

2016

平成 28 年度（第 41 回）

学 術 研 究 振 興 資 金

The Science Research Promotion Fund

学 術 研 究 報 告

平成 29 年 10 月

は じ め に

この報告書は、平成 28 年度(第 41 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、高等専門学校の学術研究の振興のために、私学事業団が広く一般から寄付を集めて、これを「学術研究振興基金」として運用し、その運用益から私立大学等における社会的要請の強い学術研究に対して助成を行っているものです。

昭和 51 年度に交付を開始して以来、平成 29 年 5 月末までに交付した資金総額は、2,929 件、75 億 6,628 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、本基金の保有額は、平成 29 年 9 月末で、54 億 1,475 万円に達しました。本事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに本基金を充実させたいと考えております。本基金の趣旨をご理解のうえ、一層のご支援とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

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

平成 29 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 28 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 28 年度学術研究振興資金 研究課題一覧	3
V	平成 28 年度（第 41 回）学術研究振興資金 学術研究報告	5

I 平成28年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況

区 分		応募		採択		採択率(%)	
		件数(件)	希望額(千円)	件数(件)	交付額(千円)		
合 計		136	316,300	52	80,100	38.2	
内 訳	新規・継続別	新規	109	248,600	30	41,700	27.5
		継続 2 年 目	16	42,700	13	22,300	81.3
		継続 3 年 目	11	25,000	9	16,100	81.8
	学校種別	大 学	128	311,800	51	79,500	39.8
		短期 大 学 (高等専門学校を含む)	8	4,500	1	600	12.5
	研究区分別	人文・社会科学系	39	50,600	16	14,500	41.0
		理工系、農学系	43	103,400	16	27,700	37.2
		生物学系、医学系	54	162,300	20	37,900	37.0

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22年度	23年度	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	合 計
経 済 団 体	2,107,328	0	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	2,132,328
個 別 会 社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学 校 法 人	1,456,749	3,376	708	0	0	0	0	1,460,833
個 人	197,016	151	52	1,133	1,022	213	0	199,587
合 計	5,383,093	3,527	5,760	6,133	6,022	5,213	5,000	5,414,748
基金保有額	5,383,093	5,386,620	5,392,380	5,398,513	5,404,535	5,409,748	5,414,748	-

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22年度	23年度	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	合 計
医 学	2,609,480	53,500	53,800	49,400	47,600	36,900	28,400	2,879,080
環 境 科 学	188,340	3,300	13,900	8,700	2,000	1,000	3,000	220,240
理 学	840,410	4,100	5,900	22,900	19,200	20,700	9,500	922,710
工 学	1,597,760	6,900	8,600	5,000	5,100	2,600	4,400	1,630,360
農 学	248,800	15,600	2,800	11,100	8,200	11,500	16,100	314,100
文 学	672,260	17,700	9,100	7,100	10,000	7,000	11,400	734,560
法 学	99,920	2,400	2,000	0	0	2,300	500	107,120
経 済 学	208,880	8,800	10,700	6,000	2,200	1,400	900	238,880
家 政 学	205,260	2,200	800	2,500	3,500	3,000	3,200	220,460
体 育 学	20,100	2,200	4,500	0	0	0	1,000	27,800
教 育 学	175,270	2,800	2,900	2,100	2,200	3,400	1,700	190,370
合 計	6,866,480	119,500	115,000	114,800	100,000	89,800	80,100	7,485,680

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

(注) 2. 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28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	iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究	1,700	6
2	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	3,000	10
3	昭和薬科大学	医学	YAPシグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の基盤研究	3,000	14
4	聖路加国際大学	医学	世代間交流看護ベストプラクティスのための支援ガイドの創生	400	19
5	創価大学	医学	ES/iPS細胞のナイブ状態を決める糖鎖と再生医療への応用	3,000	24
6	帝京大学	医学	乾癬の病態における尿酸結晶の役割の研究	1,400	28
7	自治医科大学	医学	慢性炎症病態のマルチスケール生体イメージングと光制御	1,500	32
8	聖マリアンナ医科大学	医学	新たな腎臓病進行機序の解明とその治療法の確立	1,900	36
9	金沢医科大学	医学	糖尿病合併症の病態形成におけるオートファジーの意義	1,200	40
10	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	1,200	44
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	1,400	48
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	52
13	日本薬科大学	医学	ペプチド前駆体POMCより生成される新規活性ペプチドの探索	500	56
14	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	60
15	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	4,000	64
16	尚絅大学	医学	新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの評価	300	68
17	関西学院大学	環境科学	海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO ₂ 固定系解明と増強	3,000	72
18	杏林大学	理学	X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の解明	1,500	76
19	明星大学	理学	ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究	2,000	80
20	立命館大学	理学	圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」	3,000	84
21	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	3,000	89
22	埼玉工業大学	工学	π 共役系分子集合体の光配向制御	700	94
23	東京電機大学	工学	地域継続居住を支えるCCRCにおける建築的特性と居住者の生活	600	98
24	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	1,500	103
25	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	1,600	107
26	工学院大学	農学	ほ乳類キチナーゼの活性喪失とその活性化に関する研究	2,000	112
27	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	4,800	116
28	東京農業大学短期大学部	農学	ダイコン辛味形質をモデルとした環境耐性遺伝資源の探索	600	121

IV 平成28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	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	2,200	125
30	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	2,500	129
31	名城大学	農学	フルオラス分子の疎水性制御に立脚した簡易分子合成手法の開発	1,000	134
32	大阪電気通信大学	農学	高濃度プロアントシアニジン含有ラズベリーの栽培法開発	1,500	137
33	近畿大学	農学	統合的アプローチによる哺乳類初期胚の発生能力を予測する新手法の開発	1,500	141
34	放送大学	文学	山岳高所・遊牧地域における社会変容と遠隔教育の試行と研究	700	146
35	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	151
36	国士舘大学	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	1,200	155
37	法政大学	文学	能楽の国際参照標準確立と多面的展開に向けての総合研究	1,400	159
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	800	162
39	愛知学院大学	文学	ミャンマーの政治的発展と民主化への移行過程における政策的課題	700	166
40	日本福祉大学	文学	福祉社会開発の実践モデルの構築	2,500	171
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	176
42	同志社大学	文学	「良心」に関するグローバルな思想研究と実証研究の総合	800	180
43	安田女子大学	文学	日本の若者の自己肯定感を規定する心理的・社会的要因の解明	1,200	185
44	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	500	189
45	北海商科大学	経済学	地域経済強靱化に向けた「物流体系の再構築」に関する研究	400	193
46	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	198
47	藤女子大学	家政学	北海道産食品素材の生活習慣病等抑制に関する生理活性物質の探索	700	202
48	中村学園大学	家政学	食による乳癌の発症予防と再発防止の分子基盤の構築	2,500	206
49	大阪体育大学	体育学	ヒトの多様なスポーツ動作を可能とする動作機序の解明	1,000	210
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	900	214
51	椋山女学園大学	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	219
52	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	500	224
			交付額計	80,100	

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

V 平成 28 年度（第 41 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	iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究 ーiPS細胞移植によるin vivoモデルの病態解析ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①パーキンソン病 ②iPS細胞 ③LRRK2 ④ゲノム編集 ⑤神経幹細胞移植 ⑥免疫不全マウス ⑦PD病態モデル ⑧創薬研究			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
太 田 悦 朗	医 療 衛 生 学 部	講 師	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
永 井 真 貴 子	医 学 部	講 師	実験・論文作成・データ整理
江 島 耕 二	医 学 部	准 教 授	実験・データ整理

iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究 ーiPS細胞移植によるin vivoモデルの病態解析ー

1. 研究の目的

(1) 優性遺伝パーキンソン病 (PD) の原因分子LRRK2に変異をもつ患者は、臨床症状や発症年齢が孤発性PD患者と類似した特徴を示す。そのため、LRRK2に起因した病態の解析は、孤発性PDの発症機序解明の鍵となる。申請者は、日本の優性遺伝PD家系 (相模原家系) のI2020T変異LRRK2をもつPD患者2名からiPS細胞 (LRRK2-iPSC) を樹立し、解析を進めてきた。その結果、LRRK2-iPSC由来神経細胞を用いて、患者脳内における病態を再現し、ドーパミン放出異常やリン酸化タウの増加などPD発症メカニズムの一端を明らかにした。そこで本研究は、PDのさらなる病態解明を目指し、iPSC由来神経幹細胞移植マウスにおけるin vivoのPD病態モデルの作製および遺伝子修復iPSCの樹立と創薬研究を展開する。

2. 研究の計画

(1) iPSC由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおけるin vivo PD病態モデルの作製

①使用するiPSCは、慶應義塾大学との共同研究で樹立のI2020T変異LRRK2をもつ相模原家系内PD患者2名のiPSC 2株と健常者2名のiPSC 2株を用いる。分化誘導法は、iPSCから胚様細胞塊を介して神経幹細胞塊を形成させ、神経細胞に分化誘導する。また、低分子化合物を用いた神経細胞への分化誘導法も検討する。

②iPSC-NS移植の予備実験は、8週齢のC57BL/6マウスを麻酔下で定位脳手術装置に固定し切開後、マイクロシリンジを用いて片側線条体にPD患者iPSC-NS (4×10^5 cells/4μL) を移植する。その後、本実験として、8週齢の免疫不全マウス (SCIDマウス) の片側線条体にiPSC-NSを移植する。

③移植マウスにおける運動機能および行動異常を調べるために、シリンダーテスト、飲水量や摂食量の測定を行う。

④移植マウスにおけるiPSC-NSの生着および分化を評価するため、脳を灌流固定後、凍結切片を作製してHE染色および免疫組織化学染色を行う。

(2) 遺伝子修復iPSCの樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

①TALENを用いたゲノム編集によってLRRK2-iPSCにおけるI2020T変異を遺伝子修復する。

②多能性マーカー発現および正常な染色体核型解析などのcharacterizationを行って、遺伝子修復したPD患者iPSC (TALEN-iPSC) を樹立する。

③LRRK2-iPSCとTALEN-iPSCから分化誘導させた各神経細胞を用いて、神経突起長や酸化ストレス抵抗性について解析を行う。

3. 研究の成果

(1) iPSC由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおけるin vivo PD病態モデルの作製

①胚様細胞塊を介した神経細胞への分化誘導においては、神経前駆細胞やグリア前駆細胞が含まれるため、分化させた細胞を免疫細胞化学染色で評価した。その結果、80%以上が神経細胞 (そのうち約7%がドーパミン作動性神経細胞) で、約5%がアストロサイトであることを確認した。また、低分子化合物を用いた神経細胞への分化誘導においては、60%以上が神経細胞であり、そのうち約20%がドーパミン作動性神経細胞であった。

②移植後7日のC57BL/6マウス脳を灌流固定後、凍結切片を作製してHE染色を行った結果、iPSC-NS移植側の線条体では、神経細胞様の形態を示す細胞が複数みられ、移植細胞の正着を確認した。また、Iba1抗体による免疫組織化学染色を行った結果、短期移植のマウスミクログリアでは、非移植側に比べ、形態学的な変化や細胞数に差異がみられなかった。

③移植後3、16、20、30、36、51、77、95、120日のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスとinjectionコントロールSCIDマウスにおける運動機能をシリンダーテストで解析した結果、51日以降において差異が生じ始める傾向を確認した。また、移植後における飲水量および摂食量を測定した結果、移植後76日以降のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群において共に低下する傾向がみられた。

④移植後213日のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいて、ヒト細胞質特異的抗体（Stem121抗体）とヒト核特異的抗体（Stem101抗体）を用いて免疫組織化学染色を行った結果、PD患者iPSC由来の移植細胞の正着を確認した。さらに、ヒトGFAP特異的抗体（Stem123抗体）陽性のアストロサイトへの分化生着も確認した。また、移植側のマウス由来ミクログリアでは、非移植側に比べ、形態学的な変化がみられる部位が確認された。

(2) 遺伝子修復iPSCの樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

①TALENによるゲノム編集によって遺伝子修復したiPSC（TALEN-iPSC）を樹立し、多能性マーカーの発現および正常な染色体核型を確認した。

②低分子化合物を用いてiPSC-NSを介して神経細胞に分化させ、分化誘導効率を調べた結果、70%以上が神経細胞であり、そのうちドーパミン作動性神経細胞が15–20%程度であった。

③神経突起長について解析を行った結果、TALEN-iPSC由来神経細胞および健常者iPSC由来神経細胞に比べ、PD患者iPSC由来神経細胞の神経突起長は短いことがわかった。また、酸化ストレスに対する脆弱性について解析を行った結果、TALEN-iPSC由来神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性は、健常者iPSC由来神経細胞と同程度であり、PD患者iPSC由来神経細胞では、酸化ストレスに対する脆弱性が亢進していた。

4. 研究の反省・考察

(1) iPSC由来神経幹細胞（iPSC-NS）移植マウスにおける*in vivo* PD病態モデルの作製

①C57BL/6マウスを用いて、iPSC-NS移植部位の選定、HEおよび免疫組織化学染色、行動実験に関する条件検討を行った。この予備実験を通して、本実験であるiPSC-NS移植SCIDマウスの作製を円滑に進めることができた。

②移植後76日以降のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、injectionコントロールSCIDマウスに比べ、飲水量および摂食量の低下が疑われたが、今後再現実験を行う必要がある。

③シリンダーテストにおいて、移植後76日以降で両群に差異が生じ始める傾向を確認したため、現在、ビームテストやオープンフィールドテストなどの行動解析を進めている。また、行動実験を評価する上で、injectionコントロールSCIDマウスではなく、健常者iPSC-NS移植SCIDマウスを作製し、病態解析を行う必要がある。

④移植後213日のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいて、ヒト由来移植細胞の正着を確認し、非移植側に比べ、移植側のマウス由来ミクログリアの活性化を予測する形態学的な変化を見出したため、詳細な解析が必要である。また今後、移植後分化した神経細胞およびアストロサイトが、マウス脳内の既存の神経細胞およびアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアを含めた脳内環境に神経炎症を惹起するかどうかを調べる予定である。

(2) 遺伝子修復iPSCの樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

①多能性マーカーの発現および正常な染色体核型を示したことから、遺伝子修復したiPSC（TALEN-iPSC）が樹立できた。しかし、全ゲノム解析とオフターゲットの有無について、詳細な解析を行う必要がある。

②樹立したTALEN-iPSCから低分子化合物を用いて神経細胞へと分化させた結果、高効率で神経細胞になり、分化誘導効率は、PD患者iPSCと比べて差異はみられなかった。また、病態解析を行った結果、PD患者iPSC由来神経細胞でみられた神経突起の異常短縮や酸化ストレスに対する細胞脆弱性が、TALEN-iPSC由来神経細胞では、健常者iPSC由来神経細胞と同程度まで回復することを確認した。今回、TALEN-iPSC由来神経細胞が健常者と同じ正常な表現型を示したことは、病態解析のコントロールだけでなく、将来的に細胞治療にも応用できる可能性

を示している。また現在、TALEN-iPSC由来神経細胞とPD患者iPSC由来神経細胞を用いて、薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索を進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Kubo M, Nagashima R, Ohta E, Maekawa T, Isobe Y, Kurihara M, Eshima K, Iwabuchi K, Sasaoka T, Azuma S, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F. Leucine-rich repeat kinase 2 is a regulator of B cell function, affecting homeostasis, BCR signaling, IgA production, and TI antigen responses. J Neuroimmunol., 292, 1-8, 2016
- ②Tominaga N, Iizuka T, Kaneko J, Nagai M, Hara A, Onozawa Y, Kanazawa N, Nishiyama K. Autoimmune brachial amyotrophic diplegia and sensory neuropathy with Sjögren's syndrome: A case report. J Neurol Sci., 368, 1-3. 2016
- ③太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鵜飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立」第16回日本再生医療学会総会、2017年3月
- ④Hoshino K, Hayashi M, Isono Y, Nagao Y, Kimura K, Hachimori K, Nozaki H, Ohta E, Obata F, Kawarai T, Kaji K. Segawa disease with action retrocollis (cervical dystonia); A case report of 23-year-old female. 14th International Child Neurology Congress, 2016.5
- ⑤大日方友理、太田悦朗、曾根岳史、鵜飼英樹、久松知子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞のゲノム編集および病態解析」第11回日本臨床検査学教育学会学術大会、2016年8月
- ⑥太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鵜飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立」第39回日本神経科学大会、2016年7月

(2) 口頭発表

- ①太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鵜飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立」第16回日本再生医療学会総会、2017年3月
- ②大日方友理、太田悦朗、曾根岳史、鵜飼英樹、久松知子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞のゲノム編集および病態解析」第11回日本臨床検査学教育学会学術大会、2016年8月

(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コネキシン 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 ー内耳イオン環境と聴覚神経の変性・回復機構ー

1. 研究の目的

(1) 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)。本研究では蝸牛内リンパ電位維持機構とその破綻による遺伝性難聴の分子病態を様々な薬理活性物質を用いて解明し、これらの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。

2. 研究の計画

(1) 蝸牛イオン輸送経路の修復による蝸牛内リンパ液恒常性の回復
以下の材料・方法により蝸牛リンパ液恒常性の回復に標的を絞った新たな難聴治療法を開発する。【遺伝子改変難聴モデル動物および薬剤スクリーニング用モデル細胞】Cx26-Tgマウス (Kudo, *Hum. Mol. Genet.*, 2003) Cx26-KOマウス (Kamiya, *J. Clin. Invest.*, 2014) 【選抜した薬剤の内耳局所治療による聴力回復】蝸牛ギャップ結合形成細胞を用いて選抜した薬理活性化化合物を様々な条件で遺伝子改変難聴モデル動物の内耳へ投与し、聴力をモニタリングする。これにより安全で有効性の高い化合物を更に選抜する。必要であればこれらの効果を補足するため、アデノ随伴ウイルスでのCx26遺伝子治療や細胞治療との混合治療の検討を行う。

3. 研究の成果

(1) 本研究ではGJB2変異型遺伝性難聴の発症機構を患者細胞にて再現する難聴モデル細胞を薬剤スクリーニングに応用することを目的とし、難聴モデル動物由来induced pluripotent stem (iPS) 細胞からの分化誘導を試みた。まず、正常マウスiPS細胞から外胚葉、非神経外胚葉への分化誘導を行い、蝸牛様CX26ギャップ結合プラークの形成能を持つ細胞の作製法を選抜した。さらにCx26欠損難聴モデルマウスの蝸牛線維細胞からiPS細胞の樹立した。これらのiPS細胞から内耳細胞への分化誘導を行い、GJB2変異型遺伝性難聴の疾患モデル細胞を作製することに成功した(Fukunaga, *Stem Cell Reports*, 2016, 7(6), 1023–1036)。Cx26欠損難聴モデルマウスにおいて見られるGJP崩壊の分子病態はCx26欠損難聴モデルマウスのiPS細胞から分化誘導した内耳細胞においても再現することが可能であった。

4. 研究の反省・考察

(1) 上記のように遺伝子改変難聴モデルマウスから難聴疾患モデル細胞を開発することに成功したが、この開発に時間と労力を費やしたことにより、疾患モデル細胞を用いて薬剤を選抜す

るには至らなかった。しかし、上記のGJB2変異型遺伝性難聴の疾患モデル細胞は、蝸牛における難聴の発症機構を再現することを可能とし、これにより患者由来内耳細胞を用いた大量の薬剤スクリーニングが可能となることが考えられる。これらの成果は遺伝性難聴の創薬や再生医療の開発へ活用されることが大いに期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①福永一朗, 藤本あゆみ, 畠山佳欧里, 青木徹, 西川貴菜, 美野輪治, 池田勝久, 神谷和作.
マウスiPS細胞からコネキシン26陽性細胞への分化誘導とギャップジャンクションプラークの形成.
耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 30, 11-12
- ②福永一朗, 池田勝久, 神谷和作.
iPS細胞からコネキシン26発現細胞への分化誘導とギャップ結合プラークの構築.
Otolology Japan 26, 298
- ③福永一朗, 青木徹, 池田勝久, 神谷和作.
iPS細胞からConnexin26(Cx26)発現細胞および細胞間ギャップ結合プラーク構築細胞への分化誘導.
日本耳鼻咽喉科学会会報 119, 534
- ④神谷和作, 飯塚崇, 福永一朗, 青木徹, 安齋崇, 池田勝久.
GJB2変異遺伝性難聴の分子病態解析と新規治療法の開発.
日本耳鼻咽喉科学会会報 119, 534
- ⑤神谷和作, 池田勝久.
GJB2変異型遺伝性難聴への細胞治療法・遺伝子治療法の開発.
Audiology Japan 59, 607-608
- ⑥安齋崇, 池田勝久, 神谷和作.
コネキシン26欠損モデルマウスにおける外有毛細胞の変形とカベオリン2の集簇.
日本耳鼻咽喉科学会会報 119, 614

(2) 口頭発表

- ①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 大阪市、2016年3月17日
- ②Kazusaku Kamiya.
Genetics in otology, Molecular pathology of cochlear gap junction in GJB2 associated hearing loss.
10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery
英国・エジンバラ 2016年6月8日(招待講演)
- ③Katsuhisa Ikeda.
Virus induction therapy for GJB2 abnormality animal.
10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery
英国・エジンバラ 2016年6月8日(招待講演)
- ④Fukunaga I, Iizuka T, Hatakeyama K, Fujimoto A, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K.
Gene therapy and cell therapy targeting cochlear gap junction fomation for GJB2associated hearing loss.
Inner Ear Biology 53rd Workshop フランス・モンペリエ 2016年9月20日
- ⑤神谷和作, 池田勝久
GJB2 変異型遺伝性難聴への細胞治療法・遺伝子治療法の開発

第61回日本聴覚医学会総会 岩手県盛岡市、2016年10月21日

(3) 出版物

①Fukunaga, I., Fujimoto, A., Hatakeyama, K., Aoki, T., Nishikawa, A., Noda, T., Minowa, O., Kurebayashi, N., Ikeda, K., and Kamiya, K.
In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca^{2+} Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea.
Stem cell reports 2016, 7, 1023-1036

学 校 名	昭 和 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	YAPシグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の 基盤研究		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① YAP ② 中皮腫 ③ SNIPER ④ IAP ⑤ プロテインノックダウン ⑥ TMEPAI ⑦ TGF- β シグナル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
伊 東 進	薬 学 部	教 授	研究総括、TMEPAIに関する研究

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 本 巖	薬 学 部	教 授	化合物合成ルートの検討・合成
山 崎 龍	薬 学 部	准 教 授	新規化合物のデザイン・合成
伊 藤 愛	薬 学 部	助 教	化合物合成ルートの検討・合成
中 野 な お こ	薬 学 部	助 教	YAP阻害剤及びSNIPERを用いたin vitro及び in vivo実験
内 藤 幹 彦	国立医薬品食品衛生研究所	部 長	SNIPER合成展開時のモデル化合物・リード化合物の提供、SNIPER合成技術提供

YAPシグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の基盤研究

1. 研究の目的

本研究では、様々な腫瘍で恒常的に活性化されている転写コアクチベーターYAPの活性を阻害することで腫瘍進展を抑制することを目的としている。その方法として、申請者らが単離し、その機能解析を世界に先駆けて行ってきたTGF- β シグナル抑制分子であるTMEPAIファミリー(TMEPAIとC18orf1)がYAPの活性を抑制する結果を得たことに基いて(図1)、下記(1)～(4)の研究課題を行った。

(1)TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

YAPの恒常的活性化が高頻度で認められる悪性中皮腫でYAPシグナルとTGF- β シグナルが協調してがんを悪性化することが報告されている。すでに申請者らが精力的に解析を進めているTMEPAIファミリーがYAPの活性を抑制する基礎データを得たので、TMEPAIファミリーがYAPシグナルとTGF- β シグナルを共に抑制し、悪性中皮腫の進展を抑制する可能性があるかと推測し(図2)、その分子メカニズムの解明を試みた。

(2)YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

YAPは中皮腫以外の様々ながんでも恒常的に活性化されているので、YAPの活性抑制は、がん征圧に繋がる可能性を秘めている。そこで、YAPを標的としたリード化合物の探究及び合成展開を目指した。すでに申請者らは、2万を超える化合物ライブラリースクリーニングでYAP結合化合物を約30種類同定している。これらの化合物の中にYAP活性を阻害する化合物を見出すことを目的とした。加えて、他の化合物ライブラリーの網羅的スクリーニングを展開した。

(3)YAPを標的としたSNIPER(Specific Non-genetic IAP dependent Protein ERaser)法による分子標的薬の合成展開

申請者らは、SNIPER法と呼ばれる新規概念に基づいた低分子化合物を合成し、YAPタンパク質の発現を抑制することで抗腫瘍活性を持つ分子標的薬の基盤研究を進めるために以下の研究を展開した。SNIPER法とは、E3ユビキチンリガーゼcIAP1に結合する化合物BS(Bestatin-methyl ester)に標的タンパク質に高親和性を持った低分子化合物Xを共有結合した化合物(SNIPER)であり、このSNIPERにより、目的タンパク質を強制的にユビキチン化し、分解する方法(図3)である。すでにYAPに結合する化合物を見出しているの、BSと共有結合が可能かつYAPと高親和性のSNIPER候補化合物を見出すことを目的とした。

(4)新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

他のE3ユビキチンリガーゼに結合する低分子化合物を化合物ライブラリーで探索し、効率よく標的分子を分解できるSNIPERの開発を目的とした。

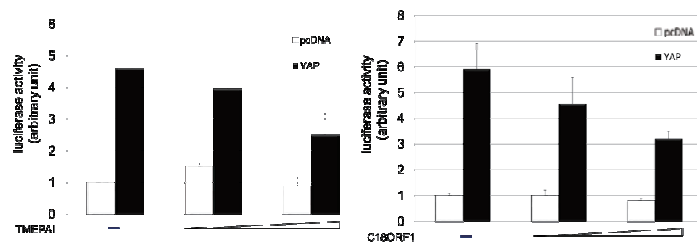


図1 TMEPAIファミリーは、YAPによるレポーターの活性化を抑制する

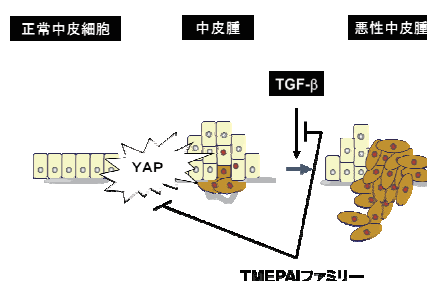


図2 悪性中皮腫におけるYAP、TGF- β シグナル:悪性中皮腫では恒常的にYAPシグナルが活性化されており、加えてTGF- β シグナルが細胞増殖促進に働く。TMEPAIファミリーは両シグナルを抑制し、がん進展を阻害する分子となる。

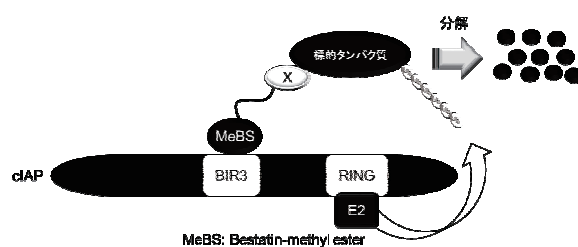


図3 SNIPERによる標的タンパク質分解: MeBSと化合物Xを共有結合した新規化合物を合成し、cIAPを標的タンパク質の近傍に寄せることにより、ポリユビキチン化し、分解する。

2. 研究の計画

(1) TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ① TMEPAIファミリーがYAPと直接結合して機能を抑制するか、それともYAPの機能を抑制するHippoシグナル系を活性化することにより抑制するかをルシフェラーゼアッセイ、免疫沈降法、ウェスタンブロット法で確認することを計画した。
- ② 申請者らは、中皮腫細胞株を所有しているため、TMEPAIファミリーを高発現及びsiRNAまたはCrisper/Cas9システムによりノックダウンさせることにより、中皮腫の悪性度が変化するのをin vitro腫瘍形成実験及びin vivoゼノグラフトモデルで確認することを計画した。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ① 約30種類存在するYAP結合化合物がYAPシグナルを抑制することをルシフェラーゼアッセイ並びにYAPによって誘導される遺伝子発現で確認した。
- ② ①においてYAP阻害活性の強い化合物Aを用いて、中皮腫細胞でin vitro細胞増殖抑制実験、in vivoゼノグラフトモデルを行った。
- ③ ②と同時に、本学天然物化学研究室が所有する化合物ライブラリーを用いて、ビアコアによるハイスループットスクリーニング(HTS)を行い、YAPに結合する化合物を選別した。

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成展開

- ① ビアコアを用いて、すでにYAPと結合することが認められている約30種類の化合物の中から高親和性で結合する化合物を見出すことを計画した。
- ② ①の中で見出した高親和性化合物Bをリード化合物として、さらにYAPに対して高親和性を有する化合物の合成を試みた。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

- ① E3ユビキチンリガーゼの中で、ユビキタスに発現している分子を分類する目的で、各種中皮腫細胞から全RNAの調製を行った。

3. 研究の成果

(1) TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ① TMEPAIファミリーのC18ORF1を用いてYAPとの結合領域を検討したところ、C18ORF1のPYモチーフを介して結合していることを明らかにした(図4)。加えて結合領域を欠損した変異体(C18ORF1ΔPY)はYAPシグナルを抑制できなかった(図5)。さらにC18ORF1がYAPタンパク質の不安定化に関与している可能性を見出した(図6)。
- ② 中皮腫細胞を用いて、TMEPAIファミリーノックダウン細胞をCrisper/Cas9システムにより樹立することを試みたが、現在まで有望なノックダウン細胞の樹立に成功していない。

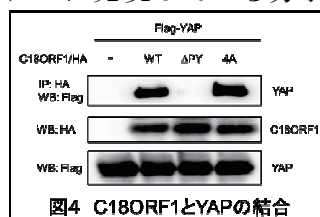


図4 C18ORF1とYAPの結合

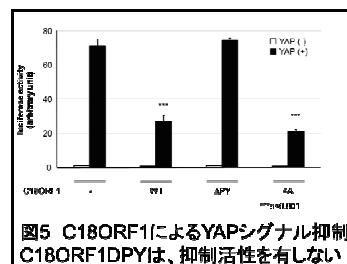


図5 C18ORF1によるYAPシグナル抑制
C18ORF1ΔPYは、抑制活性を有しない

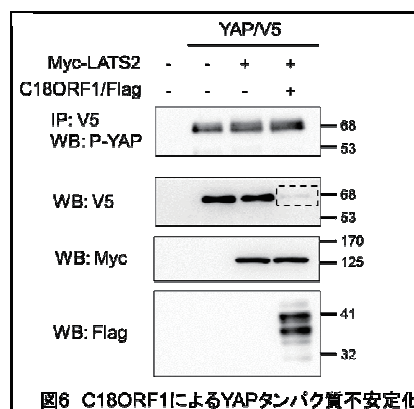
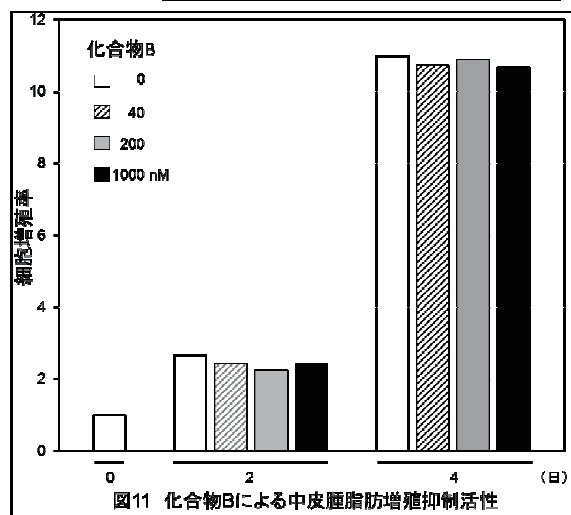
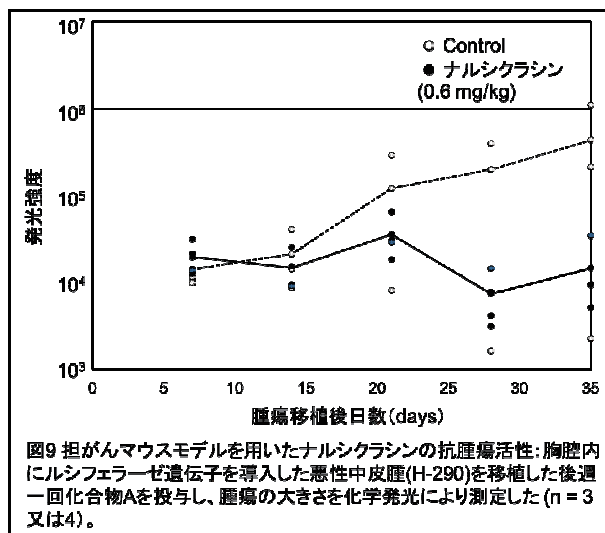
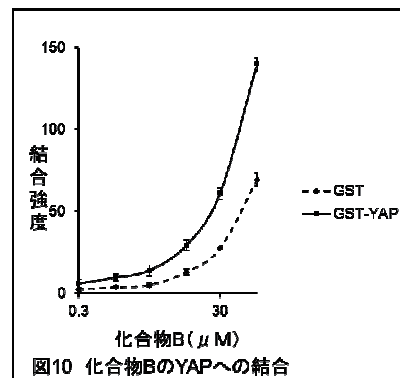
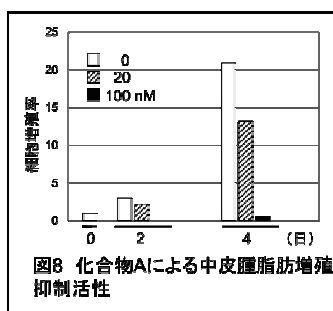
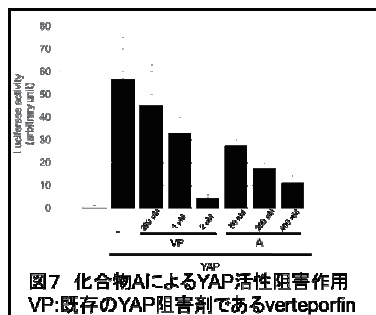


図6 C18ORF1によるYAPタンパク質不安定化

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ① YAPに結合することを見出した化合物AがYAPシグナルを抑制すること(図7)並びに中皮腫細胞の増殖を抑制する(図8)ことを見出した。
- ② ルシフェラーゼ遺伝子を導入した中皮腫細胞をヌードマウス胸腔内に移植後、化合物Aを週1回腹腔内投与を行い、経時的に腫瘍の大きさを測定したところ、綿実油を投与したマ



ウスに比較し、腫瘍増殖が抑制された(図9)。

- ③ 本学天然物化学研究室が所有する化合物ライブラリーを用いて、YAPに結合する化合物の探索をビアコアで行っているが、現在まで有望な化合物を見出すことができていない。

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成展開

- ① 化合物BはYAPに対する結合能が高いが、中皮腫細胞増殖抑制が弱かった(図10、11)のでSNIPERのリード化合物として利用することにした。
- ② 化合物Bをリード化合物として、いくつかの化合物合成を行った。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

- ① 中皮腫に発現しているE3ユビキチンリガーゼをRNAレベルで調べるために、全RNAをいくつかの中皮腫から調製したが、確認まで至らなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ① TMEPAIファミリーがPYモチーフを介してYAPタンパク質を不安定化することによりYAPシグナルを抑制していることを見出した。
- ② 中皮腫細胞でTMEPAIファミリーの発現を抑制した細胞株を樹立することができなかった。細胞の樹立は本プロジェクトに必要な不可欠であるので次年度さらに精力的に取り組む、in vivoでの作用を明らかにする。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ① 化合物AがYAP阻害剤として見出すことができ、さらにin vivoで中皮腫細胞増殖を抑制することができた。今後は化合物AのYAP阻害機構の分子メカニズムの解明を行う。

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成展開

- ① 化合物BがYAPのリガンドのリード化合物になることを見出したので、さらに高親和性リガ

ンドの合成を行った。

- ② 今後は合成した化合物の中で高親和性リガンドを見出し、それを用いてSNIPER化合物合成を行う。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

- ① (1)～(3)の研究課題を中心に行ったため、本プロジェクトを進めることが殆どできなかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 転写因子YAPを標的としたプロテインノックダウン法の確立 中野なおこ、服部隆行、内藤幹彦、伊東進 第75回日本癌学会学術総会 横浜（パシフィコ横浜）

(3) 出版物

なし

学 校 名	聖 路 加 国 際 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	世代間交流看護ベストプラクティスのための支援ガイドの創生		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①世代間交流 ②地域看護 ③生涯発達看護 ④ベストプラクティス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
亀 井 智 子	大学院看護学研究科	教 授	研究の統括・文献検討・支援ガイドの編集、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 上 千 春	大学院看護学研究科	准 教 授	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
金 盛 琢 也	大学院看護学研究科	助 教	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
桑 原 良 子	大学院看護学研究科	助 教	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
目 黒 齊 実	大学院看護学研究科	助 教	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
山 本 由 子	武蔵野大学人間科学部	准 教 授	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成

世代間交流看護ベストプラクティスのための支援ガイドの創生

1. 研究の目的

看護の実践現場においての「ベストプラクティス」は、ある結果を得るための最も効率の良いプロセスや、そのための活動のことをさしている。そのためには、対象者のニーズを明確化し、エビデンスに基づいて看護職が直接的な解決策を提供することであり、最善策を検討する必要がある。

世代間交流を取り入れた看護支援は、高齢者看護や地域看護の中では新しい領域であるが、超少子・高齢社会となったわが国において、持続可能なプログラム開発が望まれており、地域のニーズに応じたベストプラクティスのための知見を集積している段階であるといえる。

本研究の目的は、市民主導型の世代間交流看護支援に関するベストプラクティスについて具体的要素を示し、それにもとづく支援ガイドを創生することである。

2. 研究の計画

(1) 世代間交流実践にもとづく「世代間交流看護支援のベストプラクティス」の要素の抽出

以下①～③の対象者からそれぞれデータを収集し、高齢者と子ども(小学生)の間の世代間交流量、および利用者の交流満足度、世代間交流プログラムを運営するボランティアと主催者の支援内容を収集・分析し、ベストプラクティスの要素を明確化する。

① 世代間交流プログラム利用者

本学内で毎週開催している世代間交流プログラムを研究フィールドとし、そこに参加した高齢者と子どもの間に生じる世代間交流の内容、交流の様子について、聖路加式世代間交流観察尺度(SIEROインベントリー)を用いて観察・評価する。また、各回のプログラム終了時に利用者によるプログラム参加満足度を0(とても不満)～10(とても満足)のvisual analog scale(VAS)-10により収集する。

② ボランティア

プログラム終了時にインタビューを行い、世代間交流プログラムの内容や最良と考えるプログラム運営等について意見を収集し、分析する。

③ 支援者

世代間交流プログラムの主催者について、高齢者と子どもとのコミュニケーションの特徴、および会の前後のミーティングの内容を分析し、最良の世代間交流のプログラムの内容とその時に行われていた支援方法について分析する。

(2) 先行研究からの「世代間交流看護支援のベストプラクティス」の要素の分析

医中誌webおよびCINAHL Plus with Full Textを用いて、世代間交流看護に関する国内外の関連文献を検索・収集し、世代間交流支援のベストプラクティスとは何か、ベストプラクティスの構成要素などをレビューし、要素を明確化する。

(3) 世代間交流看護支援ベストプラクティスのための支援ガイドの創生

(1)(2)で明確化したベストプラクティスの要素に基づき「世代間交流看護支援ベストプラクティスのための支援ガイド」原案を作成する。このガイドでは、世代間交流プログラムの利用者(高齢者、子ども)、ボランティアからのプログラム参加による感想文を加え、市民主導による世代間交流プログラムを運営する際の手引きとなる支援ガイドとして完成する。

3. 研究の成果

(1) 世代間交流実践にもとづく「世代間交流看護支援のベストプラクティス」の要素

プログラムは年間35回開催され、全ての回をSIEROインベントリーを用いて観察し、各回

終了時には、利用者の参加満足度を収集した。

① 利用者の特性

高齢者は全て女性で、年齢平均79.9±5.8歳、一般高齢者5名、虚弱高齢者9名、認知症高齢者2名であった。利用期間は平均5.0±2.6年であった。小学生は女子7名、年齢平均8.0±0.8歳、参加期間は平均5.1±1.8年であった。

② 交流プログラムの内容

行われた交流プログラムは、ちぎり絵などの共同制作、歌、回想法、話し合い、朗読、書道、体操、おやつ作り、ゲーム、季節の行事、ミニ映画鑑賞、アロマケア、共におやつを食べるであった。

③ プログラム別の満足度および世代間交流量の評価

全ての回の参加満足度(VAS-10)は平均9.2 であった。高齢者・子どもの両世代の満足度が高かったプログラムは、アロマハンドケア、話し合い、歌、体操、おやつ作りなどの会話や身体活動、ふれあいを取り入れた内容であった。

プログラム別のSIEROインベントリーを用いた世代間交流量は、アロマケア、おやつ作り、ゲームなどで多かった。

④ 実践から示されたベストプラクティスの要素

高齢者と子どもの交流量や参加満足度が高いプログラムに含まれる共通した要素として「高齢者と子ども両世代の関心事を取り入れる」「教え-教えられる」「自然な双方向的コミュニケーションの成立」「高齢者と子ども両世代の協力や助け合いによる共同・連帯感」「成果などを喜びあう」という、互恵性、および世代継承性、コミュニケーションを含むものであることが示された。

⑤ 主催者、および支援ボランティアによる支援内容

高齢者と子どもの交流が促進されるよう、好みの活動をプログラムとして取り入れる、子どもの特技を披露してもらう、テーブルや座席の配置を十分検討する、事故予防など心地よい場を作ることに主眼をおいたものであった。また、高齢者に対しては、身体機能や認知機能などに応じて子どもに関心が向けられるよう支援し、子どもに対しては、プログラムを通じて高齢者との会話を橋渡しするなど、両者の特徴やペースに応じてコミュニケーションをつなぐ支援をタイムリーに実施していた。さらに認知症高齢者の家族には、参加中の様子などを伝え、会に安心して参加し続けられるよう支援していた。

(2) 文献検索とレビューの結果

医中誌webから「世代間交流」and「原著」で検索し、計30和文献、CINAHL Plus with Full Textからは同様の検索用語で7英文献が検索された。各文献からベストプラクティスの要素を抽出した結果「孤立している一人一人をつなぐ」「各自のコンフォートゾーンを侵さない」「自然な関係性を構築する」「家族支援として家族にも利益となることを考える」「相互の理解」「世代継承性の増加」「身体・心理・社会的well-being」「人間関係の広がり」「地域共生」「パートナーシップを築く」の要素が抽出できた。

(3) 世代間交流看護支援ベストプラクティスのための支援ガイドの創生

前述の世代間交流プログラムにおける調査、および文献レビューの結果を統合し、世代間交流看護支援のベストプラクティスの要素を抽出した。それらは、＜心身の健康状態を観察する＞＜参加者の好みの活動を取り入れる＞＜自然なコミュニケーションを促進する＞＜高齢者と子どもの一人ひとりの特性に配慮する＞＜高齢者と子どもの特技や強みを引き出す＞＜高齢者と子ども間の互恵性を引き出す＞＜世代継承性を狙う＞＜心地良い空間を創る＞＜高齢者と子どもの関係づくりを支える＞＜参加者が満足できるかを考える＞＜認知症高齢者の家族に参加中の様子を伝える＞が挙げられた。これらに基づき、世代間交流支援ガイドとして「地域における世代間交流ベストプラクティスハンドブック」を編集し、冊子を刊行した。

4. 研究の反省・考察

(1) 高齢者と子どもの交流を促進する世代間交流看護支援のベストプラクティス

高齢者・子どもの両世代において満足度が高い交流活動として、アロマケア、話し合い、歌、体操、おやつ作りなどが挙げられた。これらのプログラムでは、参加者の好みの活動を取り入れることや、高齢者と子どもの自然なコミュニケーションを促進すること、互恵性・世代継承性が引き出されるなどの要素が含まれていた。一方、虚弱高齢者や認知症高齢者ではこれらの交流活動においても、子どもに関心が向くことが少なく、交流頻度が少なかった。そのため多様な高齢者が利用する世代間交流プログラムでは、高齢者と子どもの一人ひとりの特性に配慮することも重要な要素であると考えられた。また両世代の自然なコミュニケーションを促進する上では、高齢者・子どもにとって心地良い空間を創ることや、高齢者と子どもの関係づくりを支える支援が必要であった。

世代間交流は、両世代のニーズに合致した安心できる場や、豊かなプログラム内容の提供により、両世代がパートナーシップの構築を通して、互恵性と世代継承性を発揮するというプログラムデザインに基づくもので、これらにより参加者が満足できることが、世代間交流看護支援のベストプラクティスにとって重要であると考えられた。

(2) ベストプラクティス支援ガイドの活用と今後の課題

本研究で作成した「地域における世代間交流支援ベストプラクティスハンドブック」は、実践から得た量的・質的データの統合、および文献検討から得たベストプラクティスの構成要素をまとめ、それに基づいて構成した。そのため、世代間交流のための手引書として有用であるとする。一方で、各地で開催される世代間交流プログラムの実施頻度や内容、場所は多様化しており、参加者や支援者も多様である。特に看護職が大学において継続的に開催している世代間交流プログラムは先例がなく、本支援ガイドが今後すべての世代間交流プログラムに適用可能であるかは検討の余地がある。今後は、他の世代間交流プログラム実践機関の協力を得て、本支援ガイドの転移可能性を検討する必要がある。多様な地域や対象者における世代間交流看護支援の実践が集積され、ベストプラクティスを希求した支援が浸透し、超少子・高齢社会のさらなる進展が予想されるわが国においての持続可能なプログラム運営により、両世代の生活の質の向上に寄与するものとなることが望まれる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①金盛琢也、亀井智子、山本由子：都市部多世代交流型デイプログラムにおける参加高齢者特性および活動内容別の世代間交流の評価、日本世代間交流学会誌、6(1)、83-88、2016.
- ②亀井智子：都市部地域における多世代交流型デイプログラムを通じた高齢者の社会参加支援とPeople-Centered Careの開発、Geriatric Medicine、55(2)、185-90、2017.

(2) 口頭発表

- ①亀井智子、山本由子、川上千春、金盛琢也、桑原良子、目黒斉実：多世代交流看護支援ベストプラクティスの開発：第1報参加者満足度によるプログラム評価、第36回日本看護科学学会学術集会、2016(東京).
- ②山本由子、亀井智子、川上千春、金盛琢也、桑原良子、目黒斉実：多世代交流看護支援ベストプラクティスの開発：第2報プログラム別交流感と満足度の関連、第36回日本看護科学学会学術集会、2016(東京).
- ③目黒斉実、亀井智子、川上千春、金盛琢也、桑原良子：認知症高齢者への世代間交流看護支援の検討：2年7か月の参加経過のケーススタディ、第21回聖路加看護学会学術大会、40、2016(東京).

(3)出版物

- ①日本混合研究法学会監修、抱井尚子、成田慶一編、亀井智子他著、混合研究法への誘い、第8章看護における混合研究法の活用例、67-75、2016、遠見書房(東京).
- ②亀井智子、川上千春、金盛琢也、目黒齊実、桑原良子、山本由子、百武ひとみ、ボランティア・参加者一同:地域における世代間交流支援ベストプラクティスハンドブック、1-54、2017、聖路加国際大学大学院看護学研究科老年看護学(東京).

(4)投稿中

Tomoko KAMEI, Takuya KANAMORI, Yuko YAMAMOTO, Chiharu KAWAKAMI, Satomi MEGURO, Yoshiko KUWABARA: The best practice of intergenerational programs based on a reciprocity and generativity between non-frail, frail and cognitive impairment older adults and school aged-children through a mixed methods study.

学 校 名	創 価 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ES/iPS細胞のナイーブ状態を決める糖鎖と再生医療への応用 ー糖鎖の網羅的探索と新規培養法の開発ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① ES細胞 ② 糖鎖 ③ ナイーブ状態			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 原 祥 子	理 工 学 部	教 授	全体の統轄、糖鎖構造を制御したES細胞の作製、各種シグナルの解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 瀬 明	理 工 学 部	教 授	ベクターの作製、分子生物学的解析
一 宮 智 美	理 工 学 部	研究支援員	ES細胞の培養、生化学的解析

ES/iPS細胞のナীব状態を決める糖鎖と再生医療への応用 ー糖鎖の網羅的探索と新規培養法の開発ー

1. 研究の目的

ヒトとマウスのES/iPS細胞は、異なる発生段階にある。マウスES/iPS細胞はより初期の内部細胞塊に対応する状態、すなわち、ナীব状態にあり、ヒトES/iPS細胞はこれより少し分化した状態、エピブラストに近いプライム状態にある。このため、両者は異なる性質を示す。マウスES/iPS細胞は、単一細胞で培養可能で増殖能が高く、培地に白血病抑制因子（LIF）を添加して、未分化性を維持する。一方、ヒトES/iPS細胞は、増殖が遅く、単一細胞では生存性が低く、扱いにくい。未分化性維持には、LIFではなく、FGF2とactivinが必要である。再生医療への応用を容易にするため、ナীব状態のヒトES/iPS細胞の作製されている。このような背景から、我々は、これらにおける糖鎖修飾に注目した。

糖鎖修飾は、主な翻訳後修飾の一つであり、細胞表面や細胞外に分泌されるタンパク質の80%が糖鎖修飾を受けるとされる。また、細胞表面には、様々な糖鎖を持つ糖脂質も存在している。これらの糖鎖は、各組織や癌などの疾病の状態を反映して変化し、細胞外からの様々なシグナルを制御している。生物の発生過程においても、糖鎖は、発生段階特異的に顕著に変化する。ES/iPS細胞の表面マーカーは、SSEA-1やSSEA-4、TRA-1-60抗原、GCTM2抗原など、その多くが糖鎖であるが、マーカー糖鎖の機能は明らかではない。

ES/iPS細胞は、自己複製能と多能性を持つ。ナীবなマウスES細胞の自己複製能・多能性は、転写因子であるOct3/4やNanogといった細胞内因子の発現に加え、LIF、Wnt、骨形成タンパク質（BMP）などの細胞外因子からのシグナル伝達によって維持される。我々は、ナীবなマウスES細胞を用い、RNAiにより糖鎖合成に関わる100種以上の糖転移酵素を網羅的にノックダウンして、自己複製能・多能性維持に必須な糖鎖修飾の探索を行ってきた。これまで、(1)グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸が、WntやBMPシグナルを制御して自己複製能と多能性維持に、また、FGF4やFasシグナルを制御して分化に関与すること、(2)ラックダイナック糖鎖構造(GalNAc β 1-4GlcNAc)が、LIFシグナルを介して自己複製能と多能性維持に関与することを明らかにしてきた。さらに、現在、関与の可能性がある新たな糖鎖を見出している。

本研究では、新たな糖鎖を加えた「ナীব状態で働く糖鎖の役割の解明」とそれに基づいた「ナীবなES/iPS細胞の作製と維持を促進する糖鎖制御培養法への応用」を目的とした。本年度は、関与の可能性がある新たな糖鎖、すなわち、*O*-GlcNAc（*O*-結合型*N*-アセチルグルコサミン）の役割を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の計画

O-GlcNAc修飾は、核・細胞質内に存在する種々のタンパク質のセリン(Ser)、スレオニン(Thr)残基に、GlcNAcが1分子結合したものである。*O*-GlcNAc転移酵素(Ogt)は、タンパク質のSer、Thr残基に、UDP-GlcNAcからGlcNAcを転移する。一方、*O*-GlcNAcは、*O*-GlcNAc分解酵素(Oga)により分解される。

(1) ナীব状態のマウスES細胞におけるOgtの機能解析

マウスES細胞において、short hairpin RNA (shRNA)発現ベクターによる*Ogt*のノックダウンを行い、アルカリフォスファターゼ（ALP）染色やナীব状態の未分化性維持因子の発現を検討した。

(2) プライム状態のES cell-derived epiblast stem cells (ESD-EpiSCs)におけるOgtの機能解析

ナীব状態のマウスES細胞を、LIFを添加せずに、15ng/ml FGF2と、0.6 μ M JAK阻害剤（LIFシグナル阻害剤）を加えて培養し、プライム状態のES cell-derived epiblast stem cells (ESD-EpiSCs)に分化させ、*Ogt*、*Oga*、*O*-GlcNAcの局在を検討した。さらに、*Ogt*阻害

剤であるPhenyl 5-chloro-2-oxo-3-hydrobenzoxazole-3-carboxylateと、Oga阻害剤であるPUGNAcを用いた検討も行った。

(3) プライム状態からナイーブ状態への移行におけるOgtの機能解析

プライム状態のESD-EpiSCsを、FGF2とJAK阻害剤を加えずに、LIFとFGFシグナル阻害剤であるPD0325901を1 μ M、Wntシグナル促進剤であるCHIR99021を3 μ M加えて、1週間フィーダー細胞上で培養し、ナイーブ状態のマウスES細胞様の細胞 (reverted ESCs : rESCs) へ戻した。この時、Ogt阻害剤とOga阻害剤を加え、ALP染色によりナイーブ化効率を検討した。

3. 研究の成果

(1) ナイーブ状態のマウスES細胞におけるOgtの機能解析

- ① ナイーブ状態のマウスES細胞におけるO-GlcNAcの機能を検討するため、OgtをRNAi法によりノックダウン (KD) し、O-GlcNAcを減少させた。O-GlcNAc修飾されたタンパク質の発現は、KD効率に比例して減少した。ALP染色を行ったところ、Ogt KD細胞におけるALP陽性コロニーの数は顕著に減少した。また、ナイーブ状態の未分化性維持因子であるNanogとSox2のmRNAとタンパク質の発現も、コントロールに比較し有意に減少した。これらの事実から、ナイーブ状態のマウスES細胞の維持には、OgtによるO-GlcNAc修飾が必要であることがわかった。
- ② ナイーブ状態のマウスES細胞から胚様体 (EB) を形成し、分化に伴うOgtの発現の変化を検討した。Ogtの発現はEB分化に伴い減少し、O-GlcNAcの発現も、また、減少した。

(2) プライム状態のESD-EpiSCsにおけるOgtの機能解析

- ① Ogtには、nucleocytoplasmic Ogt(ncOgt)、mitochondrial Ogt(mOgt)、short Ogt(sOgt)の3種のアイソフォームがある。ncOgtとsOgtは核と細胞質に、mOgtはミトコンドリアに局在する。また、Ogaにはlong-Oga(L-Oga)とshort-Oga (S-Oga)の2つのアイソフォームがある。ncOgtの発現は、ナイーブ状態のマウスES細胞とプライム状態のESD-EpiSCsで変化が認められなかったが、L-OgaとS-Ogaの発現は、ESD-EpiSCsで顕著に増加した。また、タンパク質のO-GlcNAc修飾のパターンも両状態で異なっていた。
- ② ESD-EpiSCsにおけるOgt、Oga、O-GlcNAcの細胞内局在を検討したところ、ncOgtは核と細胞質に局在し、L-OgaとS-Ogaは細胞質のみに局在していた。また、核と細胞質画分におけるタンパク質のO-GlcNAc修飾のパターンは異なっていた。
- ③ Ogt阻害剤とOga阻害剤を用いて、ESD-EpiSCsにおけるOgaとOgtの機能について検討した。Ogt阻害剤を加えると、O-GlcNAcが減少した。未分化性に変化は認められなかったが、死細胞の数が有意に増加し、Ogtがプライム状態のESD-EpiSCsの生存に必要であることがわかった。また、Ogaは生存や未分化性維持には関与していなかった。

(3) プライム状態からナイーブ状態への移行におけるOgtの機能解析

- ① Ogt阻害剤とOga阻害剤を用いて、ナイーブ化効率を検討した。Ogt阻害剤を加えた場合も、Oga阻害剤を加えた場合も、有意にナイーブ化効率が減少し、プライム状態のESD-EpiSCsからナイーブ状態のrESCsへの移行には、OgtとOgaの両者が必要であることがわかった。

4. 研究の反省・考察

(1) プライム状態のESD-EpiSCsにおけるOgtの機能解析

プライム状態のESD-EpiSCsにおいて、Ogtは未分化性には関与しないが、生存に必須であることが、明らかになった。

(2) プライム状態からナイーブ状態への移行におけるOgtの機能解析

プライム状態のESD-EpiSCsからナイーブ状態への移行にはOgtとOgaの両者が必須であることが、明らかになった。

(1)(2)の結果は、ナイーブ状態とプライム状態の維持と遷移において、タンパク質のO-

GlcNAc修飾が重要な役割を担っていることを示していた。現在、修飾を受けているタンパク質を同定しているところである。今後は、同定されたタンパク質に変異を導入して、各シグナルとの関連を検討する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 * corresponding author

①Miura T, Nishihara S*: O-GlcNAc is required for the survival of primed pluripotent stem cells and their reversion to the naïve state.

BBRC, 480, 655-661 (2016).

②Nishihara S*: Glycans define the stemness of naïve and primed pluripotent stem cells.

Glycoconj J. 2016 Oct 28. [Epub ahead of print] PMID: 27796614.

(2) 口頭発表

①三浦太一, 西原祥子 : 細胞内糖鎖修飾である O-GlcNAc による多能性幹細胞のナイーブ状態とプライム状態の制御機構.

第16回日本再生医療学会総会, 仙台, 3月, 2017.

(3) 出版物

①西原祥子 : 多能性幹細胞における糖鎖の機能-ナイーブ状態とプライム状態に関わる糖鎖.

Bio Clinica, 32, 412-418 (2017) .

