎水性である（図2上）。そして、セルロース溶液から凝固が開始されると、ピラノースリング表面の疎水性表面積を減らすような熱力学的駆動力が働き、ピラノースリング平面の疎水性部分がファンデルワールス力などの疎水性相互作用でスタッキングする。これが分子シートの形成仮説である。この分子シートはあたかも水中に分散したミセルのように内部が疎水性で、表面は水酸基が露出し親水性の可能性がある。この親水性分子シートが集合した再生セルロースも極めて親水性であり、水が浸入しやすい構造になってしまう。

本研究の最終ゴールは、将来発生する莫大なコットンギャップを、再生セルロースで埋めようとするものである。これを阻むのは構造形成初期に形成すると想定される表面が親水性の分子シートである。本研究の目的はこの親水性分子シートの構造評価を行い、その形成要因を洗いだし、再生セルロースの親・疎水性を任意に制御（分子シートの形成抑制）する方法論を見出すことである。

(1) 親水性分子シートの構造評価：セルロース溶液の高輝度X線散乱測定により、本研究

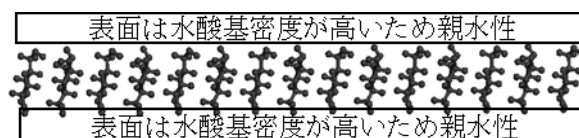


図1 親水性分子シート

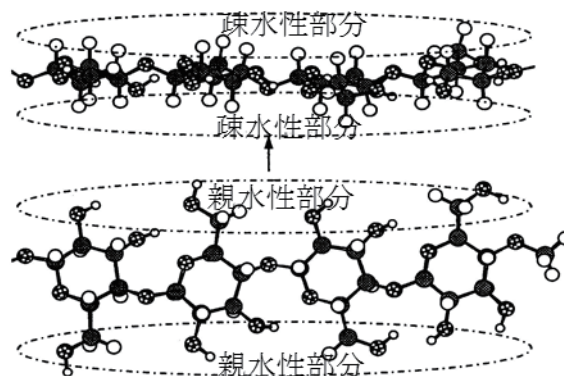


図2 セルロース分子の親水性部分（下）と疎水性部分（上）

課題で最も重要となる分子シートの形成を確認する。そして形成した分子シートが積層する過程を追跡する。

- (2) 親・疎水性の制御：MD計算による予備調査では、最も親水性の高い分子シートでは（図1）、分子シート内のセルロース分子間水素結合が全く存在しない。すなわちすべての水酸基が分子シートの表面に突き出ていることになる。このようにセルロース分子間水素結合の形成度合いがその親疎水性に大きく影響を及ぼしている可能性があるため、分子間水素結合性が高くなる媒体をMDで割り出し、再生セルロース調製実験を行い、親・疎水性制御の方法論を見出す。

2. 研究の計画

研究は「分子シートの構造評価」と「親・疎水性の制御」の二つの観点で進める。再生セルロースの構造形成は、分子分散状態から親水性の分子シートが形成されることに始まり、この分子シートが更に積層し結晶化し、最終構造が形成すると提案されている。本年度は最終ゴールを目指して、本研究課題の基盤となる構造形成仮説を実験的及び分子動力的に確認することに重点を置いた。

- (1) 親水性分子シートの構造評価：親水性分子シートが構造形成の初期に形成され、それが積層して3次元構造を構築することを、大型放射光施設 SPring-8 の高輝度 X 線散乱測定により行う。もし構造形成初期に分子シートが形成されるならば、分子シートを形成しているセルロース分子鎖間の周期が広角 X 線回折ピークとして観察されるはずである。セルロース/水酸化ナトリウム水溶液は温度を上げるとゲル化する。そこでキャピラリーに封入したセルロース/水酸化ナトリウム水溶液を加熱し、昇温過程での広角 X 線測定を行う。次に、もし分子シートが形成し時間とともに積層したら、その厚みが増すはずである。これを小角散乱領域の厚さのギニエプロットから見積もる。厚さのギニエプロットでは、平板構造の厚さを見積もることができる。広角 X 線測定と同様に、セルロース/水酸化ナトリウム水溶液を加熱させ、その昇温過程での小角領域での散乱を時分割的に観察する。これらは溶液の上、昇温過程での時分割測定なので、高輝度 X 線が必要であり、SPring-8 での測定を行う。今まで、SPring-8 では「セルロースの超臨界水中での溶解状態と当該水溶液から得られる再生セルロースの構造形成に関する研究」や「水和型セルロース結晶 (Na-cellulose IV) の高温・高圧水中での溶解状態と溶液からの構造形成」などの実績があるのでその進め方を踏襲する。この検討は多糖の溶液構造・物性の専門家である大阪電通大 湯口宜明准教授と研究分担する。（担当：山根、湯口）
- (2) 親・疎水性の制御：まず、各種媒体中での分子シートの再配列状態を、分子動力的に観察する。疎水性の相互作用により分子シートが形成したら、表面が親水性の分子シートが必然的にできてしまう。水を媒体とした時にはこれが最も顕著である。すなわち、極性の高い溶媒ほど、この傾向が高そうなため、極性の系統的に異なる溶媒を用いて、その再配列度合いを観察する。親水性を抑制するためには、水素結合により分子シートが形成することが重要である。分子シートの再配列状態は、分子シート間の分子間水素結合度合いという観点で進める。加えて、周辺媒体との相互作用（回転・並進拡散係数、近傍溶媒の自由エネルギー、近傍溶媒の動径分布など）の解析はこの検討は多糖の計算機化学の専門家である横浜国立大学大学院 上田一義教授と研究分担する。（担当：山根、上田）

3. 研究の成果

- (1) 親水性分子シートの構造評価：
- ① 広角領域の高輝度放射光による検討：セルロース/水酸化ナトリウム水溶液の凝固過程（構造形成過程）を高輝度放射光で追跡した。もし分子シートが構造形成初期に形成されるとしたら、分子シート内のセルロース分子鎖の周期が観察されるはずである。測定では、凝固直

後に $q = 14 \text{ nm}^{-1}$ に回折ピークが現れた、これは 0.45 nm の周期に相当し、初期構造として分子シートが形成したことを示唆するものである。

②小角領域の高輝度放射光による検討：次に分子シートが積層し3次元構造が形成されるはずである。上記の構造形成過程を小角領域で観察し、厚さのギニエ解析を行った。厚さのギニエプロットにより平板状構造の厚さを見積もることができる。厚さのギニエプロットの直線部分の傾きから、平板状構造の厚さが時間とともに厚くなることが観察され、最終的には分子シート3~4層分の厚みになることが示された。これは分子シートの積層過程が観察されたことを示すものである。

以上の結果から、本研究課題の最終ゴールを達成する重要な基盤が構築できた。それにとともに、下記のように査読付き論文5報を掲載することができた。

(2) 親・疎水性の制御：

分子動力学 (MD) 的検討として、分子シートをメタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、DMAc、DMFなどの極性の異なる溶媒中に配置し、その媒体中での分子シートの再配列を観察した。そこでの評価項目は、主鎖・側鎖のコンフォメーションや分子内・分子間水素結合である。極性が低くなるほど、主鎖・副鎖のコンフォメーションに分布ができ、分子内水素結合が開裂し、逆に分子間水素結合の発達が観察され、疎水性要素が増すことが示唆された。このように、基準となる評価法を確立することができた。しかし、当初予定していた、周辺媒体との相互作用 (回転・並進拡散係数、近傍溶媒の自由エネルギー、近傍溶媒の動径分布など) の解析はまだ行っていない。また、現在工業的に使用されているビスコース系、キュブラ系、N-メチルモルホリンN-オキシド系をはじめ、我々が長年研究を続けてきた水酸化ナトリウムや、最近セルロースの溶媒として発見されたイオン液体などの溶媒系も手付かずである。

4. 研究の反省・考察

(1) 親水性分子シートの構造評価：

親水性分子シートが構造形成の初期に形成され、それが積層して3次元構造を構築することを、実験的に確認し、「親水性分子シートの構造的評価」を実施するうえでの科学的基盤を作ることができた。しかし分子動力学的手法での構造評価を平行して検討すべきであり、現在実施中である。

(2) 親・疎水性の制御：

分子動力学的検討により、コンピュータ上では、溶媒の極性を変えることで親・疎水性が制御できそうな結果を得た。しかし、これを実験的に確認するには至らなかった。今後は、シミュレーションで得られた知見をもとに、実際に再生セルロースフィルムを調製し、得られたフィルムの水滴接触角、水膨潤度、乾・湿強度、乾・湿弾性率、湿潤動的粘弾性、結晶性、面配向性などの構造と物性を測定し、親・疎水性制御の可能性を見出す。

(1)、(2)以外では、湿潤状態での摩擦によるフィブリル化が、再生セルロースの利用拡大に大きな問題となっていることがわかってきた。これは当初の研究計画では触れていなかったことである。本研究の最終ゴールは、将来発生する莫大なコットンギャップを、再生セルロースで埋めることにあるので、この湿摩擦によるフィブリル化についても、新たな課題として取り組まなくてはならない。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① C. Yamane, R. Hirase, H. Miyamoto, S. Kuwamoto and Y. Yuguchi, "Mechanism of structure formation and dissolution of regenerated cellulose from cellulose/aqueous sodium hydroxide solution and formation of molecular sheets deduced from the mechanism", *Cellulose*, Vol. 22, P2971-2982 (2015)

- ② C. Yamane, "Structure formation of regenerated cellulose from its solution and resultant features of high wettability", *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, Vol. 30(1), P78-91(2015)
- ③ C. Yamane, K. Abe, M. Satho, and H. Miyamoto, "Dissolution of cellulose nanofibers in aqueous sodium hydroxide solution", *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, Vol. 30(1), P92-98(2015)
- ④ H. Miyamoto, C. Yamane and K. Ueda, "Molecular dynamics simulation of dehydration in cellulose /water crystals", *Cellulose*, Vol. 22, P30-37(2015)
- ⑤ H. Miyamoto, K. Ueda and C. Yamane, "Dissolution mechanism of cellulose in a solution of aqueous sodium hydroxide revealed by molecular dynamics simulations", *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, Vol. 30(1), P67-77(2015)
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし

学 校 名	中 央 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	激甚災害時の文化財保全とその後の整理活用に至る 方法論的研究 ー長野県北部地震で被災した栄村をモデルとしてー		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①文化財レスキュー活動 ②大規模災害 ③古文書 ④民具 ⑤考古資料 ⑥文化財整理 ⑦文化財教育 ⑧文化財活用		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
白 水 智	法 学 部	教 授	全体総括と史学分野の調査、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 野 律 子	神 奈 川 大 学 大 学 院 歴 史 民 俗 資 料 学 研 究 科	非 常 勤 講 師	民 俗 ・ 民 具 学 分 野 の 調 査 ・ 総 括 と 論 文 作 成
荒 垣 恒 明	成 城 学 園 教 育 研 究 所	職 員	文 献 史 学 分 野 の 調 査 と 論 文 作 成
赤 澤 春 彦	撰 南 大 学 学 部 外 国 語 学 部	専 任 講 師	文 献 史 学 分 野 の 調 査 と 論 文 作 成
高 橋 健 樹	武 蔵 村 山 市 立 館 歴 史 民 俗 資 料 館	嘱 託 学 芸 員	考 古 学 分 野 の 調 査 と 論 文 作 成

激甚災害時の文化財保全とその後の整理活用に至る方法論的研究 —長野県北部地震で被災した栄村をモデルとして—

1. 研究の目的

- (1) 激甚災害時の文化財救出・保全の効果的手法を明らかにする。
- (2) 救出文化財の整理の考え方と効果的な整理の手法について明らかにする。
- (3) 救出文化財の利活用のあり方について、具体的な実践を行いながら明らかにする。
- (4) 救出文化財を分析することで得られる文化財救出の社会的意義について、具体的に明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) 救出文化財のうち古文書については整理と概要目録作成および写真撮影を継続する。
- (2) 救出民具および村所有民具についての写真データ整理と聞き取り調査を継続する。
- (3) 専門の学芸員による考古資料調査をさらに進める。
- (4) 村が設置を決めた「歴史と文化の拠点施設」における文化財の具体的な利活用方法に関して、民具の展示計画を先行して策定しつつ検討する。
- (5) 地域の学校における文化財教育を引き続き実施し、文化財をどのように教材化し、子供たちに地域文化への理解を深めさせるのが適当か、その方法論について探っていく。
- (6) 善光寺地震等に関わる新出史料をさらに探り、同地震による栄村の被害状況についてより緻密な考察を行う。

3. 研究の成果

- (1) 古文書の整理と目録作成ならびに写真撮影
 - ① 古文書は目録を採りながら同時に記番を記した短冊を挟む方式で整理を進め、その目録用紙を元に入力作業を実施している。今年度も年10回の保全活動の中で作成される手書き目録を入力する作業を継続した。
 - ② 隣接する飯山市教育委員会に保管をお願いしていた震災後の救出古文書を、新たに誕生した「歴史と文化の拠点施設」である「栄村歴史文化館」に少しずつ運び込み、整理を継続した。
 - ③ 「栄村歴史文化館」では、地元住民の方々と共同作業で大型の収納棚作りを実践し、整理の済んだ分から古文書保存専用容器に入れ替え、棚に整理し始めた。
 - ④ 古文書写真の撮影は、善光寺地震関係など研究上注目すべき史料の選択撮影を継続した。
- (2) 保全した民具の収納と展示へ向けての作業
 - ① 民具活用へ向けて 新しい歴史文化施設に土蔵内部の復元展示を完成させることを2015年度の目標に掲げ、計画的に作業を行った。漆器木箱の中身と反故紙・木箱に分けてから燻蒸と清掃を行った。大量にある器で実際に使えそうな民具はサンプルを残して使用している。使うことで器は本来の姿を取り戻した。また土蔵復元の際には、被災前に白水古文書班が調査されていた土蔵内部の現状記録のスケッチや写真を参考に、棚を手作りし、可能な限り被災前の状況に戻して民具展示をした。結果臨場感が出せたと思う。
 - ② 地域住民との連携 基本的には外部からの参加者と村民との共同作業で行ったが、今年度は今まで以上に地元村民による自主的な活動内容が目立った。特に地元栄村産の杉材を使って村民の手で製作された民具収納棚は、大型民具に合わせて設計され丈夫な作りで棚板の高さも調整可能である。また古写真やアルバムから昭和40年代ごろをテーマに編集した画像も作られ、3月の活動報告会でお披露目されて村民に好評であった。
 - ③ 民具の保存・管理について 新しい歴史文化館では人工的に資料保存環境は作らず、自然

環境の中で「目通し、風通し」をモットーに保管すると決めたので、部屋の換気と漆器などの保管状態のチェックをこまめに実施している。温度湿度計も1階と2階に4か所設置して計測中である。施設全体が木造建造物であり民具収納棚も木製なので、雪の積もる冬場も意外と湿度が低く、また非常に風通しの良い場所に施設が建っているため、温度湿度は一年を通して良好であった。

(3) 考古資料の調査と整理

- ① 4・5月に栄村立栄小学校保管の考古資料の整理を進め、縄文時代中期資料を中心に総計831点を確認した。
- ② 8月に栄村泉平遺跡の発掘作業を含む「詳細分布調査」を実施。4日間の調査であったが、遺跡の土層状況の把握、遺構設置面の確認、遺構内覆土の把握、泉平遺跡範囲の一部確認などの成果を上げた。

(4) 「歴史と文化の拠点施設」の利活用について

従来より懸案となっていた「歴史と文化の拠点施設」が、2015年度より「栄村歴史文化館」（愛称こらっせ）の名称で部分開館し、村公民館兼用施設として利用されるようになった。当館には公民館職員が常駐することになり、年10回行われる文化財の整理や活用の中心拠点として活用され始めた。文献・民具・考古の3分野の利用はもとより、地元住民主体の公民館活動の中でも、古民具を活用した農作業の実践や藁細工のワークショップ、子供向け自然教室の拠点として活用されている。まさに当施設改修前に描いたとおりの活用が推進されており、村外からの保全活動参加者にとっても住民にとっても心の拠り所となる施設になっている。

2016年8月の本格オープンを控えて、2015年8月には、文化財の仮保管場所となっている旧保育園から4分の1ほどの民具を歴史文化館の方の一斉移動させる「民具中規模移動プロジェクト」を実施し、5日間で延べ130人ほどのボランティアの力を借りて、予定どおり文化財移動を完了させた。現在は文献・民具・考古3分野とも目前に迫った展示準備に追われている。

(5) 地域の子供たちへの文化財教室の実施について

今年度は民具と考古の両分野で地元小学生との交流が実現した。小学生は地域の次代を担っていく人材であり、村の文化に対する関心を少しでももってもらうことを願って交流を実施した。

- ① 民具と子供たち 3月22日、栄小学校3年生の授業支援「蚕繭の糸引き作業と真綿作り」を子供たち自らが蚕を育ててとれた繭を使って実施した。指導は経験のある地元住民にお願いし、私たちはサポート役でお手伝いをした。道具の糸枠と座繰りは文化財レスキューで整理された資料を活用し、藁細工の廃物利用で手作りしたヌイゴ箒を使用した。自分たちで育てた繭から丈夫な白い絹糸が巻き取れた喜びや真綿の作り方を小学生が体験できた点、民具が活用できた点、村の大先輩から生活文化を知るきっかけができた。

② 考古資料と子供たち

- ・土器づくり教室：8月20日午後の約2時間をかけて、栄村立栄小学校6年生7人と担任の先生8人で、「縄文土器づくり」を行った。使用粘土は事前にセメント用の砂を約1割程度混ぜ込んで粘性を高めたテラコッタ粘土、目指すは「火焰式土器」であったが、成果のほどは？2か月近くじっくり乾燥させて、10月13日（水）「土器野焼き」を学校の校庭で行う予定となった。
- ・縄文土器焼き教室：10月13日（水）校庭の一角を使って、準備に取り掛かったのが午前9時過ぎ。土器を温めながら1時間以上燃やし、子供達の授業が終わるのを待って熾き火の上に子供たちで土器を並べ、一気に火を付けた。約1時間、土器が透き通るような真赤になるまで焼き、13時ごろから給食を終えた子供たちと一緒に土器の取り出し。残念ながら、地面の湿気対策、火を付けるのを急いだこと、薪の乾燥具合も良くなかったことなどが相まって、土器が割れてしまったが、「真赤になった土器が素晴らしかった」などの感想があり、いい体験になったと思う。

(6) 現地報告会の開催

3月13日には、初めて「栄村歴史文化館」を会場として、1年間の文化財保全活動報告会を開催した。文献・民具・考古の3分野からの報告以外に、地元住民の方による考古発掘体験の報告も織り交ぜ、また3分野からの報告後には「第Ⅱ部 車座になって栄村歴史文化館「こらっせ」の活かし方を考えるつどい」と題して、文化館の活用方法を話し合う会をもった。住民からも県外の参加者からも、今後につながるさまざまな意見が出された。

(7) 文化財の保存環境について

2015年7月に文化財の仮保管場所となっている旧保育園について業者による全館燻蒸を実施した。翌月に同場所からの文化財一部移動を控えていたためである。

(8) 報告書について

2015年1月～12月に至る1年間の活動について、文化財保全活動報告書を発刊した。

4. 研究の反省・考察

(1) 古文書の発見・整理・考察について

① 目録作成 震災後救出した古文書はH家のものを中心に数万点に上るとみられる。その目録整理作業を進めているが、膨大な量のため、かなり時間がかかっている。また2015年はじめには、栄村に関する新たに段ボール箱2つ分の新出史料が歴史文化館に届けられた。これについても現状記録を行い、これから目録作成を開始する予定である。目録は、年に10回の現地出張によって着実に進捗してはいるが、未だ完了には至っておらず、長期的な計画で継続していくことが必要である。

② 新出史料 2014年度2月に新出した史料は青倉地区のもので、江戸幕府成立当初の時期に遡る貴重な古文書であった。これについては、昨年度末の報告会で発表した。同家から他に見つかった史料の中からは、善光寺地震に関する新たな史料も見出されている。これらの整理・分析については、今後の課題とせざるを得ない。

(2) 民具の整理ならびに保全に関して

① 変化する展示施設へ向けて 被災後にレスキューした民具と村所有民具の全てを新しい歴史文化館に収蔵や展示することは空間的に不可能であるため、毎年少しずつ展示替えを行いつつ、民具整理や調査を行っていく予定である。同じ民具を長期に渡って展示することは、資料にとってダメージも大きいから、展示替え作業は大変であるが、資料整理や記録保存は進むと思われ、何より村民にとって施設へ出向く機会が増える。

② 民具の保存について 腐食した羽釜や鍋は、実際に炊き出しで使用しているうちに次第に状態が良好になっていくことが分かった。どのような民具も丁寧に扱い、使用した後は手入れをして片付けることが民具保存と活用へ繋がる。今回の活動では、欠損破損した容器の収納木箱の修理を積極的に行った。1階展示では床の直置きはせず、木っ端をかませて空気の流通と虫害予防対策を行ったが、人の出入りが激しい1階部分の民具展示空間では、特に展示環境と民具の状態チェックは欠かせない。民具にはできるだけ「お手を触れないください」の表示をやめたい栄村公民館の意向にどれだけ近づけて展示ができるか、保存と活用をめぐって工夫が求められている。

(3) 文化財の保存環境について

現在多数の文化財を仮保管している旧東部保育園の保存環境について、同場所は普段無人で締め切りのため、環境が悪い。2015年7月には燻蒸を実施したが、今後も定期的に燻蒸を行うとともに、文化財の状況についてチェックを重ねていくことが必要である。

(4) 「歴史と文化の拠点施設」の充実について

「栄村歴史文化館」は、2016年8月の本格オープンに向けて展示準備をしているが、基本的に同館での展示は文化財の整理・調査・研究の進展を随時展示にも反映させていく方針であるため、今後も更に継続的な展開を考えていかななくてはならない。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 石野律子「被災地での活動を通して見た民具の力ー長野県栄村と陸前高田市の民具の保存・整理活用と現状ー」(2015年12月12日 第40回日本民具学会大会 公開シンポジウム「あれからもう少しで5年ー災害と民具再考ー」 パネラー及びレジュメ)
- ② 白水 智「震災から5年、ここから始まる栄村の文化復興」(2016年3月13日 地域史料保全有志の会主催 文化財保全活動報告会「3.12長野県北部地震から5年 第5回栄村文化財保全活動報告会〜ついに歩み始めた栄村の文化復興〜」)
- ③ 石野律子「今よみがえる！生かされた12年前の調査データ」(2016年3月13日 同上報告会)
- ④ 高橋健樹「泉平発掘報告と武蔵村山市での栄村展」(2016年3月13日 同上報告会)
- ⑤ 白水 智「救出文化財の活用段階に入った栄村の保全活動」(2016年3月19日 歴史資料ネットワーク主催「第2回全国史料ネット研究交流集会」)

(3) 出版物

- ① 白水 智『古文書はいかに歴史を描くのかーフィールドワークがつなぐ過去と未来ー』(NHK出版・2015年12月)
- ② 白水 智「『激甚災害時の文化財保全とその後の整理活用に至る方法論的研究』の成果についてー長野県北部地震で被災した栄村での実践からー」(地域史料保全有志の会編『地震被災地 長野県栄村における 文化財保全活動のあゆみⅢ』・自費出版・2016年3月)
- ③ 石野律子「栄村で被災した民具レスキューの問題点と解決法」(同上書所収)
- ④ 高橋健樹「2015年活動報告と栄村における考古学資料レスキューの問題点」(同上書所収)
- ⑤ 荒垣恒明「廣瀬博明家土蔵文化財調査の成果をめぐって」(同上書所収)
- ⑥ 赤澤春彦「栄村における文化財レスキュー活動と文献史料」(同上書所収)
- ⑦ 地域史料保全有志の会編『地震被災地 長野県栄村における 文化財保全活動のあゆみⅢ』(本研究助成利用による自費出版・2016年3月)
- ⑧ 高橋健樹「平成27年度企画展「栄村に行こう！」(武蔵村山市立歴史民俗資料館発行「資料館だより57号」)

学 校 名	学 習 院 大 学	研究所名等	国 際 研 究 教 育 機 構
研 究 課 題	東アジアの都市における歴史遺産の保護と破壊 ー古写真と旅行記が語る近代ー		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①アジア ②近代 ③歴史遺産 ④古写真 ⑤絵はがき ⑥旅行記 ⑦バーチャル・ミュージアム		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
村 松 弘 一	国 際 研 究 教 育 機 構	教 授	研究代表者 統括・アジア古写真全体

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
伊 藤 真 実 子	国 際 研 究 教 育 機 構	准 教 授	万国博覧会と古写真
湯 川 真 樹 江	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	中国所蔵アジア古写真
三 瀧 み ず ほ	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	欧州所蔵アジア古写真
犬 飼 崇 人	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	欧州所蔵アジア古写真
原 信 太 郎 アレシヤンドレ	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	絵葉書資料
武 藤 那 賀 子	国 際 研 究 教 育 機 構	PD共同研究員	データベース作成
大 出 尚 子	国 際 研 究 教 育 機 構	客員研究員	満洲関係古写真
長 佐 古 美 奈 子	大 学 史 料 館	学 芸 員	学習院大学所蔵古写真
長 谷 川 怜	東 京 都 公 文 書 館	学 芸 員	絵葉書資料

東アジアの都市における歴史遺産の保護と破壊

—古写真と旅行記が語る近代—

1. 研究の目的

20世紀初め、それは日本人が写真と旅行記・手紙・新聞等によって日本に居ながらにして世界を知ることができるようになった時代である。携帯用小型カメラの開発、近代郵便制度の確立、絵はがきの製作・販売など、諸条件が揃ったのがその時期であった。百年の時間を経て、古写真や絵はがきは劣化が激しく、また、所蔵機関で資料的価値が認められずに廃棄されることも多い。幸いにも学習院大学には教材として使われたガラス乾板や絵はがき資料が千点以上残されている。これらの写真には百年前のアジア・日本の風景・風俗文化、歴史遺産（建築物）のすがたが残されている。本研究ではそのなかでも東アジアの都市にある歴史遺産はこの百年で保護されてきたのか、破壊されたのか、海外に流出した文物は現在どのような状態におかれているのか、という問題について考えたい。そのためには、国内外の機関における古写真・絵はがき・旅行記・新聞記事を収集・整理し、それらを時間軸に沿って並べ、変化を見る必要がある。すでに本学が所蔵している画像資料は**文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「近代アジアへの眼差しと教育—学習院コレクションの総合的活用」**によっておおまかな調査は進んでいる。本研究ではその調査を基礎として、中国の北京・上海・青海・大連、台湾の台北・台中、韓国のソウル・釜山、ベトナムのハノイ、北方のサハリン、南洋のパラオなどの都市・地域をフィールドとして設定したい。これらの都市・地域には20世紀の初めに学習院関係者が訪れて、旅行記を残している。例えば、北京には白樺派の文豪・里見弴や志賀直哉、朝鮮には民芸運動の柳宗悦、サハリンには戯曲作家の長与善郎、パラオには彫刻家・民俗学者の土方久功、ベトナムには歴史学者の山本達郎・澄子、台北では台湾からの留学生・顔惠民の記録・記憶がある。さらに国内やヨーロッパ、中国に残された写真資料を渉猟し、現在の状況も踏まえ、時間軸に沿って歴史遺産の保護・破壊の過程をたどりたい。方法としては以下の3つのステップによってすすめる。

- 1、古写真資料の調査・収集・整理・公開—学習院所蔵のほかギメ東洋美術館（仏）やロンドン大学東洋アフリカ研究学科（SOAS、英）などで未整理の写真を調査。
- 2、旅行記・日記・新聞記事の収集・整理・関係づけ—文献資料を収集し、各都市の歴史遺産の状況を調査。
- 3、現在の歴史遺産の保護・破壊状況を調査。

上記の調査・研究によって得られた成果は三つの方法で公開する。

- ① アジア古写真のWEBデータベース「バーチャル・ミュージアム」への掲載（2015年）
学習院および国内外の古写真を整理し、また、現代の写真も加え、イパレットと称される技術を利用した「バーチャル・ミュージアム」というサイトのコンテンツとして公開する。
- ② 写真展「近代アジアの肖像」の実施（2016年）
北京・台北・ソウルなどの都市の近代の移り変わりを海外の写真も含めて時間軸に沿って陳列する。歴史遺産の保護・破壊、そして未来のあり方を都内で開催する写真展によって多くの市民に広める。
- ③ 書籍『旅するアジア—写真と旅行記が語る近代（仮称）』の刊行（2017年）
写真と旅行記をリンクさせた書籍を編集・刊行する。特に、写真の対象物に関する当時の状況や感想などの旅行記の記事を中心にまとめ、画像資料と文書資料の結びつけをおこなう。

2. 研究の計画

平成27年度は、古写真でみる「旅するアジア」バーチャル・ミュージアム（試用版）の構築を計画目標とする。そのために、以下の作業を実施する。

- (1) バーチャル・ミュージアム（試用版の作成）－学習院大学所蔵資料および国内外研究機関所蔵の古写真、同じアングルから撮影した現在の歴史遺産・旅行記資料を時間軸・地域軸に沿ってWEB上で古地図とリンクして見ることができる古写真でみる「旅するアジア」バーチャル・ミュージアムの試用版を平成28年3月末までに作成する。
- (2) 資料調査－上記の試用版を作成するための材料として平成27年度は中国大陸の北京・大連・上海および韓国・ソウル、台湾・台北の資料を調査・整理する。特に学習院所蔵資料については北京・大連・上海・ソウル・台北の古写真・絵はがき・旅行記資料を再整理する（高松宮下賜写真を含む）。
- (3) 海外機関との連携－海外の写真資料・絵葉書資料について調査している研究者を招聘し、研究交流をすすめるとともに、国際シンポジウム・講演会を実施する。
- (4) 現地調査－古写真資料に残る北京・大連・上海・ソウル・台北の歴史遺産の現状についての現地調査をおこない同じアングルからの写真撮影を実施。

