

2017

平成 29 年度（第 42 回）

学 術 研 究 振 興 資 金

The Science Research Promotion Fund

学 術 研 究 報 告

平成 30 年 10 月

はじめに

この報告書は、平成 29 年度(第 42 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 30 年 5 月末までに交付した資金総額は、2,984 件、76 億 4,688 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 30 年 9 月末で、54 億 1,483 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 30 年 10 月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長 清 家 篤

目 次

I	平成 29 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 29 年度学術研究振興資金 研究課題一覧	3
V	平成 29 年度（第 42 回）学術研究振興資金 学術研究報告	5

I 平成29年度学術研究振興資金 応募状況及び採択状況

内 訳	区 分	応募		採 択		採択率(%)
		件数(件)	希望額(千円)	件数(件)	交付額(千円)	
	合 計	137	310,800	53	80,600	38.7
新規・継続別	新 規	104	223,100	27	39,200	26.0
	継 続 2 年 目	21	59,300	15	25,800	71.4
	継 続 3 年 目	12	28,400	11	15,600	91.7
学校種別	大 学	126	303,000	53	80,600	42.1
	短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	11	7,800	0	0	0.0
研究区分別	人文・社会科学系	38	42,100	15	11,500	39.5
	理工系、農学系	37	95,400	15	32,400	40.5
	生物学系、医学系	62	173,300	23	36,700	37.1

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23年度	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	29年度	合 計
経済団体	2,107,328	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	0	2,132,328
個別会社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学校法人	1,460,125	708	0	0	0	0	0	1,460,833
個人	197,167	52	1,133	1,022	213	0	90	199,677
合 計	5,386,620	5,760	6,133	6,022	5,213	5,000	90	5,414,838
基金保有額	5,386,620	5,392,380	5,398,513	5,404,535	5,409,748	5,414,748	5,414,838	-

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23年度	24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	29年度	合 計
医学	2,662,980	53,800	49,400	47,600	36,900	28,400	29,100	2,908,180
環境科学	191,640	13,900	8,700	2,000	1,000	3,000	3,000	223,240
理学	844,510	5,900	22,900	19,200	20,700	9,500	13,000	935,710
工学	1,604,660	8,600	5,000	5,100	2,600	4,400	10,700	1,641,060
農学	264,400	2,800	11,100	8,200	11,500	16,100	8,300	322,400
文学	689,960	9,100	7,100	10,000	7,000	11,400	9,500	744,060
法学	102,320	2,000	0	0	2,300	500	300	107,420
経済学	217,680	10,700	6,000	2,200	1,400	900	900	239,780
家政学	207,460	800	2,500	3,500	3,000	3,200	3,000	223,460
体育学	22,300	4,500	0	0	0	1,000	2,000	29,800
教育学	178,070	2,900	2,100	2,200	3,400	1,700	800	191,170
合 計	6,985,980	115,000	114,800	100,000	89,800	80,100	80,600	7,566,280

(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。

IV 平成29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	岩手医科大学	医学	抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による抗粥状硬化症新規治療法の開発	1,200	6
2	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	1,400	10
3	東京慈恵会医科大学	医学	動脈管閉鎖機序の解明	2,400	15
4	芝浦工業大学	医学	脳障害により失われた脳神経を修復・再生する低分子化合物の創製	500	19
5	順天堂大学	医学	iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬	4,800	24
6	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	28
7	日本大学	医学	糖尿病発症の新たな責任分子としての脂肪組織ダイオキシン受容体	600	33
8	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	37
9	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	1,700	41
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	45
11	常葉大学	医学	脳梗塞モデル動物への運動処方と糖代謝を介する神経可塑性の関係	700	49
12	京都薬科大学	医学	慢性炎症制御を基盤とした非アルコール性脂肪肝炎治療法の開発	1,000	53
13	大阪薬科大学	医学	水腎症の早期検出を指向した基礎および臨床検討	1,000	58
14	大阪歯科大学	医学	安全性の高いiPS細胞由来間葉系幹細胞調達方法の探索	700	62
15	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	66
16	兵庫医科大学	医学	IL-33がアトピー性角結膜炎などの炎症性疾患に与える影響の研究	500	70
17	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	74
18	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	2,000	78
19	産業医科大学	医学	環境汚染物質が誘発する酸化ストレス応答の高感度検出法の開発	1,000	82
20	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	86
21	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	1,400	91
22	中央大学	理学	光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築	5,400	95
23	明星大学	理学	ス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	99
24	光産業創成大学院大学	理学	動いている生体分子1分子の高時間分解能蛍光検出	1,200	103
25	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	108
26	東北工業大学	工学	睡眠覚醒リズムを持つヒトiPS細胞由来神経ネットワークの創生	2,900	111
27	青山学院大学	工学	層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用	3,000	114
28	東京理科大学	工学	新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生	700	117

IV 平成29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	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	1,400	122
30	愛知工業大学	工学	高機能形状記憶材料の開発とスマート素子への応用	1,200	126
31	名城大学	工学	触媒環境の構築による細径単層カーボンナノチューブの高効率生成	1,500	130
32	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	135
33	東京農業大学	農学	妊娠を支えるエキソソーム由来miRNAの解明とその制御	3,000	139
34	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	2,100	143
35	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	1,200	147
36	学習院大学	文学	東アジアの都市における歴史遺産の保護と破壊	2,500	152
37	昭和女子大学	文学	ベトナム・クーラオチャム島の日越共同考古学調査	1,000	156
38	成城大学	文学	地域社会における関係性の変容に関する実証的研究	500	160
39	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	1,000	164
40	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	700	167
41	京都外国語大学	文学	考古学博物館学によるニカラグア・カリブ海地域古代社会の再検討	900	171
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	900	175
43	追手門学院大学	文学	遺児へのグリーフケアプログラムの実証的効果研究	300	180
44	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	1,400	185
45	熊本学園大学	文学	障害児者入所施設への外部アドボカシー導入研究	300	188
46	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	300	193
47	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	500	198
48	愛知大学	経済学	「家族と市場の境界」に関する理論及び実地調査に基づく実証分析	400	203
49	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	500	207
50	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	211
51	豊橋創造大学	体育学	サルコペニア克服へ向けた加齢性骨格筋萎縮機構の解明	2,000	215
52	大正大学	教育学	避難が発達障害の子どもと家族に与えた影響	500	219
53	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	224
交付額計				80,600	

(注) 研究分野の「医学」には薬学、歯学を、「理学」には生物学、生物科学、生理人類学(生物系理学)を、「工学」には情報科学、原子力学を、「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 29 年度（第 42 回）

学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	岩 手 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による抗粥状硬化症新規治療法の開発 —革新的細胞治療による抗動脈硬化療法の開発—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①歯周病 ②動脈硬化症 ③M2マクロファージ ④間葉系幹細胞 ⑤ニッチ ⑥細胞治療 ⑦アテローム硬化			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 崎 明	歯 学 部	教 授	研究の計画、研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
八 重 柏 隆	歯 学 部	教 授	研究の計画、研究全般
原 田 英 光	歯 学 部	教 授	研究の計画、組織学的実験
佐 原 資 謹	歯 学 部	教 授	研究の計画、動物学的実験
加 茂 政 晴	歯 学 部	准 教 授	細胞培養実験、分子生物学的実験
客 本 齊 子	歯 学 部	研 究 員	細胞培養実験、分子生物学的実験
帖 佐 直 幸	歯 学 部	准 教 授	細胞培養実験、分子生物学的実験
滝 沢 尚 希	歯 学 部	助 教	細胞培養実験、動物実験、分子生物学的実験

抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による 抗粥状硬化症新規治療法の開発 — 革新的細胞治療による抗動脈硬化療法の開発 —

1. 研究の目的

- (1) アテローム硬化症の発症や進行には炎症性マクロファージ (M1-MΦ) のプラーク周囲への浸潤が著明であり炎症巣としての病変は明らかであるが、炎症症状を抑制する機能を有する抗炎症性マクロファージ (M2-MΦ) の集積は少ない。また、他の研究グループによる動物実験で明らかとされたエビデンスにより、多くの M2-MΦ をプラーク周囲に集積させ、その抗炎症機能を強く発現させればアテローム硬化症は治癒に向かうことは間違いないと考えられる。しかし、自己の M2-MΦ を *ex vivo* で大量に増殖させる技術や、プラーク周囲に M2-MΦ を選択的に集積させる技術は確立されていない。加えて、プラーク周囲への歯周病菌の感染が、どのようにアテローム硬化症の発症の誘導に関わるかは分子レベルで不明である。
 - ① これまでの我々の調査により明らかとなった抗炎症性血球細胞ニッチとしての間葉系幹細胞と M2-MΦ あるいはその前駆細胞との細胞間相互作用による M2-MΦ の活性化機構について、分子生物学レベルで明らかとする。
 - ② ① で明らかとされた間葉系幹細胞による M2-MΦ の活性化機構を応用した *ex vivo* M2-MΦ 大量培養系を確立し、間葉系幹細胞と M2-MΦ との併用による革新的な細胞治療基盤を動物実験レベルで樹立する。
 - ③ 間葉系幹細胞と M2-MΦ との相互作用によるアテローム硬化治癒機構に歯周病がどのように関わるかについて分子生物学レベルで明らかとする。

2. 研究の計画

抗炎症性血球細胞ニッチとしての間葉系幹細胞と M2-MΦ あるいはその前駆細胞との細胞間相互作用による M2-MΦ の活性化機構の全容について、分子生物学レベルで明らかとする。

- (1) M2-MΦ 前駆細胞の増殖・分化を促進する因子 (液性因子、接着因子) の候補となるモデル因子 (遺伝子) のピックアップをする。
 - ① マウス脛骨髄より骨髄細胞を採取し我々の確立した独自の条件下で培養を行う。この条件下では間葉系幹細胞と血球系細胞の共存下、M2-MΦ が増殖することが分かっている。共培養 (赤血球は培地交換時に除かれる) を行った細胞を Lineage Depletion Kit を用いて間葉系幹細胞と Lin+ 細胞に分離する。
 - ② ① により得た間葉系幹細胞と Lin+ 細胞を用いて、A. それぞれの単独培養、B. トランスウェルを利用した非接着共培養、C. 接着共培養の3つの培養法を行う。培養後、間葉系幹細胞と Lin+ 細胞をそれぞれ回収し mRNA を抽出する。C では混在する両細胞を上記キットで分離してそれぞれの mRNA を得る。次いで DNA アレイ法により間葉系幹細胞と Lin+ 細胞それぞれにおいて A と B 間、また B と C 間に発現頻度差のある遺伝子を網羅的に解析しピックアップする。この中から細胞増殖因子、サイトカイン、受容体ならびに接着因子を見いだして候補 (モデル) 遺伝子とする (A と B 間では液性因子、B と C 間では接着因子としてのモデル因子がピックアップされる)。
- (2) M2-MΦ 増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子の同定
 - ① (1)-② でピックアップされたモデル因子が M2-MΦ 前駆細胞の増殖・分化誘導能があるか各因子 (遺伝子) 過剰発現系を用いて検討する。この際、因子の発現ベクターが市販されている場合はこれを用いるが、そうでない場合には、因子をクローニング (In-Fusion cloning) 後アデノウイルス発現ベクターを構築し、これを用いて間葉系幹細胞ならびに、骨髄を採取し分離した Lin+ 細胞にモデル因子をそれぞれ過剰発現させる。
 - ② (2)-① によりモデル因子を過剰発現させた間葉系幹細胞と Lin+ 細胞を共培養し、(ア) 細胞増殖能を調べる (過剰発現させない場合と比較)。(イ) 共培養した間葉系幹細胞から

Lin⁺細胞を(1)-①の方法により分離し、M2-Mφマーカー(IL10, Arg-1, CD206)の発現を調査する。これら(ア), (イ)より、ピックアップされたモデル因子が実際にM2-Mφ前駆細胞の増殖・分化を促進するか否かが明らかになり、真の因子(液性因子と接着因子)が同定される。

3. 研究の成果

- (1) M2-Mφ前駆細胞の増殖・分化を促進する因子(液性因子、接着因子)の候補となるモデル因子(遺伝子)のピックアップと一部因子の同定に成功した。
 - ① マウス脛骨髄より骨髄細胞を採取して低酸素条件(5% O₂ならびに5% CO₂の条件)で培養すると、IL-10を分泌するM2-Mφが大量に得られることを明らかとした。そこで、この低酸素培養におけるM2-Mφ増殖促進メカニズムについて細胞・分子レベルで明らかとするため、この骨髄細胞を構成する間葉系幹細胞と血球系細胞とを分離した後、各細胞間で5倍以上発現の異なる遺伝子について調査した。とくに、間葉系幹細胞で多く発現するサイトカインと血球細胞側で多く発現するサイトカイン受容体との組合せを検討したところ、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)とM-CSF受容体の組み合わせが明らかとなった。加えて我々は、この間葉系幹細胞から産生・分泌されるM-CSFが骨髄細胞に含まれるM2-Mφ前駆細胞を刺激して増殖させることを明らかとした
 - ② 間葉系幹細胞の表面に発現する接着因子intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)とM2-Mφ前駆細胞の表面に発現する接着因子lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1)との結合により、M2-Mφ前駆細胞が成熟したM2-Mφに分化誘導されることを明らかとした。
 - ③ 我々が発見した骨髄細胞の低酸素培養条件では、通常の培養条件と比較しても間葉系幹細胞からのM-CSFの発現やM2-Mφ前駆細胞におけるM-CSF受容体の発現が促進される訳ではなく、低酸素培養によりM2-Mφ前駆細胞を選択的に増殖させるためにはM-CSFとその受容体を介した増殖メカニズムのみならず、その他の分子メカニズムの存在が示唆された。現在、この分子メカニズムを解明するため、低酸素培養と通常培養条件下で発現が異なる遺伝子発現について各細胞で明らかにすべく調査を実施しているところである。この研究結果が明らかとなれば、我々の発見した骨髄細胞の低酸素培養での選択的なM2-Mφの増殖メカニズムの全容解明に近づくものと大いに期待される。

4. 研究の反省・考察

- (1) M2-Mφ増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子のさらなる同定を継続中である。
 - ① 平成29年度研究計画に従い、細胞単独培養、非接着性共培養ならびに接着性共培養の間で比較した際に各々の培養条件で発現の異なる遺伝子を同定するための研究を実施しているところであるが、3-(1)-①ならびに②に記載した液性因子と接着因子以外には新たに同定された分子は得られていない。このため、M2-Mφ増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子のさらなる同定を継続中である。
- (2) M2-Mφ大量培養キー遺伝子の同定を実施している。
 - ① 上記3-(1)-③にも記載したように、低酸素培養と通常培養条件下で発現が異なる遺伝子発現についても調査中であり、これらの研究によりモデル遺伝子のピックアップと、それらの中からのM2-Mφ大量培養キー遺伝子の同定を継続して実施している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Takizawa, N., Okubo, N., Kamo, M., Chosa, N., Mikami, T., Suzuki, K., Yokota, S., Ibi, M., Ohtsuka, M., Taira, M., Yaegashi, T., Ishisaki, A., and Kyakumoto, S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Exp. Cell Res.*, 358: 411-420, 2017.
- ② Nemoto, A., Chosa, N., Kyakumoto, S., Yokota, S., Kamo, M., Noda, M., and Ishisaki, A. Water-soluble factors eluted from surface pre-reacted glass-ionomer

filler promote osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mol. Med. Rep.*, 17: 3448-3454, 2018.

- ③Chosa, N., and Ishisaki, A. Two novel mechanisms for maintenance of stemness in mesenchymal stem cells: SCRG1/BST1 axis and cell-cell adhesion through N-cadherin. *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, 54: 37-44, 2018.
 - ④石崎 明、帖佐直幸. 間葉系幹細胞の幹細胞性維持のために働く新たな分子機構. *生化学*, 89: 428-431, 2017.
 - ⑤Kikuchi, K., Masuda, T., Fujiwara, N., Kuji, A., Miura, H., Jung, H-S., Harada, H., and Otsu, K. Craniofacial bone regeneration using iPS cell-derived neural crest like cells. *J. Hard Tissue Biol.*, 27: 1-10, 2018.
 - ⑥Shimizu, T., Wisessmith, W., Li, J., Abe, M., Sakimura, K., Chetsawang, B., Sahara, Y., Tohyama, K., Tanaka, K.F., Ikenaka, K. The balance between cathepsin C and cystatin F controls remyelination in the brain of Plp1-overexpressing mouse, a chronic demyelinating disease model. *Glia* 65:917-930, 2017.
- (2) 口頭発表
- ①客本齊子、滝沢尚樹、大久保直登、加茂政晴、帖佐直幸、横田聖司、大塚正人、衣斐美歩、八重柏隆、石崎 明. 低酸素培養下においてマウス骨髄由来間葉系幹細胞は細胞間接着依存的ならびに非依存的に免疫抑制（抗炎症）性マクロファージ（M2-MΦ）を誘導する. 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月7日（神戸ポートアイランド）
 - ②根本 章、帖佐 直幸、客本齊子、横田聖司、加茂政晴、野田 守、石崎 明. 歯科材料からの溶出成分がヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に与える影響. 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月7日（神戸ポートアイランド）
 - ③太田麻衣子、帖佐直幸、横田聖司、客本齊子、加茂政晴、佐藤健一、城 茂治、石崎 明. 歯周靭帯由来細胞における神経栄養因子NGFの発現機構に関する研究. 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月7日（神戸ポートアイランド）
 - ④Harada H. Contact inhibition of locomotion via EMT by TGF-Rho signal leads to genesis of Epithelial cell rests of Malassez from Hertwig' s epithelial root sheath. 15th Annual Meeting of the Korean Basic Dental Science Society Association, 25 November 2016 (Seoul, Korea)
- (3) 出版物
なし

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 －iPS細胞移植によるin vivoモデルの病態解析－		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 — iPS細胞移植による in vivo モデルの病態解析 —

1. 研究の目的

- (1) 優性遺伝性パーキンソン病 (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 使用した 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 1 名の iPSC 1 株を用いる。また、本研究で樹立したゲノム編集で I2020T 変異を修復した PD 患者 iPSC (ゲノム編集 iPSC) も使用する。分化誘導法は、iPSC から神経幹細胞 (NS) を形成させて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。
 - ② iPSC-NS 移植マウスを作製するために、8~22 週齢の雄性 SCID マウスまたは雄性 RAG2-KO マウスを使用し、ソムノペンチル麻酔下で脳定位固定装置に固定し切開後、マイクロシリンドジを用いて右線条体 (Br; 0.0 mm, L; 2.0 mm, D; 3.0mm) に iPSC-NS 懸濁液を 4×10^5 cells/4 μ l ずつ移植する。また Injection control として、NS 用培地を移植する。
 - 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、オープンフィールド、ロータロッドテスト、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。
 - ⑤ 一部の移植マウスは、解剖時に右および左線条体領域を摘出して RNA を抽出し、炎症関連シグナル伝達分子および炎症性サイトカイン群の mRNA 発現レベルを定量的 PCR で調べる。さらに、摘出した線条体または中脳について、HPLC を用いて脳内モノアミンの測定を行う。
- (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
 - ① TALEN 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。
 - ③ LRRK2-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。
 - ④ PD 患者 iPSC およびゲノム編集 iPSC 由来神経細胞に対して、薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索を行う。神経保護効果の指標は、酸化ストレスに対するアポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長について評価する。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
 - ① 申請者の研究室が作製の I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウス (LRRK2-TG マウス) は、23 および 34 週齢において運動機能異常を示すことを報告している (Molecular Neurodegener 2012)。LRRK2-TG マウスを繁殖させ、移植に備えて 20 週齢および 30 週齢まで育成する。
 - ② 樹立ゲノム編集 iPSC-NS を実験 I と同様の方法で線条体に移植する。移植後、細胞治療による治療効果として、運動機能テストを行い、運動機能異常の改善がみられるかどうかを評価する。
 - ③ 移植マウスは、免疫組織化学染色による形態学的解析と HPLC による生化学的解析を行い、

病態の改善がみられるかどうかを評価する。

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33週の長期移植におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスから作製した脳凍結切片を用いて、HE染色を行った。その後、ヒト特異的抗体STEM121（細胞質タンパク質）およびSTEM123（アストロサイトGFAPタンパク質）を用いて免疫組織化学染色を行った結果、移植側の線条体において、iPSC-NS由来の神経細胞およびアストロサイトの生着を確認した。さらに、STEM121抗体陽性神経細胞がTH抗体と共局在していることを確認した。また、移植後31週のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいては、ヒト特異的抗体STEM101（核タンパク質）、STEM121、STEM123にそれぞれ陽性を示す細胞を多数確認した。さらに、STEM121抗体がヒト神経細胞特異的なhMAP2抗体と共局在していることを確認した。同様に、移植後33週のPD患者iPSC-NS移植RAG2-KOマウスにおいても、STEM121抗体陽性神経細胞がTH抗体と共局在していることを確認した。また、移植後36週および39週のPD患者iPSC-NS移植RAG2-KOマウスにおいても、STEM121抗体陽性神経細胞を確認した。
- ③ 移植したPD患者iPSC-NS由来細胞がマウスミクログリアに及ぼす影響を調べるために、Iba1抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、移植後33週のSCIDマウスにおける移植側の線条体ミクログリアは、非移植側に比べ、形態学的な変化や細胞数に差異はみられなかった。しかし、移植側の線条体ミクログリアは、細胞質が肥大したPD患者iPSC-NS由来アストロサイトの周囲に多数存在していた。
- ④ iPSC-NS移植による運動機能の差異を調べるため、移植後3日から195日間におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群とInjection control SCIDマウス群について、シリンダーテストを行った。その結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、Injection control SCIDマウス群に比べ、立ち上がり時の前肢がシリンダー壁内に触れる回数に増加傾向がみられた。また、前肢がシリンダー壁内に触れる回数に左右差はみられなかった。また、移植後36日から181日までの期間におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群とInjection control SCIDマウス群について、飲水および摂食テストを行った結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群において、飲水量および摂食量が減少している傾向がみられた。オープンフィールド、ロータロッドテストについては、現在解析中である。
- ⑤ 移植した健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS由来細胞がマウスミクログリアに及ぼす影響を調べるために、健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスを作製した。移植後3週、10週、20週、31週の各iPSC-NS移植SCIDマウスにおける脳凍結切片を作製し、免疫組織化学染色を行い、現在解析中である。
- ⑥ iPSC-NS移植細胞が誘発するミクログリアの活性化について明らかにするために、移植後20週の健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群の線条体におけるmRNA発現レベルを調べた。mRNA発現解析の結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウス群に比べ、ERK1、p38、IL-1 β 、TNF- α のmRNA発現レベルが増加していた。

(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

- ① 低分子化合物を用いて、樹立したゲノム編集iPSCから神経細胞を分化誘導した。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。
- ② 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。

- ③5種の既存化合物を用いた解析から、アポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長を示すCompound Xを見出した。現在、詳細を解析中である。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
- ①現在、LRRK2-TGマウスを繁殖させ、移植に備えて20週齢および30週齢まで成育中である。今後、LRRK2-TGマウスに遺伝子修復iPSC-NSを実験(1)と同様に脳内移植する予定である。

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
- ①PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスの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、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウスを作製し、病態解析を現在進めている。
- ②PD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、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。
- ③移植後20週の PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウス群に比べ、炎症性サイトカインが増加していたため、今後再現実験を行う必要がある。
- (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樹立したゲノム編集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、ゲノム編集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。
- ②今回のゲノム編集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。
- ③既存化合物を用いた解析から、アポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長を示すCompound Xを見出したため、今後詳細について解析を必要がある。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
- ① 現在、LRRK2-TGマウスを繁殖させ、移植に備えて20週齢および30週齢まで成育中である。今後、LRRK2-TGマウスに遺伝子修復iPSC-NSを脳内移植する予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
- ①Murakami N, Ishikawa T, Kondo T, Keiko Imamura, Tsukita K, Enami T, Funayama M, Shibukawa R, Matsumoto S, Izumi Y, Ohta E, Obata F, Kaji R, Inoue H. Establishment of DYT5 patient-specific induced pluripotent stem cells with a GCH1 mutation. *Stem Cell Res.*, 24, 36-39, 2017.
- ②Ohta E, Sone T, Obinata Y, Ukai H, Hisamatsu T, Kitagawa T, Ishikawa M, Komano H, Ueda HR, Obata F, Okano H. Generation of gene-corrected iPSC from patient-derived iPSC with familial Parkinson's disease: International Society for Stem Cell Research 2017 Annual Meeting, USA(Boston) 2017.
- ③Obinata Y, Iwashita Y, Nagai M, Hattori A, Eshima K, Obata F, Okano H, Ohta E. Generation of a mouse model of familial Parkinson's disease bearing patient iPSC-derived transplanted neurospheres: XXIII World Congress of Neurology, Japan(Kyoto) 2017.
- ④Ohta E, Obinata Y, Iwashita Y, Nagai M, Hattori A, Eshima K, Obata F, Okano H. Generation of a mouse model of familial Parkinson's disease bearing patient

iPSC-derived transplanted neurospheres: The 8th meeting of Asian Cellular Therapy Organization, Japan(Tokyo) 2017.

- ⑤大日方友理、岩下由佳、永井真貴子、服部精人、江島耕二、岡野栄之、小幡 文弥、太田悦朗「遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経幹細胞移植マウスの作製」 第40回日本神経科学大会、2017年7月
 - ⑥大日方友理、岩下 由佳、永井 真貴子、服部 精人、江島 耕二、小幡 文弥、川村 俊彦、岡野 栄之、太田悦朗「遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経幹細胞移植マウスの作製および病態解析」 第17回日本再生医療学会総会、2018年3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、川村俊彦、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経細胞における経時的なmRNA発現解析」 第17回日本再生医療学会総会、2018年3月
- (3) 出版物
- ①高橋良輔（企画）、太田悦朗（分担執筆）：週刊「医学のあゆみパーキンソン病の新展開－発症の分子機構と新規治療」（担当箇所：LRRK2(PARK8)の病態）、医歯薬出版株式会社、262巻6号、pp. 591-596、2017

学 校 名	東京慈恵会医科大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動脈管閉鎖機序の解明 －動脈管開存症の新たな治療法開発をめざして－		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①未熟児 ②胎児循環 ③血管生物学 ④先天性心疾患 ⑤プロスタグランジン ⑥血管リモデリング ⑦内皮細胞 ⑧治療法開発			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 沢 享	医学部 医学科 細胞生理学講座	教 授	研究の立案と統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 池 徹	医学部 医学科 細胞生理学講座	講 師	分子生物学的実験を担当

動脈管閉鎖機序の解明

—動脈管開存症の新たな治療法開発をめざして—

1. 研究の目的

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈とを連結して、右室からの血液を直接、体循環に送る大血管であるが、出生後数日で閉鎖しなくてはならない。出生後も動脈管が閉鎖しない場合を動脈管開存症 (PDA) と呼び、未熟児に高頻度 (出生体重 1500 g 未満の低出生体重児の 40-50%) で認められ、未熟児の予後を決定する因子として極めて重要である。未熟児 PDA への治療はカテーテル治療や手術治療が困難なため、動脈管収縮を促すインドメタシンなどのプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 合成阻害剤による薬物療法が主体となるが、無効例や副作用も多い。しかし、インドメタシンに代わる新たな薬剤は未だに開発されていない。申請者らは PGE₂ が動脈管拡張という機能的役割以外に、その特異的受容体 EP₄ を介して、動脈管血管内膜肥厚を促進すること及び動脈管弾性線維の形成不良の主因となることを明らかにした。これらの一連の先行研究によって「動脈管の恒久的な閉鎖には血管収縮のみならず、構造的機能的分化・成熟を促すことが重要である」ことが明らかとなり、本研究では、動脈管の閉鎖・開存を制御する分子機序に基づいた新たな治療法を開発・確立することを目的とした。小児医療の分野では極めて重要な研究課題であるが、基礎的研究が進展していないため、本研究によって PGE₂ 合成阻害剤に代わる新たな治療法が開発が期待され、新生児・小児医療上の臨床的意義が大きいと考えられる。また、本研究により得られた知見は、動脈硬化や機械的血管内皮障害によって、病的な内膜肥厚が形成されることや加齢に伴い血管弾性線維の低形成が生じることから、血管病変の病態の解明に寄与すると考えられる。

2. 研究の計画

(1) 動脈管内皮細胞特異的因子の役割解明:

先行研究で見出した動脈管内皮細胞に高発現する因子が血管収縮や組織構築に果たす役割を明らかにすることを目指した。血管内皮細胞は血管内腔に面し、血流中の様々な刺激や変化を最初に感知し、血管全体に伝える。そのために血管内皮細胞は一酸化窒素 (NO) やエンドセリンの産生をはじめ、重要な血管機能が備わっている。動脈管で酸素や PGE₂ に対して感受性が高い原因には、それらを感知する内皮細胞の性質が、隣接する他の血管の内皮細胞の性質と異なることが推測される。我々は先行研究において FACS 法を用いてラット胎仔動脈管内皮細胞を単離・収集し、DNA マイクロアレイ法を用いて、動脈管内皮細胞で高発現している遺伝子の同定に初めて成功した。これらの遺伝子群の中から、血管リモデリングに関与する可能性の高い遺伝子をさらに選択し、神経堤細胞に高発現するとされる Tbx1、Pitx2、Fgf10 が血管収縮や組織構築に大きな役割を果たすと考え、その役割を明らかにすることを目指した。

(2) PGE₂-EP₄ 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明:

先行研究の結果、EP₄ 刺激が弾性線維形成を抑制する下流シグナルとして Src-PLC 経路が働くことを平滑筋培養細胞実験において見出した。しかし、実際の生体内でこの経路が働いているのかに関しては実験的に確かめられていない。弾性線維は EP₄ 刺激によって、細胞外での架橋形成が不良になる。そこで動脈管平滑筋細胞に EP₄ 刺激を与えた際に分泌が変化するエラスチン以外の細胞外基質因子を LC-MS/MS 分析法で調べた。これによって EP₄ 下流における cAMP を介さない経路の同定と機能解明について実験的に検証した。

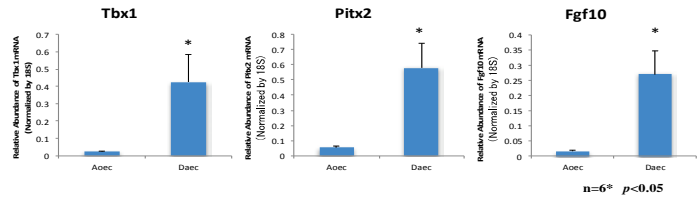
(3) PGE₂-EP₄ シグナル経路を介さない動脈管リモデリング因子の同定:

平成 29 年度は酸素分圧の上昇と動脈管リモデリングの研究に着手した。動脈管平滑筋培養細胞を 1% 低酸素下で培養後に、正常酸素下 (21%) に戻す実験系において、低酸素から正常酸素下に戻した過程で、培養上清中に分泌が変化する細胞外基質因子を LC-MS/MS 分析法で調べた。さらに PGE₂-EP₄ シグナルを介さない経路の研究のため、胎生期の PGE₂ 主要産生臓器である胎盤を持たない鳥類 (ニワトリを使用) の動脈管におけるリモデリング機序の解明にも着手した。

3. 研究の成果

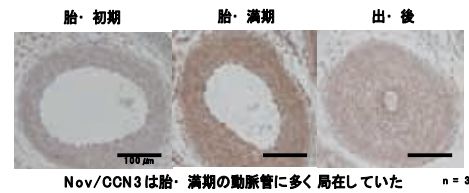
(1) 動脈管内皮細胞特異的因子の役割解明

先行研究 (Liu et al. Plos One 2013)で見出した動脈管内皮細胞に高発現する遺伝子のうち、Tbx1、Pitx2、Fgf10が血管収縮や組織構築に大きな役割を果たすと考えた。最初にFACS法を用いてラット胎仔・新生仔動脈管内皮細胞を単離・収集し、RT-PCR法でこれらが動脈管内皮細胞で高発現していることを確認した(右図: 生直後: 各パネル左が大動脈内皮細胞、右が動脈管内皮細胞)。Fgf10に関しては、免疫染色法にて、ラット動脈管内皮細胞に高発現していることも確認できた。その他、eNOS、エンドセリン受容体(A、B)、P2X4などが動脈管内皮細胞で特異的に発現が上昇していることをRT-PCRで確認した。



(2) PGE₂-EP4 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明

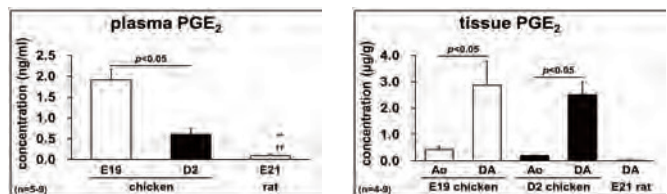
EP4刺激が弾性線維形成を抑制するSrc-PLC経路を検証するのに先だって、動脈管平滑筋細胞にEP4刺激を与えた際に分泌される、エラスチン以外の細胞外基質因子をLC-MS/MS分析法で調べた。その結果、Nov/CCN3が有意にPGE₂およびEP4刺激により動脈管平滑筋細胞培養上清中に増加することを見出した。Nov/CCN3は他の血管でリモデリングに影響を及ぼす可能性が示唆されているものの、これまで、動脈管リモデリングについては全く研究がなされていなかった。そこで、Nov/CCN3リコンビナントタンパク質を使って、Nov/CCN3が動脈管平滑筋細胞からのヒアルロン酸の分泌量を低下させること、平滑筋細胞増殖能へは大きな影響を与えないことを明らかにした。EP4刺激によって、細胞外基質が複雑に変化し、動脈管リモデリングに影響を及ぼす可能性が示唆された。また、Nov/CCN3が胎生後期のラット動脈管に強く発現することを見出した(右図)。



(3) PGE₂-EP4 シグナル経路を介さない動脈管リモデリング因子の同定

動脈管平滑筋培養細胞を1%低酸素下で培養後に、正常酸素下(21%)に戻す実験系において、低酸素から正常酸素化過程で、培養上清中のエラスチンが減少すること、平滑筋細胞内カルシウム濃度が上昇すること、平滑筋細胞遊走能が亢進することを見出した。これらの結果は酸素化が動脈管リモデリングを促進していることを強く示唆していた。

また、ニワトリ胚を使った実験において、まずPGE₂が本当に少ないのかどうかを検証したところ、想定外にもニワトリ胚の血中PGE₂濃度はラット胎児以上に高値であった。さらに血管組織においてもニワトリ動脈管ではPGE₂濃度が大動脈に比して有意に高値であった(右図)。



4. 研究の反省・考察

(1) 動脈管内皮細胞特異的因子の役割解明

- ①ラット動脈管内皮細胞において、Tbx1、Pitx2、Fgf10の発現が高いことが確認できた。この結果からラット動脈管内皮細胞の多くは神経堤細胞由来であることが示唆された。本結果はラットのみならず、今後、ヒト動脈管組織を収集し、Tbx1、Pitx2、Fgf10などの内皮細胞での発現確認が必要である。
- ②当初計画していたラット動脈管内皮細胞の継代培養実験系は、平成29年度内では確立できてなかった点が反省点である。この大きな原因は小さい組織から十分量の細胞数を取るための細胞分離方法が試行段階であることである。実験個体数を増加させる、分離の負荷を減らす工夫をして生細胞数を多くするなど、細胞数の確保を目指す必要がある。

(2) PGE2-EP4 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明

- ① Nov/CCN3はこれまで、動脈管リモデリングについては全く研究がなされていなかったことから、今後、その機能解明をさらに進めていくことが期待される。
- ② 一方、EP4-Src- PLC経路が生体内においても弾性線維形成の抑制に働くことを検証する実験があまり進展しなかったことが反省点である。

(3) PGE2-EP4 シグナル経路を介さない動脈管リモデリング因子の同定

- ① 平成29年度に着手したニワトリ胚動脈管を使った実験は大きく進展し、The 8th TAKAO International Symposium (2017年10月)に2題ポスター発表し、そのうちのひとつがPoster Awardを受賞した。
- ② 一方、一酸化窒素、エンドセリンが、動脈管リモデリングに関与しているか否かを明らかにする実験があまり進展しなかったことが反省点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Fujimoto Y, Urashima T, Kawachi F, Akaike T, Kusakari Y, Ida H, Minamisawa S. Pulmonary hypertension due to left heart disease causes intrapulmonary venous arterialization in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. 154(5):1742-1753, 2017.
- ② Yokoyama U, Y Ichikawa, Minamisawa S, Ishikawa Y. Pathology and molecular mechanisms of coarctation of the aorta and its association with the ductus arteriosus. J Physiol Sci 67(2):259-270, 2017.

(2) 口頭発表

- ① 南沢 享。心筋筋小胞体でのカルシウム再取り込み機構。第94回日本生理学会大会。 浜松、3月。(シンポジウム)
- ② 金 美香、横山詩子、石渡 遼、南沢 享、石川義弘。酸素化により動脈管は解剖学的閉鎖を誘導する。第94回日本生理学会大会。浜松、3月。(シンポジウム)
- ③ 岩城隆馬、松久弘典、大嶋義博、赤池 徹、南沢 享、築部 卓郎。プロスタグランディン(PGE1)製剤の長期投与が動脈管に及ぼす組織的变化の検討。第47回日本心臓血管外科学会学術集会。 東京、3月。
- ④ 横山詩子、南沢 享、石川義弘。動脈管の基礎研究から臨床へ。第120回日本小児科学会学術集会。 東京、4月。

(3) 出版物：なし

学 校 名	芝 浦 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	脳障害により失われた脳神経を修復・再生する低分子化合物の創製 －強力な神経分化誘導作用をもつ化合物の開発－		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①脳神経幹細胞 ②ニューロン ③ビタミンK ④分化誘導			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
須 原 義 智	システム理工学部 生命科学科	教 授	研究総括、化合物の合成および論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
廣 田 佳 久	システム理工学部 生命科学科	助 教	化合物の生物活性評価
中 川 公 恵	神戸薬科大学 衛生化学研究室	准 教 授	作用メカニズムの解析
栗 原 正 明	国立医薬品食品 衛生研究所	有機化学部 部長	フォーマコフォア解析

脳障害により失われた脳神経を修復・再生する低分子化合物の創製 —強力な神経分化誘導作用をもつ化合物の開発—

1. 研究の目的

(1) 背景

現在わが国は急速な高齢社会を迎えており、それに伴う高齢身体障害者の急激な増加は極めて深刻な社会問題となっている。高齢者の寝たきり発生原因の40%以上が脳血管障害などの中枢神経障害であるとされており、これらの疾患に対する有効な治療法の開発は、高齢社会において解決しなければならない喫緊の課題である。

これまでに、脳梗塞後の機能回復を目標に無数の研究が行われており、動物実験では1,000以上の治療薬が有効と報告され、そのうちの100以上において臨床試験が実施されたが、明確な有効性を証明できたものは皆無である。現在唯一の治療法である組織プラスミノゲン活性化因子を用いる方法も治療期間がごく短く、その期間を過ぎるとリハビリ訓練以外に有効な治療法はなく、そのリハビリの効果も限定的である。以上の背景から、新規の概念による治療法が切望されている。

(2) 目的

このような薬剤による治療に対して我々は、最近益々注目されている「再生医療」の観点から、脳障害により失われた「脳神経の再生」を目指しつつ、「脳を正常な状態に戻す」ための新たな治療法を開発することを目標に基礎研究を行っている。脳神経系の細胞は、神経伝達を担うニューロンと支持細胞として働くグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）から構成される。これらの細胞は、脳の複雑な高次構造の中で時間的かつ空間的に高度な遺伝子制御を受けて未分化の神経幹細胞から増殖・分化し、脳の高次機能を制御している。我々は、脳神経の素となる脳神経幹細胞から脳神経細胞への分化を、従来の遺伝子導入によらず、安全性の高い低分子の神経分化誘導物質によって誘導し、脳神経を修復・再生することを目指している（図1）。脳神経幹細胞は高齢者にも存在することが確認されていることから、このような化合物が創製できれば、高齢者の脳神経をも再生させることが可能であり、脳梗塞などの脳障害やパーキンソン病をはじめとした各種の脳神経変性疾患に対する治療法に応用できると考えている。

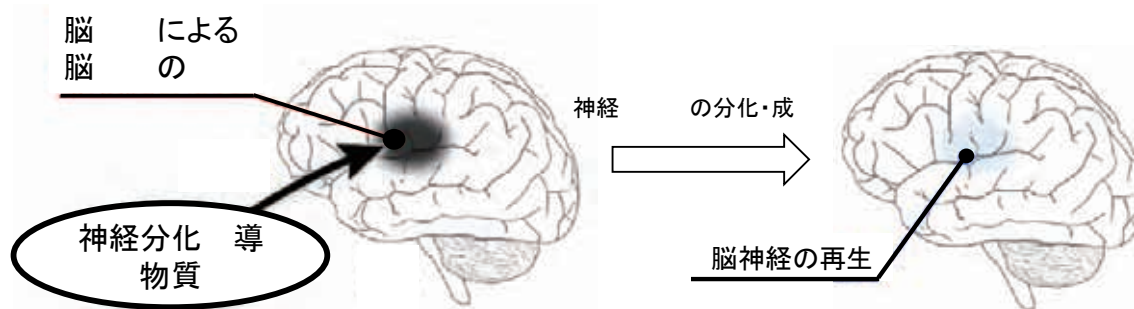


図1. 脳神経の再生・修復を促す神経分化誘導物質の開発

すでに当研究室では、脳内に存在するビタミンKが、マウス胎仔大脳由来の脳神経幹細胞を脳神経細胞へ選択的に分化させる作用をもつことを見出している。さらに、ビタミンKの側鎖末端部に様々な置換基を導入した誘導体を合成し、同様の評価系で細胞毒性が無く、天然のビタミンKと比較して約2倍の脳神経細胞選択的な分化誘導作用をもつ誘導体を得た。しかし、脳障害治療の候補化合物に応用可能にするには活性をさらに強力にする必要がある。そこで、安全性が高くかつ強い神経分化誘導作用を有する新たな誘導体の創製を本研究の目的とした。

2. 研究の計画

(1) 研究計画の概要

これまでの我々の知見から、ビタミンKの側鎖部分を修飾した化合物に高い分化誘導活性が見られたため、側鎖部分を系統的に修飾した化合物を合成した。合成した化合物ライブラリーから高活性を有する化合物を抽出し、構造活性相関からさらに強い活性をもつ化合物をデザインしていく。また、得られた高活性化合物を基にして標識化合物を合成して、標的タンパク質を解析し作用メカニズムを明らかにする。

(2) 具体的な研究計画

① 分化誘導活性を示すビタミンK誘導体を簡便に合成する方法の確立

我々がこれまでに見出した分化誘導活性をもつビタミンK誘導体の知見を基にして、すでに明らかにされている神経分化を誘導する化合物の部分構造を融合した多数の誘導体を合成し、新規の化合物ライブラリーを構築する。このとき、「組み合わせ」の概念により、一度に多種多様な化合物を合成する方法として知られている「コンビナトリアルケミストリー」の手法を応用する。

② 高活性を示す化合物の選別

化合物ライブラリーの分化誘導活性を評価するために、高効率なHigh-Throughput Screening法を用いる。細胞は取扱いが簡単で再現性の高い、市販の株化されたヒト脳神経幹細胞を用いる。具体的な評価方法として、分化したニューロンの表面に特異的に発現するタンパク質 (MAP2) やアストロサイトの表面に特異的に発現するタンパク質 (GFAP) などを認識する一次抗体と蛍光標識した二次抗体を用いて、化合物がどのくらい分化を促進したのかを細胞表面の蛍光強度によって測定する。得られた結果から高活性化合物を選別し、高活性を示す化合物を見出す。

③ さらに高活性を示す化合物を得るための検討

上記で得られた化学構造と分化誘導活性の関係から、高活性化合物のどの部分が生物活性に重要なのかをファーマコフォア解析により考察する。さらに、化合物の三次元構造と電子配置の関係を表すファーマコフォアモデルを計算化学の手法により構築する。その情報を基にして新たな誘導体を設計し、さらに強い分化誘導活性を有する化合物を目指す。

④ 作用発現に関与するタンパク質の解析手法の確立と評価

上記により化合物ライブラリーから得られた高活性化合物について、作用メカニズムを明らかにするために、どのようなタンパク質に作用しているのかをアフィニティークロマトグラフィーを用いたpull-down法により分離・精製して明らかにする (図2)。その後、化合物の分化誘導作用のメカニズムを解明する。

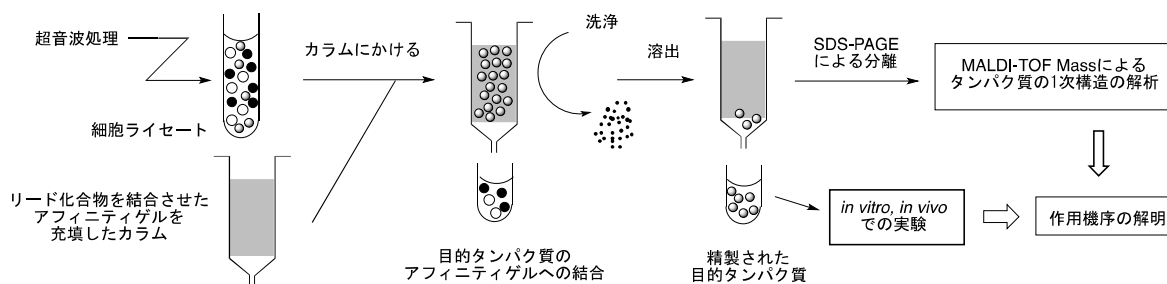


図2. 高活性化合物を固定化したアフィニティークロマトグラフィーによる作用タンパク質の解析

⑤ 作用発現に関与するタンパク質に作用する神経分化誘導物質の探索

上記で得られた神経分化誘導作用の発現に関係するタンパク質に、強く作用する化合物を化合物ライブラリーから探索する。その際に得られた化合物が実際に強い神経分化誘導作用を持つのかを活性評価により確かめる。

3. 研究の成果

(1) 化合物ライブラリーの構築について

今回我々はビタミンKの側鎖部分に着目し、側鎖末端部に芳香環を導入した化合物我々がこれまでに見出した分化誘導活性をもつビタミンK誘導体の知見を基にして、構造修飾を施した新規誘導体の化合物ライブラリーを構築し、構造活性相関を検討した。研究計画では、「コンビナトリアルケミストリー」の手法により様々なビタミンK誘導体を合成する予定であったため、側鎖末端部に様々な脂溶性の官能基をはじめとして窒素原子、酸素原子、電子求引性の置換基などを導入した誘導体1-34を合成した(図3)。

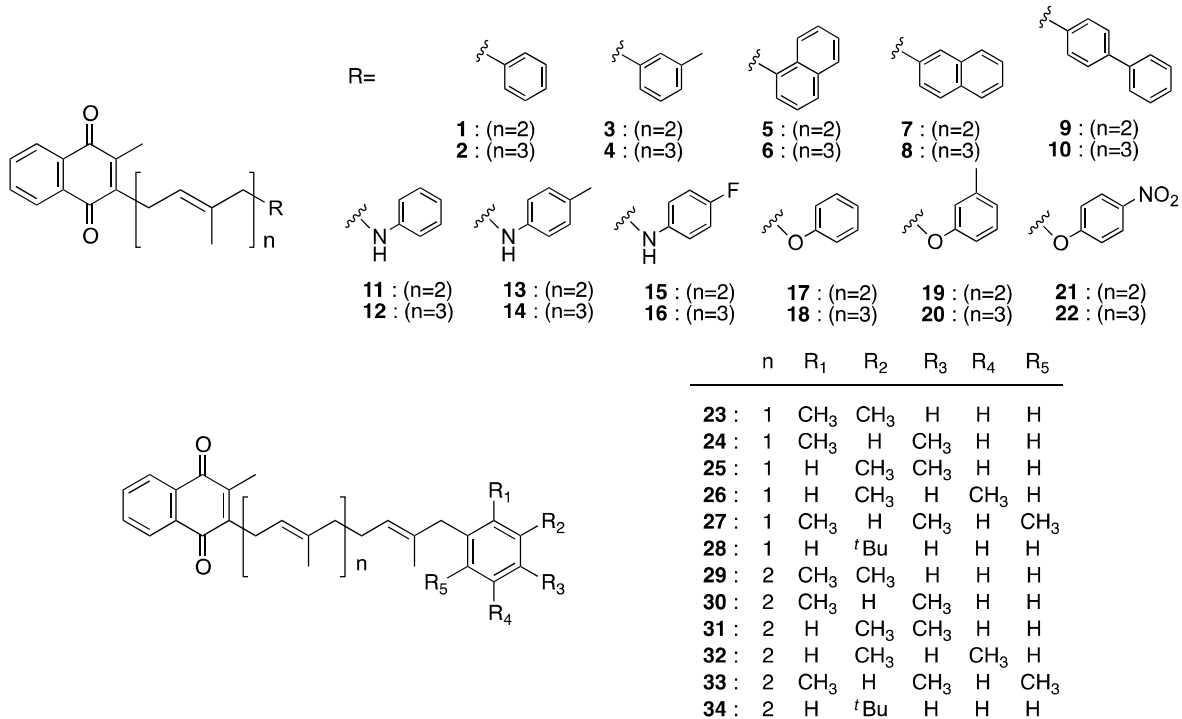


図3. コンビナトリアルケミストリーの手法によって合成した多様なビタミンK誘導体

(2) 化合物の分化誘導活性評価

これらの誘導体について、マウス胎仔大脳由来の神経幹細胞を用いて神経細胞への分化誘導活性を調べた。活性の評価方法として、神経細胞への分化マーカーであり神経細胞表面に特異的に発現するタンパク質 (Map2) のmRNA量を、リアルタイムPCR法により定量して調べた。その結果、興味深いことに、天然のビタミンKより強い分化誘導活性をもつ化合物と共に、神経細胞への分化を抑制する化合物が含まれていることが明らかとなった。

(3) 作用タンパク質を解明するための標識化合物の合成と作用タンパク質の解析

上記で得られた情報から、高活性を示した化合物について、それらの作用タンパク質を解析するためのツールとして用いる標識化合物を合成した。標識化合物として、ビタミンKの側鎖の末端に蛍光物質を導入したものと、ストレプトアビジンを結合させた磁気ビーズに結合させるためのビオチン標識化合物を合成した。

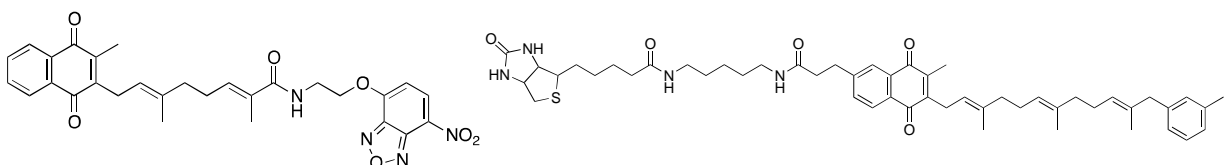


図4. 作用タンパク質を解析するための蛍光標識化合物(左)およびビオチン標識化合物(右)

4. 研究の反省・考察

今回我々の見出した化合物は、ニューロンへの分化を促進するものと、反対に抑制する化合物を見出した。しかしながら、いずれもニューロンへの分化誘導活性がin vitroで1 μ Mレベルのものであるため、動物レベルで効果のある化合物を得るためには、さらに強力な活性を持った化合物の開発が必要である。また、これら化合物の分化誘導作用に関与するタンパク質も明らかになっていない。今後は作用タンパク質を明らかにした後、それに強力に作用してnMレベルで幹細胞から神経細胞への分化を選択的かつ強力に誘導する化合物を得る必要がある。そして、さらに次のステップで「脳血管障害のモデル動物を用いた活性評価」などを行い、我々の化合物が脳神経の再生・修復に応用できる可能性を示すことを目標にする予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「分子内にヘテロ原子を導入した新規ビタミンK誘導体の神経分化誘導作用の検討」 第58回天然有機化合物討論会，2016年9月14日，仙台
- ②木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「側鎖末端にヘテロ原子を導入した新規ビタミンK誘導体の合成と神経分化誘導作用の検討」 第60回日本薬学会関東支部大会，2016年9月17日，東京
- ③木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「ニューロンへの分化を高選択的に誘導する新規メナキノン誘導体の合成」 第34回メディシナルケミストリーシンポジウム 2016年12月1日，つくば

(2) 口頭発表

- ①木村キミト、廣田佳久、坂根里枝、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「ビタミンKの側鎖末端を修飾した誘導体の合成と核内受容体SXRに対する転写活性の検討」日本ビタミン学会第68回大会，2016年6月17日，富山

(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	iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①パーキンソン病 ②iPS細胞 ③ドーパミンニューロン ④創薬スクリーニング ⑤神経幹細胞			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 松 和 土	医 学 部	特 任 教 授	研究代表者・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
服 部 信 孝	医 学 部	教 授	臨床検体採取・解析手法の提供
斉 木 臣 二	医 学 部	准 教 授	臨床検体採取・解析手法の提供・実験
常 深 泰 司	医 学 部	准 教 授	臨床検体採取・解析手法の提供・実験

iPS 細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬

1. 研究の目的

疾患特異的 iPS 細胞は、病変部位へのアクセスが困難な神経疾患の解析ツールとして極めて有用であるが、iPS 細胞樹立・解析クローン選択・分化誘導のステップに要する日数が長く作業量も膨大である。従来の解析方法では単一遺伝子病の数例の解析(平均して1つの研究あたり約3症例)が国内外での既報の研究における現実的な限界であった。しかしながら、パーキンソン病(PD)やALSを例にとると、その大半(~90%)が孤発性であり家族性の症例が占める比率は多いとは言えない。このような神経疾患の孤発性症例の病態再現においては、iPS 細胞で再現される Genetic, Epigenetic な変異だけでなく、環境要因などの要素が含まれる点を考慮すると、その解決策としては従来のスケール(1研究あたり遺伝性症例を3-5症例程度)に比して、極めて多くの症例数(n>100)の解析を行う必要があるのではないかと考えられる。申請者はこの問題を解決すべく、患者検体からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導システムを小スケール・効率化して 96well プレートで解析する方法を開発してきた。

本研究では、研究代表者が持つこの技術を用いて順天堂大に通院する孤発性 PD 患者(数百例)において複数の表現型を小スケールで定量的に解析し、各症例が示す表現型から孤発性症例を仮分類する。臨床経過の分析と、細胞機能異常で分類されたそれぞれのグループに対して、申請者が現在同定を進めている薬剤スクリーニングで得られた細胞機能特異的な薬剤を用いてその効果を評価する。これらの結果から孤発性 PD を細胞生物学的表現型によって分類し再定義する。パーキンソン病の病態はドーパミンニューロンの脱落を主とするが、その病態は解明されておらず、治療は主に不足するドーパミンの補充に留まっている。ドーパミン神経脱落を抑え、病気の進行を止める disease modifying effect を有する新規治療薬の開発が期待されているが、本研究によってそのような新規治療薬の開発が期待できる。一方、このように大規模に孤発性症例の iPS 細胞の解析を行い結論を得ている報告は世界でも例が無いために、本研究で構築されるシステムが初めての孤発性疾患に対する系統的な iPS 細胞モデルの確立となると思われる。さらにこの方法をモデルとして他の孤発性疾患、多因子疾患の疾患 iPS 研究の大規模化が実現され、疾患病態解明・治療薬探索研究の加速・発展に繋がると期待される。本研究における患者検体の採取と利用は順天堂大学の倫理委員会の承認を得ている(順大医倫第2015094号)。

2. 研究の計画

(1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

研究開始までに順天堂医院に通院する孤発性 PD 患者・対照約 150 例のリンパ球および一部の症例でリンパ芽球細胞株の樹立を行っている。孤発性患者リクルートと検体採取は継続的に行い、研究期間終了までに 400-500 症例の検体採取を目指す。実際の患者検体は病院外来で末梢血 10ml 程度を採取し、T 細胞を分離培養し順次蓄積する。

(2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

申請者はこれまで 96well 中で T 細胞から iPS 細胞を樹立し、分化誘導する手技を確立しつつある。実際に患者から採取された複数の T 細胞を同時に 96well 上で iPS 細胞化しドーパミンニューロンへ分化させるプロトコルを確立する。また既存の誘導法では目的の神経細胞に誘導できなかった細胞が混入するため、アッセイによっては目的細胞の抽出が必要で画像解析プログラムのような画一的評価システムでは異常検出が難しいものも多いため、正確な解析のための高純度な分化誘導方法の確立を目指す。

(3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

申請者らはこれまでに自身が樹立した遺伝性 PD のうち PARK2-iPS 細胞を用いて、細胞死・神経突起の脱落・ミトコンドリア機能異常のそれぞれを小スケールで In Cell Analyzer を用いて定量する方法を確立している。さらに、 α シヌクレイン凝集を示す PARK4-iPS 細胞を用いて Lewy 小体を形成する α シヌクレインの異常凝集を定量化する。リソソーム異常が病態に関与する PARK9-iPS 細胞では、不要タンパク質分解障害をきたすリソソーム内 pH 異常をすでに再現しており、これを小スケール化する。PARK8-iPS 細胞においては tau のリン酸化異常を示すことが既に明らかであるが、この表現型を小スケール化する。

(4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

申請者らはこれまでに細胞死・神経突起の脱落・ミトコンドリア機能異常を指標に

PARK2-iPS 細胞を用いて、それらの表現型を改善する薬剤をスクリーニングしている。約 200 種類の既存薬ライブラリーをスクリーニングし、すべての表現型を回復させる候補薬剤を同定している。この方法を③で開発する他の遺伝性 PD-iPS の細胞機能特異的表現型を指標にして、それぞれのタイプの遺伝性 PD-iPS 細胞において固有の表現型を回復させる薬剤候補を同定する。

3. 研究の成果

(1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

H29 年度までに順天堂医院に通院する約 300 症例の孤発性症例を中心とするパーキンソン病および正常対照から末梢血検体を採取し、T 細胞もしくは不死化リンパ芽球の状態でゲノム・再生医療センターに細胞をストックした。一部の検体に関しては iPS 細胞の樹立と解析を進め、iPS 細胞樹立と神経分化および表現型解析が可能であることを確認している。

(2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

(1) で樹立したリンパ球を小スケールで iPS 樹立し、クローン選択せずに神経分化誘導を行い、同一の Well 上で(3)で開発された表現型解析を行う方法を確立した。この方法で順次孤発性検体の解析を進めている。

(3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

すでに樹立済みの遺伝性パーキンソン病患者由来の iPS 細胞において、細胞死・神経突起進展など共通の表現型と、マイトファジー異常・ α シヌクレイン蓄積など細胞機能特異的な表現型の検出方法を確立し、それぞれの遺伝性症例における各表現型のパネル化をほぼ終了した。

(4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

PARK2 に関しては全ての表現型を改善する化合物候補を複数同定済み、PARK9 に関して一次スクリーニングを終了している。その他遺伝性 PD に関してはスクリーニングの準備中である。

4. 研究の反省・考察

(1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

患者検体の収集は予定通りに進行し、特に問題点は無かった。iPS 細胞の樹立効率が低い検体が一定頻度で存在したため、T 細胞のストックまでの方法の改良を続ける。

(2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

①小スケールでの iPS 樹立が 6-7 割程度の成功率であったため、樹立不成功例は通常スケールで順次 iPS 細胞樹立を行わざるを得なかった。さらにプロトコールの改良が必要である。

②神経分化誘導に関して順調に安定して再現出来た。

(3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

問題なくそれぞれの遺伝性症例における各表現型のパネル化をほぼ終了した。

(4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

一部のスクリーニングを終了し他を順調に遂行中である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr Res.* 181:75-82. 2017

②Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N. Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2017 Aug 15;26(16):3172-3185.