学 校 名	帝 京 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	乾癬の病態における尿酸結晶の役割の研究 －乾癬治療薬としてのP2Y6阻害剤の検討－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 乾癬、尿酸、受容体拮抗薬			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
多 田 弥 生	医 学 部	准 教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 川 武 子	医 学 部	助 手	データー整理、解析
武 岡 伸 太 郎	医 学 部	後期研修医 (大学院生)	実験・データー整理・論文作成

乾癬の病態における尿酸結晶の役割の研究 —乾癬治療薬としてのP2Y6阻害剤の検討—

1. 研究の目的

(1) 研究目的の要旨

尋常性乾癬は厚い鱗屑と血管拡張を伴う紅斑を特徴とし、炎症性角化症に分類されている皮膚疾患である。病因として多因子遺伝、免疫学的異常、ケラチノサイトの分化、増殖異常などが言われているが、その病態の多くは不明である。古くから、乾癬患者の半数近くで高尿酸血症があり、表皮内に尿酸結晶があることも報告されているが、尿酸結晶の乾癬の病態への関与は不明である。尿酸結晶がケラチノサイトにP2Y6受容体を介してサイトカイン分泌を促すことは代表者が以前報告した (Uratusji H, Tada Y et al. *J Immunol* 2012)。今回はP2Y6阻害剤を乾癬の治療薬として使用できるかどうかをイミキモドを用いた乾癬マウスモデルを用いて検討した。

(2) 研究の学術的背景

① 乾癬の病態の理解の必要性

乾癬は有病率が日本では0.025%~0.11%で、欧米では2~3%の疾患であり、世界中に多くの罹患患者がいる。全身に厚い鱗屑を伴う紅斑が散在するため、鱗屑が移動のたびににはがれおち、美容上の問題も伴うため、患者のQOLが著しく障害され、その苦しきからうつ病になったり、自殺することがあることも知られている。乾癬の病態を理解することは乾癬の治療につながり、世界中の多くの乾癬患者の治療に役立てることができると考えた。

② 乾癬の病態形成におけるケラチノサイトと炎症細胞のクロストークの重要性

最近までの研究から乾癬患者の病変部と末梢血においてはケラチノサイト、免疫担当細胞の双方に異常があり、また、それらがお互いに影響しあうことにより、さらに病態が悪化することがわかってきている。病変部皮膚ではケラチノサイトからIL-8/CXCL8, S100A7/A8/A9などのケモカインが分泌され、好中球が病変部に遊走してくる。さらにこのケラチノサイトの近くには多くのCD11c陽性CD83陽性樹状細胞 (Dendritic cells: DC) が存在していることを研究代表者らは見出した (Komine M, ..., Tada Y: *J Invest Dermatol* 2007)。これらの樹状細胞に加え、特に乾癬病変部に特異的に出現するとされる樹状細胞: Tip-DC (TNF and iNOS-producing DC) はTNF- α , IL-23, IL-20を産生し、T細胞、ケラチノサイトを活性化する。さらに、末梢血においても、乾癬患者単球においてIL-23のサブユニットであるIL-12p40の産生が、健常人と比較して亢進していることも研究代表者らは報告している (Tada Y et al.: *Br J Dermatol* 2006)。さらに脂肪細胞が分泌するadipokineが乾癬の主要な免疫反応であるTh17系免疫反応を制御することを代表者らは報告した (Shibata S, Tada Y et al. *Nat Commun* 2015)

③ 乾癬と高尿酸血症

乾癬患者の半数において、高尿酸血症が認められ、乾癬の加療により、その多くで、血中尿酸値の低下が認められることは広く知られている。これは乾癬表皮のturn overの亢進により、ヌクレオチドの代謝産物である尿酸の産生亢進が表皮で起こり、末梢血中に影響を及ぼした結果と推測されている。この尿酸は、生体内で飽和濃度を超えると、容易に結晶化することが知られている。事実、Goldmanらは偏光顕微鏡などを用いて、乾癬の表皮内に尿酸結晶が存在することをすでに報告している (Goldman M: *Am J Dermatopathol* 1981)。この尿酸結晶がケラチノサイトにP2Y6を介してIL-8/CXCL8など病態に重要なサイトカイン分泌を促すことは代表者が報告した (Uratusji H, Tada Y et al. *J Immunol* 2012)。

④乾癬モデルマウスでのP2Y6阻害剤の治療効果の検討

乾癬の病態にはケラチノサイト、T細胞をはじめとする様々な炎症細胞の関与がこれまでに指摘されており、この炎症が抑制できる薬剤は、実際の治療に結びつく可能性がある。本研究の目的はイミキモド誘発乾癬マウスモデルを用いて、P2Y6阻害剤の乾癬治療薬としての可能性とその作用機序を探ることにある。

2. 研究の計画

(1) 乾癬モデルマウス作成と阻害剤投与による臨床的、組織学的改善の評価

①乾癬モデルマウス作成と阻害剤投与

野生型マウスにイミキモドを連日（6日間）外用し、乾癬皮疹を誘導する。具体的には、剃毛したマウスの背部皮膚にイミキモド（商品名：ベセルナクリーム、持田製薬株式会社）を125mg/日で、6日間連日外用し、乾癬皮疹が誘導されることを確認する。外用開始1日前（day-1）と3日目（day3）にPBS0.1mlまたはP2Y6阻害剤0.1ml（3.0mg/kg）を腹腔内投与する。

②皮疹の重症度評価（臨床的評価、組織学的評価）

外用終了後にP2Y6阻害剤投与群およびPBS投与群各マウスの背部皮膚における紅斑、浸潤、鱗屑の程度を乾癬重症度のスコア法であるPASI（Psoriasis Area and Severity Index）スコアに準じて、1-5のスコアリング（1なし、2軽度、3中等度、4高度、5極めて高度）で評価し、P2Y6阻害剤が乾癬皮疹の形成を抑制できるかどうかを検討する（Van der Fits L et al. J Immunol. 182:5836, 2009）。同時に、組織学的にも治療効果を検討する。具体的には、P2Y6阻害剤およびPBS投与群の各マウスの背部皮膚を6mmトレパンを用いて採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋し、6 μ mの厚さで切片を作製し、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。1検体中5箇所をランダムに選び、表皮の厚さを測定し、平均化する。乾癬の皮疹に浸潤する細胞（T細胞、樹状細胞、単球、好中球）の数をP2Y6阻害剤投与群およびPBS投与群で免疫組織学的に検討し、P2Y6阻害剤がどの炎症細胞浸潤を抑制しているかを検討する。6日間のイミキモド連日外用終了後に背部皮膚を6mmのトレパンを用いて採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋する。切片は次いでT細胞のマーカーCD3、樹状細胞のマーカーCD11cまたは単球のマーカーCD14、好中球のマーカーGr1で染色する。

(2) P2Y6阻害剤投与のサイトカイン発現への影響の検討（mRNAレベルでの検討）

P2Y6阻害剤およびPBS投与下のイミキモド誘発乾癬マウス皮膚におけるサイトカイン、ケモカインのmRNA発現をreal-time PCR法にて定量的に測定する。サイトカインとしては、①Th1サイトカインであるIFN- γ 、CXCL9、CXCL10、CXCL11、②Th17サイトカインおよびケモカインであるIL-17A、IL-17F、IL-12p40、IL-23、CCL20、③乾癬の病態形成に関与している各種サイトカインであるTNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-22などを測定する。イミキモド外用開始前、2日後、4日後、6日後において、これらのサイトカイン、ケモカインのmRNAの発現をreal-time PCR法によって経時的に評価する。全RNAを凍結皮膚組織よりQIAGEN RNeasy spin column（QIAGEN社）を用いて単離する。Messenger RNAはその後cDNAにTaqman® Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems）にて逆転写する。プライマーとプローブはPre-Developed TaqMan® Assay Reagents（Applied Biosystems社）にてデザインする。Real-time PCRはABI Prism 7000 Sequence Detector（Applied Biosystems社）を用いて行う。組織の固定、real time PCRのprimerに経費を使用する。

3. 研究の成果

(1) 乾癬モデルマウス作成と阻害剤投与による臨床的、組織学的改善の評価

①乾癬モデルマウス作成と阻害剤投与

野生型マウスにイミキモドを連日（6日間）外用し、乾癬皮疹を誘導し、外用開始1日前（day-1）と3日目（day3）にPBS0.1mlまたはP2Y6阻害剤0.1ml（3.0mg/kg）を腹腔内投与することで、P2Y6発現がmRNAレベルで認められることを確認し、このプロトコールが適切であることを確認できた。

②皮疹の重症度評価（臨床的評価、組織学的評価）

ダブルブラインドでP2Y6阻害剤投与の効果を臨床的、組織学的に評価した。まず臨床的には2回、コントロール抗体投与群も含め、3匹ずつのグループで検討を行ったが、2回とも有意差をもって、PBS投与群、あるいはコントロール中和抗体投与群と比較して、臨床的な改善を認めた。HE標本による組織学的な検討においては、表皮肥厚、浸潤細胞数いずれにおいてもP2Y6阻害剤による改善を認めた。浸潤細胞のうち、T細胞を含めたいずれの細胞が特に浸潤が抑制されていたかについては、まだ検討中である。

(2)P2Y6阻害剤投与のサイトカイン発現への影響の検討(mRNAレベルでの検討)

サイトカイン、ケモカインなど計画にあげたもののうち、特に乾癬の病態に重要なIL-17Aについては検討し、阻害剤投与により、発現が低下する傾向があることがわかった。皮疹誘導の比較的早期に認められる傾向があったため、今後経時的に最も適切な評価時期を検討の上、よりn数を増やして検討を続ける必要があると考えた。

4. 研究の反省・考察

(1)イミキモド誘発乾癬マウスモデルに対するP2Y6阻害剤の治療効果について

臨床的にも組織学的にも治療効果が認められたため、P2Y6阻害剤が乾癬の炎症抑制効果を有する可能性があることがわかった。今後はn数を増やしより有意差がつくように検討を加えることと、さらに、P2Y6阻害剤の安全性についての検討も同時に始めるべきであると考えた。

(2)イミキモド誘発乾癬マウスモデルに対するP2Y6阻害剤の作用機序について

以前の我々の検討は主に、表皮細胞をとりまく炎症をP2Y6阻害剤が抑制する点について検討したが、今回の結果ではIL-17Aの発現低下が認められたことから、そのターゲット細胞が表皮細胞以外の免疫担当細胞である可能性も考え、今後引き続き検討が必要であると考えられた。

5. 研究発表

(1)学会誌等

特になし

(2)口頭発表

特になし

(3)出版物

特になし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	
研 究 課 題	慢性炎症病態のマルチスケール生体イメージングと光制御 -慢性炎症病態の可視化と光制御-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①生体イメージング ②慢性炎症 ③生活習慣病 ④二光子顕微鏡			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 村 智	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	教 授	研究計画立案・遂行, 論文執筆

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 田 飛 鳥	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	助 教	慢性炎症病態のイメージングと光制御
瀬 尾 欣 也	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	平成29年 4月21日退職	バイオイメージングシステムの構築

慢性炎症病態のマルチスケール生体イメージングと光制御

－慢性炎症病態の可視化と光制御－

1. 研究の目的

(1) 生活習慣病、悪性腫瘍といった疾患の背景には慢性炎症病態が存在すると推測されている。この病態の理解のため、生体を網羅的・探索的に解析を行いたいというニーズが増えている。従来のフローサイトメーターなどを用いた位置情報が無い解析、あるいは病理サンプルなどの時間情報の失われた解析ではヘテロな細胞集団がリアルタイムに形作る病態を理解することは難しい。生体内の細胞の形態、動態を高い時間分解能で観察出来るバイオイメージングがこれらに代わる手法として注目されている。しかし、既存顕微鏡で用いられている顕微鏡レンズ、光路、撮像素子ではマクロ・ミクロの統合的理解のために必要な、広視野・高解像度の両立は不可能である。そこで我々は8K CMOSセンサと一眼レフカメラ用のレンズ、半導体用レンズ、天体望遠鏡用レンズなどの設計を応用してマクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡開発を計画した。さらに、手持ち運用が可能なマクロ・ミクロ光学観察機器を開発し臨床応用の可能性を探った。急性期の生体反応は光操作で血管傷害・炎症を惹起して評価した。慢性的な病態形成の評価にはレンズレス・オンチップイメージングで無麻酔の生体組織を長時間観察した。

2. 研究の計画

(1)

①マクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡の開発

工業用レンズ、一眼レフ用レンズ設計の応用と8K CMOSセンサの使用により、細胞内構造や細胞形態・動態といったミクロ情報から組織までを同時に観察可能な高解像度顕微鏡を開発する。8Kの超高精細画像を利用して俯瞰像で細胞間のクロストークを画像拡大による局所像から組織中での細胞の役割を明らかとする。

②手持ち運用可能なマクロ・ミクロ光学観察機器の開発

高倍率の顕微鏡用レンズ、オリジナル光路、民生用CMOSセンサを組み合わせ、手持ちで運用できる小型軽量のイメージング装置を開発する。本機器は臓器形状や臓器血流といったマクロ情報と血球細胞のようなミクロ情報を切り替えにより取得できる機器になる。ウサギ・ブタといった大型動物で模擬手術による実証実験を行う。

③光操作による血管傷害・炎症惹起

生活習慣病の臨床イベントとしておこる心血管病病態を光操作で再現する。光化学反応による活性酸素生成で血管内皮の機能障害と血栓形成を起こすモデル、血管内皮にレーザーを照射して作成した内皮破綻部位で血栓形成と引き続く炎症反応を観察するモデル、虚血再灌流による組織障害と炎症反応を観察するモデルを作成する。

④レンズレス・オンチップイメージングによる無麻酔の生体組織長時間イメージング

レンズレス・オンチップイメージング装置を開発する。動物体内に埋め込み可能なサイズまで小型化し、無麻酔自由行動下マウスの体内長時間イメージングを行う。

3. 研究の成果

(1)

①マクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡の開発

8K CMOSカメラの応用と同時に光路の最適化を行い、XY方向解像度8K、Z方向解像度1K、時間

分解能60fps、4色画像の超高速、高解像度、広視野イメージングを達成した。構造化証明をくみあわせ高速性と空間解像度を両立させた。8KサイズのCMOSセンサでは一分間に数百ギガバイトという圧倒的なデータ量が得られ、現在生体の網羅的解析につながる唯一のセンシング技術と考える。一方で画像センサの解像度にみあうレンズ、光路、スキャニング技術は無く、今回我々は従来の顕微鏡形態からくる制約を外し、新たに8K CMOSセンサのためのレンズ、光路設計の最適化を行った。本機器により血栓中での一血小板の挙動と組織応答、あるいは炎症時の一細胞の挙動と組織再構築を同時に評価できた。

②手持ち運用可能なマクロ・ミクロ光学観察機器の開発

顕微鏡用の高倍率レンズと申請者独自の光路系を組み合わせ、倒立顕微鏡に匹敵するミクロ像とマクロの俯瞰像取得が可能な小型イメージング装置を開発した。本機器をウサギ腹腔内およびブタ腹腔内で腹腔鏡として用い、模擬手術を行った。マクロ像での腹腔鏡としての性能とミクロ像でのリアルタイム顕微鏡としての性能を実証した。臨床では術中の病理学的診断だけでなく、リアルタイム画像であることを利用した臓器の柔軟性評価や機能評価にも応用が期待できた。

③光操作による血管傷害・炎症惹起

ア) 活性酸素による血栓形成モデル

光刺激による血栓惹起と血栓観察に同一の光源を用いることで血栓形成の初期よりタイムラグ無く継続した観察を可能とした。本モデルでは血管内皮破綻は無く、その構造は保たれた状態であった。

イ) 血管内皮損傷血栓モデル

観察と同時に任意領域に高エネルギーのレーザーを照射することにより血管内皮を傷害した。内皮破綻部位で活性化され血栓を形成する血小板と障害部位に遊走する白血球が観察できた。

ウ) 虚血再灌流モデル

局所臓器の栄養血管クリッピング/解除で再灌流後に血小板および白血球の血管内皮への接着が増加することが確認出来た。特に白血球の血管内皮への遊走亢進が顕著で、炎症病態の白血球解析に有用と思われた。

④レンズレス・オンチップイメージングによる無麻酔の生体組織長時間イメージング

本体が縦横7mm厚さ1.5mm程度の持つ小型のイメージング装置を開発し、マウス腹腔内に挿入して無麻酔自由行動下のイメージングを行った。腹腔内の組織と腸間膜血流を精細な画像で得ることに成功した。

4. 研究の反省・考察

(1)

①マクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡の開発

生体のマクロ変化とミクロ変化を評価可能な手技を構築した。本機器の空間解像度、時間解像度、視野は世界的にも類を見ないものである。今後、慢性炎症病態の臓器機能不全における繊維化・炎症のプロセスを観察する。不可逆的障害の原因となる因子を解明し、その制御を試みる。

②手持ち運用可能なマクロ・ミクロ光学観察機器の開発

生きている大型動物体内のマクロ・ミクロ環境を観察出来る手技を構築した。運用には動物麻酔が必要であり、特にブタでは人工呼吸機管理、気腹装置などの補助が必要であるが、得られる情報は既存の腹腔鏡を遙かに超えるものであった。血流や臓器柔軟性といった機能情

報も取得可能であり、本機器は慢性炎症におけるミクロでの繊維化とマクロでの柔軟性低下・機能異常を直接に評価できると考えられた。本機器の新規性・独自性は高く、基礎研究のみならず臨床においても貢献が期待できる。平成28年度研究成果として特許申請を行った。

③光操作による血管傷害・炎症惹起

生活習慣病の重要な臨床イベントである血栓症を再現可能なモデルを構築した。本手法をマクロ・ミクロ観察手技と組み合わせることで慢性炎症・心血管病の病態形成に重要な因子を明らかにすることができると思われた。

④レンズレス・オンチップイメージングによる無麻酔の生体組織長時間イメージング

生活習慣病では臨床イベント発症よりも前から血管や臓器の機能障害が進んでいると考えられるが、この変化は日にちや月の単位で緩やかに進行するものである。麻酔下に長時間観察を続けることは不可能であるため、従来、動物に観察窓を作る方法などがとられてきたが、侵襲が大きく、生理的とはいいがたかった。本機器では生理的状態の動物体内でゆっくりと進行する病態を連続して観察できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

無し

(2) 口頭発表

① 2016. 4. 7th Asian Pacific Topic Conference. Fluorescent imaging: from basic to application

② 2016. 4. 第89回日本内分泌学会学術集会. マルチスケールイメージングによる生活習慣病解析

③ 2016. 5. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 生体イメージングを用いた無麻酔・自由行動下での代謝研究

④ 2016. 6. 第68回日本細胞生物学会大会共済ランチョンセミナー. イメージングの過去・現在・未来

⑤ 2016. 6. 第37回日本炎症・再生医学会. マルチスケールイメージングによる炎症反応と生活習慣病

⑥ 2016. 7. 第12回循環器専門医を志す研修医の為の卒後セミナー循環器卒後サマーキャンプ. うごめく生き物をそのまま撮影するために—蛍光イメージングの実情と展開

⑦ 2016. 8. 第17回日本分子脳神経外科学会. 生体イメージングで見る血栓・炎症

⑧ 2016. 9. 第89回日本生化学大会. Multi-scale fluorescent in vivo observation of thrombus formation

⑨ 2016. 10. 第37回日本肥満学会. ウェアラブルセンサと光計測による生活習慣病モニタリングシステム

⑩ 2016. 11. 第54回日本生物物理学会大会. 4K/8K CMOSイメージングによるマルチスケール生体全細胞解析

⑪ 2017. 3. 第8回クラスター研究会. 生体を光で理解する理工学アプローチ

(3) 出版物

無し

学 校 名	聖 マリアンナ 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新たな腎臓病進行機序の解明とその治療法の確立 -尿細管間質障害をターゲットとして-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①慢性腎臓病、②尿細管間質障害、③尿細管虚血、④上皮間葉移行			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
池 森 敦 子	医 学 部 ・ 解 剖 学 (機 能 組 織)	教 授	研究代表及び総括、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
柴 垣 有 吾	医 学 部 ・ 内 科 学 (腎 臓 ・ 高 血 圧 内 科)	教 授	データ解析・論文作成
黒 川 真 奈 絵	大学院医学研究科・疾患バイオマーカー・標的分子制御学	大学院教授	実験(プロテオミクス)・データ解析
菅 谷 健	医 学 部 ・ 内 科 学 (腎 臓 ・ 高 血 圧 内 科)	客 員 教 授	実験(蛋白解析)
武 永 美 津 子	先端創薬科学(㈱LTTバイオファーマ寄附)研究部門	特 任 教 授	実験・データ解析
有 戸 光 美	医 学 部 ・ 生 化 学	講 師	実験(遺伝子解析)・論文作成

新たな腎臓病進行機序の解明とその治療法の確立 ー尿細管間質障害をターゲットとしてー

1. 研究の目的

(1) 急性腎障害からの慢性期尿細管間質障害への進展機序の解明

急性腎障害で生じた尿細管虚血は、CKDの重要な進行因子である。申請者らは、腎虚血後3-6週間後においても腎虚血耐性（複数回の虚血刺激にも関わらず、間質線維化が進行しない）が、維持される事を見出しており（未発表）、その分子機序を明らかにし、虚血耐性をさらに長期に維持することができればCKDの進行阻止に有効と考えられる。これに関わる遺伝子発現制御変化を、マイクロアレイを用いて解析し、治療標的となる分子を同定する。

(2) CKDにおける尿細管間質障害の進行機序の解明と新規治療法の開発

① Layilinを介したEMTによる腎間質線維化の機序解明

CKDで生じる尿細管上皮細胞のEMTは、炎症性サイトカイン（TNF- α ）により促進されることから、TNF- α によるEMT促進メカニズムの解明およびEMTの制御が、CKDにおける尿細管間質障害を抑制する可能性がある。Layilinは、C型レクチンと相同性を持つ膜貫通型蛋白質で、申請者らはTNF- α 刺激によりその発現が増強すること、かつ、EMT誘導に関与している可能性があることを見出している（Biochem Biophys Res Commun, Epub ahead of print, 2015）。そこで、Layilin欠損マウスを樹立し、LayilinのEMT促進機序を詳細に検討し、Layilinおよびその関連分子の制御が腎間質線維化を抑制することを立証する。

② L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

CKDの中でも、特に患者数が増加し続けている糖尿病性腎症に着目する。最近、糖尿病性腎症の進展機序として、尿細管のミトコンドリア機能障害が注目されており、ミトコンドリア異常がEMTに関与し、糖尿病性の尿細管間質障害を進行させる可能性がある。本研究では、申請者らが、長年研究しているL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)が、ミトコンドリア機能を維持する事でEMTを抑制し、糖尿病性尿細管間質障害を抑制する事をL-FABP染色体遺伝子導入マウスを用いて明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 急性腎障害の重症化抑制：尿細管虚血耐性メカニズムの解明のための実験計画

2回の虚血再灌流(I/R)腎の作成：C57B16オスマウスの左腎動静脈茎を背側よりクランプし、20分後にクランプを開放、右腎臓を摘出し片腎とする。20日後に再度左腎動静脈茎を腹側クランプし、20分後に開放する。1回目I/R20日後、2回目I/R 20日後の計2ポイントで、大動脈よりカテーテルを挿入し、腎臓をリン酸緩衝液で環流後摘出する。血管からの採血は、1回目I/R 1日後、19日後、2回目I/R 1日後、19日後の計4ポイントで行う。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

① Layilinを介したEMT促進の機序解明

Layilinを介したEMTによる尿細管間質性障害の機序を解明するため、Layilin欠損マウスをCRISPR-Cas9システムを用いて作製する。この手法により、従来の欠損マウス作製法と比較して短期間で作製が可能である。

② L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

ア 腎臓のL-FABP発現が、糖尿病性腎症において、ROS活性を低下させ、ミトコンドリア機能異常を抑制し、EMTが抑制されることを、in vitroおよびin vivoの検討で明らかにする。
イ 糖尿病性腎症モデルの作成：野生型マウス、ヒトL-FABP染色体遺伝子導入マウスにstreptozotocin (STZ, 50mg/kg body weight)を連日5日間腹腔内投与する。投与終了1週間後に血糖値を測定し250mg/dl以上であれば、糖尿病発症マウスとして以後の検討に使用する。

ウ 2週間おきに、体重、血糖測定、採尿を行い、糖尿病発症19週間後に採血および腎臓を摘出する。

3. 研究の成果

(1) 急性腎障害の重症化抑制

- ① 急性腎障害の程度は、血清クレアチニンで評価した。1回目I/R 1日後の血清クレアチニンは著明に増加した (0.62mg/dl)。2回目I/R 1日後の血清クレアチニンは、1回目I/R19日後より上昇は認めなかったもの (0.32mg/dl)、その程度は、1回目I/R 1日後の値より有意に低値であった ($p < 0.05$)。
- ② 尿細管壊死、アポトーシスの所見が、1回目I/R 1日後と比較し、2回目I/R 1日後では、有意に抑制された。
- ③ マイクロアレイ解析を施行し、尿細管虚血耐性に関連する候補分子を見出した。この候補分子の発現調節には、ヒストンアセチル化が関与していることが知られており、腎臓でも同様の発現調節が行われているかを確認する。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

① Layilinを介したEMT促進の機序解明

Layilinを標的としたguideRNA及びcas9をDBA/1Jマウスの受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親に移植後ファウンダーマウス (F0) を作製した。F0のゲノム編集が成功しているか否かを検証するためにゲノタイピングを行ったが、Layilin欠損マウスであることを確認した。

② L型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) によるEMT抑制の機序解明

- ア 糖尿病発症ヒトL-FABP染色体遺伝子導入 (Tg) マウスの腎臓では、非発症Tgマウスと比較し、有意に腎臓でのL-FABP発現が増加し、尿中L-FABP排泄が高値であった。
- イ 糖尿病発症野生型 (WT) マウスでは、尿アルブミン排泄が増加したが、糖尿病発症Tgマウスでは、その程度は、有意に抑制されていた。
- ウ ミトコンドリア局在の酸化還元酵素 (Superoxide dismutase2, SOD2) は、糖尿病発症2WTマウスでは、有意にその発現が低下したが、Tgマウスでは、その発現が維持された。

4. 研究の反省・考察

(1) 急性腎障害の重症化抑制

腎組織からヒストンを抽出し、ヒストンアセチル化程度を評価する。さらに、ChIP解析を行い、尿細管虚血耐性に関連する候補分子のプロモーター領域のヒストンアセチル化程度を評価する。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

① Layilinを介したEMT促進の機序解明

Layilin欠損マウス (F0, F1) から、さらにF2 (ホモ) を作成し、フェノタイプの検討を行う。

② L型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) によるEMT抑制の機序解明

糖尿病性腎症の尿細管間質障害にL-FABPが、保護的に作用していることを再確認した。次に、L-FABPが、ミトコンドリア機能を維持する事を明らかにする。ミトコンドリアの新生因子 (PGC-1 α)、融合関連因子 (misofusin)、分裂促進因子 (Drp1, Fis1)、オートファージマーカー (Atg5)、マイトファージ促進因子 (Pink1) について、抗体を使用し免疫染色を行い、発現部位の確認および定量的評価を行う。さらに、マウス近位尿細管細胞 (mProx) およびヒトL-FABP発現mProxを使用し、検証する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表
なし

(3) 出版物
なし

学 校 名	金 沢 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	糖尿病合併症の病態形成におけるオートファジーの意義 ーオートファジーと糖尿病合併症ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① オートファジー ② たんぱく質制限 ③ 糖尿病腎症			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
古 家 大 祐	医 学 部	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
金 崎 啓 造	医 学 部	准 教 授	実験・データ整理
北 田 宗 弘	医 学 部	准 教 授	実験・論文作成
神 谷 英 紀	愛知医科大学 医学部	准 教 授	実験・データ整理
中 村 二 郎	愛知医科大学 医学部	教 授	実験・データ整理

糖尿病合併症の病態形成におけるオートファジーの意義 ーオートファジーと糖尿病合併症ー

1. 研究の目的

- (1) 糖尿病腎症から末期腎不全となり、透析導入される患者は増加の一途を辿っている。つまり、進行した糖尿病腎症に対する抜本的な治療手段がないのが実情である。そこで、臨床的エビデンスには乏しいが、厳格な低たんぱく質食の限定的な進行した腎症への有効性は報告されている。そこで、本研究では、オートファジーに着目して、厳格な低たんぱく質介入によって、進行した糖尿病腎症が改善されるか否かを明らかにすることを目的とした。
- (2) 既に、進行した糖尿病腎症がオートファジー機構の維持によって改善するとともに、代謝異常も改善傾向を示した。その結果、たんぱく質制限によって代謝改善作用があるのか否かを糖尿病発症早期から検討することを目的とした。

2. 研究の計画

- (1) 24週齢の肥満2型糖尿病ラット(Wistar Fatty rat)に、通常食 (Protein 23.84%、Lipid 16.8%、Carbohydrate 59.36%、Energy 3.55kcal/g ; STD)、低たんぱく質食 (Protein 5.77%、Lipid 16.48%、Carbohydrate 77.75%、Energy 3.54kcal/g; LPD) にて20週間介入して、代謝検査 (HbA1c、インスリン値、シスタチンC)、組織検査 (Masson-Trichrome染色、PAS染色、Kim-1免疫染色、電子顕微鏡検査、CD68免疫染色) と、栄養応答シグナル (mTOR 経路: p-S6RP免疫染色、オートファジー関連: p62免疫染色)、アポトーシス関連: cleaved caspase3 を検討した。一部のラットには、30%カロリー制限を行い同様に組織の検査をした。さらに、LC3-GFPトランスジェニックマウスを用い、オートファジーの可視化した。
- (2) 6週齢の肥満2型糖尿病ラット(Wistar Fatty rat)に、通常食 (Protein 23.84%、Lipid 16.8%、Carbohydrate 59.36%、Energy 3.55kcal/g ; STD)、低たんぱく質食 (Protein 5.77%、Lipid 16.48%、Carbohydrate 77.75%、Energy 3.54kcal/g; LPD) にて24週間介入して、上述した代謝検査に加えて、血中FGF21、アディポネクチン値を測定した。

3. 研究の成果

- (1) 糖尿病ラット (DM)-STD群では、非糖尿病コントロールラット (CONT) と比べ体重、脂肪重量、腎重量の増大を認めたが、DM-LPD群では体重、脂肪重量、腎重量ともに有意に減少した。平均血圧は4群間において差はなかった。摂食量は自由摂食下で、DM群に比べDM+LPD群では食事介入実験期間中、平均15.5%減少していた。DM-STD群においてCONTに比べ上昇したHbA1C値、CHO値はLPD群で有意に低下したが、ITT、GTT、IRI値、TG値、FFA値は両群間で有意な差はなかった。食事介入開始時のUA1b/Cr比およびULFAB/Crは、それぞれCONT群に対して、DM-STD群では有意に増加していた。介入20週後においては、CONT群に比べDM-STD群ではUA1b/Cr比、血漿シスタチンC値の有意な増加を示した。DM-LPD群ではDM-STD群と比べUA1b・ULFAB・シスタチンC値)の有意な低下を認めた。マッソン/トリクローム染色による尿細管間質および糸球体の線維化は、CONTに比してDM-STD群においては著明に尿細管間質および糸球体の線維化は改善した (図1)。またDM-STD群で増加した腎皮質3型コラーゲンのmRNA発現も同様にDM-LPD群で低下した。尿細管障害スコア、Kim-1免疫組織染色強度、腎皮質Kim-1mRNA発現はいずれもDM-STD群ではCONTと比較して増加し、DM-LPD群で低下した。

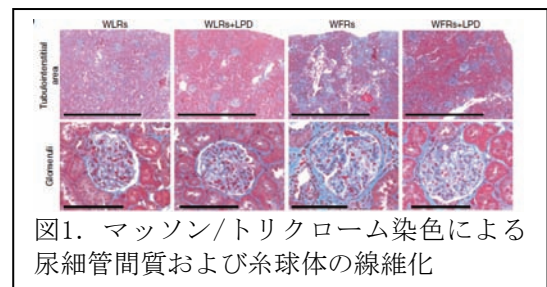
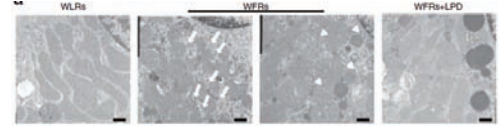


図1. マッソン/トリクローム染色による尿細管間質および糸球体の線維化

CD68免疫組織染色強度、腎皮質CD68、MCP-1、IL-6、TNF- α 、TLR2 mRNA発現はCONTに比べてDM-STD群で有意に増加し、DM-LPD群で改善を認めた。DM-STD群では、近位尿細管細胞におけるミトコンドリアの断片化および膨化の増加、腎皮質におけるcleaved caspase3発現の増加（アポトーシスの増加）を認めたが、DM-LPD群で改善した（図2）。

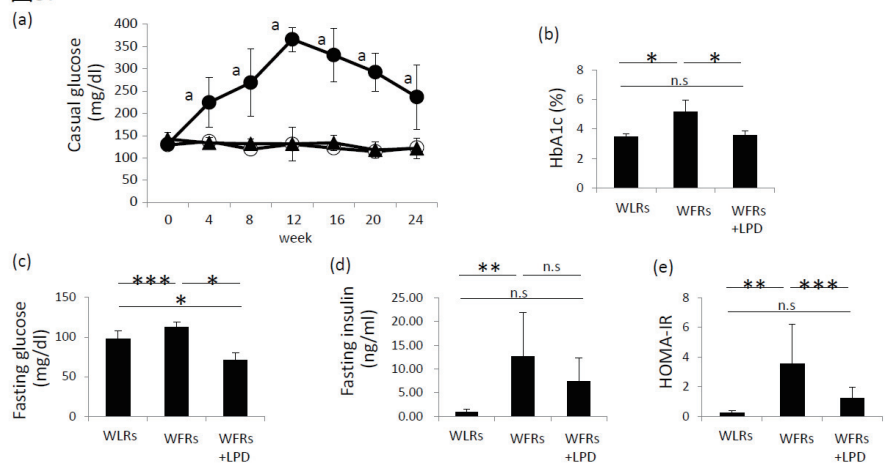
DM-STD群では、CONT群に比し、p62・p-S6RP免疫染色強度の増強を認めるが、DM-LPD群にて改善した。DM群にて増加する腎皮質p-S6RP発現の増加は、STDからLPDに飼料をスイッチ2週間後で減少したが、DM-STD群とDM-LPD群間でp-Akt発現に差はなかった。

図2. ミトコンドリア形態異常はLPDにて改善した



(2) 6週齢からのDM-LPD介入は、摂餌量にDM-STD群と差がないものの、有意な体重増加と脂肪重量の抑制がみられた。随時血糖、HbA1c、空腹時血糖は、LPD介入によって有意に減少し、空腹時インスリン値は有意にLPD介入によって、STD群と比べて低下した（図3）。これらの結果から、LPD介入によってインスリン感受性の亢進が示唆された。そこで、その分子機構を明らかにする目的に、代謝改善作用を有するアディポネクチンおよびFGF21の血中濃度を測定した。CONT群に比べてDM-STDにて低下したアディポネクチンおよびFGF21濃度は、LPD介入によって改善していた。

図3.



a) Casual blood glucose levels during the experimental period (n=6). b) HbA1c levels after the 24-week dietary intervention (n=6), (c) fasting blood glucose levels (n=6), (d) fasting plasma insulin levels (n=6) and (e) calculated HOMA-IR (n=6) after the 24-week dietary intervention. The data shown are the mean $\pm$ SD. a: $p < 0.001$ compared to WLRs and LPD-WFRs, n.s.: not significant. White circles: WLRs, black circles: WFRs, black triangles: WFRs+LPD. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.05$ compared to the indicated groups. n.s.: not significant.

4. 研究の反省・考察

低たんぱく質介入によって、糖尿病腎症におけるオートファジー機構の破綻の改善が有効な治療手段であることも報告できた。また、低たんぱく質食による早期からの介入は、糖尿病の増悪を改善する、つまりメタボリックヘルスを誘導することを見出した。その分子機構は、代謝改善作用を有するアディポネクチンとFGF21の増加による可能性が示唆された。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Sen S, Lee SM, Kanasaki K, Kume S, Koya D. A very-low-protein diet ameliorates advanced diabetic nephropathy through autophagy induction by suppression of the mTORC1 pathway in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. Diabetologia. 2016 Jun;59(6):1307-17.

- ② Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016 Nov 14;9:279-290. eCollection 2016.
- ③ Kitada M, Ogura Y, Koya D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis. *Aging (Albany NY).* 2016 Oct 15;8(10):2290-2307

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	朝 日 大 学 歯 学 部	准 教 授	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	朝 日 大 学 歯 学 部	教 授	遺伝子発現解析実験 データ整理
高 山 英 次	朝 日 大 学 歯 学 部	准 教 授	分子生物学的実験 データ整理
神 谷 真 子	朝 日 大 学 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	朝 日 大 学 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	朝 日 大 学 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	朝 日 大 学 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た。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やエピジェネティック因子の関与について解析することは、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。申請者らは、以下の計画で、細胞移植を伴う骨再生療法での移植細胞の運命と分化過程における調節機構の詳細を、担体となる骨補填材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

異所性骨誘導能評価系、幹細胞移植による骨伝導能評価系の構築を以下の計画により行う。

- (1) ノードマウス皮下へ、骨補填材（炭酸含有アパタイト（CA）と、比較対照として水酸化アパタイト（HA）、 β リン酸三カルシウム（ β -TCP）を使用する）と共に培養し骨芽細胞様へと分化させた幹細胞の移植、あるいは未分化の状態での骨補填材との同時移植を行い、経時的に組織からパラフィン包埋切片を作製して以下の組織学的解析を行う。

①HE染色、特殊染色を行い、骨様組織の形成について組織化学的に解析する。

②抗ヒト核抗体を、増殖細胞マーカーや骨芽細胞分化マーカーに対する抗体と組み合わせて蛍光多重染色を行い、その局在と、移植後の幹細胞のホスト側組織での動態を詳細に解析する。

- (2) ラット大腿骨欠損モデルを作製し、骨欠損部へ同様に移植する。

骨髄由来幹細胞、脂肪組織由来幹細胞についてはGFP発現TGラットより細胞を採取することを予定していたが、ヒト由来幹細胞の移植により、ヒト特異的抗体によって検出可能であったこと、歯髄由来の幹細胞も導入可能であることから、ヒト細胞に変更して実験を行うこととし、骨欠損部へ移植を行い(1)と同様に①②の解析を行うとともに、③欠損部の骨再生に伴って出現する破骨細胞の動態を解析する。

3. 研究の成果

(1) ヒト骨髄由来幹細胞（hBMSC）、ヒト歯髄由来幹細胞（hDPSC）、ヒト脂肪組織由来幹細胞（hASC）を骨補填材と共に7日間培養し、骨芽細胞様へと分化させた後にノードマウス皮下へ移植した群と、培養用ディッシュから酵素処理により回収した未分化な状態の3種の幹細胞をそれぞれ骨補填材と混合して移植した群を作製し、経時的に組織からパラフィン包埋切片を作製して、①HE染色等による組織学的解析、②免疫染色による移植後の幹細胞の動態解析を行い以下の結果を得た。

①HE染色およびコラーゲン線維を染色するピクロシリウスレッド染色、マッソンゴールドナー染色により、骨用組織形成について検討したところ、移植後3週間で、全ての群で線維性コラーゲンの増生がみられたが、とくにhDPSCを用いた群で顕著であった。また、いずれの幹細胞でも、

あらかじめ分化を誘導した群で増生が旺盛であった。さらに6週間後の組織を検討したところ、hBMSCを用いた群で、CA、HAを用いた群で骨補填材周囲に硬組織様組織が形成されたが β -TCP群では石灰化組織はみとめられなかった。

②抗ヒト核抗体により移植幹細胞の検出を行ったところ、いずれの群でも移植後6週間を経過してもヒト核陽性細胞が検出された。また、osterix、osteocalcinをヒト核と共に検出したところ、特にCA、hBMSCを用いた群でヒト核陽性細胞に骨芽細胞マーカー陽性細胞が多数みとめられた。一方で、hDPSCを用いた群では、増殖細胞マーカーKi67陽性細胞が多数みとめられた。さらに、骨補填材を用いず、細胞のみの移植についても検討したが、いずれの幹細胞も移植部に石灰化様組織はみとめられなかった。

(2) ラット大腿骨欠損モデルを作製し、(1)と同様に移植実験を行い、以下の結果を得た。

①骨補填材と共に培養して分化誘導を行った後に移植した群では、CAあるいはHAと組合せたhBMSC群で顕著な新生骨の形成がみとめられた。一方でhASCを移植した群では骨形成が遅延する傾向にあった。

②移植後の組織を回収してRNAを抽出し、骨分化マーカー遺伝子の発現量を、ヒト特異的配列およびラット特異的な配列のプライマーを用いて検討したところ、hBMSCを用いた群でヒトおよびラットの配列ともに、Runx2、osterix、osteocalcinの発現上昇が顕著であった。

③術後3か月から6か月で、CA、 β -TCP移植群でTRAP陽性細胞が顕著に検出された。そこで、破骨細胞分化誘導培養系での検討も行ったところ、他の骨補填材と比較して、CAを用いた群で、TRAP陽性細胞、カテプシンK活性陽性の多核の巨細胞が顕著にみられた。また、幹細胞を共培養した群で多核巨細胞の割合が多く、特にhBMSCを組合せた群で顕著であった。

4. 研究の反省・考察

(1) 幹細胞の異所性骨誘導能評価

①ヌードマウス皮下への骨補填材の移植実験ではCAとHAにのみ硬組織様組織形成をみとめられ、hBMSCとの組合せにより、硬組織形成が促進され、 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たが、幹細胞のみでは異所性骨誘導がみられなかったことから、骨の無機成分であるリン酸カルシウムと共存することで、骨芽細胞への分化、骨形成へと機能することが示唆された。また、hDPSCでは骨芽細胞への分化がhBMSCと比較して少数であったが、移植後も増殖を続けて生存していること示された。

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、hDPSC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、移植後の組織で長期間生存し、増殖していることが示唆され、用途によっては幹細胞移植療法に効果をもたらす可能性が示唆された。

(2) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

皮下組織と異なり、骨欠損部では、hBMSCとhDPSCは細胞を移植しない群に比べて新生骨の形成を促進し、細胞移植が骨再生療法に効果的であることが示唆された。特にhBMSCでは骨分化マーカー遺伝子の発現上昇が顕著であり、ジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子発現変化の解析を行うための試料採取も継時的に行うことができた。一方でhASCを移植した群では骨再生が遅延する傾向がみられ、骨組織内への移植とい環境下でも由来組織により細胞の動態が異なることが示された。また、破骨細胞分化についてもhBMSC共存下で破骨細胞の分化が促進されていることから、hBMSCの関与を培養系でも検討する必要があると考えられた。

以上の結果から、骨再生には比較した3種の幹細胞では骨髄由来のhBMSCが最も適しており、由来組織によって移植後の幹細胞の動態が異なること、骨再生の過程で破骨細胞分化にも作用を及ぼすこと、骨補填材としてはハイドロキシアパタイトを主体とするCA、HAが骨再生に適した足場であり、特にCAは破骨細胞による吸収を受け得る材料であることが示された。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Adachi N, Takayama E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Takeuchi H, Kubo S, Ishigami H, Kurachi M, Kondoh N. Promotion of Nickel (Ni) Allergy by Anamnestic Sensitization with a Bacterial Component, Lipopolysaccharide (LPS), in Mice. *Open Dentistry Journal*. 2016. 30:10531-10537.
- ② Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Analysis of expression of CCN family genes in skeletal tissue-derived cells. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:33-41.
- ③ Kubota S, Kawaki H, Takigawa M. ELISA of CCN family proteins in body fluids including serum and plasma. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:127-138.
binding to CCN family proteins. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:155-167.
- ④ Kubota S, Kawaki H, Takigawa M. Protocols for screening peptide motifs for CCN family proteins. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:139-143.
- ⑤ Sumi S, Umemura N, Takayama E, Ohkoshi E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Inagaki T, Kawaki H, Sumitomo S, Kondoh N. Metastasized murine oral squamous cell carcinoma cells induce intratumoral polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells. *Oncology Report*. 2017. 37:2897-2904.
- ⑥ Masuda J, Takayama E, Strober W, Satoh A, Morimoto Y, Honjo Y, Ichinohe T, Tokuno SI, Ishizuka T, Nakata T, Mizutani A, Umemura N, Kitani A, Fuss IJ, Shigehiro T, Kawaki H, Mizuno-Kamiya M, Kondoh N, Seno M. Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities. *Oncology Report*. 2017. (in press)

(2) 口頭発表

- ① Hayashi Y, Kawaki H, Hori M, Hasegawa T, Tanaka M, Kawano S, Yoshida T, Tamaki Y. Characteristics of experimental calcium silicate as a pulp capping material. *International Dental Materials Congress 2016*. 2016年11月4日～6日. Bali, Indonesia.
- ② Uno M, Kawaki H, Doi Y, Kurachi M, Ishigami H. Effect of surface treatment on the bond strength between zirconia ceramic and core resin. *International Dental Materials Congress 2016*. 2016年11月4日～6日. Bali, Indonesia.
- ③ 近藤雄三, 山田尚子, 川木晴美, 高橋 潤, 長谷川ユカ, 近藤信夫, 玉置幸道, 永原國央. チタン表面への簡便なカルシウム修飾法の検討. 第20回日本顎顔面インプラント学会. 第20回日本顎顔面インプラント学会. 2016年12月3日～4日. 東京.

(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 ⑥ 3次元組織担体 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	主 任 教 授	総括・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 伊 紀	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

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、利用される補填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) 新規細胞培養足場材料の開発

ポリ乳酸 (PLLA) 表面は疎水性であり、PLLAはセラミックと比較して可撓性があるという利点はあるが、生体親和性に乏しく細胞接着性、増殖性はもたない。そのために細胞の播種性が悪い。我々はPLLAをアンモニウム処理を行うことで材料表面が親水化し、細胞接着が飛躍的に向上することを報告している (Liao et al. *Mater Sci Eng C*, 2013)。そこで、昨年度に樹立したiPS由来間葉系幹細胞 (MSLC) 表面処理を行った織物スキャホールドに対しドロップレット法を用いて細胞を播種した。しかし、播種細胞数を多くし、長期に培養すると3次元形態を維持することが難

しかった。そこで、同じく吸収性の生体材料として使用される α リン酸三カルシウム (α -TCP) に着目し足場材料としての可能性を探った。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) のヘパリンとの親和性に着目し、ヘパリンを α -TCP多孔質体に化学的に固定させた薬物担持担体を開発した。 α -TCPは生体吸収材料であり、骨再生材料として使用される。bFGFは人体に広く分布する強力な血管新生因子であり、神経や骨の形成にも関与していることが知られている。 α -TCP (対照群) にオリゴリンを固定化することで表面を正電荷にし、負電荷であるヘパリンを静電的相互作用にて固定した。動物実験は、ビーグル成犬、雌2歳で、体重約10 kgの6匹を使用した。ビーグル犬下顎小白歯を抜去し、8週の治癒を経過後、インプラントドリルを用いて骨窩洞 (直径4.5 mm、深さ6 mm) を3ヶ所形成した。術後2、4、8週に各2匹を安楽死させ、下顎骨を摘出し、還流固定を行った。実験部位をマイクロCTで撮影後にマイクロX線画像解析装置を用いた骨のパラメーター解析を行い、硬組織脱灰研磨・薄切にてヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、免疫染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色による病理組織学的観察も行った。

(2) *in vitro*人工骨の作製

研究計画 (1) で作製した α -TCP多孔質体に化学的に固定させた薬物担持担体を用いて細胞播種数、分化期間、分化因子を変化させ、次に行う*in vivo*骨再生実験に向けた複数の*in vitro*人工骨の作製を試みる。bFGF固定化がMSCLCの分化に与える影響を調べた。hMSC をbFGF/ α -TCP多孔質体 (bFGF) 群および α -TCP 多孔質体のみ (α -TCP) 群とともに骨分化誘導培地中で一定期間培養する。細胞増殖能の評価として蛍光色素でアクチン染色を行った。骨芽細胞分化の評価として、それぞれの群からRNA を抽出し、逆転写を行い、cDNA を作製する。リアルタイムPCR 法を用いて I 型コラーゲン、オステオカルシン、RUNX2 の発現を評価し、両群の骨芽細胞分化マーカー発現の定量比較を行なった。

3. 研究の成果

(1) 新規細胞培養足場材料の骨再生評価

骨のパラメーター計測においてbFGF群と対照群を比較して骨密度は、2、4、8週の全てで骨塩量は4、8週において有意差を認めた。一方で、骨体積率では2、4、8週の全てにおいて有意差を認めなかった。病理組織学的観察では、2週においてはbFGF群では結合組織が残存 α -TCP顆粒を取り囲む様に形成され、多数の新生血管や破骨細胞を認めることから骨形成が活発に行われていた。対照群では多数の α -TCP顆粒の残存が観察された。4週においてはbFGF群では新生血管や破骨細胞は少なくなるのに対し、対照群では2週のbFGF群と同様、結合組織が残存 α -TCP顆粒を取り囲む様に形成され、多数の新生血管や破骨細胞を認めることからbFGF群に遅れて骨再生が行われていることが明らかとなった。8週においてはbFGF群では新生血管や破骨細胞はほとんど認めず、大部分の α -TCPは分解され新生骨に置換されるのに対し、対照群では新生血管や破骨細胞が多数確認でき骨形成が続いていることが明らかとなった。さらに、HE染色画像より計測した骨領域率では2、4、8週全てにおいてbFGF群と対照群で有意差を認めた。

以上、bFGFを担持した α -TCP多孔質体薬物徐放担体は、顎骨骨欠損部の骨再生における新規足場材料として臨床応用可能であると示唆された。

(2) *in vitro*人工骨の作製

bFGF群ならびに α -TCP群で細胞増殖を示し、培養3日後で骨芽細胞の初期分化マーカーであるRunx2がbFGF群で有意に高い発現を示すことが明らかとなった。同様にアルカリフォスファターゼ遺伝子の発現も有意に高くなった。一方で、培養期間の延長によって両群に差がなくなってくることはbFGFが分化の初期段階に影響を与えていることが考えられる。

4. 研究の反省・考察

当初の研究計画では、ヌードラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いた骨再生評価ならびに安全性評価を行う予定であったが、足場材料を変更したため研究期間内には終了しなかった。しかし、現在、ヌードマウス頭蓋冠に直径5 mmの骨欠損をトレフィンバーにて形成し、上記で作製した *in vitro* 人工骨を欠損部に移植し、骨再生能をマイクロCTによるX線評価と病理組織学的評価から解析している。また、癌化の有無についても病理組織学的に評価する予定である。

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MSLCの樹立を行っている。加えて、MSLCのゲノム不安定性や造腫瘍安全性のPOC（概念実証）取得に向けた試験の実施、細胞品質基準の策定、MSLCの免疫不全動物を用いたトランスレーショナル研究についても計画している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kobayashi N, Hashimoto Y, Otaka A, Yamaoka T, Morita S. Porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor enhances bone regeneration in a canine mandibular bone defect model. *Materials* 2016; 9 (10) Article Number 853 (11pages).

(2) 口頭発表

- ① 橋本典也. インテグレーションフリーiPS細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導. 第14回日本再生歯科医学会総会・学術大会 2017. 2. 26. 札幌市
- ② Kobayashi N, Hashimoto Y, Otaka A, Yamaoka T, Morita S. Effect of porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor on bone regeneration in a canine mandibular bone defect model. *International Dental Materials Congress* 2016. 2016. 11. 5. Bali, Indonesia.
- ③ Kubo H, Nishio A, Miya Y, Hashimoto Y, Kishimoto N. Chondrocyte differentiation ability of dedifferentiated fat cells compared with adipose-derived stem cells derived from the human buccal fat pad. *International Dental Materials Congress* 2016. 2016. 11. 4. Bali, Indonesia.

(3) 出版物

- ① 馬場俊輔、橋本典也、笠原真二郎他. 医療用バイオマテリアルの研究開発. シーエムシー出版 2017年2月 73-81.

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	関 西 医 科 大 学 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	関 西 医 科 大 学 医 学 部	教 授	疾患モデルの確立と解析
藤 澤 順 一	関 西 医 科 大 学 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	関 西 医 科 大 学 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 ーヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立ー

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) これまでの研究計画においてなされた免疫学的解析からヒト化マウスの胸腺成熟が抗原刺激で促進されること、組織イメージング等の解析からヒト由来である胸腺細胞と樹状細胞の相互作用が明らかになった。そこで、炎症・感染モデルを用いて以下の項目を検討する。
- ①胸腺の選択過程や炎症部位へ集積に関与する動態制御分子の可視化し、その重要性を明らかにする。
 - ②免疫関連疾患モデルマウスにおけるイメージング手法を確立し、炎症細胞の動態、病態形成について検討する。

2. 研究の計画

- (1) 細胞動態、活性化を追跡するための蛍光蛋白質でラベルされたプローブを造血幹細胞に導入し、移植する。
- 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。2カ月後以降、定期的に末梢血を採取し、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レンチウイルスベクターを用いて蛍光タンパク感染導入する系を確立する。接着制御分子Rap1の活性化型を認識するプローブ(Rap affinity probe)、細胞内カルシウム検出プローブ(GCAMP3)、細胞増殖シグナルを検出するプローブ(NFATプローブ)をヒト臍帯血由来CD133陽性細胞に感染導入し、NOG(NSG)マウスに移植する。導入前にこれらの蛍光プローブを細胞株に導入し、*in vitro*で2光子顕微鏡による定量的イメージングを確認する。また*in vitro*培養法を検討し、ヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞に蛍光タンパクを高効率で導入する感染・培養系を確立する。そして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質プローブ遺伝子を導入を確認した上で、NOG(NSG)マウスに移植する。NOG(NSG)マウスに移植後、胸腺の発達とヒトリンパ球の分化・成熟を調べ、胸腺内移動と選択との関連を追跡する。そのためヒト臍帯血由来造血幹細胞由来細胞のキメラ状態を確認後、胸腺組織を取り出し同時導入されたGFPマーカーを指標にexplantまたは組織スライス法にてヒト胸腺細胞の移動、樹状細胞の分布を2光子顕微鏡を用いて解析する。また、末梢リンパ組織（表在リンパ節、腸間リンパ組織）のイメージングを行い、各蛍光プローブによっての関与を抗体等を用いて動態制御の機構について抗原刺激等による変化をマウスと比較検討する。
- (2) 炎症・感染モデルの樹立とイメージング解析系樹立
- ①炎症、感染モデルのイメージング系を確立する。

- 1) 炎症モデルとしてDSS大腸炎を用いる。大腸を2光子顕微鏡による生体イメージングを確立する。そのため、大腸を固定する装置を対物レンズに装着し、吸引による固定下でイメージングを行う。蠕動運動等の不随意運動が激しい場合は薬剤投与（アトロピン等）、アガロース固定等を試みる。DSS大腸炎はすでに確立されており、DSSを含む飲水を与え、3日から10日の間、排便の状態から炎症状態を推定し、イメージングを行う。
- 2) 感染モデルとしてHTLV-1による感染病態をイメージングにより観察する系を樹立する。HTLV-1感染後、定期的に脾臓の組織切片を作成し、リンパ球（T細胞、B細胞）の増殖を調べる。また、Tatに対するペプチド・アジュバントを投与した場合の効果について調べる。また平行して脾臓の2光子イメージング系を確立する。

3. 研究の成果

- (1) CD133陽性造血幹細胞を骨髄内骨髄移植による直接注入することによって最高で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。ヒト由来T細胞が2〜3カ月後から観察され、遅れてB細胞が出現した。これらを確認後、OVAペプチドとCFAを用いて免疫刺激を行った場合、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。また、低形成であった胸腺は免疫刺激により増大する現象が再現よく観察された。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。抗体産生をELISAで調べ、IgMが多く産生され、IgGは低値であるが増加していた。
- (2) 蛍光プローブの細胞内局在を2光子イメージングするため、蛍光蛋白質としてVenusを用いたRap affinity probe、カルシウムセンサーであるGCAMP3を293細胞に発現させてイメージングを行った結果、Rap affinity probeは細胞質に存在し、PMA刺激によって細胞膜に移行する過程が観察できた。GCAMP3はカルシウムイオノフォア処理で上昇した。NFATプローブは293細胞では核に移行することを確認した。次にレンチウイルスを効率よく造血幹細胞に導入する条件をVenusを発現するレンチウイルスを用いて検討した。その結果、CD133陽性細胞をレンチウイルス（MOI 100）およびサイトカイン（thrombopoietin, stem cell factor, Flt3 ligand）存在下で24時間培養後、移植した。2カ月後、出現したリンパ球の蛍光を、薄切した胸腺や脾臓の2光子顕微鏡での観察で確認した。Rap affinity probe, GCAMP3, NFATプローブを発現するレンチウイルスをCD133陽性細胞に感染導入後、NOG (NSG) マウスに移植した。今後、解析を進めていく予定である。
- (3) 大腸における炎症細胞の動態を可視化するための腸管固定を検討した。YFPマウスにDSS腸炎を誘発したうえで、吸引装置付きレンズを用いて2光子顕微鏡で生体観察した。麻酔下でマウスを開腹後、腸管を一部露出し、吸引装置のついた状態で観察を行った。その結果、腺構造や粘膜固有層の小血管などの組織構築、および血管内を免疫細胞（白血球）がローリングし、停止する様子が明確に観察できた。疾患モデルとして炎症性腸疾患のモデルであるDSS腸炎に着目した。ヒト化マウスにDSS溶液を飲水させ腸炎を誘発することを組織学的に確認しフローサイトメトリー法にてヒト由来CD4陽性T細胞が炎症の場に集積していることを見いだした。以上、疾患モデルとしてヒト化マウスのDSS腸炎、観察評価方法として蛍光遺伝子導入および2光子顕微鏡による腸管の生体観察が確立できた。今後、炎症状態でのデータ収集のみならず、抗インテグリン抗体などで免疫細胞移動を阻害し腸炎の治療となるか検証していく。

共同研究者である藤澤らはヒト化マウスにヒトにしか感染しえないHTLV-Iを感染させた感染モデルを確立している。HTLV-Iの増殖に重要なtaxのペプチドワクチンを作成しアジュバントとともに経鼻免疫しウイルス増殖の抑制となるかを検討した。ワクチンを投与した感染ヒト化

マウスは致死率が下がりワクチンによるウイルス感染細胞増殖の抑制効果が証明された。感染マウスの脾臓の組織では感染のターゲットとなるCD4陽性T細胞が著増しており、アジュバントがTh1誘導の場合にはCD8陽性T細胞が、Th2誘導ならB細胞が増加していることが観察された。これはHTLV-I感染に続発する成人T細胞白血病（ATL）の治療モデルとなりうるとともに、ヒト化マウスの抗ウイルス免疫が生理的な状態と同様に働いている傍証でもある。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本年度の成果として、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、炎症・感染モデルとしてDSS腸炎、HTLV-1感染のイメージングに向けての準備は進んだ。しかし、移植から観察まで3カ月から5カ月程度経なくてはならず、当初予定したすべての実験の結果を出すことができなかった。今後継続して行っていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T. NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. *Mol Cell Biol.* 2017 Jan 30. pii: MCB.00424-16. doi: 10.1128/MCB.00424-16. [Epub ahead of print]
- ② Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol.* 196(7):3019-31.2016
- ③ Iida T, Saito K, Katagiri K, Kinashi T, Ohta Y. The RacGAP protein FilGAP is a negative regulator of chemokine-promoted lymphocyte migration. *FEBS Lett.* 2016 May;590(10):1395-1408. doi: 10.1002/1873-3468.12189. Epub 2016 May 11.
- ④ Katakai T, Kinashi T Microenvironmental Control of High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node. *Front Immunol.* 2016 May 13;7:194. doi: 10.3389/fimmu.2016.00194. eCollection 2016.

(2) 口頭発表

- ① Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, High-affinity LFA-1/ICAM-1 binding triggers the reorganization of vesicular transport regulators to facilitate the maturation of immunological synapse. (1P-0317) The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2016. 11.30-12.2 Yokohama
- ② Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Rap1-deficiency caused defective lymph node homing of lymphocytes and thymocyte-selection.(3-E-W31-11-O/P) The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2016. 12.5-7 Okinawa

(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	ペプチド前駆体POMCより生成される新規活性ペプチドの探索 －新規な活性化機構によるペプチドの産生調節－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ペプチド ②プロテアーゼ ③基質特異性 ④皮膚 ⑤プロセッシング			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 本 博 之	薬 学 部	講 師	研究総括および発現タンパク質の探索

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 橋 栄 造	薬 学 部	平成29年3月 31 日 退 職	探索試料の調整ならびに評価
井 口 和 明	静 岡 県 立 大 学 薬 学 部	講 師	ペプチド基質合成研究

ペプチド前駆体POMCより生成される新規活性ペプチドの探索 —新規な活性化機構によるペプチドの産生調節—

1. 研究の目的

(1) 背景

ペプチドホルモンは小胞体で前駆体が産生された後、ゴルジ体・分泌顆粒中でプロセッシングを受け、活性を有する成熟体に変換されて分泌される。このようなペプチドホルモンの成熟機構は、インスリンや α -MSHの前駆体であるプロオピオメラノコルチン (pro-opiomelanocortin, POMC) をモデルとして、詳細な解析がなされてきた。我々は、皮膚で生成されるPOMCが、細胞内で活性化する古典的な活性化機構で α -MSHを産生するのではなく、角化細胞から分泌されたPOMCが細胞外で酵素により切断を受けて α -MSH(1-8)に活性化する「細胞外活性化機構」の存在を明らかにしている。また、POMCは下垂体において、古典的な活性化経路により、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) や β -エンドルフィンなどの複数の活性ペプチドを生成するが、POMCが細胞外で活性化される機構では、従来の古典的経路とはまったく異なるペプチド断片が生成されることが予想されるが、細胞外プロセッシングによりPOMCから生成される生理活性ペプチドについては未だ明らかになっていない。また、生体内において、プロテアーゼは酵素や生理活性因子を特異的な部位で切断することにより、時間的・空間的な活性調節を担っており、生体内でいつ、どこで、どのような基質特異性を持ったプロテアーゼが発現しているのかを評価することは、生体の機能調節機構を理解するのに重要である。しかしながら、基質特異性の網羅的な解析は、ペプチドマイクロアレイ法やプロテオームスケールの解析が一般的であるが、1回の測定が高価であることや共雑物の多い試料を用いた際の精度などに問題点がある。

(2) 目的

本研究では、神経ペプチドの細胞外活性化機構に関わるプロテアーゼを明らかにすることを目的とし、紫外線曝露時に皮膚で発現するプロテアーゼの探索を実施するために以下の方法にて検討する。

- ① プロテアーゼの基質特異性のハイスループットスクリーニング系の構築
- ② DNAマイクロアレイを用い、紫外線曝露後に発現が変化するプロテアーゼと生理活性因子の探索

2. 研究の計画

(1) MALDI-TOF質量分析計を用いた、酵素特異性のハイスループットスクリーニング系の構築

基質特異性の決定にはペプチド性基質を用いた。ペプチド基質は、プロテアーゼにより切断されるとビオチンを有するN端断片とC端断片を生成する。N端配列は、アミノ酸Xを除く配列が同一の構造を有しており、切断部位のアミノ酸Xの分子量の違いにより酵素の切断特異性を評価することができる。また、同じ分子量を持つロイシンとイソロイシンの評価を可能とするためにイソロイシンのグリシンスーパーの数を变えることで判別を可能とした。プロテアーゼの基質特異性の決定法を図1示した。すなわち、合成基質をプロテアーゼにより消化した後、消化したビオチン標識ペプチドは、ストレプトアビジン-セファロースを用いてアフィニティ精製を行った。精製したビオチン標識ペプチドは、MALDI-TOF質量分析により解析しプロテアーゼにより消化されたペプチド断片を探索した。

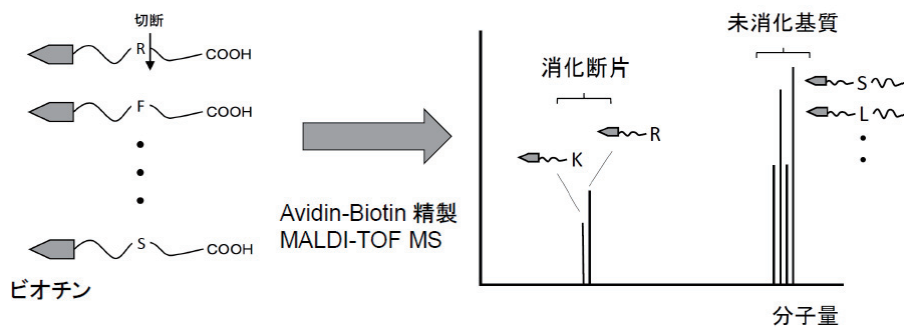


図1

(2) DNAマイクロアレイを用いた発現酵素および生理活性ペプチドの探索

ラット胎児由来皮膚角化細胞FRSKを用いて実験を行った。FRSK 細胞は UVB 領域の波紫外線で曝露した後、6 時間培養したのち トータルRNAを抽出・精製した。調整した試料はDNA マイクロアレイにより遺伝子の発現変動を解析した。また、発現変動の認められた遺伝子を定量 RT-PCR法により評価した。

3. 研究の成果

(1) プロテアーゼの基質特異性決定法の構築

① モデルプロテアーゼによる検討

合成基質により基質特異性の決定が可能であるかを、TPCK-トリプシンおよびV8プロテアーゼ、エラスターゼを用いて評価した。その結果、トリプシンでは、リジンおよびアルギニンのC端部位で切断を受けて生成した断片が検出された。また、V8プロテアーゼでは、グルタミン酸およびアスパラギン酸のC端部位で切断を受けて生成した断片が検出された。エラスターゼではアラニンとバリンのC末端で切断された断片が検出された。いずれもプロテアーゼの基質特異性と一致していた。一方、いずれのプロテアーゼもあらかじめ95℃で10分間加熱して失活させることにより、切断断片は検出されなかった。さらに、臭化シアンを用いた化学的な切断においても、メチオニンのC末端部位で切断されたペプチド断片が検出された。以上の結果から、本決定法はプロテアーゼの基質特異性の決定が可能であることが示された。

② 組織中プロテアーゼによる検討

S180サルコーマをICRマウスの皮下に移植して作製した腫瘍組織中のプロテアーゼの基質特異性について評価した。その結果、リジン、チロシンおよびフェニルアラニンのC端部位で切断を受けて生成する断片が検出され、腫瘍組織中にトリプシン様活性およびキモトリプシン様活性を有するプロテアーゼの存在が示唆された。また、腫瘍組織抽出物を沸騰水浴中でプロテアーゼを失活させると消化断片は検出されなかった。以上の結果より、我々が考案したプロテアーゼの基質特異性決定法は、未精製の試料においてもプロテアーゼの基質特異性を決定することができた。

(2) DNAマイクロアレイを用いた発現酵素および生理活性ペプチドの探索

紫外線で曝露したFRSK細胞を6時間培養した後、トータルRNAを抽出・精製した後、発現変動が見られる遺伝子の探索をDNAマイクロアレイにより行なった。その結果、発現変動が見られた酵素が3分子、生理活性因子では5分子同定された。発現変動の認められた一部の遺伝子について定量RT-PCR法により評価を行い、DNAマイクロアレイの結果を確認することができた。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の反省と考察

本研究では、神経ペプチドの細胞外活性化機構に関わるプロテアーゼの探索を試みた。組織

中にはさまざまなタンパク質やその消化断片が存在することから、抽出物を用いて簡便な手法でプロテアーゼの基質特異性を決定できる手法の構築を行なった。我々が考案した、ビオチン標識ペプチドを用いた系は、非常に簡便で高感度にプロテアーゼの基質特異性を評価することができた。今後は、POMCの細胞外活性化が確認できている皮膚組織を用いて、組織中のプロテアーゼの基質特異性の検討を進めている。本系は未精製の抽出物においても簡便に実施できる有用な方法であるが、酵素活性の定量性までは評価できていない。簡便さは失われるものの高速液体クロマトグラフィー質量分析法と組み合わせることにより定量性まで評価できるものと考えられ、今後の検討課題と思われる。また、本系では基質特異性は明らかになるが、プロテアーゼの同定までは行なうことができない。今後は組織に発現するプロテアーゼの同定にも着目した基質ペプチドの合成が必要である。一方、本研究で実施したDNAマイクロアレイは、基質特異性は明らかにすることはできないが、紫外線の曝露により発現が亢進したプロテアーゼを見出すことができた。今後は、発現亢進が認められた酵素や基質特異性の解析結果からPOMCをはじめとする神経ペプチド前駆体の切断部位を推定し、予想されるペプチドの生理活性の評価を実施する予定である。

(2) 研究経過

当初の計画よりも進み、DNAマイクロアレイを用いて発現酵素や生理活性因子の探索まで実施することができた。引き続き、新しく見出された生理活性ペプチドについても活性化のメカニズムの検討を進め、神経ペプチドの細胞外活性化機構が、皮膚組織が持つ中枢を介さない独立した活性調節機構であることを明らかにしたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hiroyuki Yamamoto, Syota Saito, Yoshikazu Sawaguchi, Michio Kimura, Identification of protease specificity using biotin-labeled substrates, The Open Biochemistry Journal. 11, 27-35, (2017)

(2) 口頭発表

なし

(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	医学部産婦人科学教室	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
四 元 房 典	医学部産婦人科学教室	講 師	実験・論文作成
漆 山 大 知	医学部産婦人科学教室	大 学 院 生	実験・データ整理
深 川 怜 史	医学部産婦人科学教室	大 学 院 生	実験・データ整理
清 島 千 尋	医学部産婦人科学教室	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 ーHB-EGF発現に関与する分子群の解析ー

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-coding RNAといわれるmicroRNAは近年の研究により、癌の増殖、転移に関与す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-EGF 3' 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、卵巢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。卵巢癌患者の血清を対象に、Y14の発現量を比較検討した結果、Y14は6ヶ月以内に再発した予後不良患者で有意に発現が上昇していた。
- ② マイクロアレイ解析の結果、予後不良な卵巢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、卵巢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、正常卵巢や良性卵巢腫瘍患者および卵巢癌患者の血液を対象にRT-PCR法で発現解析を行った結果、卵巢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。
さらに、HB-EGFが高く予後不良で有意に発現が上昇する4つのmiRNA、HB-EGFが高く予後良好な卵巢癌患者血液で有意に発現が低下する5つのmiRNAを同定した。これら9つのmiRNAのプラスミドベクターを作製し、卵巢癌細胞株に遺伝子導入し腫瘍増殖抑制効果等を比較検討している。

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ン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、卵巢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

BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: a first-in-human phase-I study.

Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, Fukami T, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Fukagawa S, Katsuta T, Maehara M, Kondo H, Miyahara D, Shiota K, Yoshizato T, Kuroki M, Nishikawa H, Saku K, Tsuboi Y, Ishitsuka K, Takamatsu Y, Tamura K, Matsunaga A, Hachisuga T, Nishino S, Odawara T, Maeda K, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Ohishi M, Hikita T, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E: BMC Cancer , 17(1), 2017, 89, DOI 10.1186/s12885-017-3071-5, 2017.

(2) 口頭発表

- ① 「Identification of microRNA as a biomarker in primary ovarian cancer」 深川 怜史
第68回日本産科婦人科学会学術講演会 平成28年4月21日 東京
- ② 「HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor) に関連した卵巣癌予後予測」 清島 千尋
第68回日本産科婦人科学会学術講演会 平成28年4月21日 東京
- ③ 「卵巣癌の予後予測因子としての microRNA-135a」 深川 怜史
第15回日本婦人科がん分子標的研究会 平成28年8月19日 札幌
- ④ 「Screening of microRNA associated with HB-EGF as a biomarker of ovarian cancer prognosis」
清島 千尋
第75回日本癌学会 学術総会 平成28年10月6日 横浜
- ⑤ 「Identification of microRNA as a biomarker of ovarian cancer prognosis」 深川 怜史
第75回日本癌学会 学術総会 平成28年10月6日 横浜
- ⑥ 「HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)の静脈内投与による有効性の検討」 深川 怜史
第20回バイオ治療法研究会学術集会 平成28年12月10日 福岡

「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 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：前年度までの成果である候補抗原に対して二次元SDS-PAGEを用いて複数の特異的なスポットが得られており、これらのスポットに対してプロテオミクス解析を行う。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。候補抗原の遺伝子を単離し、タンパク質抗原を作製した後、真菌反応性T細胞の実験系にて候補タンパク質を絞り込む。
- ② 真菌のT細胞抗原を認識するT細胞クローンの樹立：前年度に得られた真菌のT細胞抗原を用いて、抗原を特異的に認識するT細胞クローンの樹立を行う。具体的には、BM-mDCを抗原提示細胞として用いて真菌T細胞抗原を抗原提示させる。これによって、真菌抗原を投与した野生型マウスから単離したCD4⁺ T 細胞を刺激して増殖を誘導する。複数回抗原刺激を繰り返しながら、限界希釈法によって抗原を特異的に認識するT細胞クローンを樹立する。

(2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析

- ① 腸管における真菌反応性ヘルパーT細胞の解析：胃ゾンデを用いてマウスの腸管に真菌を直接投与した後、マウスからヘルパーT細胞を単離して、真菌抗原への反応するヘルパーT細胞をFlowcytometryで解析する。その際に腸間膜リンパ節や末梢リンパ節といったマウスの各種2次リンパ組織からヘルパーT細胞を単離して、真菌反応性T細胞の解析を行う。
- ② 真菌反応性ヘルパーT細胞の生体内での分布と局所への遊走の解析：光照射で色が変わるマウスの細胞や臓器を用いて蛍光特性を測定する。具体的には、マウスから単離したヘルパーT細胞での蛍光特性について時間的な解析を行う。また、マウスの腸間膜リンパ節に光照射して、照射直後と24時間後の各種2次リンパ組織における色の変化を解析する。

(3) 分化と遊走を制御している細胞内シグナル経路の同定と機能解析

- ① T細胞に発現する遺伝子ノックダウンの実験系の構築：マウスからT細胞を単離して、アンチセンスオリゴを遺伝子導入装置で細胞内に導入する実験系を構築する。
- ② Th17細胞における免疫系GEFの発現レベルの比較検討：真菌をマウスに感染させて生体内で真菌反応性T細胞を誘導しておき、マウスからヘルパーT細胞を単離した後、再刺激してTh17細胞を分離する。一方、未感染マウスからナイーブT細胞を単離して比較対照群として、これらの細胞において発現する遺伝子プロファイルをマイクロアレイ解析する。

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 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：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、骨髓細胞由来樹状細胞(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。候補抗原に対して二次元SDS-PAGEを用いて得られた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た。これらの成果は、平成28年8月歯科基礎医学会（札幌）にて共同研究者とともに2演題「口腔カンジダ症を制御するT細胞応答の誘導」「*Candida albicans*由来CD4⁺ T細胞分化誘導画分の解析」として特に発表した。候補抗原となった複数の遺伝子を単離した。発現ベクターを構築し、タンパク質抗原を作製した後、真菌反応性T細胞の実験系にて候補タンパク質の絞り込みを行った。
 - ② 真菌のT細胞抗原を認識するT細胞クローンの樹立：前年度に得られた真菌のT細胞抗原を用いて、抗原を特異的に認識するT細胞クローンの樹立を試みた。真菌T細胞抗原を抗原提示させたBM-mDCを用いて、真菌抗原を投与した野生型マウスから単離したCD4⁺ T細胞を刺激して増殖を誘導し、限界希釈法によって抗原を特異的に認識するT細胞クローンの樹立に成功した。樹立したT細胞クローンを超低温凍結保存するなどして、本年度の本資金で購入した超低温フリーザーを有効に活用している。
- (2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析
 - ① 腸管における真菌反応性ヘルパーT細胞の解析：真菌を胃ゾンデにてマウスの腸管に投与後、マウスからヘルパーT細胞を単離して、真菌抗原への反応性を解析した。真菌反応性ヘルパーT細胞が腸間膜リンパ節や末梢リンパ節に存在することが明らかになった。
 - ② 真菌反応性ヘルパーT細胞の生体内での分布と局所への遊走の解析：光照射で色が変わるマウスを用いて実験を行った。マウスの腸間膜リンパ節に光照射をしたところ、照射直後はほぼ100%の細胞で色に変化しており、遠隔リンパ節には色に変化した細胞がないことを確認した。24時間後には腸間膜リンパ節では10%程度まで減少しており、遠隔リンパ節では色に変化した細胞が1%未満存在する結果が得られた。
- (3) 分化と遊走を制御している細胞内シグナル経路の同定と機能解析
 - ① T細胞に発現する遺伝子ノックダウンの実験系の構築：本年度の本資金で購入した超純水製造機と遺伝子導入装置を有効に活用し、超純水グレードのアンチセンスオリゴを遺伝子導入装置で細胞内に導入する実験系を構築した。
 - ② Th17細胞における免疫系GEFの発現レベルの比較検討：真菌感染マウスから単離したTh17細胞ならびに未感染マウスから単離したナイーブT細胞において発現する遺伝子プロファイルをマイクロアレイ解析した。また、本年度の本資金で購入したPCR装置を有効に活用して、マウス遺伝子を増幅して解析を進めている。

4. 研究の反省・考察

口腔真菌感染症は常在菌が原因となって発症する疾患であり、宿主の免疫状態に依存して起こる日和見感染症として知られている。しかしながら、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て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。近年、Th17細胞に関する知見が集積しており、例えば、歯周病などではTh17細胞そのものが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る。そのため、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、プロテオミクス解析を行うことで候補となる抗原を特定しつつある。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。

口腔感染症は口腔内局所に限局された疾患としてとらえられることが多く、実際、*in vitro*ならびに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」という概念でとらえる必要がある。本研究の研究成果をあげることで、「口腔医学」という新しい領域の発展を目指して、今後の研究を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Nagao, J., Cho, T., Mitarai, M., Iohara, K., Hayama, K., Abe, S. and Tanaka, Y. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of a salmon protamine peptide and its derived cyclic peptide against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 17: fow099, 2017. DOI: 10.1093/femsyr/fow099.

(2) 口頭発表

- ① Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Narita, Y., Hashimoto, M., Ikezaki, S., Yasumatsu, K., Arita (Morioka), K., Kojima, H., Tanaka, Y. Investigation of the mechanism of T cell response in oral candidiasis. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Okinawa, Dec. 5-7th (7th), 2016.
- ② 田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御する免疫制御機構の解明. 第23回日本歯科医学会総会, 福岡, 10月21-23日 (23日), 2016.
- ③ 池崎晶二郎、長環、田崎園子、橋本麻利江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、田中芳彦. Mild heat stress 条件下における*Candida albicans*の遺伝子発現と細胞応答. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 東京, 10月1-2日 (2日), 2016.
- ④ 田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. *Candida albicans*に対するT細胞応答を誘導する表層抗原探索. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 東京, 10月1-2日 (2日), 2016.
- ⑤ 田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御するT細胞応答の誘導. 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 8月24-26日 (25日), 2016.
- ⑥ 池崎晶二郎、長環、田崎園子、橋本麻利江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、池邊哲郎、田中芳彦. *Candida albicans*のバイオフィルム形成におけるmild heat stress の影響. 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 8月24-26日 (25日), 2016.
- ⑦ 長環、田崎園子、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、田中芳彦. *Candida albicans*由来CD4⁺ T細胞分化誘導画分の解析. 第58回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 8月24-26日 (26日), 2016.

(3) 出版物

なし

学 校 名	尚 綱 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの評価		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 歯周病菌			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
狩 生 徹	生 活 科 学 部	准 教 授	研究代表者 研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
今 村 隆 寿	熊 本 大 学 医 学 部	准 教 授	実験全般
本 田 智 巳	生 活 科 学 部	助 手	実験全般 データ解析

新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの評価

1. 研究の目的

(1)

①歯周病は、歯肉炎や歯周炎などの慢性疾患の総称であり、う蝕と並ぶ2大口腔内疾患の一つである。近年、歯周病が冠動脈性心疾患や脳梗塞、メタボリックシンドローム、誤嚥性肺炎、骨粗鬆症、早産・低体重児出産などの様々な全身性疾患を誘発することが明らかとなってきた。重度の歯槽膿漏の場合にはペニシリン系、セファム系抗菌薬が経口投与されるが、耐性菌の出現と副作用の問題点から、慎重な選択が必要とされる。歯周病の発症・進行に関わる主要な病原性細菌は、グラム陰性偏性嫌気性菌の*Porphyromonas gingivalis* (ジンジバリス菌)である。ジンジバリス菌は外界のタンパク質分解・アミノ酸取り込みによりエネルギーを獲得する。そのため、ジンジパインと呼ばれる強力なシステインプロテアーゼを菌体表面や菌体外に分泌する。ジンジパインは、菌の増殖のみならず、補体系、血液凝固系、サイトカインなどの血漿タンパク質の分解や細胞傷害により全身疾患を誘発する病原因子でもある。そのため、ジンジパインインヒビターの解析は、ジンジバリス菌が引き起こす全身疾患への治療薬開発に重要な基礎知見と成り得る。

②我々の研究グループでは、良く知られるカテキンやケルセチンの様なフラボノイドと共に、生薬の一つであるイカリソウエキスが含有するプレニル基含有フラボノイド (プレニル化フラボノイド) のジンジバリス菌抑制活性を解析したところ、プレニル基を持たないフラボノイドに比べて制菌活性が増強される傾向が確認出来た。これらの結果から、ジンジバリス菌抑制へのプレニル化フラボノイドの有用性を確認し、これらの成果はJ. of Periodontal Research誌に掲載された。

③ジンジバリス菌制菌剤としてのジンジパイン活性阻害剤の探索・開発は現在でも国内外の複数の研究グループが取り組んでいる。しかしながら、口腔内での安定性や口腔内皮細胞への毒性、呈味性(薬剤の苦味)、抗原性等が問題となる。一般的なシステインプロテアーゼ阻害剤であるE-64やロイペプチン等は、安定性が低く、酵素特異性が低いことなどから人体への応用は困難である。プレニル化フラボノイドが長い食経験が有る植物性食品や生薬に存在する安定な成分であることは、製品化への有利な点である。

オーラルケア関連製品は、国内市場は1,292億円に達し、堅調に拡大している。その一方で、通常の医薬品に比べ販売価格の安い歯磨き粉やマウスウォッシュ等へ医薬部外品メーカーが投資出来る開発費用は低く抑えられており、新規化合物の認可申請にメーカーは慎重である。その点において、安価で製造可能かつ認可を受けやすいプレニル化フラボノイドは、他社製品と機能性で差別化を図りたいオーラルケア製品メーカーのニーズに適している。以上のことから、本研究によって新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの有効性を確立することは、歯周病とその関連疾患への対策に極めて大きな貢献となる。

④本研究では、イカリソウエキスが口腔内局所でのジンジバリス菌増殖のみならず、歯周病が誘発する全身性疾患の抑制における有効性評価を目的とし、まずジンジバリス菌液体培地培養及びバイオフィルム形成阻害アッセイ系の確立を目指す。

⑤ジンジバリス菌の主要な病原因子でもあるシステインプロテアーゼ類(Rgp及びKgp)とそれらを含む菌体外微小包(MV)の迅速な調整法を確立し、ジンジバリス菌が誘発する血液循環系への障害に関しての抑制効果を確認することにより新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキス有効性を評価する。

2. 研究の計画

(1)

①ジンジバリス菌は、偏性嫌気性菌であるため、通常嫌気チャンバーや脱酸素剤を用いたシステムでの培養が必要となる。また菌株によるジンジパイン産生量の違いも考慮に入れなが

ら各アッセイに必要なStrainの選択や培養が重要となる。ヘミン及びメナジオン含有eTSBやBHI等の既成の培養液を用いながら、ジンジパイン高発現Strainのコンスタントな培養が可能となる条件を検討する。また今後のジンジパイン精製を考慮し、Rgp又はKgp欠損菌の培養と培養液からのプロテアーゼ精製を行う。

②血液凝固障害に対する抑制効果

ジンジパインは、プロトロンビンや第X因子を分解・活性化することにより異常な血液凝固を誘発し、播種性血管内凝固症候群や歯周炎を誘発する。また同時にフィブリノーゲンやフィブリンを分解することにより、歯周病局所での易出血性に関わる。ジンジパインの血液凝固・線溶系タンパク質分解に対するイカリソウエキスの効果は、コアグロメーターを用いた血液凝固時間の測定やin vitroにおけるフィブリノーゲン分解量をウェスタンブロッティングで解析することにより評価する。

3. 研究の成果

(1)

①ルイビル大学Dr Potempaとの共同研究によりジンジバリス菌高発現株数種類とジンジパイン欠損ミュータントの培養を行った。eTSB培養液を用いて嫌気チャンバー(10% CO₂、10% N₂)若しくは嫌気パック使用システムで数日間静置培養後、遠心分離した培養上清よりジンジパインのアセトン沈殿による粗精製、イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製、Hisタグカラムによるアフィニティー精製を行った。各精製ステップの確認では、システインプロテアーゼインヒビター処理後にSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い夾雑タンパク質の存在をチェックするとともに、比活性と総酵素量の推定を蛍光合成基質を用いて行った。

②レンサ球菌*Streptococcus gordonii*とジンジバリス菌の共バイオフィーム形成アッセイを習得した。*Streptococcus gordonii*はデンタルプラーク形成に関わる主要な細菌の一つであるとともに、心臓内膜炎などを引き起こす可能性が知られている。*Streptococcus gordonii*をスライドガラス上で1日静置培養後洗浄し、さらにジンジバリス菌培養液を添加することにより、口腔内環境に近い評価をすることが可能となる。これは歯表面に形成されたプラークが、ジンジバリス菌の接着を促進する足場を形成し、さらなるバイオフィーム形成とプロテアーゼ等の病原因子発揮を促進することをin vitroで評価することが可能となる。

③血液凝固障害を確認するためにMV精製のためのBHI培地培養の確立を現在行っている。

4. 研究の反省・考察

(1)

①当初の研究計画より若干の進捗遅延が生じている。これは平成28年4月の熊本震災の影響により、研究教育環境の復旧作業、研究試薬の損失、大学実験機器の損壊が主な原因である。重要な研究サンプルや細胞株等は保全出来たため、今後の研究推進を滞りなく進めていく予定である。

②共同研究者であるDr Potempaが所有するジンジパイン高発現Strainやジンジパイン欠損ミュータント使用することが可能となり、今後のジンジパイン精製とイカリソウエキス影響評価系の確立に大きな進展となった。さらに口腔内バイオフィーム形成に関わる主要なレンサ球菌である*Streptococcus gordonii*の共バイオフィーム形成アッセイを用いることにより、イカリソウエキスの口腔内環境に近い評価が可能となった。これまでの本研究の知見でも、イカリソウエキに含まれるプレニル化フラボノイドのプロテアーゼ活性に依存しないバイオフィーム形成阻害活性が存在することが示唆されており、ジンジバリス菌と*Streptococcus gordonii*の接着因子相互作用や多糖の高次構造形成等の評価を迅速化することが可能となる。

③今後は全身循環系への影響を血液凝固因子分解を中心に、補体タンパク質分解、血管内費への傷害などとともに評価する。また難培養性のFilifactor alocisがプラークの成熟とバ

イオフィルム共生に関わることから、コラゲナーゼ等Filifactor alocis産生酵素の活性を指標にプレニル化フラボノイドの評価も進めていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①くまもと産業復興支援プロジェクトフォーラム ポスター発表
2017年2月28日 熊本大学
プレニル化フラボノイドの歯周病菌増殖抑制活性
狩生徹

(2) 口頭発表

なし

(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	海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO ₂ 固定系 解明と増強 ーCO ₂ 濃縮強化による光合成機能改変の試みー		研 究 分 野	環 境 科 学
キ ー ワ ー ド	①海洋性珪藻 ②光合成 ③CO ₂ 濃縮機構 ④代謝制御 ⑤バイオ燃料 ⑥環境応答			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 田 祐 介	理 工 学 部	教 授	研究代表者:研究の統括および珪藻CO ₂ 濃縮機構のモデル構築

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 敬 典	理 工 学 部	助 教	研究分担者:珪藻代謝の工学的改変
中 島 健 介	理 工 学 部	博 士 研 究 員	研究分担者:CO ₂ 取り込みに関わる分子と機能の 同定

海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO₂固定系解明と増強副 —CO₂濃縮強化による光合成機能改変の試み—

1. 研究の目的

珪藻は地球上における一次生産のおよそ20%を担っている。その生産物質は主にオイルであり、有力なバイオ燃料生産藻類候補としても着目される (Yoshida et al. 2012)。珪藻は、光合成で固定した炭素を多糖 (β-グルカン) やオイル (トリアシルグリセロール) として蓄積する。そのため、CO₂固定効率の強化は、多糖やオイルの高蓄積につながることを期待される。

しかし、珪藻生産力の基礎となる光合成分子メカニズムは、極めてユニークな進化を辿り、その殆どは未解明である。珪藻が生育する海水は高塩・高アルカリであるため溶存CO₂濃度は低く (15 μM)、一方で高濃度のHCO₃⁻ (2 mM) が存在する。我々の先行研究において、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* が、細胞膜上のHCO₃⁻輸送体 (SLC4) によって積極的にHCO₃⁻を細胞内に取り込み、光合成に利用することを示した (Nakajima et al. 2013, *PNAS*)。SLC4を介したHCO₃⁻利用は、光合成における「CO₂不足」を解消し、海洋性珪藻の生産力を支える重要メカニズムの一つである。

海洋性珪藻の高いオイル生産性を利用するために、CO₂およびHCO₃⁻の取り込みから、葉緑体内での固定に至るまでのプロセスを包括的に理解する必要がある。しかし珪藻では、①取り込まれたHCO₃⁻やCO₂が葉緑体内に輸送されるしくみ、②葉緑体内でHCO₃⁻がCO₂に変換されてCO₂固定酵素であるRubiscoに供給されるしくみ、③Rubiscoの活性化メカニズム、④カルビン回路を律速する酵素、などの点が明らかにされていない。また、これらプロセスが環境条件に応じて協調的に調節される機構も不明である。

本研究では、海洋性珪藻のCO₂固定プロセスを包括的に解明し、CO₂固定のボトルネックを解放してオイル生産を高めることを目指している。

2. 研究の計画

(1) SLC4によるNa⁺依存性HCO₃⁻輸送機構の解明

SLC4輸送体は、Na⁺イオン依存的にHCO₃⁻を輸送することが判明したが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。そこで、種々のイオノフォアやNa⁺チャネル阻害剤、およびナトリウム特異的蛍光標識剤等を活用し、細胞内外のNa⁺イオン濃度勾配とHCO₃⁻取込みの共役機構を明らかにする。CO₂応答性を示し、かつ機能未同定のSLC4-1およびSLC4-4の過剰発現体を作成し、の粗機能を決定する。

(2) 葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の同定

珪藻葉緑体は二次共生により獲得されたため、四枚包膜を有する。葉緑体内のRubisCO酵素にCO₂を供給するためには、HCO₃⁻あるいはCO₂が四枚の包膜を通過するが、この仕組みは不明である。葉緑体包膜上の無機炭素輸送体を同定するために、核ゲノムにコードされる無機炭素輸送体候補を探索し、GFPタギングによる網羅的な局在解析を行う。葉緑体局在が示された候補について、珪藻でのノックダウン実験あるいは異種発現系を利用した機能解析を行う。

(3) SLC4に依存しない無機炭素獲得機構の解明

複数の珪藻種での比較解析から、*Thalassiosira pseudonana*など一部の珪藻種では、SLC4非依存の無機炭素取込みの存在が示唆されている。これらの珪藻では細胞外炭酸脱水酵素 (CA) によってHCO₃⁻をCO₂に変換し、CO₂を細胞内に取り込んでいる可能性が高い。*T. pseudonana*のCA依存的な無機炭素獲得機構を解明するために、CO₂の膜透過性を高めるチャネルおよび輸送体に着目し、それらの局在解析と特性解析を行い、SLC非依存型の無機炭素獲得機構を解明する。

3. 研究の成果

(1) SLC4によるNa⁺依存性HCO₃⁻輸送機構の解明

- ① *P. tricornutum*におけるSLC4-1およびSLC4-4遺伝子について、その過剰発現体を取得した。これらの輸送体候補タンパク質はすべて細胞膜に局在した。定常的過剰発現によってこれらの産物が全てHCO₃⁻特異的な輸送体であることが分かった。
- ② エフェクターイオンはともにNa⁺であるが、その特異性はSLC4-4でSLC4-1に対して低いことが分かった。これらのHCO₃⁻輸送活性は光化学系直線電子伝達の阻害剤によって効果的に阻害され、光化学系からのエネルギーで駆動されることが分かった。これらの成果は国際会議を含む複数の学会で報告した。

(2) 葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の同定

- ① *P. tricornutum*ゲノムにコードされるSLC4-6およびSLC4-7遺伝子について、その過剰発現体を取得した。これらの輸送体候補遺伝子はすべて葉緑体包膜に局在した。
- ② これら葉緑体包膜型SLC4は、細胞膜型SLC4-2と同時に定常過剰発現させると、無機炭素への親和性の高い光合成を行うことが分かった。これらの成果は現在投稿準備中である。

(3) SLC4に依存しない無機炭素獲得機構の解明ほか

- ① 4種の珪藻、*P. tricornutum* (羽状目) *Chaetoceros muleri* (中心目) *T. pseudonana* (中心目) および *Sylindrotheca fuciformis* (羽状目) の進化系統の異なる4種の海洋性珪藻を用いて、これらの光合成無機炭素親和性に対するSLC阻害剤 DIDS および細胞外CA阻害剤 AZA の影響を検証したところ、前者2種の珪藻がDIDSおよび後者2種がAZAの添加によって著しい無機炭素濃縮の阻害をうけた。このことから、珪藻光合成は進化系統にかかわらずSLC4依存型のHCO₃⁻輸送或いは細胞外CA依存的なCO₂取り込みのいずれかの戦略により基質を獲得していることが示された。本研究成果は査読付き英語論文に発表した。
- ② このほか重要な発見として、葉緑体内で光化学系のプロトン濃度勾配を利用して、CO₂を局所的に発生させるチラコイド内腔局在型CAを発見した。この酵素は新奇一次配列を有するためθ型CAと命名し、植物プランクトンにおける普遍的存在が示唆された。光合成に必須の役割を負うと考えられる。この成果を査読付き英語論文に発表した。

4. 研究の反省・考察

(1) SLC4によるNa⁺依存性HCO₃⁻輸送機構の解明

- ① 細胞膜型のSLC4は海洋一次生産を制御する重要因子の一つであることが判明した。
- ② 細胞膜輸送体増強による一次生産性の増強には繋がっていない。今後増強効果を精査する。

(2) 葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の同定

- ① 葉緑体包膜系は定常的に強いHCO₃⁻輸送を有する事が分かった。十分な細胞膜上の取り込み活性がある場合、葉緑体包膜系がCi供給のボトルネックとなる事が示唆された。
- ② 葉緑体包膜輸送体増強による一次生産性増強には繋がっていない。今後この増強効果を精査する。

(3) SLC4に依存しない無機炭素獲得機構の解明ほか

- ① 2つの無機炭素取り込み戦略が存在することが判明した。この2戦略のエネルギーコストを定量化する必要がある。
- ② 葉緑体内で重要な働きをするCAが発見された。CCM増強に関わる新たなモデル構築が必要である。アウトプットとして油脂生産に炭素フローを切り替える有効ポイントを見いだす必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 (すべて査読付き原著論文)

- ① Kikutani S, Nakajima K, Nagasato C, Tsuji Y, Miyatake A, Matsuda Y (2016年8月) Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**(35): 9828-9833, Doi: 10.1073/pnas.1603112113
- ② Shimakawa G, Matsuda Y, Nakajima K, Tamoi M, Shigeoka S, Miyake C (2017年1月) Diverse strategies of O_2 -usage for preventing photodamage under CO_2 -limitation during algal photosynthesis. *Scientific Report* **7**:41022 DOI:10.1038/srep41022
- ③ Matsuda Y, Hopkinson BM, Nakajima K, Dupont CL, Tsuji Y (2017年1月) Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO_2 sensing in marine diatoms - A gateway to carbon metabolism. *Philosophical Transaction B*, Royal Society, In press
- ④ Tsuji Y, Mahardika A, Matsuda Y (2017年3月) Evolutionary-distinct strategies to acquire inorganic carbon from seawater in marine diatoms. *J. Exp. Bot.* DOI: 10.1093/jxb/erx102 In press
- ⑤ Hopkinson BM, Dupont CL Matsuda Y (2016年4月) The physiology and genetics of CO_2 concentrating mechanisms in model diatoms. *Current Opinion in Plant Biology* **31**: 51-67

(2) 口頭発表

- ① The biophysical CO_2 -concentrating mechanism in marine diatoms - diversity of components and convergent aspects in function. Yusuke Matsuda, 2016年8月17日 The 9th International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms. Cambridge, UK (招待講演)
- ② Signal transduction and promoter regulation systems in marine diatoms in response to carbon dioxide and light. 2016年9月27日, Stazione Zoologica, Anton Dorn, Napoli, Italy (招待講演)
- ③ The biophysical CO_2 -concentrating mechanism in marine diatoms - diversity of components and convergent aspects in function. 2016年10月4日, University of Konstanz, Germany (招待講演)

(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	X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の 解明 ー脳の微小管の分子運動はなぜ小さいのか？ー		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①微小管 ②Tubulin ③X線1分子計測 ④電子線1分子計測			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 山 高 宏	医 学 部	助 教	研究総括および微小管Tubulin精製・組換え体作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 川 直 樹	日 本 大 学 文 理 学 部	非 常 勤 講 師	電子線1分子計測(DET)の実施
佐 々 木 裕 次	東京大学 新領域創成科学 研 究 科	教 授	X線1分子計測(DXT)の実施

X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の解明 — 脳の微小管の分子運動はなぜ小さいのか? —

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

全身性のあらゆる細胞においてその形態維持に必要とされる微小管は、恒常性維持や神経伝達物質の軸索輸送に不可欠な小胞膜輸送機能にも関与していることが知られている。我々はこの小胞膜輸送に対して微小管の重合・脱重合に代表される分子動態の変化が作用し、形質膜表面への小胞輸送に影響を及ぼす現象を明らかにしてきた(Nakayama, *J Cell Sci* 2012)。更に我々はこの微小管の分子動態変化に伴って分子運動自体にも変化が起きることにより輸送小胞との物理的親和性が輸送効率に影響している可能性に着目し、ラット脳より精製した微小管と、水溶タンパク試料にて1ピコメートルの分子運動変化を検出可能な新技術であるX線1分子計測法(DXT)(Sekiguchi, *Sasaki PLoS One* 2013)を用いて、分子運動度の計測を試みた。その結果、脳由来の微小管において、これまで確認されたことのない極微な分子運動が存在する現象を見出してきた。またこの現象が他の臓器由来の微小管においても見られるか検証したところ、脳由来の微小管の方が肝臓由来のもの比べて、その分子運動度が小さくなる現象を見出してきた。興味深いことに同様の現象は、MAPs, Kinesin等の微小管結合タンパクを除いた高純度の微小管でも確認された(Nakayama, Unpublished data)ことから、分子運動度の差は微小管自体の分子運動に起因することが示唆された。この修飾因子を除いた場合、一般的にタンパク質分子の運動に影響を及ぼす因子として分子内極性が大きな比重を占めていると考えられるが、本現象の詳細については更なる解析が必要とされている。

近年、組織特異性を示すTubulin (TUB) isoformが多数同定されてきた。それらの中には、ユビキタス発現型のTUBB5以外にも、TUBB3のような脳に高発現を示し小胞膜輸送に基づくAxonガイダンスに関与したisoformが同定されてきているが、これらisoform間での特にC末端領域においてアミノ酸配列相同性に相違が見られることが知られている(Leandro-Garcia, *Cytoskeleton*, 2010)。またTUBは様々な翻訳後修飾を受けるが、その中でも二量体分子の極性に大きな影響を及ぼすC末端は、リン酸化、パルミトイル化、 $\Delta 2$ 化、脱チロシン化、ポリグリシン化、ポリグルタミン酸化に代表される分子修飾を受けることが知られている。この中で特に大きな荷電変化をもたらすポリグルタミン酸化は、興味深いことに、ほとんどの神経の微小管で特異的に修飾を受けていることが明らかになっている(Janke, *Trends Neurosci* 2010)。これらの知見は、脳と肝臓由来の微小管の間で極微な分子運動度に差が見られた現象が、その構成因子であるTUB二量体のisoformの構造および翻訳後修飾による分子特性の差に起因している可能性を示唆しているものと考えられる。

(2) 研究の目的

従って本研究は、TUBB3, 5に代表される脳と肝臓で高発現を示す内在性TUB二量体の詳細な分子運動度の測定を行う。更に組換えタンパク質を用いた再構成実験によって、微小管の極微な分子運動がTUB配列依存的に決定されるのか、分子修飾依存的に決定されるのかの可否を明らかにすることを通して、微小管の分子運動度に差が生まれる因子を同定し、微小管の新しい小胞輸送機能の解明へ向けた基盤を築くことを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 内在性Tubulin (TUB) 二量体の精製 (中山)

脳由来の微小管で高発現を示すTUBB3, 2A, 2B, 4A, TUBA1Aと脳以外の組織由来の微小管で高発現を示すTUBB5, 2C, 6, TUBA1B, 1C, 4Aについて分子運動度計測のための内在性TUB精製を行う(Nakayama, *J Cell Sci* 2012)。具体的には、内在性TUB二量体を精製するために、ラット脳およ

び肝臓組織より抽出を行う。具体的にはラット脳および肝臓組織にReassembly buffer (RB)を加え、ホモジナイザーにて破碎を行い、238,400 gの超遠心により、TUB-rich上清を得て、グリセロール、GTP存在下にて37℃で微小管重合反応を行う。100,000 gの超遠心で得られたペレットにRBを加え氷上にて重合微小管の脱重合を行いTUB分画を得る。このTUB分画をPhosphocelluloseカラムに通し、GTP、ADP処理後の超遠心によりMAPs, Kinesinモーター等のTUB結合タンパク質の除去を行った高純度TUB分画を得る。上記TUB isoformについてProtein-GにBis-sulfosuccinimidyl suberateにて架橋したアフィニティー抗TUB抗体カラムを作製し、高純度TUB分画との結合反応、グリシン塩酸による酸溶出、塩基性トリスによる中和、自然重合阻止のための塩化カルシウムの添加を行い、最終的に技法の異なる極微1分子計測(X線、電子線)の為に組織特異的内在性TUB二量体の精製試料を得る。

(2) 内在性TUB二量体のX線1分子計測 (DXT) による分子運動解析 (佐々木)(小川)

(1)にて得られた精製TUB二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能なX線1分子計測法(DXT)と電子線1分子計測法(DET)を用いて分子運動度の評価を行う(Yamamoto, **Ogawa, Sasaki** *FEBS Open Bio* 2016)。特徴として、DXTは早い時分解能(10 μ sec)を持つX線照射によって大量の回折点が得られデータ取得が容易である一方で、DXTは微量サンプル(50nl)でより正確な3次元分子運動測定が可能である。具体的には、1-10 μ gの精製タンパクと金ナノ結晶との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行う。次に水溶試料の計測を可能にするDXTセル内にセットするため、金ナノ結晶架橋タンパク試料を金支持基板上に固定し、100 μ lの緩衝溶液中において、SPRING8-BL40XUによるDXT計測を行う。上記DXT計測法を用いた評価実験に関しては東京大・佐々木裕次 教授との共同研究により行われる。このDXT計測により、早い時間成分におけるTUB二量体の分子運動が定量的に同定可能になる。また電子線1分子計測法(DET) (**Ogawa**, *Scient Rep* 2013)はDXT計測法と同じく水溶試料にて極微分子変化を検出可能である。特徴としては微量サンプル(50nl)でより正確な3次元分子運動測定が可能である一方で、取得データ数と時分解能は悪い(1msec)。具体的には、(I-1)にて得られた精製TUB二量体サンプルと金コロイド粒子との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行った後、厚さ20nm、耐圧1.3気圧の真空蒸着カーボン隔膜と対峙した支持膜上に固定し、DETセル内にて50nlの緩衝溶液中において計測を行う。上記DET計測法を用いた評価実験に関しては日本大・小川直樹 非常勤講師との共同研究により行われる。このDET計測により、遅い時間成分におけるTUB二量体の分子運動が3次元詳細情報として定性的に同定可能になる。技法の異なる一連のDXT、DET計測を通して、より確度の高い分子運動が計測可能になると共に、組織特異性をもつTUB二量体の分子運動度の値から微小管とTUB二量体の分子運動の相関関係を示せることが期待される。またそれらに共通する配列特異性に関する手掛かりが掴めると予想される。

3. 研究の成果

(1) 内在性Tubulin (TUB) 二量体の精製 (中山)

内在性TUB二量体を精製するために、100匹のラット脳、心臓および肝臓組織より抽出を行った。主な実験操作としては、ラット組織にReassembly buffer (RB)を加え、ホモジナイザーにて破碎を行い、238,400 gの超遠心により、TUB-rich上清を得て、グリセロール、GTP存在下にて37℃で微小管重合反応を行った。100,000 gの超遠心で得られたペレットにRBを加え氷上にて重合微小管の脱重合を行いTUB分画を得た。このTUB分画をPhosphocelluloseカラムに通し、GTP、ADP処理後の超遠心によりMAPs, Kinesinモーター等のTUB結合タンパク質の除去を行った高純度TUB分画を得た。脳由来の微小管で高発現を示すTUBB3(神経型), 4A(神経/グリア型)と脳以外の組織由来の微小管で高発現を示すTUBB2C(心臓/精巣型), 5(全身型)の計4つのisoformの各抗体1mgをBis-sulfosuccinimidyl suberateにてProtein-Gに架橋したアフィニティー抗TUB抗体カラムを作製し、高純度TUB分画との結合反応、グリシン塩酸による酸溶出、塩基性トリスによる中和、自然重合阻止のための塩化カルシウムの添加を行い、最終的に技法の異なる極微1分子計測(X線、電子線)

の為の組織特異的内在性TUB二量体の精製試料を得ることに成功した。

(2) 内在性TUB二量体の極微1分子計測 (DXT、DET) による分子運動解析 (佐々木)(小川)

(1)にて得られた脳由来TUBB3, 4Aと肝臓由来TUBB2C, 5の精製TUB二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能なX線1分子計測法(DXT)と電子線1分子計測法(DET) (Yamamoto, **Ogawa, Sasaki** *FEBS Open Bio* 2016)を用いて分子運動度の評価を行った。特徴として、DXTは早い時分解能 ($10 \mu \text{sec}$)を持つX線照射によって大量の回折点が得られデータ取得が容易である一方で、DETは微量サンプル(50nl)でより正確な3次元分子運動測定が可能である。具体的には、1-100 μg の精製タンパクと金ナノ結晶との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行った。次に水溶試料の計測を可能にする観測セル内にセットするため、金ナノ結晶架橋タンパク試料を金支持基板上に固定し、0.5-100 μl の緩衝溶液中において計測を行った。その結果、脳由来TUB二量体の方が肝臓由来のものと比較して x 軸方向の分子運動度が低くなる傾向を示し、微小管運動の結果と相関傾向にあることが示された。一方、これらの isoformの組換えTUBを利用した先行実験を試みたが、現在までのところ明確な運動度の傾向は得られていないが、グリアを含む脳高発現型TUBB4Aの高運動度から神経特異的TUBB3とそれ以外とで配列特異性がある可能性も示唆された。従って、次年度以降に内在性及び組換えTUBの更なる解析を行う予定である。

4. 研究の反省・考察

(1) 実施した内在性Tubulin二量体の分子運動度解析は当初計画の半数であったが、脳由来TUB二量体と肝臓由来TUB二量体との間で比較をして、 x 軸方向の分子運動度が低くなる明確な傾向が得られてきたことは大きな発見であった。この結果は、脳と肝臓由来の微小管で見られた分子運動度の違いが、それを構成するTubulin二量体の差に起因している可能性をあらわしているものと考えられる。それと同時に、この傾向が他のTUB isoformでもあらわれてくるかを明らかにするために更なる解析の必要性があり、その為にもその他のTUB isoformに特異性の高い抗体の取得が急務であると考えている。

5. 研究発表

なし

学 校 名	明 星 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究 ー原子レベルから細胞までの統合的理解ー		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	① ヌクレオソーム ② クロマチン ③ リモデリング因子 ④ リピート配列 ⑤ ヒストンテール ⑥ ヒストン修飾 ⑦ 転写制御 ⑧ 相同組換え			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
香 川 亘	理 工 学 部	准 教 授	総括、構造生物学・生化学的解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
清 水 光 弘	理 工 学 部	教 授	分子遺伝学・生化学・分子生物学的解析
須 賀 則 之	理 工 学 部	准 教 授	生化学・細胞生物学・分子生物学的解析

ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究 ー原子レベルから細胞までの統合的理解ー

1. 研究の目的

真核生物において、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、ゲノムDNAを核内に収納するだけでなく、生命の根幹に関わるDNAの転写、修復、組換えなどを制御する機能を有する。このような制御において、ヌクレオソームの構造はダイナミックに変化することが考えられているが、その分子機構はほとんど不明である。そこで本研究では、緊密な共同研究体制を組み、ヌクレオソームダイナミクスに重要と考えられるクロマチンリモデリング因子、ヒストン結合因子、およびDNAの構造特性に着目した。そして、それらを原子レベルでの立体構造解析から細胞における機能解析まで多角的に解析することによって、ヌクレオソームダイナミクスの分子機構を統合的に解明することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) リモデリング因子の大量調製系の確立

クロマチンリモデリング因子の機能構造は、未だ明らかにされていない。そこで代表的なクロマチンリモデリング因子として、相同組換えで働くRad54に着目し、そのヌクレオソームとの複合体の立体構造を明らかにすることを目的とした。これまでの研究から、ヒトや出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のRad54は、大量発現が困難であることが明らかにされている。そこで本研究では、部分構造が明らかにされているゼブラフィッシュRad54に着目し、その全長タンパク質を大腸菌の発現系を用いて大量調製する系の確立を目指した。

(2) *In vivo*における新規ヌクレオソーム解析法の開発

*In vivo*でのヌクレオソームの位置と動態を解析するために、ヒストンのDNA結合部位特異的切断法の開発を目的とした。出芽酵母ヌクレオソームのX線結晶構造に基づいて、4種類のヒストンH2A、H2B、H3、H4のDNA接触部位を予測した。それらのアミノ酸残基にCys変異を導入し、N-(1,10 phenanthroline-5-yl) iodoacetamideを連結し、Cu²⁺をキレートした後、OHラジカルを局所的に発生させてDNAを切断する方法を計画した。

(3) DNA構造特性によるヌクレオソーム多様性の解析

DNAの構造特性とヌクレオソームダイナミクスとの関係を明らかにすることを目的として、ヒトゲノムに存在する単純反復配列に着目した。ヒトゲノムでは3~5塩基の単純反復配列（マイクロサテライト配列）が広く見出されている。そこでこれらのリピート配列におけるヌクレオソームの形成と安定性について、出芽酵母ミニ染色体の系を用いて解析した。具体的には、ヌクレオソームのポジショニングが確立している出芽酵母ミニ染色体の特定部位に、マイクロサテライト配列を挿入し、*in vivo*でミニ染色体上のヌクレオソームの配置と構造をマイクロコッカルヌクレアーゼ（MNase）およびhydroxylradical footprintingによって詳細に解析した。得られた結果から、マイクロサテライト配列のDNA構造特性とヌクレオソームダイナミクスとの関係を考察した。

3. 研究の成果

(1) リモデリング因子の大量調製系の確立

今回、大腸菌を用いた系で全長Rad54を大量調製するために、先行研究で安定な断片の大量調製が報告されているゼブラフィッシュRad54 (*Danio rerio* Rad54、以下DrRad54) に着目した。まず、DrRad54を大腸菌内で効率よく発現させるために、DrRad54の遺伝子を大腸菌が好むコ

ドンに書き換えた合成遺伝子を用いた。DrRad54を5種類の大腸菌株を用いて大量発現を試みた結果、BLR(DE3)株においてDrRad54の発現が確認された。発現したDrRad54をNiアフィニティークロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行ったところ、DrRad54を高純度に精製することに成功した。

(2) *In vivo*でのヌクレオソームのポジションを決定するパラレルマッピング法の確立

ゲノムにおけるヌクレオソームの配置の解析には、従来、micrococcal nuclease (MNase)が広く用いられているが、その塩基配列特異性のために、得られた結果の解釈に問題が指摘されてきた。本研究において、MNase法と併用して、ヒストンH4のDNA部位特異的の化学切断法を核に適用したパラレルマッピング法を確立した。本法によって、*in vivo*でのヌクレオソーム配置の解析がより正確になり、マイクロサテライト配列の形成するヌクレオソームの構造的特徴を新たに見いだした (*PLoS ONE*, 論文投稿中)。

(3) DNA構造特性によるヌクレオソーム多様性の解析

DNAの構造特性がヌクレオソームの形成に及ぼす影響を調べることを目的として、全10種類のトリヌクレオチドリピート配列をデザインした。ポジショニングしたヌクレオソームから構成される出芽酵母ミニ染色体のアッセイ系を用いて、36 bpのトリヌクレオチドリピート配列をヌクレオソームの中央に挿入し、パラレルマッピング法で解析した。その結果、ヌクレオソーム形成を促進する配列と阻害するリピート配列を明らかにした。また、進行性ミオクロームステんかん (EPM1) と筋強直性ジストロフィー2型 (DM2) に関与するCCCCGCCCGCGとCCTGリピートについても解析した。その結果、CCCCGCCCGCGが*in vivo*でヌクレオソームの形成を強く阻害することを見いだした。継続時間を加味した隠れマルコフモデルに基づくヌクレオソーム配置予測解析結果と比較することによって、ヌクレオソーム形成に及ぼすDNA配列特性の寄与について考察した。

さらに、さまざまな塩基配列を含むヌクレオソームの立体構造をX線結晶構造解析法により明らかにするために、塩基配列が異なるDNAを含むヌクレオソームを比較的簡便に大量調製する方法を検討した。このようなヌクレオソームの大量調製のボトルネックとなっているDNAの調製方法として、オリゴDNAを用いたOne-Pot反応を確立した。この方法により、ミニ染色体の系で解析したマイクロサテライト配列を含むDNAを簡便かつ大量に調製することが可能になった。また、プラスミドにNCP再構成用の様々なDNA配列を制限酵素非依存的かつシームレスに、一度に多コピークローニングする迅速で簡便な方法の開発を行った。

(4) ヒストンのDNA結合部位特異的切断によるヌクレオソーム解析法の開発

*In vivo*での多様なヌクレオソーム構造と動態を明らかにするために、ヒストンのDNA結合部位を特異的に切断する方法の開発を目的とした。出芽酵母ヌクレオソームのX線結晶構造に基づいて、4種類のコアヒストンのDNA接触部位を予測し、部位特異的の化学切断法を検討した。これまでに、ヒストンH2AとH2B、ヒストンバリエントH2A.Zの部位特異的切断の検出に成功し、*in vivo*におけるヌクレオソームの新たな解析法の実現性を示した。

4. 研究の反省・考察

本研究は、全長Rad54を大腸菌の大量発現系を用いて大量調製した初めての例であり、今後Rad54のクロマチンリモデリング活性の解析に大きく貢献することが考えられる。また本研究では、様々なDNA配列を含むヌクレオソームを比較的簡便に大量調製する方法を確立した。この方法を用いることにより、*in vitro*でのヌクレオソームの生化学的解析およびX線結晶構造解析が進むことが予想される。一方で、*In vivo*でのヌクレオソームの解析法として、部位特異的の化学切断法をMNaseと併用するパラレルマッピングを確立し、ヒストンのDNA結合部位特異的切断に

よる新規ヌクレオソーム解析法の実現性を示した。*In vivo*でのヌクレオソームマッピングの結果と*in vitro*での結果を相互検証することにより、クロマチンダイナミクスを統合的に理解できることが期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Saotome, M., Saito, K., Onodera, K., Kurumizaka, H. and Kagawa, W. Structure of the human DNA repair protein RAD52 containing surface mutations. *Acta Crystallogr. F* **72**, 598-603. (査読あり)
- ② Ichikawa, Y., Morohashi, N., Tomita, N., Mitchell, A. P., Kurumizaka, H. and Shimizu, M. Sequence-directed nucleosome-depletion is sufficient to activate transcription from a yeast core promoter *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **476**, 57-62. (査読あり)

(2) 口頭発表

- ① 香川 亘、ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発、クロマチン動構造ワークショップ、ルスツリゾート（北海道）、2016年7月7日～9日
- ② 布施智博、勝俣光司、諸星皓哉、栗原陽平、勅使川原裕太、林俊樹、清水光弘（招待講演）、*In vivo*においてポジショニングに依存したヌクレオソーム構造の多様性、第89回日本生化学会大会、東北大学（宮城県・仙台市）、2016年9月25日～27日
- ③ 清水光弘（招待講演）、部位特異的ヒストンケミカルマッピングによるヌクレオソームの解析、平成28年度国立遺伝学研究所研究会「クロマチン・細胞核の動的構造変換とエピジェネティック制御」、国立遺伝学研究所（静岡県・三島市）、2016年10月27日～28日
- ④ 諸星皓哉、今井洸志、布施智博、香川 亘、清水光弘、出芽酵母PH05の転写活性化と抑制に伴う+1ヌクレオソームの解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）、2016年11月30日～12月2日
- ⑤ 清水光弘（招待講演）、ヒストンのDNA部位特異的切断による*in vivo*でのヌクレオソームの解析、第4回ヒストンバリエーション研究会、東北大学（仙台市）、2017年2月11日

(3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」 ータンパク質の離合集散の圧力応答研究ー		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	① 圧力、②生物リズム、③細胞分裂、④タンパク質			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 原 亮	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
松 村 浩 由	生 命 科 学 部	教 授	実験・論文作成
寺 内 一 姫	生 命 科 学 部	教 授	実験・論文作成
北 沢 創 一 郎	薬 学 部	助 教	実験・データ解析
吉 澤 拓 也	生 命 科 学 部	助 教	実験・データ解析

圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」 ータンパク質の離合集散の圧力応答研究ー

1. 研究の目的

- (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究
 - ①近年の院内感染の蔓延にともなってメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の新たな創薬ターゲットの開拓が求められている。そこで本研究では、MRSAの細胞分裂タンパク質FtsZのコンフォメーション標的阻害剤の設計基盤を構築することを目的とする。
 - ②FtsZは、細菌の細胞分裂時に中心的な役割を果たすタンパク質で、細胞中央部にリング状のポリマーを形成して細胞膜の陥入を引き起こす。この膜陥入はFtsZの離合集散が関わっており、その離合集散はFtsZの構造多型が関係していると考えられているがそのメカニズムは不明である。そこで本研究では、FtsZの構造多型性と離合集散の関係を解明することを目的とする。
- (2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究
 - ①野生型KaiCのリン酸化/脱リン酸化の周期長は、20～40℃付近で変化しないことが温度補償性として知られているが、圧力に対する応答は全くの未解明である。リン酸化/脱リン酸化の周期長の圧力依存性を調べる。
 - ②寺内ら (Terauchi et al. PNAS 2007) による研究から、リン酸化/脱リン酸化周期長がKaiCのATPase活性の増加と共に短くなるという負の相関が知られている。KaiCのATPase活性の圧力依存性を調べる。

2. 研究の計画

- (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究
 - ①FtsZ-構造選択的阻害剤複合体の構造解析を行うとともに、高圧力技術を用いて不安定なコンフォメーションのタンパク質を結晶化する手法 (高圧結晶成長法) の開発を進める。FtsZのコンフォメーション平衡の圧力依存性に基づいて、FtsZの結晶化を行う。
 - ②NMR法、蛍光法を用いて、FtsZの構造多型性を解明する。圧力を用いた新しい結晶化技術を開発する。
- (2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究
 - ①KaiCのリン酸化/脱リン酸化周期長の圧力効果を調べる。耐圧性の光学セルを用いて、30℃で1～3000気圧において野生型KaiCのリン酸化、脱リン酸化に伴う蛍光強度の変化を測定する。試料は、KaiA、KaiB、KaiC及びATPを含み、KaiAはKaiCのリン酸化を促進し、KaiBはKaiAを阻害することがわかっている。
 - ②KaiCのATPase活性の圧力効果を調べる。
 - ③KaiC及びKaiAの高圧蛍光測定を行い、それらの立体構造や解離・会合の変化を調べる。

3. 研究の成果

- (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究
 - ①本研究では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 由来の分解能2.2 Åの立体構造を決定した (*J. Struct. Biol.* 2017)。FtsZは同一結晶の中に、大きく立体構造が違う2種で存在していた (図1)。この立体構造の異なるFtsZは結晶中でフィラメントを形成しており、一方 (黄色の分子) のフィラメント内の



図1 同一結晶内に、構造の異なる2種の分子 (黄色と緑色) が同時に存在していた。この図は2種の分子の重ね合わせを示している。

分子間接触面積は1154 Å²、もう一方（緑色の分子）のフィラメントでは741 Å²であったことから、黄色がフィラメント構造を強固に結合する状態（T状態）で、緑がフィラメント構造から離れる状態（R状態）を示していると予想できた。次に、分子動力学計算によるT状態からR状態へのFtsZの構造遷移の再現を試みた。構造変化経路探索法 (Parallel Cascade Selection MD: PaCS-MD) を適用することで、T状態からR状態への構造遷移の再現に成功した。そのFtsZの構造遷移において、構造遷移が段階的に起きることが分かった。そこで、この段階的構造遷移で特に重要なアミノ酸であるArg29をアラニンに置換した変異体の構造解析を行った。その結果、R29A変異体はT状態とR状態ともに保てないことが実証できた。

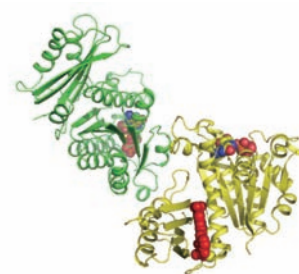


図2 阻害剤（赤色）はT状態の疎水性ポケットにのみ結合していた

- ②FtsZの結晶を阻害剤含有溶液に浸漬することによってFtsZと阻害剤との複合体の構造解析を行った (*ACS Chem. Biol.* 2017)。構造解析の結果、阻害剤はT状態のクレフトに結合していることが分かったが、R状態にはこのクレフトが存在しないためにその結合は見られなかった（図2）。したがって、阻害剤はコンフォメーション選択阻害剤であることが分かった。阻害剤が結合していないアポ体の立体構造と比べても、阻害剤が結合したことによる大きな構造変化は見られなかった。
- ③高圧結晶成長法による結晶化方法を開発した。高圧での結晶化については定まった手法がないために、様々な方法を試験した結果、キャピラリーを用いたバッチ法で1000気圧下においてFtsZの結晶を得ることが不十分であるため、さらに高圧下でのFtsZの結晶化条件を最適化しているところである。また、NMR蛍光法の解析に向けてトリプトファン変異体を作製した。

(2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究

- ①高圧蛍光法による実験から、30℃、1気圧下で21.5時間のリン酸化/脱リン酸化周期長が、高圧力下で変化した。
- ②30℃におけるKaiCのATPの加水分解反応速度定数を求めた。
- ③KaiCとKaiAは、それぞれトリプトファンを有するため、高圧蛍光法により蛍光スペクトルの圧力依存性を確認した。

4. 研究の反省・考察

(1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究

- ① 同一種のFtsZにおいて、2種類のコンフォメーションが見られたのは初めてで、本研究で見いだした構造遷移を伴いながら、重合・解離サイクルが進行するという分子モデルを提案することができた。今後は、重合サイクルの進行過程を直接観察する手法を試験する必要があると考えている。
- ② 阻害剤は、①で述べたFtsZの機能に必要なT状態からR状態への構造遷移サイクルの進行を阻害する化合物であると予想された。実際、この阻害剤がFtsZのポリマー化を促進するという結果が得られている。これは、解離する構造であるR状態への構造変化を妨げることでFtsZの構造遷移サイクル進行を阻害するという今回の構造解析結果と一致している。また、GTPase活性測定では、阻害剤はFtsZのGTPase活性を上昇させるという結果が得られている。これより阻害剤がGTP結合状態に結合し、重合を促進していることが示唆されるが、この詳細を明らかにするためには、阻害剤存在下でのポリマー化速度を測定する必要があると考えられる。
- ③ 高圧結晶成長法による結晶化方法を確立して、さらにトリプトファン変異体の作製にも成功した。これらは全く初めての試みであったことから多くの課題に直面したが、頻繁に本

異分野グループ内での議論を行うことで解決できた。今後も、同様にグループ内での議論を繰り返し行うことによって、X線結晶構造解析およびNMR蛍光法による解析を行う必要があると考えている。

(2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究

① KaiCにおけるATP加水分解速度は他のタンパク質に比べて極めて遅く、30℃では1日あたり10-12分子程度である。活性部位において、加水分解に関わる水分子の位置がその分解速度の遅さと関係していることが示唆されている(寺内ら, PNAS2007)。KaiCリン酸化周期長及びATPase活性の圧力依存性から、圧力が構造や機能に及ぼす効果について考察した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Fujita J., Maeda Y., Mizohata E., Inoue T., Kaul M., Parhi A.K., LaVoie E.J., Pilch D.S., Matsumura H., Structural flexibility of an inhibitor overcomes drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ, *ACS Chem. Biol.*, in press (2017)
- ② Fujita J., Harada R., Maeda Y., Saito Y., Mizohata E., Inoue T., Shigeta Y., Matsumura H., Identification of the key interactions in structural transition pathway of FtsZ from *Staphylococcus aureus*, *J. Struct. Biol.*, 198, 65-73 (2017)
- ③ Kono T., Mehrotra S., Endo C., Kizu N., Matsuda M., Kimura H., Mizohata E., Inoue T., Hasunuma T., Yokota A., Matsumura H., Ashida H., A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea, *Nature Commun.*, 7(13007), 1-12 (2017).
- ④ Kawamura T., Wakamoto T., Kitazawa S., Sakuraba S., Kameda T., Kitahara R., Analysis of O₂-binding sites in proteins using gas-pressure NMR spectroscopy: outer surface protein A. *Biophysical Journal*, *Biophysical Journal*, 112, 1820-1827 (2017).
- ⑤ La Penna G., Mori Y., Kitahara R., Akasaka K., and Okamoto Y., Modeling 15N NMR chemical shift changes in protein backbone with pressure, *J. Chem. Phys.* 145, 085104 (2016).
- ⑥ Xue M., Kitahara R., Yoshimura Y., Mulder F.A.A., Aberrant increase of NMR signal in hydrogen exchange experiments. Observations and explanation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 478, 1185-1188 (2016)
- ⑦ Sato T., Kawasaki T., Mine S., Matsumura H., Functional role of the C-terminal amphipathic helix 8 of olfactory receptors and other G protein-coupled receptors, *Int. J. Mol. Sci.*, 17(11), 1930 (2016).
- ⑧ Tominaga Y., Maruyama M., Yoshimura M., Koizumi H., Tachibana M., Sugiyama S., Adachi H., Tsukamoto K., Matsumura H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Yoshikawa H.Y., Mori Y., Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation, *Nature Photonics*, 10, 723-726 (2016)
- ⑨ Maruyama M., Hayashi Y., Yoshikawa H.Y., Okada S., Koizumi H., Tachibana M., Sugiyama S., Adachi H., Matsumura H., Inoue T., Takano K., Murakami S., Yoshimura M., Mori Y., A crystallization technique for obtaining large protein crystals with increased mechanical stability using agarose gel combined with a stirring technique, *J. Crystal Growth*, 452 172-178 (2016)
- ⑩ Sugiyama S., Ishikawa S., Tomitori H., Niiyama M., Hirose M., Miyazaki Y., Higashi K., Murata M., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Kashiwagi K., Igarashi K., Matsumura H., Molecular mechanism underlying promiscuous polyamine recognition by spermidine acetyltransferase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 76, 87-97 (2016)
- ⑪ Oyama K., Azai C., Nakamura K., Tanaka S., Terauchi K., Conversion between two conformational states of KaiC is induced by ATP hydrolysis as a trigger for cyanobacterial circadian oscillation. , *Scientific Reports* 6, 32443; doi: 10.1038/srep32443 (2016)
- ⑫ Sugiyama M., Yagi H., Ishii K., Porcar L., Martel A., Oyama K., Noda M., Yunoki Y., Murakami R., Inoue R., Sato N., Oba Y., Terauchi K., Uchiyama S., and Kato K., Structural characterization of the circadian clock protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering. *Scientific Reports* 6, 35567; doi: 10.1038/srep35567 (2016)

(2) 口頭発表

- ① 寺内一姫 「試験管内の概日時計：発振子の正体を追って」北山陽子メモリアルシンポジウム-光合成生物の概日時計機構, 名古屋大学, 2017年3月11日
- ② 松村浩由 「MRSA細胞分裂必須タンパク質の構造遷移」、四私大合同生命科学シンポジウム, 兵庫県西宮市・関学会館, 2017年3月7日
- ③ 松村浩由 「MRSAの細胞分裂をターゲットにした阻害剤開発」, 東京生化学研究会成果報告会, 野村コンファレンスプラザ日本橋, 東京都中央区, 2017年3月3日
- ④ 松村浩由 「創薬に貢献するタンパク質結晶化技術」、メディカルジャパン, 大阪市住之江区・インテックス大阪, 2017年2月15日
- ⑤ 松村浩由 「タンパク質の離合集散が織りなす生命現象」、自然科学カフェの集い, 東京都中央区・銀座ルノアール貸会議室プラザ, 2017年2月18日
- ⑥ 松村浩由 「Structural transition pathway of the bacterial cell division protein」, 新学術領域研究「動的秩序と機能」第5回国際シンポジウム, 東京大学数理科学研究棟, 東京都目黒区, 2017年1月21日
- ⑦ 北原亮 「High-energy conformations of proteins are new targets for structural biology」, 第39回日本分子生物学会年会, 日本分子生物学会, パシフィコ横浜・横浜, 2016年12月1日
- ⑧ 北原亮 「High pressure NMR reveals a fluctuating ubiquitin structure」, 第42回内藤コンフェレンス、シャトレゼキングダムサッポロ、北海道、2016年10月5日、
- ⑨ 松村浩由 「離合集散する柔らかいタンパク質の構造機能解析光合成CO₂固定回路と細胞分裂」, X線の会, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪, 2016年9月24日
- ⑩ Kitahara R, Yoshimura Y, Xue M, Kamade T, Mulder FAA, O₂ binding sites in protein cavities detected by gas-pressure NMR spectroscopy, High Pressure Bioscience and Biotechnology, Toronto, Canada, 2016年7月25日
- ⑪ Kitazawa S, Wakamoto T, Ikeya T, Kameda T, Yagi-Utsumi M, Kato K, Roumestand C, Baxter NJ, Williamson MP, Kitahara R, NMR snapshots of a fluctuating ubiquitin structure, EUROMAR2016, Aarhus, Denmark, 2016年7月4日
- ⑫ 松村浩由 「細胞分裂の階層構造ダイナミクスの解明」, 平成28年度「動的秩序と機能」全体班会議, 長浜ロイヤルホテル, 滋賀県長浜市, 2016年6月12日
- ⑬ 寺内一姫 「生物時計再構成系の動的秩序探究」平成28年度「動的秩序と機能」全体班会議, 長浜ロイヤルホテル, 滋賀県長浜市, 2016年6月12日
- ⑭ Kitahara R, Solution structure of transiently populated excited states of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy, Protein NMR beyond, Osaka University, Osaka, 2016年6月3日

(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	神戸薬科大学・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	ミュータントオプシンの作成と結合実験
山 野 由 美 子	神戸薬科大学・薬学部	准 教 授	発色団の合成・構造解析
沖 津 貴 志	神戸薬科大学・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ミュレーションを行い、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新規ChRの吸収曲線のブロードバンド化の原因がシクロヘキセン環内あるいは側鎖二重結合のどちらの影響が大きいのかを特定するため、レチナール側鎖に二重結合を1個導入した化合物を合成する。
 - ②レチナールおよび3,4-デヒドロレチナールの共役系を更に延長するため、側鎖部分に二重結合を2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ミュ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 β -ヨノンを出発原料として、側鎖の延長と官能基変換により合成を行った。すなわち、側鎖の延長には、C2ホスホネートあるいはC5ホスホネートとのHorner-Emmons反応により炭素数を増加し、官能基変換は、エステル還元と酸化によりアルデヒドへと変換した。ホスホネートの組み合わせを変えることにより、8位、12位および14位の後にそれぞれ二重結合を導入したアナログ3種を合成した。これらの化合物は、A1アルデヒドより二重結合が1個伸びたものであり、UV吸収スペクトルにおいていずれも吸収極大波長は約30nm長波長していた。
 - ② これまでに合成したA2アルデヒドの側鎖に二重結合を1個導入した発色団から創製した新規ChRでの吸収曲線のブロードバンド化において、12位および14位に二重結合を導入したアナログでより大きな効果が見られたことから、二重結合を2個導入する位置として12位および14位を選択し、A1アルデヒドの場合には β -ヨノンを原料とし、A2アルデヒドの場合にはアクチノールを原料として、C2ホスホネートあるいはC5ホスホネート

とのHorner-Emmons反応の組み合わせと官能基変換により合成した。

- ③シクロヘキセン環を芳香環状に代えたアナログ化合物として、p-ジメチルアミノベンゼン環、p-メトキシベンゼン環を持つ化合物を合成した。

(2) オプシンの作成ならびに発色団との結合

- ①前年度に合成したA1アルデヒドの4位から二重結合を2個延長した化合物(I)およびA2アルデヒドの3位から二重結合を1個延長した化合物(II)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。
- ②2種の新規ChRの吸収極大は、天然のChRの吸収極大 ($\lambda_{\max}$) に比べてIで 7 nm IIで 12 nm 長波長シフトしていた。また、これまでのアナログから得られた新規ChRの場合と同様、吸収曲線にブロードバンド化が認められ、 $1/2 \lambda_{\max}$ の吸収波長を比較するとIで 40 nm、IIで 50 nmと大きく長波長シフトしていることが判明した。IとIIは、二重結合の数が同じことから、より長波長シフトする発色団を設計する場合には、A2アルデヒドに 3位から二重結合を延長する方がより効果的なことが判明した。
- ③また、生成した新規ChRについて、光反応を検討したが活性化は起こらず、応答しないことが明らかになった。

(3) コンピューターを用いたドッキングシミュレーション

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種類の時と同様に、A1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種類についてC1C2-ChRのオプシンを用いてドッキングシミュ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。また、(2)で記載のChRについてもドッキングシミュレーションを行っているところである。また、それぞれの最安定コンホメーションにおけるE値と、吸収曲線の吸収極大値やブロードバンド化への影響についても解析する予定である。

4. 研究の反省・考察

- (1) A1アルデヒドのシクロヘキセン環を複素環に変えて発色団と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ミュ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方法として、レチナールを基盤として二重結合を延長するだけでは、大きな長波長シフトが望めず、限界があるように推察されるので、新しい発想に基づくアナログ化合物を設計すると共に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) 新たな発色団とオプシンから生成した新規ChRについて光反応を検討し、チャンネルロドプシンとしての機能があるか確認する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Okitsu, T.; Ogasahara, M.; Wada, A.
Convergent Synthesis of Dronedarone, an Antiarrhythmic Agent
Chem. Pharm. Bull. **2016**, *64*(8), 1149–1153.