3. 研究の成果

- (1) 「旅するアジア」バーチャル・ミュージアム（試用版の完成）－「旅するアジア」バーチャル・ミュージアムの試用版を学内サーバーにUPし、学内での確認作業ができる段階までに至った。

- (2) 資料調査および現地調査の実施

学習院大学所蔵資料をベースに写真に写された都市の建築物などに焦点をあて、同じアングルからの撮影をおこなった。平成27年度は台北・韓国・上海・北京にてフィールド調査を実施し、100枚分の建築物の写真を撮影した。台湾では、学習院大学史料館蔵高松宮下賜絵葉書28枚を取り上げ、

- ① 日本が近代に建設した建築物・跡地（明治橋・台湾神社（現円山大飯店）・鉄道ホテル・台北測候所・台北中学校・台湾日日新報社）
- ② 日本が近代に建設した建築物・現存（台北駅、台北庁、台湾総督府研究所、国立台北博物館、台北医院、総督官邸、台湾総督府、高等女学校、専売局、台北市場）
- ③ 現在も残る名所（風景）（大稲埕地区、円山公園、府前街道、府後街道、公園通り、台北新公園、三線道路、台北苗圃、水道水源池）

以上の3つのカテゴリーから調査した。また、台北絵葉書発行所2枚（現存せず）の愛国婦人会台湾本部、東方出版社を撮影した。

北京では、『北京写真帖』（1918年）所収の6地点（前門牌楼・前門箭楼・天安門・天安門華表・端門・午門）、『震旦旧蹟図彙』（1933）所収の2地点（正陽門・天安門）について調査・撮影をおこなった。ソウルでは写真帖『朝鮮』（1925年）の19枚、上海では写真帖『支那大観 第壹集 中部支那』（1921年）の25枚・絵葉書20枚に写された風景を調査・撮影した。

- (3) 海外機関との連携、シンポジウム・講演会の実施

海外の写真資料・絵葉書資料について調査している研究者を招聘して以下のシンポジウム・講演会を実施した。

- ① 国際シンポジウム「近代日本と観光旅行－絵葉書と博覧会－」（5月18日、於：学習院大学）－ケネス・ルオフ（米国・ポートランド州立大学）およびポール・バークレー（米国・ラファイエット大学）を招聘して開催。バークレー氏は「East Asia Image Collection」を主催する研究者で以後、資料情報の交換をおこなっている。
- ② 報告会「古写真からアジアをみる」（2016年1月8日、於：学習院大学）－年次作業報告会「古写真からアジアをみる」を開催し、年間の本研究の研究成果を発信するとともに、さらに、ソウル市立大学の朴喜用氏を招聘し、特別講演「慶熙宮の歴史的变化について」をおこなった。歴史遺産が日本植民地期、そして現在に至るまでどのようなかたちで利用されてきているのかについての研究の報告があった。

以上のように研究の第一年目には学内の既存資料の調査→海外における現状の調査（写真・絵葉書100枚分）→海外の最新の研究とのコラボレーションの三つの研究活動をすすめた。2016年度には、これまでの研究成果公表の場として東京芸術劇場にて写真展を実施する予定である。

4. 研究の反省・考察

2015年度は、写真資料の整理と現地調査にほとんどの時間を使ったため、個別の都市の歴史的・地理的な差違と遺跡の保存・破壊に関する比較研究をすすめることができなかった。次年度以降は、韓国のソウル・プサン、中国の北京・瀋陽・上海・青島、台湾の台北の近代から現代に至るまでの歴史的変化との関係から遺跡の現在について考察したい。また、本学所蔵資料との比較のため、足立喜六旧蔵の西安に関する写真（鶴田氏所蔵）やポールバークレー氏所蔵の台湾絵葉書などとの比較検討もすすめたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

村松弘一「清末西安の教育と日本人教習－足立喜六を事例に」『学習院大学国際研究教育機構研究年報』2号、学習院大学国際研究教育機構、2016年2月、44－64頁

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

長佐古美奈子『ボンボニエールと近代皇室文化：掌上の雅』えにし書房、2015年11月、176頁

学 校 名	国 士 館 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヨルダンの環境と地域構造の変化に関する地理学的研究 ーヨルダン所蔵の歴史的空中写真を手掛かりにー		研究分野	文 学
キ ー ワ ー ド	①ヨルダン ②地域構造 ③歴史的空中写真 ④景観復元			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 谷 川 均	文 学 部	教 授	統括、画像処理とGISによる土地利用と景観の復元、現地調査

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
磯 谷 達 宏	文 学 部	教 授	植生景観の復元、現地調査
加 藤 幸 治	文 学 部	教 授	経済統計の解析、現地調査
宮 地 忠 幸	文 学 部	准 教 授	農業統計の解析、現地調査
東 郷 正 美	法 社 政 会 大 学 学 部	名 誉 教 授	変動地形の解析、現地調査
佐 々 木 明 彦	信 州 大 学 学 部 山 岳 科 学 研 究 所	研 究 員	気候データの解析、地形プロセスに着目した土地改変の解析、現地調査
牛 木 久 雄	元国際協力機構(JICA)	-	環境、水文、灌漑施設等の現地調査
石 山 達 也	東 京 大 学 学 部 地 震 研 究 所	助 教	変動地形の解析、現地調査
小 原 丈 明	法 政 大 学 学 部	専 任 講 師	都市空間の解析、現地調査

ヨルダンの環境と地域構造の変化に関する地理学的研究 —ヨルダン所蔵の歴史的空中写真を手掛かりに—

1. 研究の目的

(1) 研究の目的は、次の4点である。

- ①：歴史的空中写真を活用してヨルダン渓谷および周辺地域の地形、植生景観を復元するとともに、大規模に改変され農業地帯に変貌したヨルダン渓谷の景観変化を抽出する。
- ②：地形改変前の空中写真判読により、死海トランスフォーム断層に接するヨルダン全域の変動地形を抽出し、ヨルダン渓谷で初の高質な変動地形（活断層等）分布図と資料を作成する。
- ③：先進国の支援で灌漑設備を整備させ一大農業生産地に変貌したヨルダン低地の農業の発展過程、開発過程、急速な開発で顕在化した環境汚染の実態を明らかにする。
- ④：アフリカと西アジア、ヨーロッパを結ぶヨルダン渓谷の立地上の位置づけを物流や経済地理学的視点から明らかにする。

(2) 上記①～④を具体的に説明すると次のようになる。

ヨルダンは、アフリカ大陸から続く大渓谷（地溝帯）とそれに沿う高地、砂漠地帯からなり、国土は地中海性気候から乾燥気候にまたがる。地形・地質的特徴により多様な自然景観が見られるが、気候や水文条件は自然環境に強く規定されている。そのことが農業生産力の地域間格差を生み、その結果として資本蓄積の格差をつくりだし、ヨルダン国土の地域構造を規定しているといっても過言ではない。

ヨルダンは、地理的にはアジアとヨーロッパの接合地帯に位置し、現在の中東にあっては安定した政治体制を維持する。地下資源には恵まれないが、過去においては欧米諸国からの経済支援、現在では周辺国への支援拠点とし資金が流入し経済的にも安定しており治安もよい。

環境に強く規定された地域構造を持つと考えられるヨルダンは、この数十年間に国際的な支援下で大規模な開発と土地改変が進行し景観ばかりか住民の生活や社会構造も急速な変貌を遂げつつある。また近年は、隣国シリアからの100万人にもおよぶ難民を受け入れ、人口構成に少なからぬ影響を与えている。

これらの変化を地理学的な手法で明らかにすることが本研究の目的である。細分化された分野で個別の事例を扱うやり方もあろうが、広範な領域を網羅することができる地理学の学問的特徴をいかした総合研究を、ヨルダンの地でおこなうことに意味があると考えている。

なお、本研究を行うきっかけは、1950年代に英国軍により撮影されたものの、我々のグループにより見出されるまで長く放置されていた歴史的空中写真の存在にある。我々は、これらをデジタル化し景観データベースとして整備しつつあり、現地では「これら空中写真はNational Treasure」と評価されている。

2. 研究の計画

研究は、初年度をキックオフの年と位置づけ、研究資料を整備する。二年目以降は研究を発展させ、三年目で目的の達成を目指す。

(1) 研究の目的であげた①～④に関し、初年度である平成27年度は下記のような計画をたてた。

初年度の調査では、基礎的なデータ整備・データ収集を主な目的とする。ヨルダンにおける自然・経済の地域構造の全体像を把握しより具体的に把握すべき問題点の抽出が可能となり次年度以降の研究の基盤を構築する。また、ヨルダンとのデータ共有を行い研究の深化を図る端

緒とする。

- ① 目的 1 に関して：死蔵されていた歴史的空中写真のデジタル化を完了し、修復作業を行う。また、並行して修復済みのものから順次位置情報を付与しデータベースでの検索が可能な形に整備する（アルバイトを雇用または外注）。これにより、日本・ヨルダン両国でデータ共有が可能となり景観データベースの機能を持たせることができる。その後、写真の解析を目視判読、画像解析により実施しその結果を GIS（地理情報システム）により図化・管理する。
- ② 目的 2 に関して：空中写真の実体視により、変動地形・活断層を抽出し図化する。その際、主要部分については近年撮影された空中写真を購入して比較する。それに基づく現地調査を実施し、露頭調査等により年代測定資料を採取し過去の活動時期を特定する。空中写真の購入と年代測定に経費を使用する。また、現地調査時の車両の借り上げ等で経費を使用する。
- ③ 目的 3 に関して：主に既存の資料に基づく調査、現地での行政関係や農民への聴き取り調査を実施する。インタビューは行政機関へは英語で、住民へはアラビア語が担当なメンバーを中心に聴き取り調査を実施する。経費は資料の複写、購入や現地調査に使用する。
- ④ 目的 4 に関して：現地での統計資料の収集と解析、図書資料の収集などが初年度の主要な作業となる。また、ヨルダンの主要な交通結節点での通行量・物量などの現地調査を行う。さらに、土地利用（とりわけ農業的土地利用）に現地調査を実施する。経費はこれらの購入や調査に充てられる。

3. 研究の成果

(1) 計画通りの成果が得られたものは下記のとおりである。

- ① 上記の目的①に関しては、1/2.5万、1/6万 空中写真6000枚以上の修復とデジタル化を終え、標定作業も終了した。そしてこれらに位置情報を付与しデータベースで検索、パソコン上で表示するシステムを完成させた。このシステムは、ヨルダンと日本で共有し共に運用することになる。
- ② 上記目的②に関しては、ヨルダン渓谷およびヨルダン高地西部での写真判読を終了した。また、夏期の調査により活断層の位置の特定を終えた。すでに掘削済みの活断層トレンチにおいては、採取済みの年代資料を基に活断層の活動時期を特定した。ただ、ヨルダン高地の活断層掘削調査は、H28年3月期の調査において大学の渡航許可が下りなかったために実施できなかった。
- ③ 上記目的④の土地利用変化については、1950年代、1980年代、2000年代の三時期について、地形図や空中写真の判読に基づく土地利用図を作成し、2000年代についてはヨルダン渓谷内のイスラエルとヨルダンの農業的土地利用の明瞭な差異を見いだした。また、農業統計資料、経済統計資料の解析が進行している。
- ④ ヨルダン人、共同研究者の招聘と講演会の開催
H28年3月22日、国士舘大学において「ヨルダン・ヴァレーとその周辺の地質と地震活動」と題する講演会を開催した。ヨルダンの研究者2名、日本人研究者2名による講演会である。またこの前後に、ヨルダン人研究者を同行した野外巡検を伊豆半島、湘南地域で実施した。温暖な変動帯にある日本の活断層と、乾燥地にあるヨルダンの活断層の比較をこころみる巡検であった。なお、この催しは当初の計画には無かったが、2回目のヨルダン調査が中止となり資金に余剰が生じることが懸念されたため、最終年度に実行予定であったシンポジウムを、前倒しで実施したものである。

(2) 計画通りの成果が得られなかったものは下記のとおりである。

- ① 上記目的③に関して、現地でのインタビューが実施できなかった。
 - ② 上記目的④に関して、現地での通行量・物量などの現地調査ができなかった。
- これらの理由はH28年3月期、大学から渡航許可禁止指示により実施できなかったためである。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究計画の遂行と成果に関して

- ① 当初、初年度はキックオフの年と位置付け、研究資料の整備をめざした。しかし、予想した以上の成果をあげることができたと思われる。研究計画は、大学の渡航禁止により70%程度しか消化できなかったが、成果に関しては次年度の研究発展につながる成果が得られた。

(2) 研究計画遂行にあたっての反省

二回の現地調査を予定していたが、二回目の渡航は大学の判断により中止となった。ヨルダンは、中東にあっても安全で治安が良いことが知られている。多くの中東支援プロジェクトの本部がヨルダンに置かれている理由もここにある。しかし、シリア難民の流入が大きく報道され、またヨルダン軍のパイロットと日本人人質がシリアを拠点とするISにより殺害されたことで、ヨルダンで事件が起こっているわけではないのにも関わらず、「中東＝危険」というステレオタイプな見方がなされる傾向にあった。国士舘大学では、独自のルートで安全情報を入手し「国士舘大学安全総合会議」の判断により、渡航に関して許可が得られなかった。

これはひとえに、我々研究チームの力不足で、安全面に関して大学上層部に適切な説明を行い納得してもらおう努力が足りなかったものと反省している。今後は、従来以上の適切な情報分析を行い、現地関係者、在東京ヨルダン大使館、在アンマン日本大使館などからの情報もこれまで以上に入手したうえで、大学上層部への説明を試みたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① ヨルダン砂漠で見いだされるQa' aと疑似氷河地形、東郷正美・長谷川均・石山達也、法政大学多摩研究報告、i～ii、2015年、30号。
- ② ヨルダン渓谷と周辺の自然環境、長谷川均、地図中心、6～9、2015年、518号。
- ③ ヨルダン渓谷を撮影した1950年代初期の空中写真、長谷川均、地図中心、24～27、2015年、518号。
- ④ “デカポリス” “ガダラ” は、本当に749年パレスティナ大地震で壊滅したか、東郷正美、長谷川均、後藤智哉、石山達也、今泉俊文、松本健、文化遺産学研究、39～50、2016年、9号。
- ⑤ ヨルダンの火山と地震、東郷正美、地図中心、10～13、2015年、518号。
- ⑥ ヨルダン周辺のプレート・テクトニクスと大地形、石山達也、地図中心、19、2015年、518号。
- ⑦ ヨルダン渓谷の水資源開発：その曙から現代へ、牛木久雄、地図中心、20～23、2015年、518号。

(2) 口頭発表（公開講演会の開催）

講演会：ヨルダン・ヴァレーとその周辺の地質と地震活動

日時：2016年3月22日（火） 10：00～12：30

会場：国士舘大学世田谷キャンパス メイプルセンチュリーホール5階 大会議室

第一部 10：00～11：20

1. Mahmoud Al-Qaryouti Ministry of Energy and Mineral Resources, Jordan Seismological Observatory.
Seismic Risk Assessments in Jordan: An Overview
2. Kaled Ali Momani Ministry of Energy and Mineral Resources, Geological Mapping Division.
Geology of Jordan: An Overview

第二部 11:30~12:30

1. 武田哲也 (国立研究開発法人 防災科学技術研究所)

The 2011 Tohoku-Oki earthquake (Mw9.0) and Construction plan for the Giant Seafloor Observation Network

2. 吾妻 崇 (国立研究開発法人 産業技術総合研究所)

Paleoseismology and active fault study in Japan

(3) 出版物

なし

学 校 名	江 戸 川 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	大学生のドロップアウト防止のための介入方法の確立 ー心理学・睡眠学・教育学からの総合的検討ー		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①ドロップアウト ②大学生 ③生活習慣改善 ④予防的介入			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
福 田 一 彦	社 会 学 部	教 授	研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 崎 孝 治	メディアコミュニケーション学部	教 授	教育学的視点からの分析
Timothy M. Kelly	社 会 学 部	教 授	教育学的視点からの分析
中 村 真	社 会 学 部	教 授	心理学的視点からの分析
浅 岡 章 一	社 会 学 部	准 教 授	睡眠学的視点からの分析

大学生のドロップアウト防止のための介入方法の確立 ー心理学・睡眠学・教育学からの総合的検討ー

1. 研究の目的

文部科学省の調査によれば、高等教育段階における中退者は6.9万人にもおよび、大学生における退学者数の増加は多くの大学で問題になっている。本学も含め各大学では、様々な取り組みが行われているが、まだまだ効果的な方法が確立しているとは言い難い状況である。本研究課題の目的は「大学生の退学（ドロップアウト）防止のための効果的な介入プログラムの開発」である。本学においても既に学習支援の体制を整えて学習面から指導したり、精神健康上の問題を有する学生向けに学生相談室を設置してカウンセラーによるカウンセリングが受けられる体制を整えたりと、様々な取り組みがなされてきたが、本研究課題は、このようなこれまでの教育学・心理学視点からの援助だけでなく、睡眠学の視点も加えた介入・援助プログラムを科学的データに基づいて開発することを目的として行われている。

日本の大学生の睡眠習慣は世界で最も乱れており、不健康感の訴えも強い (Steptoe *et al.*, 2006)。大学生における睡眠で特徴的な「夜更かし・朝寝坊」は、彼らの学業成績の低下や (e.g., Eliasson *et al.*, 2010)、精神的健康の低下 (e.g., Asaoka *et al.*, 2004) と関連している。我々も、睡眠学の観点から、これまでに大学生を対象とした睡眠調査を継続的に実施し、就床時刻の後退と眠気の増加および成績の低下との関連を報告し (福田・浅岡, 2012)、睡眠習慣の悪化が成績不振によるドロップアウトのリスクファクターであるとともに、大学卒業後の職場環境への適応にまで影響しうることを確認している (Asaoka *et al.*, 2014)。

本課題ではドロップアウトリスクの高い学生を早い段階で見つけ出し、予防的に介入する方法の確立を目指している。我々は、これまでにドロップアウトリスクの高い学生を見つげ出すための基準を教育的変数であるGPA (Grade Point Average) および出席状況を基に提案した (Kelly, 2013, 2014)。平成27年度にはそれらの教育的変数のみでなく、心理学的変数および睡眠学的変数も用いてドロップアウトリスクの高い学生を予測しうる変数を見つげ出し、その精度 (感度・特異度) を測定することを目的とした。さらに、ドロップアウトリスクの高い学生を対象とした睡眠覚醒パターンに着目した生活習慣の改善を目的とした介入方法の確立を目指した。

2. 研究の計画

(1) ドロップアウトリスクの高い学生の早期発見手法 (スクリーニング手法) の確立

平成25年度より開始した睡眠習慣調査のデータ、出席率、成績データ、精神健康度等 (表1) の内容に関して縦断的データ収集を継続しておこなうとともに、平成27年度入学生を対象としても同様の調査を実施した。

平成25年度入学生の入学直後の各種データを用いて、彼らの第2学年終了時点における留年・退学および学業問題の有無を予

測することを目的として、入学直後の各変数を独立変数、第2学年終了時の学業問題の有無を従属変数とするROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を実施した。さらに、平成25～27年度入学生のデータを用いて解析を行い、学年の進行に伴って睡眠習慣と学業成績の関係がどのように変化するかを確認するとともに、入学目的や友人関係の状況、大学への愛着、授

表1 本課題における主な調査内容

- 教育的変数 (本学データベースより利用可能)
 - ・学業成績 (Grade Point Average: GPA) ・取得単位数
 - ・講義への出席率 ・入学時学力テスト
- 心理学的変数
 - ・精神健康度 ・大学への愛着 ・大学不適応感
 - ・入学目的 ・友人関係の尺度
- 睡眠学的変数
 - ・睡眠習慣 ・睡眠の質 ・日中の眠気

業の理解度といった心理学的変数が学業成績に与える影響について質問紙調査のデータを基に検討した。

(2) 予備的介入の長期的効果確認とブラッシュアップ

生活習慣の改善を目的として実施した予備的な介入において対象となった学生のその後の在籍状況、出席率、GPAを確認することで、介入の効果の持続性について検討した。

3. 研究の成果

(1) ドロップアウトリスクの高い学生の早期発見手法（スクリーニング手法）の確立

各睡眠変数および入学直後に実施されたテストの成績、および精神健康度の指標を独立変数として、第2学年終了時の学業問題の有無を従属変数とするROC解析を実施した。その際、GPAが1.5未満および第3学年への進学ができない状態（退学含む）を学業問題ありとした。その結果、入学直後の睡眠変数、中でも特に睡眠効率（実際に眠っている時間 ÷ 床上の時間 × 100）が有する予測力は高く、睡眠効率80%をカットオフポイントとして設定すると、第2学年終了時点で学業問題を呈した学生の6割を入学直後の時点で前もってマークすることができ（感度60%）、第2学年終了時点で問題を呈さない学生を間違えてマークしてしまう確率が1割以下（特異度91%）となる結果を得た（浅岡他, 2015 於: 第79回日本心理学会大会）。この睡眠変数の予測率は、入学直後の精神健康度や入学直後に行う学力テストの得点がある予測率よりも優れたものであった。

学年の進行に伴う睡眠習慣と学業成績の関係の変化を確認したところ、1学年次よりも睡眠習慣の乱れが顕著となる3学年次において睡眠変数の学業成績に与える影響が大きいことを確認した。特に第3学年になると睡眠の乱れや、夜更かし朝寝坊はGPAと高い負の相関を示し、睡眠リズムの正規化の重要性が考えられた（福田, 2015 於: 日本健康心理学会第28回大会; 図1）。

さらに、入学目的や友人関係の状況、大学への愛着、授業の理解度といった心理学的変数が学業成績に与える影響を検討した。その結果、友人関係の良好さや入学目的の明確さは大学への愛着を高めることで大学不適応を予防し、授業の理解度とともに学業成績の低下防止に寄与する事を確認した（中村・松田, 2015）。

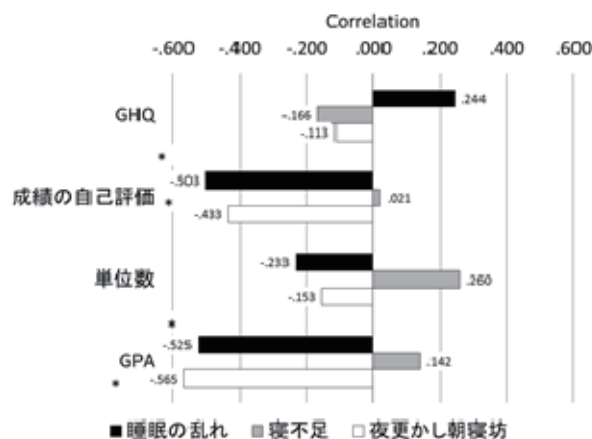


図1 大学3年次の適応状況と睡眠変数

(2) 予備的介入の長期的効果確認とブラッシュアップ

これまでに予備的な介入の対象となった学生のその後の在籍状況、出席率、GPAを確認した。その結果、4年次在籍時まで大きな睡眠問題の再発は認められず、長期的な効果が認められたケースも存在するなど一定の効果を確認できた（福田, 2015 於: 日本健康心理学会第28回大会）。一方で睡眠問題だけでなく臨床心理学的な問題も有するため、睡眠指導自体が継続不可能となるケースが何例か確認された。これまでの試験的な介入の結果も基に、睡眠問題を有する学生に典型的な睡眠パターンを幾つかのタイプに分類し、そのタイプごとに効果的と考えられる介入（アドバイス）方法をまとめた。

4. 研究の反省・考察

(1) ドロップアウトリスクの高い学生の早期発見手法（スクリーニング手法）の確立

入学直後に得られる各種データを用いることによって、その後のドロップアウトリスクの高い学生を予測することがある程度可能であると考えられた。特に睡眠変数を用いた際のド

ロップアウト予測力は高く、ドロップアウトリスクの高い学生を早い時点で検出するために、睡眠変数が有用な指標になると考えられた。しかしながら、単独の変数による予測では、最も予測力の高い変数でもその感度は60%程度に留まった。これまでの研究結果は、入学目的や友人関係の状況、大学への愛着等の変数も、ドロップアウトを予測しうることを示唆しており、今後データを蓄積したうえで、それらの変数も用いた多変量解析による予測を行うことでドロップアウト予測の感度および特異度をさらに上昇させる必要がある。

また、ここで報告した内容は主に第1学年から第2学年終了時点までの学業問題発生の有無を目的変数に用いた結果である。我々の解析では乱れた睡眠習慣の悪影響が学年の進行に伴って大きくなると推測されたことから考えると、睡眠習慣の乱れを有した学生が3年次以降にドロップアウトするケースも少なくないと予想される。引き続き調査を継続し4年間の追跡調査が完了した時点で、4年間におけるドロップアウトの有無を目的変数に用いた解析の必要性が考えられた。

(2) 予備的介入の長期的効果確認とブラッシュアップ

睡眠リズムの正規化に焦点を当てた予備的介入が一定程度の効果を持つことが確認された。しかしながら、睡眠問題だけでなく臨床心理学的な問題も有するために、睡眠指導自体が継続不可能となるケースが何例か確認されている。そのため、臨床心理学的問題への対処と並行して睡眠指導を行える体制づくりが必要であると思われる。また、睡眠の専門家だけでなく一定程度の介入ができるようにする事を目指して、介入方法の半マニュアル化も進めていく必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 福田一彦 (2015) 反復孤発性睡眠麻痺と入眠時幻覚 睡眠医療, 9, 527-532.
- ② 中村 真・松田英子・薊 理津子 (2016) 大学への帰属意識が大学不適應に及ぼす影響 (3) -帰属意識に基づいて分類した大学生のタイプと大学不適應との関連- 江戸川大学紀要, 26, 23-31.

(2) 口頭発表等

- ① 浅岡章一・福田一彦・中村 真・TM Kelly・宮崎孝治 (2015) 大学生における睡眠習慣と学業成績 -大学1年次前期の睡眠習慣はその後の学業問題の発生を予測しうるか? - 日本心理学会第79回大会 (名古屋)
- ② 福田一彦、長谷川智子、川端一光、今田純雄 幼児の食と睡眠に関する研究 (4) 休日のブランチの習慣は様々な症状を悪化させる 日本心理学会第79回大会 (名古屋)
- ③ 福田一彦 (2015) 睡眠習慣は学業や健康にどのようなインパクトを持つのか 日本健康心理学会第28回大会 (東京)
- ④ 福田一彦・長谷川智子・川端一光・今田純雄 (2015) 幼児期における食と睡眠に関する生活習慣と子どもの諸症状との関連 -特にSocial Jetlagの影響について- 日本睡眠学会第40回定期学術集会 (宇都宮)
- ⑤ 福田一彦 (2015) 昼寝とSocial Jetlag. シンポジウム「Social Jetlagの現状と課題 -社会的時間と生体リズムの不調和-」 日本睡眠学会第40回定期学術集会 (宇都宮)
- ⑥ 中村 真・松田英子・薊 理津子 (2015) 大学への帰属意識が大学不適應に及ぼす影響(4) -帰属意識に基づいて分類した大学生のタイプと大学不適應との関連- 日本パーソナリティ心理学会第24回大会 (北海道)
- ⑦ 浅岡章一 (2015) 若者のキャリア形成と生活リズム-睡眠リズムと学校・職場適応の問題- 日本キャリア教育学会第33回研究セミナー (福島)

(3) 出版物

- ① 岡島義・福田一彦監訳 (2015) 睡眠障害に対する認知行動療法-行動睡眠医学的アプローチへの招待- 風間書房

② 福田一彦 (2016) 保育園のお昼寝、本当に必要？ 宮崎総一郎、北浜邦夫、堀忠雄(編) 睡眠のトリビア2 中外医学社

学 校 名	日 本 福 祉 大 学	研究所名等	アジア福祉社会開発 研 究 セ ン タ ー
研 究 課 題	福祉社会開発の実践モデルの構築 ー制度外コミュニティ福祉の生成と支援ワークー		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①福祉社会開発 ②制度外福祉 ③場 ④相互作用 ⑤プロセス ⑥アクター ⑦共同フィールドワーク ⑧メタ現場		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
穂 坂 光 彦	アジア福祉社会開発 研 究 セ ン タ ー	センター長・ 教 授	研究総括および同和地区研究リーダー

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 野 隆 之	社 会 福 祉 学 部	教 授 ・ 副 学 長	被災地研究リーダー・ 地域福祉
雨 森 孝 悦	福 祉 経 営 学 部	教 授	中山間地研究リーダー・ NPO論・ソーシャルビジネス
吉 村 輝 彦	国 際 福 祉 開 発 学 部	教 授	中山間地研究メンバー・ まちづくり論
小 國 和 子	国 際 福 祉 開 発 学 部	准 教 授	中山間地研究メンバー・ 開発人類学・フィールドワーク方法論
朴 兪 美	福 祉 社 会 開 発 研 究 所	准 教 授 ・ 主 任 研 究 員	統括補佐および中山間地研究メンバー・ 地域福祉
小 木 曾 早 苗	福 祉 社 会 開 発 研 究 所	助 教 員 ・ 研 究 員	被災地研究メンバー・ 地域福祉
藤 井 博 志	神 戸 学 院 大 学 総 合 リ ハ ビ リ テ ー シ ョ ン 学 部	教 授	被災地研究メンバー・ 地域福祉
全 泓 奎	大 阪 市 立 大 学 大 都 市 研 究 プ ラ ザ	教 授	同和地区研究メンバー・ 居住福祉
寺 川 政 司	近 畿 大 学 近 建 築 学 部	准 教 授	同和地区研究メンバー・ まちづくり論
熊 本 理 抄	近 畿 大 学 人 権 問 題 研 究 所	准 教 授	同和地区研究メンバー・ ジェンダー論
D.G.J.Premakumara	地 球 環 境 戦 略 研 究 所	研 究 員	同和地区研究メンバー・ 都市計画
久 野 研 二	国 際 協 力 機 構	国 際 協 力 専 門 員	障害平等研修担当・ 障害と開発

福祉社会開発の実践モデルの構築

－制度外コミュニティ福祉の生成と支援ワーク－

1. 研究の目的

- (1) 制度外で地域住民がつくり出すコミュニティ福祉メカニズムの生成プロセスをモデル化し、これを支える政策環境と支援の方法を明らかにする。
- (2) こうした「福祉社会開発」を共同的に討議する「メタ現場」を各地に設け、そこでの研究プロセスそのものを実践者育成の枠組みとして確立する。

