

2018

平成 30 年度（第 43 回）

学 術 研 究 振 興 資 金

The Science Research Promotion Fund

学 術 研 究 報 告

令和元年 10 月

はじめに

この報告書は、平成30年度(第43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、令和元年5月末までに交付した資金総額は、3,336件、78億6,728万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、令和元年9月末で、54億1,490万円に達しました。本事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに本基金を充実させたいと考えております。本基金の趣旨をご理解のうえ、一層のご支援とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

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

令和元年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 30 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 30 年度学術研究振興資金 研究課題一覧	3
V	平成 30 年度（第 43 回）学術研究振興資金 学術研究報告	5

I 平成30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	140	354,400	55	80,600	39.3
新規・継続別	新 規	104	256,500	26	31,900	25.0
	継 続 2 年 目	22	52,200	18	27,700	81.8
	継 続 3 年 目	14	45,700	11	21,000	78.6
学校種別	大 学	134	351,200	54	80,300	40.3
	短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	6	3,200	1	300	16.7
研究区分別	人 文 ・ 社 会 科 学 系	32	34,100	15	11,100	46.9
	理 工 系 、 農 学 系	34	109,100	15	29,600	44.1
	生 物 学 系 、 医 学 系	74	211,200	25	39,900	33.8

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24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	29年度	30年度	合 計
経済団体	2,112,328	5,000	5,000	5,000	5,000	0	0	2,132,328
個別会社	1,622,000	0	0	0	0	0	0	1,622,000
学校法人	1,460,833	0	0	0	0	0	0	1,460,833
個人	197,219	1,133	1,022	213	0	90	0	199,677
合 計	5,392,380	6,133	6,022	5,213	5,000	90	0	5,414,838
基金保有額	5,392,380	5,398,513	5,404,535	5,409,748	5,414,748	5,414,838	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24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	29年度	30年度	合 計
医学	2,716,780	49,400	47,600	36,900	28,400	29,100	27,000	2,935,180
環境科学	205,540	8,700	2,000	1,000	3,000	3,000	4,500	227,740
理学	850,410	22,900	19,200	20,700	9,500	13,000	19,800	955,510
工学	1,613,260	5,000	5,100	2,600	4,400	10,700	9,700	1,650,760
農学	267,200	11,100	8,200	11,500	16,100	8,300	6,500	328,900
文学	699,060	7,100	10,000	7,000	11,400	9,500	7,400	751,460
法学	104,320	0	0	2,300	500	300	0	107,420
経済学	228,380	6,000	2,200	1,400	900	900	1,900	241,680
家政学	208,260	2,500	3,500	3,000	3,200	3,000	0	223,460
体育学	26,800	0	0	0	1,000	2,000	2,000	31,800
教育学	180,970	2,100	2,200	3,400	1,700	800	1,800	192,970
小 計	7,100,980	114,800	100,000	89,800	80,100	80,600	80,600	7,646,880
若手研究者 奨励金	48,700	14,500	18,900	19,400	19,400	18,400	-	139,300
合 計	7,149,680	129,300	118,900	109,200	99,500	99,000	80,600	7,786,180

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

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

IV 平成30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	東北医科薬科大学	医学	C型肝炎ウイルスCoreタンパク質の変異によるC型肝炎病態への影響	2,500	10
3	埼玉医科大学	医学	ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御	1,500	14
4	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	600	19
5	慶應義塾大学	医学	腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明	1,500	24
6	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	3,000	28
7	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	4,500	32
8	東海大学	医学	がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立	1,500	36
9	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	1,200	39
10	日本医科大学	医学	非コードRNAを分子基盤とした包括的がん治療戦略の開発	2,400	43
11	日本歯科大学	医学	垂直性歯根根破折接着線相当部のMTA充填による歯周組織再生	600	48
12	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	700	51
13	金沢医科大学	医学	疾患および老化研究に必要な不可欠なストレス可視化マウスの開発	1,200	56
14	北陸大学	医学	閾値下レーザーに反応する網膜色素上皮細胞の分子基盤	600	59
15	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	500	63
16	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	67
17	福岡大学	医学	マイクロバイオームと宿主反応解析による子宮内感染症の解明	2,000	71
18	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	500	74
19	福井工業大学	環境科学	雨水活用による地域災害レジリエンスの向上	1,500	78
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CO2固定系解明と増強	3,000	82
21	獨協医科大学	理学	がんにおける自然免疫型T細胞の機能解明	2,200	87
22	杏林大学	理学	X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の解明	1,500	92
23	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	96
24	帝京大学	理学	スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と先天性代謝異常症への応用	1,000	101
25	明星大学	理学	ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究	2,000	105
26	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	109
27	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」	4,500	113
28	近畿大学	理学	非フラーレンアクセプターを用いた半透明有機薄膜太陽電池の開発	1,500	118
29	日本薬科大学	理学	母乳中に含まれるメラトニンの乳幼児および母乳産生に対する役割	500	123
30	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	2,100	127

IV 平成30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
31	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	1,500	133
32	上智大学	工学	水を溶媒とする環境調和型有機反応の汎用化	1,000	138
33	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	141
34	神奈川大学	工学	“可逆的”燃料電池用電極触媒の新展開	2,900	146
35	大阪大谷大学	工学	タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究	1,200	149
36	大阪成蹊短期大学	工学	動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用	300	153
37	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	157
38	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	162
39	東洋大学	農学	マイクロ皮膚モデルを用いるトリコセセンの皮膚抗炎症効果の検討	1,500	166
40	北海学園大学	文学	巨大津波常襲地帯における災害文化の継承メカニズムの解明	800	171
41	札幌学院大学	文学	精神疾患患者の認知機能改善療法に関する実践的研究	300	175
42	昭和女子大学	文学	ベトナム・クラーオチャム島の日越共同考古学調査	1,000	179
43	聖心女子大学	文学	記憶方略に及ぼすステレオタイプの影響に関する検討	400	183
44	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	187
45	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	900	192
46	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	195
47	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	1,000	199
48	天理大学	文学	古代東地中海地域における都市文化の変容とその背景	1,600	203
49	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	300	207
50	武蔵大学	経済学	アジアにおける女性の経済・政治活動への参加拡大とそのインパクト	500	212
51	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	500	216
52	関西大学	経済学	災害移民に関する国際比較研究	600	220
53	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	224
54	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	1,500	228
55	大阪成蹊大学	教育学	グローバル社会における大学生の「成熟」に関する研究	300	233
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 30 年度（第 43 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

- (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する。
- ① 前年度 (平成29年度) には、M2-MΦ 大量培養キーマスター分子としての液性分子 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) ならびに接着装置としての intercellular adhesion molecule (ICAM)-1/lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 系を同定した。今後も、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頻度差を有する上記以外の分子の同定を継続して実施する。これらの研究によりさらなるモデル遺伝子のピックアップと、それらの中からの M2-MΦ 大量培養キーマスター遺伝子の同定を完了し、「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」のための準備を完了する。
- (2) 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 大量培養系を確立する：本件急で同定した液性因子や接着因子を用いて M2-MΦ を *ex vivo* で大量培養できる培養法を確立する。
- ① 同定された液性因子、接着因子が新規のタンパク質であった場合には、ほ乳類細胞でのタンパク質発現系を構築しそれぞれリコンビナントタンパク質を得た後、接着因子はシャーレ上にコーティングし、この上に骨髄由来 Lin⁺ (血球細胞) を播種する (既知のタンパク質であった場合には市販のリコンビナントタンパク質を利用する)。加えて、既に我々が明らかとしている M2-MΦ 前駆細胞への増殖促進作用のある M-CSF とともに、新たに同定された液性因子を培地に添加させて M2-MΦ 前駆細胞の増殖・分化誘導効果を調査し、M2-MΦ が大量に培養される液性因子と接着因子の組み合わせを検討する。
- ② マウスの尾静脈から採血し、これを①で確立した条件下にて培養し M2-MΦ 前駆細胞の増殖能と M2-MΦ 分化マーカーの上昇を確認する。かくして、末梢血由来血球系細胞を用いた、*ex vivo* における間葉系幹細胞に頼ることのないタンパク質成分のみによる M2-MΦ の大量培養法を確立する。

3. 研究の成果

- (1) M2-M ϕ 前駆細胞の増殖・分化を促進する因子(液性因子)の候補となるさらなるモデル因子(遺伝子)のピックアップに成功した。
 - ①マウス脛骨髄より骨髓細胞を採取し我々の確立した独自の条件下で、間葉系幹細胞とM2-M ϕ 前駆細胞としての血球細胞(Lin+細胞)との共培養を行った細胞をLineage Depletion Kitを用いて間葉系幹細胞とLin+細胞に分離し、これらの細胞間で発現頻度差を示す遺伝子について、プライマーアレイ法を用いてmRNAレベルで網羅的に調査した。その結果、昨年度までにLin+細胞(M ϕ 前駆細胞)の増殖を促進する効果のある間葉系幹細胞由来の液性因子としてのM-CSFに加え、とくに間葉系幹細胞から発現している液性因子としてのCXC motif chemokine 12 (CXCL12)/stromal cell-derived factor (SDF)-1を見出した。また、興味深いことに、このCXCL12の受容体であるCXC chemokine receptor 4 (CXCR4)はとくにLin+細胞で多くの発現が認められた。加えて、LC-MS/MS装置によるタンパク質レベルでの網羅的な解析でも、間葉系幹細胞からのCXCR4の発現が確認された。これらの結果から、間葉系幹細胞より分泌されるCXCL12がLin+細胞の増殖やM2-M ϕ 分極化に影響を及ぼすことが予測されたため、まずはCXCL12がLin+細胞の増殖活性に影響するかどうかについてalamarBlue法(代謝活性の測定法)を用いて調査した。その結果、CXCL12はLin+細胞の増殖活性を濃度依存的に増強する効果を有することが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

- (1) M2-M ϕ 前駆細胞の増殖・分化を促進する因子(液性因子・接着因子)の同定作業の遅れが生じており、これらの因子を利用した *ex vivo* における M2-M ϕ 大量培養系の確立にも遅れが生じている。
 - ①前年度(平成29年度)までにM2-M ϕ 前駆細胞の増殖・分化を促進する因子としてM-CSFやICAM-1/LFA-1系を同定したものの、その後のさらなる同因子の同定は捗っておらず、上記の通りに間葉系幹細胞由来のCXCL12がLin+細胞の増殖を促進するという発見をしたに留まっている。現在までに、このCXCL12がM-CSFと同様にM ϕ 前駆細胞の増殖を促進するのか、あるいはM1あるいはM2に分極化した後のM ϕ の増殖を促進するのかについて明らかとされていない。従って、CXCL12とM-CSFとの相乗効果によりM2-M ϕ 前駆細胞の増殖を誘導するかどうかは確かめられておらず、*ex vivo*におけるM2-M ϕ 大量培養系確立のために役立てられるかどうかの判断がなされていない。
- (2) 今後の本研究の方向性について：M2-M ϕ 前駆細胞の増殖・分化を促進する因子の同定作業を進めてM2-M ϕ 大量培養系の確立を早期に完了し、間葉系幹細胞とM2-M ϕ との同時移植によりアテローム硬化を治癒させる動物モデルを樹立したい。さらにこの動物モデルを利用して、アテローム硬化に歯周病がどのように関わるのかについて分子レベルで明らかとする。
 - ①間葉系幹細胞とM2-M ϕ (現在開発中の*ex vivo*における大量調整法を利用する)をアテローム硬化症モデルマウス(市販の自然発症アポE欠損マウスを利用する)の尾静脈に注入し、冠動脈におけるアテローム硬化症の抑制効果を病理組織学的に調査する。このとき用いる間葉系幹細胞は緑色蛍光強発現TGマウスより分離し、一方、M2-M ϕ は赤色蛍光強発現TGマウス抹消血より大量調整し、それぞれの細胞が異なる蛍光色でトレース可能になるようにする。そして、アテローム硬化部位に集積する間葉系幹細胞が抗炎症性血球細胞ニッチとしてM2-M ϕ のプラーク周囲への集積を促進しうることを病理組織学的に明らかとする。
 - ②①により確立されたアテローム硬化症の細胞治療モデルマウスの口腔内に歯周病菌(*P. gingivalis*や*A. actinomycetemcomitans*)を投与し、プラーク周辺部における間葉系幹細胞とM2-M ϕ との相互作用にどのような影響を及ぼすか調査する。歯周病菌投与マウスと非投与マウスそれぞれのプラーク周囲組織切片から緑色・赤色蛍光を指標として間葉系幹細胞とM2-M ϕ をそれぞれマイクロダイセクション装置(既に本学に設置済み)で切離し、mRNAを抽出後、歯周病菌の作用により各細胞で変化する遺伝子発現頻度差を捉える。とくに間葉系幹細胞ではM2-M ϕ ニッチとして重要な液性因子や接着因子(初年度の研究で明らかとしたもの)の発現低下、M2-M ϕ ではM2-M ϕ 分化マーカー(CD206等)や抗炎症性サイトカイン(IL-10やTGF- β 等)の発現低下に注目して調査する。
 - ③①と②の研究成果により、間葉系幹細胞とM2-M ϕ との併用による革新的なアテローム硬化症の細胞治療基盤を動物実験レベルで樹立したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kim, E. J., Yoon, K. S., Arakaki, M., Otsu, K., Fukumoto, S., Harada, H., Green, D. W., Lee, J. M., Jung, H. S. Effective differentiation of induced pluripotent stem cells into dental cells. *Dev. Dyn.* 248: 129-139, 2019.
- ② Ohta, M., Chosa, N., Kyakumoto, S., Yokota, S., Okubo, N., Nemoto, A., Kamo, M., Joh, S., Satoh, K., and Ishisaki A. IL-1 β and TNF- α suppress TGF- β -promoted NGF expression in periodontal ligament-derived fibroblasts through inactivation of TGF- β -induced Smad2/3-, and p38 MAPK-mediated signals. *Int. J. Mol. Med.*, 42: 1484-1494, 2018.
- ③ Ohta, M., Nemoto, A., Chosa, N., Kyakumoto, S., Yokota, S., Kamo, M., Shibata, S., Joh, S., Satoh, K., Ishisaki, A. Toll-like receptor 4-mediated signaling activated by lipopolysaccharide suppresses transforming growth factor-beta-induced nerve growth factor expression in periodontal ligament-derived fibroblasts. *Dent. J. Iwate Med. Univ.*, 43: 61-73, 2018.
- ④ Mototani, Y., Okamura, T., Goto, M., Shimizu, Y., Yanobu-Takanashi, R., Ito, A., Kawamura, N., Yagisawa, Y., Umeki, D., Nariyama, M., Suita, K., Ohnuki, Y., Shiozawa, K., Sahara, Y., Kozasa, T., Saeki, Y., Okumura, S. Role of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (GRIN3) in β -arrestin 2-Akt signaling and dopaminergic behaviors. *Pflügers Arch.* 470: 937-947, 2018.
- ⑤ 石崎 明、客本 齊子、横田 聖司、加茂 政晴、帖佐 直幸、間葉系幹細胞を利用した再生医療における新たな戦略、*お茶の水医学雑誌*、66巻、247-258頁、2018年

(2) 口頭発表

- ① 横田 聖司、帖佐 直幸、松本 識野、客本 齊子、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明、顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるプリン体作動性シグナルの役割、第41回日本分子生物学会年会（横浜）、2018年11月
- ② 松本 識野、横田 聖司、帖佐 直幸、菊池 恵美子、木村 仁迪、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明、細胞外ヌクレオチドが顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞に与える影響について、第41回日本分子生物学会年会（横浜）、2018年11月
- ③ Fukami, H., Sahara, Y. fMRI connectivity analysis of sensory effect on jaw tapping associated brain network in elderly. 第41回日本神経科学学会（神戸）、2018年7月
- ④ Otsu, K., Harada, H. Oxygen levels regulate cell fate of mouse dental epithelial stem cells via RhoA signaling. International society for stem cell research (ISSCR) 2018 annual meeting（メルボルン）、2018年6月
- ⑤ 滝沢 尚希、鈴木 啓太、伊東 俊太郎、村井 治、佐々木 大輔、客本 齊子、石崎 明、八重柏 隆、*in vitro*で培養された抗炎症マクロファージの歯周病治療への応用、第61回春季日本歯周病学会学術大会（東京）、2018年6月

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 北 医 科 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	C型肝炎ウイルスCoreタンパク質の変異によるC型肝炎病態への影響		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①Hepatitis C virus(HCV) ②肝病態(肝硬変・肝がん) ③Coreタンパク質 ④小胞体ストレス応答 ⑤小胞体関連分解(ERAD)			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
久 下 周 佐	薬 学 部	教 授	研究計画の立案・推進・取り纏め

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
猪 瀬 敦 史	薬 学 部	講 師	研究の推進・取り纏め「平成31年3月31日退職」
佐 藤 賢 一	医 学 部	教 授	臨床研究の推進・取り纏め
小 暮 高 之	医 学 部	講 師	臨床検体・データの取り纏め

C型肝炎ウイルス Core タンパク質の変異による C型肝炎病態への影響

1. 研究の目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は高頻度で持続感染し、数十年を経て肝炎、肝硬変、肝がんと肝病態を増悪化する。HCVは細胞質で複製するプラス鎖 RNA ウイルスで、がん遺伝子は持たないことから肝がん発症機構は未解明である。HCVの複製において重要な役割を果たす細胞内器官は小胞体である。小胞体は大量に合成される分泌タンパク質の品質管理の場であり、HCV感染がその機能に影響を与える可能性がある。正確な折りたたみがなされないタンパク質が蓄積した場合に、小胞体はその状況を検知してシャペロンタンパク質の合成を促進したり、タンパク質合成そのものを抑制したり、変性タンパク質を細胞質に輸送してユビキチンプロテアソームシステムに乗せて分解するなどして小胞体ストレスを回避する。しかし、小胞体が過剰なストレスにさらされるとカルシウムイオンが流出すると、さらに小胞体ストレスが増強し活性酸素種 (ROS) 産生を誘導する。また、タンパク質の小胞体の酸化還元酵素の制御異常によっても ROS が産生される。この過剰な ROS 産生が持続すると遺伝子変異を誘発して多発的ながんの誘発につながる可能性が考えられる。

ではHCVのどのタンパク質が小胞体ストレスに寄与しているのだろうか？HCVキャリアが持つウイルスの変異と肝がん発症の解析がなされ報告されてきた。特に日本人のキャリアの70%を占めるゲノタイプ 1b 型の臨床解析の結果から、HCV 粒子の核を形成する Core タンパク質の 70 番目のアミノ酸のアルギニンがグルタミン (R70Q 変異) に置換した場合に肝がん発症と予後のリスクが増強することが指摘されている。しかし、これまでに R70Q 変異が細胞に与える影響とその機構は解明されていない。また、この変異を持たない HCV のキャリアからも肝がんが発症するケースもある。そこで、R70Q の変異 Core (Core(R70Q)) がヒト培養細胞の小胞体の恒常性維持に与える影響を非変異 Core 70R と比較しながら解析することで肝がん発症機構の糸口をつかむことを目的とした。本研究では次の 2 つの点に着目して研究を進めた。

(1) Core (R70Q) 変異体の性状とこの変異体が細胞に与える影響を解析した。

本研究者はこれまでに Core タンパク質を発現細胞に小胞体ストレスを与えること、Core (R70Q) は非変異 Core (70R) と異なった影響を与えることを示唆してきた。そのメカニズムの解析を目指した。

(2) 病原性に寄与する可能性のある R70Q 以外の Core の変異の同定を目指した。

2. 研究の計画

(1) Core (R70Q) 変異タンパク質小胞体の与える影響を観察する目的で、小胞体関連分解 (ERAD) への影響を ERAD で分解されていることが報告されている NHK タンパク質の分解速度を指標にした。また、小胞体→ゴルジ体の小胞輸送に与える影響を観察する目的で細胞培養液中の分泌型ルシフェラーゼ Gluc の分泌量への Core 発現の影響を観察した。

(2) 本学附属病院の HCV のキャリアで肝がんを発症した患者よりインフォームドコンセントを取得して、検査目的で採取された血清を用いてウイルスゲノム解析を行い、Core の変異の同定と特定の変異による細胞影響を解析した。

3. 研究の成果

(1) Core (R70Q) 変異体の細胞影響

小胞体関連分解 (ERAD) への影響を観察するため、小胞体内腔で変性し ERAD で分解される基質として使用される NHK タンパク質の分解は、Core 発現細胞において阻害されたが、その作用は非変異 Core (70R) よりも Core (R70Q) 発現細胞において顕著であった。さらに分泌型ルシフェラーゼ Gluc の培養液中への分泌も Core の発現により抑制されたが、逆に Core (70R) の方が Core (R70Q) に比べて強く阻害した。さらに、小胞体シャペロン Bip の誘導は Core (R70Q) の方が高かった。

(2) R70Q 以外の Core の変異同定と細胞影響

- ① 凍結保存血清より RNA を分離して逆転写反応後に特異プライマーを用いた PCR により増幅した HCV ゲノムの Core 部分を直接シークエンスおよびクローニング後に塩基配列を解析した。その結果、解析した約半数の Core は 70R であった。その他の共通した Core 変異を洗い出した結果、Core の中盤のアミノ酸の変異に直目した。この変異を導入した Core は一部 R70Q 変異と同様の性質を示すことが示唆された。
- ② また、70R で C 末端付近に特徴的な変異がある Core が患者一例より見出した。この変異と同様な変異が報告されているか、文献およびデータベースより HCV ゲノム (Core) 配列情報を得て解析した結果、この変異は複数の肝がん発症例で見いだされていたが着目されてこなかった。しかし肝生検サンプルのがん部、非がん部における解析例では、がん部にこの変異を持つ HCV が優位に存在する例も報告されており、発がんに寄与する可能性があると考えて解析を進めた。

Core は HCV ゲノムにコードされるポリプロテインの N 末端に位置する 191 アミノ酸長のタンパク質である。Core の C 末端の 178-191 領域は次に続く E1 タンパク質のシグナル配列として機能し、E1 が小胞体に分泌した後にシグナルペプチダーゼにより 191/192 の間で E1 と切り離され生成する。次に Core の C 末端に残存したシグナル配列は同じく小胞体膜酵素のシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) で切断され 177 アミノ酸長の Core に成熟する。

前述した Core の C 末端領域の変異 (C 末端変異) は、発現細胞内で未成熟型の分子量の Core が成熟型と同等に存在することから、成熟過程、すなわち SPP による切断が遅い可能性が示唆された。次にこの Core を持つ HCV が増殖可能かを検証した。HCV は唯一の培養細胞—ウイルス感染・増殖系がある。ヒト肝がん Huh7 細胞とゲノタイプ 2a 型の JFH1 の感染系である。JFH1 に 1b 型 Core および C 末端変異 Core を導入した組換えウイルスを作成して Huh7 細胞に感染させた結果、ウイルスとして増殖するが、感染細胞内の Core の成熟過程が遅延していることが判明した。さらに、C 末端変異 Core を培養細胞に高発現すると顕著に小胞体ストレス (ATF6 転写活性を指標とした) を上げることが判明した。

4. 研究の反省・考察

(1) Core の R70Q 変異体の細胞影響

Core タンパク質の高発現は小胞体の機能に影響を与えることが判明したが、Core (70R) と Core (R70Q) 変異体の方が小胞体内腔の変性タンパク質の ERAD をより阻害したことから、これにより小胞体ストレス応答を誘導し Bip の発現誘導を起こした可能性が考えられた。

(2) R70Q 以外の Core の変異同定と細胞影響

肝がんを発症した患者の臨床分離株より得られた C 末端付近の変異 Core は非常に強く小胞体ストレスを誘導した。

以上の結果は、複数の Core の変異が小胞体の恒常性に影響を与え小胞体ストレス応答をかく乱する可能性が示唆された。今後、これらの Core の変異が ROS の産生誘導に違いがあるのか等、発がんにつながる過程への影響を解析する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Methylmercury enhances cytotoxicity through inhibition of its activity by a decrease in PTEN solubility. Kobayashi T, Toyama T., Lee J.Y, Miura N, Kuge S, Naganuma A, Hwang G.W, 2018, BPB Reports (1, 1) pp1~5.
- ② Methylmercury induces the expression of chemokine CCL4 via SRF activation in C17.2 mouse neural stem cells. Kim MS, Takahashi T, Lee JY, Toyama T, Hoshi T, Kuge S, Fujiwara Y, Naganuma A, Hwang GW, 2018, Nature Publishing group, Scientific Reports 9, 4631. doi: 10.1038/s41598-019-41127-y

(2) 口頭発表

- ① 活性酸素種により誘導されるピルビン酸キナーゼ M2 型 (PKM2) の酸化型システイン残基の解析、色川 隼人, 沼崎 賢史, 加藤 慎, 高橋 庄太, 久下 周佐、第 91 回日本生化学会大会 (全国学会、口頭発表)、京都、2018 年 9 月、演題番号 3P-167 (3T13a-07)

- ② チオール-ジスルフィド交換反応による過酸化水素感知機構、久下周佐、日本薬学会東北支部第40回東北薬学セミナー（地方学会、招待講演）、仙台、2018年12月、特別講演
 - ③ 酸化ストレス負荷時のピルビン酸キナーゼM2（PKM2）を介した糖代謝制御、色川隼人、久下周佐、日本薬学会第139年会（全国学会、口頭発表）、幕張、千葉、2019年3月、一般シンポジウムS46-2
- (3) 出版物
- ① 糖代謝とレドックス制御，久下周佐、色川隼人，実験医学増刊Vo136 No5 羊土社 ISBN 978-4-7581-0369-5, 2018

学 校 名	埼 玉 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御 —マウス乾癬モデルを用いて—		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①自己免疫疾患 ②好中球性炎症 ③乾癬 ④ドーパミン ⑤ドーパミン受容体アンタゴニスト ⑥T helper 17 ⑦IL-8 ⑧ILC3		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 野 雅 章	医 学 部	准 教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 村 晃 一 郎	医 学 部	教 授	組織学的評価
高 木 理 英	医 学 部	助 手	実験・データ整理

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

1. 研究の目的

- (1) 本研究で我々は、好中球性炎症疾患に有効な薬剤の作用メカニズムを解明し、新規治療を提供することを目的とした。これまでの研究で我々は、ドーパミンやそのアゴニスト、アンタゴニストがサイトカインの分泌を制御することを示し、特に、モデルマウスを用いた実験でドーパミンのD1受容体アンタゴニストが様々な炎症性自己免疫疾患の病態を改善することを示した。本研究では、薬剤として、パーキンソン病の治療薬でもあるD2受容体アゴニスト、を取り上げ、その好中球性の炎症性疾患における有効性を解析した。好中球性炎症疾患における有効性を解析するためのモデルとしては、まず乾癬を用いた。マウスモデルで乾癬発症後にパーキンソン病の治療薬を投与し、その有効性を解析した。
- (2) さらに、これまでの研究で我々は天然物化合物の探索を行い、漢方薬の成分でもあるベルベリンが、ドーパミンD1およびD2受容体のアンタゴニストであり、消炎効果を有することを示し、マウスにおいて腸炎の誘導を改善することを示した。本研究ではさらにD2受容体アゴニスト活性がある天然物化合物の探索を行い、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能を解析した。

2. 研究の計画

- (1) パーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストが既に発症した好中球性炎症を伴う自己免疫疾患に対して効能があることを示すために、以下の実験を計画した。自己免疫疾患のモデルマウスとしてTLR7/8リガンドであるイミキモドの皮膚塗布による乾癬発症モデルマウスを用いた。
 - ① 活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌をパーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストが抑制することを解析した。
 - ② C57BL/6マウスにイミキモドを塗布し、乾癬を誘導した後、パーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストを含む軟膏を塗布してその効能を皮膚の状態から評価した。
 - ③ 乾癬の組織切片を作製し、組織染色で免疫細胞の浸潤を解析した。パーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストの投与でその浸潤が抑制されることを解析した。
- (2) ドーパミンのD2アゴニスト活性を有する天然物化合物を探索し、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能を解析するために以下の実験を計画した。
 - ① Lipopolysaccharide (LPS) 刺激したマウス脾臓細胞からのIFN- γ 放出を抑制する漢方薬の成分を探索した。
 - ② 同定した漢方薬の成分がドーパミン受容体に作用することを解析した。
 - ③ 活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分が抑制することを解析した。
 - ④ 同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分の乾癬に対する効能を評価した。
 - ⑤ 同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分の投与でその浸潤が抑制されることを解析した。
 - ⑥ 同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分が種々の炎症疾患に効能があることを、腸炎誘導マウス、および、歯周病誘導ラットを用いた実験を用いて解析した。

3. 研究の成果

- (1) パーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストである、プラミペキソール、および、ロピニロールを用いて既に発症した好中球性炎症を伴う自己免疫疾患に対して効能が

あること解析し、以下の成果を得た。

- ① プラミペキソール、および、ロピニロールは活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を抑制した。
 - ② マウス腸炎モデルにおいて、飲水によるロピニロールの投与は、マウスの体重減少を抑制した。
 - ③ マウス好中球性気道炎症モデルにおいて、プラミペキソール、および、ロピニロールの投与は、マウス肺への好中球の遊走を抑制した。
- (2) ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性を有する天然物化合物の探索を行い、以下の成果を得た。
- ① 漢方薬成分であるタンニン酸 (TA, tannic acid) がLPS刺激によってマウス脾臓細胞から産生されるIFN- γ 放出を抑制した。
 - ② TAはドーパミンD2受容体のアゴニストであり、また、ドーパミンD4およびD5のアゴニストでありアンタゴニストであることを示した。
 - ③ TAは特徴的な構造としてガロイル基を5つ有するが、同じくガロイル基を有するエピカテキンガラート、エピガロカテキンガラートもドーパミンD2受容体アゴニストであることを示した。
 - ④ TAは活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を抑制した。
 - ⑤ TAおよびガロイル基である没食子酸の塗布はマウス乾癬モデルにおいて乾癬発症による耳介腫脹を抑制した。
 - ⑥ マウス乾癬モデルにおいて組織学的解析において、TAの塗布は、リンパ球の浸潤、表皮層の腫脹、過角化、真皮乳頭の延長、表皮下微小膿瘍の症状を抑制した。
 - ⑦ マウス腸炎モデルにおいて、飲水によるTAの投与は、マウスの体重減少を抑制し、腸の収縮、腸上皮の破壊、および、好中球の浸潤を抑制し、抗CD3/28抗体によるマウス腸間膜リンパ球のIL-17産生を優位に抑制した。
 - ⑧ ラット歯周病モデルにおいて、TAの塗布は、歯周病誘導による歯茎の退縮を抑制した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究は、好中球性炎症疾患に有効な薬剤の作用メカニズムを解明し、新規治療を提供することを目的とした。実際、好中球性炎症疾患に有効な薬剤として、ドーパミン D2 受容体アゴニストである、プラミペキソール、および、ロピニロールを取り上げ、薬剤の作用メカニズムとしては、プラミペキソール、および、ロピニロールは活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を抑制することを示し、プラミペキソール、および、ロピニロールの薬剤の作用メカニズムの一端を解明した。IL-8は好中球の遊走を誘導する因子であることから、プラミペキソール、および、ロピニロールは炎症部位からのIL-8分泌を抑制することで、好中球の炎症部位への浸潤を抑制すると予想された。実際、マウス好中球性気道炎症モデルにおいて、プラミペキソール、および、ロピニロールの投与は、マウス肺への好中球の遊走を抑制し、また、マウス腸炎モデルにおいて、ロピニロールの飲水による投与は、マウスの体重減少を抑制した。このことから、ドーパミン D2 受容体アゴニストが好中球の炎症部位への浸潤を抑制することで、好中球性炎症疾患に有効であることが提案できた。
- (2) また、本研究では、ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物の探索を行い、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能を解析することを目的とした。実際、ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物として、漢方薬の成分である、タンニン酸 (TA, tannic acid)、を同定し、TAの構造の特徴であるガロイル基を有する、エピカテキンガラート、および、エピガロカテキンガラートもドーパミン D2 受容体アゴニストであることを示した。これらの化合物はLPS刺激によってマウス脾臓細胞から産生されたIFN- γ 放出を抑制した。さらにTAは、TAおよびガロイル基である没食子酸の塗布はマウス乾癬モデルにおいて乾癬発症による耳介腫脹を抑制し、リンパ球の浸潤、表皮層の腫脹、過角化、真皮乳頭の延長、表皮下微小膿瘍の症状を抑制した。また、マウス腸炎モデルにおいて、飲水によるTAの投与は、マウスの体重減少を抑制し、

腸の収縮、腸上皮の破壊、および、好中球の浸潤を抑制し、抗 CD3/28 抗体によるマウス腸間膜リンパ球の IL-17 産生を優位に抑制した。さらに、ラット歯周病モデルにおいて、TA の塗布は、歯周病誘導による歯茎の退縮を抑制した。このことから、本研究の目的であった、ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物の探索を行い、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能の解析、は達成されたと考えられる。

(3) 一方、ドーパミン受容体への作用が免疫細胞からのサイトカイン分泌を制御する分子機構は今回の研究では明らかにできなかった。この分子機構を解明することで、ドーパミン受容体アゴニストおよびアンタゴニストが炎症性疾患に有効である理由が明らかになるものと期待されるので、ドーパミン受容体への作用によるサイトカイン分泌制御の詳細なメカニズムの解析が待たれる。

(4) また、本研究では、生体外からドーパミン D2 受容体のアゴニストを添加することで、免疫細胞のサイトカインの分泌を制御し、炎症性疾患に有効であることを解析したが、生体内で神経伝達物質であるドーパミンが免疫細胞のサイトカインの分泌を制御するために用いられているかどうかは不明である。このことを解明するためには、神経細胞と免疫細胞との間の相互作用を解析するための系を構築し、神経細胞からのドーパミン分泌が免疫細胞のサイトカイン分泌制御に利用されていることを解析する必要があると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会等

- ① Dopamine regulates cytokine secretion during innate and adaptive immune responses. Kawano M., Takagi R., Saika K., Matsui M., Matsushita S. *Int. Immunol.*, 査読有り, 30:591-606, 14 Nov. 2018.
- ② IL-8 produced by T cells is under the control of dopamine signaling. Matsuyama T., Kawano M., Takagi R., Nakagome K., Chikamatsu K., Matsushita S. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 査読有り, 9:251-257 21 June 2018
- ③ Protein kinase C activation via serotonin receptor induces IL-8 in antigen-presenting cells stimulated with diazinon. Nishizawa K., Takagi R., Kawano M., Matsushita S. *Curr. Topics Toxicol.*, 査読有り, 14:41-52, 2018. 8 Sep 2018

(2) 口頭発表

- ① Tannic acid affects dopamine receptors, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis. Kawano M., Takagi R., Saika K., Matsui M., Matsushita S. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018年12月
- ② 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎におけるあらたな治療（生物的製剤を中心に）。第67回日本アレルギー学会学術大会（幕張）。2018. 6. 24
- ③ 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎の新しい治療と期待。第82回日本皮膚科学会東京支部学術大会。シンポジウム。（東京）。2018. 12. 02
- ④ 中村晃一郎。ベーチェット病の皮膚粘膜病変の臨床と診断。第2回日本ベーチェット病学会（横浜市）2018. 12. 14。
- ⑤ Koichiro Nakamura, Kyohei Miyano, Tetsuya Tsuchida. Susceptibility of single nucleotide polymorphism of interleukin17A concerned with intestinal symptoms in Behcet's disease. 18th International Conference on Behcet's disease. (Rotterdam) 2018. 9. 13.

(3) 出版物

- ① ロドデノール誘発性脱色素斑は自己免疫機序により生じる。土田 哲也、中村 晃一郎、高木 理英、川野 雅章、松下 祥。「What's new in 皮膚科学」宮地良樹編, メディ

- カルレビュー社（東京），44-45，2018（2018年4月16日、第1版）.
- ② 高木理英、松下祥：ロドデノールによって誘発された白斑発症のメカニズムと今後の化粧品開発 COSMETIC STAGE 13:54-58, 2018.
 - ③ 中村晃一郎、岩田洋平 浅井純 川上民裕 常深祐一郎 金子史男。ベーチェット病の皮膚粘膜病変診療ガイドライン。日本皮膚科学会雑誌2018, 128(10); 2087-2100.
 - ④ 中村晃一郎。保湿剤の種類と特徴。丈夫な皮膚をつくる 正しい保湿剤の使い方。WOC Nursing（医学出版）2018, 16（8），7-22.
 - ⑤ 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎の新規治療。アレルギーの臨床。（北陵館）。2018, 38（11），1039-1042.
 - ⑥ 中村晃一郎。手湿疹。小児科（金原出版）。2018, 59(9), 1325-1329.
 - ⑦ 中村晃一郎。カラーアトラス。皮膚症状110症例でみる内科疾。Sweet病。日本医事新報社。（編集、出光俊郎） 2018, 16-17.
 - ⑧ 中村晃一郎。皮脂欠乏性皮膚炎。皮膚病診療[®]ワラップ。中山書店。2018, 93-96.

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 週齢まで成育する。
 - 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。
- ④iPSC-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。iPSC-NS移植SCIDマウス群の運動学習機能を評価するために、移植後133~136日および移植後167~170日においてロータロッドテストを行ったが、健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群に運動学習機能の差異はみられなかった。オープンフィールドテストにおいて、不安の指標となる中心領域滞在率を解析したところ、PD患者iPSC-NS移植マウスの中心領域滞在率は、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植マウスに比べ増加傾向がみられたことから、マウスの情動性への影響が示唆された。
- 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週および31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、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、ERK1、p38、IL-1 β 、TNF- α のmRNA発現レベルが増加していた。さらに、移植後31週のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、p38、IL-1 β 、TNF- α 、iNOS、RelA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細胞治療実験には、申請者の研究室が作製した23週齢および34週齢において運動機能異常を示すLRRK2-TGマウスを使用した。20週齢のLRRK2-TGマウスに、遺伝子修復iPSC-NSを実験Iと同様の方法で線条体に移植した。LRRK2-TGマウスはC57BL/6系統のため、定期的に免疫抑制剤を腹腔内に投与した。細胞治療による運動学習機能を評価するために、移植後6日から15日までのLRRK2-TGマウス移植群と非移植群において、ロータロッドテストを行った。その結果、全群において、日を追うごとに落下するまでの歩行時間にある一定の増加傾向がみられ、運動学習機能を確認した。LRRK2-TGマウス移植群では、非移植群に比べ、運動学習機能の改善がみられ、non-TGマウス群に近い歩行時間を示す傾向があった。また、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については、現在解析中である。

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、今後マイクロアレイなどによる網羅的な解析が必要である。
- (2) 遺伝子修復 iPSC の樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索
 - ①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、今後詳細や作用機序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遺伝子修復iPSC-NSを用いたLRRK2-TGマウスの細胞治療実験では、を行った。LRRK2-TGマウス移植群のロータロッドテストにおいて、運動学習機能の改善がみられ、表現型における治療効果を示す結果が得られた。今後、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によって、移植による治療効果の詳細を調べる必要がある。

5. 研究発表

- (1)学会誌等

- ①Kubo KY, Suzuki A, Iinuma M, Sato Y, Nagashio R, Ohta E, Azuma K. Vulnerability to stress in mouse offspring is ameliorated when pregnant dams are provided a chewing stick during prenatal stress. *Arch Oral Biol* 97,150-155, 2019
- ②服部精人、太田悦朗、曾根岳史、三好浩之、新田龍人、Andrew Yoo、川村俊彦、岡野栄之「microRNAを用いた遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞の病態解析」第18回日本再生医療学会総会、2019年3月
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
- ①服部信孝（企画）、太田悦朗、川村俊彦（分担執筆）：「日本臨床 増刊号 パーキンソン病（第2版）－基礎・臨床研究のアップデート－」（担当箇所：LRRK2）、日本臨床社、76巻、pp. 65-72、2018
- ②高橋良輔（企画）、太田悦朗（分担執筆）：別冊「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、1巻、pp. 10-15、2018

学 校 名	慶 應 義 塾 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明 －超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①腸内細菌 ②自己免疫疾患 ③酪酸 ④関節リウマチ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 谷 耕 二	薬 学 部	教 授	自己免疫疾患モデルの評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
金 倫 基	薬 学 部	教 授	腸内細菌叢と代謝物の解析

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

1. 研究の目的

(1) 研究背景：腸内細菌の異常による疾患形成

- ① ヒトの大腸には 100 兆個以上もの腸内細菌が定着しており、消化液では分解できない食物繊維などを腸内発酵により分解し、生体にとって有用な短鎖脂肪酸に作り替える働きをしている。短鎖脂肪酸は大腸上皮の重要なエネルギー源である。短鎖脂肪酸以外にも、糖・脂質代謝の補酵素となるビタミン B 類なども腸内細菌叢によって産生されている。一方、宿主は腸内細菌叢の存在を許容し、食物残渣やムチンを発酵基質として提供することで、生物種間における trade-off が成立し相利共生関係が維持されている。
- ② しかしながら、遺伝的素因や老化といった宿主側の要因や、薬剤やストレス、偏った食生活などの環境要因により、ひとたび腸内細菌叢のバランスに異常をきたすと、炎症性腸疾患や大腸癌などの消化器疾患に加えて、アレルギーや自己免疫性疾患、さらには精神性疾患や生活習慣病といった全身性の疾患が誘導されることが示唆されている。つまり腸内共生バランス失調は各種疾患の発症に関わる鍵因子であると想定されているが、その病態メカニズムは不明である。
- ③ 興味深いことに、炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生菌種の減少である。申請者はこれまで、酪酸が腸内で多く産生された際に、炎症やアレルギー反応を抑制する制御性 T 細胞が増加する現象を見出した (Furusawa et al., *Nature* 2013)。制御性 T 細胞は宿主にとって無害な食品成分や腸内細菌に対する免疫寛容を誘導することで、炎症・アレルギー反応を抑制する。よって、酪酸は、制御性 T 細胞を誘導することで、大腸における炎症を未然に防いでいる。さらに興味深いことに、腸内の酪酸濃度を高めることで、全身性の自己免疫疾患であるコラーゲン誘導性関節炎の病態が緩和する事実を見出している。

(2) 研究目的

- ① 以上の研究背景から、腸内で産生された酪酸（あるいはその影響を受けたリンパ球）は循環血に移行し、全身における炎症応答の抑制に寄与することが示唆される。すなわち、『腸内細菌叢の変容によって、腸内における酪酸産生が低下することが、炎症の惹起や増悪に繋がっている』との作業仮説が成り立つ。そこで本研究では、下記の項目を実施し本仮説の検証を試みる。
- ② コラーゲン誘導性関節炎モデルにおける、酪酸による自己免疫制御メカニズムを検討する。
- ③ 関節リウマチ患者と健常人の糞便中の短鎖脂肪酸濃度を測定により、酪酸の低下と病態の発症との関連を明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 酪酸による自己免疫制御メカニズムの解明

- ① 腸内代謝物である酪酸が腸管以外の臓器における炎症制御にも関わると推定した。そこで、そのメカニズムを検証した。まず、免疫病理学的解析として、炎症局所の滑膜ならびに所属リンパ節より細胞を取得し、病態形成に関わる自己応答性 17 型ヘルパー T (Th17) 細胞と、炎症を制御する制御性 T (Treg) 細胞の存在比率をフローサイトメトリーにより検出する。

- ② さらに、自己抗体であるコラーゲン特異的IgG産生量をELISAにより定量した。これより酪酸の標的細胞候補を試みた。

(2) 関節リウマチ患者検体における酪酸濃度の解析

- ① これまで関節リウマチ患者では、腸内細菌叢の異常として*Prevotella copri*の増加が報告されている。さらにあまり注目されていないものの、健常人と比較して酪酸産生菌種を多く含むLachnospiraceae科細菌の減少が認められることから、酪酸産生が低下している可能性が考えられる。これを検証するため、関節リウマチ患者と健常人より糞便および血液サンプルを取得し、酪酸およびその他の腸内代謝物の濃度を分析した。

3. 研究の成果

(1) 酪酸による自己免疫制御メカニズムの解明

- ① 対照群にコラーゲンを2回免疫すると、2週間以内に100%のマウスが関節炎を発症したが、酪酸化スターチを摂取させ大腸内酪酸濃度を高めることで、関節炎の発症率が有意に低下した。さらに関節炎のスコアにおいても、酪酸化スターチ摂取群で有意な改善が認められた。μCTによるイメージングでは、対照スターチ群では骨破壊が顕著であったが、酪酸化スターチ群では骨破壊は軽度にしかな認められなかった。以上の観察結果より、酪酸は自己免疫性関節炎の発症を抑制する作用があることが判明した。
- ② 免疫学的性状解析を実施した。炎症部位である関節の滑膜、所属リンパ節、および、脾臓より細胞を取得し、病態形成に関わる17型ヘルパーT細胞(Th17細胞)と、炎症を抑制する制御性T細胞(Treg細胞)の存在比率をフローサイトメトリーにより検出した。その結果、酪酸化スターチ群では対照スターチ群と比べてわずかにTreg細胞の増加が認められた。Th17細胞については両群で差が認められなかった。
- ③ 続いて、血清中のコラーゲン特異的IgG価を測定した結果、酪酸化スターチ群において抗体価の低下が観察された。興味深いことにコラーゲン免疫によって大腸リンパ組織の胚中心反応が活性化して、肥大が認められた。酪酸はこの大腸リンパ組織の胚中心反応を抑制する事が判明した。

(2) 関節リウマチ患者検体における酪酸濃度の解析

- ① 健常人および初発かつ未治療の関節リウマチ患者の便中において、各種有機酸量を測定した結果、酪酸濃度が有意に減少していることが判明した。一方で、酢酸やプロピオン酸には有意な変化は認められなかった。さらに、腸内細菌組成と酪酸の相関解析を実施し、関節リウマチ患者では*Facalibacterium*属細菌とunclassified Lachnospiraceae科細菌の減少が酪酸産生の低下に繋がっていることが示唆された。

4. 研究の反省・考察

(1) 酪酸による自己免疫制御メカニズムの解明

- ① 近年、関節リウマチ患者において腸内細菌の異常(ディスバイオーシス)が報告されている。関節リウマチ患者ディスバイオーシスの特徴として*Prevotella copri*の増加が最もよく知られている。*P. copri*はTh17細胞誘導作用があることが知られている。Th17細胞は滑膜細胞からのRANKL発現を促す。RANKLは、破骨細胞の分化と活性化を促し、炎症性サイトカインを分泌させるため、骨破壊と炎症を促進する。無菌化したSKGマウス(関節リウマチ自然発症マウス)に関節リウマチ患者由来の腸内細菌を移植すると、健常人由来の糞便を定着させた場合に比べて、関節炎の病態スコアが悪化する。SKGマウスはTh17細胞依存的に発症するモデルである。
- ② 一方、今回の研究で解析したコラーゲン誘導性関節炎モデルは、細胞性免疫であるTh17細胞の活性化に加えて、液性免疫であるコラーゲン特異的抗体の産生も関節炎の発症に関与している。酪酸は、滑膜や所属リンパ節におけるTh17細胞を抑制する作用は認められなかったが、これは血清中の酪酸濃度が低いことから腸管外組織におけるTreg誘導作用は少ないためと思われる。酪酸は腸上皮の主要なエネルギー源であり、また肝臓においても代謝されるため、腸から全血への移行は少ない。酪酸は自己抗体の産生を抑制したが、これは腸管関連リンパ組織における胚中心応答を抑制したと想定されるが、現在、その詳細なメカニズムを検討中である。

(2) 関節リウマチ患者検体における酪酸濃度の解析

- ① 既報では、関節リウマチ患者において *P. copri* の増加と、酪酸産生菌が多く含まれる Lachnospiraceae の低下が認められることが報告されてきた。我々の解析においても、関節リウマチ患者において unclassified Lachnospiraceae 科細菌の減少が確認できた。さらにもっともメジャーな酪酸産生菌として知られる *Faecalibacterium* 属細菌の低下も観察された。以上の結果より、関節リウマチ患者では腸内細菌の異常により酪酸産生が低下することが判明した。自己免疫応答のブレーキ役として機能する酪酸の産生低下が、関節リウマチ病態の悪化を促している可能性が示唆された。ただし、今回の解析では血液パラメーターは調べておらず、酪酸低下とリウマチ因子などとの相関解析を行うことで、臨床における酪酸減少の重要性がより明確になると思われる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, Hase K. Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning. **J. Exp. Med.** 2019, 216, 831-846, doi: 10.1084/jem.20181604.
- ② Onuki M, Watanabe M, Ishihara N, Suzuki K, Takizawa K, Hirota M, Yamada T, Egawa A, Shibahara O, Nishii M, Fujihara M, Makishima M, Takahashi D, Furusawa Y, Kakuta H, Hase K. A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. **Int. Immunol.** 2019, 31:251-262, doi: 10.1093/intimm/dxy089.
- ③ Zai K, Ishihara N, Oguchi H, Hirota M, Kishimura A, Mori T, Hase K, *Katayama Y. Regulation of inflammatory response of macrophages and induction of regulatory T cells by using retinoic acid-loaded nanostructured lipid carrier. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** 2019, 30, 1-11, doi: 10.1080/09205063.2018.1493671
- ④ Kato T, Yamazaki K, Nakajima M, Date Y, Kikuchi J, Hase K, Ohno H, Yamazaki K. Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. **mSphere.** 2018, 3, e00460-18, doi: 10.1128/mSphere.00460-18.
- ⑤ Zai K, Hirota M, Yamada T, Ishihara N, Mori T, Kishimura A, Suzuki K, Hase K, Katayama Y. Therapeutic effect of vitamin D(3)-containing nanostructured lipid carriers on inflammatory bowel disease. **J Control Release.** 2018, 286, 94-102, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.019.
- ⑥ Nakamura Y, Kimura S, Hase K. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. **Inflamm Regen.** 2018, 38, 15, doi: 10.1186/s41232-018-0072-y.
- ⑦ Kikuchi K, Iida M, Ikeda N, Moriyama S, Hamada M, Takahashi S, Kitamura H, Watanabe T, Hasegawa Y, Hase K, Fukuhara T, Sato H, Kobayashi EH, Suzuki T, Yamamoto M, Tanaka M, Asano K. Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. **J Immunol.** 2018, 201, 635-651, doi: 10.4049/jimmunol.1800040.