- ② Luk, H. L.; Bhattacharyya, N.; Montisci, F.; Morrow, J. M.; Melaccio, F.; Wada, A.; Sheves, M.; Fanelli, F.; Chang, B. S. W.; Olivucci, M.
Modulation of thermal noise and spectral sensitivity in Lake Baikal cottoid fish rhodopsins
Sci. Rep. **2016**, *6*, 38425.
- ③ Sato, K.; Yamashita, T.; Haruki, Y.; Ohuchi, H.; Kinoshita, M.; Shichida, Y.
Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain.
PLoS One **2016**, *11*(5) e0155339.
- ④ Kato, M.; Sugiyama, T.; Sakai, K.; Yamashita, T.; Fujita, H.; Sato, K.; Tomonari, S.; Shichida, Y.; Ohuchi, H.
Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain.
PLoS One **2016**, *11*(11) e0163925.
- ⑤ Yue, W. W.; Frederiksen, R.; Ren, X.; Luo, D. G.; Yamashita, T.; Shichida, Y.; Cornwall, M. C.; Yau, K. W.
Spontaneous activation of visual pigments in relation to openness/closedness of chromophore-binding pocket.
Elife **2017**, *6*, e18492.
- ⑥ Shigeta, A.; Ito, S.; Inoue, K.; Okitsu, T.; Wada, A.; Kandori, H.; Kawamura, I.
Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Structural Study of the Retinal-Binding Pocket in Sodium Ion Pump Rhodopsin
Biochemistry **2017**, *56*(4), 543-550.
- ⑦ Kimura, K.; Hirota, Y.; Kuwahara, S.; Takeuchi, A.; Tode, C.; Wada, A.; Osakabe, N.; Suhara, Y.
Synthesis of Novel Synthetic Vitamin K Analogues Prepared by Introduction of a Heteroatom and a Phenyl Group That Induce Highly Selective Neuronal Differentiation of Neuronal Progenitor Cells
J. Med. Chem. **2017**, *60*(6), 2591-2596.
- ⑧ Yamano, Y.; Nishiyama, Y.; Aoki, A.; Maoka, T.; Wada, A.
Total synthesis of lycopene-5,6-diol and γ -carotene-5',6'-diol stereoisomers and their HPLC separation
Tetrahedron **2017**, *73*(15), 2043-2052.
- ⑨ Okitsu, T.; Matsuyama, T.; Yamashita, T.; Ishizuka, T.; Yawo, H.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.; Wada, A.
Alternative Formation of Red-Shifted Channelrhodopsins: Noncovalent Incorporation with Retinal-Based Enamine-Type Schiff Bases and Mutated Channelopsin
Chem. Pharm. Bull. **2017**, *65*(4), 356-358.

(2) 口頭発表

- ① 神崎 さくら子、石井 菜紬子、沖津 貴志、和田 昭盛
共役したクロメン環を有するレチナールアナログの合成研究
日本ビタミン学会第68回大会 (2016. 06. 18 富山)
- ② 山野 由美子、諏訪脇 幸歩、菅原 史仁、和田 昭盛
Siphonaxanthinの合成研究
第30回カロテノイド研究談話会 (2016. 06. 25 沖縄)
- ③ 眞岡 孝至、西野 梓、安井 裕之、山野 由美子、和田 昭盛
貝類やホヤ類はなぜfucoxanthinをmytiloxanthinに変換するのか抗酸化活性からの考察
第30回カロテノイド研究談話会 (2016. 06. 25 沖縄)
- ④ 細川 雅史、小林 乗時、小林 次郎、三上 浩司、宮下 和夫、山野 由美子、和田 昭盛
紅藻スサビノリのカロテノイド生合成経路の解析

- 第30回カロテノイド研究談話会 (2016. 06. 25 沖縄)
- ⑤ 沖津 貴志、池田 裕明、安田 峻佑、和田 昭盛
1,2-ジアゼチジン類と芳香族化合物のFriedel-Crafts型反応
第36回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」 (2016. 08. 09 京都)
- ⑥ 沖津 貴志、吉田 裕司、小林 恵子、松井 佑記、大西 莉加、安田 峻佑、和田 昭盛
ドナー-アクセプター置換1,2-ジアゼチジンの求核的開環反応
第46回複素環化学討論会 (2016. 09. 27 金沢)
- ⑦ 和田 昭盛、山野 由美子、沖津 貴志、山下 高廣、今本 泰、七田 芳則
レチナール環構造に共役系を導入したアナログの合成とタンパク質オプシンの相互作用
日本レチノイド研究会第27回学術集会 (2016. 10. 21町田)
- ⑧ 山野 由美子、諏訪脇 幸歩、菅原 史仁、和田 昭盛
Siphonaxanthinの合成研究
第42回反応と合成の進歩シンポジウム (2016. 11. 07 静岡)
- ⑨ Shichida, Y.
Molecular properties of opsins belonging to one of the subgroups of Opn5.
17th International Conference on Retinal Proteins (2016. 10. 5 Potsdam, Germany)
- ⑩ Kojima, K.; Yanagawa, M.; Matsutani, Y.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Yamano, Y.; Wada, A.; Shichida, Y.
Comparative analysis of thermal activation rate in vertebrate cone visual pigments
日本動物学会第87回大会 (2016. 11. 17. 沖縄)
- ⑪ Matsutani, Y.; Kojima, K.; Yanagawa, M.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Hisatomi, O.; Yamano, Y.; Wada, A.; Shichida, Y.
Optimization mechanism of vertebrate visual pigments for photic environment
日本動物学会第87回大会 (2016. 11. 17. 沖縄)
- ⑫ 七田芳則
生体光操作技術の進展
第54回日本生物物理学会年会シンポジウム (2016. 11. 26 つくば)
- ⑬ Kojima, K.; Matsutani, Y.; Yanagawa, M.; Yamashita, T.; Imamoto, Y.; Hisatomi, O.; Yamano, Y.; Wada, A.; Shichida, Y.
Thermal activation rates of visual pigments expressed in rods.
第54回日本生物物理学会年会 (2016. 11. 26 つくば)

(3) 出版物

なし

学 校 名	埼 玉 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	π 共役系分子集合体の光配向制御		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	① 液晶 ② 光配向 ③ 色素			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
木 下 基	工 学 部	准 教 授	研究総括・材料・物性評価・デバイス作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 崎 政 和	工 学 部	教 授	材料設計・調製

π 共役系分子集合体の光配向制御

1. 研究の目的

近年、携帯電話やパソコンなどの情報端末の普及や公衆無線LANやFTTHなどの高速通信環境の充足が進むにつれて、手軽に情報のやりとりができるユビキタスな環境が整備されてきた。今後のユビキタスネット社会の持続的発展において、特にIoT化が加速しており、それらの基盤要素である光通信技術や安価なデバイスと材料に対する需要は日々増大している。

電場、磁場および光電場などの外場により分子配向を制御可能な π 共役系液晶は、フォトンクス材料としてのみならず電荷輸送性に優れるエレクトロニクス材料として魅力的であり、IoT化に貢献する材料として期待されている。これまでに液晶中にフォトクロミック分子を分散あるいは液晶分子自体に光応答性を付与し、それらの光化学反応を利用した液晶の光配向制御に関する研究が多数行われ、液晶を利用した高速光-光制御が可能であることが示されている。しかしながら、これらの系を用いた光制御は分子構造の変化、つまり光化学プロセスを駆動力とするために必然的に系に乱れが生じ、微小領域において精密な配向制御を行うことは困難である。このため光化学プロセスを利用しない光配向制御法が望まれている。

光化学プロセスに換わる配向手法として光カー効果などの非線形光学効果を利用した例があるが、配向応答性は小さく、液晶の配向制御の手法としては適切でない。近年、少量の π 共役系色素アントラキノン誘導体を液晶にドーピングし色素を光励起することで、液晶の配向応答性を飛躍的に増大できる新しい配向手法が見出されている。その後、液晶性を示すチオフェン誘導体を用いることによって、アントラキノン誘導体より液晶が高い配向応答性を示すことが報告され、最近では、光配向を利用した新しい光学素子として展開されている。

π 共役系色素を用いた液晶の光配向挙動は、励起色素分子と液晶分子の特異的な相互作用に基づくと推測されているが、明確な分子構造や詳細なメカニズムは未解明である。特に、これらの色素を用いた場合、照射光強度が高くなると色素からの熱の発生が顕著になる。このため、光熱効果により系の配向が乱れて配向安定性に欠けるため、優れた系の探索が重要な課題となっている。そこで、光で分子配向制御可能な π 共役系システムの構築を目指して、液晶分子の配向を安定に誘起できる色素を用いた液晶の光応答挙動について検討した。

2. 研究の計画

光で分子配向制御可能な π 共役系システムの構築のためには、優れた光配向性の色素の探索が鍵となる。また、色素からの熱の発生を抑制のための、色素の検討として、光の吸収により生成する励起状態からの熱失活の低減を考えて、蛍光性に優れる色素の検討を行うこととした。

(1) 蛍光性色素を用いた液晶の光応答挙動

有機EL素子用の発光性色素やレーザー色素として実績のある光や電気化学的に優れた安定性を示す市販材料を用い、液晶中における光応答挙動について、ポンププローブ法により評価した。

(2) 類似構造有する色素の光配向挙動の比較

(1)において光配向性を示した分子構造に着目し、それらと類似構造を有する色素を用いて、光応答挙動の違いについて詳細に比較・検討した。

3. 研究の成果

(1) 蛍光性色素を用いた液晶の光応答挙動

色素としてCoumarin 6をドーピングしたサンプルを用いた場合、閾値以上のポンプ光を照射するとサンプルを透過した光は、スクリーン上に干渉縞を形成した。これは液晶を透過した光が自己位相変調効果に基づき位相差を生じるためである。また、プローブ光を同時に入射したところ、ポンプ光の照射偏波面が平行方向の時だけ干渉縞が現れ、垂直方向の時には見られないこ

とから、液晶の配向方向は照射偏波面と平行方向であることがわかった。それゆえCoumarin 6が、従来の液晶性チオフェンと同様な配向挙動で、光配向することが明らかとなった。さらに、Coumarin 6を含むサンプルを用いて、干渉縞の光強度依存性を観察したところ、液晶性チオフェンを用いた場合と比較して、高光強度照射時においても安定に干渉縞を形成することがわかった。これは光照射にともなう色素からの熱の発生が、蛍光性に優れる色素を用いることにより低減化できたためと考えている。また、その他の色素を用いたサンプルについても光照射を行ったところ、Coumarin 7やCoumarin 30が、Coumarin 6と同様に液晶の光配向変化を誘起できるが、DCM、Nile Red、Rhodamine B、Coumarin 153やCoumarin 337においては、液晶の配向変化を誘起できないことがわかった。

(2) 類似構造有する色素の光配向挙動の比較

(1)において、ベンゾチアゾール骨格を有するCoumarin 6が優れた光配光特性を示すことが明らかとなった結果を受け、Coumarin 6のジエチルアミノフェニル骨格がジュロリジル骨格に変わったCoumarin 545およびCoumarin 545Tを用い、液晶の光応答挙動について比較・検討した。ある一定の光強度以上のレーザー光をサンプルに照射すると、いずれのサンプルにおいても透過光に干渉縞が観測されることから、Coumarin 545およびCoumarin 545TもCoumarin 6と同様な挙動で液晶を光配向できることが明らかになった。さらに、光を照射し続けると、Coumarin 6とは異なって、Coumarin 545およびCoumarin 545Tを用いたサンプルは、透過光による干渉縞が見られなくなり、初期配向へ緩和することがわかった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 光配向性色素における分子構造の特徴としては、比較的分子長の長いCoumarin誘導体が光配向しやすいことが推察される。さらに、光配向性色素の共通性を見出すために、すべてのサンプルの偏光吸収スペクトルを測定したところ、光配向性色素は、液晶の配向方向と平行方向に吸光度が大きく、垂直方向に吸光度が小さくなる吸収異方性があることが明確になった。また、孤立系の色素の分子軌道計算の結果から、双極子の向きや大きさには共通性がないが、基底状態のHOMOおよびLUMOの電子雲の変化に若干の共通性が見られることがわかった。具体的に、光配向性色素においては、HOMOにおける電子雲は色素全体に分布し、LUMOにおける電子雲は色素の中心部分に偏在していることが明らかとなった。従来、基底状態と励起状態の色素の電子状態の差が多いいほど光配向に有利と考えられていたが、電子状態の変化の様式に分布が寄与するのではないかという新たな知見が得られた。
- (2) 類似構造有する色素の光配向挙動の比較の結果から、分子構造の平面性が光配向挙動に影響を与えることが示唆される。液晶中の色素の吸収スペクトルは、孤立系の色素と類似した形状であったが、蛍光スペクトルの形状は分子構造により差異がみられた。Coumarin 6は、孤立系とほぼ変わらなかったが、Coumarin 545およびCoumarin 545Tにおいては、孤立系の蛍光スペクトルに加えて新たなスペクトルが重なって観測された。これは励起状態のみに観測されることから、光照射に伴う励起色素とホスト液晶による励起錯体エキシプレックスの形成によるものと考えた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① M. Kinoshita, M. Furukawa, S. Oka, Y. Aoki, A. Shishido, “Photoresponsive Behavior of Orange and Red-Fluorescent Dyes in Nematic Liquid Crystals”, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **29**, 293-294 (2016).

(2) 口頭発表

- ① 木下 基、古川 元行「ニッケル錯体を含む液晶の光応答挙動」2016年色材研究発表会 14B02、大阪(大阪大学)、14B02、2016年10月14日。

②浅見秀和、岩崎政和「Grignard 試薬を用いたオキソシクロブテニルPd(Ⅱ)錯体の反応性に関する研究～ 新規シクロブテノール合成への展開 ～」第14回若手研究フォーラム 深谷(埼玉工業大学)A01、2016年7月16日。

③宮下聖樹、浅見秀和、岩崎政和「Pd錯体触媒を用いたプロパルギルクロリドと末端アルキンとのカルボニル化カップリング反応によるシクロブテノン類の合成に関する研究」、第14回若手研究フォーラム 深谷(埼玉工業大学)A02、2016年7月16日。

(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	地域継続居住を支えるCCRCにおける建築的特性と 居住者の生活 － 都心団地等改修型と地方集落新築型の比較 －		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①日本版CCRC ②地域性 ③コミュニティ ④既存建物の改修利用 ⑤事業モデル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 田 あ す か	未 来 科 学 部	准 教 授	研究代表者 総括 建築計画, 福祉住環境・介護サービス視点からの 研究・調査・分析デザイン, 同実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
土 田 寛	未 来 科 学 部	教 授	都市計画視点からの研究・調査・分析デザイン, 同実施
横 手 義 洋	未 来 科 学 部	准 教 授	建築史, 住環境史視点からの研究・調査・分析デ ザイン, 同実施
古 賀 誉 章	宇都宮大学大学院工学研究科	准 教 授	建築設計, 環境心理生理視点からの研究・調査・ 分析デザイン, 同実施

地域継続居住を支えるCCRCにおける建築的特性と居住者の生活 — 都心団地等改修型と地方集落新築型の比較 —

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

我が国は人口減少を伴う超高齢社会を迎え、過密地域では介護者・介護支援の不足、過疎地域では人口減少による生活必需施設の維持の困難さが想定されている。このようななか、過密地域（都心部）から過疎地域（地方都市とその辺縁部）への移住や住み替えを含む、人口移転・介護ニーズの移転構想が国策として進められている。このひとつとして、高齢期の安定的で充実した生活と、自助・共助・互助を基軸に公助によって必要な介護・看護サービスを提供する、日本版 CCRC（Continuing Care Retirement Community：継続的な介護を受けられる退職者のコミュニティ、後に「生涯活躍のまち」と構想名称を変更）が構想されている。この日本版 CCRC は、高齢者のためのケア付きの住宅である有料老人ホームやサービス付き高齢者住宅に、食堂や購買施設などの生活基盤施設、デイサービスや小規模多機能などの介護拠点を併せもち、居住者に安全安心な住まいを提供すると同時に、周辺地域に対しても雇用や介護の拠点として機能することが期待されている。

(2) 研究の目的と研究の枠組み

日本版CCRC構想の推進にあたっては、地域特性に応じたその成立の様態がまだ十分に検証されておらず、先駆的事例での入居者らの生活の様子や、運営の様子の実態が丁寧に整理される必要がある。本研究では、日本版CCRC構想のモデルの一つである「地方都市での集落新築型」事例Nと、これと対照的でCCRCの概念の拡張モデルとなりうる「都心部での既存集合住宅改修型」事例Tを調査対象とする。こうしたモデルによる整理と事象の把握は、今後“地方都市と都心部”“新築と改修”“戸建て集落型と中高層集合住宅型”という多様なCCRCモデルを模索していく上での土台となると考える。本研究ではこの2つのモデルでの建築的特徴と、入居者の生活様態、コミュニティ運営の手法を整理し、建築の改修・転用利用による利点や課題点、地域連携やコミュニティ内での互助共助を含めた都市的レベルでの検討を行い、今後のCCRC構想推進のための基礎的知見とする。

2. 研究の計画

(1) 「地方都市での集落新築型」事例N

事例Nは、北関東の地方都市に立地し、新幹線駅から自動車で20分程度の山間部に新規開発された有料老人ホームを核とするケア付きコミュニティである。コミュニティ内に移動販売等も来るが、最も近い商店への移動には車が必要で、入居者らは自家用車か乗り合いのタクシーやバスを利用している。地方都市・新築型であるため、多数が県外からの移住者でありコミュニティ居住者同士の関わりは、園芸や音楽、調理教室などの趣味活動、居住環境保全活動を通じて培われている。

(2) 「都心部での既存集合住宅改修型」事例T

事例Tは、東京都23区内・城北エリアに位置し、地下鉄の最寄り駅から徒歩10分強、公共交通網としてバスも利用できるアクセシビリティの高い事例である。既存団地の一角にある高層集合住宅1棟のうち、空室が出ると順次改修して、居室が分散したサービス付き高齢者として運営している。徒歩5分ほどの団地内にスーパーや医療施設など生活関連施設があり、生活利便性が高い。

(3) 調査概要

- ① **参与型観察調査（事例N）**：事例内に調査・研究拠点を設け、調査員が長期滞在し、入居者らのコミュニティになじむなかで、イベントや日常的な作業・活動などを通じたコミュニティ形成や入居者らの生活や共助の様子を把握する。
- ② **入居者に対するアンケート・ヒアリング調査**：入居者からの聞き取りによって、入居の経緯や入居の決定要因、生活の様子（地域への生活の広がりや、日々の過ごし方、人間関係の様子）、介護が必要になった場合の生活ニーズ等について把握する。
- ③ **運営者に対するヒアリング調査**：コミュニティの運営者や生活支援事業等運営者からの聞

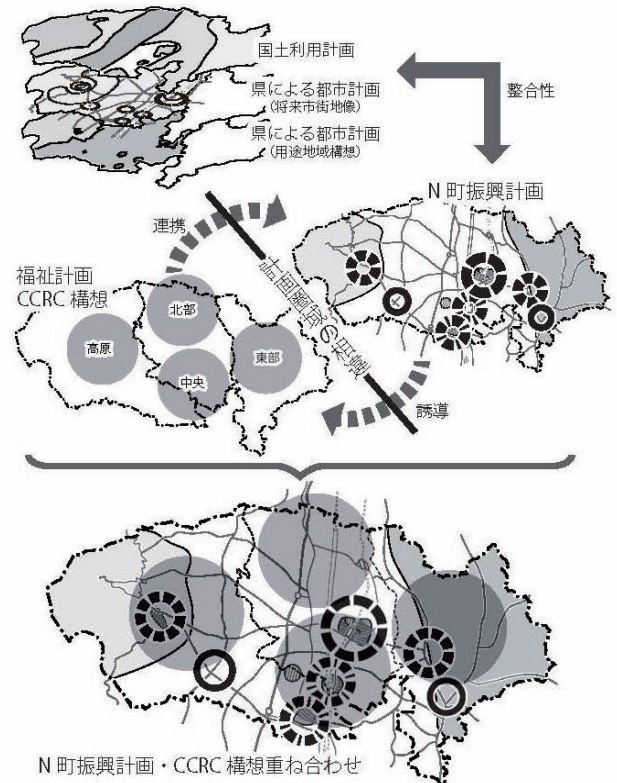
き取りによって、各種支援の利用の状況や必要な支援の状況、必要な支援の把握方法、コミュニティ周辺の事業との連携の実態、事業運営モデルなどの情報を収集し、整理する。

- ④ 文献調査：T団地の住棟配置、対コミュニティ機能の変遷などの文献を調査し、まとめる。

3. 研究の成果

(1) N町を題材とした、日本版CCRC構想の推進に必要な都市側の基盤形成に関する考察

- ① CCRC構想は、現代的な課題に対応しながら、地域という空間的な概念を導入することで、雇用の創出、都市機能の再生・維持を伴う高齢者福祉を契機とした持続的な地域社会を形づくる取り組みである。一方で、都市・地域の一般的な状況として、少子・高齢化、自治体の財政問題などは深刻化しており、各種の都市地方再生の試みの多くでは有効な手立てが見いだせていない。そのような中で、高齢者福祉施設を契機とした地域再生の取り組みとしてCCRC構想が新たに都市内に地域もしくは拠点を形成し、持続的都市の活力の源になる可能性として期待は大きい。このとき、CCRC構想によって自立的な地域もしくは拠点が形成されるうえで、各地域の上位にある都市自体（全体）の各種計画等による将来像との整合がとれている必要があると考えられる。そこで本稿では、CCRC構想のモデルの一つと位置づけられる、事例N（N町）を事例として、その成立のプロセスから、都市の将来像と事例NにおけるCCRC構想との相互の関係を分析し、関係構築の実態と高齢者の持続的な居住を可能とする地域形成に関連した課題を抽出することを目的とする。
- ② 第一に、当該事例が立地する自治体において、概況とこれからのまちとCCRCの将来像を規定する各種計画等を文献調査ならびに当該自治体のヒアリングを通じて把握し、CCRCの形成への影響を考察する。第二に、サービス付き高齢者住宅について事業者に対するヒアリングを通じて、周辺地域との関係や自治体へのニーズを把握し、CCRCの実現と発展のために必要な事柄等について、考察を加える。第三に、両者の関連性を分析して課題等を抽出する。
- ③ 本事例においては、ひとつの民間事業としてCCRC 構想と関連した事業（地方移住を想定した高齢者向け複合施設の建設・運営）がなされている。国土利用計画は振興計画を受けての計画であるため、直接的な誘導方策は有していないと考えられるが、町のなかでの人々の生活支援のベースとなる、町の振興計画はじめ各種計画の拠点形成指針が、CCRC構想の標榜する拠点形成と十分に連携ができていない、あるいはコントロールの様相を呈していない可能性は否めない。これは、移住から定住、さらにはその後の高齢者の持続的な居住を可能とする地域形成に関連して、各種計画やCCRC構想に必要とされる総合性に関する課題を提示している。



(2) 事例Nでの観察調査・ヒアリング調査に基づく生活ニーズの把握

- ① 事例Nは周辺が県境に位置する過疎地域で、こうした地域の場合には移住促進によって提供できる近隣周辺地域でもサービス利用者が少なく、事例内のデイサービスの外部利用者も少ない。つまり、介護ニーズも過疎であるため元々の住民にとっては地域継続居住への効果が薄い。また、過疎地域に立地するため移動手段の確保が大きな問題となっていた。また、現状では事例Nが開設されたことでの地域の交通ネットワークの維持または形成などの効果は生じていない。
- ② 事例Nに移住した居住者からの移住理由の聞き取りによれば、自然環境の豊かさは移住の決め手

ロントを地域に開放しやすく、また居住者が利用の頻度や距離感を自身の考えでコントロールでき、外出機会を提供する契機ともなっている。さらに、行き来の際に団地内の移動が生じ、居住者の日々の生活において地域に溶け込んだ福祉の提供が自然に行いやすい。一方、[改修型]の分散型であることで改修工事における周りの住宅への配慮の必要性、水回りの配管取り回しなど設備計画や断面・平面計画の自由度の制限、などの困難が指摘された。

- ② 入居者からの聞き取りをもとに、入居理由ならびに現在の評価の要因となる事例Tの特長を[改修型][分散型][都心型][その他]の4つに整理した。入居者らは、このうち複数の特徴を評価しており、分散型サービス付き高齢者住宅という特徴と、T団地という立地の特性が合った運営と生活の実態が把握できた。

(5) 秀例調査による事例の整理・データベース作成

- ① 現在は、複数の政策誘導や取組など、複数のCCRC類似事業がある。そこで、日本版CCRCのモデル事業、スマートウェルネス事業、生涯活躍のまち事業に認定された取組みや、それ以外の独自の取組みなど、全国の優れた事例を視察し、関係者等に聴き取り調査を行った。
- ② 高齢化率や居住地の密度、交通状況、地域の介護・看護資源など地域の実状に応じた、継続居住の取組がなされている。継続居住支援の拠点となるのは小規模多機能など通所系施設、グループホームや有料老人ホーム、サービス付き高齢者住宅などの住宅系施設、特別養護老人ホームなど入居系施設、と多岐にわたる。それぞれの地域で長年高齢期の生活を支えていた施設や法人が、地域の高齢化の進展と地域包括ケアへの支援体制の移行とを背景として、それぞれの取組を展開しておりそれらが整理されていないのが実情である。
- ③ また、CCRCの観点からは特に、子育て世代・セミリタイア世代・前期高齢者と幅広い年代層の移住促進が、結果的に地域継続居住の維持に役立つ方策のひとつと考えられていることがわかった。地域にいま住んでいる高齢者の生活支援・地域継続居住支援の意味でも、生活の場の整備と就労の場の整備の観点からの移住の促進が重要であると考えられていた。

4. 研究の反省・考察

今回の調査時点では、事例Tではまだ介護が必要な入居者がいなかった。このため、今後介護や支援が必要になった場合やそうした場合への備えを入居者がより強く認識するフェーズに入ったときに生じる課題や必要な配慮の把握は課題として残った。経時的な調査研究によって、この形式での福祉拠点整備や住環境整備における、より有効な知見が得られると考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 小西千秋、山田あすか、土田寛：CCRC 構想を推進するために必要な都市側の基盤形成に関する考察 ―北関東に位置する N 町の高齢者施設と関連諸計画の考察を通じて、日本建築学会地域施設計画研究シンポジウム、Vol. 35, 掲載ページ未定, 2017. 07【掲載決定】
- ② 八角隆介、山田あすか、古賀誉章、横手義洋：団地改修・分散型サービス付き高齢者向け住宅の運営と利用者の生活実態についての事例的研究、日本建築学会地域施設計画研究シンポジウム、Vol. 34, pp. 103-108, 2017. 07

(2) 口頭発表

- ① 小西千秋、山田あすか、土田寛：CCRC 構想を推進するために必要な都市側の基盤形成に関する考察 ―北関東に位置する N 町の高齢者施設と関連諸計画の考察を通じて、日本建築学会地域施設計画研究シンポジウム、Vol. 35, 掲載ページ未定, 2017. 07. 21【発表決定】
- ② 高瀬敦、山田あすか、古賀誉章：過疎地域における福祉型複合コミュニティのあり方と施設運営に関する研究、日本建築学会学術講演大会、掲載ページ未定, 2017. 9. 1【発表決定】

(3) 出版物

・該当なし

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 理 学 部	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する。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) 間質・リンパ管を考慮したデバイスの作製

前年度に開発したデバイス作製法を発展させ、血管に加えて、生体内で腫瘍を取り巻く間質、およびナノ薬剤の腫瘍からの回収を担うリンパ管に相当する要素をデバイスに組み込むこととした。まず、前年度に開発した作製法では、流路を仕切る多孔膜を組み込むことができるものの、特殊な装置による基板の表面処理が必要であり、本法を世に広めるには不利と考えた。そこで表面処理をせず、重ね合わせた基板をベイクすることで同等の操作を実現した。

具体的にはまず、レーザー加工で作製したマイクロ流体デバイスの鋳型をシリコーンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン(PDMS)でかたどりしものち、別のシリコーンゴム基板と重ねベイクして貼り合わせた。基板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た。本実験では多孔膜で仕切られた3本の流路を有するデバイスを作製し、それぞれ血管部・間質部・リンパ管部とした。間質部には、間質を模擬する物質としてマトリゲルを、申請者らの既報(Anal. Biochem. 2014)に従い充填できた。一方、生体内で間質を構成するヒト皮膚線維芽細胞NHDFを流路に充填し、実際の生体組織により近い構造を作ることも検討した。

(2) 間質流存在下でのナノ粒子透過試験

蛍光標識ポリスチレンナノ粒子を血管部に、緩衝液をリンパ管部にそれぞれ導入し、ナノ薬剤透過試験を行った。シリンジポンプの高さを変えることで、生体内の血管から間質に向かう流れ(間質流)に相当する流れを起こし、透過性を調べた。間質流存在下で、リンパ管部に到達する粒子量が増加し、本研究の原理を実証できた。一方、間質部にとどまる粒子量は間質流存在下で減少し、間質部にとどまりやすいナノ薬剤の重要性を示唆する、極めて興味深い結果が得られた。

(3) 全血中でのナノ粒子透過試験

これまで用いてきた緩衝液に代わり、市販のヒト全血を用いた実験を行った。ヒト全血をリン酸緩衝生理食塩水で希釈しさらに蛍光標識ナノ粒子を一定量加え、これをマイクロ流路にシリンジポンプで送液して蛍光観察した。ヘマトクリット値(血液中に含まれる血球の体積分率)20%以下で蛍光輝度が一定となり、これらの条件では全血成分の影響を気にせずに蛍光観察できることが分かった。血管および間質に相当する要素を有するデバイスに試料を流し経時観察したところ、全血成分存在下においても間質部へのナノ粒子透過量は直線的に増加していくこと、および緩衝液を用いた場合と比べ透過量が増大していることを示唆する結果を得た。

4. 研究の反省・考察

(1) 間質・リンパ管を考慮したデバイスの作製

マイクロ流体デバイスの作製において、基板のベイクは極めて一般的な操作であり、これのみでデバイスを作製できたことの意味合いは大きい。今後、さらに高度なデバイスの開発を目指していく。間質部に線維芽細胞を組み込んだ実験では、数日間にわたる培養が達成できていない。培地交換の頻度を培養皿での実験よりも高くすることが必要だと考えられる。

(2) 間質流存在下でのナノ粒子透過試験

間質流の影響を評価するきっかけとなるデータを得られ、極めて有意義であった。ただし、シリンジポンプの高低差のみでは流量制御に精度さを欠く部分もあるため、今後さらに検討

を進めていく。

(3) 全血中でのナノ粒子透過試験

ナノ粒子の性質だけでなく、ナノ粒子が置かれている環境の影響も考慮する必要があることを示した、極めて興味深いデータが得られたと考えている。次年度、さらに検討を進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① “マイクロ血管モデルの構築と分析化学的応用”、佐々木直樹、佐藤香枝、分析化学、65(5)、241-247 (2016)。
- ② “A Membrane-Integrated Microfluidic Device to Study Permeation of Nanoparticles through Straight Micropores toward Rational Design of Nanomedicines”, N. Sasaki, M. Tatanou, T. Suzuki, Y. Anraku, A. Kishimura, K. Kataoka, K. Sato, Analytical Sciences, 32(12), 1307-1314 (2016)。

(2) 口頭発表

- ① “無細胞マイクロ微小循環モデルの開発”、臼井裕也、佐々木直樹、第76回分析化学討論会、岐阜薬科大学・岐阜大学、平成28年5月
- ② “Fabrication of an easy-to-observe membrane-integrated microfluidic device”, S. Watanabe, N. Sasaki, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2016), Dublin, IRELAND, 平成28年10月

(3) 出版物

「腫瘍への届きやすさ評価 東洋大、マイクロチップ開発」日経産業新聞、平成28年5月2日

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 ー新型鳥インフルエンザの選択的検出の研究ー		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
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28年度は次の2つの課題を実施した。

(1) グラフェンの成長を利用したデバイス化

自己組織化成長プロセスで、インフルエンザウイルスセンサーを作製すると共にその最適化を図る。特に、糖鎖のシアロ糖鎖プローブの構造多様化・分布制御を行う。糖鎖の幾何学的構造(長さ、枝分かれ、修飾基等)や、糖鎖の大域的分布構造等によりウイルスの反応様式が変化するので、多様な糖鎖プローブを調製し、糖鎖の構造とウイルスとの反応様式を調べることで、効果的にウイルスと反応するシアロ糖鎖プローブ・分布構造を開発する。さらに、ウイルスヘマグルチニン(HA)とシアロ糖鎖との分子相関の解析・反応形状評価を行う。分子反応機構解析では、各種反応時間、反応温度、pH、シアロ糖鎖の集積密度、シアロ糖鎖のグラフェン上での存在様式について検討して、HAとシアロ糖鎖との結合性・ウイルス動態を解析する。また、クライオ電子顕微鏡を用いて、糖鎖の幾何学的形状を観察する。同時に、糖脂質単分子膜や人工リボソーム脂質2重膜等の表面での反応と比較を行うことで、生物学的知見との対応を明らかにして高感度化を図る。

(2) 超高感度鳥インフルエンザセンサーによるウイルス調査

高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)がヒトへ伝播し、ウイルスのヒトへの適応性変異が起これつつある国(過去ヒトへの感染が最も多発しているアジア諸国、インドネシア、ベトナム等)の機関、大学、研究所との共同監視体制を構築する。この体制のもとに、新開発の自己組織化グラフェン素子の糖鎖修飾による超高感度センサーを用いて、ヒトへの感染力の強い、ヒト型受容体シアロ糖鎖結合性獲得変異株のフィールド監視調査を試みる。これにより、今回構築した世界初の革新的鳥ウイルスのヒトへの適応性変異獲得変異株を事前に発見する国際監視基盤と、新たなインフルエンザ世界流行を事前に阻止する体制基盤の確立を進める(WHO、日本国立感染症研究所とも連携する)。

3. 研究の成果

(1) グラフェンの成長を利用したデバイス化

平成27年度までに検討したナノカーボン材料の成長条件最適化を受けて、デバイスプロセスに関して検討を行った。まず、ゲート酸化膜の欠陥を避ける等のために、チャネル領域以外の配列制御していないナノカーボン層を除去する必要がある。酸素プラズマによるエッチングと転写法による除去を試みて、酸素プラズマエッチングで6桁程度ゲートリーク電流を減少させることが出来(図1)、転写法ではさらに1/3になった。その結果、p型のゲート電圧ドレイン電流特性が得られた。また、金属特性の素子では水素エッチングにより電気伝導率が向上した。その際、ノイズ特性は1/f型となるが、水素エッチングでノイズ強度が減少し(図2)、電極界面でのコンタクトの改善が出来たことが分かった。

糖鎖分子の最適化として、電気的検出では分子サイズが重要となるため、Sialylglycopeptide (SGP)と高分子であるシアロ糖鎖ポリマーを比較した。シアロ糖鎖ポリマーとHAタンパク質の反応に対する吸光度を評価することで、ヒト型受容体、鳥型受容体への結合性を評価した。一例として、図3にシアロ糖鎖ポリマーとヒト型、鳥型ウイルスの反応に対する吸光度を示す。図3で赤線はヒト型受容体、青線は鳥型受容体への結合性を示す。鳥型、ヒト型に応じて、反応性が高

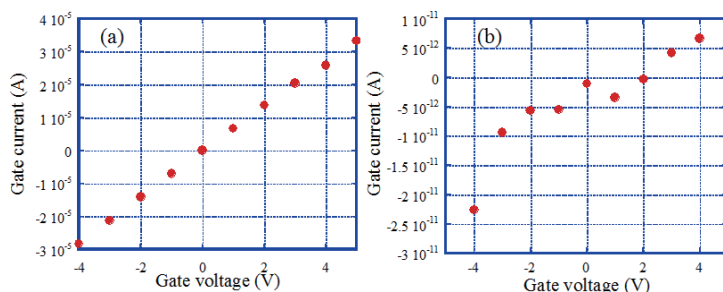


図1: O₂エッチング前後のゲートリーク特性。(a)前(b)後。

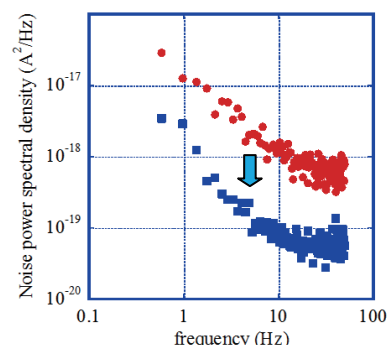


図2: H₂エッチングによるノイズ強度の減少。●:なし■:あり

い糖鎖の配位が異なることが分かった。SGPでも同様であるが、反応性にプレートごとのばらつきが見られた。これは、糖鎖の展開時に複数の吸着サイトが確率的に反応するためである。また、原子間力顕微鏡を用いて凝集等を検討すると共に、高さの検討を行い、デバイス化に関する検討を行った。

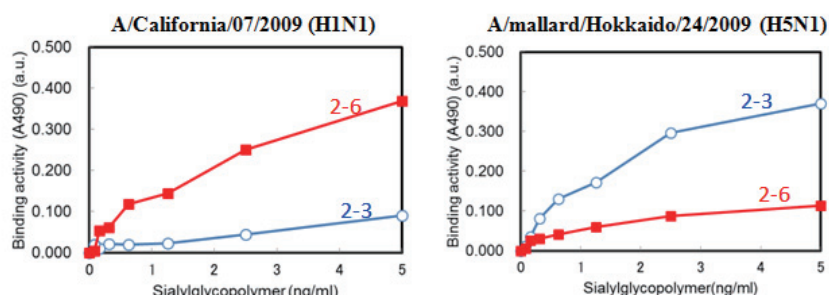


図3: ヒト型、鳥型ウイルスとシアロ糖鎖ポリマーの反応

(2) 超高感度鳥インフルエンザセンサーによるウイルス調査

平成27年度に検討したエジプトでの調査に引き続き、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(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。インドネシアで豚から分離されたH5N1型ウイルスで、2-3配位の糖鎖と2-6配位の糖鎖の両方に結合するウイルスが発見された。そして、鳥のインフルエンザウイルスからの変異が遺伝子解析により分かった。また、中国ではライブマーケットの鳥から分離されたH6N2型ウイルスの中に、2-6配位の糖鎖に結合性を示すウイルスが数多く(分離株中の34%)発見された。

以上、エジプトやインドネシア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複数見いだした。

4. 研究の反省・考察

(1) グラフェンの成長を利用したデバイス化

数層グラフェンに対する材料プロセス・デバイスプロセスの最適化は進んだが、十分な移動度が得られなかった。今後もナノカーボン材料の最適化を行い、高感度化を図りたい。また、赤血球凝集阻害活性の実験等から糖鎖の干渉を避けるスペースの重要性が明らかとなった。そのため糖鎖分子単独での構造最適化に加えて、分布制御が重要であると考えられる。今後、高分子鎖への糖鎖の修飾や脂質膜の制御による分布制御等、複数の制御方法を検討し、分布制御糖鎖プローブを使った超高感度検出システムの開発を行っていきたい。

(2) 超高感度鳥インフルエンザセンサーによるウイルス調査

エジプトに続き、インドネシアや中国でも2-6配位の糖鎖に結合を示すウイルスを見つけたが、タイなどその他の国でも後半に調査を行うことが出来ればよかった点が反省点である。今後、研究者間の交流をすすめて、さらなる調査、及び、既に調査を開始した国でも継続して調査を行い、鳥インフルエンザのヒト型レセプターへの結合性の変異を追いかけていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 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,” 総合工学, 28 (2016) 22-29.
- ② R. Papon, K. P. Sharma, R. D. Mahayavanshi, S. Sharma, R. Vishwakarma, M. S. Rosmi, T. Kawahara, J. Cline, G. Kalita, M. Tanemura, “CuNi binary alloy catalyst for growth of nitrogen-doped graphene by low pressure chemical vapor deposition,” Phys. Status Solidi Rapid Res. Lett., **10** (2016) 749-752.
- ③ 玉田敦子, “古代ギリシアのリベラルアーツ構想とその近代化,” Glocal, **9** (2016) 4-5.

- ④ **T. Kawahara**, Singh K. Rupesh, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, R. Utsunomiya, T. Matsuba, “Plasma process for the improvements of device characteristics for self-aligned nano-carbon FETs,” Proc. of 38th International Symposium on Dry Process, (2016) 51–52.
- ⑤ Y. Kodama, H. Hiramatsu, M. Honda, **Y. Suzuki**, Y. Ito, T. Kawasaki, **K. Uemura**, “Recognition of mumps virus by mannan-binding lectin,” Immunobiology, **221** (2016) 1150-1151.
- ⑥ **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, R. Utsunomiya, “Development of Nano-Carbon Biosensors Using Glycan for Host Range Detection of Influenza Virus,” Condens. Matter, **1** (2016) 7.
- ⑦ **A. Tamada**, “Le goût et la sensibilité pour le sublime,” Implications philosophiques, numéro special "Culture et sentiment" (2017).

(2) 口頭発表

- ① **玉田敦子**, “近代とリベラルアーツ — 8世紀フランス修辞学を中心に,” 中部大学国際人間学研究科第5回研究会, 中部大学 (2016年7月27日).
- ② **河原敏男**, 平松宏明, **鈴木康夫**, **中北慎一**, 渡邊洋平, 大野恭秀, 前橋兼三, 小野堯生, 金井康, 松本和彦, “インフルエンザバイオセンサー開発のための糖鎖分子の検討,” 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセ, 2016年9月13日～16日, 14p-P19-9, (2016年9月14日).
- ③ **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, R. Utsunomiya, “Developments of the nano-carbon bio sensors using glycan for influenza virus”, 13th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN2016), Rome, Italy, 2016年10月9日～15日, 127 (2016年10月14日).
- ④ **T. Kawahara**, Singh K. Rupesh, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, R. Utsunomiya, T. Matsuba, “Plasma process for the improvements of device characteristics for self-aligned nano-carbon FETs,” 38th International Symposium on Dry Process, 北海道大学, 2016年11月21日～11月22日, P-4 (2016年11月22日).
- ⑤ 児玉佳輝, 平松宏明, 本田昌士, **鈴木康夫**, 伊藤康彦, 川寄敏祐, **上村和秀**, “マンナン結合タンパク質によるムンプスウイルスの認識,” 糖鎖科学中部拠点「若手の力」フォーラム, 岐阜大学 応用生物科学部 (2016年11月26日).
- ⑥ 本田昌士, 橋詰祐希, 森本達也, 小野孝彦, 川寄敏祐, **上村和秀**, “IgA 腎症増悪機序におけるマンナン結合タンパク質の役割—HIGA マウスを用いた 解析—,” 糖鎖科学中部拠点「若手の力」フォーラム, 岐阜大学 応用生物科学部 (2016年11月26日).
- ⑦ **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, Y. Ohmi, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, “Comparison of Sugar Chains of Sialylglycopeptide and Sialyllactose for the Application of Influenza Bio Sensor,” 24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM24), HAWAII CONVENTION CENTER, 2016年12月14日～16日 (2016年12月14日).
- ⑧ 川田拓哉, 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, “ヒト感染性の即時鑑別のための糖鎖機能化グラフェンを用いたインフルエンザウイルスの検出,” 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜, 2017年3月14日～17日, 15a-B6-9 (2017年3月15日).
- ⑨ **A. Tamada**, “Enthousiasme, sublime, urbanite,” 名古屋大学高等研究院プロジェクト研究会, 一橋大学講堂 (2017年3月22日).

(3) 出版物

- ① **T. Kawahara**, H. Hiramatsu, **Y. Suzuki**, **S. Nakakita**, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, K. Okamoto, T. Matsuba, R. Utsunomiya, “Atomically Controlled Surfaces Interfaces and Nanostructures,” edited by A. Bianconi, A. Marcelli, Superstripes Press, Rome (2016) 総ページ数/340.
- ② 池内了, 安藤隆穂, **玉田敦子**, “中部高等学術研究所共同研究「人文学の再構築」第1回研究会報告書, Studies Forum Series,” 中部高等学術研究所, (2016) 総ページ数/27.

学 校 名	工 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ほ乳類キチナーゼの活性喪失とその活性化に関する研究 －酵素の活性化に関わる研究－		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①キチナーゼ, ② AMCase, ③ 酵素の不活性化, ④ 酵素の活性化			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 山 文 隆	先進工学部生命化学科	教 授	研究代表者, 統括, 組換えタンパク質のベクターの構築, 発現

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 口 政 吉	先進工学部生命化学科	准 教 授	組換えタンパク質の精製・酵素化学的解析

ほ乳類キチナーゼの活性喪失とその活性化に関する研究 — 酵素の活性化に関わる研究 —

1. 研究の目的

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine の重合体で、真菌類、甲殻類、昆虫の主な構成成分である。ヒトとマウスは内在性のキチンを持たないが、キチンを加水分解する二種類の酵素、キトトリオシダーゼ (Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase、AMCase)、を発現している。

AMCase は、喘息、アレルギーで発現が増加する。さらに、ヒト AMCase の一塩基多型 [non-synonymous SNPs (nsSNPs) がコード] によるアミノ酸置換は喘息に関係している。これらのことから、AMCase が喘息、アレルギー等の疾患の発症において重要な役割を果たしている。しかし、その病理学的機構は不明な点が多い。

ヒトとマウスの AMCase におけるアミノ酸配列の同一性は 86%、相同性は 90% で、両分子はよく似ている。大腸菌で、マウスとヒト AMCase を発現し、キチナーゼ活性を比較した。驚いたことに、ヒト AMCase のキチナーゼ活性はマウスの 1/75 で、活性が非常に低かった。これらの結果は、ヒト AMCase が、進化の過程で、機能を喪失(偽遺伝子化、Pseudogene 化)しかけている酵素である可能性を強く示唆した。

本研究では、ヒト AMCase の不活性化メカニズムを明らかにし、その活性化を試みた。以下の 2 項目を研究した。

- (1) ヒト AMCase の酵素活性喪失のメカニズムを、ヒトとマウスのキメラ体作製、AMCase の 1 塩基置換 (nsSNPs にコード) に基づくアミノ酸置換に注目して明らかにした。
- (2) ヒト AMCase (不活性型) の活性化、マウス AMCase (活性型) の不活性化を試みた。

2. 研究の計画

(1) ヒト AMCase の酵素活性喪失のメカニズム

① マウス-ヒト AMCase のキメラ体発現ベクターの構築と大腸菌での発現、精製

ヒトとマウス AMCase cDNA 断片を exon 単位で互いに繋いで、キメラ体を 6 種類作製した。作製した AMCase キメラ体 cDNA を発現ベクター pEZZ18 に導入し、大腸菌で発現した。

② AMCase キメラのキチナーゼ活性の解析

発現したキメラ体のキチナーゼ活性を合成基質 (4-methylumbelliferyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside) を使って測定し、キメラ体相互で比較した。高分子量キチン (コロイダルキチン) を各キメラ体が分解した際の分解産物の還元末端を蛍光標識し、電気泳動で分離し、比較した。

③ ヒト AMCase の不活性化に関する実験

ヒト AMCase のアミノ酸置換体 (Variant A、Variant B、Variant C、Variant C/B) の cDNA を調製した。これらは nsSNPs にコードされている。Variant A~Variant C はすでに論文で報告されている variants である。しかし、Variant C/B は、ヒトでは報告されていない (Variant C の N 末と Variant B の C 末領域をつないで創製した)。Variant C/B のアミノ酸置換は、マウス AMCase に最も対応している。作製した ヒト AMCase variant cDNAs を大腸菌発現ベクター pEZZ18 に組み込み、上述のように大腸菌で発現した。発現したヒト AMCase variants のキチナーゼ活性について、合成基質を用いて比較した。コロイダルキチンをヒト AMCase variants が分解した際の分解産物の比較を行った。

(2) ヒト AMCase (不活性型) の活性化、マウス AMCase (活性型) の不活性化

① ヒト AMCase の活性化に関する実験

前ページ図3 で示した各種組換え体について、nsSNPs にコードされたアミノ酸置換の位置と種類に注目し、不活性なヒト AMCase の活性化が起こるかどうか、検討する。活性化が起きた場合、どのような nsSNPs にコードされたアミノ酸かを明らかにする。

② マウス AMCase の不活性化に関する実験

マウス AMCase の N 末端領域に nsSNPs にコードされた 3 アミノ酸置換 (D45N、N47D、M61R) を導入し、マウス AMCase の不活性化を試みた。3 種類の nsSNPs にコードされたアミノ酸置換 (D45N、N47D、M61R) をマウス AMCase に導入し、3つの組み合わせのコンストラクト (NDM、DNR、NDR と名付けた) を作製した。作製したマウス AMCase Variant cDNAs を pEZZ18 に組み込み、上述のように大腸菌で発現した。発現したマウス AMCase variants のキチナーゼ活性を測定し、variants 間で比較した。

3. 研究の成果

(1) ヒト AMCase の酵素活性喪失のメカニズム

AMCase は、喘息とアレルギー性炎症、食物消化に関わっている。しかし、AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知見は、とても限られていた。組換えヒトAMCase のキチナーゼ活性をマウス AMCase と比較した時、ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウスに比べ、約 70 倍低下していた。このことから、本研究において、ヒト AMCase が活性を喪失していることを明らかにした。

次に、ヒトとマウスで AMCase のキメラタンパク質を作製することで、ヒト AMCase のキチナーゼ活性低下の原因がキチナーゼの活性中心を含む N 末領域に存在することを明らかにした。

ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、nsSNPs にコードされたアミノ酸置換によって変化した。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、N45、D47、R61 をマウス AMCase のアミノ酸配列において保存されている D45、N47、M61 に置換することによって著しく上昇させることができた。

(2) マウス AMCase の不活性化に関する実験

マウス AMCase のキチナーゼ活性は M61R 変異を導入することで顕著に減少させることができた。さらに、進化的解析から、AMCase の M61 は、ヒトやオランウータンを除いた他の霊長類やほ乳類で保存されたものであった。オランウータンの AMCase は 61I であり、これもマウス AMCase に置換した際にキチナーゼ活性を低下させた。これらのことから、M61 は、AMCase のキチナーゼ活性にとって重要なアミノ酸残基であることが示された。

4. 研究の反省・考察

平成 28 年度の計画は、ほぼ達成された。

本研究の結論として、ヒト AMCase キチナーゼ活性が nsSNPs によって制御され、高い活性を有したヒト AMCase variant のアミノ酸置換は、マウス AMCase のアミノ酸配列と一致することを明らかにした

本研究では、ヒト AMCase のキチナーゼ活性の喪失と活性化を調べてきた。ヒト AMCase のキチナーゼ活性の喪失は、この分子が進化の過程で機能を失い、偽遺伝子化しつつあることを示している。偽遺伝子化は、ゲノムレベルで起こる進化的現象で、環境の変化に対応するため、遺伝子にアミノ酸置換が入り、機能喪失に至ったと推定している。

本研究では、61 番目の Met が、機能獲得的ともいえる強いキチナーゼ活性に関係することを明らかにした。Seibold らの集団遺伝学的解析で、ヒト AMCase の nsSNPs である G339T (Arg61Met) は、喘息に対して保護的に働くと報告されている。本研究の成果と Seibold らの先行研究で、喘息の抑制には AMCase のキチナーゼ活性が深くかかわる可能性を強く示している。

本研究で、機能喪失したヒトのキチナーゼで置換しているアミノ酸を明確にし、活性が高い

ほ乳類キチナーゼで保存されているアミノ酸に置換することで、不活性酵素の再活性化に成功している。この概念は、最小限の遺伝子操作で、他の不活性化酵素の再活性化にも応用できる。さらに、活性化したヒト AMCase は、喘息、アレルギーなど、AMCase がかわる様々な疾患の治療法、補充療法の開発に用いることが出来る。

5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kimura, M., Kobayashi, Y., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Kamaya, M., Kino, Y., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2016) Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 3183–3193. Oxford University Press, December 14, 2016.
- ② Ohno, M., Kimura, M., Miyazaki, H., Okawa, K., Onuki, R., Nemoto, C., Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Nukina, N., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Sci. Rep.* **6**, 37756. Nature Publishing Group, November 24, 2016.
- ③ Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K., Sekine, K., Yoshikawa, S., Sato, A., Okawa, K., Kashimura, A., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Yamanaka, D., Ohno, N., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2016) Functional properties of mouse chitotriosidase expressed in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **11**, e0164367. Public Library of Science October 7, 2016.