- ③Fujimori K, Matsumoto T, Kisa F, Hattori N, Okano H, Akamatsu W. Escape from Pluripotency via Inhibition of TGF- β /BMP and Activation of Wnt Signaling Accelerates Differentiation and Aging in hPSC Progeny Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Nov 14;9(5):1675-1691. (赤松和土は責任著者)
- ④Okuno H, Renault Mihara F, Ohta S, Fukuda K, Kurosawa K, Akamatsu W, Sanosaka T, Kohyama J, Hayashi K, Nakajima K, Takahashi T, Wysocka J, Kosaki K, Okano H. CHARGE syndrome modeling using patient-iPSCs reveals defective migration of neural crest cells harboring CHD7 mutations. *Elife*. 2017 Nov 28;6. pii: e21114.
- ⑤Mao D, Chung XKW, Andoh-Noda T, Qin Y, Sato SI, Takemoto Y, Akamatsu W, Okano H, Uesugi M. Chemical decontamination of iPSC cell-derived neural cell mixtures. *Chem Commun (Camb)*. 2018 Feb 1;54(11):1355-1358.
- ⑥ Suda Y, Kuzumaki N, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, Iwasawa C, Shibasaki M, Maekawa A, Matsuo M, Akamatsu W, Hattori N, Okano H, Narita M. Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol Brain*. 2018 Feb 20;11(1):6.
- (2) 口頭発表
- ①赤松和土「Patient-specific iPSC cells for neural disease modeling and drug screening」65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research シンポジウム (招待講演) 2017.11.19
- ②赤松和土「iPSC 細胞を用いた神経疾患の病態解析」iCell Users' Meeting 2018 Keynote lecture (招待講演) 2018.2.7
- ③赤松和土「Patient-specific iPSC cells for neural disease modeling and drug screening」国際シンポジウム 早老症と関連疾患 2018 (RECQ2018) シンポジウム (招待講演) 2018.2.18
- (3) 出版物
なし

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	①YAP ②中皮腫 ③SNIPER ④IAP ⑤プロテインノックダウン⑥TMEPAI ⑦TGF-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
福 田 和 男	薬 学 部	特 任 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実験
佐 野 圭 吾	薬 学 部	特 任 助 教	YAP阻害剤及びSNIPERを用いたin vivo実験

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づいて(図 1)、下記(1)~(3)の研究課題を行った

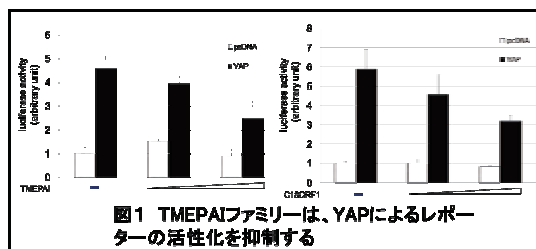


図1 TMEPAIファミリーは、YAPによるレポーターの活性化を抑制する

(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。

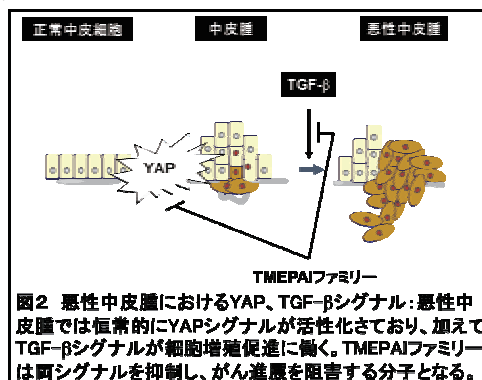


図2 悪性中皮腫におけるYAP、TGF- β シグナル:悪性中皮腫では恒常的にYAPシグナルが活性化されており、加えてTGF- β シグナルが細胞増殖促進に働く。TMEPAIファミリーは両シグナルを抑制し、がん進展を阻害する分子となる。

(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。最近 BS よりさらに cIAP に高親和性で結合する LCL161 が報告されているので、本研究では LCL161 を用いて合成を行うことにした。すでに YAP に結合する化合物を見出しているので、LCL161 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。

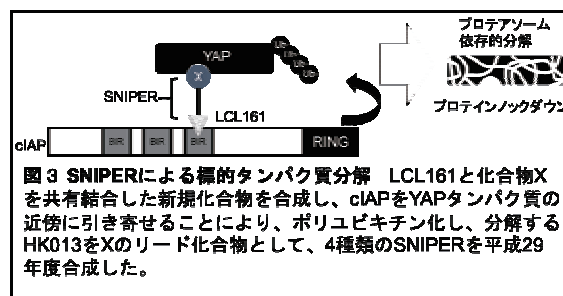


図3 SNIPERによる標的タンパク質分解 LCL161と化合物Xを共有結合した新規化合物を合成し、cIAPをYAPタンパク質の近傍に引き寄せることにより、ポリユビキチン化し、分解するHK013をXのリード化合物として、4種類のSNIPERを平成29年度合成した。

2. 研究の計画

(1) TMEPAI ファミリーである C18ORF1 による YAP 抑制メカニズムの解明

① TMEPAI ファミリーが YAP タンパク質の分解を促進することを確かめるために、YAP タンパク質の半減期及びポリユビキチン化についての検討を免疫沈降・ウェスタンブロット法

により検討した。

- ②中皮腫細胞にTMEPAIファミリーであるC18ORF1を大量発現させ、in vitro腫瘍形成実験及びin vivoゼノグラフトモデルでTMEPAIファミリーが腫瘍形成を抑制するか否か検討した。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ①化合物AのYAP結合部位の同定を行った。
 ②化合物AによるYAP活性阻害作用の検討をルシフェラーゼ法により行った。
 ③in vitro腫瘍進展抑制作用について軟寒天培地を用いて行った。
 ④19種類の化合物B誘導体 (HK002~HK020) のYAP結合能についてビアコアを用いて検討を行った。
 ⑤化合物B誘導体 (HK002~HK020) の中皮腫細胞増殖抑制活性の検討を行った。

(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

- ①HK002~HK020の中で、YAPと最も強く結合したHK013を用いて、LCL161とのSNIPER合成法の検討を行った。

3. 研究の成果

(1) TMEPAI ファミリーである C18ORF1 による YAP 抑制メカニズムの解明

- ① COS7 細胞に V5-YAP を発現させ、100 mg/mL シクロヘキシミドを加えることで、新たなタンパク質合成を阻害し、C18ORF1/Flag存在下でのYAPタンパク質の半減期を検討したところ、C18ORF1/Flag存在時に劇的にV5-YAPの半減期が減少した(図4)。さらにYAPのポリユビキチン化を調べたところ、C18ORF1存在下でYAPのポリユビキチン化の亢進が認められた。YAPのポリユビキチン化は、C18ORF1存在下でさらに増加した(図5)。

- ②悪性中皮腫細胞であるNCI-H290細胞にC18ORF1を大量発現させたところ、in vitro腫瘍形成として知られる軟寒天培地を用いた腫瘍細胞コロニー形成実験で、C18ORF1を高発現した細胞では、コントロール細胞に比べてコロニー形成能は著しく低下した(図6)。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ①化合物AのYAPとの結合領域をビアコアを用いて検討したところ、YAPのN末端から280番目の間で結合することが認められた(図7)。この領域には、YAPとTEAD間の結合部位である61番目のセリンから99番目のプロリンまで含まれているので、この領域に化合物Aが結合するか否かを検討したところ、YAPの85番目のプロリンから99番目のプロリン間の15アミノ酸からなるペプチドに化合物Aが結合することが見いだされた(図8)。

- ②化合物AがYAP阻害剤として知られているVP (verteporfin) より強いYAP阻害活性を有することをYAP活性を検出することができるルシフェラーゼ法により明らかにした。

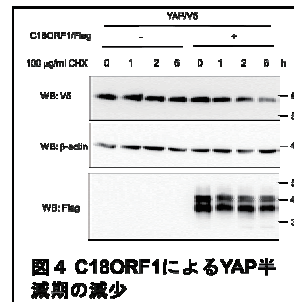


図4 C18ORF1によるYAP半減期の減少

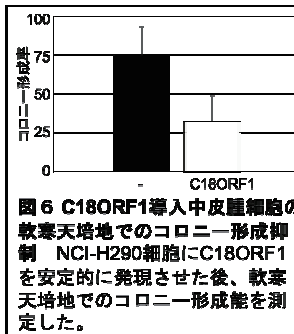


図6 C18ORF1導入中皮腫細胞の軟寒天培地でのコロニー形成抑制 NCI-H290細胞にC18ORF1を安定的に発現させた後、軟寒天培地でのコロニー形成能を測定した。

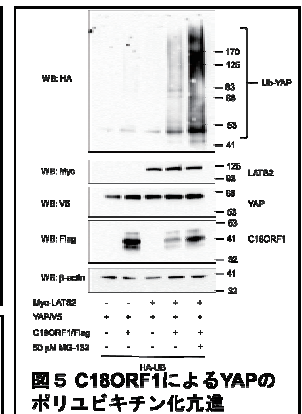


図5 C18ORF1によるYAPのポリユビキチン化亢進

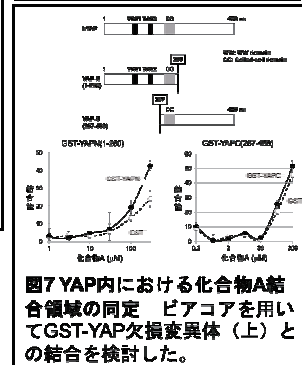


図7 YAP内における化合物A結合領域の同定 ビアコアを用いてGST-YAP欠領域異体(上)との結合を検討した。

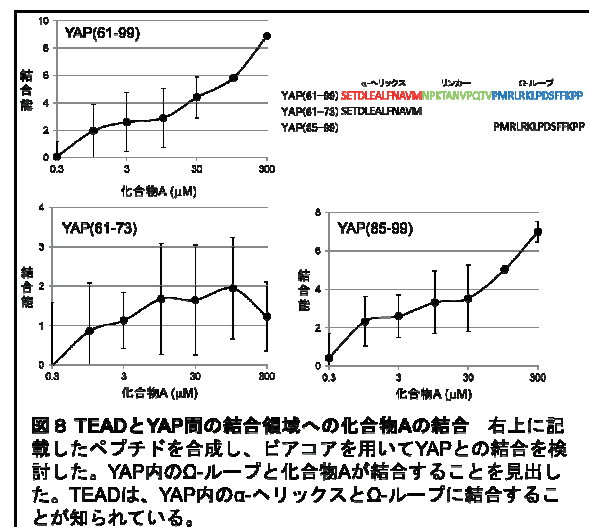
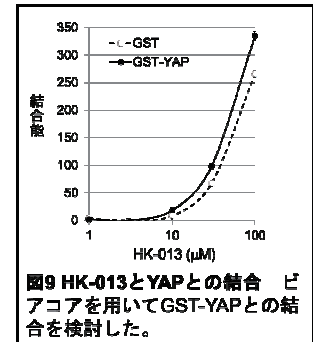


図8 TEADとYAP間の結合領域への化合物Aの結合 右上に記載したペプチドを合成し、ビアコアを用いてYAPとの結合を検討した。YAP内のα-ループと化合物Aが結合することを見出した。TEADは、YAP内のα-ヘリックスとα-ループに結合することが知られている。

- ③NCI-H290細胞を用いたin vitro腫瘍形成実験で、化合物Aは容量依存的にコロニー形成を抑制することができた。
- ④HK002～HK020までの19種類の化合物D誘導体を用いて、ビアコアによるYAPとの結合活性を調べたところ、HK013がYAPとの強い結合が認められた(図9)。
- ⑤HK002～HK020は、化合物Dと同様に、中皮腫細胞増殖抑制活性をほとんど有していなかった。
- (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
- ①HK013とLCL161間を共有結合させた化合物を合成するために、リンカー長を変えたSNIPER化合物4種類の合成を行った (HK021～HK024)。



4. 研究の反省・考察

- (1) TMENPAI ファミリーである C18ORF1 による YAP 抑制メカニズムの解明
- ①TMENPAIファミリーがYAPのポリユビキチン化を促進することによりYAPを分解する可能性を見出したが、実際ポリユビキチン化を行う酵素については同定できていない。
- ②C18ORF1大量発現系において、中皮腫細胞の増殖抑制活性を見出すことができたが、未だC18ORF1の発現を抑制した中皮腫細胞を樹立できていない。C18ORF1発現抑制（又は欠損）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組み、ゼノグラフトモデルを含めて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の85番目のプロリンから99番目のプロリン間の領域と結合したことから、化合物AはYAPとTEAD間の結合を阻害することで、YAP活性を抑制していると考えられた。現在実際化合物AがYAPとTEADの結合を抑制することを培養細胞で検討している。
- ②現在まで知られているYAP阻害剤VPより低濃度で化合物AはYAP活性を抑制することができたので、新規抗YAP活性を有する中皮腫治療薬のリード化合物となる可能性が見いだされた。
- ③HK013は、親化合物である化合物Dより強いYAP結合を有するが、化合物Dと同様にYAP活性を阻害しないことより、有望なYAPリガンドとして、SNIPER化合物合成に使用できると考えられた。
- (2) 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
- ①HK021～HK024までの合成が終了したので、SNIPER化合物として、YAPを特異的に分解し、抗中皮腫活性を有していることを今後検討する。さらにHK013を基本構造としたさらにYAPに強い親和性を持った化合物の合成にも着手したい。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
- ①YAPを標的とした中皮腫進展制御と分子標的薬開発 伊東進、中野なおこ、佐野圭吾、中根孝久、岡本巖、内藤幹彦 日本薬学会第138年会（金沢）
- ②プロテインノックダウン法を利用したYAPシグナル阻害剤の開発 石川遼、河本恵理、福田和男、森彩里穂、岸福子、正田卓司、小野寺祥子、服部隆行、栗原正明、内藤幹彦、山崎龍、中根孝久、岡本巖、中野なおこ、伊東進 平成29年度日本生化学会関東支部例会（東京）
- ③YAP阻害剤による抗腫瘍活性をin vivoイメージングで評価する 入江美樹、幾田鞠子、中野なおこ、佐野圭吾、伊東進 平成29年度日本生化学会関東支部例会（東京）
- ④新規YAP阻害剤による悪性中皮腫細胞増殖抑制機構 岸福子、河本恵理、石川遼、小野寺祥子、内藤幹彦、中野なおこ、伊東進 平成29年度日本生化学会関東支部例会（東京）
- ⑤がん遺伝子YAPを標的とした抗がん剤開発 中野なおこ、正田卓司、服部隆行、栗原正明、内藤幹彦、伊東進 第21回日本癌分子標的治療学会（福岡）

⑥TGF- β シグナルによるがん進展制御機構 伊東進 第一回細胞内シグナル応答研究会
(熱海)

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 大 学	研究所名等	薬 学 研 究 所
研 究 課 題	糖尿病発症の新たな責任分子としての脂肪組織ダイオキシン受容体 —一分子基盤の解明と新規糖尿病治療薬への展開—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①ダイオキシン ②糖尿病 ③脂肪細胞		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
榛 葉 繁 紀	薬 学 部	教 授	研究代表者 総括、マウスの管理・解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
内 山 武 人	薬 学 部	教 授	リガンドの合成、分析
和 田 平	薬 学 部	助 教	マウスの解析

糖尿病発症の新たな責任分子としての脂肪組織ダイオキシン受容体 — 分子基盤の解明と新規糖尿病治療薬への展開 —

1. 研究の目的

(1) 背景

戦後のわが国におけるライフスタイルの変化は糖尿病をはじめとする生活習慣病の患者数の増加を招いており、その制圧は喫緊の課題であるといえる。糖尿病への罹患要因として、食事性脂肪の過剰摂取や運動不足などが挙げられるが、ダイオキシン類などの内分泌かく乱物質への曝露もそのひとつである。現在、わが国においてダイオキシン類の排出レベルは減少し、高濃度曝露とその急性毒性が問題となる可能性は少ない。しかしながら、近年の国内外における多くの疫学研究によりダイオキシン類に対して職業曝露あるいは事故曝露などが無い一般住民においても体内に微量のダイオキシン類が存在すること、そしてその血中レベルと糖尿病発症との間に正の相関が存在することが示されている。

生体内に取込まれたダイオキシン類は、主に脂肪細胞に貯蔵される。脂肪細胞は、単に過剰な脂溶性物質の貯蔵の場ではなく、様々な生理活性物質の産生・分泌を介して全身の代謝調節を行う。そしてその機能変化がインスリン抵抗性を誘発し、糖尿病の発症へとつながる。細胞内においてダイオキシン類は、その特異的受容体 Ah レセプター(AhR)と結合して毒性の多くを発現する。したがって脂肪組織における AhR の機能解析は、ダイオキシン類の慢性毒性発現機構の解明への主たる戦略である。

以上をふまえて我々は、脂肪細胞特異的 AhR KO(A-AhR)マウスを確立した。本マウスの使用により従来成し得なかった極微量ダイオキシン類の慢性曝露による脂肪細胞の機能かく乱とそれに起因した疾病の発症メカニズム解析を行うことが可能となった。例えば高脂肪食下において飼育した本マウスに対してグルコース負荷試験並びにインスリン負荷試験を課したところ、顕著な耐糖能並びにインスリン感受性の亢進を示した。この結果は、全身の耐糖能並びにインスリン感受性が脂肪細胞における AhR 遺伝子の有無により変化することを示している。すなわち疫学的に示されてきた「極微量ダイオキシンの持続的な曝露による慢性毒性としての II 型糖尿病」において、脂肪細胞 AhR が発症の責任分子であることが強く示唆された。

(2) 研究期間内に、何をどこまで明らかにしようとするのか

本研究では、脂肪細胞特異的に AhR を欠損したマウスの病理的、病態生化学的並びに分子生物学的な解析を通じて、インスリン感受性の制御に関連した脂肪細胞機能（他臓器とのクロストークを含む）の AhR による調節を明らかにする。さらにはこれらの知見を基に AhR アンタゴニストの糖尿病治療・改善薬としての可能性を検証する。

以上の検討により得られた知見は、極微量ダイオキシンの持続的曝露の影響並びに糖尿病の発症といった2つの社会的問題の解決において科学的な基盤を提供するものである。

2. 研究の計画

(1) 高脂肪食負荷時における脂肪組織特異的 AhR KO (A-AhR KO) マウスの病態生化学的・病理学的解析

- ① 体重、摂餌量、呼吸商（酸素吸入量・二酸化炭素排出量）、脂肪組織重量、血液パラメーター（コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸及びアディポサイトカイン類、随時インスリン並びにグルコース負荷試験時のインスリン）量を常法に従い測定する。
- ② 白色並びに褐色脂肪組織をそれぞれ精巢上体、腸間膜、皮下及び肩甲骨周辺より採取し、その組織を固定、切片化、そして染色（ヘマトキシリン・エオシン）し、脂肪細胞数並びに大きさを中心に定性的に観察する。
- ③ 病理切片の確認時には、併せてマクロファージ等の免疫担当細胞の染色並びに遺伝子発現を解析し、炎症の有無とその程度についても検討する。
- ④ II型糖尿病患者では、脂肪組織における脂質代謝異常に起因した肝臓や骨格筋での異所性脂肪の蓄積が認められる。そこで肝臓と骨格筋におけるトリグリセリド含量、遊離脂肪酸含量並びにコレステロール含量を測定する。これらの解析により差異が認められたならば、各組

織における病理所見、そして脂質代謝に関連した因子の遺伝子発現も検討する。

(2) A-AhR KO マウスのインスリン感受性亢進に関わる責任臓器の同定

- ① 肝臓、骨格筋並びに精巣上体脂肪組織におけるインスリンシグナル伝達活性を解析するため、短時間の絶食後、マウスに対してインスリン(0.5 U/Kg体重)を投与する。一定時間後、各臓器を摘出し、ウエスタンブロット法によりインスリンシグナル伝達因子の活性を評価する。
- ② 肝臓における糖新生活性を評価するため、ピルビン酸 (2g/Kg体重) を負荷し、その後の血糖値を経時的に測定する。

3. 研究の成果

(1) 高脂肪食負荷時における脂肪組織特異的 AhR KO (A-AhR KO) マウスの病態生化学的・病理学的解析

A-AhR KO マウスにおける全身性のインスリン感受性の変化は、多くの代謝機能の変化を伴うと予想できる。そこで本年度は、A-AhR KO マウスのより詳細な生化学的並びに生理学的な特徴を明らかにする目的で、マウスを通常食並びに高脂肪食 (12 週間) 下で飼育し、生理・生化学的パラメーターを解析した。

- ① 通常食あるいは高脂肪食下で飼育したコントロールマウス及びA-AhR KOマウスにおける体重、脂肪組織重量、摂食量並びに血液パラメーター (随時血糖値、随時インスリン量、中性脂肪量、遊離脂肪酸量及びコレステロール量) を測定した。その結果、いずれの食事下においても両マウス間に違いは認められなかった。
 - ② 肥満時には脂肪組織において免疫担当細胞が浸潤し、その結果起こる炎症が糖尿病発症に強く関わっている。そこで脂肪組織における炎症の程度を病理学的並びに遺伝子発現の点から解析した。その結果、高脂肪食負荷によりコントロールマウスの脂肪組織ではマクロファージの浸潤並びに炎症の惹起が認められたが、A-AhR KOマウスにおけるその程度はわずかであった。一方、通常食飼育下ではこれらの違いは認められなかった。すなわちAhRが肥満時における脂肪組織の炎症の惹起に関与することが示された。
 - ③ 各組織における脂肪蓄積量は、インスリン感受性に大きく影響する。そのため脂肪組織、肝臓そして骨格筋における中性脂肪量を測定した。その結果、通常食で飼育した両マウスの各組織における中性脂肪量に違いは認められなかった。また高脂肪食負荷により両マウス共に各組織における中性脂肪量は増加したが、その程度は両マウス間で同程度であった。
- ### (2) A-AhR KO マウスのインスリン感受性亢進に関わる主たる臓器の同定

A-AhR KO マウスにおけるインスリン依存的な耐糖能の亢進の主な要因として以下のことが考えられる。すなわち脂肪細胞あるいは骨格筋における糖の取込み増加、そして肝臓における糖新生の抑制である。そこでインスリン感受性亢進における主たる臓器を明らかにする目的で以下の検討を行った。

- ① コントロールマウス及びA-AhR KOマウスを6時間の絶食下に置き、その後インスリン(0.5 U/Kg体重)を投与した。その15分後に肝臓、骨格筋並びに精巣上体脂肪組織を摘出し、各組織におけるインスリンシグナル伝達因子であるAKTのリン酸化状態からインスリンシグナル伝達活性を解析した。その結果、A-AhR KOマウス精巣上体脂肪組織においてインスリンシグナル伝達強度の増強が認められた。一方、骨格筋及び肝臓におけるインスリンシグナル伝達活性は、コントロールマウス及びA-AhR KOマウス間で同程度であった。
- ② 通常食飼育下及び高脂肪食飼育下の何れにおいてもA-AhR KOマウスの糖新生能は、コントロールマウスのそれと同程度であった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 高脂肪食下で飼育した A-AhR KO マウスは、コントロールマウスに比較して良好な耐糖能及びインスリン感受性を示した。また体重増加率並びに脂肪組織重量に違いは認められないものの、脂肪組織におけるマクロファージ浸潤の抑制並びに炎症性サイトカイン発現量の低下が認められた。さらに A-AhR KO マウス脂肪組織におけるインスリン感受性の亢進が観察された。一方、これらの変化は、通常食飼育時には認められなかった。以上の結果は、AhR が肥満時における脂肪組織における炎症を惹起することで糖尿病発症に関与することを示している。

5. 研究発表

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

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ー慢性炎症病態の可視化と光制御ー		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①生体イメージング ②二光子顕微鏡 ③CMOS ④炎症・血栓・造血			

○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	研究計画と進捗管理、プロトタイプ製作、 知財管理

○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	平成30年3月 31日退職	動物実験、研究計画管理

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) マクロミクロイメージングシステムの開発

①生体レベルでのミクロとマクロをカバーするイメージングモダリティを開発し、個体全体をみつつ、細胞レベルの解析を行う基礎研究技術を開発する。同時に、本システムを臨床に活かすべく、さらに、手持ち可能な極小化したイメージングデバイスを開発する。CMOS センサー、ロボティクス、にくわえ、制御工学、情報工学との連携をはかった開発を行い、今まで「目で見えないものをみる」「画像から理解を直結させる」だけでなく、実時間で変動していく生体材料に対して低侵襲な治療を可能にする基盤技術を開発する。

(2) 慢性生命現象の可視化

①画像解析の対象として、従来画像化をし易かった発生・発がんなどの領域だけでなく、炎症・造血・臓器不全といった緩徐かつ慢性的に進む生命現象を扱う。

近年、生活習慣病・悪性腫瘍といった慢性疾患の背景には持続する炎症が存在することが示され、「慢性炎症」を鍵とした病態解明が試みられている。これまでに、急性の生命現象にはアプローチ方法が多く呈示されているのに比して、慢性かつ緩徐に進む現象への高感度の解析はほとんど存在していない。西村らは慢性生体へのマルチスケールな病態把握をめざし、マクロ・ミクロをカバーする生体イメージング技術を開発している。そのなかで、生体を網羅的に解析するための、低倍率・高解像度・CMOS イメージングシステム、紫外線・可視光・赤外線のを無収差・同一レンズで撮像できる結像システム（全波長顕微鏡）、および最小化光診断技術を開発している。これらの実証実験として、炎症・造血・臓器不全を対象とした可視化および光制御実験を行う。

2. 研究の計画

(1) マクロミクロイメージングシステムの開発

①生体に特化した一細胞を中心とする周辺環境とのマイクロネットワークを、長時間に長時間空間解像度で追従・可視化するマイクロイメージングシステムを基礎光学理論から開発する。新たな基礎光学理論では従来の結像光学では不可能な幅広いズーム比率、焦点可変、低収差をコンパクトに実現する。結像そのものからシステムまで幅広く知財化を行う。さらに、生体にフィットした光学要素技術として、高画素 CMOS を用いた生体深部・超多色・長時間解像度イメージング（NHK サイエンス ZERO、NHK スペシャル人体などでもたびたび取り上げられた）、ロボティクスによるリアルタイム追従制御を開発する。従来、観察視野と解像度にはトレードオフがあり、単一光学系でこれらの光学仕様を両立することは不可能であった。本研究ではこれらの実証に関して、基礎光学理論を構築するだけでなく、ワーキングサンプル、量産製品のプロトタイプ作成、実データのマウス・ウサギ・ブタでの撮影まで行う。その一部分として、臨床現場での使用を視野にいれ、臨床医師と直接議論をおこない、システムの作り込みを行っている。臨床医師（皮膚科・眼科など）からのフィードバックをもとに、それぞれの診療領域に応じた作り込みを行う。

(2) 慢性生命現象の可視化

①生体内で一細胞中心のネットワークをその細胞の生涯にわたって可視化し、細胞運命を解析・予測・制御をめざし、可視化と光制御を試みる。個々の細胞から生体を統合的に理解するためのネットワーク情報を引き出し、得られたネットワークの個々の繋がり（ノード）に対する検証を行うために、フェムト秒レーザーによる生体光操作および光化学反応による積極的介入と反応観察を行う。さらに、生体の超多色・多光子イメージングによる形態解析と組み合わせ、これまで評価対象としてこなかった慢性病態に対しても解析を行う。なお、初期には臓器不全を主要な研究対象としたが、むしろ緩徐にす

すむ生理的現象（造血など）においてイメージングの優位性が示されたため、研究内容をシフトしている。

本研究では個体のなかで既存の細胞生物学・分子生物学を展開するための基盤技術とし、形態をみる一細胞イメージングにくわえて、通常では「見えない」機能情報も同時に明らかにできるシステムを構築する。

慢性炎症をあつかうために、組織傷害時の好中球の挙動を時空的にマルチスケールで解析し、限局したミクロの傷害と、マクロな臓器連関作用を同時に明らかにする。光化学反応およびフェムト秒レーザーでの内皮傷害をもとに、炎症の終息機構の破綻、即ち慢性炎症の病態解明を行い、急性炎症に対して好中球を標的とした細胞操作を試み、観察臓器は末梢および肝臓での血管を対象とする。炎症を介在する因子として vWF (von willebrand factor) など血栓・凝固関連物質にも着目し、イメージング解析を行う。持続的な慢性炎症は、さらに、線維芽細胞の増殖、すなわち、線維化と臓器障害も引き起こす。心不全、腎不全など線維化が関与する臓器機能障害は従来考えられていたよりも広範であるため、線維化の初期因子および遷延化機構を明らかにし、光化学反応を用いた治療を試みる。

さらに、生体外では再現や解析がほぼ不可能である造血にも着目する。造血は緩徐なフェーズと、急性のフェーズが複雑に絡み合っていることから、骨髄イメージングでは時間・空間的に広スケールでの解析を行う。

3. 研究の成果

(1) マクロミクロイメージングシステムの開発

①マクロ・ミクロを網羅するイメージングシステムを開発し、複数の知財申請を行った。特に、マクロ・ミクロを単一かつ最小化したシステムで実現するために、独自の光路設計により、倒立顕微鏡に匹敵するミクロ像と、俯瞰操作が可能なマクロ像のシームレスを達成した。本特許は多くのアプリケーションを有しており、手術中にも運用可能なシステムになることから、医療デバイスとしての臨床応用を前提に開発研究を現在も行っている。さらに、結像にレンズとミラーを組み合わせ、紫外・可視光・赤外・遠赤外までのすべてを網羅する結像系を開発し、全波長がみえる顕微鏡を独自に開発した。可視光で詳細な形態・動態が明らかになると同時に、赤外で物質情報が得られている。物質は特有の赤外吸収・散乱をもたらすため、赤外線ではそれぞれの物質の局在を、染色を行わずに明らかにできる。さらに、通常 MRI や超音波観察では得られない、リアルタイム性、高解像度、物質特異性を得られることが特徴といえる。すでにワーキングプロトタイプと予備データを取得しており、知財化をすすめている。また、発光と蛍光を単一システムで観察するシステムを開発した。遺伝子治療におけるベクター発現をブタの手術により発光で確認し、免疫細胞療法における輸注細胞の分布をマウス生体で高解像度に画像化した。発光と蛍光とオーバーラップさせることで、癌部と正常部の組織・血管構造を一連のものとして広スケールで画像化した。いままでの血管新生研究ではごく限られた部位の反応のみを観察対象としていたが、本システムでは正常から癌壊死部までを一連のつながりとして解析できるため、治療法開発の面からも大きな進展が得られている。

(2) 慢性生命現象の可視化

①本システムでは、ごくミクロで生じる血栓止血反応・炎症反応と、マクロで生じる臓器障害・慢性化を結びつけることを可能にする。臓器線維化など通常であれば撮影が困難である慢性のプロセスに対しても、可視化・定量化を可能にする高い有用性が示された。一方で、慢性炎症における生体の変化率は大きくないため、ダイナミックレンジが重要なファクターであることも明らかになった。肝臓での虚血再還流傷害において vWF が重要な因子であることを、血小板および血管内皮との関連からも明らかにした。イメージングにより、従来難しかった、肝実質・血管・間質の相互作用を解析し、炎症性細胞の遊走を示した。さらに、レーザー傷害や光化学反応を用いた生体操作とあわせて、血栓病態モデルを光制御により作成し、心血管障害へのアプローチを行った。ROS 産生を伴う血栓形成モデル、血管内皮傷害・白血球遊走モデル、および、虚血再灌流モデルの 3

つの血栓動物モデルを確立した。内皮損傷を限局した部位に誘導すると、好中球が局所傷害後に集積するとともに、他の慢性炎症を引き起こす免疫細胞にもシグナルを伝播していた。ミクロでは好中球は血小板・内皮・周囲の免疫細胞とのネットワークを形成し遠隔連関を形成していた。このような、生体特有の非線形・二相性以上の複雑な時間変化を捉えるためにも、時空間マルチスケールな可視化手法が有効であった。

臓器不全は生活習慣病臨床で残された最も大きな課題である。心臓線維化による拡張障害が、主な原因と考えられる。本提案でのイメージングシステムでは、生体の線維化、肉芽形成、炎症といったプロセスが明らかになった。特に、比較的軽微な皮膚炎症については、炎症から創傷治癒、慢性化のプロセスを画像化により示すことができた。一方で、心臓・腎臓では十分な機能マーカーが見つけれず、機能変化をとらえるだけの感度や再現性はイメージングでは得られなかった。心臓の網羅的観察に関しては、ミラーを用いた全周性イメージングを行い、透明化・非透明化生体サンプル両方で網羅的イメージングを行った。

さらに、造血イメージングでは、血流の広スケール解析により「乱流」が最終的な造血を加速することを明らかにし、2018年に”Cell”に掲載される。乱流の解析は、従来生体外で流体力学的に行われていたが、今回の広スケールイメージングによりはじめて可能になったといえる。造血過程は、血球の成熟から放出まできわめて複雑である。成熟については一定の知見が得られているが、放出および血球老化については不明な点が多い。実際の臨床疾患でもこれらが問題となる場面は多いが、介入手段は限られていた。今回、乱流による血球放出にかかわる因子を複数同定できたため、生体外での人工血小板の作成や、血小板機能異常病態への治療など、現在治療の困難な場面へのアプローチが開かれたと言える。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究で得られるシステムは、免疫・炎症・再生・造血といった通常の顕微鏡観察では全貌を捉えることの難しい時間・空間的階層性をもった生命現象に対して、ミクロな分子生物学的機序とマクロな病態形成を同時に明らかにしている。一方で、得られる知見は、従来の仮説検証型研究のものとは異なるが多かった。限られた書面での伝達は困難なことから、特にアウトリーチ活動として講演・執筆だけでなく体験授業なども積極的に取り入れた。また、患者さんにとどくシステムを目指した事業化を考え、プロトタイプ製作にも多くの時間を費やし、研究とシステム製作を同時に行った。日本では、このようなプロトタイプを製作できるアカデミアラボは皆無に等しく、実際にそのような進行でアカデミアの提案が事業になった例を知らない。一つのラボで引き受ける内容としてはあまりに膨大であったため、よりオープンな体制の構築も今後の課題である。本研究資金は、このような体制の中において大きな位置づけを占めており、継続的な支援が得られたことに感謝の意を表したい。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
 - ① 西村 智、生体分子イメージングによる生活習慣病のとらえ方、第 65 回日本心臓病学会学術集会、2017 年 9 月
 - ② 西村 智、バイオイメージングが明らかにする血小板誕生から死滅まで、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、2017 年 6 月
 - ③ 西村 智、Multi-Scale Visualization of Living Large Animals by Infrared and Minimized Microscope、Bordeaux, France. Fom、2017 年 4 月
- (3) 出版物
なし

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(エピジェネティック)・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 (株) L T T 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 —尿細管間質障害をターゲットとして—

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

①Layilin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。

②L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 1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日後の計3ポイントで行う。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

①Layilin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、CRISPR-Cas9システムを用いてLayilin欠損マウスを作製する

②L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 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/R 9日後より上昇は認められたもの(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マイクロレイ解析を施行し、尿細管虚血耐性に関連する候補分子[X]を見出した。この候補分子[X]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いる。1回目IR19日後の腎臓からDNAを抽出し、候補分子[X]のプロモーター領域のChIP解析を行った結果、ヒストンアセチル化が確認された。現在、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の腎保護作用の検討、さらに近位尿細管培養細胞を用いて、同様の現象を再現できるのか、検討をしている。

(2) 尿細管のEMT抑制

①Layilin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。Layilin欠損マウス (F0) を野生型マウスと交配し、Layilin欠損ヘテロマウス (F1) を作製、さらには、F1同士を交配し、Layilin欠損ホモマウス (F2) を作製した。現在、F2の繁殖を行っている。

②L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

ア 平成 28 年に摘出した糖尿病ヒト L-FABP 染色体遺伝子導入マウス (Tg) を使用し、腎障害の程度を糖尿病野生型マウス (WT) と比較した。血糖値や血清クレアチニンには、両群で同程度であったが、尿中アルブミンは、Tg マウスで有意に低値であった。

イ 腎組織の検討：糖尿病による糸球体障害は、認められなかったが、尿細管間質の炎症および線維化は、Tg マウスで有意に軽減していた。アポトーシスは、認められなかった。

ウ ミトコンドリアの形態・機能の検討：尿細管内のミトコンドリア形態は、電子顕微鏡で観察したが、明らかな形態異常は認められなかった。

エ ミトコンドリアの新生因子 (PGC-1 α) の遺伝子発現は、Tg マウスで有意に亢進していた。PGC-1 α は、抗炎症による尿細管保護作用を有することが知られており、現在、L-FABP による PGC-1 α の発現亢進機序を、検討している。

4. 研究の反省・考察

(1) 急性腎障害の重症化抑制

- ①ヒストンアセチル化を維持するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を事前に投与することで、1回目の虚血腎障害が有意に抑制されていることを確認する。
- ②マウス近位尿細管細胞 (mProx) を使用し、近位尿細管における虚血耐性を確認するとともに、in vivoの系で見出した虚血耐性に関与する候補分子[X]の遺伝子・蛋白発現を確認する。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

①Layilin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) を作成したので、そのマウスを使用し、虚血再灌流モデルにおける慢性期EMT抑制および間質線維化の程度を組織学的 (PAS染色) および遺伝子・蛋白解析により評価する。さらに、Layilin欠損による腎臓以外の他臓器への影響も確認し、Layilinの新規機能の探索を行う。

②L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、ミトコンドリアの新生因子 (PGC-1 α) の発現を増加させ、腎保護的に作用していることを見出した。現在、マウス近位尿細管細胞(mProx)およびヒトL-FABP発現mProxを使用し検討している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Ichikawa D, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Ohata K, Hisamichi M, Hoshino S, Kimura K, Shibagaki Y. Utility of urinary tubular markers for monitoring chronic tubulointerstitial injury after ischemia-reperfusion. *Nephrology (Carlton)*, 23:308-316, 2018.

② なし

(2) 口頭発表

① 市川大介、池森敦子、菅谷健、柴垣有吾、急性腎障害後のnephron lossを鋭敏に反映するバイオマーカーの探索、第60回日本腎臓学会学術総会、2017年5月26日

② なし

(3) 出版物

① なし

② なし

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

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 木 晴 美	歯 学 部 歯 学 科	准 教 授	研究の総括及び実験、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
近 藤 信 夫	歯 学 部	教 授	遺伝子発現解析及びデータ整理
高 山 英 次	歯 学 部	准 教 授	分子生物学的実験及びデータ整理
神 谷 真 子	経 営 学 部	准 教 授	細胞生物学的実験及びデータ整理
永 原 國 央	歯 学 部	教 授	動物実験及び標本作成、データ整理
吉 田 隆 一	朝 日 大 学	教 授	理工学的解析及びデータ整理
玉 置 幸 道	歯 学 部	教 授	骨補填材料作成及びデータ整理

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

(1) 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 低下が懸念され、社会生活を営むための機能を維持した健康寿命の延伸による健康長寿社会実現のための取り組みがなされている。特に、運動機能に深く関わる骨組織再生の分野では、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。そこで、異なる人工骨補填材上での由来組織の異なる移植幹細胞の応答変化の検討と、骨髄抽出液等を用いた破骨細胞分化における動態解析を行う。

①担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価

②骨補填材上での破骨細胞分化評価

③①②の結果から、(2) で行う解析試料を選択

(2) 次いで、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ヒストン修飾解析

②DNA メチル化、脱メチル化部位の探索

2. 研究の計画

前年度に行った骨補填材担体上での骨髄由来幹細胞 (hBMSC) の遺伝子発現変化から、培養開始直後と、骨芽細胞様細胞へと分化した培養 14 日後の細胞より試料を調整する。また、同様に骨髄懸濁液を培養し、由来組織や足場条件の異なる幹細胞の骨芽細胞分化、破骨細胞分化におけるジェネティックおよびエピジェネティックな制御因子の探索、同定、および機能解析を以下の手順で行った。

(1) リアルタイム PCR を骨芽細胞、破骨細胞分化マーカーの発現変化の解析とメチル化 DNA の単離

hBMSC が骨補填材存在下では骨芽細胞分化誘導因子を必要とせず骨芽細胞へ分化したことから、通常の培養容器を比較対照とし、ラット頭蓋骨由来の焼成骨片を陽性対象として足場を用い、骨形成に関わる転写因子群の発現変化等を骨補填材の有無、種類ごとに解析した。また、ラット骨髄を抽出し、懸濁液を同様に培養して破骨細胞分化に関連する遺伝子発現変化を介指揮し、それぞれの試料からメチル化 DNA を回収した。

(2) ヒストン修飾 (脱アセチル化等) 解析

由来組織および担体となる材料の異なる培養細胞試料に HDAC 活性測定キットを用いて培養条件によるヒストン修飾の変化を解析した。

(3) DNA メチル化解析

破骨細胞分化過程において、担体となる材料の異なる培養細胞試料で DNA メチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼの検出を試みヒストンのヘミメチル化、CpG 上のメチル化反応について解析した。

3. 研究の成果

(1) 骨芽細胞分化誘導因子を用いずに、hBMSC を通常培養、あるいは骨補填材、骨片上で培養し遺伝子発現解析を行い①の結果を、また、骨髄懸濁液を用いた同様の実験で②の結果を得た。

①骨芽細胞分化マーカーの発現変化は、通常の培養容器でも培養日数の増加に伴って徐々に上昇したが、骨補填材、骨片上で培養した試料では、転写因子 *Runx2* の発現をはじめ

めとして、アルカリホスファターゼ (ALP)、骨シアロタンパク質、オステオカルシン等のマーカー遺伝子の発現が顕著に上昇した。特に転写因子 Runx2 の発現上昇は培養 7 日目からみられ、骨片、水酸化アパタイト (HA)、炭酸アパタイト (CA) で顕著であったことから、培養液中に溶出したカルシウムの影響を検討するため、骨補填材を浸漬した培地でカルシウム濃度を測定したところ、細胞を培養した場合にカルシウム濃度が上昇していた。次いで、骨補填材を用いず、培養液に塩化カルシウム水溶液を加えてカルシウム濃度を変化させ、同様に培養し遺伝子発現変化を検討したところ、ALP、I 型コラーゲンの発現上昇はみられたが、他のマーカー遺伝子に顕著な発現変化はみられなかった。

- ②破骨細胞分化過程を①と同様の培養条件で検討したところ、骨補填材、あるいは骨片とともに培養することで培養液中のカルシウム濃度が顕著に上昇し、また、培養液にカルシウムを添加して培養すると、骨補填材、骨片存在下で培養した細胞と同様に破骨細胞分化マーカー、酒石酸耐性酸性ホスファターゼの発現上昇がみられた。
- (2) (1) と同様に培養した細胞を用いて HDAC 活性を測定し以下の結果を得た。
 - ①コントロールとした通常の培養容器で培養した細胞よりも、骨補填材や骨片存在下で培養した細胞で HDAC 活性が顕著に検出され、何らかの制御が働いていると考えられたが、骨補填材の種類が異なっても大きな変化はみられなかった。
 - ②一方で、破骨細胞分化過程における検討では、コントロールとした通常の培養容器で培養した細胞よりも、骨補填材や骨片存在下で培養した細胞で HDAC 活性がより顕著に検出され、特に、 β -TCP よりも、骨片、CA、HA で顕著であり、培地中のカルシウム濃度とも正の相関がみられた。
- (3) (2) で、骨髄懸濁液を培養して破骨細胞分化過程でのエピジェネティックな制御の有無を検討した試料で、より顕著な変化が見られたことから、(2) -②と同様に培養した細胞を用いてメチルトランスフェラーゼの検出を試み CpG 上のメチル化反応等を解析し、以下の結果を得た。
 - ①コントロールとした通常の培養容器で培養した細胞よりも、骨補填材や骨片存在下で培養した細胞でメチルトランスフェラーゼ活性が顕著に検出された。
 - ②①のメチルトランスフェラーゼ活性はカルシウム濃度を变化させた培地を用いて培養を行った場合、カルシウムの濃度依存的に上昇した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 骨芽細胞分化とエピジェネティックな因子の検討では、材料の違いによる大きな差異み見いだせなかったが、骨アパタイト、人工アパタイトいずれも骨芽細胞分を促進し、HDAC 活性にも変化が見られたことから、骨形成において、ジェネティックな因子のみでなく、なんらかのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の存在が考えられ、今後の研究課題として検討していきたい。
- (2) 一方、破骨細胞分化においては *in vitro* の培養系においても、HDAC、メチルトランスフェラーゼ活性に顕著な変化が見られ、とくにアパタイト系骨補填材で顕著なこと、培養液にカルシウムを添加した場合に濃度依存的に骨片上での変化と同様の結果が得られたことから、破骨細胞による骨吸収とその結果もたらされるカルシウムイオンの増加が破骨細胞分化のエピジェネティックな制御に関与していると考えられた。エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明は現在も発展段階にあり、活性の上昇している転移酵素の同定やターゲット遺伝子の同定を今後の課題としたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Sumi S, Ohashi M, Muramatsu Y, Sumitomo S, Sikimori M, Yamazaki Y, and Kondoh N. Gene expression analyses associated with malignant phenotypes of metastatic sub-clones derived from a mouse oral squamous cell carcinoma Sq-1979 cell line. *Oncol Lett*. In press.
- ② Azuma Y, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Chihara E, Muramatsu Y, and Kondoh N. The producing capabilities of Interferon-g and Inter-

leukin-10 of spleen cells in primary and metastasized oral squamous cell carcinoma cells-implanted mice. *Transl Med* 2017;3:194–199.

③Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama, E, Moritani N, Oka M, Kawaki H, and Takigawa M. A tumor suppressor gene product, platelet-derived growth factor receptor-like protein controls chondrocyte proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* 2017 ; 118:4033-4044.

(2) 口頭発表

川木晴美, 石樽大嗣, 近藤信夫, 堀田正人. S-PRG フィラーと血清・唾液タンパク質の相互作用. 第3回生体機能性材料 S-PRG フィラー研究会. 2018年2月. 京都

(3) 出版物

なし

学 校 名	常 葉 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	脳梗塞モデル動物への運動処方と糖代謝を介する神経可塑性の関係 －ニューロリハと糖代謝の関係－		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①リハビリテーション ②脳梗塞 ③運動処方 ④代謝		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
熊 田 竜 郎	保 健 医 療 学 部	教 授	研究課題全体の統括・立案・実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 木 聖	保 健 医 療 学 部	教 授	糖代謝と運動機能の関係性の検討
寺 島 健 彦	健康プロデュース学部	准 教 授	糖代謝の生化学的検討
縣 信 秀	保 健 医 療 学 部	講 師	モデル動物の作出、運動評価、組織学的評価
森 下 紗 帆	健康プロデュース学部	助 手	モデル動物の作出、運動負荷法の検討、糖代謝と運動機能の関係性の検討、組織学的評価

脳梗塞モデル動物への運動処方と糖代謝を介する神経可塑性の関係 —ニューロリハと糖代謝の関係—

1. 研究の目的

脳梗塞を含む脳血管障害（脳卒中）は、発症後に後遺症を残し日常生活に支障をきたす代表的な疾患である。運動療法を含むリハビリテーションは発症後の運動障害や高次脳機能障害などからの回復を促すが、どのような機序によるのか、特に神経系の再構築に対してどのような影響を与えるのか、については良く分かっていない。そこで、我々は光増感法による実験的脳梗塞モデル動物作出法を改良して独自に確立した運動皮質梗塞モデル動物を用いて、梗塞巣近傍の神経再構築と運動機能回復との関係とそれらに対する運動負荷の役割について組織学および運動学的に検討している。

神経系は神経（電気）活動による入力情報の変化に伴い、その構造・機能に変化が生じる「神経可塑性」という性質を持つ。この神経可塑性は成体では大部分失われていくと長いこと考えられてきたが、神経科学の進歩から成体の脳にも潜在的な可塑性があり、その能力を顕在化していく重要性が示唆された（Hubener & Bonhoeffer, *Cell*, 2014）。脳の傷害時においても特定の条件下で起こる神経細胞やグリア細胞の新生が脳機能の獲得や傷害後の機能回復と関わる事が分かってきている。そこで、我々も上記モデル動物を用いて神経系の細胞の新生と運動負荷の関係について調べたところ、運動負荷群では後肢の運動機能が回復する事と梗塞巣の近傍に新たに分裂することで生じた神経（幹）細胞やそれに由来する細胞が集積することが見出された。

一方、熊田らは特定パターンを示す神経活動（細胞内 Ca^{2+} 変化で可視化される）がシナプス形成以前においても神経発生（神経新生や神経細胞移動など）のイベントの進行を制御することを見出してきた（Kumada & Komuro, *PNAS*, 2004, Kumada et al, *J. Neurosci*, 2006, Komuro, Kumada et al, *Comp Dev Neurosci*, 2013）。この神経活動には NMDA 受容体や GABA_A 受容体の活性化などの神経伝達物質とその受容体が関与する（小室・熊田 *臨床神経学* 2005, Wang, Kumada et al, *Cereb Cortex*, 2014）。そこで、我々は運動に伴う神経活動が傷害後に起こる神経新生を伴う再生過程を促す可能性に着目しているが、成体の組織培養系が困難なため、両者の直接的な関係を求めるのは難しい。

糖代謝産物の乳酸は運動時に濃度上昇し疲労に関わる物質として広く知られる。最近、乳酸は NMDA 受容体を介する神経の電気活動に影響を与え可塑性の制御に関わる事が報告された（Suzuki et al, *Cell*, 2011, Yang et al, *PNAS* 2014）。そこで、我々は「乳酸などの運動による糖代謝産物が神経幹細胞の産生や神経再編成に影響を及ぼすメディエーターとして働き、神経伝達物質受容体活性化に起因する神経活動のパターンに影響を与える」という仮説を立てた。

本研究では、第一歩としてリハビリテーション、栄養科学の専門家と共に、運動負荷の介入法（タイミングや強度など）とグリコーゲンや乳酸などの糖代謝産物、神経新生を中心とした神経系の再構築、運動機能の回復の関係性について明らかにしたい。

2. 研究の計画

(1) 運動負荷法と糖代謝の関係性についての検討

脳梗塞術後の運動処方の負荷の度合いや様式（強制運動や自発運動、その組み合わせ）を変化させたことによる脳内を中心とした糖代謝産物に与える影響について、生化学的・組織学的に解析する。

(2) 運動負荷法の違いが脳梗塞動物の運動機能の回復に与える影響

糖代謝への影響を基に選んだ運動負荷条件を実験的脳梗塞モデル動物に課し、ビームウォーキング試験や動物用三次元動画撮像装置（Kinematracer, キッセイコムテック社）などを用いて詳細に運動評価する。

(3) 運動負荷法の違いが脳梗塞巣のサイズや神経系細胞の新生に与える影響

運動負荷法の違いと栄養代謝の関係性に加えて、術後の運動処方の違いが脳内の神経機能の再構築にどのような影響を及ぼすのかについて神経組織学的に検討する。まずは生染

色による梗塞巣サイズの違いを定量し比較検討する。また、脳梗塞やその後の運動負荷により惹起された神経系の幹細胞の産生や移動、分化の違いについて調べるために、上記動物群の脳切片を作製し、新生細胞を標識するBrdUと神経発生の細胞種や分化度合いを知ることができる各種マーカー分子の分布と数について定量評価する。

3. 研究の成果

(1) 運動負荷法と糖代謝の関係性についての検討

強制運動の強度がどのようにグルコース代謝の基準となる血中乳酸値に影響を与えるのかについて検討した。具体的にはトレッドミル走による強制運動の運動強度を増大させていく過程で、血液採取直後の乳酸量の生化学的な測定と呼気ガス解析を実施した。その結果、運動強度を増大させるとある変曲点から血中の乳酸値（乳酸性作業閾値）と最大酸素摂取量が著しく上昇することが分かり、齧歯類における糖代謝と運動負荷の関係性が見えてきた。

栄養・運動・分子の関係性を調べるために、各因子が脳内の糖代謝（律速段階や組織（細胞）内外の物質の運搬）に影響を及ぼす分子の発現動態をプロファイリングしている。今年度は、乳酸や酸素欠乏時にエネルギー物質として使用されるケトン体を取り込む輸送体であるMCT2bの脳組織内におけるmRNAの発現量をqPCR法にて調べた。食餌の栄養素（摂取タンパク質）の変化はMCT2bの発現量に影響を与えた。こうした栄養に伴う脳内の代謝変化が、運動負荷に伴う代謝とその後の機能変化にどのような影響を及ぼすのか、新たな研究期間に検証したいと考えている。乳酸以外の定量法については定量法については今後検討の余地があるが、少なくとも糖代謝を定量していく方法については確立しつつある。

(2) 運動負荷法の違いが脳梗塞動物の運動機能の回復に与える影響

脳梗塞術後の動物に対してトレッドミル走による強制運動に加えて、回転車を利用して動物に自発走を促すなど様々な運動負荷を課し、その運動負荷法の違いが運動機能の回復度合いに与える影響について調べた。実験的脳梗塞モデル動物に対して運動強度の異なるトレッドミル走（強制走）トレーニング、回転車を飼育ゲージ内に設置して動物が自発的に走行する事を促すトレーニング、両者を組み合わせたトレーニングを課し、運動機能の回復度合いをビームウォーク試験で定量的に調べた。その結果、障害動物では後肢が角材からスリップする頻度が有意に増加すること、機能回復については、低負荷のトレッドミル走を組み入れる運動法がより効果的である可能性が示唆された。

齧歯類の運動皮質は緻密な運動の調節に関与すると考えられているが、ビームウォーク試験では歩行時にも障害動物の後肢が異常をきたす可能性が示唆された。そこで、運動皮質梗塞はどのように歩行動作に影響を及ぼすのかについて、三次元動画解析装置を用いてラットの歩行を運動学的に解析している。各膝関節の歩行周期あたりの角度変化を調べたところ、脳梗塞モデル動物ではYZ平面上での膝関節の動作に違いが見いだされている。今後、個体数を増やして統計学的に検証していく必要はあるが、各運動負荷による運動機能の回復度合いについては示すことが出来てきた。

(3) 運動負荷法の違いが脳梗塞巣のサイズや神経系細胞の新生に与える影響

術後の運動処方の違いが脳内の神経機能の再構築にどのような影響を及ぼすのかについて、神経組織学的に検討した。脳梗塞やその後の上記複数条件下の運動負荷（トレッドミル走行（低負荷・高負荷）、自発走、両者の組み合わせ）により惹起された神経系の幹細胞の産生や移動、分化の違いについて調べるために、上記動物群の脳切片を作製し、新生細胞を標識するBrdUラベリング実験と神経発生の細胞種や分化度合いを決めるため複数のマーカー（DCX, NeuNなど）の二重免疫染色を実施し、定量評価を行っている。定量法としては梗塞巣近傍、側脳室近傍領域に複数のROI（興味領域）を設定し、それらのROI内のBrdUや二重陽性細胞の数をカウントした。現在までのところ、低負荷トレッドミルを課した動物群でBrdU陽性細胞が多い傾向を示している。

4. 研究の反省・考察

(1) 運動負荷法と糖代謝の関係性についての検討

研究開始当初は、高負荷の運動強度により乳酸量が増え、これが脳の再構築を促すことに関与する可能性を考慮したが、現在までのところ運動処方の違いと運動機能の変化につ

いての関係は、この仮説を支持していない。そこで、特定の代謝産物を生化学的に定量するという計画から、運動処方の程度により異なる糖代謝系を調べるため、より広くプロファイリングする必要性が出てきた。

(2) 運動負荷法の違いが脳梗塞動物の運動機能の回復に与える影響

運動皮質梗塞モデル動物に対して異なる運動負荷を課したところ、少なくとも低負荷トレッドミル走を課することが脳梗塞後の歩行に関する運動障害からの回復を促すことが分かってきた。その運動障害についても障害の度合いや傷害部位を同定していくために、今回三次元動画解析を用いた。市販のシステムに改良を加えることで、脳梗塞術後の運動障害についての詳細が分かってきた。

(3) 運動負荷法の違いが脳梗塞巣のサイズや神経系細胞の新生に与える影響

運動負荷の違いと脳の再構築の関係性について調べたところ、少なくとも運動機能の回復を促進する低負荷トレッドミル走が新たに生まれた神経幹細胞に由来する細胞系譜に影響を与える可能性が見えてきた。今後詳細に系譜解析をする必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Takagi S, Yamashita T, Miura T. Does a Treadmill Running Exercise Contribute to Preventing Deterioration of Bone Mineral Density and Bone Quality of the Femur in KK-Ay Mice, a Type 2 Diabetic Animal Model? *Calcif Tissue Int.* 2017 Dec;101(6):631-640.

(2) 口頭発表

① Kumada, T., Morishita, S., Hokamura, K., Yoshikawa, A., Agata, N., Tsutsui, Y. and Umemura, K. Effects of various exercises on motor recovery through gating and neuro/gliogenesis in motor cortex infarction in rats. The 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, 11/11-14, 2017.

② 森下紗帆, 外村和也, 吉川輝, 縣信秀, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. Effect of different exercises on the differentiation of neural stem cells and motor recovery in rats with motor cortex infarction. 第95回日本生理学会大会, 高松, 2018.03.30

(3) 出版物

なし

学 校 名	京 都 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	慢性炎症制御を基盤とした非アルコール性脂肪肝炎 治療法の開発 －IVA型phospholipase A ₂ を標的分子として－		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①非アルコール性脂肪肝炎 ②IVA型ホスホリパーゼA ₂ ③炎症 ④モデルマウス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
秋 葉 聡	薬 学 部	教 授	IVA型ホスホリパーゼA ₂ 細胞種特異的欠損マウスの作製、データの総括と議論

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 原 慶 一	薬 学 部	講 師	IVA型ホスホリパーゼA ₂ 細胞種特異的欠損マウスの作製、病態モデルの作成、組織学的解析、生化学解析、データの解釈と議論
河 下 映 里	薬 学 部	助 教	IVA型ホスホリパーゼA ₂ 細胞種特異的欠損マウスの作製、病態モデルの作成、組織学的解析、生化学解析、データの解釈と議論

慢性炎症制御を基盤とした 非アルコール性脂肪肝炎治療法の開発 — IVA 型 phospholipase A₂ を標的分子として —

1. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、肝臓での脂肪蓄積に伴う酸化ストレスや慢性炎症により発症・進展し、その過程で活性化された肝星細胞から産生されたコラーゲンの蓄積により、線維化をきたす進行性の肝疾患である。今回、我々は NASH の進展において重要である慢性炎症を抑制できるような標的分子として IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (IVA-PLA₂) に着目し、NASH 治療への応用性について検討する。本酵素は、プロスタグランジン E₂ を含む脂質性生理活性物質の産生過程の初発酵素であり、生体内で炎症反応を制御している重要な酵素であることが示唆されている。これまでに我々は、世界に先駆けて高脂肪食あるいは酸化ストレス誘発性 NASH マウスモデルにおいて、IVA-PLA₂ の欠損や IVA-PLA₂ 阻害剤の経口投与により、病態進展が顕著に抑制されることを見出した。これらの研究成果は、IVA-PLA₂ 阻害剤が NASH の新規治療薬となる可能性を強く示唆している。しかし、NASH 病態の軽減には、高用量の IVA-PLA₂ 阻害剤を全身投与する必要があり、本酵素の生理的機能から考えると副作用の発現リスクが高いと推察される。そこで、より効果的な治療効果や副作用の軽減効果を狙った病態責任細胞選択的な薬物療法の確立に繋げる基礎的知見を得るために、申請者らは細胞種選択的に IVA-PLA₂ 活性を制御するという発想に至った。

NASH の病態進展には、肝実質細胞の細胞死、肝星細胞によるコラーゲン産生およびマクロファージによる炎症の増幅など様々な細胞種が関与している。各細胞種における IVA-PLA₂ の役割は未だ不明であることから、全ての細胞種における IVA-PLA₂ を阻害すると、結果的に治療効果の軽減や副作用の増強が促進される可能性が危惧される。そこで本研究では、細胞種選択的に IVA-PLA₂ 活性を制御することで、より効果的な治療効果や副作用の軽減効果が期待できるという着想の基に、細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを用いて、IVA-PLA₂ を介した NASH の進展機構に寄与する責任細胞種の特特定と各細胞種における IVA-PLA₂ の役割を明らかにする

2. 研究の計画

(1) IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特特定

① NASH 検討に最適な Genetic background の決定

各細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出において、異なる遺伝子背景 (C57BL/6N および C57BL/6J) を持つマウス亜型同士を交配するため、遺伝子背景の混雑による NASH 病態の表現型への影響が懸念された。そこで、交配に使用するマウスの両亜型間での NASH 形成能を比較した。

② 単球・マクロファージ特異的および血管内皮細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作製

NASH 病態への関与が予測される肝実質細胞、肝星細胞、マクロファージおよび血管内皮細胞の各細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスと標的細胞特異的で Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配により作出した。

③ 各細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスにおける NASH 病態の解析

各遺伝子改変マウスについて、高脂肪食誘発性 NASH モデルを作成し、肝障害、炎症性細胞の浸潤、脂肪肝形成および肝線維化の程度を解析した。

(2) 細胞培養系での各細胞種における IVA-PLA₂ の役割の解明

IVA-PLA₂ 全身欠損マウスおよび野生型マウスから肝実質細胞や肝星細胞、マクロファージ、血管内皮細胞を単離・培養し、脂肪酸の添加による細胞死誘導、炎症性サイトカインの分泌について解析した。

3. 研究の成果

(1) IVA-PLA₂が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特定

①NASH検討に最適なGenetic backgroundの決定

細胞種特異的-IVA-PLA₂欠損マウスのNASH解析を行うための遺伝背景を決定することを目的として、C57BL/6J (B6J) とC57BL/6N (B6N) の亜型間でのNASHモデル病態発現解析を行った。四塩化炭素誘発性の肝線維化形成について調べたところ、酸化ストレスマーカーの上昇はB6Nに比し、B6Jマウスにおいて高かったが、肝障害の指標となる血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値の測定や、肝細胞の風船化や炎症性細胞の浸潤に関する組織学的解析においては、BL6NおよびBL6Jマウス間で、有意な差はみられなかった。また、肝組織中のコラーゲンは、BL6Nマウスと比較してBL6Jマウスにおいてより多く蓄積しており、肝星細胞の活性化マーカーである α -SMAの発現量についても、BL6Nマウスと比較してBL6Jマウスにおいて高い傾向を示した。さらに、高脂肪食誘発性のNASH形成能も検討した。高脂肪食投与による体重増加率は、BL6Nマウスと比較してBL6Jマウスの方が低い傾向が見られたが、肝組織中トリグリセリド量は、B6Jの方が高い傾向を示した。また、両亜型間で、コラーゲン蓄積量にほとんど差は認められなかった。このように、亜系統間でNASHの病態の表現型が異なることが示されたため、Creリコンビナーゼ発現マウスおよびIVA-PLA₂^{flox/flox}マウスの遺伝子背景を戻し交配によりBL6N亜型に揃え、各細胞種特異的 IVA型PLA₂欠損マウスを作出した。

②単球・マクロファージ特異的-および血管内皮細胞特異的-IVA-PLA₂欠損マウスの作製

IVA-PLA₂^{flox/flox}マウスは、既存の常法により作製した全身欠損マウスの標的エキソンと同じP1a2g4a遺伝子のエキソン8をloxPで挟み込んだターゲティングベクターを構築し、組換えES細胞を樹立する常法によって作製した。つまり、ターゲティングベクターをC57BL/6マウスES細胞にエレクトロポレーションにより導入し、PCRおよびサザンブロット法によりloxP配列の挿入を確認できた7つの陽性クローンを単離し、これらを受精卵へインジェクションすることでキメラマウスの作製を行った。この内、1種類のクローンから製したキメラマウスにおいてジャームライントランスミッションが確認され、F1ヘテロマウスとCAG-FLPトランスジェニックマウスとの交配によりネオマイシン耐性遺伝子配列の除去を行った。次いで、遺伝背景をC57BL/6Nとするために4回戻し交配を行い、細胞種特異的Creリコンビナーゼ発現マウスと交配することで各細胞種特異的-IVA-PLA₂欠損マウスを作出した。ポジティブコントロールとして、Cre-loxP systemにより作出された全身性-IVA-PLA₂欠損マウスも作出した。

③各細胞種特異的-IVA-PLA₂欠損マウスにおけるNASH病態の解析

NASHを比較的短期間で誘発できるコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFDリサーチダイエット社, A06071302) あるいは通常食 (ND; MF飼料) を、全身性-、単球・マクロファージ特異的-、あるいは内皮細胞特異的-IVA-PLA₂欠損マウスに3週間与え、肝線維化の程度を比較検証した。肝障害を血清中のASTおよびALT値および肝組織切片のHE染色による組織学的解析により評価し、また脂肪肝の程度については、肝組織におけるトリグリセリド蓄積量の測定およびHE染色による組織観察によって評価した。さらに線維化については、肝組織切片のシリウスレッド染色による肝組織へのコラーゲン線維の蓄積量やWestern blottingによる α -SMA (α -平滑筋アクチン、肝星細胞の活性化マーカー) の発現量の定量によって評価した。全身性欠損マウスと同様の肝障害、脂肪肝形成、および肝線維化進展の抑制が内皮細胞特異的欠損マウスで見られ、単球・マクロファージ細胞特異的欠損マウスでは見られなかったことから、血管内皮細胞のIVA-PLA₂がNASHの発症および病態進展に関与する責任細胞種の一つであることが示された。

(2) 細胞培養系での各細胞種における IVA-PLA₂ の役割の解明

①肝実質細胞における IVA-PLA₂ の役割

まず、野生型 (WT) マウスおよびIVA-PLA₂欠損マウス由来の初代培養肝実質細胞におけるパラコート (酸化ストレス) 誘発性細胞死に対する感受性を検討したが、酸化ストレス誘発性細胞死はWT細胞とIVA-PLA₂欠損細胞で同等であった。また、パルミチン酸 (PA) 刺激による細胞死に対するIVA-PLA₂阻害剤の影響についても、ヒト肝癌由来細胞

株 (HuH-7) を用いて解析したが、明確な変化は認められず、オレイン酸 (OA) 刺激による炎症性サイトカインの誘導についても IVA-PLA₂ 阻害による変化は認められなかった。一方、通常培養条件下での肝実質細胞の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) の発現は、IVA-PLA₂ 阻害剤により有意に抑制された。また、IVA-PLA₂ 欠損マウス由来の肝実質細胞における VEGF-A の mRNA 発現量は、野生型マウス由来肝実質細胞に比し有意に減少していた。

②マクロファージにおける IVA-PLA₂ の役割

WTマウス由来腹腔内マクロファージでは、OA刺激による単球走化性因子 (MCP-1) の発現変動は見られなかったが、PA刺激により MCP-1 の発現量は増加した。しかしながら、PAによる MCP-1 の発現誘導に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響はほとんど認められなかった。さらに、酸化ストレス誘発物質であるパラコートによる MCP-1 の発現誘導に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響もほとんど認められなかった。

③肝星細胞における IVA-PLA₂ の役割

通常培養条件下で活性化状態であるヒト由来不死化肝星細胞 (TWNT-1細胞) における MCP-1、 α -SMA、コラーゲンおよび TGF- β 1 (トランスフォーミング増殖因子 β 1) の mRNA 発現量に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響を解析した。結果、IVA-PLA₂ 阻害剤存在下では、TWNT-1細胞における MCP-1、 α -SMA、コラーゲンおよび TGF- β 1 の発現量が有意に抑制された。さらに、アラキドン酸カスケードの下流に存在するシクロオキシゲナーゼ (COX) およびリポキシゲナーゼ (LOX) のいずれの経路が、肝星細胞の活性化に関与しているかを明らかにするため、これらの mRNA 発現量に対する COX 阻害剤および LOX 阻害剤の影響を解析した。その結果、MCP-1 および肝星細胞の活性化関連遺伝子である α -SMA、コラーゲンおよび TGF- β 1 の発現は COX 阻害剤により抑制されなかったが、LOX 阻害剤存在下では、これらの発現量が、阻害剤濃度依存的に抑制された。

4. 研究の反省・考察

(1) IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特特定

①NASH検討に最適な Genetic background の決定

細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出に使用する、細胞種特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスの遺伝子背景の亜系統 (BL6N および BL6J) マウスにおける NASH 病態の表現型を比較した。酸化ストレス誘発性 NASH マウスモデルでは、BL6N マウスと比較して BL6J マウスにおいて、酸化ストレスレベルが高く、コラーゲンがより多く蓄積していた。一方、高脂肪食誘発性 NASH モデルでは、BL6N マウスと比較して BL6J マウスにおける体重増加率の低下、肝障害レベルの低下および肝組織中トリグリセリド量の増加が認められた。これらの結果より、Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスの遺伝子背景が混雑による NASH 病態の表現型への影響が懸念されるため、本研究で使用する細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出には、遺伝子背景を BL6N 亜型に揃えた、Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスを用いた。

②IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特特定

CDAHFD 誘発性 NASH の病態解析の結果、全身性および血管内皮細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損により、肝組織中のトリグリセリドおよびコラーゲン蓄積が抑制され、この現象は単球・マクロファージ特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは認められなかった。このことから、血管内皮細胞の IVA-PLA₂ が NASH の発症および病態進展に関与する責任細胞種の一つであることが示された。しかしながら、NASH の病態進展において、血管内皮細胞での IVA-PLA₂ の役割については未だ不明であるため、この解明に向けて、今後、NASH の発症・進行の要因の一つとして考えられている肝臓での血管新生への IVA-PLA₂ の関与に注目し、研究を進めていく。

(2) 細胞培養系での各細胞種における IVA-PLA₂ の役割の解明

肝実質細胞の IVA-PLA₂ は、炎症誘発に関与していないことが示唆されたが、血管新生促進因子である VEGF-A の発現誘導を介した、血管新生の促進作用が示唆された。最近、NASH 病態での血管新生の関与が示唆されていることから、非常に興味深い発見であると期待し

ている。マクロファージのIVA-PLA₂もまた、酸化ストレス誘発性あるいはPA刺激によるMCP-1発現誘導を伴う炎症誘発に関与していないことが示された。このことから、マクロファージから産生されるMCP-1誘発性の白血球浸潤にIVA-PLA₂は関与していないと推察される。また、本実験結果は、単球・マクロファージ特異的欠損マウスにおいて、NASH病態が軽減しなかったという結果とも矛盾がない。肝星細胞の不死化細胞を用いた実験結果ではあるが、今回の検討で肝星細胞のIVA-PLA₂がコラーゲン産生およびMCP-1の発現誘導を亢進すると考えられた。さらに、これらの作用には、IVA-PLA₂の下流に存在するLOXが関与している可能性が考えられた。これらの結果より、肝星細胞のIVA-PLA₂が星細胞自身の活性化促進因子であることが示された。

以上の *in vitro* の実験結果より、肝実質細胞および肝星細胞に発現している IVA-PLA₂ が NASH の病態を進展させる決定的因子である可能性が示唆された。現在、肝実質細胞あるいは肝星細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出を進めており、これらの細胞に発現する IVA-PLA₂ の NASH 発症・病態進展への関与を明らかにしたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 秋葉 聡

NASHの新規治療観点としてのIVA型ホスホリパーゼA₂の阻害

日本薬学会第138年会（金沢）、2018. 3.