(2) 口頭発表

- ① 長谷 耕二, 自己免疫疾患の発症を制御する短鎖脂肪酸. 第72回日本栄養・食糧学会大会, 2018/5/13, 岡山.
- ② 長谷 耕二, 腸内細菌による慢性炎症の制御. 第33回日本乾癬学会学術大会, 2018/9/7, 松山.
- ③ Koji Hase, Commensal microbe-derived metabolites shapes host immunity and metabolism. The Korean Society of Food Science and Nutrition 2018, 2018/11/1, Seoul, Korea.

(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 士	大学院医学研究科 ゲノム・再生医療学	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

H30 年度までに順天堂医院に通院する約 450 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。100 症例程度を iPS 細胞として樹立しその一部を解析した。

(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 に関して表現型を改善する化合物候補を複数同定済み。PARK1/4 を用いて α シヌクレイン蓄積以上を改善する化合物をスクリーニングする体制が整った。

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 樹立はプロトコルの改良で改善されつつある。

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

PARK14/22 など細胞機能異常の詳細が不明なタイプでは特異的な表現型の検出が今後の課題である。ミトコンドリア関連の表現型の特異度が低く、孤発性症例の分類が難しい。

(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

遺伝性症例で同定された化合物が一部の孤発性症例でも有効なことを確認した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Imaizumi K, Fujimori K, Ishii S, Otomo A, Hosoi Y, Miyajima H, Warita H, Aoki M, Hadano S, Akamatsu W, Okano H. Rostrocaudal Areal Patterning of Human PSC-Derived Cortical Neurons by FGF8 Signaling. *eNeuro*. 2018 Apr 26;5(2). (赤松和土は責任著者)
- ② ☆Ren Q, Ma M, Yang J, Nonaka R, Yamaguchi A, Ishikawa KI, Kobayashi K, Murayama S, Hwang SH, Saiki S, Akamatsu W, Hattori N, Hammock BD, Hashimoto K. Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 19;115(25):E5815-E5823.
- ③ Ueno SI, Saiki S, Fujimaki M, Takeshige-Amano H, Hatano T, Oyama G, Ishikawa KI, Yamaguchi A, Nojiri S, Akamatsu W, Hattori N. Zonisamide Administration Improves Fatty Acid β -Oxidation in Parkinson's Disease. *Cells*. 2018 Dec 29;8(1).
- ④ Nishihara K, Shiga T, Nakamura E, Akiyama T, Sasaki T, Suzuki S, Ko M, Tada N, Okano H, Akamatsu W. Induced pluripotent stem cells reprogrammed with three inhibitors show accelerated differentiation potentials and express 2-cell-stage markers. *Stem Cell Reports* in press IF: 7.181 (赤松和土は責任著者)

(2) 口頭発表

- ① 赤松和土「iPS細胞技術を用いた神経疾患解析」第28回日本サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム (招待講演、座長) 2018. 5. 26
- ② 赤松和土「iPS細胞を用いたパーキンソン病の病態解明」第53回 TOKYO ニューロサイエンス研究会 (招待講演) 2018. 10. 27

(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	SNIPER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	SNIPER化合物ルートの検討・合成
福 田 和 男	薬 学 部	特 任 助 教	SNIPER化合物ルートの検討・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	平成31年3月 31日退職	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、下記(1)~(3)の研究課題を行った

(1) TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

YAPの恒常的活性化が高頻度で認められる悪性中皮腫でYAPシグナルとTGF- β シグナルが協調してがんを悪性化することが報告されている。すでに申請者らが精力的に解析を進めているTMEPAIファミリーがYAPの活性を抑制するので、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と推測し、その分子メカニズムの解明を試みた。特にC18orf1がYAPの分解を介して、YAPシグナルを抑制していることを見出しているため、その分子機構を明らかにする目的で研究を行った。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

YAPは中皮腫以外の様々ながんでも恒常的に活性化されているので、YAPの活性抑制は、がん征圧に繋がる可能性を秘めている。そこで、YAPを標的としたリード化合物の探究及び合成展開を目指した。すでに申請者らは、2万を超える化合物ライブラリースクリーニングでYAP結合化合物を同定し、これらの化合物の中にYAP活性を阻害する化合物Aを見出した。化合物AはYAPのTEAD結合領域を含んだ部位に結合していることをペプチドを用いたピアコアで見出しているが、実際YAPとTEAD間結合を阻害することを確かめられていないので、今回この可能性について検討した。

(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・抗がん作用

申請者らは、プロテインノックダウン法の一つであるSNIPER法とよ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ている。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HK-13という低分子化合物を見出しているため、LCL161と共有結合が可能かつYAPと高親和性のSNIPER候補化合物を見出し、実際YAPタンパク質を分解することを明らかにする。

2. 研究の計画

(1) TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ①TMEPAIファミリーによってリクルートされ、YAPのユビキチン化を行うE3リガーゼの同定
- ②in vitro腫瘍形成実験を用いたTMEPAIファミリーの中皮腫増殖抑制実験

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ①化合物Aの中皮腫進展抑制メカニズムの解明
- ②化合物A類似化合物の合成ルートの探究と合成展開

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成・抗がん作用

- ①HK13をベースとしたSNIPER合成
- ②SNIPERのin vitro評価

3. 研究の成果

(1) TMEPAI ファミリーによる YAP 抑制メカニズムの解明

① TMEPAI ファミリーによってリクルートされ、YAP のユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼの同定

YAP を分解できる E3 ユビキチンリガーゼとして β -TrCP が知られていたため、C18orf1 が β -TrCP を介して YAP を分解している可能性について検討した。実際 C18orf1 は、YAP を介して β -TrCP と結合していたが、C18orf1 による YAP のポリユビキチン化は、 β -TrCP 存在下で増強されず、C18orf1 は他の E3 ユビキチンリガーゼを介して、YAP をポリユビキチン化し、分解している可能性が示唆された。

② in vitro 腫瘍形成実験を用いた TMEPAI ファミリーの中皮腫増殖抑制実験

中皮腫細胞である NCI-H290 細胞に C18orf1、YAP との結合領域を欠失した C18orf1 Δ PY、Smad2/3 との結合領域を欠失した C18orf1 (4A) を安定的に発現した細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて、軟寒天コロニー形成実験を行ったところ、C18orf1 を発現した NCI-H290 はコロニー形成を抑制したが、C18orf1 Δ PY と C18orf1 (4A) はコロニー形成抑制が殆ど認められず、中皮腫増殖には C18orf1 が Smad2/3 や YAP に結合する必要性が示唆された。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

① 化合物 A 中皮腫進展抑制メカニズムの解明

GST-YAP と細胞内で発現させた TEAD4 の結合を化合物 A は抑制することを見出した。

② 化合物 A 類似化合物の合成ルートの探究と合成展開

化合物 A は天然物由来アルカロイドであり、化合物 A 類似化合物の合成経路について文献等で検討したが、効率良く、収量を確保できる方を見出すことができず、断念した。

(3) YAP を標的とした SNIPER 法による分子標的薬の合成・抗がん作用

① HK13 をベースとした SNIPER 合成

YAP 結合活性を有する HK-13 と、cIAP 結合を有する LCL161 との間を長さの異なるポリエチレングリコール鎖 (PEG 鎖) によって結合することにより、SNIPER 活性を発現させることを目指して構造展開を行った。HK-13 にはカルボン酸部位が 1 か所あり、この部位の誘導化によって YAP 結合活性が大きく損なわれないことが確認されている。そのためここからアミド結合を形成することによって、各種の長さを有するリンカーを効率よく合成する手法を確立した。LCL161 誘導体は、若干保護基の変更を要したものの、主として既存の合成方法によって合成した。LCL161 の末端アミノ基部分は BOC にて保護し、cIAP 結合とは離れた部分の末端である芳香環はヒドロキシル基として、ここにリンカーを結合している。リンカーである PEG 鎖を、末端がトシル化された状態で長さを決定してつなぎ、その後アミノ化すると同時に HK-13 またはその誘導体と縮合し、脱 BOC 化することで SNIPER 分子である HK-21~HK-26 を合成した。

② SNIPER の in vitro 評価

YAP に対する SNIPER である HK-21~HK-26 の中で、HK-22、HK-24、HK-25、HK-26 が YAP と結合することをピアコアにより明らかにした。結合した 4 種類の化合物は HK-13 と LCL-161 間のリンカー長のみで相異があり、リンカー長が最も短い HK-22 に比較してリンカー長の最も長い HK-26 が強く YAP に結合していた。特に HK-24 を用いて中皮腫細胞である NCI-HK290 を用いて細胞増殖に対する影響を調べたところ、HK-24 は用量依存的に NCI-H290 の細胞増殖を抑制し、YAP タンパク質発現を阻害した。

4. 研究の反省・考察

(1) TMEPAI ファミリーによる YAP 抑制メカニズムの解明

① TMEPAI ファミリーによってリクルートされ、YAP のユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼの同定

C18orf1 が属する TMEPAI ファミリーが結合することが知られている E3 ユビキチンリガーゼを用いても YAP のユビキチン化を促進することはできなかった。今後は、網羅的に C18orf1 に結合する E3 ユビキチンリガーゼを探索する、又は E3 ユビキチンリガーゼ shRNA ライブラリーを用いて、C18orf1 による YAP のユビキチン化を抑制する shRNA を見出し等の方法から YAP のユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼの同定を行いたい。

② in vitro 腫瘍形成実験を用いた TMEPAI ファミリーの中皮腫増殖抑制実験

C18orf1又はその変異体を大量発現させたNCI-H290細胞を用いて、中皮腫がん増殖にC18orf1のPYモチーフとSIM領域が重要であることを見出したが、実際in vivoでの実験まで遂行できなかった。逆にC18orf1をノックダウンさせたNCI-H290細胞を樹立することを試みたが、最近樹立できたところでまだがん化への影響について研究するに至っていない。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

①化合物A中皮腫進展抑制メカニズムの解明

化合物AがYAPとTEAD4間の結合を阻害することを見出したことは大きな進歩である。しかしながら、阻害するために高濃度の化合物Aが必要であり、化合物A自身を創薬として考えることは極めて難しい。

②化合物A類似化合物の合成ルートの探究と合成展開

効率良く化合物A類似化合物の合成経路を探索できなかったことは悔やまれるが、代わりにHKシリーズの合成に集中することができた。

(3) YAP を標的とした SNIPER 法による分子標的薬の合成・抗がん作用

①HK13をベースとしたSNIPER合成

6種類のSNIPERを合成することができたが、YAPに対する高親和性の化合物を合成することができなかった。

②SNIPERのin vitro評価

合成した中でHK-24が最もYAP分解能を有していたが、分解活性は弱かった。また、合成できた収量が少なかつたため、in vivo研究を行うことができなかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 伊藤愛、天木崇真、浅見優希、石井亜椰子、安里まりの、福田和男、山崎龍、岡本巖：
N-チエニル型およびN-アズレニル型芳香族アミドの立体構造特性 第29回基礎有機化学
討論会（東京）平成30年9月

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 海 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立 ーがん幹細胞の治療高感受性化の実現ー		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①がん幹細胞 ②白血病 ③分子標的薬 ④幹細胞動態制御			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
八 幡 崇	医 学 部	准 教 授	がん幹細胞の性状解析と研究全体の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 藤 潔	医 学 部	教 授	白血病の臨床試験と患者検体を利用した解析
平 山 令 明	先進生命科学研究所	教 授	PAI-1阻害剤の最適化と適応拡大
穂 積 勝 人	医 学 部	教 授	がん幹細胞生体モデルの作製

がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立 ーがん幹細胞の治療高感受性化の実現ー

1. 研究の目的

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

研究代表者らは、ニッチ因子である TGF- β が幹細胞の PAI-1 発現を強力に誘導すること、そしてその PAI-1 が幹細胞に運動能を付与する因子である膜型メタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の活性を抑制するため、幹細胞の運動能が制限されることを明らかにした。すなわち、ニッチから離脱しないように幹細胞を繋ぎ止めている主要な因子は PAI-1 であることを突き止めた (Blood, 2017)。本研究は、TGF- β が誘導する PAI-1 によって白血病幹細胞がニッチに留まるのが治療抵抗性の根本原因であるという仮説に基づき『ニッチからの離脱によるがん幹細胞の治療高感受性化』によりがんの撲滅を実現する斬新で独創的ながん治療コンセプトの確立を目指す。

2. 研究の計画

研究代表者らのこれまでの解析から、『PAI-1 阻害剤によりがん幹細胞の運動能が高まり、ニッチからの離脱を促進する。このことにより抗がん剤に対する感受性が高まる』という仮説が成り立つ可能性が高い。そこで、がん幹細胞をニッチに静止させ、抗がん剤が効きにくくする根本原因が PAI-1 であることを *in vitro*, *in vivo* の実験系で実証し、PAI-1 阻害剤の分子レベルでの作用機序を明確にすることを目指して、以下にあげる (1) ~ (3) の課題に取り組んだ。

- (1) ニッチ因子 (TGF- β) によるがん幹細胞の PAI-1 発現誘導メカニズムの解明
- (2) PAI-1 によるがん幹細胞の運動性制御メカニズムの解明
- (3) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証

3. 研究の成果

- (1) ニッチ因子 (TGF- β) によるがん幹細胞の PAI-1 発現誘導メカニズムの解明
 - ① TGF- β はがん幹細胞の治療抵抗性獲得に重要な分子であり、PAI-1 発現を強力に誘導する。TGF-Smad 阻害剤をマウスに投与したところ、PAI-1 が低下し、抗がん剤抵抗性が減弱することを確認した。すなわち、がん幹細胞における PAI-1 の高発現が TGF-Smad シグナル依存的であることを明確にした。
- (2) PAI-1 によるがん幹細胞の運動性制御メカニズムの解明
 - ① PAI-1 の発現量の異なる白血病細胞を作製し、PAI-1 発現量の多寡によって MT1-MMP などの運動性制御因子の発現が制御されていることを確認した。

(3) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証

- ①PAI-1 を高発現あるいは欠損した白血病細胞の抗がん剤抵抗性を検討したところ、PAI-1 高発現型の白血病細胞は治療抵抗性であることを見出した。すなわち、PAI-1 によって抗がん剤に対する抵抗性が制御されていることを確認した。
- ①PAI-1 阻害剤を投与するとがん幹細胞がニッチから離脱することを実証した。

4. 研究の反省・考察

幹細胞は、細胞分裂による機能低下を防ぐために増殖しないように保護されている。その保護作用の基盤がニッチとの相互作用である。現在、幹細胞の静止状態に関しては、細胞が増殖しない仕組みにのみ焦点を当てた研究が先行しており、本研究で着目する幹細胞の動きそのものという視点が全く欠如している。ニッチとの相互作用が幹細胞の保護作用の根幹であるからには、幹細胞がニッチから離脱しないように留めておく仕組みの解明が、がんの撲滅を実現するための重要な課題である。本研究の遂行により、がん幹細胞がニッチに静止するメカニズムを明らかにすることができた。PAI-1 阻害剤のがん治療への適用に向けた理論的基盤が確立しただけでなく、全く新しい研究領域を切り拓く知見が得られたことは大きな成果であると言える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Higuchi H, Yamakawa N, Imadome KI, Yahata T, Kotaki R, Ogata J, Kakizaki M, Fujita K, Lu J, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Alba SM, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Handa H, Kuroda M, Nakamura N, Kotani A. Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma. *Blood*. 2018;131(23):2552-2567.

(2) 口頭発表

- ①八幡 崇「PAI-1 阻害薬の臨床応用に向けて」第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2019年2月
- ②八幡 崇「PAI-1 活性の阻害による慢性骨髄性白血病幹細胞の治療高感受性化」第80回日本血液学会学術集会 2019年10月
- ③八幡 崇「Blockade of PAI-1 activity increases therapeutic susceptibility of Leukemic stem cells」The 16th Stem Cell Research Symposium 2018年6月

(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 —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	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	准 教 授	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) 脂肪組織における炎症関連イベントの解析

肥満に伴い脂肪組織に免疫担当細胞が浸潤し炎症が惹起される。この脂肪組織における炎症により脂肪酸、サイトカイン、活性酸素等が産生・分泌され全身の耐糖能を低下させる。一方、リガンド投与による AhR の活性化は炎症の進行を促すことが多く報告されている (Stockinger et al. *Annu Rev Immunol.* 2014; Hanieh. *Biomed Res Int.* 2014)。前年度に遂行した病理学的解析において、A-AhR KO マウス脂肪組織への免疫担当細胞の浸潤に変化が認められた。さらに各組織の生化学的解析により脂肪組織がインスリン感受性亢進の責任臓器であると同定された。したがって平成 30 年度は以下の検討から脂肪組織における炎症関連イベン

トを解析する。

- ① 脂肪組織中におけるケモカインならびに炎症性サイトカインの遺伝子発現量を測定する。差異が認められた因子に関しては、組織中ならびに血中におけるレベルを ELISA により測定する。
 - ② 炎症性サイトカイン類の発現ならびにシグナル伝達の多くは NF- κ B により媒介される。また NF- κ B は AhR と直接的な相互作用を示すことが知られている。そこで、①においてサイトカイン量に違いが認められたならば、脂肪組織中抽出液を調製し、それを用いて NF- κ B 活性（特異的 DNA 結合活性）を測定する。また NF- κ B はリン酸化により活性制御を受けるため、リン酸化の程度ならびにタンパク質レベルでの量的変動を解析する。
- (2) 脂肪組織における活性酸素産生酵素の解析
- ① 脂肪細胞における NADPH oxidase の活性化は活性酸素種の産生が亢進させ、酸化ストレスの増大を介してインスリン抵抗性発症に深く関与している。そこで、精巣上体周囲脂肪組織における NADPH oxidase 活性を測定する。活性に差異があった場合は、各酵素のサブユニットに関して、発現量を解析する。

3. 研究の成果

(1) A-AhR KO マウス脂肪組織における炎症関連イベントの解析

- ① 高脂肪食を与えたマウスの精巣上体周囲脂肪組織における炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現量を解析した結果、A-AhR KO マウスにおいて一連の炎症性サイトカイン、特にインターロイキン(IL-)6 の発現量の有意な低下が示された。この IL-6 発現量の低下は、ELISA によりタンパク質レベルにおいても確認された。一方、抗炎症性サイトカイン IL-10 の A-AhR KO マウスにおける増加が示された。また、高脂肪食を与えた A-AhR KO マウスにおいて、マクロファージのマーカーである F4/80 遺伝子の発現量及び M2 マクロファージのマーカー（CD163）の遺伝子発現量はコントロールマウスと比較して低値を示した。これらの結果から、A-AhR KO マウスで見られた免疫担当細胞の浸潤減少は、M1/M2 マクロファージのバランスの変化よりも、マクロファージの数あるいは活性化によることが推察された。糖および脂質代謝を改善するサイトカイン Fgf21 およびグルコーストランスポーター4 の発現も合わせて解析したが、A-AhR KO マウスとコントロールマウスの間に違いは認められなかった。
- ② 炎症性サイトカイン類のシグナル伝達の多くは NF- κ B により媒介される。また NF- κ B は AhR と直接的な相互作用を示すことが知られている。そこで、脂肪組織中における NF- κ B の活性（特異的 DNA 結合活性）、リン酸化の程度ならびにタンパク質レベルでの量的変動を解析した。リン酸化 p65 は高脂肪食を負荷した群にのみ発現が確認された。さらに、A-AhR KO マウスにおける発現量はコントロールマウスのそれと比較して減少傾向が見られた。一方、高脂肪食を負荷した両群の IR β の発現量に差は認められなかった。また NF- κ B 活性に関しては、両マウス間で差異は認められなかった。

(2) A-AhR KO マウス脂肪組織における活性酸素産生酵素の解析

- ① 高脂肪食を負荷した A-AhR KO マウスの精巣上体周囲脂肪組織における NADPH oxidase 活性を検討した。その結果、高脂肪食あるいは通常食下のいずれの場合においても両マウス間で違いは認められなかった。

4. 研究の反省・考察

昨年度の検討により、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と比較して良好な耐糖能及びインスリン感受性を示すこと、そして脂肪組織におけるマクロファージ浸潤の低下が認められた。本年度の検討により A-AhR KO マウス脂肪組織では、NF- κ B の量あるいは活性に変化が見られないものの炎症性サイトカイン量の減少と抗炎症性サイトカインの増加が見られた。これらの結果より、AhR は、炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの発現を NF- κ B を介さずに直接的に制御することで炎症を惹起し、その結果、インスリン抵抗性を誘発する可能性が示唆された。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 和田 平、斎藤 賢宏、榛葉 繁紀「肝臓AhRによるコレステロール排泄制御機構」日本薬学会第139年会 2019/03/23

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	非コードRNAを分子基盤とした包括的がん治療戦略の開発 －がんと共生に向けた治療シーケンス探索－		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①がん ②非コードRNA ③治療シーケンス ④がん性疼痛 ⑤分子標的薬 ⑥免疫チェックポイント阻害薬 ⑦ウイルスベクター ⑧薬剤耐性		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 秀 典	大学院医学研究科	大学院教授	がん医療における疼痛緩和におけるncRNAの役割と治療戦略の開発

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
清 家 正 博	大学院医学研究科	大学院教授代行	薬剤選択・薬剤耐性化における機能性ncRNAの役割解明
瀧 澤 俊 広	大学院医学研究科	大学院教授	がん浸潤・転移制御lncRNAの同定と機能解析
岡 田 尚 巳	大学院医学研究科	令和元年 6月30日退職	ベクター構築と機能検証
岩 井 佳 子	大学院医学研究科	大学院教授	免疫チェックポイント阻害薬感受性決定因子の探索

非コード RNA を分子基盤とした包括的がん治療戦略の開発 —がんとの共生に向けた治療シーケンス探索—

1. 研究の目的

がんによる死亡は依然死因のトップであり、その克服は医療上の最大の課題である。近年、がん薬物治療に劇的なパラダイムシフトが起きている。様々な分子標的治療薬が開発され、さらにニボルマブ（抗 PD-1 抗体）に代表される免疫チェックポイント阻害薬が加わった。これらは従来の薬物で有効性が得られなかった一群の患者に著明な効果をもたらしている。しかしながら、こうした新規治療薬の使用選択に関する生物学的基盤あるいは特異的な副作用発症機構とその予防については十分な知見が得られていない。また、がん医療の向上に伴いがん共生する期間が長くなり、薬剤耐性化に伴う再発・進行の解明と克服、がん疼痛の緩和対策も問題となっている。すなわち、新規薬物を含む新たな治療シーケンスの確立においては、患者の状態の向上・維持に力点を置いた包括的ながん基盤研究が喫緊の課題である。一方、従来はジャンクとみなされていたタンパク質をコードしていない非コード RNA (ncRNA)、特に短鎖 ncRNA である microRNA (miRNA) と長鎖 ncRNA (lncRNA) の重要性が明らかにされつつあり、革新的な医療への応用が期待されている。

このような背景に基づいて、本研究ではがんの浸潤や転移、薬剤耐性、薬剤障害に共通する機能、すなわちがん細胞の形質変化に関与する ncRNA の細胞生物学的機能を包括的に検討することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) がん浸潤・転移を制御している機能性 ncRNA の解明

本学で保有するがん症例における再発時再生検体バンク (Re-biopsy Bank) を活用し、肝胆道系・泌尿器系がんを中心に RNA シーケンス解析 (RNA-Seq) を行う。同定した lncRNA について、がん細胞株を用いて CRISPR-Cas9 法で lncRNA を発現抑制および過剰発現させ、細胞浸潤アッセイを行い、がん浸潤を促進・抑制する lncRNA の同定および下流がん浸潤シグナル経路の変動を検証する。

(2) 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性 ncRNA の解明

これまでに樹立した分子標的薬耐性肺癌細胞株とこれらの親株を用いて、分子標的薬耐性関連 lncRNA 候補を網羅的に同定する。

(3) 免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) 感受性決定因子の探索

PD-1 結合能を有する可溶性 PD-L1 (bsPD-L1) を検出する新規 ELISA システムを開発し、肺癌患者検体を中心に bsPD-L1 を測定し、予後や ICI に対する治療効果および副作用との関連について検討を行う。

(4) がんに関連する神経障害性疼痛の解明

抗がん薬誘発性の神経障害性疼痛モデル動物を用いて、疼痛の発症および維持に関わる一次感覚神経中の lncRNA を RNA-seq により網羅的にスクリーニングし、疼痛との関連を調べる。

(5) lncRNA の機能解析・治療応用に向けたベクター開発

lncRNA は通常行われる遺伝子導入による強制発現では厳密な全長塩基配列の発現誘導は困難であり、RNA 干渉による発現抑制もしばしば有効でないため、lncRNA 機能スクリーニングに適した CRISPR 搭載ベクターシステムの開発・作製を行う。

3. 研究の成果

(1) がん浸潤・転移を制御している機能性 ncRNA の解明

① 消化器外科学分野と連携し、胆嚢癌症例の RNA-Seq データをバイオインフォマティクス解析し、癌部で有意に変動した ncRNA (miR-192、MEG3 など) を見出した (論文投稿準備中)。

② 男性生殖器・泌尿器科学分野と連携し、転移性前立腺癌に関与する ncRNA の同定と機能解析を行い、骨転移特異的に過剰発現している lncRNA として、HOX クラスターから発現する HOX-AS lncRNA を見出した。HOX-AS の前立腺癌浸潤促進作用を明らかにし、HOX-AS に

よって直接制御される遺伝子、およびその上流で働いている、前立腺癌で発現が高い転写因子を同定した（論文投稿準備中）。

(2) 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性 ncRNA の解明

EGFR阻害剤、ALK阻害剤、MET 阻害剤に対する分子標的薬耐性肺癌細胞株を用いて、薬剤耐性に関与するncRNA (miR-200 family) を明らかにするとともに(Nakamichi S et al. Oncotarget, 2018; Takahashi A et al. Sci Rep, 2018)、網羅的lncRNAプロファイリングによって、分子標的薬耐性に共通に関与するlncRNAとしてCRNDEとDGCR5を同定した。さらに、バイオインフォマティクス解析によって、CRNDEパートナー蛋白質としてIRX5を同定した。IRX5は耐性細胞株において有意に発現が上昇していた。耐性細胞株においてCRNDEを抑制するとIRX5発現が低下し、IRX5の抑制によってアポトーシスが誘導された。すなわち、CRNDE-IRX5経路は、耐性克服に向けた新規治療標的となることを明らかにした。

(3) ICI 感受性決定因子の探索

血中に存在する可溶性PD-L1 (soluble PD-L1: sPD-L1) に着目して、PD-1受容体に対する結合能をもったbsPD-L1を検出する新規ELISAシステムを開発した。この新型ELISAを用いて、非小細胞肺癌患者血漿75検体についてbsPD-L1を測定したところ、新型ELISAは従来型ELISAに比べて検出頻度およびシグナル強度が著しく増強し、非小細胞肺癌患者29検体(38.6%)でbsPD-L1が検出された。現在、ICIを投与した肺癌患者血液検体を用いて、治療効果予測におけるbsPD-L1の有用性について検討中であり、有望な結果が得られつつある。

(4) がんに関連する神経障害性疼痛の解明

末梢神経障害を誘発する抗がん薬による神経障害性疼痛モデル動物を用いて、後根神経節における遺伝子発現変化をRNA-seqにより網羅的に捉え、疼痛発症への寄与が考えられるmRNAおよびlncRNAを同定した。さらにバイオインフォマティクスを用いて、これらの遺伝子変化の誘導に関わるシグナル経路を推測し、疼痛治療の標的となりうることを見出した。

(5) lncRNA の機能解析・治療応用に向けたベクター開発

In vivoで使用可能なlncRNA解析用CRISPR搭載ベクターの開発に向けて、無毒化したヘルペスウイルス (HSV) にCRISPR interference (CRISPRi) システムを組み込んだ新規ベクターを開発した。同ベクターの機能性評価を進めるとともに、増幅・精製系を構築し、各研究室に供給する準備を整えた。また、アデノ随伴ウイルス (AAV) のキャプシドに機能性核酸を効率的にパッケージングする技術を考案し(特願2017-014461号)、現在、本システムを用いてがん細胞に機能性核酸を導入する条件検討を進めている。

4. 研究の反省・考察

(1) がん浸潤・転移を制御している機能性 ncRNA の解明

前立腺癌の骨転移を制御しているncRNA (HOX-AS lncRNA) を見出すことができたが、個体レベルにおける機能解析およびncRNAを介した癌転移治療薬開発の基盤解析が課題として残された。

(2) 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性 ncRNA の解明

今後、Re-biopsy Bankで収集した分子標的薬治療歴のある再生検検体を用いてCRNDEとIRX5の発現を検証する。さらに、CRNDEとIRX5に対する阻害剤をスクリーニングし、in vivoで耐性克服法を検討し、新規治療法開発に繋げていく予定である。一方、ROS-1阻害剤、RET阻害剤に対する肺癌細胞株の樹立には現時点では至っておらず、耐性株樹立に向けて研究を継続中である。

(3) ICI 感受性決定因子の探索

開発したbsPD-L1測定キットについては、2件の特許申請を行った。診断薬の実用化を目指して知的財産権獲得を優先したため、研究成果の公表に制限があり、下記の発表にとどまった。現在、治療効果予測におけるbsPD-L1の有用性について患者血液検体で検討している。

(4) がんに関連する神経障害性疼痛の解明

抗がん薬誘発性神経障害性疼痛の発症に関わるシグナル経路を同定し、治療標的となりうることを見出した。しかしながら、疼痛発症における本シグナル経路の役割は未だ不明であり、今後解明していく必要がある。

(5) lncRNA の機能解析・治療応用に向けたベクター開発

CRISPRiシステムのin vivo遺伝子導入系として無毒化HSVを用いた系を確立した。しかし

無毒化のための遺伝子改変により、生産性が低下しているため、本ベクターの安定的な供給には、効率的かつ大量に生産する技術の開発が今後必要である。AAVに関しては、機能性核酸を封入したAAVキャプシドは組織指向性のある新規の医療用担体として期待されるため、実用化に向けて生体内挙動を検討していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Nakamichi S, Seike M, Miyanaga A, Chiba M, Zou F, Takahashi A, Ishikawa A, Kunugi S, Noro R, Kubota K, Gemma A. Overcoming drug-tolerant cancer cell subpopulations showing AXL activation and epithelial-mesenchymal transition is critical in conquering ALK-positive lung cancer. *Oncotarget*. 2018;9:27242-27255.
- ② Takahashi A, Seike M, Chiba M, Takahashi S, Nakamichi S, Matsumoto M, Takeuchi S, Minegishi Y, Noro R, Kunugi S, Kubota K, Gemma A. Ankyrin repeat domain 1 overexpression is associated with common resistance to afatinib and osimertinib in EGFR-mutant lung cancer. *Sci Rep*. 2018;8:14896.
- ③ Takeuchi M, Doi T, Obayashi K, Hirai A, Yoneda K, Tanaka F, Iwai Y. Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Immunol Lett*. 2018;196:155-160.
- ④ Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, and Okada T. Highly efficient ultracentrifugation-free chromatographic purification of recombinant AAV serotype 9 (rAAV9). *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;11:180-190.
- ⑤ Nito C, Sowa K, Nakajima M, Nakamoto Y, Suda S, Nishiyama Y, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Ueda M, Okada T, Kimura K. Transplantation of human dental pulp stem cells ameliorates brain damage following acute cerebral ischemia. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:1005-1014.
- ⑥ Ikeue R, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Watanabe A, Muramatsu T, Sato T, Okada T. Bone-targeted alkaline phosphatase treatment of mandibular bone and teeth in lethal hypophosphatasia via an scAAV8 vector. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018; 10:361-370.
- ⑦ Sowa K, Nito C, Nakajima M, Suda S, Nishiyama Y, Sakamoto Y, Nitahara-Kasahara Y, Nakamura-Takahashi A, Ueda M, Kimura K, Okada T. Impact of dental pulp stem cells overexpressing hepatocyte growth factor after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;10:281-290.
- ⑧ Nakajima M, Suda S, Sowa K, Sakamoto Y, Nito C, Nishiyama Y, Aoki J, Ueda M, Yokobori S, Yamada M, Yokota H, Okada T, Kimura K. AMPA receptor antagonist perampanel ameliorates post-stroke functional and cognitive impairments. *Neuroscience*. 2018; 386:256-264.
- ⑨ Zhang B, Nakata M, Lu M, Nakae J, Okada T, Ogawa W, Yada T. Protective role of AgRP neuron's PDK1 against salt-induced hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 500:910-916.
- ⑩ Yoshizawa T, Mizumoto S, Takahashi Y, Shimada S, Sugahara K, Nakayama J, Takeda S, Nomura Y, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Matsumoto K, Yamada S, Kosho T. Vascular abnormalities in the placenta of *Chst14*^{-/-} fetuses: implications in the pathophysiology of perinatal lethality of the murine model and vascular lesions in human *CHST14/D4ST1* deficiency. *Glycobiology*. 2018;28:80-89.
- ⑪ Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, Goswami C, Aoki R, Arai T, Kumari P, Hayakawa M, Masuda C, Okada T, Hara H, Drucker DJ, Yamada Y, Tokuda M, Yada T. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun*. 2018;9:113.
- ⑫ 坂井 敦、鈴木 秀典. microRNAクラスターmiR-17-92による神経障害性疼痛の制御. *生化学*. 2018;90:524-528.

- ⑬Iwasaki H, Sakai A, Maruyama M, Ito T, Sakamoto A, Suzuki H. Increased H19 long non-coding RNA expression in Schwann cells in the peripheral neuropathic pain. J Nippon Med Sch, in press.
- (2) 口頭発表
- ①高橋宏典、小古山学、石田洋一、大口昭英、瀧澤俊広、松原茂樹：WNT10BによるCD44を介した絨毛外栄養膜の浸潤促進、第70回日本産科婦人科学会学術講演会、2018年5月
- ②坂井敦、丸山基世、岡田尚巳、鈴木秀典：神経障害性疼痛モデルラットの一次感覚神経におけるNeat1長鎖非コードRNAの解析、第40回日本疼痛学会、2018年6月
- ③岡田尚巳：AAVベクターを用いた遺伝子治療、第34回日本DDS学会学術集会シンポジウム『遺伝子細胞治療に用いる DDS』、2018年6月
- ④Motoyo Maruyama, Atsushi Sakai, Takashi Okada, Hidenori Suzuki：Involvement of the long non-coding RNA Neat1 in the neuropathic pain and neurite outgrowth following nerve injury、18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto)、July 2018
- ⑤Atsushi Sakai, Fumihito Saitow, Motoyo Maruyama, Noriko Miyake, Koichi Miyake, Takashi Okada, Hidenori Suzuki：Role of miR-17-92 in the functional changes of primary sensory neurons following nerve injury、18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto)、July 2018
- ⑥丸山基世、坂井敦、福永津嵩、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典：神経障害性疼痛及び軸索再生に対するNeat1の関与、第20回日本RNA学会年会、2018年7月
- ⑦吉川明子、清家正博、高橋聡、中道真仁、菅野哲平、武内進、峯岸裕司、野呂林太郎、久保田馨、弦間昭彦：EGFR遺伝子変異を有する肺癌においてアファチニブ・オシメルチブの薬剤耐性とANKRD1過剰発現の関係、第16回日本臨床腫瘍学会学術集会、2018年7月
- ⑧Aya Misawa, Toshihiro Takizawa：Identification and functional analysis of lncRNAs in prostate cancer bone metastasis、第77回日本癌学会学術総会、2018年9月
- ⑨岡田尚巳：AAVベクターを用いた遺伝子治療とゲノム医療、第50回日本臨床分子形態学会総会シンポジウム『ゲノムで見える病態』、2018年9月
- ⑩宮川世志幸、丸山基世、黒田誠治、坂井敦、佐藤優里子、喜納裕美、山本基子、Justus B. Cohen、Joseph C. Glorioso、岡田尚巳：生体内における新規無毒化ヘルペスウイルスベクターの遺伝子発現特性・動態解析、第41回日本分子生物学会年会、2018年11月
- ⑪高橋宏典、小古山学、永山志穂、大口昭英、瀧澤俊広、松原茂樹：WNT10Bによる絨毛外栄養膜の浸潤促進、第33回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2018年11月
- ⑫坂井敦、丸山基世、福永津嵩、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典：神経障害性疼痛における長鎖非コードRNA Neat1の作動機構の探索、生理学研究所 研究会「生体サバイバル戦略としての痛みの機構と意義」、2018年12月
- ⑬Nakamichi S, Seike M, Miyanaga A, Takahashi A, Noro R, Kubota K, Gemma A. Overcoming drug-tolerant cancer cell subpopulations showing AXL activation and epithelial-mesenchymal transition is critical in conquering ALK-positive lung cancer. 2019 AACR Annual Meeting, March 2019
- ⑭三沢彩、近藤幸尋、武井寛幸、瀧澤俊広：癌の骨転移に関与する lncRNA の分子解剖学的解析、第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019年3月
- (3) 出版物
- ①瀧澤俊広：12章 受精、妊娠、出産におけるエクソソーム（医療を変えるエクソソーム [落谷孝広、吉岡祐亮（監修）]）、化学同人、2018;92-98.

学 校 名	日 本 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	垂直性歯根破折接着線相当部のMTA充填による歯周組織再生		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 垂直性歯根破折 ②MTA ③意図的再植術 ④根管内接着法			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 島 佳 代 子	新 潟 生 命 歯 学 部	准 教 授	研究計画の立案・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
新 井 恭 子	新 潟 生 命 歯 学 部	講 師	実験・データ管理
湊 華 絵	新 潟 生 命 歯 学 部	助 教	実験・データ管理
山 田 理 絵	新 潟 生 命 歯 学 部	非常勤歯科医師	実験・データ管理
五 十 嵐 勝	生 命 歯 学 部	教 授	実験の遂行と指導・統括

垂直性歯根破折接着線相当部の MTA 充填による歯周組織再生

1. 研究の目的

- (1) 従来、垂直性歯根破折歯は保存不可能のため抜歯が適応とされてきた。しかし修復材料の接着性向上により、破折部に接着性材料を応用することにより、歯の保存を図る試みが成されるようになってきた。
- (2) しかし、破折部の感染原の残存等により、一時的な保存は可能であっても長期経過例では深い歯周ポケットが改善せず、十分期待できざる結果が得られていないのが現状である。
- (3) 本研究は、垂直性歯根破折歯に対して、根管内接着法と意図的再植術を応用した歯根表面の破折線部への MTA 充填を併用することにより、歯周組織を再生させ、歯を長期間保存するための新しい術式を確立することを目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 被検歯周囲の歯周ポケットを歯周ポケット測定器 (PAM) で測定し、PC データ上に記録する。
- (2) 垂直性歯根破折歯の作成
 - ①ラット上顎右側第一臼歯を注意深く脱臼し、歯槽窩から抜去する。
 - ②保存液で歯根膜を保護しながら近心根のみメスで分離する。
- (3) 被検歯の接着実験
 - ①近心根管を髓室開拡後、Ni-Ti ロータリーファイルで機械的拡大を行う。
 - ②メスで近遠心方向に破折させ、破折部が復位することを確認する。
 - ③歯根破断面の象牙質を歯根表面まで大きく切削する。
 - ④破折片を復位し、根管内に補強線を入れ、接着性レジンで充填する。
 - ⑤歯根表面の破折線に沿ってレジン面の深さまでライン状に窩洞形成し、窩洞内を根管内バキュームで吸引、乾燥する。
 - ⑥乾燥したライン状の窩洞を MTA で充填する。
 - ⑦被験歯根を抜歯窩に再植する。
 - ⑧経時的に歯周ポケット測定器 (PAM) で歯周ポケットを測定し、PC データ上に記録す
- (4) 試料作製
 - ①術後 1 週、1 か月、3 か月で sacrifice し、固定、脱灰後パラフィン包埋、薄切切片を作成する。
- (5) 結果の判定
 - ①HE 染色、AZAN 染色、鍍銀染色等を行い光学顕微鏡下で組織変化を観察する。
 - ②データをまとめ、考察する。

3. 研究の成果

- (1) 本実験の被検歯はラットの上顎大臼歯であったが、極小であり、実験開始前及び実験にあたっていくつかの難題をクリアする必要があった。
 - ①ラットの歯の中では最も大きい上顎第一大臼歯を用いたが、肉眼では施術が困難であった。本大学生物科学施設に設置されているマイクロスコープを導入することで良好な視野を確保することができ極めて有効であった。
 - ②歯周ポケット測定器 (PMA) はヒト対照用のチップであるため、チップ先端をラットに適合するよう加工し、微細な歯の歯周ポケット測定が可能となるよう調整した。なお、実験に先立って、被検体以外のラットを用いて歯周ポケット測定を繰り返し行い、値が正確であることを確認した。
 - ③ラット第一大臼歯は 5 根性であり、1 根が細いこともあり、抜歯操作が極めて困難であった。歯を抜歯窩から脱臼するために、マイクロエクスカーターを使用するなど、ヒトや大型動物で使用できる器具が使用できないことも多く、代用品の使用や加工、調整が必要なことも多く、実験に困難を伴った。

- ④使用する器材も極小ポイントやバー類を必要とし、破折線作成も薄刃のメスを使用するなど細心の注意を払う必要があった。
 - ⑤破折線接着のための乾燥に使用した根管内バキュームは歯根表面の細胞を湿潤状態に維持したまま、ライン状の窩洞内のみを乾燥するために極めて効果的であった。
 - ⑥根管内の接着性レジンによる破断面の接着は良好に行うことができた。
 - ⑦MTAの混和操作は概ね良好にできたが、歯根表面のライン状窩洞への充填は極めて微細な操作を必要とし、MTAの物性から予想されたことではあったが、困難であった。
 - ⑧抜歯窩への再植後、被検歯を十分コントロールすることができず、途中脱落したものがあつた。
 - ⑨実験後の歯周ポケット測定自体には問題はなかったが、測定の度ごとにラットに全身麻酔を施す必要があり、時間を要した。
- (2) データのまとめ
- ①以上のように、実験自体に時間と労力を必要とし、当初の計画通りに実験を遂行することが困難であった。予定していた術後経過時間による匹数の確保ができなかった。
 - ②現在、顎骨を固定、脱灰後、脱水、パラフィン包埋、薄切切片作成の手順をすすめ、各種染色を行っている。
 - ③データをまとめ考察するにあたって統計分析する必要があり、現在に匹数確保のための追加実験を行っている。

4. 研究の反省・考察

- (1) 近年の寿命の延長とともに歯の寿命も延長し、自分の歯を長く保ちたいという希望が強くなっているが、臨床においては、垂直性歯根破折の多発が問題となっている。これまでは、抜歯の対照となってきた垂直性歯根破折も、接着法を応用した歯の保存が可能となってきたはいるが、歯根表面の破折面に感染源が残存することにより、しばしば深い歯周ポケットが完治しないという問題が残っている。
- (2) MTAは、工業用セメント同様の硬度を有する水硬性セメントで、生体親和性があり、硬組織形成能に優れ、欧米諸国では、直接覆髄、生活断髄、穿孔、根管充填、逆根管充填等に幅広く使用され、有効性が報告されている。
- (3) 本研究代表者は、歯根膜表面から採取した細胞とMTAを供培養し、微細線維様構造がMTAと共存する像を観察している。
- (4) そこで、意図的再植術を併用して、一旦抜歯し、根管内を接着性レジンで接着した後、歯根表面の破折線上の感染源を完全に除去し、破折線上のライン様窩洞をMTAで充填することにより、再植後、深い歯周ポケットの改善が期待できると考え、本実験を開始した。
- (5) 臨床において要求の高い症例に関する実験であるが、現在、ヒトに近いサル等の大型動物を用いた実験には倫理的問題等を含め種々の制約があり、本学施設では実験を行うことができない。成熟サイクルの早い小型動物での実験が主流となっており、等講座でも、近年revascularization等の実験にラットを用いており、ある程度の実験のKnow Howを得ているため、本実験を計画したが、予想以上の問題が多々生じた。
- (6) 人的、環境的、時間的制約等々の問題があるが、臨床での要求が高い分野であるために、実験を継続し、垂直性歯根破折歯に対する成功率の高い確実で安全な治療法の確立を目指したいと考えている。

5. 研究発表

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

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

○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
口 丸 高 弘	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	講 師	研究補助

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

生体非侵襲診断に用いられる撮像デバイスの開発と炎症性疾患・不全疾患への応用を試みる。生体での非侵襲診断、さらに、実時間での光治療を目指し、臨床現場で用いられるような撮像デバイスを開発する。特に、顕微鏡のような基礎ツールに限らず生体に直接関わるツールを目指す。いままで、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が、これらの要素技術を活かして治療法の存在しない末期不全病態にアプローチを行うために、手持ちサイズでこれらをカバーしうる撮像デバイス、また、生体実時間制御に必要な生体安定化装置およびソフトを開発する。

2. 研究の計画

生体撮影を行うために主に CMOS センサーを応用する。顕微鏡に対して高画素 CMOS センサーを用いる、あるいは、手持ちのような小さいデバイスのために小型 CMOS センサーを用いる。センサの実証のために、複数のプロトタイプを作成する。

これらと同時に、生体の実時間制御のために不可欠なリアルタイムでの生体安定化装置を作成する。呼吸や心拍と言った不確定な動きをキャンセルし、同一場所を保証しながら、介入治療・経過観察を可能にするデバイスを目指す。

3. 研究の成果

生体深部で血管や細胞の微細構造をスキャンするためには、二光子顕微鏡は大きなアドバンテージを依然もっており、画像 1 点の情報の質では群を抜くセンシング方法である。解像度や画像取得深度は現存モダリティのなかで優位性をもっているが、高コストになってしまう。では、広スケールに対応するにはどのような方策が考えられるのか。ひとつは、倍率を下げて時間・空間解像度をあげることが考えられる。そこで、赤外領域の長波長を用いたフェムト秒レーザーによる深部励起に加え、新たな収差補正を含み広帯域に対応した広サイズ光路を開発した。高速 (30fps)・高解像度 (300nm)・高画素数 (1000 から 8000 ピクセル) でのマルチカラーイメージングシステムが可能になっている。さらに、可視蛍光、明視野、近・中・遠赤外、微弱発光までをすべてカバーするために、独自設計でのイメージングモジュールを追加しており、ほぼどのような撮影でもひとつの顕微鏡・対物レンズ・ステージで撮像可能にしている。

さらに、生体をありのまま観察するには、三次元の長時間スキャン (XYZT) も必要である。Z スキャンを高速に行うためにステッピングモーターによる粗動では十分な追従がはかれないため、ステージ (マウス) はピエゾ素子による高速微動を組み合わせて制御している。

我々のシステムでは、観察対象のマウスは麻酔管理下におき、専用ホルダで保持する。こういった、周辺モジュールの開発も、イメージングを支える上では重要となり多数の知財をいれている。たとえば、マウス本来の心拍・呼吸は保たれながら、長時間の観察を可能になるが、充足する製品はほとんどない。観察するマウスへの侵襲性を最小限におさえるために、臓器表面を最小限の手術でステージホルダにマウントしており、ソフトマテリアルを複数多用している。

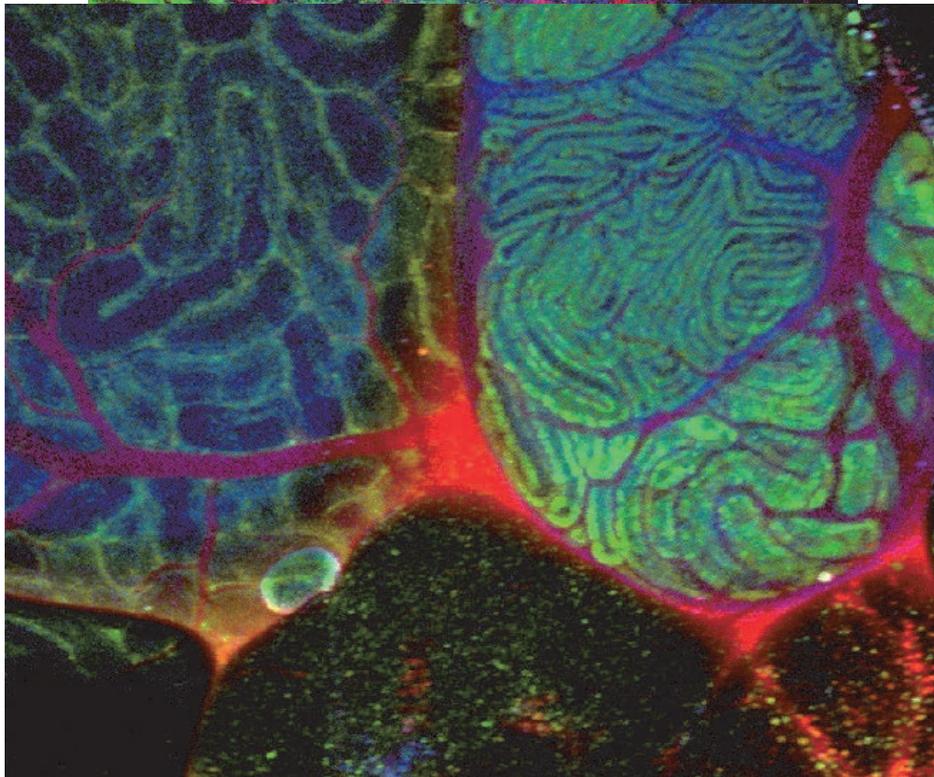
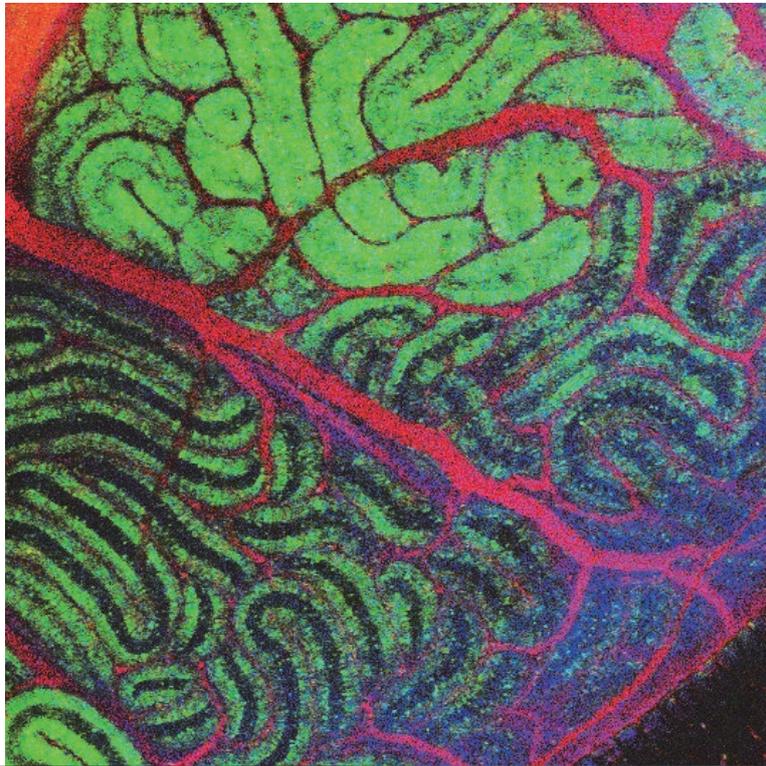