2. 研究の計画

平成27年度は、三年間にわたるアクションリサーチの第2年次であった。初年度の目標「アクションリサーチの組織化および実験的推進」に続き、平成27年度は「アクションリサーチの展開」を掲げ、上記の研究目的(1)(2)に対応して、以下を計画した。

(1) 対象拠点でのフィールドワークの蓄積と、知見の理論化

① フィールドワークの蓄積

当該年度においては下表の3地区（高知県の中山間地、大阪府の同和地区、東北の被災地）を重点対象拠点とし、そこで進行中の活動（アクション）を調査テーマとして設定する。さらにこれらに対応する参照フィールドや活動を想定し、補足的な比較考察の対象とする。

フィールド拠点	地区の特性	制度外アクション	理論化の枠組	関連参照フィールド
高知県土佐町	中山間地	中間的営農による社会参加の維持	集落福祉	韓国鎮安郡
大阪府北芝地区	都市貧困地	同和地域での共済型生活保障	コミュニティマネジメント	大阪浅香地区 韓国ノンコル信用協同組合 スリランカ女性組合
岩手県大槌町 福島県浪江町	被災地	災害復興を支える共生型交流空間	地域支え合い	宮城県女川町 福島県二本松市

② 知見の理論化

コアグループの研究者に加えてフィールド拠点・関連参照フィールドの実践者も参加する定例研究会および現地研究会を通じて、実践現場で各主体の行動やそれによる社会変化を「福祉社会開発の実践モデル」として考察する。その仮説的な理論化枠組は上表の通り。

(2) 対象拠点を「メタ現場」とする体制構築と、実践人材育成の事業化

① メタ現場の形成

上記の研究会活動に際して、フィールド各地で「メタ現場」（研究者と実践者がそれぞれ自己相対化しつつ相互の観点を投入し、現場の社会変化をある抽象度をもって写像する協働空間）が構成されるように意識化し、視点の交換、助言、研修の組織、政策提言など、状況に応じた発信を行なう。とくにフィールド実践者の自己発見的(heuristic)な学びの場とする。

② 人材育成事業への展開

上記拠点でのフィールドワークを基盤にして、福祉社会開発を担う実践者育成のための教材を作成し、かつ実験的に使用し、大学としての人材育成事業化に貢献する。さらにこうした教育研修の場から研究上のフィードバックを得るよう試みる。

3. 研究の成果

(1) 対象拠点でのフィールドワークの蓄積と、知見の理論化

前掲地域でチームによるフィールドワークを実施した。主な知見として、第1に、中山間地における「集落福祉」の概念的操作化がある。「集落福祉とは、最低限の集落機能を自ら維持するための諸活動と、それを支援するサービスの体系であり、集落内外の社会関係を再構築し、それに基づいて経済生産性を維持し、新たな生産関係の展開が翻って集落維持の社会ネットワークを再生させるような関係形成の循環を目的とするもの」と定式化し、それを支えるソーシャルビジネス・中間的市場・中間的営農をモデル化し、土佐町・土佐町社協と共催の研究集会「中山間地セミナー：福祉と生産を結び集落の暮らしを支える」を開催して好評を得た（2016年2月）。

第2に、同和地区の隣保館事業や被災地の支えあいの場にも通底するアプローチとして、拠点型福祉とネットワーク型福祉の結合を理論化し、論文発表とともに、北芝地区（2015年9月、11月）、高浜市（2015年11月）、ソウル（2015年12月）などで現地実践者との共同研究集会を重ねた。これらにおいては、とくに韓国で政策的な焦点となっている「福祉生態系」の理論的骨格に日本のフィールド経験からアプローチし、日本の地域福祉との比較考察を行った。

これらを通じて「福祉社会開発の実践モデル」の仮説的な枠組みとして「まず地域の諸個人の自由なストーリーを支える「場」が支援的な環境の下に設定され、その場が、主体間の相互作用の活性化や関係の変容といった媒介変数を通じて、新しい共同性、外部との関係性など、問題解決への資源を用意するとともに、問題の構造自体が転換し、包摂的なプログラムが生まれていく」というプロセスが検証されつつある。

一方、福祉開発ワーカーが地域支援を通じて自己変化を遂げていくプロセスの事例研究として、福島県二本松市での避難者仮設住宅地での作業療法士チームの活動分析、福島県浪江町と熊本県のワーカーたちによる相互交流型事例検討会（2016年3月）に着手した。

(2) 対象拠点を「メタ現場」とする体制構築と、実践人材育成の事業化

過年度に構築したフィールド拠点体制、すなわち高知県自治研究センター、土佐町社協、NPO暮らしづくりネットワーク北芝、高浜市役所、NPO全国コミュニティライフサポートセンター（仙台）、NPOつどい（大槌町）、NPOJin（浪江町）、ソウル福祉財団等との共同研究体制は維持され、拠点相互の交流が図られるとともに、フィールドワークの実施地ともなった。一連のフィールドワークは現場実践者の課題提起を受け止めつつ実施し、報告・執筆・発表もできるだけ当該実践者たちとの共同作業とするように努めた。また他の実践現場からの活動家や住民代表、さらに社会人院生を招いて新たな視点を導入した。このように研究活動が生起する場に受け入れ側・訪問側の実践者を巻き込むことで、双方に実践上のインパクトを与えた。その効果はとくに、土佐町の集落福祉、ソウル市の地域福祉に対して顕著に感じられた。

フィールドワークに基づき、実践人材育成のためのビデオ・ドキュメンテーション「高知県の集落福祉」（3巻 計190分）、「北芝のコミュニティマネジメント」（4巻 計260分）を完成し、あわせ開発したオンデマンド教材「福祉社会開発論」他とともに、大学院によるリカレント事業「地域再生のための福祉開発マネジャー養成プログラム」にて使用した。また同プログラム履修生によるフィールドワークを北芝と高知県にて実施し、さらなる研究フィードバックを得た。

平成26年度において、支援的介入に対応する地域社会変容プロセスを言わば「実験室」的にモデル化するメタ的作業として「障害平等研修」（DET）を実施した。平成27年度は、この経験を基に、DETのスタンダードな研修モジュールを確定したうえでオンデマンド教材を作成した。これを以て、協力機関であるNPO法人DETフォーラムを通じて、DETの全国的波及に貢献した。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の知見

当該年度では、NPOやコミュニティビジネス、さらに「障害と開発」分野に視野を広げるために、これらを専門とする研究分担者を2名追加した。その効果はあったと考えている。

「中山間地」「同和地区」「被災地」を、制度的福祉がギャップを生じている3つの地域類型と捉え、それぞれにおける制度外福祉メカニズムの構築を横断的に理解する枠組みを設け、本学における福祉社会開発研究を一步進めることができた。とくに「集落福祉」の一定の定式化、コミュニティマネジメントの方法的核心となる「中間的社会空間」への注目などは、海外の地域福祉にもインパクトを与える射程をもつものと思われる。

当該年度に予定された成果で遅れているのは、福祉社会開発の実践事例集「コミュニティ変化のダイナミズムと支援的対応」（仮題）の出版である。これは企画内容を修正し、単なる実践例の紹介と編集ではなく、理論的考察と新たなアプローチの提示を加えた形で「開発福祉のプロセス：制度的アプローチを越えて」（仮題）として出版準備中である。

(2) 人材育成事業への波及

本研究事業三年間の目標として「福祉社会開発の教育・研修のモデル策定」を掲げていたが、これはすでに具体化させることができた。既述した大学院リカレント事業「地域再生のための福祉開発マネジャー養成プログラム」の開設（2015年6月）と運営である。同プログラムは、制度外の福祉開発を担う人材育成をめざし、本研究が対象とするフィールドと研究成果としての教材を活用するものであり、かくして学園戦略の促進に貢献することができた。今後は単一プログラムにとどまらず、各地の拠点をネットワークし、地域に根ざした人材育成体制を構築すべきであろう。この点で、高浜を一拠点とする日本福祉大学まちづくり研究センター、フィールドでの議論から生まれた日本福祉大学土佐町集落福祉研究所などが、相次いで設立されてきたのは、大きな可能性を示している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 元持幸子・穂坂光彦「岩手県大槌町における地域支え合い拠点の再生：東日本大震災後の社会的居場所の分析」『日本福祉大学社会福祉論集』134号、2016年3月、59-77.
- ② 平野隆之「地域福祉と地域ケア」『日本の地域福祉』第29巻、2016年3月、3-12.
- ③ 朴愈美・平野隆之「計画的推進に求められる地域福祉アセスメントの基本的枠組み：2つの社会福祉協議会の事例分析から」『日本の地域福祉』第29巻、2016年3月、31-41.
- ④ 雨森孝悦「庭先集荷の持続可能性に関する一考察：高知県における事例から」『日本福祉大学経済論集』第52号、2016年3月、87-96
- ⑤ 藤井博志「漏れのない総合相談支援に向けた社協エリアチーム制構築のための委員会運営」『地域福祉実践研究』第6号、日本地域福祉学会、2015年、13-23
- ⑥ 全泓奎「アジア大都市における居住貧困の実態と政策方向」（韓国語）『WORLD & CITIES 世界と都市』Vol.9（2015春号）ソウル研究院、6-17
- ⑦ 全泓奎「同和地区における包摂的な地域再生に向けたアクションリサーチ」（韓国語）*LHI Journal*, 7(2)、韓国土地住宅研究院、2016年、121-129
- ⑧ 久野研二「障害はどこにある 1：障害者のお友達はいませんか？」、同「障害はどこにある 2：国連障害者権利条約を知っていますか」、同「障害はどこにある 3：あなたの会社のビジネスモデルは大丈夫」『アイユ』2016年1月号、同2月号、同3月号
- ⑨ 寺川政司「生活困窮者と居場所」『部落解放研究』203号、2015年10月、141-157
- ⑩ 熊本理抄「被差別部落における相談・支援の現状と課題：相談員（支援者）ヒアリング調査から」『部落解放研究』203号、2015年10月、43-66

(2) 口頭発表

- ① Mitsuhiko Hosaka, “Housing rights and settlement development in Asia: Viable trends under new contexts”, *Proceedings of East Asia Conference on Housing Welfare*, Seoul, May 2015, pp.31-42
- ② 朴愈美・藤井博志・平野隆之・井岡仁志・佐藤寿一・山本信也「地域福祉アセスメントという概念化の可能性ー2 社会福祉協議会の地域福祉の計画的推進の相対化から」第29回日本地域福祉学会大会（東北大会）東北福祉大学、2015年6月
- ③ 吉村輝彦「まちづくりの展開における対話や交流の場づくりの意義」日本計画行政学会第38回全国大会研究報告要旨集、2015年、37-40
- ④ 吉村輝彦「まちづくりの展開における対話や交流の場づくりの意義と可能性～高浜市と長久手市における取り組みを事例に～」日本建築学会大会学術講演梗概集、2015年、155-156
- ⑤ 三矢勝司・吉村輝彦・秀島栄三・兼田敏之「地区リノベーションを促進する中間支援組織の支援技術：岡崎市松本町の事例」日本建築学会技術報告集、21(48)、2015年、805-809
- ⑥ 小國和子「「考え<続け>る農民」アプローチで生産と福祉をつなぐーカンボジアと高知県中山間地域の事例から」国際開発学会第26回全国大会、2015年11月、新潟大学
- ⑦ 小木曾早苗・平野隆之・半田幸子「被災地における地域福祉計画策定プロセスとその意義：宮城県女川町の考察から」日本地域福祉学会第29回年次大会、2015年6月、東北福祉大学
- ⑧ 掛川直之・全泓奎「矯正施設等出所者に対する居住支援の現状と課題」第15回日本居住福祉学会全国大会、東北工業大学、2015年5月
- ⑨ HSIAO Hong-wei・全泓奎「社会的不利地域における住民自立支援のまちづくりー大阪の三つの事例に着目して」第15回日本居住福祉学会全国大会、東北工業大学、2015年5月
- ⑩ 全泓奎「包摂型地域再生：同和地区と在日コリアンコミュニティの再生に向けた実践 (Inclusive Regeneration for Disadvantaged Areas: Practices for the Revitalization of Dowa and Zainichi Korean Communities)」*Proceedings of East Asia Conference on Housing Welfare*, Seoul, May 2015、361-366

(3) 出版物

- ① 穂坂光彦「都市貧困層の居住形成と政策・支援」松行美帆子他編『グローバル時代のアジア都市論』丸善出版、2016年1月、132-149.
- ② 穂坂光彦「グローバル経済下の地域再生：<中間的社会空間>試論」大阪市立大学都市研究プラザ編『市大都市研究の最前線』大阪市立大学都市研究プラザ、2016年3月、31-39.
- ③ 平野隆之・小木曾早苗「東日本大震災におけるサポートセンターによる支援とその条件整備」日本地域福祉学会東日本大震災復興支援・研究委員会編『東日本大震災と地域福祉：時代への継承を探る』中央法規、2015年7月、50-69
- ④ 小國和子「共感と合理：南スラウェシ農村の灌漑管理における水番マンドロ・ジェネの事例より」関根久雄編『実践と感情：開発人類学の新展開』春風社、2015年9月、31-58
- ⑤ 小國和子「水管理を巡る人々の価値の行方」窪田順平編『水を分かちー地域の未来可能性の共創』勉誠出版、2016年3月、35-58
- ⑥ 藤井博志監修・宝塚市社会福祉協議会編『市民がつくる地域福祉のすすめ方』NPO全国コミュニティライフサポートセンター、2015年6月
- ⑦ 高橋誠一・大坂純・志水田鶴子・藤井博志・平野隆之編『生活支援コーディネーター養成テキスト』NPO全国コミュニティライフサポートセンター、2016年2月
- ⑧ 全泓奎『包摂型社会:社会的排除アプローチとその実践』法律文化社、2015年4月
- ⑨ 全泓奎編『包摂都市を構想する：東アジアにおける実践』法律文化社、2016年3月
- ⑩ 全泓奎「包摂型アジア都市の実践」大阪市立大学都市研究プラザ編『市大都市研究の最前線』大阪市立大学都市研究プラザ、2016年3月、91-98

学 校 名	桜 花 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	暁台・樗良・蕪村における連句手法の総合的研究		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①暁台 ②樗良 ③蕪村 ④連句 ⑤俳人			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 月 静 恵	保 育 学 部	教 授	研究総括および近世俳人の分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
寺 島 徹	金 城 学 院 大 学 人 間 科 学 部	教 授	暁台・樗良・蕪村に関する資料収集と分析
柴 田 竹 代	桜 花 学 園 大 学	客 員 教 授	データ分析

暁台・樗良・蕪村における連句手法の総合的研究

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

- ① 暁台・樗良・蕪村ら、中興期俳人の連句手法については、これまで、あまり研究が進んでいなかった。その理由として、この時期が、発句の独詠化が盛んになる時期にあたっていることと、連句資料自体が蕪村以外の俳人に関して、きわめて未整備であることもあげられる。
- ② このような問題を抱える中興期の連句の分析に有用なものとして、「蕉風伝書」の存在に着目している。中興期は蕉風復興運動が行われた時代であり、「芭蕉に帰れ」のかけ声のもと、「蕉風伝書」が流布し、権威を持つようになっていたのである。すでに、これまでの共同研究で、暁台が連歌伝書『白砂人集』の出版に関与していることを明らかにしており、このような伝書を研究の中心に据え、連句資料を収集し、分析することを目的とする。

(2) 研究の目的

- ① 具体的な研究目的として、樗良、暁台について未紹介の連句資料の収集、調査分析を行う。近年、名古屋市博物館に尾張・伊勢における暁台・樗良関係の資料が数多く寄贈された。また、暁台自筆の連句資料として、中興期俳人、白雄の一座する歌仙資料も発見することができた。俳諧資料が豊富である天理図書館、柿衛文庫、早稲田大学中央図書館、国文学研究資料館にくわえ、このような、各地、文庫における連句の新資料の調査を行いながら、基礎資料を翻刻し目録を作成する。
- ② 暁台・樗良の連句において、その傾向をデータ化する。連句評および俳論（七名八体など）の付けと作品の付けの距離をはかることを目的とする。連句評点の調査から導き出した特性を樗良、暁台らの連句実作の分析に応用する。

2. 研究の計画

(1) 調査と資料収集

- ① 書誌調査を進めるため、デジタル端末やデジタルカメラ・NAS等を利用して調査を行うこととした。デジタルカメラで撮影を進め、マイクロ化されているものは、現地調査で必要箇所を確認したあと、適宜、紙焼き複写を依頼し資料を集めることを計画した。名古屋市博物館では、加藤暁台資料、三浦樗良資料を中心に俳書、書簡、句幅などの調査を行うこととした。東京方面には、おもに、国文学研究資料館と早稲田大学中央図書館、国会図書館等へ調査のため、定期的に出張調査を行うことを予定した。インターネットで公開されていないマイクロフィルムと紙焼き資料を中心に俳壇事項について分析することとした。
- ② 関西方面では、おもに天理大学図書館に赴き、資料収集と書誌調査を行う予定をたてた。同館綿屋文庫蔵の伊勢資料である「逸漁俳諧資料集」を中心としたマイクロ・フィッシュについて調査を行い、その過程でリストアップした資料数十点の紙焼き複写を行うこととした。これらの資料をもとに、逸漁関係の連句の資料を翻刻し分析しようとした。

(2) 資料・作品の分析

- ① 文学・歴史学の観点から分析を行い、適宜、資料収集・データ化を進めることとした。翻刻した資料のOCR作業、データ化も行うこととした。また季語、付合、俳壇資料のデータ化も進めることとした。
- ② 翻刻した作品について、式目の観点からおもに指合の有無を分析し、エクセル・アクセスへの入力とデータ整備を進めるようにした。

3. 研究の成果

(1) 資料の整理

- ① 暁台の連句資料の収集と本文の確定作業を行った。満田達夫氏「蕪村と暁台—その連句作法をめぐって」（『連歌俳諧研究』66号）において、暁台の全連句一覧が示されている。歌仙形式主体で表六句をこえる長さを持つ連句を収集し、おもに蕪村連句と比較において初裏の月の出所と表の述懐について調査すべく作成されたものであった。しかし、暁台の連句リ

ストは、30年の時を経て、かなりの連句を補うことができるようになった。この基準にそって考えたとき、そのリストにのる99巻に、逸漁文庫（綿屋文庫）の連句、羅城卷子資料、維駒暁台歌仙資料などの連句資料を加えることができる。この方針にもとづき、逸漁資料の書誌データの収集を行い、とくに、明和八年から天明元年におよぶ連句資料の調査を行った。これらの詳細な書誌調査をあらためて行い、「加藤暁台連句の補遺と考察」『金城学院大学論集』（人文科学編）12-2（2016年3月刊行）として、本文校訂ならびに、資料翻刻を行った。

② 同様に、樗良の連句資料について、逸漁文庫の資料を中心に書誌調査を行い、一座する連句のリスト化と、本文校訂を行った。「三浦樗良の連句資料について」『金城学院大学論集』（人文科学編）13-1（2016年9月刊行予定）として、翻刻紹介も行っている。さらに、連句の会には、女性も参加しており、俳句は近世の女性に許された自己表現の手段であった。石月は女性史研究の泰場から近世の女性俳人についての調査も行った。

(2) 資料の分析

① 加藤暁台の連句資料の分析を行った。新たな資料をもとに月の出所、述懐などの傾向を分析した。逸漁資料においても、初折の月の出所は、初折7句目に集中しており、比較的忠実に守られていることが看取された。

② 一方の樗良は、ほとんど初折の月の出所が定まっておらず、同じ地方系の蕉門である暁台とは対照的な傾向にあることを明らかにできた。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究体制の変化による計画の変更

① 本研究は、申請時に、暁台、樗良、蕪村を中心に、俳論書・伝書をもとに、連句の資料整理や分析を行うことを目的としていた。暁台・樗良の連句において、その傾向をデータ化し、連句評および俳論の付けと作品の付けの距離をはかりながら、樗良、暁台らの連句実作の特徴の析出を目指したものである。ただ、申請時の研究代表者と研究分担者が、採択時には変更となり、本研究体制の環境が大きく変化することを余儀なくされるという特殊事情が生じた。そのため、申請時に3年計画であった計画が、1年で中断せざるを得ない状況となった。

② 結果として、申請時に、1年目は、資料集収集に重点を置く計画であったため、比較的未整備である、暁台、樗良の連句資料の収集と資料整備に、研究遂行上の多くの労力を費やすこととなった。付合に関する分析は進めながらも、具体的な成果に乏しい点は、そのような事情によるものであり、本研究の反省点といえる。ただし、資料収集および翻刻などの資料紹介などで、申請当初の目的の一部は達成できたことは明記しておきたい。

(2) 研究の反省・考察

① また、資料収集・整理中に、派生的な課題も数多く生じた。尾張、三河、近江、南信濃に関する俳諧、連句資料に関する課題である。

② 今後、学術研究振興資金の調査で得た知見をもとに、ひきつづき中興期の連句を分析する上で、風羅念仏法要、歌仙合といった個別のジャンルにおいて、資料収集や内容の分析を行っていく必要があると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① 石月静恵「近世の女性俳人」『桜花学園大学保育学部研究紀要』第14号（査読無）pp. 1～7（2016）

② 寺島徹「加藤暁台連句の補遺と考察」『金城学院大学論集』（人文科学編）12-2（査読無）pp. 33～43（2016）

③ 寺島徹「蝶夢序『俳人自筆句帳』（仮題）の調製についての補訂」『東海近世』23号研究ノート（東海近世文学会）（査読有）pp. 138～141（2015）

- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし

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	ニカラグアの考古学及び文献学資料評価と発展への 応用 ーアメリカ地中海文化圏研究へのアプローチー		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①中米考古学 ②カリブ海沿岸地域史 ③地域博物館 ④地域開発		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 博 史	外 国 語 学 部 京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 国 際 文 化 資 料 館	教 研 究 館 授 員 長	・研究代表者・研究統括 ・考古学調査実施、資料整理・分析 ・博物館活動の実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 豊 治	外 国 語 学 部 京都外国語大学ラテンアメリカ研究所	教 授 所 授 長	・開発政策と環境政策に関する調査・分析 ・先住民政策と先住民自治に関する調査・分析
立 岩 礼 子	外 国 語 学 部 京都外国語大学ラテンアメリカ研究所	教 授 主 任 研 究 員	・植民地時代の文献調査・分析 ・ラテンアメリカ諸国駐日大使会議(GRULAC)との 連絡・調整
住 田 育 法	外 国 語 学 部 京都外国語大学ラテンアメリカ研究所	教 研 究 館 授 員	・アフロ文化・社会に関する調査・分析
Sagrario Balladares	ニカラグア国立自治大学 人文学法学部歴史学科 考 古 学 情 報 研 究 機 関	教 授	・考古学調査の分析と検証 ・ニカラグア文化庁との交渉

ニカラグアの考古学及び文献学資料評価と発展への応用 ーアメリカ地中海文化圏研究へのアプローチー

1. 研究の目的

- (1) ニカラグア共和国マタガルパ県マティグアス郡ティエラブランカ地区における考古学研究の成果をさらに蓄積し、遺跡を共通項として地域産業、環境、歴史、教育を通して地元住民が課題解決に主体的に関われるモデルづくりをすすめる。
 - ① ティエラブランカ地区の考古学調査の成果をもとにフィールドミュージアムづくりに向けた教育・普及活動を行なう。
- (2) 運河工事によってニカラグア全体の環境・産業・先住民文化の急速な変化がもたらす課題の調査と考古学および文献学資料評価と実践的モデルへの応用について検証する。
 - ① 植民地時代の文献研究からアメリカ地中海文化圏、とくにニカラグアにおけるカリブ海と太平洋の関係を歴史的に明らかにする。
 - ② カリブ海地域における博物館を調査し、先住民文化の資料を収集、現地事情を把握する。
 - ③ ニカラグアの運河計画に関わる開発政策と環境政策について調査分析を行う。

2. 研究の計画

- (1) マタガルパ県マティグアス郡ティエラブランカ地区における考古学・博物館活動の実施
 - ① 平成27年夏期および平成28年春期間、文科省科学研究費による現地調査と並行して、マティグアス市やティエラブランカ地区および周辺の考古学情報の収集につとめる。
 - ② ティエラブランカ地区小学校における博物館活動の実施
- (2) カリブ海地方での地域研究
 - ① ブルーフィールズにおける博物館調査
 - ② カリブ海における先住民の歴史と文化に関する資料収集

3. 研究の成果

- (1) マタガルパ県マティグアス郡ティエラブランカ地区における考古学・博物館活動の実施
 - ① 考古学調査

プロジェクト・マティグアスによる発掘調査の対象としたフィンカ・ラスベガス (MATI-1:ラスベガス遺跡) の考古学調査の目的は、遺跡の範囲を確定させ、遺構を測量して分布・配置を明らかにすること、遺跡内に分布する遺構 (マウンド) の発掘調査を行い遺跡の性格を明らかにすること、層位的な発掘によって土器を編年し、メソアメリカ文明圏から近隣地域の編年と比較し、その相対的な位置を明らかにすることである。

ア. 測量調査とその成果

遺跡の範囲確認のための測量調査と正確なマウンドの配置を測量し、マウンド配置図 (図1) を作成した。その結果、直径20mをこえる大型のマウンドがほぼ中央部に集まっていることと、その内側に縦横40-50mの広場の空間があることがわかった。この北側には長さ4.5mのモノリット (装飾付き石柱) が倒れており注目できる。また、高さが50cm以下の低いマウンドも確認できた結果、マウンドは40基となった。また、マウンドのほか

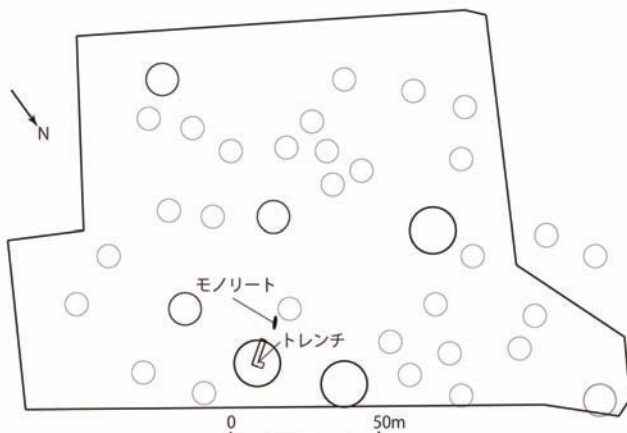


図1 マウンド分布図

に新たに集石遺構を確認した。

イ. 考古学調査とその成果

遺跡の中でもっとも北側にあつて大型のマウンド1の発掘調査を行った。マウンドの頂部から裾部にかけて試掘坑では直線的な石壁が2列確認しており、このマウンドは平面四角形で2～3段のピラミッド階段状になっていることがわかった。また、マウンド頂部では長軸が北の方向を指している集石1と、その周辺にも長さ60cmほどのモノリット状のものが確認された。

マウンド1が遺跡内で一番北側にあつて、広場・モノリットとマウンド1、そして背景のキラグア山系山並みとの位置関係から、このマウンドが太陽や月などの動きと結び付いた儀礼を行う祭壇であるという仮説をたてている。

② 博物館活動

ア. 地域活動の課題

ラスベガス遺跡の考古学調査の成果を、博物館活動（ワークショップや写真展、発掘現場見学・体験など2014年以来10回開催）を通してマティグアス市民やティエラブランカ地区住民に普及することでどのような効果が期待できるか、とくに文化財の価値の再発見に繋げていく方法の研究を行なった。マティグアス郡の各地区長ーマティグアス市民ーティエラブランカ地区住民など各アクターへの活動報告やアンケート調査を通して、考古学を仲介者とした地道な住民との交流が、地域の文化財やプロジェクトへの関心を高めることを立証しようとするものである。

イ. ティエラブランカ地区におけるワークショップとアンケート調査の実施

ティエラブランカ地区が考古学調査と博物館活動の拠点である。また、地区のフアナ・アリシア・セルドン・フローレス小学校は京都外国語大学スペイン語学科がお手伝いする教育資材提供ボランティア活動の対象となっていて、子どもを通じた地区住民との接点でもある。

このティエラブランカ地区住民を対象として調査報告会とアンケート調査を2015年夏と2016年春の2回行った。

1回目の調査では、小学校内で写真展を開催するとともに調査報告会を実施した。そして、参加者にアンケート調査を行った。

アンケートは、文字ではなく画像で選択できるように工夫した（図2）。結果は、質問事項にほぼ全員がすべて「はい」をマークしている。一方、情報が十分に周知されていない段階でのこうしたアンケートの実施方法には課題があり、住民の意識調査についてはあらたな方法の開発が必要である。

2回目は、調査の現状報告の後、ANIDESによる将来のコミュニティ・ミュージアムづくりに関するグループワークを行った。参加者は55名。おもに30～50代の女性で多くが小学生の保護者ならびに縁者である。5～7人のグループにわけて進めたが、積極的にリードする人や読み書きができない人へのサポートがスムーズに行われていた。こうした活動が2回目というのもあったかもしれない。

一方、報告会の参加者に、このプロジェクトが始まる前からフィンカ・ラスベガスにマウンドがあることを知っていたかどうかの質問を行った。知っていたと答えたのはわずか3人だった。こう

2015/Sep/11
Proyecto Arqueológico Matiguás

Enquesta en Tierra Blanca

Sexo (Masculino / Femenino)

Q1

Q2

Q3

Q4

Q5

図2 アンケート用紙

した文化財（マウンド）が自身の生活と結びついていないことがわかる。

しかし、グループワークの発表の中では、コミュニティ・ミュージアムに期待するものとして、子どもへの地区の歴史や文化についての教育を指摘していた。ここでは周辺の考古学情報（文化遺産）の住民への啓発という課題が明らかになったことと、子どもを対象とした活動を行うことで親や大人も巻き込んでいける可能性を感じた。