② 河下映里、石原慶一、柏田千紘、泰地健芳、長尾美奈、加納菜瑠実、米岡那夏子、金井志帆、秋葉 聡

IVA-PLA₂欠損下でのNASH病態軽減に関与する細胞種の特定

2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）（神戸）、2017. 12.

③ 中本彩奈、中西李澄、今田百南、河下映里、石原慶一、秋葉 聡

各種肝構成細胞での脂肪酸刺激によるmonocyte chemotactic protein-1

発現誘導へのIVA-PLA₂の関与. 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会（神戸）、2017. 10.

④ 今田百南、河下映里、石原慶一、江川奈生、木原望、倉田麻未、種草大貴、秋葉 聡

細胞培養系を用いたNASH病態進展におけるIVA-PLA₂の機能解析

日本薬学会第137年会（仙台）、2017. 3.

⑤ 福本紗与、河下映里、石原慶一、泰地健芳、秋葉 聡

酸化ストレス誘発性肝線維化の進展過程におけるIVA-PLA₂の役割の解明

日本薬学会第137年会（仙台）、2017. 3.

(3) 出版物

なし

学 校 名	大 阪 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	水腎症の早期検出を指向した基礎および臨床検討 —水腎症の診断バイオマーカーの開発—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①水腎症 ②非侵襲性バイオマーカー ③近位尿細管 ④腎臓			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
細 畑 圭 子	薬 学 部	准 教 授	基礎研究実施、臨床研究の解析、研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 永 一 範	薬 学 部	教 授	基礎研究実施
宮 川 友 明	自治医科大学 医学部 総合医学第2講座	講 師	臨床研究実施
鷲 野 聡	自治医科大学 医学部 総合医学第2講座	助 教	臨床研究実施

水腎症の早期検出を指向した基礎および臨床検討 —水腎症の診断バイオマーカーの開発—

1. 研究の目的

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

- ①水腎症は慢性化すると不可逆的な腎機能障害につながる。水腎症診断にはCT・エコーや血清クレアチニン値などが用いられるが、これらのみでは正確には評価できないことが多いため、正確な通過障害の評価・鑑別には^{99m}Tc-MAG3利尿レノグラムを組み合わせる。
- ②利尿レノグラムとは、放射性医薬品^{99m}Tc-MAG3を静脈注射すると同時に背面から動態撮像を行い、腎臓の経時的な^{99m}Tc-MAG3の動態情報を示す時間放射能曲線のパターンから、水腎症の診断、尿路通過障害を評価する検査であるが、この検査は高額であるため患者の費用負担が大きく、放射線被曝も避けられないという問題がある。しかしながら、利尿レノグラムに代わる診断法は開発されていない。そこで申請者が見いだした新規腎障害バイオマーカーvanin-1が水腎症の重症度および治療判定に資するか否かを明らかにすることを目的とする。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ①vanin-1が水腎症バイオマーカーとなり得るか否かを明らかにする。
- ②水腎症の進展過程におけるvanin-1の役割を解明する

2. 研究の計画

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

- ①自治医科大学附属さいたま医療センターにおける前向き研究（目標症例数は計70例）として、水腎症患者（Case）および非水腎症患者（Control）に対して、保険診療下にて実施されたCT・エコー・利尿レノグラムに基づく重症度と尿中vanin-1をはじめとする各種バイオマーカーとの比較を行った。
- ②Caseにおいては治療前後の尿中バイオマーカー濃度を比較した。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ①水腎症モデル動物（片側尿管結紮ラットを用いて結紮後14日間飼育）を作製し、腎盂尿中および血中vanin-1濃度を評価した。
- ②各ステージにおいて繊維化の指標であるマッソン・トリクローム染色を行うとともに腎切片の免疫染色を行いvanin-1の局在変化を評価した。

3. 研究の成果

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

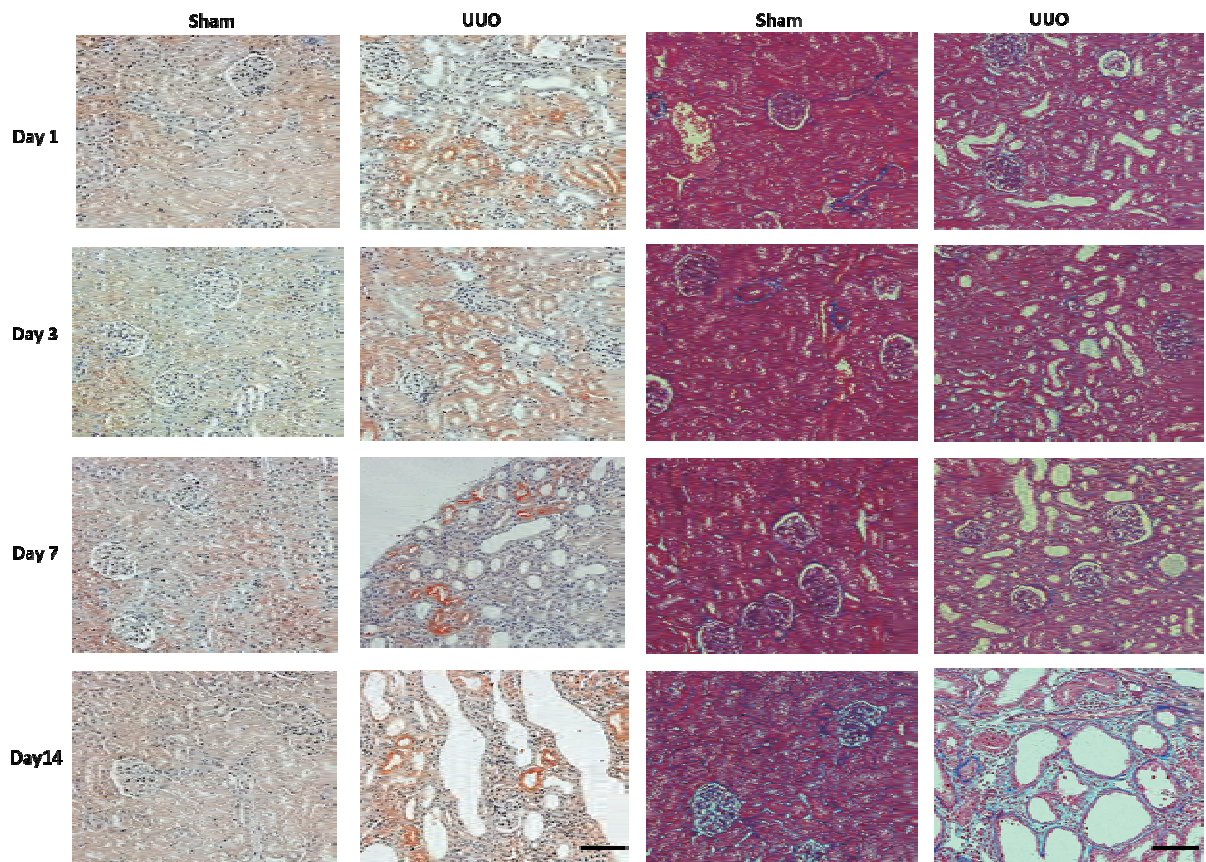
- ①臨床研究の中間解析を平成29年9月1日時点で行った。同意を取得した33例のうち担当医師の判断による脱落例3例を除外すると、解析対象者はControl群11例、Case群19例であった。Caseの内訳は、外科的手術またはステント留置術を行った10例と手術適応がなく経過観察となった9例であった。上記の計20例に対して、尿検体測定および解析を行った。ベースラインにおける膀胱尿中の各種バイオマーカー濃度および腎機能指標（mean ± SD, (95% CI)）を次表に示す（* $P < 0.05$ vs. Control）。Case群におけるvanin-1濃度はControl群に比べて有意に高値であり、upper limitよりも全症例で高値であったことから、水腎症を反映するマーカーであることが示された。

バイオマーカー/腎機能指標	Control(n=11)	Case (n=19)
vanin-1 (ng/mg Cr)	0.093±0.18 (-0.028-0.22)	1.59±2.57(0.35-2.82)*
KIM-1 (ng/mg Cr)	0.423±0.31 (0.211-0.64)	0.68±0.87 (0.25-1.10)
NGAL (ng/mg Cr)	8.895±24.1 (-7.53-24.9)	105.5±199.4 (9.4-201.6)
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	63.7±1.74 (56.2-71.1)	62.1±206 (52.2-72.0)

- ②治療効果判定については、さらなる症例数が必要であり、実施施設を増やすことを検討している。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ① 麻酔下に7週齢のSDラットの左尿管を結紮して後天的な水腎症モデル動物 (Unilateral Ureteral Obstruction; UUO) を作製した。1、3、7、14日後に病理変化と尿中vanin-1濃度を評価した。UUO群では腎盂尿、Sham群では膀胱尿を用いた。結紮3日後には尿細管の拡張所見が観察され、7日後、14日後における尿中vanin-1はSham群に比べて有意に高値であった (7日後・UUO : 3.73 ± 1.07 mg/mgCr、7日後・Sham : 0.30 ± 0.12 mg/mgCr、 $P = 0.013$; 14日後・UUO : 3.63 ± 1.47 mg/mgCr、14日後・Sham : 0.07 ± 0.04 mg/mgCr、 $P = 0.028$) 。3日後、7日後の腎組織中のvanin-1タンパクがSham群に比べて有意に低値であったことから、腎盂尿中のvanin-1は水腎症進展過程において尿中へとリリースされたと考えられた。
- ② 繊維化の指標であるマッソン・トリクローム染色を行ったところ、結紮14日後には繊維化が認められた (下右図)。免疫組織染色により、vanin-1は糸球体ではなく尿細管に局在したが、扁平化した尿細管上皮細胞では認められなくなった (下左図)。尿中vanin-1は尿細管上皮細胞に由来するが、繊維化形成とともにタンパクレベルで低下すると考えられた。



4. 研究の反省・考察

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

- ① 症例の収集に時間がかかった。
- ② 解析可能な症例数を確保するため施設数を増やすなど研究計画の練り込みを早期に検討すべきであった。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ① 計画通りに研究が遂行した。
- ② vanin-1は水腎症バイオマーカーであることが明らかになった。水腎症の進展に伴い、繊維化が見られる段階ではvanin-1の発現はみられなくなることから、初期のバイオマーカーであると考えられた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

- ① **Hosohata K.** Biomarkers for Chronic Kidney Disease Associated with High Salt Intake. *Int J Mol Sci*, 18: E2080. 査読有
- ② Kapse S, Ando H, Fujiwara Y, Suzuki C, Ushijima K, Kitamura H, **Hosohata K**, Kotani K, Shimba S, Fujimura A. Effect of a dosing-time on quetiapine-induced acute hyperglycemia in mice. *J Pharmacol Sci*, 133: 139-145, 2017. 査読有
- ③ **Hosohata K.** Can Focal Segmental Glomerulosclerosis Be Differentiated From Minimal Change Nephrotic Syndrome Using Biomarkers? *Am J Med Sci*, 355: 305-306, 2018. 査読有
- ④ Washino S, **Hosohata K**, Jin D, Takai S, Miyagawa T. Early urinary biomarkers of renal tubular damage by a high-salt intake independent of blood pressure in normotensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 45: 261-268, 2018. 査読有

学 校 名	大 阪 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	安全性の高いiPS細胞由来間葉系幹細胞調達方法の探索		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①iPS細胞 ②間葉系前駆細胞 ③広域顎口腔組織再生 ④再生医療 ⑤幹細胞 ⑥3次元織担体 ⑦歯学			

○研究代表者

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

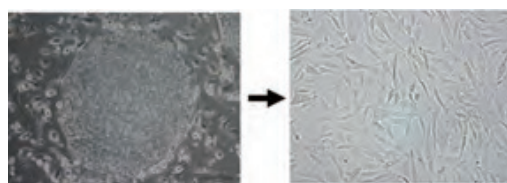
○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 伊 紀	歯 学 部	准 教 授	動物実験
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
南 部 隆 之	歯 学 部	講 師	ゲノム解析実験

安全性の高い iPS 細胞由来間葉系幹細胞調達方法の探索

1. 研究の目的

欠損補綴、顎顔面補綴においてはインプラントによる形態、機能回復が拡大傾向にある。このような状況の中で治療経過を大きく左右する要素として喪失した骨、軟組織をいかにインプラント治療に適した環境に改善するかという点に着目されており、現在の骨補填材に代わり、今後は細胞を用いた再生医療による安全で確実な骨増生が望まれている。再生医療に用いる再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするには、培養系を用いた *in vitro* 組織再生が望ましい。山中らは 2007 年ヒトの線維芽細胞にごく少数の遺伝子を導入することによって多能性幹細胞である iPS 細胞を樹立した (Cell, 2007; 861-872)。



iPSMSLC への効率的樹立

臨床応用可能な iPSMSLC

iPS 細胞は従来の間葉系幹細胞に比較して無限に増殖する長所を有しており顎顔面補綴のような大きな欠損を治療するには適している。すでにマウス iPS 細胞では、骨分化因子を含む培養液を用い *in vitro* で骨芽細胞へ直接分化させる方法が行われている (STEM CELLS 2011; 206-216, PLoS ONE, 2013 e80026)。

しかし、iPS 細胞から骨芽細胞へ分化させる際に分化が不完全で、未分化な iPS 細胞が混入することで腫瘍が形成されてしまうという臨床的リスクが伴う事、さらに、iPS 継代時にゲノム異常を誘発してしまい分化細胞が癌化するリスクが想定されている。現在、歯科再生医療で行われている細胞治療は骨髄間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へと分化させ移植するという試みである。我々が樹立を行った iPS 細胞由来の iPSMSLC は、1) 細胞増殖能に限界を持つ骨髄間葉系幹細胞などと異なり、iPS 細胞の特徴である無限に細胞が増殖する利点を受け継ぎ、2) 分化させなくとも癌化しないという間葉系前駆細胞の特徴を有し、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。平成 27 年 9 月より再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクトが立ち上がり、血液から作製された細胞移植において拒絶反応が起こりにくい HLA ホモの iPS 細胞が提供されることとなった。これら細胞の iPSMSLC のストックを作製することで他家移植が可能となり、経済的にも臨床応用への道が開ける。すなわち、iPSMSLC 細胞を用いた顎顔面の再生医療に有用であるに違いない。

2. 研究の計画

(1) iPS 細胞からの iPSMSLC の樹立の効率化

iPS 細胞は mTeSR1 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) の培養液を用いてマトリゲル上で (GFRM; BD) フィーダ細胞無しで 3 日間培養を行う。培養液は 10% FBS を含む DMEM low glucose に 10 ng/mL bFGF で 2 週間培養し、継代を行い、ゼラチンコートシャーレに移し、同様の培養液を用い培養を続ける。4 継代で iPSMSLC に形態が変化する。すでに細胞播種密度、培養液組成 (血清品質、bFGF)、細胞外マトリックス (ゼラチン、マトリゲル) が効率化に影響することを明らかにしており、それら条件を変化させることで歯肉 iPS 細胞からの iPSMSLC の樹立効率の最適化を行う。効率化は、フローサイトメトリー解析にて MSC 特異的マーカーである CD44, CD73, CD90, および CD105 の発現率ならびに内皮細胞および造血幹細胞の CD34 および CD45 のマーカー、SSEA-3 および TRA-1-60 のような多能性マーカーが発現していないことから調べる。また、リアルタイム PCR 法によって Lin28 の発現挙動も明らかにする。

(2) iPSMSLC の三胚葉の細胞分化

iPSMSLC を骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、リアルタイム PCR 法による細胞分化遺伝子マーカーの発現、フローサイトメーターならびに特殊染色法によってタンパク質マーカーの発現を調べることで iPSMSLC の三胚葉へ細胞分化する条件を探索する。

(3) iPSMSLC の骨芽細胞分化

iPSMSLC をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10%FBS、10 ng/mL 線維芽細胞増殖因子を含む培地で培養後、DMEM に 10%FBS と骨芽細胞分化因子 (50 mM アスコルビン酸-2-リン酸、10 mM β -グリセロリン酸、100 nM デキサメタゾン、100 ng/mL BMP-2) を含む培地に交換し、骨芽細胞様細胞への分化誘導を行い、分化誘導後 1、2、3 週で細胞を回収した。骨芽細胞分化因子を添加しない群をコントロール群とした。骨芽細胞様細胞への分化の評価は、Real-time PCR (ALP、Runx2、COL1-A1、OCN)、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン (OCN) 発現定量測定により行った。

3. 研究の成果

(1) iPS 細胞からの iPSMSLC の樹立の効率化

iPSMSLC への最適な分化法を探索する為、我々は、分化方法の最初の工程であるフィーダーフリー化に着目した。フィーダーフリー化する際の培地を、mTeSR1 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)、DEF-CSD500 (Takara Bio, Shiga, Japan)、StemFit AK02N (Ajinomoto, Tokyo, Japan)、Stemsure hPS 培地 (Wako, Osaka, Japan) を使用し、培養液は 10% FBS を含む DMEM low glucose に 10 ng/mL bFGF で 2 週間培養し、継代を行い、ゼラチンコートシャーレに移し、同様の培養液を用い培養を続けた。培地により分化スピードの差は認めしたが、約 4 継代で iPSMSLC に形態が変化した。

フローサイトメトリー法にて解析を行ったところ、間葉系幹細胞のマーカーである CD24、CD44、CD73、CD90 は陽性を認め、造血幹細胞のマーカーである CD34、CD45 および未分化マーカーである SSEA-4、TRA-1-60 の陰性 (図 1 を参照) を認めた。現在まで、フィーダーフリー化での iPSMSLC への分化には、mTeSR1 が使用されており、近年商品化された他のフィーダーフリー培地 (上記の 3 つ等) における iPS 細胞からの iPSMSLC は報告されておらず、更なる効率化を進行する上で、重要な知見となりうる事が推察される。

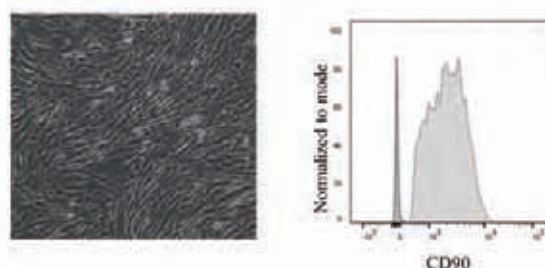


図 1. iPSMSLC と CD90 の発現

(2) iPSMSLC の三胚葉の細胞分化

iPSMSLC を骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、リアルタイム PCR 法による細胞分化遺伝子マーカーの発現を調べた。その結果、Runx2、PPAR γ 、Sox-9 の上昇を認めたためそれぞれの細胞へと分化誘導するのを明らかにした。

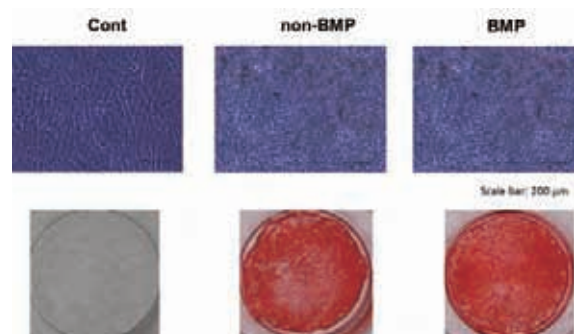


図 2. iPSMSLC 由来骨芽細胞分化のアリザリン染色

(3) iPSMSLC の骨芽細胞分化

iPSMSLC から分化誘導した細胞は Real-time PCR において、コントロール群と比較して、BMP-2 添加群では、ALP は 1、3 週目で、COL1-A1 は 1 週目で最も高かった、Runx2、OCN では上記マーカーと異なる発現挙動を示した。BMP-2 添加群の ALP 活性では 2 週目で最も高い発現を示し、3 週目では発現が低下し、OCN では 3 週目で高い発現を示した。また、アリザリン染色の結果では Bone morphogenetic protein-2 (BMP2) を用いなくても濃染した (図 2)。

4. 研究の反省・考察

作製した MSLC は間葉系幹細胞マーカーを発現し、内皮および造血細胞マーカーは認めなかった。Lin28 の発現がないことから、歯肉 iPS 由来 MSLC は iPS 細胞の残存がなく安全な細胞であると考えられる。Col1A1 と ALP の結果から、BMP-2 は MSLC の骨芽細胞分化の早期の分化を促進するのではないかと考えられる。BMP なし群でも、アリザリン染色の結果からカルシウムの堆積

が確認できたため、分化の終末期に達したと考えられる。またこのカルシウムの堆積は β グリセロリン酸の効果であると推測された。

今後、実用化のためにはゲノム変異性安全性試験が必要である。iPS細胞のゲノム不安定性と造腫瘍性安全性に関する評価を行う。具体的には、iPS細胞を長期、単一培養することであえてゲノム変異を誘発する(Garitaonandia et al, 2015, PloSONE) iPS細胞株を作製し、ゲノム変異 iPS細胞由来 MSLC細胞分化誘導する。ゲノム変異 MSLC細胞に iPS が未残存である事を確認後、NOGマウスへ移植することでゲノム異常と造腫瘍性リスクを評価したい (Sci. Reports 2013.)。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Nakayama Y, Hashimoto Y, Honda Y, Matsumoto N Induction of Mesenchymal Stem Cells-like Cells Derived from Human Gingival iPS Cells into Osteoblast-like Cells. Journal of Oral Tissue Engineering. 2017;15(2):85-94.

(2) 口頭発表

- ① 中山 雄司、橋本 典也、本田 義知、松本 尚之. 歯肉 iPS 細胞に由来する間葉系幹細胞様細胞からの骨芽細胞様細胞への誘導. 2017. 12. 9 第 556 回大阪歯科学会例会 枚方市
- ② 上田 衛、橋本 典也、本田 義知、馬場 俊輔、森田 章介. 異なるフィーダーフリー条件における皮膚由来 iPS 細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導. 2017. 10. 17 第 15 回日本再生歯科医学会総会・学術大会 大阪市

(3) 出版物

なし

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

○研究代表者

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

○研究分担者

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

ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 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イメージング等の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、末梢では成熟 T 細胞の増加と活発な移動が観察された。胸腺では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、この過程をさらに掘り下げ、選択過程における HLA 分子の関与や制御性 T 細胞の分化を検討する。
 - ① ヒト胸腺細胞の選択過程が起こる組織構築、細胞相互作用について詳細に検討する。
 - ② ヒト胸腺組織培養を用いて、制御性 T 細胞分化における HLA 分子の必要性を明らかにする。

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。
 - 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。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、組織側のマーカーである BP1, podoplanin の抗体による可視化、および造血幹細胞に導入された 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。
- (2) ヒト化マウス胸腺組織培養を用いて、制御性 T 細胞分化における HLA 分子の必要性を明らかにする。
 - ① ヒト化マウス胸腺組織培養の樹立
 - 1) ヒト化マウスから胸腺を取り出し、組織スライスを作成後、培養する。培養条件として酸素濃度、IL-2 の添加、およびコントロールとして抗ヒト CD3 抗体による刺激を用いる。3日から5日にかけて細胞を取り出し、CD3, CD4, CD8, Foxp3 の発現を調べる
 - 2) 上記実験によって設定された培養条件を用いてイメージング、および抗 HLA 抗体による阻害実験を行い、ヒト胸腺細胞から HLA による選択を受けているかどうかを判定する。

(3) ヒト化マウスを用いた大腸炎症モデルとイメージングの樹立。

①レーザー照射による血管炎症惹起によるイメージング。ヒト化マウスの大腸をイメージング装置に固定し、粘膜固有層の血管損傷から白血球集積過程を可視化する。

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し、ヒト由来細胞生着率7割以上のマウスに OVA ペプチドと CFA を用いて免疫刺激を行った場合、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ヒト CD4 または CD8 陽性胸腺細胞、ヒト CD11c+SIRPα+の樹状細胞の集積が島状に分布しており、その周りを BP1+, Pdn+のマウス由来胸腺上皮細胞が取り囲むように存在していた。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。

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、NFAT プローブについて *in vitro* の発現系で機能的イメージングを確認した後、レンチウイルス (MOI 100) を用いて臍帯血由来 CD133+造血幹細胞に感染させ、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、簿切した胸腺を高酸素灌流下で2光子顕微鏡を用いて観察した。Venus 陽性細胞の形態から胸腺細胞および樹状細胞が比較的小さな島状に分布しているのが観察された。胸腺は活発に移動し、樹状細胞は定着しながらも突起を活発に伸縮させていた。(1)と同様に免疫した場合、これらの細胞集積が増大し、BP1+Pdn+境界内の髄質と考えられる領域で胸腺細胞はもっとも活発に移動し、樹状細胞と接触している様子が観察された。それに比較し、外側の皮質領域での運動性は低かった。Rap affinity probe は Venus 同様に効率よく発現し、移動過程の胸腺細胞の先端、樹状細胞との接着面に集積した。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) マウスにくり返し移植したが、高発現するに至らなかった。

(2) 胸腺組織培養について CD3 抗体刺激でヒト胸腺細胞が増殖可能であることを確認したが、CD3 抗体の刺激なしでは IL-2 添加しても増殖は限定的であった。そこで高酸素下で、培養を検討したところ、high oxygen + IL2 添加で胸腺細胞がもっとも増加した。この場合、CD4 または CD8 陽性胸腺細胞、CD4 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の出現を確認した。今後、HLA 抗体存在下で胸腺細胞の選択過程を追跡する予定である。

(3) 大腸における炎症細胞の動態を可視化するため吸引装置付きレンズを用いて2光子顕微鏡で生体観察を行った。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2光子顕微鏡観察下にレーザーを照射後、血管部位への白血球集積を観察できた。炎症性腸疾患のモデルである DSS 腸炎においては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。

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、胸腺細胞選択過程についての解析が可能になった。しかし、いくつかのシグナル可視化プローブは導入が困難であり、他の方法(組織培養によるカルシウムインジケータの使用など)を試みる。

(2) ヒト化胸腺組織培養の条件検討に時間を要したので年度内に胸腺細胞選択過程についての解析ができなかったが、実験系が確立されたので、この過程解析を進める予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M, Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen, *J. immunol.*, 2017 199(12):3959-3971

(2) 口頭発表

①Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, NDR1 acts as a molecular hub for the organization of

immunological synapse (3-I-W42-12-0/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

②Ueda Y, Kondo N, Kamioka Y, Kinashi T, Regulation of cell polarization by Rap1 via NDR/Rab8 axis upon chemokine stimulation(1-G-W13-21-P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

③Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Roles of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph nodes (3-I-W42-10-0/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology2017. 12.12-12.14 Sendai.

(3) 出版物

なし

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	IL-33がアトピー性角結膜炎などの炎症性疾患に与える影響の研究 —アトピー性角結膜炎に関わる、IL-33受容体陽性細胞・自然リンパ球の解析—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①アトピー性角結膜炎 ②IL-33 ③2型自然リンパ球(ILC2) ④hK14-IL-33Tg			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
細 谷 友 雅	医 学 部	助 教	研究の全て

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
今 井 康 友	医 学 部	講 師	免疫学的実験の施行
石 川 裕 人	医 学 部	講 師	論文作成の助言、校正

IL-33 がアトピー性角結膜炎などの炎症性疾患に与える影響の研究 —アトピー性角結膜炎に関わる、IL-33 受容体陽性細胞・自然リンパ球の解析—

1. 研究の目的

2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cells: ILC2) は、抗原刺激とは関係なくIL-33に直接反応してIL-5やIL-13などの2型サイトカインを産生する、2010年に発見された新しい白血球である。この発見により、Th2細胞が欠損していてもアレルギーが起こるといった謎が解き明かされ、また治療のターゲットとして有力視されていることから、近年、注目されている。ヒトにおいても、アトピー性皮膚炎 (AD) の皮疹部やアレルギー性眼疾患ではILC2の増加が報告されている。

IL-33は自然リンパ球などを抗原なしに活性化 (自然免疫) でき、IL-5やIL-13などのTh2細胞が産生するのと同じアレルギー関連サイトカインを誘導できる点で注目されている。喘息やアレルギー性鼻炎は獲得免疫が主な原因であるのに対して、ADは獲得免疫だけでは説明できず、自然免疫、汗やバリア機能、細菌叢、痒痒などによる多因子疾患であると考えられる。ADはIL-33が表皮で高発現することが分かっている。IL-33が表皮で高発現する遺伝子改変マウスを作成したところ、ILC2の活性化を伴ったAD様の皮膚炎を自然発症し、続いてアトピー性角結膜炎 (Atopic keratoconjunctivitis: AKC) 類似の眼病変も発症した。

AKCは、顔面のアトピー性皮膚炎に合併して生じ、角結膜への好酸球浸潤を伴って角膜障害や視力障害を生じる重篤な難治性の疾患である。AKC患者の結膜の病変部ではIL-33が強く発現していることは分かっていたが、その発症機序はまだよく分かっていない。

本研究では、AKCの発症におけるIL-33の標的細胞やアトピー性皮膚炎の皮膚病変とAKC眼病変の関連性を探索し、AKCの発症におけるIL-33の役割を解明する。また、感染症やドライアイ、自己抗体などとの関連性についても探索する。

- (1) ケラチン 14 プロモーターの制御下に IL-33 を過剰産生する遺伝子改変マウス (hK14-IL-33Tg マウス) において観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性を解析する。
- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析を行う。また、他疾患で採取した検体との比較検討を行う。

2. 研究の計画

- (1) hK14-IL-33Tg マウスにおいて観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性の解析
 - ① 経時的に角膜および結膜を採取し、角結膜の変化を検討する。生体染色、サイトカインの免疫染色、ヘマトキシリンエオジン染色、トルイジンブルー染色を行い、角結膜病変の特徴を解析する。また、角結膜に浸潤した炎症細胞をフローサイトメトリーで解析する。
 - ② 角膜、結膜のPCRおよびサイトカイン測定を行い、結膜炎、角膜炎の発症時期の検討および免疫学的特性を解析する。
- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析
 - ① 同意を得たAKC患者より検体採取を行い、IL-33がAKCにどのように関与するか検討する。
 - ② 感染症やドライアイ、自己抗体などとの関連性についても検討する。

3. 研究の成果

- (1) hK14-IL-33Tg マウスにおいて観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性の解析
 - ① hK14-IL-33Tgマウスは20週齢で約半数に、24週齢ではほぼ全例にフルオレセイン染色で確認できる角膜病変を発症した。hK14-IL-33Tgマウスでは免疫染色で角膜上皮細胞核内にIL-33の過剰発現を認めた。ヘマトキシリンエオジン染色では角膜中央部にシールド潰瘍様の角膜潰瘍形成とプラークの付着、角膜上皮の肥厚、角結膜に好酸球を含む炎症細胞浸潤を認め、トルイジンブルー染色では結膜と角膜実質にマスト細胞の浸潤を認めた。フローサイトメトリーでは角膜にILC2が浸潤していることが確認された。
 - ② 角膜病変部のPCRではIL-4、IL-5、IL-13、IL-33遺伝子の高発現を認めた。涙液のプロ

テインアレイではIL-5、13などのTh2サイトカインと、好酸球の活性化、遊走に関与するケモカインの増加を認め、涙液中にもこれらの物質が存在することが確認された。結膜、角膜のリアルタイムPCRでは、IL-4、5、13といったTh2サイトカインのmRNAの発現が上昇していた。また、好酸球のマーカーであるPreg2と好塩基球の特異的分化マーカーであるMmcp8の発現が上昇していた。

ILC2はフローサイトメーターで同定できるが、その表面マーカーはLineage⁻Sca-1+IL-33受容体 (ST2) +などと表記される。このLineage⁻という表現は、系統 (Lineage) マーカーがすべて陰性、つまりT細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、好酸球、好塩基球などの既知の細胞のマーカーがすべて陰性、という意味で、具体的にはCD3、CD4、CD8、CD19、Gr-1、Siglec-F、NK1.1、IgEといったマーカーがすべて陰性の細胞である。現在、リンパ球であるにもかかわらず、これらLineageマーカーを持たない細胞を自然リンパ球と呼んでいる。角膜病変部の細胞内サイトカイン染色を行い、Lineage陰性でIL-5陽性細胞のみを集めたところ、その97%がST2陽性、Sca-1陽性のILC2であった。

- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析
検討に必要な検体数を確保することができなかつたため、29年度中に成果をだすことはできなかった。

4. 研究の反省・考察

- (1) hK14-IL-33Tg マウスにおいて観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性の解析

hK14-IL-33Tg マウスの角膜病変部では IL-5、13 の主な産生細胞は ILC2 であると考えられた。hK14-IL-33Tg マウスの角結膜病変は、組織学所見やサイトカイン分布がヒト AKC に類似していた。IL-33 と ILC2 は AKC の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、hK14-IL-33Tg マウスは AKC モデルマウスとしても有用である可能性が示唆された。AKC の病態として、さまざまな刺激で眼上皮から遊離される IL-33 が角結膜に常在する ILC2 を活性化し、IL-5、IL-13 などの炎症性サイトカインが産生される結果、AKC が発症するというメカニズムが考えられる。

- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析
重症 AKC 患者は症例数が少なく、検討に必要な検体数を確保するためには、数年を要すると考えられる。研究成果を臨床につなげるためにも引き続き研究する必要がある。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等

① Imai Y, Hosotani Y, Ishikawa H, Yasuda K, Nagai M, Jitsukawa O, Gomi F, Nakanishi K, Yoshimoto T, Nakamura T, Yamanishi K. Expression of IL-33 in ocular surface epithelium induces atopic keratoconjunctivitis with activation of group 2 innate lymphoid cells in mice. *Sci Rep.* 2017 Aug 30;7(1):10053.

② 今井康友. アトピーに関わる 2 型自然リンパ球 (ILC2) と IL-33, 日皮会誌:128(2), 189-196, 2018.

- (2) 口頭発表

① 細谷 友雅, 今井 康友, 石川 裕人, 中村 隆宏, 安田 好文, 永井 諒, 實川 織江, 中西 憲司, 善本 知広, 山西 清文, 五味 文. アトピー性角結膜炎モデルとしての IL-33 過剰産生遺伝子改変マウスの有用性. 第121回日本眼科学会総会 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区) 2017年4月6日~9日 (発表日: 4月6日)

② 今井 康友, 細谷 友雅, 石川 裕人, 安田 好文, 永井 諒, 實川 織江, 五味 文, 中西 憲司, 善本 知広, 中村 隆宏, 山西 清文. 角結膜上皮の過剰な IL-33 はアトピー性角結膜炎を誘導する. 第66回日本アレルギー学会 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区) 2017年6月16日~18日 (発表日: 6月16日)

③ Imai Y, Hosotani Y, Kusakabe M, Ishikawa H, Yasuda K, Nagai M, Gomi F, Nakanishi K, Yoshimoto T, Nakamura T, Yamanishi K. Atopic keratoconjunctivitis spontaneously develop in a mouse model of atopic dermatitis expressing the mouse inte

rlleukin-33 gene driven by a keratin 14 promoter. Meeting of Society for Investigative Dermatology (SID 2017), Oregon convention center, Portland, USA, April 26-29, 2017

(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 医 学 科	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 医 学 科	講 師	実験・論文作成
深 川 怜 史	医 学 部 医 学 科	助 教	実験・データ整

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

1. 研究の目的

本研究の目的は、造腫瘍能のない卵巣癌、乳癌、胃癌のがん前駆細胞を用いて、種々の遺伝子発現ライブラリーを導入し、HB-EGF の発現亢進にともない造腫瘍能の獲得に寄与する分子群を探索・同定する。HB-EGF は上皮系増殖因子ファミリーに属する細胞増殖因子であり、近年、申請者らはHB-EGF が卵巣癌・乳癌・胃癌などの悪性腫瘍の治療の標的分子であること明らかにしている。これまでの研究成果より、血中HB-EGF 値や組織中HB-EGF 発現量が高い症例が予後不良であり、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 の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 の一つである micro RNA(miRNA)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、miRNA は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て存在することが報告された。そこで我々は miRNA に着目して、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 miRNA を検索するとともに、BK-UM に感受性を示す患者を選別するため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 miRNA を検討し、BK-UM の効果が期待できる症例を診断する miRNA を同定する。さらに、HB-EGF とともに変動する miRNA を同定し、卵巣癌患者血清を用いて real-time PCR 法で臨床的意義を検証する。

3. 研究の成果

- ① CGH アレイによるスクリーニングやウイ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 の導入によって、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。卵巣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 臨床試験で BK-UM に高い感受性を示した患者に特異的な 6 種類の microRNA を同定し、HB-EGF 高発現で予後不良群と HB-EGF 低発現で予後良好群の発現アレイ解析により、HB-EGF が高値で予後不良の症例において有意に発現が上昇する 9 種類の micro RNA を同定した。一方、卵巣癌細胞株に BK-UM を添付して HB-EGF の発現とともに変動する 3 種類の microRNA を同定した。その中の一つである miR-135a-3P は、卵巣癌患者血清でコントロールより有意に高発現であり、特にプラチナ耐性の予後不良患者で高発現であったことを明らかにした。さらに、卵巣癌患者の組織・腹水・血液のいずれにおいても miR-135a-3P の発現が低い場合に予後不良であったことを同定した。

4. 研究の反省・考察

- ① Y-14 はヒトでは、RNA binding motif 8A とよばれ、mRNA のスプライシングや輸送、翻訳や調節に関わるエクソジャンクソン複合体の一つである。MAGOH、PYM などの分子との相互作用により翻訳調節を行うことがわかっている。今回の研究では、Y-14 は HB-EGF の発現を調節することを証明した。さらに、HB-EGF 発現の低下において、転写後発現調節機構が関与しているかを検討するため、RBM8A をノックダウンした細胞により得られた RNA で、HB-EGF の全長を増幅させるような RT-PCR を行った。その結果、RBM8A をノックダウンした細胞で、全長の PCR 産物は減少し、短いフラグメントが増幅され、スプライシング異常が起こっていることが判明した。
- ② miRNA の機能の特性として、一つの miRNA は複数の標的遺伝子を制御している一方で、ひとつの遺伝子を制御するために複数の miRNA が関連すると考えられている。今回の解析で同定された miRNA (miR-135a-3P) 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 を複数検出し、それぞれにおいて RT-PCR 法で臨床的意義を確認する必要がある。

また、卵巣癌患者の組織・腹水・血液のいずれにおいても miR-135a-3P の発現が低い場合に予後不良であったことにより、miR-135a-3P が血清バイオマーカーおよび核酸医薬として有用である可能性が示唆された。今後はこのように同定された miRNA を用いて、卵巣癌細胞株へ遺伝子導入し細胞増殖試験や薬物感受性試験などを行っていく予定である。さらにウイルスベクターを用いて、それらの miRNA を安定的に過剰発現させた細胞株を作製し、その細胞をマウスの皮下に移植して、xenograft model での腫瘍増殖能の検討などを行う。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① MicroRNA-135a-3p as a promising biomarker and nucleic acid therapeutic agent for ovarian cancer.
Fukagawa S, Miyata K, Yotsumoto F, Kiyoshima C, Nam SO, Anan H, Katsuda T, Miyahara D, Murata M, Yagi H, Shirota K, Yasunaga S, Kato K, Miyamoto S:
Cancer Science, 2017 Feb 23. doi: 10.1111/cas.13210.
- ② HB-EGF Is a Promising Therapeutic Target for Lung Cancer with Secondary Mutation of EGFRT790M.
Yotsumoto F, Fukagawa S, Miyata K, Nam SO, Katsuda T, Miyahara D, Odawara T, Manabe S, Isikawa T, Yasunaga S, Miyamoto S:
ANTICANCER RESEARCH, 37: 3825-3831, 2017
- ③ 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.

④Antitumour Effects of Intravenous Administration of BK-UM, a Novel Inhibitor of HB-EGF, in Ovarian Cancer Therapy.

Fukagawa S, Yotsumoto F, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Yasunaga S, Miyamoto S: ANTICANCER RESEARCH, 37: 3891-3896, 2017

⑤Serum Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) as a Biomarker for Primary Ovarian Cancer.

Miyata K, Yotsumoto F, Fukagawa S, Kiyoshima C, Nam SO, Urushiyama D, Ito T, Katsuda T, Kurakazu M, Araki R, Sanui A, Miyahara D, Murata M, Shiota K, Yagi H, Takono T, Kato K, Yaegashi N, Akazawa K, Kuroki M, Yasunaga S and Miyamoto S: ANTICANCER RESEARCH 37: 3955-3960, 2017

(2) 口頭発表

①「HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)の投与方法による比較」清島 千尋

第69回日本産科婦人科学会学術講演会 平成29年4月13日～16日 広島

(3) 出版物

該当なし

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	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、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) 分化と遊走を制御している全身における細胞内シグナル経路の同定と機能解析

①前年度に実施した免疫系Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF)発現プロファイルのマイクロアレイの解析を継続して進める。これらの解析結果に基づき、Th17細胞における免疫系GEFの同定を試みる。免疫系GEFの同定された場合には、Pull down assayなどにより新しい免疫系GEFが活性化する低分子量G蛋白質の特定を行い、構造生物学的解析へと橋渡ししていく。

(2) 真菌T細胞抗原をもとにした新技術の開発

①前年度までの成果として得られている真菌T細胞抗原の候補分画について、口腔カンジダ真菌感染症による動物実験を用いて病態との関連を検証する。具体的にはIL-17-GFPレポーターマウスから分離したヘルパーT細胞を候補分画抗原と骨髄細胞由来樹状細胞によってTh17細胞へ分化させ、FlowcytometryによってGFPの蛍光発現をシングルセルレベルで確認する。確認されたTh17細胞を野生型マウスに経静脈的に養子移入した後、マウス舌にカンジダ真菌を塗布し口腔カンジダ真菌感染症を発症させ、病態の評価を行うことで候補分画の選別を行う。

②口腔カンジダ真菌感染症の病態評価については、体重変化、舌におけるカンジダ真菌の量、口腔カンジダ真菌感染症の臨床スコア、舌組織の病理学的な炎症細胞浸潤といった項目で評価する。

③病態を制御する分画について、プロテオミクス解析にて候補タンパク質を選定した後、大腸菌を用いて精製タンパク質を作成する。得られた精製タンパク質を用いてIL-17産生を指標に真菌T細胞抗原をタンパク質レベルで同定する。さらにペプチドレベルで抗原が特定された場合には、真菌抗原-MHC複合体テトラマー、真菌T細胞エピトープのペプチドを用いたワクチン開発、真菌抗原特異的T細胞受容体トランスジェニックマウスの作製に着手する。

3. 研究の成果

(1) 分化と遊走を制御している全身における細胞内シグナル経路の同定と機能解析

①前年度に実施した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細胞に関するマイクロアレイのデータについて、免疫系GEF発現プロファイルの解析を継続して進めた。これらの解析結果に基づき、Th17細胞において特徴的な発現を示す免疫系GEFの同定を試みたが、今回の解析結果からは特徴的な免疫系GEFの発現パターンは認められず、Th17細胞特異的免疫系GEFの同定には至らなかった。

(2) 真菌 T 細胞抗原をもとにした新技術の開発

①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、得られた真菌T細胞抗原の候補分画について解析した。これらの研究成果を、平成29年9月歯科基礎医学会（松本）にて共同研究者とともに2演題「口腔カンジダ症に対してT細胞応答を誘導する抗原探索」「mild heat stress 下の*Candida albicans* バイオフィームと宿主免疫応答の解析」、ならびに平成29年9月日本医真菌学会（金沢）にて2演題「*Candida albicans* に対するT細胞による免疫機構の解明」「Mild heat stress条件下における*Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答」として発表した。さらに、IL-17-GFPレポーターマウスから分離したヘルパーT細胞を候補分画抗原と骨髄細胞由来樹状細胞によってTh17細胞へ分化させ、本年度の本資金で購入したFACSVerse装置を有効に活用して、GEFの蛍光発現をシングルセルレベルで解析した。その後これらの細胞を養子移入して口腔カンジダ真菌感染症の病態評価を行った。

②口腔カンジダ真菌感染症を誘導したマウスについて、体重変化、舌におけるカンジダ真菌の量、口腔カンジダ真菌感染症の臨床スケール、舌組織の病理学的な炎症細胞浸潤といった項目で病態を評価した。これらの評価項目によって、カンジダ真菌の菌糸型細胞膜成分分画によって分化したTh17細胞に口腔カンジダ真菌感染症の発症を抑制する効果があることが明らかとなった。このように個体レベルにおいて口腔カンジダ真菌感染症の発症を抑制する真菌T細胞抗原を特定することに成功した。これらの研究成果は、平成30年3月に英文学術誌にて、Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. (*FEMS Yeast Res.* 18(3): foy018, 2018) として公表した。

③特定されたカンジダ真菌の菌糸型細胞膜成分分画について、プロテオミクス解析を行った。解析結果に基づき、前年度の本資金で購入したPCR装置を有効に活用して、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細胞の実験系にてタンパク質レベルで候補タンパク質の免疫応答を検証した。複数のタンパク質においてTh17細胞への誘導能が高いことが示唆された。ペプチドレベルの研究へと展開するために、すでに構築済みの口腔カンジダ真菌感染症による動物実験を用いて病態を確認する状況へと進展した。

4. 研究の反省・考察

口腔真菌感染症は新生児や高齢者、あるいは免疫力が低下した患者におこる難治性の口腔感染症で、その病態には免疫応答が関与している。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 細胞抗原は未だに明らかになっていない。Th17 細胞そのものは歯周病などでは増悪因子となるため、口腔真菌感染症に対するワクチンの開発において、抗原と無関係に単に Th17 細胞の免疫応答を誘導するだけでは不十分であり、T 細胞受容体を介した真菌特異的な抗原の特定は不可欠であると言える。近年、Th17 細胞を介した免疫応答と真菌感染症の関係が脚光を浴びつつあるものの、その詳細な病態のメカニズムは未だにほとんど明らかにされておらず、口腔真菌感染症に特異的な免疫応答に関する治療法の開発は全く進んでいない。このため、全身での免疫応答の包括的な理解に立脚した口腔真菌感染症に関する基礎的研究が必要であると考えられてきた。

本研究では、*C. albicans* の口腔真菌感染症において Th17 細胞が重要な役割をはたしており、*C. albicans* 菌糸型細胞膜成分分画によって分化した Th17 細胞に口腔カンジダ真菌感染症の発症を抑制する効果があることが明らかとなった(*FEMS Yeast Res.* 18(3): foy018, 2018)。本研究で計画・実施した網羅的なアプローチによる口腔真菌感染症解析の研究報告はこれまでになく、抗体

を主体とする体液性免疫による生体防御機構とは異なるヘルパーT細胞を介した細胞性免疫を主眼とした研究報告ができた意義は高いと考えられる。本研究を継続して発展的に進めることで、菌体成分分画レベルからタンパク質レベルへと精度を上げて抗原を特定できれば、具体的なワクチン開発が視野に入ってくると思われる。ヒトを対象とした研究に発展させるためにも、本研究で実施した生体反応を直接に検証する動物実験の解析による基盤的な研究成果は重要となろう。また、病原性真菌のT細胞抗原をさらにペプチドレベルで同定することができれば、真菌抗原特異的なT細胞受容体トランスジェニックマウスの作製、真菌抗原-MHC複合体テトラマーの開発、そして真菌のT細胞エピトープによる新しいワクチンへの応用が可能となり、本研究成果が将来のより豊かな生活に貢献する医療技術の開発への道を拓くものと期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Ikezaki, S., Narita, Y., Arita-Morioka, K., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Kojima, H. and Tanaka, Y. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. *FEMS Yeast Res.* 18(3): foy018, 2018. DOI: 10.1093/femsyr/foy018.

(2) 口頭発表

- ① Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Narita, Y., Hashimoto, M., Ikezaki, S., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Arita-Morioka, K., Kojima, H., Tanaka Y. Investigation of mechanisms underlying the T cell response in oral candidiasis. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Sendai, Dec. 12-14th (12th), 2017.
- 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、安松香奈江、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. *Candida albicans* に対するT細胞による免疫機構の解明. 第61回日本医真菌学会総会・学術集会, 金沢, 9月30日-10月1日(30日), 2017.
- ③ 池崎晶二郎、長 環、田崎園子、安松香奈江、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61回日本医真菌学会総会・学術集会, 金沢, 9月30日-10月1日(30日), 2017.
- ④ 長 環、池崎晶二郎、田崎園子、安松香奈江、成田由香、有田(森岡)健一、永尾潤一、田中芳彦. mild heat stress 下の*Candida albicans* バイオフィルムと宿主免疫応答の解析. 第59回歯科基礎医学会学術大会・総会, 松本, 9月16-18日(17日), 2017.
- 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、安松香奈江、小島寛、田中芳彦. 口腔カンジダ症に対してT細胞応答を誘導する抗原探索. 第59回歯科基礎医学会学術大会・総会, 松本, 9月16-18日(17日), 2017.

(3) 出版物

なし

学 校 名	産 業 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	環境汚染物質が誘発する酸化ストレス応答の高感度検出法の開発 —高感受性好中球利用による新規影響評価法—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①Dynamin ②Endocytosis ③Neutrophil ④TLR4			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 田 安 宏	医 学 部	准 教 授	研究全般の遂行

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
矢 寺 和 博	医 学 部	教 授	細胞の病理像及び炎症反応解析

環境汚染物質が誘発する酸化ストレス応答の高感度検出法の開発 —高感受性好中球利用による新規影響評価法—

1. 研究の目的

(1) 背景

これまでに申請者らのグループは、越境汚染物質である黄砂（PM10 の一つ）や PM2.5 の生体影響について動物モデルを解析し報告してきた。PM10 に属する黄砂の影響に関しては、アレルゲン誘導の肺における好酸球増加を増悪させること (Ren Y, Yoshida Y. et al, Allergy Asthma Clin Immunol. 2014;10:30)、またその増悪機構には自然免疫に重要な細胞表面上受容体 TLR2 /TLR4 が関与していること (Song Y, Yoshida Y. et al, Toxicol Res. 2016;5:1445) を報告してきた。更には、肺以外の脾臓において黄砂が転写因子 NF- κ B の活性化を介した亜急性の免疫反応修飾を引き起こし、それは肺の炎症とは時間的に遅延した時点で起こること (Song Y, Yoshida Y. et al, Environ Toxicol. 2015;30:549) を証明した。PM2.5 の影響については、肺の好中球浸潤を引き起こし、アレルギー性疾患の危険因子となり (He M. et al, Inhal Toxicol. 2015;27:287)、またマクロファージにおいて酸化ストレス反応を引き起こすこと (Bekki K, Yoshida Y. et al, Environ Toxicol Pharmacol. 2016;45:362) などを報告してきている。これらの炎症惹起には粒子そのものの性質と、粒子に付着した物質の相互作用の結果であることが分かってきた (He M, Yoshida Y. et al, Sci Rep. 2017;7:11027)。しかしながら、現在まで粒子の大きさ（粒径）の相違、粒子に含まれる構成成分の違いと、生体影響との関連性についての解析は十分には行われていない。更には肺の炎症初期に重要である好中球に焦点を当てた研究も皆無である。本研究課題では、肺での初期炎症を模倣するため、炎症誘導性好中球を調整し、それらに対し異なる粒径の粒子状物質の作用を、細胞内シグナル伝達の観点から解析する課題である。

(2) 研究期間内に明らかにすること（3年計画のうち、初年度に行う計画について）

肺での炎症初期を模倣するため、炎症誘導性マウス好中球を調整し、

- ①粒子状物質に対する *in vitro* での好中球の反応を解析する。
- ②免疫修飾物質の *in vitro* での好中球への影響を解析する。
- ③種々のノックアウトマウスを用いた解析を行う。

2. 研究の計画

(1) 細胞（好中球）の調製

PM2.5 が肺に入ってきて、炎症を惹起した状態を想定しているため、炎症誘導性好中球を中心に解析を進める。6週齢雌の BALB/c マウス、および各種ノックアウト (KO) マウス (TLR2-KO、TLR4-KO、TLR9-KO、MyD88-KO など) の腹腔内に 4%チオグリコレート 2 ml を注射し、4時間後に HANKs で腹腔内を洗浄して腹腔内洗浄液を採取する。遠心・洗浄して得られた細胞に培養液 RPMI を加えて細胞懸濁液を作成し、フローサイトメトリーによる好中球表面マーカー (CD4/violet, CD11b/cy5.5, Gr1/FITC, F4/80/PE) を解析する。

- ①本研究では炎症誘導性の好中球を想定しているが、他の常在好中球（脾臓Ly6G・6C陽性細胞、および骨髄Ly6G・6C陽性細胞）との比較も行う。

(2) 食食能の測定

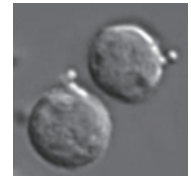
- ①粒子食食能の解析は蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス社) とフローサイトメーターで観察・測定する。

(3) 細胞培養上清・細胞溶解液の調整

好中球を粒子状物質などで刺激し、細胞上清と細胞溶解液を調製する。細胞上清中のサイトカインを ELISA 法で測定、および標的タンパクをウエスタンブロットで解析する。

3. 研究の成果

(1) 好中球の調製は順調に進み、CD11b 陽性細胞率は 90% を超えていた。その貪食能も 60% 以上であることが分かった (下図、好中球が粒子を捉えた瞬間の写真)。さらに、抗酸化剤の存在下ではその貪食能が亢進することから、活性酸素種が好中球の機能を抑制していることがわかった。

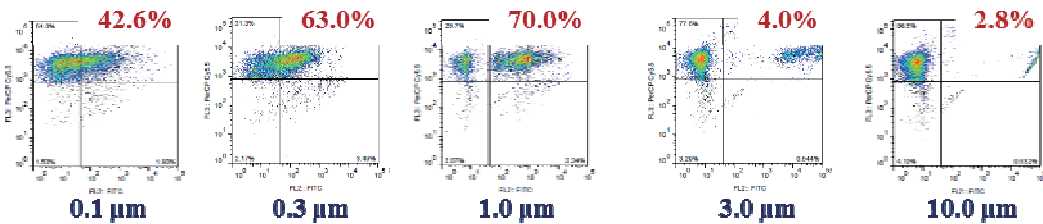


①, ③ 腹腔内炎症誘導性好中球が脾臓・骨髄由来好中球よりも貪食能が高かった。

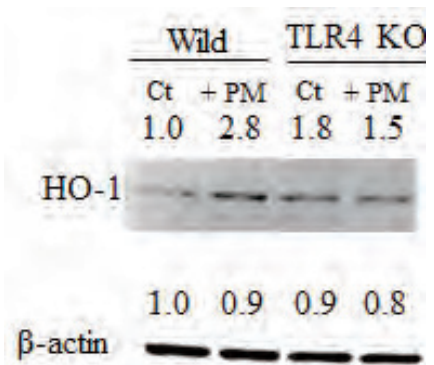
② KOマウスから調整した好中球を用い同様な解析を行った。具体的にはTLR2(グラム陽性菌/マイコプラズマの脂質タンパク、脂質ペプチドを認識する受容体) KOマウス、TLR4(グラム陰性菌の外膜の主成分であるLPSを認識する受容体) KOマウス、MyD88(TLRを介した細胞内シグナル伝達におけるアダプター分子) KOマウスを用いることで、粒子状物質が取り込まれる際に重要な細胞表面受容体のサイトカイン産生や分子活性化における役割を評価した。特にTLR4-MyD88が粒子の貪食に重要な働きをしていることがわかった。

(2) 貪食能の測定

調製した好中球は比較的大きな細胞で、更に細胞内に顆粒を持つ。そのため、フローサイトメトリーで解析すると、大きさと複雑さを反映した領域に分布することが確認され、その集団は多くが貪食細胞のマーカーでもある CD11b が陽性であった。蛍光粒子 (PE) を貪食するとこの集団が右にシフトすることで、貪食能を評価することができる。種々の大きさの粒子を好中球と培養し、3 時間後の様子をフローサイトメトリーで解析した結果が下図である。粒子サイズによって、その貪食能に大きな違いがあることが示唆された。特に 3 μm 以上の粒子の貪食は観察されなかった。これらは PM2.5 の粒径が 1 μm 付近であることを鑑みると、好中球の貪食が生体でも行われていることが予想される結果となった。



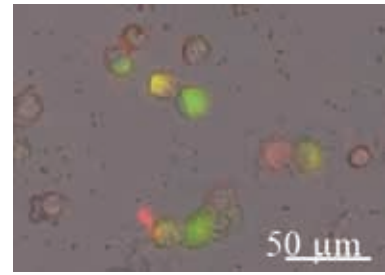
(3) 粒子で刺激した好中球からのサイトカイン産生を炎症性サイトカインである IL-6 と TNF-α の産生能で評価した。予想通り貪食により産生能が亢進していた。また酸化ストレスが何らかの影響を及ぼしていることが示唆されたので、粒子で刺激した好中球の細胞溶解液を用い、酸化ストレスマーカーである HO-1 の発現をウェスタンブロットで調べたところ、発現が増強されていた (右図)。一方、貪食能が低下していた TLR4 KO マウスでは、その発現増強が認められなかった。このことから、貪食の際には自然免疫に重要である TLR4 が鍵となる働きをしていることが示唆された。



4. 研究の反省・考察

環境汚染物質、特に PM2.5 に関しては一過性の肺の炎症は引き起こすものの、全身性には負に生体応答を制御する傾向があり、それは粒子が取り込まれた場所である肺で起こした現象の続きが全身への影響として観察されることを、我々のグループは最近報告している (He C, Yoshida Y. et al, J Appl Toxicol. 2018;38:471)。その鍵を握るのが粒子状環境汚染物質と初期に遭遇する好中球であり、好中球による粒子の貪食が、引き続き起こる生体影響に関連があるのではないかと作業仮説を立てた。まず、in vivo でのシステムで、実際に粒子を気管内投与し、細胞が貪食している様子を肺胞洗浄液中の細胞を使用して観察した。確かに CD11b 陽性細胞が蛍光シリカを貪食している様子が蛍光顕微鏡で観察された (次ページ写真)。今回使用している粒子は付着物質を含んでいないシリカ粒子であるため、LPS や PAH といった物質の手助けなく、貪食が行われたことを示唆する (ただし、生体には補体などは存在するのでその影響は無視できない)。

本研究課題では、肺での初期炎症を模倣するため、まずは好中球の調製方法の検討から行った。肺の炎症が起きた際遊走されてくる好中球に近いフェノタイプということで、チオグリコレート誘発の炎症誘導性好中球に目を付けた。まさに貪食能を備え、炎症サイトカインを産生する細胞であった。異なる粒径の粒子状物質の作用を細胞内シグナル伝達の観点から解析していくのが1つ目の計画であった。驚いたことに、小さい粒子ほど貪食能が高いわけではなく、1 μm の粒径が好中球の‘好み’であった。自然免疫に関与する好中球であるが故に、バクテリアサイズほどを好んで貪食することは非常に興味深かった。



黄色が肺で粒子を取り込んだ好中球を表す

好中球への作用では酸化ストレスが重要な役割を果たしている。貪食後の好中球は確かに酸化ストレスマーカータンパクの発現を増強させていた。抗酸化剤の同時処理により貪食能が亢進したことから、酸性されたROSは貪食をストップするべく、抑制する役割を果たしていた。当研究室では酸化ストレスに高感受性のメタロチオネイン (MT) ノックアウト (KO) マウスを保持し、金属に対する細胞死誘導が非常に高いことを発表している。このマウスの好中球はより鋭敏なストレスマーカーを呈するものと予想され、実際、本年度には期待通りにその貪食能が高いことを観察できている (プレリミナルデータ)。一方、低感受性のマウス (NALP3 -KO マウス) の開発も進めており、既に新技術 (Crisper/Cas9 法) により本年度に F2 を得ることができている。これらのマウスの対比をすることで、よりマーカーの確からしさを強調できるシステムが構築できると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌など

なし

(2) 口頭発表

① Yasuhiro Yoshida.

Endocytosis and cytokine production by neutrophils is mediated through TLR4 and dynamin proteins and inhibited by ROS production. 2017-12、第40回日本分子生物学会シンポジウム (神戸)

② Wang Duo, Tamotsu Kanazawa, Kentaro Morita, Yasuhiro Yoshida

Dynamin inhibitor interrupts endocytosis of neutrophils. 2017-12、2017年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸)

③ Yasuhiro Yoshida, Tadahiro Miyake, Duo Wang, Kentaro Morita.

Endocytosis of particulate matter and cytokine production of neutrophils induced oxidative stress. 2017-09、フォーラム2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー (仙台)

(3) 出版物

① Miyake T, Wang D, Matsuoka H, Morita M, Yasuda H, Yatera K, Kanazawa T, Yoshida Y.