図 広視野・高解像度イメージングにより得られた生体血管画像
赤:デキストラン、緑:CAG-eGFP、青:核染色

では、このように苦労して得た生体イメージングで何がわかるのか、具体的なアプリケーションとして血栓イメージングが挙げられる。心筋梗塞の瞬間に何がおきているのか、といった普遍的な問いに答えるためには、ただ生体を観察するだけでなく、実際に病態の場を生体画像で再現するしか方法がなく、イメージングは有効である。再現性よく生体に血栓止血反応を引き起こす必要があり、新たな介入手法を加えたイメージングが必要となる。血栓形成をよりリアルにとらえるために、そこで、我々は光操作技術を応用し、血栓を体内に誘導しつつ観察するシステムを構築し、ブレイクスルーとしている。光による血栓形成の反応を観察し、血栓

症の基礎メカニズムと背景にある分子機構を明らかにしている。再現性よく血栓をつくり反応を観察し、循環器疾患の新たな研究ツールとしている。

なお、こういった画像に対して、定量解析・画像解析を行うこともある。しかし、生体画像はコントラストの低さなどから解析が難しく、一般の自動化システムでは対処できないことが大半である。それぞれのアプリケーションに応じてコードを書く必要があるのが現状である。

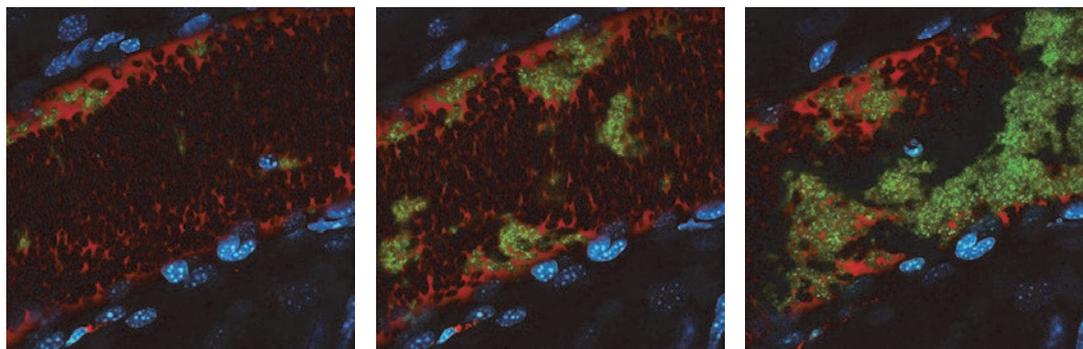


図 どんどん育つ血栓画像 緑が血小板
赤:デキストラン、緑:CAG-eGFP、青:核染色

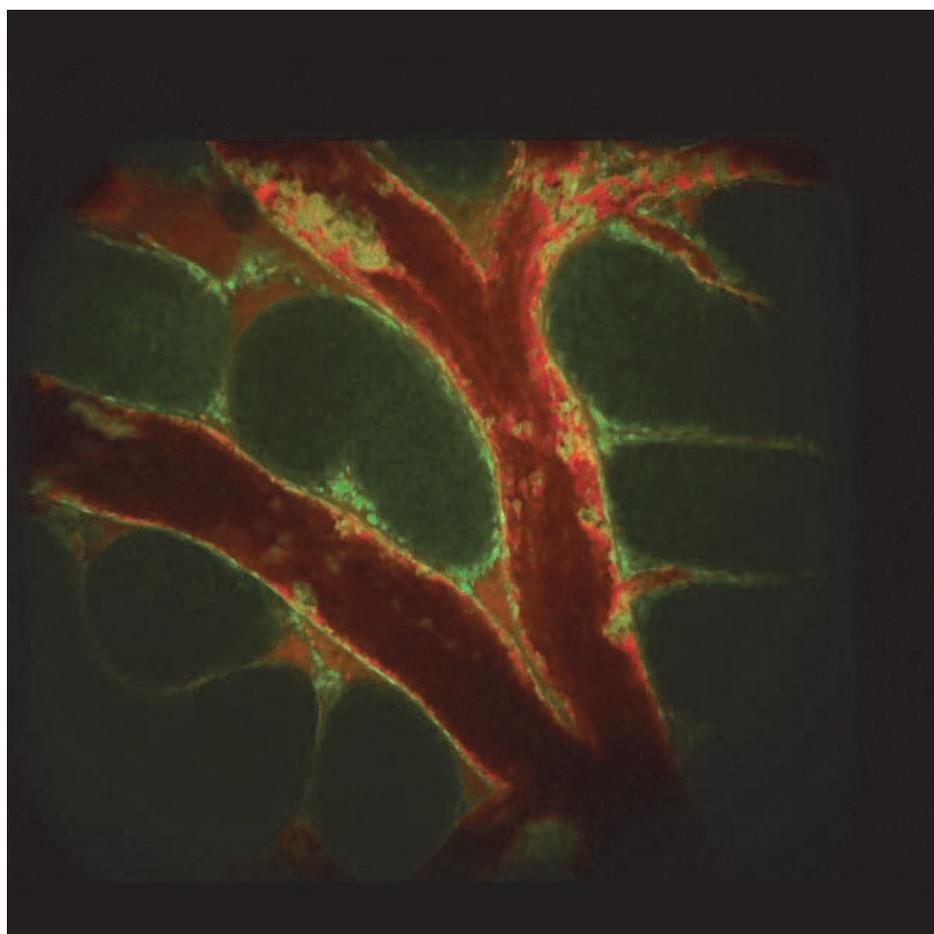


図 視野のひろい8K CMOS 共焦点イメージング
赤:デキストラン、緑:CAG-eGFP、青:核染色

生体イメージングは常に巨大なシステムが必要なわけではない。高コストでハイエンドを追求した基礎実験から離れてもイメージング提案は可能である。実臨床での運用を視野にいと、システムの最小化・軽量化とロバスト性の維持は避けて通れない。そこで今回、あらたにマクロ・ミクロをカバーする最小化システムを開発した。手持ちサイズでの倒立顕微鏡と同等の解像度、と、無限遠・無限ズームを可能にしておき、「どこでも機械をかざせば撮像できる」

ため初学者でも使用可能である。極端な小型化・軽量化を通して、はじめて臨床現場の医師から「使いたい」という声を聞くようになった。潜在的にマクロ・ミクロマルチスケールへの要求は研究だけでなく臨床ニーズからも声は大きく、光イメージングを使うべき潜在的なユーザーは多いと思われる。放射線ツールは被爆問題が避けられないが、光は侵襲性が低いメリットがある。ただし、実際に、手を動かしているユーザーは尖った仕様よりも使いやすさを求めていることが多いことから、光診断を目指したモダリティ提案は小さなシステムからはじめるべきだろう。

4. 研究の反省・考察

既存の生体イメージングでの観察時間・視野範囲への制約をこえて、より広い時間・空間スケールを目指し、新たなイメージングシステム開発を行った。特に、CMOS センサを積極的に用いて、生体親和性・追従性を高めていった。このような広いイメージングでは、急性反応だけでなく、慢性期の個体マクロでの表現形（疾病形成）についても評価可能であり、将来予測と制御を行うことにもつながることが明らかになった。時空間的なミクロでの分子機序の基礎的な解析と、超長時間マクロでの疾病の間にあるギャップをつないでいけば、新たな病態理解だけでなく光診断も可能になるとと思われる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Shigemori T, Kato Y, Ohno M, Sakuma S, Ito K, Kumon H, Hirose H, Okamoto H, Nogawa M, Iwasaki M, Kihara S, Fujio K, Matsumoto T, Higashi N, Hashimoto K, Sawaguchi A, Harimoto KI, Nakagawa M, Yamamoto T, Handa M, Watanabe N, Nishi E, Arai F, Nishimura S, Eto K. Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell*. 2018 July 26;174(3):636-648. e18. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.011. Epub 2018 July 12.

(2) 口頭発表

focus on microscopy (FOM2019) ・ 500nm Resolution, 2K Pixels, 30fps by 300g Hand-Held Nir/vis Imager ・ Working Distance and Magnification Power for Objective Lens Can Be Changed in Conventional Microscope by New Image Formation Theory

(3) 出版物

なし

学 校 名	金 沢 医 科 大 学	研究所名等	総 合 医 学 研 究 所
研 究 課 題	疾患および老化研究に必要な不可欠なストレス可視化マウスの開発 －「見えない」を「見える」にする技術へ挑戦－		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①細胞ストレス ②生体イメージング ③疾患モデル ④老化モデル		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 脇 隆 夫	総 合 医 学 研 究 所	教 授	研究全体の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 井 良 子	総 合 医 学 研 究 所	助 手	マウス飼育・解析
竹 田 直 樹	熊本大学 生命資源研究・ 支 援 セ ン タ ー	助 教	マウス発生工学支援

疾患および老化研究に必要な不可欠なストレス可視化マウスの開発 「見えない」を「見える」にする技術へ挑戦

1. 研究の目的

切ったり、固めたり、すり潰したりせずに生きている状態そのまま生命現象を見る取組みは多くの医学研究者にとって大変重要であることは言うまでもなく、最近では「生体イメージング」とよばれる研究領域が医学・薬学分野において顕著な成果を挙げている。2008年に長崎県出身の下村博士がノーベル賞を授与されているが、GFP（緑色蛍光タンパク質）の発見を通じて生体イメージングへの貢献が評価されてのことだと理解している。GFPはそれ自体が緑色の蛍光を発するタンパク質であるが、現在までに様々な光特性を持つタンパク質が開発されていて、それらを上手く活用すれば疾患に関連する分子の挙動や細胞のストレス状態も把握することができる。また生体イメージングを上手く活用することで種々の疾患の原因究明や治療法開発にも研究を発展させられる。その際に必要不可欠になるのは生体イメージング用のモデルマウスである。本研究では未だ作製されていないモデルマウスの新たな開発に挑戦して、生体イメージング技術を通じて医学研究に貢献することを目的とする。

まず初めに目指すのは、統合ストレス可視化モデルマウスの開発である。私たちのカラダにはアミノ酸飢餓、ウイルス感染、タンパク質の構造異常、および鉄欠乏などといったストレスを特異的に感知して統合的に処理する仕組みが備わっている。その仕組みにおいてATF4遺伝子はユニークな制御を介してストレスに対する生体防御反応を促す役目を担っており、そのATF4の活性化に収束されるストレスは「統合ストレス」とよばれている。近年、この統合ストレスは糖尿病や慢性炎症、記憶障害など様々な疾患の病態を理解する上で注目されるようになっており、極めて重要な開発研究と考えている。

2. 研究の計画

ストレスの有無に対するATF4活性のON/OFFは翻訳領域の切り替えで制御されることが分かっている、その仕組みは以下の通りである。ATF4遺伝子から転写されるmRNAには真の翻訳領域より上流に偽の翻訳領域が存在する。ストレスがない場合、ATF4遺伝子の翻訳は偽の領域で優先して起こる。逆にストレスがある場合、ATF4遺伝子の翻訳は真の領域から切り替わる。つまり、正常な環境下では機能的な真のATF4タンパク質が合成されず、一方ストレス環境下では真のATF4タンパク質が合成される。

このATF4の翻訳切り替えは厳密に制御されていて生体イメージング技術に利用するには恰好の分子メカニズムである。ゆえにATF4遺伝子の真の翻訳領域を光レポーター遺伝子のものに置換することで「統合ストレス」を視覚化できると考えた。特に置換した遺伝子をマウス全身で転写されるようにすれば、カラダのあらゆる部位でストレスを評価できるはずである。

なお、計画時点では光レポーター遺伝子には理化学研究所の宮脇グループが開発したVenusやAzaleaB5などの蛍光レポーター遺伝子あるいはルシフェラーゼなどの市販されている発光レポーター遺伝子を利用予定であるが、状況に応じて最適なものを選択することとしていた。

3. 研究の成果

繰り返しになるが、私たちのカラダを構成する細胞はストレスに曝されると、自身を守るために様々な応答反応を示す。その1つに統合ストレス応答と呼ばれるものが知られている。この応答はストレスによりeIF2 α がリン酸化を受けることから始まる。そのeIF2 α はタンパク質の翻訳を調整する分子であるが、それがリン酸化されるとATF4タンパク質の翻訳は活性化されるようになる。活性化されたATF4は転写因子として機能して、ストレス時における特定遺伝子の転写誘導を担っている。これらeIF2 α およびATF4による機能は、生体の恒常性維持に必要なため、幾つかの疾患にも関連することが報告されている。これらの報告を受けて、これまでに私たちは統合ストレス応答を生体マウスレベルで視覚化できるマウスモデル（UMAIマウス）を開発した。このマウスはeIF2 α のリン酸化に由来するATF4の活性化をルシフェラーゼの発現に変換できる仕組みを備えており、私たちは統合ストレス応答を発光シグナルで捉え

ることができるようになった。ただルシフェラーゼ発光では高価な発光基質を必要とする点が欠点の1つであるため、蛍光タンパク質の発現に変換できる仕組みを備えた改良型 UMAI マウスの開発が求められた。本研究では2種類の赤色蛍光タンパク質 (AzaleaB5 と tdTomato) を採用して、新たな遺伝子コンストラクトを何十種類も構築した。それらの中から最適なものを選択するために培養細胞レベルで性能テストを繰り返し、2種類の遺伝子コンストラクトに辿り着いた。これら2種類の遺伝子コンストラクトを一般的な方法に従ってマウス受精卵に顕微注入してトランスジェニックマウスの作製を行った。2018年12月までにトランスジェニックマウスは全体で25匹誕生している。現在は導入した遺伝子の発現レベルや蛍光シグナルのストレス応答性などの面から誕生したトランスジェニックマウス系統の性能評価を行っており、すでに期待しているレベルのマウスが存在することを確認できている。

なおレポーター遺伝子コンストラクトの作製および培養細胞での性能テストは研究代表者 (金沢医科大学・岩脇) が全てを担当した。トランスジェニックマウスを作製するための発生工学支援については研究分担者 (熊本大学・竹田) より協力を得た。得られたトランスジェニックマウスの繁殖や表現型解析については研究代表者 (金沢医科大学・岩脇) と研究分担者 (金沢医科大学・赤井) が手分けして行った。

4. 研究の反省・考察

懸命にトランスジェニックマウス系統の性能評価にあたったが、2018年度内に終了することができなかった。ただ、これはネガティブな理由によるものではなく、得られたマウス系統が予想より多かったためである。良いモデルマウスを得るためには多くの中から選ぶ方が良いので、時間がかかっても全ての系統を評価して系統確立まで持って行きたい。

先行して開発に成功した発光型の UMAI マウスは高い性能を有しており、既に海外の共同研究者から多くの分与依頼を受けている。そのリクエストの中には蛍光型を望む声もあり、本開発研究が有意義であったと自負している。特に血球系細胞での解析ではフローサイトメーターを使うことがあり、その際には発光型ではなく蛍光型が必要になる。

また研究代表者は以前に小胞体ストレスを可視化するマウスを開発しており、それにも発光型と蛍光型が存在するが、その蛍光型マウスは緑色蛍光レポーターを採用している。今回の統合ストレス可視化マウスでは先述した通り赤色蛍光レポーターを採用しているため、それらマウス交配してダブルトランスジェニックマウス系統を作れば、1匹のマウスで同時に小胞体ストレスと統合ストレスを解析できるようになる。小胞体ストレスと統合ストレスは同じ細胞ストレスの中でも密接な関係にあることが分かっており、それらの生体レベルにおける応答反応を蛍光色で簡単に見分けながら検出できるようになることは実験技術上の大きな進歩であると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭およびポスター発表

1. 赤井良子、岩脇隆夫「ATF4の翻訳活性化機構を利用した統合ストレス可視化モデルマウスの開発」住商ファーマインターナショナル株式会社in vivoイメージングフォーラム2018
2. 赤井良子、岩脇隆夫「ATF4の翻訳活性化機構を利用した統合ストレス可視化モデルマウスの開発と疲労研究への応用」第14回日本疲労学会総会・学術集会
3. 赤井良子、岩脇隆夫「ATF4の翻訳活性化機構を利用した統合ストレス可視化モデルマウスの開発」第65回日本実験動物学会

(3) 出版物

なし

学 校 名	北 陸 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子基盤 －糖尿病黄斑浮腫治療に向けた光刺激の実証－		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①糖尿病 ②糖尿病黄斑浮腫 ③レーザー治療 ④光エネルギー ⑤網膜色素上皮細胞 ⑥細胞応答 ⑦細胞恒常性 ⑧傍細胞輸送		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
周 尾 卓 也	薬 学 部	講 師	全体総括・分子細胞生物学実験・データ解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
亀 井 敬	薬 学 部	准 教 授	生物化学実験
柴 田 宏	医 療 保 健 学 部	教 授	生物医学実験監督評価
佐 藤 妃 映	医 療 保 健 学 部	准 教 授	生物物理学実験
大 越 貴 志 子	聖 路 加 国 際 大 学 ・ 研 究 セ ン タ ー	教 授	レーザー実験監督評価
稲 垣 圭 司	聖 路 加 国 際 病 院 ・ 眼 科	医 幹	電気生理学実験

閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子基盤 —糖尿病黄斑浮腫治療に向けた光刺激の実証—

1. 研究の目的

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

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

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

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

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

2. 研究の計画

有孔膜の表面にコンフルエントな単層として4週間培養した天然のヒト網膜色素上皮細胞に、一様にレーザーを照射して、経時的に実験に供する。レーザー照射部位の物理的な変容は明視野ライブイメージングおよび走査型電子顕微鏡により精査する。

(1) 恒常性を維持する仕組みの解析

Hsp70は、分子シャペロンとしてタンパク質の凝集を、あるいはJNKシグナル経路の賦活化によりアポトーシスをそれぞれに抑制することから、Pifithrin-uでHsp70の働きを阻害した条件で、タンパク質の凝集をProteo Statで検出されるアグリソームとして共焦点顕微鏡で定性、フローサイトメトリーで定量する。またJNK経路(JNK、c-Jun、Bax、cytochrome c)の賦活化は、JNK、c-Junのリン酸化をウエスタンブロットで、Baxの細胞質からミトコンドリア膜への局在を免疫細胞化学で、cytochrome cの含有量を細胞質とミトコンドリア画分のELISAで調べる。これにより、レーザー照射は温熱ストレスを惹起するが、網膜色素上皮細胞はHsp70の発現増強によって細胞の恒常性を維持していることを明らかにする。

(2) 微細構造を改変する仕組みの解析

AMTNの同族であるSPARCは細胞外基質に沈着することで細胞密度を調節し、ZO-1はタイト結合の本体であるClaudinを細胞骨格に繋ぎ止める。したがって、AMTNの発現増強やZO-1の脱局在は共にタイト結合の機能を変調すると考えられることから、バリウム有含・重炭酸不含の培養液やアンモニウムで傍細胞輸送にかかわるイオンチャネルを阻害した条件で、単層細胞を横切るFITC標識デキストランの変化量を蛍光プレートリーダーで、電気抵抗を経上皮電気抵抗計で、電解質(LiCl/NaCl/KCl/RbCl/CsCl)に依存的な膜電位をウッシングチャンバへ接続した電流電圧クランプの回路で調べる。これにより、タイト結合が制御する傍細胞輸送に注目して、浮腫の軽減に直結する電解質や水の流動を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 恒常性を維持する仕組みの解析

閾値下レーザー照射において、温熱ストレスに耐性する網膜色素上皮細胞の恒常性が、転写因子 HSF1 を介在する HSPA1A や HSPA6 の発現と、引き続く Hsp70・DNAJB1・BAG3 複合体の誘導に依拠するオートファジー-リソソーム体系の観点から特定できつつある。

①Hsp70 は細胞の脆弱化を抑制する

Pifithrin-u の選択的な Hsp70 活性阻害によって、細胞傷害性アデニル酸キナーゼの経時的な放出増加を示すことができた。

②Hsp70 は HSF1 の制御下で mRNA 転写される

4 個のファミリーからなる転写因子 HSF のうち、KRIBB11 の選択的な HSF1 活性阻害によって、細胞傷害性の惹起、HSPA1A と HSPA6 の下方制御を示すことができた（レーザー照射後 3 時間で 1.6、0.7、0.5 倍であった）。

③Hsp70 は HSPA1 と HSPA6 からタンパク合成される

13 個のファミリーからなる Hsp70 mRNA のうち、HSPA1A と HSPA6 の上方制御を示すことができた（同様に 4.6、668.2 倍であった）。

④Hsp70 は DNAJB1 や BAG3 と共役する

温熱ストレスを感受して作動する分子群のうち、Hsp70 と連動する DNAJB1 と BAG3 の上方制御を示すことができた（同様に 3.4、3.9 倍であった）。

(2) 微細構造を改変する仕組みの解析

傍細胞輸送を調整する網膜色素上皮細胞の微細構造が、経上皮電気抵抗値の測定から検知できたが、タイト結合の一時的な開口 ZO-1 やアクチンの動態が関連しない分子メカニズムが顕在化しつつある。

①タイト結合は培養 60 日で定常化する

有孔膜で培養した単層の経上皮電気抵抗値は、タイト結合の強度を反映するが、培養初日の 139 Ω から、7 日以降の上行、60 日の 257 Ω に達する安定水準を示すことができた。

②タイト結合は開閉する

閾値下レーザーの照射で一過的な抵抗値の減少を示すことができた（1 時間で最小、3 日で処置前と同等であった）。

③タイト結合は、ZO-1 と連動せずに、開口する

最小の抵抗値においてもなお、タイト結合を細胞質側で裏打ちする ZO-1 や細胞骨格アクチンフィラメントの不変な局在を示すことができた。

4. 研究の反省・考察

(1) タンパク凝集の過程を、オートファジー-リソソーム体系の構成要員となる Hsp70・DNAJB1・BAG3 複合体、CHIP、p62、LC3 として、およびアポトーシスの過程を、Hsp70 が動員されるシグナル伝達カスケード JNK-cJun-BAX 軸として、それぞれの明確化に取り組まなければならない。

網膜色素上皮層は、多能性幹細胞 (iPS) から分化誘導されて、移植に供する再生医療の臨床治験が開始されている。本研究で探究する細胞恒常性の維持は、レーザー治療の学術的基盤となるだけでなく、生体外で細胞を賦活 (耐ストレス) 化する手段の開発に進展できると考えている。

(2) 溶質透過の過程を、分子直径が異なるデキストランの流通、およびタイト結合変調の過程を、細胞内タンパク質の可逆的なリン酸化反応として明確化に取り組まなければならない。

網膜色素上皮層は、関門形成により物質の往来を規定する。本研究で探究するタイト結合の開口は、浮腫軽減の基盤だけでなく、薬物送達的手段に進展できると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

Inagaki Keiji, Takuya Shuo, Ohkoshi Kishiko

Heat shock protein and Metallothionein family genes expression after sublethal

micropulse laser photocoagulation in primary human retinal pigment epithelial cells
LIGHT 2018 4th annual meeting, The International Retinal Laser Society, 2018/10

(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 *臨床ニューロサイエンス* 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。

今後の仮説の検証をするために、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。そのためには基盤となる評価系の確立が欠かせない（特に運動評価系について）ことが分かってきたので、本研究課題では、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、その課題に取り組むこととした。特に運動負荷と代謝マーカーの関係と三次元動画解析による運動機能への影響について中心に調べる。

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定量解析と代謝経路のスクリーニング

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、生化学的に検討する。血中乳酸以外に代謝マップ上で隣接する分子についてのスクリーニングを行う。

(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を用いた代謝系の変化による運動機能の回復を調べるためには、動きの回復度合いを詳細に解析する必要があり、一般的な動物の動作を評価する方法では不十分であることが分かってきた。そこで、動作の三次元動作分析を導入した。本研究課題ではモデル動物の後肢の歩行パターンと各関節の時空間的な変化を三次元動画撮像装置 (Kinematracer, キッセイコムテック社) を用いて定量的に解析する。さらに、糖代謝の異なる運動負荷法が運動機能の回復度合いに対する影響を調べるために、脳梗塞モデル動物に運動処方を課して、その後の経時的な変化を定量的に調べる。

(3) 長期的な神経回路の再構築における新生した神経系細胞の性質の組織学的検討

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。脳梗塞術後に課す運動負荷の違いがどのような影響を及ぼすのかについて、組織化学的に調査する。特に、神経回路網の長期的な変化を視野に調べる。軸索のトレーサー分子を脳内に投与して、新生細胞との関係性について調べる。

(4) 運動処方が促す糖代謝が神経系の再構築や機能回復に及ぼす影響

脳梗塞モデル動物に対する運動処方中に糖代謝阻害剤を投与し、乳酸などの糖代謝産物の濃度を変化させると障害後の運動機能回復や新生神経に対してどのような影響を及ぼすのかについて検討する。浸透圧ポンプを含む Brain infusion kit を用いて糖代謝阻害剤を投与し、運動の効果がどのように変化するかについて検討する。

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定量解析と代謝経路のスクリーニング

血中乳酸濃度を元にして本研究課題で課している強制運動系 (トレッドミル運動) の運動強度を決めた。後述の通り糖代謝経路のスクリーニングまでには至らなかった。

(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

運動皮質は運動指令を発する大脳皮質の一部であるが、歩行のような粗動の運動には脊髄や脳幹レベルでの制御には関与せず、緻密な運動の調節に関わるという考えた方が主流になっている。ところが、我々の作出する運動皮質梗塞モデル動物におけるスクリーニング的な運動評価では少なくとも粗大運動時においても運動障害を起こしている可能性が示唆された。そこで、脳梗塞術前・術後のラットのトレッドミル走行について三次元動画撮像装置を用いて解析したところ、歩行周期に関わる一般的な時間パラメーターは、従来の報告と同様、術前・術後に差が無いことが分かった。しかしながら、各成分分析の結果、膝関節上部位では障害側・健常側両側に、膝関節下部位では障害側に動作異常があることが見いだされた。動作分析の解析が予想以上に時間を要することから、リハビリテーションを課した動物における動作分析の結果を得るまでには至っていないので、今後の課題である。

(3) 長期的な神経回路の再構築における新生した神経系細胞の性質の組織学的検討

脳梗塞術に糖代謝への影響の異なる運動負荷を一定期間課して神経学的にどのような変化が生じるのかを組織学的に検討した。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、定量評価を行った。今年度目指した点は、動物個体数の増加による定量的妥当性の検討とより長期にわたる変化を追うことにある。また、ROI (興味領域) は梗塞巣を覆う広範囲の皮質領域に新たに設定して定量した。結果として、乳酸濃度の大きな上昇を起こさない低負荷トレッドミルを課した動物群において BrdU を取り込み、かつ分化する細胞群が多いことが分かった。ただし、NeuN との共染されるポピュレーションは少なく、単純に神経細胞に分化するのではなく、さらなる検討が必要であった。また、長期間飼育した動物については、現在までのところ運動機能における変化が捉えられていないため、今後の課題とした。

- (4) 運動処方が促す糖代謝が神経系の再構築や機能回復に及ぼす影響
浸透圧ポンプ法により脳内に薬物を投与する系を確立し、脳梗塞術後に乳酸トランスポート阻害剤を投与した動物の動作分析および組織学的な解析を行っている。

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定量解析と代謝経路のスクリーニング
- ① 本研究課題で課した運動負荷法と血中乳酸濃度との関係性について明らかにした。
 - ② 糖代謝スクリーニングや組織学的な解析に関わる試薬を含めた試薬およびサンプルが2018年度10月に浜松市に直撃した台風と1週間にわたる停電のため損失してしまったため、評価用の試薬を再購入せざるを得ず、新規スクリーニングについては断念せざるを得なかった。
- (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
- ① 三次元動作分析を運動皮質梗塞動物の動作分析に適用することで、詳細に運動障害を定量的に評価できるようになった。この手法の有用性について現在論文執筆中である。また、糖代謝の影響を調べるまでに至らなかったのは、評価に関わる時間的な要素を甘く見積もりすぎたことによると反省している。この点をクリアするため我々は新たな課題として同手法を効率的に実施する工夫を試行錯誤している。また同時に、本研究の目的を達するために糖代謝に関わる影響についても引き続き検討している。
- (3) 長期的な神経回路の再構築における新生した神経系細胞の性質の組織学的検討
運動機能の回復に関わる運動処方については、機能回復面、組織学的の両者にて少なくとも乳酸上昇に関わる強度の運動が良いわけではない、という結果を示唆した。臨床的な知見とも差があることもあり、今後は高負荷の運動負荷を課すタイミングなどの要素についてさらに検証する必要があると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Mori T, Agata N, Itoh Y, Inoue-Miyazu M, Mizumura K, Sokabe M, Taguchi T, Kawakami K: Post-Injury Stretch Promotes Recovery in a Rat Model of Muscle Damage Induced by Lengthening Contractions. *J Physiol Sci.* 68(4): 483-492, 2018.
- ② Takagi S, Yamashita T, Miura T, Tanaka H.: Hip fracture risk and effects of exercise therapy in preventing bone deterioration in diabetes mellitus. *Biochem Physiol* 7:231, 2018. doi:10.4172/2168-9652.1000231.
- ③ Tanaka H, Miura T, Yamashita T, Yoneda M, Takagi S.: Characteristics of bone strength and metabolism in type 2 diabetic model Nagoya Shibata Yasuda mice. *Biol Pharm Bull* 41: 1567-1573, 2018.
- ④ Yoshikawa, A., Morishita, S., Hokamura, K., Umemura, K., Izumizaki, M., and Kumada, T. Three-dimensional kinematic evaluation of motor dysfunction in a rat model of photochemically induced focal stroke. Abstract. The 42st Annual Meeting, Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, 11/3-7, 2018.

(2) 口頭発表

なし

(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 A2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A2 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	病 態 生 化 学 分 野	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 原 慶 一	病 態 生 化 学 分 野	講 師	実験実施、データ解析
河 下 映 里	病 態 生 化 学 分 野	助 教	実験実施、データ解析

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る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 の進展要因とな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、本酵素の機能や既知の役割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得るため、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 肝臓を構成する各種細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出

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な IVA-PLA₂ 欠損マウスを作出した。細胞種特異的な IVA-PLA₂ 欠損マウスは、我々が作出した IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスと標的細胞特異的に 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。

② 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 モデルを作製し、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) 肝星細胞における IVA-PLA₂ の役割の解明

NASH における肝線維化を進展させる肝星細胞の活性化および増殖能に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の効果について解析した。

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特定

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討した。肝線維化の程度は、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および免疫組織染色による 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。その結果、全身性欠損マウスと同様の肝線維化進展の抑制が内皮細胞特異的欠損マウスでみられ、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、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。また、全身性欠損マウスおよび内皮細胞特異的欠損マウスの肝臓において、高脂肪食摂取によるCD34 (類洞内皮細胞の毛細血管化マーカー)のmRNA発現誘導が認められなかったことから、内皮細胞のIVA-PLA₂が類洞内皮細胞の毛細血管化を促進することで、肝線維化を進展させる可能性が示唆された。

さらに、ヒトのNASHの発症および病態進展に近いNASHモデルである、高コレステロール含有高脂肪食誘発NASHモデルを作製し、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欠損の肝線維化に対する影響を解析した。全身性欠損マウスおよび内皮細胞特異的欠損マウスの肝臓における α -SMA発現量が有意に減少したことから、高コレステロール含有高脂肪食誘発NASHモデルにおいても、内皮細胞のIVA-PLA₂がNASHの発症および病態進展に関与することが示唆された。

(2) 肝星細胞における IVA-PLA₂ の役割

通常培養条件下では活性化状態であるヒト由来不死化肝星細胞 (TWNT-1 細胞) を用い、 α -SMA 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 α -SMA の発現量が有意に抑制された。また、IVA-PLA₂ 阻害剤存在下では TWNT-1 細胞の増殖も抑制された。細胞増殖の亢進にオートファジーが関与することから、TWNT-1 細胞におけるオートファジー活性に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響を解析したところ、IVA-PLA₂ 阻害剤により有意にオートファジーが抑制された。以上より、IVA-PLA₂ は肝星細胞の活性化および増殖を亢進する役割を担うことが示され、肝星細胞の IVA-PLA₂ 活性の阻害が、NASH の治療戦略となる可能性が示唆された。

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定

CDAHFD誘発性NASHおよび高コレステロール含有高脂肪食誘発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欠損により肝線維化が抑制され、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唆された。また、内皮細胞のIVA-PLA₂が類洞内皮細胞の毛細血管化を促進することで、肝線維化を進展させる可能性が示唆された。しかし、他の肝臓構成細胞である、肝実質細胞あるいは肝星細胞が、IVA-PLA₂が介在するNASHの病態進展の責任細胞種であるかどうかについては未だ不明である。現在、肝実質細胞特異的-および肝星細胞特異的-IVA-PLA₂欠損マウスにおけるNASHの病態について解析中である。

(2) 肝星細胞における IVA-PLA₂ の役割

肝星細胞に関する結果は、そ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 が肝星細胞自身の活性化および増殖促進因子であることが示唆され、肝星細胞の 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考えられた。現在、肝星細胞特異的-IVA-PLA₂ 欠損マウスを用いて NASH 病態の解析を進めており、肝星細胞に発現する IVA-PLA₂ の NASH 発症・病態進展への関与を明確にしていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Madoka Nomoto, Mika Taniguchi, Satoshi Akiba: A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 204.

(2) 口頭発表

① 秋葉 聡

IVA型ホスホリパーゼA₂に着目した肝線維化の進展機構の解明
第54回日本肝臓学会総会，大阪，2018.06.

② 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，2018.03.

③ 加納菜瑠実，河下映里，石原慶一，柏田千紘，泰地健芳，長尾美奈，米岡那夏子，村岡理沙子，親川奈未，秋葉 聡

非アルコール性脂肪肝炎の新規治療標的としての内皮細胞のIVA型ホスホリパーゼA₂の可能性

日本薬学会第139年会，千葉，2019.03.

④ 野本真斗香，河下映里，石原慶一，谷口実花，秋葉 聡

非アルコール性脂肪肝炎マウスモデルにおけるC57BL/6JおよびC57BL/6N亜系統間での表現型の相違

日本薬学会第139年会，千葉，2019.03.

(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	マイクロバイームと宿主反応解析による子宮内感染症の解明 ー絨毛膜羊膜炎リスクの診断検査法の開発ー	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①マイクロバイーム ②絨毛膜羊膜炎 ③早産予防		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 本 新 吾	医 学 部	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	准 教 授	実験・論文作成
清 島 千 尋	医 学 部	助 教	実験・データ整理
漆 山 大 知	医 学 部	助 手	実験・データ整理
平 川 豊 文	医 学 部	助 手	実験・データ整理
吉 川 賢 一	医 学 部	助 教	実験・データ整理
秦 健 一 郎	国立成育医療研究センター 研 究 所	部 長	実験・データ整理

マイクロバイオームと宿主反応解析による子宮内膜感染症の解明 —絨毛膜羊膜炎リスクの診断検査法の開発—

1. 研究の目的

一般に、子宮内感染・絨毛膜羊膜炎は、早産や前期破水を引き起こす感染症であり、様々な新生児疾患との関連も指摘されている。これまでの様々な研究から、子宮内感染は腔内からの上行感染がメインであると考えられているが、一般臨床では出生前に診断が困難であり、その予測はさらに困難である。これまで様々な早産予防研究が行われているが、実際に早産率は低下していないのが現状である。

これまで我々は、絨毛膜羊膜炎 (CAM) による早産予防を目的として、以下のように羊水中細菌組成解析を行ってきた。福岡大学病院及び共同研究施設で患者の同意を得た後に、福岡大学病院で 2009 年 12 月からの 5 年間に、羊水検査と胎盤病理検査を施行した 41 例 (早産 38 例、正常産 3 例) を対象とした。絨毛膜羊膜炎の重症度分類 (Blanc 分類) に基づいて各群に分け、コントロール羊水として妊娠初期に得られた羊水 19 検体、実験ネガティブコントロールとして DNA 抽出時とライブラリー作製時に Blank (精製水) を置いて実験を行なった。後方視的に、子宮内感染が明らかであったことを胎盤への白血球浸潤の深さで表すことができ、胎盤の絨毛側の表層への白血球の浸潤は Blanc I 度、絨毛側二分の一を超えると Blanc II 度、絨毛側から羊膜まで達していると Blanc III 度と診断する。実臨床では、Blanc III 度は、明らかな子宮内感染があったと診断し、Blanc II 度は子宮内感染を強く疑わせることになる。採取した羊水の DNA を抽出したのちに、16S のユニバーサルプライマーを用いて次世代シーケンズを行った。クオリティコントロールを行い、ランダムで 1500 リードした 16S-rRNA 遺伝子を選出した。16S-rRNA 遺伝子を網羅的に解析して、細菌叢構造の違いを距離として計算する解析方法である UniFrac Distance を算出した。UniFrac Distance から、類似している菌、相違の強い菌を主座標分析で視覚化した。また、16S-rRNA 遺伝子の 97% 以上の類似性によりグループ分類をする OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析を行った。

定量性を考慮した Weighted UniFrac Distance に基づいて主座標分析 (PCoA) を行った結果、Blanc III 度の 12 例全例、Blanc II 度の 17 例中の 6 例は、クラスター 1 に属していた。胎盤に重度の炎症を伴う症例の多くは、再現性よく同一クラスター (クラスター 1) を形成した。一方、その他の検体はシーケンズごとにクラスター形成し、コンタミネーションによるアーチファクトが考えられた。OTU 解析では、主座標解析でクラスター 1 を形成した 18 検体 (CA 群全 12 例と C 群の 6/17 例、Sample1-18) は、明らかに他と異なった細菌組成が観察された。Sample1-18 は他と明らかに異なった population が観察された。うち 12 検体では、Tenericutes が Dominant であった (38-100%)。Sample 19-60 と Blank 群は、全サンプルで Proteobacteria が最多であった (50-90%)。Bacteroidetes と Actinobacteria も多くの検体で dominant であった。この同 18 検体を、羊水感染群と診断した。

羊水感染群で特徴的な細菌組成を引き起こしている菌種の同定を行うために、すなわち、OTU の組成菌種の同定を行った。1500 リードで OTU を作製しましたので、羊水感染群で 10% (300 リード) 以上、コントロール群 (Non-C 群、1st. AF 群、Blank 群) で 0.5% (15 リード) 未満の OTU (菌種に相当) の同定を行なった。その結果、9 種類の菌種が羊水感染群の特異的な細菌組成に関与していることが明らかとなった。また羊水感染群を簡便に検出する目的で、16S 全長配列と同属の配列、20-30 配列をダウンロードし、各菌種に特異的なプライマーを作製し、PCR 実験 (*in-silico* & *in-vivo*) で確認した。Universal primer で internal positive control を行い、サンプルの確認を行い、9 種類の菌種の特異的 Primer を設定して、想定されるサイズの増幅産物が確認した。

以上のように、絨毛膜羊膜炎 (CAM) 例の羊水中細菌組成解析を行い、CAM の起炎菌と考えられた 11 菌種を同定し、同解析による CAM の出生前診断法を報告した。しかし羊水穿刺による羊水検査は侵襲の強い検査であり、全ての妊産婦にスクリーニング検査として施行するのは

困難であると考えられる。そこで今回は、より簡便に検査できる腔内細菌叢解析によってCAMのリスク評価を試みた。

2. 研究の計画

2014年5月～2016年4月の2年間に切迫早産の診断で入院し、本研究に同意した未破水の日本人妊婦83例を対象として、入院時の腔分泌物を採取した。分娩時のCAMのBlanc分類に基づいて、CAM群(Stage II度以上)46例とnon-CAM群(Stage I度以下)37例の2群でケースコントロール研究を行った。腔分泌物中のDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV1V2領域をターゲットとして、MiSeqで16S rDNA amplicon sequencingを行い、 α 多様性解析、UniFrac距離を用いた β 多様性解析、細菌組成解析を行った。CAM群に関連の強い菌を絞り込む際にRandom Forestを用い、ROC曲線を用いて診断精度を評価した。P<0.05を統計学的有意差とした。

3. 研究の成果

CAM群の α 多様性指数chao1は、non-CAM群のそれよりも有意に高かった(P<0.001)。主座標分析では、各群がクラスターを形成しなかった。Weighted UniFrac距離のPERMANOVA検定では有意差はなかったが(P=0.116)、Un-weighted UniFrac距離のそれでは有意差があった(P<0.001)。CAM群と関連の強い上位20菌種を絞り込み、それらの組み合わせによるCAM群の予測精度はAUC 0.842(95%信頼区間0.759-0.925)、感度73.9%、特異度78.4%であった。腔内細菌叢解析によって、CAMを予測できる可能性が示された。

4. 研究の反省・考察

今回の研究で、腔内細菌叢解析によって、CAMを予測できる可能性が示されたが、解析に用いた症例数が両群とも40例程度であった。今後はさらに症例数を加えて、より確かなものとしていく必要がある。最終的には早産の予防と治療における「真の」ターゲットを同定し、予防法と治療法の開発を目指す。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 羊水のマイクロバイオームプロファイルによる絨毛膜羊膜炎の診断予測：漆山大知、荒木陵多、清島千尋、倉員正光、讚井絢子、四元房典、村田将春、斎藤 滋、野見山亮、宮本新吾、秦健一郎：日本産科婦人科学会第70回学術講演会、平成30年5月10～13日、仙台
- ② 羊水分析と組織学的絨毛膜羊膜炎との関連についての検討：井槌大介、倉員正光、倉員真理子、平川豊文、深川怜史、漆山大知、清島千尋、荒木陵多、讚井絢子、伊東裕子、村田将春、宮本新吾：第75回九州連合産科婦人科学会、平成30年5月27日、宮崎
- ③ 羊水分析と新生児感染・組織学的絨毛膜羊膜炎・臍帯炎との関連についての検討：井槌大介：第54回日本周産期・新生児医学会、平成30年7月8-10日、東京

(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) 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確立し、解析・報告してきた。PM10 に属する黄砂の影響に関しては、アレルギー誘導の肺における好酸球増加を増悪させること (Allergy Asthma Clin Immunol. 2014)、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 (J Applied Tox. 2018) 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 の活性化を介した重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を証明した (Environ Toxicol. 2015)。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ることなどを報告してきている (Inhal Toxicol. 2015)。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 (Toxicol Res. 2016)。

以上の知見を踏まえて、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ているのでは、という作業仮説・機構を想定するに至った。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考えた。しかしながら現在まで肺での好中球の役割に焦点を当てた研究は皆無であり、粒径及びその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行われていない。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、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ことが目的である。

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

- ①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、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各種KOマウスを用いて解析する。

2. 研究の計画

(1) 細胞 (好中球) の調製 (前年度同様)

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 2ml 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から調製する。

(2) 貪食能の測定

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。

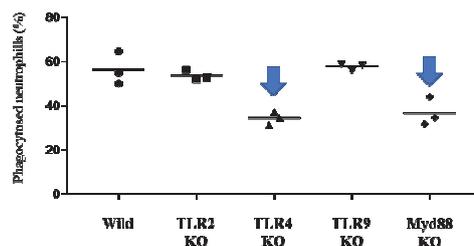
(4) 付着物質の気管内投与

既に LPS の関与を黄砂の影響で証明している (Toxicol Res. 2016) が、加えて、多環芳香族炭化水素 (PAH) が付着物質に多く含まれることがわかっている。PAH としては、DBA (ジベンゾアントラセン) が中国由来の PM2.5 に最も多く含まれているので、前年度までのシステムを用い、これらの単独及び投与 (*in vivo*) で解析する。

3. 研究の成果

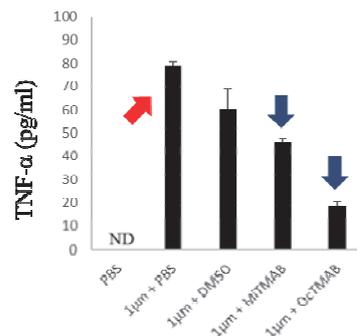
(1) 各種 TLR-KO マウスでの解析

先行研究でパターン認識受容体が一連の炎症反応に重要であることを報告していたので、TLR2、4、9、MyD88のKOマウスから調製した好中球を用いて貪食能を解析した。KOマウスから調整した好中球を用い、特にTLR4-MyD88が粒子の貪食に重要な働きをしていることを突き止めた(右図)。更に、TLR4のリガンドであるLPSや、その刺激により産生されるTNF- α の刺激により、好中球の貪食能が増強することがわかった。この時点で、粒子自身とその付着物との関連が好中球でも示唆された。国際ヨーロッパ免疫学会(アムステルダム、2018年9月=研究発表欄)にて、この内容で発表を行った。



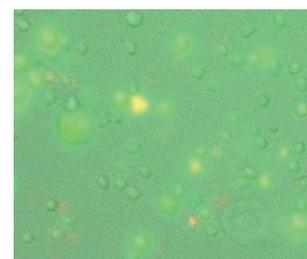
(2) サイトカイン産生

炎症性サイトカインであるTNF- α の産生をELISA法で測定した。貪食により、サイトカイン産生が誘導された(右上向き矢印)。IL-6も同様な傾向を示した(data not shown)。貪食能は、細胞膜近辺に存在するダイナミンの阻害剤で減弱し(data not shown)、サイトカイン産生も阻害された(右下向き矢印)。



(3) 活性酸素種産生

活性酸素種(ROS)の産生を蛍光色素で検出すると、貪食に伴い、ROSを細胞が産生していることが観察された(右図緑色の細胞)。ROS産生を阻害するN-アセチルシステインで処理すると、貪食能は増強した(data not shown)。



(4) DBAの影響

PM2.5に含まれているDBAの生体影響を気管内投与により評価した。非常に低い濃度(0.8 μ M)では、脾臓細胞を活性化させる働きがあった。この詳細な機構を調べ、現在論文準備中である。

4. 研究の反省・考察

PM2.5を中心とした大気汚染による健康影響評価は、法整備を伴う極めて大きな社会的要請を含む、喫緊の課題である。先行研究の多くは疫学を中心としたものが多く、特に粒子状汚染物質の生体への影響を詳細に検討しているプロジェクトは申請者らのグループが中心となって行ってきた。これまでに行ってきた黄砂・PM2.5に対する生体影響の研究は実際に採取された粒子状汚染物質を用いた解析であり、同分野の研究において非常に先駆的なものである。好中球は広く生体内における炎症現場での初動隊として働き、粒子状汚染物質との戦いの末、細胞死に至り次のラウンドで働くマクロファージなどに情報を受け渡す。それ故好中球に対する影響を解析することは、炎症初期の生体イベントを観察することに繋がり、得られる情報は非常に有用なものであるが、好中球に着目した研究は未だ報告されていない。そこで粒子状汚染物質を貪食する細胞の一つである好中球に着目した。この視点が本課題を提唱するきっかけとなったと同時にこのプロジェクトの特徴の一つである。

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い、1 μ mの粒径が好中球の‘好み’であることが分かった。自然免疫に関与する好中球であるが故に、バクテリアサイズを好んで貪食することは非常に興味深い点である。また、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た。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(HO-1やp62)の発現を増強させていた。抗酸化剤の処理により貪食能が亢進したことは、産生されたROSは貪食をストップさせるために、抑制的な役割を果たしていることを示唆するものであり、生体のフィードバック機構を想起させる。

このように好中球に対する影響を解析することで、PM2.5に曝露した際、初期段階で生じる

炎症に対する粒径の違いがどのように寄与するかが明らかになり、粒子に起因する生体が負に傾いている状態にある病気に対する治療・予防法の確立を含め、様々な分野に貢献することが可能となる基礎データであると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① Yasuhiro Yoshida, Tadahiro Miyake, Duo Wang, Mengyue Shen, Kentaro Morita
Endocytosis of particulate matter of neutrophils induced oxidative stress through dynamin. EIC2018, Amsterdam, Netherland, 2018-09
- ② Yasuhiro Yoshida, Cuiying He, Takamichi Ichinose, Kentaro Morita
LPS levels adherent to PM2.5 is an important factor for particulate matter induced-immunosuppressive effects in splenocytes. 第25回日本免疫毒性学会学術年会 (つくば) 2018-09
- ③ 王 鐸, 森田 健太郎, 申 夢月, 金澤 保, 吉田 安宏
LPS can enhance endocytosis of particulate matter in neutrophil. 第36回産業医科大学学会 (北九州) 2018-10
- ④ 吉田安宏
黄砂による免疫亢進が I 型糖尿病に与える影響 The 41st Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Yokohama) 2018-11
- ⑤ Cuiying He, Kentaro Morita, Mengyue Shen, Tamotsu Kanazawa, Yasuhiro Yoshida
Low-dose dibenzo (a,h) anthracene activates T cell in mouse splenocytes. The 41st Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Yokohama) 2018-11
- ⑥ Duo Wang, Kentaro Morita, Mengyue Shen, Tadahiro Miyake, Yasuhiro Yoshida
Inhibition of p38 regulate endocytosis of neutrophil. 第49回日本免疫学会学術集会 (福岡) 2018-12

(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.