(2) カリブ海地方での地域研究

① ブルーフィールドズにおける博物館調査

2014年度予備調査を行ったブルーフィールドズでアメリカ地中海文化圏の総合調査に向けた本格的な情報収集を開始した。

ブルーフィールドズにあるブルーフィールドズ・インディアン・カリビアン大学（以降BICU）の附属研究所CIDCAは、博物館的機能も持っている。また、周辺の考古学資料も保管しており、ここを拠点に考古学と博物館学を通じた地域研究を開始することになった。

② カリブ海における先住民の歴史と文化に関する資料収集

ニカラグアからコスタリカにかけてのカリブ海沿岸には、現在先住民やアフリカ系など出自の異なった多様な住民が住み分けている。オランダ、スペイン、そして英国による統治の歴史が背景にある。ニカラグアにおいては、カリブ海側は大きく南北二つの自治区となっており、北は北部カリブ海自治地域（Región Autónoma de la Costa Caribe Norte）、南は南部カリブ海自治地域（Región Autónoma de la Costa Caribe Sur）と呼ばれ、ブルーフィールドズは南の自治区の中心である。

人類学および社会学の調査は、ニカラグア国立自治大学人類学学科などからの情報提供を受けるとともに、ブルーフィールドズにおいて現地の地域事情収集に努めた。これについてもCIDCAから協力を得た。とくに調査地は、運河計画のカリブ海側起点となっている。運河がもたらす地域の影響を人類学社会学の側面から調査し、住民が主体となった持続可能な開発に向けた実証的研究を進めていく。

4. 研究の反省・考察

(1) 考古学調査の反省と考察

① 考察

以下に簡単にまとめる。

- ・遺跡の範囲を確定しマウンドの位置関係を明らかにできたことで、広場と思われる空間を確認できた。
- ・マウンド1は、頂部に石組の構造物を持つ階段ピラミッド状の祭壇である。
- ・キラグア山系の山並みを背景に、マウンド1、モノリット、広場が直線状に位置していることから天体の運行と関係しているという仮説をたてた。

② 今後の調査にむけて

引き続き、マウンド1の発掘を継続し、祭壇としての構造、頂部の石組遺構の解明に取り組む。また、マウンド1とモノリットの関係も明らかにしていきたい。

(2) 博物館活動の反省と考察

① 考察

ラスベガス遺跡の考古学調査の成果を、ワークショップや写真展、発掘現場見学・体験などの博物館活動を通して地域に普及するプログラムは4回実施した。2014年以来では10回開催したことになる。とくに今年度はティエラブランカ地区でワークショップや写真展、現地見学会などを開催することができ、コミュニティ・ミュージアムづくりに向けて住民との交流が深まった。

② 今後の調査

引き続き、ティエラブランカ地区を中心に博物館活動を継続し、こうした方法が住民主体の地域活動につながることを明らかにしていきたい。

(3) カリブ海側地域研究の反省と考察

ブルーフィールドズに拠点があるBICUの研究所（CIDCA）に所蔵されている文献、考古学資料の調査を開始した。しかし、人類学調査としては当初アフロ系住民を対象とした聞き取り調査を予定していたが現地での準備が整わず実施することができなかった。反省点であり今後の課題である。

考古学については、ラスベガス遺跡から出土した土器がカリブ海側のものであるという分析がある。また、時期も紀元前に遡る可能性もあり、ラスベガス遺跡の成立とカリブ海側の交流という視点からも大きな発見であり、カリブ海側の土器の調査を進めていく必要がある。CIDCAには、UNAN・CADIが調査したモンキーポイントの貝塚の資料が保管されている。この資料を分析・解釈していきたい。

2016年6月5日に開催された第37回日本ラテンアメリカ学会定期大会において、「ニカラグア・太平洋岸地域における開発の歴史と現状」をテーマに本研究の成果を含めたパネル発表をもった。このなかで運河問題を取り上げているが、植村まどか氏（京都外国語大学院博士課程後期）が、現地の学会「ニカラグア、カリブ海岸におけるインディヘナ・コミュニティとアフロ・コミュニティの文化遺産および自然遺産の保護に関する国際研究会」の成果を踏まえて「運河問題については、在ニカラグアで開発が進む大運河建設に伴うカリブ海岸のインディヘナ・コミュニティ区域の文化・自然遺産破壊問題の深刻化が顕著であること、一方で各コミュニティ間にはテリトリー問題があるということである。現在のカリブ海岸地域には運河建設による外面的問題と、コミュニティ間で抱える内面的問題が存在している。」と報告している。

このパネルは、研究分担者の辻豊治京都外国語大学ラテンアメリカ研究所所長、立岩礼子同主任研究員、住田育法同研究員が研究成果の一部を含んだ発表を行った。今後はこうした成果と課題解決に向けて研究を進める。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

南博史「古代メキシコ・オルメカにおける日本人研究者の課題」、『京都外大国際文化資料館紀要』11号／京都ラテンアメリカ研究所国際文化資料館共催国際シンポジウム特集号掲載、査読無、51－55頁、2015年

(2) 口頭発表

- ① 立岩礼子「スペイン植民地における大学の創設に関する一考察」日本イスパニヤ学会第61回大会、2015年10月10日、神田外語大学
- ② 南博史「中米における地域開発の現状と課題」第15回ラテンアメリカ研究講座／国際文化資料館第2回研究講座、2015年10月9日、京都外国語大学
- ③ 南博史、植村まどか「El Proyecto Arqueológico Matiguás y su actividad en Nicaragua.」ニカラグア国立自治大学第19回科学大会、2015年8月21日、マナグア（ニカラグア）
- ④ 住田育法「国際シンポジウム 多面体日本、交差するアイデンティティの過去、現在、未来」2015年5月31日、東京外国語大学

(3) 出版物

なし

学 校 名	慶 應 義 塾 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	東アジアにおける権威主義国家の議会と選挙 －民主的な制度が権威主義的な政治体制の安定と 持続に果たす役割－	研 究 分 野	法 学
キ ー ワ ー ド	①権威主義国家 ②東アジア地域		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
加 茂 具 樹	総 合 政 策 学 部	教 授	研究代表・中国研究

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 串 敦	法 学 部	准 教 授	ソ連研究
磯 崎 敦 仁	法 学 部	准 教 授	北朝鮮研究
山 田 紀 彦	日 本 貿 易 振 興 機 構 ア ジ ア 経 済 研 究 所	主 任 研 究 員	ラオス研究
石 塚 二 葉	日 本 貿 易 振 興 機 構 ア ジ ア 経 済 研 究 所	主 任 研 究 員	ベトナム研究
山 田 裕 史	新 潟 国 際 情 報 大 学 国 際 学 部	講 師	カンボジア研究
古 谷 知 之	総 合 政 策 学 部	教 授	統計処理
オウンバートル・ ムンヘジン	大 法 学 学 院 院 科 法 学 研 究 科	博 士 課 程	モンゴル研究
中 西 嘉 宏	京 都 大 学 大 学 京 東 南 ア ジ ア 研 究 所	准 教 授	ミャンマー研究
ヴィダ・マチケナイテ	国 際 大 学	講 師	事務局・東欧研究

東アジアにおける権威主義国家の議会と選挙

— 民主的な制度が権威主義的な政治体制の安定と持続に果たす役割 —

1. 研究の目的

- (1) 本研究の目的は、東アジアにおける権威主義国家の民主的制度（議会や選挙）が、その体制の安定と持続にどの様に貢献をしているのかを明らかにすることである。
- (2) 先行研究は、権威主義国家の民主的制度が「体制エリートの離反防止」と「反体制勢力の抑制と弱体化」、そして「統治の有効性の向上」という政治的な機能を発揮して、権威主義国家の持続に貢献していると論じている。しかし、こうした研究成果は中南米諸国、東欧・旧ソ連圏諸国、中央アジア、中東地域などを対象とした研究の成果を踏まえて導き出されたものである。
- (3) 本研究は、先行研究の成果を発展させるために、東アジアにおける権威主義国家の民主的制度を分析対象とする。本研究プロジェクトが分析対象とする国家は、現在、あるいはかつて共産主義政党が支配政党であった社会主義国家である（かつて社会主義国家であった国家も含む）。
- (4) 分析対象の国家は、おおよそ以下の三つに分類できる。①体制の持続に成功している（今のところ）社会主義国家（中国、ベトナム、ラオス、北朝鮮）。民主化したモンゴル、カンボジアは、民主化のプロセスの相違によって区別する。②支配政党が民主化プログラムを選択した国家（モンゴル）。③国外の圧力（国連）によって民主化した国家（カンボジア）。なお、モンゴルの場合は複数政党制が定着したが、カンボジアの場合は民主化以前の政党が引き続き政権与党の地位を維持している。
- (5) 本研究は、これらの国家における政治体制の現状、およびそれが変化した経緯の相違に留意しながら、民主的制度の政治的機能の特徴を明らかにし、権威主義国家の民主的制度改革に貢献しようとするものである。

2. 研究の計画

- (1) 本研究は複数年度にわたって実施する研究プロジェクトとして設計した。第一年度は、研究プロジェクトが設定した目標に到達するために不可欠な、研究インフラの設計に力を入れた。
- (2) 設計する研究インフラとして、以下の3点を設定した。第一には、東アジア地域の権威主義国家、特に（旧）社会主義国家の民主的な制度について、関連する文献を利用した制度研究及び現地調査をつうじて、理解を深めることである。第二には、共同研究者の間における知識の共有に務めることである。各国の民主的制度の政治的機能を理解するうえで、共有できる分析の枠組みを、本研究プロジェクトに参加する研究者間で共有することであった。
- (3) 第三には、定期的な研究会の設置である。本研究プロジェクトを推進する研究チームは、東アジア地域の一つの権威主義国家を専門とする研究者が集まって組織された。このため、自らが専門とする地域以外の民主的制度の実態についての理解は、必ずしも十分ではない。そこで、他の国家の民主的な制度に関する理解を共有するために、自らが担当する国家の民主的制度の実態と関連する先行研究の紹介をおこなう研究会を定期的で開催した。また比較の視点の獲得のために、ソ連および旧東欧諸国の事例についての理解を深めた。
- (4) 初年度は、東アジアの社会主義（権威主義）国家が、1980年代以降、いずれも「体制の生き残り」を目的として提起した政治改革構想の重要な項目の一つとして、民主的制度改革を提起していることに注目した。この改革史を概観しながら、各国の支配政党が民主的制度改革に期待していた政治的機能の析出を試みた。

3. 研究の成果

- (1) 研究プロジェクトを実施して第一年目であったため、研究者が個別に研究活動を展開し、その成果を研究プロジェクトチームのメンバーが一堂に会する研究会で共有する活動をつうじて、各国家の民主的制度に対する理解を深めることに努めた。その結果として、研究プロジェクトのメンバーが一堂に会したワークショップを開催するなど、研究プロジェクト全体としての研究成果は十分ではない。
- (2) 初年度の研究活動の目的は、本研究プロジェクトにおいて追究する具体的な研究テーマを見出すことにあり、初年度の活動をつうじて、この目標を達成した。
 - ① すなわち、東アジアの社会主義（権威主義）国家が、1980年代以降、いずれも「体制の生き残り」を目的として提起した政治改革構想の重要な項目の一つとして民主的制度の改革を提起していたことの意味を論じることである。
 - ② 当時の政治指導者は、なぜ、民主的な政治制度改革の必要性を提起したのか（各国間の連携はないと思われる）。各国の政治文化のなかにおける議会制度の位置付けに対する理解をふまえながら、各国の政治指導者（体制）が、民主的制度に期待していた政治的機能の析出を試みる。
- (3) 下記の「研究発表」に示されるように、研究プロジェクトチームのメンバーの個別の研究成果は豊富である。

4. 研究の反省・考察

- (1) 極めて野心的な研究プロジェクトであったため、分析の対象国毎に研究の進捗度が不揃いとなった。一部の国家については研究に必要な資料の蒐集が難しかった。
- (2) 本研究プロジェクトの継続の申請の手続きに失敗したこと（研究プロジェクトと大学事務局との連携が十分ではなかった）、十分な研究成果を取りまとめることができなかつたことが極めて残念である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
 - ① 石塚二葉「ベトナムにおける一党独裁体制の安定・維持と国会の機能」『アジア研ワールド・トレンド』No. 245、2016年、14-17頁。
 - ② 石塚二葉「ドイモイ期ベトナムにおける国会の刷新と政治的機能」山田紀彦編『独裁体制における議会と正当性：中国、ラオス、ベトナム、カンボジア』日本貿易振興会アジア経済研究所、2015年、141-176頁。
 - ③ 磯崎敦仁、「金正恩 2016年「新年の辞」を読み解く」『公研』、No. 629、2016年、84-87頁。
 - ④ 磯崎敦仁、「北朝鮮の個人主義体制」『法学研究』、89巻3号、2016年、161-184頁。
 - ⑤ 磯崎敦仁、「金正恩政権初期における朝鮮労働党中央委員会機関誌」『教養論叢』、No. 137、2016年、235-271頁。
 - ⑥ 大串敦、「ウクライナの求心的多頭競合体制」『地域研究』16巻1号、2015年、46-61頁。
 - ⑦ Atsushi Ogushi, “Executive Control over the Parliament and Law-Making in Russia: The Case of the Budget Bills”『法学研究』89巻3号、2016年、61-77頁。
 - ⑧ 加茂具樹、「中国の政治制度と中国共産党の支配：重大局面・経路依存・制度進化(最終回)人民代表大会のなかの軍：変化する解放軍と社会の関係」『東亜』第585号、財団法人霞山会、2016年、100-108頁。
 - ⑨ 山田紀彦、「独裁体制における議会と正当性」山田紀彦編『独裁体制における議会と正当性：中国、ラオス、ベトナム、カンボジア』日本貿易振興会アジア経済研究所、2015年、3-24頁。

- ⑩ 山田紀彦、「ラオスにおける国民の支持獲得過程-国会を通じた不満吸収と国民への応答メカニズム-」山田紀彦編『独裁体制における議会と正当性：中国，ラオス，ベトナム，カンボジア』日本貿易振興会アジア経済研究所、2015年、69-108頁。
 - ⑪ 山田紀彦「独裁体制をとらえる視座-正当性維持の視点から-」山田紀彦編『独裁体制における議会と正当性：中国，ラオス，ベトナム，カンボジア』日本貿易振興会アジア経済研究所、2015年、177-192頁。
 - ⑫ 山田紀彦「ラオスにおける国民の支持獲得過程-国会を通じた不満吸収と国民への応答メカニズム」『アジ研ワールド・トレンド』No. 245、2016年、10-13頁。
 - ⑬ 山田裕史「カンボジア人民党の体制維持戦略：議会を通じた反対勢力の取り込み・分断と選挙への影響」山田紀彦編『独裁体制における議会と正当性：中国、ラオス、ベトナム、カンボジア』日本貿易振興会アジア経済研究所、2015年、141-176頁。
 - ⑭ 山田裕史「カンボジアの平和構築における市民社会の役割：懸念されるNGO法の影響」『アジア平和構築イニシアティブ』ウェブサイト、2016年2月15日。
(<http://peacebuilding.asia/civil-society-peace-building-cambodia-ja/>)
 - ⑮ 山田裕史「人民党一党支配体制下のカンボジア議会の役割：反対勢力の取り込み・分断による体制維持」『アジ研ワールド・トレンド』No. 245、2016年、18-21頁。
- (2) 口頭発表
- ① Atsushi Ogushi, “Bureaucratic Elites in Russia Revisited: Modernity and Patrimonialism” paper presented to the IX ICCEES (International Council for Central and East European Studies) World Congress 4 August 2015, Kanda University of Foreign Studies, Makuhari.
 - ② 加茂具樹、「中国地方人大代表行為的变化趨勢：対東部Y市の考察」、新中国選挙制度的回顧與展望学術研究討論会、報告、(2015年11月8日、於中国、広州、中山大学)
- (3) 出版物
- ① 山田紀彦編『独裁体制における議会と正当性：中国，ラオス，ベトナム，カンボジア』日本貿易振興会アジア経済研究所、2015年
 - ② 大串敦「ロシアにおける混合体制の成立と変容」川中豪編『発展途上国における民主主義の危機』調査研究報告書 アジア経済研究所 2016年(近刊予定)

学 校 名	龍 谷 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	大学におけるシティズンシップ教育の意義と方法に関する研究 －政治的リテラシーの視点からのアプローチ－		研 究 分 野 法 学
キ ー ワ ー ド	①シティズンシップ教育 ②主権者教育 ③民主主義(デモクラシー) ④政治的リテラシー ⑤若者の政治離れ ⑥選挙投票率 ⑦問題発見/解決型学習(Problem-Based Learning, PBL)		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
渡 辺 博 明	法 学 部	教 授	代表者、総括、シティズンシップ教育の方法論と北欧の現状分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 田 徹	政 策 学 部	教 授	シティズンシップ概念に関する政治学的考察とEUの動向の分析
高 橋 進	法 学 部	教 授	シティズンシップ教育の方法論とイタリアに関する現状分析
落 合 雄 彦	法 学 部	教 授	アフリカの紛争経験国におけるシティズンシップ教育の現状分析
橋 口 豊	法 学 部	教 授	イギリスのシティズンシップ教育における国際関係の意義の研究
寺 川 史 朗	法 学 部	教 授	シティズンシップ教育における憲法学の定位に関する研究
奥 野 恒 久	政 策 学 部	教 授	憲法学における民主主義教育の可能性に関する研究
的 場 信 敬	政 策 学 部	准 教 授	イギリスにおけるシティズンシップ教育の社会的意義と効果の現状分析
中 島 琢 磨	法 学 部	准 教 授	政治的リテラシーの研究、日本外交分野におけるシティズンシップ教育の方法の研究
濱 口 晶 子	法 学 部	准 教 授	憲法における主権者教育の方法論、ドイツにおけるシティズンシップ教育の現状分析
福 島 都 茂 子	宮 崎 産 業 経 営 大 学 学 部 法 学	教 授	フランスにおける政治的シティズンシップ教育の現状分析
八 木 橋 慶 一	高 崎 経 済 大 学 学 部 地 域 政 策	准 教 授	シティズンシップ教育の方法論とイギリスに関する現状分析
大 村 和 正	法 学 部	非 常 勤 講 師	イギリスにおけるシティズンシップ教育の現状と政治的条件の研究
城 下 賢 一	法 学 部	非 常 勤 講 師	日本における政治的シティズンシップ教育の現状分析

大学におけるシティズンシップ教育の意義と方法に関する研究 —政治的リテラシーの視点からのアプローチ—

1. 研究の目的

本研究の目的は、現在の日本の大学における「シティズンシップ教育」の可能性を、「政治的リテラシーを重視した主権者教育」という観点から、政治学と憲法学との協働を通じて、また理論と実践の往復の中で追求し、実証的な成果に裏づけられた方法論として提示することにある。

近年の先進工業諸国では、さまざまな要因によって若者の政治離れが進んでおり、国内外で「シティズンシップ教育」が注目されているが、（中学・高校ではなく）大学における本格的な取り組みは少ない。しかし、「大学全入時代」が到来しつつある現状では、むしろ、大学が政治的リテラシーの向上を含めた主権者教育に取り組む必要性は高まっており、その方法と内容の研究が焦眉の課題となっている。ここでは、学生の政治意識の把握や「問題発見／解決型学習（Problem-Based Learning, PBL）」の活用に取り組んできたメンバーの経験を出発点として、それらの理論化と精緻化を図りながら、自律的で能動的な主権者という点での市民性を高めるための方法論の構築を目指す。

また本研究は、近年のシティズンシップ教育研究の中でも特に、国民の義務やグローバル化への対応力ではなく、批判的思考や政治的リテラシーの習得を重視した主権者教育を目指している。そして、大学の社会的責任としてのシティズンシップ教育が重要であるという問題提起を通して、この分野の研究のさらなる発展に寄与することをも意図している。

折しも本研究発足の時期には、選挙権年齢の18歳への引き下げが決まり、特に高校での政治教育のあり方が見直されることとなった。それを受け、政府や文部科学省も関わって、全国共通教材の導入も含めた新たな動きが見られるようになってきている。3年計画の1年目となる2015年度には、そのような動向をも見据え、その中で特に大学が主権者教育においていかなる役割を果たすべきか、という点を意識しながら、上記の目的に向けた取り組みを進めた。

2. 研究の計画

本研究は、3年の研究期間の中で、諸課題の明確化を含む理論面での検討作業や、より正確な現状認識を得るための試みから始め、次第に授業を通じた実践的探求へと比重を移していき、龍谷大学において有効かつ実施可能な具体的な手法を模索しながら、最終的にはより普遍的な方法論として学外にも発信できる形にしていくことを目指している。その一年目である2015年度は、主として以下の活動を行うことを予定していた。

- (1) 先行研究や実践例の検討を通じて、「シティズンシップ教育」「政治的リテラシー」など主要な概念を整理するとともに、学生の政治意識に関する現状を把握し、主権者教育の課題を明確化する。
- (2) 研究会や聴き取り調査を通じて「シティズンシップ教育」に関連した活動実績をもつ他大学の状況を把握する。
- (3) 諸外国における政治教育の実態を調査し、それをふまえて日本の問題状況やシティズンシップ教育の課題を検討する。
- (4) 政党活動などの現実政治に携わる人を講師として招いて講演や討論を行い、その前後で学生の政治に対する意識の変化を調べる。
- (5) 政治的リテラシーを測定するための暫定モデルを作成する。

3. 研究の成果

2015年度には、龍谷大学での調査や授業実践を通して学生の政治的関心を高める方途を模索しながら、外部から講師を招いて研究会を開いたり、国内外へ調査に出かけたりして、シティズンシップ教育をめぐる理論状況や課題を整理した。具体的には、下記のような活動を通じて、3年計画のプロジェクト全体の基礎を形成した。その結果として特に、「シティズンシップ」を（「権利」や「資格」というよりも）「政治的リテラシー」がその中核をなすような「技量」や「態度」としてとらえるとともに、その向上を図り、それが国や地方の政治の場で発揮される（選挙での投票もその一つ）よう促していくうえで大学におけるシティズンシップ教育が重要な役割を果たしうるとの認識を得ている。

- (1) 学生意識調査の実施： 法学部1年生全員（約400人）を対象に、学期の最初（4.14）と最後（7.28）に政治と選挙に関する意識調査を実施した。それらと下記（2）の活動から、学期中に政治への関心が一定程度高まったことが確認できた（その理由の分析や方法の一般化については検討中である）。
- (2) 政治家を招いた授業： 法学部1年生全員を対象に、奈良市長・仲川げん氏（5.12）、高槻市議（同議会副議長）・野々上愛氏（7.14）による講演と質疑・応答の機会を設け、その前後の時間をも活用して、受講者に地域の政治について考えさせる授業を行った。
- (3) 討論型の授業： 政策科学部2回生以上の授業で、選挙権年齢の引き下げをテーマに、学生が地元国会議員（宮崎謙介氏・泉健太氏）にインタビューし、それをもとに1年生の授業で発表・討論を行った（6.26）。また、法学部2年生の授業で、京都市議会の全6会派から議員を招き、原発をめぐる問題や若者の政治離れについて議論した（7.10）。
- (4) 研究会： 京都教育大学の水山光春氏を招いて講演・討議の機会をもち、シティズンシップ教育と政治的リテラシーに関する基本的な知見の共有を進めた（5.12）。寺川史朗氏の報告により、PBLの具体例を見ながら、その方法や課題についての理解を深めた（6.6）。関西大学の石橋章市朗氏を招き、大学生の政治理解を促す体験学習の方法について議論した。他に、二回に分けて各海外出張報告とそれを基に意見交換をする機会をもった。
- (5) 海外調査： イギリス（大村8.16～23、的場3.5～11）、スウェーデン（渡辺8.31～9.10）、フランス（福島9.1～12）、南アフリカ（落合12.22～1.4）、イタリア（高橋3.23～31）について、それぞれ政治教育ないしシティズンシップ教育の実施状況について調査した。
- (6) 外部研究会等への参加： 日本シティズンシップフォーラム主催ミーティング（神戸7.1）、開発教育全国研究集会（札幌8.8～9）、シンポジウム「政策から考えるシティズンシップの教育」（広島大学学習システム促進研究センター他主催）（東京11.22）、日本シティズンシップ教育フォーラム・第3回全国ミーティング（東京3.19, 20）にメンバーを派遣した。

4. 研究の反省・考察

2. の計画との関連での反省点は、以下のとおりである。

- (1) 外部から講師を招いた研究会や文献講読を通じて、シティズンシップ教育や政治的リテラシーの概念を整理し、理解を深めることができた。また、学生の政治に対する意識や態度については、法学部一年生全員に対して2度にわたって実施した調査から、その実態と、授業を通じた変化についてある程度把握できている。その後の分析・検討作業は遅れているが、2016年には論稿にまとめて発表する予定である。
- (2) 他大学への聴き取りとして、関西大学の事例については詳細な情報を得て2016年度のPBL的授業の計画立案にも活かすことができた。ただし、個々の教員によるものは別として、大学としての取り組みの事例が少ないこともあって、計画が十分に実行できているといえないところもある。
- (3) 海外実態調査は、イギリス、フランス、イタリア、スウェーデン、南アフリカについて行うことができ、それらはすべて研究会での報告を通じてメンバー間での共有がはかられた。

各国の実態およびそれらの違いについての知見が蓄積できた一方、それらを日本の大学での実践に結び付けていく道筋については今後も検討を続ける必要がある。

- (4) 奈良市長や高槻市議を招いた講演会、京都市議会全会派の代表を招いた討論会、京都選出の与野党国会議員へのインタビュー、といった様々な形で学生達が現実の政治にふれる機会を作るよう努め、いずれも政治ないし政治家の仕事への関心を高めるという点では効果が確認できた。ただし、それらを方法論として一般化することは容易ではなく、そのための模索が続いている。
- (5) 政治的リテラシー測定モデル化については進んでいない。これは本年度の最大の反省点であるが、ことの性質からすると、本来は授業実践や学生の反応に関する調査の蓄積が進んだ後で取り組むべき課題であったとも考えられる。2年目以降に重点的に取り組むつもりである。

全体として、現実政治とのつながりを重視した授業を行いながら、政治意識の変化を観察することはできたし、学生に能動的な関与を促す授業実践については、予定を早めて実施した分も含め、積極的に展開することができた。しかし、それらを基に政治的リテラシーの指標化を図ることは予想以上に難しく、思うように進んでいないのが実情である。今後、今年度の経験の分析をふまえて知識として体系化し、政治的リテラシーを向上させる手法やその評価方法の確立へとつなげるべく、いっそうの努力が必要である。

なお、選挙権年齢の引き下げにともなう動きに関しては、各種シンポジウム等に参加する中で、現在の日本において高校での政治教育の充実が求められている一方、「中立性」の問題をめぐって現場が困難を抱えていることもあり、当面は大学での主権者教育が独自の意義をもちうると認識している。引き続きそのための理論と方法に関する研究に取り組んでいきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 渡辺博明「スウェーデンにおける代表と統合の変容」、日本政治学会編『年報政治学』2015-II、2015年、80-99頁
- ② 石田徹「福祉をめぐる『再国民化』— 欧州における最近の動向」、龍谷大学『社会科学研究所年報』第45号、2015年、187-194頁

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

- ① 高橋進・石田徹編『「再国民化」に揺らぐヨーロッパ』法律文化社、2016年
- ② 落合雄彦編『アフリカの女性とリプロダクション』晃洋書房、2016年
- ③ 奥野恒久「代表制論の再検討—熟議民主主義との関係で」、本秀紀編『グローバル化時代における民主主義の変容と憲法学』日本評論社、2016年、44~76頁
- ④ 落合雄彦「「宗教の大地」の〈これまで〉と〈いま〉」、佐島隆他編『国際学入門—言語・文化・地域から考える—』法律文化社、2015年、212-221頁。

学 校 名	成 城 大 学	研究所名等	経 済 研 究 所
研 究 課 題	環太平洋地域における中小企業支援施策の比較分析 －日本型金融モデルの有効性の検証－		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①銀行型金融システム ②市場型金融システム ③中小企業金融 ④信用補完 ⑤サポーティング・インダストリー ⑥ベンチャービジネス ⑦ファンド ⑧イノベーター		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
村 本 孜	経 済 研 究 所 社会イノベーション学部	平成28年3月 31日退職	研究代表者(全体総括)

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
明 石 茂 生	経 済 研 究 所 経 済 学 部	所 教 員 授	論文作成
内 田 真 人	経 済 研 究 所 社会イノベーション学部	所 教 員 授	論文作成(カントリースタディ総括)
中 田 真 佐 男	経 済 研 究 所 経 済 学 部	所 教 員 授	カントリースタディ、論文作成(日本担当)
花 井 清 人	経 済 研 究 所 経 済 学 部	所 教 員 授	カントリースタディ、論文作成(オーストラリア担当)
福 光 寛	経 済 研 究 所 経 済 学 部	所 教 員 授	カントリースタディ、論文作成(中国担当)
福 島 章 雄	経 済 研 究 所 成 城 大 学	客 員 所 員 非 常 勤 講 師	カントリースタディ、論文執筆(ベトナム担当)
柿 原 智 弘	経 済 研 究 所 グアダラハラ大学経済経営 学部 経済地域研究所	研 究 員 授 客 員 教 授	カントリースタディ、論文執筆(メキシコ担当)

環太平洋地域における中小企業支援施策の比較分析 — 日本型金融モデルの有効性の検証 —

1. 研究の目的

- (1) 環太平洋地域の各国の経済問題のうち、成長産業のサポーター・インダストリーとして機能する中小企業問題に焦点を当て、経済発展に果たす中小企業の育成に必要な中小企業支援施策を横断的ないし比較研究することを目的とする。分析的には比較制度分析に力点を置き、その際、単に、各国毎の中小企業問題を抽出するのではなく、環太平洋地域に属する成熟国・成長国・成長途上国の典型的な事例を取り上げ、中小企業育成という切り口から、共通の課題の抽出・発掘と、個別の課題を整理することによって、中小企業施策の普遍的な課題を分析する。
- (2) 中小企業の育成施策における金融システムの効果を、中小企業金融という中小企業特有のリスクの情報生産機能が不可欠な点に注目し、そのリスク負担を補う信用補完制度・先駆的な直接融資制度・エクイティ型ファイナンスにおける公的関与などが必要になることを、国際比較分析する。その際、現地における最新情報のヒアリングにも重点を置く。