Endocytosis of particulate matter induces cytokine production by neutrophil via Toll-like receptor 4. *Int Immunopharmacol.* 2018 Apr;57:190-199. doi: 10.1016/j.intimp.2018.02.020. [Epub 2018 Mar 6.](#)

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 —CO ₂ 濃縮強化による光合成機能改変の試み—		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 —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 μ M)、一方で高濃度のHCO₃⁻ (2 mM) が存在する。我々の行研究において、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。これは珪藻CO₂-Concentrating Mechanism (CCM) の重要因子である。

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CCMのしくみ、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CCMのしくみ、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 CCM および 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) 珪藻のカルビン回路のボトルネック部位の同定

① 陸上植物のカルビン回路は、sedoheptulose-1,7-phosphatase (SBPase) および fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) が律速因子であり、これらの酵素過剰発現により生産性は約1.5倍となる。珪藻SBPaseは細胞質に局在し、葉緑体には存在しないなど独自の特徴を持つが、カルビン回路律速段階は明らかにされていない。これを明らかにするために、カルビン回路各酵素の過剰発現体を作成する。

② これら過剰発現体を用いて光合成CO₂固定特性およびオイル蓄積量等を調べる。

(2) CO₂ 固定の場である葉緑体内ピレノイドの生化学的構造の解明

① 微細藻類葉緑体内には、ピレノイドと呼ばれるタンパク質ボディが存在する。これはCO₂固定化酵素RubisCOの集積構造体であり、CO₂濃縮と炭酸固定を連結する場と考えられるが、ピレノイド構成因子については多くが謎であり、その構造と機能は不明である。先行研究において珪藻 *P. tricornutum* のピレノイドに、見いだした β 型CAおよびRubisCOと相互作用するタンパク質を精製する。

② これら精製タンパク質をLC-MSによって網羅的に同定し、ピレノイドの生化学的構造とその機能を解明する。

(3) 新規 θ -CA を介した光化学系と CO₂ 固定の協調的制御機構の解明

① 重要な新規ピレノイド因子が発見されたため、本項目を新設する。申請者らが発見した θ -CAはピレノイドを貫通するチラコイドの内腔に局在し、HCO₃⁻のCO₂への変換を加速することでRubisCOにCO₂を供給すると同時にチラコイド膜のpH勾配制御にも関与すると考えられる (Kikutani et al., 2016, *PNAS*)。そこで、 θ -CAと相互作用する光化学系タンパク質の網羅的同定を行う。

② これら因子のノックダウン株での光合成パラメーターの測定を行い、 θ -CAを介した光

合成最適化メカニズムを解明する。

(4) 珪藻が持つ紅藻型 RubisCO の活性化機構の解明

- ① RubisCO は、生体内で複雑な活性制御を受けており、暗下では基質である ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) と強固に結合した不活性状態になる。緑色植物では、RubisCO activase (Rca) が、RuBP を解離させることで RubisCO を再活性化するが、珪藻は、緑色型とは起源が異なる紅藻型 RubisCO を持ち、この活性化酵素は不明である。現在この候補と考えられる CbbX タンパク質を珪藻 *P. tricornutum* のゲノム上に見いだしたため、CbbX が RubisCO の活性化に関与している可能性がある。そこで、珪藻の RubisCO の活性化機構を明らかにするために、組換え CbbX を用いた *in vitro* での RubisCO 活性化実験を行う。
- ② CbbX のノックダウン珪藻株を作出し、光合成特性を野生型と比較して、機能を同定する。

3. 研究の成果

(1) 珪藻のカルビン回路のボトルネック部位の同定

- ① 珪藻カルビン回路の律速段階を探索する目的で、カルビン回路各酵素遺伝子の同定とクローニングを行っている段階である。珪藻ゲノムは2回の共生現象によって複雑にモザイク化しているため、炭酸固定系の還元的ペントースリン酸系を構成する遺伝子群は複数のセットで存在していた。現在これらから葉緑体内に移行することが考えられる因子を特定している。
- ② ①の進展が遅く形質転換体の作製に至っていない。

(2) CO₂ 固定の場である葉緑体内ピレノイドの生化学的構造の解明

- ① 羽状目珪藻 *P. tricornutum* の既知ピレノイド因子、 β -CA および RubisCO と相互作用するタンパク質を、photoアミノ酸というアミノ酸アナログを用いた感光架橋技術を使って単離することに成功した（投稿準備中）。またこの情報をもとに中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* におけるオーソログ因子を検索し、*P. tricornutum* と同様の葉緑体因子が存在することをつきとめた。
- ② これら単離タンパク質を LC-MS によって網羅的に同定した結果、アセチル CoA カルボキシルラーゼ (ACCase)、複数の機能未知タンパク質が再現性良く検出された。ACCase と機能未知タンパク質は GFP タギングによる解析でピレノイドに局在することが明らかとなった。機能未知タンパク質のひとつはピレノイドの辺縁部を覆う、新規ピレノイド被殻タンパク質で、Pyrenoid Shell 因子 (Pysshell) と命名した。また、ACCase がピレノイドで脂質合成と CCM を直結させていることが示唆された (国際会議でベストポスター賞を受賞、投稿準備中)。

(3) 新規 θ -CA を介した光化学系と CO₂ 固定の協調的制御機構の解明

- ① 申請者らが昨年度に発見した、ピレノイド貫通型チラコイドの内腔に局在する θ -CA (Kikutani et al., 2016, *PNAS*) の機能をさらに詳細に解明するために、 θ -CA の相互作用光化学系タンパク質の同定を試みた。因子同定には至っていないが、 θ -CA が CO₂ 環境に応じてチラコイド膜に結合・解離するダイナミズムが観察された (国際会議で発表)。
- ② θ -CA には相同遺伝子が *T. pseudonana* を含めて複数存在していることが判明した。また、この相同遺伝子は珪藻のみならず藻類に幅広く存在することも突き止めた。そのためこれら因子を取得しその局在解析、過剰発現体およびノックダウン体の機能解析を行っている。結果の一部として、これら因子が主にピレノイドに存在すること、一部はミトコンドリア及びオルガネラ間の境界面に存在することが示された (一部データは国際会議で発表)。これら因子のいくつかについて、ノックダウンおよびノックアウト株をすでに取得しており、順次の光合成パラメーターの測定を行いつつある。
- ③ 上記データに基づいて、ピレノイド周辺の新規因子を含めた新たな CCM モデルを提唱した (総説として国際誌に発表: Matsuda et al., 2017; Tsuji et al., 2017b)

(4) 珪藻が持つ紅藻型 RubisCO の活性化機構の解明

- ① 珪藻が持つ紅藻型炭酸固定化酵素 RubisCO の活性化を担う新規因子 CbbX タンパク質を珪藻 *P. tricornutum* から取得し、リコンビナント CbbX が珪藻 RubisCO の活性化に関与していることを示した (投稿準備中)。
- ② CbbX ノックダウン珪藻株を作出し、光合成特性を野生型と比較したところ、RubisCO 活

性が顕著に低下していると考えられる表現型を示す株が得られた。すなわち、活性化酵素としての機能を同定した（投稿準備中）。

4. 研究の反省・考察

(1) 珪藻のカルビン回路のボトルネック部位の同定

- ① (2), (3)において、CCMにかかわる重要ピレノイド因子の発見が続いたため、ピレノイド構造・機能にかかわる基礎的な知見の精査にプロジェクトのパワーが傾注されたため、(1)は生物情報を精査するにとどまった。
- ② ①の進展が遅く形質転換体の作製に至ることができなかった。

(2) CO₂固定の場である葉緑体内ピレノイドの生化学的構造の解明

- ① photoアミノ酸標識という斬新な手法が機能し、非常に多くの有益な遺伝子と周辺情報が得られた。この技術は1.5Åというほぼファンデルワールス距離による特異的架橋が可能であり、今後難単離タンパク質超複合体の解析にも使用が可能である。
- ② LC-MS解析から判明したピレノイド因子、アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACCCase) および Pyrenoid Shell因子 (Pysshell) は非常に有益な情報をもたらしている。まず、ACCCaseがピレノイドで脂質合成とCCMを直結させる機能を有し、脂質合成の始発点となっていることが示唆された。またPysshell因子は二次共生藻で初めての発見であり、地球のCO₂固定の最大45%を担うとされるピレノイド構造・機能解明の第一歩となるであろう。

(3) 新規 θ -CA を介した光化学系と CO₂ 固定の協調的制御機構の解明

- ① 申請者が発見した、 θ -CA (Kikutani et al., 2016, *PNAS*) チラコイド膜に結合・解離することから、チラコイドの光化学系と機能連携することが考えられる。これは光エネルギーと無機炭素平衡がチラコイド内腔で密接な連携関係にあることを示し、これまでATP、NADPH合成およびカルビン回路を隔てて間接的に連携する因子であった光とCO₂が極めて直接的な相互依存関係にあることも示唆しており、今後光合成の基礎知見を一部書き換える可能性もある。
- ② θ -CAは珪藻のみならず藻類葉緑体に幅広く存在することから、水中光合成の収斂進化において重要な鍵因子の一つとして扱われうるものと考えられる。
- ③ これら新規発見因子はここまでのCCMモデルに修正を加えるに十分なインパクトを持つ。また、幅広く存在し藻類ピレノイド機能の収斂進化に、光とCO₂による極めて強い方向性制限が介在することを示している。

(4) 珪藻が持つ紅藻型 RubisCO の活性化機構の解明

- ① RubisCOの活性化因子は今後(1)のサブプロジェクトの一つとして統合する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等（すべて査読付き原著論文）

- ① Yoshinori Tsuji, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda (2017年6月) Molecular aspect of biophysical CO₂ concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *J. Exp. Bot.*, **68**(14): 3763-3772. doi: 10.1093/jxb/erx173.

(2) 口頭発表

- ① Potential role of adenylyl cyclases as CO₂ sensor in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Mayu Nakagawa, Kento Saito, Kensuke Nakajima, Yoshinori Tsuji, Yusuke Matsuda, The 73rd Fujihara Seminar, International Conference “Molecular Life of Diatoms” 2017年7月13日 生田神社会館、神戸
- ② Characterization of phosphate uptake mechanism in the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. Nanae Kimura, Toshiki Sugiyama, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda, The 73rd Fujihara Seminar, International Conference “Molecular Life of Diatoms” 2017年7月12日 生田神社会館、神戸
- ③ Aquaporins in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricorutum* and *Thalassiosira pseudonana* - the function of plasma membrane type component. Hiroaki Matsui, Brian Hopkinson, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda, The 73rd Fujihara Seminar, International Conference “Molecular Life of Diatoms” 2017年7月10日 生田神社会館、神戸

- ④海洋性珪藻におけるCO₂応答性機構の解明 中川真佑、斎藤健人、中島健介、松田祐介 日本植物学会第81回大会 2017年9月9日 東京理科大学野田キャンパス
 - ⑤海洋性珪藻における細胞膜重炭酸イオン輸送体 中島健介、岩山和史、大橋弘章、松田祐介 日本植物学会第81回大会 2017年9月9日 東京理科大学野田キャンパス 口頭発表
 - ⑥海洋性珪藻ピレノイドにおける無機炭素流路制御機構の解明 山岸寛征、菊谷早絵、宮武愛、辻敬典、松田祐介 日本植物学会第81回大会 2017年9月9日 東京理科大学野田キャンパス
 - ⑦松田祐介. 海洋一次生産の分子機構:珪藻のCO₂濃縮機構とその制御. 第50回高知大学アカデミアセミナー「バイオマス資源の利活用に向けた化学/生命研究の最前線」. 2018年3月2日. 高知大学 朝倉キャンパス (招待講演)
 - ⑧海洋性珪藻類の無機炭素濃縮機構とθ型炭酸脱水酵素の役割 松田祐介、Hermanus Nawary、辻敬典、中島健介 日本藻類学会第42回大会、2018年3月25日東北大学青葉山新キャンパス
 - ⑨海洋性珪藻*Phaeodactylum tricornutum* ピレノイドにおける無機炭素流路制御とプロトン駆動力制御の解明 山岸寛征、菊谷早絵、宮武愛、辻敬典、松田祐介 日本植物生理学会第59回大会 2018年3月28日 札幌コンベンションセンター
 - ⑩244. 海洋性珪藻におけるcAMP依存的なCO₂応答機構の解明 中川真佑、斎藤健人、中島健介、松田祐介 日本植物生理学会第59回大会 2018年3月28日 札幌コンベンションセンター
- (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 －脳内の微小管の分子運動はなぜ小さいのか？－		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 大 学 院 新 領 域 創 成 科 学	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に比べて、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することを目的とする。

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, 4Aと脳以外の組織由来の微小管で高発現を示すTUBB5, 2C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)を加え破碎を行い、超遠心によりTUB-rich上清を得て微小管重合および脱重合反応を行いTUB分画を得る。このTUB分画をPhosphocelluloseカラムに通し、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 架橋した抗 TUB 抗体カラムを作製し、高純度 TUB 分画との結合反応、酸溶出、中和、自然重合阻止のための処理を行い、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。

(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 ($10 \mu \text{sec}$) 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、DXT は微量サンプル (50n1) 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、 $1-10 \mu \text{g}$ 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、 $100 \mu \text{l}$ の緩衝溶液中において、SPRING8-BL40XU による DXT 計測を行う。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, *Sci 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 (50n1) でより正確な 3 次元分子運動測定が可能一方で、取得データ数と時分解能は悪い (1msec)。具体的には、(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 50n1 の緩衝溶液中において計測を行う。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。

(3) 組換え TUB 二量体の極微 1 分子計測 (DXT、DET) による分子運動解析 (中山) (佐々木) (小川)

TUB 二量体は、isoform により極性アミノ酸の位置と数が異なっている。そこで組換え TUB 二量体を用いた DXT、DET 計測を行うと共に、分子動力学法 (MD) による予測計算 (Yoshidome, Ikeguchi, *Phys Rev E* 2015) を行う。具体的には、(2) で得られた分子運動情報の比較から配列特異性を抽出し、翻訳後修飾の少ない大腸菌発現系で野生型とアミノ酸置換を施した組換えタンパク質の作製 (Nakayama, *FEBS Lett* 2003) を行い、再構成 TUB 二量体と 37°C 、GTP 存在下で重合させた微小管系における DXT、DET 計測によって配列依存性の検証を行うと共に、スーパーコンピューターを用いた原子間力計算に基づく MD により isoform 間、アミノ酸置換に伴う理論的な動態変化予測を行う。MD 計算に際しては、モデリング構造と実験値を比較した溶液構造モデルを導出すると共に、必要に応じて粗視化 MD、全原子 MD による動態変化予測を行う。微小管の DXT、DET 計測に際しては静電的吸着法により行い、二量体の計測では詳細な運動方向を計測するため、TUB 二量体が支持膜上に垂直に固定されるようヒスチジン法を採用し、セル内の Ni^{2+} 支持基板を介して TUBA のヒスチジン (6 x His) タグを固定し計測を行う。

3. 研究の成果

内在性 TUB 二量体を精製するために、ラット脳及び肝臓組織より TUB-rich 上清を得て、微小管重合及び脱重合反応を行い TUB 分画を得た。この TUB 分画を Phosphocellulose カラムに通し、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, 4A と脳以外の組織由来の微小管で高発現を示す TUBB2C, 5 isoform の各抗体を ProteinG に架橋した TUB 抗体カラムを作製し、高純度 TUB 分画を用いて、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。これにより得られた精製 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

度の評価を行った結果、脳由来 TUB 二量体の方が肝臓由来のものと比較して χ 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。そこで次にこの現象が TUB アミノ酸配列に起因しているか否かの検証を試みた。具体的には、上記脳由来 TUBB と肝臓由来 TUBB について翻訳後修飾の少ない大腸菌発現系で His タグ組換え TUB 二量体を作製し、再構成 TUB 二量体が支持膜上に垂直に固定されるよう、観測セル内の Ni^{2+} 支持基板を介して二量体中の TUBA のヒスチジンタグを固定し、詳細な運動方向の計測を行った。その結果、脳由来 TUBB 二量体の方がそれ以外の TUB 二量体と比べて垂直軸方向の分子運動が低下していたことから、脳由来 TUBB 中に配列特異性がある可能性が示唆された。そこで各々の二量体について、アミノ酸配列の相違が見られる C 末端アミノ酸残基を置換したキメラ変異クローンを作製し、三次元分子運動測定が可能な DET 法により詳細な分子運動の計測を行った。その結果、脳由来 TUBB 変異体では、野生型で低下していた垂直軸方向の分子運動が上昇すると共に、肝臓由来 TUBB 変異体では逆に低下する現象が得られてきた。

4. 研究の反省・考察

内在性 Tubulin 二量体の分子運動度解析より、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、 χ 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。また組換え Tubulin 二量体の分子運動度解析により、脳由来 TUBB の C 末端アミノ酸配列中に TUB 二量体の分子運動の差を規定する因子が存在することを明らかにしたことは大きな発見であった。これらの結果は、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 C 末端アミノ酸配列の差に起因していることを示唆しているものと考えられる。今後の解析により、このアミノ酸配列以外にも大きな分子荷電変化をもたらすことが予想される翻訳後修飾の関与も明らかにする必要があると考えている。またこれらの現象は、当初予定していたものマシントイムの事情により遅延が認められる MD 解析によっても再現されることが予想され、その為にも 100m 秒オーダーの全原子 MD データの取得が急務であると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Ogawa N, Mizokawa R, Saito M, Ishikawa A. “A simple method for environmental cell depressurization for use with an electron microscope.” *Microscopy (Oxf)*. 2017 66(6):424-430. doi: 10.1093/jmicro/dfx029.
- ②Matsushita Y, Sekiguchi H, Wong CJ, Nishijima M, Ikezaki K, Hamada D, Goto Y, Sasaki YC. “Nanoscale Dynamics of Protein Assembly Networks in Supersaturated Solutions.” *Sci Rep*. 2017 7(1):13883. doi: 10.1038/s41598-017-14022-7.

(2) 口頭発表

Nakayama T, Fukutomi T, Fujiwara T, Terao Y, Akagawa K. “P300/CBP is a neuron-specific positive regulator of the syntaxin 1A gene expression: participation to unusual behavioral profile.” *ConBio 2017*, kobe.

(3) 出版物

なし

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	理工学研究所
研 究 課 題	光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①メタノール ②光脱酸素 ③金属錯体 ④光触媒		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
張 浩 徹	理 工 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
芳 賀 正 明	理 工 学 部	教 授	光誘起電子・プロトン移動の設計
片 山 建 二	理 工 学 部	教 授	無輻射過程等の光誘起ダイナミクスの解析
松 本 剛	理 工 学 部	助 教	光応答性有機配位子及び錯体の合成
孫 雲 龍	理 工 学 部	助 教	水素種の励起状態ダイナミクスの測定と解析

光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築

1. 研究の目的

申請者らは、H25年に安価な *o*-フェニレンジアミン(opda)を含む Fe(II)錯体が「室温で光により有機骨格から水素を触媒的に発生」することを見出した (*J. Am. Chem. Soc.*表紙)。更に EC としての利用が熱望されている MeOH の脱水素化にこの材料設計概念を応用し、opda の NH₂ の一つを O に置換したアミノフェノール(apH)及びその Fe(II)錯体が、「室温で MeOH の触媒的光脱水素化を世界最高の量子収率(2.9-4.8%)で駆動」することを見出した(*Nature Commun.*)。これらの反応は、安価な有機骨格と非貴金属の相乗効果により発現する光反応であることから、これまでに無い EC 操作技術として高い注目を集めている。そこで本研究では、申請者らが見出したアミノフェレート 3d 金属錯体 (非貴金属触媒) が示す有機骨格上での光誘起電子・プロトン移動の高次設計と反応ダイナミクスの解明による、高活性光駆動型キャリアシステムの構築を目指す。本研究では、錯体及び有機化学を専門とする張・松本に加え、電子・プロトン移動の精密制御を専門とする芳賀及び、励起状態ダイナミクスを専門とする片山・孫からなる研究グループを新たに立ち上げ、室温下での「光」エネルギーの入力により、効果的に水素を利用できる材料を得るための基礎学理を構築することを目的とした。

2. 研究の計画

本研究を遂行すべく、H29年度には主に課題1：光触媒の基本設計-活性種の光誘起発生-について検討する。申請者らが見出した apH 等のプロトン・電子プーリング配位子と Fe(II)等の非貴金属の協奏による光水素発生反応は、有機骨格の光励起を引き金として生じる。具体的には、 $\pi\text{-}\pi^*$ 状態への励起に続く N-H($\pi\text{-}\sigma^*$)状態への円錐交差により N-H 結合が均等解裂し、「水素ラジカル(H•)」を発生することが実証されている(*Nature Commun.*, 2016)。ここで、EC を活性化する触媒部位は、①プロトン・電子プーリング配位子と、②非貴金属から構成される。従って、これらの組み合わせにより、望む EC の触媒的光活性化を達成しうる。以下その具体的設計を記す。

- (1) **プロトン・電子プーリング配位子の設計**：配位子は、光吸収部位である π 電子系と、金属への配位部位(O, S, NH_x, PH_x ($x = 1, 2$))からなる。X = O, S, NH_x と、Y = N, P を組み併せることで、異なる反応活性種を発生しうる。本研究では、各種金属及びこれらの配位子を組み合わせにより光による活性種の発生を実現する。中でも、EC 種との反応性が期待される水素ラジカルとヒドリド種を効率的に発生する配位子開発を次に記す②金属種の選定と組み合わせにより遂行し、他に類を見ない独自の活性種ライブラリを活用した触媒設計を進める。
- (2) **非貴金属の設計**：金属は、活性電子/水素種を発生する配位子と結合することで配位子の分解を抑制し、触媒サイクルを担保する役割を担う。本研究では、高活性 EC 活性化触媒を創成するための金属種の役割である、1) 活性光励起状態の形成、2) 電子・プロトン移動の促進、3) 基質活性化能を重要視し、非貴金属種に限定した触媒開発を展開する。1) については金属が絡む MLCT, LMCT (可視光励起) 状態からの活性種の放出を、2) においては配位子からのスムーズな活性種の放出を、3) に関しては金属中心における EC 分子のトラップと活性化を指向し、高活性触媒を構成する化学因子を最適化する。

3. 研究の成果

光化学的に水素ラジカルを生成し MeOH からの脱水素を触媒的に駆動する反応場において、発生した水素ラジカル種と 2-iminosemiquinonato を有する中間体間の N-H 結合再形成や配位子部位の解離に伴う触媒の不活化といった副反応を抑制し、効率的にメタノールと反応させるための中心金属および配位子の設計が重要であると考えられる。そこでまず以下の検討を行い有用な知見を得た。

(1) MeOH の触媒的光化学的脱水素反応に対する金属効果の解明

貴金属触媒を使用した高温反応により進行する既報の熱的メタノール脱水素反応に比べ、本系の TON_{H₂} は低く、さらなる改善が必須である。特に、光反応過程において推定される輻射及び無輻射失活を抑制し、効果的に $\pi\pi^*$ および $\pi\sigma^*$ 状態へ光励起させた後、発生すると予想される水素ラジカルとメタノールを効率的に反応させる反応条件を見出すこ

とが、触媒活性向上への鍵となると考えられる。そこで本研究では、 d^6 電子配置を有する既報の Fe(II) に対し、 d^5 及び d^7 配置を持つ Mn(II) と Co(II) に加え、 d^0 及び d^{10} 配置を有する Mg(II) および Zn(II) を用いた系統的研究により、最適な金属イオンを選定し、 d 電子数の違いに依存した反応性の差異を確認した。

各種金属塩と apH の混合により得られる MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) の MeOH- d_4 中での ^1H NMR スペクトルを測定したところ、MapH (M = Mn, Co) はブロードなシグナルを与え、常磁性錯体種の形成が示唆する一方、MapH (M = Mg, Zn) は apH $_2$ 類似のシグナルパターンを与えたものの、いずれも apH $_2$ よりわずかに低磁場側にシグナルを与えた。このことから、全ての金属種が apH と錯形成し、類似の触媒活性を示しうる構造を有することが確認できた。実際、Co については、同形の単結晶構造解析に成功し、上述の仮定を支持する結果を得た。

apH $_2$ (2.0 mM) および MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) (1.0 mM) の MeOH 溶液に、紫外光 ($\lambda = 289 \pm 10$ nm) 照射を行なったところ、apH $_2$ の MeOH 溶液への 6 時間の光照射により 0.8 当量の水素発生が確認された。一方、MapH (M = Fe, Mn, Mg, Zn) においてはそれぞれ、1.1, 1.5, 0.7, 1.5, 1.0 当量の水素の発生が確認でき Co を除く金属イオンの利用による水素発生量の増加が確認でき、 d^6 以下の d 電子を持つ錯体により水素発生反応が促進されることが確認された。

(2) MeOH の触媒的光化学的脱水素反応に対する置換基効果の解明

中心金属を Fe(II) から Mn(II) へ変更し、前述の FeapH と同様の反応条件において光反応を検討した結果、MnapH では 8.9 当量 (5 h) の水素が発生することが明らかになった。さらに Mn(II) 錯体に関して、*t*-Bu 基をアミノフェノラートの 4 位並びに 4,6 位にそれぞれ導入した錯体 (MnBuapH および MnBu $_2$ apH) の光水素発生量は、MnBuapH では 9.2 当量 (5 h)、MnBu $_2$ apH では 9.4 当量 (5 h) となり、いずれの場合も無置換の MnapH の場合と比べ水素発生量は向上した。これらの反応においては、触媒の構造や性質に関する詳細は明らかではないものの、配位子に導入する置換基が反応活性に有意な影響を及ぼし得ることを明らかにした。

(3) 光脱水素反応を阻害する抑制反応の解明

本光触媒活性を向上させるためには、それを抑制する因子の制御が重要である。apH $_2$ の MeOH 溶液に対し光照射したところ、新たな吸収帯を 406 nm に示した。その生成物の ^1H NMR スペクトルにはオルト二置換ベンゼン骨格の形成を示唆する二組の二重線および三重線を与え、MS 測定により 2,3-ジヒドロベンザオキサドールの形成が示唆された。2,3-ジヒドロベンザオキサドールは、apH 及び HCHO の暗条件下における反応によっても生成が確認されたことから、光照射後の 2,3-ジヒドロベンザオキサドールの形成は、遊離した apH と MeOH の光脱水素化により生成する HCHO 間の暗反応により生成したと推察された。一方、MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) は光照射後にそれぞれ薄黄色、橙色、茶色、薄茶色、黄色、黄色を呈する生成物を与え、 ^1H NMR スペクトルにおいても apH $_2$ とは異なるオルト二置換骨格の存在を示唆する二組の二重線および三重線シグナルを与えた。注目すべき事に、MapH (M = Mg および Zn) の場合は apH $_2$ の場合と同様の光照射後生成物に由来するシグナルと共に、光照射前に確認された錯体種由来のシグナルが確認された。これらの結果は、錯形成により光照射後生成物の生成が抑制され、初期状態の錯体種が残存していることを示唆する。以上の結果は、金属イオンの共存により apH が固定化され、光生成した HCHO との反応を抑制した結果、光反応活性が向上したことが強く示唆された。

以上の結果は、Fe 系において初めて見出された世界最高の量子収率で MeOH からの室温光脱水素反応を向上しうる化学因子が存在することを示す結果であると共に、金属により活性部位である apH 骨格の補足が極めて重要な鍵を握る事を解明した有用な知見であると考えられる。

4. 研究の反省・考察

H29 年度は過去に報告されている apH $_2$ および FeapH による光水素発生反応とその反応機構をもとに、光反応に対する金属効果の検証に加え、副反応に及ぼす金属効果を検証し、本光触媒の活性向上を検討した。今後はより脱水素活性効率を向上させるため条件の最適化を図るべく、①強配位子場の形成・置換不活性金属の利用及び②無機担体への固定化に焦点を当て研究

を展開する。①に関しては配位子の解離を抑制すべく、これまでに用いた d^0 , $hs-d^5$, $hs-d^6$, $hs-d^7$ および d^{10} という置換活性電子配置に対し、 d^3 や $ls-d^6$ 置換不活性系を構築すべく、CN 基や NR_3 , PR_3 軸配位子の導入を検討する。②については、シリカ等の担体表面への固定化により液相において生じる配位子交換や無輻射失活を抑制し、触媒相とその励起状態の安定化を図る。

5. 研究発表

(1) 学会誌

- ① Masanori Wakizaka, Takeshi Matsumoto, Atsushi Kobayashi, Masako Kato, Ho-Chol Chang, A coordination network with ligand-centered redox activity based on *facial*-[Cr^{III}(2-mercaptophenolato)₃]³⁻ metalloligands, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9919-9925.
- ② Takahiro Ito, Takeshi Matsumoto, Masanori Wakizaka, Ho-Chol Chang, Coordination behavior of *N,N'*-bis(diisopropylphosphinoacetyl)-*o*-phenylenediamide with Ni^{II} and Cu^I ions, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 3498-3507.
- ③ 張 浩徹, 松本 剛、非貴金属-電子・プロトンプーリング有機骨格の協奏による光水素発生システムの構築、*JXTG Technical Review* **2017**, *60*, 12-18.
- ④ 張 浩徹, 松本 剛、レドックス活性配位子によるメタノールの光脱水素化、*化学と工業 (Division Topics, 錯体化学・有機金属化学)* **2017**, *70*, 1105.

(2) 口頭発表

- ① 秋澤 秀明, 山本 莉紗, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン錯体の光水素発生反応とその制御因子、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ② 西澤 忠晃, 秋澤 秀明, 王 龍坤, 張 嶺碩, 松本 剛, 張 浩徹、レドックス活性三座配位子を有する Fe(II) 錯体の合成と多電子・多プロトン移動反応、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ③ 小池 拓司, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、Photochemical hydrogen radical generation of *o*-phenylenediamine iron(II) complexes、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ④ 小池 翔太, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、2-アミノフェノール及びその金属錯体が示すメタノールの光脱水素化、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ⑤ 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン Fe(II) 錯体が示す CO₂ の光固定化錯体化学会第 67 回討論会, 2017 年 9 月 16-18 日
- ⑥ 小池 拓司, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン鉄(II) 錯体が示す光水素ラジカル発生反応、錯体化学会第 67 回討論会, 2017 年 9 月 16-18 日
- ⑦ 秋澤 秀明, 山本 莉紗, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-ベンゾキノジイミン錯体の水素化法の開発錯体化学会第 67 回討論会, 2017 年 9 月 16-18 日
- ⑧ 小池 拓司, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン鉄(II) 錯体が示す光化学的水素ラジカル発生反応、第 29 回配位化合物の光化学討論会, 2017 年 8 月 5-7 日
- ⑨ 松本 剛, 内城 大貴, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン鉄(II) 錯体が CO₂ 下において示す光化学的カルボキシル化反応、第 29 回配位化合物の光化学討論会, 2017 年 8 月 5-7 日
- ⑩ Takuji Koike, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Photochemical hydrogen evolution reaction of *o*-phenylenediamine iron(II) complexes、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑪ Daiki Uchijyo, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Photochemical reaction of [Fe^{II}(opda)]²⁺ under CO₂ atmosphere、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑫ Hideaki Akisawa, Risa Yamamoto, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Syntheses of *o*-phenylenediamine/*o*-benzoquinodiimine complexes and their electron/proton transfer processes、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑬ Ho-Chol Chang、Design and properties of redox-active metallomesogens、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑭ Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Photochemical hydrogen evolution based on metal complexes bearing redox-active ligands、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日

(3) 出版物

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 —原始レベルから細胞までの統合的理解—		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 —原子レベルから細胞までの統合的理解—

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) リモデリング因子とヌクレオソームとの相互作用解析

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。平成28年度の研究で確立した、全長のゼブラフィッシュRad54の大量調製系を用いてRad54を調製し、Rad54とヌクレオソームとの相互作用を生化学的に解析した。

(2) 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構造の多様性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安定性と構造の多様性について、物理化学的解析およびX線結晶構造解析を用いて解析した。

(3) *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、酵母遺伝学・分子生物学的手法に化学的アプローチを組み合わせ、全ヒストンのDNA結合部位特異的の化学切断法を開発することを目的とした。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. 研究の成果

(1) リモデリング因子とヌクレオソームとの相互作用解析

Rad54と再構成ヌクレオソームとの相互作用を調べるために、様々なモル比で混合したゼブラフィッシュRad54（以下DrRad54）とヌクレオソームの混合液を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、複合体の形成効率を調べた。混合液には、ATPまたはその非加水分解アナログ5種類（ATP α S、ApCpp、AppCp、AppNHp、ATP γ S）を加え、それぞれの複合体の形成効率への影響を調べた。ゲルシフト法によるDrRad54とヌクレオソームとの相互作用解析を行なった結果、DrRad54とヌクレオソームのモル比が3:1以上の条件において、DrRad54・ヌクレオソーム複合体と考えられるバンドが検出された。さらに、ATPおよびATP非加水分解アナログ存在下におけるDrRad54とヌクレオソームとの相互作用を調べたところ、ATP存在下においてDrRad54とヌクレオソームとの相互作用が強くなることが分かった。これらの結果から、DrRad54がヌクレオソームと安定に結合するためには、ATPが必要であることが考えられた。

(2) 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安定性と構造の多様性に及ぼす影響を調べることを目的として、10種類のトリヌクレオチドリピート配列をそれぞれ含む147 bp DNAをデザイ

ンした。36 bpのリピート配列は、147 bp DNAの中でヌクレオソームの形成と安定性に最も影響すると考えられる中央の位置に導入した。この10種類のDNAをそれぞれ大量調製するために、平成28年度に確立したオリゴDNAを用いたOne-Pot反応系を使用した。調製したDNAはそれぞれリコンビナントヒトヒストン（H3.1、H4、H2A、H2B）より再構成したヒストン八量体と混合し、塩透析法によるヌクレオソームの再構成を行なった。再構成したヌクレオソームは、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Prep Cell）により、高純度に精製した。

再構成したヌクレオソームの安定性を調べるために、蛍光分光光度計を用いた塩耐性試験を確立した。この方法では、ヒストン八量体の内部に位置するチロシン残基から発せられる蛍光を検出しており、塩濃度の上昇に伴い、147 bp DNAがヒストン八量体から外れて、蛍光強度が上昇する様子を測定する。10種類のトリヌクレオチドリピート配列をそれぞれ含むヌクレオソームについて塩耐性試験を行った結果、トリヌクレオチドリピート配列によって蛍光強度の上昇に違いが見られた。得られたデータから、それぞれのヌクレオソームの安定性について考察を行った。

(3) *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。本法は、従来のMNase法のみよりも精度が高く、正確にヌクレオソームの位置を決定することを可能にした (Fuse et al., *PLoS One* 2017)。この方法を用いて、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 (投稿論文準備中)。

(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、酵母遺伝学・分子生物学的手法に化学的アプローチを組み合わせ、全ヒストンの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H2A、H2B、H3、H4のDNA接触部位を予測し、それらをCys残基に置換した各ヒストンの変異株7種を作製した。また、各ヒストンのN末端またはC末端テールにもCys残基を導入した株の作製に成功した (投稿論文準備中)。現在、各ヒストンのさまざまなDNA結合部位を次世代シーケンサー (NGS) によって解析しているところである。これらの結果に基づいて、個々のヒストンの結合部位の全てについてゲノムアトラスの作成を進めている。

4. 研究の反省・考察

本研究は、全長Rad54とヌクレオソームとの相互作用を生化学的に解析し、それらの安定な相互作用に必要な条件を明らかにした。この情報は、今後Rad54とヌクレオソームとの複合体の立体構造解析を成功させるために、重要であると考えられる。また本研究では、様々なDNA配列を含むヌクレオソームを大量調製することに成功した。今後、ヌクレオソーム構造の多様性を明らかにする研究が進むことが期待される。*In vivo*の解析においては、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を用いた方法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。今後、*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 Yasuda, T., Kagawa, W., Ogi, T., Kato, T. A., Suzuki, T., Dohmae, N., Takizawa, K., Nakazawa, Y., Genet, M. D., Saotome, M., Hama, M., Konishi, T., Nakajima, N. I., Hazawa, M., Tomita, M., Koike, M., Noshiro, K., Tomiyama, K., Obara, C., Gotoh, T., Ui, A., Fujimori, A., Nakayama, F., Hanaoka, F., Sugasawa, K., Okayasu, R., Jeggo, P. A., Tajima, K. Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites.

PLoS Genet. 14, e100727. (査読あり)

- ② Fuse, T., Katsumata, K., Morohoshi, K., Mukai, Y., Ichikawa, Y., Kurumizaka, H., Yanagida, A., Urano, T., Kato, H., **Shimizu, M.** Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes *in vivo*. *PLoS One* 12, e0186974. (査読あり)

(2) 口頭発表

- ① **香川亘**、五月女美香、齋藤健吾、安田武嗣、杉山修正、胡桃坂仁志、ヒトRAD52が促進するDNAアニーリングの分子機構、第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会、蒲郡（愛知県）、2017年12月20日～22日
- ② 布施智博、勅使川原裕太、林俊樹、今井洸志、**香川亘**、胡桃坂仁志、浦野健、加藤太陽、**清水光弘**、ヌクレオソームDNA座標特異的切断法の開発、第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会、蒲郡（愛知県）、2017年12月20日～22日
- ③ **清水光弘** (依頼講演) 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の解析、平成29年度年度国立遺伝学研究所研究会「エピジェネティクスの基盤となるクロマチン・細胞核の動的構造変換」、三島（静岡県）、2017年10月26日～27日
- ④ **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、第5回 科研費 新学術領域 クロマチン動構造 班会議、留寿都（北海道）、2017年7月13日～15日
- ⑤ 五月女美香、齋藤健吾、安田武嗣、胡桃坂仁志、**香川亘**、相同組換えタンパク質RAD52とssDNAとの複合体のX線結晶構造解析、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台（宮城県）、2017年6月20日～22日
- ⑥ 讓原秀隆、相澤由有希、横山浩、近重裕次、原口徳子、平岡泰、胡桃坂仁志、**香川亘**、分裂酵母Bqt1-Bqt2複合体の大量調製と結晶化、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台（宮城県）、2017年6月20日～22日
- ⑦ 浦野一輝、堀越直樹、鯨井智也、田口裕之、胡桃坂仁志、**香川亘**、多様なヌクレオソーム構造を決定するためのX線結晶構造解析、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台（宮城県）、2017年6月20日～22日

(3) 出版物

なし

学 校 名	光産業創成大学院大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動いている生体分子1分子の高時間分解能蛍光検出 －一定常蛍光検出と蛍光寿命測定－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①1分子計測 ②高時間分解能蛍光検出 ③ナノバイオサイエンス ④生体分子の動態			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
横 田 浩 章	光産業創成大学院大学・ 光産業創成研究科	准 教 授	研究代表者 総括・実験・データ処理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 野 美 奈 子	光産業創成大学院大学・ 光産業創成研究科	講 師	実験・データ処理・論文作成
井 出 徹	岡山大学大学院・ 自然科学研究科	教 授	実験・論文作成
瀧 口 義 浩	光産業創成大学院大学・ 光産業創成研究科	教 授	実験・論文作成

動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出 — 一定常蛍光検出と蛍光寿命測定 —

1. 研究の目的

(1) 本研究の背景

生命科学の研究現場において生体分子を生きたままイメージングできる蛍光顕微鏡はなくてはならないツールとなっている。とりわけ、蛍光標識した生体分子 1 分子を実時間で直視できる蛍光 1 分子検出技術は、個々の生体分子の運動・相互作用・構造変化などのダイナミクスを集団平均することなく実時間で観察できる強力な蛍光顕微鏡法である。生体内で通常動き回って機能している生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出が、そのダイナミクスや関連する生命現象の生体分子間相互作用の機序を理解する上で重要であるにもかかわらず、光検出器の性能上の制約から、同一の動いている生体分子 1 分子の継続した高時間分解能蛍光検出の報告はない。蛍光 1 分子検出でよく使われる電子増倍型 CCD (EMCCD) は広視野観察ができるが時間分解能は数 ms に制限される。一方、それ以上の高時間分解能検出が可能であるアバランシエホトダイオード (APD) は受光面が小さいため広視野観察はできない。

そこで我々は広視野高時間分解能蛍光 1 分子検出が可能な HPD を用いて研究を行っている。HPD は APD と同等の高い時間分解能の特長をもちながら、CCD なみの広い受光面をもつ。HPD は光電子増倍管にまさる光検出器として高エネルギー物理学の研究用に開発されたため、生命科学の分野ではほとんど知られていない。

(2) 本研究の目的

本研究では、ハイブリッドホトディテクタ (HPD) と呼ばれる微弱光検出器を用いて生命機能で重要な役割を果たしている動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出を達成することを目的とした。この蛍光検出から対象とする生体分子の運動様式や構造変化を解き明かしたい。

① 本研究で対象とする蛍光検出技術

蛍光検出技術はその励起光の性質によって連続した励起光を用いる定常蛍光検出とパルス状の励起光を用いる時間分解蛍光検出に大別される。従来の蛍光 1 分子検出のほとんどは定常蛍光検出である。本研究では、時間分解蛍光測定光学系を構築し、蛍光寿命測定にも取り組む。研究期間である 3 年間で以下の系を構築する。

- ア 偏光 2 成分同時時間分解蛍光検出系
- イ 蛍光 2 色同時時間分解蛍光検出系

② 本研究で対象とする動く生体分子

- ア 2 次元自由拡散する脂質
- イ ミオシン上で滑走するアクチンフィラメント
- ウ DNA 上で運動する DNA 修復タンパク質

③ 本研究で用いる蛍光プローブ

- ア 蛍光色素
- イ 半導体超微粒子 (Qdot)
- ウ 蛍光ダイヤモンドナノ粒子

(3) 本研究から期待できる波及効果

本研究で行う動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出は、さまざまな生体分子への適用が想定できる。本研究は、蛍光 1 分子検出系の高度化と生体分子のダイナミクスの解明に貢献し、様々な病態の発現機構などの分子レベルでの理解に通じる。

2. 研究の計画

平成 29 年度は、定常蛍光検出の計測対象を脂質からタンパク質に広げる。また、Qdot や研究代表者が取り扱ってきた蛍光ダイヤモンドナノ粒子を生体分子に標識する蛍光プローブとして用い定常蛍光検出を行う。蛍光ダイヤモンドナノ粒子は、高い発光安定性をもち褪色やブリンキング (明滅) を起こさない。このため強い励起光で照射して長時間明るく観察できる。さらに、

時間分解蛍光検出の系の立ち上げに取り組む。

(1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出

①2次元自由拡散を行う脂質分子

本研究開始前に、我々は動いている脂質に標識したQdotの蛍光強度を、HPDを使って 0.1 msの高時間分解能で観察できることを実証し、ブリンキング（明滅）現象を詳細に解析している。そこで平成29年度は蛍光ダイヤモンドナノ粒子を表面修飾し脂質に標識し、その脂質を用いて同様の検出をし、さらなる時間分解能の向上をはかる。

②モータータンパク質ミオシン上を運動するアクチンフィラメント

モータータンパク質の一種であるアクチンフィラメントはガラス基板上に固定したミオシンとの相互作用によってATP存在下で滑り運動することが知られている。ここでは蛍光色素でまばらに標識したアクチンフィラメントを用いて滑り運動中の蛍光検出を行う。また蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したアクチンフィラメントで同様の蛍光検出を行う。

③DNA上で1次元拡散を行うDNA修復タンパク質

研究代表者は、蛍光色素やQdotで部位特異的に標識した大腸菌のDNA修復で損傷部位を切除するヘリカーゼUvrDなどのDNA修復タンパク質を用いて研究を行っている。ここではこれらDNA修復タンパク質の1本のDNA上での動きを蛍光検出する。蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したDNA修復タンパク質についても同様の蛍光検出を行う。

(2) 時間分解蛍光検出系の構築

時間分解蛍光検出に使う励起パルス光は、学内共同利用施設に設置している大出力フェムト秒レーザー（7 mJ・800 nm・1 kHz）を用いて取り出す。

3. 研究の成果

(1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出

①2次元自由拡散を行う脂質分子

蛍光ダイヤモンドナノ粒子を表面修飾し、ビオチン-アビジン系を利用して脂質の蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識を行った。そして、HPDによるサブmsの蛍光1分子強度検出とEMCCD（時間分解能33 ms）による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った。

②モータータンパク質ミオシン上を運動するアクチンフィラメント

蛍光色素、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で蛍光標識を行った。そして、蛍光色素でまばらに標識したアクチンフィラメントを用いて滑り運動中の蛍光検出を行った。また、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したアクチンフィラメントのミオシン上での滑り運動の蛍光検出も行った。

③DNA上で1次元拡散を行うDNA修復タンパク質

UvrDについて蛍光色素、Qdot、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で蛍光標識を行った。蛍光ダイヤモンドナノ粒子による標識については、直径100nmおよび20nmのストレプトアビジンPEGコート蛍光ダイヤモンドナノ粒子をヘリカーゼUvrDに標識した。標識に用いた直径100nmの蛍光ダイヤモンドナノ粒子の1つを調べてみたところ、UvrDに特異的に蛍光標識した色素の褪色段階数の解析から、複数（4分子）のUvrDが結合していることがわかった。

(2) 時間分解蛍光検出系の構築

時間分解蛍光検出に使うパルスレーザー（515nm・繰り返し周波数最大 100 MHz）と、時間相関単一光子計数モジュールを、それぞれ顕微鏡と計測用 PC に導入した。当初計画していた大出力フェムト秒レーザーを用いたパルス光の取り出しは断念した。繰り返し周波数が低く、パルス光の取り出しが煩雑であり、1 パルスあたりのエネルギーが大きすぎることから、本研究で行う蛍光寿命測定に適さないと判断したためである。

(3) 生体分子 1 分子の時間分解蛍光検出

当初は平成 30 年度に計画していた生体分子 1 分子の時間分解蛍光検出に着手した。

①2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光寿命測定（図1）

Qdot標識した脂質について、HPDによる蛍光寿命測定とEMCCD（時間分解能33 ms）による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った。我々が知る限り動いている蛍光分子1分子の蛍光寿命を計測した初めての例である。

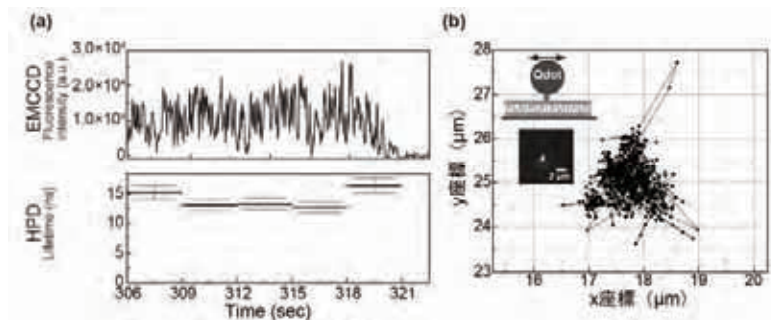


図 1: 平面上を 2 次元自由拡散する Qdot 標識脂質分子の蛍光寿命測定 (3 秒ごと・320 秒付近で視野外に移動). (a) 上: 蛍光強度変化 (EMCCD). 下: 蛍光寿命の時間経過 (HPD). (b) 軌跡.

② 蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命測定

基板に固定した蛍光ダイヤモンドナノ粒子 (直径100 nm) について、HPDによる蛍光寿命測定とEMCCD (時間分解能33 ms) によるイメージングの同時観察を行った。我々が知る限り蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命を計測した初めての例である。

4. 研究の反省・考察

(1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出

① 2次元自由拡散を行う脂質分子

脂質はタンパク質と異なり活性を気にする必要がないので、比較的スムーズに計画通りの研究を遂行することができた。ただ、ガラス基板表面への蛍光プローブの非特異吸着があり、蛍光検出の妨げになった。今後はPEG修飾したガラス基板などを用いて、この非特異吸着を抑制し、より効率的な蛍光検出ができるようにしたい。

② モータータンパク質ミオシン上を運動するアクチンフィラメント

蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識したアクチンフィラメントの運動を観察することができたが、アクチンフィラメントに標識した蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光検出には至っていない。蛍光ダイヤモンドナノ粒子のアクチンフィラメントへの標識率を上げ、より効率的な蛍光検出ができるようにしたい。

③ DNA上で1次元拡散を行うDNA修復タンパク質

蛍光ダイヤモンドナノ粒子でDNA修復タンパク質を標識はできたが、まだそのDNA結合活性は確認していない。DNA結合活性がある標識したDNA修復タンパク質のみをアフィニティカラムなどで単離する必要性が出てくるかもしれないと考えている。

(2) 時間分解蛍光検出系の構築

当初計画していた大出力フェムト秒レーザー (7 mJ・800 nm・1 kHz) を用いたパルス光の取り出しを断念し、より小型で顕微鏡に導入が容易なパルスレーザーを用いたことで、時間分空き蛍光検出系の構築を加速し完了させることができた。将来的には、より高出力のパルスレーザーを導入して、単位時間あたりの蛍光の光子数を増やし、より高時間分解能の検出ができるようにしたい。

(3) 生体分子 1 分子の時間分解蛍光検出

① 2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光寿命測定

動いている生体分子1分子の蛍光寿命の時間経過検出の原理検証実験に成功した。今後は背景光を下げるなどして、より高精度な蛍光検出をめざす。また、蛍光寿命測定が有効な生体分子局所領域での環境変化検出に応用したい。

② 蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命測定

今後は動いている生体分子1分子に標識した蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命の時間経過をとらえる予定である。また、蛍光寿命測定が有効な生体分子局所領域での環境変化検出に応用したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ①横田浩章：生体分子1分子の蛍光イメージング～1分子直視と高精度化～. 第14回バイオオプティクス研究会, 北海道大学(札幌市), 2017年9月. (招待講演)
- ②Yokota, H.: Single-molecule imaging and manipulation. 浙江大学研究交流会, 浜松ホトニクスシステム中央研究所(浜松市), 2017年8月. (招待講演)
- ③横田浩章：過渡的に形成されるDNA結合タンパク質多量体の動的構造の蛍光1分子イメージング. 科研費・新学術領域「動的構造生命」第3回班会議, ザ・ルイガンズ(福岡市), 2017年6月.
- ④横田浩章：最新型微弱光検出器による生体分子1分子の高時間分解能蛍光検出. 東海産業技術振興財団第29回研究助成金交付決定通知書伝達式, ホテルアークリッシュ豊橋(愛知県豊橋市), 2017年4月. (招待講演)

(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」 －タンパク質の離合集散の圧力応答研究－		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、解析、論文作成
寺 内 一 姫	生 命 科 学 部	教 授	実験、解析、論文作成
北 沢 創 一 郎	薬 学 部	助 教	実験、解析
吉 澤 拓 也	生 命 科 学 部	助 教	実験、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) 生命の圧力応答に関する研究は、温度や他の環境因子に比べ圧倒的に不足している。本課題では、生命現象の圧力に対する応答を解明し、「圧力生命科学」という特徴ある学術領域を発展させる。とりわけ、「生物リズム」の圧力研究から、他の環境因子の研究では得られない新しい情報を収集する。シアノバクテリアの Kai タンパク質群が織りなす概日周期のメカニズムを解明する。

① 周期長の圧力依存性を解明する。

② KaiCのATPase活性の圧力依存性を解明する

(2) 圧力はタンパク質の多様なコンフォメーションを探索するための優れた環境因子である。溶液 NMR 測定、X 線結晶構造解析の手法と組み合わせることにより、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の FtsZ についてコンフォメーション選択的医薬品開発を実践する。

① FtsZについて立体構造の多型性をX線結晶構造解析により解明する。

② 抗菌阻害薬の候補化合物とFtsZの複合体構造を解明する。

2. 研究の計画

(1) シアノバクテリア KaiC の野生型に加え、周期長が異なる変異体についても研究を展開し、周期長に関わる立体構造変化を突き止める。

① 高圧蛍光法を用いて概日周期の周期長の圧力依存性を調べる。

② KaiCのATPase活性の圧力依存性を調べる。酵素活性の圧力効果から、活性化体積を求める。

(2) 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 の圧力応答研究する。

① FtsZ-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生理条件下では僅かにしか存在しない不安定なコンフォメーション (高エネルギー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。

② NMR法 (常圧、高圧)、蛍光法を用いて、FtsZの構造多型性を解明する。(FtsZのコンフォメーション平衡の圧力依存性に基づいて、1~7000気圧までの範囲で、FtsZの結晶化を行う。

3. 研究の成果

(1) 概日周期のメカニズムに関する研究

① 高圧蛍光法を用いて、野生型KaiCのリン酸化周期に伴う蛍光強度の周期的な変化を測定した。各圧力における周期長測定を複数回行い精度を高めた (9thIMBP 口頭発表)。

KaiA, KaiB, KaiCの高圧力下の蛍光スペクトル測定を行った。

② KaiC野生型およびその変異体 (A251V, R393Cなど) についてATPase活性の圧力依存性を調べた。KaiC野生型については、活性化体積を求めた。

(2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の FtsZ についてコンフォメーション選択的医薬品開発に関する研究

① 新規阻害剤が構造選択的にMRSA FtsZに結合し、その構造のやわらかさによって薬剤耐性菌にも効果を示すという、新たな知見を得た (*ACS Chem. Biol.*, 2017、2017年7月プレスリリース、京都新聞掲載)。

② 細胞分裂タンパク質FtsZの異なる立体構造の存在を初めて明らかにし (*J. Struct. Biol.*, 2017)、FtsZの構造変換が膜分裂の駆動力となる可能性を示した。

③ トリプトファンを導入したFtsZ変異体を作成し、高圧蛍光測定を行った。スペクトル変化から、会合状態や立体構造の圧力依存性を調べた。

4. 研究の反省・考察

(1) 概日周期のメカニズムに関する研究

- ①周期長測定には、KaiA, KaiB, KaiCの全てが十分な活性を示す必要がある。精製後の品質についてはゲルろ過クロマトグラフィーにより評価しているが、周期を示さない場合があった。精製したそれぞれのタンパク質について活性評価、周期長測定を行い、品質を把握する必要がある。
 - ②KaiCのATPase活性においては、活性を k_{cat} により評価した。1回の高圧活性測定で必要なタンパク質量が多く、実験回数が限られた。より経済的でより再現性の高い k_{cat} を得るために、高圧力実験方法やタンパク質の精製手法の検討が必要である。
- ### (2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の FtsZ についてコンフォメーション選択的医薬品開発に関する研究

- ①新規阻害剤が構造選択的にMRSA FtsZに結合すること、また細胞分裂タンパク質FtsZの異なる立体構造の存在の発見という新たな知見を得た。この成果をもとに、高圧下でのタンパク質を結晶化する手法（高圧結晶成長法）の開発を行っているが、結晶が得られているものの、圧力実験の特徴を生かした技術の確立には至っていないため、今後の検討課題である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Junso Fujita, Ryuhei Harada*, Yoko Maeda, Yuki Saito, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Yasuteru Shigeta, Hiroyoshi Matsumura*, Identification of the key interactions in structural transition pathway of FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *J. Struct. Biol.*, 198(2), 65-73 (2017).
- ②Junso Fujita, Yoko Maeda, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Malvika Kaul, Ajit K. Parhi, Edmond J. LaVoie, Daniel S. Pilch*, Hiroyoshi Matsumura*, Structural flexibility of an inhibitor overcomes drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ, *ACS Chem. Biol.*, 12(7), 1947-1955 (2017).
- ③寺内一姫, 大山克明, 浅井智広, ブルーネイティブ電気泳動による時計タンパク質 KaiCの動的構造解析, 電気泳動 61, 107-110 (2017).
- ④Katsuaki Oyama, Chihiro Azai, Jun Matsuyama, and Kazuki Terauchi*, Phosphorylation at Thr432 induces structural destabilization of the CII ring in the circadian oscillator KaiC. *FEBS Lett.*, 592(1), 36-45 (2018).

(2) 口頭発表

- ①藤田純三, 原田隆平, 杉山翔吾, 吉澤拓也, 溝端栄一, 井上豪, 内橋貴之, 重田育照, ○松村浩由, 細菌の細胞分裂タンパク質の動的秩序解析, 平成29年度日本蛋白質科学会年会, 2017年6月22日(木), 仙台国際センター, 仙台市
- ②○松村浩由, 細胞分裂タンパク質の構造研究, 大阪大学蛋白質研究所セミナー SPring-8先端利用技術ワークショップ 「SPring-8における蛋白質構造生物学研究の現状と将来」, 2017年8月3日(木), 大阪大学蛋白質研究所, 大阪市
- ③Katsuaki Oyama, Takahiro Kawamura, Megumi Fujimoto, Takuro Wakamoto, Soichiro Kitazawa, Kazuki Terauchi, ○Ryo Kitahara, Pressure shortens an oscillatory period of the cyanobacterial circadian clock, The 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure, 2017年8月21日, 青蓮会館, 京都市
- ④○寺内一姫, ブルーネイティブ電気泳動による時計タンパク質KaiCの動的構造解析, 第68回日本電気泳動学会総会シンポジウム, 2017年11月25日, 広島大学広仁会館, 広島市
- ⑤○寺内一姫, 時計タンパク質KaiCの探究, 藍藻の分子生物学2017, 2017年12月1日, かずさアカデミアホール

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 北 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	睡眠覚醒リズムを持つヒトiPS細胞由来神経ネットワークの創生 －生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築－		研究分野 工 学
キ ー ワ ー ド	①ヒトiPS細胞由来ニューロン ②睡眠 ③覚醒 ④概日リズム ⑤生体脳モデル ⑥新規薬効評価系		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 郁 郎	工 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
辛 島 彰 洋	工 学 部	准 教 授	データ解析

睡眠覚醒リズムを持つヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの創生 — 生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築 —

1. 研究の目的

我々はヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を長期間モニタリングできる機能評価技術を開発し、薬剤応答性を見出すとともに、開発技術を用いた医薬品の開発および安全性・毒性評価法への展開を目指している。本研究では、開発した評価系の薬効評価精度を更に向上させるために、培養細胞であるヒト iPS 細胞由来ニューロンに生体脳で見られる現象である睡眠・覚醒状態を惹起させ、そのメカニズムを検証するとともに、生体概日リズムを模倣したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの新規薬効評価系を構築することを目的とする。

2. 研究の計画

生体脳の睡眠において、脳幹のアミンニューロン（ノルアドレナリン・ヒスタミン・セロトニン）やコリンニューロンが睡眠-覚醒状態を制御していること、睡眠-覚醒状態依存的に大脳皮質内アミン・コリン濃度が変化することが明らかとされている。初年度は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンに睡眠-覚醒のリズムを惹起するために、(1) 脳内物質であるアミン、コリン濃度を 12 時間周期で変化させる「液性因子刺激」と、(2) 1 Hz の「電気刺激」によりノンレム 睡眠時の「徐波」を模倣して概日リズムを惹起させる方法について検討した。

3. 研究の成果

(1) 液性因子刺激による睡眠-覚醒リズムの惹起

① 神経伝達物質投与による自発活動の変化

平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来大脳皮質ネットワーク (Xcell 社)、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (CDI 社)、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (Axol 社) を培養し、神経伝達物質であるセロトニン、ヒスタミン、アセチルコリン、オレキシン、ノルアドレナリンの用量依存的な自発活動変化を調べた。CDI 社のヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンにおいて、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、オレキシン、ノルアドレナリン投与で、用量依存的に同期バースト発火の個数が増大する神経ネットワークの興奮応答が認められた。このことから、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (CDI) は、各種受容体を有し、電気生理学的な機能を示すことが確かめられ、その後の実験において、CDI 社の細胞を主に用いることとした。

② 長期計測の評価

ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動における概日リズムを培地交換なしで安定的に評価できるかを検討した。培養 18~21 日目、培養 34~37 日目に自発活動を培地交換なしで 72 時間連続計測した。培養 18~21 日目では、時間経過に伴い発火数が増加していることがわかり、培養 34~37 日目では計測 30 時間後から徐々に発火頻度が減少し、72 時間後には発火数が 20% まで減少した。培養 18 日目は神経ネットワークの成長期であるため、計測期間中に発火数が増加することが明らかとなり、培養 34 日目の成熟した神経ネットワークでは、培地交換後の発火数は安定しているものの、培地成分の消費により、30 時間後から発火数が減少してしまうことがわかった。次に、培養 1 か月以上のサンプルに対して、12 時間毎に培地交換をしたところ、自発活動の頻度が保たれることがわかった。これらの結果により、神経伝達物質投与による概日リズムの惹起を検証する実験において、12 時間毎に培地交換することとした。

③ セロトニン投与による概日リズムの惹起

同期バースト発火の増加が顕著に見られたセロトニンを用いて、培地のみでの計測を 12 時間、セロトニン 100nM を投与した計測を 12 時間、これらを交互に行い 72 時間の計測を行った。セロトニン投与後には、同期バースト発火数が増大し、6 時間程度顕著な増加が観察された。3 回のセロトニン投与で繰り返し同様の増加が観察され、培地のみの場合は見られなかった。これらの結果により、セロトニンの周期的な投与により覚醒期

を模倣した概日リズムの惹起に成功したと言える。

④ステロイド投与による概日リズムの惹起

脳スライスの実験で、ステロイドを投与するとPeal遺伝子の発現がリセットされ、同調した概日リズムが遺伝子レベルで見られるとの報告がある。この方法をヒトiPS細胞由来ニューロンに適応できれば、自発的な概日リズムを形成させることができると考え、デキサメタゾン100nMを12時間投与し、投与前48時間と投与後48時間のリズム変化を調べた。しかしながら、CDI社およびAxol社のヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンどちらにおいてもステロイド暴露前後で変化は見られなかった。

(2)電気刺激による睡眠-覚醒リズムの惹起

ノンレム睡眠のうち、最初の15分は周波数の低い成分(1Hz)の脳波が中心となる。この睡眠は徐波睡眠と言われる。徐波睡眠時の状態を模倣するために、ヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンに徐波の周期を模倣する電気刺激を行い、自発活動の変化を調べた。具体的には、自発活動を3時間計測後、1Hzの電気刺激を15分間行い、その後75分間の自発活動計測を4セット行った。セロトニン100nMを暴露した状態でも同様の電気刺激を行い、応答性の違いを調べた。CDI社およびAxol社のヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンどちらにおいても、電気刺激前後で発火数や同期バースト発火頻度の減少などの顕著な変化は見られなかった。刺激条件および解析法の検討が示唆された。

4. 研究の反省・考察

- (1)概日リズムで変化する5種類の神経伝達物質に対して、ヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンは同期バーストが増加する興奮作用を示した。セロトニンの周期的な投与により、同期バーストが増減する概日リズムモデルを惹起することができた。神経伝達物質の組み合わせによる効果の検証は今後の課題である。ステロイド暴露によるリズムの変化は見られなかったため、遺伝子発現リズムの同調確認および暴露濃度の検討が必要である。また、リズム変化を検出するための解析パラメータの検討は必須であると考えている。
- (2)電気刺激によって惹起する方法については、刺激入力電流値、刺激電極数の検討および1Hz刺激の追従性などを検討する必要がある。また、ノンレム睡眠時のスピンドル波を模倣する14Hz刺激などの刺激周波数を検討する必要がある。液性因子刺激と同様、電気刺激前後の自発活動パターンの違いを見出す解析パラメータを検討する必要がある。

5. 研究発表

(1)学会誌等

(2)口頭発表

- ①岡部美穂, 小田原あおい, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, *in vitro*ヒトiPSC由来中枢神経ネットワークに睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 平成29年 電気学会電子・情報・システム部門大会, 2017年9月
- ②岡部美穂, 石橋勇人, 奥山夏輝, 松田直毅, 小田原あおい, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, 培養ヒトiPS細胞由来中枢神経ネットワークに睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 第33回ライフサポート学会大会, 2017年8月
- ③岡部美穂, 石橋勇人, 奥山夏輝, 松田直毅, 小田原あおい, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, ヒトiPS細胞由来中枢神経ネットワークに概日リズムを惹起させる為の基礎検討, 平成30年東北地区若手研究者研究発表会, 2018年3月

(3)出版物

鈴木郁郎, “ヒトiPS細胞由来神経細胞の機能評価と創薬応用”, 創薬のための細胞利用技術の最新動向と市場, 第II編 創薬・新薬への応用, 第2章 薬剤安全性評価への応用, シーエムシー・リサーチ, P222-229, 2018

学 校 名	青 山 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①高温超伝導体 ②微細加工 ③生体高分子検出 ④固有ジョセフソン効果			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 野 晴 久	理 工 学 部	教 授	研究代表者総括、素子の設計・実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 井 敏 之	理 工 学 部	教 授	実験方法の検討

層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用

1. 研究の目的

- (1) 本研究では、液体窒素温度 (77 K) を超える高い超伝導転移温度により、動作温度の飛躍的増大が期待される $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_y$ (以下 Bi2212 と略記) 銅酸化物超伝導体を用いた生体高分子の検出方法を研究する。特に、この物質の特徴である超伝導層と絶縁体層が交互に積層する結晶構造に起因する固有ジョセフソン効果 (超伝導状態で発現する量子トンネル効果が結晶内部で自発的に発現する効果) に着目し、単結晶試料への3次元(3D)微細加工技術およびイオン衝突により発生する格子振動 (フォノン) が固有ジョセフソン接合と強く相互作用する特性を組み合わせた、従来にない新しい検出原理を探求し、層状超伝導体を用いた高分子検出の道を拓く。基本原理の検証までを3年間の研究目標とし、具体的目標を以下に挙げる。
 - ①フォノンとの相互作用効果が現れやすい3D微細構造の決定
 - ②固有ジョセフソン接合素子を用いたフォノン検出の原理検証実験の実施
- (2) 上記の固有ジョセフソン接合素子との組み合わせや上記以外の検出原理の可能性を追求するために、Bi2212単結晶の良好なへき開性を用いて作製される単結晶薄膜を微細加工し、飛行時間型質量分析法に従来から用いられている超伝導ストリップ線路型イオン検出器と類似のストリップ線路構造を作製する。スプリット線路素子と固有ジョセフソン接合素子の特性比較や組み合わせを検討することにより、上記以外の検出原理も含めた新しい生体高分子イオン検出技術の可能性を探る。

2. 研究の計画

- (1) 3D微細加工を駆使した固有ジョセフソン接合素子の作製と3D形状観察
 - ①本研究代表者が所属する理工学部の共同利用設備である集束イオンビーム(FIB)加工装置と研究室現有のアルゴン(Ar)イオン照射装置を用い、微小ブリッジの側面部に2つのスリットを設けた3D微細構造を有するBi2212系固有ジョセフソン接合素子を作製する。
 - ②加工後の3D形状をFIB装置に付属する走査イオン顕微鏡(SIM)と共同利用設備である走査電子顕微鏡(SEM)、および本研究予算で導入するデジタル顕微鏡を用いて観察する。デジタル顕微鏡は、SIMやSEM観察時の電荷蓄積効果によりBi2212単結晶部分と絶縁体基板部分の境界観察が困難になる問題点を回避し、FIB未加工部分の検出精度を高めるために用いる。
 - ③透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてFIB加工に伴う加工断面部のダメージを調べる。
 - ④作製した固有ジョセフソン接合素子の電気抵抗特性および電流電圧特性を測定し、フォノンとの相互作用に起因する電流電圧特性の微細構造について検証する。
- (2) スプリット線路素子作製に向けたBi2212単結晶薄膜の微細加工
 - ①Bi2212単結晶の良好なへき開性を利用して、良質かつ大面積のBi2212単結晶薄膜を作製し、FIBまたはArイオン照射を用いてスプリット線路構造を作製する。
 - ②これまでの研究から、膜厚の減少に伴い、低温実験時に微細加工部が断裂する事故が増えることが分かっている。これは、薄膜試料部を基板に固定する際に用いる絶縁性樹脂の熱硬化工程で発生する微小気泡の影響と考えられるため、デジタル顕微鏡を用いて微小気泡の発生を抑制する熱硬化条件を探る。
 - ③得られたBi2212薄膜に対して、光リソグラフィによるフォトマスク形成とArイオン照射を用いて微細加工を試み、スプリット線路構造を作製する。
- (3) 生体高分子イオンの検出原理の検証に向けた実験方法の検討
 - ①作製した素子を用いて生体高分子イオンの検出実験を行うには、通常、ソフトレーザー脱離法を用いて高分子イオンを作製するための真空チャンバーとレーザー光源を整備する必要がある。現有装置ではスパッタ法による超伝導薄膜の作製用とArイオン照射用の真空チャンバーがあるが、レーザー光源はなく、本研究で予定する3年間の研究期間では間に合わない可能性も考えられる。このため、別な検証方法として、高分子イオンの衝突時と類似の振動刺激を固有ジョセフソン接合素子に加えた場合の応答から検

出原理を検証する方法を検討する。

3. 研究の成果

- (1) Bi2212 単結晶の 3 次元微細加工により作製される固有ジョセフソン接合素子において、FIB 加工時のダメージを TEM 観察から評価した結果、加工表面から少なくとも 30nm の領域が照射ダメージで非晶質化すること、および FIB で用いられる Ga イオンビームとは別の Ar イオンビーム照射によって非晶質領域が除去できること、さらに FIB 加工後の Ar イオン照射の追加工により、固有ジョセフソン接合素子の電流電圧特性におけるスイッチング電流密度が増大することを見出した。
- (2) スプリット線路素子の作製に向け、Bi2212 単結晶の良好なへき開性と粘着テープ剥離法を用いて Bi2212 単結晶薄膜を作製した。粘着テープによる薄膜剥離の成否が、単結晶試料を石英基板に固定する際に用いる絶縁性樹脂に混入する微小気泡に影響されること見出し、デジタル顕微鏡を用いて微小気泡の生成条件を探索した。その結果、真空容器中での絶縁性樹脂の脱泡処理が薄膜試料の大面积化に有効であることを見出し、Ar イオンビーム照射によるストリップ線路（線幅 $20\mu\text{m}$ 、厚さ $0.3\text{--}0.4\mu\text{m}$ ）の試作に成功した。
- (3) 生体高分子イオンの検出原理検証に向けた実験方法について、従来の手法では実験環境の整備のため、3 年間の研究期間では間に合わない事態も想定されるため、別手段として、高分子イオンの衝突時と類似の機械的振動刺激を素子に加える手法を検討した。分担者の三井が成功した鶏胚から取り出した心臓組織片へ機械的振動刺激を加える実験を参考に、ピエゾステージまたはバイモルフ型振動子に連結させた微小な針を外部信号によって駆動させ、その応答を調べるための実験インサートの設計に着手した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 上記した研究成果の(1)および(2)についてはほぼ予定通りであるが、本研究の具体的目標の2つ目として挙げた、イオン衝突に伴うフォノン検出の原理検証実験については、現有の装置環境で実施するのはかなり困難との見通しを得て、別な検証方法を検討するに至った。
- (2) 2017年11月に参加した超伝導の「渦糸物理国内会議」で別の超伝導体 MgB_2 薄膜で生体高分子イオン検出を目指す産総研グループの研究者（全伸幸氏）と議論する機会を得た。素子の完成後に従来の方法でイオン衝突実験を共同で実施する可能性を打診し、共同実験の実施に前向きな感触を得たが、まずは自分たちで検証できる方法を再検討し、上記研究成果の(3)で述べた新しい検証方法の着想を得た。これにより、本格的な衝突実験に必要な素子構造の最適化や測定分解能に関する情報が得られると期待される。
- (3) 以上より、現時点での達成度は計画をやや上回っていると判断される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Y. Kakizaki, J. Koyama, A. Yamaguchi, S. Umegai, S. Ayukawa, H. Kitano, “Transmission electron microscopy study of focused ion beam damage in small intrinsic Josephson junctions of single crystalline $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_y$ ”, Japanese Journal of Applied Physics, **56**, 043101 (2017).
- ② S. Umegai, A. Yamaguchi, Y. Kakizaki, D. Kakehi, H. Kitano, “Fabrications of Small and High-quality Intrinsic Josephson Junctions by Combinatorial Method of Ar-ion and Focused Ga-ion Etchings”, Journal of Physics: Conference Series (in press).