学 校 名	福 井 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	雨水活用による地域災害レジリエンスの向上 —技術と普及啓発手法開発からのアプローチ—		研究分野	環境科学
キ ー ワ ー ド	①雨水活用 ②蓄雨 ③水循環健全化 ④水資源確保 ⑤スマートシステム ⑥地域災害レジリエンス ⑦地域活性化 ⑧経済性評価			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
笠 井 利 浩	環 境 情 報 学 部	教 授	統括、調査・総合評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 上 眞 二	環 境 情 報 学 部	教 授	IoT技術
矢 部 希 見 子	環 境 情 報 学 部	教 授	水質評価
田 中 真 由 美	環 境 情 報 学 部	教 授	経済性評価
近 藤 晶	環 境 情 報 学 部	講 師	普及・広報
中 城 智 之	工 学 部	教 授	コーディネータ

雨水活用による地域災害レジリエンスの向上 —技術と普及啓発手法開発からのアプローチ—

1. 研究の目的

雨水活用が地域社会にもたらす、水資源の確保、都市型洪水の緩和、被災時の水資源確保等の効果を高める技術開発と普及施策の検討を行い、地域社会の持続可能性と災害レジリエンスの向上に関する研究を行う。しかしながら、これらの技術は一般社会に普及して初めて効果を発揮するものである。従って、雨水活用の一般社会への普及に必要な経済性評価や雨水活用のブランディング化についても検討する。

2. 研究の計画

(1) スマート雨水活用システムの開発

① 雨水活用システム開発

戸建住宅に設置したスマート雨水活用システムの稼働状況を基に、長崎県五島市赤島でのスマート雨水活用総合給水システムの構築に着手した(図1)。H30年度は、雨水タンク、コンピュータ制御式初期雨水除去装置および各種計測装置の設置を行った。また、雨水活用システムの効率的な運用には、集水面積、雨水タンク容量、水使用量のバランスが重要である。そのため、H29年度から行っている島内居住者の水使用状況調査のデータを含めたシミュレーションを行い、結果をシステム設計に反映させた。

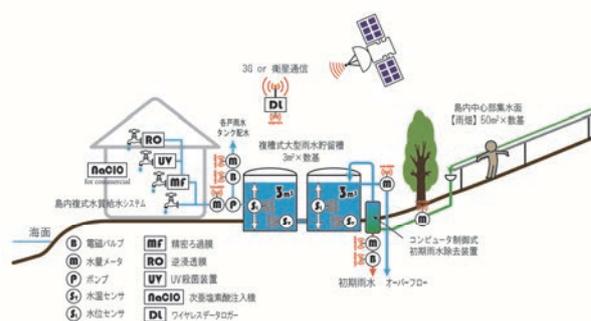


図1 雨水を水源とした小規模集落給水システム

② 貯留雨水の水質評価

福井市内の雨水タンクで進めてきた解析手法の確立およびタンク内の各部位で検出される微生物の同定を行い、各部位における微生物群の違いを明らかにした。また、一般細菌検査による微生物数測定方法の最適化を検討した。さらに、赤島の貯留雨水サンプルについて、同様の微生物解析を試み、福井市内の雨水タンクとの水質を比較して、雨水タンク設置環境の水質への影響について予備的知見を得た。

(2) 雨水活用が社会にもたらす効果と普及策の検討

① 雨水活用の経済的評価

環境保全と経済発展の両立の観点から、雨水活用が社会にもたらす効果を環境と経済を同一基準軸で評価する方法についても検討した。これまでに実施した雨水貯留槽の設置状況調査では、企業が公開している環境報告書から企業への雨水貯留槽設置はまだ普及していないことが分かっているため、テキストマイニングの手法を用いた調査を継続して行い、調査範囲の拡大と分析精度の向上を目指した。

② 雨水活用の普及と地域活性化

国内では例がない雨水を水源とした地域給水システムに基づく地域ブランディング化による雨水活用の普及PRと地域の活性化に取り組んだ。実践の場となる長崎県五島市の赤島では、その準備段階として地元住民との信頼関係の構築や今後実施するコンテンツ制作に必要な画像・動画素材の蓄積を行った。また、持続可能な島の活性化に向けた島内収益に繋がる事業立案を住民と共同して実施した。

③ 雨水活用による災害対策と他との連携

雨水活用システムの治水性能を最大限に高めるには、積極的に降雨予測などの地域環境情報を活かすことが必要である。福井工業大学でH28年度から始まった“ふくいPHOENIXプロジェクト”の成果として得られる衛星からの降雨、大気汚染情報等の活用による効果的なスマート雨水活用システムの制御手法の開発に向けた連携の可能性を検討した。

3. 研究の成果

(1) スマート雨水活用システムの開発

① 雨水活用システム開発

雨水を水源とした小規模集落給水システムの基幹装置の設置を、雨水活用装置の稼働シミュレーション結果にしたがって実施した。また、今後の雨水利用システムの稼働状況モニタリングに利用するIoTデータ収集システムについて検討を行い、収集データの変化に応じてデータ収集間隔やデータキャッシュ量を自律的に調整するデータ収集最適化方式を考案した。さらに、考案した方式を実装したプロトタイプシステムを構築し、その有効性の評価を実施した。また、DRAGINO社のLoRaWANの適用可能性評価を実施した。以上の結果から省電力でデータ収集を行い、各稼働データをまとめてインターネット上にアップロードするシステム構成を確定した。今後は赤島の雨水利用システムに実装し、稼働状況のモニタリングおよび問題点抽出・改善を実施する。

② 貯留雨水の水質評価

集水面～貯水タンク間が完成後に行った貯留雨水の水質検査の結果、概ね想定通りの水質が得られた。一部の細菌類を除いて簡易水道基準に近い水質が得られた。集水面を島の中心に近い山陰に設置する事で強風時の海塩粒子による塩害を大幅に低減できた。これによって、最終的な小型RO浄水システムに対する負荷が減り、長期間良好な水質が得られる可能性が高まった。

(2) 雨水活用が社会にもたらす効果と普及策の検討

① 雨水活用の経済的評価

ESG投資を意識して設計された環境省の「ESG対話プラットフォーム」を分析対象とし、その中で公開されている企業の環境報告書を「水資源問題」をキーワードにテキストマイニングを行った。その結果、企業は「洪水」や「渇水」といった環境問題に対してサプライヤーやサプライチェーンの分散化といったリスク回避的な消極的方策を主に採っていることが判明した。

② 雨水活用の普及と地域活性化

赤島での研究活動をドローンや4Kカメラ、360度カメラなどを用いて映像で記録した。またこれらの素材を使って赤島活性化プロジェクトのPR映像を制作し、YouTube等で配信した。また、活動内容をFacebookを通じてPRし、アクセス解析を行うことでPR活動の有効性を検討した結果、前年度と比較して赤島がある長崎からのアクセスが増加しており、周辺地域での認知度が高まっていることが分かった。

③ 雨水活用による災害対策と他との連携

県内企業も含めて人工衛星を用いたスマート雨水活用総合給水システムの稼働データ送受信の実現性について検討した。その結果、3G回線が通じないような辺境地域での稼働データ収集に超小型人工衛星の適用が有効であることが分かった。

4. 研究の反省・考察

(1) スマート雨水活用システムの開発

雨水を水源とした小規模集落給水システムの開発と、その水を使った実生活を含めた実証実験に取り組んでいるが、現段階は集水面や貯水タンクの設置の他基本的なシステムが完成した段階となっている。今後はIoTを用いた稼働データ収集や気象観測データと連携した集水・排水制御に関する実験を行い、より清浄な貯留雨水水質が得られるようにする。

(2) 雨水活用が社会にもたらす効果と普及策の検討

社会における雨水活用の普及は不十分な状態である。本研究で取り組む雨水を水源とした小規模集落給水システムを中心とした赤島活性化プロジェクトを通じて、社会に雨水活用の普及を継続する。無人島化の危機という離島問題、またそれに伴う国土保全の問題等現在活動を行っている赤島には無視できない多くの大きな問題がある。その解決策の一つとして「雨水生活体験」と題する環境教育プログラムの開発・実践も始まっており様々な取り組みを行う中で有効な施策を模索したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① T. Suganuma, T. Oide, S. Kitagami, K. Sugawara, N. Shiratori: Multiagent-Based Flexible Edge Computing Architecture for IoT, IEEE Network, Vol. 32, pp. 16-23, 2018
- ② S. Kitagami, etc.: Proposal of a Distributed Cooperative IoT System for Flood Disaster Prevention and its Field Trial Evaluation, International Journal of Internet of Things, Vol. 5, No. 1, pp. 9-16, 2018
- ③ 笠井利浩, 近藤晶, 野村利空, 表寺佳奈: 長崎県五島列島赤島における雨水利用状況調査, 福井工業大学研究紀要, No. 48, pp. 91-97, 2018
- ④ 近藤晶, 笠井利浩: 雨水活用による五島列島赤島活性化プロジェクトの広報活動報告, 福井工業大学研究紀要, No. 48, pp. 200-210, 2018
- ⑤ 田中真由美: 水資源問題に特化した企業の環境情報公開に関する一考察, 環境経営学会秋季研究報告大会報告論文集, pp. 41-44, 2018

(2) 口頭発表

- ① 近藤晶, 笠井利浩: 長崎県五島列島赤島における雨水利用を用いた離島振興活動, 日本デザイン学会第65回春期研究発表会講演要旨集, pp. 388-389, 2018/6/23
- ② 笠井利浩, 近藤晶: 離島における雨水生活体験を通じた水環境教育プログラムの実践, 日本環境教育学会第29回大会(東京)研究発表要旨集, p. 126, 2018/8/26
- ③ 笠井利浩, 近藤晶: 雨水活用による五島列島赤島活性化プロジェクト, 2018年次日本島嶼学会東京大会要旨集, pp. 86-87, 2018/9/1
- ④ 笠井利浩: 離島における雨水を水源とした小規模集落給水システムの開発, 2018年度日本建築学会大会(東北)学術講演会研究発表梗概集, pp. 635-636, 2018/9/4
- ⑤ 近藤晶, 笠井利浩: 長崎県五島列島赤島における離島振興に向けた環境教育プログラムの実践, 地域活性学会第10回研究大会, pp. 302-304, 2018/9/16
- ⑥ 近藤晶, 笠井利浩: Noctiltone, 環境芸術学会第19回大会「環境芸術の半世紀」, 2018/10/27
- ⑦ 笠井利浩, 近藤晶: 長崎県五島市赤島における離島振興プロジェクト, 日本雨水資源化システム学会第26回研究発表会講演要旨集, pp. 49-52, 2018/11/4
- ⑧ 表寺佳奈, 笠井利浩: 長崎県五島市赤島における生活用水使用量調査に基づく雨水利用シミュレーション, 日本雨水資源化システム学会第26回研究発表会講演要旨集, pp. 53-56, 2018/11/4
- ⑨ 野村空, 表寺佳奈, 矢部希見子, 笠井利浩: 長崎県五島市赤島における貯留雨水および降雨区分雨水の水質調査, 日本雨水資源化システム学会第26回研究発表会講演要旨集, pp. 57-61, 2018/11/4
- ⑩ 近藤晶, 笠井利浩: 長崎県五島列島赤島活性化プロジェクト広報に関する昨年度との比較, 日本雨水資源化システム学会第26回研究発表会講演要旨集, pp. 62-65, 2018/11/4
- ⑪ 田中真由美: 企業の環境情報公開に関する一考察 -雨水資源を論点として-, 日本雨水資源化システム学会第26回研究発表会講演要旨集, pp. 73-77, 2018/11/4
- ⑫ 田中真由美: 水資源問題に特化した企業の環境情報公開に関する一考察, 環境経営学会秋季研究報告大会, 2018/10/14
- ⑬ 田中真由美: 水資源にみる日本企業のリスク認識の現状と課題, 環境経営学会シンポジウム, 2018/12/8
- ⑭ 飯田晃浩, 笠井利浩, 北上眞二: 雨水利活用のためのIoTデータ収集最適化方式, 平成31年電気学会全国大会講演論文集, pp. 137, 2019/3/12

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO ₂ 固定系解明と増強 —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 (2019年3月31日 付 退 職)	研究分担者:珪藻代謝の工学的改変

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

珪藻は地球年間一次生産の約20%を担う。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着目される。珪藻は、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、ユニークな進化を経ており、多くが未解明である。珪藻が生育する海水は溶存CO₂濃度は低い (< 15 μ M) 一方、高濃度のHCO₃⁻ (2 mM) が存在する。我々の先行研究によって、海洋性珪藻が細胞膜上のHCO₃⁻輸送体によって積極的に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)。この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CO₂-Concentrating Mechanism (CCM) の重要因子である。

本研究では、海洋性珪藻の高いオイル生産性を活用するために、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ことを目的とする。そのために以下の未解明ポイント、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、⑤油脂合成に無機炭素を送り込む仕組み、および⑥光合成産物を油脂合成へ振り向ける仕組み、を明らかにする。

2. 研究の計画

(1)珪藻カルビン回路の律速解除と炭素骨格仕分けの改変：無機炭素取込・カルビン回路律速段階解除および β -グルカン合成酵素1の発現抑制を行い、高油脂生産珪藻を作出する。

①カルビン回路律速因子の解明と解除を行う：陸上植物のカルビン回路律速因子であるとされる、sedoheptulose-1,7-phosphatase (SBPase)およびfructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)の過剰発現を行う。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。これらを過剰発現し、CO₂制限がない状態での最大光合成活性と油脂蓄積量の分析を行う。

②炭酸固定化酵素の人為的活性化を行う：昨年度のサブプロジェクト(4)からの統合。炭酸固定化酵素RubisCO遺伝子である*RbcL*および*RbcS*は葉緑体コードであるため、発現量の人為制御ができない。しかし、RubisCO活性化因子とであることが分かった*CbbX*は2つあり、これらを強発現した変異体珪藻をもちいて最大光合成活性と油脂蓄積分析する。

③細胞の無機炭素輸送を増強する：これまでに知られている細胞膜型Solute Carrier 4 (SLC4)輸送体に加え、葉緑体包膜型SLC4輸送体を増強発現し、CO₂濃度が限られている状況での光合成活性および油脂蓄積状態を分析する。

④多糖合成系を人為的に弱め、炭素骨格の油脂への転換を促進する： β -グルカン合成酵素1の発現抑制を行い、糖合成系への炭素フローを遮断し、油脂合成系に振り向けることが出来るか否かを検証する。

(2)ピレノイド構造に基づいた無機炭素濃縮機構 (CCM) 増強：葉緑体内の炭酸固定場であるピレノイド構成因子を明らかにし、(1)の改変に資する情報を得る。

①ピレノイド構成因子を網羅する：我々はこれまでにピレノイド構成因子として、RubisCO、*CbbX*の他に、 β 型炭酸脱水酵素 (CA)、機能未知ピレノイド構造因子 (PysHells)、チラコイド膜型と考えられる輸送体因子、油脂合成初発酵素 (ACCase)、および我々が初めて発見した新規 θ 型CAなどの存在を確認した。これら以外にも重要な因子をさらに網羅する。

②ピレノイドを構成する脂肪酸代謝初発酵素を増強する：ACCaseを人工的に高発現し、その光合成や脂質蓄積への影響を分析する。

③ピレノイド構造・機能をモデル化し、最適化する：ピレノイド因子の局在と機能の情報をもとにピレノイドにおける、光エネルギーと有機物生産の連携機構についてまとめ、モデル化をすすめ、油脂合成に向けた機能改変の可能性を探る。

- (3)新規 θ 型炭酸脱水酵素 (θ -CA) の機能確認および炭素取込最適化変異体の作出 : (2)のピレノイド構造のなかでも最近発見された θ -CAの役割は大きいと考えられる。本酵素のピレノイド内での機能を解明する。
- ①珪藻葉緑体に存在する θ -CAを網羅し、その機能をj確認する : 発見された θ -CAの機能とこれと相互作用する光化学系タンパク質の探索を行う。
 - ②これら θ -CA等の重要因子改変を上記(1)(2)の改変と戦略的に組み合わせ、CCM増強に基づいたオイル生産性能向上多重変異体珪藻とその設計ルールを確立する : (2) ③のモデル化の進展に伴い考えられ得る油脂生産増強代謝デザインを行う。

3. 研究の成果

(1)珪藻カルビン回路の律速解除と炭素骨格仕分けの改変

- ①カルビン回路律速因子の解明と解除を行う。陸上植物のカルビン回路律速因子であるとされる、sedoheptulose-1,7-phosphatase (SBPase)およびfructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)の過剰発現を行った。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。しかし、細胞質と基質の交換を行いながら還元的ペントースリン酸回路を稼働するシステム等の存在が考えられるため、これらを*Pheodactylum tricornutum*で過剰発現し、CO₂制限がない状態での最大光合成活性を測定した。しかし、際立った表現型は観察されなかった。原因として強力なプロモーターが現在開発されていないことおよび核コード葉緑体因子の機能的な発現量が翻訳後レベルで強く調節を受けていることなどが考えられた。これらの強発現変異体については、ナイルレッドを用いて油脂蓄積量を顕微鏡レベルで定量したが、野生型に比べ若干の高蓄積傾向を示したものの、有意差は得られなかった。
- ②炭酸固定化酵素の人為的活性化を行う : 炭酸固定化酵素RubisCO遺伝子である*RbcL*および*RbcS*は葉緑体コードであるため、発現量の人為的制御ができない。しかし、RubisCO活性化因子であることが分かった*CbbX*は2つあり、一つが葉緑体コード、もう一つが核コードであることが分かった。おそらくこれらコードゲノムを異にする2つの活性化因子により、珪藻ではRubisCO活性化における核と葉緑体間のクロストークを行っていると考えられた。このため、核コード*CbbXn*を強発現した変異体*P. tricornutum*を作製し、その特性を分析したが、現時点で野生型に対し有意な最大光合成活性と油脂蓄積は観察されていない。①と同様の理由と考えられる。
- ③細胞の無機炭素輸送を増強する : *P. tricornutum*で葉緑体包膜に発現するSLC4-6およびSLC4-7輸送体を発見した。これらの因子が低CO₂環境下で極めて高く発現することを確認し、これらの輸送体候補因子を高発現した変異体を作製した。しかしながら、この発現増強による光合成の無機炭素に対する親和性上昇は見いだせなかったため、細胞膜に発現することがすでに分かっているSLC4-2をこれら葉緑体包膜輸送体と共発現させた。その結果、野生型細胞と比較して光合成の無機炭素に対する親和性が3倍程度に上昇した。このことから、SLC4-6とSLC4-7はSLC4-2が細胞質へ輸送したHCO₃⁻を速やかにストロマに送り届ける機能を有することが示された (投稿準備中)。
- ④多糖合成系を人為的に弱め、炭素骨格の油脂への転換を促進する : β グルカン合成酵素1のRNA干渉による発現抑制株の作製を試みた。取得された株における標的酵素の発現抑制効率はすべての取得株で野生株と比較して有意差がなく、油脂蓄積にも影響が観察されていない。発現抑制効率の高い変異体の取得を継続している。一方で、 θ 型CAの機能解析 {サブプロジェクト (3)} 実験の過程で、CRISPR/Cas9 nickase (D10A)による、ゲノム編集法を*P. tricornutum*および*Thalassiosira pseudonana*の両珪藻で初めて確立した。これにより簡便な実験手法で、極めて正確なゲノム編集および編集による遺伝子破壊が可能となった。現在、CRISPR/Cas9 nickase法による β グルカン合成酵素1の遺伝子破壊をすすめている。

(2)ピレノイド構造に基づいた無機炭素濃縮機構 (CCM) 増強

- ①ピレノイド構成因子を網羅する : 我々はこれまでにピレノイド構成因子としてRubisCO、*CbbX*の他に、 β 型炭酸脱水酵素 (CA)、機能未知ピレノイド構成因子 (Pyshells)、チラコイド膜型と考えられる輸送体因子、油脂合成初発酵素(ACCase)、および我々が初めて発見した新規 θ 型CAなどの存在を確認した。同様の光アミノ酸を利用した感光架橋技術と質量分析を利用し、今回新奇の機能未知タンパク質とBestrophin様陰イオン輸送体候補タンパ

ク質、グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびアスコルビン酸パーオキシダーゼを見出した。このうち、Bestrophin様因子 (Best因子) は哺乳類で塩素イオン輸送体とされており、*P. tricornutum* および *T. pseudonana* の両種に2つずつパラログが存在した。分子系統樹を作製したところ、すべての光独立栄養生物に保存されているが機能が確定していない重要因子であることが分かった。我々はこれをチラコイド膜上に存在するHCO₃⁻輸送体ではないかと考えている。チラコイド膜HCO₃⁻輸送体は、あらゆる生物で未同定である。多くの光合成生物でチラコイド内腔にCAが存在していることから、チラコイド内腔の無機炭素平衡は光合成に必須の反応であることが考えられる。CCMを有する生物で、チラコイド内外で無機炭素をやり取りし、RubisCOにCO₂を、ACCCaseにHCO₃⁻を供給するシステムは極めて重要なピレノイドの機能であり、炭水化物と油脂合成への基質供給の最初の分岐点を、極めて近接した場で形成していることが考えられた。現在、このBest因子を上述したCRISPR/Cas9 nickaseによるDNA編集で破壊し、その機能の解明に取り組んでいる。

②ピレノイドを構成する脂肪酸代謝初発酵素を増強する：ACCCaseにGFPを融合し、人工的に高発現した。その結果、GFP蛍光はピレノイドに局在することが分かり、ACCCaseはピレノイド因子であることを決定した。これをACCCase高発現株として、油脂蓄積を顕微鏡レベルで定量したが、野生株との有意差は見られていない。

③ピレノイド構造・機能をモデル化し、最適化する：上の①②で述べたように、ピレノイドにはRubisCOとACCCaseが存在し、それぞれCO₂とHCO₃⁻を基質として炭水化物および油脂を合成している。細胞膜と葉緑体包膜におけるHCO₃⁻輸送体が葉緑体に無機炭素を蓄積し、チラコイド膜に存在するHCO₃⁻輸送体Best因子が内腔へHCO₃⁻を送り込み、内腔のθ-CAがチラコイド内の酸性環境を利用してHCO₃⁻を効果的に脱水し、CO₂を生成して、これをRubisCOに供給すると考えられる。RubisCOは諸々の理由で非効率的な酵素であるため、チラコイドからあふれ出してくるCO₂は少なからず固定されずに漏れ出そうとする。そのため、ピレノイドに存在するCAがストロマの高pHを利用して速やかにCO₂をHCO₃⁻へ水合し、ACCCaseに与えるとともに、漏れ出しを防いでいると考えられる。一方、ピレノイドにはこのような効率的な無機炭素フローを可能にする構造的特徴がある可能性を我々は指摘してきたが、今回①に上述したピレノイド因子、PyshellをGFP標識によって局在確定したところ、ピレノイドの外縁を覆うタンパク質であり、これを精製するとチューブリン様の精緻な管構造を形成する新奇繊維タンパク質である可能性が示されている (投稿準備中)。

(3)新規θ型炭酸脱水酵素 (θ-CA) の機能確認および炭素取込最適化変異体の作出

①珪藻葉緑体に存在するθ-CAを網羅し、その機能を確認する：すでに機能解析まで行っているθ-CA (PtθCA1) の他に、*P. tricornutum* にはPtθCA2~3の3つの因子がある。これらの局在解析を行った結果、それぞれミトコンドリア、葉緑体とミトコンドリアの接する空間、および液胞と葉緑体の接する空間に局在した。これらの機能は現在ゲノム編集による遺伝子破壊で解析中である。一方、*T. pseudonana* には少なくとも4つのθCA遺伝子があり (TpθCA1~4)、配列の特徴からこのすべてが葉緑体に発現することが示唆された。このうち2つ (TpθCA1, 3) についてGFP標識による局在解析を行ったところ、いずれもピレノイドと考えられる区画に局在した。現在これらについてもゲノム編集による遺伝子破壊を行っており、すでに遺伝子破壊株を数株取得した。

②これらθ-CA等の重要因子改変を上記(1)(2)の改変と戦略的に組み合わせ、CCM増強に基づいたオイル生産性能向上多重変異体珪藻とその設計ルールを確立する：(2) ③のモデル化の進展に伴い考えられ得る油脂生産増強代謝デザインを継続的に行っている。現時点で、ピレノイド内で無機炭素を基質としていかに炭水化物と脂質の代謝に仕分けるかについてのモデル化を提唱した。また、光エネルギーの効果的利用の妨げになる強光阻害に対抗する無機化合物のフロー調節もこの中に組み込んだ (国際誌に発表Matsui et al., 2018)。

4. 研究の反省・考察

(1) 珪藻カルビン回路の律速解除と炭素骨格仕分けの改変

①および②ではカルビン回路の最大回転数を上げるための酵素増強発現を試みたが、葉緑体代謝の強いホメオスタシスを正方向にかく乱するレベルの高発現には届いていないと考えられる。一方③では細胞膜と葉緑体包膜のHCO₃⁻輸送体を同時に増強することによって、無機炭素制限下での無機炭素基質インプット強化法に一定の成果が得られた。④多糖合成

系遺伝子発現抑制は、ここまでRNA干渉が唯一の方法で効果が限定的であったが、2018年度末に先端的なゲノム編集に成功した。すなわち、Cas9改変によるnickaseと2つのガイドRNA発現による正確なDNA編集は使用実績が限られているが、我々が珪藻で初めて成功した。これにより、今後所望する遺伝子破壊を進めることが出来る。この手法では、変異体選抜の過程で大量の細胞を破碎する。このために超音波式細胞破碎装置を活用している。

(2) ピレノイド構造に基づいた無機炭素濃縮機構 (CCM) 増強

①Bestrophin様陰イオン輸送体候補タンパク質の発見とチラコイド膜上での局在確認から、理論上のピレノイド内の炭素フロー調節の骨格が見えてきた。しかし、Best因子の機能は未同定であり、今後ゲノム編集技術を駆使して解明する。②および③では、脂質合成初発酵素 ACCaseが新たにピレノイド因子であること、および新奇に我々が発見したピレノイド構造タンパク質Pyshellが極めてユニークな管構造を有する結果を得つつある。これらの機能とその連携を明らかにすることで、(1)③で成果のあったHCO₃⁻インプット強化をさらに助長しながら炭素をACCaseに供給する代謝デザインが可能になると思われる。

(3) 新規θ型炭酸脱水酵素 (θ-CA) の機能確認および炭素取込最適化変異体の作出：

①このタイプのCAが珪藻やその他の藻類に広く存在する重要因子であることが分かり、また前述したゲノム編集技術のブレークスルーによってその機能確認が順調に行われている。一方で反省点として②に提唱する代謝デザインは基礎的な知見が増えるに伴い、その調節や構造との関りの複雑さも露呈し、簡便に油脂蓄積に資するデザインと改変には至っていない。しかし、極めて正確で効率の良い遺伝子破壊が可能になり、これによる機能同定と共に炭素フローの改変が効果的に進むと考えている。

5. 研究発表

(1)学会誌等 (すべて査読付き)

- ①Matsui H, Hopkinson BM, Nakajima K, Matsuda Y (2018年6月) Plasma membrane-type aquaporins from marine diatoms function as CO₂/NH₃ channels and provide photoprotection. *Plant Physiol* **178**(1): 345-357
- ②Broddrick JT, Du N, Smith SR, Tsuji Y, Jallet D, Peers G, Matsuda Y, Dupont CL, Mitchell GB, Palsson BO, Allen AE (2018年12月) Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *New Phytol* **222**(3): 1364-1379, DOI:10.1111/nph.15685
- ③Tsuji Y, Matsuda Y (2019年3月) Uncovering the hidden world of molecular life of diatoms. *Perspectives in Phycology* DOI: 10.1127/pip/2019/0087

(2)口頭発表

- ①Structure and function of new pyrenoidal components in marine diatoms. Matsuda Y, SEB Florence 2018, 2018年7月6日, Firenze Fiera Congress and Exhibition Centre, Firenze, Italy
- ②珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発、大西菜月、中島健介、辻敬典、松田祐介、2018年9月6日、第70回日本生物工学会、関西大学千里山キャンパス
- ③海洋性珪藻ピレノイドにおけるCCMと光化学系機能連携解明、天野凌輔、山岸寛征、菊谷早絵、辻敬典、松田祐介、2018年9月15日、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場
- ④海洋性珪藻リン酸獲得機構、前田香菜子、木村奈々恵、福地庸平、杉山俊樹、中島健介、辻敬典、松田祐介、2018年9月15日、日本植物学会第82回大会、広島国際会議場
- ⑤Molecular aspects of CO₂ concentrating mechanism in marine diatoms. Matsuda Y, Japan-Finland Seminar 2018, 2018年9月25日, 生田神社会館, 神戸 (招待講演)
- ⑥Revealing new structures and functions of the aquatic chloroplast bundling the photosystem and the CO₂-concentrating mechanism. Matsuda Y, Tsuji Y, Kikutani S, Ohkubo R, Morishima N, 2018年11月10日, International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis (ISPCB). 倉敷市民会館, 倉敷 (招待講演)
- ⑦珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発、大西菜月、中島健介、辻敬典、松田祐介、2019年3月24日、日本農芸化学会2019年度大会、東京農業大学、東京
- ⑧海洋性珪藻ピレノイドにおけるCCMと光化学系機能連携の解明、天野凌輔、辻敬典、松田祐介、2019年3月14日、第60回日本植物生理学会年会、名古屋大学、名古屋

(3)出版物

なし

学 校 名	獨 協 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	がんにおける自然免疫型T細胞の機能解明 －新規免疫療法を目指して－		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①iPS細胞 ②MAIT細胞 ③養子移入 ④抗がん活性 ⑤分化誘導 ⑥メラノーマ ⑦肺転移 ⑧生存期間		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
若 尾 宏	医 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
杉 本 智 恵	医 学 部	講 師	実験・論文作成

がんにおける自然免疫型 T 細胞の機能解明 —新規免疫療法を目指して—

1. 研究の目的

- (1) MAIT 細胞は新規の自然免疫型 T 細胞であり、ヒトにおける最大の T 細胞亜集団を形成し、微生物・ウイルス感染、自己免疫疾患、生活習慣病、がん等において重要な機能を有すると考えられる。種々のがんにおいて MAIT 細胞は患者末梢血から消失し、がん浸潤リンパ球 (TIL) 中に多く存在する。しかし、がんにおける MAIT 細胞機能の詳細については未解明である。一方、実験動物モデルとして汎用されるマウスには MAIT 細胞は極微量にしか存在せず、マウスでの解析が困難であった。そこで、本研究ではがんにおける MAIT 細胞機能を解明し、新規の治療法を開発するため、
- ① マウス MAIT 細胞由来 iPS 細胞から分化誘導した MAIT 細胞を利用して「MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウス」を構築する。
 - ② ①を利用してがんにおける MAIT 細胞機能を解明することを目的とした。

2. 研究の計画

- (1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立
- ① マウス MAIT 細胞の iPS 細胞化
移入細胞をレシピエントと区別するためコンジェニックマウス由来 MAIT 細胞から iPS 細胞を樹立する。具体的には Ly5.1 マウスから MAIT 細胞を単離し、センダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞化する。
 - ② iPS 細胞からの m-reMAIT 細胞分化誘導
多能性細胞からの T 細胞系への標準分化誘導法に則り、m-reMAIT 細胞を分化誘導する。
 - ③ m-reMAIT 細胞の性状解析
m-reMAIT 細胞を Ly5.2 マウスに移植し、移植細胞のレシピエントにおける生着臓器、細胞表面マーカー・サイトカイン産生能を明らかにする。
- (2) m-reMAIT 細胞養子移入による MAIT 細胞を豊富に持つ新規モデルマウスを用いた抗がん活性評価
- ① m-reMAIT 細胞養子移入によるメラノーマに対する抗がん活性評価

3. 研究の成果

- (1) Ly5.1 マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) の樹立
- ① マウス MAIT 細胞の iPS 細胞化

2018年の秋時点では本学における Ly5.1 マウスの繁殖の問題から、iPS 細胞化に必要な十分な MAIT 細胞を精製することができなかった。その後、繁殖の問題が解決され、マウスから MAIT 細胞を認識する試薬 (5-OP-RU loaded murine MR1-tetramer) を米国 NIH tetramer core facility (Atlanta 州) より供与を受け、広く T 細胞を認識する anti-マウス TCR β 抗体と組み合わせることで、MAIT 細胞を染色・セルソーティングすることにより 95% 以上の純度で精製することができた。MAIT 細胞 (31,400 個) に山中因子をコードするセンダイウイルスベクターを感染させることで 36 個の iPS 細胞コロニーを得、以下の解析を行った。

iPS 細胞コロニーが MAIT 細胞から由来することの確認

得られたコロニーが MAIT 細胞から由来することを確認するため、PCR を用いて iPS 細胞が遺伝子再構成済み MAIT 細胞特有の T 細胞受容体 (TCR, V α 19-J α 33) を有するか確認した。

その結果、得られた36個のiPS細胞のうち、2個を除いたものがMAIT細胞由来であった。また、MAIT細胞TCRは $\alpha\beta$ 型であり、その β 鎖使用はTCR β 5, 6, 8に偏っていることが知られている。そこで本研究で得られたMAIT細胞由来iPS細胞のTCR β 鎖をPCRによって解析したところ、TCR β 5とTCR β 8の2種類であることが判明した。さらこれらiPS細胞はマウス繊維芽細胞をフィーダーとして用いるとサイトカインleukemia inhibitory factor (LIF)の存在下で無限の増殖能を示した。これらiPS細胞が多能性(pluripotency)を有するか否かの証明はキメラマウスを産生する能力を測定する必要がある、現在鋭意、遂行中である。

② iPS細胞からのm-reMAIT細胞分化誘導

次にTCR β 5とTCR β 8を持つ代表的なLy5.1マウスMAIT細胞由来iPS細胞 (TCR α 鎖は共にV α 19-J α 33)をOP9 (血液細胞の分化誘導に頻用されるフィーダー細胞)にNotch ligandであるDelta-like 1を強制発現させた細胞上(OP9/d1k1)に播種して、中胚葉・リンパ球幼若細胞を誘導した。リンパ球幼若細胞をサイトカイン(IL-7及びFlt3-ligand)の存在下で培養することによってLy5.1-m-reMAIT細胞を得た。iPS細胞を播種した時点から細胞数を測定すると、上記分化誘導によって1000倍以上の増幅が観察された。この時、Ly5.1-m-reMAIT細胞の純度はLy5.1で98%, 5-OP-RU-mMR1 Tetramer/TCR β 染色で95%以上であった。

③ m-reMAIT細胞の性状解析

上記で得られたLy5.1⁺m-reMAIT細胞がMAIT細胞のアゴニストである5-OP-RUによってin vitroで活性化されるかを検討した。抗原提示細胞としてB細胞腫瘍株にMAIT細胞への抗原提示を行うMR1を高発現させた細胞を用いた。その結果、Ly5.1⁺m-reMAIT細胞は5-OP-RU濃度依存的に活性化され、CD25⁺CD69⁺で定義される活性化のEC50は5 pM程度であることが判明した。また、抗原提示細胞を使用しない実験系でもLy5.1⁺m-reMAIT細胞は5-OP-RUによって活性化された。Ly5.1 m-reMAIT細胞をLy5.2マウスに移植し、移植細胞のレシピエントにおける生着臓器、細胞表面マーカー・サイトカイン産生能を評価する実験は現在鋭意進行中である。

(2) 新規モデルマウスを用いた抗がん活性評価

① m-reMAIT細胞養子移入によるメラノーマに対する抗がん活性評価

- メラノーマ肺転移抑制

in vivoにおけるLy5.1⁺m-reMAIT細胞の抗がん活性を評価するため、メラノーマ移植によるがんの肺転移を解析した。予めマウス(Ly5.2)にLy5.1⁺m-reMAIT細胞を腹腔内投与し、5日後にメラノーマ(B16F10)を尾静脈経由で移植する。移植後18日でマウスを安楽死させ、肺に転移したメラノーマの結節数を測定するものである。対照群としてLy5.1⁺m-reMAIT細胞を移入せずにメラノーマを移植したものを用いた。その結果、Ly5.1⁺m-reMAIT細胞を移入した群では対照群に比して有意に肺のがん結節数低下が観察された(図1)。この抗がん活性の細胞・分子機序を明らかにするため、メラノーマ移植/Ly5.1⁺m-reMAIT細胞移入によっていかなる免疫細胞集団の数・割合が変動するのかを検討中である。

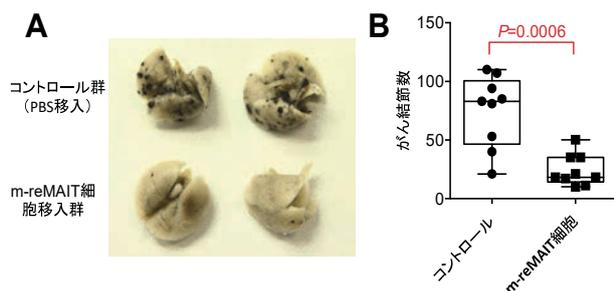


図 1. m-reMAIT 細胞移入によるメラノーマ肺転移の抑制: m-reMAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞移入群) または PBS (コントロール群) 静注後、5 日後に B16 メラノーマを静注により移植した。メラノーマ移植後 18 日後に肺を摘出し、がん結節数を測定した。(A) 各群の代表的な肺。コントロール群には多数の黒色のがん結節が認められた。(B) 各群 9 匹ずつのマウスから得られた肺のがん結節数を顕微鏡下でカウントした (Mann-Whitney test による P 値=0.0006)。

- マウス生存期間延長

Ly5.1⁺m-reMAIT細胞によるメラノーマ肺転移抑制能が担がんマウスの生存期間延長をもたらすか検討した。上記の系を用いて実験を行った。Ly5.1⁺m-reMAIT細胞養子移入有無

にてがんを移植し、マウスの生存期間を測定した。この時、可能な限り動物に苦痛を与えないという人道的見地から、エンドポイントとして死亡のみならず、体重・体温・呼吸等マウスの健康状態を日々観察し、持続的低体温・体重減少・極度な衰弱・長期に渡る下痢等の極限症状が見られたらこの時点で死とみなしマウスを安楽死させた。実験の結果、Ly5.1⁺m-reMAIT細胞移入は担がんマウスの生存期間を有意に延長させることが判明した(図2)。

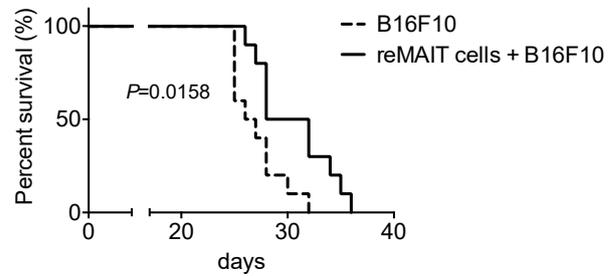


図 2. m-reMAIT 細胞移入による担がんマウス生存期間延長 (カプラン-メイヤー曲線): B16F10 メラノーマ移植マウス(破線)、m-reMAIT 細胞移入+メラノーマ移植マウス(実線)。P値は Log rank test による。

4. 研究の反省・考察

(1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立

① マウスMAIT細胞のiPS細胞化

Ly5.1マウスを理研バイオリソースセンターから本学に導入し、繁殖させるのに1年半以上の時間がかかった。これは偏に本学の動物施設のハードの問題ではなく、Ly5.1マウスの特性によると考えられる。事実、産仔の数はしばしば2-3匹にとどまり、多い時で5匹程度、食殺もしばしば経験した。この繁殖力の弱さから、マウスMAIT細胞の精製に必要なマウス数を用意するのに相当の時間を費やした。しかし、一旦、Ly5.1⁺MAIT細胞が十分量精製できると以前行ったLy5.2マウス(通常、繁殖業者から購入できるマウス)からのMAIT細胞のiPS細胞化の経験が生かされ、問題なく、iPS細胞化が遂行できた。

② iPS細胞からのm-reMAIT細胞分化誘導

Ly5.1⁺MAIT細胞由来iPS細胞からのm-reMAIT細胞への分化誘導もLy5.2⁺MAIT細胞由来iPS細胞からの分化誘導法に従って滞りなく、遂行できた。また、マウスMAIT細胞が使用しているTCRβ鎖の違い(Ly5.1m-reMAIT細胞のTCRはTCRβ5とTCRβ8であった)によるiPS細胞の分化能には差異がなかったことから、iPS細胞からの選択的分化誘導には遺伝子再構成済みTCRα鎖(Vα19-Jα33)が重要であることが改めて明らかになった。今後、TCRβ鎖による相違がm-reMAIT細胞の活性化、サイトカイン産生能等に影響を与えるのかを明らかにしたい。

(2) 新規モデルマウスを用いた抗がん活性評価

本研究は従来の研究用マウスでは解析不可能であったMAIT細胞のin vivo抗がん活性評価を新モデル構築によって可能とした。解析の結果、各種がん患者で見られるTILにおけるMAIT細胞の集積はこの細胞の抗がん活性を説明するものと解釈できる。しかし、ここで観察された抗がん活性が細胞傷害性T細胞に代表されるようにMAIT細胞がエフェクター細胞として直接がん細胞を殺傷することに起因するのか、あるいはMAIT細胞がレギュラトリー細胞として他の免疫細胞の活性・動態を制御することに起因するのかは今後の課題として残る。

① m-reMAIT細胞養子移入によるメラノーマに対する抗がん活性評価

本研究の初年度で、m-reMAIT細胞のマウスへの養子移入によりメラノーマに対する肺転移阻害と担がんマウス(メラノーマ)の生存期間延長が確認できた。この詳細な分子・細胞機序解明は今後の研究に委ねられるが、本研究は従来の概念にはない、がん免疫細胞療法開発へ向けた第一歩を記すことができた。今後はメラノーマ以外の他のがん種にも

m-reMAIT細胞は有効であるのか、MAIT細胞アゴニストである5-OP-RU、他のMAIT細胞活性化方法（例えば、Toll-like ReceptorリガンドやIL-12/IL-18に代表される自然免疫型サイトカイン、ピシバニール・BCG等に代表される生菌）投与は抗がん活性に影響を及ぼすのか、を明らかにし、m-reMAIT細胞の応用範囲をさらに広げて行く。

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

当該研究成果は喫緊に特許申請（本研究内容の特許性につき、既に弁理士と相談しており、特許性ありとの予備判断をいただいている）並びに論文投稿を予定しており、学会・講演など学外発表はその後となる予定である。

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 新 領 域 創 成 科 学 研 究 科	教 授	X線1分子計測(DXT)の実施
池 口 満 徳	横 浜 市 立 大 学 生 命 医 科 学 研 究 科	教 授	分子動力学(MD)計算の実施

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、ポリグリン化、ポリグルタミン酸化に代表される分子修飾を受けることが知られている。この中で特に大きな荷電変化をもたらすポリグルタミン酸化は、興味深いことに、ほとんどの神経の微小管で特異的に修飾を受けていることが明らかになっている(Janke, *Trends Neurosci* 2010)。これらの知見は、脳と肝臓由来の微小管の間で極微な分子運動度に差が見られた現象が、その構成因子であるTUB二量体のisoformの構造および翻訳後修飾による分子特性の差に起因している可能性を示唆しているものと考えられる。

(2) 研究の目的

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

2. 研究の計画

(1) 内在性Tubulin (TUB) 二量体の精製 (中山)

脳由来の微小管で高発現を示すTUBB3, 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 分子計測による分子運動解析 (佐々木・小川)

(1)にて得られた精製 TUB 二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能な X 線 1 分子計測法 (DXT) と電子線 1 分子計測法 (DET) を用いて分子運動度の評価を行う (Yamamoto, **Ogawa, Sasaki** *FEBS Open Bio* 2016)。特徴として、DXT は早い時分解能 (10 μ sec) を持つ X 線照射によって大量の回折点が得られデータ取得が容易である一方で、DXT は微量サンプル (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 μ g の精製タンパクと金ナノ結晶との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行う。次に水溶試料の計測を可能にする DXT セル内にセットするため、金ナノ結晶架橋タンパク試料を金支持基板上に固定し、100 μ l の緩衝溶液中において、SPring8-BL40XU による DXT 計測を行う。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である一方で、取得データ数と時分解能は悪い (1msec)。具体的には、(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 分子計測による分子運動解析 (中山・佐々木・小川・池口)

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 Ni²⁺ 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 x 軸方向の分子運動度が低くなる傾向を示し、微小管運動の結果と相関傾向にあることが示された。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 Ni²⁺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分子動力学法(MD)による予測計算により isoform 間での理論的な動態変化予測を行ったところ、TUBA と TUBB の会合面におけるインターフェース領域中に存在する3つのアミノ酸残基の相違により、脳と肝臓由来の TUB 二量体間で分子運動度が変化するというシミュレーション結果が得られてきた。そこで各々の二量体について、インターフェース領域中に相違がみられるアミノ酸残基を置換した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 χ 軸方向の分子運動が上昇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 のインターフェース領域中に 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、それらを構成する Tubulin 二量体のインターフェース領域中に存在する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、これらのアミノ酸配列に変異を加えた発現ベクターを構築し、培養細胞における微小管重合と小胞輸送動態に与える影響を明らかにすることを通して微小管の新しい小胞輸送機能の解明へ向けた研究を行っていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ogawa N, Yamamoto YY, Abe K, Sekiguchi H, Sasaki YC, Ishikawa A, Frydman J, Yohda M. “Time-Resolved Measurement of the ATP-Dependent Motion of the Group II Chaperonin by Diffracted Electron Tracking.” *Int J Mol Sci.* 2018 19(4). pii: E950. doi: 10.3390/ijms19040950.
- ② Sekiguchi H, Kuramochi M, Ikezaki K, Okamura Y, Yoshimura K, Matsubara K, Chang JW, Ohta N, Kubo T, Mio K, Suzuki Y, Chavas LMG, Sasaki YC. “Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions.” *Sci Rep.* 2018 8(1):17090. doi: 10.1038/s41598-018-35468-3.