2. 研究の計画

- (1) 研究目的に従い、日本の中小企業支援策が各国にいかに関適用可能かの観点から検証する。前年度に行った近年の日本における中小企業政策の整理・分析を踏まえて、2015年度においては、日本の中小企業支援・政策システムの課題や今後のあり方を検討するほか、地域金融の現状分析としてソーシャルビジネス、創業向け資金に焦点を当てた日本型モデルのアジアへの適用可能性を検討する。
- (2) 同時並行で、2015年度はメキシコ等環太平洋諸国の従来の対象国に加えて、インドネシア、マレーシア等についても現地情報の収集に力点を置きつつカントリースタディを深掘りする。

3. 研究の成果

- (1) 研究成果は、研究代表者・研究分担者がシンポジウム・研究会を組織し、各自の研究テーマの展開を行なった。すなわち、学者、金融当局、金融機関、ベンチャー企業経営者を招いて、わが国の中小企業支援・政策システムの課題、今後のありかたについて幅広い視野で議論するシンポジウムを開催した（成果は2016年度年報に掲載）。また、4回に渡り外部専門家を招いた研究会を開催、アジアにおけるソーシャルビジネス、ベンチャーファイナンスを横断的に分析したほか、中国、インドネシア、マレーシアのカントリースタディを行なった。加えて、研究代表者は、本研究の基礎となる日本型モデルの一考察として、創業を中心とした中小企業支援に関するシンポジウムを企画、金融庁、地方支援機関（青森）、企業データ会社を招聘し、パネル討論を行なった。
- (2) 海外大学との学術交流の成果に関しては、本研究所は2005年以降、メキシコ・ハリスコ州・グアダハラハラ大学と研究者の交流の形で学術交流を実施し、本研究プロジェクト生成に至る各種のセミナー・シンポジウムを実施してきた。2015年度も10月にグアダハラハラ大学の研究者8名を招聘し第9回日本メキシコ研究プログラム（PROMEJ）国際セミナーを開催、日本・メキシコについてEPAや海外直接投資など経済的視点から分析を行ったほか、移民や日本文化といった社会文化的視点からも考察した。
- (3) 研究代表者及び各研究分担者の研究成果は以下のとおりである。
 - ① 研究代表者は、日本の中小企業支援・政策システムについてシンポジウムで課題を整理したうえで解決策を提示、その成果を出版した。また、中小企業金融との関連において、民法改正と個人保証、瑕疵担保履行制度についてまとめ、その成果を論文として発表した。

- ② 研究分担者の福光所員は、中国におけるシャドーバンキングの議論について所属する学会で発表、また中国の市場化に向けた考察を行ない、いずれも論文として発表した。
- ③ 研究分担者の内田所員は、地方における創業支援についてフランスの事例を日本と比較した考察を地方銀行協会の研究会で発表した。
- ④ 研究分担者の花井所員は、オーストラリアの税制改革の課題について財・サービス税改革と政府間財政関係に着目して考察し、論文として発表した。
- ⑤ 研究分担者の福島客員所員は、経済の開放性、多様化、特異性と経済成長につき実証分析し、海外査読付きジャーナルで論文を発表した。
- ⑥ 研究分担者の柿原研究員は、グアダラハラ大学において日本・メキシコ研究プロジェクトを継続、第9回日本メキシコ研究プログラム（PROMEX）国際セミナーでメキシコにおけるリテールファイナンスの現状と課題について日本と比較しながら口頭発表した。
- ⑦ 研究分担者の中田所員は、電子マネーを中心とする小額決済手段やその普及に関する消費者の選択行動を分析、財務省及び所属する学会で研究成果を発表した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究は、2010～2013年度の4年間に亘り実施した共同研究プロジェクト「環太平洋地域における中小企業金融ならびに政府支援」を基礎にしている。近年の世界的規模での経済危機の克服を念頭に置いたものである。これは、先進諸国のみならず、エマージング国についても同様な課題があることによる。この過程で、間接金融中心の日本型システムと直接金融や市場型間接金融の割合の高いアメリカ型システムとを比較し、これらの環太平洋地域各国における有効性を分析してきた。この視点の重要性は、世界金融危機を契機に、先進的と見られていたアメリカ的アプローチについて中小企業金融面でも大幅な修正をせざるを得なくなってきたことから窺える。第二に、経済の効率性を保つ上で、如何に貸し手・借り手間での情報の非対称性を緩和し、借り手の返済能力を評価するかが重要な課題の一つである。そのため、先進国では情報開示・ガバナンスの強化、途上国ではマイクロファイナンスなどの対応策が実施された。これらの対策の効果と課題を追求するため既存制度の比較研究を行なう。

このような問題意識と研究の蓄積の下、前年度は日本の中小企業支援が各国にいかに関適用可能かについて、主に過去の日本の経験から、経済発展段階も念頭におきつつ検証した。2年目の2015年度は、現在・未来の視点で課題と将来展望の視点から研究した。また、カントリースタディについても前年度の中国、オーストラリア、メキシコ、ヴェトナムに2015年度はインドネシア、マレーシアも対称先に加えて考察した。これらの研究過程・成果は2016年度のまとめのシンポジウムの準備として相応に行なわれた。

- (2) 本研究プロジェクト設計時には十分議論されていなかったが、2014年以降、日本では地域創生が重要課題になっており、地域イノベーションの遂行がその中心課題になっている。この地域イノベーションは中小企業支援の新たなフェーズであり、本研究においても積極的に対応すべきテーマである。日本では、2006年以降人口減少社会に突入し、特に地方圏から都市圏への人口移動が進み、地方の疲弊が深刻化している。さらに、中小企業数もこの20年間に150万社ほど減少し、地方経済の担い手は著しく減少してきた。中小企業は、地方部に7割ほど存在するからである。こうした状況下、若い企業への支援が重要な政策課題となっている。そこで地方銀行協会の協力を得てシンポジウム（同協会内の金融構造研究会）を開催、本研究代表者が座長、研究分担者の内田所員がパネリストとして参加し、地域での創業支援について考察を行なった。
- (3) 来年度は、日本型モデルをブラッシュアップし、環太平洋地域の諸国の課題に対応できる施策等の検討・提言の取り纏めを行なう最終年度となる。これまでの成果を基に日本モデルのアジア諸国への適応について、この分野で造詣の深い日本金融学会会長を座長にシンポジウムを行なってさらなる成果を導き出して参りたい。また、研究を進めるうちに、本提言の

実現化に当たっては、アジア地域での中小企業経営者への金融教育問題、環太平洋諸国においての大都市と地域の格差問題もクローズアップされてきた。本研究テーマは奥が深い。今後どのような課題が残されているかについても包括的に整理し、本テーマのさらなる発展的な展開につなげられるようにしていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 村本孜「民法改正と個人保証 — 議論の整理：中小企業金融との関連において—」『成城大学経済研究所研究報告』第71号、2015年9月、81ページ。
- ② 村本孜「民法における「瑕疵」文言の消滅 — 住宅瑕疵担保履行制度との関連において—」『成城大学社会イノベーション研究』第11巻第1号、2016年3月、pp. 89～140。
- ③ 花井清人「オーストラリア税制改革の残された課題：財・サービス税改革と政府間財政関係に着目して」『成城大学 経済研究』第212号、2016年3月、pp. 25～58。
- ④ 福光寛「中国のシャドーバンクについて—郎咸平の議論に学ぶ—」『立教経済学研究』第69巻3号、2016年1月、pp. 1～29。
- ⑤ 福光寛「中国経済の過去と現在—市場化に向けた議論の生成と展開—」『立命館経済学』第64巻5号、2016年3月、pp. 194～222。
- ⑥ 福島章雄“Openness of the Economy, Diversification, Specialization, and Economic Growth” Yutaka Kurihara, Akio Fukushima, *Journal of Economics and Development Studies*, 4(1), 2016, pp. 31～38.

(2) 口頭発表

- ① 内田真人「地方における創業支援～仏ローヌアルプ地域圏の考察」地方銀行協会金融構造研究会、2015年12月25日。
- ② 中田真佐男「小額決済手段の現状と展望 ～ 電子マネーを中心として～」財務省財務総合政策研究所研究会、2015年6月29日。
- ③ 中田真佐男「消費者の決済手段選択行動 電子マネーの普及要因に関する実証分析」日本応用経済学会創立10年記念大会（秋季大会）、2015年11月15日、独協大学。
- ④ 福光寛「シャドーバンクについて中国では何を議論しているか」日本金融学会2015年度春季大会、2015年5月17日、東京経済大学。
- ⑤ 柿原智弘“Retail finance in Mexico : current situations and issues” 日墨学術交流ミニ・シンポジウム、2015年10月21日、成城大学経済研究所

(3) 出版物

村本孜『中小企業支援・政策システム ～金融を中心とした体系化～』蒼天社出版、2015年6月、601p.

学 校 名	武 蔵 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	保険業の規制に関する総合的研究 －経済価値ベースのソルベンシー規制と統合リスク 管理(ERM)－		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①代替的リスク移転手法(ART) ②国際会計基準 ③伝統的保険数理 ④責任準備金評価 ⑤システミックリスク ⑥ディスクロージャー		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
茶 野 努	経 済 学 部	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 野 早 苗	経 済 学 部	教 授	論文作成
安 田 行 宏	一 橋 大 学 商 学 研 究 科	教 授	サブ総括
鈴 木 雅 貴	横 浜 国 立 大 学 大 学 院 国 際 社 会 科 学 研 究 院	准 教 授	論文作成
菅 野 正 泰	日 本 大 学 日 商 学 部	教 授	論文作成
大 塚 忠 義	早 稲 田 大 学 早 稲 田 大 学 院	助 教	論文作成

保険業の規制に関する総合的研究

—経済価値ベースのソルベンシー規制と統合リスク管理（ERM）—

1. 研究の目的

(1) 研究の背景・課題

- ① 金融庁「ソルベンシー・マージン比率等の算出基準等について」（2007）によりソルベンシー規制の転換が図られつつあるが、世界的な見直しの流れに比べて進捗が遅い。その一つの理由は、わが国におけるソルベンシー規制に関する研究が十分とは言えない現状にある。
- ② 本研究の課題は、経済価値ベースでのソルベンシー規制について理論的かつ実証的に分析し、その合理性と限界を明らかにすることである。
- ③ 経済価値ベースのソルベンシー規制とは、保険会社の資産及び負債等を市場価値等で評価した上で、その差額である純資産価値自体の変動をリスクとしてとらえ、当該保険会社のソルベンシー（保険金支払い能力）を評価するもの。（理論的には、企業のデフォルト確率をオプション価格モデルで評価するMerton(1974)のバランスシート・アプローチと類似の考え方である。）
- ④ 具体的には、研究計画にあるような個別研究テーマについて包括的に研究を進め、最終年度において保険業の新しい規制のあり方について総合的な政策提言を行うのが研究の本来的目的である。最終成果物は商業出版の予定。

(2) 研究の体制

関連分野の研究実績がある研究者、茶野努・大野早苗・安田行宏・鈴木雅貴・菅野正泰・大塚忠義に加え、植村信保（キャピタス）、増井正幸・浅見潤一（住友生命）、浜崎浩一（ガイカーペンター）、西山昇（アバディーン投信）の各氏ら実務者が研究協力者として研究を行う体制。

2. 研究の計画

(1) 平成25年度

- ① IFRS/IAIS等の国際的会計基準・保険監督規制の制度的枠組み
- ② 伝統的な保険数理（保険会計、保険料計算、責任準備金評価）の問題点
- ③ ソルベンシー・マージン比率に代わる財務健全性指標

(2) 平成26年度

- ① 生命保険契約（責任準備金）の経済価値ベースでの評価
- ② オプション、CDSに代表される代替的なリスク移転手法（ART）
- ③ 伝染リスク、流動性リスク等々新たなリスクの把握

(3) 平成27年度

これまでの研究成果を踏まえ、最終年度に報告書を中央経済社より出版する。

3. 研究の成果

(1) 茶野努・安田行宏編『経済価値ベースのERM—グローバル規制改正とリスク管理の高度化—』（中央経済社）の出版

(2) 最終報告書の概要

本書は、第一部「経済価値ベースのソルベンシー評価」、第二部「ERM実務の進化」、第三部「新たなチャレンジ」の三部構成となっている。第一部では、伝統的な保険数理の限界を明らかにしたうえで経済価値ベースのソルベンシー規制の必要性を説く。そしてこれまでのソルベンシー規制の動向を概観し、ファイナンス理論をもとに保険負債の経済価値評価について考察している。第二部では、ERMにおいて重要なリスク計測手法について、銀行におけ

るその進展過程を整理し、現状の問題点を整理する。続いて、生保、損保のERM実務の現状と将来の方向性について報告されている。また、保険会社の先進的な情報開示について紹介されている。第三部は、伝染リスク、システミックリスクおよび情報開示リスクといったERMにおいて重要になってきている領域について実証分析を行ない、提言を試みる本書のチャレンジングなパートである。

各章の概要は以下の通りである。

第1章では、経済価値に基づくソルベンシー・マージン規制の必要性を明らかにする。伝統的な収支相等の原則のもとでは、保険料に含まれる保守性は計算基礎率に暗黙的に含めざるを得ず、また、ソルベンシー・マージン比率では自己資本のみに焦点をあて責任準備金の十分性を検証していない等の問題がある。これらの問題は、経済価値基準による資産・負債評価により総合的に支払能力を測定することにより解決でき、責任準備金を「最良推定負債」と「リスクマージン」に区分することで保守性を明示することが可能だと指摘する。

第2章では、経済価値ベースの考え方を軸に、EU、米国、日本の各ソルベンシー規制のこれまでの展開や今後の方向性、また、別途検討が進められている国際的な保険のソルベンシー規制の検討状況を概説している。経済価値ベースのソルベンシー規制の下では、資産と負債が市場整合的に評価されることから、経営行動の成果がストレートに反映され、保険会社内のリスクカルチャー醸成に繋がるという利点があると主張する。

第3章は、保険契約のキャッシュフローに内包される様々なリスクの市場整合的な評価方法について、ファイナンス理論を通じて考察している。経済価値ベースのソルベンシー規制が機能するには、市場性を伴わない条件付き請求権の複雑な集合体である、保険負債の経済価値の推計が重要である。最良推定負債およびリスクマージンから構成される保険負債価値が市場整合性を有するためには、特にリスクマージンの部分において、既存の様々な資産価格と矛盾しないようリスクに対する合理的な評価が反映される必要があるからである。

第4章は、現行のソルベンシー・マージン比率は透明性、簡便性、再現可能性を備えておらず、その代替指標としてバランスシート・アプローチによる破綻距離を用いて90年代生保業の破綻を分析し、その有用性が高いことを検証・確認している。そして、経済価値ベースのソルベンシー規制に移行していった後も、第三者が公表された財務情報をもとに健全性評価を行なえるように、当局が情報開示の環境を充実していく必要があるとしている。

第5章は、銀行のバーゼル規制の動向とリスク計測・管理手法の精緻化の関係についてまとめたのち、今後のERMの進展について論じている。VaR法には様々な限界があり、期待ショートフォール、ストレスVaR、ストレステストの実施など欠点を補う手法が追加されている。ERMの態勢整備には計測手法の高度化のみならず、リスクガバナンスの向上や組織内のリスクカルチャーの醸成が望まれる。

第6章は、生保のERMについて、銀行との比較を通じてその特性を明らかにする。銀行は信用供与、生保は保険引受を収益源としており、リスク管理の観点からは、銀行は信用ポートフォリオの管理、生保は評価が困難な保険引受リスクを含むより広範囲なリスク評価が必要である。とくにALMの観点からは、契約が長期にわたり、かつ多様なオプション性をもつ生保は、金利リスクを含めリスク管理実務がより困難であると指摘する。

第7章は、損保のリスク管理の全体像を眺めつつ、保険引受けリスクの中でも損保事業に特有で、かつテールリスクをもつ巨大自然災害リスクとその管理手法について説明する。当該リスクの把握のためのリスク計測モデル（キャットモデル）構造とヘッジ手段としての再保険スキームについて紹介したうえで、キャットボンドなどの資本市場キャパシティの流入によって進んでいる再保険市場の構造変化について述べた後、今後の方向性を示唆している。

第8章は、近年、ERMの導入・高度化に積極的な日本の上場保険会社と、早くからERMに取り組んできた欧州大手保険会社による関連情報開示の現状を分析し、開示によって期待される効果を考察する。欧州では、定量的な開示で日本よりも充実した事例が見られるほか、定性的な開示は量・質ともに充実しているという。ERM関連情報の開示によって、企業活動の成果

だけではなく経営プロセスを伝えることや、投資家による保険事業への理解を深めることを通じ、企業価値評価の適正化につながることを期待できると述べている。

第9章はリスク情報開示の現状と課題について検証する。まずリスク情報の開示状況を概観し、現行のリスク情報が業種特性を反映していること、一方、同業種内での企業間では開示内容がかなり類似していることが銀行業の検証を通じて示される。その上で、リスク情報開示の決定要因とリスク情報の株式市場での評価を実証的に分析し、リスク情報開示量が多いほど企業リスクが高く、投資家視点からリスク情報開示が有用であることが示される。最後に、ERMの観点から、経営者視点に立ちリスク情報開示に期待できることを明らかにする。

第10章は、リーマンショックと欧州ソブリン危機の時期を対象に、主要国の金融機関のCDSスプレッドの決定要因を検証したものである。2008年の世界金融危機の特徴として、極度の信用収縮が起こったが、こうした流動性逼迫がリスク・アペタイト等の変化を通じてCDSスプレッドにどのような影響を与えたかを検証している。とりわけこのような影響が軽微であるとみなされている保険会社にどのような影響が観察されるかに焦点を当てて考察しているのが特長である。

第11章は、最近のグローバルな金融危機を契機として問題となったシステミックリスクについて、再保険によりネットワークが構築されている損害保険会社を「相互連関性」の観点から分析する。モデル分析の結果、先の危機時等では理論上のデフォルト連鎖は検出されなかったものの、単独のデフォルトは数多く検出された。また、ストレステストによれば、先の金融危機時以上のストレスを受けて、一斉に多くの再保険会社が破綻するほどの状況にならないければ、損害保険会社が連鎖の誘因となる存在にはならないだろうとしている。

4. 研究の反省・考察

- (1) 計画通りに最終年度において、茶野努・安田行宏編『経済価値ベースのERM－グローバル規制改正とリスク管理の高度化－』（中央経済社）を出版しており、とくに反省すべき点はないと思料する。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物

茶野努・安田行宏編『経済価値ベースのERM－グローバル規制改正とリスク管理の高度化－』（中央経済社）

学 校 名	立 正 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	国際天然水産資源の総合的フロー分析 －ウナギ資源の市場分析と持続的利用－		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①天然水産資源 ②ウナギ ③資源フロー ④需給構造 ⑤生態系 ⑥持続的利用		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
櫻 井 一 宏	経 済 学 部	准 教 授	ウナギ資源の社会的利用に関する総合的 データ分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 永 龍 起	北 海 道 大 学 学 部 海 洋 生 命 科 学 部	准 教 授	ウナギの生態分析, データ収集

国際天然水産資源の総合的フロー分析 —ウナギ資源の市場分析と持続的利用—

1. 研究の目的

大多数の食料が栽培や畜産など人工的生産手法により確保される現代社会にあって、世界の水産物生産量は天然資源の漁獲・採取が過半数を占めている。また、養殖においてもライフサイクル全てを人工飼育による完全養殖は限定的であり、未だに採取した卵あるいは稚魚・稚貝を育成する不完全養殖が主である。したがって、魚食産業は自然環境に大きく依存し、その変動によって影響を受ける産業であるといえよう。こうした背景から、乱獲や海洋環境の悪化、気候変動などにもともなう天然水産資源の枯渇・減少が懸念されている。特に近年は複数の魚種で極端な漁獲量の落ち込みが記録されており、水産業・食産業へ深刻な打撃を与えている。

そうした中で、わが国において広く認知され人気の高い鰻料理は、特に江戸時代以降夏の風物詩として親しまれてきた。われわれが食用として利用してきたウナギは、世界に19種あるうちのニホンウナギ (*Anguilla japonica*) という種であり、東アジア一帯に生息している。これについて生物学や生態学の観点から種々の研究が進められ、近年目覚ましい成果が得られてきた。例えばその生活史（生態的な視点に基づく生物の一生の変化）は長らく謎とされてきたが、2009年に初めて天然の受精卵が採取され産卵場が特定されるなど、海洋から沿岸、内陸を通して回遊するということが解明された。

昨今、天然水産資源の持続的利用については世界的にも盛んに議論されている。北欧をはじめ一部の国では管理漁業を実践し、資源の保全と経済的利用の両面から成果を挙げているが、わが国の漁業政策においては資源管理が行われているとは言えない。特にニホンウナギに関しては大規模な経済的利用はわが国のみとあってよい状態であったがために、他国による事例はない。世界最大の漁獲者であり消費者であるわれわれは同資源の持続的利用について検討し、実践する義務がある。そのためには、早急かつ正確に資源や利用の現状を把握する必要がある。

本研究では、ニホンウナギを主な対象とし、わが国を中心としたウナギ資源利用に関して総合的な観点から分析を行う。すなわち、天然水産資源であるシラスウナギの採取から養殖や加工を経て消費に至るまでのプロセスの全体像とその構造を把握しモデル的に整理した上で、時間的・空間的推移を含めた総合的資源フローについて分析することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 自然科学的視点に基づいたウナギの生息実態に関する調査

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) をはじめとするウナギ属 (*Anguilla*) の各種・各系統について、日本および諸外国における既存研究のレビューや現地調査を行い、主に以下の3点から自然科学的知見を整理する。

- ① 分布と回遊・生活史のとりまとめ
- ② 着岸と沿岸・陸水域における生息状況調査
- ③ 稚魚および成魚の漁業実態調査

(2) ウナギ資源を用いた加工・生産の実態調査

蒲焼きなどを中心としたウナギ資源の利用に関して、供給プロセスにおける各関係者の実態を調査し、天然資源であるシラスウナギの調達や養殖、加工についてどのような意識を持ち、今後の資源利用や生産をどう考えているか、アンケート・ヒアリングなどによる調査を行う。

- ① 供給プロセスにおける関係者に対する実態調査
- ② 調査による情報のデータ化

(3) 現状調査に基づくウナギ資源の社会的利用実態の分析

ウナギ資源の消費および生産、そして流通などそれぞれのプロセスにおける調査によって得られた情報やデータに基づいて、社会的な資源利用の実態を把握・分析する。

3. 研究の成果

- (1) 自然科学的視点に基づいたウナギの生息実態に関する調査
ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) をはじめとするウナギ属 (*Anguilla*) の各種・各系統について、分布と回遊の現状に関する既存研究のレビューを行った。現状では公的機関等による体系的な生態的データは存在しないため、本研究の共同研究者が中心に実施している観測のデータに基づいて分析を行った。これにより季節や地域による稚魚の回遊状況を明らかにすることができた。
- (2) ウナギ資源を用いた加工・生産の実態調査
蒲焼きなどを中心としたウナギ資源の利用に関して、供給プロセスにおける主体としての生産者にヒアリングを行い、養殖の現状や流通の実態に関して調査を行った。また、外食産業としてのウナギ資源の需給に関して調査を行った。2010年代以降、市場規模が減少しつつあることがわかった。
- (3) 現状調査に基づくウナギ資源の社会的利用実態の分析
ウナギ資源の消費動向と供給の現状に関する情報を整理し、社会的な資源フローモデルに展開する予定でデータ化を実施している。来年度の採択が得られれば、生態的なデータを加味して総合的な分析を行い、社会に発信してゆく予定である。

4. 研究の反省・考察

- (1) 自然科学的視点に基づいたウナギの生息実態に関する調査
生態的実態については、近年の研究の蓄積により整理することが比較的容易いところであるが、量的なデータは十分な蓄積もなく分析が難しいため推測・推計に頼る部分が多いことが注意点である。このことは、社会的にデータ収集の必要性を強調すべきであるといえる。
- (2) ウナギ資源を用いた加工・生産の実態調査
ウナギの供給に関しては、主たる現場としては海外（特に中国）が挙げられるが、実際には国内の生産者のみしか現地調査を実施できなかった。今後、養殖のシステムを含め中国における生産体制について調査したい。
- (3) 現状調査に基づくウナギ資源の社会的利用実態の分析
市場規模を含めウナギ資源の需給についてモデル化することで、収集したデータに基づいて定量的な分析を実施することが可能となる。養殖による生産といっても、ウナギは自然界から稚魚を採取して育て、消費されているという意味では生態的な賦存量が社会的利用量に関連する。今後はこの点について分析を実施する予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
 - ① Nakazato S, Minagawa T, Shirotori F, Shinoda A, Aoyama J, Yoshinaga T* (in press). Ages of the giant mottled eel *Anguilla marmorata* recruited at the northern Luzon Island, the Philippines between 2009 and 2011. *Coastal Marine Science* (accepted on 150510).
 - ② Tsutsui S*, Yoshinaga T, Komiya K, Yamashita H, Nakamura O (in press). Differential expression of skin mucus C-type lectin in two freshwater eel species, *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica*. *Developmental & Comparative Immunology* 61, 154-160 (doi: 10.1016/j.dci.2016.03.027)
 - ③ Tsutsui S*, Yoshinaga T, Watanabe S, Aoyama J, Tsukamoto K, Nakamura O (2015). Skin mucus C-type lectin genes from all 19 *Anguilla* species/subspecies. *Fisheries Science* 81, 1043-1051 (doi: 10.1007/s12562-015-0922-3)
 - ④ Shinoda A*, Yoshinaga T, Aoyama J, Tsuchida G, Nakazato S, Ishikawa M, Matsugamoto Y, Watanabe S, Azanza RV, Tsukamoto K (2015). Early life history of the Luzon mottled eel *Anguilla luzonensis* recruited to the Cagayan River, Luzon Island, the Philippines. *Coastal Marine Science* 38, 21-26.