学 校 名	東 京 理 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①再生医療 ②軟骨 ③分化 ④細胞足場 ⑤間葉系幹細胞 ⑥相互侵入高分子網目ゲル ⑦ペプチド ⑧キトサン			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 塚 英 典	理 学 部 第 一 部	教 授	高分子設計、細胞機能の評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
橋 詰 峰 雄	工 学 部	教 授	細胞機能の評価、材料物性評価
松 隈 大 輔	理 学 部 第 一 部	平成29年2月 28 日 退 職	
飯 島 一 智	工 学 部	助 教	遺伝子発現解析、免疫染色

新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生

1. 研究の目的

(1) 背景

加齢に伴う軟骨の磨耗により膝関節の炎症・変形が引き起こされる変形性膝関節症は超高齢社会を迎えた我が国における最重要課題の一つである。現在は人工関節への置換が広く行われ、本邦の市場規模は 1000 億円にも上るが、約 9 割を海外に依存しているのが現状である。人工関節は、置換手術後の QOL の低下や 10 年～20 年で再置換の手術が必要となるなどの問題がある。本研究の目標は、人工関節に替わる自律再生軟骨の開発であり、これにより海外品シェアを国産再生組織製品に移行でき、大きな社会・経済効果が期待される。組織再生を目指した細胞移植において、一般に細胞は細胞足場材料とともに患部へ移植されるが、細胞足場材料に求められる機能は対象とする組織により異なる。関節軟骨においては、高い治療効果を得るために線維軟骨化を抑制し、耐摩耗性に優れた本来の硝子軟骨として修復・再生させることが重要であり、細胞の分化状態の制御・維持機能が求められる。さらに、膝関節軟骨では移植部位に対して常に大きな負荷がかかるため、十分な力学的強度も必要とされる。

申請者らは天然由来多糖のキトサン (CHI) と生体適合性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) からなる化学架橋ネットワークと自己会合性ペプチド RADA16 (Ac-RADARADARADARADA-CONH₂) からなる物理架橋ネットワークにより構造化した、相互侵入高分子網目 (IPN) 型ゲルを開発した。化学架橋ネットワークが十分な力学的強度を、物理架橋ネットワークが細胞外マトリックスの構造を模倣することで播種された細胞の高機能化に寄与する。CHI/PEG/RADA16 IPN ゲル内に軟骨細胞を播種し培養すると、CHI/PEG ゲルや軟骨移植用足場材料として臨床応用されているアテロコラーゲンゲルと比べて高いグリコサミノグリカン (GAG) 産生と細胞増殖性を示した。さらに、ヒト軟骨細胞を IPN ゲルとともにマウスへ移植すると、炎症反応はほとんどみられず、アテロコラーゲンゲルと比較してより良好な GAG などの軟骨基質の蓄積がみられ、本 IPN ゲルの軟骨再生用足場材料としての有効性が示された。

一方、近年、再生医療における細胞ソースとして体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞が注目を集めている。間葉系幹細胞は患者本人の骨髄液や脂肪組織などから低侵襲に採取し生体外で増幅することができる。間葉系幹細胞は軟骨や骨、脂肪、心筋など間葉系に属する種々の細胞に分化することができ、軟骨再生においては軟骨底部の骨組織との連続的な再生も可能になると期待される。間葉系幹細胞を用いた組織再生は広く検討されているが、軟骨に関しては硝子軟骨への選択的分化手法が未だ確立されておらず、膝関節軟骨再生の大きな障壁となっていた。

(2) 目的

成熟軟骨細胞の優れた足場材料である CHI/PEG/RADA16 IPN ゲルは間葉系幹細胞からの軟骨再生における足場材料としても有効であると考えた。本研究では、IPN ゲルを用いた間葉系幹細胞による軟骨再生法の開発を目指す。まず、IPN ゲル内における間葉系幹細胞の軟骨分化挙動を解析し、IPN ゲル中で間葉系幹細胞から誘導された軟骨組織の評価を行う。さらに、IPN ゲル内における間葉系幹細胞の軟骨分化機序を明らかにするとともに、IPN ゲルへの軟骨分化誘導因子の担持や分解ドメインの導入による分解性の付与など IPN ゲルの高機能化とそれが軟骨分化に与える影響について評価し、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発へと展開する。

2. 研究の計画

(1) IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織の評価

これまでの軟骨マーカー遺伝子発現解析より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨は硝子軟骨と推測される。凍結切片の免疫化学染色により、その組織構造と軟骨基質の蓄積について評価する。具体的には軟骨分化誘導後のゲルより薄切片を作製し、

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色より組織構造について評価するとともに、アルシアンブルー染色によりグリコサミノグリカンを、免疫染色により I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンをそれぞれ検出する。また、間葉系幹細胞から軟骨への分化に伴う軟骨基質の産生により IPN ゲルの力学特性が変化すると推測される。そこでレオメーターを用いて軟骨分化に伴う弾性率の変化についても解析する。

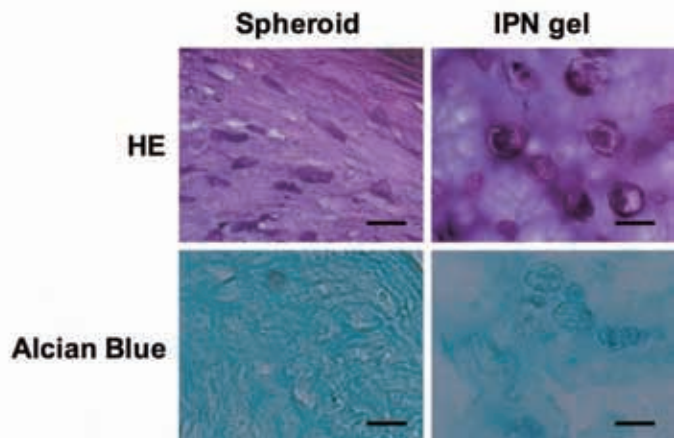
(2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞の軟骨分化特性の解析

間葉系幹細胞は骨髄のみならず脂肪組織中にも存在し、低侵襲かつ大量に採取可能であることから、脂肪組織由来間葉系幹細胞は移植用間葉系幹細胞ソースとして重要である。一方で間葉系幹細胞はその由来により分化特性が異なることも報告されている。そこで、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いて IPN ゲル中での軟骨分化について、軟骨分化マーカー遺伝子の発現解析とグリコサミノグリカン産生の定量により評価し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞との比較を行う。

3. 研究の成果

(1) IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織の評価

遺伝子発現解析より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨は硝子軟骨と推測されていた。本年は化学染色によりその組織構造と軟骨基質の蓄積について評価を行なった。軟骨分化誘導後のゲルより薄切片を作製し、HE 染色より組織構造について評価するとともに、アルシアンブルー染色によりグリコサミノグリカンを検出した。結果、スフェロイドによる軟骨組織が線維軟骨様の構造であったのに対し、IPN ゲル中において軟骨小腔様の構造と周囲への GAG や II 型コラーゲンなど軟骨基質の蓄積が観察された (図 1)。以上より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織は関節軟骨本来の硝子軟骨でと考えられ、スフェロイド培養に対する優位性が示された。



(2) 分解性 IPN ゲルの作製と軟骨細胞への効果

IPN ゲルは軟骨再生に伴って分解・吸収され、最終的には間葉系幹細胞より分化した軟骨細胞によって産生された軟骨基質と完全に置換されることが望ましい。本年は、分解ドメインとして乳酸を導入した PEG (図 2A) を合成し、それより IPN ゲルを作製した。ゲル単体での評価において非分解性ゲルと比較して大きな重量減少が見られ、分解ドメインの導入の効果が確認された (図 2B)。

図 1 軟骨分化培地にて 30 日培養後のスフェロイド培養および IPN ゲルの HE 染色組織学的像。スケールバー：20μm

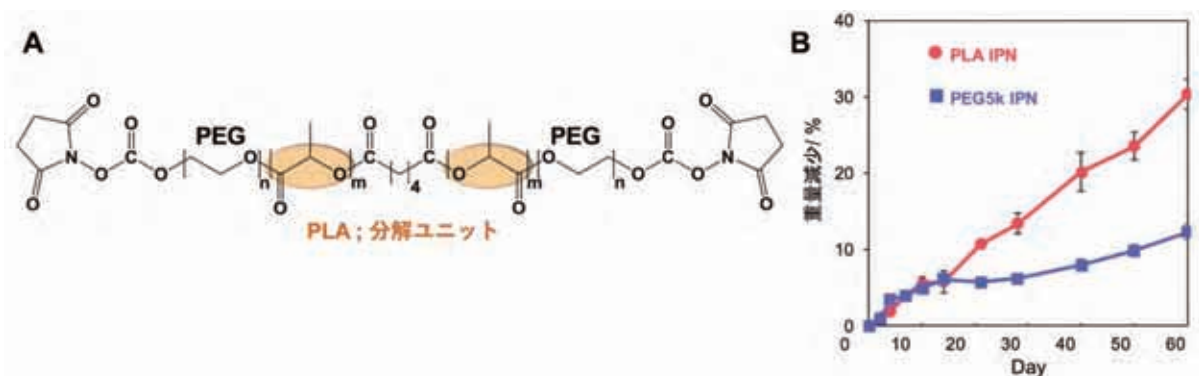


図 2 (A)ポリ乳酸 (PLA) 分解ユニットを導入した PEG の化学構造, (B) PEG および分解ユニット導入 PEG を用いて作製した IPN ゲルの分解挙動

(3) IPN ゲル中への分化誘導因子の担持

IPN ゲル中にインスリン様成長因子 (IGF-1) や線維芽細胞増殖因子 (FGF)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) など軟骨分化誘導に関連する増殖因子を安定に担持させることで、培地中への添加と比較してより高効率に軟骨への分化を誘導することができると期待される。本年はゲル形成時に混合する方法にて IPN ゲル中への IGF-1 の担持を検討し、IPN ゲルおよび分解性 IPN ゲル中に IGF-1 が担持されること、ゲルの分解に伴って放出されることが明らかとなった (図 3)。

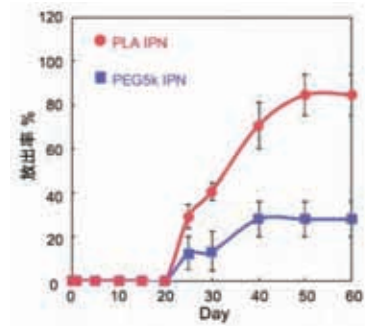


図 3 PEG および分解ユニット導入 PEG を用いて作製した IPN ゲルからの IGF-1 の放出挙動

(4) 分解性の付与と分化誘導因子の担持が関節軟骨細胞へ与える影響の解析

(2), (3) で示したゲルへの分解性の付与と IGF-1 の担持について、予備検討としてウシ関節軟骨細胞への影響を解析した。IGF-1 担持 IPN ゲル中においてグリコサミノグリカン (GAG) 産生の向上がみられ (図 4)、IGF-1 の担持およびゲル内細胞への効果が示された。

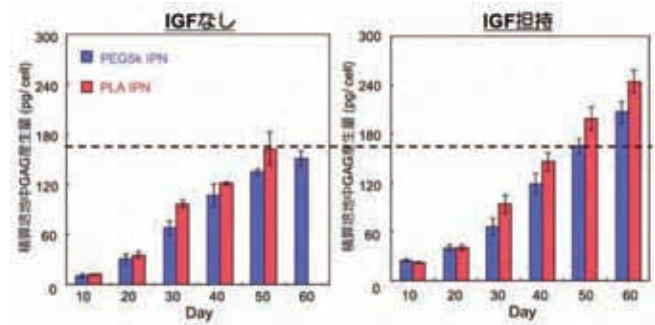


図 4 PEG および分解ユニット導入 PEG を用いて作製した IPN ゲルからの IGF-1 の放出挙動

4. 研究の反省・考察

IPN ゲル中において間葉系幹細胞から誘導された軟骨が組織構造的にも硝子軟骨であることが確認され、さらに PEG への分解性ユニットの導入によるゲルへの分解性付与や IGF 担持など IPN ゲルの高機能化についての実証を進めており、本研究は当初の研究計画を上回るペースで進捗している。一方、間葉系幹細胞の由来による軟骨分化能の評価のための脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた検討については、今後、分解性ゲルと分化誘導因子の担持が間葉系幹細胞からの軟骨誘導に与える影響を明らかにすることで、硝子軟骨再生足場としての IPN ゲルの有効性を示すことができる。さらに、医学部との共同研究により移植臨床実験に着手しており、IPN ゲルを用いた軟骨再生の実用化に向けた研究体制が整いつつある (長崎大学医学部、東京大学医学部)。本研究の継続により、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Ishikawa S, Iijima K, Sasaki K, Kawabe M, Otsuka H, Improvement of hepatic functions by spheroids coculture with fibroblasts in 3D silica nonwoven fabrics, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, in press.
- ②Daisuke Matsukuma, Taketomo Sambai, Hidenori Otsuka. UCST-type phase transition driven by protein-derived polypeptide employing gelatin and chitosan. *Polymer. Adv. Technol.* Volume28, Issue12, December 2017, Pages 1636-1641.
- ③飯島一智, 鈴木彩未, 橋詰峰雄, 多糖と支持基材からなる膨潤性と高い操作性を併せ持つ複合フィルムの作製, *高分子論文集*, **75**, 195-202 (2018).
- ④Iijima K, Iizuka A, Suzuki R, Ueno-Yokohata H, Kiyokawa N, Hashizume M, Effect of protein adsorption layers and solution treatments on hydroxyapatite deposition on polystyrene plate surfaces in simulated body fluids, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **28**, 193 (10 pages) (2017).
- ⑤Iijima K, Tsuji Y, Kuriki I, Kakimoto A, Nikaido Y, Ninomiya R, Iyoda T, Fukai F, Hashizume M, Control of cell adhesion and proliferation utilizing polysaccharide composite film scaffolds, *Colloids. Surf. B*, **160**, 228-237 (2017).
- ⑥Iijima K, Kimura T, Sato R, Takahashi T, Hashizume M, Kinetic analysis of molecular permeabilities of free-standing polysaccharide composite films, *Macromol. Chem.*

Phys., **218**, 1600391 (2017).

(2) 口頭発表

- ① Iijima K, Ishikawa S, Matsukuma D, Hashizume M, Otsuka H, Regeneration of hyaline cartilage from mesenchymal stem cells in interpenetrating polymer network gels consisting of chitosan, polyethylene glycol and peptides, 第27回日本MRS年次大会, 横浜市開港記念会館他, Dec. 2017
- ② 石川昇平, 飯島一智, 松隈大輔, 橋詰峰雄, 飯島道弘, 大塚英典, ペプチド繊維と糖鎖から形成される相互侵入高分子網目 (IPN) ゲルへの生分解性付与と組織再生足への応用, 第68回コロイド・界面化学討論会, 神戸大学鶴亀キャンパス, Sep. 2017
- ③ 石川昇平, 飯島一智, 松隈大輔, 橋詰峰雄, 飯島道弘, 大塚英典, ペプチドと糖鎖からなる再生組織置換型生分解性インジェクタブルゲルの創製, 第66回高分子討論会, 愛媛大学城北キャンパス, Sep. 2017
- ④ Ishikawa S, Iijima K, Matsukuma D, Hashizume M, Iijima M, Otsuka H, Fabrication of biodegradable and injectable IPN hydrogel consisting of self-assembling peptide and chitosan, 日本化学会第97春季年会, 日本大学船橋キャンパス, Mar. 2018

(3) 出版物

- ① 飯島一智, 橋詰峰雄, 第25章 “タンパク質含有多糖複合フィルムの作製とその保持能の評価”, in “ドラッグデリバリーシステム”, CMC出版, in press
- ② Ishikawa S, Iijima K, Yahagi Y, Otsuka H, (Ed. Rosa S), Chapter 3 “Fabrication of Stimuli-Triggered Polypeptide-Based Hybrid Biomaterials for Biomedical Application” pp.77-108 in “Advances in Chemistry Research, Volume 45”, Nova Science Publishers, U.S.A. (2018)
- ③ Ishikawa S, Iijima K, Otsuka H, (Ed. Taylor JC) Chapter 17 “Nanofabrication Technologies for Controlled Cell Tissue Engineering and Bioapplication”, pp. 385-409 in *Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications*, Elsevier Ltd. (2017)

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	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 28 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 28.5%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、がん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環境が大きく異なる。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。

研究代表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に見立てた蛍光標識ナノ粒子の透過性を評価する。

昨年度までの経過を踏まえ、本年度は以下の 2 点を検討することとした。

(1) 間質の弾性率を考慮したデバイスの作製

血管内皮細胞の足場となる間質の弾性率がナノ薬剤の血管透過性に与える影響を調べるために、弾性率の異なる間質模擬物質をデバイスに組み込む。ゲルに架橋剤を加えたものを用い、架橋度によって弾性率を制御する。対照実験においては、内皮細胞が間質模擬物質に接触した状態で培養するためにデバイスの形状を工夫し、そこに内皮細胞を導入して培養する。

(2) 弾性率制御下でのナノ粒子透過試験

上で作製したデバイスを用いナノ粒子透過試験を行う。

3. 研究の成果

(1) 間質の弾性率を考慮したデバイスの作製

弾性率を制御可能な間質模擬物質として、ゲニピン架橋コラーゲンを選定した。コラーゲンは間質の主成分であり、その溶液を生理的温度に保つとゲル化する。ゲルの弾性率はコラーゲン濃度を変えることで制御できるが、ゲルの網目構造のサイズが変わってナノ粒子の透過性も変化するため、弾性率の影響のみを評価できない。そこで本研究では架橋剤の一種であるゲニピンでコラーゲンを架橋することで、架橋度によって弾性率を制御可能な系の構築を目指した。

デバイスの鑄型はアクリル板をレーザー加工機で加工して作製した。これをポリジメチルシロキサン (PDMS) でかたどりして、流路パターンをもつ基板を作製した。この基板を別のパターンをもたない基板と接合し、流路の一部に孔径 3 μm の多孔膜を、流路を区切るように挟み込むことで、疑似血管および疑似間質となるマイクロ流路を有するマイクロ流体デバイスを作製した。これを 3°C に設定した温調プレートに置き、疑似間質側の流路に 8 mM ゲニピン/0.5 % ペプシン可溶化コラーゲン溶液を注入した。これを 37°C で 1 時間インキュベートして溶液をゲル化させた。インキュベート後のデバイスを顕微鏡で観察したところ、ゲルが疑似間質側の流路にのみ形成されていること、および後述のナノ粒子透過試験の際にゲルが流路内に安定して保持されていたことから、ゲニピン架橋コラーゲンのデバイスへの組み込みに成功したと結論付けた。

内皮細胞が間質模擬物質に接触した状態で培養するためのデバイスには、デバイスの材料として間質模擬物質であるゼラチン (コラーゲンの熱変性物質) を用いた。ゼラチンは培養温度である 37°C ではゲル化しないため、トランスグルタミナーゼで架橋した。ゼラチンの流路は型取り法で作製した。PDMS の加工と異なり流路の導入孔を後から開けることは困難なため、あらかじめ導入部となる PTFE のチューブを流路の鑄型の両端に立てた状態でゼラチンを流し入れた。ゲル化したゼラチンデバイスをカバーガラスと貼り合わせ、PTFE のチューブとシリンジポンプと接続し、送液培養可能な流路とした。流路に培地を送液したところ、PTFE チューブの配管部やカバーガラスとの貼り合わせ部から培地が漏れることなく、PDMS のデバイスと同様の流量で送液できることが示された。このデバイス中に血管内皮細胞を導入したところ、流路にコンフルエントに近い状態で細胞を培養でき、間質模擬物質に細胞が接触した状態での培養が可能なデバイス作製に成功したと結論付けた。

(2) 弾性率制御下でのナノ粒子透過試験

デバイスの疑似血管側の流路に、異なる分子量の蛍光標識デキストラン溶液を送液し、ゲルへ透過する様子を蛍光顕微鏡で一定時間ごとに撮影し、蛍光強度から透過量を求めた。透過量は時間と共に増加し、かつ分子量が小さいほど多くなった。これは分子量が大きいほどゲルの網目を透過しにくくなるためと考えられる。透過量の経時変化から透過係数を算出したところ、分子量から求まる流体力学半径と高い相関を示し、粒子のサイズが透過性に与える影響を定量評価できた。一方、血管内皮細胞を培養した系では、細胞を一定の密度で培養できたものの、流路全体に隙間なく培養された状態ではなかったため、ナノ粒子透過試験に応用するにはデバイス形状等の更なる工夫が必要であると結論付けた。

4. 研究の反省・考察

(1) 間質の弾性率を考慮したデバイスの作製

本研究ではコラーゲン濃度 0.5% の条件で主に実験を行ったが、生体内の腫瘍間質のコラーゲン濃度は、腫瘍の種類によってはさらに高いことが報告されている。今後は弾性率のみならず、より高いコラーゲン濃度での検討も進めることで、包括的な知見を得る必要があると考えられる。

(2) 弾性率制御下でのナノ薬剤透過試験

本研究では主にサイズの影響の評価にとどまったが、これ以外の種々の実験条件の影響を検討することで、腫瘍に到達しやすいナノ薬剤の条件が明らかとなり、より効果的なナノ DDS によるがん治療が可能になると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 佐々木直樹、ナノ薬剤開発のための無細胞マイクロ血管モデル、第27回日本MRS年次大会、横浜市開港記念会館、2017年12月.
- ② Yumi MORIYA, Miki ODANAKA, Naoki SASAKI, “Simulation of nanoparticle extravasation using an easy-to-observe membrane-integrated microfluidic device”, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), Savannah, USA, 2017. 10.
- ③ 守谷侑美、小田中美希、佐々木直樹、“マイクロ流体デバイスと疑似血液を用いるナノ粒子の血管透過性評価”、第7回CSJ化学フェスタ2017、タワーホール船堀、2017年10月.
- ④ 守谷侑美、小田中美希、佐々木直樹、“無細胞血管-間質マイクロモデルを用いるナノ粒子の透過性評価”、化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会、桐生市民文化会館、2017年10月.
- ⑤ 守谷侑美、小田中美希、佐々木直樹、“マイクロ流体デバイスとヒト全血を用いたナノ粒子の血管透過性評価”、日本分析化学会第66年会、東京理科大学葛飾キャンパス、2017年9月.
- ⑥ Yumi MORIYA, Miki ODANAKA, Naoki SASAKI, “Evaluation of vascular permeation of nanoparticles by using a membrane-integrated microfluidic device”, RSC Tokyo International Conference 2017, Makuhari, JAPAN, 2017. 09.

(3) 出版物

- ① 佐々木直樹、生体に「まねぶ」バイオ分析、工業技術(東洋大学工業技術研究所報告), 40, 22-26 (2018).

学 校 名	愛 知 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高機能形状記憶材料の開発とスマート素子への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①形状記憶合金 ②傾斜機能材料 ③粉末冶金 ④塑性加工 ⑤不動態皮膜 ⑥腐食疲労 ⑦窒素イオン注入 ⑧超音波ショットピーニング			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 井 良 介	工 学 部	准 教 授	総括、実験・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
武 田 亘 平	工 学 部	講 師	実験・データ整理・論文作成
服 部 兼 久	東 洋 製 鋼 株 式 会 社	部 長	実験・データ整理・論文作成
半 田 充	東 洋 製 鋼 株 式 会 社	課 長	実験・データ整理・論文作成

高機能形状記憶材料の開発とスマート素子への応用

1. 研究の目的

形状記憶合金 (shape memory alloy、以下 SMA) は大きな変形が加熱または除荷のみで元の形状を回復する特徴を持つ。これまでに様々な合金系で形状記憶特性の発現が見出されているものの、広く実用化されている合金系が TiNi 系である。しかし TiNi SMA においても応用は発展途上にあり、普及を妨げる主な原因は機能特性を十分に生かすことができない点にある。例えば医療用ガイドワイヤは、外科手術の際、様々な曲率を持つ血管に沿ってカテーテルを案内する役割を持つものであり、形状記憶合金の機能特性を発揮できる用途である。しかし、先端を軟らかく、他端を硬くすることが要求されるため積極的な実用化はなされておらず、それぞれの部位に応じて材料を選択し、これらを複雑に組み合わせて製造されたものが現状の主流である。さらに、ステント等の医療デバイスに用いる場合には Ni イオンの溶出や腐食疲労強度も懸念材料となる。

(1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

以上の現状を踏まえ、本研究者らは、曲げ剛性が長手方向に徐々に変化する傾斜機能 TiNi SMA ワイヤをその製造方法とともに考案した。この材料は、材料中で変態温度 (または曲げ剛性) が徐々に変化する特徴を有しており、医療用ガイドワイヤに要求される変形特性を満足できる。さらに、自己ストローク制御式アクチュエータも実現できる。自己ストローク制御式アクチュエータは傾斜機能 SMA をばね形状に成形したもので、ばね全体を加熱で形状回復する形状記憶効果を発現するように設定し、形状回復温度 (変態温度) を傾斜化させることで温度に応じたストロークに自ら形状変化する、温度センサ機能を備えた全く新しいアクチュエータである。この製造のために本研究者らは粉末冶金プロセスと塑性加工を組み合わせる方法を既に提案しているが、粉末冶金と塑性加工を組み合わせる方法で作製した SMA について微視組織や変態・変形特性を詳細に明らかにした結果は報告されていない。

本研究者らがこれまでに提案してきている新規プロセスで得られた傾斜機能 TiNi SMA ワイヤについて、自己ストローク制御式アクチュエータや医療用ガイドワイヤに必要な、長手方向に変形抵抗 (ひずみ分布) の傾斜機能特性を有する TiNi 形状記憶合金の微視組織、変態・変形特性を解明することを目的とする。

(2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

本研究では、耐食性および腐食疲労寿命を生体材料である純 Ti や Co-Cr 合金同等以上に引き上げるべく、純窒素ガス雰囲気下での熱処理 (熱窒化処理、thermal nitridation process、以下 TN 処理) によって生成される皮膜の耐食性および腐食疲労特性への効果検証に取り組む。これまでの研究で、表面性状が良好である (表面粗さが小さい) ほど均質な皮膜を生成できることを示唆する結果が得られており、系統的な実験からこのメカニズムを明らかにする。TiNi SMA において TN 処理の耐食性および曲げモードにおける腐食疲労寿命向上への効果を明らかにし、TiNi SMA を用いた血管内治療デバイスの長寿命化に向けた指針を示すことを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

TiNi SMA ビレットはガスアトマイズ Ti 粉末とカルボニル Ni 粉末から成る混合粉末を焼結して作製した。まず、合金化後に Ti-49.8at%Ni から Ti-51.0at%Ni の組成比となるよう各粉末を秤量・混合し、混合粉末を黒鉛型に積層・充填した。これに真空環境下でパルス通電加圧焼結を施すことによって焼結体を作製した。この TiNi SMA の Ni 濃度は材料の一端では 49.8at% であり、他端では 51.0 at% に設定し、その間は 0.2 at% ごとに段階的に変化させてある。この後 Ti と Ni の相互拡散を促すための溶体化処理を 1273 K で 43.2 ks 施し、高さ約 29 mm の TiNi SMA 焼結体を得た。その後、焼結体の軸方向に沿ってワイヤ放電加工にて幅 5 mm、厚さ 1 mm のビレットに切り出した。ワイヤ放電加工後には材料に酸化物が付着し、さらに表面の凹凸

が大きくなるため、1000番の軸付砥石で表面研磨を施した。また、熱間圧延時には加熱したピレットの急激な温度低下を防ぐため、ピレットケース内にピレットを挿入し、加工温度に設定した電気炉内で共に加熱した。加熱温度は1073 Kに設定し、酸化皮膜の生成を防ぐためAr雰囲気中で加熱した。加熱時間は1回の圧延につき1.5 ksとし、熱間圧延は圧下率を変更して2回行った。また圧延時に生じるスプリングバックを考慮した最終的な圧下率(厚さの減少割合)は熱間および冷間圧延についてそれぞれ $5\pm 2\%$ および $10\pm 2\%$ とした。本研究ではこの方法で作製したTiNi SMAについて、デジタル画像相関法(digital image correlation method、以下DIC)によって引張変形中のひずみ分布を測定して局所ひずみの傾斜機能特性を明らかにした。除荷後は試験片を逆変態終了温度以上まで加熱し、非回復ひずみを調べた。

(2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

供試材として株式会社古河テクノマテリアル製のTiNi SMA線材(Ti-49.7at%Ni、直径0.7 mm)を用いた。この線材に研磨を行い、TN処理を施して窒化物皮膜を生成した。TN処理は673 Kを3.6 ks保持し、炉冷する条件で行った。各材料の耐食性を評価するために、アノード分極試験を行った。対極にはPtを用い、電解液には3% NaCl水溶液を使用した。掃引速度は10 mV/minとし、電流密度が 10^{-3} mA/cm²を示す電位を腐食開始電位とした。

3. 研究の成果

(1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

熱間および冷間圧延を施した傾斜機能TiNi SMA帯板材について、DICを用いて応力-ひずみ曲線を求めた。その結果、負荷過程ではNi濃度が低い位置において局所ひずみが優先的に大きくなることが明らかとなり、変形抵抗の傾斜機能化を確認することができた。

次に、Ni濃度の違いに伴う局所的な変形特性を明らかにするために、50.2および50.6 at%のNi濃度に対応する位置における応力-局所ひずみ曲線を調べた。その結果、Ni濃度が50.2 at%に対応する位置においては局所ひずみの最大値が約5.3%であり、除荷後の加熱においても3.1%のひずみが残留することがわかった。一方で、50.6 at%に対応する位置においては局所ひずみの最大値が4.3%であり、除荷後の加熱でほとんどのひずみが消滅した。これはNi濃度の違いによる逆変態終了温度の違いによるものである。以上のように、Ni濃度の違いに伴う非回復ひずみの変化は、一般的な溶製材のTiNi 形状記憶合金と同様に、Ni濃度が比較的高い位置では部分超弾性が現れ、低い位置では形状記憶効果が現れることに起因していると考えている。

(2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

各材料のアノード分極曲線から、TN材では未処理材に対して分極曲線が貴方向にシフトしており、腐食開始電位が高いことを明らかにした。これは、TN処理によって生成した皮膜の耐食性への効果が認められることを示している。TN処理を施した試験片では材料表面に窒化物層が生成され、これが不動態皮膜として働き耐食性が大きく向上したと考えられるが、今後詳細な検討が必要である。

4. 研究の反省・考察

(1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

当初の狙い通り、本提案プロセスで作製したTiNi SMAは変形抵抗(局所ひずみ)の傾斜機能化を有することを明らかにすることができた。しかしながら局所ひずみ分布に揺らぎが認められ、この原因は微視的なNi濃度のばらつきによるものと考えている。従い、今後は微視的な領域での成分分析などを行ってこの点を明らかにする必要がある。

(2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

本研究によって、TN処理がTiNi SMA表面に不動態皮膜を生成することを明らかにすることができた。そこで今後は腐食環境下での疲労試験を行い、腐食疲労特性に対するTN処理の効果を明らかにする必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Matsui, R., Takeda, K., Tobushi, H. and Pieczyska, E. A., Mechanical Properties and Advanced Subjects in Shape-Memory Alloy and Polymer, *Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, Vol. 56, No. 2, pp. 447-456, DOI: 10.15632/jtam-pl.56.2.447.

(2) 口頭発表

- ① 山田和希、松井良介、不動態皮膜を生成させたTiNi形状記憶合金の腐食疲労寿命、日本機械学会M&M2017材料力学カンファレンス、北海道大学（北海道札幌市）、2017年10月
② 山田和希、松井良介、熱窒化処理を施したTiNi形状記憶合金の腐食疲労特性、日本機械学会東海支部第67期総会・講演会、名古屋大学（愛知県名古屋市）、2018年3月
③ 藤田裕介、松井良介、圧延加工を施したTiNi形状記憶合金焼結体の力学的特性、日本機械学会東海学生会第49回学生員卒業研究発表講演会、名古屋大学（愛知県名古屋市）、2018年3月
④ 奥村雅斗、松井良介、窒化皮膜を生成したTiNi形状記憶合金の腐食疲労特性、日本機械学会東海学生会第49回学生員卒業研究発表講演会、名古屋大学（愛知県名古屋市）、2018年3月

(3) 出版物

なし

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	触媒環境の構築による細径単層カーボンナノチューブ の高効率生成 －酸化物担持材を用いた触媒の電子状態制御－		研 究 分 野 工 学
キ ー ワ ー ド	①カーボンナノチューブ ②CVD(化学気相成長)法 ③触媒 ④Pt ⑤Rh ⑥Ru ⑦XAFS ⑧XPS		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
丸 山 隆 浩	理 工 学 部	教 授	研究全体の統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
才 田 隆 広	理 工 学 部	助 教	触媒担持材の開発
成 塚 重 弥	理 工 学 部	教 授	触媒ナノ粒子の作製

触媒環境の構築による細径単層カーボンナノチューブの高効率生成 —酸化物担持材を用いた触媒の電子状態制御—

1. 研究の目的

- (1) 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は、ナノサイズの触媒粒子を用いた化学気相成長 (CVD) 法により一般に作製されるが、直径 1 nm 程度以下の細径の SWCNT を大量生産することは困難であった。本研究では、TiO₂ やアルミナなどの酸化物を白金族元素の触媒粒子の担持材に用いて SWCNT の成長を行うことで、直径 1 nm 程度以下の細径の SWCNT の生成効率の向上を目指した。
 - ①Pt触媒粒子の担持材としてTiO₂を用い、細径のSWCNT成長を実現する。
 - ②白金族元素の金属触媒粒子の担持層としてアルミナを用いてSWCNT成長を行い、白金族元素による生成量増強効果の差異を明らかにするとともに、直径1 nm程度以下の細径のSWCNTの生成量の向上を目指す。
- (2) さらに、アルミナ担持層を用いることで SWCNT の生成量が向上する Rh 触媒に対し、アルミナ担持層の結晶性が触媒活性に与える影響を調べ、そのメカニズムの解明を目的とした。
 - ①X線光電子分光 (XPS) やX線吸収端近傍構造 (XANES)、透過電子顕微鏡 (TEM) 観察によるアルミナ担持層の評価
 - ②担持層が触媒の電子状態に与える影響の解明

2. 研究の計画

- (1) TiO₂ ナノシートを担持材に用いて Pt 触媒粒子からの SWCNT 成長を行なう。
 - ①交互吸着法を用いて、層数や被覆率を制御してTiO₂ナノシートをSi基板上に堆積する技術を確立する。
 - ②TiO₂ナノシート上に直径1~3 nm程度のPt触媒粒子を堆積させる技術を確立する。
 - ③TiO₂ナノシート上に堆積したPt粒子からのSWCNT成長を行なう。
- (2) アルミナを担持材に用いて白金族元素の触媒粒子からの SWCNT 成長を行ない、アルミナ担持層が触媒粒子の物性に与える影響を解明する。
 - ①Pt, Ru, Rhなどの白金族元素の触媒粒子をアルミナ上に担持し、SWCNT成長を行い、比較する。
 - ②結晶性・酸化度の異なるアルミナ担持層を作製し、触媒活性に与える影響とそのメカニズムについてXANES, XPSおよびTEMを用いて調べる。

3. 研究の成果

- (1) TiO₂ ナノシートを触媒担持材に用いた Pt 触媒粒子からの SWCNT 成長
 - ①交互吸着法 (Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly; LBL) 法を用いて、TiO₂ ナノシートをSiO₂/Si基板上に積層させた。交互吸着法は、正の荷電粒子を含むカチオン溶液と負の荷電粒子を含むアニオン溶液を用意し、これらの溶液に基板を交互に浸漬させることにより、基板表面に正の荷電粒子に基づく層と負の荷電粒子に基づく層とを交互に形成することができる。本実験では、カチオン溶液にPDPA、アニオン溶液にTiO₂ナノシート溶液を用いた。浸漬回数を変化させ、TiO₂ナノシートの堆積状態を原子間力顕微鏡 (AFM) で調べたところ、3回の浸漬後、基板表面の約80%をTiO₂ナノシートで被うことができた。また、TiO₂ナノシート1層の厚さは約2 nm程度で、場所によってはTiO₂ナノシートが2~3層に重なっている様子もみられた。次にSiO₂/Si基板上に堆積させたTiO₂ナノシート上に、電子ビーム (EB) 蒸着装置を用いて Pt触媒粒子を堆積させた。蒸着時間を制御することにより、SWCNT作製に適した、0.2 nm 相当の膜厚のPt触媒を高密度で堆積させることができた。
さらに高真空アルコールガスソース装置を用いて、SWCNT成長を行った。本装置は、高真空下で原料ガスのエタノール蒸気を触媒に供給することができ、SWCNTに適した最適の流量に原料ガスを制御することができる。本実験では、SWCNTの成長温度を500~700℃、

エタノールガス圧力を $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ Paと変化させて、TiO₂ナノシート上でのSWCNT生成の様子を調べた。

作製した試料のラマン分光測定を行ったところ、成長温度700°Cのときには、エタノール圧力 $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ Paの範囲でGバンドとRBMピークがみられ、SWCNTが成長していることがわかった。また、 1.0×10^{-2} Paのときに最もSWCNT成長が多くなった。成長温度600°Cにおいてもエタノール圧力 1.0×10^{-3} PaでSWCNTの成長が確認されたが、500°Cでは成長量は激減し、わずかにRBMピークが観測されるのみであった。

また、TiO₂ナノシートを用いた試料とSiO₂/Si基板上に直接成長した試料の比較を行ったところ、ラマン分光測定からは、TiO₂ナノシートを用いた試料のほうが、SWCNT成長量が少なくなっていることがわかった。走査電子顕微鏡 (SEM) 観察から、TiO₂上にSWCNTが生成しているもののSiO₂/Si基板上に比べて生成密度が低くなっている様子が観察された。成長温度700°Cのときには、1 nm付近の直径のSWCNTが多く生成したが、成長温度が600°Cのときには、直径0.7 nmのSWCNTも多く生成している様子がみられた。さらに、ラマンスペクトルのGバンドピークとDバンドピークの強度比からSWCNTの結晶性の評価を行ったところ、TiO₂ナノシート上に成長したSWCNTのほうがG/D比が向上し結晶性が良くなる傾向があることがわかった。

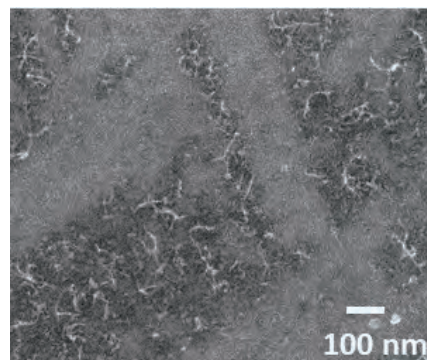


図1 TiO₂ ナノシート上の Pt 触媒粒子から生成した SWCNT の SEM 像. 白い繊維状の物質が SWCNT で白いエリアが SiO₂ 上に堆積した TiO₂ ナノシート.

②アルミナを担持層に、Pt、Rh、Ru触媒を用いて

SWCNT成長を行い、アルミナ担持層がSWCNT成長に与える影響について比較を行った。膜厚20 nmのアルミナをSiO₂/Si基板の上に作製し、その上に各触媒を膜厚0.2 nm相当堆積して触媒粒子を形成し、高真空アルコールガスソース法によりSWCNTの作製を行った。ラマン分光測定とSEM観察から、SWCNTの生成量の比較を行ったところ、Ptを除く触媒金属では、アルミナ担持層を用いることでSWCNT生成量が増加した。すなわち、白金族元素を触媒に用いる場合も、Ptを除き、アルミナ担持層による触媒活性の効果があることがわかった。

(2) アルミナ担持層上に堆積した白金族元素を触媒粒子を用いた SWCNT 成長とアルミナ担持層が触媒活性に与える影響の解明

①SiO₂/Si基板の上にアルミナ担持層を形成し、その上にPt、Ru、Rh触媒粒子を堆積させてSWCNT成長を行い、SiO₂/Si基板の上に堆積させた場合との比較を行なった。Pt触媒の場合、アルミナ担持層上とSiO₂/Si基板上でSWCNT生成量にほとんど差はなかったが、RuおよびRh触媒の場合、アルミナ上に担持させることで大幅にSWCNT生成量が向上した。また、Rh触媒を用いた場合、成長温度300°CでSWCNTを生成することができた。

②酸化度や結晶化の異なるアルミナ担持層を作製し、それらの上に担持したRh触媒を用いてSWCNT生成量の比較を行った。ラマン分光測定とSEM観察から、作製法によりSWCNT生成量が異なることがわかった。XPSやXANES測定から、内部まで十分酸化していないアルミナ層では、触媒粒子の内部拡散が生じ、SWCNT生成がほとんどみられないことがわかった。また、熱処理を行ったアルミナ担持層では、SWCNTが成長するものの生成量が減少した。TEM観察から、熱処理を行った試料では、Rh触媒粒子が凝集し肥大化している様子がみられた。熱処理によりアルミナの結晶化が生じてRh原子の表面マイグレーション距離が増大し、その結果、触媒粒子の凝集が促進され、SWCNT生成に適した粒径のRh粒子の数が減少し、SWCNT生成量が減少したと考えられる。以上の結果から、アモルファスのアルミナ膜を用いることで、SWCNTの生成量が向上することがわかった。また、アモルファスのアルミナ担持層の場合、アルミナ密度が高くなるほど、触媒金属のアルミナ内への内部拡散が減少し、SWCNT生成量が増加することがわかった。

③アルミナ担持層がRh触媒の電子状態に与える影響を調べるため、SWCNTの成長量とRh触媒の電子状態を真空紫外光電子分光測定により調べたところ、最もSWCNT生成量の多く

なるアルミナ担持層上では、Rh触媒の4d準位が最もフェルミ準位付近に存在していることが分かった。アルミナ担持層により、原料ガス分解に影響のある4d準位のエネルギー位置が変化し、触媒活性に影響を与えている可能性があることがわかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 酸化物を触媒担持材に用いた白金族元素の触媒粒子を用いた SWCNT 成長

①本研究の結果、TiO₂ナノシート上にPtを触媒粒子として用いてSWCNTを成長させることに成功した。期待に反してSWCNTの生成密度は減少したが、SWCNTの結晶性が向上している様子がみられた。TiO₂上で生成量が減少した原因は現在、考察中であるが、触媒粒子がTiO₂ナノシート内に潜り込み、SWCNT成長に寄与する触媒粒子の数が減ってしまったことなどが考えられる。

②一方、アルミナを担持層として用いることで、RhやRu触媒からのSWCNTの生成量を増加させることができた。アルミナ担持層を用いたSWCNTの報告は多数あるが、触媒活性化に与える影響が、金属種により異なることが明らかとなった。これは金属により、触媒粒子からのSWCNT生成メカニズムが異なることを示唆している。

(2) アルミナ担持層が触媒活性に与えるメカニズムの解明

①アルミナ担持層の結晶性・酸化度が触媒活性に与える影響の詳細が明らかとなった。成長温度により、アルミナの結晶性が変化していることが考えられることから、他の温度の場合についても調べていく予定である。

②アルミナ担持層の結晶性・酸化度により触媒金属の電子準位が変化し、その結果、触媒の活性度が変化し、SWCNTの生成量に違いが生じることが初めて明らかとなった。今後は他の触媒金属の場合も、同様の現象が生じているのかについて明らかにしていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Takahiro Maruyama, Akinari Kozawa, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, Sumio Iijima, “Low temperature growth of single-walled carbon nanotubes from Rh catalysts”, Carbon 116 (2017) 128-132.

②Hoshimitsu Kiribayashi, Takayuki Fujii, Akinari Kozawa, Seigo Ogawa, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, Takahiro Maruyama, “Effects of fabrication method of Al₂O₃ buffer layer on Rh-catalyzed growth of single-walled carbon nanotubes by alcohol-gas-source chemical vapor deposition”, J. Cryst. Growth 468 (2017) 114-118.

③Hoshimitsu Kiribayashi, Takayuki Fujii, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, Takahiro Maruyama, “Effects of Al₂O₃ Type on Activity of Al₂O₃-Supported Rh Catalysts in Single-Walled Carbon Nanotubes Growth by CVD”, MRS Advances 2 (2017) 89-95.

(2) 口頭発表

①T. Maruyama, A. Kozawa, T. Saida, S. Naritsuka, and S. Iijima, “Single-Walled Carbon Nanotube Synthesis from Rh Catalysts by Alcohol Gas Source Method”, The 15th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017), August 27-September 1, Yoshida Campus, Kyoto University, Kyoto, Japan. C1-001-010, Sept. 1 (2017).

②Takahiro Maruyama, Hoshimitsu Kiribayashi, Takayuki Fujii, Takahiro Saida, Shigeya Naritsuka, “Enhancement mechanism of catalyst activity of Rh particles supported on Al₂O₃ layers in SWCNT growth”, 2017 MRS Fall Meeting & Exhibit, Hynes Convention Center, NM02.11.25, Sheraton Boston Hotel, Boston (USA), November 26-December 1 (2017).

③丸山隆浩, 桐林星光, 才田隆広, 成塚重弥, “Rh触媒を用いた単層カーボンナノチューブ作製時におけるAl₂O₃バッファ層による生成量増加のメカニズム”, 第78回応用物理学会秋季学術講演会 7a-C11-3, 福岡国際会議場・福岡国際センター・福岡サンパレスホテル, 9月5日-8日 (2017)

- ④丸山隆浩, 桐林星光, 才田隆広, 成塚重弥, “カーボンナノチューブ成長用触媒粒子への Al_2O_3 担持層の結晶性の影響”, 第7回名古屋大学シンクロトン光研究センターシンポジウム, 1月19日, 名古屋大学東山キャンパス

(3) 出版物

- ①Takahiro Maruyama, “Nanoscale Carbon Materials: Carbon Nanotubes”, in Atsushi Nagai, and Koji Takagi eds. “Conjugated Objects: Developments, Synthesis, and Applications”, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., CRC Press, USA, Chap. 16, 439-468 (2017).

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 ②AMCase ③酵素の不活性化 ④偽遺伝子化 ⑤酵素の活性化 ⑥Non-synonymous SNPs(nsSNPs) ⑦キチナーゼ様タンパク質Ym1 ⑧キチナーゼ様タンパク質Chi31l			

○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	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 (GlcNAc) 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 (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) を発現している。

AMCCase は、喘息、アレルギーで発現が増加する。さらに、ヒト AMCCase の 1 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。最近、我々は、マウス AMCCase が、消化器系条件下でプロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し得ることを示した。これらのことから、AMCCase が、喘息、アレルギー等の疾患の発症、他方では、胃での食物消化において重要な役割を果たしている、と考えられる。

ヒトとマウスの AMCCase 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 AMCCase を発現し、キチナーゼ活性を比較したところ、ヒト AMCCase 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。この結果は、ヒト AMCCase 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。同様の不活性化は、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 と Chi311 でも知られている。Ym1 は AMCCase に、Chi311 は Chit1 にそれぞれ構造が類似しているが、キチナーゼ活性がなく、喘息をはじめとする様々な病気で増加する。

本研究では、まず、ヒト AMCCase の不活性化メカニズムを明らかにし、その活性化に成功した (平成 28 年度の研究成果; Okawa et al., (2016) Loss and Gain of Human Acidic Mammalian Chitinase Activity by Nonsynonymous SNPs, *Mol Biol Evol.* 33, 3183-3193)。平成 29 年度の研究では、キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 の不活性化のメカニズムを探り、分子進化における酵素機能に影響を及ぼすアミノ酸、配列変化を推察した。具体的には、AMCCase での研究手法で、キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 (これらは、不活性キチナーゼである) の不活性化のメカニズムを探り、活性化を試みた。さらに、家畜を含む様々な動物での AMCCase の活性の比較を行った。

2. 研究の計画

(1) キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 の活性化

① AMCCase cDNA から触媒ドメイン (Catalytic domain) cDNA を PCR 法で調製した。このドメインは、Ym1 と高い相同性を示す。Ym1 の活性中心に変異を導入したもので Ym1 mutant (Mut) cDNA を調製した。AMCCase、Ym1、Ym1 Mut の cDNA のアミノ酸配列が保存されている部分同士で組み合わせたキメラ体を 6 種類構築した (図 1)。作製したそれぞれの cDNA を pEZZ18 に組み込み、大腸菌で発現した。

② 発現した各キメラ体のキチナーゼ活性について、合成基質を用いて比較した。さらに、蛍光標識糖電気泳動法を改良し、コロイダルキチンに各融合タンパク質を作用させ、それら分解産物の比較を行った。

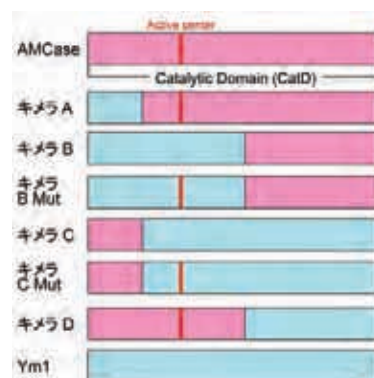


図 1 : AMCCase-Ym1 キメラ体の模式図

(2) 家畜を含む動物の胃での AMCCase のキチナーゼ活性の比較

① 家畜を含む動物の胃での AMCCase mRNA レベルを定量し、種間で比較した:ニワトリ, ブタ, ウシ, イヌの胃における AMCCase mRNA レベルについて、種間での比較を行った。AMCCase mRNA レベルと食性との関係を明らかにした。

② 大腸菌組換え AMCCase の性質:各種動物の大腸菌組換え AMCCase を調製し、キチナーゼ活性について特性解析を行った。そして、種間で性質を比較した。

3. 研究の成果

(1) キチナーゼ様タンパク質 Ym1、Chi311 の活性化

Ym1 に AMCase の活性中心に相当するアミノ酸変異を導入したが、活性が認められなかった (結果示さず)。また、AMCase の C 末端領域を導入したキメラ B でも活性を検出できなかった (図 3 キメラ)。しかし、活性中心を導入したところ活性化した (図 2 キメラ B Mut)。逆に、Ym1 の C 末端領域を持つキメラ D は失活した。

(図 2、キメラ D)。以上の結果は、Ym1 の C 末領域に不活性化にかかわるアミノ酸が存在することを示している。今後、Ym1 キメラ体の活性を確認し原著論文を完成する。Chi311 についても同様の実験を進めている。

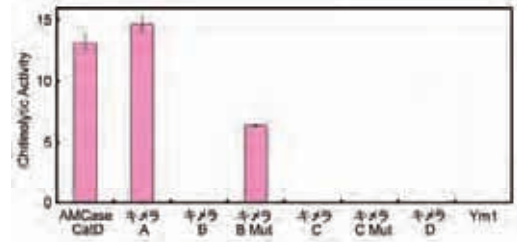


図 2 : AMCase-Ym1 キメラ体の模式図

高分子量キチン基質詳細な解析のため、FACE 法の改良を行った。この方法は、HPLC, NMR などに比べても感度が高く、キチン分解産物の解析には非常に適していた (5. 研究発表、(1)学会等④)。

(2) 草食動物であるウシの AMCase の不活性化

動物体内におけるキチンの分解性を検討するため、代表的な家畜であるウシにおける AMCase の遺伝子発現レベル、酵素活性を比較した。その結果、ニワトリの胃に比べ、草食性のウシでは著しく低かった (5. 研究発表、(1)学会等①)。そこで、大腸菌組換え体タンパク質として AMCase を発現させ、ニワトリとキチナーゼ活性を比較した。比活性も同様に、ウシ AMCase のキチナーゼ活性は、マウスの 1/10 程度だった (図 3)。また、それぞれの至適 pH は、マウス AMCase は、pH 2.0、ウシは pH 4.0 と、違いが生じた (図 3)。平成 28 年度の研究中、ヒト AMCase のキチナーゼ活性は M61R の置換であることを明らかにした。しかし、ウシは M61 なので、ヒト AMCase の不活性化とは異なるメカニズムであろうと考えられる。これらの結果から ウシ AMCase の一次構造上にも、キチナーゼ活性に関わる種差があることが示唆された。

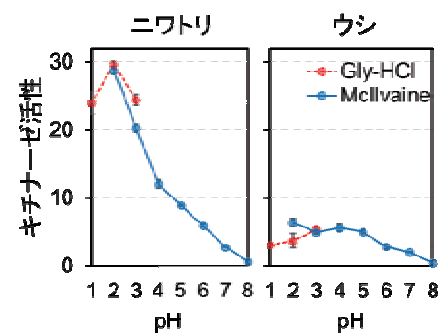


図 3. 大腸菌組換えニワトリとウシ AMCase のキチナーゼ活性の比較。ウシ AMCase は、ニワトリに比べ活性が著しく低かった。

4. 研究の反省・考察

ヒトやマウスなどのほ乳類における酵素活性の遺伝的制御に関してほとんど研究がされていなかった。平成 28 年度の研究中、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。

平成 29 年度の研究では、平成 28 年度に確立した実験手法で、喘息とかかわる Ym1 の活性化を試みた。現在、Ym1 の不活性化に関する仮説は、活性中心の保存配列 (DXXDXDXE) の D と E へのアミノ酸変異、である。しかし、我々は、Ym1 において、それらのアミノ酸の D と E へのアミノ酸置換のみでは、活性化されなかった。加えて、マウス AMCase の C 末の配列を導入することで Ym1 の活性化できることを明らかにした。これらは新規の知見である。平成 30 年度の研究で、Ym1 の不活性化に関わるアミノ酸の同定と、さらに効率の良い活性化のメカニズムを明らかにしている。さらに、Ym1 同様に不活性な Chi311 についても同様に不活性化のメカニズムと再活性化を試みている。

AMCase は、マウス、ニワトリ、ブタ (これらは雑食性) の胃で、高く発現しており、比活性も高い (5. 研究発表、(1)学会等①~③)。他方、ウシ (草食性) では発現が低く、比活性も低い。ウシの AMCase の活性化を試みる。ウシは重要な家畜であることから、これらの知見は食糧につながる。

本研究では、分子細胞生物学的な手法に加え、進化的な解析手法を用い、実際に不活性なヒト AMCase、Ym1 の不活性化と再活性化のメカニズムを明らかにした。そしてウシの AMCase の

不活性の原因に迫る。本研究は新規研究領域、新規応用領域の開拓に展開できる可能性が高い。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Tabata, E., Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2018) Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs, *Sci Rep.* **8**, 1461. Nature Publishing Group, January 23, 2018.
- ② Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Kino, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2017) Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry, *Sci Rep.* **7**, 6662. Nature Publishing Group, October 11, 2017.
- ③ Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Imamura, Y., Seki, S., Ueda, H., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2017) Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources, *Sci Rep.* **7**, 12963. Nature Publishing Group, July 27, 2017.
- ④ Wakita, S., Kimura, M., Kato, N., Kashimura, A., Kobayashi, S., Kanayama, N., Ohno, M., Honda, S., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2017) Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: Chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions, *Carbohydr Polym.* **164**, 145-153. Elsevier Ltd., May 15, 2017.