(2) 口頭発表

- ① Nakayama T, Fukutomi T, Fujiwara T, Hamada H, Terao Y, Akagawa K. “Suppression of a neuron-specific positive regulator of the syntaxin 1A gene transcription causes unusual behavioral profile.” The 41st Ann Meeting of Japan Neuroscience Society 2018, 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光脱水素 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

究極的な一次エネルギーが太陽光であり、光電変換技術や人工光合成技術が日に日に高まっているにも関わらず「光によるエネルギーキャリア (EC) 操作技術は未踏の域」である。EC の社会普及には、安全性や利便性、経済性や環境性能が要求される事を踏まえ、**光 EC 技術の基本駆動原理を明確化することが何よりも重要となる**。即ち、どのような EC 種がどのような光触媒により活性化できることを明らかにしつつ、熱には無い光の優位性を最大限利用する事が可能なシステムを構築する必要がある。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)。更に水素 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」することを発見した (*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 apH-3d 金属錯体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。

2. 研究の計画

(1) 課題 1 : 光触媒の基本設計-活性種の光誘起発生- (主担当 : 張、松本)

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、 π - π^* 状態への励起に続く N-H(π - σ^*)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、a) プロトン・電子プーリング配位子と、b) 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。

(2) 課題 2 : 活性種の光発生効率の向上-励起状態の制御- (主担当 : 芳賀、片山、孫)

効率的な EC からの光脱水素には、高い光水素活性種 (例 : 水素ラジカル) 発生効率に加え、活性種と EC の選択的反応が必須である。よって、目的反応を阻害する励起状態からの輻射失活 (発光) や無輻射失活を抑制しつつ、活性種を発生する励起状態へ如何に高効率に励起するかが鍵となる。本年発表した報告 (*Nature Commun.*) では、アミノフェノール (光水素発生量子収率 (Φ_{H_2}) = 2.9%)、アミノフェノラート (Φ_{H_2} = 3.7%) 及びその Fe(II)錯体 (Φ_{H_2} = 4.8%、世界最高) の光 MeOH 脱水素触媒能を報告している。加えて申請者らは既に Fe(II)の代わりに、Mg(II), Mn(II), Co(II)を用いることで、それぞれ 7.8, 8.9, 4.8% の水素発生量子収率を実験により得ており、金属種の選択により量子収率が上昇することを確認している。また配位子への電子供与性

置換基の導入により、吸収極大が長波長シフトする事も実験で確認している。以上の知見を踏まえ、EC からの脱水素を引き起こす水素ラジカル・ヒドリド発生効率を向上すべく、金属種及び配位子骨格への電子供与基及び電子吸引基の導入効果を水素発生量(TON, TOF)や失活に通ずる輻射(発光)効率を測定し明らかにする(担当:芳賀)。また、これらの活性種が示す反応ダイナミクスを各種時間分解分光法により定量的に明らかにし(担当:片山・孫)高活性触媒の設計にフィードバックする。

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_{H_2} 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 apH₂ 類似のシグナルパターンを与えたものの、いずれも apH₂ よりわずかに低磁場側にシグナルを与えた。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。apH₂ (2.0 mM) および MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) (1.0 mM) の MeOH 溶液に、紫外光 (289 ± 10 nm) 照射を行なったところ、apH₂ 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 1.1, 1.5, 0.7, 1.5, 1.0 当量の水素が発生し、Co を除く金属イオンの利用による発生量の増加が確認できた。

(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 apH の 4 位並びに 4,6 位にそれぞれ導入した錯体 (MnBuapH および MnBu₂apH) の光水素発生量は、9.2 (5 h)、9.4 当量 (5 h) となり、いずれの場合も MnapH 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。apH₂ 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 apH₂ 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 apH₂ 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。

(4) 金属中心のスピン状態が与える効果の解明

前述の様に、光反応中に apH の脱離と分解が副反応として進行することが実験的に示唆された。これは錯体中の高スピン型 Fe(II) の置換活性が影響していると考えられた。そこで本研究では、触媒の安定性並びに活性向上を目的に、強配位子場を与え得る補助配位子を用いた電子状態制御と光反応性に及ぼす効果について検討した。常磁性錯体種である Fe(II) 錯体に対しそれぞれ二当量の NBU₃, PEt₃ および DMAP を添加した結果、MeOH-d₄ 中での ¹H NMR スペクトルにおいて、補助配位子添加前には見られないブロードな芳香族プロトン由来のシグナルが現れた。一方、それぞれ二当量の tBuNC および AdNC を添加した錯体種においては、より先鋭化されたシグナルが確認され、反磁性錯体種の形成が示唆された。また、それぞれの錯体種の MeOH 溶液への光照射 (ex = 289 ± 10 nm) によりそれぞれ 1.1, 1.1, 0.8, 0.3, 1.3, および 0.3 当量の水素が発生し、発生量に差異が見られた。これらの結果は、補助配位子のドナー性の違いにより錯体の電子状態に影響を及ぼしていることを示し、補助配位子効果を考慮した錯体種的设计により触媒の活性および安定性を制御可能であることを示唆する結果である。

4. 研究の反省・考察

これまでに我々が見いだした光レドックス活性錯体触媒を用いた MeOH の光脱水素化を実現すべく、1) 金属、2) 置換基及び、3) 金属中心のスピン状態の効果を実験的に明らかにし、高活性触媒化に向けた分子レベルの検証を行ってきた。その結果、これらの三因子がいずれも MeOH 脱水素化反応に影響する事を見いだすと共にその活性を定量的に示すことができた。一方、このような均一系にて得られた知見を不均一系へと展開する点においては今後迅速に遂行すべきと考える。本研究では本触媒を中低温での反応に応用すべく、シリカや MCM 表面のターミナル酸素、または担体への異種金属のドーピングにより固定化する。担体としては、(i)光透過性、(ii)熱的・機械的安定性、(iii)高い表面積、(iv)化学的安定性、(v)経済性に加え(vi)PRC の固定に必要な十分な量の固定化サイトが求められるため、メソポーラス担体を中心に最適化する。また HCHO の過剰酸化を化学因子の最適化により抑制しつつ、最適な担持法を探索する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① The Impact of Group-10 Metals on the Solvent-induced Disproportionation of o-Semiquinonato Complexes, S. Yamada, T. Matsumoto, H.-C. Chang, *Chem Eur. J.*, **2019**, *29*, 8268-8278.
- ② Direct Photochemical C-H Carboxylation of Aromatic Diamines with CO₂ under Electron-Donor- and Base-free Conditions, T. Matsumoto, D. Uchijyo, T. Koike, R. Namiki, H.-C. Chang, *Sci. Rep.*, **2018**, *8*, 14623.
- ③ Tuning Electron Acceptability of the [Mo₆S₈] Core by Decorating with Methyl Groups on Face-Bridging μ³-Sulfides, T. Matsumoto, R. Namiki, H.-C. Chang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2018**, 3900-3904 (Front Cover).
- ④ Tuning the Mesomorphism and Redox-Response of Anionic Ligand-Based Mixed-Valent Ni(II) Complexes via Alkyl-Substituted Quaternary Ammonium Cations, Y. Nakamura, T. Matsumoto, Y. Sakazume, J. Murata, H.-C. Chang, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 7398-7409 (Inside Cover).
- ⑤ Bio-inspired Protonic Memristor Devices Based on Metal Complexes with Proton-Coupled Electron Transfer, Y. Hiruma, K. Yoshikawa, M. Haga, *Faraday Discussions*, **2019**, *213*, 99-113.
- ⑥ Humidity-controlled rectification switching in ruthenium-complex molecular junctions, H. Atesci, V. Kaliginedi, J. A. C. Gil, H. Ozawa, J. M. Thijssen, P. Broekmann, M. Haga and S. J. Molen, *Nature Nanotechnology*, **2018**, *13*, 117-121.
- ⑦ Robust Nanowrapping of Reduced Graphene Oxide by Metal-Organic Network Films between Fe Ions and Tetra(Catechol-Substituted) Porphyrin, H. Ozawa, S. Kusaba, M. Matsunaga, M. Haga, *Langmuir*, **2018**, *34*, 2952-2958.
- ⑧ Proton-Rocking-Chair-Type Redox Capacitors Based on Indium Tin Oxide Electrodes with Multilayer Films Containing Ru Complexes, K. Yoshikawa, D. Motoyama, Y. Hiruma, H. Ozawa, S. Nagano, M. Haga, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2018**, *10*,

26990-26700.

- ⑨Uncovering Photo-Excited Charge Carrier Dynamics in Hematite (α -Fe₂O₃) Hidden in the Nanosecond Range by the Heterodyne Transient Grating Technique Combined with the Randomly Interleaved Pulse-Train Method, W. Y. Sohn, M. Inaba, T. Tokubuchi, J. E. Thorne, D. Wang, K. Katayama, *J. Phys. Chem. C*, **2019**, *123*, 6693-6700.
- ⑩Photoexcited charge carrier dynamics of interconnected TiO₂ nanoparticles: evidence of enhancement of charge separation at anatase-rutile particle interfaces, D. Shingai, Y. Ide, W. Y. Sohn, K. Katayama, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, *20*, 3484-3489.
- ⑪Comparative study of photo-excited charge carrier dynamics of atomic layer deposited and solution-derived hematite films: Dependence of charge carrier kinetics on surface orientations, M. Inaba, J. E. Thorne, D. Wang, W. Y. Sohn, K. Katayama, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2018**, *363*, 645-649.

(2) 口頭発表

- ①Solvent-induced Disproportionation of Group 10 Metal Complexes with o-Semiquinonato, Shota Yamada, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang, 第68回錯体化学討論会, 仙台, 2018/7/28-30.
- ②Redox-active Ligands as Photo-responsive Electron/Proton Poolers, Ho-Chol Chang, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, Sendai, 2018/7/30-8/4.
- ③CO₂下においてo-フェニレンジアミン鉄(II)錯体が示す光化学的 C-H カルボキシ化反応、松本剛、内城大貴、小池拓司、阿部叶、小池翔太、張浩徹、第30回配位化合物の光化学討論会、2018/7/14-16、札幌。
- ④新規Ru(II)二核錯体と半導体から成るCO₂還元ハイブリッド光触媒の開発、村越莉帆・玉置悠祐・芳賀正明・石谷治、日本化学会第99春季年会、甲南大学、2019/3/19.
- ⑤3{5}-置換ピラゾール三座配位子を有するIr(III)錯体の構造の光物理特性に与える影響、佐藤和香・小高智子・芳賀正明、日本化学会第99春季年会、甲南大学、2019/3/19.
- ⑥インジゴ誘導体配位子を有する新規ルテニウム錯体の電気化学およびCO₂還元への応用、有谷一志、Madhumita Chatterjee, Goutam K. Lahiri, James Taylor, Frantisek Hartl, 谷津大気、石谷治、芳賀正明、ポーラグラフィ討論会、長崎県、2018/11/23.
- ⑦Synthesis and Electrochemical Properties of Ruthenium Complexes Containing Non-innocent Indigo Derivatives, Kazushi Aritani・Kai Yoshikawa・Madhumita Chatterjee・Goutam K. Lahiri・James Taylor・Frantisek Hartl・芳賀正明、43rd International Conference on Coordination Chemistry, Sendai, 2018/7/30-8/4.
- ⑧Lifetime mapping of photo-excited carriers on TiO₂ by transient grating imaging, M. Ebihara, N. Yoshinaga, W. Y. Sohn, K. Katayama, 日本化学会大99春季年会、甲南大学、2019/3/19.
- ⑨Photo-induced dynamics of photo-devices -solar cell, photocatalysis, water splitting, K. Katayama, OIST Seminar, 2019/1.
- ⑩ Photo-response analysis of photo-devices by transient grating phase imaging microscopy, K. Katayama, 日本分析化学会第67年会, 2018/9.
- ⑪Uncovering Charge Carrier Dynamics of Hematite Hidden in Nanosecond Range by Transient Grating Technique with Randomly-Interleaved-Pulse-Train Method, W. Y. Sohn, K. Katayama, 27th PhotoIUPAC, 2018/7.

(3) 出版物

- ①分子アーキテクトニクス (CSJ Current Review 31 日本化学会編)、芳賀正明・小澤寛晃 分担執筆、化学同人、2018/12.
- ②現代界面コロイド化学の基礎、原理・応用・測定ソリューション、芳賀正明編集担当および分担執筆、丸善、2018/4.

学 校 名	帝 京 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と先天性代謝異常症への応用		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①ゲノム編集 ②メタボローム ③スフィンゴ脂質 ④高速液体クロマトグラフィー質量分析系(LC-MS) ⑤極長鎖脂肪酸 ⑥副腎白質ジストロフィー(X-ALD) ⑦新生児マススクリーニング		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
濱 弘 太 郎	薬 学 部	准 教 授	実験・データ整理・論文作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 原 優 子	薬 学 部	助 教 授	実験・データ整理・論文作製
林 康 広	薬 学 部	助 教 授	実験・データ整理・論文作製
横 山 和 明	薬 学 部	教 授	データ整理・論文作製
山 下 純	薬 学 部	教 授	データ整理・論文作製

スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と 先天性代謝異常症への応用

1. 研究の目的

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド長鎖塩基を持つ脂質で、脂質ラフトなど生体膜マイクロドメインの構成を介して様々な機能を持つ。スフィンゴイド塩基と脂肪酸の鎖長や極性頭部の種類により、様々な分子種が存在する。各スフィンゴ脂質分子種は異なる物性を有し、マイクロドメインの物性の調節など、生体膜の機能を変化させる。各スフィンゴ脂質分子種の機能を明らかにする為には、各分子種の産生・代謝経路を正確に理解する必要がある。本研究ではスフィンゴ脂質の脂肪酸および極性頭部に着目し、以下4つの課題に対して、ゲノム編集技術と高速液体クロマトグラフィー-質量分析系によるメタボローム解析を用いた解析を行う。

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：スフィンゴ脂質は、リン脂質等の他の複合脂質と比較して、炭素数が24以上の極長鎖脂肪酸を含む割合が高い。申請者は、細胞内の極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質群を増加又は減少させることで、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質代謝制御機構の細胞生物学的意義を解明する。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：副腎白質ジストロフィーは、極長鎖脂肪酸の蓄積を生化学的な主徴とする先天性代謝異常疾患で、約2万人に1人の頻度である。現時点で唯一の治療法は造血幹細胞移植であり、脱髄症状等を抑制する為には早期の移植が必須となる。申請者は新生児マススクリーニングに適用可能な極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリン (SM) 分子種の簡便な測定系を開発する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ脂質の主要な産生・代謝酵素は同定されているが、各スフィンゴ脂質量の制御機構について定量的な議論は殆ど進んでいない。申請者はスフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法を確立する。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：SMとスフィンゴ糖脂質は、共通の基質であるセラミドに対して、ホスホコリンもしくはグルコースが結合することで合成される。SMとスフィンゴ糖脂質の生理的意義は大きく異なるが、どちらをどれくらい産生するかという制御機構は不明である。申請者はSMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け制御機構を解明する。

2. 研究の計画

本研究では以下4つの計画に従って行われた。

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：細胞内の極長鎖脂肪酸量は、厳密に制御される。申請者は、細胞内の極長鎖脂肪酸含有脂質量を上昇させるために、極長鎖脂肪酸の代謝に必須であるABCトランスポーターの欠損細胞株を、ゲノム編集技術を用いて確立する。さらにこの細胞に対して、さらに様々な脂質代謝酵素の機能を変動させることで、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の変動を解析する。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：副腎白質ジストロフィーの診断基準は、血中の極長鎖脂肪酸値の上昇である。しかし従来の極長鎖脂肪酸の測定は、試料の前処理が煩雑であり、一検体あたりの測定時間も長い。そこで申請者は、副腎白質ジストロフィー患者では血中の極長鎖脂肪酸含有SMが上昇することに注目し、より簡便なスクリーニング技術を開発する。具体的には、試料である濾紙血から適切な溶媒によってSMを含む脂質画分を溶出し、これを直接、質量分析計に投与して極長鎖脂肪酸含有SMを検出する方法を検討する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ糖脂質の極性頭部を構成する糖鎖構造は、糖鎖の数と共に、その結合様式が非常に多様である。そのために分子種間の疎水性度が近似しており、高速液体クロマトグラフィー-質量分析系で通常用いられる疎水性カラムによる分離は困難である。申請者は、糖鎖構造の立体構造の差異に注目し、

キラルカラムを用いて各分子種を分離、測定する。

- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのヘテロ複合体における近傍領域を同定するために、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのアミノ末端が近接するのかを蛍光タンパク質再構成法で調べる。具体的には蛍光タンパク質VenusのN末端側あるいはC末端側を、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼそれぞれのN末端あるいはC末端に付加したキメラ蛋白質の発現ベクターを構築する。これらを細胞に発現させ、共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて細胞内局在および蛍光強度を解析し、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのヘテロ複合体における近傍領域を同定する。

3. 研究の成果

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：極長鎖脂肪酸の代謝に必須であるABCトランスポーター遺伝子の欠損細胞株を、ゲノム編集技術を用いて確立し、極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質分子種が増加することを確認した。さらに、この細胞に対して、幾つかの脂質代謝酵素の機能を、ゲノム編集技術を用いてさらに欠損させることで、極長鎖脂肪酸含有脂質代謝への寄与を検証し、その候補分子を得た。

- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：有機溶媒を用いて濾紙血から極長鎖脂肪酸含有 SM を効率良く回収可能であることを確認した。また、先だって開発した SM 測定技術 (*Lipids* (2017), 図1) に関する問い合わせが多かった為、詳細な手技を公開した (*J Vis Exp* (2018))。

- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：マウス脳及びHeLa細胞から総脂質画分を抽出し、中性および酸性スフィンゴ糖脂質の分子種解析を行った。その過程で脳内の一部のスフィンゴ糖脂質クラスでは SM に比べて極長鎖脂肪酸を含有する割合が高いことも見出している。保有する質量分析器の検出可能域は m/z 2000以内であり、特に複雑な糖鎖構造を有するガングリオシド分子種は一価のイオンとして測定不可能であったが、質量分析器の各種条件検討の結果、二価イオンとして測定可能になった。

- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：スフィンゴミエリン合成酵素の N 末端と グルコシルトランスフェラーゼ の C 末端が近傍にあることを明らかにした (図2 AおよびB)。さらに、ラパマイシンを用いた蛋白質複合体を誘導実験によって、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのヘテロ複合体が SM の産生を正に制御することを見出した (図2 C)。

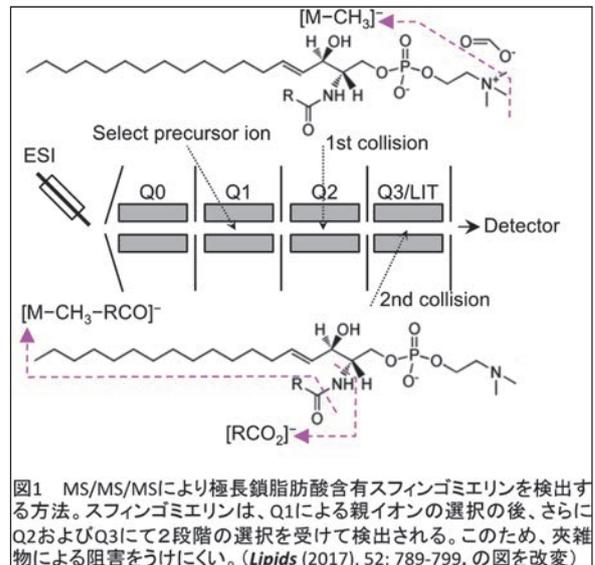


図1 MS/MS/MSにより極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリンを検出する方法。スフィンゴミエリンは、Q1による親イオンの選択の後、さらにQ2およびQ3にて2段階の選択を受けて検出される。このため、夾雑物による阻害をうけにくい。(Lipids (2017), 52: 789-799, の図を改変)

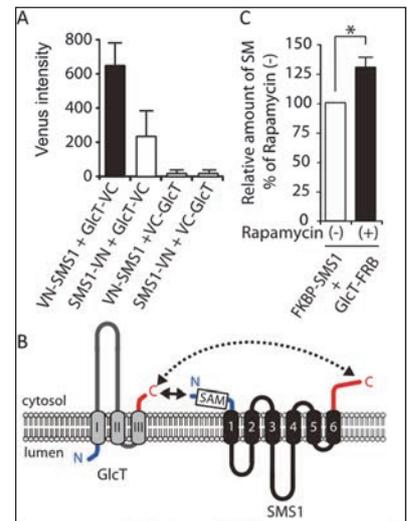


図2 (A, B) 蛍光タンパク質 Venus の N 末側 (VN), C 末側 (VC) の再構成を指標に分子間の近接を調べる BiFC 法を行い、GlcT の C 末端と SMS1 の N 末端が最接することが分かった。(C) FKBP-SM51キメラ蛋白質とFRB-GlcTキメラ蛋白質を SMS1/GlcT 欠損細胞に発現後 ^{14}C -ステアリン酸で代謝ラベルし、ラパマイシン存在下でヘテロダイマーを形成させると、SM 量が増加した。

4. 研究の反省・考察

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：検証した脂質代謝酵素は、極長鎖脂肪酸含有脂質代謝への関与が認められるものの、その寄与度は十分ではないことから、他の代謝酵素とのリダンダンシーが考えられた。今後は当該代謝酵素のファミリー内の分子を中心にその他の代謝酵素との相互作用を検証する必要がある。

- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：試料中の大量のホスファチジルコリンが原因と考えられるイオン化抑制効果が見られた。そこで、試料をアルカリ処理することでホスファチジルコリンを加水分解し、脱塩処理することでイオン化抑制効果を克服できるかを検証する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：キラルカラム使用時の各スフィンゴ糖脂質分子種の溶出時間の決定が今後の課題である。その為に、グルコシルトランスフェラーゼをノックアウトすることでスフィンゴ糖脂質が減少した細胞を作出し、これと親細胞株とを比較することで、スフィンゴ糖脂質特異的なシグナルを効率良く検出し、スフィンゴ糖脂質の溶出時間決定に用いる。また、スフィンゴ糖脂質に含まれる脂肪酸には、炭素数や二重結合数だけでなく、水酸基が結合したものが分かるなど、当初の予想以上に多様なスフィンゴ糖脂質分子種が存在することが分かった。これらの分子種についても溶出時間を決定する必要がある。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：本年度の研究によって、SM合成酵素は様々なタンパク質と相互作用することで、その機能を調節している可能性が示された。今後は、SM合成酵素と近傍にあるタンパク質を網羅的に探索し、SM合成酵素の制御機構の全貌を明らかにする必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hama K*, Fujiwara Y, Morita M, Yamazaki F, Nakashima Y, Takei S, Takashima S, Setou M, Shimozawa N, Imanaka T, Yokoyama K. Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice. *Lipids*, 3(1):85-102, 2018 (*corresponding author)
- ② Hama K*, Fujiwara Y, Yokoyama K. Quantitative and Qualitative Method for Sphingomyelin by LC-MS Using Two Stable Isotopically Labeled Sphingomyelin Species. *J Vis Exp*, May 7; (135). doi: 10.3791/57293, 2018 (*corresponding author)
- ③ Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Matsumoto N, Hama K, Tanikawa T, Oka S, Saeki T, Kumasaka T, Koizumi T, Arai S, Wada I, Yokoyama K, Sugiura T, Yamashita A. Complex formation of sphingomyelin synthase 1 with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels. *J Biol Chem*, 293(45):17505-17522, 2018
- ④ Fujiwara Y, Hama K, Tsukahara M, Izumi-Tsuzuki R, Nagai T, Ohe-Yamada M, Inoue K, Yokoyama K. Acyl Chain Preference in Foam Cell Formation from Mouse Peritoneal Macrophages. *Biol Pharm Bull*, 41(1):86-91, 2018
- ⑤ 山下 純, 岡 沙織, 谷川 尚, 中島 圭佑, 杉浦 隆之, ‘LPI受容体としてのGPR55’, *生化学*, 第90巻5号, 2018

(2) 口頭発表

- ① 濱弘太郎, 藤原優子, 山下純, 横山和明 「ロレンツォオイル添加時の各種極長鎖脂肪酸脂肪酸CoAの定量」第60回日本脂質生化学会、八王子、2018年6月
- ② 藤原優子, 濱弘太郎, 横山和明 「キラルカラムを用いたヒドロキシ脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析」第60回日本脂質生化学会、八王子、2018年6月
- ③ Yasuhiro Hayashi
 “Sphingomyelin synthase 1 forms a complex with glucosylceramide synthase that is involved in the regulation of selective ceramide usage”
 Gordon Research Conference, The Biochemistry, Biophysics and Physiology of Glycolipid and Sphingolipid Biology
 February 11 - 16, 2018, Galveston, TX, USA (招待講演)

(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 —原子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	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DNAの構造特性、ヒストンバリエーション、及びヒストン結合因子に着目した。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) 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、リピート配列の中で安定なヌクレオソームを形成し、筋強直性ジストロフィー症などの疾患との関係が明らかにされているCTGリピートに着目した。CTGリピートを含むヌクレオソームを再構成し、X線結晶構造解析を行い、標準的なヌクレオソームの立体構造と比較した。

(2) 出芽酵母ゲノムにおけるH2A.Zを含むヌクレオソームの解析法の開発

出芽酵母のゲノム上でのH2A.Zを含む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、ヒストンH2A.Z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及びヒトH2A.Zを含むヌクレオソームの結晶構造に基づき、ヒストンH2A.Z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を連結して、Cu²⁺をキレートした後に、OHラジカルを局所的に発生させてDNAを切断する方法を開発した。

(3) クロマチン上でのDNA修復反応の分子機構の解明に向けた構造生物学的研究

RAD52は、活性酸素やDNA複製のエラーによって発生する単鎖DNA領域に結合し、その領域と相同なDNA領域を、クロマチン構造を有する姉妹染色分体または相同染色体の中から見つけ出す。その分子機構を明らかにすることを目的として、まずRAD52と単鎖DNAとの複合体のX線結晶構造解析を行い、複合体の立体構造からRAD52が触媒するDNA修復反応のモデルを構築した。

3. 研究の成果

(1) 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、CTGリピートを含むヌクレオソームの再構成を試みた。CTGリピートを含む146 bp DNAは、合成オリゴDNAをアニーリングすることにより大量調製した。CTGリピートは、146 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。調製したDNAは、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CTGリピートを含むヌクレオソームのX線結晶構造解析を行ったところ、3.6 Å程度の分解能でその立体構造を明らかにすることに成功した。これまでに決定された標準的なヌクレオソームの立体構造との比較を行った結果、ヒストン八量体の構造は両者の間でほとんど違いはなかったが、DNAの構造に違いが見られた。CTGリピート領域では、標準的なヌクレオソームの対応するDNA領域と比べてminor grooveが広がっていた (Kagawa, Shimizu et al., 投稿論文準備中)。

(2) 出芽酵母ゲノムにおけるH2A.Zを含むヌクレオソームの解析法の開発

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、H2A.Zを含むヌクレオソームの構造的特徴を新たに見いだした (Shimizu, Kagawa et al., 投稿論文準備中)。

(3) 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の作製に成功した。現在、各ヒストンの様々な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) クロマチン上でのDNA修復反応の分子機構の解明に向けた構造生物学的研究

X線結晶構造解析によりRAD52と単鎖DNAとの複合体の立体構造を3.6 Å分解能で決定した (Saotome et al., *iScience*, 2018)。RAD52と結合した単鎖DNAはB-form様構造をとり、Watson-Crick塩基対を形成する塩基の部位が溶媒側に露出していた。RAD52はこのような単鎖DNAの立体構造を誘起することで、相同なDNA同士の対合反応を促進することが考えられた。さらに、複合体の構造解析によって、単鎖DNAはRAD52が形成する溝の内側に結合することが明らかになり、その近傍に存在する第2のDNA結合領域に二重鎖DNAが結合することによって、RAD52がDNA修復反応を触媒するモデルが考えられた。

4. 研究の反省・考察

本研究は、CTGリピートを含むヌクレオソームの立体構造をX線結晶構造解析により決定し、CTGリピートが特徴的なDNA構造を有することを明らかにした。この情報は、今後CTGリピートの伸長と疾患との関係性を解明するために、手がかりとなる可能性が考えられる。*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、ヒストンバリエーションの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。また、RAD52が触媒するDNA修復反応の詳細な分子機構を解明し、今後クロマチン上で修復反応が起こる分子機構を解明するための重要な知見となった。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 Saotome, M., Saito, K., Yasuda, T., Ohtomo, H., Sugiyama, S., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., Kagawa, W. Structural Basis of Homology-Directed DNA Repair Mediated by RAD52. *iScience* **3**, 50-62. (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.04.005>
- ② Fuse, T., Yanagida, A., Shimizu, M. The Yeast Minichromosome System Consisting of Highly Positioned Nucleosomes *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* **42**, 289-294. (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00732>

(2) 口頭発表

- ① 五月女美香、相澤由有希、香川亘、RAD52による不正確なアニーリング反応の生化学的解析、第36回染色体ワークショップ・第17回核ダイナミクス研究会、宝塚（兵庫県）、2019年1月23日～25日
- ② 清水光弘（依頼講演）部位特異的切断によるヒストン-DNA 結合部位のゲノムワイド解析への展開、平成30年度国立遺伝学研究所研究会「クロマチン・細胞核の動的構造変換とゲノム機能制御」2018年10月17～18日，国立遺伝学研究所，三島（静岡県）
- ③ 五月女美香、相澤由有希、香川亘、RAD52が触媒するDNAアニーリングにおけるミスマッチ配列の影響、第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24日～26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 ヘルスシステム統合科学研究科	教 授	実験・論文作成
瀧 口 義 浩	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 分子検出に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ェホトダイオード (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 30 年度は動いている蛍光標識した生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光測定を継続する。また、HPD を 1 台追加導入し、蛍光 2 色同時検出・偏光 2 成分同時検出の系に拡張する。

(1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・時間分解蛍光検出

連続した励起光を用いて、動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出を行う。生体分子に

標識する蛍光プローブとして、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用いる。生体分子の構造や周囲の環境（pH・温度・疎水性）、運動性の変化を高時間分解能で検出する。

(2) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターとダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・偏光 2 成分同時検出の系に拡張する。こうすることで、蛍光を直交する 2 つの偏光成分に分けて同時検出したり、2 色の蛍光を同時検出することができるようになる。

3. 研究の成果

(1) 周囲環境の定常蛍光 1 分子検出・時間分解蛍光 1 分子検出

① pH 感受性蛍光色素標識 Qdot の蛍光寿命変化測定

pH 感受性蛍光色素を標識した Qdot の蛍光寿命測定を行った。そして、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を利用して、pH 変化を Qdot1 分子の蛍光寿命変化として検出した（図 1）

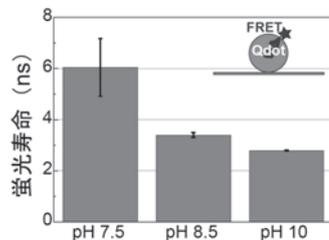


図 1：pH 感受性蛍光色素を標識した Qdot1 分子の蛍光寿命測定.

② 温度変化系の構築

顕微鏡のステージに取り付けられる加温冷却プレートを導入した。定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出によって、生体分子のすぐそばの局所的な温度や温度変化の検出を実証する準備が整った。

(2) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターやダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出の系に拡張した。1 台の時間相関単一光計数モジュールで 2 成分の時間分解蛍光 1 分子の同時検出を可能にするため、複数（4）チャンネルルーターモジュールも導入した。

(3) 蛍光 2 色同時検出系を用いた動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・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

構築した蛍光 2 色同時検出系を用いて、2次元自由拡散を行う脂質分子に標識した Qdot585 と Qdot655 の定常蛍光検出と蛍光寿命測定（図 2）を行った。

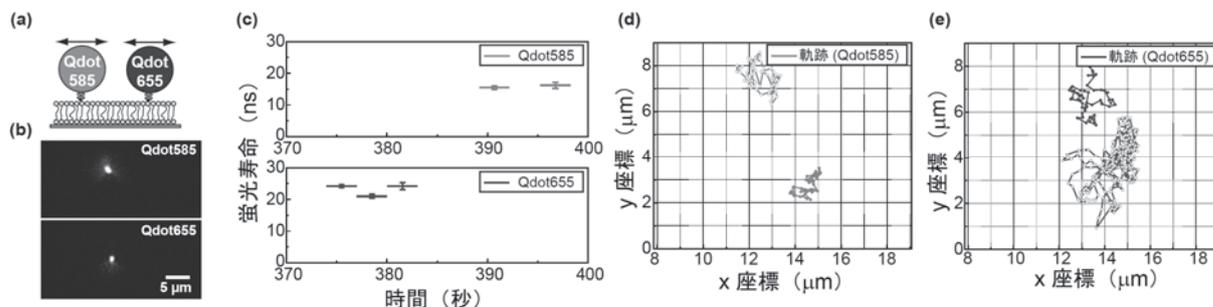


図 2：平面上を 2 次元自由拡散する Qdot 標識脂質分子に標識した Qdot585 と Qdot655 の蛍光寿命同時測定（3 秒ごと）. (a) 模式図. (b) 蛍光像 (EMCCD (デュアルビュー光学系)). (c) 蛍光寿命の時間経過 (HPD) 上：Qdot585 下：Qdot655. (d) Qdot585 の軌跡 (EMCCD). (e) Qdot655 軌跡 (EMCCD).

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・時間分解蛍光検出

① 生体分子の蛍光標識

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。一方、アクチンフィラメントについては、蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識したものの運動を観察することができたが、標識され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。DNA 修復タンパク質については蛍光ダイヤモンドナノ粒子による標識はできたが、まだその DNA 結合活性が確認できていない。標識率を上げ、DNA 結合活性があるもの効率的に見つけられるようにできる必要がある。

(2) 周囲環境の定常蛍光 1 分子検出・時間分解蛍光 1 分子検出

ガラス基板に固定したpH感受性蛍光色素標識Qdotの蛍光寿命変化測定によって、pH変化が検出できることを実証した。次は、生体分子にこのQdotを標識し、動いている状態でもpH変化が検出できることを実証する。また、構築した温度変化系を用いて、定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出によって、生体分子のすぐそばの局所的な温度や温度変化が検出できることを実証する。

(3) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターやダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出の系に拡張した。

(4) 蛍光 2 成分同時検出系を用いた動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・時間分解蛍光検出

構築した蛍光 2 色同時検出系を用いて、2 次元自由拡散を行う脂質分子に標識した 2 色の Qdot の定常蛍光検出と蛍光寿命測定ができることを実証した。次は、構築した蛍光偏光 2 成分色同時検出系を、動いている生体分子に適用していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①横田浩章、深澤宏仁：ハイブリッドフォトディテクタ (HPD) のバイオ蛍光顕微鏡応用と広視野高時間分解能生体1分子蛍光検出 *応用物理* 87(9) 670-673, (2018)

(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と蛍光検出～1 分子直視と高時間分解能検出～ 第15回バイオオプティクス研究会 山形大学 (米沢市) 2018年12月 (招待講演)

②横田浩章：大腸菌非六量体型DNAヘリカーゼUvrD変異体の1分子イメージング 第41回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2018年11月 (招待講演)

③Yokota, H.: Single-molecule imaging of the oligomeric form of the non-hexameric *Escherichia coli* helicase UvrD mutants. 第56回日本生物物理学会年会 熊本大学 (熊本市) 2018年9月

④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4回班会議 ザ・ルイガンズ (福岡市) 2018年6月

(3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	薬 学 部
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生物時計 ③細胞分裂 ④立体構造解析		

○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
田 中 俊 一	立命館グローバル・イノベーション 研究機構（R-GIRO）	平成30年 9月30日退職	実験、解析

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—

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、タンパク質のコンフォメーション平衡と離合集散が織りなす生命現象に注目し、圧力実験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し、そのメカニズムの解明と応用研究を行う。
- ①タンパク質の多様なコンフォメーションの構造研究を可能にする溶液NMR法とX線結晶構造解析法を開発する。
 - ②多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対し抗菌性を示すリード化合物の創出を行う。
 - ③圧力実験によるシアノバクテリアの生物時計の制御メカニズムの解明を行う。

2. 研究の計画

- (1) タンパク質の多様なコンフォメーションの観測を可能にする溶液 NMR 法と X線結晶構造解析法を開発する。
- ①超高磁場NMR装置（大阪大学 950 MHz）を用いた高圧力NMR測定を行う。
 - ②高圧力NMR法によりタンパク質のコンフォメーション平衡と水和状態の変化を観測する。
 - ③圧力を用いたコンフォメーション選択的結晶化技術の開発
- (2) コンフォメーション選択的な新たな作用機序をもつ抗 MRSA 薬の開発を目指す。
- ①圧力軸実験（高圧NMR法、高圧蛍光法）によるFtsZの多型構造の探索を行う。
 - ②圧力を用いたコンフォメーション選択的結晶化技術の開発とX線結晶構造解析による各コンフォメーションの立体構造解明を行う。
 - ③FtsZに対する阻害剤の結合様式解明に基づく抗菌剤リードの構造最適化を行う。
- (3) 圧力実験によるシアノバクテリアの生物時計の制御メカニズムの解明を目指す。
- ①KaiC周期長変異体について研究を拡張し、KaiCの「体積揺らぎ」がATPase活性、さらには周期長を制御することを立証する。
 - ②核磁気共鳴(NMR)法を用いて、KaiC内のリン酸化状態の概日変動を捉える。
 - ③高圧顕微セルを導入し、発光酵素ルシフェラーゼ-遺伝子を導入したシアノバクテリアを用いて、生物発光の変化から *in vivo*での概日周期長の圧力応答を解明する。

3. 研究の成果

- (1) タンパク質の多様なコンフォメーションの観測を可能にする溶液 NMR 法と X線結晶構造解析法を開発
- ①超高磁場NMR装置（大阪大学蛋白質研究所 950 MHz）に高圧力NMRシステムを構築し、2500気圧までの測定を可能にした。
 - ②高圧力NMR法を用いて、ユビキチンについて水からタンパク質アミド水素への磁化移動を捉えるCLEANEX-PM測定を行い、コンフォメーション変化に伴う水和状態の変化を観測した。
 - ③キャピラリーを用いたバッチ法により、高圧力下でタンパク質の結晶化に成功した。
 - ④様々なタンパク質を用いて、X線結晶構造解析法の技術開発を行った。
- (2) コンフォメーション選択的な新たな作用機序をもつ抗 MRSA 薬の開発
- ①圧力軸実験（高圧NMR法、高圧蛍光法）により、細胞分裂に関わるタンパク質FtsZの多型構造の探索を行った。黄色ブドウ球菌由来FtsZ (SaFtsZ) のX線構造解析を行い、構造状態の異なる二種類のFtsZの立体構造を同一結晶内から初めて明らかにした。その結果、FtsZはフィラメントを形成する構造状態 (T-state) からフィラメントから解離する構造状態 (R-state) へその構造を変化させることによって、FtsZの離合集散が制御されてい

ることが示された。遺伝子操作によってSaFtsZにトリプトファンを導入し高圧蛍光測定を行なったところ、加圧とともに長波長シフトし、2500気圧、3000気圧で波長シフトが終了している様子が確認でき、圧力によってSaFtsZの構造平衡が偏る様子が初めて観測できた。

②高圧下の結晶化を、キャピラリーを用いたバッチ法で行い、SaFtsZの結晶を得ることができたが、結晶の取り出しや凍結の際の技術的課題があり、構造解析することはできなかった。そこで、FtsZの新たなコンフォメーションを捕らえることを目的に、黄色ブドウ球菌以外の細菌FtsZの発現・精製・結晶化・構造解析に取り組んだ。これまでに、黄色ブドウ球菌と同様に院内感染の原因菌である肺炎桿菌FtsZおよび大腸菌FtsZの発現・精製・結晶化に成功し、これらのFtsZについては世界で初めて立体構造を決定することができた。構造解析の結果、これまでのFtsZの構造研究では見られなかった新しいコンフォメーションを捕らえることができた。

③FtsZに対する阻害剤の結合様式解明に基づく抗菌剤リードの構造最適化

FtsZに対する阻害剤を開発する上で、障害となっているのが、FtsZへの阻害剤の親和性を評価する方法がないことである。一般に、阻害剤の親和性は、表面プラズモン共鳴法と等温滴定カロリメトリー法が用いられるが、FtsZは自己集合する性質を有するタンパク質であるため、それらの方法を使用することができない。そこで、これまで私達が開発してきた阻害剤の結合様式を利用して、新たに阻害剤に蛍光官能基を結合させた蛍光分子を設計・合成し、阻害剤の親和性評価に挑戦した。その結果、初めてFtsZの親和性を評価することができ、さらにそれらの蛍光分子がFtsZのフィラメント形成を妨害しないことを、X線構造解析によって明らかにすることができた。

さらに、これまで開発してきた阻害剤の結合構造を元に新しく阻害剤を設計・合成し、それらの阻害剤の結合構造を2種決定することができ、構造-活性相関の解明を行った。

(3) シアノバクテリア生物時計の制御メカニズム解明

①時計タンパク質KaiCの六量体を構成する2つのリング構造解析

KaiCが有する2つのATPaseの役割を明らかにすることを目的として、KaiC六量体を構成するCIリングとCIIリングとよばれる2つのリング構造を個別に作製した。ゲル濾過クロマトグラフィーの解析により、CIリングは常に六量体構造を維持し、CIIリングは単量体へ解離する不安定な構造であることがわかった。また、その要因がCIIリングにある特定のトレオニン残基のリン酸化修飾であることを質量分析解析により明らかにした。

②時計タンパク質KaiCのC末端領域の機能解析

KaiC六量体には、リング構造から飛び出た約30アミノ酸からなるC末端領域が存在する。本研究においては、この領域を欠失させた変異型KaiC (N-Strep-KaiC487) を作製した。N-Strep-KaiC487のリン酸化状態は常に高リン酸化状態を示し、KaiAやKaiBを加えてもリン酸化状態は変化しなかった。さらに、Blue Native-PAGE解析では、N-Strep-KaiC487はKaiAともKaiBとも相互作用しないことが明らかとなった。KaiCはKaiAおよびKaiBと結合離脱を繰り返すことにより生物時計として機能が発揮されることから、N-Strep-KaiC487は時計としての機能失っていると考えられた。すなわち、C末端領域はKaiCが時計タンパク質として働くために必須の領域であることがわかった。

(4) シアノバクテリアの生物時計の圧力応答

①高圧蛍光法によるKaiCリン酸化サイクルの観察

KaiCリン酸化サイクルに伴う蛍光強度の観測を行った。1気圧と複数の高圧条件下による観測を各3回以上行い、平均値と標準偏差を求めた。

②KaiCのATP加水分解活性の圧力依存性

KaiCの野生型および変異体の高圧力下のATP加水分解実験を温度調節可能な耐圧容器と液体クロマトグラフィーを用いて行った。KaiC全体における活性に加え、CIまたはCIIの触媒能を欠如させた変異体を作製し、CIドメインとCIIドメインそれぞれの活性評価を1気圧と複数の高圧条件で行った。また、KaiC周期長変異体(R393CおよびF470Y)について、1気圧及び200気圧でATP加水分解活性の評価を行い、野生型と顕著に異なる結果を得た。それぞれ4回~17回の実験回数を重ね、平均値と標準偏差を示した。これにより、それぞれのドメインのATP加水分解に伴う活性化体積の算出に成功し、ドメイン間の差異についての定量的な解明に至った。

③KaiCリン酸化の圧力依存性

KaiABCおよびATPを混合した試料を、耐圧容器を用いて30°C、1気圧または高圧下で保管し、定期的なサンプリングを行った。KaiCのリン酸化率をSDS電気泳動法により定量した。1気圧及び高圧下におけるKaiCのリン酸化周期は、高圧蛍光測定により得られた蛍光強度の振動周期と良い一致を示した。KaiCのリン酸化周期が、KaiCのATPase活性と相関があることが示されているが、野生型KaiCについては高圧力下でも周期長とATPase活性に相関性があることがわかった。

④高感度NMR検出器を用いた³¹P-核磁気共鳴(NMR)法により、ATP由来およびADP由来のNMR信号、KaiC内のリン酸化セリン、リン酸化スレオニンの観測に成功した。

4. 研究の反省・考察

(1) 高圧力 NMR によるタンパク質の多様なコンフォメーションの構造、物性研究

①高圧力下で、ユビキチンやT4リゾチームなど複数のタンパク質について天然状態を逸脱した高いエネルギー状態（高エネルギー状態）を発見し、その構造やダイナミクス、水和の解析、部分モル体積変化など熱力学量の算出に成功した。

(2) コンフォメーション選択的な新たな作用機序をもつ抗 MRSA 薬の開発

①FtsZの2種類のコンフォメーションを確認でき、構造遷移を伴いながら、重合・解離サイクルが進行するという分子モデルを提案することができた。今後は、圧力下で重合サイクルの進行過程を直接観察する手法を試験する。

②高圧結晶成長法による結晶化方法を確立して、さらにトリプトファン変異体の作製・精製・結晶化にも成功したが、結晶の取り出しや凍結の際の技術的課題があり、構造解析することはできなかった。

③FtsZの親和性評価を、新たに阻害剤に蛍光側鎖を結合させた蛍光分子を設計・合成することで達成できたことは、今後抗菌剤リードの構造最適化において重要なステップである。

(3) シアノバクテリアの生物時計の制御メカニズムの解明

①KaiCの2つのリング構造の安定性の違いが明らかになった。2つのリング構造をコードするアミノ酸配列は相同性が高く、ともにATPaseとして働く。これらリング構造が互いに協同して24時間周期を刻む仕組みを明らかにするために、より詳細なKaiCのATPase活性測定、リン酸化状態の解析とともに構造解析も進める必要がある。

②KaiCのC末端領域が生物時計として機能に重要であり、特にKaiAのみならずKaiBとの結合にも関わっていることは新しい発見であった。3つの時計タンパク質の結合様式がより詳細になることで概日振動するタンパク質の制御解明が可能になると期待できる。

③高圧力下でKaiCリン酸化周期長やATP加水分解活性が変化することが分かった。周期長決定因子であるKaiCの構造や酵素活性が、進化的に温度変化に耐性を備えているのに対し（温度補償性）、圧力では比較的容易に変化することがわかった。

④シアノバクテリアの生物発光を数日間観測するためには、光と二酸化炭素の供給が必須となる。圧力下で生物発光を観測するためには、光と二酸化炭素の供給が可能な高圧顕微鏡システムの開発が必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Yamashita T, Mizohata E, Nagatoishi S, Watanabe T, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Nakayama T, Kado Y, Yokota Y, Matsumura H, Kawamura T, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T, Fujitani H, Tsumoto K Affinity improvement of a cancer-targeted antibody through alanine-induced adjustment of antigen-antibody interface Structure 27, 519-527 (2019).

②Tsuru Y, Maruyama M, Fujimoto R, Okada S, Adachi H, Yoshikawa H, Takano K, Murakami S, Matsumura H, Inoue T, Tsukamoto K, Imanishi M, Yoshimura M, Mori Y Crystallization of Aspirin Form II by Femtosecond Laser Irradiation Appl. Phys. Express 12, 015507(2019).

③Fujimoto R, Maruyama M, Mori Y, Okada S, Adachi H, Yoshikawa H, Takano K, Murakami

- S, Matsumura H, Inoue T, Imanishi M, Tsukamoto K, Yoshimura M, Mori Y Growth of high-quality metastable crystal of acetaminophen using solution mediated phase transformation at low supersaturation J. Cryst. Growth 502, 76-82 (2018).
- ④ Kobayashi N, Maruyama M, Mori Y, Fukukita S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Matsumura H, Inoue T, Yoshimura M, Nakabayashi S, Mori Y, Yoshikawa H Atomic-scale imaging of surface and hydration structures of stable and metastable acetaminophen crystals by frequency modulation atomic force microscopy J. Phys. Chem. C 122, 21983-21990 (2018).
- ⑤ Sato T, Matsukawa M, Mizutani Y, Iijima T, Matsumura H Initial, transient, and specific interaction between G protein-coupled receptor and target G protein in parallel signal processing: a case of olfactory discrimination of cancer-induced odors Arc. Med. Res. 6, 1801(2018).
- ⑥ Nii K, Maruyama M, Okada S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Yoshikawa H, Matsumura H, Inoue T, Imanishi M, Tsukamoto K, Yoshimura M, Mori Y Improvement of metastable crystal of acetaminophen via control of crystal growth rate Appl. Phys. Express 11, 035501 (2018).
- ⑦ Teramoto T., Azai C., Terauchi K., Yoshimura M., Ohta T. Soft X-ray imaging of cellular carbon and nitrogen distributions in heterocystous cyanobacterium, Plant Physiology 177, 52-61 (2018).
- ⑧ Oyama K., Azai C., Matsuyama J., Terauchi K., Phosphorylation at Thr432 induces structural destabilization of the CII ring in the circadian oscillator KaiC, FEBS Lett. 592, 36-45 (2018).
- ⑨ Kitazawa S., Aoshima Y., Wakamoto T., Kitahara R. Water-protein interactions coupled with protein conformational transition, Biophys. J. 115, 981-987 (2018).
- ⑩ Williamson, M.P. and Kitahara R. Characterization of low-lying excited states of proteins by high-pressure NMR spectroscopy, BBA Proteins & Proteomics 1867, 350-358 (2019).