(2)口頭発表

- ① 大川一明、大野美紗、樫村 昭徳、**坂口政吉**、菅原康里、**小山文隆**、ヒトとマウスの酸性哺乳類キチナーゼの機能解析と比較、第30回日本キチン・キトサン学会大会、ウエスタ川越、2016年8月19日
- ② **小山文隆**、大野美紗、木村将大、大川一明、田畑絵理、脇田悟誌、樫村昭徳、**坂口政吉**、菅原康里、マウス胃における酸性ほ乳類キチナーゼの発現と生産細胞の同定、第30回日本キチン・キトサン学会大会、ウエスタ川越、2016年8月19日
- ③ Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kobayashi, Y., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., **Oyama, F.**, Loss and recovery of chitinolytic activity by amino acid substitutions in human acidic mammalian chitinase, the American Society of Human Genetics (ASHG) 66th Annual Meeting (Vancouver), カナダ バンクーバー, 2016年10月21日
- ④ Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K., Sekine, K., Yoshikawa, S., Sato, A., Okawa, K., Kashimura, A., Yamanaka, D., Ohno, N., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., **Oyama, F.**, Protein A-mouse Chit1-V5-His expressed in *Escherichia coli* possesses chitinase functions comparable to CHO-expressed protein, the American Society of Human Genetics (ASHG) 66th Annual Meeting (Vancouver), カナダ バンクーバー, 2016年10月21日
- ⑤ **Oyama, F.**, Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kobayashi, Y., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Inactivation of mouse AMCase by introducing amino acid substitutions encoded by single-nucleotide polymorphisms in human AMCase gene, the American Society of Human Genetics (ASHG) 66th Annual Meeting (Vancouver), カナダ バンクーバー, 2016年10月19日

(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	生 命 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	生 命 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

脳機能に対するビタミンA及びB1、ミネラル (Mg) の役割を以下の方針で解析する。

(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等の発現プロファイルを解析し、栄養素が作用する細胞内情報伝達経路を同定し、栄養素の摂取不足と過剰摂取が及ぼす影響を明らかにする。

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次元的に解析し、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及びin vivoカルシウムイメージング手法を用いて、海馬ニューロンの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)

学習記憶課題、オープンフィールドテスト、不安行動解析課題、うつ様行動解析課題、社会行動・攻撃性評価課題、運動能力評価課題、概日リズム測定等により、栄養素の役割を評価する。

(2) 実験系の説明

① 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を成体期に前脳領域特異的に発現させたコンディショナル変異マウス(dnRARマウス、RARマウス)を作製している。これら変異型マウスを用いて、ビタミンA情報伝達経路のgain of function及びloss of functionの影響を解析する。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。

② ビタミンB1のマウス解析系の説明

ビタミンB1欠乏症であるウェルニッケ・コルサコフ症候群では、健忘や記憶力障害等の記憶能力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不明である。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、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てビタミンB1欠乏回復マウスを作製し、上記の解析を行う。

③ Mg欠乏のマウス解析系の説明

Mg欠乏により学習・記憶の障害が現れることが示唆されているものの、統合的な解析は行われていない。そこで、Mg欠乏食を4週間以上給餌したマウスを用いて、上記の解析を行う。

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 ビタミンAの標的となる記憶能力制御遺伝子の同定（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、RARマウスの海馬及び前脳領域を中心とした発現プロファイルの解析を継続した。得られた結果の中から、ムスカリン性アセチルコリンM4受容体に着目してその発現解析を行った。その結果、ムスカリン受容体の発現はマウス海馬においてビタミンA情報伝達経路により顕著な上方制御を受けることが明らかとなった。次にムスカリン性アセチルコリンM4受容体遺伝子プロモーター領域を取得し、*in silico*解析により、転写開始点5'上流にレチノイン酸応答領域に類似した配列を4箇所同定した。これらの類似配列を含むプロモーター領域のレチノイン酸 (*All trans-retinoic acid*; ATRA) に対する反応性をNIH-3T3細胞を用いて解析した結果、ATRAによってプロモーター活性が正に制御されることが示され、ムスカリン性アセチルコリンM4受容体遺伝子がビタミンAの標的遺伝子であることが強く示唆された。

② 行動レベルの解析

記憶形成に対するムスカリン性アセチルコリンM4受容体の役割を解析するために、このM4受容体のアゴニスト投与による記憶形成に対する効果を解析した。その結果、新規物体認識課題において、学習直後にM4アゴニストを投与した結果、アゴニスト未投与の野生型マウスは24時間後に既知と新規の物体の区別がつかなかったのに対して、アゴニストを投与されたマウスは新規の物体により興味を示し、顕著な記憶形成の向上が観察された。従って、ビタミンAがムスカリン性アセチルコリンM4受容体の発現制御を介して記憶能力を制御するメカニズムの存在が示唆された。

(2) 脳機能に対するビタミンB1の役割の解析

① 行動・細胞レベルの解析（行動バッテリー解析、ニューロン機能・性状解析のイメージング）

B1欠乏回復マウスでは、海馬依存性記憶形成能力の障害が観察され、記憶障害が不可逆であることを示し、このマウスはウェルニッケ・コルサコフ症候群モデルであることを示した。B1欠乏により海馬ニューロンの欠落とスパイン密度の減少、すなわち、海馬の変性が誘導されることを示した (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80:2425-2436, 2016. 2016年度 *BBB*論文賞受賞)。

② ビタミンB1欠乏によるウェルニッケ・コルサコフ症候群の症状改善の試み

転写因子cAMP-responsive element binding protein (CREB)は記憶形成を正に制御しており、さらに、ニューロンの生存に必要であることが示されている。一方、我々はCREB活性型変異体 (DIEDML) を前脳特異的に発現するDIEDMLマウスを作製し、このマウスは海馬依存性記憶形成能力の向上を示すことを明らかにした。そこで、CREB活性化がB1欠乏による海馬変性を妨げ、記憶障害を緩和するのではないかと考え、DIEDMLマウスにビタミンB1欠乏処置を施し、解析した。B1欠乏により、野生型マウスでは海馬成熟ニューロン数とスパイン密度の有意な減少が観察されたが、B1欠乏を誘導したDIEDMLマウスでは、これら海馬の変性は観察されなかった。さらに、B1欠乏を誘導したDIEDMLマウスでは海馬依存性記憶能力の低下は観察されなかった。従って、CREB活性化により海馬変性が妨げられ、B1欠乏による海馬依存性記憶障害が改善されることが示され、CREB活性化がB1欠乏誘導性記憶障害を妨げる有用な手段であることが示唆された。

(3) 脳機能に対するMgの役割の行動学的解析と海馬形態学的解析

Mg欠乏食を5週間以上給餌したマウスには、恐怖条件づけ文脈課題及び社会的認知記憶課題において海馬依存性記憶の障害が観察された。一方、味覚嫌悪条件付け課題では扁桃体依存的記憶に影響は観察されず、オープンフィールド課題を用いた解析でも行動活性並びに不安行動に異常は観察されなかった。従って、Mg欠乏により海馬依存性記憶に障害が誘導されることが示された。一方、Mg欠乏によるスパイン密度の変化は観察されず、Mg欠乏により海馬ニューロンの形態に顕著な影響が生じないことが示された。

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

ビタミンA情報伝達経路の標的遺伝子として、ムスカリン性アセチルコリンM4受容体遺伝子が同定され、さらに、M4受容体のアゴニスト投与により記憶形成の向上が観察された。ビタミンAはM4受容体遺伝子発現を正に制御することで記憶能力向上に寄与する作用メカニズムが示唆された。

(2) 脳機能に対するビタミンB1の役割の解析

ビタミンB1欠乏回復マウスではウエルニッケコ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障害が観察され、B1欠乏回復マウスはウエルニッケコルサコフ症候群モデルとなるものと考えられた。さらに、B1欠乏による記憶障害の原因が海馬の変性であることが強く示唆された。さらに、このB1欠乏誘導性の海馬変性と記憶障害はCREBの活性を高めたDIEDMLマウスでは観察されなかったことから、CREB活性化は海馬変性を妨げ、さらに、B1欠乏誘導性の海馬依存性記憶障害を改善することが示され、B1欠乏誘導性記憶障害を妨げる有用な手段がCREB活性化であることが強く示唆された。

(3) 脳機能に対するMgの役割の解析

Mg欠乏により顕著な海馬依存性記憶障害が誘導されることが明らかとなった。しかし、ビタミンB1欠乏の場合とは異なり、この記憶障害は海馬ニューロンの変性に起因するものではないことも明らかとなった。Mg欠乏はNMADA型グルタミン酸受容体を不活性化する可能性があることから、今後、Mg欠乏による記憶障害のメカニズムを明らかにする必要がある。

(4) 総括と今後の展望

本研究においてビタミンA、ビタミンB1、Mg等の脳機能に対する役割とその作用メカニズムの一端が明らかとなり、今後の脳栄養学推進の重要性が示された。また、Thy1レポーターマウスを用いたニューロンイメージングや、行動バッテリーなど、脳栄養学における研究ストラテジーも確立した。今後は、脳機能に対する栄養素・食品の役割・効果をより網羅的に解析する体制を整えることで、「食と脳」の観点から、QOLの向上に貢献することが望まれよう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Tanimizu, T., Kenney, J.W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P.W., Kida, S. Functional connectivity of multiple brain regions required for the consolidation of social recognition memory. *J. Neurosci.*, **37**, 4103-4116, 2017.

Doi :10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017.

② Serita, T., Fukushima, H., Kida, S. Constitutive activation of CREB in mice enhances temporal association learning and increases hippocampal CA1 neuronal spine density and complexity. *Scientific Reports*, **7**:42528, 2017.

Doi:10.1038/srep42528.

③ Ishikawa, R., Fukushima, H., Frankland, P.W., Kida, S. Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval *eLife*, **5**: e17464, 2016.

doi: 10.7554/eLife.17464.

④ Yu, Z., Fukushima, H., Ono, C., Sakai, M., Kasahara, Y., Kikuchi, Y., Gunawansa, N., Takahashi, Y., Matsuoka, H., Kida, S., Tomita, H. Microglial production of TNF- α is a key element of sustained fear memory. *Brain Behav. Immun.* **59**:313-321, 2017. 査読有

Doi : 10.1016/j.bbi.2016.08.011.

⑤Inaba, H., Kishimoto, T., Oishi, S., Nagata, K., Hasegawa, S., Watanabe, T., Kida, S. Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**:2425-2436, 2016. (2016年度 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 論文賞受賞)

Doi:10.1080/09168451.2016.1224639

⑥Inaba, H., Kai, D., Kida, S. N-glycosylation in the hippocampus is required for the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Neurobiology of learning and memory*, **135**: 57-65, 2016.

doi: 10.1016/j.nlm.2016.06.018.

⑦石川 理絵、稲葉 洋芳、喜田 聡、メマンチンによる恐怖条件づけ記憶忘却の生化学的性状の解析、日本健康医学会雑誌、25:121-126, 2016.

(2) 口頭発表

①喜田 聡「記憶制御に対するビタミン群の役割」(第99回日本栄養・食糧学会 関東支部シンポジウム「栄養とメンタルヘルス -栄養と心の健康のかかわり-」) 2017年3月4日 明治大学(東京)

②喜田 聡「Regulation of Memory Retrieval by Hippocampal Circadian Clock」(ZING Conferences ” Memory Mechanisms in Health and Disease) Dec 5-8, 2016 Tampa (USA)

③喜田 聡「海馬操作によるトラウマ記憶の忘却促進」2016年医療心理懇話会、2016年11月2日、フクラシア東京ステーション(東京)

④喜田 聡「Regulation of memory retrieval by forebrain clock」(19th Korean Society for Brain and Neural Science (KSBNS) annual meeting), Sep28-29, 2016, Seoul (Korea)

⑤喜田 聡「想起後の恐怖記憶制御のメカニズムとPTSD」(第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会 合同年会 大会長合同企画「記憶・情動の分子基盤破綻と精神疾患」), 2016年9月8-10日 福岡国際会議場(福岡)

⑥喜田 聡「Active transition of memory phases from fear to safety」 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20日~22日 バシフィコ横浜(神奈川)

⑦喜田 聡「Active transition from fear to safety」(International Symposium on Microendophenotype on psychiatric disorders 「Cellular and Circuit Mechanisms underlying Psychiatric Disorders」) 2016年7月19日 横浜ワールドポーターズ(神奈川)

⑧喜田 聡「Identification of fear and extinction neurons」(The 11th International Conference for Neurons and Brain Diseases) July 14-16, 2016 Vancouver (Canada)

⑨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」日本睡眠学会第41回定期学術集会 2016年7月7-8日 京王プラザホテル (東京)

⑩喜田 聡「ビタミンA情報伝達経路活性化による記憶能力向上の分子機構」日本栄養・食糧学会 2016年5月13-15日、武庫川女子大学 (兵庫)

(3) 出版物

喜田 聡 「ビタミンによる脳機能制御」(特集・予防医学の扉を開く「食品に秘められた扉を開く」) 実験医学 35, 1378-1380, 2017

学 校 名	東京農業大学短期大学部	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ダイコン辛味形質をモデルとした環境耐性遺伝資源の探索		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	① 環境応答 ② 遺伝資源 ③ 園芸作物 ④ ゲノム ⑤ 育種			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 松 憲 治	生 物 生 産 技 術 学 科	助 教	研究代表者 総括 実験・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 井 裕 樹	農 学 部	准 教 授	実験・論文作成

ダイコン辛味形質をモデルとした環境耐性遺伝資源の探索

1. 研究の目的

(1) ダイコンの農業形質をモデルケースとした環境応答に関する有用遺伝資源の探索

動くことのできない植物は、様々な環境変化に適応するための発達した情報伝達機構を備えている。環境適応の働きは、植物体の生存に有利に働く一方で、植物体の成長や二次代謝産物の生合成に影響を及ぼすことから、農業形質のばらつきを引き起こす原因にもなる。環境適応の分子機構を理解することは、農業形質に影響を与える栽培環境の変化に影響を受けにくい品種を育種する上での有用な知見となる。

ダイコンは、野菜の中で第3位の消費量を誇る重要品目であり、昨年の厚生労働省の調査で「日本人が最も食べる野菜1位」にランキングされるなど、日本人にとって最も身近な野菜の1つである。ダイコンを特徴付ける形質の1つが辛味であるが、「辛味の強さ」は栽培環境、特に気温（高温）による影響を受けやすく、揃いの良い青首総太系ダイコンであっても、ばらつきの生じやすい形質の1つである。本研究は、ダイコン辛味形質の高温応答をモデルケースとして、栽培環境条件に左右されやすい形質の均一化に資する遺伝資源の探索を行うことを目的として行われた。

(2) 辛味形質の高温応答性の解明および有用遺伝資源の探索

これまでに申請者らは、青首総太系ダイコンを対象に高精度の全ゲノム解析を行い、約65,000個の遺伝子を同定すると共に、それらをデータベース化し一般に公開してきた。さらに、獲得したゲノム情報を利用し「根の肥大」や「辛味成分の生合成」に関する分子機構の一端を明らかにした（Mitsui et al. 2015）。我々は、網羅的な遺伝子発現解析からダイコンの辛味成分の前駆体であるグルコシノレートの生合成量の調節を担うMYB型転写因子を同定した。MYB型転写因子は、グルコシノレート生合成経路の酵素をコードする複数の遺伝子の転写調節を介し、グルコシノレートの生合成量を調節していると考えられる。ダイコンは高温に晒されると辛味が増すが、申請者はこの応答に、このMYB遺伝子の発現上昇が関与していると考えている。申請者らが行った予備的な実験において、高温条件下で栽培した個体では、適温下で栽培した個体と比較して有意なMYB遺伝子の発現量の上昇が認められた。この結果から申請者は、MYB遺伝子が環境応答のセンサーとして機能し、その発現量の調節によって温度変化に連動したグルコシノレート生合成量の調整が行われていると考えた。さらに、MYB遺伝子の発現量には品種間差が見られ、その差がグルコシノレート生合成関連遺伝子の発現量と強い相関を示すという実験データを得ている。

本課題で、MYB遺伝子に高温応答性が見られること、その発現パターンに品種間差が認められることに着目し、この高温応答性の弱い系統を環境応答に鈍感な環境耐性系統と位置付け、豊富に存在するダイコン遺伝資源の中から環境耐性系統を選抜することを目的として行われた。環境耐性系統の発見は、栽培環境の変化に影響を受けにくい品種を育成するための育種素材として活用できるほか、環境応答の分子メカニズムを解明するためのモデルにもなり得ると考えられる。

2. 研究の計画

(1) 高温応答性の評価期等の検討および環境耐性遺伝資源の探索

グルコシノレート生合成の調節に関わるMYB遺伝子は、ダイコンゲノム中に2コピー存在する。その発現量と、その下流に位置するグルコシノレート合成関連遺伝子の発現量を、適温下で栽培した個体と、高温下で栽培した個体との間で比較する。約30品種を対象に高温応答性の評価

を行い、他品種と比較して優位に高温応答性が弱い系統を環境耐性系統と位置付け選抜する。評価を進めるにあたり、高温応答性を評価する上で適切な生育ステージを見極めるために、数品種を対象に幼苗期から成熟期にかけて高温処理を行い、MYB遺伝子の高温応答性の評価を行う。具体的には以下のように実施する。発芽後14, 20, 40, 60日目まで生育させた個体を、適温(20℃)または高温(35℃)に設定した人工気象器に移動し、さらに3日間栽培し、高温処理を施す。処理後、各個体の根部からRNAを採取し、定量的RT-PCR法を用いてMYB遺伝子およびその制御下にあるグルコシノレート合成関連遺伝子の発現量を定量する。この評価実験から適当とされた生育ステージにおいて約30品種を対象に高温応答性試験を行い、環境耐性系統の選抜を試みる。

3. 研究の成果

(1) 高温応答性の評価期等の検討

生育ステージ評価試験の結果、生育14日目から40日目の個体については、成長速度およびMYB遺伝子の発現量の個体間差が大きく、特に地域在来種は、個体間のばらつきが大きい傾向が見られた。そのため、高温応答性を評価するためには、成熟期の個体を用いることが適当であると判断した。また、地域在来種の評価においては、生育の揃った個体を確保するために、高温応答性試験に用いる予定数の倍程度の個体を栽培し、生育不良の個体を除いた上で高温応答性試験を行うなど、検定個体の均一化を施す必要があると判断された。

(2) 高温応答性の評価期等の検討

9系統に対し高温応答性試験を行った。うち1系統が他系統と比較して優位に高温応答性が弱い傾向が見られたため、この系統を環境耐性系統の候補とした。検定対象とする品種数は当初を下回った。その理由について下記の考察において述べる。

4. 研究の反省・考察

(1) 環境耐性遺伝資源の探索効率について

高温下でMYB遺伝子の発現量に変化が生じにくい遺伝形質を有する系統を環境耐性遺伝資源として位置付け選抜を試みたが、当初予定されていた品種数を検定するには至らなかった。先の研究成果で述べたように、発現量に変化が生じにくい候補系統が1系統選抜されたものの、今後高温応答性に関わるゲノム領域を限定するための情報を得るには数として不十分であった。その主な理由は、高温処理を施すための空間の制約が大きく、十分な品種数を対象とした選抜試験を行うことが困難であったことである。高温応答性の評価は、一般的な植物培養インキュベータを使用したが高齢個体のばらつきの大きい在来品種では、個体サイズの小さい幼苗期に選抜試験を行うことが困難であったため、成熟期まで栽培する必要があった。成熟期まで栽培を行った場合は、空間の制約から一度の処理で1品種の検定しか行えない。高温処理区においては、個体をインキュベータに多く入れると過湿になるという制約もあった。また在来品種では、個体間の成長のばらつきが非常に大きく、高温処理検定に供試することのできる育ちの揃った個体を得るために、実際の検定に使用する個体数の倍以上の個体数を予め栽培する必要があったことも、選抜のスループットを大きく下げる原因となった。そのため、今後より大規模な選抜を進めるためには、温室や大規模なチャンバーの利用を検討していく必要があると考えられる。同時に、MYB遺伝子の発現制御領域の配列解析から、予め高温応答性に差が生じる可能性のある系統をインシリコで選抜し、それらの系統の試験を優先的に進めるといった方法も取り入れる必要があると考えられる。この取り組みはすでに進めている。一方で、比較的少数の品種数を対象とした選抜において環境耐性を有する候補系統を選抜できたことから、選抜効率を改善することで有望な系統の選抜が可能であることがわかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 獣 医 生 命 科 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 ー原因遺伝子の同定とてんかん外科の基礎研究ー		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	遺伝子解析指導
五 十 嵐 亜 紀	獣 医 学 部	講 師	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	平成29年6月 30 日 退 職	遺伝子解析指導
内 田 和 幸	東京大学 大学院農学生命 科 学 研 究 科	教 授	病理解析指導
大 和 修	鹿児島大学 共同獣医学部	教 授	遺伝子解析指導
太 組 一 朗	日本医科大学 医学部	講 師	外科手術指導
川 上 康 彦	日本医科大学 医学部	准 教 授	脳波解析指導

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 前年度（平成27年度）に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し（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）、FSECのサンプルを用いて変異解析を行ったが、てんかんの原因・関連遺伝子となるような明らかな変異は認められなかった。本年度はLGI蛋白の足場となるADAM22およびADAM23（これらもヒトおよび犬のてんかん原因遺伝子として同定されている）についてLGIファミリーと同様の方法で解析を行う。
- ② 昨年度選定したFSEC 4頭のサンプルを用いてNGS解析を行う。ただしNGS解析には高額な費用が掛かるため、他の手法（ゲノムワイド関連解析：GWAS）による解析も検討する。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

- ① 前年度、発作間欠期および発作後期における拡散強調画像および灌注強調画像を用いることで、脳波による発作発現部位に一致した領域-海馬・扁桃体-で拡散・灌注の変化が認められたことからFSECのてんかん原性領域（機能異常域）がそれらの領域にあることを確認できた。本年度は現在、ヒトてんかんおよびその他の機能性脳疾患の画像解析として利用されているvoxel-based morphometry (VBM) の手法を用いて、海馬や扁桃体に変化が認められるかどうかを検討する。
- 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。

犬5頭を用いた前側頭葉切除術を施術し、その術式の確立と術後合併症／後遺症について評価する。

3. 研究の成果

(1) FSECの原因遺伝子の同定

①前年度のLGIファミリーの遺伝子同定および変異解析と同様の手法（機能的クローニング）により猫のADAM22およびADAM23遺伝子の同定とFSEC個体における変異解析を行った。猫におけるADAM22およびADAM23の全配列を同定することに成功したが、残念ながらFSECにおいててんかんの原因・関連遺伝子となるような変異は認められなかった。

②FSEC4頭でNGSをもちい全ゲノムシーケンスを行った。その結果合計18.5Xのカバレッジを得ることができ、バリエーション・コーリングを実施後、SIFT解析を行ったところ、約7,000の有害なアミノ酸置換を検出した。今後これらの中から候補を絞っていくことになるが、一方で、NGSによる更なる研究は、費用および時間が膨大に係り、早期に原因遺伝子を究明するには困難があると判断したため、GWASおよび連鎖解析を検討した。猫のGWAS解析に用いるSNPアレイは米国Morris Animal Foundation（以下MAF）が使用権利を有していたため、MAFに使用および購入申請（研究計画書などの提出）を行い、許諾を得ることができた。このため次年度はGWAS解析、連鎖解析を用いてFSECの候補遺伝子座を同定し、先のNGSで得られた全ゲノム情報と照合することで原因遺伝子の究明を図る。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

①次年度～本年度に行った拡散強調画像および灌注強調画像の研究について、論文として公表した（下記研究発表参照）。本年度の主要研究であったVBMについては、32頭の正常猫のMRIデータを基に、SPM（VBMのためのソフトウェア）を用いて、猫の標準脳テンプレートを作成した（世界で初めての試みであろう）。その猫標準脳テンプレートを基に、正常猫群（12頭）vs. FSEC群（25頭）の群間VBM解析および正常猫群 vs. FSEC各個体のVBM解析を行った。その結果群間解析では有意差は認められなかったが（これはおそらく個体によっててんかんの重症度や発作の側方性が異なるためであろう）、個体解析ではFSEC25頭中7頭で海馬・扁桃核領域での有意な体積変化が認められた。この所見はこれまでの脳波および画像解析所見と一致する。

②健常犬4頭に対し、ヒトの扁桃体・海馬領域の切除術の一方である前側頭葉切除術を施術した。うち1頭で脳底中央部に位置する中大脳動脈起始部からの出血および止血不能により術中安楽死があったが、3頭では扁桃体、海馬吻側を含む前側頭葉切除が可能であった。1頭では術後一過性に、1頭では術後2ヵ月まで永続した旋回運動（線条体損傷によるものと予想される）が認められたが、1頭では明らかな合併症／後遺症を認めなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) FSECの原因遺伝子の同定

①上記研究の成果にも記載したが、FSECの最大の原因遺伝子候補と予測していたLGIファミリーおよびADAM蛋白に明らかな変異が認められなかったのは至極残念な結果である。とはいえ、これまで同定されていなかった猫におけるこれらの遺伝子配列を同定できたことは、将来この領域に異常が推測される疾患-主にてんかんになるであろうが-の研究に大きく貢献できよう。我々の研究目的としてはネガティブデータであるが、前述した利用価値が大きいものと考えられることから、現在これらの成果を論文としてまとめ、投稿準備している。

②同様に、NGSを用いた全ゲノムシーケンスにてFSECの原因遺伝子を同定するには膨大な費用と時間がかかることを認識した。約7,000もの候補を挙げることはできたが、これをさらに頭数を増やし（＝また膨大な時間と費用が必要となる；ただし将来NGSがより一般的になり価格降下が起こるかもしれないが）、NGSで絞り込むのは極めて困難なものになるであろう。救い

はMAFより猫のSNPアレイの使用許可が得られたことである。またアメリカの獣医脳外科医を通じて猫の遺伝子解析の第一人者であるDr. Leslie Lyons（ミズーリ大）と本件についてコンタクトを取ることができた。次年度、MAFから提供される猫SNPアレイを用いたGWASおよび連鎖解析とDr. Lyonsによる協力を得ることで、また本年度NGSで得られた全ゲノム情報を利用することで、FSECの原因遺伝子同定が進むことを期待している。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

①猫のVBMの方法、すなわち猫の標準脳テンプレートを確立できたことは、本研究のみならず、将来的な猫の脳構造画像解析に多大な影響を与えるものと期待できる。FSECは個体により重症度や側方が異なる（すなわち不均一な表現形である）事から群間解析では有意な結果を得ることはできなかったが、てんかん外科で必要となる個体毎の確認には利用可能であることが示された。今後てんかん外科を計画するにあたりVBM解析を用いた画像解析は、てんかん原性領域の決定に貢献するものになるであろう。

②犬での前側頭葉切除術の術式がほぼほぼ確立し、また慎重に手術することで重大な合併症／後遺症が出ないことがわかった。特に脳底部や海馬の奥での過剰な操作はウイリス動脈輪から派出する中大脳動脈や前脈絡叢動脈を損傷し、致命的になること、および基底核領域を損傷することで後遺症が出やすいことが判明した。これらを損傷せずに手術するにはある程度の熟練が必要であろう（手術回数が増す毎に損傷は少なくなっていくため）。平成29年度は健常猫、そしてFSEC個体での前側頭葉切除術実施を計画している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Mizoguchi S, Hasegawa D, Hamamoto Y, et al. Interictal diffusion and perfusion magnetic resonance features of cats with familial spontaneous epilepsy. *American Journal of Veterinary Research* 78:305-310, 2017.

② Hasegawa D. Diagnostic techniques to detect the epileptogenic zone: Pathophysiological and presurgical analysis of epilepsy in dogs and cats. *The Veterinary Journal* 215:64-75, 2016.（本論文はThe Veterinary Journalの2016年年間最優秀論文賞-George Flemming Prizeを受賞した）

(2) 口頭発表

① 濱本裕仁、長谷川大輔、溝口俊太ら。自然発症性家族性てんかん猫（FSEC）における拡散強調画像および脳灌流MRI：発作間欠期と発作後期での変化。第159回日本獣医学会学術集会（2016年9月6日）

② 長谷川大輔。新規画像診断機器の臨床獣医学への応用：3テスラMRIと特殊撮像法の適応。第159回日本獣医学会学術集会（2016年9月6日）

③ 長谷川大輔。犬と猫の臨床てんかんと基礎てんかん研究。関東機能的脳外科カンファレンス（2016年4月2日）

(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オー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 獣医療 ③ マイクロバイオーーム ④ 細菌叢解析			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
菊 水 健 史	麻布大学・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	麻布大学・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	麻布大学・獣医学部	講 師	犬の循環器疾患と細菌叢の研究
伊 藤 哲 郎	麻布大学・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	麻布大学・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	麻布大学・附属動物病院	教 授	犬の眼疾患と細菌叢の研究
上 家 潤 一	麻布大学・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オーーム研究の基盤形成 ー細菌叢研究を基盤とする病態解析と治療戦略ー

1. 研究の目的

(1) 細菌叢共生システムの探求

- ① 健康個体（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（マイクロバイオーーム）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、健康個体の分娩様式、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、免疫系が自然分娩子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康犬から、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 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。次世代シーケンサー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2か月）と母体から皮膚スワブおよび糞便を採取し、16S解析を行い、細菌叢に違いが生じるか明らかにする。

(3) ストレス誘発性腸内細菌叢の病態への因果関係の解明

- ① 研究施設内で飼育されたマウスは野外マウスより免疫系が幼若であることが報告されている（Beura L.K., et al. Nature, 2016）。ノトバイオートマウスの解析方法の確立を行うため、イヌの唾液を摂取させたマウスの免疫学的解析を行う。

(4) ストレス誘発性腸内細菌叢と各疾患バイオマーカーの関連性を解明

- ① CD14 は主に単球に発現し、大腸菌などグラム陰性菌のリポ多糖類と結合して自然免疫系に関わる。バイオマーカーとしての可能性を探るため、犬の CD14 遺伝子のクローニングおよび一塩基多型 (SNP) の解析、FACS を用いた単球表面の CD14 発現解析を行う。

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 アレルギー性皮膚炎の症例を中心に症例を収集して延べ50頭の検体を得た。トイブード

ルの犬種に関して、アレルギー発症時、食物アレルギー負荷時と回避時など延べ27検体の腸細菌叢ゲノムDNAを精製し、16S解析とUniFrac解析を実施した。

- ② 犬の白内障症例の眼結膜、僧帽弁閉鎖不全症例の糞便、炎症性腸疾患症例の糞便、放射線治療を受けている鼻腔および口腔内腫瘍症例の腫瘍周囲から細菌叢採取し、一部においてゲノムDNAを精製している。
- ③ 東北大震災によって心的ストレスをもつ犬を訓練し、家庭に譲渡することで、訓練前、譲渡後の心的ストレスの変化による腸細菌叢への影響を調べるための糞便を13件体収集した。
- ④ 慢性消化器疾患のマーマセットに対して糞便細菌叢移植(FMT)を試験的に実施し、症状の改善を認めた(Yamazaki Y., et al., BMC vet res, 2017)。

(2) 環境および宿主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150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、網羅的細菌叢解析（16S解析）を実施した。

(3) ストレス誘発性腸内細菌叢の病態への因果関係の解明

- ① イヌ唾液を摂取させたマウスにおける末梢血および脾臓のCD3陽性リンパ球中のCD8陽性およびCD44陽性細胞の比率を検討した。イヌ唾液摂取マウスに感染による炎症反応は認められなかったが、リンパ球の比率にも差は認められなかった。

(4) ストレス誘発性腸内細菌叢と各疾患バイオマーカーの関連性を解明

- ① 犬の CD14 遺伝子のクローニングを初めて行い、2 つの一塩基多型(SNP)を同定した。そのうちひとつは転写調節領域と思われる部分に存在した。SNP の有無と単球表面の CD14 発現量の関連性が示唆されたが、SNP の有無と犬アトピー性皮膚炎との関連性は認められなかった。

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 症例収集に遅れている。実施した16S解析の結果の解析および、引き続き症例数を増やして疾患と健常における常在細菌叢の破綻（ディスビオシス）を解析していく。

(2) 環境および宿主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 肉眼的に糞便を観察すると、胎便、離乳前、離乳後において明らかに便性が異なっていた。得られた16S解析結果の検討を行っていく。

(3) ストレス誘発性腸内細菌叢の病態への因果関係の解明

- ① イヌの唾液が、Beura L.K.ら(Nature, 2016)の報告に認められるような免疫系に影響する結果は得ることができなかった。免疫系への影響をみるには、ディスビオシスを生じさせた個体を用いた検討が必要であるかもしれない。

(4) ストレス誘発性腸内細菌叢と各疾患バイオマーカーの関連性を解明

- ① 国内の保険に登録した犬の疫学調査では、今回対象とした犬種は、犬アトピー性皮膚炎の好発犬種ではなかった。このため、関連性が認められなかったのかもしれない。好発疾患による検討および実際に SNP が転写調節に影響するか解析する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ohkita M, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. Owners' direct gazes increase dogs' attention-getting behaviors. ***Behavioral Processes.*** 2016 125: 96-100
- ② Katayama M, Kubo T, Mogi K, Ikeda K, Nagasawa M, Kikusui T. Heart rate variability predicts the emotional state in dogs. ***Behavioral Processes.*** 2016 128: 108-112
- ③ Kawarai S, Fujimoto A, Nozawa G, Kanemaki N, Madarame H, Shida T, Kiuchi A. Evaluation of weekly bathing in allergic dogs with methicillin-resistant Staphylococcal colonization. ***Jpn J Vet Res.*** 2016 May;64(2):153-8.
- ④ Kanemaki N, Inaniwa M, Terakado K, Kawarai S, Ichikawa Y. Fundus photography with a smartphone in indirect ophthalmoscopy in dogs and cats. ***Vet Ophthalmol.*** 2017 20:280-284.
- ⑤ Mineshige T, Kawarai S, Yauchi T, Segawa K, Neo S, Sugahara G, Kamiie J, Hisasue M, Shirota K. Cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma with systemic dissemination in a dog. ***J Vet Diagn Invest.*** 2016 28(3):327-31.
- ⑥ Tanabe, T., Deguchi, T., Sato, T., Nemoto, Y., Maruo, T., Madarame, H., Shida, T. Naya, Y., Ogihara, K. and Sahara, H. (2016): Radioresistance of cancer stem-like cell derived from canine tumours. ***Vet Comp Oncol*** 14: e93-e101.
- ⑦ Sugimoto K, Fujii Y, Ogura Y, Sunahara H, Aoki T. Influence of alterations in heart rate on left ventricular echocardiographic measurements in healthy cats. ***J Feline Med Surg.*** 2016 Aug 8
- ⑧ Sato R, Aoki T, Kobayashi S, Uchida N, Simamura S, Yamasaki M. The modulating effects of propofol and its lipid carrier on canine neutrophil functions. ***J Vet Med Sci.*** 2016. 78:1825-1829.

(2)口頭発表

- ① 菊水健史、オキシトシンによる母子間の絆形成、小児成長研究会経団連会館、東京都港区、2017年2月
- ② Kikusui T. Reciprocal communication and endocrine response in human-dog interactions. CID International Symposium "Essentials of informative communication; What we can learn from inter-species communication" Senshu University, Chuo, Tokyo. 2016 Nov
- ③ 菊水健史、オキシトシンによるヒトとイヌの関係性の構築、日本動物心理学会第76回大会公開シンポジウム"身近な動物たちのコミュニケーション研究最前線"、北海道大学、北海道札幌市、2016年11月
- ④ 菊水健史、犬の問題行動を考えるとときに理解してほしいこと?犬とはどんな動物なのか?犬は人をどのように見ているのか?、動物臨床医学会大会行動学分科会、大阪国際会議場、大阪府大阪市、2016年.11月
- ⑤ 菊水健史、動物学からみた親子の関係?乳幼児期子育ての意味を探る?、石川県子供をはぐくむ研究会、石川県金沢保健センター、石川県金沢市、2016年10月
- ⑥ 菊水健史、ヒトとイヌの共生、動物愛護ふれあいフェスティバル、いわき市総合保健福祉センター、福島県いわき市、2016年10月
- ⑦ 菊水健史、マウス社会性の機能解明、第50回日本実験動物技術者協会総会、教育講演、ウエスタ川越、埼玉県川越市、2016年9月
- ⑧ 菊水健史、ヒトとイヌの共生から見えてきたこと、日本社会心理学会第57回大会シンポジウム"比較することの意味と意義?社会心理学と比較認知科学の新たな接点を求めて?"、話題提供者、関西学院大学、兵庫県西宮市、2016年9月
- ⑨ 菊水健史、幼少期ストレス負荷による情動行動の変化、第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会合同年会企画シンポジウム"こころの健康と破綻を生み出す脳と環境の相互作用"、福岡国際会議場、福岡県福岡市、2016年9月
- ⑩ Kikusui T. Oxytocin forms inter-individual relationship. ICP2016 Symposium "New Horizons in Cognitive Neuroscience: Face-to-face social interactions between two individuals probed by hyperscanning, neuronal recording, and neuroendocrinological approaches. Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa. 2016 Jul
- ⑪ 菊水健史、ヒトの表情を読み取るイヌの能力について、第7回WJVF市民公開講座、大阪

松下IMPホール、大阪府大阪市、2016年6月

- ⑫ Kikusui T. The social function of male mouse pheromone ESP1. ISOT Satellite Symposium "Olfaction: from Chemosensory Signals to the Brain" The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo. 2016年6月
- ⑬ 菊水健史、社会内分泌学、新・社会心理学コロキウム、東京大学、東京都文京区、2016年4月
- ⑭ 菊水健史、性シグナル伝達神経回路の機能的性差とその構築機構の解明、第89回日本内分泌学会学術総会シンポジウム'性分化疾患：その基礎と臨床、国立京都国際会館、京都府京都市、2016年4月
- ⑮ Maruo T., Iwano M, Nagata K, Fukuyama Y, Kawarai S., Yoshioka C, Kanai E, Orito K: The usefulness of a 3D sensor for detecting rotational errors for the canine head immobilized with a bite block system for radiation therapy. Veterinary Cansor Society. Orlando, Florida, 2016 Jan
- ⑯ Sugiyama Y, Goshyu T, Murakami H, Kawarai S., Madarame H. Canine skin mast cell degranulation from polyoxyethylene hydrogenated castor oil 60-containing human drugs. World Congress Of Veterinary Dermatology. Bordeaux, France, 2016 May
- ⑰ 杉野悠、川原井晋平、増田正樹、岩田将成、橋上竜二、藤田幸弘、圓尾拓也、斑目広郎、松浦忍、印牧信行、イヌCD14遺伝子のクローニングと遺伝子多型の探索、日本獣医学会学術集会、神奈川県藤沢市、2016年9月
- ⑱ 川原井晋平、江州智行、國澤沙世、金井詠一、茅沼秀樹、圓尾拓也、安斎眞一、賀川由美子、斑目広郎、イヌ肥満細胞腫の新規予後因子、東京都台東区、2016年6月、
- ⑲ 高橋聡一郎、加藤なつ紀、田端伴行、川原井晋平、食物アレルギーのネコの3例、神奈川県獣医師会学術大会、神奈川県伊勢原市、2017年3月
- ⑳ 加藤なつ紀、高橋聡一郎、田端伴行、東宮敦士、圓尾拓也、川原井晋平、イヌにおけるTSH刺激試験の有用性の検討、神奈川県獣医師会学術大会、神奈川県伊勢原市、2017年3月
- ㉑ 江州智行、國澤沙世、川原井晋平、福山泰広、金井詠一、茅沼秀樹、圓尾拓也、安斎眞一、賀川由美子、斑目広郎、犬の皮膚肥満細胞種におけるCD34の免疫組織化学的評価と予後との関連、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月
- ㉒ 横山大希、川原井晋平、菅原優子、榎本力弥、斑目広郎、茅沼秀樹、片側腭部に限局した休止期脱毛より腹腔内精巣の腫瘍化を疑った犬の1例、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月
- ㉓ 加藤なつき、高橋聡一郎、田端伴行、山口忠義、川原井晋平、斑目広郎、トリアムシノロンが奏功した猫の形質細胞性肢端皮膚炎の一例、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月
- ㉔ 田端伴行、高橋聡一郎、加藤なつき、東宮敦士、川原井晋平、皮内検査と血清特異的IgE検査の陽性一致率の調査、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月
- ㉕ 高橋聡一郎、加藤なつき、田端伴行、浅川瑞季、杉山由貴奈、東宮敦士、市原伸恒、大谷伸代、川原井晋平、メチルプレドニソロン酢酸エステル投与後の猫の副腎予備能の評価、日本獣医皮膚科学会、埼玉県大宮市、2017年3月

(3)出版物

- ① 青木卓磨（共著）. 犬の先天性疾患におけるインターベンション治療. 石田卓夫編：伴侶動物治療指針 臓器・疾患別 最新の治療法. 緑書房, 2016, 34:63-70.
- ② 青木卓磨. 高齢犬・高齢猫の心臓, MVM. 2016, 161:5-25.
- ③ 青木卓磨. 動脈管開存症. Veterinary Circulation. 2016, 6:9-25.
- ④ 杉本佳介, 青木卓磨. 猫の肥大型心筋症, CAP. 2016, 328:17-32.

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	フルオラス分子の疎水性制御に立脚した簡易分子合成手法の開発 ーフルオロミクスの効用ー		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①疎水性 ②有機分子触媒 ③フルオロミクス ④省資源型化学合成 ⑤プロセス化学			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 儀 真 人	農 学 部	教 授	研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
濱 本 博 三	農 学 部	准 教 授	フルオラス固相担持型触媒の合成
杉 山 祐 也	農 学 部	特 任 助 手	実験・データ整理
塩 入 孝 之	名古屋市立大学薬学部	名 誉 教 授	分子コンフォメーション解析の実施

フルオラス分子の疎水性制御に立脚した簡易分子合成手法の開発 ーフルオロミックスの効用ー

1. 研究の目的

有機合成分野では、フッ素分子の「疎水性」を利用するケミストリーとして、長鎖パーフルオロアルキル基を分子中に組み込んだ「ヘビーフルオラスケミストリー」と、短鎖パーフルオロアルキル基を組み込んだ「ライトフルオラスケミストリー」の2つの研究領域がこれまで相補的に展開されてきた。両者はそれぞれ相反する長所と短所が存在するので、常に別々に有機合成分野で取り扱われており、両者の中間のフルオラストグ鎖を用いる研究はこれまで全く行われてこなかった。

本研究では、この中間領域のフルオラストグ鎖を用い、フルオラス分子の疎水性を外部からの水の添加でコントロールする「フルオロミックス」を活用する。「フッ素を導入した分子」と「反応媒体の水分量」をコントロールすることで「フルオラス分子の疎水性制御」を簡便に達成し、化学合成分野において、選択的に標的分子のみを析出させる簡易精製技術を確立すると共に、様々な合成反応系において簡易有機合成プロセスへと展開することを目的とする。

2. 研究の計画

これまでの予備的研究成果を基盤として、順次、研究期間中に以下の検討を計画した。

- (1) 反応溶媒の組成変化に基づく「フルオラス分子の疎水性制御」を介して、フルオラス分子の選択的析出現象を利用し、カラムクロマトグラフィー精製を必要としないペプチド合成反応系への応用展開を試みた。ペプチドN末端保護基上に導入するフルオラストグの長さを変更しつつ、フルオラスペプチドの溶解度を制御できる条件を細かく精査した。
- (2) 有機分子触媒（ミディウムフルオラスプロリン誘導体）を用いて「固相-液相間を任意に移動可能な固相触媒反応系」を計画した。まず光学活性プロリンにフルオラストグをラジカル反応経路で導入する合成を試みた。その後、本触媒の不斉アルドール反応などへの利用を計画した。
- (3) フルオロミックスを活用した生物活性物質（MaD5）の簡易全合成を計画した。まずモデル実験として、フルオラストグを組み込んだ Fmoc 保護基を活用するペプチドの液相ミクスチャー合成を試みた。フルオラストグを当該分子の簡易精製のための疎水性制御に使うだけでなく、エンコード化にも利用し、反応後の分離段階においてフルオラス性の違いを認識した分離法により混合物の精製を試みた。

3. 研究の成果

- (1) カラムクロマトグラフィー精製を必要としないアミノ酸の縮合反応系（HOBT, HBTU）が可能になり、トリペプチドまで簡易合成できることを明らかにした。すなわち、フルオラス保護基の疎水性を利用し、反応系への水の添加のみで目的のペプチドのみを析出させ簡易精製できることを見出した。濾過操作ではテフロン®パウダーに目的物を吸着させる手法が効果的であることも併せて見出した。
- (2) 光学活性なプロリンにフルオラストグ（C₈F₁₇タグ）を組み込んだフルオラス有機分子触媒の合成に成功した。本フルオラスプロリンの溶解度を疎水性制御にて調べる予備実験をおこなった結果、当該フルオラスプロリン触媒は、メタノールには溶解するが、80%メタノール水溶液にすると析出し、漏れなく回収できることがわかった。
- (3) フルオロミックスを基点としたミクスチャー合成にて、36種類のトリペプチド及び3種類の親水性基を有するペンタペプチドを一挙に合成した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 反応溶媒の組成変化に基づく「フルオラス分子の疎水性制御」による析出実験では、析出結晶が細かく、濾過操作がかなり困難であった。最終的にはテフロン®パウダー (25 μ) を反応系に添加することで吸着させて濾過する手法がブレイクスルーとなり、濾過性の問題点を克服することができた。
- (2) フルオラス有機分子触媒 (ミディアムフルオラスプロリン) は当初の予想よりも親水性が高く、目的分子を析出させる為にはかなりの水添加が必要であった。今後、分子中のフルオラス含量を上げたフルオラスプロリン触媒の合成とその利用条件検討が必要である。
- (3) フルオロミクスによるミクスチャー合成では、当初予定していた天然物合成 (MaD5) まで時間的に進めることができず、予備実験のペンタペプチドの液相簡易ミクスチャー合成に留まった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kotaro Ishihara, Mayumi Kawashima, Takayuki Shioiri, Masato Matsugi; Synthesis of 5-Substituted 1*H*-Tetrazoles from Aldoximes Using Diphenyl Phosphorazidate.; *Synlett* **2016**, 27, 2225-2228.
- ② Yuki Kobayashi, Hiroki Miyazaki, Sae Inukai, Chika Takagi, Reo Makino, Kento Shimowaki, Rina Igarashi, Yuya Sugiyama, Shuichi Nakamura, Masato Matsugi; Highly Activated Second-generation Grubbs-Hoveyda Catalyst Driven by Intramolecular Steric Strain.; *Synlett* **2016**, 27(16), 2352-2356.

(2) 口頭発表

- ① 石原稿太朗、川島麻友美、塩入孝之、濱本博三、松儀真人; Diphenyl Phosphorazidate を用いたアルドキシムからのテトラゾール合成反応の開発; 2016年7月28日 (名古屋)。
- ② 宮崎裕紀、小林佑基、宮田一誠、榊原有希、杉山祐也、塩入孝之、松儀真人; フルオラス科学研究会第9回シンポジウム; 2016年10月7日 (名古屋)。
- ③ 宮崎裕紀、小林佑基、宮田一誠、榊原有希、杉山祐也、塩入孝之、松儀真人; ユビキタス鉄サレン錯体による孤立二重結合の不斉エポキシ化反応; 第42回 反応と合成の進歩シンポジウム; 2016年11月7日 (静岡)。
- ④ 下脇健斗、五十嵐里奈、小林佑基、杉山祐也、塩入孝之、松儀真人; 分子内ひずみを利用した高活性型 Grubbs-Hoveyda メタセシス触媒の開発; 日本農芸化学会2017年度大会; 2017年3月19日 (京都)。
- ⑤ 石原 稿太朗、川島 麻友美、塩入 孝之、松本 高利、松儀 真人; Diphenyl Phosphorazidate を用いたアルドキシムからテトラゾールの効率的合成; 日本農芸化学会2017年度大会; 2017年3月19日 (京都)。
- ⑥ 白井竜平、杉山祐也、吉田彩那、塩入孝之、松儀真人; フルオラス Fmoc 試薬を活用するトリペプチド及びペンタペプチドの液相スプリット型合成; 日本薬学会第137年会日本薬学会第137年会; 2017年3月25 (仙台)。
- ⑦ 後藤 万智子、杉山 祐也、塩入 孝之、松儀 真人; 固相-液相間移動型フルオラス有機分子触媒の開発: ミディアムフルオラスプロリン触媒の合成及び移動能の確認; 日本薬学会第137年会; 2017年3月25 (仙台)。
- ⑧ 濱本博三、松田大和、塩入孝之、松儀真人; イオン性高分子を用いる *N*-ヒドロキシフタルイミド酸化反応法の開発; 日本薬学会第137年会; 2017年3月25 (仙台)。

(3) 出版物

Masato Matsugi; Concise Synthesis of Peptide Analogs Using a Fluorous-Fmoc Protection Strategy.; *New Horizon of Process Chemistry by Scalable Reactions and Technologies*, Springer, March **2017**, pp201-215.

学 校 名	大 阪 電 気 通 信 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高濃度プロアントシアニジン含有ラズベリーの栽培法 開発 ー植物工場栽培と非破壊分析法の開発ー		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①機能性ポリフェノール ②環境非依存型栽培 ③プロアントシアニジン非破壊分析法 ④ラズベリー			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
齊 藤 安 貴 子	工 学 部 環 境 科 学 科	教 授	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 田 成 昭	工 学 部 基 礎 理 工 学 科	教 授	非破壊分析法の開発
川 崎 崇	立 命 館 大 学 学 科 薬 学 部 薬 学 科	助 教	遺伝子解析

高濃度プロアントシアニジン含有ラズベリーの栽培法開発 ー植物工場栽培と非破壊分析法の開発ー

1. 研究の目的

プロアントシアニジン（以後 PA）と呼ばれる高機能性化合物群は、多くの作物中に存在し日々食品として大量に摂取されている。その優れた健康機能性は、強い抗酸化活性をはじめとし、発ガン抑制や動脈硬化抑制、抗ウイルス活性など、一般的にも認められ機能性食品として販売されている。しかし、実際は構造が極めて近い化合物の混合物として得られるため、どの成分が機能を発揮しているのか、現在でも明らかになっていない。近年、高機能性の食品を摂取することによる健康寿命の延長が我が国にとって重要だと考えられるようになった。食品の機能性を利用して高齢化社会の QOL を高く保ち、かつ、医療費を減らすことができる可能性がある。PA はその効き目は緩やかであるが、様々な生物活性を同時に示すことから、日々摂取することで健康維持が可能だと考えられる。

我々が研究対象として選んだラズベリーは、10 数年前に日本に導入された比較的新しい作物で国内需要が年々高まっている作物の一つである。また、植物に含まれるポリフェノール類は、短い波長（青色）や紫外線の光を当てることで含有量が増えるという報告があり、研究代表者はラズベリーにおける PA 含量でも同様な現象がみられると考えた。PA を増加させたラズベリーの栽培法を確立できるならば、国内の健康食品需要、国民の健康維持への貢献が可能だと考え研究に着手した。本研究は 3 年計画の 1 年目であり、対象年度の目的を以下のように設定して研究を進めた。また PA の定量は、現在果実を破壊して定量する方法しか存在しないが、もし非破壊で分析することが可能であれば、光の波長を制御した植物工場で栽培したラズベリーに、数値化した付加価値を与えることができる。さらに、様々な作物に含まれる PA を定量するために応用することで、本研究課題の成果は多くの作物栽培に対して広く影響を与えることが可能である。

(1) 「植物工場」内での、PA増量ラズベリー栽培法の確立に向けた検討

①ラズベリー水耕栽培法の確立

工学的農業である「植物工場」内での、PA増量ラズベリー栽培法を開発するためには、ラズベリーの水耕栽培法の確立が必要である。ラズベリーは根茎で増える多年草であるため、通常の水耕栽培法では長期にわたる栽培は難しい。そこで、根の保持剤を工夫することで水耕栽培を可能にするため検討を行った。

②ラズベリー果実中のポリフェノール量、PA量の定量、機能性測定

上記①と同時に、ラズベリー果実中のポリフェノール量、PA量を定量し、かつ、その機能性を測定し、栽培環境や果実収穫時期による変化を確認することにした。これらの分析結果を指標として栽培法の検討を進めることができる。

(2) ラズベリー中のプロアントシアニジンの非破壊分析法の開発に向けた検討

糖度の非破壊測定などに使用されている近赤外領域の波長を用いた分析は、PA量の非破壊分析にも応用できると考えた。

2. 研究の計画

(1) 「植物工場」内での、PA増量ラズベリー栽培法の確立に向けた検討

本研究計画は3年間の研究の一年目として行った。一年目の計画として、植物工場内でラズベリーを栽培するための条件検討を行うことを目的として以下の研究計画を立てた。

①ラズベリー水耕栽培法の確立

ラズベリーは根が発達するため比較的乾燥に強い。一方で根が酸素を十分に吸収できる環境が必要であるため、植物工場内で一般的な水耕栽培には向かないと考えた。また、葉物の

栽培のように、短期間で栽培が終了せず、長期的に栽培する必要がある。また、そのような栽培環境で栽培可能な品種の選抜が必要だと考えた。また、根の保持剤の違いによる根の状態を顕微鏡観察し、生育状態の把握に努めることも目的の一つとした。

②ラズベリー果実中のポリフェノール量、PA量の定量、機能性測定

本研究期間においては、ラズベリー果実中のポリフェノール量の変化などを確認するところから研究を行うことにした。土壌栽培、水耕栽培、また品種間による含有量の違いなどを測定し、次年度以降の方向性を決定する基礎とする。

(2) ラズベリー中のプロアントシアニジンの非破壊分析法の開発に向けた検討

本研究期間においては、プロアントシアニジンを構成する化合物の特徴的なスペクトルを見出すことを目的に検討を進める。非破壊分析で最も難しい部分は、混合物の中の目的の化合物を、他の化合物のスペクトルと分離することである。

3. 研究の成果

(1) 「植物工場」内での、PA増量ラズベリー栽培法の確立に向けた検討

①ラズベリー水耕栽培の確立

ラズベリー水耕栽培の確立について、砂を根の保持剤として用いる水耕栽培（以後砂栽培と略）に成功した。数種類の品種で試したが、ヒンボートップ種が最も生育が早いことが確認できた。土壌栽培と砂栽培の果実を比較すると、ラズベリーの生育が土壌栽培と比較して極めて早いことに加え、砂栽培の果実の方が1.5倍以上大きいことを確認した。この時、水分含量は変わらなかったことから、栽培の効率化の面からも砂栽培、将来的には植物工場内におけるラズベリー栽培の有効性が確認できた。

②ラズベリー果実のポリフェノール量、PA量の定量、及び、抗酸化活性における機能性評価

ラズベリー果実を図1のように8のステージに分けて、それぞれ総ポリフェノール分析、PA分析等化学分析を行った。その結果、ステージが若い方が総ポリフェノール量、総PA量DPPHラジカル消去活性共に高いことが確認できた。

機能性を指標に収穫をするならば、ステージ6が収穫適期であると示唆された。また、HPLC-MS分析の結果、PA数種類が確認できたが、これらもステージが進むごとに減少していることが確認

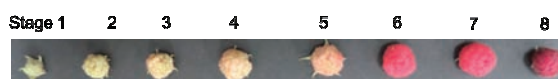


図1. 水耕栽培ラズベリー生育ステージ

できた。今年度の目標である水耕栽培の確立と化学分析はほぼ達成できた。

(2) ラズベリー中のプロアントシアニジンの非破壊分析法の開発に向けた検討

近赤外領域の波長を用いた非破壊ポリフェノール定量分析開発を目的として、まず、プロアントシアニジンを構成する標準化合物を用いて分析検討を行った。

4. 研究の反省・考察

(1) 「植物工場」内での、PA増量ラズベリー栽培法の確立に向けた検討

①ラズベリー水耕栽培の確立

ラズベリーの水耕栽培はこれまでに報告例がなく、本研究費の助成によって実現したと考えている。一方で、3年計画の研究が1年で終了してしまったことについては残念に考えており、実験の大変さや成功した時の効果などを、もっとアピールすべきであったと反省している。

②ラズベリー果実のポリフェノール量、PA量の定量、及び、抗酸化活性における機能性評価

ラズベリー果実中のポリフェノール量、PA量測定について、微量のサンプルで分析可能な改良法を開発することで、果実一つでも測定できるようになったことは、今後の研究にとって大きな一歩だったと考えている。この手法については、今後の研究に十分役立つと考えている。

(2) ラズベリー中のプロアントシアニジンの非破壊分析法の開発に向けた検討

PAの非破壊分析法は、様々な作物において分析法の開発が望まれているもので、ラズベリーは果実が比較的小さいうえ、PA含量が高いため開発が比較的しやすいと考えている。これらの研究に関しては、今後も継続していずれかの予算を獲得しつつ進めていこうと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 現時点でなし（投稿準備中）

(2) 口頭発表

①八上修一、小堀亮、平井瑞輝、奥井志穂、重金大貴、藤見佳奈、堀潤治、齊藤安貴子、「水耕栽培ラズベリー抽出液における食機能性ポリフェノール分析研究」、日本フードファクター学会学術集会(2016年11月19日、富山)

②小堀亮、八上修一、西村拓哉、道下僚、奥井志穂、重金大貴、川崎崇、齊藤安貴子、「ラズベリー‘ヒンボートップ’種のポリフェノール類分析と機能性評価研究」、日本農芸化学会(2017年3月、京都)

(3) 出版物 現時点でなし

学 校 名	近 畿 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	統合的アプローチによる哺乳類初期胚の発生能力を予測する新手法の開発		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①初期胚 ②ライブセルイメージング ③トランスクリプトーム ④マウス ⑤染色体異常 ⑥胚の質 ⑦不妊治療			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 縣 一 夫	生 物 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
宮 本 圭	生 物 理 工 学 部	講 師	実験・データ整理・論文作成

統合的アプローチによる哺乳類初期胚の発生能力を予測する新手法の開発

1. 研究の目的

現在、先進諸国では6組に1組のカップルが不妊症で悩んでいる。近年の生殖補助医療技術の著しい進歩により、そのようなカップルでも子を持てる可能性が拡大しているが、その成功率は10～30%と依然として低いのが現状である（de Mouzon et al, 2012, Hum Reprod、日本産科婦人科学会平成27年倫理委員会・登録・調査小委員会報告）。翻って、動物生産の現場においても近年受胎率の低下が大きな問題になってきている。それらの主たる原因として、母体の高齢化や外的環境ストレスによる配偶子や胚の質の低下が想定されている。つまり、妊娠率の向上を目指してより良い胚を選別し、ゆくゆくは質の改善につなげるためにも、まずは質の実体を理解しそれを客観的に評価する方法が求められている。

生殖補助医療の現場では、従来から胚の形態により質の良し悪しを評価しているが、個人の感覚に依拠することから正確であるとは言い難く、かつ科学的根拠に乏しい。現在では高感度な検出器を用いて胚の呼吸活性や代謝産物を測定することにより胚の質を評価する手法が開発されており、妊娠率・受胎率の向上に成果を挙げているようである。しかし、「胚の質」の実体を理解するためには、これら一義的な指標ではなく、様々な指標を同時に評価可能な統合的なアプローチが必要になる。本研究では、以下に示すように単一胚を用いたライブセルイメージング技術とトランスクリプトーム解析を統合した新たなアプローチ方法を開発し、それを用いて実際に「胚の質」を評価し得る分子マーカーを探索することを目的としていた。

- (1) 「胚の質」を評価する新たな分子マーカーを探し出すため、新規イメージングプローブを開発する

研究代表者（山縣）はこれまでにライブセルイメージング技術を応用して、胚の異常を母体への着床前に検出する手法を確立してきた。この方法では、試験管内で蛍光タンパク質をコードするmRNAを合成し受精卵に注入する。その後、顕微鏡ステージ上の培養器に移し、目的に応じた発生ステージまで連続観察を行う。多色観察により複数の蛍光プローブを同時に観察できるだけでなく、撮影後の胚を仮親に移植することで観察された異常と個体発生能を単一胚で関連付けることができる。この方法論を用いて、初期卵割時における異常な染色体分配が初期流産の一原因であることをマウス胚で示した。本提案ではこれら細胞核内の現象に加えて、ATP産生能や活性酸素産出量をレポートできる蛍光プローブをあらたに開発することを目的としていた。

- (2) 「胚の質」を評価する新たな分子マーカーを探し出すため、単一極体からの網羅的転写産物解析法を発展する

胚の質を評価する上で、卵内に蓄積された転写物も重要な指標と考えられる。卵内転写物は受精後に翻訳され、胚発生に必須なタンパク質として機能することが知られているが、生かしたまま単一受精卵から転写情報を抽出する方法は確立されていない。研究分担者（宮本）は、哺乳類を含めた種々の動物種において、初期胚の全転写情報（トランスクリプトーム）を解析し、それを元に発生に必須な因子や現象を発見した。本提案では、卵と相同性の高い転写物を含むと考えられる極体に注目し、マウスを用いて極体一つからの網羅的RNA解析技術を確立し、受精卵の持つトランスクリプトーム情報を非侵襲的に抽出する方法を開発することを目的としていた。

2. 研究の計画

ライブセルイメージングによるATP産生能や活性酸素量の定量化、および微量トランスクリプ

トーム解析を可能にするため、それぞれ以下のような計画を立てた。

(1) イメージングプローブの検討

イメージングプローブをマウス卵子に注入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてライブセルイメージングにより、プローブ注入卵の発生過程を観察する。ATPの検出には今村らが開発したA-teamと呼ばれるFRETプローブ (Imamura et al., 2009, PNAS) を用い、活性酸素の検出には市販の蛍光試薬を検討する。得られた大量の画像データは多次元画像解析に供試し、新規プローブの輝度と受精卵の発生の相関データを解析し、発生能と高い相関を持つプローブやその条件を検討する。

(2) シングルセルRNA解析技術の発展

受精卵の発生能を損なわずにトランスクリプトーム情報を得る必要があるため、受精卵に付随する極体一つからRNAシーケンシングを行う必要がある。極体からのRNAシーケンシングの報告は一報のみあるが (Reich et al., 2011, JBC)、利用した手法の解像度が低く (同定遺伝子数が期待される数の5分の1程度)、更なる発展の必要がある。具体的には以下の順に検討を進める。(A) 発生率に影響を与えない極体摘出法の検討、(B) 極体RNAからのRNAシーケンシング用ライブラリーの作製、(C) 極体RNAと対応する卵子RNA間でのトランスクリプトーム比較解析。

3. 研究の成果

(1) 新規イメージングプローブの開発

①FRET (Fluorescence resonance energy transfer) 現象をもとに細胞内のATP濃度を可視化・定量化できるA-teamと呼ばれるプローブ (Imamura et al., 2009, PNAS) をマウス初期胚に応用することに成功し、胚の生存性を保ったまま発生過程におけるATP産生能の時空間的变化を捉えることに成功した。

②活性酸素の検出用蛍光プローブは多数知られているため、それら一つ一つをマウス卵胞培養系で検討した結果、6-Carboxy DCFDA (6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate) が毒性・シグナル強度などから最も適していることを明らかにした。

(2) シングルセルRNA解析技術の発展

①受精卵から放出された単一第二極体を用いて、遺伝子発現を定量的に検出する方法を確立した。

②卵および対応する極体を用いてシングルセルRNAシーケンシングを行い、卵と極体において多くの共通する転写産物を同定し、極体中に多くの卵転写産物が存在することを示した。

4. 研究の反省・考察

(1) 新規イメージングプローブの開発

①ATP濃度は細胞の生存性を示す確かな指標の一つであり、継時的に、また定量的にATP濃度を測定する実験系の開発の意義は深い。

②ライブセルイメージングを用いて、生細胞で活性酸素を定量的に検出するシステムを卵胞培養の系を用いて構築した。今後マウスやヒト初期発生過程に当該システムを応用することによって、胚の発生予測する指標の一つになると考えている。