(2) 口頭発表

- ① **小山文隆**、大野美紗、樫村昭徳、木村将大、**坂口政吉**、菅原康里、大川一明、ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの nonsynonymous SNPs による活性の調節、日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋市、2018 年 3 月 17 日
- ② 田畑絵理、樫村昭徳、脇田悟誌、大野美紗、**坂口政吉**、菅原康里、**小山文隆**、ニワトリ酸性キチナーゼの消化酵素としての機能解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、名古屋市、2018 年 3 月 17 日
- ③ **Oyama, F.**, **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Okawa, Mechanistic insight of inactivation of mouse chitinase-like protein Yml, The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG), Orlando, 2017 年 10 月 19 日
- ④ **小山文隆**、大野美紗、樫村昭徳、木村将大、**坂口政吉**、菅原康里、大川一明、ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの進化学的解析、第 31 回日本キチン・キトサン学会大会、宜野湾市、2017 年 8 月 24 日
- ⑤ 脇田悟誌、木村将大、樫村明徳、**坂口政吉**、菅原康里、**小山文隆**、キチンオリゴ糖蛍光標識法を用いた酸性ほ乳類キチナーゼの特性解析、第 31 回日本キチン・キトサン学会大会、宜野湾市、2017 年 8 月 23 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	妊娠を支えるエクソソーム由来miRNAの解明とその制御 —加齢に伴う妊孕性低下とmiRNAの関係—		研究分野	農 学
キ ー ワ ー ド	①エクソソーム ②加齢 ③卵および胚 ④卵巣 ⑤卵管 ⑥子宮 ⑦miRNA			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 田 尚 孝	農 学 部	教 授	研究総括及び生殖細胞実験系

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
亀 山 祐 一	生 物 産 業 学 部	教 授	生殖細胞実験系:マウス実験解析
下 井 岳	生 物 産 業 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウス作製および解析: マウス実験解析
白 砂 孔 明	農 学 部	准 教 授	体細胞培養実験系:ウシ実験解析

妊娠を支えるエクソソーム由来 miRNA の解明とその制御 — 加齢に伴う妊孕性低下と miRNA の関係 —

1. 研究の目的

- (1) 妊娠と加齢：近年の社会情勢やライフスタイルの変化に伴い、30代後半で挙児を希望する女性が増加している。しかし、母体の加齢によって卵子数が減少するだけでなく、卵子内の活性酸素種の蓄積・ミトコンドリアの機能異常・異常受精の増加など複合的な原因で卵子の質が低下し、妊孕性が急激に低下する。加齢に伴う妊孕性の低下は現代社会で少子化問題の一大要因とされており、いかにして妊孕性を維持するのか、加齢に伴い妊孕性を低下させている原因を明らかにするのは喫緊の課題である。
- (2) 卵子・胚の周囲環境の重要性：これまでの加齢の研究では主に卵子や胚そのものの質的低下に焦点が当てられている。一方で卵子は長期間母体内で発育・受精し、受精卵・胚は卵管や子宮などの母体との相互作用を行い、胎児として娩出される。これらのプロセスは、卵子・受精卵の周囲の細胞や体液との高次な相互作用の下で実施される。我々はこれまで、加齢に伴い母体の体液（卵胞液）および卵子や初期胚の周囲の環境（顆粒層細胞や卵管細胞）が大きく劣化し、これが卵子や胚の質を低下させている要因であることを示す知見を得ている。
- (3) 以上から、①卵子・胚および周辺細胞（顆粒層・卵管・子宮細胞）はエクソソームを介してmiRNAを伝達することで互いの機能を制御する、②加齢に伴い適切なmiRNAによる制御機構が破綻し、周囲環境が悪化することで胚発生が低下する、という仮説を想定した。本研究では、卵巣・卵管・子宮内のエクソソームを介した卵や胚の発育制御機構とこれに加齢が及ぼす影響を検証し、加齢に伴う妊娠成立機構の破綻を改善する手法の開発を目指す。

2. 研究の計画

- (1) 若齢・老齢ウシにおけるエクソソーム内miRNAおよび老化関連因子の探索
 - ①卵子の発育に及ぼすmiRNAを同定するため、発育段階の異なる卵胞、質の異なる卵胞を対象に顆粒層細胞のRNA-seqから推測した上流因子としてのmiRNAと卵胞液中のmiRNAをsmall-RNA-seqによって推測し両者を比較した。
 - ②正常な胚発育へのmiRNAの関与を検討するため、子宮内（体内）および体外培養で発育した胚のRNA-seq解析を行った。
- (2) 卵子・胚と周囲環境の相互作用：若齢・老齢ウシ由来の miRNA の関与
 - ①卵胞液の性状を比較するため卵子の発育培地及び成熟培地に若齢および加齢のウシから採取した卵胞液を添加し卵子の体外発育および卵子の成熟後の発生能力を比較した。また加齢および若齢の卵胞液からエクソソームを抽出しsmall-RNA-seqを行った。
 - ②ウシに過剰排卵および人工授精を行い、胚の存在・非存在下の子宮内膜上皮細胞における RNA-seq解析を実施した。
- (3) 若齢および老齢マウスモデルにおける全身性エクソソーム内miRNAの特定
全身性のエクソソームの重要性を見出すため、若齢・老齢マウスから採血し、高純度のエクソソームの抽出を行いsmall-RNA-seq解析を行った。

3. 研究の成果

- (1) 若齢・老齢ウシにおけるエクソソーム内miRNAおよび老化関連因子の探索
 - ①卵胞内のmiRNA：異なる発育ステージの卵胞から採取した顆粒層細胞のRNA-seq解析および卵胞液中エクソソームのsmall-RNA-seq解析から、卵子の発育に伴い発現が変化するmiRNAを同定した。さらに、良好な顆粒層細胞を多く含む卵胞と少ない卵胞の卵胞液からsmall-RNA-seq解析を行い、上記の因子と共通する因子の絞り込みから、卵胞発育を

制御する候補miRNAを同定した。また、若齢ウシ由来の卵胞液と比較して、これらのmiRNAの構成は加齢によって大きく変化することを見出した。

- ②胚発育とmiRNA：正常な胚発育へのmiRNAの関与を検討するため、子宮内（体内）および体外培養で発育した胚のRNA-seq解析を行った。体内発育胚では炎症や代謝が低く制御され、体外発育胚ではミトコンドリアに障害があることなど、質的な違いが大きいことが分かった。さらに、体内ではmiRNAが胚発育を制御することを示す結果を得た。
- ③卵胞内の環境：若齢ウシと比較して、加齢ウシの卵胞液中に多くの細胞外DNAと炎症系サイトカインが存在することを見出した。この原因として、ミトコンドリアが障害を受けると顆粒層細胞が細胞外にDNAを放出することを示した。

(2) 卵子・胚と周囲環境の相互作用：若齢・老齢ウシ由来のmiRNAの関与

- ①若齢由来と比較して老齢由来の卵胞液で卵子の発育を行うと体外発育した卵子の受精能力が著しく減退することが明らかになった。また体外成熟においても、卵子成熟の促進やギャップ結合の閉鎖が早まり、活性酸素種の過剰産生や多精子受精などの異常受精が起きた。また加齢個体の卵胞液中に多いまた少ないmiRNAを同定することが出来た。
- ②子宮内に胚の存在の有無で子宮上皮の細胞の遺伝子発現は著しく変化していた。さらに上流因子としてのmiRNAを同定することが出来た。

(3) 若齢および老齢マウスモデルにおける全身性エクソソーム内miRNAの特定

全身性のエクソソームの重要性を見出すため、若齢・老齢マウスから採血し、高純度のエクソソームの抽出に成功した。small-RNA-seq解析を行い、老齢特異的に変動するmiRNAを同定することが出来た。

4. 研究の反省・考察

(1) 若齢・老齢ウシにおけるエクソソーム内miRNAおよび老化関連因子の探索

異なるステージと卵胞の質を組み合わせることで、正常で高質な卵胞に関連するmiRNAの絞り込みが出来た。従来の研究では1回の網羅的解析から得られる候補は数十-数百と非常に効率の悪いものであったが、今回の検討では数個のmiRNA候補を選び、体外の培養系で検証したところ予想どおり卵子の体外発育や成熟を左右する結果を得ることが出来た。体内で発育した胚の中で低発現の遺伝子群の多くはmiRNAに関連付けられ体内ではmiRNAによる胚の発生制御が行われているものと考えられた。これらのmiRNAを培地に外挿することで胚の発生を改善する可能性があり、次年度検討を行う。

(2) 卵子の体外発育培地への卵胞液の添加により、若齢ウシ由来卵子の受精能力が低下したことは、月齢依存的な卵子の質低下が外部環境によって引き起こされている可能性があることを意味している。また月齢依存的に増減するmiRNAが同定できたため次年度これらの卵子発育に及ぼす影響を検証する。さらに、卵子の存在によって変動する子宮上皮の遺伝子発現が関連付けられるmiRNAを同定できた。これらは胚の遺伝子発現と一部オーバーラップしているものがありこれらの機能解析を次年度行う。

(3) 若齢および老齢マウスモデルにおける全身性エクソソーム内miRNAの特定

small-RNA-seq解析を行い同定したmiRNAは、次年度では初期胚の培地に外挿して胚発生に及ぼす影響を検証する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H

「Differential effects of mitochondrial inhibitors on porcine granulosa cells and oocytes.」 *Theriogenology* Vol. 103 pp. 98-103 2017年

- ②Itami N, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H

「Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown in vitro.」 *Zygote*

Vol. 25 pp. 65-74 2017年

- ③Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H
「Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles.」 *Molecular Reproduction and Development* Vol. 84 pp. 44-54 2017年
- ④Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K
「Age-associated mRNA expression changes in bovine endometrial cells in vitro.」 *Reproductive Biology and Endocrinology* Vol. 15 63 2017年

(2) 口頭発表

- ①Iwata H. Granulosa cell number and oocyte growth. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan. (招待講演 シンポジウム)
- ②Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Exosome-free follicular fluid has differential ability to support granulosa cell and oocyte development. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan.
- ③Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Inflammation, interferon signaling, and cell cycle-related genes are changed with aging in bovine endometrial cells. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan.
- ④Shirasuna K, Tanaka H, Ohtsu A, Nakamura Y, Kawahara-Miki R, Iwata H, Kuwayama T. Inflammatory-related factors are activated depending on aging in bovine oviduct epithelial cells. Fourth World Congress of Reproductive Biology. 2017 Sep 27-29, Okinawa, Japan.
- ⑤Kin A, Kansaku K, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Age-associated increases in mitochondrial DNA mutations in bovine oocytes. The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine. 2017 Oct 14-15, Osaka, Japan.
- ⑥Munakata Y, Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial damage increases cell free mitochondrial DNA in spent culture medium of cumulus cells and oocyte complexes. The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine. 2017 Oct 14-15, Osaka, Japan.

(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 －原因遺伝子の同定とてんかん外科の基礎研究－		研究分野	農 学
キ ー ワ ー ド	①てんかん ②自然発症性疾患モデル ③遺伝子解析 ④てんかん外科			

○研究代表者

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

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
盆 子 原 誠	獣 医 学 部	教 授	遺伝子解析指導
近 江 俊 徳	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
大 和 修	鹿 児 島 大 学 学 部 共 同 獣 医 学 部	教 授	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
太 組 一 朗	聖 マリアンナ 医 科 大 学 学 部 医 学	准 教 授	てんかん外科(外科技術)指導
川 上 康 彦	日 本 医 科 大 学 学 部 医 学	准 教 授	てんかん外科(脳波解析)指導

自然発症性家族性てんかん猫の包括的研究 —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。

- ①FSEC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当初想定していたLGIファミリー（平成27年度）およびそれに関連するADAM22およびADAM23（平成28年度）の機能的クローニング解析では、原因／関連遺伝子となるような変異は認められなかったため、平成29年度は下記②の広範囲なゲノム解析に全面移行する。なお、猫LGIファミリーおよびADAM22、ADAM23の解析結果については順次公表する。
- ②昨年度4頭のFSECにおけるNGSを用いた全ゲノムシーケンス (WGS) を行い、結果約7,000のアミノ酸置換を検出したが、低カバレッジであった。本年度は63,000SNPsのジェノタイプングが可能な猫SNP Array（米国Morris Animal Foundationの許諾を得て使用）を用いて96検体（FSEC及び遺伝学的に近縁な個体の合計81頭）をジェノタイプする。この結果を用いて、ゲノムワイド解析（連鎖解析、伝達不平衡検定[TDT]、ケース・コントロール解析）を実施する。これにより、FSECのてんかん発症に関与する座位の同定が可能となると考えた。昨年度のWGSはカバレッジが20を下回っていたため、illumina HiSeq X Tenを用いて高カバレッジのWGSデータ（4頭）を取得し、ゲノムワイド解析にて示唆された座位を探索することで、FSECの疾患原因/感受性バリエーションの同定に繋がると考えた。

(2) FSEC を利用したてんかん外科の基礎研究

- ①昨年度から開始したFSECと健常猫を比較するVoxel-based morphometry (VBM) 法について解析および考察をつめて、研究報告および学術論文として公表する。また平成27年度から測定・解析を行ってきたMRスペクトロスコピー (MRS) に関して、その有用性につ

いて結論づける。

- ②昨年度にFSECの代替として健常ビーグル犬を用いた前側頭葉切除術を行っており（これまで4頭）、追加実験を行い（3頭）、前側頭葉切除術の術式および術後合併症について考察する。くわえて最終的に猫での応用を含めた、無鎮静無拘束下での脳波測定法および定量的手術実現のための手術支援画像作成を検討する。

3. 研究の成果

(1) FSECの原因遺伝子の同定

- ①前述の通り、本年度の研究自体は下記②の広範囲なゲノム解析へシフトした。昨年まで解析を行ってきた猫LGIファミリーの同定および変異解析については、BMC Veterinary Research誌で公表した。
- ②SNP Arrayにおいて、総じて良好なジェノタイピング・データ・クオリティーが得られた。連鎖解析では、D2染色体にてSuggestive linkage (LOD score > 2) を認めた。さらにB1、B3、B4にもLOD score > 1を認めた。TDTではB3染色体に最も強い関連を認めた。ケース・コントロール解析ではC1に最も強い関連を認めた。上述の3つの手法にて得られた座位の近傍には、てんかん発症に寄与し得る、AMPA受容体やカリウム及びカルシウムチャンネルをコードする遺伝子やてんかん脳にて発現が亢進する遺伝子が認められた。これら座位における、かつFSECにてユニークな、遺伝子変異およびコピー数バリエーションを、本年度新たに獲得した高カバレッジ (30X) のWGSデータを用いて検討中である。

(2) FSECを利用したてんかん外科の基礎研究

- ①最終的に、VBM解析では5頭のFSEC（これら5頭は通常のMRIでは明らかな構造異常を示さなかった）で海馬および／あるいは扁桃体に有意な灰白質容積の減少を認めた。本結果は9月にフィンランド・ヘルシンキで開催された欧州獣医神経病学会-専門医協会 (ESVN-ECVN) の年次大会でポスター発表し、現在Frontiers in Veterinary Science (Neurology and Neurosurgery) 誌に投稿、リバイス中である。一方、MRSの解析では、本来ならばFSECでてんかん原性領域と考えられる扁桃体や海馬での解析が望ましかったものの、猫の脳サイズが小さいために視床でしかスペクトログラムを測定することができなかった。しかしながら、FSECsではN-アセチルアスパラギン酸（減少）、グルタミン・グルタミン酸複合体（上昇）の有意な左右差が得られた。FSECsは個体によって焦点側が異なるため、MRSの結果のみで判断することはできないものの、発作焦点の側方性検索において一役を担えるものと考えられた。
- ②昨年度に引き続き、3頭の健常犬で前側頭葉切除術を行い、合計7頭における本術式およびその術後合併症について評価した。扁桃体および海馬吻側を含めた前側頭葉切除は7頭中5頭（71%）で成功し、2頭は術中の脳底動脈分枝からの制御不能な出血のため術中安楽死した。手術に成功した5頭中1頭は、皮膚縫合時に突然の心拍停止で死亡した。残りの4頭について、術後3ヵ月間のモニタリングおよび追跡MRI検査を行った。1頭は術後なんら合併症を認められなかった。残りの3頭では、一過性の対側性視覚障害および同側の側頭筋萎縮が認められたが、視覚障害は時間経過とともに回復した。これら術後合併症を示した個体では術後の追跡MRI検査において手術による浮腫あるいは損傷が視索領域に及んでいた。上述した前側頭葉切除術をより正確により低侵襲に行うためには、ニューロナビゲーターなどの手術支援画像が必要と考えられたため、それを可能にするためのMRI対応頭部固定具の開発を行った。一方、ワイヤレス生体計測装置を導入し、てんかん外科の術前検査として必須となる発作時脳波を取得するための無麻酔無拘束脳波測定を犬および猫で検討した。その結果いずれの動物種でも脳波測定は可能であるが、電極を止めておくための頭部包帯を嫌がり外そうとする行動が認められ、それを防除するためのエリザベスカラーの装着や多の方法を考慮する必要性があると考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) FSECの原因遺伝子の同定

これまでの FSEC の系統・維持において、未発症個体のゲノム DNA を確保していなかったことで、解析の幅が狭まってしまった。また、FSEC では近親交配が行われているため、解析検出力の低下が生じてしまった。しかしながら、本年度のゲノムワイド解析によって、いくつかの座位が示唆されたことは興味深い。連鎖解析にて D2 に Suggestive linkage が認められたが、家族性てんかんなどに代表される複雑疾患では、人医学においても Suggestive linkage のみを認めるという報告も少なくはない。今年度新たに獲得した WGS データは高カバレッジであり (30X)、猫 WGS データ・コンソーシアム (米国 99 Lives Consortium) と共同し (200 頭近いてんかんではない猫との) 比較検討が現在進行中である。

(2) FSEC を利用したてんかん外科の基礎研究

平成 27 年度から始まった本研究において、FSECs における拡散強調画像 (発作間欠期-発作後期)、脳灌流画像 (発作間欠期-発作後期)、MRS および VBM 解析を行うことができ、MRI で行えるてんかん原性領域の検索技術はおおよそ完成されたといつて良いだろう。今後は FSEC における個体毎のてんかん原性領域の同定をビデオ脳波、MRI と組み合わせて行っていく、本研究で犬において確立できた前側頭葉切除術を FSECs に応用していく所存である。またこれらの技術は、動物病院に来院するペットの犬猫に対しても十分適応可能であることから、近い将来的、難治性てんかんに苦しむ犬および猫に対する術前検査およびてんかん外科が実施されるものと期待する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hamamoto Y, Hasegawa D, Mizoguchi S, Yu Y, Wada M, Kuwabara T, Fujiwara-Igarashi A, Fujita M. Changes in the interictal and early postictal diffusion and perfusion magnetic resonance parameters in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Research* 133:76-82, 2017.
- ② Yu Y, Hasegawa D, Fujiwara-Igarashi A, Hamamoto Y, Mizoguchi S, Kuwabara T, Fujita M. Molecular cloning and characterization of the family of feline leucine-rich glioma-inactivated (LGI) genes, and mutational analysis in familial spontaneous epileptic cats. *BMC Veterinary Research* 13:389, 2017.

(2) 口頭発表

- ① 長谷川大輔. 脳MRIの新しい撮像技術. 獣医神経病学会2017 (2017年7月8日・東京)
- ② 長谷川大輔. てんかん発作重積とてんかん外科. 第10回中部小動物神経病検討会 (2017年8月25日・名古屋)
- ③ Hamamoto Y (ポスター発表). Statistical structural analysis in familial spontaneous epileptic cats using voxel-based morphometry. Annual congress of ESVN-ECVN 2017 (2017年9月21-23日・フィンランド、ヘルシンキ)
- ④ Yu Y (ポスター発表). Evaluation of the epilepsy associated genes in familial spontaneous epileptic cats using whole genome sequencing. Plant & Animal Genome Conference XXXVI (2018年1月13-17日・米国、サンディエゴ)

(3) 出版物

なし

学 校 名	麻 布 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	動物疾患のマイクロバイーム研究の基盤形成 －細菌叢研究を基盤とする病態解析と治療戦略－		研究分野 農 学
キ ー ワ ー ド	①犬 ②獣医療 ③マイクロバイーム 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	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	獣 医 学 部	准 教 授	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	獣 医 学 部	准 教 授	組織細菌叢と病理組織像の関係解明
森 田 英 利	岡 山 大 学 ・ 環 境 生 命 科 学 研 究 科	教 授	組織細菌叢の解析・個別菌の解析
服 部 正 平	早 稲 田 大 学 大 学 院 ・ 先 進 理 工 学 研 究 科	教 授	宿主－細菌叢相互作用の分子機構の解明・菌組成比に基づく主成分分析

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

1. 研究の目的

進化の過程で常在細菌叢（マイクロバイーム）とその宿主動物は共生システムを形成し、このバランスは免疫機能、肥満、心身の発達などに大きく関与する。宿主側からの要因（食事や生活様式等）が常在細菌叢の破綻（ディスバイオシス）を生じ、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。本研究では、獣医学の分野でこれまでに試みられなかった細菌叢共生システムを探求し、健常個体（宿主）の恒常性機能における細菌叢の果たす役割を調べると共に、細菌叢の変化が及ぼす疾患への影響と治療法の確立を目指し、細菌叢共生システムの探求と新規治療法の確立に向けた応用動物科学研究を実施する。

- (1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢の同定: 健常個体と疾患個体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。細菌叢の変化と疾患との網羅的関連解析を実施し、ディスバイオシスをもたらす細菌叢の同定を目指す。
- (2) 分娩様式および環境要因が犬の腸内細菌叢（マイクロバイーム）に及ぼす影響: 細菌叢の定着は無菌状態での出産後の環境、特に母子間での伝達によってなされる。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ており (Oiszak, et al., Science, 2012)、出産後の細菌叢定着様式が、個体の疾患のリスク因子である。そこで、分娩様式の違いが、成長過程における細菌叢の定着と関連するかを明らかにする。
- (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: ストレスを受けた動物は様々な心身の変化を呈する。ストレスがアレルギー性疾患、心疾患、中枢機能障害、消化器障害など多くの疾患の原因であり、ストレス制御機構の解明は、様々な疾患の治療法につながる重要な課題である。腸内細菌叢がストレス制御に関わることが知られており、このことからストレス制御と細菌叢の関係を、高ストレス下にある犬を対象として解析し、またマウスを用いて、そのメカニズムを解明する。
- (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: ストレスによる腸内細菌叢のディスバイオシスと疾患とをつなぐバイオマーカーを探求し、臨床場面での新たな診断ならびに治療法の確立に役立てる。
- (5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明
細菌叢の変化が及ぼす疾患への影響に対して細菌叢を整えることで、細菌叢共生による新規治療法の確立を行う。

2. 研究の計画

- (1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢の同定
人との共通性が高い犬の疾病（アレルギー性皮膚炎、白内障、心筋症、炎症性腸疾患、末期癌等）を対象とする。疾患ストレスのある罹患犬と心理ストレスのある健常犬から、糞便、皮膚、涙液、唾液など細菌叢サンプルおよび血清、尿など生体試料を採取する。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、疾病関連と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
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とする。

(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

東日本大震災後に遺棄された犬は高いストレスレベルにあること、またヒトの心的外傷後ストレス障害様の行動と内分泌変化を示すことを見出してきた (Nagasawa et al. Sci. Rep. 2012)。同様のストレス下にあると想定される保護犬を福島県から譲り受け、長期リハビリテーション中のストレス応答性と腸内細菌叢の変化、ならびに社会性の変化を解析する。

さらに、マウスを用いて、ストレス誘発性の心身の変化における細菌叢の果たす役割の実証研究を実施する。これまでマウスでも幼少期のストレス経験が、生涯にわたる行動の異常と代謝内分泌疾患をもたらすことを見出してきた。本モデルを用いて、ストレス経験のマウスより採取した腸内細菌叢を、無菌マウスに定着させてノトバイオトマウスを作出、腸内細菌叢によるストレス応答性、中枢、行動、免疫系の変化を明らかにする。またヒトのストレス応答は、イヌとの共生により改善されること、特にヒトの心的外傷後ストレス障害に効果があることが知られており、これの要因の一端に、イヌからの細菌叢の定着が考えられる (Fujimura et al, PNAS, 2014)。このことから、イヌの唾液を摂取させたマウスの内分泌変化ならびに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

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。

(5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明

ストレス誘発性細菌叢を改善する候補となる生菌を分離して、細菌叢破綻の改善を指標とした臨床試験を実施する。

3. 研究の成果

(1) 犬の疾患病態に影響する腸内細菌叢の同定

それぞれ、アレルギー性皮膚炎 20 頭、白内障 13 頭、心筋症 2 頭、炎症性腸疾患 1 頭、鼻腔及び口腔腫瘍 4 頭とおよそ同数の健常犬より経時的に糞便、皮膚、涙液、唾液など細菌叢サンプルを採取した。このうちアレルギー性皮膚炎と白内障を発症した同一犬種より細菌叢のゲノム DNA を精製して、次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌叢解析を実施した。UniFrac 解析 (群集解析) 等を行い、アレルギー性皮膚炎をもつスタンダードプードルの腸内細菌叢において α 多様性と β 多様性に差があることが示唆され、白内障およびアレルギー性皮膚炎をもつトイプードルの涙液細菌叢において、 β 多様性に有意差があることが示された。(in preparation)

(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

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て 16S 解析を行った。子犬の皮膚および腸内細菌叢は、経日的に細菌叢に変化が生じ、2 歳齢では成犬と変わらないことが、 α 多様性と β 多様性の差から明らかとなった。(in preparation)

(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

福島県で遺棄された保護犬の長期リハビリテーション中の細菌叢ならびにストレス応答性を 3 年間、10 頭追跡した。導入直後のグルココルチコイドは平常時の 5-10 倍と高く、2 週間から 1 か月で平常値に戻った。また不安や恐怖の行動スコアが低下し、愛着のスコアが上昇した。並行して腸内細菌叢が変化し、腸炎などの疾患と関連の深いクロストリジウム科が低下、*Ruminococcus gnavus* の上昇が確認された。また保護犬が譲渡され、家庭犬となった後の追跡では、大腸癌の抑制効果を持つ *Lachnospiraceae* が上昇した。このように、ストレスに応じた細菌叢のダイナミズムが捉えられた。

マウスを用いた実証研究では、ストレス症候を呈する動物由来の細菌叢を無菌マウスに投与し、ノトバイオトマウスを作成、行動と免疫、中枢機能を評価した。ストレス動物

由来の細菌叢はマウスのうつ様行動を増加させ、新奇物に対するパニック様行動を誘発した。胃潰瘍を併発、消化管ならびにいくつかの免疫器官において、制御性T細胞の発現が抑制され、中枢では栄養因子の発現が低下した。心身共に障害が検出され、細菌叢がストレス感受性に大きく関与することが明らかとなった。

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。非常に興味深いことに、犬の唾液を投与されたマウスと同居したマウスの脳内オキシトシン濃度は上昇した。オキシトシンはヒトの心的外傷後ストレス障害様を軽減させる効果を持つことが示唆されており、イヌとの共生によるストレス応答性の改善効果が、イヌからの細菌叢を介したオキシトシン分泌上昇である可能性を見出した。

(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

イヌの*CD14*遺伝子のクローニングを行い、犬種における一塩基多型(SNP)の存在を明らかとした。*CD14*遺伝子のAP-1転写領域にSNPが存在したが、発現に対する影響は見いだせなかった。SNPの有無とFACSを用いた単球表面のCD14発現には違いが示唆されたが、SNPの有無とアトピー性皮膚炎の発症との間に関連性は見いだせなかった。(in preparation)

(5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明

近年、健康人の皮膚細菌叢より分離された*Roseomonas mucosa*塗布が、アトピー性皮膚炎の破綻した皮膚細菌叢を改善することが報告された(Myles et al., JCI Insight, 2018)。この菌が、健康犬および子犬の細菌叢にも存在することが明らかとなった。

オオカミに由来するイヌは肉食である。高蛋白負荷に伴う腸内細菌叢の変化が、アレルギー性皮膚炎のイヌ腸内細菌叢に有用であるかを調べるために、獣肉を用いて高蛋白食になるように調整して、食事摂取前後の腸内細菌叢解析を行った。イヌ2頭に実施し、1頭の症状が改善したが、腸内細菌叢に有用と知られる*Lactobacillus*、*Bifidobacterium*属の顕著な増加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

犬の疾患病態に影響するストレス誘発性細菌叢の存在を示すデータが得られ、獣医領域における細菌叢解析の重要性を示すことができた。いくつかの症例では、飼い主の同意が得られにくく収集が進まない疾患分野もあった。引き続き検体収集とディスバイオシスの存在が明らかとなったアレルギーおよび白内障におけるストレス誘発性細菌叢の解析を進め、その因果関係の解明と治療法の確立につなげたい。

(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

出産前から2年間にわたる腸内細菌叢の定着を追跡した世界初の研究となった。さらに分娩様式の異なる同胎の子犬の追跡は、ヒトでは実現不可能なケースであった。発達に伴う細菌叢の構成は劇的に変化したことから、年齢のみならず食や環境の影響を受けつつ定着することが示された。分娩様式が子犬の皮膚および腸内細菌叢に影響を与えるか否か、明確な解答をすることができなかったが、一因として皮膚および糞便が経日的に変化することが明らかとなったことで解析手法がより複雑化したことが考えられた。

(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(H28の実績報告記載のまま)

ストレス応答性に関連するイヌの腸内細菌叢のダイナミズムが明らかになった。特にストレス状態が改善されることで、有益な菌種が増加したことから、細菌叢と疾患の循環様式の存在が示唆された。これまでヒトやマウスで報告されていたが、今回の研究で改めて、疾患の背景にあるストレスディスバイオシスが認められたことから、細菌叢を対象にした治療法の確立に向けた第一歩といえる。

マウスを用いた実証研究でも有益な結果が得られた。ストレス状態にある動物の細菌叢は、多個体に作用して、ストレス応答性を鋭敏化させることが示された。特にうつ様行動が増加、パニック障害、脳内の発育に悪影響を与えたことは、腸内細菌叢のもつ役割の重

要性を示せた。また胃潰瘍、免疫疾患の背景となる分子細胞変化を同定した。特に免疫疾患では、アレルギー性反応を抑制する制御系 T 細胞が減少したことから、ストレスを介したアレルギー症状の悪化の要因に、細菌叢の変化を見出せたことは重要な知見である。

イヌの唾液投与によって、オキシトシンの分泌が上昇したことは大きな発見である。これまでイヌとの生活がヒトの心身、特に精神疾患に有用であることが疫学的に知られていたが、今回、そのメカニズムとしてイヌが保有する細菌叢によって、ヒトのオキシトシン分泌が上昇、精神症状が改善されることが示唆され、世界初の発見となった。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

CD14 遺伝子 AP-1 転写領域に存在する SNP が発現に対して影響しなかったことで、この SNP の腸内細菌叢に及ぼす影響を調べる理由が脆弱となった。メタボローム解析などの新技術を用いることで、新規バイオマーカーを探索できるかもしれない。

(5) ストレス誘発性細菌叢の制御方法の確立と臨床的有効性の解明

皮膚の細菌叢破綻を改善する可能性のある菌種が、イヌの皮膚においても存在することが明らかとなった。しかし、イヌ本来の食性に戻した場合では、従来報告されている腸内細菌叢を改善する細菌種の顕著な変化は観察されなかった。イヌ本来の食性では、現在、ヒト化されたイヌの腸内細菌叢と異なった細菌種に着目する必要があるかもしれない。今後、症例数を増やして進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Yoshizawa M*, Kawarai S*, Torii Y, Ota K, Tasaka K, Nishimura K, Fujii C, Kanemaki N. Eosinophilic plasmacytic conjunctivitis concurrent with gingival fistula caused by *Schizophyllum commune* in a captive cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Med Mycol Case Rep.* 2017. 18:34-9. *co-first author
- ②Yamazaki Y, Kawarai S, Morita H, Kikusui T, and Iriki A. Faecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection in a marmoset. *BMC Vet Res.* 2017. 13(1):150.

(2) 口頭発表

- ①西山優太、福山泰広、川原井晋平、金井詠一、安齋眞一、斑目広郎、代田欣二、圓尾拓也、パピローマウイルス介在性多中心性皮内扁平上皮癌の犬と猫の2例
- ②加藤なつ紀、高橋聡一郎、田端伴行、村上弘正、斑目広郎、代田欣二、川原井晋平、猫アレルギー性皮膚炎におけるFcεR1αを用いた血清抗原特異的IgE検査の検討、
- ③久保田翔太、仁比大記、園尾美穂、加藤なつ紀、望月美佐、木内明男、川原井晋平、蓬来温泉のマラセチア性皮膚炎に対する緩和効果、
- ④渡辺征、長谷川雅邦、瀬川和仁、川原井晋平、久末正晴、ナファモスタットメシル酸塩によるLPS刺激犬末梢血単核球のTNF-α産生抑制効果
- ⑤圓尾拓也、福山泰広、堀江和香、吉岡千恵、川原井晋平、犬の鼻腔腫瘍に対して照射とアクリジンオレンジ光線力学療法を実施した1症例、

(3) 出版物

- ①川原井晋平、松田秀則、荻田あづさ、伊東慶悟、安齋眞一. ロジックで学ぶ、犬と猫の臨床テクニック(第5回) 人医療から学ぶ獣医療の皮膚生検(解説). *Companion Animal Practice.* 2018. 33(3):52-7.
- ②久保田翔太、川原井晋平. その症状、歳のせいにしていませんか? 第3回皮膚. *SAC.* 2018. 190: 4-11.
- ③川原井晋平. 「細菌とアレルギーの新しい考え方(ブドウ球菌、腸内細菌叢を含む)」に寄せる、犬のアレルギー性皮膚炎と表在細菌(解説). *アレルギーの臨床.* 2017. 37(12):1163-9.

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
鶴 間 和 幸	文 学 部 史 学 科	教 授	研究代表者 統括・アジア古写真と東洋学

○研究分担者

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	統括補・アジア古写真全体
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	東 京 都 公 文 書 館	学 芸 員	絵はがき資料

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、絵葉書の製作・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、古写真や絵葉書は劣化が激しく、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葉書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・絵葉書・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29年度は、書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの150年』（研究計画段階での名称は「旅するアジア—写真と旅行記が語る近代」）の発行を目標とする。そのために、以下の作業に

取りくむ。

(1) 書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの 150 年』の発行

出版社を介した商業出版とする。学習院大学所蔵資料を中心とした古写真・絵葉書の図版を都市別にまとめて掲載し、都市の歴史とともに各図版に解説（一部には現在の写真）を付し、現在の地図上に撮影地の位置を示す。また、その都市を旅した人々の旅行記の記述により都市の風貌を描きだす。

(2) バーチャル・ミュージアムの完成

平成 27 年度に試用版が完成し、平成 28 年度に内容を充実させたバーチャル・ミュージアムを完成させる。撫順・瀋陽・蘇州・台中などのページを追加したうえで、ページ閲覧の操作性を改善する。青島・台中・台南で現地調査した成果を反映させる。

(3) 資料調査

学習院大学所蔵の絵葉書・古写真の撮影地点を古地図から特定し、旅行記に描かれた旅のルートを把握する。

(4) 現地調査

青島・台中・台南で現地調査を実施する。絵葉書・古写真に写された建築物や通りなどの現状について、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) 書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの 150 年』の発行

研究成果として村松弘一（学習院大学）・貴志俊彦（京都大学）を編者として、書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの 150 年』（勉誠出版、平成 30 年 3 月）を出版した。B5 版全 176 頁、フルカラー。目次は下記のとおりである。

旅のはじめに

絵葉書の誕生

本書とあわせて—絵葉書・古写真データベースの利用

東アジア地図・凡例

◆中国東北部（旧満洲）を旅する

大連—「満蒙」の玄関口／旅順—日露戦争の戦跡観光／瀋陽〔奉天〕—清朝の故地から近代都市へ／撫順—炭鉱の街／長春〔新京〕—「満洲国」の計画都市／哈爾濱—東洋の小パリ

◆華北を旅する

北京—八〇〇年の古都／西安—古都・長安の黄昏／青島—紅い瓦と碧い海／済南—泉の都

◆華南を旅する

上海—「魔都」と呼ばれた街／杭州—湖光山色／蘇州—詠われた水郷／南京—文雅の淵藪／香港—世界にひらく移民雑居の街

◆台湾を旅する

台北—「南進」の拠点／台中—台湾第二の都市／台南—重なり合う歴史の街

◆朝鮮半島を旅する

ソウル〔京城〕—朝鮮半島の中核都市／仁川・水原—ソウル近郊の都市／慶州・大邱—慶尚北道の都市／釜山（プサン）—港湾都市／平壤（ピョンヤン）—朝鮮半島第二の都市

旅のおわりに—描かれた近代都市・建築をめぐって

読者のためのブックガイド

このほかに、「旅の道標」と題するコラムを 17 点、同じく「あの作品の舞台」を 12 点掲載した。

(2) バーチャル・ミュージアムの完成

代表者を中心にページ閲覧の操作性を改善したうえで、撫順・瀋陽・蘇州・台中などのページを追加し、さらに既存の内容についても平成 29 年度に新たに判明した調査結果を

反映させた。

(3) 資料調査

古書店から絵葉書を購入し、絵葉書の写真に関する情報をバーチャル・ミュージアムおよび書籍『古写真・絵葉書で旅する東アジアの150年』に反映した。

また、研究に関する情報収集のため以下の施設を訪れた。

- ・名古屋市立博物館：企画展「異郷のモダニズム—満洲写真全史」の観覧、および学芸員による解説会「建国と崩壊のグラフィズム」への参加（6月17日）
- ・日本郵船歴史博物館：常設展示・特別展示の観覧（7月25日）

(4) 現地調査

絵葉書・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29年度は台北・台中・台南・青島へ赴き、30余枚分の建築物の写真を撮影した。

台北・台中では、学習院大学所蔵の5枚の絵はがきを取り上げ、

- ① 日本統治期に建てられて現存するもの（総督官邸〔現台北賓館〕
- ② 日本統治期に建てられて現存しないもの（鉄道ホテル〔現新光三越ビル〕）
- ③ 日本統治期に撮影された場所（日月潭）

以上の三つに分類したうえで調査、撮影を行なった。

青島では学習院大学所蔵の19枚の絵葉書を取り上げ、

- ① ドイツ統治期に建てられたもの（忠の海海水浴場〔現在第一海水浴場〕、青島市迎賓館〔現在ドイツ総督旧址博物館〕、青島基督教堂、青島小学校〔現在総督府童子学童旧址〕、青島守備軍司令部〔現在人大常委会〕、日本領事館〔現在徳華銀行旧址〕、青島軍政署〔現在膠州帝国法院旧址〕、青島郵便局〔現在郵電博物館〕、陸軍病院〔現在総督府野戦病院旧址〕、青島桜公園〔現在中山公園〕、守備軍万年兵営〔現在中国海洋大学〕、高等女学校〔現在青島医学院黄台路教学区〕）
- ② その他（青島神社〔現在貯水山児童公園〕、青島栈橋）

以上の二つに分類したうえで調査、撮影を行った。

4. 研究の反省・考察

本研究は三年間の研究を通じて、現地調査／バーチャル・ミュージアム／展覧会／書籍刊行という年次計画を順番に実施し、平成29年度には最終目標の書籍刊行を達成することができた。その時々ではかならずしも十分なものではなかったかもしれないが、全体として大変大きな成果を得たと言ってよい。所蔵する絵葉書資料のボリュームはかなり増えたので、将来的にはバーチャル・ミュージアム等を通じた他大学とのWEB情報共有によってより広汎な資料を活用できることとなるだろう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 武藤那賀子「『台湾研修』事前学習会」（於お茶の水女子大学附属高等学校、平成29年7月24日）
- ② 曹雯「清末租界発展終末」（於学習院大学、平成29年8月17日）学習院大学東洋文化研究所
- ③ 村松弘一「『古写真』の書誌学の試み—足立喜六『長安史蹟の研究』からの発想」（於：学習院大学東洋文化研究所「連続講座 東アジア書誌学への招待」）

(3) 出版物

- ① 貴志俊彦・村松弘一編『古写真・絵葉書で旅する東アジア150年』勉誠出版、平成30年

学 校 名	昭 和 女 子 大 学	研究所名等	国 際 文 化 研 究 所	
研 究 課 題	ベトナム・クーラオチャム島の日越共同考古学調査 —文化資源を活用した島の観光開発—		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①ベトナム ②ホイアン市 ③考古学 ④観光開発 ⑤文化資源 ⑥遺跡の保存と活用			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
菊 池 誠 一	国 際 文 化 研 究 所	副 所 長	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 藤 勝 洋	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	観光まちづくり
大 橋 康 二	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	出土陶磁器調査
菊 池 百 里 子	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	発掘調査・観光開発
歳 原 佳 世 子	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	発掘調査
四 日 市 康 博	国 際 文 化 研 究 所	研 究 員	文献調査
田 中 眞 奈 子	人 間 文 化 学 部	講 師	文化財科学
山 岸 良 二	人 間 文 化 学 部	講 師	文化遺産調査・博物館展示調査

ベトナム・クーラオチャム島の日越共同考古学調査 －文化資源を活用した島の観光開発－

1. 研究の目的

(1) 文化資源を活用した島の観光開発

①ベトナム中部に位置するクアンナム省ホイアン市の東海上にクーラオチャム島がある。この島は七つの島からなっており、人が住む島はホンラオと呼ばれる比較的大きな島で住民の大半は漁業関係者である。また、高級食材として知られる海燕の巣が島の外洋面の洞窟から採取され、その採取関係者も居住する。

1997年頃に、この島の沖合の海底から15世紀頃の大量の陶磁器が引き揚げられ、この島の歴史的背景がにわかに注目を浴びた。また、9世紀から10世紀頃に書かれたアラブ商人の航海記にこの島の様子が記されている。それによると、真水が補給できる島という。こうしたことから、1998年から翌年にかけてハノイ国家大学が発掘調査を実施したところ、9世紀から10世紀頃のイスラム・ガラスや陶器、また同時代の中国陶磁器が出土し、アラブ商人の記録を裏付けることとなった。以後、ベトナム歴史学界はこの島の歴史上の重要性を認識してきたものの、継続調査が行われることはなかった。

島を管轄するホイアン市当局は、ホイアン市旧市街地がユネスコの世界遺産に登録されているため、その観光開発の一環として、近年この島の観光開発を考えてきた。特に欧米人が近年、離島をリゾート地と考え、この島に行く観光客が増えてきたことが開発の要因でもある。

我われは、1993年から日越共同考古学調査チームを編成し、ホイアン旧市街地の考古学調査や歴史調査を実施し、現在も継続中である。こうしたホイアン地域の歴史的研究から、この島の重要性を踏まえ、日越共同の調査を考えてきた。そのため、まずは観光開発に先立つ日越共同考古学調査を実施し、島の文化遺産状況を確認し、下記の視点から考古学調査をし、島の観光開発に資することを目的に活動することにした。

- ②西アジア世界と中国世界が結びついた“海のシルクロード”のなかで、この島の位置を世界史視点から解明すると同時に、歴史上にはたした役割を解明することが必要と考え、その位置づけのための発掘調査を島内で行う。
- ③ホイアン市が進めている島の観光開発に、歴史学・考古学の視点を導入し、島に残る遺跡や出土品、調査成果を観光開発の資源として活用する観光開発計画案を策定する。そのため、島の文化遺産の悉皆調査と考古学調査を実施、観光アプリの開発をし、観光客に島の歴史的背景を理解してもらう。
- ④上記の調査等をへて、観光開発計画をホイアン市当局に提言し、文化遺産を活用した観光開発を推進することを目的とする。

2. 研究の計画

(1)クーラオチャム島で発掘調査を実施し、島の歴史的意義を解明すると同時に観光開発に資する観光アプリの開発をする。

- ①【4月～7月】ベトナム側の関係機関（ハノイ国家大学、ホイアン市遺跡保存管理センター等）と考古学調査上の諸手続きを行う。
- ②【8月～9月】クーラオチャム島において発掘調査を実施し、遺跡の歴史的意義を解明し、島の世界史上における位置づけを行う。また、出土遺物の整理作業（写真撮影、実測等）をホイアン市博物館において実施する。島での調査は10日間ほどを予定している。
- ③【10月～3月】昭和女子大学において出土遺物図面のトレース作業を行う。観光アプリの開発をする。調査チームでの勉強会を設け、出土陶磁器やガラス製品についての共通の理解と今後の研究方針を確認し、次年度に備える。

3. 研究の成果

(1)クーラオチャム島の①文化財分布調査、②考古学調査、③資料館調査を実施している。こ

これらの計画は、ハノイ国家大学・クアンナム省文化局・ホイアン市遺跡保存管理センターと共同で実施している。調査中は、ベトナムテレビ局(VTV1)の密着取材もあり、ベトナム側の関心は高い。

①文化財分布調査：島内には、文化財が広く分布していることがわかった。しかし、案内板の設置はほとんどなく、いくつかある案内板はベトナム語での説明であり、外国人観光客に資するものではなかった。また、ホイアン市には旧市街地用の観光ガイドの育成はあるものの、島の歴史や文化遺産をよく知ったガイドも滞在しておらず、島の歴史を語る役割を果たしていない状況であった。

②考古学調査：発掘調査は、調査面積2m×2m四方の狭い試掘であった。しかし、9世紀前後のイスラーム・ガラスや陶器片、中国陶磁器片などが出土した。あらためて“海のシルクロード”上の要衝であったことが確認でき、今後、遺構確認が可能な本格的発掘調査実施の必要性があることを認識した。また、基礎的な遺物整理を実施したところ、遺物は、大きく分類するとイスラーム・ガラス、陶器と同時期の中国陶磁器、同時期のチャンパー陶器・土器が出土した。また、16世紀以降の中国陶磁器も存在した。

このことから、発掘地点は9～10世頃の居住地の一部と考えられ、その後は16世紀まで空白時期となっており、空白時期は島の別地点へ移動したものと考察される。イスラーム・ガラスは、薄青色、濃青色などのものであり、内陸シルクロード出土のイスラーム・ガラスの様相と異なっていることから、海路で運ばれたものと推測できる。

中国陶磁器は、越州窯系青磁、長沙窯陶器、白磁が出土し、初期貿易陶磁の様相を示している。9～10世紀頃のチャンパー陶器や土器の様相は、これまで当該時期の発掘調査件数が少なく不明であった。しかし、今回の調査によって陶器と土器が多く出土し、その様相がわかり、貴重な資料を得ることができた。このことは、チャンパー時代の研究に大きく貢献をするものと考察できる。

③資料館調査：調査展示品や解説が不十分であり、多くの問題点を確認した。具体的には、島内に資料館がひとつあるが、その展示面積に比べて展示品の少なさがめだつた。また、解説が不十分でベトナム語表記しかなく、外国人観光客に対応できていない状況であった。本来ならば、島の歴史的位置づけを世界史のなかに置き、島の重要性を語るとともに、島の動植物、海洋資源までを紹介するコーナーも必要と考えられる。以上のことから、現在の資料館を日越共同で知恵を出し合い、充実した資料館としていく努力が必要である。

4. 研究の反省・考察

(1) 調査研究は順調に進んでいる。予想以上にベトナム側の受け入れ態勢が迅速に進み、当初は予定していなかった試掘調査を実施することが可能となった。その結果、次年度の本格的調査に道を切り開くことができた。しかし、下記の点について今後、今まで以上に取り組んでいきたい。

①発掘調査で多くの遺物が出土したことにより、その整理作業に時間をとられてしまった。整理作業をした後でないと、学会報告もできないため、本年度の学会でその成果を公表できなかった。しかし、次年度以降には、その成果を積極的に学会報告したい。まずは、来春の一般社団法人日本考古学協会での報告となる。また、東南アジア考古学会での報告も考えている。同時に、ベトナム人研究者と共同でベトナムの専門雑誌への投稿も視野に入れている。

②国内の研究者とさらに研究交流を密にしていきたい。今回出土した遺物には、イスラーム・ガラスや陶器がある。そのため、当該分野の研究者を調査隊に入れると同時に、考古学だけではなく、文献史、文化財科学、博物館学分野の研究者との意見交流をし、有益な助言を得ることにしたい。特に、島の資料館の改善には、日本の博物館関係者の助言は有益となろう。そのため、調査関係者や助言が得られる研究機関や博物館の研究者との会合を積極的に開催したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし(初年度のため、ございません)

(2) 口頭発表

なし（初年度のため、まだ十分な遺物整理が終わらず、発表はございません）

(3) 出版物

なし（初年度のため、ございません）

学 校 名	成 城 大 学	研究所名等	民 俗 学 研 究 所
研 究 課 題	地域社会における関係性の変容に関する実証的研究 —循環的ソーシャルキャピタルの構築にむけて—		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①柳田國男 ②山村調査 ③海村調査 ④地域社会 ⑤日常生活 ⑥家業 ⑦ライフヒストリー ⑧循環的ソーシャルキャピタル		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 島 孝 夫	文 芸 学 部 ／ 民 俗 学 研 究 所	教 授 〓 所 員	地域社会における関係性の変容に関する研究の 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 宣 一	成 城 大 学	名 誉 教 授	地域社会における年中行事の変容と生活改善諸 活動の展開に関する調査研究
俵 木 悟	文 芸 学 部 ／ 民 俗 学 研 究 所	教 授 〓 所 員	地域社会における文化財保護活動の課題に関する 調査研究
亀 井 好 恵	民 俗 学 研 究 所	研 究 員	地域社会における人生儀礼の変容に関する調査 研究
今 野 大 輔	民 俗 学 研 究 所	研 究 員	地域社会における社会的弱者への対応に関する 調査研究
高 木 大 祐	民 俗 学 研 究 所	研 究 員	地域社会における民間信仰の展開に関する調査 研究
加 藤 幸 治	東 北 学 院 大 学 文 学 部	教 授	東日本大震災被災地における地域社会の再構築 に関する調査研究
玄 蕃 充 子	船 橋 市 教 育 委 員 会	学 芸 員	中山間地域における環境保全と資源利用に関する 調査研究
関 根 康 正	神 奈 川 大 学 日 本 常 民 文 化 研 究 所	客 員 研 究 員	都市生活における他者認識に関する調査研究
原 山 浩 介	大 学 共 同 利 用 機 関 法 人 人 間 文 化 研 究 機 構 国 立 歴 史 民 俗 博 物 館 研 究 部	准 教 授	地域社会における消費生活の生成と変容に関する 調査研究
丸 尾 依 子	山 梨 県 立 博 物 館	学 芸 員	離島における移住者の混住への対応に関する調査 研究
八 木 橋 伸 浩	玉 川 大 学 リベラルアーツ学部	教 授	町村合併の可否にともなう地域社会の再編に関する 現状と課題に関する調査研究
山 崎 久 登	東 京 都 立 砂 川 高 等 学 校	教 諭	離島社会における廃置分合の通史的調査研究
山 本 志 乃	旅 の 文 化 研 究 所	研 究 主 幹	地域社会における小資本生業の存立に関する調査 研究

地域社会における関係性の変容に関する実証的研究 —循環的ソーシャルキャピタルの構築にむけて—

1. 研究の目的

- (1) 地域をめぐる所与の環境との関係を循環的で強固なものに再構築するための関係性の検証
 - ① 平成23～25年度にわたり日本私立学校振興・共催事業団学術研究振興資金の研究助成を得て実施した「町村合併による社会・文化の再編に関する民俗学的研究—『平成大合併』を視野に一」の研究成果をさらに深化させることで、地域社会において自律的に形成されてきた住民自治のあり方を検証する。地域社会が直面している現状や課題を、主体となる地域社会に生きる人びとと所与の環境との関係を包摂的に把握することで、より安定した生活環境を維持することが可能になる循環的なソーシャルキャピタル（社会関係資本）を蓄積するための集団形成の論理を明らかにすることを試みる。
 - ② 今年度は、そのための具体的な方法として、地域で暮らす人びとのライフヒストリーを主たる資料とし、当該地域の日常生活を構成してきたさまざまな関係性を再検討し、当該地域の人びとのそれらに対する対応の分析をとおして、現在の地域社会の現状を包摂的に捉えなおすための実証的研究を行った。
- (2) 地域をめぐる所与の環境との関係を循環的で強固なものにするための関係性の再構築にむけた提言
 - ① 次年度以降は、上記のライフヒストリーの収集とそれらの分析作業を継続し、家業なき地域社会において紐帯となっている関係性の抽出を試み、現在の地域社会における集団形成の論理を明らかにするための検討を研究会で定期的に行う。
 - ② 定量的分析で把握される地域社会の現状は必ずしも、当該地域の暮らしの実態を示したものではないことを示し、当該地域において「ともに生きる」ことを選択した人びとの心意を明らかにしていくことで、地域社会における循環的で強固な暮らしにするための関係性の再構築にむけた提言を行う。

2. 研究の計画

- (1) 現地調査
 - ① 本学民俗学研究所が所蔵する、柳田國男主導により全国各地で同時に実施された共同調査である「山村調査」（昭和9年～11年）と「海村調査」（昭和12・13年）の調査地を主たる研究対象とした。平成28年度まで実施した「地域社会における関係性の変容に関する基礎的研究」において予備調査が終了している13地域を主対象に、各担当者が継続的に現地調査を実施した。
- (2) 研究会
 - ① 平成28年度までの基礎的研究においてすすめてきた調査成果の検証と共有を目途とした研究会を定期的で開催し、現地調査報告の成果を共有することを試みた。
 - ② 6月、7月、10月、12月に通常の研究会を開催し、3月にゲストスピーカーを交えた研究会を開催した。

3. 研究の成果

- (1) 現地調査
 - ① 予算の制約を調整しながら計画的な現地調査が実施された。前プロジェクトから継続されている対象地での継続的な調査活動は順調に推移している。今年度より着手した現地調査については、調査地や対象集団に関する基礎的調査に着手した
 - ② 今年度の現地調査の成果の概要は次のとおりである。平成の大合併にいたるまでの三次にわたる廃置分合は日本の経済活動を最優先させた施策で、当該地域で生きてきた人びとがともに生きることを前提として構築してきた循環的な関係を日常生活の要素ごとに分断させてしまうことにもなった。当該地域内で循環的に継承されてきた日常生活の諸要素が、経済活動に従属するような形で変容を余儀なくされていった。昭和の大合併は高度経済成長期を現出させることになったが、高度経済成長の展開につれて、自然

環境に依存する第1次産業は衰退し、日本社会の基層を形成していた世代を超えて継承されてきた家業も消失していった。家業の存在によって維持されてきた地域社会の紐帯も希薄なものになり、その後の市場経済の展開は地域社会における支えあう生活を急速に崩壊させていくことになった。平成の大合併がめざした行政的な公共性と当該地域社会で暮らす人びとが培ってきた自律的な公共性との間には大きな差異があり、前者の公共性は、主体となる人びと自身がそれらを選択しなければ受容できないものになりつつある。家業が消滅したことで、地域内においても世襲的な家業によって生計を維持してきた世代と、他の生業を選択した下の世代との間で当該地域社会に対する意識に齟齬が生じており、互助協同慣行などの協同性に対する意識も変容しつつある。総じて、地域社会内では自律的な生活意識が希薄化し、それにともない、主体を取りまく自然や社会を含む他者との関係性が大きく変容している。

前プロジェクトの成果を検証しながら継続調査を実施していくことで、上記の地域社会の現状をより明確に把握することができた。

(2) 研究会

- ① 全5回の研究会を計画どおりに実施した。報告者が現地調査の成果を報告し、その事例を題材に、各自の現地調査の成果をもとにした比較研究的分析を行なった。

第1回研究会 6月3日(土) 16:00-18:30

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第2回研究会 7月29日(土) 13:30-16:00

報告 ホンムラと他出者

—山梨県南巨摩郡早川町茂倉のソウニンソクの現状と課題— 小島孝夫

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第3回研究会 10月7日(土) 15:00-18:00

報告 追跡調査という一つの研究法

田中 宣一

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第4回研究会 12月22日(金) 18:00-21:00

報告 減る人口と増えた観光客

高木 大祐

議事 今期プロジェクトの研究計画等について

第5回研究会 3月17日(土) 15:00-18:00

報告 日本一人口が少ない町・早川町と日本上流圏文化研究所の20年

日本上流圏文化研究所前事務局長 鞍打 大輔

山村集落への他出者によるかかわり—その重要性と課題—

滋賀県立琵琶湖博物館学芸員 大久保実香

議事 今期プロジェクトの総括と次年度の研究計画等について

- ② 今年度の研究報告に共通したテーマとして人口減少地域における日常生活の現状や課題が検討された。第5回研究会では、このテーマについてより具体的な検討を行うために、第2回研究会報告の対象地において継続的な調査研究を実施しているゲストスピーカーを交えて、「中山間地域のくらしの現状と課題」に関する討議を行い、今年度の研究活動を総括した。

報告者の現地調査を題材に検討した成果は次のとおりである。日本の経済活動を最優先させた施策である三次にわたる廃置分合が地域社会にもたらしたのは、世襲的な家業の継承を前提に、「利用」と「保全」とのバランスを調整することで維持されてきた地域社会における生き方の転換であり、生活の場としての地域社会の変容であった。こうした転換や変容の実態を理解するためには行政側が強力に推し進めた施策が外因であったとしても、それらを受容・対抗した地域社会の人びとの内因を理解していかなければ、地域社会に生きる人びとがより安定した生活環境を維持することが可能になる循環的なソーシャルキャピタルを蓄積するための集団形成の論理を明らかにすることは困難である。かつての「利用」と「保全」とのバランスは、当該地域の時代的・社会的背景に応じて形成させたものであり、現在、私たちの眼前で展開されている地域社会の日常生活にいたるまでの、当該地域で暮らしてきた人びとの選択や決断の過程の理解を抜きにして、本研究の目標を達成することはできない。

次年度以降の研究活動の視座として、地域社会の日常生活の成りたちや移り変わりを

理解していくためには、当該地域の実態調査と併せて、当該地域の暮らしを大きな影響を与えてきた時代的・社会的背景にも留意していかなければならないことがプロジェクト参画者全員で共有されることになった。

4. 研究の反省・考察

(1) 現地調査

- ① 現地調査の進捗状況は、対象地域の事情や調査テーマにより一様ではない。
- ② 当該地域や集団が内包している複雑な関係性を理解していくためには継続的な現地調査が必須となるため、計画的な調査活動の実施にむけて調整を図りたい。

(2) 研究会

- ① 5回の研究会を開催したが、全員が毎回出席するということは困難であった。毎回の報告は個別に実施している調査の事例であるため、報告内容を全員で共有することが課題となった。
- ② この課題への対応策として、毎回の報告・討議内容を文章化することで、欠席者を含めた全員で共有できるようにした。各自の総括原稿を作成することや研究成果の出版作業にむけて、研究会での議論が記録化できるようになったことは初年度の大きな成果となった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 小島孝夫 「地域社会における祭礼の変容－埼玉県北足立郡伊奈町下郷区の春祈禱を事例に－」『日本常民文化紀要』33輯 15-52頁 成城大学大学院文学研究科 2018年3月
- ② 俵木 悟 「『正しい神楽』を求めて－備中神楽の内省的な伝承活動に関する考察－」『日本常民文化紀要』33輯 53-94頁 成城大学大学院文学研究科 2018年3月

(2) 口頭発表

- ① 小島孝夫 「島渡りという戦略－石川県輪島市海士町の海女の生き方－」2017年韓国文化人類学会大会 2017年10月20日

(3) 出版物

- ① 小島孝夫 (監修) アン・ミジョン『济州島海女の民族誌－「海畑」という生活世界－』アルファベータブックス 2017年11月
- ② 関根康正編 『ストリート人類学－方法と理論の実践的展開－』風響社 2018年2月

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・芸芸伝承

○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
林 容 市	文 学 部	専 任 講 師	芸芸伝達に関する実験と分析
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
横 山 太 郎	跡 見 学 園 女 子 大 学 文 学 部	准 教 授	芸芸伝承・能楽を廻る言説の研究
高 桑 い づ み	東 京 文 化 財 研 究 所	特 任 研 究 員	能の演出研究
玉 村 恭	上 越 教 育 大 学 学 校 教 育 学 部	准 教 授	能楽論の研究
Tomas Hare	プ リ ン ス ト ン 大 学 比 較 文 化 学 科	教 授	海外研究者総括・能と宗教・世阿弥の生涯
Monica Bethe	中 世 日 本 研 究 所	所 長	能の演出研究
Michael Watson	明 治 学 院 大 学 国 際 学 部	教 授	芸芸伝承・能楽社会の分析
Eike Grossmann	ハ ン プ ル ク 大 学 人 文 科 学 部	准 教 授	能楽史の研究・関連芸能
Paul Atkins	ワ シ ン ト ン 大 学 文 理 学 部 ア ジ ア 言 語 文 学 科	教 授	能の脚本構造の分析・金春禅竹の生涯
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

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拓け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) 前年度に引き続き各チームで研究を進め、従来の解説書等で手薄だった分野から優先的に、能楽全書の英語原稿としてまとめていく。同時に、成果を日本語・英語それぞれで論文化していく。
 - ① 能楽史に関しては前年度の近代史に続き、大和猿楽の成立に関わる部分の研究を進める。また、能楽の特殊な興行形態・人材育成・経済基盤・素人の役割等について、前年度に引き続き、学会発表に向けて英語原稿の精度を高め、一部は論文化する。
 - ② 能の現行曲全体の英語による包括的なリスト（各曲のあらすじと基本情報を含む）の方針を決定し、原稿作成に入る。
 - ③ 演出に関わる諸問題、能楽と宗教、能のテキストの文学的特徴、世阿弥の能楽論、狂言の演劇的特徴等、優先的に進めてきた分野の英語原稿を完成させる。
- (2) 研究成果をシンポジウム、研究セミナー、講演、展示等で発信し、フィードバックを得る。
 - ① EAJS（ヨーロッパ日本学会）にて、能楽の特殊な興行形態・人材育成・経済基盤・素人の役割・能のテキストの文学的特徴等について、研究発表を行う。
 - ② EAJSに参加する日本学関係の出版社との交渉や編集についての相談をおこない、出版のめどをつけるため、EAJS大会までに全体の構成表を確定する。
 - ③ 能楽の芸芸伝承に関するスポーツ科学との学際研究と、能付資料に関する文献学的研究を併せて、資料展示と研究セミナーを開催する。
 - ④ 英語版能楽全書として、書籍として刊行する内容と別に、ウェブサイトで常に最新の研究成果を発表できる場の確保をはかり、そのコンテンツも蓄積していく。

3. 研究の成果

- (1) 各領域での原稿作成
 - ① 古代から中世への過渡期において大和猿楽がどのように成立・発展していったか、能楽史の根本に関わる部分の研究を進め、論文化した。
 - ② 能の台本に採り入れられた仏教関連語句のデータベース構築に向けた研究を進めるとともに、能役者を取り巻いていた宗教的環境について英語原稿を完成させた。能における素人の役割については成果を論文化した。
 - ③ 演出に関わる諸問題、世阿弥の能楽論、狂言の演劇的特徴等、優先的に進めてきた分野の英語原稿をほぼ完成させた。また現行曲の英語による包括的リストも、方針を決定し、全曲数の30%程度の原稿を作成した。
- (2) 国内外での研究発表、シンポジウムなど
 - ① 一般演劇とは大きく異なる能楽の興行形態、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、能楽における素人の役割、謡曲独特のレトリック等について

て、EAJS 大会にて英語での研究発表をおこなった。

- ② 能楽の技芸伝承に関し、スポーツ科学やエスノグラフィーの手法を使った研究と、能付資料に関する文献学的研究、役者のインタビュー、ワークショップ等を組み合わせた研究セミナーを開催し、研究成果を発表した。併せて、能の技芸伝承の基盤となる能付資料の変遷をたどる資料展示を行った。
- ③ 英語版能楽全書とゆるやかにリンクするウェブサイトの構築を開始し、作り物図、演能図などの画像資料や舞台写真等のコンテンツを蓄積している。

4. 研究の反省・考察

(1) 項目により進捗状況に差ができています。

- ① 限られた人数による共同研究で、各研究者が複数の項目を担当しているため、英語原稿がほぼ完成している項目もあれば、まだほとんど手が付けられていない項目もある。ただし、それらも執筆の枠組みや方針はすでに決まっており、現在手がけている項目が終わり次第、とりかかることができる。
- ② 研究活動として、従来の研究が手薄だった分野から始めたので、現在原稿化が進んでいる項目には新たな研究成果が多い。今後は、完結した英語版能楽全書として世に出すために必要な項目を加えていく作業になるが、その場合も、旧態依然のスタイルに留まらず、新たな視点による工夫やウェブサイトとの連携を考えていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 宮本圭造、金春家本面の復元、『能と狂言』15、pp76-92、能楽学会、2017年7月。
- ② 山中玲子、源氏物語と能楽研究、『能と狂言』15、pp34-46、能楽学会、2017年7月。
- ③ PELLECCCHIA Diego, Noh Creativity? The role of amateurs in Japanese Noh theatre, “Contemporary Theatre Review” 27-1, pp34-45, 2017.