(2) 口頭発表

- ① Sakurai K and Shibusawa H, “Simulation Analysis of the Regional Economy and Water Environmental Pollutant Emission for Integrated River Basin Management,” *55th Annual Meeting of Western Regional Science Association, Big Island, Hawaii*, 14-17 February, 2016.
- ② 櫻井一宏, “わが国におけるウナギ消費の動向分析,” 日本地域学会第 52 回(2015 年)年次大会, 岡山大学, 2015 年 10 月 10-12 日.
- ③ 櫻井一宏, “日本海に対する国際的環境投資政策の分析,” 日本地域学会第 52 回(2015 年)年次大会, 岡山大学, 2015 年 10 月 10-12 日.
- ④ Sakurai K, Shibusawa H and Nakayama K, “Simulation Analysis of Water Environmental Policy Taking in Consideration of Regional Characteristics: A Case Study of Toyogawa Basin, Japan,” *55th European Congress of the Regional Science Association International, Lisbon, Portugal*, 25-28 August, 2015.
- ⑤ 櫻井一宏・渋澤博幸, “植物工場導入のための流域政策評価モデル,” 日本応用経済学会 2015 年度春季大会, 九州産業大学, 2015 年 6 月 13-14 日.
- ⑥ 前菌孝彰, 白鳥史晃, 篠田 章, 青山 潤, 高野昌和, 嵯峨篤司, 白石 學, 吉永龍起. ウナギ属熱帯種 *Anguilla interioris* の初期生活史. 日本水産学会春季大会. 東京 (2016.3).
- ⑦ 吉永龍起. 熱帯ウナギの接岸生態と保全. うなぎプラネット (日本大学学部連携研究推進シンポジウム). 神奈川 (2015.12).
- ⑧ 山口杏奈, 白鳥史晃, 金澤麻紀, 吉永龍起. 日本で流通する輸入蒲焼. うなぎの未来III - 科学はウナギを救えるか? (東アジア鰻資源協議会・日本支部会 公開シンポジウム). 東京 (2015.7).
- ⑨ 白鳥史晃, 中里 翔, 石川美那, 田中千香也, 青山 潤, 篠田 章, 吉永龍起. フィリピン・ミンダナオ島におけるウナギ属稚魚の種多様性. 日本水産学会春季大会. 東京 (2015.3).
- ⑩ Shinoda A, Nakazato S, Ishikawa M, Yoshinaga T, Tsutsui S, Amiya N, Tanaka Y. Eel River Project: Monitoring Glass Eel Recruitment during 6 Seasons at Sagami River. The 18th Annual Meeting for the East Asia Eel Resource Consortium. Shanghai, China (2015.8).
- ⑪ Nakazato S, Inoue R, Ishikawa M, Toida S, Yoshinaga T. Habitat preference of the Japanese eel *Anguilla japonica* at various developmental stages in the freshwater environment. International Eel Symposium Eel Planet. Tokyo, Japan (2015.6).
- ⑫ Yamaguchi A, Shirotori F, Yoshinaga T. Genetic species identification of the freshwater eels in the Japanese market. International Eel Symposium Eel Planet. Tokyo, Japan (2015.6).
- ⑬ 吉永龍起. 「食卓からウナギがいなくなる!? ～大学で学ぶ, もうひとつの食の安全～」第 18 回大学で学ぼう～生涯学習フェア, 聖セシリア女子短期大学, 神奈川 (2015.7.10)

(3) 出版物

- ① Sakurai K, “Optimal International Investment Policy for the Sea Environment in East Asia: Case Study of the Sea of Japan,” *Socioeconomic Environmental Policies and Evaluations in Regional Science: Essays in Honor of Yoshiro Higano*, Springer. (in press)
- ② Sakurai K, “A Management Policy of Demand-driven Service for Agricultural Water Use in Japan,” *Socioeconomic Environmental Policies and Evaluations in Regional Science: Essays in Honor of Yoshiro Higano*, Springer. (in press)
- ③ Sakurai K, Mitsuhashi K, Kobayashi S and Shibusawa H, “Evaluation of the Water-environment Policy in the Toyogawa Basin, Japan,” *Socioeconomic Environmental Policies and Evaluations in Regional Science: Essays in Honor of Yoshiro Higano*, Springer. (in press)
- ④ 吉永龍起 「ニホンウナギ どうなる国際的な取り引き規制」NHKニュース7 (NHK総合) (2016.1.9; 収録出演)
- ⑤ 吉永龍起 「ウナギ 今年は安い」モーニングバード (テレビ朝日) (2015.7.24; スタジオ出演)
- ⑥ 吉永龍起 「専門家もビックリ・奇跡のウナギ」モーニングバード (テレビ朝日) (2015.5.15; 収録出演)
- ⑦ 吉永龍起 「環境DNA」NHKニュース7 (NHK総合) (2015.5.9; 収録出演)

学 校 名	大 阪 青 山 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	インクレチン分泌を促進する食品成分の検索と分泌促進機構の解明 ー糖尿病の予防・治療を目途とする食品の開発ー		研究分野 家 政 学
キ ー ワ ー ド	①レジスタントスターチ-タイプ4(RS-4) ②RS-4含有食パン ③GLP-1 ④PYY ⑤短鎖脂肪酸 ⑥食欲 ⑦ラット		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
海 老 原 清	健 康 科 学 部	教 授	実験計画・総括、実験結果の解析、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
片 山 洋 子	健 康 科 学 部	教 授	実験指導、実験結果の解析、論文の作成
金 子 雅 文	健 康 科 学 部	教 授	サンプル分析、データ整理
中 西 康 人	健 康 科 学 部	教 授	サンプル分析、データ整理
島 田 良 子	健 康 科 学 部	助 手	実験動物飼育、データ整理

インクレチン分泌を促進する食品成分の検索と分泌促進機構の解明 —糖尿病の予防・治療を目途とする食品の開発—

1. 研究の目的

近年、2型糖尿病患者数は大変な勢いで増加し、その原因は肥満に伴うインスリン抵抗性に依るとされるが、インスリン分泌能の低下をきたしやすい体質的素因に依るところも大きいといわれている。糖尿病の治療は食事療法やインスリン治療が主体であるが、インスリン治療の場合は副作用が指摘されている。

近年、2型糖尿病のインスリン分泌障害に対する新たな治療戦略として、「インクレチン」と呼ばれる消化管ホルモンが脚光を浴びている。「インクレチン」とは、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称であり、これまでにグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（GIP）とグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の2つのホルモンが「インクレチン」として機能することが確認されている。

2型糖尿病は肥満と密接に関連している。肥満は過食が原因である。したがって、食欲の抑制は2型糖尿病の発症抑制および治療において非常に重要である。PYYは摂食を抑制し、肥満を防止する。

GLP-1は分泌後直ちにジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）によって分解されてしまう。そこで、医療の場ではDPP-4阻害剤の使用によりGLP-1の活性を維持させ、膵臓から分泌されたインスリン濃度を維持し、糖尿病治療を進める試みが医療の場で行われている。DPP-4阻害剤の使用は、血中インスリン濃度を維持する1つの手段であるが、たとえDPP-4によってインスリンが分解されるとしても、膵β細胞に作用してインスリン分泌をより促進することにより血中インスリン濃度を維持することも1つの手段である。

昨年、学術研究振興資金の助成のもとにラットを用いた研究で、①食物繊維にGLP-1分泌およびPYY分泌促進作用のあること、②食物繊維のGLP-1分泌促進作用が盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量と相関性のあることを明らかにした。

そこで、本研究では、①食物繊維のGLP-1およびPYY分泌促進作用、DPP-4活性に対する短鎖脂肪酸の関与の有無および程度を明らかにする、②食物繊維を利用したGLP-1およびPYY分泌促進効果を有する食品の開発を試みるための実験を行った。

2. 研究の計画

実験は大阪青山大学倫理委員会の承認を得て実施した。また、ラットは大阪青山大学実験動物にかかわるガイドラインに順守して飼育した。実験動物には9週齢のWistar系雄性ラット（日本SLC株式会社、浜松）を飼育環境に馴化させた後に用いた。

(1) 実験1

ラットでは盲腸が短鎖脂肪酸生成の主要な場である。昨年度の実験で強いインクレチン分泌促進作用が認められたグアーガム酵素分解物（Partially hydrolyzed guar gum、PHGG）を食物繊維源として用い、盲腸切除手術を施したラットと偽手術を施したラットに、PHGGを含まない精製飼料（FF飼料）、FF飼料にPHGGを5%添加した飼料（PHGG飼料）を与え、血中GLP-1およびPYY濃度、体重増加量、体脂肪量、DPP-4活性、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量などについて測定した。

(2) 実験2

食物繊維を利用した糖尿病の予防・治療を目途とする食品の開発にあたっては、毎日無理なく摂取可能な食品を開発することが重要である。毎日無理なく、量的にも摂取可能な食品としては、パン、ご飯、うどんのような炭水化物を主体とする食品が最適と考えた。

本実験では、まずパンについて検討することにした。食物繊維には昨年度の実験でGLP-1およびPYY分泌作用の強かったPHGG、レジスタントスターチ・タイプ4 (RS-4) で置換度の異なる2種類のヒドロキシプロピル化デンプン (HPS: Hydroxypropyl starch)、架橋度の異なる2種類のリン酸架橋デンプン (DP: Distarch phosphate) を用いた。パンへの添加は、小麦粉の20%および40%置き換えて行った (HPS20パン、HPS40パン、DP20パン、DP40パン)。PHGG含有パンは、膨らみも、食感も悪く日常的にヒトが食べるのには非常に難があった。一方、HPS、DP含有パンは、40%の置き換えでも、膨らみ、食感も良く、市販の通常のパンと何ら遜色がなかった。そこで、本実験では、HPS、DP含有するHPSパン、DPパンを用いることにした。

HPS、DPを含まないパン (FFパン)、HPS、DPパンを凍結乾燥し、粉碎して実験に用いた。FF、HPS、DP含有パンの実験飼料への添加量は25%とした。パンに含まれるデンプン、脂質、タンパク質は、実験飼料作成時に核実験飼料が同じになるように調製した。

FFパン含有飼料、HPS20パン含有飼料、HPS40パン含有飼料、DP20パン含有飼料、DP40パン含有飼料の食物繊維量は、それぞれ1 kg 飼料あたり11、65、118、54、111 gであった。

3. 研究の成果

(1) 実験1

体重増加量は盲腸切除によって減少したが、PHGG飼料摂取による影響は認められなかった。飼料摂取量及び肝臓相対重量は盲腸切除やPHGG飼料摂取によって影響されなかった。FF飼料摂取に比べ盲腸組織重量及び内容物重量はPHGG飼料摂取により有意に重たくなった。内臓脂肪 (精巣上体、腎周囲、腸間膜、後腹膜脂肪) および総白色組織重量は盲腸切除により有意に減少した。

盲腸内容物中の酢酸、プロピオン酸、n-酪酸量は、FF飼料摂取に比べPHGG飼料摂取により有意に増加した。

門脈血及び腹部大動脈血中の活性型GLP-1濃度は、偽手術ラットではPHGG飼料摂取によって増加したが、盲腸切除ラットでは増加しなかった。門脈血および腹部大動脈血中の総PYY濃度は盲腸切除およびPHGG飼料摂取により影響されなかった。DPP-4活性はPHGG飼料摂取ラットでは盲腸切除により減少したが、FF飼料摂取ラットでは盲腸切除による減少は認められなかった。腹部大動脈血中のインスリンおよびグルコース濃度は盲腸切除や飼料による影響は認められなかった。

上記のことから食物繊維摂取によるGLP-1、PYY分泌促進効果に短鎖脂肪酸が密接に関与していることが明らかになった。

(2) 実験2

盲腸内容物のpHおよび短鎖脂肪酸量は、FFパン含有飼料摂取に比べHPSパン含有飼料およびDPパン含有飼料を摂取することにより有意に低下および増加した。門脈血中のGLP-1およびPYY濃度は盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量が増加と正の相関性 ($r=0.958$, $P<0.0001$ for GLP-1 and $r=0.974$, $P<0.0001$ for PYY) が認められた。

飼料摂取量は門脈血中のPYY濃度の増加に伴い低下した ($r=0.725$, $P=0.018$)。体脂肪量はHPSパン含有飼料及びDPパン含有飼料を摂取することにより優位に低下した。

HPS、DPのGLP-1、PYY分泌促進作用は製パン後も維持されることが明らかとなり、糖尿病の予防・治療を目途とする食品の開発の有益な知見を得た。

4. 研究の反省・考察

(1) 実験1

食物繊維のインクレチン分泌に回腸を主たる場とするL細胞の関与の他に、大腸を主たる場とする短鎖脂肪酸の関与のあることが示された。しかし、ラットとヒトでは大腸の機能が大き

く異なっており、ラットの実験で得た結果をヒトに演繹することには多々問題もあり、今後はこの溝を埋めていく実験が必要である。今後の課題である。また、短鎖脂肪酸がGLP-1、PYY分泌促進作用のメカニズムを明らかにできなかった点も今後の課題として残っている。

(2) 実験2

レジスタントスターチ・タイプ4はインクレチン分泌に有効な素材であり、製パンに応用してもGLP-1分泌促進効果や食欲制御に関係するPYY分泌促進効果が担保されることが明らかとなった。実験1と同様に実験動物（ラット）での実験であり、実際にヒトで効果を示すかは不明である。今後はこの点についての研究が必要であり、今後の課題である。パンと同様に、糖尿病の予防・治療を目途とする食品の開発と考えられる米飯、麺類の開発まで実験が及ばなかったことは反省すべき点である

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shimada R, Ebihara K. (2015) Plasma GLP-1 concentration and dipeptidyl peptidase-4 activity in rats fed partially hydrolyzed guar gum are affected, not plasma PYY concentration, by cecectomy. *Jpn Pharmacol Ther* 43(10) 1481-1486.
- ② Shimada R, Yoshimura M, Murakami K, Ebihara K. (2015) Plasma concentration of GLP-1 and PYY in rats fed dietary fiber depend on the fermentability of dietary fiber and respond to an altered diet. *Int J Clin Nutr Diet* (2015) 1:103 <http://dx.doi.org/10.15344/incnd/2015/10>
- ③ Shimada R, Tachibe M, Ebihara K. (2016) Type 4 resistant starch (RS-4) enriched breads increase portal vein plasma GLP-1 and PYY concentration. *Jpn Pharmacol Ther* 44(7) In press.

(2) 口頭発表

- ① Shimada R, Katayama Y, Ebihara K. Plasma GLP-1 concentration is increased in non-operated rats fed fermentable dietary fiber, but not in cecectomized rats. 12th Asian Congress of Nutrition 2015, May 14-18, 2015, Yokohama, Abstract p.162.
- ② Shimada R, Katayama Y, Ebihara K. Decrease of plasma GLP-1 concentration and DPP-4 activity in rats fed partially hydrolyzed guar gum by cecectomy. 6th International Dietary Fibre Conference 2015, June 1-3, 2015, Paris, Abstract p.107.

(3) 出版物

なし

学 校 名	中 村 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	乳がんを制御する食因子に関する基礎及び臨床疫学的研究 －制がん標的としての増殖／生存シグナルの解析－		研究分野	家 政 学
キ ー ワ ー ド	①乳がん ②一次予防 ③制癌作用 ④フィトケミカル ⑤症例対照研究 ⑥細胞周期 ⑦シグナル伝達 ⑧アポトーシス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 野 修 治	栄 養 科 学 部	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
竹 嶋 美 夏 子	栄 養 科 学 部	講 師	食事因子の乳がん発症モデル動物における乳がん発症予防の研究および乳癌細胞におけるシグナル伝達制御
小 野 美 咲	栄 養 科 学 部	助 教	乳がん細胞におけるシグナル伝達制御及び乳がんの発症に関与する食事性因子の検討

乳がんを制御する食因子に関する基礎及び臨床疫学的研究 －制がん標的としての増殖/生存シグナルの解析－

1. 研究の目的

(1) 乳がん制御に関する食因子の疫学的研究

本邦で増加が著しい乳癌はその発症が食習慣に密接に関連していることが示されている。このため九州地区の乳がん専門施設において大規模な食事調査を実施し、乳がん患者と非がん者の食事成分を比較する症例対照研究を行うことにより乳がんの発症を抑制あるいは促進する食事性因子を明らかにする。

(2) 乳がん制御に関する食因子の予防効果研究

植物由来の生化学物質（フィトケミカル）は、その抗酸化作用および抗炎症作用により、癌化をイニシエーションやプロモーションの段階で抑制することが推定されている。大豆イソフラボン、リコペン、カテキン、ノビレチン、レスベラトロールなどのフィトケミカルが真に乳癌発症を予防可能かどうか、我々が開発したEMS誘導乳癌発症モデルラットを用い検討する。

(3) 乳がん制御に関する食因子の分子機序解析研究

フィトケミカルのもつ抗酸化作用・抗炎症作用に比べ、フィトケミカルの癌細胞に対する直接の制癌作用のメカニズムはほとんど知られていない。受容体発現の異なる種々の乳癌細胞を用い、制がん標的としての増殖/生存シグナルを分子レベルで解析し、標的蛋白を同定する。

以上(1)～(3)の基礎及び臨床疫学的研究を通して、臨床応用への可能性検討および基礎情報構築により乳がんの一次予防や治療に応用することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 乳がん制御に関する食因子の疫学的研究

すでに倫理審査を通過した九州各県の29施設が登録され、各施設に調査員（管理栄養士）を派遣し、栄養素等摂取状況、生活習慣、身体活動状況などの調査を行っている。これらの調査を継続し、症例対照研究の累積症例数を増やす。臨床情報は各登録施設の医師が診断し提供される。

(2) 乳がん制御に関する食因子の予防効果研究

抗がん作用のあるフィトケミカルの乳癌発症動物モデルでの検証：我々が開発したEMS誘発ホルモン依存性乳癌発症モデルラットを使用し、フィトケミカルの予防効果を検討する。検討するフィトケミカルとしては、われわれがすでに細胞実験により抗腫瘍効果および機序を同定しているリコペンと大豆イソフラボンとする。血中濃度の測定や形成された乳がんの病理組織のERやPR、Her2などの発現を調べることにより、感受性のあるサブタイプを決定し予防機序を推定する。

(3) 乳がん制御に関する食因子の分子機序解析研究

ホルモン陽性乳癌細胞（MCF-7）およびHer2増幅乳癌細胞（SK-BR3）、トリプルネガティブ乳癌細胞（MDA-MB-468）の3つの発現パターンの異なるタイプの細胞特性をもった乳癌細胞を使用し、乳がん発症予防に関与するフィトケミカルの作用を細胞増殖、細胞周期、アポトーシス誘導から解析する。増殖抑制効果をWSTアッセイで、細胞周期解析をフローサイトメトリー（FACS）で、アポトーシスに対する作用をFACSとPARP切断法により測定する。またウエスタンブロットにより、PI-3K-Akt-mTOR経路、Ras-Raf-Erk経路、アポトーシス関連因子（Bcl-2, Bax, Bad, NF- κ B）、さらにmTORの基質であるS6K1と4EBP-1などの活性化を検索することで、関わっている増殖/生存シグナルを特定する。

3. 研究の成果

(1) 乳がん制御に関わる食因子の疫学的研究

すでに倫理審査を通過した九州各県の29施設が登録され、各施設に調査員（管理栄養士）を派遣し、栄養素等摂取状況、生活習慣、身体活動状況などの調査を行っており、エントリー数を増やしている。

(2) 乳がん制御に関する食因子の乳癌発症予防効果と担癌ヌードマウスによる腫瘍増殖抑制の研究

① リコペンは細胞実験によって3つのサブタイプの乳癌細胞に対し、生理学的血中濃度で増殖抑制効果が示されており、特にトリプルネガティブの乳癌細胞に効果があった（Cancer Sci. 2014）。さらにEMS誘発ホルモン依存性乳癌発症モデルラット（Cancer Lett. 7:79-84, 1979）を使用して、リコペンを高含有するトマトパウダーを投与し、リコペンの乳癌予防効果を検討した。リコペン添加群は無添加群と比較し、発症を遅らせることはできなかったが、無添加群が100%腺癌を発症するのに対し、添加群では6割以上が嚢胞状腺癌を形成した。このためリコペンはより分化した乳癌組織を作る傾向がみられた。現在、病理組織と血清リコペン濃度の関連を解析している。

② エストロゲン受容体陽性細胞に対し相乗的に増殖抑制を起こす大豆イソフラボンのゲニステインとエコールの併用投与を行い、リコペンと同様、予防効果を検討した。併用添加群においてやや腫瘍未発生期間は長かったものの有意差はなかったが、形成腫瘍重量に関しては併用添加群が有意に低かった（現在論文作成中）。

③ メトキシレスベラトロールはトリプルネガティブ乳癌細胞であるMDA-MB-468に感受性が強く、このため乳癌増殖抑制効果をMDA-MB-468乳癌細胞を皮下移植した担癌ヌードマウスで検証した。メトキシレスベラトロールは腫瘍の増殖をわずかながら抑制したため、乳癌発症や再発抑制にも有効である可能性が示唆された。

(3) 乳がん制御に関する食因子の分子機序解析研究

① 大豆イソフラボン成分の乳癌細胞増殖抑制効果の検討—とくに併用における相乗作用について：化学構造の異なる大豆イソフラボン主要4成分（ゲニステイン、ダイゼイン、エコール、グリシチン）の乳癌細胞増殖抑制効果を、サブタイプの異なる3種の乳癌細胞を用い検討した。エストロゲン受容体陽性のMCF-7においてゲニステインとエコールの併用は他の組み合わせと比較し、強い相乗的な増殖抑制を示した。この相乗作用の機序はFACS解析から細胞周期抑制とアポトーシス誘導が主要因であることが示唆された。Her2陽性のSK-BR-3やトリプルネガティブの乳癌細胞MDA-MB-468では相乗作用は見られず相加効果を示した。（Food Chemistry 2016 in press）。さらにMCF-7におけるゲニステインおよびエコールの相乗作用の作用機序を単独添加と併用添加で比較検討し、詳細な分子機序の解析を行った。ゲニステインおよびエコール単独ではほとんどアポトーシスを示すsubG1分画は増加しないが、併用ではsubG1分画が3倍に増加し、同時にDNAの断片化を示すcleaved PARPの顕著な増加がみられた。さらにアポトーシスを抑制するAkt-mTOR経路の活性が低下し、抗アポトーシス蛋白であるBcl-xLの減少、アポトーシス誘導蛋白のBaxが増加した。このためゲニステインとエコールの併用はエストロゲン受容体陽性乳癌細胞に対してBax/Bcl-xL比の上昇により強力なアポトーシスを誘導することが示された。アジア人女性は腸内細菌によりダイゼインをエコールへの転換するエコール産生能力が高いことが報告されており、本研究結果は、アジア人女性が西洋に比較し、乳癌罹患リスクが低いという一つの理論的根拠となりうると思われる（Cancer Science 2016 in press）。

② メトキシレスベラトロールの乳癌細胞増殖抑制効果の検討：バイオアベイラビリティの高いメトキシレスベラトロールはリコペンと同様にトリプルネガティブの乳癌細胞MDA-MB-468に対し効果を示し、細胞周期をG1に停止させ、AKT-mTORのシグナルを抑制した。

4. 研究の反省・考察

(1) 乳がん制御に関する食因子の疫学的研究

本研究は調査を進行させ、登録者数を増やすことができたが、目標登録者数に届かず、論文として報告することができなかった。今後も調査を進め、登録者数を増やし統計解析する。

(2) 乳がん制御に関する食因子の予防効果研究

平成27年度は、細胞実験で分子レベルの抗癌機序が解明した大豆イソフラボンのゲニステインとエクオールを併用投与する動物実験およびリコペンについて実施した。本研究で用いる乳癌モデルラットは、発癌剤であるEMSを低濃度で長期間投与する実験系であり、自然発症に近い利点があるが、乳がん発症までの実験期間が長く、結果が得られるのは次年度になる。

(3) 乳がん制御に関する食因子の分子機序解析研究

平成27年度は、①大豆イソフラボン、②レスベラトロールの乳癌に対する抗癌分子機序を明らかにし発表した。計画時の候補フィトケミカルであったカテキンに関して細胞増殖抑制効果は見いだせているため、現在、分子機序の解析を進めている。フィトケミカルは抗がん剤と比較し、ターゲットとする分子が複数であるため、標的蛋白の解析に時間がかかる。今後はDNAマイクロアレイやプロテオーム解析などにより効率的にターゲットの同定と分子機序を解析する実験系を検討している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Misaki Ono, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Mechanism of the Anticancer Effect of Lycopene. THE ENZYMES, edited by Bathaie S. and Tamanoi F., Academic Press., 37: 139-166, 2015. 査読有

② 小野美咲、Chen Chen、竹嶋美夏子、中野修治. ノビレチンによる乳癌細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導作用-サブタイプ別機序解析 総説. 果汁協会報 5: 14-22, 2015. 査読無

(2) 口頭発表

① 小野美咲、中野修治. ゲニステインおよびエクオールの併用添加ヒト乳癌細胞に対しアポトーシスを相乗的に誘導する. 第74回日本癌学会学術総会 名古屋 2015年10月9日

② 竹嶋美夏子、小野美咲、甲斐田遥香、脇本麗、中野修治. EMS誘発性乳癌モデルラットにおけるリコペンの予防的効果の検討. 第57回果汁技術研究発表会 東京 2015年9月25日

③ 竹嶋美夏子、小野美咲、中野修治. リコペンによる乳癌細胞のサブタイプ別増殖抑制作用の機序解析. 第62回日本栄養改善学会学術総会 福岡 2015年7月11日

④ Misaki Ono. Mechanism of the anticancer effects of soy isoflavones on breast cancer. 遼寧腫瘍病院海外研究交流会議 中国遼寧省 2015年7月8日

⑤ Shuji Nakano. The molecular targets of phytochemicals in cancer signaling and their application to the prevention and treatment of breast cancer. 遼寧腫瘍病院海外研究交流会議 中国遼寧省 2015年7月8日

⑥ 小野美咲、中野修治. ゲニステインおよびエクオールの併用添加はそれぞれの大豆イソフラボン単独添加と比較しヒト乳癌細胞に対しアポトーシスを相乗的に誘導する. 第22回日本がん予防学会総会 さいたま 2015年6月6日

⑦ Rei Wakimoto, Mikako Takeshima, Misaki Ono, Takako Higuchi, Shuji Nakano. Methylated resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in three subtypes of human breast cancer cell lines. 第69回日本栄養・食糧学会大会合同大会 横浜 2015年5月16日

⑧ Mikako Takeshima, Misaki Ono, Takako Higuchi, Rei Wakimoto, Shuji Nakano. Effects of dietary lycopene rich tomato powder on rat mammary carcinogenesis induced by ethyl methanesulphonate. 第69回日本栄養・食糧学会大会合同大会 横浜 2015年5月15日

⑨ Misaki Ono, Kaoru Ejima, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Mechanistic study of synergistic interaction between genistein and equol in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. 2015 American Association for Cancer Research Philadelphia, PA 2015年4月19日

(3) 出版物

小野美咲、中野修治. 最新 臨床栄養学(第2版): 新ガイドライン対応 (担当:分担執筆, 範囲: 第22章 癌) 光生館 311-324 2015年

学 校 名	郡山女子大学短期大学部	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	微細藻類を利用したバイオテクノロジーの教材開発 ーボツリオコッカスの培養及びオイル抽出ー		研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①微細藻類 ②生物教材 ③バイオテクノロジー ④オイル抽出 ⑤ボツリオコッカス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
伊 藤 哲 章	幼 児 教 育 学 科	講 師	研究総括、微細藻類の培養及び論文執筆

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 高 泉	筑波大学大学院 人間総合科学研究科	教 授	論文執筆
佐々木 秀明	いわき明星大学 科学技術学部	准 教 授	微細藻類の培養実験及びデータ整理

微細藻類を利用したバイオテクノロジーの教材開発 ーボツリオコッカスの培養及びオイル抽出ー

1. 研究の目的

近年、食用農作物や廃材と競合しないバイオマスエネルギーとして微細藻類に注目が集まっている。微細藻類をバイオマスエネルギーとして活用する研究は、国内においても産学連携した取り組みが見られ実用化に向けて研究が本格化している。本研究では、微細藻類ボツリオコッカスからのオイル確認実験を中心としたバイオテクノロジーの教材開発を目的とする。

この目的を達成するために、以下の下位目標を設定する。

- (1) 普通高校の生物実験室で実施可能な微細藻類の培養方法及び簡便なオイル抽出方法を明らかにする。
- (2) 微細藻類からオイルを抽出する実験を中心とした教材とその指導法を開発する。
- (3) 教材を評価するため、授業の映像やプロトコル、また質問紙調査やインタビュー調査の結果を分析し、教材の有効性を明らかとする。
- (4) 分析結果から教材の導入方法や教育効果について検証し、改善を加えた上でマニュアル化し汎用化する。

2. 研究の計画

- (1) 微細緑藻ボツリオコッカスを培養し、実験を重ねて最も効率的な培養方法を確立する。
- (2) ボツリオコッカスからオイルを確認する実験を行い、普通高校の平均的な設備を備えた生物実験室で簡便にオイルを確認する方法を検証する。
- (3) 高等学校生物分野において微細藻類の実験を導入する学習単元を選定する。
- (4) 生徒の学習活動や授業計画を作成する。この計画をもとに個々の授業の教材・指導法を検討し、指導案を作成する。授業の前後に実施する生徒対象の質問紙調査、また生徒・授業者対象のインタビュー調査の質問項目も作成する。
- (5) 対象となる高校へ授業の実施を依頼し、開発した実験教材をもとに予備実験を行う。この予備実験で得た反省点を踏まえて教材を改善した後、実際に高校の生物授業で実践する。

3. 研究の成果

(1) 培養状況測定

まず、ボツリオコッカスの培養状況測定実験を始めるには、保存施設より入手したボツリオコッカスの総量を増加させる必要がある。保存施設から送付される際、ボツリオコッカス NIES-2199は寒天培地、同じく NIES-836は液体培地で培養されているが、それぞれの株を AF-6 液体培地で試験管培養を 1 ヶ月ほど行い藻体の総量を増加させた。1 ヶ月間の培養によって試験管の培養液の色が無色透明から黄緑色に変わり、肉眼でもボツリオコッカスの総量が増えていることがわかる。1 ヶ月間の培養条件は次の通りである。明暗周期は12時間明期-12時間暗期、光照射は6000lx照射、室温は電気定温器により25℃を保ちながら振とう培養を行い、試験管の栓は通気性のあるシリコセンを利用した。なお、実験で用いた AF-6 液体培地は保存株を安定的に培養できる液体培地であり、保存施設より購入して用いた（約10mLの培地入り試験管が10本で6,000円）。AF-6 培地の組成は保存施設のWEBサイトに掲載されているが、AF-6 培地の硝酸イオン濃度は約120mg/L、リン酸イオン濃度は約10mg/Lである。通常、自然の湖沼では富栄養状態でも硝酸イオン濃度が1mg/L程度、リン酸イオン濃度が0.1mg/L程度であるので、AF-6 培地の栄養塩類濃度は非常に高いといえる。

続いて、ボツリオコッカスの培養状況測定実験を実施した。一般に、微細藻類の培養状況測定方法は乾燥重量による測定と吸光度による測定の2つの方法がある。乾燥重量による測定は、

最初にろ紙の重量 (a) を測定し、次に培養液中に存在する藻体をろ過し乾燥させた後、ろ紙の重量 (b) を測定する。最後に (b) - (a) を計算して藻体量を計測する。また、吸光度による測定はある波長の光を培養液に当て、光の弱まり具合 (吸収の度合い) で藻体密度を推測する。乾燥重量による測定は藻体量が大量にないと継続して測定することが難しいため、今回は分光光度計を用いて吸光度を測定して培養状況を測定した。実験では、ボツリオコッカスを培養した試験管に600nmの光を照射し、藻体の密度を測定した。培養条件は前述と同様であるが、培地はAF-6培地ではなくChu13改変培地 (液体培地) を作成して用いた。Chu13改変培地は、ボツリオコッカスの総量を増やす際によく使われる液体培地でAF-6よりもさらに栄養塩類が多い培地である。吸光度による測定は週に2回程度行い、120日間の培養期間で合計36回の測定を実施した。また、吸光度を測定する際、ボツリオコッカスは沈殿する性質があるため、直前にヴォルテックスミキサーで密度をなるべく均一にしてから測定を行った。培養はNIES-2199が9本の試験管、NIES-836が10本の試験管で実施した。

(2) 光学顕微鏡による観察

次に、ボツリオコッカスのコロニーを光学顕微鏡 (600倍) で観察した。どちらの培養株も肉眼でコロニーの存在を確認できるほど、大きく成長していた。また、光学顕微鏡では、ボツリオコッカスの細胞内にある葉緑体の観察も可能であり、NIES-836には細胞の周囲にオイルが蓄積している部分を確認できる。また、NIES-2199はプレパラートのスライドガラスの上を軽く押しつぶすと中央部にオイルが集まった。NIES-836も同様に押しつぶしを行ったが、NIES-2199のようにオイルを確認することはできなかった。

(3) オイル測定

次に、ボツリオコッカスのオイル生成量を測定した。測定は、油分測定試薬セットを利用した (1セットで20回測定可能、販売価格18,000円、共立理化学研究所製)。このセットは排出基準程度の水中のオイルを検水量40mL、約15分の時間で測定することができ、排水管理や油の流出事故の現地調査などのために考案されたものである。こちらも分光光度計 (660nm) を用いることで5~60mg/Lの範囲のオイルを測定することができる。本実験で実施した培養液のオイルはこの測定範囲を超えてしまうため、ボツリオコッカスの培養液を20倍に希釈して実験をおこなった。前述の120日間の培養を行ったNIES-2199及びNIES-836の水中のオイルを測定した。なお、オイルの測定法は共立理化学研究所のWEBサイトに記載されているのでここでは簡単に述べる。まず、検水を専用の瓶に入れ試薬 (R-1) を加える。次に、激しく振とうして、試薬 (R-2、R-3) を加える。再度、激しく振とうし、その後70℃以上のお湯で5分間湯煎する。再度、激しく振とうし、その後静置して白い塊が浮くのを待つ。再度、瓶を3分間湯煎し、その後シリンジで中の検水のみ抜き取る。次に、瓶に試薬 (R-4) を加え、白い塊を激しく振とうして溶かし測定液とする。最後に、分光光度計 (または専用のオイル測定計) を用いて測定液の透過光濁度を測定し、オイル濃度を得る。