(2) シングルセルRNA解析技術の発展

①極体一つという微量サンプルから定量的に、また網羅的に転写物量を評価する実験系を確立した。RNAシーケンシングに関しては、その再現性も非常に高い。

②得られた極体内転写産物から受精卵の発生に関与する転写産物を探し出すのが今後の課題であり、ライブセルイメージングデータとの統合解析により、正確に胚の質を評価するシステムが立ち上げられると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① S. Misu, M. Takebayashi, K. Miyamoto. Nuclear actin in development and transcriptional reprogramming. *Front Genet.* Vol.8:27. 2017年3月
- ② J. Jullien, M. Vodnala, V. Pasque, M. Oikawa, K. Miyamoto, G.E. Allen, S.A. David, V. Brochard, S. Wang, C. Bradshaw, H. Koseki, V. Sartorelli, N. Beaujean, J. Gurdon. Gene resistance to transcriptional reprogramming following nuclear transfer is directly mediated by multiple chromatin repressive pathways. *Mol Cell.* Vol 65(5): 873-884. 2017年3月
- ③ Y. Satouh, K. Nozawa, K. Yamagata, T. Fujimoto, M. Ikawa. Viable offspring after imaging of Ca²⁺ oscillations and visualization of the cortical reaction in mouse eggs. *Biol Reprod.* 96(3): 563-575. 2017年2月
- ④ J. Ueda, A. Harada, T. Urahama, S. Machida, K. Maehara, M. Hada, Y. Makino, J. Nogami, N. Horikoshi, A. Osakabe, H. Taguchi, H. Tanaka, H. Tachiwana, T. Yao, M. Yamada, T. Iwamoto, A. Isotani, M. Ikawa, T. Tachibana, Y. Okada, H. Kimura, Y. Ohkawa, H. Kurumizaka, K. Yamagata. Testis-specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* 18(3): 593-600. 2017年1月
- ⑤ K. Miyamoto. A new era of human assisted reproductive technology. *J Mamm Ova Res.* Vol. 33(2): 77-77. 2016年11月
- ⑥ Y. Sato, T. Kujirai, R. Arai, H. Asakawa, C. Ohtsuki, N. Horikoshi, K. Yamagata, J. Ueda, T. Nagase, T. Haraguchi. A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. *J Mol Biol.* 428(20): 3885-3902. 2016年10月
- ⑦ S. Kobayashi, Y. Hosoi, H. Shiura, K. Yamagata, S. Takahashi, Y. Fujihara, T. Kohda, M. Okabe, F. Ishino. Live imaging of X chromosome reactivation dynamics in early mouse development can discriminate naive from primed pluripotent stem cells. *Development.* 143(16): 2958-2964. 2016年8月
- ⑧ M. Teperek, A. Simeone, V. Gaggioli, K. Miyamoto, G. Allen, S. Erkek, A. Peters, T. Kwon, E. Marcotte, P. Zegerman, C. Bradshaw, J. Gurdon, J. Jullien. Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. *Genome Res.* Vol. 26(8): 1034-1046. 2016年8月
- ⑨ T. Yao, J. Ueda, T. Kobayashi, M. Hori, K. Yamagata. Quantitative assessment of embryo quality based on a live-cell imaging technique. *J Mamm Ova Res.* Vol. 32(4): 149-157. 2016年5月
- ⑩ A. Isotani, K. Yamagata, M. Okabe, M. Ikawa. Generation of Hprt-disrupted rat through mouse $\times$ rat ES chimeras. *Sci Rep.* 6: 24215. 2016年4月
- ⑪ Y. Muro, H. Hasuwa, A. Isotani, H. Miyata, K. Yamagata, M. Ikawa, R. Yanagimachi, M. Okabe. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon

after mating to the beginning of fertilization. *Biol Reprod.* 94(4): 1-7. 2016年4月

(2) 口頭発表

- ① **宮本圭**、転写と核内構造の調節における核アクチン、ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム (HFSP) キックオフシンポジウム、2017年1月26日
- ② **山縣一夫**、Understanding of nuclear function by live imaging of chromatin dynamics. 第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日
- ③ **宮本圭**、生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御 新学術領域研究第4回公開シンポジウム、2016年11月16日
- ④ 藤村雪乃、玉置幸嵩、大西佐知、**山縣一夫**、細井美彦、マウス卵胞培養過程で生じる細胞死を利用した評価基準の作成、第19回 日本IVF学会学術集会、2016年10月1日
- ⑤ **山縣一夫**、ライブセルイメージングを用いた胚のup to date、第34回日本受精着床学会総会・学術講演会、2016年9月14日
- ⑥ **宮本圭**、クローン動物がもたらした可能性、第109回日本繁殖生物学会大会市民公開講座、2016年9月11日
- ⑦ **K. Miyamoto**, Y. Tajima, K. Yoshida, T. Tsukaguchi, C.R. Bradshaw, G.E. Allen, M. Mori, Y. Imazato, J. Jullien, K. Matsumoto, H. Imai, J.B. Gurdon, and M. Yamada. The improved culture condition for mouse nuclear transfer embryos enables highly efficient nuclear reprogramming. The 4th China-Japan-Korea reproduction meeting. 2016年8月19日
- ⑧ **宮本圭**、アフリカツメガエル卵母細胞を用いたリプログラミングとクロマチン動構造の解析、次世代両生類研究会第二回会合、2016年8月8日
- ⑨ **Y. Yamagata**, Quantification of Embryo Quality by Live-Cell Imaging. Society for the Study of Reproduction. 2016年7月19日
- ⑩ **山縣一夫**、初期胚ライブセルイメージングによる胚の質の評価、第57回日本卵子学会、2016年5月15日

(3) 出版物

- ① **宮本圭**、次世代の核移植技術の利用に向けて、Campus & Conference探訪記、実験医学、羊土社、第34 巻第8 号、p1328-1331、2016年4月

学 校 名	放 送 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	山岳高所・遊牧地域における社会変容と遠隔教育の 試行と研究 -ブータンとモンゴルを中心に-		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①山岳高所、②遊牧、③遠隔教育、④コンテンツ制作			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
稲 村 哲 也	教 養 学 部	教 授	総括、モンゴルの社会変容と遠隔教育

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河 合 明 宣	教 養 学 部	教 授	ブータンの社会変容と遠隔教育
近 藤 智 嗣	教 養 学 部	教 授	遠隔教育のための情報技術とコンテンツ
山 田 恒 夫	教 養 学 部	教 授	遠隔教育システムと科目制作

山岳高所・遊牧地域における社会変容と遠隔教育の試行と研究 ーブータンとモンゴルを中心にー

1. 研究の目的

ブータンやモンゴルなどの山岳地域・遊牧社会では、険しい自然環境のなかで、移動性の高い伝統的な生活が維持されてきた。一方で、近年には首都への人口集中が著しく、災害へのリスクも著しく増大している。これらの国々では、人口集中の緩和のためにも、地方の活性化が望まれている。中央と地方の教育の格差の緩和は、教育機会の平等の観点から重要であるが、地方の活性化と人口集中緩和の観点からも、重要な課題の一つである。そうした課題の解決のために、遠隔教育の普及はたいへん有効であり、そのニーズも高い。近年は、山岳地域・遊牧社会でも、ソーラーパネルや携帯電話が普及し、遠隔教育の条件が整っているが、一方で、遠隔教育の技術は乏しい。そこで、本研究では、これまで代表者らが文化人類学や地域研究などの研究をおこなってきたブータンとモンゴルを中心に、放送大学における放送とインターネットの遠隔授業の蓄積を活かし、コンテンツ制作などの技術移転のための適切な方法と、遠隔教育システムの構築のための社会状況・社会変容に関する基礎研究を実施することを目的とする。

(1) ブータンに関して

①交流協定校との共同による遠隔教育システムの研究

ブータン政府は、国が電波中継塔を建設し、2014年からBhutan e-Government Master Planを実施し、インターネットにより証明書交付等の行政サービスや高等教育の充実を図っている。そうした情報伝達システムを含むブータンの社会的状況を把握し、また、そのシステムを基盤として、放送大学と交流協定校であるシェラブツェ・カレッジ(SC)とが共同して、公開遠隔教育の実現・充実のため適切な方式に関する研究を行なう。

②コンテンツの制作と技術移転のための基礎的研究

高等教育におけるインターネットを通じた公開遠隔学習(ODL: Open Distance Learning)の普及に資する科目コンテンツの共同制作のため、その課題や効果を明らかにしていく。ブータンでは、すでに、教員を育成するための遠隔教育プログラムが試行的に実施されており、インターネットによる授業を配信し、試験がキャンパスで行なわれている。ただし、コンテンツ制作にスタジオは使用せず、音声や編集の経験も乏しく、映像を用いた興味深い科目をどのように制作するかの経験は少ない。そこで、コンテンツ制作の技術移転のための試行と研究を行なう。コンテンツは、両国の歴史・文化等に関するテーマを中心とし、相互の異文化理解の深化を目指す。

(2) モンゴルに関して

①モンゴル国立大学との共同による適切な遠隔教育システムの研究

モンゴル国立大学において、遠隔教育の重要性に関する議論が行なわれ、中期計画にも明記されているが、まだその実施にはいたっていない。そこで、モンゴル国立大学の国際関係・行政学部の学部長であるバートルガ教授らと共に、遠隔教育にかかわる社会状況・社会変容の研究を行ない、モンゴルの遊牧民の子弟に高等教育の道を開くための遠隔教育システムの適切な方式を探る。

②コンテンツの制作のための研究と資料収集

モンゴルには世界最大級の活断層があり、大規模な地震も起こっているが、これまでは遊牧という生業とゲル(移動式家屋)の生活様式のため、人的被害はほとんどなかった。しかし、首都ウランバートルをはじめとする都市の拡大によって、リスクが急激に高まっている。また、遊牧社会における旱魃や雪害などの自然災害に加え、近年では、ウランバートルや地方都市、定住地

区で洪水も発生している。そこで、遠隔教育試行ためのコンテンツとして活用するため、名古屋大学環境学研究科がモンゴル国立大学内に設置したレジリエンス共同研究センターと連携し、防災・減災教育に関する調査研究を行なう。

(3) 途上国における遠隔教育システムに関して

①遠隔教育導入のための適切な方式の検討

ブータンとモンゴルに共通する課題として、また両地域での研究を踏まえて、途上国全般における遠隔教育システム導入の適切な方式等に関する基礎的研究を行なう。

②遠隔教育における博物館の活用に関する検討

遠隔教育の内容の充実（バーチャルな学習と実物による学習の連動など）として、また、遠隔教育における地方学習拠点として、遠隔教育における博物館の活用に関する基礎的研究を行なう。

2. 研究の計画

(1) ブータンに関して

①AAOU（アジア公開大学）総会への参加

SCのスタッフをフィリピンで開催のAAOU総会に派遣し、遠隔教育システムの多様性を把握し、より確実な研究と技術移転を実施するための適切な方式を探る。

②コンテンツ制作のための研究

ブータンからSCのスタッフを招聘し、放送大学の簡易スタジオの見学、収録、編集などの研修を行なう。

(2) モンゴルに関して

①遠隔教育に関する社会環境の調査

遠隔教育の実現にむけて、現地調査によって、教育、行政、コミュニケーション等に関するモンゴルの現状を明らかにする。また、モンゴルにおける遠隔教育と博物館の共同の有効性や適切な方式を探る。

②コンテンツ制作のための研究と資料収集

現地を訪問し、モンゴル国立大学内における、遠隔教育用の科目制作の仕組みの構築に協力する。また、災害・防災・減災をテーマとするコンテンツの調査研究を行なう。

(3) 途上国における遠隔教育システムに関して

①途上国における遠隔教育システム

途上国における遠隔教育システムの先進的な事例として、ブラジルにおける遠隔教育システムの現状を調査し、途上国における遠隔教育の適切なしくみを探る。

②遠隔教育と博物館との共同

日本の博物館における地域連携・生涯学習等の現状を調査するとともに、博物館の生涯学習・校外学習の取り組みが進んでいるフランスの現状を調査する。

3. 研究の成果

(1) ブータンに関して

①AAOU総会への参加と多様な遠隔教育システムの知見

SCのスタッフをAAOU総会に派遣し、協議することにより、教材の質（音声、動画映像）の改善や、生涯教育や高等教育のための遠隔教育の多様なシステムに関する知見を得ることができた。

②コンテンツの制作のための研究

SCのスタッフを招聘して、放送大学のスタジオの見学、収録・編集などの研修を実施し、時間配分、質問・課題の配置、講義内容など、ブータンでの公開遠隔教育（オンライン授業）の科目制作のための適切なしくみについて多くの知見を得ることができた。

(2) モンゴルに関して

①遠隔教育実現のための社会環境等の調査

モンゴルでは、1989年までの社会主義時代に30の県に博物館が設置されたが、現在はモンゴル国立博物館のリニューアルが完了し、県レベルの博物館とのネットワーク化が進められている。遠隔教育の地域の拠点として県レベル博物館を活用すること、遠隔教育における実物教育の導入など、遠隔教育における博物館活用の有効性が明らかとなった。

②防災・減災に関するコンテンツ制作のための研究

モンゴルには世界最大級の活断層があり、比較的長い間隔において大きな地震が発生している。これまでは、遊牧の生活様式により地震が発生しても被害は軽微だったため、モンゴル国民には防災意識が希薄であるが、現モンゴル政府も地震のリスクを認識している。また、遊牧社会にとっては、雪害などが現実の重大な自然災害となっている。そこで、遠隔教育のコンテンツとしてまずは「災害・防災・減災」を選択し、モンゴル国立大学、名古屋大学減災連携研究センター、モンゴル国緊急事態庁と連携して、過去に大地震が発生した地域の活断層調査や住民意識等の調査研究を行い、多くの知見と、コンテンツ制作のための材料を得ることができた。

(3) 途上国における遠隔教育システムに関して

①途上国における遠隔教育システムの事例研究

学内の別資金も活用し、ブラジルにおける遠隔教育システムの現状を調査した。ブラジルの最高学府であるサンパウロ州立大学、遠隔教育のさきがけとなったマトグロッソ連邦大学等を訪問し、広大な国土における多様な遠隔教育のシステムの導入のプロセスや現状、東海大学がマトグロッソ大学と実施した遠隔教育にかんする国際共同事業等に関して多くの有益な知見を得ることができた。

②遠隔教育における博物館の活用

日本の博物館における地域連携・生涯学習等の現状を調査するとともに、ブラジルでの遠隔教育調査の帰路に、フランスの自然史博物館、人類博物館などを視察し、先端的な展示と博物館の生涯学習・校外学習の取り組みについて調査した。遠隔教育への博物館の活用に関する有益な知見を得ることができた。

4. 研究の反省・考察

(1) ブータンに関する研究

①オンライン科目の充実

王立大学の中でオンライン授業を先導するSCの役割は大きい。今後、SC と共同して、オンライン科目を作成、充実しながら、地域学習拠点、試験方式、単位互換のあり方などを含め、遠隔教育システムを具体化していくことが課題である。

②TV科目への拡充

現在、SC内にメディア学科のスタジオが作られる。そこで、放送(ラジオ/テレビ)を利用した遠隔公開大学の歴史を持つ放送大学の経験を活かし、オンライン科目での連携と共に、TV放送を用いた遠隔教育も拡充していくための方式を探る。

(2) モンゴルに関する研究

① JICA「草の根プロジェクト」への展開

災害の認識や防災教育の普及に関連して、名古屋大学減債連携研究センターが主体となってJICAの草の根プロジェクトを実施することが予定されている。放送大学として、そのプロジェクトに共同して、コンテンツ制作の技術移転を実施することを検討している。

② モンゴル国立大学への技術移転のための協力

モンゴル国立大学では、中期基本計画で遠隔教育の実施が明記されている。それが実現すれば、遊牧民の子弟が移動しながら教育を受けられる機会となる。遠隔教育の本格的な実施のためには多くの課題があるが、放送大学のノウハウを活かして、今後も協力を続ける予定である。

(3) 途上国における遠隔教育システムに関して

① 研究と技術移転の具体化に向けた支援の継続

ブータンやモンゴルに対する遠隔教育導入の支援は、両国にとって極めて高いニーズがあり、有益であり、かつ費用対効果の高いものであることが明らかになった。今後は、より適切な遠隔教育システムを探るため、これまでの研究を継続しながら、技術移転の具体化に向けた支援につなげていくことが重要である。

② 適切な遠隔教育システムの探求とわが国への貢献

ブータンやモンゴルに限らず、途上国への遠隔教育の導入は極めて重要かつ有効なものである。一方で、グローバル化が進む現代社会において、こうした研究と実践は、対象国のみならず、わが国の遠隔教育の将来にとっても重要であろう。流動性の高い日系ブラジル人をはじめとする在留外国人の教育、海外に進出する移動性の高い日本国民のさらなる増加などによって、インターネットによる遠隔教育システムは、新たな学習システムとしての可能性が大きいからである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Akinobu Kawai・Tshering Wangdi・Peljor Galay・Chimi Dorji・Makiko Miwa・Tsuneo Yamada 2017 “Project Report: ICT-enhanced GNH Society in Bhutan”, Journal of The Open University of Japan, No. 34, pp.137-151.

② 稲村哲也、スヘー・バートルガ、石井祥子、石黒聡士、鈴木康弘2017「モンゴルにおけるレジリエンスに関する学際共同研究—地震被害・活断層調査」『放送大学研究年報』34：39-52

(2) 口頭発表

① 平成28年3月 放送大学のTV番組「大学の窓」で紹介

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	東 洋 文 化 研 究 所	客員研究員	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	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 づ 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
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	千代田区立日比谷図書文化館	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28年度は、写真展『旅をしぞ思ふ——戦前の絵はがきにみる東アジアの都市景観』（研究計画段階での名称は「近代アジアの肖像」）の実施を目標とする。そのために、以下の作業に取

りくむ。

- (1) 写真展「旅をしぞ思ふ——戦前の絵はがきにみる東アジアの都市景観」の実施
都内の展示場を借りて4-5日の写真展を開催する。学習院大学所蔵資料を公開し、本プロジェクトで扱う各都市の特色をふまえた見せ方によって、当時の街の景観がわかりやすいよう展示する。
- (2) バーチャル・ミュージアムの拡充
平成27年度に試用版が完成したバーチャル・ミュージアムに、学習院大学所蔵資料を追加する。加えて、学習院大学所蔵の古写真、およびそれらと同じアングルから撮影した現在の写真、さらに各都市を旅した人物による旅行記の記述を整理し、絵はがき・古写真と合わせて見られるようにする。また、(1)の写真展において、観覧者が利用できるように閲覧コーナーを設ける。
- (3) 資料調査
古地図を入手して、学習院大学所蔵の絵はがき・古写真の撮影地点を特定し、旅行記に描かれた旅のルートを把握する。
- (4) 現地調査
絵はがき・古写真に写された大連・上海・台北の建築物や通りなどの現状について、現地調査を行ない、同じアングルから現在の写真を撮影する。

3. 研究の成果

- (1) 写真展『旅をしぞ思ふ——戦前の絵はがきにみる東アジアの都市景観』の実施
11月1日から11月8日までの8日間、東京芸術劇場（東京都豊島区西池袋1-8-1）のアトリエ ウェストにて写真展を行なった。扱った都市は、哈爾賓・新京〔長春〕・奉天〔瀋陽〕・北京・大連・京城〔ソウル〕・済南・青島・上海・台北の10都市。なお、期間中の来場者数は以下の通り。
11/1 25名、 11/2 27名、 11/3 43名、 11/4 35名
11/5 47名、 11/6 38名、 11/7 48名、 11/8 34名 合計 297名（延べ人数）
- (2) バーチャル・ミュージアムの拡充
バーチャル・ミュージアムの拡充をはかったことで、11月に行なった写真展（(1)参照）において、一般に研究成果を紹介することができた。なお、10月31日に行なわれた講演「学習院大学アジアコレクションの世界—デジタル化のあとさき」（東洋文化講座シリーズ「デジタル化とアジア研究」第90回、学習院大学東洋文化研究所）においても紹介した。
- (3) 資料調査
古書店等から戦前の地図を購入し、絵はがき・古写真が撮影された場所や、戦前の学習院生による修学旅行のルートを明確にした。
また、これらの資料の整理方法を学ぶことと研究に関する情報収集のため、12月10-11日に以下の施設を訪れた。
 - ・国際日本文化研究センター：所蔵資料（戦前中国都市の絵はがき帖）閲覧
 - ・京都市歴史博物館：「絵図のまなざし」展見学
 - ・立命館大学ミュージアム：「絵葉書に見る日本と中国」展見学
- (4) 現地調査
絵はがき・古写真に写された都市の建築物や通りなどと同じアングルから現在の状況を撮影した。平成28年度は台北・上海・大連へ赴き、49枚分の建築物の写真を撮影した。
台北では、学習院大学史料館蔵の「高松宮下賜絵葉書」13枚を取り上げ、
 - ①日本が建設した建築物および施設・現存（北投温泉・台北賓館）
 - ②日本が建設した建築物・跡地（明治橋、台湾神社、国立図書館、東門国小学校）
 - ③現在も残る名所（風景）（淡水、水道水源池、菜寮）以上の3つのカテゴリーから調査した。

上海では、絵はがき3枚——①龍華塔、②日本高等女学校跡（現在マンション）、③フランス租界ジョッフル（霞飛路）通り（現在淮海中路）国泰電影院付近——および、写真帖（金丸健二『支那大觀 第壹集 中部支那』上海家庭写真会、1920年）の3枚——①徐家滙天文台跡（徐家滙气象台）、②東亜同文書院跡（現樂山新村付近）、③李鴻章像跡（現復旦中学）——を調査した。

台北と上海は、昨年度に撮影できなかった場所の撮影を行なったため、今年度の撮影場所は、中心地から離れた場所が多かった。

大連では、絵はがき30枚を取り上げ、

①日本が建設した建築物および施設・現存

大連郵便局と大山通り（現在上海街）、大連日本橋（現在勝利橋）、児玉町（現在俄羅斯風情街）、満蒙資源館（現在大連自然博物館）、満蒙資源館から東南方面の風景、北公園（現在北海公園）、西広場（現在友好広場）、大連民政署（現在花旗銀行）、大連ヤマトホテル（現在大連賓館）、大連ヤマトホテル玄関から、大連市役所（現在中国工商銀行）、東拓ビル（現在交通銀行）、満鉄本社（現在沈陽鉄路局大連車務段）、大連医院（現在大連大学付属中山医院）、中央公園春日池（労働公園荷花池）、中央公園せせらぎ、

②日本が建設した建築物・跡地

磐城町日活館（現在天津街新世界百貨）、星ヶ浦（現在星海公園）後藤新平像、中央公園忠霊塔（現在建築芸術館）、逢坂町（武昌街）、連鎖街、大連駅、大連埠頭、埠頭事務所（大連港集団）、満洲重要物産市場大連取引所（大連銀行第一支行）

③現在も残る名所（風景）

大山通り（現在上海街）、浪速通り（天津街）、星ヶ浦浜辺、星ヶ浦霞半島（星海湾景区）、監部通り（長江路）

以上のように研究の第2年目には学内の既存資料の追加調査→海外における現状の追加調査（古写真・絵はがき49枚分）→展示会によって広く市民に提示するという三つの研究活動をすすめた。2017年度には、これまでの研究成果を公表するため、書籍『旅するアジアー写真と旅行記が語る近代（仮称）』を刊行する予定である。

4. 研究の反省・考察

平成28年度は、資料の充実・整理が進んだものの、写真展「旅をしぞ思ふ——戦前の絵はがきにみる東アジアの都市景観」の構想・準備等に時間が必要であったため、都市間の歴史的・地理的な差違と遺跡の保存・破壊に関する比較研究に不十分な点が残った。次年度は、書籍『旅するアジアー写真と旅行記が語る近代（仮称）』の刊行に向けた作業において、これまでの研究の不足を補う所存である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①村松弘一「明治—昭和前期、学習院の中国留学生について」『学習院大学国際研究教育機構研究年報』第3号、学習院大学国際研究教育機構、2017年2月、201-221頁
- ②武藤那賀子「大正8(1919)年の学習院北満旅行をめぐる」『学習院大学国際研究教育機構研究年報』第3号、学習院大学国際研究教育機構、2017年2月、222-232頁
- ③村松弘一「学習院大学アジアコレクションの世界—デジタル化のあとさき」『東洋文化研究』19号、学習院大学東洋文化研究所、2017年3月、265-287頁

(2) 口頭発表 なし

(3) 出版物 なし

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	国 士 館 大 学 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 政 大 学 社 会 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 山 岳 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 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 文 学 部	准 教 授	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 ーヨルダン所蔵の歴史的空中写真を手掛かりにー

1. 研究の目的

- ①：歴史的空中写真を活用してヨルダン溪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溪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、ヨルダン溪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始め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溪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. 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ことにした。しかし、現地調査に関しては、主要メンバーの所属校により、中東地域への渡航が許可されず、二年目の調査は主要メンバー以外の4名による1回の調査にとどまった。三年目の研究資金の支援は継続されなかった。

(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より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、ヨルダン溪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溪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、共催事業団の許可を得て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。
- これらの理由は平成28年2回の現地調査計画が、主要メンバーの所属する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。研究計画は、大学の渡航禁止によりすべてを使用することができなかった。予算の大部分を交通費、旅費として計画したため、渡航禁止によりこれらに使用が適わなかった。なお、成果に関しては継続して解析しており、ヨルダンに関する専門図書の出版を計画している。

②研究成果に基づく考察

現在のヨルダンでは開発も進み、なかでもヨルダン溪谷は灌漑農業地帯となった。ヨルダン溪谷は、パレスチナ・シリア難民を抱えるヨルダンの食糧基地ともなり、現在もなお大規模な地形改変が進行している。

プレート境界にも関わらず、活断層など変動地形に関する研究は限られた一部地域での調査事例しかなく、広域にわたる均質的な変動地形の把握は行われていなかった。本研究では、ヨルダン溪谷における主要な活断層の認定と活動時期、活動規模を特定することができた。この点で独創的であり、本研究によって、防災科学や防災施策への多大な貢献も期待できる。

開発が優先されがちな開発途上国的な事情もあって、環境破壊が進行した数十年間の経緯を客観的に追跡、分析した研究は見当たらない。また、死海周辺の環境変化やヨルダン川の水質汚濁など、解決しなければならない問題が多数存在する。その点で本研究は独創性を持つ。しかし、現地調査が実現できなかったことにより、利水の歴史等を文献からまとめること以上の成果は得られなかった。

ヨルダンの農業経営学に関する研究事例は存在する。ただしヨルダンの農業生産・加工・流通・消費までをも視野に入れた研究は管見の限りない。食料輸入と商品作物輸出という「矛盾」も浮き彫りにし、農業問題に止まらないヨルダンの状況把握につながると考えた。

また、ヨルダンを「地域構造論」の視点から把握した成果はない。日本独自の理論であり、日本経済の地域構造の把握を主としてきたからである。英語圏にありがちな偏向した中東理解にとどまらず、日本独自視点でのヨルダンの「理解」に資することができると思われた。しかし、2年目の現地調査が中止に追い込まれたことにより、文献、統計資料の解析以外の研究成果を得ることができなかった。

(2) 研究計画遂行にあたっての反省・考察

都合2回にわたる現地調査の計画が、所属する大学の判断により中止となった。理由は、現在のヨルダン地域においては、国家レベルの危険情報に勝る安全情報が皆無であり、テロが発生する可能性が常にあることを認識した不安定な地域情勢の中では、事件・事故が予見される可能性及び結果として予見できた損害を回避すべき義務があるのではないかと、とした安全への最善の配慮として「総合安全会議」において判断した結果、同地域への渡航ができなかったということで、研究計画遂行に係る反省・考察以前の問題として特記するものである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①：ヨルダン・ヴァレー断層帯の最新変位痕跡、東郷正美、長谷川均、石山達也、後藤智也、牛木久雄、Mahmoud Al-Qaryouti、法政大学多摩研究報告、1-10、2016年、31巻。
- ②：ヨルダンの森林植生概観－‘Vegetation of Jordan’に記載された情報を中心に－、磯谷達宏、国士舘大学地理学報告、1-16、2017年、25巻。
- ③：ヨルダン・ハラットで見いだされた低断層崖、東郷正美、文化遺産研究、19-25、2017年、10巻。

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

その他 編集協力

週刊「奇跡の絶景」29 死海 ヨルダン（講談社刊、H29年5月30日発行）

学 校 名	法 政 大 学	研究所名等	野 上 記 念 法 政 大 学 能 楽 研 究 所
研 究 課 題	能楽の国際参照標準確立と多面的展開に向けての総合研究		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	① 能 ② 狂言 ③ 演劇 ④ 世阿弥 ⑤ 国際 ⑥ 学際		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 中 玲 子	能 楽 研 究 所	教 授	研究代表・総括・演出研究・技芸伝承

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 本 圭 造	能 楽 研 究 所	教 授	能楽史の研究・関連芸能
伊 海 孝 充	文 学 部	教 授	謡本・狂言台本の研究
竹 内 晶 子	国 際 文 化 学 部	教 授	能の脚本構造の分析
高 桑 い づ み	東 京 文 化 財 研 究 所	特任研究員	能の演出研究
横 山 太 郎	跡見学園女子大学 文学部	准 教 授	技芸伝承・能楽を廻る言説の研究
高 橋 悠 介	慶應義塾大学 附属研究所 斯道文庫	准 教 授	能楽と宗教
玉 村 恭	上越教育大学 教育学部	准 教 授	能楽論の研究
Michael Watson	明治学院大学 国際学部	教 授	技芸伝承・能楽社会の分析
Monica Bethe	中世日本研究所	所 長	能の演出研究
Thomas Hare	プリンストン大学 比較文学科	教 授	海外研究者総括・能と宗教・世阿弥の生涯
Shelley Quinn	オハイオ州立大学 東アジア言語文学科	教 授	能楽論の研究
Paul Atkins	ワシントン大学 文理学部 東アジア言語文学科	准 教 授	能の脚本構造の分析 金春禅竹の生涯
Reginald Jackson	ミシガン大学	Assistant Professor	能楽を廻る言説・メディアと能楽
Eike Grossmann	ハンブルク大学 人文科学部	准 教 授	能楽史の研究・関連芸能

能楽の国際参照標準確立と多面的展開に向けての総合研究

1. 研究の目的

- (1) 本研究課題は、国内外の研究者の共同研究により能楽研究の国際的な参照標準を定め、最新の研究情報を英語で海外の研究者や隣接他領域の研究者、さらには実演者に向けても発信することで、能楽研究のフィールドを拡張しようとするものである。
- ①国内外の能楽研究者、演劇研究者が問題意識を共有し、方法論の違い等を認識したうえで、能楽史・能楽論・能楽の背景となる宗教思想・能楽の脚本構造や演出等々について、最新の研究の成果を英語でまとめていく。
 - ②現代思想と能楽の関係、現代における能楽の諸相（経済基盤・人材教育等）、能楽とジェンダー等、従来の能楽研究では触れられてこなかった問題についても取り組み、英語で発信していく。

2. 研究の計画

- (1) 特に従来の事典類に不足している領域から優先的に研究を進める。
- ①近代以降の能楽のあり方や現在の状況に注目し、文献調査に加え、役者への聞き取り調査や稽古の録画等を行う。
 - ②新しい視点からの能楽史の記述をめざし、幕末から明治初期の混乱、近代日本の発展と能楽の関係、キリシタン文献に見える能楽の様子等を明らかにする。
 - ③現代思想と能楽の関係・能楽の背景となる宗教思想について、それぞれミシガン大学・プリンストン大学にて内外の研究パートナーが集中的に討議をおこなう。
 - ④来日する外国人学生に向けて上記の研究成果を踏まえた英語の能楽解説とディスカッションをおこないフィードバックを得る。
- (2) 7月末に国内外の研究者が集まり、能と狂言の脚本構造・演出・歴史等につき、既にでているチームごとに原稿化に向けた作業を進め、成果を報告し合う。若い研究者を中心に曲目解説・資料のレファレンス・重要事項リスト等の項目選定や提示の方法などについても検討する。

3. 研究の成果

- (1) 英語版能楽全書刊行に向けて従来あまり研究がおこなわれてこなかった分野について優先的に研究を進め、以下のような成果を得た。
- ①現代の能楽の、一般演劇とは大きく異なる興行の仕組みについては、幕末から明治初期の資料調査に基づきその淵源を明らかにし、学校教育やオーディションに頼らない独特の能楽師養成のシステムや、素人と玄人を分ける基準等については、流儀ごとに役者からの聞き取り調査を重ね、各流の状況を明らかにし得た。ヨーロッパ日本学会大会にパネル発表として応募し採択されている（2017年8月31日に発表予定）。
 - ②玄人間の藝の伝承に関し、わざ言語、型付の重要度、時代による師弟関係の変化についての聞き取り調査を踏まえ、能楽におけるわざ継承について論文化した。
 - ③幕末期から明治維新の混乱、大正デモクラシーと能楽、植民地での能楽、軍国主義と能楽、女流能の問題等について、外国人研究者の論文も含め、研究成果を『近代日本と能楽』にまとめ刊行した。
 - ④7月28日～30日、国内外の研究者が集まり、テーマごとの小グループに分かれてのセッションと全体討議を組み合わせた研究集会をおこなった。能の脚本構造、レトリックの特徴、謡本の出版についての研究成果はヨーロッパ日本学会大会にパネル発表として応募し採択

されている（2017年9月1日に発表予定）。

⑤上記の集会に海外の研究者が参加できなかったグループもあったため、2月にはプリンストン大学にて「能楽と宗教思想」についての研究討議をおこない、英語原稿（ドラフト）にまとめた。ミシガン大学（3月）にても「能楽と現代思想」についての研究討議をおこない、現在、原稿化進行中である。

（2）上記（1）の成果を踏まえた実践として、9月にはイエール・NUSカレッジの学生（22名）に向けて、能楽の演出、政治史の中の能楽、能楽における素人の役割等についてレクチャーとディスカッションをおこないフィードバック情報として蓄積している。

4. 研究の反省・考察

（1）研究の推進と成果の積み上げに関しては、おおむね順調に進んだと考えている。

①『近代日本と能楽』は幕末から戦時中の軍国主義と能楽まで。急激に変化する現代社会の中での能楽の諸相については、現代の能楽興行のありかたや能楽師の経済基盤、素人の役割等の項目をたてて研究を進めているが、20年ほど前までの能楽を支えていた明治以来のシステムの解明が抜け落ちぬよう、今後、配慮していく必要がある。

②演出についても能楽論についても、海外の演劇関係者が海外での演劇について考える際の常識とは違う部分を中心に論述を進めているが、並行して、装束・面・音楽・舞など、言葉を尽くすより一目見れば理解できるものを、どのように組み込んでいくか（あるいはウェブ発信などどうすみ分けかつ結び付けていくか）についても検討を始めたい。

（2）網羅的に参照基準となるような記述を集成するのが目的だが、研究を進めていく過程でより詳しく論じたい部分や面白い問題も出てきている。そこを抑制して英語版能楽全書をまとめるには強い意志が必要。

①2017年8月に、英語版能楽全書に向けた見本原稿の一部を持って、いくつかの出版社の話を聞きにいく予定だが、研究の進み具合に差があり、一部、原稿化が遅れている分野もある。

②細かいテーマほど深く専門的な議論が進み、「能の演出」「能楽の通史」のような担当は概説的にならざるを得ない。

③上記の問題を解決するために、書籍としてまとめる部分とウェブサイトで常に最新の研究成果を字数制限なしに発表できる場の確保と両方を考えていく必要がある。

5. 研究発表

（1）学会誌等

①高橋悠介、能の亡霊と魂魄、『能と狂言』14、30-43頁、能楽学会。

②高桑いづみ、地拍子の古態—早歌からの継承—、『能と狂言』14、67-77頁、能楽学会。

③竹内晶子、語りとセリフが混交するとき—世阿弥の神能と修羅能を考える—、『能楽研究』41、1-30頁、法政大学能楽研究所。

④Yamanaka Reiko, La conscience qui relie un geste à l'autre: le nô et le concept de *ma*, "Ma et Aida: Des possibilités de la pensée et de la culture japonaises", pp. 229-241, Editions Philippe Picquier.

（2）口頭発表

横山太郎、わざの継承と型付、能楽学会、2016年5月15日、早稲田大学。

（3）出版物

宮本圭造編、宮本圭造・横山太郎他6名著『近代日本と能楽』、全378頁。法政大学能楽研究所、2017年3月刊。

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 退学者対策 ② 生活リズム ③ 介入 ④ 大学生			

○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
室 城 隆 之	社 会 学 部	教 授	臨床心理学的視野からの分析

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けて出すための基準を教育学の変数である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学の変数のみでなく、心理学の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について検討した。その結果、入学直後に行われている学力テストの得点よりも、入学直後の睡眠変数、特に睡眠効率（実際に眠っている時間÷床上の時間×100）がドロップアウトリスクの高い学生を正確に予測できる事が分かった。また、学年の進行に伴う睡眠習慣と学業成績の関係について検討すると、睡眠習慣の乱れが顕著となる第3学年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見出した。また、友人関係が良好である事、大学への入学目的が明確であることなどの心理学の変数は大学への愛着を高める事で大学不適応や学業成績の低下防止などに予防的に寄与している事も明らかとなった。

本研究では、以上の成果をふまえ、教育学・心理学・睡眠学的変数を用いてドロップアウトリスクの高い学生を抽出する方法の完成度をより高め、より多くの学生を対象にして介入方法を改善することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) 「質問紙調査の継続的な実施と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28年度入学生を対象としても同様の調査を実施した。平成28年度で1年次から4年次までの縦断データが完成する。並行して平成25・26年度入学者の1学年時の教

表1 本課題における主な調査内容

- 教育学の変数 (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
- 心理学の変数
 - ・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

育学・心理学・睡眠学的変数を用いて、2年終了時までの留年・退学及び学業に関する問題の有無を統計学的に予測する計算式を多変量解析によって作成し、精度を確認する。

(2) 介入の実施

予測式によって抽出された留年・退学リスクの高い学生のうち、睡眠習慣に問題がある学生を対象として介入的指導を実施する。

3. 研究の成果

(1) 「質問紙調査の継続的な実施とスクリーニング手法の確立」

昨年度、ROC (Receiver Operating Characteristic)解析を用いて、ドロップアウトリスクの高さを予測する変数として1年次の睡眠効率が最も制度が高い（感度76%、特異度70%）ことを見出した。今年度は留年や退学を目的変数として多変量解析（多重ロジスティック解析）を行った結果、有意な変数として、GHQ（精神的健康度）、週末睡眠時間（6時間未満）、徹夜（月1回以上）、就床時刻変化（2時間以上）が見出された。これらの変数を用いて、1年生前期に得られたこれらのデータを基に将来の退学・留年の確率を推測する回帰式を導き出した。

(2) 介入の実施

複数の睡眠の問題を抱える学生を対象として睡眠生活習慣の介入的指導を行い、現在も継続中である。介入により明白な成果が認められ、睡眠習慣が改善して、卒業まで到達した学生もいる（図1）一方で、他の問題も同時に抱える学生もいて、介入による効果は事例ごとに異なっている。介入の事例については、まだ、事例数が少なく、明確な結論を明らかにするまでには至っていない。睡眠習慣への指導的介入については、今後、より事例数を積み重ねて数量的な検討に耐えうるデータを蓄積する必要がある。

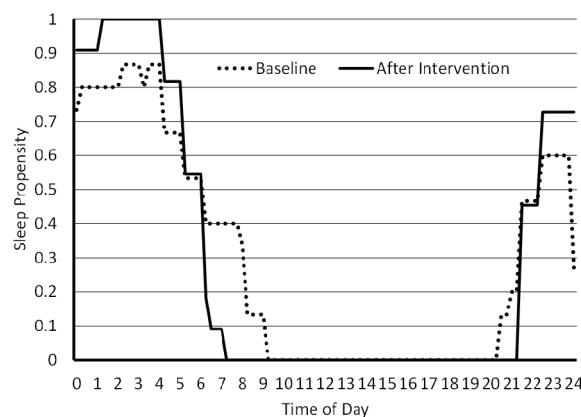


図1 指導的介入前後の睡眠覚醒パターン

4. 研究の反省・考察

研究は、当初の予定から大きな遅延があるわけではないが、主に実際の睡眠生活習慣への指導的介入を組織的に行う部分で当初の目的から多少の遅延を来している。今後は、個別的な介入と並行して、一般の教員等もより簡便に指導が出来るような資料の作成と、学生への集団的教育指導という方法についても具体的に検討をしていきたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①福田一彦・浅岡章一・中村真・Kelly, T.M.・宮崎幸司・室城隆之・山本隆一郎（2017）大学生の睡眠覚醒習慣について（第2報）．江戸川大学紀要，第27号，321-328.
- ②浅岡章一（2017）大学生活への適応と睡眠習慣 ―乱れた睡眠習慣が退学・留年リスクに与える影響―. Modern Physician 新興医学出版（印刷中）
- ③中村 真・薊理津子（2017）大学適応に影響する要因としての入学動機に関する基礎的検討 江戸川大学紀要，第27号，301-308.

(2) 口頭発表等

- ①浅岡章一（2016）長期的な睡眠教育の必要性和課題. 日本睡眠学会第41回定期学術集会，東京，2016/07/08

- ②浅岡章一・福田一彦・Kelly, TM・中村 真・室城隆之・山本隆一郎・宮崎孝治 (2017) 入学直後の睡眠習慣の乱れは大学生の留年や退学を予測しうるか ―退学者対策としての睡眠習慣調査の有効性―. 日本睡眠学会第42回定期学術集会, 東京, 2017/06/29-30
- ③福田一彦・長谷川智子・川端一光・今田純雄 (2016) 幼児の食と睡眠に関する研究 (7) 平日と週末の生活時間の差の重要性について-. 日本健康心理学会第29回大会, 岡山, 2016/11/18-19
- ④Fukuda, K. (2016) Sleep paralysis (kanashibari) is an altered state of consciousness based on the unusual occurrence of stage REM, and frequently experienced by ordinary people. The 31st International Congress of Psychology, Yokohama, 2016/07/24-29.
- ⑤Fukuda, K., Hasegawa, T., Kawahashi, I., Imada, S. (2016) Eating and sleeping in preschool children (6): Late rising and brunch on weekend causes malfunctioning of several physical and mental conditions. The 31st International Congress of Psychology, Yokohama, 2016/07/24-29.
- ⑥福田一彦・浅岡章一・嘉規智織・横山紗綾・平井希一・井上玄規 (2016) 低照度長波長のリビングの照明は居住者を早寝早起きにするのか. 日本生理心理学会第34回大会, 名古屋, 2016/05/14-15.
- ⑦廣瀬一浩・福田一彦・白川修一郎・松浦倫子 (2016) 妊婦の夢内容と産後うつ病リスクについて. 日本睡眠学会第41回定期学術集会, 東京, 2016/07/07-08.
- ⑧福田一彦・浅岡章一・嘉規智織・横山紗綾・平井希一・井上玄規 (2016) 実際の住宅の照明を赤く暗い条件に変えると居住者は早寝早起きになるのか. 日本睡眠学会第41回定期学術集会, 東京, 2016/07/07-08.

(3) 出版物

福田一彦・尼崎光洋・煙山千尋 (2016) 睡眠と身体活動 大竹恵子 (編) 保健と健康の心理学 ポジティブヘルスの実現 ナカニシヤ出版、143-160.

学 校 名	愛 知 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ミャンマーの政治的発展と民主化への移行過程における政策的課題 -地域市民社会団体の役割と積極的貢献の促進-	研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	① democratization (民主化) ② transition (移行) ③ CSOs (市民社会団体) ④ political development(政治的発展) ⑤ academic diplomacy (学問外交) ⑥ interdisciplinary policy analysis(学際的な政策分析) ⑦ citizen's awareness and capacity building (市民の意識と能力開発) ⑧ politico-administrative and socio-environmental change(政治・行政と社会・環境の変化)		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 旗 張 星 允	総 合 政 策 学 部	教 授	総括・現地調査のコーディネート・論文作成・現地調査・分析・学会企画/準備/開催

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
梅 川 正 美	法 学 部	教 授	論文作成・学会企画/準備/開催
竹 田 真 紀 子	総 合 政 策 学 部	講 師	現地調査・分析・論文作成・学会企画/準備/開催
須 藤 季 生	Thammasat University, Faculty of Political Science	教 授	現地調査・分析・論文作成
Nyo Maung	Yangon University	客 員 教 授	現地調査・分析
Sameer Deshkar	Visvesvaraya National Institute of Technology	講 師	論文作成・学会企画/準備/開催

ミャンマーの政治的発展と民主化への移行過程における政策的課題 —地域市民社会団体の役割と積極的貢献の促進—

1. 研究の目的

- (1) 現在急速な経済改革が進むミャンマーの民主化への移行プロセスを精査し、政策の正当性という観点から現状を理解・把握する。
 - ① 現在の民主化への移行プロセスは、旧軍事政権において重要な役割を担っていた軍人や元軍人によって依然として統制されており、透明性に欠け、国家、制度、国民に非常にネガティブな影響を及ぼしているという影の側面が存在する。
 - ② よって、政府主導で実施されている大規模な開発プロジェクトは、天然資源を失うだけでなく、国民から家、土地、仕事、健康、教育の機会、社会保障をも奪う結果となっている。
- (2) 近年、政治的発展や民主化への移行過程において積極的な貢献をしつつあるLocal CSOsとglobal/regional CSOs、メディア、特に国外の学者が協力できる環境を作ることによってLocal CSOsのさらなる活性化を目指し、真の民主化に向けた枠組みを作る。これを学者が主導してAcademic Diplomacy（学術外交）を通して実施する。
 - ① Local CSOsは、政府機関と連携しながら地域住民のニーズ供給のプロジェクトとして、トレーニングや教育支援を行なっている。またinternational/regional NGOsと協力することによって、ミャンマーの大半である貧困に苦しんでいる人々たちに利益を生み出すために、社会政治的なスペースを自ら模索し、つくり出している。
 - ② しかし、CSOs、反政府組織、民族グループやその関係者といった人たちは、和平会議など民主化への必要な移行プロセスから除外され、草の根レベルで活躍しているCSOsの意見が十分に反映されないのが現状である。

2. 研究の計画

- (1) 最重要であると考えられる10の分野を通してミャンマーの政治的な移行、社会環境および政治と行政の変革についてLocal CSOsに関連する学際的で包括的な政策研究を3年間の調査期間の間に行うことを予定している。
 - ① その10の分野は以下の通りである。1) rule-based societal building 2) media freedom in public education and information dissemination 3) religious harmony and ethnic diversity 4) environmental health and community security 5) human security and human rights 6) development, international assistance and democracy 7) transboundary water impacts and resource management 8) sustainable ecosystem services and ecological performance of human settlements 9) local-global interaction and interdependence on governance 10) Myanmar's cooperation in neighbors, Mekong sub-region and ASEAN
 - ② Local CSOsをエンパワーし、global/regional CSOs、世界のメディア、特に国外の学者が協力できる体制を確立する。
 - ① Local CSOsに焦点を当て、その役割、責任、実行力、限界について分析を進める。
 - ② Local CSOs、global/regional CSOs、世界のメディア、国外の学者が、それぞれの研究や課題を共有し、協働して問題に取り組むことができる機会を、フォーラム、学会、シンポジウム、専門家会議、ワークショップ等を通して作る。
 - ③ 上記②の機会を通して、協力して課題に取り組むことができるよう10の分野の中から新たな政策研究プロジェクトを計画・実施する。このように常に、それぞれの課題において、様々な分野や立場のアクターが、協力できる体制をAcademic Diplomacyを通じて構築する。
- (2) Local CSOsをエンパワーし、global/regional CSOs、世界のメディア、特に国外の学者が協力できる体制を確立する。

3. 研究の成果

- (1) 28年度は、前述の10の分野から特に、3) religious harmony and ethnic diversity 4) environmental

health and community security 5) human security and human rights 7) transboundary water impacts and resource management 8) sustainable ecosystem services and ecological performance of human settlementsの分野に関して政策研究を実施した。

- ① 政策研究に関しては、一部学術論文として報告しているが、現在昨年度の研究全体について書籍出版の準備を進めている(5. 研究発表参照)。
- ② 2017 年度に向けて共同研究計画を立案し、その研究テーマ「ミャンマーの国境地域や農村部の地域発展、社会レジリエンスの構築、子供の権利の促進における女性市民社会団体の役割と効果」「‘responsible’ and ‘filtered’ and ‘sustainable’である、求められる日本からの支援、多国からの支援者や外国直接投資のあり方」の情報収集を実施した。
- (2) 研究協力体制の構築と共同プロジェクト実施に向けての活動と成果
 - ① 国際フォーラムを企画・実施し、ミャンマー、インド、タイ、イギリス、オーストラリア、アメリカのアジア研究の専門家、学生、メディア及び様々な分野のCSOsの代表者、日本の学者及び学生を含む合計70名が参加した。12/21-23までは、2nd AUNFAIR 2016 (テーマ: Academia and CSOs in Mass Communication, Ecological Resilience, Social Transformation and International Development) としてミャンマーを中心とするアジアの問題に関して、5つの基調講演、6つのセッション、3つの特別レクチャー、3つの学生によるセッションを含む合計42の研究発表及び討論会が実施された。
 - ② 学会と同時開催でミャンマーの写真家による写真展「Law, Land, and Lives」とインドの持続可能な社会に関するポスター発表「Society, Survival, and Sustainability」も実施された。
 - ③ 12/24 は、3 日間の学会を踏まえ専門家会議 [TIJ Conclave2016: テーマ: Women’s rights, Ethnic diversity, Natural resources, Community security in Burma/GMS Countries] を開催し、学者、CSOs、メディア、学生の研究協力体制を促進した。また、2 つの基調講演及び 10 の最重要分野の中から 4 つのテーマに沿ってラウンドテーブルセッションを行い、それぞれのテーマに関して研究プロジェクト立案及び出版に関する協力の確認をした。
 - ④ 3/8-9 に名古屋大学との共同主催で、BSSS (Burma Studies Special Symposium)を企画し、7 つのスピーチ、3 つの講義及び 8 つの研究発表が実施された。また、新たな研究プロジェクトを検討するとともに、研究協力体制の確認を行った。
- (3) 実地調査及び(1), (2)の成果
 - ① ミャンマーの Mon、Karen、Tanintharyi 地域のコミュニティーにおける支援促進、市民参加、地域調査、民主主義文化の強化について、ミャンマーの国内外の学者、地域の市民社会団体、メディアの間の効果的な協力体制とその方法や機能を明らかにすることができた。
 - ② ミャンマーの地域大学の学者やメディアと市民社会団体、国外の学者等の対話や意見交換が促進され、ミャンマーの研究地域における社会・生体システムレジリエンス、地域の安全保障、民族の関係、社会の調和を Academic Diplomacy(学術外交)を通して改善していく基盤を構築することができた。
 - ③ 民主主義文化への寛容さ、全ての民族を含んだ発展プロセス、民族、宗教、権利に対する平等の促進に向けての、異なった地域の構造、多様な政治勢力、多様な国外からの関心、基本的な国内の課題、組織的な問題を比較することができた。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の反省及び研究計画の不本意な中止について

- ① 本研究は、3年間のプロジェクトにおいて、10つの最重要分野において、ミャンマーの政治的課題に関する学際的で包括的な政策研究及び民主化や発展に重要な役割を果たしている Local CSOsと様々な国の学者、メディア、市民が協力できる体制を構築することによって、Local CSOsをエンパワーし、真の民主化の促進をすることであった。
- ② しかしながら、2年目の研究計画に関する書類を準備後、公募の締め切りの4日前になって突然に、大学側から予算の制約のため2年目の公募に応募することができない旨を告知された。

- ③ よって、2-3年目に予定していた分野の政策研究及びCSOsと学者、メディア、市民の協力体制の構築も半ばにおいて中断せざるを得ない状況になっている。
 - ④ 上記のような状況であったため、なんとか1年以内に最大限の結果を残すために、当初は、最重要分野のうち4分野の政策研究を1年目を実施する予定であったが、5分野に増やして実施し、活動においても予定していたよりも多くの活動（フォーラム、シンポジウム、専門家会議の開催等）を実施した。これを通じて、Local CSOsに貢献し、研究協力体制の基盤を築くことができた。よって、できる範囲内での意義ある活動はできたと思われる。
 - ⑤ 研究代表者・分担者及び研究に関わっている世界中の研究者一同は、3年間で計画しているプロジェクトをこのような形で終わらせなければならなかったことについて非常に残念に思っている。そのようなことが今後起きないように、3年間のプロジェクトとして応募した研究計画については、学内の資金的サポートも含め、3年目まで応募することができる権利を持つことができることを強く希望する。
- (2) その他の調査結果に関する反省と考察
- ① 日本国内外の学者、メディア、CSOsが非常に効果的に協力することができ、知見を共有し、さらなる協力体制を構築するなど、プロジェクトの1年目は、ミャンマーの民主化への移行過程における地域の安定や発展、地域のCSOsのエンパワーメントに大きく貢献できた。
 - ② 1) Local CSOs 2) 地域のボランティア学生 3) 国内外の学者及び退職者 4) 地域の民族リーダー・長老 5) 地域のフリーのメディア関係者からの意見取り入れ、嘘のない真の協力体制を構築できた。また、地域の環境、女性の権利、人間の安全保障の促進、天然資源の共有および地域の自治体に地域住民の声を届けるといったCSOsの活動を促進することで、健全な民主化への移行に協力できた。
 - ③ 本研究のアプローチであるAcademic Diplomacyを通じて、研究の目的を達成するためのネットワークと基本的な協力体制構築の基盤作りをすることができた。今後プロジェクトの活動を通じて、国内外の学者、Local CSOs、メディア、市民が協力体制を継続していくことは、日本とミャンマー両国において非常に重要であると言える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 竹田真紀子 (2016) 「メータオクリニックのライフラインとしての医療サービスと今後の可能性～ボランティアの視点から～」『総合政策学会総合政策研究』第19巻第1号33-44頁
- ② Ferguson, J. (2017) Ethnic Alienation: Examining History, Categories and Contemporary Violence in Myanmar. *POSDI Working Paper Series 2016-2017*, 5,16-23.
- ③ Naw Thiri May Aye. (2017). The Role of Women Savings Groups on Post-Disaster Recovery: Assessment of Disaster Affected Areas in Myanmar. *POSDI Working Paper Series 2016-2017*, 5,45-65.
- ④ San Tha Tun. (2017). Indigenous Knowledge and Planning on Sustaining Fishery and Coastal Resources for Community Development in Kyaikkhami, Mon State, Myanmar. *POSDI Working Paper Series 2016-2017*, 5,67-77.

(2) 口頭発表

2nd AUNFAIR (Asian University Network Forum on Advances in Research, December 21-23, 2016 at Aichi Gakuin University, "Academia and CSOs in Mass Communication, Ecological Resilience, Social Transformation and International Development"

- ① Yamahata, C. Academic Diplomacy in Tackling Asian Regional Theme: Possibilities and Challenges.
- ② Takeda, M. The Possibility of Plurilingualism for Equality and Social Cohesion in Divided Society
- ③ Ferguson, J. Ethnic Alienation: Examining History, Categories and Contemporary Violence in Myanmar
- ④ Seekins, D. Naypyidaw: An Elite Vision for Burma's Future?
- ⑤ Ye Myo Hein. Who Will Guard the Guardians in Myanmar and How: The Civil-Military Relations

under the NLD Government

- ⑥ Houtman, G. How Buddhists are Buddhists? Rites of Passage and the Beiktheik Saya
- ⑦ Thein Lwin. Challenges and Opportunities for Educational Reform Under the New Myanmar Government
- ⑧ Khen Suan Khai. The Situation of Freedom of Religion and Belief in Myanmar: Case Study of Ethnic Chin Christian in Myanmar
- ⑨ Min Zin. Making Sense of “Changes” in Myanmar
- ⑩ Yin Yin Aye. Environmental Management and Planning of Mineral Resources in the Southern Part of Myanmar
- ⑪ San Tha Tun. Indigenous Knowledge and Planning on Sustaining Fishery and Coastal Resources for Community Development in Kyaikkhami, Mon State, Myanmar
- ⑫ Thant Zin. Competition for Resources, Ecological and Social Impacts of Development, and the Role of Civil Society in Myanmar
- ⑬ Maw Htun Aung. Sound Natural Resource Governance - An Impetus for Peace?
- ⑭ Okkar Phyo. About Platform Economy in Myanmar: Just a Vision or Possibility?
- ⑮ Naw Thiri May Aye. The Role of Women’s Savings Groups in Post-Disaster Recovery: Assessment of Disaster Affected Areas in Myanmar
- ⑯ Tin Nwe Oo. Challenges to Reproductive Health Services for Human Development in Burma: Viewpoint from Adolescent Fertility in Delta Region
- ⑰ Iwamoto, M. Urgency of Refugees in the Thai-Burma Border Region: The Role of MTC and CDC
- ⑱ Takahashi, Y. Burma’s Vulnerability to Climate Change Related Events – The Importance of Mangroves in Reducing the Impact of Such Events

BSSS (Burma Studies Special Symposium) March 8-9, 2017 at CALE of Nagoya University, “Challenges, Opportunities and Relations of Myanmar/Burma in Democratic Transition”

- ① Takeda, M. Reviewing Burma Under New Openings and Diverse Agenda Against Different Transitional Settings
- ② Turnell, S. Economic Policies of Myanmar to Support National Reconciliation
- ③ Yamahata, C. Roles of CSOs in Strengthening Communities in Burma on the Road to Democracy
- ④ Cho Cho. CSOs Viewpoint on Balance of Development and Environment for Sustainability
- ⑤ Voravit Suwanvanichkij. Perspectives on Linkages between the 2008 Constitution, Federalism and Social Sector Reform
- ⑥ Maw Htun Aung. Environmental ‘Health’ and Freedom from Resource Curse
- ⑦ Cho Cho. Capacity Building, Social Impact Assessment and ‘Healthy’ Rural Development
- ⑧ Doi Ra. Human Health and Community Security on Ethnic and Border Lands
- ⑨ Turnell, S. Sustainable Development Prospects through ‘Healthy’ Economic Reforms
- ⑩ Bo Bo Aung. The Present and Coming SEZs in Burma for ‘Healthy’ and ‘Responsible’ Investments
- ⑪ Shwe Sin Hlaing. CSOs’ Initiatives and Public Participation for ‘Healthy’ Peace Process
- ⑫ Sai Leng Learn Kham. ‘Healthy’ Rivers, Ecosystem Services and Lives
- ⑬ Ferguson, J. Toward a ‘Healthy’ Democratic Transition from Ethnic Dimension

(3) 出版物

- ① 竹田真紀子・山旗張星允(2017)「(仮) ミャンマーの民族女性市民社会組織の女性の権利の保護と促進における役割と機能」コン・テイリ (編) 『講座アジアの法整備支援-第9巻 ASEAN共同体の形成と法整備の課題』名古屋：名古屋大学出版 (印刷中)
- ② 須藤季夫・山旗張星允(2017)「進展する日本・ASEAN関係と戦略パートナーシップの探索」コン・テイリ (編) 『講座アジアの法整備支援-第9巻 ASEAN共同体の形成と法整備の課題』名古屋：名古屋大学出版 (印刷中)
- ③ Yamahata, C., Takeda, M., and Seekins, D. (Eds.) Academia and CSOs Exploring Regional Themes: Social Transformation and International Development from the Dimension of Burma, India and Thailand (編集集中)

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	平成29年3月31日 退職	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	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 勲 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・研究員	被災地研究メンバー・ 地域福祉
藤 井 博 志	関 西 学 院 大 学 学 部 人 間 福 祉 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 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28年度は、三年間にわたるアクションリサーチの最終年次であった。過年度の目標「アクションリサーチの組織化および実験的推進」「アクションリサーチの展開」に続き、当該年度は「アクションリサーチの総括と人材育成への適用」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) フィールド拠点のネットワーク化

過年度においてフィールドワークを蓄積してきた下表の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）を中心に、これらにおける現地研究会、フィールドセミナー、実践経験交流等を通じて、今後の相互支援体制のための組織的基盤を構築する。

拠点フィールド	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	高知県黒潮町 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

各フィールドでは、そこで進行中の活動（アクション）をめぐって「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し、これを研究方法論として確立するとともに、フィールド実践者の自己発見的(heuristic)な学びの場とする。

(2) 理論的総括

実践者を含む定例研究会では、フィールドでの多様な事例を横断的に分析し各事例を相対化するための理論的な準拠枠を確定する。成果は国際シンポジウム、共同研究書で発信する。

(3) 人材育成の制度化

研究成果の社会還元のために、知見とフィールドを「大学院履修証明プログラム」に提供するとともに、福祉社会開発人材養成をめざすリカレント教育としての自立的な事業化や、フィールド型大学院教育プログラムの制度化を果たす。あわせて拠点フィールドを中心とする現場での実践人材の育成・再教育のために、本学の知的支援体制（政策提言や助言などの社会貢献チームの設置、実践事例教材の提供、研修プログラム開発等）を成立させる。

3. 研究の成果

(1) フィールド拠点のネットワーク化

- 研究者単独での各地調査の他、研究チームによるフィールドワークを前掲地域で実施した。

かつ、そこにフィールド間の実践者交流や、専門職業人・大学院生の教育プログラムを統合した。例示すると、高知県土佐町フィールドワーク（2016年6月）、韓国ソウル市の「洞」住民センターを中心とするまちづくりモデル地区のフィールドワーク（2016年6月）、西宮市社会福祉協議会の地域福祉推進現地研究会（2016年7月）、滋賀県高島市「ぎょうれつ本舗」フィールドワーク（2016年9月）、大阪府北芝地区フィールドワーク（2016年10月）、熊本県西原村NPO法人にしはらたんぼぼハウスでの被災者交流フィールドワーク（2016年10月）、ソウル市福祉財団招聘研究会（2017年2月）等である。また地域福祉とまちづくりの焦点となる「コミュニティ組織化」について、韓国住民運動情報教育院（CONET）との共同研究会を継続してきた。大阪市立大学都市研究プラザとの共同研究は同プラザからの出版に結実した。

■これらを通じて、過年度に拠点として設置してきた中土佐町地域福祉研究所、高浜市のまちづくり研究センターに加え、日本福祉大学・土佐町共同の「集落福祉研究所」を設立した。

■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を継続した。これは、途上国という「制度がない社会」での作業療法のありようと比較して分析した。また、アジアの視点から日本の貧困の特色をみる基礎的研究に、開発支援NGOパルシックと協力して着手した。

■かくして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、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）、NPO障害平等研修フォーラム、ソウル福祉財団、韓国CONET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して活用された。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とめつつ実施し、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。

(2) 理論的総括

■高齢化し孤立する中山間地、貧困と社会的排除が進行する都心荒廃地、そして被災地や途上国農村など、制度がギャップを生じて機能しにくい領域や、制度が不在ないし喪失した社会が、本研究の対象であった。これらを類型化し、制度外で地域住民がつくり出す福祉メカニズムの生成を観察するために、中核的なフィールドを選んだ。しごとの場を身の周りにつくり出し、高齢者コミュニティの社会参加を維持する「集落福祉」（高知県）、つぶやき拾いが多様なまちづくりアクションに結びつき、それらの統合の枠組として共済組合を軸とする地域福祉が生成していく「コミュニティマネジメント」（北芝地区）、被災地で中間組織が支援して住民同士の支えあい空間を生成させる「地域共生拠点づくり」（石巻市、大槌町）である。分析の枠組みとして、マクロレベルの「支援的政策環境」、メゾレベルにおける「関係変容の場の形成」、ミクロな支援の場での「相互エンパワメント」を想定してアプローチした。

■この結果「福祉社会開発の実践モデル」の準拠枠として「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」というプロセスを検証できた。またそのプロセスにおいては、制度と非制度を結ぶ「中間的社会空間」の存在が共通しており、いわゆる「地域支援」とは、この空間を構成する場、関係、活動に働きかけるべきであることを見出した。

■これら暫定的結論は、ニューズレターで発信するとともに、World Conference on Social Work, Education and Social Development（2016年6月、ソウル）や、ソウル市福祉財団と共催した韓日共同フォーラム（2016年7月）で報告し、最終的には共同研究書『地域共生の開発福祉：制度アプローチを越えて』（2017年3月）として刊行した。

(3) 人材育成の制度化

■本研究成果の社会還元として既に「地域再生のための福祉開発マネジャー養成プログラム」の開設があるが、本年度はとくにその自立的運営に努め、定員（15名）を満たす受講生を迎えることができた。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、本研究が開発したフィールド（高知、北芝）と、研究成果として作成した教材（テキストおよびビデオ）を活用するものであり、かくして社会人リカレント教育という学園戦略の促進に貢献した。

■本研究では、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」的にモデル化する作業として「障害平等研修」(DET)に注目し、分析を踏まえた研修モジュールを作成してきたが、本年度はNPO法人DETフォーラムと協力して名古屋（2017年1～2月）と群馬（2016年7月～2017年3月）で研修事業を展開した。その結果、DETは内閣府のオリンピックパラリンピック向け「ユニバーサルデザインの社会づくりに向けた試行プロジェクト」に採択された。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の知見

■最終年度の大きな成果は、アジア福祉社会開発研究センター編『地域共生の開発福祉：制度アプローチを越えて』の取りまとめである。上記の理論的総括を踏まえ、伝統的ソーシャルワークを越える「開発福祉」的支援ワーク概念を提起した。開発福祉とは、地域の中で人びとの関係を再生させながら、市場から排除されがちな人にも地域経済への参加の機会を広げ、制度の狭間にある人も含め地域で支え合う仕組みをつくり出すプロセスであり、またそのための支援アプローチである。これを以て、本学の21世紀COEプログラム「福祉社会開発の政策科学形成へのアジア拠点」共同研究（2003年から5年間）に始まる「福祉」と「開発」の融合の試みに、一定の結論を与えることができた。

■本研究の対象の中で、東南・南アジア農村は「制度がほぼ不在の社会」に類型化されるが、これらフィールドは参加研究者個人に任され、今年度のチーム作業としては十分にカバーし得なかった。一方、韓国との交流・共同研究からは多くを学んだ。今後のアジア規模の開発福祉教育・研修のためには、さらなる体系化とともに比較研究の観点を強化しなくてはならない。

(2) 波及効果

■「開発福祉」の研究教育は、本学の新たなアイデンティティの一つとなりうるもので、それを開拓した意義は大きい。それを推進するためのメカニズムとして、学内的には、大学院のフィールド型演習のための教材作成と演習現場の開発が、本研究を通じてなされた。学外的には、フィールド拠点のネットワーク化を進め、そこへの本学からの知的支援体制（研究所設置、助言、研修資料、共同研究等）を一定程度整えることができた。ただし、これを活性化した状態に保つには、柔軟かつ継続的な今後の交流が必要とされる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①穂坂光彦「居住の権利の現在：アジアの居住問題をめぐって」『住宅会議』日本住宅会議、99号、2017年2月、31-34.