(2) 口頭発表

- ① 松村浩由 「C4およびC3光合成調節タンパク質の動的構造機能解析」 新学術領域研究「新光合成」2018年度秋期領域会議 2018年11月11日
- ② 松村浩由ら、「光量変動と代謝調節をつなぐ新規分子の定量的手法を取り入れた構造機能解析」 新学術領域研究「新光合成」2018年度春期領域会議 2018年5月28日
- ③ 寺内一姫 「Kaiタンパク質による再構成系の温故知新」CyanoClock1.0、名古屋大学、名古屋市、2018年6月29日
- ④ 寺内一姫 「シアノバクテリア概日時計の周期長と環境」タンパク質研究の最前線、立命館大学、草津市、2019年3月20日
- ⑤ Kitahara R. et al. 「Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria」 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology、ピアザヴェルデ、沼津市、2018年9月19日
- ⑥ Kitahara R. et al. 「High-pressure NMR spectroscopy: Tools for studying protein dynamics」 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Dublin, Ireland (北原 招待講演) , 2018年8月21日

(3) 出版物

なし

非フラーレンアクセプターを用いた半透明有機薄膜太陽電池の開発

1. 研究の目的

有機薄膜太陽電池は貴金属を使用しない環境に優しい軽くフレキシブルな太陽電池である。この有機薄膜太陽電池はプラスチック基板上にロール・ツー・ロールなどの低温印刷プロセスを利用することで安価に大量生産できるため、ユビキタスな電源装置としての幅広い用途への応用が期待されている。特に、半透明有機薄膜太陽電池は、その意匠性と軽量性を生かすことで、ビルの窓ガラスやブラインド、マンションのベランダの手摺、ビニールハウスなど従来のシリコン太陽電池では困難であった場所への応用が期待されている。しかしながら、現状での有機薄膜太陽電池の光電変換効率はシリコン太陽電池の半分以下であり、実用化に向けては更なる高効率化が必要不可欠である。この様な中、最近非フラーレンアクセプター (non-fullerene acceptor) を用いた有機薄膜太陽電池が注目されている。これまで有機薄膜太陽電池には、フラーレンと呼ばれるサッカーボール構造を有する炭素材料が用いられていたが、この誘導体は伝導性に優れているものの、可視領域の光を吸収せず、光電変換にはほとんど寄与していなかった。そこで、強い光吸収特性を持つ非フラーレンアクセプターの利用が提唱され、近年有機薄膜太陽電池の高効率化に貢献している。本研究ではこの非フラーレンアクセプターを用いた半透明有機薄膜太陽電池を開発し、有機薄膜太陽電池の更なる性能の向上を目指すことを目的とした。具体的な研究テーマを以下に記す。

- (1) 非フラーレンアクセプターを用いた三元ブレンド薄膜太陽電池の開発
- (2) 新規非フラーレンアクセプターの開発
- (3) カーボンナノチューブシートを用いた透明薄膜太陽電池の高効率化

2. 研究の計画

本研究では上述の目的を達成するために主に以下の研究項目を実施することにした。

- (1) 非フラーレンアクセプターを用いた三元ブレンド薄膜太陽電池の開発
本研究ではこれまでPTB7という有機ドナーとPC71BM、およびITICという非フラーレンアクセプターを用いて三元ブレンド薄膜太陽電池の高効率化に関する研究を行ってきたが、本年度はより高効率かつ透明性が高いPTB7-Thを利用して三元ブレンド薄膜太陽電池の高効率化を実現する。
- (2) 新規非フラーレンアクセプターの開発
非フラーレンアクセプターとしてフェノチアジン誘導体を骨格に含む新たな非フラーレンアクセプターを合成し、有機薄膜太陽電池のn型有機半導体としての特性を評価する。
- (3) カーボンナノチューブシートを用いた透明薄膜太陽電池の高効率化
非フラーレンアクセプターを用いた太陽電池について、カーボンナノチューブシートと有機層との間のバッファ層に用いる材料の探索と作製条件の最適化を進める。

3. 研究の成果

平成30年度は当初の研究計画に従い主に三元系有機薄膜太陽電池の高効率化、新規非フラーレンアクセプターの開発、カーボンナノチューブ (CNT) シートを用いた半透明有機薄膜太陽電池に関する研究を行った。三元系太陽電池の開発に関しては順調に光電変換効率の向上が実現できたものの、非フラーレンアクセプターの開発に関しては当初目的としていた分子の合成には至らなかった。また、カーボンナノチューブ (CNT) シートを用いた半透明有機薄膜太陽電池に関する研究に関しては概ね順調に進捗しており、当該年度は更に、無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池にて有機

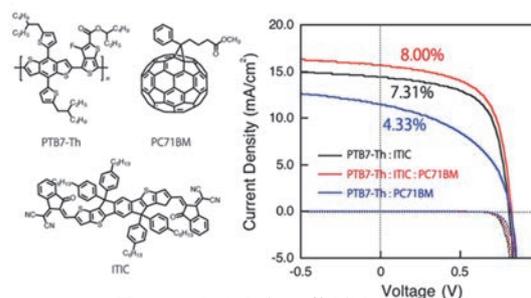


図1, 三元系有機薄膜太陽電池

薄膜太陽電池の高効率化が確認できた。各課題の具体的な進捗状況を以下に記す。

(1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

有機薄膜太陽電池の高効率化の新たな手段として3種の有機半導体を活性層にした三元系誘起薄膜太陽電池が注目されている。本研究では新たにPTB7-Th、PC71BM、ITICという3種類の有機半導体を組み合わせた薄膜太陽電池を作製し、その特性を評価した。その結果ITICとPC71BMの重量比が7:3の時に最も高い光電変換効率を示した(図1)。

(2) 新規非フラレンアクセプターの開発

今年度は主に新規非フラレンアクセプターとしてベンゾフェノチアジン(BTPT)誘導体の合成を行った。ベンゾフェノチアジンは可視領域に強い吸収を示す色素であり、溶解性を向上させるためにアルキル基を導入した(図2, 0-octyl-BTPT)。この分子は560nmに吸収極大を持つ分子であり、660nmに極大を持つ強い蛍光が観測された。単結晶X線構造解析の結果、BTPT骨格が π スタックにより一次元カラムを形成しており、溶解性が高いためスピコートによる成膜も容易であった。電界効果トランジスタ(FET)を作製し、キャリア輸送特性を調べた結果、ホール輸送性を示し、キャリア移動度は $2.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ であった。ただし、該当年度は更にアクセプター性置換基の導入を行う予定であったが、合成がうまくいかず目的の非フラレンアクセプターの合成まで行うことが出来なかった。

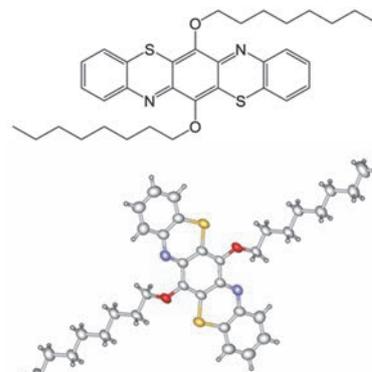


図2, 0-octyl-BTPTの構造式と単結晶X線構造

(3) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

透明太陽電池の開発に向けて、半透明太陽電池の特性評価を実施している。上部透明電極としてカーボンナノチューブ(CNT)シート、下部透明電極にITOを用いた太陽電池について、光照射方向と光電変換特性との関係について調べたところ、照射方向による短絡電流密度に顕著な違いが見られた。この原因を明らかにするために、異なる膜厚の有機層を持つ半透明太陽電池を作製し、短絡電流密度の光照射方向による違いの膜厚依存性を調べたところ、膜厚が厚くなるにつれてCNTシート側照射時の光電流が相対的に低くなる傾向が見られた(図3)。これは、短絡電流密度の差が透明電極の透過率の違いのみによって生じているのではなく、有機層内からの電子と正孔の取り出し効率の違いによる可能性が高いことを示唆している。このことは、バルクヘテロ構造を用いた透明太陽電池の最適化において、有機層の膜厚およびドナー材料とアクセプター材料のブレンド比などを考慮する際の有益な情報となると考えている。現在さらに詳細な検証実験および理論的検討を実施している。

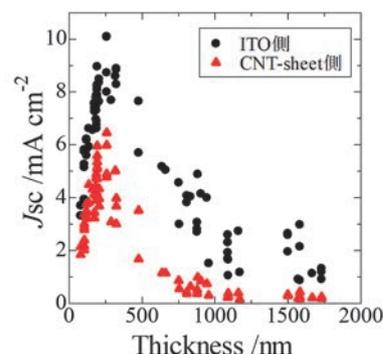


図3, 光照射方向による短絡電流密度の膜厚依存性の違い

(4) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池

当該年度は上記のテーマに加え、無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池の開発を行った。研究代表者はこれまで金属イオンと有機架橋配位子からなる配位高分子と呼ばれる無機・有機複合型ポリマーの研究を行っており、金属イオンと有機架橋配位子のエネルギー準位を考慮することで種々の半導体材料を合成してきた。特にホール輸送性を有するハロゲン化銅(I)と大きな π 共役平面を有するヘキサアザトリフェニレン(HAT)誘導体からなるd- π 複合体はバンドギャップの小さな半導体として振る舞い、更にその半導体をホール輸送層に用いた有機薄膜太陽電池が、従来のホール輸送層である MoO_3 を用いた太陽電池素子よりも、短絡電流密度が増大し、その結果として光電変換効率が向上することを見いだした(図4)。

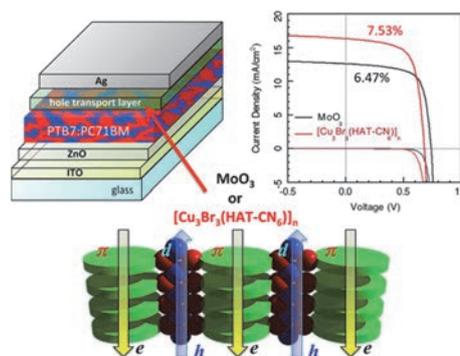


図4, 配位高分子をバッファ層とした薄膜太陽電池

4. 研究の反省・考察

(1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

三元系有機薄膜太陽電池に関してはPTB7-Tを用いることで従来の三元系有機薄膜太陽電池より高効率化が実現することを見いだした。ただし、そのメカニズムの解明に関しては更なる検討が必要である。また、今後は更なる高効率化に向けてバンドギャップの小さなドナーやLUMO準位の低い非アクセプターフラレンなどを検討していく。

(2) 新規非フラレンアクセプターの開発

今年度は主に新規非フラレンアクセプターとしてベンゾフェノチアジン (BTPT) 誘導体の合成を行いアルキル基を導入した0-octyl-BTPTを合成し、単結晶X線構造解析および基礎物性を測定したものの、アクセプター性置換基の導入には至らなかった。そこで、2019年度は有機合成を専門とする本学の須藤篤教授、松本浩一准教授にも本プロジェクトに参加してもらい非フラレンアクセプターの開発を加速することとした。

(3) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

カーボンナノチューブシートを用いた透明電極形成技術についてはある程度確立したが、形成時に100℃程度の加熱処理を必要とするために、有機層の種類によっては熱負荷による劣化が生じてしまい、適用が困難な場合が見られた。現在より低負荷な電極形成技術に取り組んでいるが、問題が生じる可能性がある。透明太陽電池に適した有機層の探索に加えて、電極形成技術もより発展させていく必要があるが、現状ではややこれが立ち遅れている。カーボンナノチューブ以外の透明電極材料についての探索も検討を進めていく予定である。光照射方向による光電変換特性の違いの原因については、興味深い結果が得られた。光電変換特性の照射方向依存性は透明太陽電池の最適化の指標の一つとなり得ると考えられるので、さらなるデータの蓄積と解析を進めていく。特に、現状では一種類の有機層での検討にとどまっているので、種々の有機層についても検証を進めていく必要がある。

(4) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池

本研究において、無機・有機複合ポリマーを有機薄膜太陽電池のバッファ層に用いることで、光電変換効率が向上することを見いだした。この技術は様々な有機薄膜太陽電池に応用可能であり、今後は膜厚の最適化や、金属イオンと有機配位子の組成比の最適化などを行い、有機薄膜太陽電池における汎用的な技術となり得るか検討を行う必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① “Measuring the competition between bimolecular charge recombination and charge transport in organic solar cells under operating conditions”, M. C. Heiber, T. Okubo, S.-J. Ko, B. R. Luginbuhl, N. A. Ran, M. Wang, H. Wang, M. A. Uddin, H. Y. Woo, G. C. Bazan, T.-Q. Nguyen, *Energy Environ. Sci.*, **2018**, *11*, 3019-3032.
- ② “P3HTの臭素化による π 共役長の短縮とP3HT:PCBMバルクヘテロ太陽電池の光電変換特性との相関”、義富 卓也、高田 謙、谷合 伯斗、安東 秀峰、松本 浩一、田中 仙君、電気学会論文誌C 2018年138巻11号 pp. 1298-1304.

(2) 口頭発表

- ① “Conducting Properties and Application to Organic Solar Cells of Coordination Polymers Consisting of Copper(I) Halides and Hexaazatriphenylene Derivatives”, T. Okubo, W. Genno, M. Okita, S. Shimakawa, K. Nakamura, K. Himoto, M. Maekawa, T. Kuroda-Sowa, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, Sendai, Japan, 2018年8月.
- ② “Crystal Structures and Carrier Transport Properties of Coordination Polymers Including Copper(I) Halides”, Takashi Okubo, Wataru Genno, Sanshiro Fukuda, Masahiko Maekawa, Takayoshi Kuroda-Sowa, 2018 Nankai International Symposium on Advanced Materials, Tianjin, China, 2018年11月.
- ③ “Conducting Properties and Application to Organic Solar Cells of Coordination Polymers including Copper(I) Halides”, Takashi Okubo, Wataru Genno, Misaki Ohkita, Sanshiro Fukuda, Masahiko Maekawa, Takayoshi Kuroda-Sowa, Advances in Organic and Hybrid Electronic Materials 2018 (AOHM19), Dubrovnik, Croatia, 2019年3月.
- ④ “半透明有機薄膜太陽電池の光電変換特性の膜厚依存性” 義富 卓也、田中 仙君、第79回応用物理学会秋季学術講演会、20p-PB4-7、2018年9月20日

⑤ "半透明有機太陽電池の光照射方向依存性" 義富卓也、田中仙君、有機エレクトロニクス研究会 (OME) 2018年11月28日

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	母乳中に含まれるメラトニンの乳幼児および母乳産生に対する役割 －母乳による乳児の覚醒と睡眠の制御－		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①母乳 ②メラトニン ③母乳産生制御 ④覚醒と睡眠 ⑤生理活性物質		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
前 田 智 司	薬 学 科	教 授	研究統括及び母乳中のメラトニンの定量・解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阿 部 賢 志	医 療 ビ ジ ネ ス 薬 学 科	准 教 授	メラトニンの定量法の確立
小 林 力	薬 学 科	教 授	研究データの解析
井 上 裕 子	薬 学 科	教 授	メラトニン合成関連遺伝子の解析
千 葉 健 史	北 海 道 科 学 大 学 薬 学 部	講 師	母乳産生に対するメラトニンの役割の解析

母乳中に含まれるメラトニンの乳幼児および 母乳産生に対する役割 — 母乳による乳児の覚醒と睡眠の制御 —

1. 研究の目的

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の測定法の確立および乳児に対する役割
 - ① 母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の測定方法の確立を行う。
 - ② 母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の乳児に対する役割の検討を行う。
- (2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。
 - ① 乳腺上皮細胞にメラトニン合成系が存在しているか確認を行う。
- (3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。
 - ① 母乳中のノルアドレナリンの定量を行う。
 - ② 母乳中のノルアドレナリンの役割の解明を行う。

2. 研究の計画

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の測定法の確立および乳児に対する検討
 - ① ヒト母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の精製方法および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた測定方法の確立を行う。
 - ② 授乳ラットまたはマウスを用いて、母乳を回収し、ヒト同様に生理活性物質の定量を行う。
 - ③ 母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の乳児に対する役割を授乳中のラットおよびその乳児ラットを用いて検討する。
- (2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。
 - ① 乳腺上皮細胞およびヒト乳腺上皮初代培養細胞を用いて、メラトニン合成経路の律速酵素であるアリルアミンN-アセチル転移酵素（AA-NAT）の発現をmRNAおよびタンパク質レベルで測定する。
- (3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。
 - ① 母乳中に含まれているノルアドレナリンの機能解明を行う。
 - ② ストレスにより母乳の質変化が起こるか検討を行う。

3. 研究の成果

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の精製法および測定法の確立
 - ① セロトニンおよびノルアドレナリンは固相抽出法により精製し、HPLCに電気化学検出器（ECD検出器）を組み合わせたHPLC-ECDで検出する方法を確立した。ヒト母乳中に含まれるセロトニンおよびノルアドレナリンの濃度はそれぞれ約30 ng/mL、500 ng/mLであった。これらの成果は論文として投稿した。メラトニンはクロロホルムを用いた液液抽出法により精製し、HPLCに蛍光検出器を組み合わせたHPLC-蛍光検出器によるメラトニンの定量法の確立を行い、現在定量中である。
 - ② マウス・ラット搾乳器を用いて、授乳中のラットより母乳の回収を行った。搾乳方法は、搾乳の4～6時間前に母親と子を隔離し、ラットにイソフルラン（40 mg/Kg）をオールインワン小動物用麻酔器を用いて吸入麻酔を行った。麻酔が効いていることを確認後、オキシトシンを0.2 U/kgで腹腔内注射し、10分間放置後、母乳の回収を行った。1匹あたり1-2 mLの回収であった。回収したラット母乳を用いて、クロロホルムを用いた液液抽出法によりメラトニンを精製し、HPLC-蛍光検出器の定量中である。
 - ③ 授乳ラットから母乳を搾乳する方法を習得でき、1回あたり、母親ラットが産生する母乳量を測定した結果、おおよそ2 mL程度であることが示された。今後、その量をもとに母乳か人口ミルクで育てたラットで学習の能力等に差がでるか検討を行う。

(2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。

①乳腺上皮細胞およびヒト乳腺上皮初代培養細胞を用いて、メラトニン合成経路の律速酵素であるアリルアミンN-アセチル転移酵素 (AA-NAT) の発現をmRNAおよびタンパク質レベルで測定し、AA-NATの発現を確認した。

(3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。

①乳腺上皮細胞にノルアドレナリンを添加し、母乳産生マーカーの1つである β -カゼインの発現量を測定したところノルアドレナリン濃度依存的に β -カゼインの発現量の低下が観察された。また、乳腺上皮細胞でノルアドレナリンが合成されているか、ノルアドレナリンの合成経路の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) をノックダウンし、ノルアドレナリンの量が減少していることを明らかにした。

②ノルアドレナリンはストレス応答に関係しており、ストレス時にノルアドレナリンを介したストレス応答が生じているか検討を行った。その結果、マウスを狭い筒状の容器にいれ、ストレスをかけた場合、母乳中のノルアドレナリンが有意に上昇し、 β -カゼインの発現量の低下が観察された。これらの成果は論文として投稿した。

4. 研究の反省・考察

(1) 母乳中に含まれる生理活性物質の測定法の確立

①セロトニン、ノルアドレナリン、ヒスタミンの精製は市販されている固相カラムを用いて精製法およびHPLCでの測定方法を確立することができた。しかしながら、メラトニンの精製には適した固相カラムがなく、クロロホルムを用いた液液抽出法を用いて行った。いくつかの固相カラムで精製可能か検討していたため、メラトニンの精製法確立までにはセロトニンやノルアドレナリンの精製法確立よりも時間がかかり、現在ヒトおよびラットの母乳中のメラトニン量を定量中である。

②授乳中のラットより母乳の回収を行った。市販のマウス・ラット搾乳器を用いてラットより母乳を回収している。搾乳を行うにも経験およびコツが必要であり、授乳ラットの体重が約300-350 gの場合、2 mL弱の母乳が搾乳できる。今後は、1回搾乳したラットを再度ケージに戻し、4-6時間後に再度母乳が搾乳可能か検討を行っていく予定である。

③母乳中に含まれる生理活性物質の乳児に対する役割に関しては、研究計画よりも遅れている。論文等を調査した結果、母乳中に含まれる生理活性物質のうち、メラトニンの合成酵素が自然発生的に欠損したマウスがおり、このマウスを用いてメラトニンの乳児ラットに対する役割の検討を行っていく予定である。

(2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。

①メラトニンの合成酵素であるAA-NATのmRNAおよびタンパク質レベルの発現は観察された。これまでに、乳腺上皮細胞はセロトニン、ノルアドレナリンの生合成系も有していることが報告されており、非常に興味深い結果であると考えている。今後は、プロラクチン刺激等でも発現の変動が生じるか発現制御機構も含めて検討を行っていく予定である。

(3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。

母乳中に含まれるノルアドレナリンに着目して、ストレスにより母乳産生の質の変化が起こることを今回の研究から示すことができた。しかしながら、ストレスにより母乳産生量の変化が起こるか検討することができず、今後は、ストレスにより母乳産生量の変化がおこるかヒトおよびマウス等を用いて検討を行っていく予定である。

本研究では、主に、母乳中に含まれる生理活性物質の母乳産生制御機構の役割を明らかにした。今後は乳児に焦点をあて、母乳中の生理活性物質の役割の解明を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①千葉健史, 前田智司, 工藤賢三, セロトニンを介した母乳産生制御メカニズム, 薬学雑誌, 138(6), 829-836 (2018).

②Chiba T., Maeda T., Fujita Y., Takeda R., Kikuchi A., Kudo K. Stress-induced suppression of milk protein is involved in a noradrenergic mechanism in the mammary gland., *Endocrinology*, 160(9), 2074-2084(2019年)

(2) 口頭発表

- ① 勝治みなみ, 千葉健史, 前田智司, 藤田融, 武田リカ, 菊池昭彦, 工藤賢三, 乳腺上皮細胞にはノルアドレナリンのオートクライン機構が存在する, 第138回日本薬学会年会, 金沢, 3月 (2018)
- ② 石黒絵理香, 齋藤祐真, 千葉健史, 平船寛彦, 前田智司, 工藤賢三, 授乳中のストレスは、母乳中ノルアドレナリンを増加させる, 第138回日本薬学会年会, 千葉, 3月 (2019).

(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共に、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為に、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ることを目的としている。前年度までに、神経伝達物質及び電気刺激が有効な惹起法である可能性を示した。平成 30 年度は、(1)神経伝達物質刺激に用いるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化、(2)ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣した電気刺激に対する神経ネットワーク活動の変化とシナプス結合強度の変化を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の計画

(1) 神経伝達物質刺激に用いるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化

平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン(iCell DopaNeurons, Cellular Dynamics International)を 8.0×10^5 cells/cm² の密度で培養し、細胞種の同定および受容体の機能について以下の 2 つの方法で評価した。

①ドーパミンニューロン、グルタミン酸ニューロン、GABAニューロン抗体による細胞種の同定を行い、中脳ドーパミンニューロンのマーカーであるFoxa2の発現、D1受容体、D2受容体の発現の確認を行った。

②培養したドーパミンニューロンにおける受容体の電気生理学的機能を評価する為に、D1 receptorのアゴニストであるSKF 83822、D2 receptorのアンタゴニストであるHaloperidol、セロトニン再取り込み阻害剤であるSertraline、Paroxetineを累積投与し、自発活動の変化を調べた。

(2) 徐波刺激による神経ネットワーク活動の変化とシナプス結合強度の変化

ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣した 1 Hz の電気刺激(LFS)をヒト iPS 細胞由来神経ネットワークに入力することで、睡眠恒常性仮説で提唱されている LTD 現象が見られるかを調べた。具体的には、培養 10 週目の Gluta neuron ネットワーク (GABA ニューロンも含む) に LFS を入力し、以下の 2 つを調べた。

①自発活動の発火数、同期バースト数(SBFs)の変化

②シナプス強度の変化

3. 研究の成果

(1) 神経伝達物質刺激に用いるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化

①グルタミン酸、GABA、TH (ドーパミンニューロンマーカー) 抗体で染色した結果、使用した Dopaminergic neuron には、TH 陽性ニューロンだけではなく、グルタミン酸ニューロンや GABA ニューロンも含有していることが判った。次に、Dopaminergic neuron の特徴づけのために、中脳の Dopaminergic neuron の発生や維持に重要な転写因子の 1 つである Foxa2 を染色した [Fig 1A(a)]。今回培養したドーパミンニューロンは中脳の Dopaminergic neuron であることが確かめられた。また、anti-dopamine D1 receptor と anti-dopamine D2 receptor の発現も確認された [Fig 1A(b)]。

②培養した DA neuronal network に D1 receptor のアゴニストである SKF 83822、を投与すると、D1 様受容体が活性化され、10 μ M で同期バースト発火数が $184 \pm 34.3\%$ に増加した [p=0.0227, Fig 2(a)]。D2 receptor のアンタゴニストである Haloperidol を投与すると、0.1 μ M で同期バースト発火が $137 \pm 19.6\%$ に増加し、1 μ M では $3.33 \pm 3.33\%$ に減少した

[$p=0.004$, Fig 2(b)]. 3 μM 投与時には、バースト発火が消失した。Haloperidolは、低容量時にはD1 receptorに作用し、高容量時には5-HT2 receptorに拮抗作用を示すことが報告されている。0.1 μM では、D1レセプターの活性化により同期バースト数が増加し、1 μM 以上の用量では5-HT2レセプターへの作用により同期バースト数が減少したものと考えられる。

セロトニン再取り込み阻害剤のSertraline、Paroxetineを投与すると、10 μM で同期バースト発火が見られなくなった[Fig 1B(d), (e)]。SertralineとParoxetineはratのVTAのDA neuronの自発活動を阻害させることが報告されている。本実験による同期バースト発火の消失は動物実験での報告と類似した結果となった。

また、DMSOの累積投与では顕著な応答は見られなかった[$p>0.999$, Fig 1(c)]。以上から、培養したDA neuronal networkにはD1 receptor、D2 receptor、Serotonin receptorが存在しており、in vivoドーパミンニューロンと同様の電気生理学的特徴を有していることがわかった。

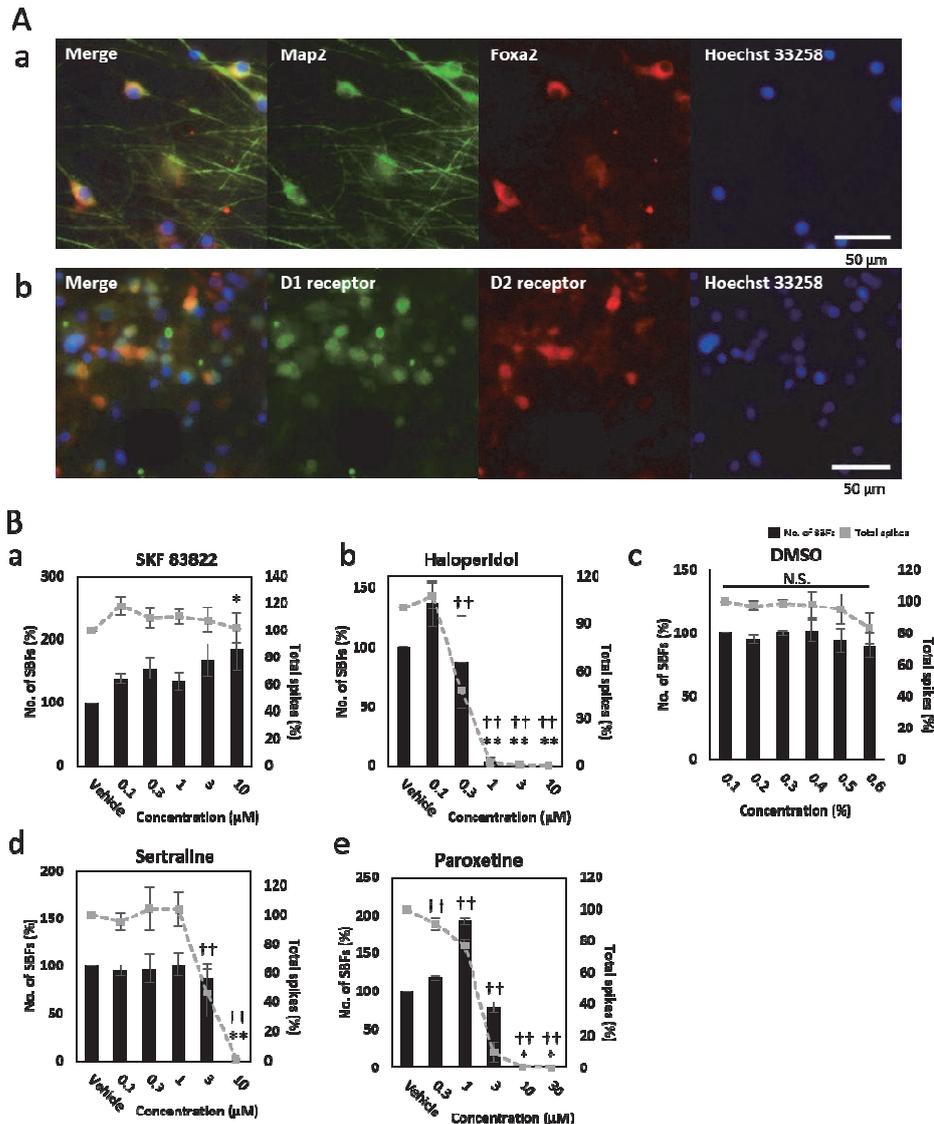


Figure 1. 神経伝達物質刺激に用いるヒトiPS細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化. (A) 23WIVのiCell DopaneuronのFoxa2及びD1およびD2受容体の免疫蛍光画像. (a) Foxa2の発現. (b) ドーパミン受容体発現の確認. (B) SKF 83822, Haloperidol, DMSO, Sertraline, Paroxetine投与におけるSBFsおよび発火数の変化. One way ANOVA検定及び, Dunnett's検定を行った. [$*p<0.05$, $**p<0.01$ vs. vehicle (SBFs), $\dagger p<0.05$, $\dagger\dagger p<0.01$ vs. vehicle (total spikes)].

(2) 徐波刺激による神経ネットワーク活動の変化とシナプス結合強度の変化

① 1 Hzの電気刺激 (LFS) による自発活動の発火数、同期バースト数 (SBFs) の変化

睡眠時に脳波で見られる徐波を模倣した1 Hzの電気刺激を外部から入力することで、培養したヒト神経ネットワークに睡眠状態が惹起できるか検証した。実験の概念図を

Fig 2A(a)に示す。まず、電気刺激入力前に3時間の自発活動計測を行い、その後、90分を1セットとした刺激セットを4回入力した。刺激セットを4回行った後、3時間の自発計測を行った。培養したヒトiPS細胞由来神経ネットワークは1 Hzの電気刺激に追従する形で誘発応答を示した[Fig 2A(b)]。電気刺激直後15分間の発火数は、4回それぞれ、 $85.7 \pm 2.74\%$ (195–210 min)、 $82.1 \pm 2.06\%$ (285–300 min)、 $80.3 \pm 2.52\%$ (375–390 min)、 $78.4 \pm 2.77\%$ (465–480 min)に減少した($p < 0.01$, one way ANOVA及びDunnett検定)。また、4回目の電気刺激後4時間(After、690–705 min)で刺激直前(Before、165–180 min)の状態まで回復した($93.3 \pm 3.23\%$, $p = 0.0756$, t test)。15分間毎の同期バースト発火数(SBF数)の変動をFig 2B(b)に示す。総発火数と同様に刺激前の165–180分のデータを100%として算出し、赤は電気刺激直後の15分間のデータを示している。赤で示した電気刺激直後15分のSBF数は、stim 1の直後から順に、 $84.5 \pm 5.05\%$ (195–210 min)、 $81.6 \pm 4.86\%$ (285–300 min)、 $80.1 \pm 4.81\%$ (375–390 min)、 $78.5 \pm 3.47\%$ (465–480 min)に減少した($p < 0.05$, one way ANOVA及びDunnett検定)。また、stim 4の電気刺激後30分(After、480–495 min)で刺激前の状態(Before、165–180 min)に回復した($101 \pm 4.37\%$, $p = 0.899$, t test)。以上から、睡眠時の徐波を模倣したLow frequency stimulation (LFS)後に、ヒトiPS細胞由来神経ネットワークの自発活動頻度が減少し、時間と共に回復する現象が繰り返し見られることがわかった。

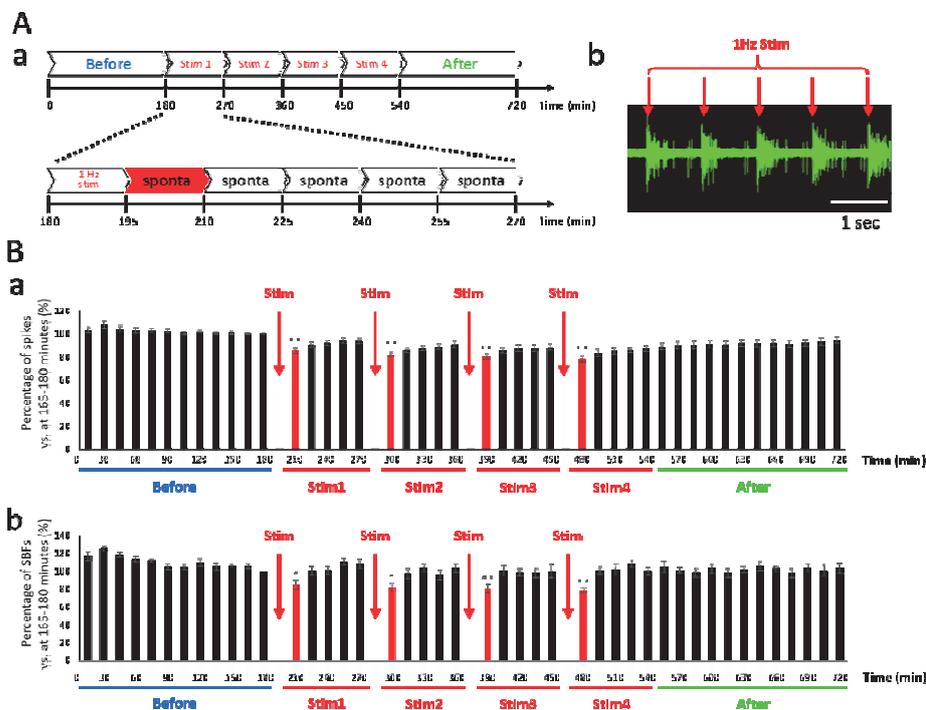


Figure 2. 徐波刺激による神経ネットワーク活動の変化. (A) 実験概要. 90周期で1 Hzの電気刺激を入力した. (a) 実験概念図. (b) 電気刺激に対する神経ネットワークの誘発応答の典型例. (B) 徐波刺激に対する神経ネットワークの応答 (n=8). 一回目の電気刺激の直前の15分間(165–180 minutes)を100%とした. (one way ANOVA及びDunnett's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 165–180 minutes).

②LFSによるシナプス強度の変化

LFSによる細胞間のシナプス結合強度の変化を2つの電極間の電気活動の同期性で評価した。ある電極の1発のスパイクに対して100 ms以内に別の電極のスパイクがある場合、その2つのスパイクをSynchronized spikeとして、カウントした(Fig 3A(a), top)。カウントしたSynchronized spikeを定量化するために、各電極のスパイク間隔(ISI)をランダムに入れ替えたsurrogate dataを100個作成し、同じようにSynchronized spikeをカウントした(Fig 3A(a), bottom)。100個のsurrogate dataから得られたSynchronized spikeの平均と標準偏差から、実際のスパイクデータのSynchronized spikeのZスコアを算出した(Fig 3A(b))。その結果、LFS後はZスコアが減少し、神経ネットワークの結合強度が減少していた。さらに、電極同士の距離が近いほど刺激直後15分間のZスコアが優位に減少

した (Fig 3B)。また、Sporadic spikesのBeforeのZスコアが2.58を超える ($p < 0.01$ の有意水準) 電極のペアのZスコアの減少率は85.6%、一方Zスコアが2.58以下のペアのZスコアの減少率は53.2%であった (Fig 3C)。これらの結果から、刺激前のZスコアが大きい、すなわち結合強度が強いものがZスコアの減少が大きいことが分かった。Sporadic のデータについてBeforeのZスコアの平均が2.58を超える電極のペアのみを解析の対象とし、ZスコアのLFSに対する時間変化を評価すると、電気刺激直後15分間のZスコアはStim 1から順に、 $76.4 \pm 6.53\%$, $74.0 \pm 5.43\%$, $71.7 \pm 7.86\%$, $70.3 \pm 4.77\%$ に有意に減少した (Fig 3D)。ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣したLFSは神経ネットワーク内の結合強度を弱める、つまり、ネットワークの興奮性を弱める傾向が認められた。

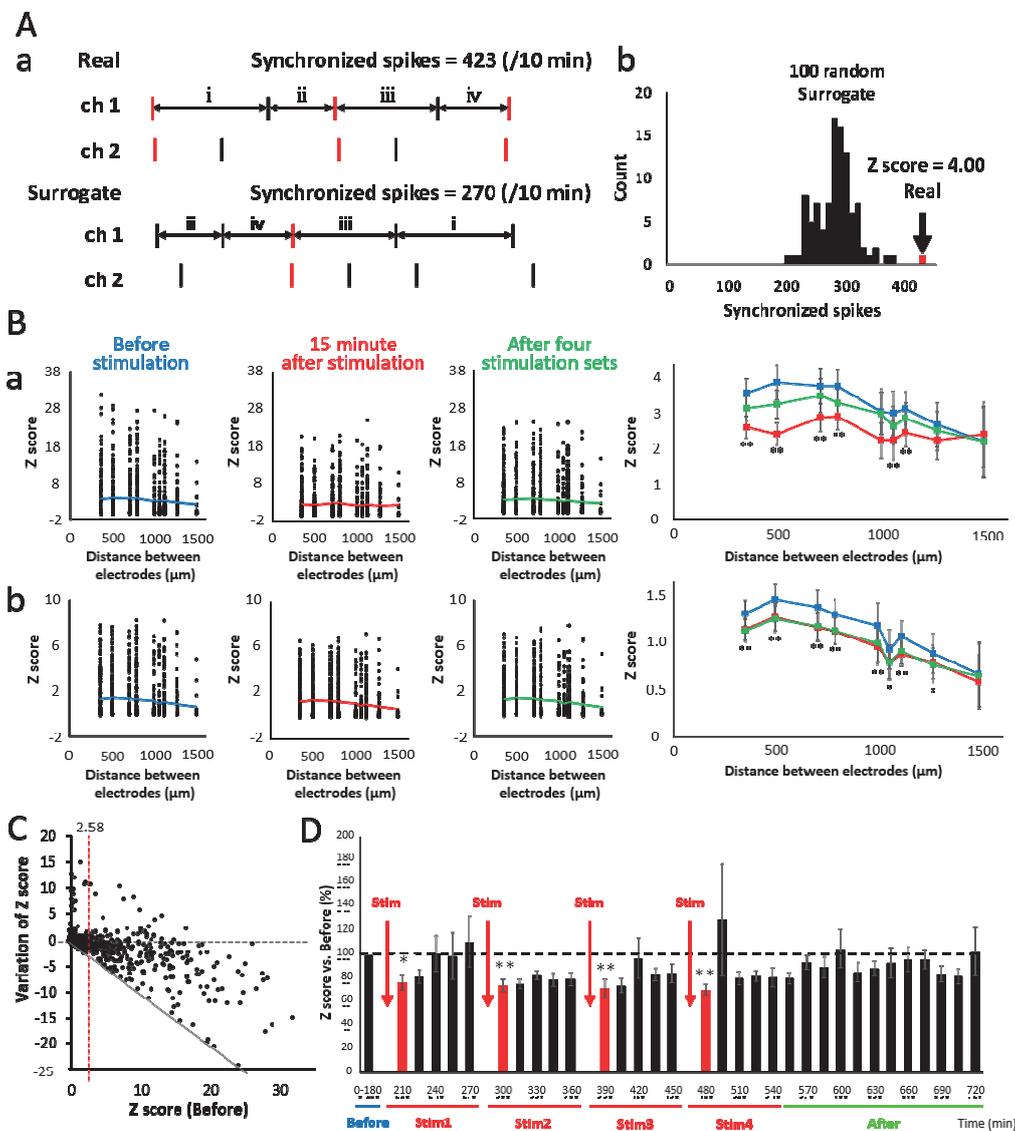


Figure 3. 徐波刺激によるシナプス結合強度の変化. (A) シナプス結合強度の定量化. (a) 2電極間のSynchronized spikesのカウント. (b) RealデータとSurrogateデータのSynchronized spikesの数のヒストグラム. Surrogate(black), Real(red). (B) 電極間の距離とZスコア. SBFs以外のspike (Sporadic spikes)とSBF内のspike (Burst spikes)に分けてそれぞれのZスコアを算出した. 左の3つのグラフはBefore stimulation(blue), 15 minute after stimulation(red), After for stimulation sets(green)のZスコアを示す. 点は電極ペアごとのZスコア、実線は電極距離ごとの平均を示す. 右のグラフは電極距離ごとの平均を示す ($n=8$ well \times 120ペア). 検定は、Before stimulationと15 minute after stimulationとでt検定を行った (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Before stimulation). (a) Sporadic spikes. (b) Burst spikes. (C) Sporadic spikesの電気刺激前のZスコアと刺激後の変動 ($n=8$ well \times 120ペア). 検定はBeforeと15 minute after stimulationとでone way ANOVA 及びDunnett's testを行った (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Before stimulation).

4. 研究の反省・考察

使用しているヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンの基礎的な性質を調べ、中脳のDopaminergic neuron であること、D1 receptor、D2 receptor、Serotonin receptorが存在しており、*in vivo*ドーパミンニューロンと同様の電気生理学的特徴を有していることがわかった。また、ノンレム睡眠時に出現する徐波に注目し、それを模擬する低頻度の電気刺激を標本に対して加えた実験からは、LFS刺激は、ヒトiPS細胞由来神経ネットワーク内の結合強度を弱めることがわかった。この結果は、シナプス結合が睡眠時に純減するという現象を再現している可能性がある。さらに、低頻度刺激を行う前のz scoreと低頻度刺激によるz scoreの変化量との関係を調べたところ、元々z scoreが大きい電極の組み合わせほど、低頻度刺激後にz scoreが減少する傾向を見出した。この結果は、全ての電極において同じ強度で刺激を加えているにも関わらず、シナプス結合の減弱は一樣ではなく一部（特に元々強い結合）にのみ誘導されることを示唆している。これは、徐波はシナプス結合を一樣に減弱させるのではなく、強い結合を減弱させる、言い換えれば結合強度のばらつきを解消させるように回路を変化させることを暗示しており、とても興味深い。

睡眠恒常性仮説では、ノンレム睡眠中に観察される特徴的な脳波である約1 Hzの徐波がニューラルネットワークのシナプス結合を弱めることが示唆されている。本研究は、培養ヒト由来神経ネットワークにおいて、睡眠恒常性仮説を支持する初の結果と言える。

睡眠関連薬剤の応答は今年度実施できなかった為、来年度に実施する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Remi Yokoi, Miho Okabe, Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Akihiro Karashima, Ikuro Suzuki, Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons, *Front. Neurosci.* 13:554. 1-15, 2019

(2) 口頭発表

横井れみ, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, *in vitro*ヒトiPS細胞由来神経ネットワークへ睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 第18回日本再生医療学会, 2019, 兵庫

横井れみ, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, 神経伝達物質および電気刺激は培養ヒトiPS細胞由来神経ネットワークに睡眠・覚醒様リズムを惹起する, 日本安全性薬理研究会 第10回学術年会, 2019, 東京

(3) 出版物

なし

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索する。
- (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、層状超伝導物質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特性評価
 - ① 昨年度に引き続き、ガリウム (Ga) イオンを用いる集束イオンビーム (FIB) 加工装置とアルゴン (Ar) イオンを用いるイオン照射装置を組み合わせ、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し、本研究予算で導入するデジタルオシロスコープを用いて、その特性を評価する。
 - ② Bi2212結晶に含まれる遷移金属元素の組成比を整数比に近づけた単結晶試料による固有ジョセフソン接合素子を作製し、その特性を評価する。
 - ③ Bi2212系固有ジョセフソン接合素子に対するスイッチング電流分布測定とスイッチングレート解析から高次位相スイッチ現象について探査し、高分子イオン検出への応用可能性を探る。
- (2) 層状超伝導体の単結晶薄膜の作製とストリップ線路型素子の作製
 - ① 層状超伝導物質の良好なへき開性を利用した機械的剥離法を用い、銅酸化物系および鉄系超伝導体の単結晶薄膜を作製し、その特性を評価する。
 - ② イオン検出時の瞬時的撃力印加に伴う微小素子部の破損を回避するための絶縁保護膜を本研究予算で導入するスパッタ装置を用いて成膜し、その特性を評価する。
 - ③ 得られた単結晶薄膜に対してイオン照射装置を用い、ストリップ線路状の微細加工素子を作製し、その特性を評価する。
- (3) 機械的振動刺激を用いたイオン検出原理の検証実験
 - ① 従来手法によるイオン検出実験は環境整備に時間がかかるため、イオン衝突によるフォノン発生と類似する機械的振動を用いる新手法を提案した昨年度の研究成果に基づき、瞬時的な機械振動を印加する実験装置を開発し、本研究予算で導入する微小振動計測システムを用いて性能を評価する。
 - ② 機械的振動刺激に伴う特性変化を直接観測するための実験条件を詳細に調べ、最適化を図る。

3. 研究の成果

- (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特性評価
 - ① 昨年度の研究成果で判明したFIB加工時のダメージ層がArイオン照射によって除去することができ、固有ジョセフソン接合素子のスイッチング電流密度向上など特性向上に有効なことが判明した。さらに、2つのスリット部分をFIB加工する際に生じる非晶質層を除

去するため、Si基板上に作製した微小孔（50 μm 四方）と微小接合部が一致するように、Si基板上に素子を設置し、FIB加工後に上下からArイオン照射する新たな素子作製方法を確立した。また、固有ジョセフソン接合素子のアレイ化、多重化に向け、2つの微小固有ジョセフソン接合素子を直列に接続した2段型固有ジョセフソン接合素子の作製に成功した。

- ② Bi2212結晶の場合、遷移金属元素(Bi, Sr, Ca, Cu)の組成比が必ずしも化学量論的整数比にならず、臨界電流密度などの超伝導特性に影響することが知られている。このため、整数比(2:2:1:2)に近づけた単結晶試料を本学理工学部物理・数理学科の下山淳一教授より提供していただき、その固有ジョセフソン接合素子の電流電圧特性と位相スイッチング特性を詳細に評価した。その結果、1つの素子に複数のジョセフソン接合が含まれる固有ジョセフソン接合素子において、各接合の特性ばらつきが従来に比べて非常に小さくなった反面、ある電流値近傍で測定されるスイッチング電流分布に、近接する複数のジョセフソン接合が関与してしまい、スイッチング電流分布が多重ピーク化しやすいつなが分かった。この特徴は位相スイッチング特性の解析を難しくするが、単一接合からの寄与のみと判断できる実験結果について解析すると、従来の素子に比べて臨界電流密度が飛躍的に増大していることが分かった。以上のことから、固有ジョセフソン接合素子の特性制御には、遷移金属イオンの組成比制御が重要なことが判明した。
- ③ Bi2212結晶のCaサイトをYで置換すると、超伝導転移温度や臨界電流密度に強く影響するキャリア注入量を系統的に制御することができる。本実験では、Y置換したBi2212単結晶試料から作製した固有ジョセフソン接合素子を用い、有限電圧状態からの位相スイッチ事象（高次位相スイッチ）に対するスイッチング電流分布のキャリア注入量依存性を調べた。その結果、高次位相スイッチでは、従来の人工的ジョセフソン接合アレイでは観測されなかったタイプの接合間相互作用の影響が強く示唆され、原子スケールでジョセフソン接合が密接する固有ジョセフソン接合系に特有の複雑な位相ダイナミクスが明らかになった。このような複雑な位相ダイナミクスは、イオン衝突に伴うフォノンとの相互作用にも強く影響すると考えられる。したがって、その位相ダイナミクスの解明は、新しい検出原理に向けた重要な知見をもたらすものと期待される。

(2) 層状超伝導体の単結晶薄膜の作製とストリップ線路型素子の作製

- ① 昨年度得られた絶縁性樹脂の熱硬化条件を再吟味すると共に、石英基板に塗布する絶縁性樹脂の体積についてもデジタルマイクロスコープによる形状測定から定量化し、粘着テープによる機械的剥離法を用いて、Bi2212単結晶薄膜を再現性良く作製する条件を決定した。さらに、今年度から本格的に単結晶育成を開始した鉄カルコゲナイド超伝導体Fe(Te, Se)に対して、同様な機械的剥離法を用い、粘着テープに付着した薄膜試料をSi基板に直接転写することにより、膜厚0.2 μm 以下の極薄膜試料を作製することに成功した。段差計を用いた膜厚測定と表面粗さ測定から、長さ数十 μm にわたり平坦な微小極薄膜試料が得られていることが判明した。Bi2212単結晶の方が、へき開性はより優れていると考えられるので、この手法はBi2212単結晶の極薄膜作製にも十分役立つものと期待される。
- ② 今年度導入したスパッタ装置を用いて、Si基板上にSiO₂またはSiNの絶縁保護膜（膜厚は約50nm）を成膜した。成膜後の微細加工におけるダメージの影響を試験するため、直径が数十nmの微小孔（ポア）を作り、微小孔を通過するDNAの泳動観測を行った。
- ③ ①で得られたBi2212単結晶薄膜に対して、ストリップライン状のフォトマスクをフォトリソグラフィ技術によって作製し、Arイオン照射を用いてストリップライン素子を作製した。昨年度判明した電極パターンの不備を改良し、液体窒素温度（約77K）までの電気抵抗測定を実施したが、超伝導特性は確認できなかった。薄膜試料の場合、膜厚減少と共に大気暴露による劣化が生じやすくなることを考慮すると、今回の実験結果から、ストリップライン素子の作製においても絶縁性保護膜の形成が必要なことが強く示唆される。

(3) 機械的振動刺激を用いたイオン検出原理の検証実験

- ① ピエゾ素子を2枚貼り合わせたバイモルフ素子の先端に細いタングステン棒を取りつけ、タッピングと呼ばれる機械的振動刺激を与えるための駆動装置を作製した。駆動試験として、ノコギリ歯状の電圧波形をピエゾドライバに入力し、タングステン棒の先端が $\pm 100 \mu\text{m}$ 程度に振動していることを確認した。また、高分子イオンの衝突実験時を想定し、

DNA分子がSi基板表面に付着する様子の直接観測を試みた。DNA分子を浸したエチレンジアミン四酢酸(EDTA)溶液中にSi基板を置き、リンス後、AFM顕微鏡を用いてDNAの付着を確認することに成功した。

- ② バイモルフ素子に細い金属針を取り付け、ピエゾドライバを用いて発生させた機械的撃力を圧電センサに加え、発生する衝撃振動をデジタルオシロスコープで直接観測した。実際のイオン衝突時の衝撃とほぼ同じ機械的振動刺激を作製するには、様々なパラメータを調整する必要があるが、今年度は、まず、金属針と圧電センサとの距離、およびノコギリ歯状の電圧波形の振幅値や勾配値を系統的に変えた実験を繰り返した。その結果、金属針には硬い材質を用いる方が衝撃に伴う変形の影響を低減できること、および、金属針と圧電センサの位置をリニアステージで制御する方が、互いの距離を数十 μm 単位で制御でき、再現性の高い実験結果が得られること、が判明した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 「研究の成果」の項(1)の①～③で述べた研究成果は、本研究の目的(1)に向けた重要な成果であり、研究の着実な進展を示している。特に、固有ジョセフソン接合素子を、①の素子作製技術、②の単結晶特性、③の位相ダイナミクス、と各方面で探求し、各々成果を挙げている点を強調しておきたい。本研究の目的(1)で挙げた新しい検出原理の創出には、このような基礎的研究成果の蓄積こそが最も重要であると考えられる。
- (2) 「研究の成果」の項(2)の①～③で述べた研究は、本研究の目的(2)に向け、今年度最も注力した研究である。特に、①で述べた鉄系超伝導体単結晶に対する微小極薄膜の作製は、本研究の提案時には全く想定しておらず、予想を大きく上回る進展を遂げたと評価できる。今後は、この技術を Bi2212 単結晶に適用していく予定である。一方、③で作製した Bi2212 ストリップライン素子の超伝導特性を確認できなかった点は、保護膜形成の重要性に対する認識不足を痛感した。その背景として、機械的剝離法による薄膜試料の作製とその素子化は、固有ジョセフソン接合素子の作製に比べて、まだ研究期間が短く、昨年度と今年度では、卒業研究の担当学生の入れ替わりにより、作製技術の進展が一進一退する状況にあったと考えられる。この点を反省し、翌年度は、大学院修士課程の院生と大学院進学予定の卒業研究生に薄膜試料作製を担当してもらい、高品質な薄膜作製技術の確立に努める。
- (3) 「研究の成果」の項(3)の①～②で述べた研究は、実験環境整備に多くの時間と費用を必要とするイオン衝突実験の実施を見直し、3年間の研究計画で一定の研究成果を挙げるために優先すべき研究として昨年度計画したものである。(1)や(2)で述べた固有ジョセフソン接合素子や超伝導薄膜素子に機械的振動刺激を加えて、その応答を直接観測する実験までは達しなかったが、①および②共に着実な成果を挙げる事ができた。翌年度以降、低温環境下での機械的振動印加実験に向けた装置開発に着手し、本研究の目的(1)および(2)に向けた新しい生体高分子イオン検出の技術開発に引き続き取り組んでいく考えである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 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* **1054**, 012030 (2018).
- ② Y. Watabe, S. Umegai, H. Ohnuma, A. Yamaguchi, J. Shimoyama, and H. Kitano, “Dynamics of Phase Switch in the Intrinsic Josephson Junctions Made of Bi2212 with Perfectly-stoichiometric Cation Compositions”, *Journal of Physics: Conference Series* **1054**, 012031 (2018).
- ③ H. Kitano, A. Yamaguchi, Y. Takahashi, S. Umegai, Y. Watabe, H. Ohnuma, K. Hosaka, and D. Kakehi, “Enhancement of macroscopic quantum tunneling in the higher-order phase switches of Bi2212 intrinsic Josephson junctions”, *Journal of Physics: Conference Series* **969**, 012065 (2018).

④T. Kubota, K. Lloyd, N. Sakashita, S. Minato, K. Ishida, and T. Mitsui, “Clog and Release, and Reverse Motions of DNA in a Nanopore”, *Polymers* 2019 11(1), 84, <https://doi.org/10.3390/polym11010084>.