(2) 口頭発表

- ① How is a Noh professional trained?、山中玲子、EAJS 15th International Conference、2017年8月、リスボン。
- ② For whom is noh staged? Training for the actors or performance for the audience?、宮本圭造、EAJS 15th International Conference、2017年8月、リスボン。
- ③ A comparative look at amateur practices in noh and contemporary theatre、PELLECCHIA Diego、EAJS 15th International Conference、2017年8月、リスボン。
- ④ Poetics of Chained Sentences: Kakekotoba and Engo in Noh Texts、横山太郎、EAJS 15th International Conference、2017年9月、リスボン。
- ⑤ Whose Words (and to Whom)?: Fusion of Narration and characters' Speeches in Noh、竹内晶子、EAJS 15th International Conference、2017年9月、リスボン。
- ⑥ 春日社と南都の律家をめぐって—禅律仏教／室町将軍／勸進猿楽、高橋悠介、能楽学会世阿弥忌セミナー（招待講演）、2017年8月。

(3) 出版物

なし

学 校 名	江 戸 川 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	大学生のドロップアウト防止のための介入方法の確立 —心理学・睡眠学・教育学からの総合的検討—		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
山 本 隆 一 郎	社 会 学 部	准 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げ出すための基準を教育的変数である GPA (Grade Point Average) および出席状況を基に提案した (Kelly, 2013, 2014)。平成27年度にはそれらの教育的変数のみでなく、心理学的変数および睡眠学的変数も用いてドロップアウトリスクの高い学生を予測しうる変数について検討した。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的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29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したので、このデータを用いて1学年時の教育学・心理学・睡眠学的変数から、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

表1 本課題における主な調査内容

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

確認した。

(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とともに、大学の中にドロップアウト対策のためのシステムを構築する事を目的とした。

3. 研究の成果

大学1年生時(総計270名)のデータを対象に精神的健康度(General Health Questionnaire-12)、日中の眠気(Epworth Sleepiness Scale)、睡眠の質(Pittsburgh Sleep Quality Index)、睡眠習慣(Edogawa Sleep Habits Questionnaire)を調査した。入学後2年間の間に退学・留年した学生と進級に問題のなかった学生との間で、1年時の睡眠変数および精神的健康度を比較した。その結果、退学・留年者では、大学1年時において平日・週末ともに睡眠時間が短く、睡眠効率も低い事が示された。またそのような学生では、徹夜の回数や、日中の居眠りの回数も多く、精神的健康も悪化していた。これらの変数を独立変数、退学・留年の有無を従属変数とする多重ロジスティック回帰分析を実施したところ、週末の睡眠時間、居眠りの頻度、徹夜の回数が退学・留年を有意に予測していた。さらにこのロジスティック回帰分析で得られた退学・留年確率を独立変数、実際の退学・留年を従属変数としてROC解析を実施した。その結果、退学・留年確率0.21をCut-Offポイントに設定すると、感度68%、特異度82%となり、大学1年時の睡眠習慣によってその後の退学・留年を予測できる可能性が示唆された。

このように、大学入学直後の生活習慣の乱れが、学生のその後のドロップアウトをかなり良く予測する事が明らかとなったため、大学の教学システムにこの知見を元にしたドロップアウト予防の仕組みを実装するべく、実践的な試みを行なった。具体的には、毎年入学者に配布され、入学時ガイダンスで使用されている「学生生活スタートアップガイド」に、規則正しい生活習慣の重要性とその根拠となる事実を分かりやすく解説した。また、本学の退学者対策検討会において、本研究で得られた知見を元にして、在学生に対して「こころの健康」と「すいみんの健康」に関する簡易チェックリストを実施することとし、その結果を元にして本学教員などが個々の学生に対してアプローチできる仕組みを構築する試みを行なった。

4. 研究の反省・考察

本研究により、入学時の生活習慣が2年生までの留年や退学などのドロップアウトをよく予測する事が明らかになった。この点は、大学生のドロップアウト対策として、入学時点において生活習慣についての介入を行う事が重要であるという事を明確にしたという点では評価に値すると考えられる。問題は、このような介入の仕組みを大学のシステムの中にどのように実装するかという点である。今年度は、本学の入学者用のパンフレットに睡眠生活習慣の重要性についての内容を記載する事が出来たことは、本研究の成果として評価できるし、また、退学者対策検討委員会において、全学の在学生に対する簡易チェックリストの実施を決定できた事も成果として評価できると考えられる。しかしながら、実際の介入を行う際には、教員が片手間に行なうわけには行かず、その作業量のみではなく、専門性も要求される事から今後は専門の相談員などの設置も必要とされるだろう。専門員の設置など、人事に関わることは研究プロジェクトの範囲を超え、大学の経営方針とも整合性を持たせる必要があり、本プロジェクトの結果がさらに実効性を発揮するためには、このような大学の運営主体への働きかけといった実践的な努力が必要とされるだろう。今後は、この成果が実効性を持つような努力を行なって行きたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①浅岡章一、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, 2017, 37, 853-855.
- ②福田一彦、保育園のお昼寝はすぐにも中止するべきである, Modern Physician, 2017, 37, 850-852.

(2) 口頭発表

- ①浅岡章一、福田一彦、Kelly, T.M.、中村真、室城隆之、山本隆一郎、宮崎孝治 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～ 第42回日本睡眠学会学術集会、横浜、2017年6月29日

- ②浅岡章一、福田一彦、Kelly, T.M.、中村真、室城隆之、山本隆一郎、宮崎孝治 大学1年時の睡眠習慣はその後の退学や留年を予測しうるか？ 第24回日本時間生物学会学術集会、京都、2017年10月28日

(3) 出版物

- ①福田一彦、生物とサーカディアン・リズム 生活リズムの乱れが生み出すもの. 児童心理、2018年、6、19-27.
- ②福田一彦、生物リズム (20章1節) 生理心理学と精神生理学・第Ⅱ巻・応用 (堀忠雄他監修) 北大路書房、2017年、211-216.
- ③浅岡章一、睡眠削減と睡眠延長 (19章1節) 生理心理学と精神生理学・第Ⅱ巻・応用 (堀忠雄他監修) 北大路書房、2017年、203-207.

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	考古学博物館学によるニカラグア・カリブ海地域古代社会の再検討 —アメリカ地中海文化圏における実践的研究—		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①アメリカ地中海文化圏 ②ニカラグア共和国南北カリブ自治区 ③カリブ海沿岸交流 ④考古学 ⑤博物館学 ⑥文化的多様性 ⑦内発的開発		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 博 史	国 際 貢 献 学 部 ラテンアメリカ研究所 国 際 文 化 資 料 館	教 授 研 究 員 館 長	研究統括、博物館活動、考古資料分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
嘉 幡 茂	ラテンアメリカ研究所 ラス・アメリカス・プエブラ大学 社会科学部人類学科	客員研究員 准 教 授	研究統括補佐、建築様式分析、考古資料分析
市 川 彰	ラテンアメリカ研究所 名古屋大学高等研究院	客員研究員 特 任 助 教	生業研究、考古資料分析
村 野 正 景	ラテンアメリカ研究所 京都府京都文化博物館学芸課	客員研究員 学 芸 員	博物館活動、考古資料分析

考古学博物館学による ニカラグア・カリブ海地域古代社会の再検討 ーアメリカ地中海文化圏における実践的研究ー

1. 研究の目的

(1) 研究の目的は、今までラテンアメリカ古代文明史において、ほとんど顧みられなかった中米カリブ海沿岸地域を考古学調査によって光をあて、生業・交易・社会レベルの復元に必要な情報を収集し、人類史における当該地の価値を発見することにある。

- ①ブルーフィールズ・インディアン・カリビアン大学（以降BICU）の付属研究所CIDCA収蔵の当該地域の考古資料を分析し、当時の生業やその技術力を考察し、社会発展レベルを解明する。
- ②文化的交流関係に有益な土器系統の研究、ヒスイや塩などのカリブ海沿岸交流に関する遺物の研究、内陸部との交流を実証的に検証する。
- ③建造物の様式・立地・方位を確認し、メソアメリカ文明圏建造物との相違を明らかにする。
- ④考古学成果を博物館学的方法で地域共同体へ還元し、文化財に対する住民意識の向上を図る。

2. 研究の計画

(1) 南カリブ自治区を対象とした考古学調査

- ①遺物確認作業（平成29年5～6月）：CIDCAと協働し遺物の現状を確認
- ②遺物整理作業（平成29年12月）：カリブ海側考古資料の分析・評価作業
- ③遺物分析・現地確認調査（平成30年2～3月）遺物分析作業を行う

(2) 博物館研究・普及活動

- ①考古学調査によって収集した情報を現地にて発表・報告する（学術研究振興資金平成26-28年度実施「考古学と博物館学を仲介者とした実践的研究」の成果と方法論を活用する）。
- ②現地の研究協力者と研究分担者による研究交流会を開催し、調査成果を広く共有する。
- ③CIDCA展示室や国際文化資料館、京都外国語大学ラテンアメリカ研究所（以降、IELAK）をベースに調査成果を適宜紹介するなど、多様な方法で活動の普及につとめる。とくに地域住民へ配慮したものとする。

3. 研究の成果

(1) 南カリブ海岸自治地域（Región Autónoma de la Costa Caribe Sur, RACCS）を対象とした考古学調査

- ①BICUの付属研究所CIDCAに収蔵されている資料の調査については、ブルーフィールズ・インディアン・カリビアン大学と京都外国語大学との間で友好交流協定提携(6月)を背景として予定通り実施できた。とくに12月には研究代表者南、研究分担者（IELAK客員研究員）嘉幡茂、市川彰、村野正景の全員がブルーフィールズに集まり、CIDCAに収蔵されている資料のうち、もっとも出土状況が明確であったエスコンディード川（Rio Escondido）下流、ムエジェ・デ・ロス・ブエジェス（Muelle de los Bueyes）市のソンプレロ・ネグロ（Sombrero Negro）遺跡出土土器の実測、分析作業を行った。

これらの資料は後述するように、墓からの一括出土遺物であると判断した。2018年度に実施する予定の北カリブ海岸自治地域（Región Autónoma de la Costa Caribe Norte, RACCN）での資料調査成果とあわせて、今後の他地域との比較資料、つまり文化的交流関係に有益な土器系統の研究について考古学価値の高い資料にできたと考える。

- ②資料分析にあわせてソンプレロ・ネグロ遺跡の現地踏査の特別許可がもらえたので、ブルーフィールズから船と車で約4時間かかる現地へ研究協力者であるドナルド・バイエ

スCIDCA所長に案内いただいた。研究目標としてあげていた建造物（様式・立地・方位）の確認については建造物そのものが発見できなかったが、分析した資料が墓から出土したものであることを確認した。葬送儀礼も目標である文化的交流関係を明らかにできる資料であり、今後の研究活動に繋げたい。

- ③さらに、遺跡からは多くの岩刻画を確認した。網羅的な調査は調査時間の関係でできなかったが、研究目標であるカリブ海沿岸交流、内陸部との交流を実証的に研究する上で興味深い文様を発見した。たとえば、マヤ文化との強い繋がりを感じさせる「十字文様」や「パトリ文様」の発見は大変重要である。
- (2) 考古学と博物館学を仲介者とした実践的研究・普及活動
- ①考古学の成果を博物館活動によって地域課題の解決につなげる総合政策科学研究に向けた地域との交流については、遺跡のあるMuelle de los Bueyes市市長と意見交換会をもった（2018年3月）。市長からは市内に予定している博物館構想への参加を求められた。また、ソンプレロ・ネグロ遺跡調査についても、ニカラグア国立自治大学による調査も実施されていたことがわかり、また現在調査は隣県チョンタレス県のNGOが計画していることを踏まえ、今後情報交換を行っていくことになった。
 - ②また、この実践的研究の共同研究者として、ドナルド・バイエスCIDCA所長に続いてニカラグア国立自治大学を卒業した考古学者バニ・サンブロナが加わった。さらにCIDCAでの遺物調査にはメキシコ国立自治大学人類学研究博士課程後期生フリエッタ・ロペス、ソンプレロ・ネグロ遺跡の踏査には名古屋大学文学研究科博士課程前期生（2018年4月からは京都外国語大学言語文化研究科博士課程後期生）深谷岬が加わった。日本・ニカラグア・メキシコの研究分担者・研究協力者による国際的チームが意見交換を行い、調査の成果を共有できる体制が作れたことは今後の研究活動につながる。

4. 研究の反省・考察

(1) 南カリブ海岸自治地域を対象とした考古学調査の反省と考察

- ①研究目的に掲げた目標のうち、生業やその技術力を考察し、社会発展レベルを解明できるような分析にたえる資料が結果的には確認できなかった。予備調査の段階での情報収集が十分ではなかったことが原因の一つであるが、CIDCAでは考古学の専門家がおらず、また収蔵されている資料も、その出土状況などの記録が不十分であったことが大きい。

今回の遺物分析の成果（概要報告）を滞在期間中に提出したこともあり、調査チームに対しての信頼度が大変高い。これを踏まえて日本・ニカラグア・メキシコの国際的共同体制による精度の高い考古学調査を実施することで、上記の課題を解決していくことを今後提案していきたい。

- ②また、建造物によるメソアメリカ文明圏建造物との比較研究を進めることについては、準備が不十分であった。建造物の存在の情報はCIDCAに集まってくるようではあったが、それを正確に記録するということが行われていなかった。これは上記の反省と同様であるが、それ以上にカリブ海沿岸の自然環境の要素（道路がなく移動が舟による）が大きく、また先住民系、アフロ系などの多様なコミュニティがあり、現地に入っていくためには十分な人類学または社会学的地域情報が必要であった。

現在、考古学・博物館学調査に平行して、京都外国語大学国際言語平和研究所嘱託研究員（人類学）青木敬による地域事情の調査を行っているが、今後はさらに人類学調査を充実していく。これによって地域コミュニティとの信頼関係も結ぶことができるし、結果として当該地域にあるとされる建造物の考古学調査に繋げたい。

(2) 考古学と博物館学を仲介者とした実践的研究・普及活動の反省と考察

- ①研究の目標にあげていたところの「考古学調査によって収集した情報を現地にて発表・報告する」機会は作れなかった。これは(1)②に記したように、地域事情の調査が十分でなかったこと、調査環境に対しての準備が十分でなかったことによる。しかし、現地の市長との直接交流ができたこと、また考古学者バニ・サンブロナが現地役所に入ったことによって、今後の総合政策科学研究に向けた多様な調査が可能になったと考える。
- ②また、国際文化資料館、IELAKでの普及活動は、HPやブログでの発信に留まる。しかし、エルサルバドル国立博物館で京都外国語大学と共催で開催した「エルサルバドル・パブリック考古学ワークショップ」では、調査の概要を報告したこともあり、この研究活動

を広く発信できる機会は作れたと考える。今後は国際文化資料館での展示も含めて研究成果の普及に努めたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 南博史、植村まどか、サグラリオ・バジャダレス、レオナルド・レチャド、Project Arqueologico Matiguas [Informe Final Jornada 2017]、京都外国語大学国際文化資料館、2018年3月、京都

(2) 口頭発表

- ① 植村まどか、南博史、サグラリオ・バジャダレス、レオナルド・レチャド、Proyecto Matiguas - Estudio local en base a arqueologia y museologia junto con la localidad、I Coloquio de Arqueologia de Nicaragua、2017年7月6日、ニカラグア国立自治大学
- ② 南博史、Community Engagement Activities in Nicaragua: -Sustainable community development mediated by museums and archeology-、The 5th University Community Engagement Conference 2017 in Kyoto、2017年9月25日、京都外国語大学
- ③ 植村まどか、南博史ほか、Archaeology and the Public Participation、Social Sciences and Humanities Research Council Conference in Canada、2017年11月12日、カルガリー大学

(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	ハワイ大学宗教学部	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 Nough	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た。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角から、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、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) 良心学の方法論の構築

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、討議を積み重ねてきた。それによって、研究分担者それぞれの専門領域から一步踏み出して、共通の課題領域としての「良心学」を意識することの学問的意義を確認することができた。昨今、専門領域は細分化され、相互のコミュニケーション不全により、問題の全体像を把握することが困難になっているが、分野横断的な知の営みが、専門化された知に対し、既存の枠組みを超える新たなパースペクティブを与えることを、研究分担者が互いに認識できたのは大きな成果であった。

②「良心」をもっとも包括的なキーワードとしながら、それと隣接し、異なる学問領域に交流を促すキーワードを模索した。「自然（生命）—人間—人工（文化）」という基本構造の中で、良心の生物学的な起源（神経回路における機能の特定）から、多様な文化における適用事例に至るまでを射程に収め、良心をマッピングした。そこで得られたキーワードとして、技術のデュアル・ユース、共感と暴力（戦争）、社会ダーウィニズム（優生思想）、利己性と利他性、身体性と大地性（地球環境）、宗教と科学などがある。

(2) 冊子『良心を考えるために』（増補改訂版）の刊行

①2017年度の研究成果として冊子『良心を考えるために』（155頁）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付）に配付した。その後、読者から得られた多様な意見を本研究にフィードバックし、2018年度の研究成果として、その増補改訂版（195頁）を刊行した。

その項目は以下のようになっている（「新」としているのが新規項目）。【第Ⅰ部】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. 法と良心（新）、8. 経済学と良心、9. エコロジー経済論・公害論と良心、10. 経営学と良心（新）、11. ビジネスと良心（新）、12. 科学技術と良心、13. スポーツと良心、14. 心理学と良心、15. 脳科学と良心、16. 進化生物学と良心（新）、17. 京都と良心。【第Ⅱ部】1. 新島襄と良心—その歴史的背景、2. 同志社建学の精神—創立150年とその先を見据えて

第Ⅰ部の各章は、「良心」というキーワードが、文理融合のプラットフォームとなり得ることを実証的に示すものである。第Ⅱ部は、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のものであり、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」に対応している。増補改訂版も、本学教職員、学生、一般市民に配付し、すでに各種の意見やアドバイスを得ている。

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、「各専門領域の知見を総合化する「良心」に関する具体的内容の提示を期待する」というものがあった。その指摘に十分に応答できる研究成果をまだ出すことはできていないが、指摘のポイントは重要なものとして受けとめている。「良心」に関する従来の研究は、主として思想・哲学・倫理・宗教・歴史の領域でなされてきたが、その理解は多義的であり、時代による変遷も小さくはない。それを意味論のレベルで論じている限りは、抽象的な議論に終始することになり、「具体的な内容を提示」することはできないだろう。それゆえ、本研究では、心理学や脳科学の知見を援用することにより、科学的な客観性を取り込むこと、また、現実社会の具体的問題と照応させることにより、良心の具体的・実践的な適応可能性を追求することを目指している。自己完結的な抽象論に陥らない、世界の具体性に開かれた「具体的な」良心の研究を心がけるつもりである。

(2) 今後の研究

これまでに獲得された良心学の方法論はまだ萌芽的なものに過ぎない。文理融合の具体的なモデルとなることを目指して、学術的検証に堪えることのできる緻密な方法論をさらに追求していく予定である。また、研究成果を絶えず学びのコミュニティに還元することにより、私立大学の建学の理念のよき展開事例となることも、継続して目指していきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①小原克博「犠牲の論理とイエスの倫理」、『福音と世界』2018年3月号、6-11頁

(2) 口頭発表

①公開シンポジウム「我等、地（つち）に生きん—持続可能な社会と人間の責任—」2018年1月22日、同志社大学 今出川キャンパス。発表者：小原克博

②公開シンポジウム「同志社建学の精神—創立150周年とその先を見据えて—」2017年11月17日、同志社大学 今出川キャンパス。発表者：沖田行司

③公開シンポジウム「良心学を語る—学際研究における方法論的探求—」2017年9月29日、同志社大学 今出川キャンパス。発表者：小原克博、木原活信、貫名信行

④公開シンポジウム「人間の発達と良心」（赤ちゃん学研究センターと共催）2017年7月28日、同志社大学 今出川キャンパス。発表者：小原克博

⑤公開シンポジウム「「良心」の現代的意義—神学・外交・インテリジェンスの視点から

一」2017年7月7日、同志社大学 東京オフィス。発表者：小原克博

⑥公開シンポジウム「自然科学と良心—科学者の良心が問われる時代の中で—」2017年6月6日、同志社大学 京田辺キャンパス。講師：貫名信行

(3) 出版物

①良心学研究センター編『良心を考えるために』（増補改訂版）、2018年3月

②小原克博『一神教とは何か—キリスト教、ユダヤ教、イスラームを知るために—』平凡社、2018年2月

学 校 名	追 手 門 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	遺児へのグリーフケアプログラムの実証的効果研究 —悲嘆、心的外傷、人間的成長の観点から—		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①グリーフケア ②自死 ③複雑性悲嘆 ④PTSD(心的外傷後ストレス障害) ⑤人格変化 ⑥人間的成長 ⑦グループ ⑧芸術療法			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
倉 西 宏	心 理 学 部	講 師	全体のコーディネーター

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 日 方 薫	近 畿 大 学 学 部 近 生 物 理 工 学 部	非 常 勤 講 師	プログラムの検討、情報収集
小 林 昌 幸	心 理 学 部	非 常 勤 講 師	プログラムの検討、情報収集

遺児へのグリーフケアプログラムの実証的効果研究 －悲嘆、心的外傷、人間的成長の観点から－

1. 研究の目的

本課題における29年度の取組みとして主に「遺児大学生へのグリーフケアグループの意義に関する検討」を行った。

(1) 遺児大学生へのグリーフケアグループの意義に関する検討

本研究は未成年時に親を亡くした遺児へのグリーフケアプログラム（悲嘆のケアプログラム）を考案・実施し、その効果測定を目的としている。そのための1つとして、今後実施予定のグリーフケアプログラムを考案するために、過去に実施した自死によって親を亡くした大学生に対して「親との死別体験をわかちあう会」という親との死別体験を表現しそれを共有するプログラムの効果検討を行う。特に、死別体験に取り組むことで悲嘆と共に「私」全体がいかに変化するのかについて検討を行った。

2. 研究の計画

(1) 自死遺児へのグリーフケアグループの意義に関する検討

① 研究協力者の募集について

近畿圏の大学、民間遺児支援団体を通じて協力者を募った。グループへの参加協力者の合計は13人（男性6名、女性7名）で参加開始時における平均年齢は20.30歳（SD=1.65）、死別後経過年数は2～17年でありその平均は8.62（SD=5.03）であった。喪失対象は父親10名、母親3名、死因は交通事故2名、病気8名、自死3名であった。

② グループによるグリーフケアについて

「親との死別体験をわかちあう会」という名称で合計3クール実施し、各クールの前後に調査面接を行った。1回90分のセッションを1、2週に1回の間隔で実施した。第1、2クールは全5回、3クール目は全4回で行い、参加者は可能な日程のみ参加した。クールごとに次クール参加の意向を確認し、クールごとに新たな参加者を募った。クールごとの参加者数は1クール目9名、2クール目8名、3クール目6名で、3クール全てに参加したのは3名であった。セッションごとの平均参加人数は4.29人（SD=1.68）であった。

グループのスタッフは3名で行い、第一筆者がリーダー、共著者がコ・リーダーを担った。参加者の安全面を守るため、初回の調査面接時と毎回のセッション開始時にグループでの約束事をリーダーから伝えた上で実施した。

その後は自己紹介として名前、死別の時期、喪失対象、死因、参加希望した理由を、言葉にできる範囲で順番に話してもらった。その後は死別体験にまつわることを自由にわかちあうセッションとし、最後には感想を話す時間も設定した。グループがスタートすると、そこで話したい話題はほぼ全てが、参加者から全体に投げかけられ、それに対して他の参加者が自身の体験や考え・思い等を話すことで展開されていき、スタッフは生じたグループの展開をより促すための介入が中心的な役割であった。

③ グループ前後に実施した個別面接について

グループ開始前に初回面接を行い、その後もクール実施前後に個別面接を行った。面接では複雑性悲嘆質問票（Inventory of Complicated Grief: ICG、25点以上で複雑性悲嘆に該当）を実施した後に、半構造化面接を行った。面接の主な質問は、初回面接では成育歴、家族構成とその関係、死別体験、死別前後での変化、死別体験の位置付けとその変化、2回目以降ではグループ体験、グループ前後の変化、前回の調査以降死別体験の捉え方に影響が与えられる体験の有無であり、これらを随時深めるよう質問を行い、語りを促した。

④ 分析方法

死別後に個々人が辿るプロセスは極めて個別的に理解されることが必要となり、それは遺族の立場に立った際に特に配慮が必要な視点であると思われる。また、物語という視点から喪失の語りを検討するならば個別的な検討が必要になる。さらに、問題で指摘したように自死遺族を理解するには個別的な検討が必要である可能性が考えられる。こ

これらのことから、ここでは事例的に検討を行うこととした。事例については以下Aさんと記載する。

3. 研究の成果

(1) 複雑性悲嘆質問票に関する検討

当初では26点と基準値(25点)を超える値であったが、1クール終了後では19点に下がった。3クール全て参加した2名の協力者のデータも含めて、Aさんも含めそれぞれが低下と上昇を繰り返しながら進むことが見出された。心理療法では、自身の安定化と新たな課題への直面という二つの動きを繰り返しながら、新しい地平へと進んでいく。悲嘆においても「二重過程モデル」(Stroebe & Schut, 1999)がそれに当たり、同様の動きがここでも生じていた可能性がある。つまり数値的には悲嘆は行きつ戻りつしながら軽減の方向を示し、それと共に質的にはこれまでとは異なる地平へと歩みを進めているのではないだろうか。ゆえにグリーフケアでは数値的には現れてこないナラティブを掴んでいくことが重要であると言える。

(2) 喪失対象との関係性の変化

① 喪失対象とのつながりと「距離」という視点

本研究では喪失対象との関係性を考える際に「距離」という視点を持ち込んだ。そのことによって関係性を空間的に認識することに寄与することができたように思われる。そしてその変化は3段階に分けることができるように思われる。初めの段階として、死別体験について「思い出すことを拒む」状態であった。「距離」としては「上」に位置されていたと話したように垂直的な距離であった。河合(2013)は「物語は、継時的なものであり、言語学的に見るとシンタグマティック(連結関係、隣り合う要素の間の関係)なもの」「水平的なもの」であると述べている。ここから考えると、垂直的な位置関係であった父親は、Aさんの人生の「物語」に含まれ切っていなかった可能性がある。

ただ、2段階目としては、第1クール参加後には「4時間で行ける距離」になり「横に来た」と水平的な関係性に至った。それは「現実味を帯びた」次元への変化であり、父がAさんの人生の物語に含み込まれるようになったことを示していると考えられる。ゆえにこれらの変化は、死別体験に意味を見出すプロセスと同時的に生じていたと考えられる。

さらに3段階目として、第3クール以降には「距離を感じなく」なり、「距離では形容しがたい」状態に至る。第3クールのグループでも「私の存在自体が(父の存在の)生きた証拠」だと表現し、さらに「父親は自分にとって実体でもあるし、(私を)構成する要素、実体として(私を)構成してくれた」と語っていた。これらから、父が自分という存在を構成してくれると共に、自分が存在することが父の存在を証明している、という関係性に変化したことが考えられる。

つまりAさんにおける父との関係性は、①父の存在が物語に含みこまれていない垂直次元の関係性、②自身の人生の物語に含みこまれた現実感のある生きた水平次元の関係性、③互いが互いの存在を生み出しあうような重なり合う関係性の次元、へと変化が生じたことが考えられる。Freud(1917/1970)が喪失対象へのリビドーの脱備給(decathexis)を論じた背景には、喪失対象と自身の自我との病的な同一化の問題がある。ここで述べた③の状態はその病的な同一化とは異なるものであると思われる。一度対象化した上で再び主体的に死別体験や喪失対象と共に生きようとした、主体的な動きが存在しているのである。

② 「死」と「生」の弁証法

中学時に死への恐怖が迫ってきた時、「自分の身体」が「残っている」と体験し、「死」から反転するように身体という「生」を実感するに至った。「死」が迫ることを通して、「身体」という「生」を実感しており、相反するものが同時的・逆説的動きとして生じている。これは「死」という一端にたどり着くことによって「生」という相反するものが立ち上がってくるという弁証法的動きであると言える。そして「私の存在自体が(父の存在の)生きた証拠」と語ったように、自身の存在から遡って父の存在を感じる事ができた。中学時代のその体験は、「ぼやぼやしてた」父の存在が、「いた」と実感す

ることを通して、父とのつながりを得たのだと言える。

ただ、喪の過程は繰り返されることで徐々に進んでいくものでもあり、自死における困難性の一つは死者への囚われによって、心理的な埋葬としてのいわゆる「あの世」に「送る」ことができないことなのである（倉西，2012）。「お父さんに死んでいうものを持たせられた」と話したように、それ以前にはAさんの内的な父には「死」が付与されておらず、「死」と「生」のいずれにも至ることができない状態であったと考えられる。しかし死別に取り組むことを通して父との記憶の賦活等も始まり、死した父とのつながりが再び生じるようになった。そして、父と再びつながることができたことによって、父に死を持たせる、つまり父を心理的に埋葬することができるようになったと思われる。さらにグループ最終日が父の誕生日であった、と布置されていたことに言及をしているが、それは内的な父という存在が新しいものとして生まれたことをAさんも感じ取っていたからだろう。Becker（2009）も「死がすべての終わりではなく、あくまでも姿を変えて存在し続ける」と遺族が体験することを述べている。つまり「死」が与えられ心理的に埋葬されることによって新しい位置づけの父が生まれたとも言えるのではないか。

つまり、Aさんは死別体験に取り組もうとすることで父とのつながりを得て内的に父が生きていることができるようになった。すると、父とのつながりを得ることによって、父に死を与えることもできるようになった。さらに、父に死を持たせ心理的に埋葬することによって、父がこれまでと異なる位置づけのものとして内的に新しく生まれたのである。このように、父という存在が内的に「生きる」と「死ぬ」ことが弁証法的に止揚されていくことでやっと、Aさんの喪の過程は進むことができたのだと考えられる。

(3) 死別体験の再構成と「私」の変容

① 死別体験の意味の変容

中学時代に死別体験は一度おさまりがついたものの、大学生になり再び「傷」として存在を示し始め、ICGでもカットオフ値を超える心理的「痛み」が顕わになり始めた。しかし、グループに参加すると「凝り固まっていた」のが「ほぐれ」、「風通しがよく」なることによって父に関する記憶も賦活され始め、死別体験への囚われから自由になっていった。また、「過去と現在を行き来しているよう」と表現したように、止まっていた死別体験の「時間」も自由になることができたように思われた。

その変化に伴い「自分の過去と自分を認め」「『人と違う』っていう過去を持っていてもいい」と思えるようになった。そして「ふさぐしかなかったはずの傷」と思っていたものが「そのことによってどんな自分が形成されたか」を考えるようになり、死別体験があるということが「ある種の個性になる」という考えにも至った。痛みある開いた傷を「塞ぐ」という次元から、開かれたその傷こそが「個」を生成し「私」を変容させていくという次元へ、傷の意味が変容したのである。そして「傷でしかないと思っていたけど、それによって色んなものを与えられる」ことに気づいたのである。大学時代に親との死別が再燃することは学生相談の事例等で述べられているが（高橋，2013）、それは青年期の自己形成への動きと連動していることが考えられる。そして青年期の自己形成には過去の傷の再構成が大きな役割を演じる可能性が示唆される。Aさんにおいては傷の「痛み」が死別体験やそれを持つ自己を「深く知りたい」という動きを起し、グループ参加を通じて「傷」が「個」へ変化するに至ったのである。

② 死別体験による「私」の変容

Aさんはグループによって「死別体験自体を眺めること」と「体験した自分を眺めることができた」と言い、グループを通じた取り組みは「父に関しての喪の作業だったと同時に、喪失した自分の過去の喪の作業だった」と語った。Aさんは「傷」が「個」を生み出すと体験し、死別体験に取り組むことは「私」全体が問題になるのだと感じ取っていたのだと思われる。つまり、死別体験に取り組むことは死別体験を入口に「私」を再構成する過程であったと言えるだろう。その具体例としては、死別体験等の感情を伴う体験について「生きてる人間としてずっと悲しみに留めておきたくない」と思うようになり、その感情を「何かに変えていくことの方が人間らしい」と思うようになったこと等が挙げられる。そして死別体験に取り組むことで、「変わることを怖がらない」「生きることを恐れない」という今後の生きる態度を形成することにも寄与し

た。

このように死別体験に取り組む際に「私」とは切り離すことができず、「私」の変容と死別体験の意味が変容していくことは同時に生じることなのだろう。それゆえ、対象化された数値的な悲嘆の側面と共に主観的な体験や変化に注目していくことが本質的な遺族支援や遺族理解のためには必要だと考えられる。

4. 研究の反省・考察

(1) 自死遺児へのグリーフケアグループの意義に関する検討についての反省・考察

本課題は今後実施予定のグリーフケアグループの内容の検討のための実施段階として、過去に実施したグリーフケアグループの検討を行ったものであった。次年度以降のグループの実施に向けて、グループの治療的側面を見出すことができたと思われる。

ただ、多くの協力者が共通して体験する側面やプロセスについてはまだ検討ができていないことは今後の課題であると言える。ただ、M-GTAのように複数事例をまとめる分析手法を用いることも重要であるが、今回のように事例研究を他の事例についても行い、丁寧な事例の積み重ねから自ずと浮かび上がってくる共通の側面を見出すことも重要であると考えられるため、今後も事例研究を継続していければと考えている。

(2) プログラム考案のための準備

上記研究と並行して、グリーフケアプログラムの検討のために、あしなが育英会のケアプログラムにおけるボランティアスタッフの体験に関する検討等も進めている。そういった検討や今回報告を行った研究成果等を含めて、早期にグリーフケアプログラムの考案を行っていくことが今後の課題として挙げられるだろう。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

無し

(2) 口頭発表

無し

(3) 出版物

無し

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 保 育 学 科	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)
西 川 京 子	心 理 学 部	講 師	調査・実験の実施, 論文作成 (実践班における研究実施)
一 木 寛 之	安 田 小 学 校	教 諭	調査・実験の実施, 論文作成 (実践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）によって捉え直すこと。

- ・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および現役教員を対象とする調査等も実施し、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) 実験班を中心に、日米の大学生（可能であれば、一般成人）を対象とする国際比較調査を実施する。

- ・当初の計画どおり、平成29年度においては、自己肯定感の文化差——日本人の自己肯定感の低さに関する定量的データ——をまず確認し、その上で、そうした文化差がなぜ生じるのかの分析を進める。
- ・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分析にも着手する。

(2) 調査班を中心に、追加ウェブ調査を実施し、小・中学生の自己肯定感の低さに関する検討に着手する。

- ・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を解明する必要がある。平成29年度には、そうした社会的要因として、現役教員がつくり出す教育環境（自己肯定的な態度を呈示しにくくさせるような社会的環境）に着目した調査を行い、自己肯定感の高い児童・生徒に対する教員の苦手意識の存在に焦点を合わせた分析を行う。

3. 研究の成果

(1) 自己肯定感の日米差に焦点を合わせた比較文化研究（日米の一般成人約 1000 名を対象とする調査）の結果から、日本人の自己肯定感の低さに関するエビデンス・ベースの解釈を得た。

- ・調査の結果から明らかにされた点をまとめると、1) 先行研究において一貫して示されて

きた自己肯定感の日米差が再認されること、また、2)自己肯定感の高い人物と中程度の人物を比較させた場合、自己肯定感の高い人物は他者から悪く思われるだろうと予想する傾向が日本人においてのみ示されること、さらに、3)そうした予想の文化差が自己肯定感の日米差を部分的に説明することの三点であった。注目すべきは、2)と3)であり、これらの知見は、日本の若者の自己肯定感が低いという事実が、彼らの内的な心の性質の反映を意味しているのではなく、むしろ、まわりの人たちから悪く思われるのを避けるための自己呈示方略を反映している可能性を示している。この研究知見は現在、国際誌への投稿を目指して準備をしている。

(2)小・中学校の現役教員を対象とするウェブ調査の結果から、児童・生徒の自己肯定感に影響を与え得る教員側の要因についても手がかりを得た。

- ・興味深い知見としては、自己肯定感の低い教員が、自己肯定感の高い児童・生徒に対して苦手意識を感じているという結果である。この研究知見は、自己肯定感の程度が全体的に（とくに、日本人若年教員層において）低いという事実、そして、上述したように自己肯定感の高い人物が嫌われ得る日本の文化的文脈も考慮に入れた場合、考察するに値する知見である。すなわち、教員がつくり出す教育環境は、実は児童・生徒たちの自己肯定感の向上を阻む社会的な要因となり得ることをこの研究知見は示唆しているといえる。もちろん、この知見のみでの議論には慎重になるべきであり、今後も継続的に個別研究を実施したのちに、結果については公表を検討する予定である。

4. 研究の反省・考察

- ・実験班を中心に、当初の計画どおり複数の個別研究の実施を通じて、潜在指標（ないし生理指標）を用いた自己肯定感の世代差の分析を進めてきたが、先行研究における知見との非一貫性、あるいは個別研究間での非一貫性が見られたため、結果の公表が遅れている。再現性の弱いデータの公表には慎重になるべきであり、その意味ではこの遅れは問題とはいえないが、今後、研究上の問題点を克服し、さらなる個別研究の実施に努めていきたい。幸いにも、個別研究をすすめていくための研究環境は整いはじめており、今後の個別研究を通じて研究成果を公表していくことは十分に可能である。
- ・本申請研究の実施を通して反省点として挙げるべき点は、自己肯定感の低さという問題を個々人の心の問題として捉えすぎてきたという点である。もっとも、本申請研究は自己肯定感の低さと関わる心理的要因の解明のみならず、その背後にある社会的要因にも目を向けることを念頭に置いてきた。さらに、社会的要因に目を向ける必要性から、調査班をおよび研究分担者として加わった現職教員とその経験を有する者との事前相談を経て、小・中学校における調査・実験の前に、現役教員を対象とするウェブ調査を実施するという判断をするに至った。次年度以降にも、本年度の研究チームとともに、これまで得た研究成果を公表段階までこぎつけるよう努めていく。

5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)学会発表

①Hirofumi Hashimoto (2017). I'm not confident of myself because I don't have a second chance: Low self-esteem among young Japanese and socio-economic situations in which it is (thought of as) difficult to re-challenge. Poster presented at the 29th Annual Convention of Association for Psychological Science, Boston, MA, USA.

②橋本博文 (2017). 褒められた経験が自尊感情およびやり抜く力に与える影響 日本教育心理学会第59回総会（於：名古屋国際会議場）

(3)出版物

なし

学 校 名	熊 本 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	障害児者入所施設への外部アドボカシー導入研究 ーシステム創出に向けたアクションリサーチー		研 究 分 野 文 学
キ ー ワ ー ド	①アドボカシー ②障害児者施設 ③意見表明支援 ④意思決定支援 ⑤虐待防止		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
堀 正 嗣	熊 本 学 園 大 学 学 部 社 会 福 祉 学 部	教 授	研究計画立案・研究組織総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鳥 海 直 美	四 天 王 寺 大 学 学 部 人 文 社 会 学 部	准 教 授	障害児施設調査分析担当者・社会調査に関する学識提供
吉 池 毅 志	大 阪 人 間 科 学 大 学 学 部 人 間 科 学 学 部	准 教 授	障害者施設調査分析責任者

障害児者入所施設への外部アドボカシー導入研究 ーシステム創出に向けたアクションリサーチー

1. 研究の目的

- (1) 日本版施設訪問アドボカシー(Residential Visiting Advocacy)による障害児者の意思決定／意見表明支援のあり方(意思決定／意見表明支援の方法、スーパービジョンの方法)
- (2) 日本版施設訪問アドボカシーによる障害児者の権利に根ざした支援環境のあり方(障害児者の権利の理解を促すための方法[施設内ワークショップ等]、施設運営への障害児者の参加促進方法)
- (3) 日本版施設訪問アドボカシーによる施設内虐待等不適切な処遇の予防のあり方(障害児者の苦情や懸念の解決に向けた支援方法、障害児者と職員の関係改善に向けた支援方法、職員による不適切な処遇への介入方法[情報提供・助言・管理者との連携・通告等])
- (4) 日本版施設訪問アドボカシーの提供体制にかかわる基盤整備のあり方(行政機関・関係機関との連携方法、財源・人材を確保する方法)

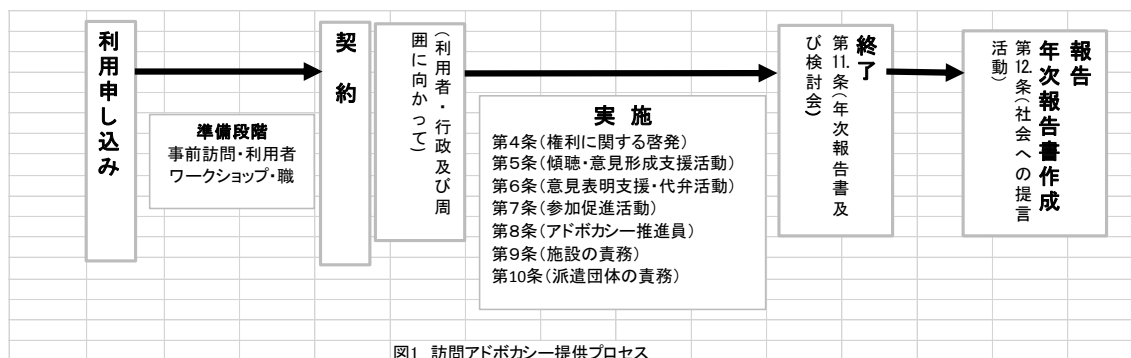
2. 研究の計画

- (1) 定期的研究会の開催(毎月1回)
- (2) 障害児者施設各1施設において、障害者権利ワークショップを行う。
- (3) 研究者及びアドボケイト候補者が、利用者・職員とのラポール形成や実践現場の理解等を目的とする定期訪問を行う。(平成29年4月～8月)
- (4) 障害児者施設各1施設に、アドボケイトが定期的に訪問し、施設利用者のアドボカシー実践を通じたアクションリサーチに取り組む。(平成29年9月～平成30年3月)
- (5) 研究者とアドボケイトによる事例検討会(スーパービジョン等)を開催する。
- (6) 研究者・施設職員・派遣団体代表者・アドボケイト等によるシステム研究会を開催する。
- (7) 公開型の報告会(平成30年3月)を開催して実践の検証を行う。

3. 研究の成果

- (1) 日本版施設訪問アドボカシー提供体制の開発

アクションリサーチにより、図1のような日本版施設訪問アドボカシーの提供体制を開発した。なお図中に記載の「第4条」等は「施設訪問アドボカシー利用契約書」の条文を意味する。



①準備段階

「アドボケイトとの関係構築の懸念」や「アドボケイトの原則(利用者中心、厳格な守秘)への懸念」に対処するために、利用申し込みのあった施設には準備期間を設け、互いが知り合い、納得してサービスを受け入れるための期間を設けた。この準備期間に、派遣機関(NPO等ケアサービス提供団体から独立した団体が想定される)の管理者及びアドボケイト候補者が施設への事前訪問を行い、施設的环境や生活を認識し、利用者・職員と知り合い、利用者への権利ワークショップや職員研修などを通して信頼関係と共通理解の構築を図る。

②契約

準備期間における事前協議を踏まえて、障害児者施設とアドボカシー提供団体との間で、「施設訪問アドボカシー利用契約書」を締結する。契約の主な内容は以下の通りである。

第1条（目的）、第2条（施設訪問アドボカシー活動）、第3条（施設訪問アドボカシー活動の指針）、第4条（権利に関する啓発）、第5条（傾聴・意見形成支援活動）、第6条（意見表明支援・意思決定支援・代弁支援）、第7条（参加促進活動）、第8条（アドボカシー推進員）、第9条（甲〔受入施設〕の責務）、第10条（乙〔提供団体〕の責務）、第11条（年次報告書及び検討会）、第12条（社会への提言活動）、第13条（利用料金）、第14条（期間・更新・解約）、第15条（協議）

(2) 個別アドボカシー実践方法の開発

図2に示す「アドボカシー実践の全体像」を踏まえて、図3に示す「個別アドボカシーの実践方法」を開発した。

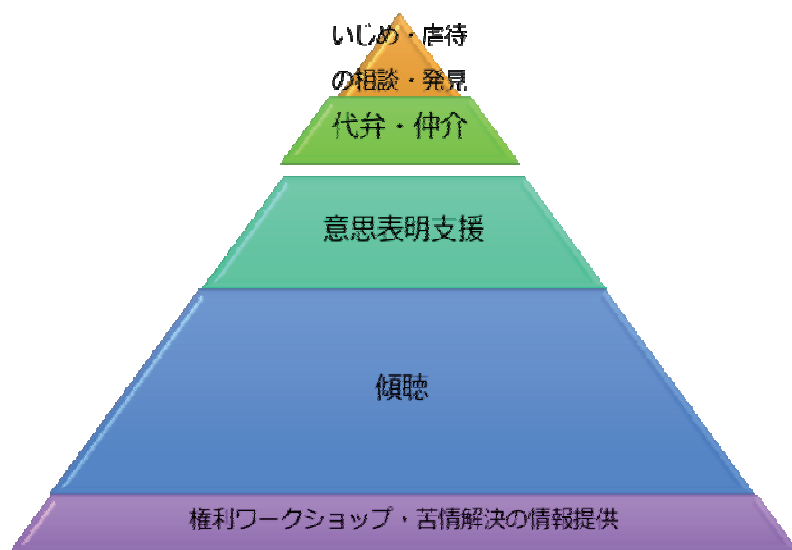


図2 アドボカシー実践の全体像

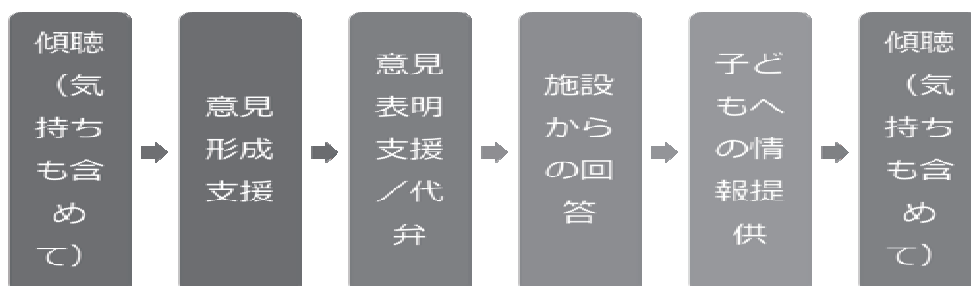


図3 個別アドボカシーの実践方法

「傾聴」だけで利用者のニーズが満たされたり、自分で周囲の人々に働きかけ問題を解決できるケースも多い。しかし、施設職員に利用者の気持ちと意見を伝えて回答を求めるケースもある。これは個別アドボカシーのプロセスであり、アドボケイトによる実践の核となる部分である。その場合の図3のようなプロセスからなる実践方法を開発した。

意見形成支援は、利用者と一緒に施設職員等に、何をいつどのように伝えるのかを考え、準備する段階である。職員に意見を伝えるために手紙書いたり、ロールプレイを行ったり、スターチャートを使うなど様々な方法が考えられる。

利用者の意見がまとまってきた段階で、意見表明支援／意思決定支援/代弁を行う。意

見表明支援は、施設職員等に利用者の意見に耳を傾けてもらえるように仲介をしたり、利用者が意見を伝える場に同席して支援する。

代弁は利用者に代わって意見や意思を伝えることを意味するが、口頭と文書の二つの方法がある。「施設訪問アドボカシー利用契約書（モデル）」においては、「（アドボケイトは）利用者の人権の確保のために、利用者の求めに応じて、口頭または文書により意見を述べるができる」（第6条2）としている。また、施設の責務として、「利用者からの意見表明（アドボケイトによる代弁を含む）を受けた場合には、速やかに（原則として1週間以内に、困難な場合には遅くとも1か月以内に）、何らかの誠実な対応を行なったうえで、それを当該利用者及びアドボケイトに対して報告するものとする」（第9条2）と定めているのである。

(3) システムアドボカシー（制度改善）実践方法の開発

利用者が抱える苦情や懸念の背景には、多くの場合システムの問題点がある。アドボケイトがそのことに気づいた場合に、施設にそれを伝え改善を求めることになる。障害児者施設の第三者評価は義務化されていない。そのため、受信していない施設の場合には、構造的な問題をアドボケイトが指摘し、提案していくことが重要である。

「施設訪問アドボカシー利用契約書（モデル）」（第10章）においては、「（施設及びアドボケイト派遣団体は）アドボカシー活動の状況を踏まえて、利用者の人権の確保及び甲（施設）が提供する福祉サービスの質の向上のために、また施設訪問アドボカシー活動の評価と改善のために、システム検討会を開催する」（第11条3）と規定している。このシステム検討会は学期に1回程度定期的に開催し、施設の利用者委員、管理者（施設長等）、アドボカシー推進員、アドボカシー派遣団体管理者（アドボカシー派遣責任者・スーパーバイザー等）、アドボケイトが参加する。必要に応じて関係する施設職員、利用者等も参加する。この検討会によって、システムの問題点及び改善策について話し合うのである。

問題点及び改善策の検討に関しては、既存の権利擁護システムの活性化も重要な課題となる。第三者委員、意見箱、ケースワーカーの訪問面接が既存の権利擁護システムとして存在するが、利用者にとって身近なものではなく、十分に機能していないことが懸念される。利用者からは、意見箱に入れても対応が遅い、回答がない、意見箱を知らないという意見もあった。

「施設訪問アドボカシー利用契約書（モデル）」においては、第11条（年次報告書及び検討会）において、「1 乙（アドボケイト派遣団体）は年度ごとに施設訪問アドボカシーの活動状況に関する年次報告書を作成、公表する。2 乙は、施設訪問アドボカシーの活動状況に関する年次検討会を開催する。」と規定している。報告会、報告書は広く公開するものであり、社会に対して制度改善の必要性を発信する機会である。また第12条（社会への提言活動）においては、「乙は、施設訪問アドボカシー活動の状況をふまえて、社会的な制度改善に向けた提言等の活動を行う。」と規定している。

4. 研究の反省・考察

- (1) 個別支援計画への意見表明支援などへの、利用者の代弁・意見表明支援の方法の開発に期間内で至ることができなかった。今後の課題である。
- (2) 日本版施設訪問アドボカシーによる施設内虐待等不適切な処遇の予防の実践方法の開発に期限内で至ることができなかった。今後の課題である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①堀正嗣：合理的配慮をとらえなおす—能力主義批判の視点から、『障害学研究』、13 巻、2018.

(2) 口頭発表

①堀正嗣：障害児者入所施設への訪問アドボカシーの構想：意思決定支援と地域移行に関わって、「障害学研究会九州沖縄部会大分研究集会」、2018.

②【招待講演】堀正嗣：「都道府県児童福祉審議会を活用した子どもの権利擁護の仕組み」に関する提案、「子ども支援学研究会」、2017.

(3) 出版物

- ①堀正嗣、栄留里美、久佐賀眞理、鳥海直美、農野寛治共著『独立子どもアドボカシーサービスの構築に向けて』、解放出版社、243p、2018.

学 校 名	龍 谷 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	大学におけるシティズンシップ教育の意義と方法に関する研究 —政治的リテラシーの視点からのアプローチ—		研 究 分 野	法 学
キ ー ワ ー ド	①シティズンシップ教育 ②主権者教育 ③民主主義(デモクラシー) ④政治的リテラシー ⑤若者の政治離れ ⑥選挙投票率 ⑦問題発見/解決型学習(Problem-Based Learning, PBL)			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
渡 辺 博 明	法 学 部	教 授	代表者、統括、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	人 間 ・ 科 学 ・ 宗 教 ー 総 合 研 究 セ ン タ ー	研究フェロー	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	人 間 ・ 科 学 ・ 宗 教 ー 総 合 研 究 セ ン タ ー	研究フェロー	シティズンシップ教育の方法論とイタリアに関する 現状分析
落 合 雄 彦	法 学 部	教 授	アフリカの紛争経験国におけるシティズンシップ 教育の現状分析
橋 口 豊	法 学 部	教 授	イギリスのシティズンシップ教育における国際 関係の意義の研究
寺 川 史 朗	法 学 部	教 授	シティズンシップ教育における憲法学の定位に 関する研究
濱 中 新 吾	法 学 部	教 授	政治的リテラシーの評価基準およびイスラエルの 政治教育に関する研究
奥 野 恒 久	政 策 学 部	教 授	憲法学における民主主義教育の可能性の研究
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
的 場 信 敬	政 策 学 部	教 授	英国におけるシティズンシップ教育の社会的 意義と効果の現状分析
中 島 琢 磨	法 学 部	教 授	政治的リテラシーの研究、日本外交分野に おけるシティズンシップ教育の方法の研究
濱 口 晶 子	法 学 部	准 教 授	憲法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 地 崎 経 済 大 学 部 域 政 策	准 教 授	シティズンシップ教育の方法論とイギリスに 関する現状分析
城 下 賢 一	大 阪 薬 科 大 学 部 薬 学	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	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
野 田 葉	法 学 部	非 常 勤 講 師	EUレベルのシティズンシップ論と民主主義論に 関する研究

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探求し、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、(中学校・高等学校ではなく)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・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。

2017年度は3年計画の最終年であり、実践的な試みを継続するとともに、海外事情調査を含めた各メンバーの研究成果を共有し、整理する。また、本プロジェクトの成果の主要部分を書籍にまとめて公開できるよう準備を進める。

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3年目である2017年度には、主として以下のような活動を予定していた。

- (1) 学生が自らの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模索を継続する。
- (2) シティズンシップ教育の問題状況を把握するための比較対象としての海外調査を継続する。主なものは1年目および2年目で完了しているため、それらに加えて補足的な調査を実施する。
- (3) 適宜研究会を開催し、メンバーが各自のテーマに沿って進めてきた研究成果の共有を目指す。前年度は、海外調査やシンポジウムの実施に力を注いだこともあり、メンバー間での意見交換のための研究会は2回実施したのみであった。2017年度は全体の総括を試みるためにも、研究会の回数を増やす必要がある。
- (4) 3年間のプロジェクトの成果を書籍として刊行することを目指し、そのための準備を進める。

3. 研究の成果

3年計画の最終年度となる2017年度は、代表者を中心に共同研究プロジェクト全体で得られた知見を整理するとともに、各共同研究者が自身のテーマに関する調査・研究の成果をまとめる作業を進めてきた。また、そのためにメンバー相互での情報交換、知見の共有を試みた。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：今年度も法学部1年生全員を対象にした「現代社会と政治」の授業において、政治家を招いた講演を実施し、当日の質疑・応答や、前後の時間での準備・検討をも含めて、受講者に現代社会の課題や政治の実情について考えさせることができた。講師およびテーマは以下の通りである。

第1回(6月27日)、小林美智子茨木市議会議員「働くことと子育て—政治の現場から」

第2回(7月4日)、福山哲郎参議院議員「国会議員としてみた現代日本政治—政治の現場から」

(2) 討論型の授業：前年度に続き、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、受講者に政治参加を意識させる試みを行った。

(3) 海外調査：ノルウェー(渡辺、9月8日～14日)、オーストラリア(石田、1月29日～2月6日)について、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) 研究会：2017年度中に5回の研究会を開催した。各回の時期、報告者およびテーマは下記のとおりである。

第1回(4月22日)、清田雄治(愛知教育大学教授)「18歳選挙権と『主権者教育』のあり方—参議院選挙アンケート結果が示唆するもの」

第2回(5月13日)、石田徹「ヨーロッパ調査報告と共同研究における報告者の研究課題」、高橋進「イタリアにおける新科目『市民と憲法』の導入とその現状」、落合雄彦「シエラレオネ、中等教育、シティズンシップ教育」、城下賢一「政治教育の岐路—蠟山政道の政治教育論をもとに」

第3回(7月15日)、寺川史朗「アメリカ合衆国都市部における教育改革と憲法伝統」、渡辺博明「大学におけるシティズンシップ教育の課題と『政治的リテラシー』」

第4回(2月24日)、渡辺博明「大学におけるシティズンシップ教育の可能性と課題—政治的シティズンシップ教育の観点から」、城下賢一「政治教育の岐路—蠟山政道の政治教育論をもとに(続)」、寺川史朗「アメリカにおける教育統制の変容とシティズンシップ教育の醸成空間」、福島都茂子「フランスのシティズンシップ教育の現状—ペイヨン法による『道徳・市民教育』(EMC)の導入過程とライセンス」

第5回(3月17日)、石田徹「政治的シティズンシップ教育と周辺諸教育との関係をめぐって—社会的シティズンシップ教育、キャリア教育、職業教育」、奥野恒久「教育と民主主義—シティズンシップ教育の試みを手がかりに」、大村和正「英国のシティズンシップ教育をめぐる政治」、高橋進「イタリアにおける新科目『市民と憲法』の導入とその現状(続)」

以上のような活動を経て、全体として、日本における主権者教育については、民主政治と選挙の重要性を説いて投票を促すだけでなく、社会の構成員たる市民を育むシティズンシップ教育として展開されることがいっそう重要になっているとの認識を得た。「18歳選挙権」の実現前後で小中学校・高等学校においてさまざまな主権者教育が実施されているとはいえ、たとえば、就労や家族形成などの可能性を意識した実践的な取り組みが可能な点、自己の認識や行為の意味自体を問うるといった点などで、大学における主権者教育には独自の意義があることが確認された。それと同時に、理論的な検討作業を通じて、主権者教育・シティズンシップ教育の実施に際しては、政治的リテラシーの獲得を通じた「意識化」によって批判的な視点を確保するとともに、市民自らが民主主義の担い手となるべく学習する「主体化」の側面が不可欠なことも明らかにされた。

また、国外の主権者教育・シティズンシップ教育の動向については、共同研究者が国ごとの事情について調査研究を行い、それぞれに成果を得ている。中でもたとえば、イギリスの中等教育

における「シティズンシップ」の科目化やスウェーデンの「民主主義教育」の経験は、主権者教育の内容面でのあり方を考える上で、また、フランスの宗教的中立をめぐる議論やイタリアでの新科目（「市民と憲法」）の導入をめぐる議論は、主権者教育をめぐる課題状況を考える上で示唆に富むことが明らかになった。

こうして得られたさまざまな知見に実践的な取り組みの経験も加えた本プロジェクトの成果の主要部分については、2018年度中に書籍として公刊されることが決まっている。

4. 研究の反省・考察

- (1) 2017年度（およびこの3年間）の研究成果としては、上記3に示したように、シティズンシップ教育の特性に関する理解の進展が挙げられる一方で、計画段階で想定していたような、政治的リテラシーの要件をその習得状況がある程度検証可能な形で整理するという点については十分に実現することができず、当初の見通しの甘さが反省される。他方で、政治的リテラシーがその性質上、長期的な相互作用を通じて獲得されるものであり、単純な形では伝授されえないという点がこの間の活動を通じて明らかになったこと自体、研究の成果だという面もある。これらのことを、出版物を通して外部に発信しつつ、プロジェクトのメンバーそれぞれが実践的な努力を続けることにより、今回の共同研究を今後のシティズンシップ教育の発展につなげていきたいと考えている。
- (2) 授業実践の面では、過去2年間と同様に、学生が政治の現場に携わる人の生の声を聴き、現実の問題や政治について考える機会を設けようとした。一年生向けの授業では、これまでに市長や市議会議員を招いてきたが、2017年度には国会議員を招聘し、国政の現場への認識を深めることもできたという点で、より有意義なものとなった。
- (3) 海外調査については、ノルウェーを北欧（スウェーデン）の、オーストラリアを英語圏（イギリス、アメリカ）の補完的事例と位置づけ、有意義な形で対象国を拡大して実施できたと考えている。
- (4) 2017年度中の成果公表の方法としては、昨年度のシンポジウムに続き、学会報告などの口頭発表の機会を設けられるとよかったが、実現できなかった。この点については、代表者の調整能力の不足に原因があったと反省している。
- (5) 本プロジェクトの最終的な成果発表としては、個々のメンバーによる著作とは別に、共著書の刊行を予定しており、2017年度中にそのための段取りを整えることができた。2018年3月末の時点で出版社や章立てを含めた内容も決まり、その後8月末の原稿提出に向けて各執筆者が準備を進めている。この点で、全体の成果を対外的に発表するという目的が達成される目処は立ったと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 渡辺博明「大学における主権者教育の可能性と課題に関する考察—政治的シティズンシップ教育の観点から」、『龍谷法学』第50巻第4号、2018年3月、323-347頁。
- ② 福島都茂子「フランスの『道徳・市民教育（EMC）』の導入とライシテ—テロの影響とシティズンシップ教育」、『社会科学研究年報』第48号（掲載予定）。
- ③ 寺川史朗「目指されるべき『教育』と憲法改革」、『龍谷法学』第50巻第4号、2018年3月、189-216頁。
- ④ 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Ⅱ・完）」、『社会科学研究年報』第47号、2017年5月、181-194頁。
- ⑤ 城下賢一「規制改革の政治力学 自民党農政と対農協関係」、阪野智一・近藤正基編著『刷新する保守—保守政党の国際比較』弘文堂、2017年12月、21-53頁。
- ⑥ 石田徹「欧州を揺るがす『福祉ポピュリズム』の波—『左翼ポピュリズム』というもう一つの動き」、『龍谷政策学論集』第7巻第1・2合併号、2018年3月、3-17頁。

(2) 口頭発表
なし。

(3) 出版物

① 石田徹・高橋進・渡辺博明（編）『18歳選挙権時代のシティズンシップ教育—現代における主権者教育の可能性』法律文化社（2018年度中に刊行予定）。

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 －北海道物流の特異性と道内地域性の視点から－		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 —北海道物流の特異性と道内地域性の視点から—

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処罰の厳格化への対応」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、「人口約540万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、道北地域、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29年度は、前年度に「(テーマ1)北海道物流の地域性・特異性の整理」により明らかにした「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」を踏まえ、地域強靱化に向けた「(テーマ2)北海道物流における課題と対策の検討」を行う。

(2) 計画

平成29年度には、主に以下の3項目について実施する。

①災害などの有事における代替輸送状況の調査を行う。

②北海道物流の整理を深化するために前年度に引き続き九州物流を対象とした分析を進める。

③食料基地北海道の発展に寄与する物流に関して、課題を整理するため、アンケート調査

を実施する。

④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)～(4)に概括する。

(1) 有事における代替輸送状況に関する調査

「有事における物流の在り方」の検討を目的として、災害などの有事における代替輸送状況について、平成28年に北海道をおそった台風災害と対象として、文献調査、ヒアリング調査に基づき整理した。「十勝地域」で開催したシンポジウム(シンポジウム～地域経済の発展を支える物流と自治体の役割について in 十勝～, 平成29年7月, 5. 研究発表(1)シンポジウムの開催①)において研究成果を公開すると共に、パネリスト(商工会議所, 農業協同組合, 通運事業者)、聴講者との情報・意見交換により、「災害に対する強靱化」、「北海道経済を支える物流システムの構築」、双方の観点から「平時における備え・取り組みの重要性」が確認された。

加えて、著書『地域経済強靱化に向けた課題と戦略—北海道の6次産業化の推進と物流の課題の視点から』(5. 研究発表(4)出版物の③)の「6章 地域経済の強靱化に向けた対応と今後の課題」に纏めた。

(2) 九州物流を対象とした調査

北海道物流に関する整理を深化するために、前年度に引き続き九州・本州間の輸送について分析を進めた。昨年までの成果と新たに調査した長距離フェリーによる輸送実績を基に、トラック運転手の労働時間に関する問題やトラック運転手不足等の解決手段として期待される「鉄道貨物輸送」、「長距離フェリーを介したトラック・シャーシ輸送」を対象とし、輸送状況を明らかにした。本成果については、土木学会全国大会第72回年次学術講演会において公表した(5. 研究発表(3)口頭発表等の①)。

(3) 実態・課題の把握を目的としたアンケート調査・分析

道内でトラック運送事業を営む企業を対象に「北海道物流実態把握調査」を実施した。国土交通省北海道運輸局、日本物流学会北海道支部、公益社団法人北海道トラック協会、一般社団法人北海道運輸交通研究センターの後援により実施した本調査の主たる項目は、「1. 輸送機能の生産性向上」、「2. 積み込み・取卸し拠点での取組み」、「3. 料金設定と負担の適正化」、「4. 労働環境の改善・人材確保」、「5. 災害に対する備え」である。1,143通の配布に対し、回収数は223通であり回答率は約20%であった。トラック運送事業を営む企業を対象とするアンケート調査の回収率としては、異例の高さであった。また、社長、取締役など上級幹部による回答が約半数と多く、関心の高さがうかがえた。現在、大凡の集計が終わり、分析を進めている。

(4) 学会・シンポジウムを通じた成果の公開

シンポジウム2回、学会誌への掲載(2編)、学会での口頭発表(1件)、書籍(1)を通じて成果を公表した。

(「3. 研究の成果」の(1)に前掲)平成29年7月26日に、平成28年8月に台風災害が発生した「十勝地域」においてシンポジウムを開催し、前項(1)に関する研究成果を報告した(5. 研究発表 (1)シンポジウムの開催①)。当地の商工会議所、農業協同組合、聴講者らと非常時の代替輸送のあり方などを中心に、意見交換・議論を行い、研究成果の妥当性を検証した。研究代表者の相浦宣徳、田辺隆司が話題提供者・パネリストを務め、阿部秀明が話題提供者・パネルディスカッションの司会を務めた。

また、平成30年3月13日には、「消費地としての北海道における物流の役割」をテーマとしてシンポジウムを開催した(5. 研究発表 (1)シンポジウムの開催②)。パネルディスカッションでは、①本州から北海道への輸送を担う物流事業者(北海道通運株式会社、新日本海フェリー株式会社)、②本州で生産し北海道に製品を供給する生産者(株式会社ネスレ日本)、③本州から商品を取り寄せ北海道で販売する小売業者(株式会社ラルズ)、④北海道の消費者(一般社団法人北海道消費者協会)のメンバーで討論した。北海道物流における諸処の課題による運賃上昇の可能性、上昇分の負担先などについて議論し、北海道における影響の大きさ、解決に向けた対策の必要性について確認した。研究代表者の相浦宣徳が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。

4. 研究の反省・考察

当初の研究計画に準じ、極めて順調に遂行された。最終年度も同様に研究を遂行し、成果を広く公表する。現在、平成30年10月6日北海道農業経済学会との共催でシンポジウムを開催する予定で準備を進めている。