②藤井博志「地域福祉実践のプロセス分析と事例化の方法—コミュニティワーク実践を中心として—」『地域福祉実践研究』日本地域福祉学会、第7号、2016年5月、3-9.

③全泓奎「同和地区の事例から見た被差別部落地域の包摂型地域再生に向けたアクションリサーチ」『LHI Journal』韓国土地住宅公社土地住宅研究院、Vol. 7、No. 2、2016年、121-129.

④久野研二「障害平等研修 (DET)」異文化間教育 Vol. 45、2017年3月、9-18.

⑤久野研二・千葉寿夫「障害平等研修：共生社会に向けた『障害の社会モデル』の視点と行動」『作業療法ジャーナル』Vol. 50、No. 6、2016年6月、578-582.

(2) 口頭発表

- ① Mitsuhiko Hosaka, “Community revitalization for inclusive development: Shaping an intermediate social space” Expert Group Meeting on Regional Development in the Context of the 2030 Agenda for Sustainable Development, the United Nations Centre for Regional Development, Nagoya, 30-31 August 2016. (招聘講演)
- ② 吉村輝彦「公共施設マネジメントの推進における住民参加」ワークショップ「公共施設・インフラマネジメントとこれからの自治体経営」日本計画行政学会第39回全国大会、関西学院大学、2016年9月.
- ③ 吉村輝彦「地域まちづくりを推進する創発的なプラットフォームの意義」日本建築学会大会、福岡大学、2016年8月.
- ④ 明石雅世・朴愈美「地域福祉活動計画の継続的推進を通じた住民参画組織の持続可能性－A社会福祉協議会での取り組み事例から」第30回日本地域福祉学会大会、日本社会事業大学、2016年6月.
- ⑤ 小木曾早苗・平野隆之「中山間地における地域福祉拠点づくりによる戦略的な人材育成の方法－高知県中土佐町の参与観察から」第30回日本地域福祉学会大会、日本社会事業大学、2016年6月.
- ⑥ 久野研二「多文化共生社会における合理的配慮：障害平等研修ワークショップ」異文化間教育学会第37回大会、桜美林大学（東京）、2016年6月.
- ⑦ Kuno, Kenji “Disability Equality Training (DET): Disability Rights Education by Persons with Disabilities” 10th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM) World Congress, Malaysia, Kuala Lumpur, 2016年5月.

(3) 出版物

以下の①から⑬は、いずれも共同研究書である日本福祉大学アジア福祉社会開発研究センター編『地域共生の開発福祉：制度アプローチを越えて』ミネルヴァ書房（2017年3月）に収録の論文である。頁数のみを記す。

- ① 穂坂光彦「開発福祉の視点」 pp. 19-35.
- ② 平野隆之「開発福祉への接近、開発福祉による接近」 pp. 3-17.
- ③ 平野隆之「共生空間をひろげる共生型ケア拠点の政策化－富山・熊本・高知三県の試み」 pp. 211-225.
- ④ 雨森孝悦「集落が生き続けるためのしくみづくり－土佐町の生産と福祉を結ぶ集落活動センター」 pp. 53-67.
- ⑤ 吉村輝彦「『たつせがある』まちづくりの推進－長久手」 pp. 102-115.
- ⑥ 小国和子「『考える農民』としての暮らしを支える多機能ワーカー生活改善と庭先集荷から学ぶ」 pp. 85-98.
- ⑦ 朴愈美「コミュニティマネジメントによる福祉とまちづくりの融合－韓国城東住民会と箕面市北芝」 pp. 135-149.
- ⑧ 朴愈美・平野隆之「まちづくりによる福祉の地域展開－高浜市」 pp. 117-130.
- ⑨ 小木曾早苗「社会参加をすすめ地域課題を解決する『しごとづくり』」 pp. 69-83.
- ⑩ 藤井博志・清水明彦「地域共生社会をめざす持続的な開発実践－西宮市社会福祉協議会青葉園」 pp. 181-194.
- ⑪ 久野研二・曾田夏記「障害平等研修がもたらす地域の変容」 pp. 209-210.
- ⑫ 穂坂光彦「包摂型アジア都市への『中間的社会空間』試論」大阪市立大学都市研究プラザ編『包摂都市のレジリエンス：理念モデルと実践モデルの構築』水曜社、2017年3月、pp. 195-206.
- ⑬ 全泓奎「東アジア都市における生産主義福祉モデルと居住福祉の実践」大阪市立大学都市研究プラザ編『前掲書』 pp. 171-184.

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 授 研 究 員 長	○研究代表者・研究統括 ○考古学調査、資料整理・分析、地域教育普及 活動

○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 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 授 主任研究員	○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、各自治体との交渉

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) ラスベガス遺跡考古学調査
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・ブランカ地区ラスベガス遺跡の考古学的研究、とくに2年間の調査で確認した祭壇建築の時期と構造の解明を目指す。
- (2) ティエラ・ブランカ地区での博物館活動
ティエラ・ブランカ地区での地域博物館づくりに向け住民意識の向上をはかる。
- (3) ブルーフィールズ・インディアン・カリビアン大学（以降、BICU）附属研究所である大西洋沿岸地域調査記録センター（以降、CIDCA）との共同研究による考古学と人類学、文献学の調査
 - ①カリブ海側出土遺物の考古学研究を行い、先住民文化の多様性と同質性、太平洋側など他地域との交流を明らかにする。
 - ②コスタリカを含むカリブ海地域の歴史と社会に関する文献学研究・社会学・人類学の調査を実施し現代的課題を明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) 現地調査
 - ①9月：ラスベガス遺跡における考古学（発掘調査など）調査を実施。また、ティエラ・ブランカ地区住民や学校を対象としたワークショップ「博物館て何？」を開催。
 - ②9月：CIDCAと協力し、先住民文化、アフロ文化の歴史資料を収集する。また、コスタリカ側においても資料を収集する。
 - ③2月：ラスベガス遺跡発掘調査。調査3年間の研究成果を踏まえた意見交換会を開催
- (2) 国内調査研究
4月－12月：2016年考古学調査報告書を作成。12月ニカラグア文化庁へ提出する。
- (3) 研究交流・成果報告
日本ラテンアメリカ学会にて研究成果を報告する（6月）とともに、8月末に京都で開催される第8回世界考古学大会連携シンポ（国際文化資料館主催）にて成果を発表する。1月には国際文化資料館にて『調査成果展』を開催する。

3. 研究の成果

- (1) ラスベガス遺跡考古学調査
 - ①現地調査：9月に京都で開催された第8回世界考古学大会運営への参加、関連研究活動実施のため、発掘調査は実施しなかった。
2月には、マウンド1の頂部に確認していた石組み遺構のさらなる掘り下げを実施した。その結果、建造物のかく乱されていない構造と思われる土層とそこからさらにほり込まれたと思われる土坑を確認した。
 - ②出土遺物：調査ではカリブ海側の土器と指摘があったものと類似する土器片が見つかり、この土器の出自と年代がティエラ・ブランカ遺跡のスタートを考える上で重要である。
- (2) ティエラ・ブランカ地区での博物館活動
 - ①3月調査報告会と現地説明会の開催：今回も発掘調査終了後、調査報告会と現地説明会を実施した。今回、駐ニカラグアの安藤日本大使夫妻が見学に見えた。
 - ②ティエラ・ブランカ地区住民へのワークショップ「コミュニティ・ミュージアムって

何？」を開いた。これは今回発掘調査に参加した3名の京都外国語大学学生が「村の女の子」「考古学者」「学芸員」の役になって紙芝居的にコミュニティ・ミュージアムについて解説した。その後のアンケートの結果、住民が主体となった「コミュニティ・ミュージアム」にむけて、「こどもたちのため」「自分たちの歴史を知るため」という意見が多く出た。また、それを観光に結び付け村を発展させていくなど住民自身の主体性を感じる回答が前回（2016年）に比べて増えた。

なお、この報告会に同席したマティグアス市長は、2018年度からコミュニティ・ミュージアム建設を始めると発表した。また、日本側からの支援課題についても安藤大使に話を はじめており、このプロジェクトの当初からの目的である日本の草の根的援助として形が できはじめた。

(3) カリブ海側地域研究の成果

- ①CIDCAとの協定：9月、CIDCAと京都外国語大学国際文化資料館（以降、MIC）との協定を結ぶための協議を行った。協定によって共同研究が効果的かつ継続的に実施できる。

その結果、2017年6月BICUと京都外国語大学は、CIDCAとMICの博物館協力を基盤とした協定を結んだ。

- ②人類学調査：2016年6月4・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のパネル発表において、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「ニカラグア・大西洋岸地域における開発の歴史と現状」をテーマにパネル発表を行った。この中で植村まどか氏（京都外国語大学院博士課程後期）は、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」の参加成果（平成28年度科研費基盤B海外：南博史代表）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。一方で各コミュニティ間にはテリトリー問題がある。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。

この成果を踏まえて、カリブ海側の内外面の問題の現状を明らかにすることを目的に、2017年3月にブルーフィールズでの人類学的調査を開始した。短期間の調査であったが、太平洋側とはまた異なった歴史を背景にカリブ海側には多様な民族グループとコミュニティがモザイク状に位置する。太平洋側のスペイン文化の影響とは異なり、明らかに英国の影響をもとにクレオール文化が形成されていること、さらにカリブ海全域のアイデンティティとして、カリビアンという意識も形成されつつあることが報告された。一方、外部とくに太平洋側からの新たな入植者たちとの土地問題があらたな課題になりつつあるとのことであった。

こうした成果の背景には、すでにブルーフィールズ・インディアン・カリビアン大学（BICU）の付属研究所である大西洋沿岸地域調査記録センター（CIDCA）に所蔵されている文献、考古学資料の調査を開始していたこと（平成27年度）、CIDCA所長の全面的協力を得ることができたことが大きい。

- ③考古学調査：ラスベガス遺跡とカリブ海側の土器の類似について、CIDCAおよびニカラグア自治大学考古学情報機関（以降、CADI）にて現状を確認した。これによれば近年カリブ海側チョンタレス地方で出土しているJobo rojo exciso式土器と近似しており、時期的には紀元前500年～200年にあたるというコメントがあった。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、C14年代調査を含めた実証的研究が必要である。

(4) 国内調査研究および研究交流

- ①国際文化資料館第3回研究講座WAC8関連企画／国際シンポジウム「考古学と博物館～考古学と社会をつなぐ博物館とは～」開催。研究分担者が所属するCADIの研究者やコスタリカの博物館の学芸員を招聘した。3年間の研究の成果をとりまとめる機会となった。また、これ

に関連したパネル展を学内で開催した。

②2月：2016年考古学調査報告書を作成、ニカラグア文化庁へ提出した。

4. 研究の反省・考察

(1) ラスベガス遺跡考古学調査

考古学調査：調査期間などの課題もあって調査が遅れている。しかし、博物学的にとらえれば住民理解を一步ずつ進める上では良かったと考える。また、キラグア山系西麓にフィールドを広げていくためには今後もゆっくりとしたペースでの調査を進めたい。

(2) ティエラ・ブランカ地区での博物館活動

①コミュニティ・ミュージアム

これに関しては順調に研究が進んでいる。とくに市長から2018年からの建設が発表されたことは大きな成果である。また、これに対して住民も冷静に受け止めていた。これは、このプロジェクトにおいて継続的な博物館活動を通して、博物館づくりについて啓発活動を続けてきたからといえる。

②キラグア山系西麓に位置する遺跡の博物館的活用について

ティエラ・ブランカ地区における博物館活動を踏まえて、多くの遺跡が分布すると思われるキラグア山系西麓のコミュニティへの普及活動が遅れていた。今回の考古学、博物館学的成果によって他地域への啓発活動が可能となる。

(3) カリブ海側地域研究

①考古学調査：CIDCAに収蔵されている資料の調査を開始できなかった。しかし、CIDCAが独自で8月までの予定で考古資料の調査を行っており、これと共同した研究を進めることで合意できた。また、その調査の状況によれば、近年各コミュニティから考古資料発見の情報が多くあるものの博物館的還元が十分ではないことがわかった。

②人類学的調査：調査期間との関係もあり、予備調査に終わった。しかし、現地クレオール文化の現状、新しい入植者との土地問題などいくつかの研究課題を得ることができた。いずれも、今後のカリブ海側～アメリカ地中海文化圏研究にとって重要な研究と考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①辻豊治「ニカラグア大西洋岸地域における開発・自治と運河計画の影響」『京都外国語大学ラテンアメリカ研究所紀要』16号、2016年12月、75-91頁。

②立岩礼子「エリザベス朝時代（1558-1603）の私掠に関する予備的考察」『京都ラテンアメリカ研究所紀要』16号、2016年12月、141-148頁。

(2) 口頭発表

①辻豊治「ニカラグア・大西洋岸地域における開発と運河計画の影響」、立岩礼子「ニカラグア植民地期におけるスペインとイギリスの入植に伴う交易拠点の建設」、住田育法「ニカラグア・大西洋岸における地域開発とアフロ・アメリカ」、パネルE『ニカラグア・大西洋岸地域における開発の歴史と現状』第37回日本ラテンアメリカ学会定期大会、京都外国語大学、2016年6月4日。

②南博史「文化財ガバナンスの構築～ニカラグア共和国プロジェクト・マティグアスを通して～」、パネルA『文化遺産の創出と普及活動―人類学研究の新たな挑戦と課題―』第37回日本ラテンアメリカ学会定期大会、京都外国語大学、2016年6月4日。

(3) 出版物 なし

学 校 名	同 志 社 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	「良心」に関するグローバルな思想研究と実証研究の総合		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①良心 ②道徳・倫理 ③価値の多様性 ④宗教 ⑤グローバル社会 ⑥認知能力 ⑦社会福祉 ⑧建学の精神			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 原 克 博	神 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
Michel Mohr	ハ 宗 イ 大 学 部 宗 教 学 部	准 教 授	西洋史・日本宗教史における良心研究
沖 田 行 司	社 会 学 部	教 授	近代日本における良心研究
内 藤 正 典	グ ロー バ ル ・ ス タ デ ィ ー ズ 研 究 科	教 授	イスラームにおける良心研究
Samir Abdel Hamid I Nouh	一 神 教 学 際 研 究 セ ン タ ー	リ サ ー チ ・ フ ェ ロ ー	イスラームにおける良心研究
村 田 晃 嗣	法 学 部	教 授	国際政治における良心研究
位 田 隆 一	滋 賀 大 学	学 長	国際生命倫理における良心研究
内 山 伊 知 郎	心 理 学 部	教 授	発達心理学における良心研究
武 藤 崇	心 理 学 部	教 授	臨床心理学における良心研究
貫 名 信 行	脳 科 学 研 究 科	教 授	脳科学における良心研究
藤 山 文 乃	脳 科 学 研 究 科	教 授	脳科学における良心研究
櫻 井 芳 雄	脳 科 学 研 究 科	教 授	脳科学における良心研究
木 原 活 信	社 会 学 部	教 授	社会福祉における良心研究

「良心」に関するグローバルな思想研究と実証研究の総合

1. 研究の目的

本研究は、人間の意識・心理・社会参与について、長い議論の蓄積のある「良心」をキーワードとして、思想研究と実証研究を総合することによって、科学的客観性のある研究基盤の構築とその成果の社会への還元を目的とする。この目的を遂行するために、同志社大学 良心学研究センター（2015年4月設立）を研究拠点とし、これまで本学が良心教育のもとに培ってきたリソースをも十分に生かす。世界の困難な現実と付き合わせる形で、旧来の「良心」理解を再考し、「良心」の応用・実践の可能性を探求するために以下の四つの研究テーマを設定する。

(1) 良心をめぐるグローバルな思想研究

西洋において、良心conscienceはギリシア・ローマの時代から哲学者たちによって論じられ、後にキリスト教世界に引き継がれ、「良心の自由」は西洋社会におけるリベラル・デモクラシーの出発点の一つともなった。わが国では「良心」は主として道徳や倫理の中で論じられてきたが、思想的科学的に理論化されたとは言い難い。そこで、まず西洋社会における良心の思想的系譜を正しく把握することが本研究の前提となる。同時に、西洋社会と非西洋社会（とりわけイスラーム社会）との価値の対立が様々な問題を引き起こしている現状を顧みて、良心概念を西欧の伝統の中だけにとどめず、わが国も含めて、多様な価値観の併存する現代社会における「良心」の確立を追求する。良心の思想史的系譜を踏まえながら、それをグローバルな国際政治や生命倫理などの現代的課題へと接続し、良心概念を思想的に深め、応用可能性を高めることが、ここでの目的である。このため、良心をめぐる西洋と非西洋（東洋・日本・イスラーム社会）の比較研究、近代民主主義と良心、日本文化における良心等の副課題を設定する。

(2) 良心の科学的実証研究

従来、良心に関する研究はもっぱら人文社会系の学問によって担われてきた。しかし、人間の精神構造や認知能力に関する科学研究は近年飛躍的に進化し、その中心にあるのが心理学や脳科学である。本研究では、人間の善悪意識や利他的行動がどのように育まれるのかを発達心理学の視点から、また、人間の認知能力（道徳的判断）について脳科学から探求し、その成果を良心の科学研究として総合する。

(3) 良心の応用・実践の検証

キリスト教社会福祉のパイオニアとしての本学の伝統を生かし、社会福祉等の社会的実践の場で良心を展開する効果的な方法を探求し、上記1) 2) において得られた研究と照合する。それによって、本研究テーマをめぐる思想と実践の間で批判的フィードバックを行っていく。

(4) 私立学校の建学の精神の学問的展開のモデル作り

官立の学校とは異なる理念や目的をもって近代に設立された私立学校の一つである同志社は、設立者・新島襄に由来する「良心教育」を建学の精神としてきた。しかし、その精神を自校史教育の中にのみとどめれば、その精神を矮小化し、社会や世界の変化に対応できないものにしてしまう可能性もある。各学校が持つ建学の精神を学問的に進化させ、さらに社会において理解・実践可能なものとして展開していくことの有用性を実証的に示す先駆的なモデルを本研究は構築していく。

2. 研究の計画

研究目的に記した研究テーマに対応した以下の三つの研究プロジェクトを立ち上げる。各担当者が役割に応じて行った研究の経過や成果を研究会やシンポジウムで発表・討論し、成果を蓄積していく。研究成果は、随時、ウェブサイト (<http://ryoshin.doshisha.ac.jp>、日本語・英語) やYouTube動画によって公開し、研究活動の透明性と社会への研究成果還元に努める。

(1) 「良心をめぐるグローバルな思想研究」プロジェクト

① 良心の思想史的系譜

conscienceの訳語としての日本語の「良心」は文献的には1863年に初出を確認することができるが（『孟子』から採用）、conscienceはラテン語およびギリシア語にさかのぼる議論の系譜を有している。「共に知る」という原義および、そこから展開された理性や自由を人間の本质とする議論は西洋史の中で脈々と受け継がれてきた。本プロジェクトでは、その膨大な探求の蓄積を整理し、現代において有用かつ適用可能なものを抽出して、論点を整理する。この作業により、良心をめぐる研究の概念的基盤を整え、同時に、西洋由来の良心概念を相対化していくために、日本文化（宗教）における良心の研究を行う。その際、日本近代教育史の視点から、近代日本における良心およびその隣接概念（道徳・倫理など）の系譜を研究する。

②グローバル社会における良心

conscienceは西洋に起源を持つ概念であるが、グローバル化した世界においては、西洋社会と非西洋社会（特にイスラーム社会）の価値の対立を読み解きながら、「良心」概念を拡張していく必要がある。そのために本プロジェクトでは、ムスリムおよびイスラーム社会における「良心」の特質を実証的に探求する。文献的な（特にアラビア語文献における）「良心」の概念的な整理のほか、イスラーム社会や、ムスリム移民のホスト社会としての欧米において近年起こっている政治的・社会的事象をケーススタディとし、良心およびそれに関連する価値規範を分析していく。

国家や国際社会も政治・経済的側面だけでなく、価値規範（どのような価値を優先するか）の側面から考察する必要がある。本プロジェクトでは国際政治における良心、国際生命倫理における良心に焦点を当て、良心が単に個人の内面的な問題だけでなく、社会規範や国際ルールにまでかかわっている現状と課題を明らかにしていく。

(2)「良心の科学的実証研究」プロジェクト

conscienceの語源としてのラテン語con-scientiaが科学の語源であるscientiaを含むことから推察されるように、西洋の知の探求において、良心は科学的客観的な観察対象ともされてきた。近代以降、人文科学と自然科学が分節化される中で、良心をめぐる研究はもっぱら前者の領域に置かれてきたが、近年の心理学および脳科学の発展は、良心の総合的研究を再度可能にする道を開いた。本プロジェクトでは、発達心理学の最先端の知見を活用しながら、人間の良心（道徳心・利他性）を育成または阻害する要因を実証的に探求する。また、心理構造に影響を及ぼす脳の諸活動に対する脳科学の知見を生かし、人間（および他の動物）に見られる良心の機能・現象を科学的に解明していく。

(3)「良心の応用・実践の検証」プロジェクト

社会福祉（特にキリスト教社会福祉）の領域では良心の実践（他者の痛みに対する共感と援助）が重視されてきた。本研究で得られる良心をめぐる思想・現状・科学的認識を「実践知」として展開していくために、どのような条件が求められるのかを明らかにする。利己的になりがちな人間が、どのような条件や環境のもとで利他的な行為へと向かうのか、困難な状況にある人々への関心や共感は、どのように育まれるのか、その状況を変えていくための効果的な手法は何かを具体的に検証する。

3. 研究の成果

(1)良心学の方法論的基礎の形成

①上述の各研究プロジェクトにおける課題を意識しながら、研究会やシンポジウム（詳細は下記「研究発表」の「口頭発表」の項を参照）を実施し、討議を積み重ねることによって、研究分担者それぞれの専門領域から一歩踏み出して、共通の課題領域としての「良心学」を意識することが可能となった。従来、学際研究や文理融合は、異なる専門家がただ居合わせるだけで、実質的に新たな融合領域を形成することは困難であった。各研究分担者がそうした長年の課題を認識した上で、実質的な学際研究を果たそうとする意欲を持つことができたことは、大きな成果であった。

②共通のプラットフォームとしての「良心学」に歩み寄りつつ、そこで共有された知見や気

づきを、それぞれの専門領域に持ち帰ることの重要性が確認された。その課題に取り組んでいくためには、異なる専門領域と良心学を有機的に連携させる学問的方法論が必要であるが、その第一段階に至ることができた。

(2) 冊子『良心を考えるために』の刊行

①現時点での研究成果を総括するため、また、それを公にして、フィードバックを得るために冊子『良心を考えるために』を刊行し、本学教職員、学生（主として講義「良心学」の履修者）、一般市民（主としてシンポジウムの参加者）、本学卒業生（本学の東京オフィスなどで配布）に配布した。本冊子では、各専門領域の先行研究の中に「良心学」との接点が多くあることを確認・整理するために、第一部では、ブックガイドの形式をとりながら、各専門領域において「良心」がどのように位置づけられるかを記した。

その項目は以下のようになっている。1. 総論、2. 聖書と良心、3. イスラームと良心、4. 哲学と良心、5. 文学と良心、6. 社会福祉と良心、7. 経済学と良心、8. エコロジー・経済論・公害論と良心、9. 科学技術と良心、10. スポーツと良心、11. 心理学と良心、12. 脳科学と良心、13. 京都と良心。

また、第二部では、本学の建学の理念をより普遍的な歴史的背景に位置づけるために、「新島襄と良心——その歴史的背景」という主題の論考を掲載した。これは、上述の「1. 研究の目的」における「（4）私立学校の建学の精神の学問的展開のモデル作り」に対応するものである。

②本研究の特徴の一つは、研究成果をすぐに教育の場に還元し、フィードバックを得ることができる仕組みを有していることであり、本学の複合領域科目「良心学」（全4クラス）において、その有効性を確認することができた（2017年度科目「良心学」では履修学生に本冊子を配布）。

4. 研究の反省・考察

(1) 選考委員からの指摘に対する応答

「書類審査時における各選考委員のコメント」において示された課題を研究分担者の間で共有し、コメントに応えることのできる研究を心がけた。コメントの中には、「脳科学研究の成果をどのように位置づけるのか」、「「良心教育」の普遍性についての説明が望まれる」といったものがあつた。その指摘に十分に応答できる研究成果を出すことができたとは、現時点では言えないが、それぞれ、以下のように考えている。

①人間の認知的特性や認知能力（学習能力を含む）の強化をめぐる様々な「神経神話」が流布しており、科学と疑似科学の境界線が非専門家からはきわめてわかりにくくなっている。それゆえ、本研究では、エビデンスを重視した、良心の科学的実証研究の方法論的基礎を構築することを目指してきた。また、脳科学の領域においては、脳機能の補助やエンハンスメントなどをめぐる倫理的課題も立ち現れており、そうした新たな課題に対応する「脳神経倫理」（neuroethics）に寄与できる領域を「良心学」の一部として展開していく必要があることを確認し、考察を続けている。

②「良心」やそれに基づく教育が、本学の建学の理念にとって重要な意味を持つことを確認する一方、「良心」が人類にとって普遍的な課題であること、とりわけ、現代社会において問うべき価値を有することを本研究では一貫して追求してきた。国内においては、「教育勅語」をめぐる議論や、2018年度から予定されている「道徳」の教科化など、心のあり方や、道徳教育のあり方をめぐる社会的関心が高まっており、本研究では、こうした国内および国際的な社会的要請に応えることを通じて、良心の研究・教育の普遍的価値を立証していきたいと考えている。

(2) 今後の研究

先述の通り、良心学の方法論的基礎を構築することができたと考えているが、それはあくまでも第一段階であり、年度ごとに課題を整理しながら、学際研究の模範的モデル、また、

私立大学の建学の理念のよき展開事例となることを目指す予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

小原克博「スポーツと良心——知・徳・体の調和を目指して」、『同志社時報』No. 142, 2016年10月、82-83頁。

(2) 口頭発表（※をつけた者以外は、すべて良心学研究センターの研究員）

① シンポジウム「スポーツと良心——知・徳・体の調和を目指して」（5月13日）

講師：沖田 行司（同志社大学 社会学部 教授、体育会ラグビー部 部長、体育会会長）、※
溝口 紀子（静岡文化芸術大学准教授、バルセロナ・オリンピック女子柔道52kg級銀メダリス
スト）

コメンテーター：下楠 昌哉（同志社大学 文学部 教授、体育会柔道部 部長）、石倉 忠夫
（同志社大学 スポーツ健康科学部 教授）

② シンポジウム「21世紀の教育に求められているもの」（6月1日）

講師：位田 隆一（滋賀大学 学長）

コメンテーター：内山 伊知郎（同志社大学 心理学部 教授、同志社小学校校長）、木原 活
信（同志社大学 社会学部 教授）

③ シンポジウム「難民問題——世界の良心に呼びかける」（6月14日）

講師：小尾 尚子（国連難民高等弁務官（UNHCR）駐日事務所副代表）

コメンテーター：内藤 正典（同志社大学大学院 グローバル・スタディーズ研究科 教授）、
ハルドゥーン・フセイン（同志社大学大学院 神学研究科 博士後期課程学生）

④ シンポジウム「自然科学と新島襄」（6月21日）

講師：※大鉢 忠（同志社大学 理工学部 名誉教授）

コメンテーター：和田 元（同志社大学 理工学部 教授）、林田 明（同志社大学 理工学部
教授）

⑤ シンポジウム「キリスト教主義大学における建学の精神——関西学院大学における取り組み」（7月16日）

講師：※神田 健次（関西学院大学 神学部教授）

コメンテーター：横井 和彦（同志社大学 経済学部 教授、キリスト教文化センター長）、原
誠（同志社大学 神学部 教授）

⑥ シンポジウム「マインドフルネス瞑想と良心の育成 — 宗教学・脳科学・心理学からの提言」（9月27日）

講師：小原克博（神学部 教授、良心学研究センター長）、貫名信行（脳科学研究科 教授）、
武藤 崇（心理学部 教授）

⑦ シンポジウム「山室軍平——良心の実践者」（11月25日）

講師：木原活信（同志社大学 社会学部教授）、※東條政利（映画監督）

コメンテーター：和田喜彦（経済学部 教授）、川満直樹（商学部 准教授）

⑧ シンポジウム「新島襄と良心——その歴史的背景」（12月3日）

講師：伊藤 彌彦（同志社大学 名誉教授）

コメンテーター：※出原政雄（法学部 教授）、中村信博（同志社女子大学 学芸学部 教授）

⑨ シンポジウム「持続可能な文明を求めて——エコロジカルな良心の実践」（2017年1月28日）

講師：※ジョン・カブ（John B. Cobb, Jr.）（クレアモント神学校 名誉教授）

コメンテーター：小原克博（同志社大学 神学部 教授、良心学研究センター長）、林田 明
（同志社大学 理工学部 教授）

(3) 出版物

冊子『良心を考えるために』（同志社大学 良心学研究センター、2017年3月、155頁）

学 校 名	安 田 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	日本の若者の自己肯定感を規定する心理的・社会的要因の解明		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①自己肯定感 ②マルチメソッド・アプローチ ③社会差 ④世代差 ⑤エビデンス・ベース			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
橋 本 博 文	心 理 学 部	講 師	研究総括, 調査・実験の実施, 論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
池 田 智 子	心 理 学 部	教 授	調査・実験の実施, 論文作成 (実験班における研究実施)
澤 田 英 三	心 理 学 部	教 授	調査・実験の実施, 論文作成 (調査班における研究実施)
中 村 涼	安 田 女 子 短 期 大 学 科 保 育	准 教 授	調査・実験の実施, 論文作成 (調査班における研究実施)
藤 原 裕 弥	心 理 学 部	准 教 授	調査・実験の実施, 論文作成 (実験班における研究実施)
西 村 聡 生	心 理 学 部	講 師	調査・実験の実施, 論文作成 (実験班における研究実施)

日本の若者の自己肯定感を規定する心理的・社会的要因の解明

1. 研究の目的

(1)日本の若者の自己肯定感が低いという事実を、多角的なデータ収集法（マルチメソッド）により捉え直すこと。

- ・ 日本人の自己肯定感に関する従来の定量的データは、そのほとんどが自己報告型の質問項目をはじめとする顕在指標にもとづいている。もちろん、これらのデータは示唆に富むものであるが、心理学の研究においては、顕在指標と潜在指標（例えば、潜在連合テスト）によって自己肯定感の社会差のパターンが異なる——すなわち、顕在指標では日本人の自己肯定感の低さが際立つが、潜在指標では日本人も他国と同様に自己肯定的である——ことを示す知見もある（Yamaguchi, et al., 2007）。そのため本申請研究では、顕在指標だけでなく潜在指標（ないし生理指標）も用いるマルチメソッド・アプローチを展開するかたちで、日本の若者の自己肯定感が低いという事実を捉え直す。
- ・ 成人を対象とする発達のデータを集めるだけでなく、国際比較調査や小・中学生を対象とする調査も実施し、日本人の自己肯定感を多角的に捉えることを目指す。

(2)なぜ日本人若年層の自己肯定感が低く、しかも年齢を重ねるごとに低下する傾向にあるのかを明らかにすること。

- ・ 日本人（若年層）に示される自己肯定感の低さの規定因を明らかにするために、自己肯定感の社会差ないし世代差がどのように示されるのかを確認すると同時に、なぜそうした差が生じるのかを説明するための準実験的調査および実験研究を展開する。これらの研究を通じて、どうして他国と比べて日本人若年層の自己肯定感が低いのか、どうして学年が上がるにつれて自己肯定感が低くなるのかという問いに対するエビデンス・ベースの説明を提示する。
- ・ 上述した研究知見を踏まえつつ、若者の自己肯定感の低下を食い止めるための具体策についても検討し、その提示も目指す。

2. 研究の計画

(1)日本人若年層の自己肯定感を顕在指標（自己報告型の質問項目など）と潜在指標（潜在連合テストなど）を組み合わせるかたちで測定する方法を確立する。

- ・ 初年度にあたる平成28年度においては、まずノイズの少ないデータを得るために、参加者の匿名性を保証するための個室を設けて、大学生参加者が繰り返し各研究に参加できる調査・実験協力体制をまず整える。
- ・ この体制のもとで自己肯定感を測定する尺度・指標間の相関を分析し、自己肯定感を適切に測定する方法の選定・確立を行う。

(2)自己肯定感の低さを規定する要因を明らかにするための研究にも着手する。

- ・ 自己肯定感の低さおよび低下トレンドを説明するためには、それを生み出す心理的要因を明らかにすることはもちろんのこと、その背後にある社会的要因——例えば、自己肯定的な態度を他者に呈示することによって集合的に生み出される社会的な誘因構造——を解明する必要がある。考え得る社会的要因を調査によって明らかにすることができた段階で、今度はその要因を操作するかたちで、解釈や説明の妥当性を高めるための研究（たとえば、準実験的調査および実験研究）を実施する。

3. 研究の成果

(1)まず、顕在指標における自己肯定感の測定において、弁別すべき二つの側面——個人基準および社会基準にもとづく自己肯定感の側面——に着目する必要性が示され、その知見を踏まえて両側面を弁別するための尺度を開発した。

- 自己肯定感の測定にあたり、「個人的自己肯定感（自らの基準に照らして自己を受容する評価基準にもとづく）」と「社会的自己肯定感（他者との比較を通じた自己評価基準にもとづく）」を弁別するための尺度開発に力を入れた。大学生を対象とする調査のみならず、成人を対象とする発達のデータを収集し、二つの側面を弁別することの妥当性を示すデータセットを得た。（また、データセットが十分ではないためその結論を急ぐことはできないが、両尺度と心理適応感の関連性が示され、社会的自己肯定感よりも個人的自己肯定感の方がより心理適応感を予測することも示唆された。）今後は、国際比較調査や小・中学生を対象とする調査においても、今年度開発した尺度を応用し、日本人の自己肯定感を多角的に捉えることを目指した調査・実験へと展開していく予定である。

(2)日本人若年層の自己肯定感の低さを生み出す社会的要因についてもその手がかりを得た。

- 現在までの主要な知見の一つとして、日本人若年層が感じている社会観——例えば、この社会では、一度人生のレールから外れるとやり直しがきかない等、社会を生きる上で失敗は許されないと（過度に）考える傾向性——が自己肯定感を低下させる一つの要因となることを示す知見が得られている。

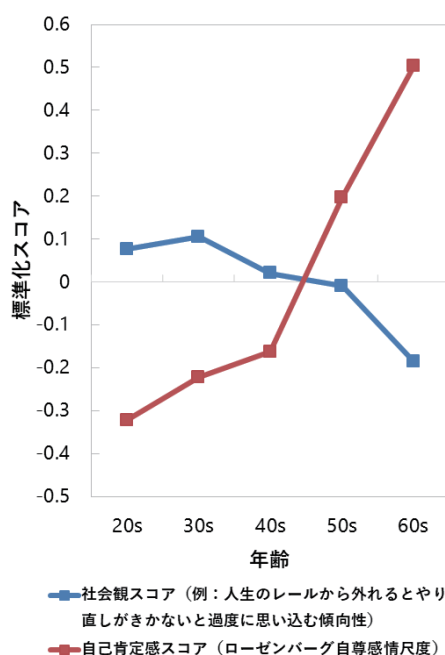


Figure 1 自己肯定感スコアと社会観スコアの世代差

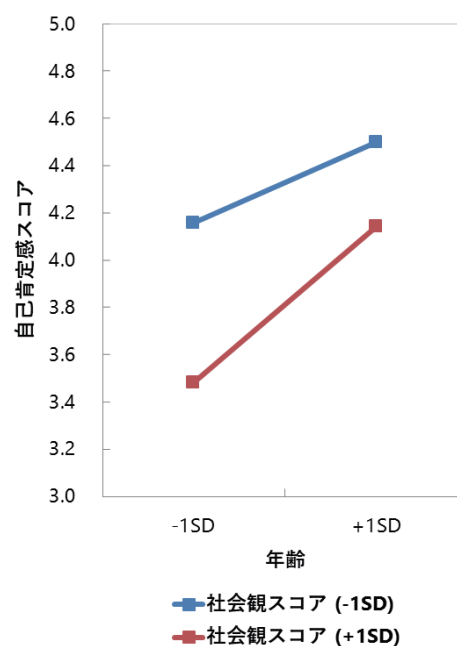


Figure 2 年齢との交互作用効果

- Figure 1に示されているように、自己肯定感スコア（ローゼンバーグの自尊感情尺度の得点）と年齢の間には正の相関が示され（ $r = .30$ ）、日本人若年層の自尊感情は老年層と比べて低い水準にとどまる傾向が一般成人約1700名を対象とする調査において示されている。そして自己肯定感スコアを従属変数、社会観スコア（日本人若年層が感じている上述のような社会観を測定するため本申請研究で独自に作成した尺度の得点）を独立変

数とする重回帰分析を行ったところ、年齢が自己肯定感スコアに対して正の効果を持つ (Standardized $\beta = 0.28$, $t(1650) = 12.39$, $p < .001$) だけでなく、社会観スコアの主効果 ($\beta = -0.29$, $t = 12.39$, $p < .001$)——すなわち、社会を生きる上で失敗は許されないと (過度に) 考える人たちは自己肯定感スコアが低い——、さらにそれらの交互作用効果 ($\beta = 0.09$, $t = 3.88$, $p < .001$) ——すなわち、若年層においてとくに、社会観スコアが自己肯定感スコアに対して負の効果を持つ——が示されている (Figure 2)。この知見の再現性も含め、次年度以降にはこうした世代差を生み出すメカニズムについてより詳細な分析を行う予定である。

4. 研究の反省・考察

(1)自己肯定感を測定する尺度・指標間の相関分析によって「個人的自己肯定感」と「社会的自己肯定感」を弁別する必要性が示されたが、その結果を解釈するためのデータの蓄積はまだまだ十分ではない。

次年度以降における対応

- ・ 顕在指標・潜在指標に加えて、生理指標を用いた自己肯定感の測定に尽力していく。
- ・ 具体的には主に実験班 (橋本・池田・藤原・西村) を中心に、現在実施している尺度・指標間の相関分析の解釈を助けるための研究に着手する。例えば、生理指標を用いた自己肯定感の測定を新たな計画として加え、心理学における先行研究を援用するかたちでストレス状況下における心拍変動 (R-R間隔) を分析の射程に収める。そして、レジリエンスと顕在・潜在両指標により測定される自己肯定感との関係等を分析する。

(2)本申請研究は、若者の自己肯定感の低下を食い止める具体策の提示も目指しているが、初年度である平成28年度には、その試みは不十分であった。

次年度以降における対応

- ・ 本研究の成果を実践の場へとつなげる動きを加速させる必要性を踏まえ、小学校における現職教員とその経験を有する二名を次年度以降の研究の分担者として加えて、実践班を新たに設ける。これにより小・中学校における調査・実験の具体化を図ると同時に、研究成果を実践の場へとつなげていくことに尽力していく。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

- ①橋本博文・池田智子・澤田英三・中村涼・藤原裕弥・西村聡生 (2016) . 自尊感情の二側面：個人的自尊感情と社会的自尊感情の弁別 日本グループ・ダイナミックス学会 第63回大会 (於：九州大学)
- ②橋本博文 (2016) . セカンドチャンスに関する信念が日本人若年層の自尊感情に及ぼす効果 日本教育心理学会第58回総会 (於：サンポートホール高松)
- ③橋本博文・宮武あゆみ・池内はるか (2016) . 青年期における居場所感が自尊感情および大学適応感に与える影響 中国四国心理学会第72回大会 (於：東亜大学)

(3)出版物

なし

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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 政 策 学 部	准 教 授	英国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	龍 谷 大 学 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	龍 谷 大 学 法 学 部	准 教 授	憲法学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
八 木 橋 慶 一	高 崎 経 済 大 学 部 地 域 政 策 学 部	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
福 島 都 茂 子	宮 崎 産 業 経 営 大 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
城 下 賢 一	大 阪 薬 科 大 学 薬 学 部	准 教 授	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 村 和 正	龍 谷 大 学 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

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の条件である市民性を高めるための方法論を追求していく。

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、国民の義務に関する認識の促進やグローバル化への対応力の強化ではなく、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。

2016年度中には、選挙権年齢引き下げ後初めての国政選挙（参議院議員選挙）が予定されていたため、特にそのことを意識した実践的な取り組みを行うとともに、3年計画の2年目にあたため、中間発表的な機会を設けることをも目指して活動を進めた。

2. 研究の計画

本研究は、3年間の研究期間の中で、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に関する知見を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2年目である2016年度には、主として以下のような活動を予定していた。

- (1) 先行研究の検討に加え、研究会等でのメンバー間の議論を通じて、本プロジェクトとしての「シティズンシップ教育」の把握と意義づけを行うとともに、「政治的リテラシー」の概念を明確化し、その状況や変化を検証するための方法を探求していく。
- (2) 自らが暮らす社会や政治に主体的に関わろうとする意識を高め、またそのような態度を涵養しうる授業実践のあり方を模索していく。
- (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を把握し直すとともに、シティズンシップ教育の課題について検討していく。
- (4) 3年計画のプロジェクトの2年目であるため、年度後半に、全体の中間発表となるような機会を設ける。

3. 研究の成果

2016年度には、海外調査を継続するとともに、理論的研究と実践的探求の両面で、初年度の活動をさらに発展させることを目指して取り組みを進めた。具体的には、以下のような活動を行った。

- (1) 政治家を招いた授業： 法学部1年生全員を対象に、前年度に引き続き、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）に講演を依頼し、当日の質疑・応答や、前後の時間での準備・検討をも含めて、受講者に地域の政治の実情や課題について考えさせることができた。
- (2) 参議院議員選挙に合わせた実践的試み： 政策学部の授業（政策実践探求演習）とも連携しながら、期日前投票所の学内設置を求めて実現させ、学内広報や当日の運営への関与を通じて参加学生に政治や地域との関連について考えさせることができた。
- (3) 討論型の授業： 法学部の授業（政治学特講E）において、二度にわたり付属高校の生徒を招き、現代政治に関わる問題提起とそれに基づく議論を通じて、学生（受講生）に政治参加を意識させる試みを行った。
- (4) 研究会： 年度の前半に研究会を2回開催した。第1回（4.23）では、城下が日本の政治教育の歴史的展開と論点を整理するとともに、落合が各種のフォーラムに参加した経験をふまえて日本のシティズンシップ教育の現状と課題を指摘し、メンバー間で認識の共有を図った。第2回（5.21）では、高橋がイタリアのシティズンシップ教育の近年の動向と問題点を、また的場と渡辺がイギリスでの聴き取り調査の結果を報告し、日本を含めた各国のシティズンシップ教育の課題を比較・検討した。
- (5) シンポジウム： 「18歳選挙権時代の主権者教育を考える」と題したシンポジウムを、龍谷大学・深草キャンパスにおいて開催した（10.15）。水山光春氏（京都教育大学）、石橋章市朗氏（関西大学）、杉浦真理氏（立命館宇治高校）らを招き、龍谷大学での授業実践の報告も交えて、高校・大学でのシティズンシップ教育の現状と課題、展望について議論した。
- (6) 海外調査： ベルギー・ドイツ（石田9.10～17）、アメリカ（寺川3.18～27、城下2.26～3.9）、フランス（福島3.17～30）、南アフリカ（落合3.17～26）について、政治教育ないしシティズンシップ教育の実施状況に関する調査を行った。

4. 研究の反省・考察

2. の計画との関連での反省・考察は以下の通りである。

- (1) 年度後半に日程調整ができなかったこともあり、研究会の回数は少なめであったが、龍谷大学所属者を中心に、日常的に議論を継続することができた。その結果として特に、従来の主権者教育における2つの主要なアプローチ（個人への倫理教育の重視と政治参加経験の重視）の対比の中で本プロジェクトの視角を定めていくという見通しが得られている。政治的リテラシーの指標化については、初年度からの課題であるにもかかわらず、十分な進展をみたとはいいがたいが、社会認識における批判的な視点を軸として検討を進めるという方向性は定まっており、実践面でのこの間の蓄積をもふまえて最終年度で一定の結論を出せるようにしたい。
- (2) 学生らが政治の現場に携わる人の生の声を聴き、現実の社会問題や政治について議論し、行動する機会を設けるという点で、有意義な実践的授業をいくつか展開できた。対象やアプローチを異にするそれらの活動から、一般化しうる知見を引き出していくことが最終年度の課題となる。

- (3) 海外調査は、ベルギー、ドイツ、フランス、アメリカ、南アフリカについて行った。前年度分の調査と合わせて、各国の実態の違いについての知見も蓄積できており、今後は、それらを日本の大学での実践に生かす方法を検討していきたい。
- (4) 中間発表の場として、当初は学会報告を考えていたが、実践的探求において地域社会とのつながりを重視した活動を行ってきたこともあり、日本政治学会を通じて案内を出すとともに、京都府下の全高等学校にも呼びかけたうえで、龍谷大学にてシンポジウムを行うこととした。学内外からの参加者を得るとともに、高校教諭にも登壇を依頼し、「中立性」の問題をはじめとした政治教育の実践上の課題についても議論を深めることができた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 福島都茂子「フランスのシティズンシップ教育の展開と現状—政治的シティズンシップ教育と民主主義の実践」、『社会科学研究年報』（龍谷大学社会科学研究所）46号、2016年5月、41-52頁
- ② 落合雄彦「南アフリカの大学におけるシティズンシップ教育関連資料—1997年高等教育法（抄訳Ⅰ）」、『社会科学研究年報』（龍谷大学社会科学研究所）46号、2016年5月、197-221頁
- ③ 石田徹「欧州における『再国民化』の動きと社会政策の変容—ポピュリズムの台頭と岐路に立つ欧州社会モデル」、『貧困研究』vol. 17、2016年12月、47-61頁
- ④ 城下賢一「何が長期政権をもたらしているのか：安倍政権の分析」、『生活経済政策』239号、2016年12月、17-20頁

(2) 口頭発表

石田徹「期日前投票所設置を中心とする若者投票率向上の取り組み—『政策実践探求演習』とRyu-voteの活動」、「シンポジウム・18歳選挙権時代の主権者教育を考える」、龍谷大学（深草キャンパス）、2016年10月15日

(3) 出版物

- ① 大村和正 他『現代政治の理論と動向』晃洋書房、2016年4月
- ② 高橋進、渡辺博明 他『ポピュリズムのグローバル化を問う—揺らぐ民主主義のゆくえ』法律文化社、2017年3月

学 校 名	北 海 商 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	地域経済強靱化に向けた「物流体系の再構築」に関する研究 ー北海道物流の特異性と道内地域性の視点からー		研 究 分 野	経 済 学
キ ー ワ ー ド	①地域物流 ②地域間物流 ③モーダルシフト ④物資流動特性 ⑤地域経済 ⑥産業構造 ⑦地域産業連関分析 ⑧総合波及効果			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
相 浦 宣 徳	商 学 部 ・ 大 学 院 商 学 研 究 科	教 授	フレームワークの構築, データ分析, シミュレーションモデルの構築, 全体総括, 取り纏め

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阿 部 秀 明	商 学 部 ・ 大 学 院 商 学 研 究 科	教 授	データ解析, 経済波及効果等の推計, 調査
田 辺 隆 司	商 学 部 ・ 大 学 院 商 学 研 究 科	教 授	データ解析, 地域経済強靱化に関する検討, 調査

地域経済強靱化に向けた「物流体系の再構築」に関する研究 ー北海道物流の特異性と道内地域性の視点からー

1. 研究の目的

北海道物流のあらゆる課題の根幹には、「①北海道物流の他地域に対する特異性」が存在する。ここでの「特異性」とは、北海道特有の「地理的条件」や「産業構造」に起因する課題である。前者としては、道外との輸送手段の制限、積雪寒冷等があげられ、後者としては、第二次産業比率の低さによる入超傾向、第一次産業比率の高さによる農産品出荷時期をピークとする季節波動等があげられる。これらに、昨今顕在化した「トラック運転手不足」、「改善基準告示違反に対する規制強化への対応」等の課題が相乗し、「北海道・道外間輸送」、「道内輸送」における輸送力は急激に低下している。また、広大な北海道では都市の商圈や経済圏が点在し、各地域の物資流動特性・産業構造が大きく異なるため、物流への依存度や、輸送力低下に伴う影響度は各地域によって大きく異なる(本研究では、これを「②物流に関する道内の地域性」と称す)。換言すると「①他地域に対する特異性」が北海道物流における課題を増幅し「②道内の地域性」が課題の解決を困難にしていると云える。

以上より、本研究では「北海道物流の特異性と地域性」を整理した上で、昨今顕在化した課題が及ぼす影響を地域ごとに推計し、その対策と北海道物流の新たな在り方を提案することを目的とする。具体的には以下の(テーマ1)～(テーマ3)を行う。これらのテーマは、「わが国最大の食糧基地」として道外に大量の農水産品を供給する一方で、「人口550万人を擁する一大消費地」として日用雑貨品等の生活必需品を道外からの移入に強く依存する北海道にあって、道民生活、地域経済の強靱化に極めて強く関わるものである。

- (テーマ1) 北海道物流の地域性・特異性の整理、
- (テーマ2) 北海道物流における課題と対策の検討
- (テーマ3) 北海道物流システムの在り方の検討

北海道総合開発計画(2016-25年度)においても、「物流ネットワークの整備推進」を産業振興の基盤と位置づけている。なお、本研究における道内地域とは、道央地域、道南地域、道北、十勝地域、オホーツク地域、根釧地域の「地域生活経済圏6地域」とする。

2. 研究の計画

(1) 研究全体における本年度の位置づけ

平成28年度には研究目的に示したテーマの内、「(テーマ1)北海道物流の地域性・特異性の整理」を行う。「物流に関する北海道内の地域性」と「北海道物流の他地域に対する特異性」を整理することは、本研究の基盤であり、その成果は「(テーマ2)北海道物流における課題と対策の検討」、「(テーマ3)北海道物流システムの在り方の検討」を遂行する際の基礎資料ともなる。

(2) 計画

平成28年度には、主に以下の3項目について実施する。

- ① 道内各地域と他都府県間の輸送等について、輸送状況、品目別・輸送機関別流動量などを分析・整理する。
- ② 上記で得られた成果と「北海道内地域間産業連関表(北海道開発局)」に基づき、地域別に物資流動と産業構造の関係を整理し、物流に関する地域性を導出する。
- ③ 学会・シンポジウムを通じて、成果を広く公開する。

3. 研究の成果

「2. 研究計画(2)計画」で示した研究項目について、各々の成果を(1)～(3)に概括する。

(1) 輸送状況、品目別・輸送機関別流動量などの分析・整理

道内各地域と他都府県間の輸送、道内地域間の輸送について、輸送状況、品目別・輸送機関別流動量などを分析・整理した。成果については、査読付論文として日本物流学会誌 第24号に掲載された(5. 研究発表(2)学会誌等の①)。以下に、その一部を纏める。

本州との間に自動車道が整備されていないため、北海道・道外間輸送は、その大半を船舶と青函トンネルを通過する貨物列車に依存している。さらには、「北海道の主要産品である農水産物の移出」、「道外からの供給に依存している日用雑貨品の移入」においては、殆どが、トラック・シャーシ、鉄道コンテナ等のユニットロード貨物として輸送されている。これまで、道外への移出、道外からの移入(以後、単に移出、移入と称す)を対象として、「各輸送機関の重要度」、「有事の際の代替輸送」等が議論される際には、貨物地域流動調査(国土交通省)による輸送機関別輸送量・分担率が利用される機会が多かった。しかしながら、同統計では、農産品、日用雑貨などの太宗貨物の輸送を担うユニットロード貨物輸送について実績が把握できない。これに対し、本研究では、「日本貨物鉄道株式会社輸送実績」、「港湾統計港湾取扱貨物量」、「FT→MT換算係数(国土技術政策総合研究所資料)」等に基づき、輸送形態別輸送量と分担率を推計した。

(2) 物流に関する地域性の導出

上記(1)で得られた成果と「北海道内地域間産業連関表(北海道開発局)」に基づき、地域別に物資流動と産業構造の関連性(特徴)を整理し、物流に関する地域性を導出した。本成果については、第33回日本物流学会全国大会での発表(5. 研究発表(3)口頭発表等の②)、日本物流学会誌 第24号(査読付論文)への掲載(5. 研究発表(2)学会誌等の①)により公表した。以下に、その一部を纏める。

広大な北海道では都市の商圈や経済圏が点在し、都市間距離が長大である。また、地域により主となる産業も異なれば、物流インフラも異なり、運ばれるモノ、運ばれ方が大きく異なる。例えば、オホーツク地域では食料工業品に関連する産業部門による移出額が全移出額の34%を占めており、その6割(重量ベース)が鉄道貨物により移出されている。これに対し、道央地域では化学工業品に関連する産業部門による移出額が全移出額の15%を占め、その内鉄道貨物で輸出される割合は0.7%(重量ベース)に留まる。道内各地域について、昨今のトラック輸送における課題である「ドライバー不足と労働時間に関する問題」、鉄道貨物輸送における課題である「青函共用走行問題」の影響を推計した。その結果、地域によって産業構造や物資流動特性が大きく異なるのと同様に、地域によって輸送力が低下した際の影響も大きく異なることが判明した。トラック輸送の課題、鉄道貨物輸送の課題の双方において、大きく影響を受ける地域はほぼ一致し、「オホーツク」「根釧」等であった。両地域は、道外移出額が道外移入額を大きく下回る北海道において(域際収支：約▲2.7兆円)、域際収支をプラス方向に押し上げている唯二の地域でもあった。

(3) 学会・シンポジウムを通じた成果の公開

シンポジウム、学会誌への掲載(1編)、学会での口頭発表(2件)を通じて成果を公表した。平成28年12月1日には、前項(2)で示した「トラック輸送の課題、鉄道貨物輸送の課題の双方において、大きく影響を受ける地域」の1つであるオホーツク地域の北見市でシンポジウムを開催し、研究成果を公開すると共に、パネリスト(北見商工会議所・副会頭 舩川 誠氏、JAきたみらい農業協同組合・常務理事 高橋 勝氏)、聴講者との情報・意見交換を行った。研究代表者の相浦宣徳が基調講演・パネルディスカッションで登壇し、阿部秀明がパネルディスカッションの司会を務めた。シンポジウムを通じ、得られた主な知見を以下にあげる。

- ・北海道は、国土の22.1%を有し、人口は6%と人口希薄な島嶼であって、都市間距離が長く「人」、「物」の移動が困難である。そこでの経済活動は農畜産業や水産業が発達していて、その生産品や一次加工品を移出し、日本の「食料基地」の役割を担っている。一方、二次産業が少なく、日常生活品等生活関連物資は移入に頼っている。これらのことから地域の産業（経済）構造は地域差、特性を有していて、「物流」も「人流」も地域特性を考慮したものが求められている。
- ・物流に関しては、多くの自治体は「重要」との認識を持つが、専属の人員を配置して居るところは非常に少ない。真の「物流の重要性の認識」は少なく、事業者任せの感がある。
- ・強靱化に向けた対策では、昨今異常気象が原因と思われる集中豪雨・豪雪或いは強風による天災が多発する傾向にあり、田畑の冠水・流出とともに交通が途絶する災害が発生していることから、平時からの交通インフラの整備、代替網の整備（リダンダンシー）が急務である。
- ・青函トンネルでの共用走行は、北海道の産業・経済を考えると各輸送モードの共存共栄を模索することが非常に重要である。
- ・地域では、市町村、商工会議所（商工会）等の経済団体や生産者製造業者等が連携する中で地域交通（人流、物流）の問題意識の共用を図り、道などへの陳情・要請等、情報の発信を継続することが必要である。
- ・道はこれらの陳情・要請に対する対応・調整をしっかりと進め、事案によっては国の支援を受け地域の交通を守ることが重要である。

4. 研究の反省・考察

(1) シンポジウムの開催について

- ①当初、平成28年12月1日に実施した北見市の他に、十勝地域でのシンポジウムの開催を予定していたが、昨年の台風災害の影響により開催を見合わせた。
- ②その対応として、平成29年7月26日に帯広市にてシンポジウムを開催する。反省点として挙げるとすれば、代替開催が遅れた点等である。

(2) 研究全般

「前節のシンポジウム開催について」以外の研究については、当初の研究計画に準じ、極めて順調に遂行された。

5. 研究発表

(1) シンポジウムの開催

- ①「シンポジウム 地域経済の発展に資する物流体制を求めて in 北見」（主催：一般財団法人 北海道運輸交通研究センター・北海商科大学，平成28年12月1日，北海学園北見校地 3号館 8階 国際会議場）

(2) 学会誌等

- ①相浦宣徳，阿部秀明，他：北海道・道外間ユニットロード輸送における新たな課題と課題解決に向けた論点の整理 ～道内各地域への影響分析から～，日本物流学会誌 第24号，pp. 41-48