(2) 口頭発表

①北野晴久, 大沼遥, 宮沢貴麿, 山口彩未, 保坂和孝, 孫悦, “Bi2212固有ジョセフソン接合系におけるマイクロ波照射時の位相スイッチングレート解析”, 日本物理学会2018年秋季大会(2018年9月9日), 9aA332-7.

学 校 名	上 智 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	水を溶媒とする環境調和型有機反応の汎用化 －水を溶媒とする低廃棄物プロセスの開発－		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①温度応答性ポリマー ②水中有機反応 ③触媒反応			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 教 之	理 工 学 部	教 授	研究総括およびポリマー合成・触媒反応実施

○研究分担者

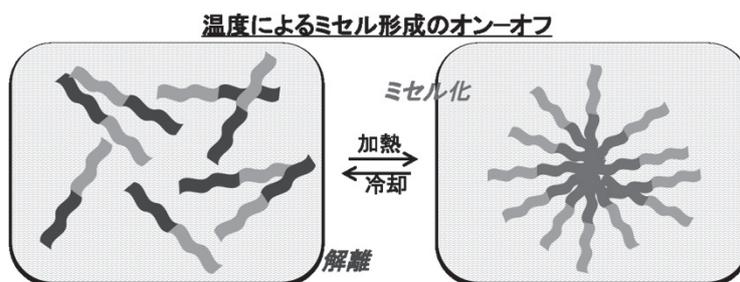
氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
陸 川 政 弘	理 工 学 部	教 授	ポリマー分析・データ解析

水を溶媒とする環境調和型有機反応の汎用化 —水を溶媒とする低廃棄物プロセスの開発—

1. 研究の目的

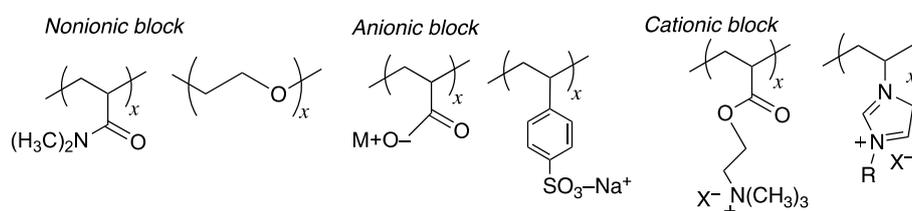
(1) 国連が設定した「持続可能な開発目標(SDGs)」の一環でもある環境保全の観点から、近年有機化学工業においては、水を溶媒とするプロセスの構築が望まれている。界面活性剤を用いてミセルを形成する方法は水中に疎水場をつくる有効な手法であるが、反応後に生成物を分離するために有機溶剤を必要とする。本研究では、温度応答性のポリマーを用いて水中にミセルを作ったり消したりする系を創製し、それを反応媒として用いることにより生成物の単離を容易にするプロセスを開発することを目的とした。その実現のために、32 °C 付近に下限臨界溶解温度(LCST)をもち、不連続的に親水—疎水性が変化するポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) [PNIPAAm] を適用した。PNIPAAm と親水性ポリマーのブロック共重合体は、LCST 以上で高分子ミセルを形成することが知られており、これに触媒機能を付与することによって、水中に分散する温度応答性の疎水性反応場を創出することを目指した。具体的には以下の目的を設定した。

- ① ポリマーに固定化された触媒を用いる再利用可能な水中触媒溶液の調整
- ② より汎用性の高いシステムの構築を目指した、外部添加触媒による反応系の開発



2. 研究の計画

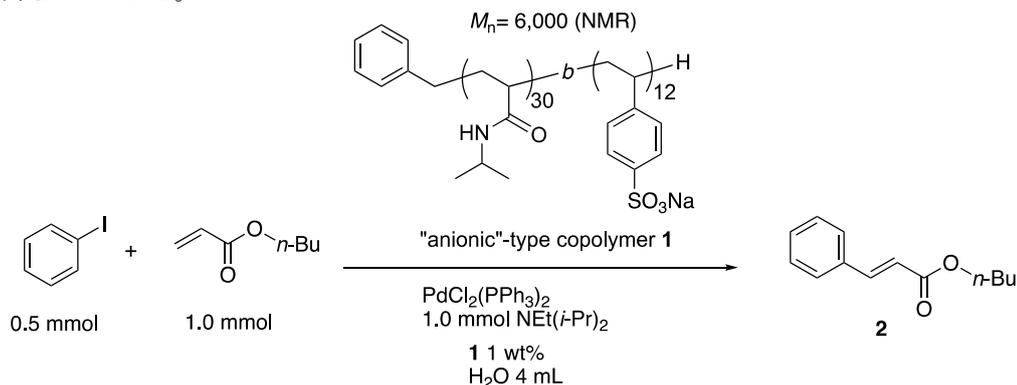
- (1) リビングラジカル重合によるブロックコポリマーの合成手法に基づき、温度応答性ブロックとしてイソプロピルアミド・エチルアミドなど種々の下限臨界共溶温度をもつセグメントを有するポリマーを新たに合成する。さらに、親水ブロックの鎖長を変えたポリマーについて濃度、温度、基質などミセルの形成・解離条件を検討する。
- (2) 親水性ブロックについては、アニオン性セグメントが有効であることがこれまでの検討から分かってきた。この合成のために、ポリマー末端にイオウ残基を有する RAFT 重合による合成からイオウを含まない ATRP 重合への転換を検討する。今後金属触媒を用いる反応への展開のため触媒毒となるイオウを含まない系が必要となるためである。また触媒はこれまでランダム重合によって導入してきたが、より高度に制御された反応系のために、ポリマー鎖一本について1原子の触媒を含む系を検討する



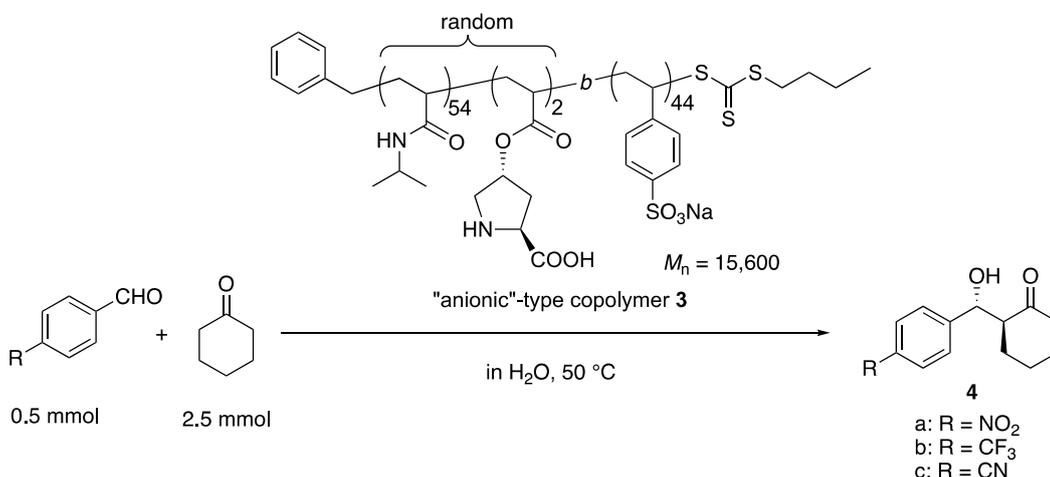
3. 研究の成果

- (1) 現在までに分子鎖長の差違はミセルの形成・有機反応の成績に大きな影響を与えないことが分かってきた。アニオン部位をベンゼンスルホン酸にしたブロックコポリマー**1**を合成し、これを用いたところ水中での触媒反応をより高い温度で行うことができるようになったので、これを用いてパラジウム触媒による有機反応を種々試みた。溝呂木-Heck 反応ではヨードベンゼンとアクリル酸ブチルからケイ皮酸ブチル**2**が収率よく得られた。また他のアルケンを用いた反応でも良好な収率で生成物を与え、反応系の汎用性が示された。その他鈴木-

宮浦反応、菌頭反応など主だった反応が収率よく進行し、かつ生成物を高効率で回収できることを明らかにした。



(2) 有機触媒である L-プロリンをポリマー鎖中に固定化した両親媒性ポリマー**3**を合成し、水中での不斉アルドール反応、不斉マイケル反応を検討した。既報では親水性部位にポリエチレングリコール鎖を用いていたが、これには反応後の生成物回収に手間がかかるという課題があった。そこでアニオン性の親水性部位を用いたところ収率・エナンチオ選択性を保ったまま回収効率を向上することに成功した。不斉アルドール反応では水中で 50°Cでおこなった反応にも関わらず 98%ee という高い光学収率を達成した。



4. 研究の反省・考察

- (1) 計画の中で、セグメント鎖長を種々変えたポリマーを合成する計画であったが、特に短い鎖長をもつポリマーはその精製が予想外に困難であることがわかり、進捗が遅かった。それに伴い種々モノマーを試みる計画にも遅れが生じたことが反省すべき点である。
- (2) パラジウムおよびプロリンを触媒とする反応が水の中で速やかに進行することが明らかとなった。これにより両親媒性ポリマーが形成するミセルが水中反応に有効であることを示すことができた。さらに温度応答性ポリマーの長所を活かす反応条件の探索が課題である。また検討の中で、親水性部位を変えることにより冷却条件下での有機層-水層分離が良好に進む例が見出された。これが再現性よく現れるようになれば、生成物の効率的回収が可能になるためより環境調和的な反応の実現に近づけたと言える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① "Palladium-catalyzed Mizoroki-Heck reactions in water using thermoresponsive polymer micelles" Noriyuki Suzuki, Taiga Takabe, Yoshiko Yamauchi, Shun Koyama, Rina Koike, Masahiro Rikukawa, Wei-Ting Liao, Wen-Sheng Peng, Fu-Yu Tsai, *Tetrahedron*, **2019**, 75, 1351-1358.

(2) 口頭発表 なし

(3) 出版物 なし

以上

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
橋 詰 峰 雄	工 学 部	教 授	細胞機能の評価、材料物性評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
飯 島 一 智	横 浜 国 立 大 学 工 学 部	准 教 授	遺伝子発現解析、免疫染色
大 澤 重 仁	理 学 部 第 一 部	助 教	高分子設計、細胞機能評価

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の治療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。また人工関節は、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を開発を目指す。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は硝子軟骨へと分化誘導されていることが示唆されてきた。本年度では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) 軟骨組織形成に重要なパラメータの選定と最適化

効率的な組織再生には、細胞、足場、成長因子の三要素が重要である。移植に用いる細胞としては間葉系幹細胞を選択しており、これが IPN ゲル中で軟骨細胞に分化誘導されやすいことはこれまでで確認済みである。続いて本検討では、分化した軟骨が効率的に組織を形成するために必要な足場、成長因子の条件について検討する。具体的には IPN ゲルへの加水分解性の付与、また成長因子の足場への結合リンカーの長さを変えることが、ゲル内で培養する軟骨細胞の組織再生能に与える影響について検討する。

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。先行研究で効果があるとされるスフェロイドによる軟骨組織再生と比較すると、IPN ゲル中ではより多くの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。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、関節軟骨を形成する主成分である硝子軟骨と考えられ、また既存のスフェロイド培養に対する優位性が示された。軟骨組織が IPN ゲル内で形成したのであれば、軟骨組織由来の力学的強度が加味されるため、IPN ゲルの強度が向上すると考えられるが、レオメーターにより実際は培養経過に伴う力学強度の向上は確認されなかった。おそらく間葉系幹細胞は IPN ゲル中では軟骨細胞に分化が進んでいるのであろうが、その後の細胞外マトリックス形成などといった軟骨組織形成に関わる機能についてはまだ不十分であり、軟骨細胞の機能を上げるためのより高機能化した IPN ゲル設計が課題として見えてきた。

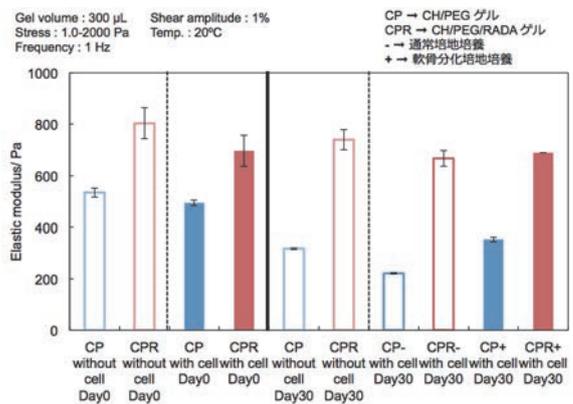


図1. 培養経過に伴うゲルの力学強度測定

(2) ゲルへの分解性の付与と軟骨細胞

IPN ゲルは軟骨再生に伴って分解・吸収あるいは代謝され、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安全性の観点から望ましい。また分解性を持つ足場は、分解により内部空隙が広がることで足場に内包された細胞が産生する ECM 蓄積量を増加させるという点より、組織形成能を高める効果も報告されている [Nicodemus, G. D. *et al.*, *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008, 14, 149-165]。本年は、両末端を官能基化した PEG と加水分解性ポリ乳酸 (PLA) を含む ABA 型ブロック共重合体 (NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS) をゲルの分解性架橋剤として合成し、これを介して CHI を基盤としたゲル CHI/PEG-PLA-PEG を作製し、CHI/PEG と比較評価した。CHI/PEG-PLA-PEG は CHI/PEG と比較して大きな重量減少が見られ、またさらに、内包した軟骨細胞のコラーゲン生成能が向上することが見出された (図 2) [S. Ishikawa *et al.*, *Biomater. Sci. and Eng.*, *in press.*]。ゲルへの分解性の付与が、安全性のみならず軟骨組織再生能にも重要であることが見出された。

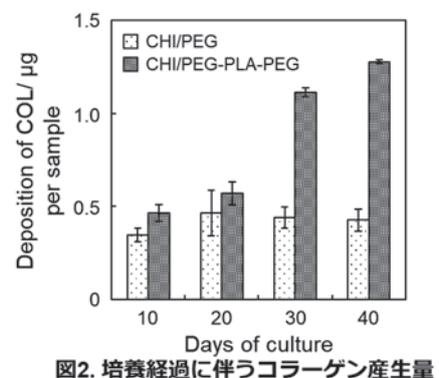


図2. 培養経過に伴うコラーゲン産生量

(3) ゲル中への成長因子の担持

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

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足場内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。実際の細胞移植を想定した場合、担持する成長因子は他の組織に拡散しないよう、足場中に化学的に結合しておく必要がある。加えて、足場中に成長因子を化学結合した方が、持続的に成長因子が細胞と相互作用するため、より効果が高いという報告もある [S. Rajabi *et al.*, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018;12:e438-e450]。本検討では、さらに足場内で化学結合した成長因子の効果を高めることを志向し、足場材中での成長因子の配置、運動性が重要であるとの仮説から、成長因子と足場材とを化学的に繋ぐリンカーの長さに着目し、これを変化させることによる組織再生機能向上を検討した。具体的には CHI に対して柔軟性の高い PEG リンカーを介して成長因子を化学結合させ、この CHI を基盤として調製した IPN ゲルを用いた軟骨細胞の三次元培養系について、PEG リンカーの分子量を変化させた時の軟骨細胞の機能変化を評価した (図 3)。軟骨組織形成能の指標である GAG 産生量は、PEG リンカーの分子量によって変化し、特に分子量 2000 Da である時に顕著に高かった。足場材と成長因子をつなぐリンカーの長さが、効率的な組織再生を促すために重要なパラメータであることが確認された。

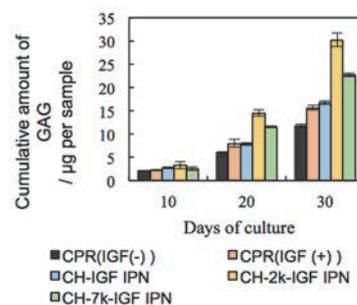


図3. 成長因子と足場をつなぐPEGリンカーの長さが異なるIPNゲル中で培養した軟骨細胞それぞれのGAG産生量。

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、さらに架橋剤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 担持方法の検討など 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通り進捗している。一方、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた軟骨分化の検討については、今後、分解性ゲルと成長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より明確にすることで、硝子軟骨再生足場としての IPN ゲルの有効性を示すことに注力する。また、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

- ① Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, Kohei Sasaki, Mineo Hashizume, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka, Cartilage Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Silica Nonwoven Fabrics, *Appl. Sci.*, **8**, 1398-1412, 2018.
- ② Kazutoshi Iijima, Shohei Ishikawa, Kohei Sasaki, Mineo Hashizume, Masaaki Kawabe, and Hidenori Otsuka, Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics, *ACS Omega*, **3**, 10180-10187, 2018.
- ③ Kazutoshi Iijima, Seiko Ichikawa, Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Yusuke Yataka, Hidenori Otsuka, and Mineo Hashizume, Preparation of Cell-Paved and -Incorporated Polysaccharide Hollow Fibers Using a Microfluidic Device, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, In press.
- ④ Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Kazutoshi Iijima, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa, and Hidenori Otsuka, N-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, In press.
- ⑤ Kazutoshi Iijima, Shun Ohyama, Kazuya Yuyama, Atsushi Shono, and Mineo Hashizume, Selective Fabrication of Hollow and Solid Polysaccharide Composite Fibers Using a Microfluidic Device by Controlling Polyion Complex Formation, *Polym. J.*, **50**, 1187-1198, 2018.

(2) 口頭発表

- ① 石川昇平, 飯島一智, 大澤重仁, 飯島道弘, 大塚英典, キトサン/PEG/RADA16で構造化した相互侵入高分子網目ゲルへの生分解性付与と軟骨組織再生足場への応用, 第68回高分子討論会, 北海道大学, 2018年9月
- ② Shohei Ishikawa, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka, Articular Cartilage Regeneration Using Growth Factor Installed, Degradable and Injectable Hydrogel with Interpenetrating Polymer Network, 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Japan, Dec. 2018.
- ③ Hiro Yamaguchi, Shohei Ishikawa, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka, Preparation of Growth Factor Conjugated Injectable IPN Hydrogel and the Effect of Conjugation-Linker Length on Improvement of Embedded Chondrocyte Function, 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Japan, Dec. 2018.
- ④ Kazutoshi IIJIMA, Shohei ISHIKAWA, Mineo HASHIZUME, Hidenori OTSUKA Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Electrospun Silica Nonwoven Fabrics. 第28回日本MRS年次大会、福岡県・北九州国際会議場、2018年12月
- ⑤ Shohei Ishikawa, Hiro Yamaguchi, Kazutoshi Iijima, Shigehito Osawa, Michihiro Iijima, Hidenori Otsuka. Acceleration of Articular Cartilage Regeneration in Degradable and Injectable IPN Hydrogel Containing Growth Factor. 日本化学会第99回春季年会、甲南大学、2019年3月

(3) 出版物

- ① Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, and Hidenori Otsuka, (Ed. Alexandru Mihai Grumezescu), “Micro- and Nanotechnologies in Biomedical Engineering (multi volume SET 1-14), VOLUME 11: Biomedical Engineering Techniques” Elsevier, 25, 2018.
- ② Shigehito Osawa and Hidenori Otsuka, (Ed. Alexandru Mihai Grumezescu), “Micro- and Nanotechnologies in Biomedical Engineering (multi volume SET 1-14), VOLUME 11: Biomedical Engineering Techniques” Elsevier, 22, 2018.
- ③ 飯島一智, 石川昇平, 大塚英典, “Journal of the Japan Society of Colour Material, 講座「新しい機能をもった先端材料」、再生医療における繊維材料” J. Jpn. Soc. Colour Mater., 5, 2018.
- ④ Shigehito Osawa and Hidenori Otsuka, “PEGylation: Advances in Research and Applications” Nov. Sci. Pub. USA., 20, 2018.
- ⑤ 石川昇平, 大塚英典, “Colloid & Interface Communication 「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構造(IPN) ゲルへの生分解性付与と組織再生足場への応用」” Coll. Int. Comm. 日本化学会, 3, 2018.
- ⑥ Mineo Hashizume, Kazutoshi Iijima, and Yusuke Yataka, “Surface Modification of Polymer Substrates for Hydroxyapatite Coating Using Biomimetic Processes, Chapter 2: Nanostructured Materials -Synthesis, Properties, and Applications” Nova Scientific Publishers, 2019.

学 校 名	神 奈 川 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	“可逆的”燃料電池用電極触媒の新展開 －計算化学と実験の融合による新規材料の創製－		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①燃料電池 ②水分解 ③電極触媒 ④酸素還元・生成反応 ⑤水素酸化・生成反応			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 本 太	工 学 部	教 授	研究代表者・総括 電極触媒の探索

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 邊 豊 和	防 衛 大 学 校	講 師	電極触媒の電子顕微鏡による キャラクタリゼーション
大 坂 武 男	神奈川大学工学研究所	客 員 教 授	電極触媒の電気化学的性能評価
郡 司 貴 雄	工 学 部	助 教	電極触媒の合成・放射光による キャラクタリゼーション
ブヤチャン ハン	Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea	教 授	電極触媒デザインの計算化学的検討

“可逆的”燃料電池用電極触媒の新展開

— 計算化学と実験の融合による新規材料の創製 —

1. 研究の目的

- (1) コア（金属）-シェル（窒素ドーパカーボン）の窒素ドーパカーボンの精密合成条件の検討
- (2) コア（金属）-シェル（窒素ドーパカーボン）の耐久性の検討
- (3) 高触媒機能を発現するコア材料の探索・理論的検証

2. 研究の計画

- (1) 窒素ドーパカーボン中の窒素のドーパ量と窒素ドーパカーボンの層数が触媒活性に大きな影響を与えることが明らかになっている。この計算予測を確証できるような窒素ドーパカーボンナノ粒子の生成条件を確立させる。
- (2) 可逆的燃料電池のカソードでは、酸素の還元反応とその逆反応が起こることから常に触媒は酸素雰囲気下にさらされている。さらに電極は高電位下におかれるため、サンプルの酸化劣化は重要な問題である。そこで合成した電極材料の“オペランド”電子顕微鏡観察によって、劣化機構を明らかにし、それを次の触媒デザインに反映し、触媒性能を向上させる。
- (3) 対象とする酸素還元反応(ORR)に関し、Ptの*d*-バンドセンターの位置とORR触媒活性との相関が広く議論されている。ORRの反応は、 O_2 がPt表面に吸着するところから始まり、電子を受け取って、還元生成物がPt表面から脱離することにより終了することから、 O_2 の2*p*軌道と相互作用するPtの5*d*軌道の位置が O_2 の吸着の度合いに関係し、Pt単独の電子状態より、ORRの反応に適切な電子状態をチューニングすることが必要と考える。窒素ドーパカーボンシェル中のコア金属、合金、金属間化合物を様々に変えたものを合成し、触媒性能を検討することで、さらに、計算結果との比較を繰り返すことにより、最適なコア物質を提案し、さらに電気化学的な活性評価を詳しく行う。

3. 研究の成果

- (1) コア（金属）-シェル（窒素ドーパカーボン）の窒素ドーパカーボン材料を精密合成するための条件を明らかにした。コア金属をカーボンブラック担持体に高分散で担持させる方法として、ポリオール法を適用することを考案した。カーボンブラックに担持された金属ナノ粒子の表面を炭素コートするための出発材料としてスクロースを用い、炭素化するためのアニール温度の最適化を行った。また、窒素ドーパのための窒素源として尿素とその量を最適化した。
- (2) 合成したサンプルのORR活性はこれまで報告されている非白金材料の場合と同様にOnset potentialが0.6 V vs. RHEであった。この値は、目的としている窒素ドーパカーボン材料を合成ができていることが確認できた。しかし、ORR活性はORRを続けると徐々に減少してしまう結果を得た。
- (3) *d*-バンドセンターの位置とORR触媒活性との相関を示す火山型のプロットの完成にはいたらなかったが、Pt系の材料において検討を進め、ORR活性においては当初の予想通りに火山型のプロットを得ることができた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 窒素ドーパカーボン材料の作製条件のアニール温度によってカーボンコートの表面に生成する官能基が違ってくるということが明らかになり、合成条件と官能基の量などの関係性がつかめた。しかし、また、当初の目的である窒素ドーパカーボンの単層の合成を完成できて

いない。これまで合成した多層材料を二酸化炭素ガスで焼成することで、多層を一層、一層除去して、単層を作る条件を今後見出す必要がある。

(2) ORR 活性が反応当初高く、その後、減少してくるのは、コア金属が徐々にイオンとなって溶出してしまい、コア金属と ORR が起こっている窒素ドープカーボン材料との電子的な相互作用がなくなっていることによると考えられ、コア金属が窒素ドープカーボン材料に完全におおわれていないために、コア金属表面が電解液に接してしまっているため、溶出してしまおうと考えた。薄い窒素ドープカーボン材料をコア金属ナノ粒子表面に作ることに注力してしまっただけで、窒素ドープカーボン材料が覆っていない部分ができてしまっていた。全体にある程度厚く作り、その後、上述したアニール過程を工夫することで全体に均一で単層のコート構造を作る条件を明らかにしていく予定である。

(3) この研究結果は非常にインパクトがある内容であることから学術誌に論文として投稿準備中である。8 月末までには投稿を完了する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① F. Matsumoto, F. Ando, T. Gunji, T. Ohsaka, Tuning of d-Band Center of Platinum Nanoparticles by Changing Transition Metal Oxide Support Materials for Enhancement of Oxygen Reduction Reaction, ACS catalysis, 投稿準備中

(2) 口頭発表

特になし

(3) 出版物

特になし

学 校 名	大 阪 大 谷 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究	研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①磁気力 ②タンパク質結晶 ③非定常短細線加熱法 ④磁気浮上 ⑤熱伝導率 ⑥熱拡散率 ⑦異方性 ⑧磁気アルキメデス効果		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
牧 祥	薬 学 部	助 教	計測装置開発、データ解析、実験担当、論文執筆担当

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宇 田 川 周 子	薬 学 部	講 師	実験担当

タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究

1. 研究の目的

- (1) 非定常短細線加熱法と磁気アルキメデス効果による磁気浮上を併用してタンパク質結晶の熱物性値（熱伝導率と熱拡散率）を詳細に計測する。
 - ①熱物性値の温度依存性を調べる。
 - ②タンパク質結晶とタンパク質溶液の定圧比熱 C_p をそれぞれ推算し、それぞれのエンタルピを推定する。
 - ③タンパク質結晶とタンパク質溶液のエンタルピと温度の状態線図を作成し、結晶化条件の探索を試みる。
- (2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べる。
 - ①磁場配向を利用してタンパク質結晶の方位を制御し、非定常短細線加熱法を利用して熱物性値の異方性の存在を確認する。
 - ②異方性が存在する可能性が示された場合は、その効果を定量的に議論する。
- (3) 結晶成長時の熱対流の効果を実験と数値計算で予測する。

2. 研究の計画

- (1) 熱物性値の詳細計測のために以下の計画で研究を進める。
 - ①従来の非定常短細線加熱法のプローブの材質はタングステン(W)製で、リード端子と短細線の溶着が悪くて破断しやすく、長時間測定が困難であった。そこでプローブ材質を変更し、耐久性を向上させた新しいプローブを開発する。
 - ②熱拡散率は熱伝導率を密度と定圧比熱の積で割った値である。結晶の密度は比較的容易に測定出来るので、非定常短細線加熱法を利用して定圧比熱が推定出来る。その結果、タンパク質結晶とタンパク質溶液のエンタルピを推定出来る。ただし熱拡散率は測定誤差が指数項に入るため誤差が拡大しやすい。熱拡散率の測定は熱伝導率よりも慎重な実験を行う。
 - ③精度の高い測定が可能になった段階で、エンタルピと温度の状態線図の作成に着手する。結晶の析出個数や大きさは毎回異なることが予想されるので、実験回数を多くすることで状態線図の精度を高める。
- (2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べるために以下の計画で研究を進める。
 - ①鉛直上向きの磁気力で結晶を浮上させる方法は短細線と磁場配向した結晶 c 軸が垂直になる。この方法は既に確立し実験回数を重ねてデータの精度を高めてきた。一方、短細線と磁場配向した結晶 c 軸が同方向になるためには超電導マグネットを水平傾斜し、半径方向磁気力で磁気アルキメデス効果を成功させる必要がある。この方法は初の試みであり、成功するかどうかさえ不明であるが、理論的には可能である。磁気浮上に適した場所は限定されているため、設置位置を目視で微調整出来る可視化装置の開発を行いながら研究を進める。またプローブ全体の小型化も試みる。
 - ②一方、半径方向磁気力で結晶を磁気浮上させることに失敗した場合も想定して研究を進める。二液法による結晶化は磁気浮上法よりも結晶成長を制御しにくいことから、結晶が側壁で発生するリスクも考慮しなくてはならない。なるべく低過飽和状態で結晶化させる条件探索を実施するとともに、独自の結晶化容器を開発して、短細線周囲に確実に結晶が付着するように工夫する。
 - ③異方性が存在するかどうかの検証は困難が予想される。そのため統計解析の手法を利用して検証する。磁場配向の有無や方向を変えた結晶の温度特性は一元配置分散分析あるいはクルスカル・ウォリス検定と比較し、それぞれの特性曲線は共分散分析で評価する。
- (3) 磁気熱対流の影響を調べるために以下の計画で研究を進める。

タンパク質溶液は沈殿剤に塩化ガドリニウムを使用していることから常磁性溶液となっている。そこでガドリニウム塩を作動流体とする対流効果の可視化実験を実施する。

可視化は感温液晶を使って実現し、まだほとんど報告されていない容器側面からの観察を行う。熱損失の効果も定量的に推算する。また三次元数値計算を利用して流動形態を比較・予想する。

3. 研究の成果

(1) 熱物性値の計測の研究成果は以下である。

- ①プローブ材質を白金(Pt)に変更し耐久性と長時間計測の実現をした。温度を変えながらタンパク質結晶の熱物性値計測を実施することが容易になったことで、熱物性値の温度依存性を調べることに初めて成功した。
- ②使用したタンパク質結晶(卵白リゾチーム)の密度は既に先行研究で明らかになっている。その数値を利用してタンパク質結晶とタンパク質溶液のそれぞれのエンタルピを推算することに初めて成功し温度依存性も明らかにすることが出来た。しかし熱拡散率の測定誤差は熱伝導率の場合よりも大きく、実験精度の向上が必要であった。測定データのばらつきの原因として電気回路内部の問題と、回路外部の問題のそれぞれを検討している。しかし詳細は依然不明である。現在、電流と電圧のケーブルを被覆ケーブルに変更することで基準電圧の安定化に成功した。エンタルピと温度の状態線図の作成に向けて研究は順調に進んでいる。
- ③実験回数を増やすという当初の計画は、上記②の課題が克服された後になる。実験手順はほぼ確立させることが出来たので、慎重に研究を進めていく。

(2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べる研究の成果は以下である。

- ①ボア軸中心から偏心させた場所であるほど効果が顕著であることや、磁気浮上可能な場所が幅わずか1センチメートル程度の限られた場所でのみであることなど、多くの困難を予想していたが、こうした諸問題は超電導マグネットボア内部を直接観察出来る独自の可視化装置を開発することで克服出来た。超電導マグネットを水平傾斜した場合の電源ケーブルを支える支持台の製作も課題であったが、非磁性材質の脚立を利用することで安全に固定出来た。こうした入念な準備の結果、研究開始からほぼ半年で、半径方向磁気力でタンパク質結晶を磁気浮上させることに初めて成功した。浮上した結晶(リゾチームの正方晶)はどれもc軸が水平方向に磁場方向し、初めて見る特異な析出様態であった。この場所に非定常短細線加熱法のプローブを固定し、短細線周囲に結晶を付着させることが出来れば、磁場異方性の効果を確実に明らかに出来る。なお、半径方向磁気力は鉛直方向磁気力よりも弱いことが数値計算によって当初から予測していたが、本研究では5T以上の強磁場が必要であった。これは従来の磁束密度の2倍以上もあり、磁気力換算では4倍以上に相当した。安全に結晶化を行う必要性から、沈殿剤濃度を高め、より小さな磁場で磁気浮上出来る条件を探索中である。
- ②二液法では短細線を密度の異なる二液界面に固定して結晶を短細線に付着させる必要がある。しかしその界面はメニスカスによって湾曲し短細線に結晶を付着させることが非常に困難であった。そこで容器の底に穴をあけて細管路を設置し、高比重溶液をシリンジに導通させることで、結晶成長を観察しながら二液界面の高さを調整出来るように改造した。この結晶化容器の使用により、二液法による熱物性値の計測に初めて成功した。そして鉛直方向磁気力で浮上成長させた結晶と熱物性値の比較を初めて実現出来た。半径方向磁気力で浮上させた結晶の熱物性値計測はこれからであるが、少なくとも異方性の存在を示す有力な手がかりを明らかにすることが出来た。
- ③鉛直方向磁気力で浮上させた結晶と磁場なし条件で成長した結晶のそれぞれの熱物性値(熱伝導率および熱拡散率)について、まず、温度依存性をクルスカール・ウォリス検定した。その結果、温度依存性が有意に存在することを統計的に明らかにした。温度依存性は最小自乗法で定式化した。次に、磁場配向の効果が熱物性値に与える影響について共分散分析で評価した。その結果、鉛直方向磁気力で浮上成長させた結晶と二液法で磁場なし条件で成長させた結晶の温度依存性には、統計的な交互作用が認められた。これは即ち、磁場配向の効果が熱物性値に影響している可能性を示唆していた。半径方向磁気力で浮上させた結晶の熱物性値測定はこれからであるが、磁場配向の効果を確認する準備はほぼ整っている。

(3) 磁気熱対流の影響を調べる研究の成果は以下である。

結晶成長時の熱対流の効果を感温液晶で可視化した。結晶化溶液が常磁性になっていることから、対流の作動流体も同じガドリニウム塩による常磁性流体を用いた。熱損失の推定はChurchill and Ozoeの方法で定量的に行った。磁気熱対流の強さはレイリー数と

ヌセルト数で評価し、自然対流との相似性は磁気レイリー数で評価した。また三次元数値計算も実施した。最終的に全ての結果を Silveston の実験式と比較し、磁気レイリー数でヌセルト数を整理すると良い一致を見た。この研究結果は査読付学術論文で発表した。

4. 研究の反省・考察

(1) 熱物性値の計測の研究についての反省

プローブの材質変更とタンパク質結晶の温度依存性の測定は順調に実現させることが出来、論文化もあまり時間はかからなかった。しかし、未だに論文を受査させることが出来ないでいる。不査査の理由としてタンパク質結晶の熱物性値計測の重要性が不明であるというコメントが多かった。そこで二液法による測定結果と、タンパク質溶液の温度依存性のデータを追加して論文内容の充実を図った。内容の大幅な変更のために時間が多くかかってしまい現在に至っている。測定結果には自信があるので、論文の査査に向けて全力を傾ける必要がある。

(2) タンパク質結晶の熱物性値の異方性を調べる研究についての反省

半径方向磁気力で結晶を磁気浮上させる場合、適当な場所がマグネットボア内部の狭小な空間のみに限定されていることは数値計算で当初から予測していた。しかし本当に浮上するかどうかは未知であった。だから半径方向磁気力でタンパク質結晶を磁気浮上成長させることに初めて成功した成果は、今後の研究を大いに進展させる画期的な成果であった。先行研究を見ても、超電導マグネットを水平にして行った実験はモーゼ効果くらいしか知られていない。本研究は超電導マグネットの新しい活用法を提案することに繋がるかもしれないと考える。一方、結晶を浮上させることには成功したが、短細線に結晶を付着させることに成功したわけではない。鉛直方向磁気力に比べて大きな磁場を印加しなければ浮上が実現しないので、その問題を解決する必要がある。論文成果を査査するまでには、まだ多くの時間がかかるのは間違いない。また、本研究では二液法による結晶化も同時に進めているが、当初の計画では界面位置の調整が必要になるなど想定すらしていなかった。研究開始から1年以内に専用の結晶化容器を開発し、(1)の研究の論文にデータを追加出来たとしても、まだ論文化したわけではない。こうした課題を早く克服し、論文成果を加速させる必要がある。

(3) 磁気熱対流の影響を調べる研究についての反省

磁気熱対流の研究は既に多く査査されてきたが、狭小な超電導マグネット内部の対流を側面から直接観察した研究はほとんど知られていなかった。本研究のプロジェクト期間内に論文査査出来たことには満足している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

- ① S. Maki, N. Hirota, and M. Hagiwara, “Visualization and analysis of magneto-thermal convection of paramagnetic liquid in the Rayleigh-Benard model”, *Physical Review E* 98, 033109 (19 pages) (September, 2018). DOI: 10.1103/PhysRevE.98.033109

学 校 名	大 阪 成 蹊 短 期 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①動物繊維 ②ケラチン ③ナノファイバー ④生体材料 ⑤再生繊維			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澤 田 和 也	生 活 デ ザ イン 学 科	教 授	研究全般の実施と総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 里 俊 哉	大 阪 工 業 大 学 部 大 工 学	教 授	ナノファイバー物性評価と組織親和性評価
山 下 義 裕	生 活 デ ザ イン 学 科	准 教 授	ナノファイバー制作

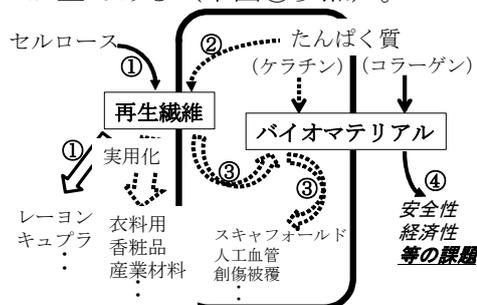
動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用

1. 研究の目的

(1) 研究背景

再生繊維は構成成分に由来する特性を活かしつつ、さらに種々の付加価値を付与することが可能となるため、天然繊維そのものに比べて応用価値は高い。下図に示す通り、現在のところ再生繊維としての実用化は植物由来のセルロースが主である（下図①参照）。

一方、動物由来タンパク質は、一部で研究例があるものの、実用的な応用には至っていない。特に、（紡績・製織時の）羊毛屑や毛髪は大量に廃棄されており、殆どリサイクルされていない。そこで、本申請者はそれらの有効活用を目指し、動物繊維である“羊毛”から構成タンパク質のケラチンを抽出し、エレクトロスピンニング法によりナノファイバーとして再生繊維化する検討を実施した（右図②）。また、抽出ケラチンをフィルムや多孔質スポンジへと加工し、ナノファイバーと共に、バイオマテリアル応用化を検討した（図中③）。



本申請課題の研究対象領域(太枠部分)
(原料素材を羊毛からヒト毛へと変換させて挑戦)

一連の研究により得られた成果は、既に国内外の学術論文および学会にて報告を終えている。本申請者が、一連の当該研究テーマに着想した経緯には、廃棄される動物繊維タンパク質のリサイクルという意味合い以外に、バイオマテリアル応用した際の、汎用素材（コラーゲン）と比較した場合の生体に対する高い安全性が挙げられる。コラーゲンは生体を構成する構造タンパク質であり、優れた生体親和性を示す反面、BSE等による安全性の危惧、複雑な精製工程、高コスト等の課題を有する（図中④）。

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

(2) 先行研究と比較した本研究の特徴

これらの特性を活かし、本研究では本申請者の先行研究成果を発展させる。即ち、上図中の②及び③部分において、原素材を“羊毛”から“ヒト毛髪”へと応用すること、及び抽出手段を“酸化的”から“還元的”へと応用展開する（下表参照）。原素材にヒト毛髪を用いることで得られる利点（下表中⑤）は、異種（羊）由来から同種（ヒト）由来の材料となることで移植時の生体への安全性が飛躍的に高まることである。さらに、“酸化抽出ケラチン”が天然構造から変性しているのに対し、“還元抽出ケラチン”は天然構造に近い。その結果、生理学的特性の維持や、化学架橋を施すことなく力学的特性を再現できる利点も有する。一方、解決すべき課題も生じる。羊毛とヒト毛髪では含有アミノ酸組成差も大きく、色素含有の有無も異なる。また、年齢・性別・人種等による相違も想定され、それらは溶媒への溶解性や物性への影響とも深く関わっていると想定される。従って、上記利点を得るためには、それらの影響を幅広くスクリーニングすることが必要となる（表中⑥）。尚、本研究では応用対象がバイオマテリアルであることを勘案し、生体構造と同じくナノスケールで構造制御が可能な、ナノファイバー作成に焦点を絞った検討を実施する。

	ターゲットとする 応用分野	素材原料	抽出手段	利点	課題
現在までの研究	スキャフォールド (バイオマテリアル)	羊毛	酸化的	⑤	⑥
本申請課題研究		ヒト毛髪	還元的		

2. 研究の計画

(1) 達成目標

当該年度の達成目標は、“ヒト毛髪”から“還元的”にケラチンを抽出し、エレクトロスピンニングによるナノファイバー作成の技術を確立することである。

(2) 研究項目

-異種類ヒト毛髪ケラチンを用いたエレクトロスピンニングにおける条件パラメータの設定-

“羊毛”に比べて“ヒト毛髪”から得られるケラチンはエレクトロスピンニング化において多くの検討すべき課題が存在する。初年度はこれらの影響を克服し、ヒト毛髪由来ケラチンから再現性あるエレクトロスピンニング化技術を確立する。ヒト毛髪では、メラニン色素の影響をも評価するため、“黒髪”と“白髪”の異種類の毛髪を用いた検討を進める。

3. 研究の成果

初年次の当該項目の達成目標をもとに、検討を行った事項および成果は以下の通りである。

	① 洗浄	② 抽出	③ 再溶解	④ エレクトロスピンニング
本申請者の従来法（実施法）	界面活性剤 CHCl ₃ /CH ₃ OH	還元抽出法	ギ酸	印加電圧、ターゲット間距離、吐出速度の調整
本年度検討による新規追加事項	超臨界流体洗浄	抽出液中からの有機溶媒を用いた選択的不純物除去	溶媒スクリーニング	温度・湿度の統一
本年度の成果	表面残脂の完全除去	疎水性のコンプレックス不純物の除去	抽出ケラチンの完全溶解	ケラチンのみから構成される再現性の高いナノファイバーの作成

①の試料洗浄工程は、界面活性剤及びCHCl₃/CH₃OH混合溶媒による手法が常法であった。しかしながら、吸着力の高い疎水性不純物の除去が困難であった。そこで本研究では、浸透力と拡散係数の極めて高い超臨界二酸化炭素による洗浄を従来工程に追加し、従来は除去困難であった表面残脂成分の除去を達成した。（右写真参照 抽出トラップに脂質が回収されている）

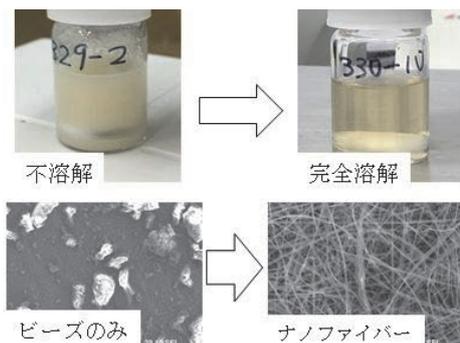


②は、還元法によるケラチン抽出工程であるが、従来法では疎水性アミノ酸側鎖と強固に相互作用している不純物の一部が最終抽出物まで残存していた。その結果、抽出ケラチンの再溶解性や成型工程にも影響を及ぼし、使用溶媒の選択制限や補助高分子等の共存による加工を余儀なくされ、純ケラチン（ケラチン100%）のみによる成型加工が困難であった。そこで本研究では、特定の有機溶媒を用いた抽出原液からの選択的不純物除去という新たな精製ステップを追加し、タンパク質の変性を起こさず、それを達成した。

さらに、この改善抽出プロトコルは、③の抽出ケラチンの最適溶媒のスクリーニングの幅を大きく広げることが可能にした。そして、従来は貧溶媒とされた溶媒でも適応可能（次頁写真上段）になることを突き止め、エレクトロスピンニング化に最適な溶媒選択が可能になった。特筆すべきは、還元抽出された純ケラチン（ケラチン100%）のナノファイバー化は困難とされてきたが、本年度の検討によりそれが可能になったことである（同写真参照）。

これにより、種の相違（白髪と黒髪）による成分の差と溶解性やナノファイバー化との関連性について、多くの基礎的知見を得ることも出来た。

④の工程では、ナノファイバー形成に影響を与える温度と湿度を完全にコントロール出来る環境を整え、最適の温度・湿度環境をスクリーニングすることで、極めて再現性の高いナノファイバー作成が可能な手法を概ね確立するに至った。



4. 研究の反省・考察

(1) ケラチン抽出プロセスにおける反省と考察

上記の通り、抽出操作において、従来法に改良を加えることにより、疎水性不純物の抽出除去が効果的に行えるようになった。その結果、従来では不可能であった、純毛髪由来ケラチンを用いたナノファイバーが可能になった。この成果は今後の毛髪ナノファイバーを用いた応用化研究にとって特筆すべき成果である。しかし一方で、この疎水性不純物がどのような物質の同定は達成されていない。この疎水性不純物は、“抽出ケラチンを再溶解した上でナノファイバー化”という目的の観点からすれば、そのプロセスを阻害することから「不純物」と表現したが、その後の成型物の細胞親和性や生体との適度な接着性、親和性、さらには力学強度保持等の全ての面で、この疎水性物質が「不純物」と表現することが正しいかの判断は出来ない。この疎水性物質は、疎水性アミノ酸残基と相互作用している色素および低分子疎水性 γ ケラチン類と推測されるが、これらの物質が成型物に混在した場合に、必ずしも応用目的に対して負の効果をもたらすとは限らない。実際、細胞親和性および増殖性の観点からすれば、適度な疎水性表面の存在は、その目的にとって効果的である。

今後、抽出の際に分離されたこれらの疎水性物質を同定し、成型物の応用目的に対して有用成分が含有されているならば、成型後の再度含有させる措置を検討する必要もある。

(2) 物性評価における反省と考察

初年時に先行的に着手した検討において、作成したケラチンナノファイバーの力学強度評価を実施した。比較対象として作成した同材料のフィルムも同時に評価を行った。しかしながら、ナノファイバーシートにおいては、膜厚においてもナノサイズであり、測定限界を下回っていた。さらに、比較対象のフィルムにおいても湿潤時には同様の結果であった。力学面での物性評価は、バイオマテリアル応用における、重要な評価項目の一つであり、今後、強度の向上を図るための後処理を検討する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 再生医療用材料としての動物由来タンパク質、澤田和也、藤里俊哉、繊維機械学会誌、印刷中

(2) 口頭発表

- ① Preparation of the fibrous bio-scaffold utilizing supercritical fluid extraction、K. Sawada, Y. Tanaka, M. Ogawa, T. Fujisato、IFPB2018(Balneário Camboriú, Brazil)
- ② Fabrication of acellular tissue utilizing supercritical fluid extraction、K. Sawada, Y. Tanaka, M. Ogawa, T. Fujisato、ISSDF(Daegu, Korea)
- ③ 癒着防止材応用のための動物毛由来ケラチンタンパク質、久米佑奈、澤田和也、藤里俊哉、ライフサポート学会バイオフィロンティア講演会、2019. 3. 10-12 (埼玉)

(3) 出版物

- ① 生活材料学、11章(産業資材)・12章(医療を支える繊維素材)、アイ・ケイコーポレーション、2018. 10. 30

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

○研究代表者

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

○研究分担者

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

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

1. 研究の目的

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) の重合体で、真菌類、甲殻類、昆虫の主な構成成分である。ほ乳類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キチナーゼ、キトトリオンダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase; 最近この酵素は、acidic chitinase, Chia とよばれている) を発現している。

他方、キチナーゼに構造が極めて類似しているが、キチナーゼ活性を示さない一群のタンパク質が知られている。これらはキチナーゼ様タンパク質 (Chitinase-like proteins) とよばれ、これまでマウスやヒトで同定され、Ym1、Chi311 (別名称 BRP-39, ヒトでは YKL-40 とよばれている) などが知られている。Ym1 は喘息や寄生虫の感染で、Chi311 は喘息や悪性腫瘍などで発現レベルが顕著に増加することから、注目されている。

ほ乳類キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質は糖加水分解酵素ファミリー18 に属している。ファミリー18の活性中心のコンセンサスアミノ酸配列は、DXDXDXE で、グルタミン酸 (E) が触媒残基として機能する。キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質を比較すると、活性中心を含むコンセンサス配列のアミノ酸が置換されている。そのため、キチナーゼ様タンパク質がキチナーゼ活性をもたないのは、活性中心のアミノ酸が置換しているからである、と一般的に考えられている。

本研究では、まず、マウス AMCCase に比べ、キチナーゼ活性が大幅に低下していたヒト 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)。次に平成 29 年度において、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 の不活性化のメカニズムを探るため、Ym1 の活性中心に変異 (N136D、Q140E) を導入し活性化を試みたが、Ym1 の活性化は起こらなかった。そこで、マウス AMCCase の触媒ドメイン (AMCCase CatD) と Ym1 とで 6 種類のキメラ体を作製し、機能比較を行った。その結果、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 は、活性中心のアミノ酸変異と AMCCase の C 末端領域と組換えることでキチナーゼ活性を発現することを明らかにした。

平成 30 年度の研究では、(1) Ym1 の活性化に関わる領域の絞り込み、(2) キチナーゼ様タンパク質 Chi311 の活性化、を行った。

2. 研究の計画

(1) Ym1 の活性化に関わる領域の絞り込み

- ① これまでの研究で、Ym1 の活性中心にアミノ酸置換を導入し、C 末端領域を AMCCase と入れ換えたキメラ体がキチナーゼ活性を示すことがわかった。逆に、AMCCase の C 末端領域に Ym1 のアミノ酸配列を導入したキメラ体は失活した。この結果から、Ym1 の C 末端領域に不活性化に関わる重要な領域、アミノ酸が存在すると考えた。そこで、C 末端領域をさらに細分化した Ym1 と AMCCase のキメラ体 cDNA を作製した (図 1)。この 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について、合成基質を用いてキチナーゼ活性を測定し、キメラ間で比較した。さらに、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。