4. 研究の反省・考察

(1) 培養状況測定

まず、ボツリオコッカスの培養状況測定実験について考察する。NIES-2199は培養を開始して60日ぐらいまでは指数関数的に増殖し (対数期)、それ以降は増殖が停止し (定常期)、100日以降は細胞数が減っていった (死滅期)。一方、NIES-836は今回の培養条件では定常期にはいるまでには至らなかった。多くの微細藻類は1日に1分裂、つまり2倍の増殖が可能であるといわれているが、ボツリオコッカスの倍加時間は7~20日であり、極めて遅い増殖といえる。NIES-2199は培養を開始して40日ぐらいで肉眼でもコロニーの存在を確認できた。本実験の培養条件において増殖速度は、NIES-836よりもNIES-2199のほうが速いことが明らかとなった。

(2) 光学顕微鏡による観察

次に、ボツリオコッカスの光学顕微鏡写真について考察する。ボツリオコッカスが他のオイ

ル産生微細藻類と異なるのは、オイルを細胞内だけでなく細胞間に溜め込む点である。そのためオイルの精製の作業が煩雑にならないという大きな特徴をもつ。また、オイルの確認には、Nile Redという試薬で染色してから蛍光顕微鏡で観察することができるが、蛍光顕微鏡は高額であり中学・高等学校で使用することは難しい。また、オイル回収工程は乾燥や加熱といった溶媒抽出が必要であり、通常の中学・高等学校の理科実験室では行うことはできない。しかし、プレパラートの押しつぶしによってボツリオコッカスからオイルが滲出す様子を観察できるので、オイルを作り出していることを間接的に確認することができる。

(3) オイル測定

最後に、オイル生成量について考察する。オイル回収は複雑な工程を必要とするが、培養液中に含まれているオイル生成量の測定は油分測定試薬セットを使うことで可能といえる。測定の結果、オイル濃度はNIES-836よりもNIES-2199のほうが高いことがわかる。これは、増殖速度がNIES-836よりもNIES-2199が高いため、培養期間内により多くのオイルをNIES-2199がつくりだしたといえる。よって、以上のボツリオコッカスの培養状況測定実験、光学顕微鏡による撮影及びオイル測定結果によりNIES-836よりもNIES-2199のほうが、中学校理科及び高等学校の生物分野での実験教材として適しているといえる。

(4) まとめ

本研究では、微細藻類ボツリオコッカスを用いて中学校理科及び高校生物における教材化を目指し、国立環境研究所微生物系統保存施設よりNIES-836とNIES-2199を入手して実験を行った。その結果、次の三点が明らかとなった。第一に、ボツリオコッカスNIES-836よりもボツリオコッカスNIES-2199のほうが増殖は速い。第二に、ボツリオコッカスは40日ほどの培養でコロニーを形成し、プレパラートの押しつぶしによってオイルが滲出する様子を確認できる。第三に、油分測定試薬セットを用いることでボツリオコッカスが作り出すオイルを安価で定量的に測定することが可能である。ボツリオコッカスは増殖速度が遅いが、増殖速度が従来のボツリオコッカスの100倍の速度のボツリオコッカスも国内で見つかっている。また、培養条件を工夫することで、より短い期間で定常期まで培養することが可能である。今後は、中学校理科及び高等学校生物でのボツリオコッカスの教材化に向けて授業実践などを行い、更に検討を重ねて行く必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

伊藤哲章・佐々木秀明、「高校生物における微細藻類ボツリオコッカスを用いた実験」日本科学教育学会年会論文集39、316-317頁 2015

(2) 口頭発表

伊藤哲章・佐々木秀明、「高校生物における微細藻類ボツリオコッカスを用いた実験」日本科学教育学会第39回年会、平成27年8月

(3) 出版物

なし

学 校 名	国 際 基 督 教 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	私学高等教育の新たな国際化戦略 ー小規模私立大学の持続可能な成長に向けてー		研 究 分 野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①私立高等教育 ②グローバル・ネットワーク ③国際教育 ④コミュニケーション能力 ⑤リベラルアーツ ⑥アクション・リサーチ ⑦システム・アプローチ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鄭 仁 星	教 養 学 部	教 授	総括、パイロット・プロジェクトのデザイン及び運営管理

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 村 幹 子	教 養 学 部	上 准 教 授	国際ネットワークの構築企画・デザイン、アクション・リサーチの評価分析補佐
笹 尾 敏 明	教 養 学 部	教 授	アクション・リサーチのデザイン・評価分析、プロジェクト・ウェブサイトの運営管理補佐
呉 恵 卿	教 養 学 部	専 任 講 師	パイロット・プロジェクトにおける言語教育のデザインおよび運営管理補佐
清 水 安 夫	教 養 学 部	上 准 教 授	パイロット・プロジェクトのガバナンスのデザインおよび運営管理補佐

私学高等教育の新たな国際化戦略

—小規模私立大学の持続可能な成長に向けて—

1. 研究の目的

グローバル化した知識基盤社会において次世代を育成するため、高等教育は様々な革新を生み出し、グローバルな次元での競争力に貢献する高度な知識を持った人材を輩出しなければならないとされている。これまで、我が国の大学はこうしたグローバル化に対応したスキルをもった人材輩出に対応していないと批判されてきた (Burgess, et al, 2010)。本研究課題は、よりグローバルな視点から、広い視野で高等教育システムを見直し、将来に向けて競争力のある人材育成のあり方を模索することが喫緊の課題であるとの認識の下、中小規模の私立大学の国際競争力と持続可能性に焦点を当て、我が国における私立大学システムの将来をデザインすることを視野に入れたものである。具体的には、現在、我が国でも注目が集まっているリベラルアーツ大学を軸に、国内外の中小規模の私立大学の中で、就学状況を維持しつつ、国際的な労働市場に卒業生を輩出し、国際的な教育研究開発事業を推進している事例を詳細に研究・分析し、そうした大学の共通性や特徴を明確にすることを試みる。

2015年度は、小規模私立大学の国際競争力と持続可能性に焦点を当て、我が国における私立大学システムの将来をデザインすることを見据え、以下の目的を設定する。

- ① 昨年度の調査に基づき、パイロット国際教育プログラムを開発することにより国際競争力と持続可能性にインパクトのある方法論を模索する。
- ② 幅広い連携によりパイロット・プロジェクトのスケールアップの方法を編み出す。

2. 研究の計画

(1) パイロット国際教育のデザイン

- ① 国際会議を組織し、共同事業の可能性を検討する。
- ② 国際基督教大学を含む選定されたモデル大学からの教育研究者がパイロット・プログラムをデザインする。
- ③ パイロット・プログラムを実施、モニタリング、評価し、国際会議を開催する。

(2) グローバル研究ネットワークの立ち上げ

パイロット・プログラムに関わった教育研究者、大学院生、国内外のリベラルアーツ大学の研究者をメンバーとする幅広いネットワークを立ち上げる。

(3) プロジェクト・ウェブサイトのコンテンツの充実化

- ① パイロット・プログラムのデザインを可視化する。
- ② パイロット・プログラムの進捗を公表する。

3. 研究の成果

(1) パイロット・プログラムのデザインと実施

- ① 日本と韓国の二国間において、異文化間コミュニケーション能力 (intercultural communication competencies) を促進するためのパイロット・プログラムをデザイン・開発して実施した。
- ② パイロット・プログラムに参加した学生の経験、異文化理解と言語学習を評価し、国際フォーラムにおいて研究成果を発表した。

(2) 研究成果の発信と共同研究の促進

- ① 国際ワークショップIの開催 (2015年6月18日～19日) : リベラルアーツ・パイロット・プログラム開発および未来のリベラルアーツ教育のためのグローバル研究ネットワーク (GRN) に関する国際ワークショップを開催した。10の研究発表を行い、東アジアのパートナー候補機関とこれまでの研究成果を共有し、パイロット・プログラムの企画・実施および

評価方法について検討し、東アジアおよびその他の地域の諸機関との研究ネットワーク構築について討議した。

② 国際ワークショップIIの開催（2016年2月26日～27日）：リベラルアーツ教育の多文化・学際的なアプローチの実践に関する国際ワークショップを開催し、グローバル研究ネットワーク（GRN）における共同アクションリサーチの進捗と成果を共有し、11の研究発表を通して多文化・学際性を反映したプログラムの策定方法等について議論した。また、さまざまな地域のリベラルアーツ大学とともに更なる共同研究および教育ネットワークを構築した。

(3) リベラルアーツ教育のためのグローバル研究ネットワーク（GRN）

2015年6月19日にリベラルアーツ教育のためのグローバル研究ネットワーク（GRN）を設立した。設置目的は、アジアおよびその他の地域におけるリベラルアーツ大学またはリベラルアーツ教育プログラムに従事する研究者・教員の間での共同研究を促進するためである。具体的には、高等教育機関におけるリベラルアーツ教育の利点と課題の特定および更なる改善のための政策およびモデルの立案を行う。現在、アジア、北米、欧州の16のリベラルアーツ大学に所属する19名によって構成されている。この研究者ネットワークの成果物として、2016年3月に東アジアのリベラルアーツ教育に関して分析した書籍を出版した。

(4) GRN Website

新たなGRNのウェブサイトを立ち上げ、ワークショップの内容等を随時報告し、内容の充実化を図った。アドレスは以下の通り。<http://grnl.weebly.com/>

4. 研究の反省・考察

(1) パイロット・プログラム

共同パイロット・プログラムにおいては、学期のスケジュール、授業のモジュール、履修者登録数が判明する時期等が異なる関係上、パートナー機関の調整に時間を要し、途中でパートナーの変更を余儀なくされた。組織間の共同プログラムの場合、各機関の授業時間やスケジュール調整を予め十分に考慮すべきであった。

(2) 2つの国際ワークショップの成果

2つの国際ワークショップを通して、国際的な研究者と協働し、本プロジェクトの成果となる2冊目の著書『リベラルアーツ教育のグローバルな事例』を刊行するためのプロポーザルを策定した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① International Workshop I on Liberal Arts Pilot Program Development & Global Research Network for Future Liberal Arts Education (18 - 19 June, 2015) における Global Research Network for liberal arts education に関する発表

② International workshop II on Practicing Liberal Arts Education: Multicultural and Multidisciplinary Approaches (26 - 27 February, 2016) におけるパイロット・プログラムの実施および成果に関する発表

③ Jung, I. (2015). Liberal Arts Education as An Approach to Improving International Competitiveness of East Asian Higher Education. Presented in the Academic Conference on Higher Education in East Asia (Nov. 14, 2015), Tokyo.

(3) 出版物

① Two Proceedings for International Workshops I and II

- ② Springer社より英文書籍として出版（『東アジアのリベラルアーツ教育および大学—グローバルな時代における可能性と挑戦 (Liberal Arts Education and Colleges in East Asia: Possibilities and Challenges in the Global Age) 』2016年3月出版

学 校 名	洗 足 学 園 音 楽 大 学	研究所名等	音 楽 感 受 研 究 所
研 究 課 題	聴覚障害者に対する音楽聴取補助の研究 ー音楽による感動を共有するためにー		研究分野 教 育 学
キ ー ワ ー ド	①聴覚障害 ②人工内耳 ③補聴器 ④磁気ループ ⑤難聴者 ⑥情報保障 ⑦音楽 ⑧音楽聴取		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 岸 博	音 楽 学 部	教 授	代表者

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
万 代 晋 也	音 楽 学 部	学 長	顧問
松 本 祐 二	音 楽 学 部	講 師	総括・研究実施・分析・論文作成
丸 山 典 子	神奈川県立津久井高校	講 師	研究実施・分析・論文作成
森 美 咲	Bloom 音 楽 教 室	代 表	研究実施・データ整理
安 里 圭 一 郎	K-A-PLANNING	代 表	研究実施・データ整理

聴覚障害者に対する音楽聴取補助の研究 —音楽による感動を共有するために—

1. 研究の目的

最近、コンサート会場に於いて開演前のアナウンスに補聴器着用者へ装着状態の確認を促す案内が入るようになった。これは、補聴器の「ハウリング」が雑音となり、他者の音楽聴取に支障を来すことが増しているからである。補聴器のハウリングは補聴器が外耳道に正しく装着していないために発生する他に、補聴器の音量を上げ過ぎていることも大きな要因である。ハウリングが発生していることを補聴器着用者自身が気付くことは少なく、周囲の人のみならず本人も気まずい結果となり、補聴器着用者がコンサートホールでの音楽聴取を諦めてしまうことに繋がってしまう問題がある。

日本医師会や日本補聴器工業会の調査によると、国内の難聴者数は1000万人以上と推定されるという報告がある。また近年、新生児スクリーニングの普及により、乳児期から難聴の早期発見が可能となり、補聴器や人工内耳を乳幼児期から使用するケースが今後も増加していくことは確実であると言われている。しかし、難聴児を持つ親は、子供の言語聴取力向上に力を入れるが、難聴であるが故に音楽聴取は後回しにされてしまう傾向にあることも否定できない。

人工内耳着用者が言語聴取の獲得後に望むことは音楽聴取であるという調査報告がある。しかし、人工内耳では健聴者と同様の音楽聴取は困難であることと、その聴こえから音楽聴取を諦めてしまう人工内耳着用者も少なくない。

このように、補聴器のハウリングや人工内耳での聴こえにより、難聴者が音楽聴取から遠ざかってしまう環境下にあるのが現状である。

補聴器のハウリングを回避し、補聴器や人工内耳での「聞こえ」を補助する方法として磁気ループやFMシステム等の「補聴システム」の利用が有効である。しかしこれらの補聴システムは講演など「言葉」の聞き取りを目的としているものであり、音楽聴取を目的に利用された例は非常に少ない。

当研究所が音楽聴取に対する補聴システムの効果を調査するために行った予備実験では、補聴システムによる音楽聴取の可能性は否定できるものではないと考える。

当該研究は、この予備実験の結果を踏まえ、コンサートホールに於いて聴覚障害者が音楽による感動を共有するために、補聴システムによる音楽聴取の可能性と限界を調査し、音楽提供方法と共に、音楽補聴の有効性を明らかにするものである。

2. 研究の計画

(1) 補聴システム（磁気ループ）による音楽聴取

- ① 本学に於いて開催される本学学生の演奏会を補聴器・人工内耳着用者に補聴システムを使用して聴取して貰い、音楽聴取状態をアンケート調査する。
- ② ホールの天吊マイクから補聴システムに音を流し、同時に出力アンプの調整を行い、音楽聴取に値するクオリティが得られるか、聴取状態をアンケート調査する。
- ③ 磁気ループへ音を流すアンプは磁気ループ用アンプ（アンプA）と音楽用アンプ（アンプB）の2種類使用し、効果の差を調べる。
- ④ 機材は以下を使用する。
 - ・マイク；DPA 4006
 - ・マイクプリアンプ；RME Fireface UFX
 - ・磁気ループ用アンプ（アンプA）；UNI-PEX UDA-202A
 - ・音楽用アンプ（アンプB）；Bose パワーアンプ 1705II
- ⑤ 13名の被験者に合計36曲を聴取して貰う。
- ⑥ 提示する楽曲は独奏、室内楽、オーケストラ等、演奏者の編成人数を変える。

(2) 実験兼演奏会の開催

- ① 補聴システム（磁気ループ、FM無線システム）の有意性が推測される楽器音や演奏形態の傾向を考慮した実験兼演奏会を開催する。
- ② 聴取状態をアンケート調査する。

3. 研究の成果

(1) 補聴システム（磁気ループ）による音楽聴取

- ① アンプAよりアンプBの方が好まれる結果となった。（アンプAとアンプBの評価；表1参照）
- ② 磁気ループの使用評価は、「使用した方が良い」が42.6%、「使用しない方が良い」が34.8%、「どちらともいえない」が22.6%であった。（磁気ループ使用評価；表2参照）
- ③ 磁気ループを使用して音楽を聴いた場合の満足感は、「大変満足」が36.4%、「満足」が54.5%、「どちらともいえない」が9.1%であった。（音楽を聴いた満足感；表3参照）
- ④ 自由筆記回答抜粋
 - ・楽器の数が少ないなら磁気ループの方が細かく聴こえる。
 - ・ループを使うと楽器毎の輪郭を感じる。
 - ・多くの楽器が一度に鳴ると全部同じように聴こえる。
 - ・打楽器とピアノは磁気ループなしの方が楽しめた。
 - ・雑音が入る。
 - ・補聴器装用ではアンプAもアンプBも良く聴こえた。
 - ・磁気ループを使用した場合と使用しない場合どちらが良いかを決めるのは難しい。
 - ・人工内耳装用後、磁気ループを通して音楽を初めて聴いた。以前より良く聴こえた。

(2) 実験兼演奏会の開催

- ① 演奏者の合計人数は10名までとし、弦楽器、木管楽器、金管楽器、打楽器、ピアノ、声楽各奏者を1名以上2名までとした。
- ② オリジナル楽曲に対する音楽聴取の評価は、「良かった」が77.3%、「良くなかった」が13.6%、「どちらともいえない」が9.1%であった。（音楽聴取評価；表4参照）

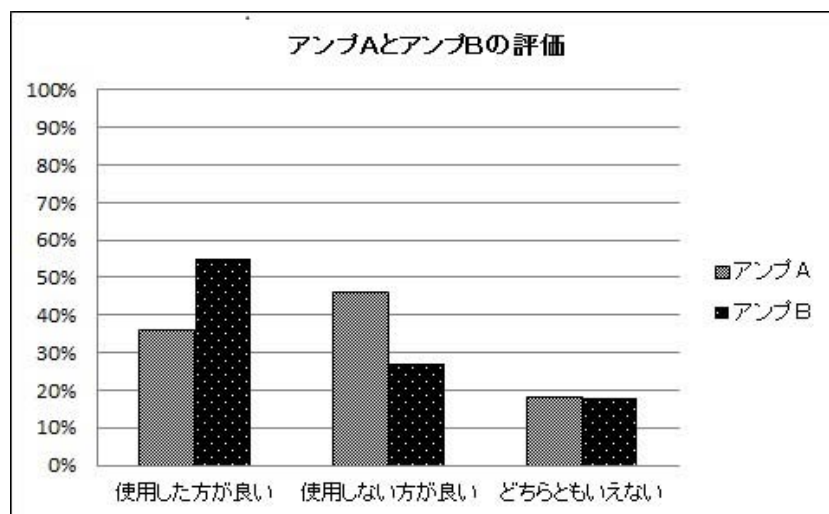


表1

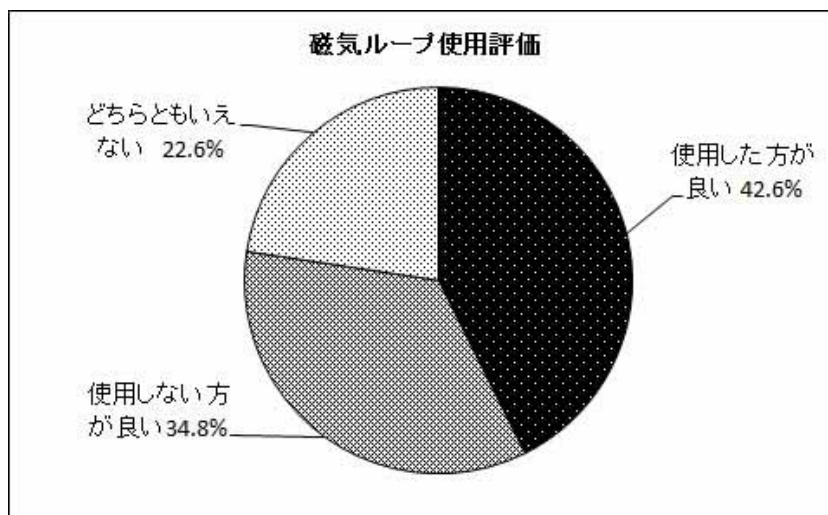


表 2

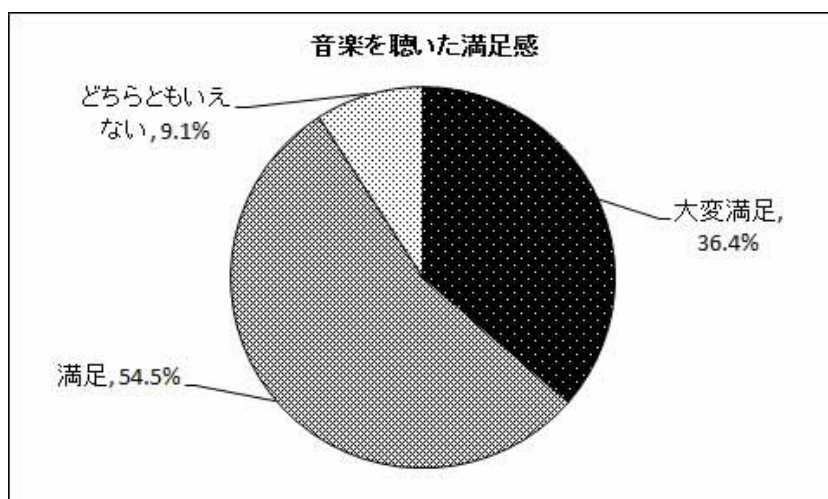


表 3

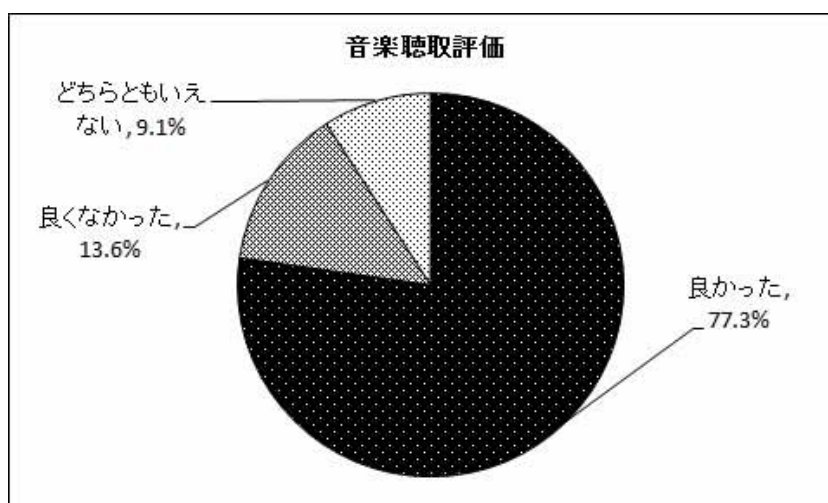


表 4

4. 研究の反省・考察

(1) 補聴システム（磁気ループ）による音楽聴取

- ① 磁気ループによる音楽聴取は、アンプによる影響が大きいと考えられる。アンプAは言語聴取用のアンプであるため、演奏会場内での「場内アナウンスはよく聞き取れた」と回答している被験者もいた。しかし、音楽聴取では高音、低音ともに音楽用のアンプBの方が良く聞き取れたと回答した被験者が多い。演奏の音量が増すと、音が割れたように響いてしまうようであり、これはアンプAのみならずアンプBでも同様の傾向が生ずるようである。
- ② 磁気ループを使用して音楽聴取を行う場合、一度に多数の楽器が奏されると音量に関係なく音質が悪くなるようである。この他「音が途切れる」「磁気ループを通すとマイクで拾った感じの音がする」などの回答もあった。上記①にも関係するが、打楽器の音量が大きくなると他の楽器の音質は大きく影響を受けるようである。
- ③ 補聴システムは、難聴者が音楽聴取に接して行く初期段階の導入方法として、その効果が期待できるものとする。この場合、編成の大きなものではなく、室内楽や声楽など、編成が比較的小さい楽曲を選択した方が効果を得られると思われる。また、打楽器アンサンブルのように打音を中心とした楽曲の聴取では、磁気ループを使用することなく、補聴器や人工内耳のマイクで直接聴取した方が良い場合もあると考えられる。
- ④ 今後の課題として、音楽、工学、音響、耳科医が共同で音楽補聴システム用のアンプ開発をする必要があると思われる。また、国内のコンサートホール等に、補聴システムの常備や常設が行われることにより、難聴者と健聴者が音楽による感動を共有することに繋がる可能性が高くなるものとする。

(2) 実験兼演奏会の開催

- ① 楽曲によっては、磁気ループを使用しないで音楽聴取をした方が良いと言う回答もあり、提示する楽曲の構成も音楽聴取に影響を与えると考える。
- ② 補聴器や人工内耳の聴こえの特性に合わせて構成をした楽曲は、聴覚障害者へ音楽聴取の満足感を与えることが期待できると考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

松本祐二、丸山典子「人工内耳装用下における音楽聴取状態の変化」第15回日本音楽療学会学術大会、2015年9月13日

(3) 出版物

なし

学 校 名	相 山 女 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	小学校教諭および児童への調査に基づく支援体制構築に関する研究 ー地域連携を活用したアクションリサーチー		研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①児童の学級適応 ②支援ニーズ ③教諭による支援 ④アクションリサーチ ⑤小学校と大学との連携			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 出 弓 枝	人 間 関 係 学 部	教 授	統括・研究遂行・小学校との連絡調整

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 立 奈 歩	人 間 関 係 学 部	准 教 授	研究遂行・分析・まとめ

小学校教諭および児童への調査に基づく支援体制構築に関する研究 —地域連携を活用したアクションリサーチ—

1. 研究の目的

児童期は仲間関係を築き、学習や対人関係スキルなど様々なスキルを習得し、安定した自己像を確立する時期である。児童が多く時間を過ごす小学校で適応して過ごせるか否かはその後の人生に多大な影響を及ぼす。

児童の学校適応に関する研究は、適応の結果と生じる状態のアセスメントに着目した研究、学校適応に影響を及ぼす要因に着目した研究に大別される（桶掛・内山，2011）。この2つとは別に、平成19年度より特別支援教育が展開する中、通常学級に在籍するニーズのある児童のアセスメントとそれに基づく教育支援に関する研究（安藤・田嶋，2012；別府，2013；司城，2013）という流れがある。通常学級にいる発達障害児への支援方略と成果を検証する研究を実施する必要性も指摘され始め（別府，2013）、ニーズがある児童生徒への支援を実施するには地域の小中学校との連携の必要性和意義が指摘されている（文部科学省2004，国立特殊教育総合研究所2008，西出2006・2012）。

本研究では、申請者2名が携わる臨床心理相談室と、X市教育委員会との連携で築いてきた学校教育領域と臨床心理領域のコラボレーションを基盤とし、地域の小学校における支援体制構築を試みる。通常学級に在籍する児童の学校適応を把握すると同時に、担任教諭が捉える児童と比較検討することで、大対・大竹・松見（2007）が提唱する学校適応アセスメントの水準2である「学業場面や対人場面において子どもの行動が教師や仲間からどの程度強化されているか」を多面的に把握し、学級における各児童に応じた支援について検討する。

2. 研究の計画

- (1) 小学校1校の全校児童に、学級適応感、学習や社会性におけるコンピテンスの意識に関する調査を1学期と2学期に同一の質問紙で行い、両者の変化を分析する。
- (2) 担任教諭に、各児童の支援ニーズ認知を調査し、児童の結果との関連を分析する。
 - ① 1学期に、学級児童全員に関する支援ニーズの認知を尋ねる。
 - ② 夏休み期間に、児童の1学期の結果と担任の支援ニーズ認知を総合し分析したフィードバックおよび対処方略に関する研修会を行う。
 - ③ 担任教諭による支援ニーズ認知の高低によって、児童の1学期と2学期の結果に相違がみられるか分析する。
- (3) 担任教諭に、児童のデータ活用と支援の実態および工夫を調査し分析する。
 - ① 3学期に、1学期と2学期の比較を分析したフィードバックを行うと同時に、担任教諭が重点的に支援した児童への支援と成果について調査する。
 - ② 夏休み期間にフィードバックしたデータが、2学期以降の学級経営で活用の指針とされたか効果測定を試みる。
- (4) 児童に実施する調査内容は次の3種類である。

- * 河村が開発したQUESTIONNAIRE-UTILITIES（以後、Q-U）。学校生活意欲（「友達関係」「学習意欲」「学級の雰囲気」）、学級満足度（「承認」「被侵害」）の下位項目からなる。
 - * 認知されたコンピテンス測定尺度（桜井，1983）から抜粋した12項目（「学習コンピテンス」「友達コンピテンス」「運動コンピテンス」「生き方コンピテンス」の4因子を想定）
 - * Kiss-18（菊池，2007）から抜粋し児童用に表現を修正した6項目（「コミュニケーションコンピテンス」「問題解決コンピテンス」の2因子を想定）
- (5) 研究対象者はA小の児童375名。担任教諭は特別支援学級担任を除く13名。

3. 研究の成果

実施に先立ち、コーディネーター教諭に概要を説明し、同意書に署名を求めた。以下、児童の数値は、1学期の得点をⅠ、2学期の得点をⅡと併記し、コンピテンスを「C」と略記する。

(1) 担任教諭による児童の支援ニーズ認知と児童の学級適応感・コンピテンスの関連

① 支援ニーズ認知6項目（「学習上の課題」「社会性の課題」「行動上の課題」「対人関係上の課題」「家庭環境上の課題」「身体・健康上の課題」）（4件法、表1）の内的整合性が認められ（ $\alpha=.78$ ）、合計得点の平均値を各児童の支援ニーズ認知得点とした。支援ニーズ認知得点と児童の学級適応感・コンピテンスの関連の関連をみるため、ピアソンの積率相関係数を算出した。

② 低学年で支援ニーズ認知との間に相関が見られたのは、友達関係Ⅰ（-.16*）、学習CⅡ（-.24**）、生き方CⅡ（-.16**）の3つで、担任教諭が捉える支援ニーズ