5. 研究発表

(1)シンポジウムの開催

- ①「シンポジウム～地域経済の発展を支える物流と自治体の役割についてin十勝～」(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29年7月26日、とちかちプラザ)
- ②「シンポジウム～道民の生活を支える物流を語る in Sapporo～」(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30年3月13日、北海商科大学)

(2)学会誌等

- ①相浦宣徳、他:【平成29年度日本物流学会賞】長距離貨物輸送の物流労働生産性指標の提案と生産性向上に向けた考察、日本物流学会誌 第25号、pp. 79-86、2017
- ②阿部秀明、相浦宣徳、他:全国経済活動における北海道・道外間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経済効果、日本物流学会誌 第25号、pp. 31-38、2017

(3)口頭発表

- ①相浦宣徳、阿部秀明、他:鉄道貨物・長距離フェリーによる輸送状況と貢献に関する一考察～北海道発着貨物を事例として～、土木学会全国大会第72回年次学術講演会、2017.9

(4)出版物

- ①シンポジウム～地域経済の発展を支える物流と自治体の役割についてin十勝～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、2018. 3
- ②シンポジウム～道民の生活を支える物流を語る in Sapporo～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、2018. 3
- ③阿部秀明、相浦宣徳、他：『地域経済強靱化に向けた課題と戦略—北海道の6次産業化の推進と物流の課題の視点から』、共同文化社、初版2018. 1. 11

学 校 名	愛 知 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	「家族と市場の境界」に関する理論及び実地調査に基づく実証分析 —沖縄のファミリービジネスの事業承継の事例—		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①事業承継 ②家族内移転 ③権限移譲 ④リスク・シェアリング		

○研究代表者

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

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
竹 田 陽 介	上 智 大 学 経 済 学 部	教 授	理論モデル・リーダー
小 卷 泰 之	大 阪 経 済 大 学 経 済 学 部	教 授	データ解析・リーダー
渋 澤 博 幸	豊 橋 技 術 科 学 大 学 工 学 研 究 科	准 教 授	データ解析担当
島 袋 伊 津 子	沖 縄 国 際 大 学 経 済 学 部	教 授	理論モデル担当
富 村 圭	経 営 学 部	准 教 授	理論モデル担当
村 上 敬 進	沖 縄 大 学 法 経 学 部	教 授	データ解析担当

「家族と市場の境界」に関する理論及び実地調査に基づく実証分析 — 沖縄のファミリービジネスの事業承継の事例 —

1. 研究の目的

(1) 家族は、教育・就労・結婚・離婚・出産・遺産相続などのライフサイクルにおいて、集合的な意思決定の主体である。社会的分化を経た現代の家族は、顔の見える家族内での資源・リスクの配分だけではなく、匿名性の担保される市場取引にも頼る。本研究は、家族内の所得・リスク移転あるいは市場取引かの選択に関わる「家族と市場の境界」について、理論モデルを構築し、実地調査を行った上で、データを用いて実証分析を行う。

研究の着想は、内製か市場調達かの生産要素の選択に関わる「企業と市場の境界」の問題にある。企業と市場の境界の決定要因には大きく分けて、ロナルド・コース流の取引費用、フランク・ナイト流のリスク・シェアリングの二つがある(Demsetz, 1988, Journal of Law, Economics, and Organization)。本研究は、この二項対立を家族と市場の境界の問題に援用する。とりわけ、「模合」と呼ばれる独自の相互扶助、ウチナーグチ、一般紙の訃報広告などに見られるように、地縁・血縁に基づく拡大家族が社会的なアイデンティティを形成する沖縄を取り上げ、ファミリービジネスの事業承継を事例とする。わが国では多くの事業主が高齢化し、小規模事業主が自身の代での廃業を考えている。政府は事業承継の環境を改善するため、本年「中小企業経営承継円滑化法」を施行し、相続税・贈与税の納税猶予などでの優遇、金融庁の監督の下での地域金融機関・信用保証協会の金融支援を実施し、地域経済の生産性の向上、雇用の確保を図っている。しかしながら、事業承継に関する先行研究の多くは、ファミリービジネスの設備投資・研究開発投資に関する経営学的分析に限られる。家族の集合的意思決定について、ミクロ経済学的理論モデルに基づき分析した研究は稀である。本研究で構築される経済学的理論モデルは、中小企業の事業承継に対する適切な政策指針を提供すると期待される。

これまで、本研究に参加するメンバーを中心に、関連するテーマについて以下の二つの研究プロジェクトを実施してきた。

- ① 2015年に宮古島商工会議所の会員企業を対象として、事業承継に関するアンケート調査を行った(科研費「インフォーマル・フォーマルな金融を通じた家族によるリスク・シェアリング: 沖縄の事例」)。事業主のみならず、事業を引き継ぐ可能性のある子息に対しても同時に調査を行い、事業を引き継ぐ側の息子・娘は、親の行っている事業への興味や事業を引き継ぐ意志が、事業主の親が考えている以上に高いことがわかり、中小企業の事業承継を考える際、家族内での意志の違いを考慮する必要がある。
 - ② 第二の研究実績は、全国10大学の学部生を対象としたアンケート調査である(愛知大学「大学生アンケート調査(2014年7月実施)報告書」)。親の就労と大学生のアルバイト、仕送り額などのデータを用いた実証分析から、家族内の所得配分を左右する要因が親と子の就労意欲に影響しない単一の予算制約に従うモデルではなく、親が労働参加しない場合にも、親の潜在的な賃金水準に子の就労が依存する集合的意思決定モデルが当てはまることを示した。
- (2) これらの先行研究実績にもとづき、本研究が明らかにする点は二つある。
- ① 第一は、家族組織のなかで親(Principal)から子(Agent)への事業承継に関する理論モデルを構築し、理論的含意を導く。経済組織における権限の配分とAgentによる情報生産の相互作用に関する理論モデル(Aghion and Tirole, 1997, Journal of Political Economy)を援用する。決定権をもつ名目権限を握る親が、支配権をもつ実質権限を有する子の意思決定に介入することを妨げ、子の情報生産の誘因両立制約を緩め、円滑な事業承継を可能にするために、不特定多数のステークホルダーである市場への名目権限の委譲は有効であると見られる。また、取引費用かリスク・シェアリングの基準で見て、親子が異なる目的を選好する場合、親子のコミュニケーションは情報の非対称性を小さくし、親の子への介入が多用されるため、コミュニケーションは少なくなると考えられる。
 - ② 第二は、沖縄県商工会連合会・那覇商工会議所等と連携し、沖縄のファミリー企業を対

象としたアンケート調査を行い、上記の理論モデルの含意について、実証的に分析する。特に、事業承継に携わる経営指導員と情報交換を行い、アンケート調査票を精査・データ収集を行うことにしている。

2. 研究の計画

(1) 平成 29 年度の研究計画は、以下のようである。

- ①第一（理論モデル部門）は、家族組織における事業承継モデル(Aghion and Tirole, 1997、Journal of Political Economy、105(1))の検討を進め、親（Principal）と子（Agent）の名目権限と実質権限及び情報生産の相互依存関係を明示的に示すモデルの構築を目指す。その中で、親が名目権限を握っている状況において、たとえ親の実質権限が損なわれても、子の情報生産の Initiative が高められ、円滑な事業承継が可能となるためには、不特定多数のステークホルダーである市場への名目的権限の委譲は必要か、権限委譲を左右する要因として、取引費用かリスク・シェアリングのどちらが支配的かを示す。理論モデルの構築には、竹田陽介理論モデル・リーダーを中心に、島袋伊津子氏、冨村圭氏が検討を行う。
- ②第二（データ解析部門）は、沖縄県商工会連合会、那覇商工会議所、沖縄県事業引継ぎ支援センターなどこれまでの視察で知遇を得た担当者と連携し、理論モデルから導かれる事業承継に関する仮説について、沖縄のファミリー企業を対象としたアンケート調査を行う。具体的には、沖縄県商工会連合会、那覇商工会議所、沖縄県事業引継ぎ支援センターなどと共同で、対象となる中小企業群に対してアンケート調査を実施する。アンケート調査において重要な点は、事業主（親）と事業承継予定者（子）に対して、同時に調査を実施する点である。アンケート調査・集計については、小巻泰之データ解析・リーダーを中心に、渋澤博幸氏、村上敬進氏が検討を行う。アンケート調査の集計は、回収数が多い場合にはプロジェクトメンバー全員で集計作業を行うが、必要に応じて作業補助（アルバイト）を利用することを検討する。

3. 研究の成果

(1) 平成 29 年度の研究成果は、以下の通りである。

- ①那覇商工会議所と往復はがきを通じた事業承継アンケート調査を行った。具体的には、往復はがきに 5 問程度の簡便的な質問を行い、那覇商工会議所会員企業で、代表者の性別が 1962 年生まれ以前の企業を対象とした（4123 社中、1792 社を対象）。この調査は、簡便的な調査の特徴上、経営者に事業承継への「気づき」を与えるものである。調査結果は、生活経済学会中部部会で報告（打田委千弘、上山仁恵、島袋伊津子「沖縄の事業承継に関する一考察－那覇商工会議所共同アンケート調査から－」2017 年 11 月）した。また、2018 年 1 月には、沖縄県の事業承継に関係する団体を前にした会議（沖縄県事業引継ぎ支援センター主催、沖縄県事業引継ぎコーディネーター第 8 回連絡会議）で報告を行った。上記の会議内容は、地元紙（琉球新報、沖縄タイムズ）でも詳細に報じられた。
- ②沖縄県商工会連合会、那覇商工会議所と共同で、現経営者である親と後継候補者である子を対象とした詳細なアンケート調査を実施した。理論モデルは、Aghion and Tirole、1997 である。調査方法に関しては、沖縄県商工会連合会は経営指導員のヒアリング方式、那覇商工会議所は郵送方式を採用した。調査結果の暫定版については、2018 年 6 月の那覇商工会議所主催、経営指導員研修会で報告を行った。
- ③沖縄県事業引継ぎ支援センターが実施する、沖縄県下の法人企業 3761 社（社長年齢が 60 歳以上）に対して行った事業承継アンケート調査について、アンケート設計及びデータ処理を担当し、分析を行った。調査結果の暫定版については、2018 年 6 月の那覇商工会議所主催、経営指導員研修会で報告を行った。

4. 研究の反省・考察

(1) 各研究成果に関する反省・考察は、以下の通りである。

- ①理論モデルである、Aghion and Tirole、1997 を事業承継のアンケート調査票に対応させるために相当数の時間を使ったが、更に時間が必要であると考えた。また、今回のモ

デルは静学モデルであるため、動学モデルに対応したアンケート調査票の作成にも力を注ぎたいと考えている。

- ②今回、沖縄県商工会連合会、那覇商工会議所、沖縄県事業引継ぎ支援センターなどを通じたアンケート調査を実施出来たが、沖縄本島においては浦添商工会議所、沖縄商工会議所と共同での調査が実施出来ていないため、担当者と連絡を密にしてアンケート調査が実施出来るように努力したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①打田委千弘、上山仁恵、島袋伊津子「沖縄の事業承継に関する一考察－那覇商工会議所共同アンケート調査から－」、生活経済学会中部部会（愛知大学）、2017年11月

(2) 口頭発表

- ①打田委千弘「沖縄の事業承継に関するこれまでの調査と今後の課題」、沖縄県事業引継ぎコーディネーター第8回連絡会議、2018年1月（琉球新報、沖縄タイムズに掲載）

(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 －新品種ストライプペポ種子等の利活用－		研究分野	家 政 学
キ ー ワ ー ド	①ペボカボチャ種子 ②培養脂肪細胞 ③脂肪分解 ④過活動膀胱			

○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	研究統括及び種子成分分析、ラット投与試験・ラット培養細胞の解析

○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	ラット培養細胞における脂肪分解の解析
中 村 健 道	理 化 学 研 究 所 環境資源科学研究センター	専 任 研 究 員	種子成分分析

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等の利活用—

1. 研究の目的

- (1) 北海道産食用ペポカボチャ種子の生活習慣病予防効果に関する科学的根拠を明らかにすることによって、付加価値を向上させ、生産地域における六次産業化に貢献する。
 - ① 昨年度の当学術研究振興資金等による研究によりストライプペポ種子エタノール抽出物がラットの初代培養脂肪細胞のホルモン感受性リパーゼ活性に影響を与えることを見出したので、その活性成分を追跡する。
 - ② ストライプペポ種子エタノール抽出物が膀胱上皮の炎症を抑制する傾向を見出したので、炎症を誘導するアクロレインに対する防御的効果を調べる。

2. 研究の計画

- (1) 脂質代謝改善作用
 - ① ストライプペポ種子分画抽出物のホルモン感受性リパーゼ活性に対する影響の測定：脱脂抽出物より、含水エタノールで分画抽出し、ラット初代培養脂肪細胞のホルモン感受性リパーゼ活性を *in vitro* の指標として活性画分を取得する。
 - ② 動物実験により血中あるいは肝臓中の中性脂肪濃度に対するそれら含水エタノール画分の影響を *in vivo* で調べる。
- (2) 排尿障害抑制作用
 - ① ストライプペポ種子抽出物によるシクロホスファミド誘導膀胱炎の抑制作用
ストライプペポ種子より 95%エタノール抽出物、または熱水抽出物を分画し、膀胱炎の予防効果について調べる。
 - ② 活性カルボニルである炎症物質アクロレインの定量：モデルラットの炎症作用抑制機構を明らかにするため炎症物質の動態を確認し、ストライプペポ種子抽出物の作用点を推定する。

3. 研究の成果

- (1) 脂質代謝改善作用
 - ① ストライプペポ種子抽出物のホルモン感受性リパーゼ活性に対する影響の測定
 - ア. ラット内臓脂肪細胞におけるストライプペポ種子 95%エタノール抽出物による脂肪分解活性の亢進
ストライプペポ種子を脱脂後、95%エタノール抽出物を試料とし、これを 0 から 1,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲でラット培養脂肪細胞に投与し、生成する脂肪分解物であるグリセロール量を測定した。その結果、95%エタノール抽出物の投与量に依存してグリセロール生成量は増加し、無添加時に比較して 1,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 投与では約 7 倍となったことを見出した。
この時 95%エタノール抽出物の培養脂肪細胞に対する毒性を細胞生存率として 10^{-8}M ノルアドレナリンと 95%エタノール抽出物を同時に添加して細胞による水溶性テトラゾリウム塩の還元性により調べたところ、細胞生存率はコントロールと比較して有意な変化はなかった。このことからストライプペポ種子 95%エタノール抽出物の細胞毒性が十分に低いことが分かった。
 - イ. ラット内臓脂肪細胞におけるストライプペポ種子 65%エタノール抽出物による脂肪分解への影響
ストライプペポ種子を脱脂後、95%エタノール抽出残渣を用いて、さらに 65%エタノールで抽出した抽出物を 65%エタノール抽出物とした。65%エタノール抽出物を 0

から 1,500 µg/mL の濃度範囲でラット培養脂肪細胞に投与し、生成するグリセロール量を測定した。その結果、65%エタノール抽出物の投与濃度に依存してグリセロール生成量は増加し、無添加時に比較して 1,500 µg/mL 投与では約 3 倍となったことを見出した。しかしながら 95%エタノール抽出物の活性増加と比較すると明らかに低い値を示し、1,500 µg/mL 投与の場合で約 30%程度の活性亢進であった。このことからストライプペポ種子エタノール抽出物の内臓脂肪分解活性亢進作用の関与成分は、65%エタノール抽出物よりも主として 95%エタノール抽出物に存在することが示唆された。

②動物実験による血中あるいは肝臓中の中性脂肪濃度に対する含水エタノール画分の影響

25%高脂肪食条件下において、ストライプペポ種子 95%エタノール抽出物を摂取したラットの血中中性脂肪濃度を測定したところ、飼育 27 日目で High Fat 群 (402.3±114.3 mg/dL) に対し、Pepo 群 (312.5±148 mg/dL) において 22%の減少が見られたが、肝臓中中性脂肪濃度についてはばらつきが大きく有意な抑制効果は認められなかった。このことから肝臓における脂質合成系や分解系についてどのように影響されているか、より詳細に検討する必要があると考えられた。

(2) 排尿障害抑制作用

①ストライプペポ種子抽出物によるシクロホスファミド誘導膀胱炎の抑制作用の定量化 ア. ストライプペポ種子 95%エタノール抽出物による過活動膀胱の抑制

ストライプペポ種子を脱脂後、95%エタノール抽出物を試料とした。95%エタノール抽出物をラットに 6 日間摂取させ、7 日目にシクロホスファミド (60 mg/kgBW) を投与し膀胱炎を誘導したとき、一日当たりの排尿回数はやや低下した。実験に用いたラットから膀胱標本を作製し顕微鏡観察したところ、95%エタノール抽出物摂取群では強度の出血や膀胱上皮剥離は認められず、浮腫が見られるものがあつたが全体的に炎症は軽度であった。このことはストライプペポ種子 95%エタノール抽出物に穏やかな炎症抑制作用が認められることを示した。

イ. ストライプペポ種子熱水抽出物による過活動膀胱の抑制

ストライプペポ種子を脱脂後、熱水抽出を行った。ストライプペポ種子熱水抽出物をラットに 6 日間摂取 (1.5%混餌) させ、7 日目にシクロホスファミド (60 mg/kgBW) で膀胱炎を誘導したとき、ラットの活動期における 1 時間あたりの排尿量は有意に低下した。このとき熱水抽出物を摂取していないラットでは 1 時間あたりの平均排尿回数が上昇したが、熱水抽出物摂取ラットでは排尿回数も膀胱炎誘導後の有意な上昇は認められなかった。このことから熱水抽出物には過活動膀胱による活動期の排尿量、排尿回数の上昇 (すなわち頻尿状態) を改善する作用が認められることが分かった。しかしながら休息期では排尿量、排尿回数ともに活動期の 50%程度であり、膀胱炎誘導による排尿量、排尿回数の上昇は認められなかった。

②活性カルボニルである炎症物質アクロレインの定量

膀胱炎誘導剤であるシクロホスファミドは肝臓の cytochrome p450 解毒酵素によって代謝され、がん細胞増殖抑制物質とアクロレインを生成する。アクロレインは分子量 56 の活性カルボニルとされる不飽和アルデヒドであり、非常に反応性が高い。遊離のアクロレインは生成後速やかに細胞内近傍のたんぱく質やペプチドなどのリシン残基と結合し、アクロレイン付加体を生成することが知られており、近年これを免疫的に検出する方法が開発されている。そこでモデルラットの過活動膀胱抑制機構解明の基礎としてアクロレインの動態を確認した。ストライプペポ種子熱水抽出物を 1.5%混餌し 6 日間摂取させたラットにシクロホスファミド (60 mg/kg BW) を投与し、24 時間後に肝臓、腎臓、膀胱、ならびに血清と尿を採取し、それぞれのアクロレイン付加体濃度を Acrolein-Lysine Adduct Competitive EIA Kit(タカラバイオ)を用いて ELISA 法により定量した。その結果、肝臓、膀胱、ならびに血清と尿においてアクロレイン付加体濃度

はストライプペポ種子熱水抽出物摂取の有無との有意な関連性は認められなかったが、腎臓においてはストライプペポ種子熱水抽出物摂取によってアクロレイン付加体濃度が有意に低くなり、正常腎臓と同程度であった。このことは腎臓におけるアクロレイン付加体の排出が促進された結果と考えられ、腎臓に対しストライプペポ種子熱水抽出物がなんらかの働きかけを行い、腎臓機能の強化に関連するものと考えられた。当研究室における以前の検討においてもストライプペポ種子水溶性抽出物が腎臓の炎症を抑制する効果を認めており、このことと関連しているかもしれない。

一方、膀胱や尿中におけるアクロレイン付加体濃度に大きな差異がなかったということから、ストライプペポ種子熱水抽出物の過活動膀胱改善作用はアクロレインの膀胱上皮に対する刺激に対してストライプペポ種子熱水抽出物が膀胱上皮に競争的に作用して改善していることが示唆された。

4. 研究の反省・考察

(1) 中性脂肪上昇抑制作用

①ラット初代培養脂肪細胞を用いたホルモン感受性リパーゼ活性の測定系を確立した。この実験系を用いて、ストライプペポ種子 95%エタノール抽出物がホルモン感受性リパーゼ活性を亢進することは間違いないことが分かったが、関与する酵素群の発現、またその遺伝子発現を示すことできなかつた。次年度はその発現メカニズムの解明を目標としたい。今年度の実験により、ストライプペポ種子 95%エタノール抽出物によるホルモン感受性リパーゼ活性の亢進の際に細胞内のたんぱく質含有量に有意な変化がなかったことから遺伝子レベルで活性発現が制御されていることが示唆された。

②ラットを用いた *in vivo* 実験では、ストライプペポ種子 95%エタノール抽出物の血中中性脂肪濃度に関する作用は抑制傾向が見られたが、内臓脂肪重量に対するストライプペポ種子 95%エタノール抽出物の減少効果は認められなかった。

(2) 排尿障害抑制作用

①実験に用いたラットの膀胱標本を顕微鏡観察し、ストライプペポ種子 95%エタノール抽出物摂取群では全体的に炎症は軽度であり、すなわち穏やかな炎症抑制作用が認められたが、これを定量的に明確化することはできなかつた。

②ストライプペポ種子熱水抽出物は腎臓機能の強化に関与していることが示唆されたが、その作用の詳細を明らかにできなかつた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①坂井絵理、山口佳織、知地英征、中河原俊治、ラットにおける‘ストライプペポ’種子摂取による血中及び肝中中性脂肪低減効果、藤女子大学 QOL 研究所紀要、第 13 巻第 1 号、2018 年 3 月

(2) 口頭発表

①坂井絵理、及川小百合、田原志麻、田中文、平敏夫、生田裕、岡崎由佳子、中村健道、大西正男、中河原俊治、ペポカボチャ種子抽出物の脂質代謝に対する影響、日本食品科学工学会 2018 年北海道支部大会、2018 年 3 月

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 — フイトケミカルの制癌ターゲットの同定 —		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フイトケミカル 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 科 学 部 科	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 科 学 部 科	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イトケミカルの作用
竹 嶋 美 夏 子	栄 養 科 学 部 科 学 部 科	准 教 授	フイ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
小 野 美 咲	栄 養 科 学 部 科 学 部 科	助 教	フイ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

- ①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発症と再発の予防の可能性を探る。
- ②乳癌リスクに関与すると考えられるフィトケミカルを乳癌細胞で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、ジメトキシレスベラトロール（プテロステシルベン）、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

乳癌細胞を移植した担癌ヌードマウスにフィトケミカルを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（DEL）、ペチュニジン、マルビジンの4種について受容体状態の異なる乳癌細胞に対する抗腫瘍効果を検討した結果、DELのみが増殖抑制を示し、他のアントシアニン成分3種はほとんど効果がなく、このパターンは受容体状態に関係なかった。しかしDELの感受性は、エストロゲン受容体陽性細胞であるMCF-7が最も強く、アポトーシス誘導が主要な機序であった。さらにMCF-7細胞をヌードマウスに移植した実験ではDELの経口投与は腫瘍体積には差がなかったものの、DEL投与群の腫瘍は病理組織では癌細胞が減少し、巣状に増殖した癌細胞の周囲は線維芽細胞で占められていた。このためDELはIn Vivoでも癌増殖抑制効果があることが判明した。
- ②プテロステシルベン（PTR）は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 (RES) と PTR の増殖抑制効果の比較を行ったところ、PTR は RES 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 (Anticancer Res. 2017)。PTR 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、PTR 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 (Anticancer Res. 2017)。PTR は RES に比し高いバイオアベイラビリティを示し、半減期も長い乳癌治療に応用できる可能性がある。

- ③ 4 つの大豆イソフラボン成分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 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 (GEN) のみ感受性を示した。GEN 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。さらに細胞周期停止の誘発要因としては、細胞周期関連蛋白である cyclin B, cyclin E, CDK2, cdc2 には変化なく、p21 のみの増加していた。この機序として p21 蛋白のリン酸化が抑制されていたため、引き続きおこるユビキチン化による分解抑制による p21 蛋白の細胞内濃度維持が主要因と判明した。
- ④ GEN と他のイソフラボンとの組み合わせでは、エクオールとの組み合わせが最も強い増殖抑制がみられた。細胞レベルで見ると、GEN とエクオールを併用は BAX/BCL-xL 比を上昇させアポトーシスを誘導することが分かった (Nutrition & Cancer 2017)。

4. 研究の反省・考察

- ① アントシアニンの側鎖構造の相違で細胞増殖抑制に大きな差が出たが、乳癌のサブタイプ別でもこのパターンは変わらなかったため、その標的分子の作用点は受容体を介するものではなく、側鎖構造に依存しており今後解明する必要がある。デルフィニジンの感受性は、エストロゲン受容体陽性細胞である MCF-7 が最も強く、その作用機序は細胞周期の G1 期での抑制とアポトーシス誘導であることが分かったが、乳癌発症モデルラットでの増殖癌予防効果と乳癌移植ヌードマウスでの腫瘍増殖抑制効果の検証するためにはデルフィニジンの適切な投与量を設定する必要がある。
- ② プテロステイルベンはヒト乳癌移植担癌マウス実験において経口投与により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。今後は乳癌発症モデルラットによる乳癌発症予防実験を行う予定である。
- 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。
- ④ ゲニステインとエクオールとの組み合わせが最も強い増殖抑制がみられた。ダイゼインは腸内細菌によりエクオールに転換され、その腸内細菌は欧米よりアジア人に多いため、アジア人では大豆イソフラボンを食べるとエクオールが沢山出来るので、ゲニステインとの相乗作用が強く働き、乳癌の発症を抑えることが考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ono M, Ejima K, Higuchi T, Takeshima M, Wakimoto R, Nakano S. Equol Enhances Apoptosis-inducing Activity of Genistein by Increasing Bax/Bcl-xL Expression Ratio in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Nutrition and Cancer 69(8): 1300-1307, 2017年.
- ② Wakimoto R, Ono M, Takeshima M, Higuchi T, Nakano S. Differential anticancer

activity of pterostilbene against three subtypes of human breast cancer cells. Anticancer Res. 37(11) 6153-6159 2017年.

- ③Otsuka Y, Ueda M, Nakazono E, Tsuda T, Jin X, Noguchi K, Sata S, Miyazaki H, Abe S, Imai K, Iwamoto M, Masuda T, Moriguchi R, Nakano S, Tsuda H. Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women. Blood Coagul Fibrinolysis. 29(1):39-47, 2018
- ④Yasutake K, Moriguchi R, Kajiyama T, Miyazaki H, Abe S, Masuda T, Imai K, Iwamoto M, Tsuda H, Obe M, Kawate H, Ueno H, Ono M, Goromaru R, Ohe K, Enjoji M, Tsuchihashi T, Nakano S. Interannual study of spot urine-evaluated sodium excretion in young Japanese women. J Clin Hypertens 19(7) 653-660 2017年
- ⑤脇本麗、竹嶋美夏子、小野美咲、中野修治. プテロステ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 705(5) 17-24 2017年.

(2) 口頭発表

- ①小野美咲、中野修治. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src-activated human adenocarcinoma cells. 第76回日本癌学会学術総会 横浜 2017年9月29日
- ② Ono M, Higuchi T, Takehima M, Wakimoto R, and Nakano S. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src- and Ras-activated human adenocarcinoma cells. EACR-AACR-SIC 2017 Special Conference 2017年6月25日
- ③小野美咲、樋口貴子、竹嶋美夏子、脇本麗、中野修治. Src活性型ヒト腺癌細胞に対する大豆イソフラボンの抗増殖活性. がん予防学術大会2017 大阪 2017年6月17日
- ④竹嶋美夏子、脇本麗、小野美咲、中野修治. 高脂肪飼料給餌ラットにおけるリコピン高含有トマトパウダーの肥満、血清脂質、酸化ストレスに対する効果. 第71回日本栄養・食糧学会大会 沖縄 2017年5月20日
- ⑤脇本麗、竹嶋美夏子、小野美咲、中野修治. プテロステルベンのヌードマウス移植乳癌細胞の腫瘍形成に対する効果の検討. 第71回日本栄養・食糧学会大会 沖縄 2017年5月20日
- ⑥ Ono M, Higuchi T, Takehima M, Wakimoto R, and Nakano S. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src-activated human adenocarcinoma cells. Experimental Biology 2017 Chicago Illinois 2017年4月24日

(3) 出版物

- ①癌の栄養管理、最新 臨床栄養学 第3版、上原 誉志夫, 岡 純, 田中 弥生 光生館、分担：第22章 癌 (321-334)、2018年1月
- ②認定NSTガイドブック2017(改訂第5版)、南江堂、Chapter 21 がん患者の栄養管理 p224-229, Chapter 24 悪心・嘔吐 p256-260, Chapter 25 食欲不振 p261-266、2017年7月

学 校 名	豊 橋 創 造 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	サルコペニア克服へ向けた加齢性骨格筋萎縮機構の 解明 ー骨格筋機能とアディポネクチンパラドックスー		研究分野 体 育 学
キ ー ワ ー ド	①サルコペニア ②骨格筋 ③アディポネクチン ④筋衛星細胞 ⑤運動 ⑥薬物療法		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
後 藤 勝 正	豊橋創造大学大学院 健康科学研究科	教 授	研究代表者 総括 単一筋細胞実験とその解析・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 野 善 隆	豊 橋 創 造 大 学 学 部 豊 保 橋 健 医 療 学 部	講 師	遺伝子およびタンパク発現量の定量評価・動物実験・データ整理
横 山 真 吾	豊 橋 創 造 大 学 学 部 豊 保 橋 健 医 療 学 部	助 教	免疫組織化学染色とその解析

サルコペニア克服へ向けた加齢性骨格筋萎縮機構の解明 —骨格筋機能とアディポネクチンパラドックス—

1. 研究の目的

- (1) 平成 29 年 9 月に総務省が発表した統計によると、65 歳以上の高齢者人口は 3,514 万人、総人口に占める割合は 27.7%と共に過去最高の値を、さらに 90 歳以上の高齢者は初めて 200 万人を超える (206 万人) などと超高齢化が進行する我が国において、『健康と長寿』への人々の関心は増大を続け、『健康長寿』を求めて様々な取り組みが個人はもちろん、国や地方自治体など様々なレベルで行われていることは周知の事実である。世間には、健康食品と呼ばれる食品やサプリメントが氾濫する一方で、運動習慣は健康の維持増進に有効であると一般に受け入れられ、ウォーキングやジョギングなど様々な運動に取り組む人が増加している。全国各地で開催されるマラソン大会の申込みが募集開始後すぐに規定人数に達することやトレーニング機器のコマーシャルの多さはこうした運動ブームの象徴的な例である。これまでの研究から、長期臥床やギプス固定など運動の抑制は、骨格筋萎縮や筋力低下など骨格筋機能を著しく低下させ、運動の継続を阻む主要因となることが明らかになっている。したがって、健康長寿社会実現に向けて運動機能を直接担う『骨格筋機能』の維持・向上は重要な意味を持つことに疑いの余地はない。
- (2) 加齢に伴い骨格筋量や筋力などの骨格筋機能は低下する。こうした症状は加齢性筋肉減弱症 (サルコペニア)、あるいは運動機能の低下と捉えた運動器症候群 (ロコモティブシンドローム) あるいはフレイルとして、我が国をはじめ高齢化が進む先進諸国で大きな社会問題となっている。これは、前述のように高齢者人口が増加する一方で、骨格筋機能の低下が高齢者の転倒や転倒に伴う骨折、そして骨折を契機とした寝たきりや認知症発症の主要因となっており、結果的に高齢者医療費など社会保障関連支出の増大を招いているためである。低下した骨格筋機能でも適切なリハビリテーションにより回復するが、高齢者では一度低下した骨格筋機能を回復させることは若齢者に比べて難しい (Goto et al, in preparation)。したがって、サルコペニアやロコモティブシンドロームあるいはフレイルを予防あるいは症状を改善する方策の早期確立が望まれている。しかし、サルコペニア発症のメカニズム自体が未解明であり、サルコペニアに対する有効な対策は未だ確立していない。
- (3) 最近の疫学研究により、高齢者の血中アディポネクチン濃度は、筋力や骨格筋量の低下と負の相関関係にあることが示されている。アディポネクチンは、全身糖脂質代謝を亢進し、体脂肪減少やインスリン感受性作用を持つことから「善玉アディポカイン」と考えられてきた。しかし、高齢者では心臓血管系のリスクと血中アディポネクチン濃度は負の相関関係にあり、「アディポネクチンパラドックス」として注目されている (Int J Crdiol 2015)。また骨格筋量の制御には、骨格筋組織幹細胞である筋衛星細胞の活性化が重要であるが、アディポネクチンが筋衛星細胞の機能に及ぼす影響は不明であるなど、血中アディポネクチン濃度による骨格筋機能低下の分子機序は明らかでない。
- (4) そこで本研究では、骨格筋組織幹細胞に着目してサルコペニア発症におけるアディポネクチンの関与を解明し、抗アディポネクチン抗体を用いたサルコペニア発症予防と症状改善策の開発を目的として、3 年計画で実施する。

2. 研究の計画

本研究は 3 年計画で実施され、まず培養骨格筋細胞を用いた実験により、細胞レベルでの現象とそのメカニズムを解明し、その結果を基に動物実験により検証する。そして、2 年間の基礎的研究成果を基盤として、研究最終年度の 3 年目にはサルコペニア発症予防と症状改善を促す運動および薬物療法の開発を予定している。3 年の研究計画の初年度に当たる平成 29 年度は、「筋衛星細胞の形態と機能に対するアディポネクチンの影響」を追究して、血中アディポネクチン濃度の上昇が、骨格筋量低下すなわちサルコペニアの要因となり得るか検証した。

- (1) 筋衛星細胞による筋細胞への分化に及ぼすアディポネクチンの影響

筋衛星細胞の実験モデルであるマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を用いて、筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導直前に、アディポネクチン受容体アゴニスト (AdipoRon) を添加し、

筋管形成ならびに筋管細胞の肥大に及ぼす影響を追究した。また、AdipoRonの影響が、アディポネクチン受容体を介したものであるか明らかにするために、アディポネクチン受容体ノックダウン実験を行う。RNA干渉法 (siRNA) を用いて、筋管細胞への分化誘導直前に、筋衛星細胞におけるアディポネクチン受容体1およびアディポネクチン受容体2をノックダウンした。ノックダウン後、筋管細胞への誘導を惹起すると同時にAdipoRonを添加し、筋管形成ならびに筋管細胞の成長を評価した。

(2) アディポネクチンによる筋管細胞の形態変化のリアルタイム三次元解析

C2C12筋芽細胞を筋管細胞へ誘導後、培地にAdipoRonを添加し、形態変化を経時的に追跡した。また、アディポネクチン受容体をノックダウンした後にAdipoRonを培地に添加し、AdipoRonの形態に及ぼす影響がアディポネクチン受容体を介したもののか追究した。

3. 研究の成果

(1) 筋衛星細胞による筋細胞への分化に及ぼすアディポネクチンの影響

筋衛星細胞から筋細胞への分化に及ぼすアディポネクチンの影響について、マウス筋衛星細胞 (筋芽細胞) 由来のC2C12細胞ならびにアディポネクチン受容体アゴニストであるAdipoRonを用いて検討した。その結果、高濃度AdipoRonは筋管形成を抑制した。このアディポネクチンの筋管抑制作用が、アディポネクチン受容体を介したものかについて、RNA干渉法 (siRNA) を用いて検討した。筋管細胞への分化誘導直前に、C2C12細胞におけるアディポネクチン受容体1およびアディポネクチン受容体2をノックダウンすると、AdipoRonの筋管形成抑制作用は軽減した。

(2) アディポネクチンによる筋管細胞の形態変化のリアルタイム三次元解析

C2C12筋管細胞の機能変化を形態 (三次元立体構造) から追究した。アディポネクチン受容体をノックダウンした後にAdipoRonを培地に添加し、アディポネクチンが筋衛星細胞の形態に与える影響を評価した。その結果、AdipoRon添加は筋管を消失させる作用を持ち、その作用は、AdipoRon濃度依存的であった。また、アディポネクチン受容体をノックダウンすることで、AdipoRonの形態に及ぼす影響は減弱した。

(3) 以上の結果より、高濃度 AdipoRon はアディポネクチン受容体を介して筋管形成を抑制すること、すなわち血中アディポネクチンの上昇が、骨格筋量低下すなわちサルコペニアの要因になり得ることが強く示唆された。

4. 研究の反省・考察

今年度設定した2つの検討課題についてはすでに結果を得た。したがって、研究は当初計画通り順調に進捗している。次年度 (平成30年度) の準備として、尾静脈からのAdipoRon投与について、マウスに対する投与量 (両並び濃度) の検討を行い、次年度使用する *in vivo* 実験モデルはすでに確立している。この実験モデルを用いて、短期間の高濃度アディポネクチンがマウス骨格筋のAMP依存性タンパクキナーゼ (AMPK) を活性化することを確認した。このAMPKは骨格筋量を抑制する作用を持つことをすでに確認している。初年度の結果を基盤として、2年目の研究を計画した。当初の計画通りの成果が得られるものと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①後藤勝正, 吉岡利忠: 筋力および筋力低下の生理学. 理学療法ジャーナル, 52巻1号: 5-14, 2018年1月.

(2) 口頭発表

①Goto, K., Ito, R., Higa, M., Yokoyama, S., Gugiura, T., Miyata, H., Ohira, Y., Yoshioka, T.: A possible role of skeletal muscle-derived adiponectin in the regulation of skeletal muscle mass. *Experimental Biology* 2017, 2017年4月.

②Apostolopoulos, A., Nakamura, A., Russomano, T., Green, D.A., Goto, K.: Ageing-associated nuclear accumulation HSP70 of mouse skeletal muscles. *Biology of Ageing II "Impactful Interventions" Systems - Models - Pathways - Diseases*. 2017年11月.

③Aoshima, M., Ohno, Y., Yokoyama, S., Ohashi, K., Ito, R., Nakamura, K., Fujimoto,

R., Goto, K.: Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates the differentiation of mammalian skeletal muscle cells. American Society for Cell Biology 2017 Meeting, 2017年12月.

- ④伊藤理香, 横山真吾, 大野善隆, 江川達郎, 青島恵, 中村晃大, 藤本理沙, 大橋和也, 宮田浩文, 後藤勝正: アディポネクチン受容体アゴニストの連続的な投与がマウス骨格筋量を減少させるか? 第80回日本体力医学会中国・四国地方会, 2017年12月.

(3) 出版物

なし

学 校 名	大 正 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	避難が発達障害の子どもと家族に与えた影響 —福島の子どもの支援のために—		研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①東日本大震災 ②原発事故 ③乳幼児健診 ④帰還 ⑤発達障害 ⑥福島県 ⑦子ども ⑧家族			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
内 山 登 紀 夫	心 理 社 会 学 部 科 臨 床 心 理 学 科	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
柄 谷 友 香	名城大学・都市情報学部・ 都 市 情 報 学 科	教 授	住宅環境調査及びまとめ
川 島 慶 子	福島大学・子どものメンタル ヘルス支援事業推進室	研 究 員	インタビュー調査実施

避難が発達障害の子どもと家族に与えた影響 —福島の子どもの支援のために—

1. 研究の目的

平成 23 年の東日本大震災から時間の経過と共に避難の長期化、転居回数の増加に伴う生活環境の変化が子どもと家族に与える影響を明らかにする。特に生活環境の変化を苦手とする自閉症スペクトラムの親子の避難の実態と支援ニーズを把握する。それにより、大規模災害時の支援体制を構築するための基礎的データとし、今後の施策に活用することを目指す。

2. 研究の計画

東日本大震災後、原発事故の影響があった福島県沿岸部を主な対象として、双葉 8 町村とその近隣地域すべての支援者（母子保健、発達障害に関する行政担当者、または発災前後からこれまで支援活動に従事する者など）を対象にインタビュー調査を実施する。インタビューの内容は、発災前後での母子やコミュニティの変化、母子保健や発達障害に関する業務の変化、発災直後からこれまでに役立ったまたは必要だった支援、今後の大規模災害に備えることなどを中心に、1 時間半程度、1 名または数名のグループで実施する。さらに、量的調査として、福島県沿岸部の市町村と協同し、震災前後で子どもの日常生活や発達面、保護者のメンタルヘルスなどに変化がみられたかを乳幼児健康調査票や質問紙などを用いて縦断的に比較検討する。量的調査、質的調査の両面から震災後の長期的避難生活における母子、特に自閉症スペクトラムの子どもの実態を把握し、現場における支援ニーズを検討する。それを基に、今後の大規模災害、または現在避難中の親子の支援に役立つガイドブックを作成する。

3. 研究の成果

(1) 量的調査

福島県 A 市（原発事故から 30 キロ圏内を含む自治体）を対象として、H22 年度から H27 年度の 3 歳 6 ヶ月児乳幼児健康診査（以下、健診）における乳幼児健康診査票（以下、問診票）の結果で質問項目として有効な 222 項目について SPSS statistics23 を用いて解析した（カイ二乗検定等）。

その結果、対象児数（今回の結果から把握された健診受診児数）は、H22 年度 555 名、H23 年度 207 名、H24 年度 230 名、H25 年度 215 名、H26 年度 251 名、H27 年度 298 名であった。避難による人口変動の影響を受け、受診児数は発災時 H23 年度から急激な減少がみられたものの、避難からの帰還者や生活再建などによる転入者により近年は増加に転じている。

解析の結果、子どもの発達や保護者のメンタルヘルス、子育て環境などの 222 項目の分析結果について、経時的な変化をみると下記の①～③に分類された。

- ①震災前後で変化がなかった項目：役割をもったごっこ遊びや自分でやりたがる遊びの存在の比率など遊びの能力の発達に関する事柄
- ②震災後に悪化した改善傾向がみられている項目：視線があわない、不注意などの項目
- ③震災後悪化したままの状態項目：1歳半健診では「有意語が確認できない」、3歳半健診では「自分の名前（言えない）」、「多動衝動性」などの言語発達面や発達障害特性と類似する項目

(2) 質的調査

東日本大震災前の各自治体の母子保健事業等を踏まえ、震災後から現在まで（避難中または帰還や生活再建後）の母子保健事業、子育ての状況、発達障害のある子どもとその保護者への支援、今後の支援における実態と課題について半構造化面接にて原発被害のあった地域の行政担当者や専門職（保健師、保育士等）にインタビューを実施した。対象者の同意の下、ICレコーダーを用いて音声を録音記録し、テープ起こしを行った。次に、実際の表現を尊重しつつ、個人情報について配慮の上、対象者のコメントを現状と課題が明らかになるよう専門家1名が文章化の作業を行った。その後、主要なコメントを抜粋して関連する内容をカテゴリー化した。

その結果、H29年度は、双葉郡内の町村とその近隣市町村の母子保健事業担当者と支援者6名にインタビューを実施した。

インタビュー結果は、テープ起こしの後、専門家1名が文章化した。文章化の際には、質問(Q)と回答(A)の形で示し、回答内容は固有名詞を削除した。回答(コメント)総数1886から今回の研究に関連する主要なコメント591を抜粋し、意味的まとまりに分けカテゴリー化した。大カテゴリーが8個作成された。さらに小カテゴリーが各大カテゴリーにおいて2から17個作成された(表1参照)。今回は、今後の支援課題に関連するカテゴリーを中心に報告する。

- a. 「震災後の子育て環境の変化」においては、避難生活から母親のストレスが高まっているとの報告が最も多かった。理由としては、避難に伴う世帯構成の変化であり、核家族化が進んでいることの影響も大きい。放射線不安は意外にも少ない結果であり、生活再建や帰還に伴う近所づきあいにおいて避難者であることを伝えられない葛藤やストレスの方が高いと感じていた。
- b. 「避難中の母子保健事業の共通課題」として、避難先との連携が大きな課題となっていた。併せて、気になる子どもへの対応については避難先が拡散していることで十分に家庭訪問が出来ず、乳幼児健診も特例法により避難先で受診しているため、顔の見える関係が作りにくく、母親のメンタル面や困り感に寄り添いにくいといった課題が挙げられた。そうした背景から、子どもの発達の理解の促しやサポートも円滑に進まない状況がある。また、避難元の住民の集える機会が欲しいとの要望が高く、母子保健事業では、いずれの地域でも親子で利用できる遊びの広場の事業から再開していた。
- c. 「帰還困難区域特有の課題」としては、生活再建に伴う住民票の移動が問題となっていた。原発事故による避難生活の補償の問題により、住民票を移動しない住民が多い。そのため、避難先の行政サービスを利用できないこともあり、遊び場や発達相談、巡回相談などの子どもの発達に関するサポートを受けられないなどの問題が生じている。
- d. 「帰還地域(避難指示解除)特有の課題」としては、行政機能や住民の帰還が進んでいても、医療・福祉サービスが再開しておらず社会資源が不足しているため、支援を要する子どもや高齢者、障がい者は避難先まで支援を受けに行く必要がある。支援の必要な子どもは帰還しにくい状況がある。
- e. 「避難中に役立った支援、必要な支援」は、今後の大規模災害に備えた防災マニュアルを作成するために、重要な手がかりとなる。重要な事柄でありながら困難であったのが住民の安否確認であった。光通信やIP電話で緊急連絡がとれるようシステム構築していた地域では円滑に進んだが、その他の地域では携帯電話の登録の重要性を訴えていた。また、支援の必要な妊婦や子ども、障害児者のいる世帯との連絡が困難であり、避難所にいる住民にしか対応できないなどの課題が浮き彫りになった。発達の気になる子どもへの連絡と避難先の療育機関につなぐ役割を担う人材を確保が可能であった場合は有効に機能した。

次に、保健師の長期間の派遣が役立ったとの声が多かった。1週間から1年以上の支援では、自主的な引継ぎが可能となり、支援を受ける側の負担が軽減され、非常に有効であった。現在も保健師派遣の支援は継続している。避難所では、自閉症の子どもの個室の確保や視覚的な情報の提供が不十分であった。避難所の集団生活は、定型発達の子どものにおいても難さがあり、車中泊や親戚宅への避難を選択する家族が多かった。
- f. 「今後必要な支援(避難が続く状況の福島県において)」は、避難者が利用できる療育サービスが最も高く挙げられている。特に、帰還した地域での再開が課題であり、避難者が県内外にあり、移動も難しい状況で生活圏内に設置されることのニーズが挙げられている。併せて、発達の偏りや遅れが気になる子どもの見立てや対応について、専門家の助言の必要性も高まっていた。

表1. インタビュー結果

大カテゴリー	小カテゴリー	件数
a.震災後の子育て環境の変化	母親のストレス	22
	世帯構成の変化	19
	帰還	8
	幼稚園	7
	生活再建	6
	地域特性	5
	避難	5
	転居	2
	放射線不安	2
	サービス	1
	b.避難中の母子保健事業の共通課題	連携
気になる子どもへの対応		24
事業再開		15
家庭訪問		8
乳幼児健診		7
保健師の不足		5
サポートブック		4
育児		4
歯科指導		1
受援		1
c.帰還困難区域特有の課題		住民票
	受援	5
	行政	5
	社会資源	3
d.帰還した地域特有の課題	社会資源	4
	教育環境	3
e.避難中(現在も含め)役立った支援、必要な支援	連絡	20
	保健師派遣	12
	避難所	12
	事業再開	12
	療育	12
	特例法	8
	連携	6
	事前の準備	4
	引継ぎ	3
	専門家の助言	3
	情報共有	3
	医療支援	3
	学校支援	3
	支援者の役割	3
	災害マニュアル	2
	地域特性	1
	支援者支援	1
f.今後必要になる支援	療育	28
	専門家の助言	5
	連携	2
	避難先自治体の医療福祉サービスの充実	1
	調査研究	1
	送迎サービス	1
g.震災前		48
h.その他		187

4. 研究の反省・考察

(1) 保健師等の専門職による直接観察から得られた項目の結果として、1歳半健診では「有意語が確認できない」、3歳半健診では「自分の名前(言えない)」、「多動衝動性」などの言語発達面や発達障害特性と類似する項目が悪化したまま改善がみられていない。

母親が回答する項目からは、1歳半と3歳半での共通項目として他児への興味関心や関り

の乏しさが悪化したままとなっており、日常生活面の問題として1歳半では食事、3歳半では排泄について悪化した状態が継続しており、支援体制の整備が必要である。このような変化が継続している理由は判然とせず、丁寧なインタビューを保健師や保護者に行うことや文献検討などを実施し要因を検討する必要がある。

(2) 今後の支援についての検討

震災後一時改善傾向にみられた保護者のメンタル面の項目がH27年度に再度悪化の状態を示しており、帰還者増加による健診受診者の増加の影響も踏まえて検討する必要がある。このように、長期避難における回復の特徴として、帰還や生活再建から、人口変動が大きく、母集団の変化が生じるため、改善と悪化を繰り返しながら徐々に回復することが考えられる。

集団に入る前の年齢の親子では、具体的な子育ての仕方、子どもとの遊び方を丁寧に指導することや母親同士の悩みを共有できる仲間づくり、子育てを一人で抱えないための支援ニーズがあることが推測される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①上田祐司, 北後明彦, 近藤民代, 柄谷友香、東日本大震災後における住宅再建地の整備状況にみる地域の災害リスク形成に関する研究—岩手県陸前高田市と宮城県気仙沼市を例に—、地域安全学会論文集、No.31、地域安全学会、2017
- ②内山登紀夫、ライフステージに応じた発達障害の診断、治療、支援 発達障害の不適応、対応困難ケースの発生予防と危機介入について、日本社会精神医学会雑誌、26 (1)、42-47、2017
- ③内山登紀夫、発達障害の過剰診断と過少診断、それぞれのリスク、総合病院精神医学、98-106、2018
- ④内山登紀夫・川島慶子、福留さとみ、志賀利一、大人の発達障害の課題と支援、LD研究、40-4、(2018).
- ⑤内山登紀夫、「切れ目のない発達障害児者支援を目指して」発達障害児者支援と犯罪、発達障害研究、40巻1号 Page1-10、2018.

(2) 口頭発表

- ①内山登紀夫、他、福島県浜通り地区における、子どもたちの諸問題、シンポジウム 子ども・若者支援をとおして考える災害復興期、第16回日本トラウマティック・ストレス学会、武蔵野大学有明キャンパス東京、2017
- ②内山登紀夫、発達障害児者支援と犯罪 発達障害学会、2017
- ③内山登紀夫、シンポジウム7：PARS-TRとWechsler知能検査をASD児者の支援につなぐ「Wechsler検査とPARS-TRの情報を治療に活用する試み」、日本児童青年精神医学会、2017
- ④内山登紀夫、教育講演 大人の発達障害の支援と課題、LD学会、2017

(3) 出版物

- ①Mahdi, S., Albertowski, K., Uchiyama, T., ..., An International Clinical Study of Ability and Disability in Autism Spectrum Disorder Using the WHO-ICF Framework, J Autism Dev Disord、2018
- ②内山登紀夫他、総説他、子ども・大人の発達障害診療ハンドブック、中山出版、2017
- ③内山登紀夫他、総論他、発達障害支援の実際、医学書院、2017
- ④内山登紀夫、これからの福島の子供たちへのメンタルヘルス支援のあり方、福島の子供たちのメンタルヘルス支援のこれまでとこれから、福島大学子どものメンタルヘルス支援事業推進室、2017
- ⑤内山登紀夫・川島慶子、困難事態・緊急時支援に関する研究—発達障害者とその保護者へのインタビュー調査—、厚生労働科学研究報告書、2017
- ⑥柄谷友香、「被災するということ」への理解と共感—被災地に学び、防災に生かすためのフィールドワーカー、人間生活工学、Vol. 18, No. 2、人間性格工学研究センター、2017

学 校 名	椚 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 —地域連携を活用したアクションリサーチ—	研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①児童の学級適応 ②支援ニーズ ③教諭による支援 ④アクションリサーチ ⑤小学校と大学との連携		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 出 弓 枝	人 間 関 係 学 部	教 授	統括・研究遂行・小学校との連絡調整

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 立 奈 歩	人 間 関 係 学 部	准 教 授	研究遂行・分析・まとめ

小学校教諭および児童への調査に基づく支援体制構築に関する研究 —地域連携を活用したアクションリサーチ—

1. 研究の目的

児童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)。これらとは別に、平成19年度より特別支援教育が展開するなか、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)の流れがある。通常学級に在籍する発達障害児への支援方略と成果を検証する研究を実施する必要性も指摘され始め(別府, 2013)、ニーズがある児童生徒への支援を実施するには地域の小中学校との連携の必要性和意義が指摘されている(文部科学省, 2004; 国立特殊教育総合研究所, 2008; 西出, 2006・2012)。

本研究は、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ものである。安立・西出(2015)は、学校適応感を測定するQ-Uおよびコンピテンスを測定するSC-Sを用い、短期縦断調査を実施した結果児童の支援ニーズに対する担任理解が児童の学級適応感に及ぼす影響について検討した結果、ニーズに応じた支援が構築されると、コンピテンス自体に変化は生じにくいものの、学級適応感を高めることが可能であることが、主に高学年において示唆された。西出・安立(2016a)では、支援ニーズの特徴を詳細に抽出し、どのような児童の学級適応感に変化が生じるのか検討した結果、低学年では行動・社会性ニーズが高い児童の学級適応感が上昇した一方で、高学年では主に、行動面、社会性、対人面で支援ニーズの高い児童の満足度は低下し、学年や支援ニーズの特徴を踏まえた支援が必要であることが示唆された。

さらに、西出・安立(2016b)では、担任教諭によって支援ニーズがあるとして抽出された児童への支援に関する調査結果を詳細に検討したことにより、(1)児童のニーズのなかでも、特に、学習支援ニーズ・社会性支援ニーズ・行動支援ニーズが認識された児童に対して担任教諭は支援の必要性を認識し、それらの支援ニーズは単独ではなく複数の領域にわたって生じるものであること、(2)支援ニーズのある児童に対して支援計画を立案して支援する場合に、担任は児童の取り組みを「やや改善した」と認識していること、(3)特に、社会性支援ニーズ・行動支援ニーズに対して、効果的である支援方略は、クラスの仲間関係づくり、担任教諭による手立てや教材の工夫、支援ニーズに応じて別課題を設定することや、保護者・他の教諭との連携を行うことであり、次に、チームティーチングや加配や学生ボランティアなどを活用した個別的な指導という形になっていた。

これらの結果をふまえ、本研究では、平成27年度より積み重ねてきた研究の最終段階として、これまでのアクションリサーチを継続するとともに、これまでの成果を検証するために対象児童に対する追跡調査を行い、学校適応感とコンピテンスの推移を検討することとする。さらに、児童の学級適応感を対人関係の側面に焦点化して把握することを目的とし、学級雰囲気認知尺度(SCAS)の作成を試みる。

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(I)と2学期(II)に同一の質問紙で行い、両者の変化を分析する。特に、本年度はX年度とX+2年度の年間比較を行った。
- (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) 児童の学級適応感を対人関係の側面に焦点化して測定する、学級雰囲気認知尺度 (SCAS) を作成し、妥当性・信頼性の検討を行う。
- (4) 児童に実施する調査内容は次の4種類である。

- * 河村が開発したQUESTIONNAIRE-UTILITIES (以後、Q-U)。これは、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)
- * 学級雰囲気認知尺度 (以後、SCAS)。「親密度」「満足感」「不和」「公正さ」の4つの下位尺度について各4項目計16項目

- (5) 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。結果は、1学期をⅠ、2学期をⅡと記し、Q-Uを「Q」、コンピテンスを「C」と略記する。

- (1) 担任による支援ニーズを基準とした全児童の群分け

X、X+2年度毎に全児童の支援ニーズ6項目合計〔「ニーズ得点」($\alpha = .78/.81$)〕の4分位を算出し、安立・西出(2015)に倣い、25%未満を「ニーズ低群」、25~75%を「ニーズ中群」、75%以上を「ニーズ高群」とした。

- (2) 時期・支援ニーズからみた児童の学級適応感とコンピテンス：X、X+2年度各々について

低・高学年毎に、Q-Uおよびコンピテンスを従属変数とし、学期(2：被験者内)×群(3：被験者間)の2要因被験者混合分散分析を行った(表1, 2：紙幅の都合によりF値の記載は省略)。

i) 低学年の適応感：両年度の主効果は共通して適応感上昇($I < II$)、もしくは低群の適応感の高さであった。X+2年度の交互作用から、「学級意欲Q」「学級満足Q」で低群のみ適応感上昇が示唆されたが、「承認Q」は各群とも上昇し($I < II$)、かつⅠで高群<中群であったもののⅡで群間差が見られなくなり、ニーズ高群の承認感が支援された可能性がある。

ii) 低学年のコンピテンス：X年度は「友達C」が上昇した($I < II$)が、「生き方C」低下、ニーズ高群の「問題解決C」低下が見られた。X+2年度は「学習C」「生き方C」でニーズ高群のみ上昇し($I < II$)、ニーズ高群のコンピテンスの上昇は年度差があると推察された。

iii) 高学年の適応感：X年度の交互作用(「友達Q」「承認Q」「被侵害Q」)から安立・西出(2015)は、ニーズに応じた支援により学級適応感が高まる可能性を考察した。X+2年度は、ニーズ低群の適応感の高さのみ示され、ニーズ高群の適応感上昇は年度差があると推察された。

iv) 高学年のコンピテンス：両年度の主効果は共通して「友だちC」・「運動C」上昇($I < II$)、もしくは低群の「友だちC」「問題解決C」の高さであった。

- (3) 対人関係の側面に焦点化した学級適応感を測定する尺度の検討を行い、「学級個性尊重」「学級凝集性」「学級個人主張性」「学級満足感」の4因子からなる学級雰囲気認知尺度について、因子妥当性および基準関連妥当性(Q-U居心地尺度との相関 $r = .16 \sim .57$)、各因子の内部整合性($\alpha = .67 \sim .80$)、再検査信頼性($r = .39 \sim .51$)が確認された。

表1. 低学年における時期と支援ニーズからみたQ-Uおよびコンピテンスの分散分析結果

	X年度	X+2年度
友だちQ	時期：I < II*	時期：I < II*, 群：高群 < 中群**
学習意欲Q	n.s.	時期×群：低群【I < II】*
学級満足Q	n.s.	時期×群：低群【I < II】*, 時期：I < II**
承認Q	時期：I < II**	時期×群：I【高群 < 中群】*, 時期：I < II**, 群：高群 < 低群**
被侵害Q	n.s.	時期：I > II*
学習C	n.s.	時期×群：高群【I < II】**, 時期：I < II*
友達C	時期：I < II*	n.s.
運動C	n.s.	n.s.
生き方C	時期：I > II**	時期×群：高群【I < II】*, 群：高群 < 中群*
コミュC	n.s.	n.s.
問題解決C	時期×群：高群【I > II】**, 群：高群 < 中・低群**	n.s.

** P < .01, * p < .05

表2. 高学年における時期と支援ニーズからみたQ-Uおよびコンピテンスの分散分析結果

	X年度	X+2年度
友だちQ	時期×群：I【高群 < 低群】*	群：高群・中群 < 低群**
学習意欲Q	n.s.	群：高群・中群 < 低群**
学級満足Q	n.s.	n.s.
承認Q	時期×群：I【高群 < 低群】*	群：中群 < 低群*
被侵害Q	時期×群：I【低群 < 中群・高群】*	群：低群 < 中 < 高群**
学習C	群：高群 < 低群**	n.s.
友達C	時期：I < II*, 群：高群 < 低群*	群：高群 < 中群・低群**
運動C	時期：I < II**	n.s.
生き方C	n.s.	n.s.
コミュC	n.s.	n.s.
問題解決C	群：高群 < 低群**	群：中群 < 低群**

** P < .01, * p < .05

表3 学級雰囲気認知尺度 (SCAS) の因子分析結果 (Promax 回転後の因子パターン)

	項目 ()内は調査前に想定していた概念	I	II	III	IV	
学級個性尊重 6項目 α=.69	33休み時間には、クラスの友だちとのびのびすることができます。(満足感)	0.65	-0.31	-0.09	0.02	
	31このクラスで何かをする時には、みんな喜んで参加します。(親密度)	0.55	0.10	-0.07	-0.05	
	23このクラスはみんな仲が良いです。(親密度)	0.50	0.32	0.04	0.05	
	20クラスでは、みんなの意見が平等にあつかわれます。(公平さ)	0.47	0.06	-0.04	-0.04	
	32先生は、私たちの意見をよく聞いてくれます。(公平さ)	0.34	-0.08	-0.07	0.18	
	26このクラスでは、自分の気持ちを気軽に言い合えます。(満足感)	0.30	0.09	0.15	0.19	
学級凝集性 4項目 α=.67	34このクラスでは、よくけんかが起こります。(不和) (*)	-0.21	0.72	-0.12	-0.03	
	19このクラスはまとまっていると思います。(親密度)	0.30	0.58	0.13	-0.06	
	22このクラスはもめ事が少ないと思います。(不和)	0.15	0.52	-0.03	-0.05	
	30クラスの友だちは、協力しあっていないと感じます。(親密度) (*)	-0.14	0.49	0.10	0.19	
学級個人主張性 4項目 α=.69	24このクラスには、自分の意見を押し通そうとする人がいます。(公平さ)	-0.12	0.14	0.62	-0.05	
	28クラスで何かを決める時に、強い力をもつ人がいます。(公平さ)	-0.03	0.04	0.62	0.09	
	27クラスがバラバラでまとまりない時があります。(不和)	0.03	-0.32	0.52	0.00	
	29クラス全体が嫌な感じになることがあります。(不和)	0.01	-0.31	0.37	-0.15	
学級満足感 2項目 α=.80	25このクラスが気に入っています。(満足感)	-0.01	0.02	-0.03	0.90	
	21このクラスになってよかったと感じます。(満足感)	0.19	0.05	0.04	0.63	
因子間相関		I	II	III	IV	
		I	-	0.60	-0.15	0.61
		II		-	-0.47	0.52
		III			-	-0.14
		IV				-

(*) は因子分析の結果、所属する下位因子の意味内容に基づいて、逆転項目と見なされるもの

4. 研究の反省・考察

(1) アクションリサーチ・追跡調査の検討による成果のまとめ

①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西出・安立(2016)で作成されたマニュアルに基づき担任教諭に結果のフィードバックを行うとともに、担任教諭が特に気になる児童の過去の調査結果も含めてフィードバックしたことにより、学級適応感とコンピテンスの変動が大きく認められた場合の背景要因について検討を試みることができた。
 - ③学級雰囲気認知尺度(SCAS)の因子妥当性・基準関連妥当性、内部整合性・再検査信頼性を検討した結果、尺度の妥当性・信頼性が確認された。
- (2)アクションリサーチの反省と課題
- ①支援ニーズ認知に関する調査は担任教諭にとって負担となり、複数回実施する際に欠損値が生じることが課題として残された。
 - ②縦断的に児童のニーズ調査の結果について検討したところ、児童のニーズの状況のみならず、担任教諭の関心によって評価が異なってしまうことが把握された。結果のフィードバックの際に、担任の理解が改めて把握されることもあり、調査研究に基づいたアクションリサーチの限界として検討すべき事項であることが認識された。
 - ③②の課題を補う試みとして、研修会を学校全体ではなく学年別に開催し、担任教諭を対象としたニーズの高い児童の縦断的データを提示し、現状の分析を試みたところ、3年間にわたる適応の状況と現在の状況を比較検討することが可能となり、有意義であることが示唆された。
 - ④③のように、担任教諭がニーズのある児童の学級適応状況を把握し支援をともに検討するという方法を研修会において試行的に実施し、一定の成果が認められた。しかし、アクションリサーチを、大学と小学校、教育委員会における発達障害保護者相談会などの連携的活動に位置づける体制づくりについては、課題が残った。

5. 研究発表

- (1)学会誌等
なし

- (2)口頭発表

安立奈歩・西出弓枝(2017)：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 (3) 一年度間の比較検討を通じて― 日本心理臨床学会第36回大会発表論文集, 425.
[2017年11月20日発表 於 パシフィコ横浜]

- (3)出版物

西出弓枝・安立奈歩(2018)：児童を対象とした学級雰囲気尺度(SCAS)作成の試み 椋山女学園大学研究論集, 49, 175-184.

平成 29 年度(第 42 回)学術研究振興資金 学術研究報告

平成 30 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