(3) 口頭発表

- ①相浦宣徳，他：長距離貨物輸送の物流労働生産性指標の提案とその活用～北海道・九州発の長距離輸送をケースとして～，第33回日本物流学会全国大会，2016.9
- ②阿部秀明，相浦宣徳，他：北海道の移出・移入における鉄道貨物輸送の貢献度と北海道新幹線による貨物輸送の効果，第33回日本物流学会全国大会，2016.9

(4) 出版物

- ① シンポジウム～地域経済の発展に資する物流体制を求めてin北見～報告書、北海商科大学、一般財団法人北海道運輸交通研究センター，2016.3

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 ー日本型金融モデルの有効性の検証ー		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
内 田 真 人	経 済 研 究 所 社会イノベーション学部	所 教 員 授	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
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)
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	論文作成
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 グアダハラ大学経済経営 学 部 経 済 地 域 研 究 所	客 員 所 員 教 員 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) 本研究は、環太平洋地域における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となる観点から、わが国の金融システムを再考察し、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。前年度までに行った近年の日本（成熟国）における中小企業分析を踏まえて、2016年のカントリースタディとしては、オーストラリア（成熟国）、ベトナム（成長途上国）の集中的な研究を深めるほか、外部研究者を招聘し、インドネシア、タイ、メキシコ（成長国）などASEAN諸国にも分析対象を広める。

(2) 日本の中小企業支援策については、これまでの分析に加えて、今年度は金融機関による中小企業の事業性評価、地方創生の可能性といった現在のホット・ 이슈の視点からも現状と課題を考察する。

(3) 今年度は本研究の最終年度として、これまでの成果を踏まえて、アジア諸国の専門家を招聘して日本モデルの環太平洋地域への適用をテーマにシンポジウムを行い、成果を刊行物として取り纏める。

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、研究の総纏め並びに各自の研究テーマの展開を行った。まず、本研究の総括的な意味でのシンポジウムについては、2016年6月、他大学の学者・シンクタンク研究員を招き、研究分担者も加わって「アジアにおける中小企業金融の展望－望まれる金融システムの模索」とのテーマで開催した。経済成長著しいアジアのなかで、ASEAN諸国の中小企業金融に焦点を当て、経済成長を支える中小企業とそこに資金を供給する金融機関について、タイ、ベトナム、インドネシアのASEAN各国の現状とそれぞれが期待される役割などについて討論した。また、信金中央金庫から専門家を招き、日本の中小企業金融との比較も考察した（以上の成果は2017年度経済研究所年報第30号に収録）。研究会については、3回に亘り、外部専門家を招いた研究会を開催した。まず、国際協力機構舟橋氏から現地最新情報を含めたベトナムの中小企業振興策について、また、麗澤大学陳准教授からは中国における民間貸借からソーシャルレンディングへの変化、とカントリースタディの報告を受けた。また、靄見法政大学名誉教授から日本の中小企業金融の変化についてリレーションバンキングからトランズアクションバンキングへ迫る歴史的サーベイを報告頂き、議論した。

(2) 海外大学との学術交流の成果については、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。本年度は日系企業のグローバル化と題して分析を行なったほか、トランポノミクスについてメキシコ経済への影響についても考察した。

(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、シンポジウムについて企画・纏めを行ない、座長に本分野で造詣の深い日本金融学会会長小川一橋大教授を招聘し、年報原稿の取りまとめを行った。また、地方銀行協会の協力を得て、日本型中小企業融資モデルが地域創生にどう効果を挙げ得るかをテーマに2016年9月に研究会（金融構造研究会）を開催し、座長を務めた。

② 研究分担者の村本元所員は日本の銀行融資が借手企業の事業性を審査するインセンティブを持たなくなるというレイジー・バンク化問題を考察した上で、解決策を模索し、論文として発表した。

③ 研究分担者の福光所員は、中国リスクと金融市場について複数回、パネリストや討論者として議論したほか、中国の経済学者馬寅初について報告した。そして、経済学者馬寅初に加え、鳥籠理論と陳雲についても論文を発表した。

④ 研究分担者の花井所員は、オーストラリアの制度的な課題について、租税と貯蓄行動に着目して考察し、論文として発表した。

⑤ 研究分担者の福島客員所員は、ベトナムにおける民間企業金融についてシンポジウムで報告したほか、体制移行国家における金融の深化と資産選択についてまとめ、論文として発表した。

⑥ 研究分担者の柿原客員所員は、メキシコ研究について、日系企業のグローバル化とトランポノミクスについて報告したほか、メキシコ中央高原地域の日系自動車企業のケースを基にした「産業集積と投資環境の変化」とメキシコのリテール金融の特徴を論文で発表した。

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についてイノベーションに着目して現状と課題を分析し、論文として発表した。

4. 研究の反省・考察

(1) 本研究は2010～13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。当該研究では、リーマンショックを機に発生した世界規模での金融危機の克服を念頭に置いた。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問題意識があった。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伺える。

(2) このような問題意識と研究の蓄積の下、本研究はわが国の中小企業支援策の整理と経済発展段階の異なる環太平洋諸国の典型的事例を取り上げつつ、平時における中小企業育成の現状と課題を考察してきた。また、本研究プロジェクト設計時には十分に議論されなかったが、2014年以降、日本では地域創生が重要課題となっており、地方銀行貸出のありかたや政府の取り組みや展望も考察した。

(3) グローバル化が進展する中、日本の経済システムに対するエマージング国の関心は高い。日本政府もアジア諸国向け技術支援事業として日本経済システムの紹介・活用を議題としている。その中で日本の中小企業金融システムは先進性があり、政策金融のみならず信用補完、中小企業支援機関・診断士制度、研修制度等はこれら諸国への政策的な問題解決上意義が大きい。

アジアの中小企業金融の先行研究は、個別国やアジア危機後ないしリーマンショック後の影響に止まっていた。アジア危機後20年を経過した中小企業金融の評価、今後の展望、日本との協力の模索はTPPなどアジアとの新展開が迫られる日本にとって大きな示唆となろう。また、研

究を進めるうちに、本研究の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。対象国が多いほかデータが限られるなど残された課題は多い。本研究所としては、本研究を踏まえて、グローバル化の質的・量的な増大に伴う社会的・文化的な不平等、格差の拡大・固定を是正し果然する取組との関係で考察を拡大させつつ継続していく。今後も本テーマのさらなる発展的な展開につながるようにしていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 中田真佐男「我が国における小額決済手段のイノベーションの現状と課題」『成城大学社会イノベーション研究』第12巻第1号、2017年2月、pp. 323～352。
- ② 福光寛「中国の経済学者 馬寅初（マー・インチュ1882-1982）について」『成城大学社会イノベーション研究』第12巻第1号、2017年2月、pp. 273～298。
- ③ 福光寛「鳥籠理論と陳雲（チェン・ユン 1905-1995）について」『成城大学経済研究』第214号、2016年12月、pp. 37～72。
- ④ 村本孜「レイジー・バンク（Lazy bank）の超克—信用調査マニュアルと事業性評価—」『成城大学社会イノベーション研究』第12巻第1号、2017年2月、pp. 517～550
- ⑤ 福島章雄「体制移行国家における金融の深化と資産選択」『成城大学社会イノベーション研究』第12巻第1号、2017年2月、pp. 433～445)
- ⑥ 福島章雄 “The Market Efficiency of Bitcoin : A Weekly Anomaly Perspective ”
Yutaka Kurihara and Akio Fukushima, Journal of Applied Finance & Banking, vol.7, no. 3, 2017, pp57～64.
- ⑦ 柿原智弘「メキシコのリテール金融の特徴—大衆層の消費行動と小口資金調達に関する一考察—」『成城大学社会イノベーション研究』第12巻第1号、2017年2月、pp. 465～495)
- ⑧ 柿原智弘「産業集積と投資環境の変化—メキシコ中央高原地域の日系自動車企業のケース—」『成城大学経済研究所研究報告』第77号、2017年3月、21ページ。

(2) 口頭発表

- ① 花井清人「オーストラリアでの租税と貯蓄行動に関する制度的課題（Institutional reform for taxation and savings in Australia）」大洋州経済学会第46回研究大会、2016年12月17日、成城大学。
- ② 福光寛「中国的経済学者：馬寅初（1882-1982）」大阪市立大学大学院都市創造研究科、2016年10月28日。
- ③ 福光寛 特別セッション「中国リスクと金融市場」指名討論者、金融学会2016年度秋季大会、2016年10月16日、関西大学。
- ④ 福光寛 共通テーマ「中国の金融システム改革とチャイナリスク」指名コメンター、信用理論研究学会2016年度春季大会、2016年5月16日、立教大学。
- ⑤ 福光寛 高橋正彦氏「証券化と債権譲渡ファイナンス」に対する指名討論者、金融学会2016年度春季大会、2016年5月15日、武蔵大学。
- ⑥ 柿原智弘「日系企業のグローバル化とトランポノミクス—メキシコ経済への影響—」成城大学経済研究所・私立大学研究ブランディング事業共催ミニ・シンポジウム、2017年3月21日、成城大学。
- ⑦ 小川英治、福島章雄ほか「アジアにおける中小企業金融の展望—望まれる金融システムの模索—」成城大学経済研究所第81回講演会（シンポジウム）、2016年6月11日、成城大学、本プロジェクト総纏めの的な位置付けにあるシンポジウム。

(3) 出版物

なし

学 校 名	藤 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	北海道産食品素材の生活習慣病等抑制に関する生理活性物質の探索 ー新品種ストライプペポ種子の利活用ー		研 究 分 野	家 政 学
キ ー ワ ー ド	① ペポカボチャ ② 脂肪分解系 ③ 活性カルボニル ④ 膀胱炎			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 河 原 俊 治	人 間 生 活 学 部	教 授	研究総括および実験と解析、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 崎 由 佳 子	人 間 生 活 学 部	准 教 授	実験と解析
中 村 健 道	理化学研究所 環境資源科学 研究センター技術基盤部門	専 任 研 究 員	実験と解析

北海道産食品素材の生活習慣病等抑制に関する生理活性物質の探索 —新品種ストライプペポ種子の利活用—

1. 研究の目的

北海道特産食品素材が含有する生活習慣病予防等に寄与する生理活性物質を探索し、作用機作の解明を通し、その科学的根拠を明らかにすることは、北海道産食品素材の付加価値を向上させ、その結果、生産地域における六次産業化に貢献する。

‘ストライプペポ’は、2012年に農研機構北海道農業研究センターで育種されたペポカボチャ (*Cucurbita pepo* L.) の新品種で、種子を食用として利用するものである。これが北海道総合研究機構上川農業試験場で栽培技術が確立された。ペポカボチャ種子は、欧州では経験的に排尿障害の改善に用いられているが、その活性成分や作用機作は明らかではない。

我が国のカボチャ生産量第一位の上川郡和寒町では、このストライプペポを新しい作物として生産開始しているが、その健康訴求に基づいた付加価値の向上のため科学的解明を必要としている。

一方、我が国の主産地である北海道の優位性を発揮できる小果樹としてアロニア (*Aronia melanocarpa* Elliot.) が北海道果樹農業振興計画(2016年)において振興品種に指定され、とくに消費者の健康志向に対応した機能性成分の開発が期待されていることから研究材料に加えた。

本研究は、北海道で開発され北海道で生産される食品素材に関するこの要請に直接応えるものである。

北海道産食品素材としてストライプペポ種子抽出物による①中性脂肪上昇抑制作用、②排尿障害抑制作用、ならびにアロニア果実抽出物による①中性脂肪上昇抑制作用を解明する。

2. 研究の計画

(1) ストライプペポ種子抽出物による中性脂肪上昇抑制作用

①我々は2015年度までにストライプペポ種子抽出物が、高脂肪食(25%)条件下で飼育したラットの血中中性脂肪濃度を有意に抑制することを見出し、またそれがリパーゼ阻害による脂肪吸収阻害によるものではないことを見出した。そこでもう一つの可能性である脂肪組織におけるホルモン感受性リパーゼなどの脂肪分解系の亢進について調べた。上川郡和寒町より供試されたストライプペポ種子風乾物を粉碎脱脂後、95%エタノール可溶成分(PE)を抽出し、ラット初代脂肪細胞(内臓脂肪細胞培養キットH-2、コスモバイオ)のホルモン感受性リパーゼへの影響を測定した。コンフルエントに達した脂肪培養細胞に200-1500 µg/ml PEを添加し、次いで終濃度 10^{-8} Mノルアドレナリンを添加し脂肪分解系を開始させた。180分後に培地上清を回収し、脂肪細胞より遊離したグリセロール量をFree Glycerol Assay Kit (CELL BIOLABS, USA)を用い570 nmの吸光度を測定した。

(2) ストライプペポ種子抽出物による排尿障害抑制作用

実験は藤女子大学動物実験委員会の承認のもとに実施した(承認番号第2016-4号)。実験動物はSD/SPF雌性ラット(6週齢、三協ラボサービス、札幌)を用いた。

①ストライプペポ種子95%エタノール可溶成分(PE)を1.5-2.7%混餌し、ラットをPE群とコントロール群の2群(各群6匹)に分け、6日間飼育後、両群にシクロホスファミド(CPA)を腹腔内投与(75-150 mg/kgBW)した後、24時間排尿行動を観察し、解剖後膀胱を採取した。これを10%中性緩衝ホルマリン液(pH7.4)で固定後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った組織標本作製し、出血、尿路上皮剥離、炎症細胞浸潤、浮腫の有無について病理学的組織観察を行った。また炎症マーカーである血清中C反応性たんぱく質(CRP)濃度を測定した。

②炎症抑制機構としてストライプペポ種子抽出物の作用点を推定することを目的に、CPA代謝産物の活性カルボニルであるアクロレインについてHPLC、LC-MSによる定量を試みた。HPLC分

析においては、ラット血清及び尿試料を用い、1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン(DDB)によって誘導体化し、蛍光検出を行った。LC-MS分析においては2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)によって誘導体化した。

(3) アロニア果実抽出物による中性脂肪上昇抑制作用

実験は藤女子大学動物実験委員会の承認のもとに実施した(承認番号第2016-4号)。実験動物はSD/SPF雄性ラット(5週齢、ホクドー、札幌)を用いた。

①普通食は5%大豆油としたAIN-93G準拠飼料組成とし、高脂肪食はこれに20%ラードを加えた飼料とした。それぞれにアントシアニンを含むアロニア色素粉末(アロニアTA;日本新薬、京都)を2.5%混餌した。7日間アロニアを添加した普通食で飼育した後、高脂肪食群と高脂肪食+アロニア群の2群(各群6匹)に分け、21日間飼育した。飼育期間中1週間毎に尾静脈より採血し、血清中の中性脂肪濃度を測定した。飼育終了後解剖し、白色脂肪組織及び褐色脂肪組織を採取して内臓脂肪量を測定した。合わせて肝重量、腎重量を測定した。また、盲腸も採取しリアルタイムPCR法により腸内細菌叢の変化を調べた。

3. 研究の成果

(1) ストライプペポ種子抽出物による中性脂肪上昇抑制作用

①コンフルエントに達したラット脂肪培養細胞に500 µg/mlのストライプペポ95%エタノール可溶成分(PE)を添加し、続いて 10^{-8} Mノルアドレナリンを添加し、180分後の遊離グリセロール量を測定したところ、PE無添加区に比してPE添加区で有意に増加した。そこでPE量を200、350、500、750、1500 µg/mlとして、1分間あたりの遊離グリセロール生成量を測定したところ、200 µg PE/ml添加区では 0.35 ± 0.09 (mean $\pm$ SD) nmol /minであり、500 µg PE/ml添加区では 0.84 ± 0.13 nmol/minを示し、用量依存的に増加した。このことはPEが脂肪分解亢進作用を有することを見出した。この成果は現在投稿準備中である。

(2) ストライプペポ種子抽出物による排尿障害抑制作用

①CPA誘導膀胱炎の病理学的組織観察によって、尿路上皮剥離、浮腫は同程度であったが、PEを摂取したラットにおいては出血、炎症細胞浸潤が抑制傾向にあることが分かった。これら定性的観察結果を定量的に記述するために生体の炎症マーカーである血清中C反応性たんぱく質(CRP)濃度を測定した結果、ほとんどの個体において検出限界以下であった。

②シクロホスファミド(CPA)を腹腔内投与すると肝臓でチトクロムP450により代謝されアクロレインが生成し、これが血流によって移動し膀胱まで達する。そこでラットの血清及び尿試料中のアクロレインをDDB誘導体化しHPLC分析を行ったが、明確に検出できなかった。またこれをDNPH誘導体化しLC-MS分析を行ったが同様に明確なピークが得られなかった。

(3) アロニア果実抽出物による中性脂肪上昇抑制作用

①飼育期間中の血清中の中性脂肪濃度は両群において有意な差は認められなかった。しかしながら腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織、副睪丸周囲脂肪組織を採取しその合計量を比較すると、高脂肪食群では 5.75 ± 0.41 g/100 gBWであったのに対し、高脂肪食+アロニア群では 5.12 ± 0.35 g/100 gBWと有意に低値を示し、とくに腎周囲脂肪組織で有意に低値を示した。褐色脂肪組織量は 0.11 ± 0.01 g/100 gBWで両群当程度であった。盲腸内細菌叢を調べたところ、肥満の程度と負の相関があることが知られる*Bacteroides*属において普通食群で総菌数の80%を占めるのに対し、高脂肪食群では54.7% of total bacteriaに低下した。このとき高脂肪食+アロニア群では73.0%に低下するに留まり、すなわち減少を抑制していた。

4. 研究の反省・考察

(1) ストライプペポ種子抽出物による中性脂肪上昇抑制作用

①ラット脂肪培養細胞においてストライプペポ95%エタノール可溶成分（PE）がホルモン感受性リパーゼを亢進する作用、並びにこのことが用量依存的に上昇することを見出した。そこでPE中の活性成分の単離精製を検討する。まず、PEを液性によって分画しホルモン感受性リパーゼ亢進作用を確認する。また、ストライプペポ種子を含水エタノールで抽出し、ホルモン感受性リパーゼ亢進作用を確認する。PEの細胞毒性を調べるためにCell Counting Kit（同仁化学）を用いて生存率を測定する。さらに培養細胞レベルにおいて活性画分を得てこれを動物実験に適用する。

(2) ストライプペポ種子抽出物による排尿障害抑制作用

①シクロホスファミド（CPA）誘導膀胱炎に関するPEの作用は病理学的組織観察によれば定性的に抑制傾向が示されるが、これを定量的に取り扱うために高感度CRP測定、あるいは尿路上皮発現たんぱく質であるウロプラキンや神経成長因子（NGF）の発現を調べることを検討する。
②CPA腹腔内投与ラットの血清及び尿中の活性カルボニルであるアクロレインは直接誘導体化してLC分析することは困難であった。これは生成したアクロレインがたんぱく質などと速やかに結合するためであると考えられた。そこでアクロレインと結合したたんぱく質のリシン残基に特異的な抗体を用いてトラッピングELISA法などの免疫化学的検出を検討する。

(3) アロニア果実抽出物による中性脂肪上昇抑制作用

①肥満は生活習慣病の要因であるため内臓脂肪蓄積抑制が課題であり、様々な研究が進められている。アロニアなどのアントシアニンが内臓脂肪の蓄積を抑制すること、またそれが腸内細菌叢の変動と関連することが報告されているが、本研究においても同様の結論が得られた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①中村悠央，中山菜摘，水落莉砂，東眞央，紙谷のはら，田中文，小山田正人，江原清，嘉見大助，知地英征，中河原俊治 シクロホスファミドによって誘導される過活動膀胱モデルラットにおける‘ストライプペポ’種子抽出物の影響 第70回日本栄養・食糧学会大会（神戸）2016年5月

(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	食による乳癌の発症予防と再発防止の分子基盤の構築 ーフィトケミカルの制癌ターゲットの同定ー		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細胞周期 ⑥シグナル伝達 ⑦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
河 手 久 弥	栄 養 科 学 部	教 授	エストロゲン受容体遺伝子とHER2遺伝子を導入した乳癌細胞でのフィトケミカルの作用
小 野 美 咲	栄 養 科 学 部	助 教	フィトケミカルによる乳癌細胞増殖制御機構の解析とsiRNA(干渉RNA)導入細胞における解析
竹 嶋 美 夏 子	栄 養 科 学 部	講 師	フィトケミカルの乳癌発症モデル動物における乳癌発症予防の研究および担がんマウスでの抗腫瘍効果の検証

食による乳癌の発症予防と再発防止の分子基盤の構築 ーフィトケミカルの制癌ターゲットの同定ー

1. 研究の目的

乳癌の発症および再発抑制に寄与する植物由来の生理化学物質（フィトケミカル）のスクリーニングおよび抗腫瘍メカニズムの解析から乳癌予防と治療への応用の可能性を探る。

- ① 疫学研究等にて報告されている乳癌リスクに関与すると考えられる抗腫瘍効果をもったフィトケミカルを乳癌細胞でスクリーニングする。
- ② 有効性が確認できたフィトケミカルについて、抗腫瘍効果の分子メカニズムを解析し、さらにこれらの標的分子を明らかにする。
- ③ すでに抗腫瘍効果が見られた大豆イソフラボン、リコペン、レスベラトロール、デルフィニジン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て検証する。
- ④ 乳癌細胞を移植した担癌ヌードマウスを使用してフィトケミカルの抗腫瘍床効果を検討し、臨床で応用可能かを探る。

2. 研究の計画

- (1) 乳癌リスクに関与するフィトケミカルの乳癌発症予防効果の検証

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、抗がん作用が示されたフィトケミカルの予防効果を検討する。フィトケミカルとして、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大豆イソフラボン、リコペン、メトキシレスベラトロール（プテロステイルベン）、デルフィニジンとする。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。

- (2) 乳がん制御に関する食因子の分子機序解析

ホルモン受容体陽性乳癌細胞（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増殖・生存関連シグナル、アポトーシス関連因子（Bcl-2, Bax）の活性を解析することで、抗腫瘍効果に関わるシグナル蛋白を特定する。

- (3) 担癌ヌードマウスを使用したフィトケミカルの抗腫瘍床効果を検討

フィトケミカルを餌に混ぜ、乳癌細胞を移植した担癌ヌードマウスに投与し腫瘍成長に及ぼす効果を検討するとともに、腫瘍組織内のアポトーシスの有無をIn Situ Tunel法で検出し定量化する。

3. 研究の成果

- ① 黒豆に含まれるアントシアニンの主要成分である、シアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、マルビジンの4種について乳癌細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。エストロゲン受容体陽性細胞であるMCF-7に対して、デルフィニジンのみ増殖抑制を示し（IC₅₀ 25 μ M）、他の3種の成分は最大100 μ Mまで添加したが効果を示さなかった。デルフィニジンの抗腫瘍効果はアポトーシス誘導が主要な機序であった。
- ② プテロステイルベンはレスベラトロールよりも高いバイオアベイラビリティを示す。ホルモン受容体あるいはHER2状態の異なる3種の乳癌細胞に対して、レスベラトロールとプテロステイルベンの増殖抑制効果の比較を行ったところ、プテロステイルベンはレスベラト

ロールと同等あるいはそれ以上の強い増殖抑制効果を示すこと、さらにトリプルネガティブ乳癌細胞に強い効果を示すことが明らかになった。トリプルネガティブ乳癌細胞の主要な増殖抑制機序はアポトーシス誘導蛋白である Bax の増加であった (Nutrition and Cancer, 2017 in press)。

プテロステイルベンのトリプルネガティブ乳癌細胞移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果の検討では、プテロステイルベンの経口投与はコントロールと比較し、75%以上の強い増殖抑制を示した (論文提出中)。プテロステイルベンは高いバイオアベイラビリティを示し、半減期も長いためレスベラトロールよりも血中濃度が上がりやすいことが予想され、このため乳癌治療に応用できる可能性がある。

- ③ 大豆イソフラボン (ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、イコール) の癌遺伝子導入腺癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討を行った。多くのヒト癌腫で活性化されている癌遺伝子である Ras 導入癌細胞においては 4 成分ともに非導入細胞と同様の感受性を示したが、Src 導入癌細胞は、ダイゼイン、グリシテイン、イコールに対しては薬剤抵抗性を示し、ゲニステインのみ感受性を示した。ゲニステインによる増殖抑制の機序はアポトーシスによるものではなく、G2M 期での強い細胞周期停止であることが分かった。関連蛋白に関しては p21 蛋白の増加のみが見られ、その下流であるサイクリンやサイクリン依存性キナーゼ (CDK) などの変化は確認できなかった。

4. 研究の反省・考察

- ① アントシアニンの抗腫瘍効果に関する研究では、エストロゲン受容体陽性細胞のみの研究で、乳癌細胞のサブタイプ別に比較評価できていないため、今後研究を進めなければならない。側鎖構造の相違で細胞増殖抑制に大きな差が出たことに関して、側鎖構造の標的分子での作用点を解明する必要がある。今後はデルフィニジンの癌予防効果と腫瘍増殖抑制効果を乳癌発症モデルラットと乳癌移植ヌードマウスで検証する必要がある。
- ② 天然食品中に含まれるプテロステイルベンは高いバイオアベイラビリティをもち、今回の研究でレスベラトロールと同等もしくはそれ以上の乳癌細胞増殖抑制効果があったことから、レスベラトロールよりも乳癌予防に対して有用なフィトケミカルであることが示唆された。さらにヒト乳癌移植担癌マウス実験において経口投与したプテロステイルベンは強い増殖抑制効果を示したことから、生体内でも抗腫瘍活性を示すことが明らかとなり、乳癌治療への応用研究が期待される。
- ③ 大豆イソフラボン成分の Src 遺伝子導入腺癌細胞に対する増殖抑制効果はゲニステインのみ見られ、その機序はアポトーシス誘導ではなく細胞周期停止であることまでは判明したが、p21 のみの増加しか認めておらず更なる検討が必要である。Src 癌遺伝子の活性化は肝臓、肺、乳房、膵臓、前立腺などの癌に発現しており、これらの癌に対しゲニステインは予防効果を示す可能性がある。今後はこれらの癌発症モデルラットを使用した研究で予防効果を検証する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Misaki Ono, Kaoru Ejima, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Rei Wakimoto, Shuji Nakano. Equol Enhances Apoptosis-inducing Activity of Genistein by Increasing Bax/Bcl-xL Expression Ratio in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Nutrition and Cancer. 2017年 July issue, in press.
- ② 脇本麗、竹嶋美夏子、小野美咲、中野修治. プテロステイルベンによるサブタイプ別乳癌細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導作用の機序解析. 果汁協会報. No705. 17-24. 2017.

(2) 口頭発表

- ① Misaki Ono, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src- and Ras-activated human

adenocarcinoma cells. ECR-ACR-SIC 2017 Conference. The Challenges of Optimizing Immune and Targeted Therapies. From Cancer Biology to the Clinic. Florence, Italy 2017年6月26日

- ② Misaki Ono, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src-activated human adenocarcinoma cells. Experimental Biology 2017 Chicago Illinois 2017年4月24日.
- ③ Misaki Ono, Mikako Takeshima, Takako Higuchi, Takaomi Koga, Shuji Nakano. Effect of Equol on Hormone-dependent Rat Mammary Carcinoma Induced by Ethyl Methanesulphonate (EMS). 第75回日本癌学会学術総会 横浜 2016年10月8日.
- ④ Misaki Ono, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Mechanistic study for interaction of soy isoflavones in vitro and in vivo animal model. International Congress of Dietetics ; ICD2016 Granada, Spain 2016年9月7日.
- ⑤ 小野美咲、竹嶋美夏子、樋口貴子、中野修治. EMS誘発性乳癌モデルラットに対するエクオール腫瘍抑制効果の検討. 第23回日本がん予防学会総会 名古屋 2016年7月2日.
- ⑥ 脇本麗、竹嶋美夏子、小野美咲、樋口貴子、中野修治. ジメトキシレスベラトロールによる乳癌のサブタイプ別抗腫瘍効果の機序解析. 第70回日本栄養・食糧学会大会 神戸 2016年5月14日.
- ⑦ 竹嶋美夏子、小野美咲、甲斐田遥香、脇本麗、古賀孝臣、中野修治. リコペン高含有トマトパウダーの乳癌発症予防効果 - EMS誘発性乳癌モデルラットによる検討. 第70回日本栄養・食糧学会大会 神戸 2016年5月14日 .
- ⑧ Misaki Ono, Mikako Takeshima, Takako Higuchi, Takaomi Koga, Shuji Nakano. Effect of Equol on Hormone-dependent Rat Mammary Carcinoma Induced by Ethyl Methanesulphonate (EMS). AACR Annual Meeting 2016 New Orleans, Louisiana 2016年4月17日.

(3) 出版物

なし

学 校 名	大 阪 体 育 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヒトの多様なスポーツ動作を可能とする動作機序の解明 ー伸縮性ひずみセンサによる即時フィードバックー		研 究 分 野	体 育 学
キ ー ワ ー ド	①ウェアラブルセンサー ②リアルタイム動作解析 ③障害予防 ④スポーツ科学			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 川 昌 紀	体 育 学 部	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
貴 嶋 孝 太	体 育 学 部	講 師	被験者リクルートと国内実験施設の調整, 測定・論文作成
佐 野 加 奈 絵	大 学 院	助 手	測定・データ整理, 論文作成
豊 岡 示 朗	教 育 学 部	教 授	動作解析データの実験デザイン, 被験者リクルート

ヒトの多様なスポーツ動作を可能とする動作機序の解明 ー伸縮性ひずみセンサによる即時フィードバックー

1. 研究の目的

- (1) ヒトの走・跳・泳・投・打・滑の身体運動における多様なヒトの身体運動の骨格筋メカニクスの解明のため、ダイナミックな身体運動中の動作を伸縮性ひずみセンサから関節角度情報を取得できるシステムを開発する。
 - ① ヒトの走・跳運動中の関節角度を、シリコンフィルムを用いてリアルタイムに動作分析できるシステムを確立する。
 - ② オプティックファイバによるアキレス腱伸張・短縮動態測定の侵襲的測定データと、シリコンフィルムと超音波装置によるアキレス腱伸張・短縮動態測定の非侵襲的測定データの関係から、シリコンフィルムの伸縮性ひずみセンサで直接アキレス腱の振る舞いを推定するモデルを確立し、多様な身体運動中での測定を可能にする。

2. 研究の計画

- (1) 本年度は、シリコンフィルムによるダイナミックな運動中の動作分析方法の検証、その後、多様な競技スポーツ動作中での動作分析をシリコンフィルムを用いて実施し、動作の精度について検証を行う。
 - ① 0.1mm以下のシリコンフィルム（薄い絆創膏のようなもの）の伸縮性ひずみセンサを足・膝・股関節、背中に貼りつけ、走・跳運動中の下肢の各関節角度計測と筋腱の長さ推定を実施する。同時に、身体関節各部に貼り付けた反射マーカを光学式ビデオカメラで撮影し、その撮影映像から計算された動作解析データと、先に記したシリコンフィルムの伸縮性ひずみセンサを用いた算出した動作解析データを比較し、シリコンフィルムの伸縮性ひずみセンサによる動作解析方法を確立する。
 - ② 上記の測定システムを用いて、剣道、競泳、カメラ撮影できない特殊免荷環境下での運動中の動作分析を、シリコンフィルムを用いて実施する。

3. 研究の成果

- (1) 本年度実施した研究の結果、以下の成果を挙げることができた。
 - ① シリコンフィルムを用いたリアルタイムのダイナミックな身体運動における動作分析データとビデオカメラによる2次元動作解析データとの比較から、シリコンフィルムを用いたダイナミックな身体運動での動作分析できるシステムを確立した。
 - ② 剣道中のアキレス腱断裂が生じるリスク要因について明らかにできた。競泳中の細かな筋内の動態を明らかにし、1つの筋内においても異なる振る舞いを行っていることが確認された。東アフリカ人陸上選手の強さがアキレス腱の弾性を利用した効率的な走行がキーであることがシリコンフィルムを用いた動作分析からも確認された。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本年度実施した研究の結果、以下の点を今後の課題として挙げることができた。
 - ① サンプル周波数がまだまだ低い点、2次元の動作分析しかできない点など、改善余地がある。
 - ② 用いたシリコンフィルムと皮膚の粘着面が、ダイナミックな運動では常時安定して粘着していないため、疲労運動など繰り返し運動での耐久性についての問題点が挙げられた。フィルムの粘着テープについてさらなる改良が求められた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Oda H, Sano K, Kunimasa Y, Komi PV, Ishikawa M. Neuromechanical modulation of Achilles tendon during bilateral hopping in unilateral Achilles tendon ruptured subject over 1 year after surgery. Sports Medicine 47(6):pp.1221-1230, 2017年. 平成28年10月3日受理 (査読有)
- ② 国正陽子, 佐野加奈絵, 久野峻幸, 牧野晃宗, 小田俊明, Nicol C, Komi PV, 石川昌紀. 下腿の骨格・筋腱形態に東アフリカ地域の陸上中長距離選手特有の特徴はあるのか. 大阪体育学研究 55:pp.1-9, 2017年. 平成28年度9月29日受理 (査読有)
- ③ 牧野晃宗, 岩崎正徳, 国正陽子, 久野峻幸, 佐野加奈絵, 村元辰寛, 村上雷多, 神崎浩, 小田俊明, 石川昌紀. 剣道経験年数の違いによる左右脚のアキレス腱の形態と力学的特性について. 体育学研究 61:pp.639-649, 2016年. (査読有)

(2) 口頭発表

- ① 上野薫, 石川昌紀, 佐野加奈絵, 国正陽子, 牧野晃宗. 陸上・競泳選手のハムストリングス筋群の特異的な太さについて. 大阪体育学会第55回大会, 2017年3月12日, 関西大学, 大阪.
- ② 佐野加奈絵, 石川昌紀. 水中ドルフィンキックにおける推進力獲得のための筋腱動態の解明. 大阪体育学会第55回大会, 2017年3月12日, 関西大学, 大阪.
- ③ 国正陽子, 佐野加奈絵, 久野峻幸, 牧野晃宗, 小田俊明, Nicol C, Komi PV, 石川昌紀. ケニア人トップランナーの特徴的な下腿形態の獲得機序. 第71回日本体力医学会大会, 2016年9月23-25日, 盛岡市民文化ホール・いわて県民交流センター, 岩手.
- ④ 大野直紀, 佐野加奈絵, 国正陽子, 久野峻幸, 牧野晃宗, 石川昌紀. 荷重量変化に対する神経-筋腱の応答. 日本体育学会第67回大会, 2016年8月25日, 大阪体育大学.
- ⑤ Ishikawa M, Kunimasa Y, Sano K, Hisano T, Makino M, Oda T, Toyooka J, Nicol C, Komi PV. Musculoskeletal characteristics for East-African top distance runners 34th International conference on Biomechanics in Sports, 2016年7月18-22日, Tsukuba, Japan.
- ⑥ Cabri J, Nicol C, Ishikawa M, Chavet P. Lower body positive pressure running: a tool for early return to sport? 21st annual Congress of the European College of Sport Science, 2016年7月6-9日, Vienna, Austria. (招待講演)
- ⑦ Ishikawa M, Sano K, Kunimasa Y, Makino A, Komi PV. Short-term influence of unweighting on muscle fascicle loading. 21st annual Congress of the European College of Sport Science, 2016年7月6-9日, Vienna, Austria. (招待講演)
- ⑧ Kijima K, Urata T, Ohta Y, Fukuda K, Nakai A, Ishikawa M, Mero A, Komi PV, Ito A. Kinematics of sprint start for masters' athletes. 21st annual Congress of the European College of Sport Science, 2016年7月6-9日, Vienna, Austria.
- ⑨ Sano K, Makino A, Kunimasa Y, Hiroishi T, Ozaki R, Miyashita A, Sakamoto T, Ishikawa M. Knee hyperextension caused by the up-beat dolphin-kick movement. 21st annual Congress of the European College of Sport Science, 2016年7月6-9日, Vienna, Austria.
- ⑩ 梅林薫, 前島悦子, 森北育宏, 藤井均, 三島隆章, 菅生貴之, 岡村浩嗣, 石川昌紀, 足立哲司, 曾根純也, 渡邊有実, 木村彩, 浦久保和哉. 大阪体育大学におけるスポーツ医・科学サポート体制について. 第13回JISSスポーツ科学会議, 2016年11月29日, 味の素ナショナルスポーツセンター, 東京.
- ⑪ 牧野晃宗, 上野薫, 国正陽子, 佐野加奈絵, 貴嶋孝太, 石川昌紀. 統括的パフォーマンス研究・サポート拠点センターの取り組み. 第13回JISSスポーツ科学会議, 2016年11月29日, 味の素ナショナルスポーツセンター, 東京.

- ⑫ Ishikawa M. Neuro-Musculoskeletal characteristics for East-African top distance runners. Denmark-Japan symposium JISS, 2016年5月12日, Japan Institute of Sports Sciences, Japan. (招待講演)

(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、事例収集の総括管理、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	上級准教授	事例の収集、事例集出版計画総括
笹 尾 敏 明	教 養 学 部	教 授	評価研究、セミナー運営管理
呉 恵 卿	教 養 学 部	専 任 講 師	パイロット・プロジェクトの結果分析と論文執筆
清 水 安 夫	教 養 学 部	上級准教授	ネットワーク拡大のためのセミナー、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

- (1) 平成27年に東アジアのパートナー大学と構築したグローバルリサーチネットワークを拠点に、欧米地域を含む国内外の革新的なリベラルアーツを基調にした中小規模の私立大学による、強力かつ持続可能なグローバル教育研究ネットワークを拡大する。
- (2) また、このネットワークを通して、リベラルアーツ教育における革新的な国際化、カリキュラム、方法論における戦略に関するケーススタディを収集する。
- (3) さらに平成27年度に実施したパイロット・プログラムを修正の上、安定的かつ拡大的なプログラムへと発展させる。

2. 研究の計画

- (1) 交渉ベースシステム・アプローチを採用し、国際基督教大学およびその他の日本、アメリカ、欧州の中小規模の私立大学における主要な研究組織から代表者を招き、グローバル教育研究ネットワークを拡大する。また、特色あるリベラルアーツ大学を訪問調査する。
- (2) パイロット・プログラムの最終評価報告の論文を出版する。
- (3) アジアまたは米国における国際的な学会およびシンポジウムにおける成果の普及。
- (4) 海外の出版社より『世界の中小規模私立大学の国際化戦略と革新的な実践（仮題）』を出版する。

3. 研究の成果

(1) グローバル教育研究ネットワークを拡大

2016年6月22日～23日に、国際基督教大学において第4回リベラルアーツ教育のためのグローバルリサーチネットワーク・ワークショップを開催した。テーマは、「リベラルアーツ・サイエンスを实践する一約束と可能性」であった。アメリカのランドマーク大学およびアマースト大学、オランダのアムステルダム大学カレッジ、バングラデシュのアジア女子大学、韓国の延世大学から教授を招聘し、各大学の多様な取り組みについて、主に教授法と革新的なプログラム、公正性と多様性、組織の意思決定のための研究という3つの角度から発表を行い、議論した。

(2) 本プロジェクトの成果としての2冊目の出版計画

本プロジェクトの成果として、特に最終年度には、具体的な実践例をまとめた『リベラルアーツ教育を实践する－グローバルな事例』と題した書籍を2017年末に出版予定である。

(3) パイロット・プログラム評価報告

2015～2016年に日本と韓国において実施した異文化間コミュニケーションに関するパイロット・プログラムの評価結果については、2016年6月のワークショップにおいて報告された。オンラインビデオを使用し、日本と韓国の学生が相互に言語を学び、相手の言語を使用してプレゼンテーションやディスカッションを行うことで、異文化に対する好奇心と開放性が刺激され、異文化に対する理解と解釈力が増し、語学力の向上にもつながることが分かった。他方で、それまでに授業内でカバーされていた事柄であるにもかかわらず、それを認識していなかったことも判明し、語学と異文化についての学習はより社会的、相互行為的な学習環境で行われる方がより効率的であることも示唆された。より具体的な研究成果については、

上記の書籍の中で報告される予定である。

(4) 国内外の学会における成果の普及。

- ① 2016年9月17日に名古屋大学で開催された第68回日本教育社会学会において、本研究プロジェクトメンバーが、「東アジアにおけるリベラルアーツ教育—グローバル化のための新たな戦略?」と題した研究発表を行った。セッションには、台湾や韓国からの参加者もあり、研究成果の共有の良い機会となった。
- ② 2016年10月12～14日に韓国ソウルで開催された第17回教育研究国際会議において世界各国の研究者や実務家に対して本研究の成果を発表した。本研究チームは10月12日に「東アジアにおけるリベラルアーツ教育の次元の探求—競争的な高等教育のブームか破滅か—」と題したパネルディスカッションを企画し、韓国、中国、日本、アメリカ、オーストラリア等の研究者とともにリベラルアーツ教育が国際化戦略にどのように結びついているのか、その成功例と課題について白熱した議論を行った。本パネルディスカッションでは、本研究プロジェクトメンバーだけでなく、本研究の成果の一つであるグローバル教育研究ネットワークのメンバーである、韓国の延世大学と韓東グローバル大学からも研究協力者が発表した。
- ③ 2017年2月21日に米国ワシントンDCで行われた国際教育実務家会議の年次大会において、本プロジェクトメンバーが上智大学副学長および早稲田大学国際部長とともに「リベラルアーツ教育における国際化と質保証—東アジアの視点」と題したパネルディスカッションに参加し、本研究のプロジェクト成果を発表した。発表内容は、2016年に出版した書籍の内容を網羅的にまとめた内容で、東アジアにおけるリベラルアーツ教育が国際化と同時進行して起きている現象についての分析結果と革新的な教育プログラムの実践事例を紹介した。

4. 研究の反省・考察

(1) 2冊目の書籍出版

2014年度から2016年度のプロジェクト期間中に2冊の書籍を出版できたことは、重要な成果である。2016年には第一冊目の書籍を発表した。2017年末には第二冊目の書籍がSpringer社より出版される見込みである。本来は第二冊目を2017年3月までに出版する予定であったが、インド、米国、バングラデシュ、オランダ、韓国、シンガポール、日本を含む複数の国に亘る著者との連絡調整や、実践的な内容を含む書籍のために実践の分析結果が出るタイミングの調整の必要もあり、出版予定が遅れてしまった。

(2) 研究発表

2016年度には国際的な会議において多数の発表を行った。会議には多数の実務家が参加していたが、もう少し焦点を絞ってリベラルアーツ大学における責任ある地位にある実務家に対して研究成果を共有する機会をもてると研究の成果のインパクトという観点からは良かったのではないかと反省している。今後は、書籍の出版を通して多様な読者や実務家に働きかけていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

① 韓国ソウル大学、Hoam会議場で開催された第17回教育研究国際会議において、2016年10月12日に5つの研究発表を行い、以下の論文が抄録に収められた。

- Jung, I.S. An analysis and comparison of core curriculum in liberal arts colleges: Implications for East Asia higher education.
- Sasao, T. Juggling Teaching and Research at Liberal Arts Colleges in East Asia: Implications for Quality of Education and Faculty Development
- Nishimura, M. Challenges and Potentials of Liberal Arts Education in East Asia
- Son, W.C. Christian Faith and Liberal Arts Education in East Asia
- Chung, K.M. Liberal Arts Education via Curricular and Extracurricular Activities in a Residential College of Yonsei University

② 2016年6月22-23日に国際基督教大学において開催された第4回国際ワークショップ「リベラルアーツ・サイエンスを実践する—約束と可能性」において以下の11の論文が発表された。

- Ohe, H. How can technology-mediated collaboration foster Intercultural Sensitivity in a language class? : A case study of ICU, Japan and Chung-Ang University, Korea
- Kim, H. Integrating Liberal Arts Education within Counseling Program at Handong Global University (HGU): A Multi-cultural Approach
- Eda, S. Development of Intercultural Competence through Guided Independence: A Case of Middlebury College
- Khoo, H. E. Yale-US: A New Liberal Arts College – Integrating, Curriculum, Residential Life and Professional Experiences
- Iwata, Y. An English language program in the context of a liberal arts education: Studying academic English and acquiring critical thinking skills
- Bennett, P. Meeting the lexical challenge of a team-taught liberal arts course
- Kloos, B. Service learning with digital natives: Linking personal change with social change
- Niiya, Y. From Surviving to Thriving: GIS's Challenges in Establishing Competitive Liberal Arts Curriculum
- Sugimura, M. Sophia University's Policy and Experience of Promoting Inclusive Learning
- Batten, B. International and Multicultural Experiences at J. F. Oberlin University
- Maxey, T. The Challenges and Promises of Diversity at Amherst College

(3)出版物

① 国際ワークショップの論文集

② Springer社より2017年末に出版予定の書籍『Doing Liberal Arts Education: Global Cases』を予定である。目次は以下の通り。

- Chapter 1. Liberal arts education – Changes, challenges and choices
- **Part I: Interdisciplinary approaches to curriculum development**
- Chapter 2. Approaches to the core curriculum: An analysis and comparison of liberal arts colleges in Asia, North America and Europe
- Chapter 3. Beyond disciplinary boundaries: The case of Week 7 at the Yale-NUS College, Singapore
- Chapter 4. Core curriculum of liberal arts education: The case of Lingnan University, Hong Kong
- Chapter 5. Interdisciplinary curriculum and leadership education: The case of Flame University, India

- **Part II: Creative ways to integrate key values of liberal arts across subject areas**
- Chapter 6. Theme-based curriculum: The case of Big Questions courses at the Amsterdam College, the Netherlands
- Chapter 7. Technology-enhanced approaches to the development of inter-cultural communicative competencies in a collaborative language program: The case of the International Christian University, Japan
- Chapter 8. English for liberal arts at the International Christian University, Japan
- Chapter 9. Using Dialogue to Prompt Intercultural Communication: The case of Hope College, USA
- Chapter 10. Physical education for liberal arts: The case of the International Christian University, Japan
- **Part III: Diversity and inclusion**
- Chapter 11. Policies and practices of diversity and inclusion in liberal arts colleges
- Chapter 12. Inclusive learning for liberal arts education: The case of Landmark College, USA
- Chapter 13. Meeting strategic gender needs: The case of Asian University for Women, Bangladesh
- Chapter 14. Cross-cultural learning within a counseling program: The case of Handong Global University, South Korea
- Chapter 15. Cultural connectivity in the international programs: The case of Sophia University, Japan
- **Part IV: Research, evaluation and evidence-based policy making**
- Chapter 16. Evidence-based policy making in liberal arts colleges
- Chapter 17. Institutional research to support planning, decision-making and teaching and learning: The case of Pomona College, USA
- Chapter 18. Evaluation of study abroad outcomes: The case of Middlebury College, USA
- Chapter 19. Evaluation and improvement of residential liberal arts education: The case of Yonsei University, South Korea
- Chapter 20. Lessons for the future: A conceptual model and practical guidelines

学 校 名	椋 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教諭と児童へのアンケート調査 ②アクションリサーチ ③大学と地域の連携 ④小中連携			

○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 ー地域連携を活用したアクションリサーチー

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際には地域の小中学校との連携の必要性と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。

①1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) 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）

(4) 研究対象者はA小の児童432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、Q-Uを「Q」、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
（「学習上の問題」「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）を用いて児童の群分けを行った。また、担任教諭による児童の支援ニーズ認知について、自由記述の結果を整理し、各ニーズにおける特徴ごとに自由記述を整理した。まず、学習支援ニーズでは、(ア)境界域知能・アンダーアチーバー、(イ)学習意欲の課題・家庭学習の困難、(ウ)学習障害・認知特性の偏り、(エ)社会性・想像力の困難、(オ)注意集中・衝動コントロールの困難が挙げられた。次に、社会性支援ニーズでは、(ア)状況理解の困難、(イ)他者の感情認知の困難、(ウ)衝動・感情コントロールの困難、(エ)集団行動・ルール理解の困難が見いだされた。行動支援ニーズでは、(ア)集団行動・ルール理解の困難、(イ)多動・注意集中の困難、(ウ)衝動コントロールの困難、(オ)感覚特性の偏り・清潔さへの配慮困難が見いだされた。さらに、対人関係支援ニーズでは、(ア)集団適応の課題、(イ)ネガティブ感情への対処困難、(ウ)神経症的な症状、(エ)家庭生活の安定性に関する課題が挙げられた。家庭環境支援ニーズにおいては、(ア)養育者の接し方・基本的養育面の課題、(イ)養育環境のサポート資源の課題、(ウ)ネガティブ感情への対処困難が示された。身体健康支援ニーズでは、(ア)アレルギーの課題、(イ)心身症的な症状、(ウ)生活リズムの課題、(エ)清潔さへの課題が見いだされた〔西出・安立（2016a）〕。

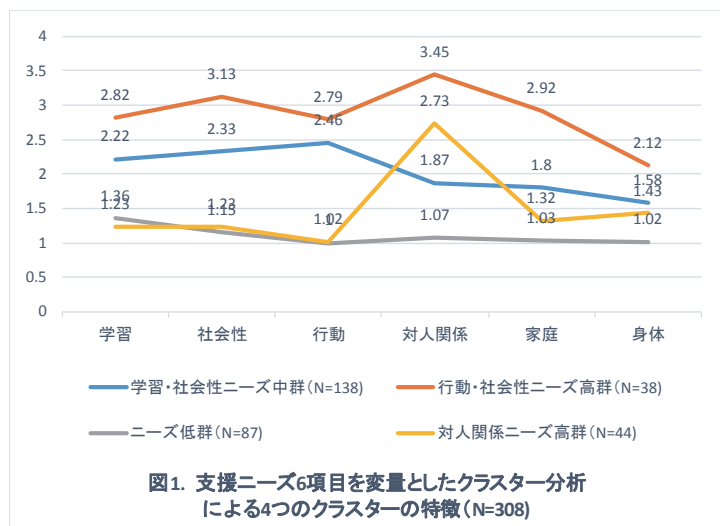
② 安立・西出（2015）同様、支援ニーズ6項目の合計得点の平均値を各児童の支援ニーズ認知得点とし（ $\alpha=.82$ ）、支援ニーズ得点が全児童の25%未満を「支援ニーズ低群」、25～75%を「支援ニーズ中群」、75%以上を「支援ニーズ高群」と命名した。学級適応感とコンピテンスについて、低学年・高学年毎に、学期（2：被験者内）×群（3：被験者間）の2要因分散分析を行った。その結果、低学年では、Q-Uの下位尺度のうち、「友達Q」「学習意欲Q」および「承認Q」において、有意な交互作用が認められ、1学期はニーズ高群が他群より有意に高かったが、2学期は群間差が見られなかった。高学年では、交互作用は見られなかった。

③ 支援ニーズ6項目の特徴を詳細に検討するために、支援ニーズ6項目を変数としたWard法クラスター分析を実施し、デンドログラムをもとに4つのクラスターを抽出し、“行動・社会性ニーズ高群(N=38)”“対人関係ニーズ高群(N=44)”“学習・社会性ニーズ中群(N=138)”“ニーズ低群(N=87)”と命名した（図1）。

④ 学級適応感とコンピテンスについて、時期（2：被験者内）×ニーズ群（4：被験者間）の2要因分散分析を行ったところ、低学年では、「友達Q」において交互作用がみられ、学習社会性ニーズ中群・ニーズ低群は時期による変化がなく、行動・社会性ニーズ高群は2学期に上昇した（図2）。また、高学年では3つの下位尺度で交互作用が見られた。「友達Q」では、対人関係ニーズ高群のみ2学期に下降し他の群は上昇した（図3）。「学習意欲Q」「学級満足Q」の2つの下位尺度では、ニーズ低

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

学習上の課題
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)
行動上の課題(多動である・衝動的である・不注意)
対人関係上の課題(過度に緊張する・黙り込む・大人しい)
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)
身体・健康上の課題(頭痛・腹痛・チック・抜毛などの身体症状)

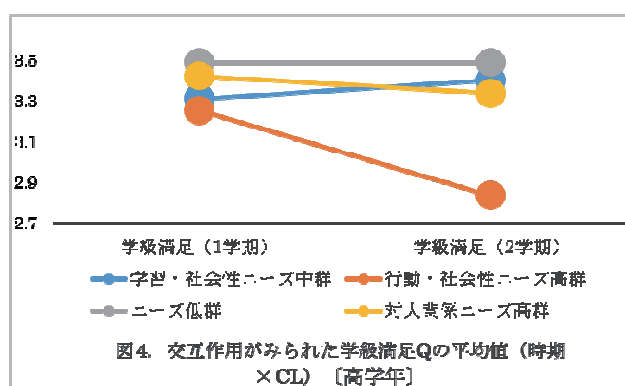
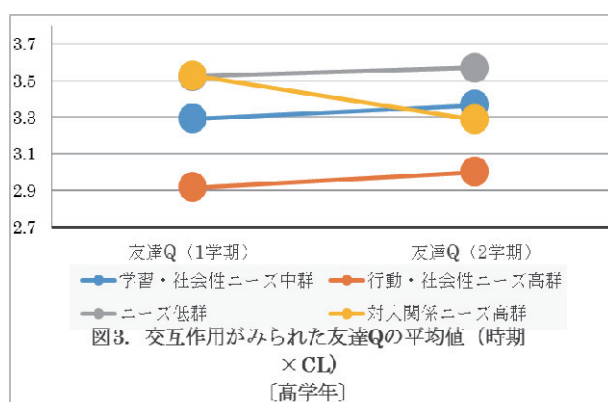
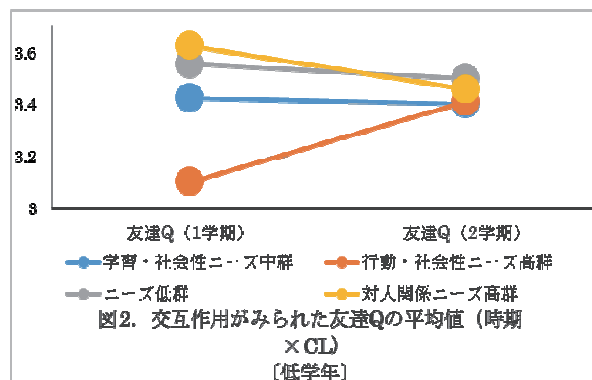


群は変化がないか上昇したが、行動・社会性ニーズ高群または対人関係ニーズ高群で低下した（図4：学級満足Q）。

＊低学年・高学年ともに「友達Q」で、行動・社会性ニーズ高群の適応感が高まった一方、高学年の対人関係ニーズ高群の「友達Q」は低下した。

＊高学年の「学習意欲Q」「学級満足Q」では、行動・社会性ニーズ高群において適応感が低下した。

＊支援は低学年で効果を示しやすいが、高学年では、フィードバックや支援方略をさらに検討する必要性が示唆された。



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実現化した。

③児童の学校適応感に関する調査結果から、担任から行動・社会性の側面で支援ニーズが高いと認知された児童は、低学年では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することが示されたが、高学年では下降する傾向が示された。発達段階に合わせた支援が必要であることが示唆された。

(2) アクションリサーチの反省と課題

①担任教諭に依頼している児童の支援ニーズ認知の調査は、担任にとって労力が大きく、欠損値が多い現状である。

②今後の課題として、①の課題を解消するためにも、小学校で実施する研修会のより効果的な方略や、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が挙げられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

西出弓枝・安立奈歩（2016b）：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（2）—調査時期および支援ニーズの特徴による学級適応感・コンピテンスの検討— 日本心理臨床学会第35回秋季大会発表論文集，592. [2016年9月7日発表 於 パシフィコ横浜]

(3) 出版物

西出弓枝・安立奈歩編（2016a）：児童のこころの健康のための支援マニュアル—調査の活用と支援のヒント集—. キンコーズジャパン.

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	九 州 共 立 大 学 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
野 田 耕	久 留 米 大 学 人 間 健 康 学 部	准 教 授	体育学からの提言
小 屋 菜 穂 子	九 州 共 立 大 学 ス ポ ー ツ 学 部	講 師	データ分析統括
久 保 田 も か	長 崎 大 学 教 育 学 部	准 教 授	運動競技コーチングの視点からの提言
松 本 亜 紀	九 州 共 立 大 学 ス ポ ー ツ 学 部	講 師	臨床心理学及び認知心理学からの提言
河 野 怜 美	福 岡 市 立 住 吉 中 学 校	教 諭	データ収集・整理
高 橋 佳 代	鹿 児 島 大 学 大 学 院 臨 床 心 理 学 研 究 科	准 教 授	臨床心理学からの提言

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

平成28年度においては、これまで行ってきた調査研究及び教育実践の成果を検証すると共に、心理学、教育学、コーチング等多角的な視点から体罰を容認しない教員養成プログラム及びツール（テキスト）の開発を行う計画であった。重点的な取り組みは以下の3点である。

【重点的な研究活動・取組】

(1) OBOGシンポジウム「体罰を許さない教員になるために」の実施

方法：教職課程学生に対して体罰に関するシンポジウムを開催し、その効果を検証する。

内容：心理教育プログラムの実施（体罰がもたらす影響、体罰にいたるメカニズム）

教育相談に関わる力量の向上, 生徒指導力の向上, 部活動のマネジメント方法

(2) 体罰防止テキストの作成

内容：昨年度作成した教育実習Q&Aを見直しつつ、研究成果を学生に還元するためのツールとして開発を行う。学生にわかりやすく調査結果のデータを解説するとともに、心理学、教育制度学、コーチング等多角的な視点から体罰がなにをもたらすのかを提示することを目指す。

(3) 教職課程科目におけるプログラムの試行

内容：これまでの調査研究の成果から得た知見を反映した講義を、教育制度論、教育方法論、教育相談、生徒進路指導論などの科目で実施し、効果を検証する。

3. 研究の成果

(1) OB・OGシンポジウムの実施とその成果

①対象：3年生・4年生（計166名）

②シンポジウムにおいて議論された内容：学校現場における体罰に関する現状、取り扱い
シンポジストの学生時代と教員になってからの体罰に関する意識の変化の有無、生徒との
関わりで注意をしていること、体罰がゼロにならない要因、体罰の効果について等。

③成果：アンケート調査の実施

シンポジウム終了後、アンケート調査を実施し、シンポジウムに参加した学生の体罰に関する認識の変化を明らかにした。

体罰に関して感想を寄せた学生は119名(71.6%)であり、記述の内容はすべて体罰に対して否定的なものであった。記述の中には、体罰の現状に対する理解が深まったことがうかがえるものや（「体罰に関して先生方の考えを聞いて体罰はいけないと再認識させられた。体罰は自分たちじゃなくて生徒たちの基準で決まるということが分かった。」）、体罰の効果に関する理解が深まったもの（「体罰は絶対にダメ。法で禁止されている。けんかを止めただけでも体罰とクレームがくる。生徒も体罰に敏感。失敗をすることが怖くなり、生徒が挑戦しなくなる。」）、体罰はなぜダメなのかという本質を理解できたことがうかがえる記述（「体罰はいけなしと思う。生徒は犬や猫のように叩いてしつけてはいけなしと思う。自分が先生としての魅力、人としての魅力を持てば、声掛けだけで生徒を従わせることができると思うし、そうであるべきだと思う。」）も多く見られた。今後、学校現場に学生が出向いた時、または卒業後学校現場に就職した際、この考えがどのように変化するかについて追跡調査を行うなどしていきたい。

他方でシンポジストらは、体罰ももちろんであるが体罰を含めてハラスメントに関する理解が今後の教員には求められるためそうした知識に対応した教育が必要であると述べていた。体罰以外のハラスメント防止についても今後は検討していきたい。

(2) 体罰防止テキストの作成 — 教育実習Q&A 2017年版の作成

体罰防止テキストについて検討を行った結果、昨年度作成した教育実習Q&Aをさらに改善し、4年生だけでなく3年生の事前指導から使用可能なテキストとして作成・使用することとした。その中に教員はなぜ体罰をしてはいけないのか、1・2年次で学んだ内容を振り返るワークシートを入れる他、シンポジウムの内容も踏まえ体罰以外のハラスメント防止にもつながる内容を取り入れた。

(3) カリキュラム開発

一部の教職課程の科目（教育制度論、教育方法論、教育相談、生徒・進路指導論）において開発したプログラムを経済学部教職課程で試行した。具体的には、教育制度論においては体罰について「禁止されているもの」と教えるだけでなく「なぜ体罰が禁止されているのか」という問いから学生に考えさせるワークを取り入れた。これまでの「禁止」前提とした講義よりも学生から様々な意見が出たうえで体罰の本質や効果に踏み込むことができたように感じている。さらに、教育方法論においては体罰の禁止を後輩に指導していくために、どのような教育方法が効果的か学生同士でディスカッションを行い、指導計画を作成するワークを行った。平成28年度に教育制度論を受講した学生が4年生になるまで過程・方法を検証しながら継続的に取り組んでいきたい。

この他、体系的に体罰の禁止及び使用の防止につながるよう、体系的かつ継続的に学生が学習することができるよう、授業計画に組み込んでいくことを確認した。1・2年次で取り扱う内容を踏まえテキストのワークシートについても作成を行った。

4. 研究の反省・考察

平成28年度においては、平成26年度より行ってきた調査研究及び教育実践の成果を検証すると共に、心理学、教育学、コーチング等多角的な視点から体罰を容認しない教員養成プログラム及びツール（テキスト）を開発することを最大の目的としていた。

3年間の取り組みを通じて、学生の実態を踏まえたうえで、体系的・継続的な体罰禁止・体罰の使用防止につながるカリキュラム開発及びテキスト作成を行うことができた。今後はカリキュラムの継続的な運用やテキストの効果的な使用法を進めていくとともに、学生のニーズや状態に応えることができているか、定期的にアンケート調査を実施するなど検証をしていかなければならない。

また、社会からのニーズとして体罰の他、あらゆるハラスメントを行わない要因の育成（ハラスメント防止教育）も応えていかなければならない。体罰という軸から様々なハラスメントが問題視されている理由等を理解できるよう指導方法の開発を今後も行っていきたい。

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9巻2号投稿予定執筆中）

(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－2017年度版』

平成 28 年度(第 41 回)学術研究振興資金 学術研究報告

平成 29 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・7319

FAX 03(3230)8223

禁無断転載