表1. 各児童別に担任教諭に尋ねた支援ニーズ認知の項目内容

①学習上の課題
②社会性の課題(意思疎通の困難・他人の気持ちがわからない)
③行動上の課題(多動である・衝動的である・不注意)
④対人関係上の課題(過度に緊張する・黙り込む・大人しい)
⑤家庭環境上の課題(不適切な養育・家庭の生活リズムの乱れ)
⑥身体・健康上の課題(頭痛・腹痛・チック・抜毛などの身体症状)

と児童の学級適応・コンピテンスの関連は限定的であった（* $p<.05$, ** , $p<.01$ ）。

③ 高学年で支援ニーズ認知との間に相関が見られたのは、友達関係Ⅰ（-.22**）、学習意欲Ⅰ（-.26**）、承認Ⅰ（-.21*）、被侵害Ⅰ（.16*）、学習CⅠ（-.34**）・Ⅱ（-.27**）、友だちCⅠ（-.18*）・Ⅱ（-.21**）、生き方CⅠ（-.16*）、問題解決CⅠ（-.23**）・Ⅱ（-.24**）で、高学年において担任教諭が捉える支援ニーズは、1学期の学級適応と1、2学期のコンピテンス評価に関連するものの、2学期末の学級適応には関連がないことが示唆された。

(2) 担任教諭による支援ニーズ認知別にみた児童の学級適応・コンピテンスの変化

① 支援ニーズ認知得点が全児童の25%未満を「支援ニーズ低群」、25~75%を「支援ニーズ中群」、75%以上を「支援ニーズ高群」と命名し、低学年・高学年毎に、学期（2：被験者内）×群（3：被験者間）の2要因分散分析を行った。

② 低学年では有意な交互作用は認められなかった。

③ 高学年では、友達 [F(2, 159)=4.58, $p<.05$]、承認 [F(2, 159)=3.07, $p<.05$]、被侵害 [F(2, 158)=4.74, $p<.01$] において有意な交互作用が認められ、友達と承認では1学期に支援ニーズ高群<支援ニーズ低群であったが、2学期には有意差が見られなかった。被侵害では1学期に支援ニーズ高群>支援ニーズ低群となっていたが、2学期には有意差が認められなかった。コンピテンスに関しては交互作用が見られず、学期および支援ニーズの主効果が認められるにとどまった。高学年における担任教諭の児童の支援ニーズ認知は、1学期には児童の学級適応と関連するものの、ニーズに応じた支援が構築されることにより、学級適応感を高めることが可能であることが示唆された。そこで、1学期から2学期への変化について、夏休みの研修会がどのように奏功したかを以下のように検討した。

(3) 担任教諭によって重点的に支援された児童の特徴および支援に際してのデータ活用の実態

① 担任教諭に、重点的に支援した児童1名を抽出してもらった。抽出された児童13名の6つの支援ニーズ種別に被験者内1要因分散分析を行い [F(1, 12)=5.04, $p<.05$]、その後の多重比較の結果、行動支援ニーズが身体健康支援ニーズより有意に高く（ $p<.05$ ）社会性支援ニーズが身体健康支援ニーズより高い有意傾向（ $p<.1$ ）であった。多動や衝動性等の行動面の課題や意思疎通の困難や他人の気持ちを理解しにくい等の社会性の課題は、注意欠陥多動性障害や自閉症スペクトラム障害の傾向のある児童に見られる状態像であり、他児とのトラブルや不適応感の引き金となるため、担任教諭が児童の支援ニーズを認識し、支援を行う必要性を認識しやすい課題であることが示唆された。

② この1名の児童の支援を行うにあたり、研修会のデータをどの程度活用したか（2件法）、どの程度役に立ったか（4件法）で回答を求め、活用の有無に偏りが見られるのかを、無回

答の1名を除いた12名について χ^2 検定を行ったが、有意差は認められなかった。

- ③ この1名の児童の支援を行うにあたり、2学期以降に支援ニーズに応じた支援を具体的に立案したか（2件法）、支援による改善の程度（4件法）を尋ねた。13名について6つの支援ニーズをまとめ、“支援ニーズの有無”“支援計画の立案の有無”で2×2のクロス表を作成し χ^2 検定を行った結果、支援ニーズが認知された場合に支援を立案し、支援ニーズが認知されない場合は支援の立案を行わないことが明らかになった（ $\chi^2=15.83$, $P<.01$ ）。また“支援ニーズの有無”および“担任教諭による支援計画の立案の有無”を独立変数、“支援結果”を従属変数とした2要因の分散分析の結果、支援計画立案の主効果が有意傾向[F(1, 28)=3.35, $P<.1$]となり、支援計画を立案した場合に児童の状態が「やや改善した」と評価され、立案しなかった場合「あまり改善しない」と評価される傾向が示唆された。
- ④ この1名の児童に対してなされた支援方略（表2）が、6つの支援ニーズに応じた支援による改善の程度とどの程度関連があるか検討するためにピアソンの積率相関係数を算出した。

表2. 抽出された児童に対して行った支援について尋ねた項目内容

①行動を意識づけるような全体教示の工夫	⑧課題場面の観察および支援記録の蓄積
②行動を意識づけるような個別の注意	⑨チームティーチングによる個別の指導
③机間指導における個別の教示	⑩リソースルーム(別教室)における個別指導
④わかりやすい板書の工夫	⑪障害児学級や通級指導教室における個別指導
⑤小グループ学習を活用した理解の促進	⑫保護者との連携による家庭での支援の工夫
⑥ニーズに応じた別課題の使用	⑬専科・教科の教諭との連携による支援
⑦視覚的にわかりやすい教材の使用	⑭学年会における連携による支援

- ・社会性支援ニーズに応じた支援による改善と、「⑥ニーズに応じた別課題の使用」($r=.59$, $p<.05$)、「⑫保護者との連携による家庭での支援の工夫」($r=.60$, $p<.05$)、「⑬専科・教科の教諭との連携による支援」($r=.61$, $p<.05$)との相関
 - ・行動支援ニーズに応じた支援による改善と、「⑬専科・教科の教諭との連携による支援」($r=.64$, $p<.05$)との相関
 - ・家庭環境支援ニーズに応じた支援による改善と、「⑫保護者との連携による家庭での支援の工夫」($r=.72$, $p<.05$)との相関
 - ・身体健康支援ニーズに応じた支援による改善と、「⑫保護者との連携による家庭での支援の工夫」($r=.74$, $p<.05$)および「⑬専科・教科の教諭との連携による支援」($r=.71$, $p<.05$)との相関
- 主に家庭に働きかけ、教諭同士で支援を工夫することが、児童の社会性の促進に関連していることが示唆された。

4. 研究の反省・考察

- (1) 年間を通じたアクションリサーチによる成果のまとめ
- ① 本研究は、通常学級に在籍する児童の学校適応を調査し、その結果を担任教諭にフィードバックすると同時に、担任教諭に対しても事前に児童の支援ニーズ認知を調査し、事後に1年間の児童への支援を振り返る事後調査を行った。研究と支援を両輪とする年間を通じた小学校へのアクションリサーチにより、担任教諭や仲間との関係の中での児童の学校適応をアセスメントすることができた。
- ② 児童の学校適応感に関する調査結果から、高学年において、1学期より2学期の方が適応の指標である得点が有意に上昇した。児童の個別的な支援ニーズを捉えながら関わることで児童の学級適応感を高める可能性が示唆された。
- ③ 担任教諭への事前事後調査から、a. 児童の支援ニーズの中でも、学習支援ニーズ、社会性支援ニーズ、行動支援ニーズが認識された児童に支援の担任教諭は支援の必要性を認識すること、b. 支援ニーズが認知された児童に支援計画を立案して支援することで児童の取り組みが改善されたと認識していること、c. 特に社会性支援ニーズ、行動支援ニーズに対して効果

的な支援方略は、家庭と連携し、教諭同士で支援を工夫することが児童の社会性の促進に関連していること、の3点が示唆された。

(2) アクションリサーチの反省と課題

- ① 今後の課題として、大学と小学校とで連携して行われる巡回相談や発達障害保護者相談会を効果的に活用するための広報の時期とあり方の検討、データを効率的に入力・出力しフィードバックレポートを作成するための人的資源と時間の確保等の問題がある。現在1校のみで実施している調査を複数校に広げるためにも、人的資源と時間の確保の課題の解決は急務である。
- ② より実効性のある研修会を行うために、データの読み方と支援方略をわかりやすく説明するためのマニュアルの作成を計画している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

安立奈歩・西出弓枝（2015）：学級担任による支援ニーズ理解が児童の学級適応に及ぼす影響—学級経営支援研修会を活用したアクションリサーチ—。日本心理臨床学会第34回秋季大会発表論文集，291。〔2015年9月18日発表 於 神戸国際会議場〕

(3) 出版物

西出弓枝・安立奈歩（2016）：児童の学級適応調査を活用した学級担任による教育支援—事後調査にみる支援方略の選択と成果—。相山女学園大学人間関係学研究14，91-104.

学 校 名	神戸芸術工科大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高大連携による理工学系デザイン教育カリキュラムの設計と実践 －「総合的な学習の時間」のカリキュラム構築－		研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①総合学習 ②高大連携 ③デザイン教育 ④ドキュメンテーション			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
曾 和 具 之	芸 術 工 学 部	准 教 授	代表、情報教育・技術に関する講座担当

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
見 寺 貞 子	芸 術 工 学 部	教 授	減災・服飾に関する講座担当
野 口 正 孝	芸 術 工 学 部	教 授	減災・服飾に関する講座担当
ばんば まさえ	芸 術 工 学 部	教 授	減災・服飾に関する講座担当
相 澤 孝 司	芸 術 工 学 部	教 授	工芸技術に関する講座担当
佐 野 浩 三	芸 術 工 学 部	教 授	製品製作に関する講座担当
田 頭 章 徳	芸 術 工 学 部	助 教	製品製作・プロデュースに関する講座担当
古 賀 俊 策	芸 術 工 学 部	教 授	人間工学に関する講座担当
相 良 二 朗	芸 術 工 学 部	教 授	ユニバーサルデザインに関する講座担当
向 井 昌 幸	芸 術 工 学 部	教 授	ロボットデザインに関する講座担当
見 明 暢	芸 術 工 学 部	助 教	製品デザインに関する講座担当
さくま はな	芸 術 工 学 部	助 教	アートに関する講座担当
曾 和 英 子	アジアデザイン研究所	客員研究員	色彩心理・雑貨に関する講座担当

高大連携による理工学系デザイン教育カリキュラムの設計と実践 — 「総合的な学習の時間」のカリキュラム構築 —

1. 研究の目的

本研究は、理工学系デザイン教育カリキュラムの設計と実践に取り組み、教育理論の考察とカリキュラムを体系化するための実践研究を行うことを目的としている。

本研究では以下の点を実践した。

- (1) 理工学系デザイン教育カリキュラムの設計と実践に取り組み、教育理論の考察とカリキュラムを体系化するための実践研究。
- (2) 総合的な知識・技能を活用しながら、コミュニケーション能力、振り返りや意思決定、自己評価の方法等のデザイン教育カリキュラムの構築。
- (3) 理工学分野とデザイン・芸術学分野の両側面からアプローチするカリキュラムによって、文・理系の両側面から考える力を高め、自らの関心事、自分自身の適性、身に付けた知識や技能などに応じて進路実現を果たそうとする生徒の育成。

理工学分野とデザイン・芸術学分野の両側面からアプローチするカリキュラムによって、文・理系の両側面から考える力を高め、自らの関心事、自分自身の適性、身に付けた知識や技能などに応じて進路実現を果たそうとする生徒の育成が期待できる。また、本学の特徴である実践的教育・研究手法に見られる、総合的な知識・技能を活用しながら、コミュニケーション能力、振り返りや意思決定、自己評価の方法等のデザイン教育カリキュラムは、考える力を高めていくというプロセスに効果を発揮する。アイデアなど知識そのものと、各教科・科目等を横断して総合的に知識・技能を活用しながら「生きる力」を育む実践的教育に十分に応用できると考えられる。

2. 研究の計画

これまでの高大連携授業は、高等学校側から授業内容の概要について依頼があり、教員を派遣する方法で実施するというものであったが、本研究は、学習を通してどのような能力開発につながりたいか、また高校生達の進路選択の幅を拡げ、高校生の早期から多様な価値観に触れる機会を提供するためにどういった授業が効果的かという相談をもとに、授業方針を決定し、カリキュラムの検討を行う。申請者たちは、新しい考え方を軸にした視点でカリキュラムを構成し、実践教育を開始することを目指す。

平成27年度は、前年度の対象校（兵庫県立神戸鈴蘭台高等学校）において引き続き高大連携体制を継承し、以下の授業を実施した。

- (1) 減災・服飾（見寺・野口・ばんば）
- (2) プロダクト製品制作（相澤、佐野、田頭、古賀、相良、向井、見明）
- (3) 情報技術・リテラシー（曾和具之）
- (4) 色彩・アート（さくま・曾和英子）

実施は、第2学年約200名（1講座40名×5講座）を対象に、総合学習の時間を利用して、年間計20回程度行う。研究の基本的な進め方は以下の通りである。

- (1) 授業内容の汎用化：先行研究においては、高校立地地域の自然・文化・社会特性に特化した授業を展開した。この結果を踏まえ、平成26年度の研究完成を見据えて、授業内容の汎用化を検討・実施し、他地域の高等学校においても、実施可能な授業を展開する。
- (2) 生徒へのプロモーションビデオの作成：平成26年度の授業内容をまとめたビデオを制作し、平成27年度受講生への喚起を促すとともに、高大連携の意味についての啓蒙を行う。
- (3) 教材開発に重点を置いた授業設計：テキスト、副教材、制作素材、制作手順、制作用各種工具などを、高等学校教育に適した教材になるよう開発・検討を行う。

3. 研究の成果

平成27年度においては、以下の結果を得た。

(1) 特別教室利用による、制作環境の整備。制作素材の選定。

平成26年度においては、各講座の授業は普通教室で行った。その結果、制作段階においてスペースの確保が必要となったため、平成27年度においては特別教室を活用することで、制作スペースの確保を狙った。

(2) 大学生、卒業生との協力体制による、授業進行。

平成27年度においては、講座の中で大学生および卒業生にティーチングアシスタントとして参加させることで、高校生が大学により興味・関心を持ちやすい環境を構築した。

(3) オープンキャンパスを利用した大学内での拡張授業の実施。

8月のオープンキャンパスにおいて、受講生のうち参加希望者に大学での授業体験を実施した。各講座の成果は以下の通り。

(1) 減災・服飾（見寺・野口・ばんば）

このテーマでは、日常生活で使用しているモノが、いざ災害発生時や被災時にも有効に機能する、使いやすい減災グッズを考え、提案した。

社会の中にある課題を見つけ、デザインを通じて問題解決する能力（調査分析・制作・発表）を身につけた。また、グループワークとして減災ポンチョを制作した（図1）。



図1 減災・服飾講座の制作物

(2) プロダクト製品制作（相澤、佐野、田頭、古賀、相良、向井、見明）

1学期はデザインに必要な観察力や描画力を身につけるため、デザインスケッチや、アイデア出しワークショップを行った。2学期は、レーザ加工機で作られた照明器具の制作を行い、さらに、コンピュータで制御されたあかりオブジェの制作にもトライした（図2）。



図2 プロダクト製品制作講座における作品

(3) 情報技術・リテラシー（曾和具之）

さまざまなテーマで実施される総合学習を取材・記録し、高校生の目線から、総合学習の意義と役割について考察した。具体的には、各テーマの活動を映像に記録・編集し、学内外に発信し、総合学習で行われていることを広く一般にも共有できる映像作品（ドキュメンタリーなど）を制作した。（図3）。



図3 情報技術・リテラシー講座における各講座のドキュメンタリー制作

表1 各講座のカリキュラム

■平成27年度高大連携プログラム開発プロジェクト年間スケジュール表

回数	授業日	講座1	講座2	講座3	講座4
		使いやすい減災グッズ制作 見寺・野口・ばんば (Fデザイン学科)	プロダクト・インテリアデザイン制作実習 相澤・佐野・田頭・相良・古賀・向井・見明	世界の生活文化・色彩・文様探求と雑貨の制作 さくま・曾和英子	ドキュメンタリー制作 曾和具之
1	5月8日	授業ガイダンス	オリエンテーション	オリエンテーション	授業ガイダンス 撮影チーム編成
2	5月15日	講義:命を守るための「減災グッズ」	スケッチテクニック①	講義「色彩の効用」	撮影レクチャー 各講座への撮影開始
3	5月29日	講義:「減災グッズ」の考え方について	スケッチテクニック②	演習①:自分の色を見つけてみよう	BGM作成について
4	6月19日	レポート作成:どのような「減災グッズ」がありますか?	キックオフワークショップ①	講義:植物文様と色彩について	撮影・編集
5	6月26日	レポート発表会	キックオフワークショップ②	演習②:切り絵を組み合わせ文様を作ってみよう!	チーム内上映会
8月23日 芸工大オープンキャンパス					
6	9月4日	講義:アイデアをカタチにするためのヒント:5W2Hから考える	2学期ガイダンス「学びとしてのデザイン」	映像鑑賞:テーブルウェアに関する映像	撮影・編集
7	9月27日	アイデア検討会	照明器具の制作①	講義:インテリア雑貨に見る植物文様について	撮影・編集
8	10月2日	アイデア発表会:どのような「減災グッズ」を提案しますか?	照明器具の制作②	講義:インテリア雑貨の提案	撮影・編集
9	10月9日	制作①	照明器具の制作③	演習③:切り絵で単位文様を作る	撮影・編集
10	10月16日	制作②	照明器具の制作④	演習④:単位文様を組み合わせ文様を構成する	チーム内上映会
11	10月30日	制作③ 中間進捗発表会	テクノ工作①	演習⑤:インテリア雑貨における文様の応用を検討する	撮影・編集
12	11月6日	制作④	テクノ工作②	演習⑥:切り絵を参照しながら、ステンシルフィルムに文様を彫る	撮影・編集
13	11月13日	制作⑤	テクノ工作③	演習⑦	撮影・編集
14	11月27日	制作⑥	テクノ工作④	演習⑧:文様の型を使って、色を塗る	チーム内上映会
15	12月4日	チーム内講評会	作品講評会	演習⑨	ダイジェストムービー編集会議
16	1月29日	プレゼン資料作成	写真撮影・パネル制作	撮影	総編集①
17	2月5日	プレゼン準備	パネル制作	パネル制作	総編集②
18	2月19日	学内発表会	学内発表会	学内発表会	学内発表会

(4) 世界の生活文化・色彩・文様探求と雑貨の制作 (さくま・曾和英子)

本授業では、世界の諸民族の喫茶などの生活文化にみられる雑貨を概観しながら、そこに見られる植物文様の形や色に込められた生命のメッセージを読み取ると同時に、自分のオリジナルな植物文様を制作し、身近なインテリア雑貨への応用を提案した。(図4)。



図4 色彩・アート講座の文様作品

4. 研究の反省・考察

本研究の効果として、以下の点が上げられる。

- (1) 高校施設の一貫した活用による、大学教育の体験学習を継続的に行うことができた。また、特別教室を用い、芸術系・工学系の実習制作作業を盛り込むことで、本学の学習環境を高校内でも体験的に実施することができた。
- (2) 大学生および卒業生の学習環境への取込により、高校生にとって、大学での学習をより身近に感じることのできる総合学習の時間を用意することができた。また、制作を通じて大学生、卒業生と高校生とのコミュニケーションによって、大学における勉学の具体的なイメージを高校生に知らせることができた。
- (3) 高校での授業時間外において、大学の施設・設備を用いることで、制作に対するより専門的な知識・経験を高校生に提供することができ、高校生のものづくりに対する意識を高めることができた。

次年度以降の改善点としては、以下の通りである。

- (1) 高校教員とのより密な授業カリキュラム計画の策定

授業を進めていく上で、高校教員の協力は不可欠であり、授業時間だけでなく家庭学習や提出物の進捗管理など、高校教員と大学教員との教育に関する役割分担を明確化・具体化し、高大連携によるカリキュラム策定の指針を立てる必要がある。

- (2) 教材開発、評価方法の策定

年間を通じた高大連携授業においては、授業日数が非常に多くなるため、高校生が自主的に学習できるような教材を開発していくことが、今後の課題としてあがった。特に、制作に関して、技術的な側面は、あらかじめ教材などで反復的に学習を重ねておくことで、完成物の質が飛躍的に向上する。今後の改善点として、高校生の自発的な学習環境を作るための教材開発が必要である。

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

学 校 名	九 州 共 立 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	体罰経験が自己肯定意識に与える影響および体罰抑制要因に関する研究 －体罰を許さない教師を育成する教員養成のあり方－		研 究 分 野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①体罰 ②自己肯定意識 ③体罰抑制要因 ④教職課程			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
日 高 和 美	経 済 学 部	講 師	研究の全体統括 教育制度学からの提言

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 橋 佳 代	鹿 児 島 大 学 大 学 院 臨 床 心 理 研 究 科	講 師	心理学的視点からの提言
野 田 耕	ス ポ ー ツ 学 部	講 師	スポーツ教員学からの提言
小 屋 菜 穂 子	ス ポ ー ツ 学 部	講 師	運動指導の視点からの提言
久 保 田 も か	ス ポ ー ツ 学 部	講 師	コーチングの視点からの提言
四 方 田 健 二	名 古 屋 学 院 大 学 ス ポ ー ツ 健 康 学 部	講 師	スポーツ教員学からの提言

体罰経験が自己肯定意識に与える影響および体罰抑制要因に関する研究 －体罰を許さない教師を育成する教員養成のあり方－

1. 研究の目的

教育現場において体罰は‘良くないもの’とされながらも、長く容認され続けて来た。体罰が容認され続けて来た要因を以下のように考える。

- ・体罰が子どもに与える影響が明確に検出されていない。
- ・教員養成課程において体罰根絶に向けた教育、体罰に代わる指導力の育成が不十分である。
- ・教員、運動指導者の力量として‘部活動経営’の視点が欠けている。
- ・実態把握、実証研究が不十分である。

本研究では以上のような体罰が容認され続けて来た背景に迫り、体罰が生徒の成長に与える影響を具体的に検出した上で体罰を許さない教員を育成するための具体的方法論について検討するものである。具体的目標は以下の通りである。

- (1) 運動指導者を目指す学生を対象に、体罰被害加害の実態とその影響を検証する。(H26年度)
 - ① 体罰被害経験、加害経験の実態調査を行う
 - ② 体罰経験の有無による自己肯定意識のあり方の差異を検討する
 - ③ 体罰を抑制する要因を特定する
- (2) 体罰を容認しない教員養成プログラムを構築し、その効果を検討する(H27年度)
 - ① 個人の価値観の変容を図る教育プログラムの検証を行う
 - ② 体罰にかわる指導力の育成を図る教育方法および教材の検討を行う
- (3) 体罰を容認しない教員養成プログラム及びツールを開発及び効果を検証する。(H28年度)

2. 研究の計画

- (1) 将来運動指導者を目指す学生を対象とした実態調査
 - ① 運動指導者を目指す学生の体罰経験および体罰意識に関する実態調査（質問紙調査）を実施し学生の意識の変容及び新一年生の状況把握を行う。
- (2) 教員養成課程において、根強い体罰容認意識を変革する取り組みを創造し、その効果を検証する。
 - ① 教育実習、就職を控えた3・4年生を対象とした学習機会の設定（体罰について他者の意見を聞く機会等を提供する）。
 - ② 本学を卒業し教職に就いているOB・OGに対して聞き取り調査を行い、学校現場における体罰に関する状況把握する。
 - ③ 教職に就いているOB・OGを講師として招聘し、学生を対象に講話やラウンドテーブル形式で意見を交流する機会を設ける。
 - ④ 事前事後指導、教育実習に関する教材開発（試行）

3. 研究の成果

- (1) 将来運動指導者を目指す学生を対象とした実態調査
 - ① 対象：教職課程を目指す大学生1～4年生341名（男子244名、女子96名、無回答1名）
 - ② 調査内容：運動指導者への志望度、体罰の必要性、運動指導における体罰の必要性等
 - ③ 実施期間：2015年4月
 - ④ 実施方法：web調査
 - ⑤ 主な結果

【運動指導者への志望度】とでもなりたい(69%)、少しなりたい(20%)、なりたくない(3%)わからない(5%)

→ 本学においては多くの学生が運動指導者を志望している状況にある。

【体罰の必要性】全く必要ない(45%) / あまり必要ない(23%) / 時には必要(30%)

【体罰がなくなると運動指導は難しくなると思う】

全くそう思わない(31%) / あまりそう思わない(31%) / 少しそう思う(26%)

/ とでもそう思う(10%)

→ 体罰への肯定的な認知、指導場面における体罰の必要性を感じている学生が3割程度いる。

(2) 教員養成課程における体罰容認意識を変革する取り組みの実施

平成27年度については、教育実習を次年度に控えた3年生および4年生に対する取り組みを強化する他、本学を卒業し教職についているOG・OBについてからの体罰に関する意識の変容の有無等の情報収集を行った。特に重点を置いたのは以下の3点の取り組みである。

① 3・4年生を対象とした学習機会の設定

2015年度後期、3年生を対象とする教育実習の事前指導と4年生を対象とした教職課程の総仕上げ科目である教職実践演習や専任教員が担当する教職必修科目「教育方法論」の講義内で体罰に関してディスカッションを通して学習する機会を設定した。特に経済学部においては前期「教育方法論」の講義の中で試行的に「「体罰を許さない意識」を育てる教育方法」をテーマに授業方法の検討を行っている。仮説的ではあるがこの検討から、①多様なアプローチによる学習機会の実施・開発、②定期的な意識啓発の機会の設定、③学校現場における体罰の現状を現職中学校・高校教員に話を聞く機会を設定することが効果的である、という結論が導きだされた。

② OB・OGに対する聞き取り調査の実施

2015年10月に、了承を得た卒業生8名に対し、在学中から現在まで体罰についての認識や変容の有無、学校現場における体罰の現状や取扱いについてインタビュー調査を行った。

その結果、今回対象とした8名に関しては全員在学中より体罰に対しては否定的な意識を持っていたが、体罰に関して在学中よりも絶対にやってはいけないという意識が高まっているという回答が多く見られた。また、その理由としては「体罰によらない指導の方法が必ずあるから」、「同僚教師より体罰を行った先輩教師が懲戒処分等になり自分のやりがいであった部活の顧問から外されている話を聞き、絶対にしない、できないと思った」、「体罰を実際に行った同僚教師を見て体罰自体に教育的効果はないことを実感したから」、「生徒との信頼関係を損なうから」という回答が見られた。

③ OB・OGを招聘したラウンドテーブルの実施

3年後期の事前指導及び4年の教職実践演習の時間を調整し、教職に就いているOB・OGを講師として招聘し、ラウンドテーブルを行う中で学校現場における体罰の取り扱いや、体罰を行った教師の現状等に関して講話をしてもらう機会を設定した。ラウンドテーブル終了後に実施した感想を含むアンケート調査の中で、「やってはいけない」ことは授業の中で理解をしていたけれど、「絶対にやってはいけない」という意識が変わったなど、体罰に関する認識が深まった学生も見られた。来年度に関しても試行的に体罰について取り上げる機会を設定していきたい。

④ 事前事後指導、教育実習に関する教材開発

本学においては、これまでも効果的な教育実習を行うサポートを意図したツールとして在学生・OG・OBと協力しながら『教育実習Q&A』というテキストを発行配布し、事前指導に役立ててきた。平成27年度においては①～③において得られた成果を教材として使用できるよう、試行的に『教育実習Q&A—平成28年改訂版』を作成し、体罰に関するコラムやデータ、OB・OGの講話などを盛り込んだ。次年度においては、教職課程において重要な位置を担う教育実習において、体罰を許さない意識を啓発することができるよう効果的な使用方法のほか、1・2年生に対する取り組みも強化していかなければならない。

4. 研究の反省・考察

本年度の取り組みにより、本学において運動指導者を目指す学生の体罰に関する意識や容認意識を明らかにすることができた。また、平成26年度の蓄積をベースに具体的な体罰によらない教員の養成方法について多様なアプローチを実施した。以下、それぞれの取り組みにおける成果と課題を挙げていく。

(1) 将来運動指導者を目指す学生を対象とした実態調査

将来運動指導者を目指す学生を対象とした実態調査に関しては、学生に合った教育活動展開していくための基礎資料として今後も継続して行う必要がある。また、今後の教育活動のエビデンスとなるデータとして活用できるよう、質問項目や分析方法の検討を行っていききたい。

(2) 教員養成課程における体罰容認意識を変革する取り組みの実施

平成27年度においては、学校現場に出る機会が増える3・4年次における取り組みの強化（ディスカッションの機会、ラウンドテーブルの実施、教材開発等）を行った。その結果、昨年度と比較して体罰に対する認識が否定する傾向が強くなっている学生が増えている他、3・4年次において体罰に関する学習機会が定期的に持てるよう、カリキュラム面から見直しをすることができた。学生の変容に関しては、より詳細な分析ができるようアンケート調査を実施するなどしていききたい。

来年度は、これまで取り組んできた研究のまとめの年となる。「研究知」から「実践知」へ移行できるよう、研究の成果を学生に還元できるよう、学習機会の定期的な実施や作成した教材の効果的な使用方法の検討の他、4年間を見通した取り組みができよう、1・2年次における見直しを行っていききたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

教員養成課程における体罰を容認しない教員を育む教育活動の実践（九州共立大学紀要7(2)投稿予定執筆中）

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

教育実習・事前事後指導テキスト（冊子） 『教育実習Q & A－平成28年度版』

平成 27 年度(第 40 回)学術研究振興資金 学術研究報告

平成 28 年 10 月発行

編 集 日本私立学校振興・共済事業団

助成部 寄付金課

発行所 日本私立学校振興・共済事業団

〒102-8145 東京都千代田区富士見 1-10-12

電話 03(3230)7315・7316

FAX 03(3230)8223

禁無断転載