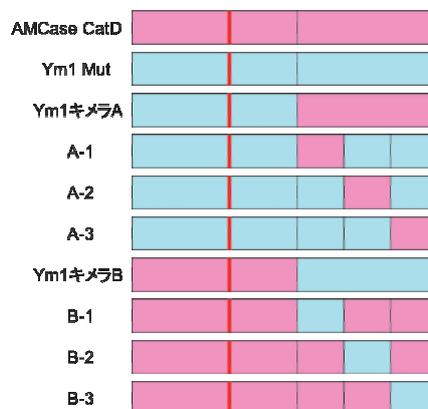


図 1: Ym1 活性化に関わる領域絞り込みのための Ym1 と AMCCase CatD のキメラ体の模式図

(2) キチナーゼ様タンパク質 Chi311 の活性化

- ① Chi311 の活性中心に変異を導入し、Chi311 mutant (Mut) cDNA を作成した。また、Ym1 での研究結果から不活性化の原因が活性中心以外に存在していると考え、Chit1 の触媒ドメイン (Chit1 CatD) と Chi311 間でキメラ体の cDNA を構築した (図 2)。これら cDNAs を大腸菌で発現した。
- ② 合成基質を用い、発現した各種組換えタンパク質のキチナーゼ活性を比較した。さらに、コロイダルキチンに各融合タンパク質を作用させ、それら分解産物を解析した。

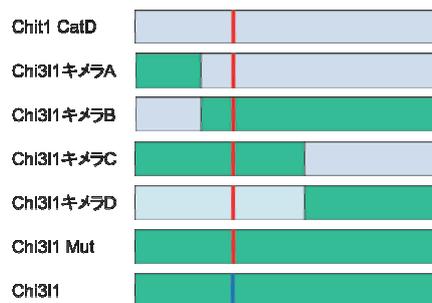


図 2 : Chit1-Chi311 間でのキメラ体模式図

3. 研究の成果

(1) Ym1 の活性化に関わる領域の絞り込み

Ym1 キメラ A は高いキチナーゼ活性を有していた。この活性化に関わる領域を明らかにするために、Ym1 キメラ A-1、A-2、A-3 を作製し、キチナーゼ活性を測定した。しかし、いずれの組換えタンパク質でも酵素の活性化は認められなかった (図 3、4)。これは Ym1 の活性化において AMCCase CatD の C 末端領域が広い範囲で必要であることを示す。

次に、AMCCase CatD への Ym1 の C 末端領域挿入の影響を調べた。AMCCase キメラ B は完全に失活した。そこで、C 末端領域を三分割した B-1、B-2、B-3 について検討した。B-1、B-2 のキチナーゼ活性は低下したが、活性は残存した。しかし、B-3 は全く活性を示さなかった (図 3、4)。このことは、AMCCase CatD のキチナーゼ活性を、Ym1 の C 末端を導入することで不活性化できることを示す。

以上の結果は、Ym1 の失活が C 末端領域の複数の領域のアミノ酸の相互作用で起きている可能性を強く示唆した (図 4)。

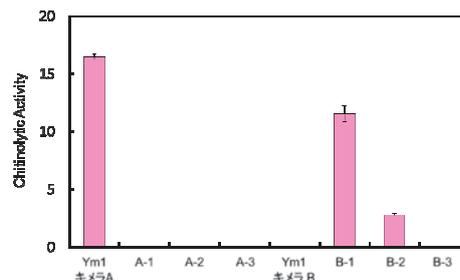


図 3 : pH 2.0 での Ym1 キメラ体のキチナーゼ活性の変化

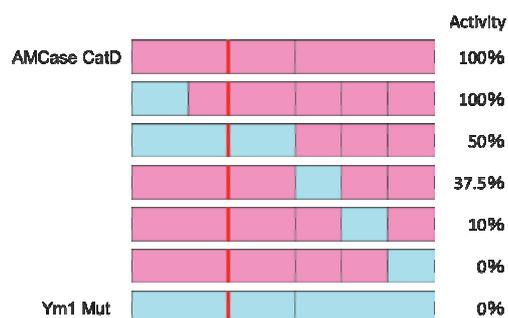


図 4 : キメラ体の結果から Ym1 には複数の活性低下の原因が存在する

(2) キチナーゼ様タンパク質 Chi311 の活性化

まず、Chi311 に Chit1 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。この結果から、活性中心の変異のみでは Chi311 を活性化することができないことが分かった。これは、昨年度の Ym1 と同様の結果であった。

次に Chi311 と活性化キチナーゼである Chit1 CatD との間でキメラ体を作成し、キチナーゼ活性を測定した。Chit1 に Chi311 の N 末端領域を導入したキメラ A は活性が低下した。このことから、Chi311 の N 末端領域には活性低下に関わる原因があることが分かった。

Chi311 に活性中心を導入し、N 末端領域に Chit1 の配列を導入した Chi311 キメラ B は活性化しなかった。これに対し、Chi311 に活性中心を導入し、C 末端領域に Chit1 の配列を導入した Chi311 キメラ C は、わずかであったが活性化した。さらに、Chi311 の C 末端領域を Chit1 に挿入した場合、活性が大きく低下した。

以上の結果は、Chi311 の不活性化に、活性中心のアミノ酸変異に加え、N 末端領域、C 末端領域にその原因があることを示す。

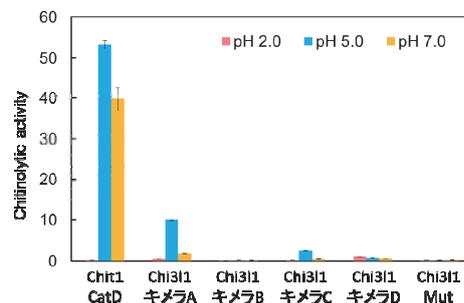


図 5 : Chi311 キメラ体のキチナーゼ活性の変化

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、進化的制御に関してほとんど研究がされていなかった。我々は、ヒト AMCase とマウス Ym1 と Chi311 について平成 28 年～30 年度において研究をおこなった。

まず、ヒト AMCase キチナーゼ活性が nonsynonymous SNPs によって制御され、キチナーゼ活性が極めて低かったヒト AMCase variant にほ乳類で保存されている 61M を導入することで活性化できることを明らかにした。次に、キチナーゼ様タンパク質 Ym1 および Chi311 の不活性化の原因と活性化を試みた。両キチナーゼ様タンパク質の不活性化の最も重要な原因は、活性に関わるアミノ酸の置換に加え、C 末端領域にキチナーゼ様タンパク質を不活性化させる領域が存在することを明らかにした。ここまでの研究において、C 末端領域にキチナーゼ様タンパク質を不活性化させる領域が存在することを明らかにし、Ym1 の C 末端側 59 アミノ酸、Chi311 では 142 アミノ酸の領域に絞り込んだ。現在、Ym1 と Chi311 について、それぞれの結果で原著論文を作成中であり、令和元年度中の受理を目指している。

我々は、ヒト AMCase が、マウス酵素に比べ活性が大きく低下しており、それは 1 アミノ酸置換が原因であり、アミノ酸を置換することで活性化できることを示した。これに対し、Ym1 と Chi311 について、複数のアミノ酸が不活性化に関わっていることを明らかにした。この件は、Ym1 と Chi311 の不活性化の解明および活性化の試みにおいて、想定以上に困難であった。しかし、原因となる領域をかなり絞り込んできているので、あと少しでアミノ酸が同定できると考えている。

Ym1 と Chi311 は、未だに機能が明らかになっていないが、多くの疾患で発現が増加することから、生物・医学的に重要な役割を果たしている可能性が高い。我々の研究結果から、Ym1 と Chi311 は、積極的にキチン分解活性を失うように進化しているとも考えられた。一般的に、機能を失いつつある遺伝子、失った遺伝子は、コード領域に停止コドンが挿入され、転写レベルが下がり、遺伝子自体が喪失することが知られている。これに対し、Ym1 と Chi311 は、コード領域がきちんと保たれ、正常組織での発現レベルが高く、炎症を伴う様々な疾患で発現が顕著に増加する。このことは、Ym1 と Chi311 は、キチナーゼとしての構造を保持しつつ、キチナーゼ活性以外の重要な役割を果たしているとも考えられる。その解明は今後の重要な課題でもある。

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、実際に不活性化ヒト AMCase を 1 アミノ酸置換で活性化することができた。さらに、Ym1、Chi311 の不活性化と再活性化のメカニズムを明らかにした。これらは、キメラ体の作成を中心とした手法によって実現された。このように、キチナーゼ、キチナーゼ様タンパク質を再活性化させたことから、この手法は非常に汎用性のある手法であり、さらなる新規研究領域、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., Uehara, M., Wakita, S., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y., Yurimoto, T., Sasaki, E., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2019) High expression of acidic chitinase and chitin digestibility in the stomach of common marmoset (*Callithrix jacchus*), an insectivorous nonhuman primate, *Sci Rep* **9**, 159.
- ② Uehara, M., Tabata, E., Ishii, K., Sawa, A., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2018) Chitinase mRNA levels determined by qPCR in crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) tissues: species-specific expression of acidic mammalian chitinase and chitotriosidase, *Genes* (Basel) **9**, 244.

(2) 口頭発表

- ① Kishigami, N., Okawa, K., **Sakaguchi, M** and **Oyama, F.** (2018) Chitinase 3-like-1 with amino acid substitutions at the active site remains inactive. **68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego)
- ② **Oyama, F.**, Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., **Sakaguchi, M.**, Sugahara, Y. and Tabata, E. (2018) Feeding behaviors determine acidic

chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. **68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego)

- ③Kishigami, N., Okawa, K., Sakaguchi, M., Oyama, F.(2018) Amino acid substitutions at the active site of Chitinase 3-like-1. **14th International Chitin and Chitosan Conference (14th ICC)** (Osaka)

(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	妊娠を支えるエキソソーム由来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エキソソーム 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	研究統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
下 井 岳	生 物 産 業 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウス作製及び解析
白 砂 孔 明	農 学 部	准 教 授	体細胞培養実験系

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) 卵胞液中で推測した卵子の発生を制御する miRNA の外挿試験

- ①ブタの初期胞状卵胞卵子へ miRNA10b, 17, 27b, 145, 92a の添加試験を行った。
- ②ウシの初期胞状卵胞卵子に対してブタで効果のあった miRNA92a の添加効果を検討した。

(2) 胚発育において見つかった miRNA の機能解析

透明帯除去胚の培養系を確立し、子宮内における制御miRNA候補の添加による胚発育の変化の観察を行なった。

(3) エクソソームの分泌変化の分子背景の探索

3. 研究の成果

(1) 卵胞液中で推測した卵子の発生を制御する miRNA の外挿試験

①miRNA の添加は miR10b が卵子の体外発育を miR17 と 27b が体外発育卵子の発生能力を miR145 がクロマチンの形態を miR92a が卵子の体外発育、発生率、クロマチンの形状すべての項目において改善する結果となった。引き続き行った miR92a の効果の詳細な検討では miR92a は卵子の支持細胞である顆粒層細胞の VEGF、p-AKT、p-S6RP の活性化をおこす効果が確認できた。またミトコンドリア数と ATP の減少そして SIRT1 と pAMPK の活性低下が観察されたため miRNA の 92a は細胞の解糖系を亢進しミトコンドリアの機能を低下させる効果があると考えた。この仮説を裏付けるように卵子と細胞のグルコース消費が上昇し乳酸の蓄積が観察された。

②ブタで得られた結果をウシの卵子顆粒層細胞複合体を使って検証した。上記と同様に92aは細胞の解糖系の亢進とミトコンドリアの機能を変化させる結果を得ることが出来た。一方で、ウシの細胞はブタと異なりリポフェクタミンの添加により著しく脂質を蓄え増殖を亢進する二次的な効果が観察されたためウシの細胞には添加方法の修正が必要と考えた。

(2) 胚発育において見つかった miRNA の機能解析

胚の透明帯を除去しその発生を評価する培養系を確立した。またこの時に培地中に放出される小胞の量をリアルタイム PCR で確認したところ、若齢と加齢のウシ由来の胚や質の異なる胚ではその分泌量が異なることが明らかになった。また候補の一つである miRN17 が胚発生を改善することが明らかになった。

(3) エキソソームの分泌変化の分子背景の探索

細胞のオートファジーや小胞形成、プロテアソームの阻害剤を用いて細胞外小胞の分泌量を比較したところオートファジーの抑制は細胞外小胞の数を著しく増加させ、一方で小胞形成とプロテアソームの阻害剤はこれを減らした。またこの放出パターンは加齢により変化することが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

(1) 卵胞液中で推測した卵子の発生を制御する miRNA の外挿試験

①ブタで得られた候補miRNAは予想どおり卵子の発育を大きく改善することが明らかになった。また解糖系の抑制は卵胞細胞を用いたRNAseqで予測したとおりであり、おおきな発見であると考えている。一方でmiR92aがどのような経路を介して解糖系に働きかけているのかは今後の課題である。

②ウシの卵子でも同様な効果を確認できたが遺伝子やmiRNAの導入において多用するリポフェクタミンはウシの細胞には思わぬ二次作用があることが分かり導入方法の再考を余儀なくされている。

(2) 胚発育において見つかった miRNA の機能解析

卵管のsmallRNAseqは1回目にRNAの純度が悪く現在再度検討中である。一方で胚のRNAseqから推測したmiRNAに発生促進効果があることが分かった。また胚からの小胞分泌においても胚の由来(卵子のドナーの月齢)が大きく作用することが分かり、加齢や生理条件がmiRNAの分泌に影響していると考えている。

(3) エキソソームの分泌変化の分子背景の探索

細胞から分泌される細胞外小胞の多少に影響する要因として細胞のオートファジー活性が示された。オートファジーの活性は細胞や母体の生理状態に大きく影響される知見があるため、現在加齢による細胞外小胞の分泌変化は細胞内部のオートファジーの活性変化によるものと考えて検討を行っている。また若齢と加齢間、肥満と痩身間で差のあるmiRNAを同定したためその背景の解明は今後の課題である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Shibahara H, Munakata Y, Ishiguro A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Modification of the medium volume and gel substrate under in vitro culture conditions improves growth of porcine oocytes derived from early antral follicles. *J Reprod Dev* 2019; In press

②Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes. *J Reprod Dev* 2019; 65: 171-175

③Ishiguro A, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Addition of granulosa cells

collected from differential follicle stages supports development of oocytes derived from porcine early antral follicles. *Reprod Med Biol* 2018; 18: 65-71

(2) 口頭発表

- ① 柴原秀典、宗像祥久、川原玲香、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. 卵胞液中エキソソームがブタ初期胞状卵胞由来卵子の体外発育に及ぼす影響 第59回日本卵子学会・2018年5月
- ② 宗像祥久、柴原秀典、植田愛美、川原玲香、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. 卵子の成熟・発育を制御するブタ卵胞液中の細胞外小胞由来miRNA 第111回日本繁殖生物学会大会(信州大学)、2018年9月

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 洋 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	マイクロ皮膚モデルを用いるトリコテセンの皮膚抗炎症効果の検討		研究分野 農 学
キ ー ワ ー ド	①トリコテセン ②免疫抑制 ③皮膚免疫 ④マイクロ流体デバイス ⑤抗炎症剤		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 藤 直 子	理 工 学 部	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
佐々木 直樹	理 工 学 部	准 教 授	実験・データ整理・論文作成
瀧 沢 麻 子	北里大学北里研究所病院 研 究 部	上 級 研 究 員	実験・データ整理・論文作成

マイクロ皮膚モデルを用いる トリコテセンの皮膚抗炎症効果の検討

1. 研究の目的

アトピー性皮膚炎や乾癬等の皮膚炎は、身体的のみならず心理的・社会的ダメージが大きいため、患者の孤立を招き、患者のクオリティ・オブ・ライフ(QOL)を著しく低下させる疾患である。これらの皮膚炎に対し、ステロイド外用薬や生物学的製剤が使用されているが、深刻な副作用も指摘されている。よって、治療効果が高く副作用の少ない抗炎症剤の開発が急務と言える。

そこで本研究では、糸状菌(カビ)の毒素であるトリコテセン類の抗炎症作用に着目した。トリコテセンは、進化的に必ずしも近縁ではない複数の糸状菌によって生産される100種類以上のカビ毒の一群である。これまで研究代表者の安藤は、希少タイプ、中間体、新規型を含め50種類近いトリコテセンの生産・構造決定に取り組み、他に類を見ないトリコテセンライブラリーの構築を手がけてきた。さらにこれらの化学構造と生理活性の相関に着目し、特定の構造を有するトリコテセンが、皮膚培養細胞における炎症性サイトカインの産生を阻害し、また、免疫細胞の増殖を抑制しうることを明らかにしてきた。これらの作用は複数の機構で起こると考えられており、毒性がより弱く、炎症阻害作用のより強い物質を探索することで、新たな抗炎症剤としての応用が期待できると考えられた。

しかし、薬剤の一次スクリーニング系として、動物実験は倫理・費用面で問題がある上に、薬効の機序の解析に多大な労力を要し、さらに種間差がある以上、結果が必ずしもヒトにはあてはまらない、という欠点がある。培養組織を用いた皮膚モデルも市販されているが、価格が高い上に、トリコテセン類が作用する免疫系の細胞がモデル内に存在しないため、炎症の評価系としては不適である。すなわち、トリコテセン類の抗炎症作用を評価するには、皮膚の実質たる表皮や真皮だけでなく、血管や免疫系の細胞も併せて組み込んだヒト細胞による実験系が必須である。そこで安藤は、研究分担者の佐々木が専門とするマイクロ流体デバイスに着目した。これはマイクロメートルサイズの流路を分析場とするものであり、試料・試薬量の削減のみならず、複数種の細胞を組み込んでその相互作用を評価できる。安藤と佐々木は、これを用いた皮膚モデルの構築に取り組み、既に角化細胞のミクロスケール培養や物質透過性評価に成功してきた。そこで本研究ではこれらの要素を組み合わせ、さらに血管内皮細胞と白血球等の免疫細胞も加えることで、「皮膚の炎症状態を顕微鏡下で再現し、トリコテセンの抗炎症作用を評価する新規実験系が構築できる」と考えた。そこで、この目的を達成するために、以下の3項目について研究を遂行することとした。

- (1) 新規トリコテセン生産と活性評価
- (2) 白血球遊走能の評価
- (3) マイクロ皮膚モデルの構築

2. 研究の計画

本研究では、角化細胞、血管内皮細胞、免疫細胞を複合的に取り込んだマイクロ皮膚モデルの構築を目指す。さらに、多様な生理活性を有し、多数の誘導体が存在しうるトリコテセン類のライブラリーを充実させ、それらの抗炎症作用について、このマイクロ皮膚モデルを使用し評価することが目的である。よって、以下のような研究計画に基づき、研究を遂行した。

- (1) 新規トリコテセン生産と活性評価:天然で得られにくい新規トリコテセンを含むトリコテセン全般を生産する。これをヒト皮膚角化細胞であるHaCaT細胞と免疫細胞であるヒト白血球細胞株に添加し、細胞毒性と炎症系サイトカイン誘導阻害能を評価する。
- (2) 白血球遊走能の評価:市販のセルカルチャーインサートの下部に化学誘因物質を、上部に白血球を加え、遊走能を評価する。トリコテセンの遊走抑制作用を評価するに最も適した系の構築を行う。
- (3) マイクロ皮膚モデルの構築:申請者の独自技術を基に、多孔膜を観察面に対し垂直に組みこむデバイスを作製する。このデバイスにHaCaT細胞を導入・培養してマイクロ皮膚モデルとし、物質透過性や好中球様細胞の遊走試験等、本モデルの基本性能を検証する。

3. 研究の成果

(1) 新規トリコテセン生産と活性評価

トリコテセン類は多様な構造をもつが、その構造や細胞毒性と抗炎症作用の関連は未だ不明な点が多い。そのため、トリコテセンライブラリーを拡充し、それらの細胞毒性と抗炎症作用を検証することが重要である。そこで、*Fusarium* 属糸状菌が生産するトリコテセン、及びその誘導体について、deoxynivalenol 系トリコテセン4種、nivalenol 系トリコテセン8種、T-2 toxin 系トリコテセン8種、また、非 *Fusarium* 属糸状菌が生産するトリコテセン8種について、生産・精製・構造解析を行った。トリコテセンの毒性検証には、皮膚細胞の HaCaT 細胞、白血球細胞の HL-60 細胞、U937 細胞を用いた。総じて、*Fusarium* 属菌由来のトリコテセンの方が非 *Fusarium* 属菌由来に比べ、低毒性であった。次に、トリコテセンの抗炎症作用を検証するために、HaCaT 細胞に炎症性サイトカイン (IFN- γ と TNF- α) を添加し、皮膚炎症性ケモカイン thymus and activation-regulated chemokine (TARC) を誘導させ、TARC 誘導に対する各トリコテセンの阻害能を調べた。その結果、*Fusarium* 属菌由来の T-2 toxin の誘導体である 7-hydroxy T-2 toxin が強い TARC 誘導阻害活性を示した。TARC はアトピー性皮膚炎のかゆみを引き起こすケモカインであるため、この誘導を阻害し、有効な抗炎症剤となりうるトリコテセン候補を獲得できたと言える。

(2) 白血球遊走能の評価

炎症を抑制するには、上記(1)で述べた炎症性ケモカインの誘導阻害のみならず、炎症部位への免疫細胞の遊走抑制も重要である。そこで、生体防御に関わる免疫細胞である白血球の遊走能を評価した。細胞種および化学誘引物質 (細胞の遊走を誘起する物質) について検討し、細胞種は上記(1)で用いた HL-60 を、ジメチルスルホキシドで好中球様細胞に分化誘導して用いることとした。化学誘引物質には、好中球様細胞の誘引物質として広く知られる、細菌性ホルミルペプチド N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) を用いた。市販のセルカルチャーインサートを用い、ウェル側 (多孔膜の下部) に fMLP 溶液を、インサート側 (多孔膜の上部) に蛍光染色した細胞懸濁液をそれぞれ加え、一定時間後にウェル側を顕微鏡観察した。ウェル側の細胞数は fMLP 濃度依存的に変化し 10 nM で極大値をとった。この結果から、トリコテセンの遊走抑制作用を評価するのに適した細胞種と化学誘引物質を決定できたと言える。

(3) マイクロ皮膚モデルの構築

トリコテセンの抗炎症作用を評価するためのマイクロ流体デバイスを開発した。まず、上記(2)で用いたセルカルチャーインサートの多孔膜を組み込んだマイクロ流体デバイスを新たに開発した。1デバイス上に24か所の細胞培養部 (膜が2本の流路に挟まれている) を配し、上記(1)で用いた HaCaT 細胞をこの培養部の膜上で培養した。生死アッセイにより、HaCaT 細胞をコンフルエントに培養できていることを確認した。さらに、蛍光標識デキストランをプローブとして HaCaT 細胞層の物質透過性を評価した。皮膚の刺激物として知られる二クロム酸カリウムを用いたところ、刺激後に物質透過性が増加し、本デバイスを用いる物質透過性の評価を実証した。

さらに、細胞遊走の評価が容易となる、2枚の多孔膜を基板に垂直に組み込んだマイクロ流体デバイスを作製した。作製法を検討し、基板表面をプラズマ処理して接着することで、通常は加熱が必要な操作を室温で行う新規手法の開発に成功した。これにより作製時間の短縮、さらには熱に弱い生体材料でコートした膜の組み込みを実現した。HaCaT 細胞培養前のデバイスを上記(2)で決定した好中球様細胞の遊走試験に応用したところ、当該細胞は fMLP の高濃度域へ濃度依存的に遊走し、本モデルの基本性能を実証できた。

4. 研究の反省・考察

(1) 新規トリコテセン生産と活性評価

本研究では、28種類のトリコテセンについて、その毒性と皮膚角化細胞に対する炎症性ケモカインの誘導阻害能を検証した。平成30年度は、新たに得られた生産・精製済みのトリコテセン全てについて検証を行えていないため、今後も検証を続けていく予定である。これらの結果から、構造活性相関の有用な情報が得られる可能性が高いと考えている。また、今回最も高い TARC 誘導阻害能を示した 7-hydroxy T-2 toxin は非天然型であるが、まだ生産・精

製・検証が行われていない類縁体が複数存在する。その取得と検証が急務と考えている。

(2) 白血球遊走能の評価

本研究では既知の化学誘引物質を用い、細胞遊走の至適濃度を決定したが、生体内での白血球の遊走にはこれ以外にも種々の物質や細胞が関与していることが、近年の研究で明らかになってきている。今後、これらの要因についても考慮した上で研究を進める必要があると考えている。

(3) マイクロ皮膚モデルの構築

本研究で開発した、24か所の細胞培養部を有するデバイスでは、実験の並列化による高スループット化が実現できるもの、実験条件を最大でも3条件しか設定できない。今後、流路の更なる集積化を進めることで、より実用性の高いデバイスにしていく必要があると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kentaro KAMATA, Hiroki SATO, Kazuyuki MAEDA, Kazuo FURIHATA, Shunichi AIKAWA, Kentaro ADACHI, Akira TANAKA, Takeshi TOKAI, Yuichi NAKAJIMA, Yasuhiko YOSHIDA, Shohei SAKUDA, Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO. "Exploring an artificial metabolic route in *Fusarium sporotrichioides*: Production and characterization of 7-Hydroxy T-2 toxin", Journal of Natural Products, 81 (4), 1041-1044 (2018).
- ② Naoki SASAKI, Kimiaki TSUCHIYA, Hironori KOBAYASHI, "Photolithography-free Skin-on-a-chip for Parallel Permeation Assays", Sensors and Materials, 31(1), 107-115 (2019).

(2) 口頭発表

- ① Marika SUGIMOTO, Fuka NAGATOMI, Naoki SASAKI, "A Dual-Membrane Microfluidic Device For Cell Migration Assay", The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2018), Kaohsiung, Taiwan, 2018. 11. 11-15.
- ② Kentaro ADACHI, Kosuke MATSUI, Shunichi AIKAWA, Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO. "Production And Structural Analysis Of Unnatural Type A Trichothecenes Using Enzymatic Reaction", The 16th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Kawagoe, 2018. 12. 18.
- ③ Koki SHINKAI, Kosuke MATSUI, Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO. "Glucoside Formation Of D-Type Trichothecene At C-4 Position By *Fusarium* App", The 16th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, Kawagoe, 2018. 12. 18.
- ④ Marika SUGIMOTO, Naoki SASAKI, "A Dual-Membrane Microfluidic Device For Chemotaxis Assays Of Immune Cells", 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, P-8, Tsukuba, Japan, 2019. 3. 7-8.
- ⑤ 杉本茉莉花、永富風花、佐々木直樹、“並行多孔膜組み込みマイクロデバイスによる細胞遊走アッセイ”、日本分析化学会第 67 年会、Y1040、東北大学川内北キャンパス、2018 年 9 月 12-14 日。
- ⑥ 岡田彩希、新海航輝、田中千智、木村真、安藤直子、“*Fusarium* 属菌と非 *Fusarium* 属菌由来のトリコテセンの生理活性の検証”、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会 広島国際会議場、2018 年 11 月 15 日-16 日。
- ⑦ 新海航輝、岡田彩希、松井宏介、相川俊一、木村真、安藤直子、“構造活性相関の解明に向けた新規トリコテセンの創製と性状解析”、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会 広島国際会議場、2018 年 11 月 15 日-16 日。
- ⑧ 足立健太郎、松井宏介、相川俊一、貞松和樹、中嶋佑一、前田一行、木村真、安藤直子、“トリコテセン前駆体生産と性状解析に向けた *Fusarium graminearum* 遺伝子破壊株の生産物解析”、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、広島国際会議場、2018 年 11 月 15 日-16 日。

⑨貞松和樹、鈴木将、大西健太、足立健太郎、木村真、安藤直子、“A 型トリコテセン生産菌の代謝産物プロファイルの検証”、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、広島国際会議場、2018 年 11 月 15 日-16 日.

(3) 出版物
なし

学 校 名	北 海 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	巨大津波常襲地帯における災害文化の継承メカニズムの解明 —岩手県三陸海岸の津波地名の事例—		研究分野 人文地理学
キ ー ワ ー ド	①災害文化 ②被災経験 ③津波地名 ④継承メカニズム ⑤歴史的・地理的要因 ⑥岩手県三陸沿岸 ⑦『岩手沿岸古地名考』		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
村 中 亮 夫	立 命 館 大 学 部	准 教 授	研究代表者 総括、防災・教育班(班長)、防災・教育班の統括、研究計画の立案、データ分析、現地調査、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
磯 田 弦	東 北 大 学 大 学 院 科 理 学 研 究 科	准 教 授	社会・経済班(班長)、社会・経済班の統括、研究計画の立案助言、データ分析、現地調査
花 岡 和 聖	立 命 館 大 学 部	准 教 授	社会・経済班、データ分析、現地調査
塚 本 章 宏	徳島大学 大学院社会産業 理 工 学 研 究 部	准 教 授	防災・教育班、データ分析、現地調査
谷 端 郷	宮 崎 産 業 経 営 大 学 部 法 学	講 師	防災・教育班、データ整備、現地調査
大 邑 潤 三	東 京 大 学 地 震 研 究 所 地 震 予 知 研 究 セ ン タ ー	特 任 研 究 員	社会・経済班、データ整備、現地調査

巨大津波常襲地帯における災害文化の継承メカニズムの解明 — 岩手県三陸海岸の津波地名の事例 —

1. 研究の目的

本研究は、1896 年明治三陸地震津波発生直後に編纂された岩手県三陸沿岸の津波地名に関する記録集『岩手沿岸古地名考』を素材に、過去の被災経験を伝える津波地名（津波由来の地名）が現代まで継承されてきたメカニズムを歴史的・地理的な背景に着目しながら解明することを目的とする。申請者らは既に『岩手沿岸古地名考』の資料批判（谷端ほか 2017）とそこに掲載された津波地名の現存状況についての調査（村中ほか 2018）を終えているが、そこで浮かび上がったのは津波地名の著しい減少（被災経験の伝達力の低下）である。村中ほか（2018）では、40 件の津波地名のうち地名・由来ともに確認された津波地名は 11 件に止まり、その他の津波地名については地名のみ確認されたか、もしくは地名・由来ともに確認できなかった。この結果を踏まえ、本研究では様々な歴史的・地理的要因に影響を受けつつも 120 年の時を超えて継承された 11 件の津波地名にどのような継承・存立基盤があるのかを歴史地理学的に解明していく。

2. 研究の計画

(1) 仮説

現在、津波地名の継承メカニズムは未解明であるが、申請者らが取り組んだ現地調査（村中ほか 2018）からは、以下のような津波地名の消滅・継承の背景について仮説が立てられる。

①消滅の背景

- ・地図に載らないような林野内のミクروسケールの地名である場合【背景①-1】
- ・過疎化・高齢化の激しい小さな農山漁村の集落・林野内にある場合【背景①-2】

②継承の背景

- ・地図や自治体・郷土誌、昔話の書籍に記載がある場合【背景②-1】
- ・家族や友人、地域の近隣住民から教えてもらう機会があった場合【背景②-2】

ただし、継承されている津波地名も限界集落に位置している場合が多く、【背景①-1・2】と同様の背景で近い将来消滅する公算が大きい地名も確認された。また、現在まで津波地名が継承されていたとしても、その内容が必ずしも当時と変わらないとも言えない言説も断片的に確認された。例えば、津波により山麓に鯨が打ち上げられ名付けられたとされる「鯨山」（岩手県山田町）については地名・由来ともに継承されているが、現地での聞き取り調査では「津波の際、鯨が山頂に打ち上げられたために名付けられた」とする住民も確認され、打ち上げられた場所として山麓と山頂が混在するようになりながら上書きされつつある実態も確認された。また三陸沿岸では、明治三陸地震津波と東日本大震災との間に、1933 年昭和三陸地震と 1960 年チリ地震による異なる浸水範囲の巨大津波が観測され、津波地名が移動・上書きされた可能

第 1 表 全研究期間の研究計画

工程	内容	平成 30 年	平成 31 年	平成 32 年
(i) 段階Ⅰ	地図データ整備と浸水範囲の復原	・旧版地図、近代以降の津波浸水範囲の GIS データ化		
(ii) 段階Ⅰ	山奈による調査資料の検討	・調査歴史資料の翻刻 ・山奈の調査復原		
(iii) 段階Ⅱ	現地での聞き取り調査	・2～3 箇所程度でパイロット調査	・全 11 箇所での本調査	・補足調査
(iv) 段階Ⅱ	地域の社会・経済、防災・教育の調査	・現地資料調査	・現地資料調査 ・津波碑の GIS データ化	・補足調査
(v) 段階Ⅱ	継承メカニズムの解明・モデル化	・文献研究	・データに基づくモデル化	・学会報告に基づくモデル修正
(vi) 段階Ⅲ	成果の公表		・学会報告 ・論文執筆	・学会報告 ・論文執筆

性もある。すなわち、被災の経験世代が世を去った後、上記のような歴史的・地理的な諸背景からの影響を受けつつ、津波地名は時を経て大きく a. 正確に継承、b. 誤謬を伴い更新・上書き、c. 消滅する仮説が立てられる。

(2) 計画

①全研究期間の研究計画

本研究では現在も現地で確認される 11 箇所津波地名に焦点をあて、下表のとおり、作業工程を(i)～(vi)の6工程に分けて進めて行く。これらの6工程は、(i)(ii)の【段階Ⅰ】基盤情報の整備・検討、(iii)(iv)(v)の【段階Ⅱ】データ収集・分析、(vi)の【段階Ⅲ】成果の公表、の大きく3段階に分けられる。平成30年度に実施した計画の詳細は後述の通りである。

3. 研究の成果

(1) 基盤情報の整備・検討 (【段階Ⅰ】)

平成30年度は、まず段階Ⅰとして(i)(ii)を最優先に進めた。(i)では、本研究の基盤となる旧版地図や近代以降に三陸地方に襲来した津波(1896年明治三陸地震、1933年昭和三陸地震、1960年チリ地震)の浸水範囲に関するGISデータを作成した。浸水範囲については統一した一次資料が存在しないため基本的には現地で各自治体・郷土誌、災害誌類を閲覧することになるが、さしあたり平成30年度は国土交通省「津波被害・津波石碑情報アーカイブ」のwebサイトで整理されている情報についてGISデータを作成した。これらのデータは、今後計画されている現地調査の際に利用する基盤データとなると同時に、土地利用の変遷や集落移転の検討、そして津波ごとに異なる津波浸水範囲が津波地名の立地地点や由来に影響を与えたかを検証する際にも利用していくことになる。

次に(ii)では、山奈が現地踏査で見聞きした情報が『岩手沿岸古地名考』の記述内容に与えた影響を検証すべく、『岩手県海岸巡回古文書収集録(日誌)』(遠野市立博物館蔵)(以下、日誌)の記述内容の翻刻を進めた。翻刻は研究分担者の大邑が所属する京都大学古地震研究会の協力を得て、当会が運営する「みんなで翻刻」の枠組みで進めた。2018年11月18日に翻刻が完了し、現在、「みんなで翻刻」Webサイト(<https://honkoku.org/>)で閲覧可能である。この日誌には踏査の際の見聞メモや、閲覧した古文書の書き写しが山奈の直筆で綴られており、その他の郷土資料類も参考にしながら山奈の見聞きした内容を総合的に検討していきたい。

(2) データ収集・分析 (【段階Ⅱ】)

平成30年度は、上記(i)(ii)を優先しながらも、段階Ⅱのうち(iii)(iv)として、津波地名の継承過程とそれに与えた歴史的・地理的影響要因に関する仮説の具体化・資料収集を開始した。(iii)については論文Ⅰ・Ⅱの知見に基づくパイロット調査地として大船渡市三陸町越喜来崎浜、釜石市鶴住居町の2箇所を選定し社会調査を実施した。社会調査は地域住民から個別具体的な情報を収集するための質的社会調査、および家庭に小学生を持つ住民を対象にした量的社会調査によって構成した。質的社会調査については2018年6月23～25日、8月21～24日の出張日程による個別の聞き取り調査・座談会形式の調査を、量的社会調査については2019年2～3月にかけて大船渡市立越喜来小学校、釜石市立鶴住居小学校に在籍する児童の保護者に対して実施した。(iv)については津波地名の消滅・継承の歴史的・地理的背景の仮説を意識しつつ、聞き取り調査を実施する過程で随時、資料収集を進めた。

4. 研究の考察・反省

(1) 考察

本節では、質的社会調査と量的社会調査によって得られたデータに基づき、津波地名が継承される背景に関する仮説ごとに考察したい。まず、「地図や自治体・郷土誌、昔話の書籍に記載がある場合【背景②-1】」に関連する情報として、聞き取り調査からは鶴住居町在住の男性(昭和24年生まれ)が小松実『ふるさとの地名物語—釜石・大槌編—』岩手東海新聞社、1978年に記載されている情報をもとに語るにとどまり、その他の調査協力者からも地図や書物から情報を得ているという証言は得られなかった。同様に、小学校児童の保護者に対する量的社会調査からも仮説を裏付けるデータは得られていない。

一方で、「家族や友人、地域の近隣住民から教えてもらう機会があった場合【背景②-2】」に関連する情報については事例を確認できる。例えば、その昔の津波の際、ツリバチ(海水を汲み上げる紐付きバケツ)が流れ着いた場所からツリバチナガレ(大船渡市三陸町越喜来崎浜)

と呼ばれる津波地名については地形図等には記されていない地名であるが、小学校の行事や家業の手伝い、子どもの遊び場として、崎浜住民にとっては親しまれていたようである。ただし、津波地関連付けて認識している住民が必ずしも多くはなく、小学校児童の保護者に対する量的社会調査においてもツリバチナガレの由来を津波と関連付けて記憶している回答者の割合は回答者51名中2名（3.9%）にとどまる。

(2) 反省

以上のように、平成30年度の研究についてはおおむね当初の計画に基づいて調査を終えたと言っても良い。大船渡市、および釜石市におけるパイロット調査として実施した質的社会調査、量的社会調査から得られたデータは、次年度以降の調査を計画するうえでの基盤データとなる。ただし、平成30年度の研究はデータ収集に重きが置かれていたため、データを詳細に検討できていない点が反省点である。今後、他の調査地においても順次データを収集していくと同時に平成30年度の調査で得られた成果を学会等で報告・議論していき、津波地名が世代を超えて継承される過程を体系的にモデル化していきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

磯田 弦「災害地名調査のすすめ」、季刊地理学、70 卷 3 号、127-133 頁、東北地理学会、J-STAGE
公開日：2018 年 10 月 10 日 <https://doi.org/10.5190/tga.70.3.127>

(2) 口頭発表

なし。

(3) 出版物

なし。

文献

- 谷端 郷・村中亮夫・塚本章宏・花岡和聖・磯田 弦（2017）：「山奈宗真著『岩手沿岸古地名考』の書誌学的検討と内容分析」、歴史地理学 59 卷 2 号：27-42 頁。
- 村中亮夫・谷端 郷・塚本章宏・花岡和聖・磯田 弦（2018）：「津波地名やその由来は継承されるのか？—山奈宗真著『岩手沿岸古地名考 全』の追跡調査—」、地理科学 72 卷 4 号：223-246 頁。

学 校 名	札 幌 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	精神疾患患者の認知機能改善療法に関する実践的研究 —統合失調症と自閉スペクトラム症の異同—		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①精神疾患 ②認知機能 ③リハビリテーション ④認知機能改善療法 ⑤統合失調症 ⑥自閉スペクトラム症 ⑦遂行機能 ⑧前頭葉		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 宮 秀 淑	心 理 学 部	准 教 授	研究代表者 総括 論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐 藤 祐 基	北 星 学 園 大 学 社 会 福 祉 学 部	専 任 講 師	研究データ処理
山 家 研 司	医 療 法 人 北 仁 会 院 旭 山 病 院	理 事 長 院 長	研究対象者選出
橋 本 省 吾	医 療 法 人 北 仁 会 院 旭 山 病 院	医 局 長	研究対象者選出
畠 山 雪 恵	医 療 法 人 北 仁 会 院 旭 山 病 院	主 任	データ収集
宮 島 真 貴	北 海 道 大 学 医 学 部	助 教	データ収集・処理
松 寄 由 莉	大 学 院 臨 床 心 理 学 研 究 科	研 究 生	データ収集

精神疾患患者の認知機能改善療法に関する実践的研究 —統合失調症と自閉スペクトラム症の異同—

1. 研究の目的

- (1) 統合失調症と自閉スペクトラム症患者が有する認知機能障害の異同の明確化
 - ① 重篤かつ中核的な精神疾患である統合失調症患者および自閉スペクトラム症患者の認知機能に関する神経心理学的アセスメントを行い両者の異同を明らかにする。
 - ② 統合失調症患者が抱える認知機能障害は、特に注意、遂行機能、言語性記憶および言語流暢性において認められている。自閉スペクトラム症患者が有する認知機能障害は、遂行機能障害であるとの研究や、反応抑制やプランニングおよび認知柔軟性であることを明らかにした研究など様々であるが、未だ両者の異同は明確になっていない。
- (2) 前頭葉/実行機能プログラム (FEP) による疾患別効果に関する研究
 - ① 統合失調症患者および自閉スペクトラム症患者に対して有効性が示された FEPを用いた介入研究を実施し、その効果の差異について検討していく。欧米を中心に精神疾患患者が有する認知機能障害を改善するために、FEPの研究が進められてきているが、対象者は統合失調症に限定されたものがほとんどであり、研究の質・量ともに十分ではない。
 - ② 研究代表者らは本邦初の実践的研究を民間精神科病院において実施し、FEPが統合失調症患者の認知機能、社会機能および精神症状に明らかな改善をもたらすことを明らかにした。対象を自閉スペクトラム症とした世界初の介入研究においても、FEPによってワーキングメモリや言語流暢性および実行機能が明確に改善したことが報告されているが、両者の治療効果の差異については不明確である。

2. 研究の計画

- (1) 対象者
 - ① 精神科病院の統合失調症患者および自閉スペクトラム症患者80名
 - ② 手続き
 - ア 患者の主治医に対して研究に関する説明を行い実施の同意を得る。
 - イ 患者に対して研究説明書を用いて研究について文書と口頭によって説明し同意書に署名を得る。
 - ③ 包含基準
 - ア 60歳以下
 - イ 9年以上の教育年数
 - ウ DSM-5(American Psychiatric Association, 2013)の診断基準を満たした統合失調症患者および自閉スペクトラム症患者
 - ④ 除外基準
 - ア 認知症
 - イ 薬物依存症
 - ウ アルコール依存症
 - エ 脳器質性疾患
- (2) 心理アセスメント
 - ① 基準に該当した対象者に対して、認知機能および社会機能アセスメントを実施する。
- (3) 分析
 - ① 各疾患のアセスメント結果を分析した上で、疾患毎に統計的分析を行い、各疾患の特徴を捉える。その上で、両疾患の差異や異同について検討を加えていく。
- (4) 考察
 - ① 疾患による認知機能および社会機能に差異が見られた場合、それらの差異が各疾患の症状や特徴との関連性について解釈を行う。
- (5) 研究成果
 - ① 国内および国際学会・論文等により積極的に公表する。

(6) 次年度以降の計画

① FEPの実施および概要

- ア 前頭葉機能に低下が存在する者を対象とする認知機能改善プログラム
- イ 使用する主な媒体は紙と鉛筆 (paper-and-pencil)
- ウ 安価に実施できるトレーニングプログラム (1人当たり約1万円)
- エ 認知的柔軟性 (cognitive flexibility)、ワーキングメモリ (working memory)、計画 (planning) という3つのモジュールで構成
- オ トレーニングの内容は段階的に難易度が上がるようにセッティング
- カ 課題の具体例としては、無限大記号線描や地図作成、文章読解および指先の運動

② 手続き

- ア 対象者に対して週に2回 (各60分)、合計44回の1対1によるトレーニングを実施する。
- イ 年齢や性別、罹病期間などを統制した上で患者を統合失調症群と自閉スペクトラム症群の2群 (各群40名) に割り付ける。

③ 分析方法

- ア 2群の等質性を検定する (t検定および χ^2 検定)。
- イ 2群のFEPが及ぼす効果の差異について分析を行う (t検定および χ^2 検定)。

④ 考察

- ア 統合失調症群と自閉スペクトラム症群において、FEPの効果に違いが見られたか否かについて検討を加える。
- イ 違いが存在しない場合においては、両疾患は認知機能上、同一あるいは類似の疾患という考察が可能かどうかを検討する。
- ウ 違いが存在した場合においては、それらの違いがどのような点から生じたものなのかについて、両疾患の症状や特性を十分に踏まえた上で解釈を行っていく。

⑤ 研究成果

- ア 国内および国際学会・論文等により積極的に公表する。

⑥ 研究終了後

- ア FEPの持続効果を検討するために、一定期間 (6か月) を置いた後の症例のフォローアップを行うなど縦断的な研究体制の準備を整備する。

3. 研究の成果

(1) 研究対象者の選考と評価に関して

- ① 研究計画に基づき、精神科病院の理事長兼院長および統合失調症患者および自閉スペクトラム症患者の主治医に対して研究に関する説明を行い実施の同意を得た。研究対象者に対しては、研究計画に示してある包含基準および除外基準に基づいて選考を進め、認知機能と社会機能に関するアセスメントを実施することとしている。
- ② 初年度は認知機能および社会機能に関するアセスメントツールを国外 (米国) より予定通り購入することが出来た。現在順次、研究対象者に対する各種アセスメントの実施が可能な状態となっている。

(2) 研究体制の整備に関して

- ① 認知機能および精神医学に関する書籍や各種のパソコン関連製品を購入するとともに、統計ソフトと心理学的統計検定に関する書籍も揃え、充実した研究体制を整備することが可能となった。
- ② アルバイターに対しては研究対象者の研究に対する理解を一層深めることを意図して、紙媒体での説明資料 (A3版・両面・カラー仕様) の作成作業を依頼した。現段階において、説明資料が完成する最終段階に入ることができている。
- ③ 初年度においては、さらなる研究対象者の確保および研究成果の公表を目的として研究用ホームページを完成させた。研究用ホームページについては国内研究者が閲覧することを想定してのパソコン用ページと研究対象者も含む一般向けの携帯電話用ホームページの2種類を作成することが可能となった。このことにより、より多くの関係者に研究内容や研究成果について周知することが出来ている。

(3) 研究成果の公表に関して

- ① 学術誌への投稿については、初年度については2論文を公表した。1論文については英語

- 論文とし、Impact Factorを有するJournalへの投稿を行い、海外に向けて研究成果の公表を実施した。1論文については和文論文とし、研究成果を国内研究者に向けて発信した。
- ②学会発表および参加については、研究代表者および研究協力者において国内学会において関連する研究成果を発表するとともに、学会参加を通して研究に関する最新の知見を得た。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究対象者の選考に関して

- ①精神科病院における選考を進めているところだが、今後より一層の研究対象者をリクルートするために、他精神科病院への研究協力を検討する必要がある。すでに研究協力者を経て、複数病院への打診を開始している段階である。

(2) 研究体制の整備について

- ①当初想定していたよりも安価な価格でアセスメントツールを直輸入することが可能となったため、研究費の配分について再考する必要がある。
- ②初年度については、研究用ホームページを完成させることができたが、英語ページの作成には及ばなかった。次年度に関しては、海外も含めより多くの研究者に対して研究内容を発信するために、可能な限り早期段階で英語版ホームページの作成を進めていくこととする。

(3) 研究成果の公表に関して

- ①研究計画段階においては国際学会での発表を予定していたが、初年度については発表可能な状態に至らなかった。次年度については、英論として公表されているものをベースとし、発表可能な状態に至るよう研究を進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①大宮秀淑、羽田直子、山家研司：統合失調症患者の認知機能と社会機能に対するプロナセリンの効果-遂行機能に変化が生じた症例報告- 最新精神医学 第23巻 第3号 p 237-241 2018/5
- ②Maki Miyajima、Hidetoshi Omiya、Kiyoko Yamashita、Kenji Yambe、Mie Matsui、Kenzo Denda：Therapeutic responses to a frontal/executive program in autism spectrum disorder: Comparison with schizophrenia Hong Kong Journal of Occupational Therapy 31(2) p 69-75 2018/11

(2) 口頭発表

- ①大宮秀淑、畠山雪恵：軽度認知障害(MCI)に対する認知機能改善療法(CRT)の効果研究-前頭葉/実行機能プログラム(FEP)を用いた症例報告- 第37回日本心理臨床学会秋季大会 2018年8月30日(木)~9月2日(日)
- ②松寄由莉、大宮秀淑：軽度認知障害(MCI)に対する認知機能改善療法(CRT)の有効性の検討 第8回日本認知症予防学会学術集会 2018年9月22日(土)~24日(月祝)

(3) 出版物

なし

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試掘調査を実施したところ、9世紀から10世紀頃のイスラーム・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おう。
- 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。
- 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。

3. 研究の成果

(1) クーラオチャム島での日越共同考古学調査

- ① 2018年8月10日から18日にクーラオチャム島のバイラン地区で発掘調査を実施した。昨年の調査地点のすぐ隣に、2m×2mのトレンチをいれた。この場所は、ハノイ総合大学がかつて発掘調査した地点からも至近距離で海岸から50mほど山側に位置し、海拔5mほどである。トレンチの深さ100cmほどのところから、土坑が検出されている。用途は不明である。また、上層から9～10世紀頃の越州窯系青磁などの初期貿易陶磁器片とともにイスラーム・ガラス片、ガラス小玉が出土している。しかし、下層になると初期貿易陶磁器の出土はないが、イスラーム・ガラス片やチャンパー陶器・土器片、ガラス小玉などがみられた。そのため、貿易陶磁器の存否を基準に大きく二時期に分けられる可能性があり、当該時期の編年資料として貴重なものとなろう。

出土遺物は、9～10世紀頃の初期貿易陶磁器（越州窯系青磁、長沙窯陶器、白磁）や同時代の中国南部からベトナム北部の施釉陶器・無釉陶器、チャンパー無釉陶器・土器、そしてイスラーム・ガラス、同陶器、各種のガラス小玉などである。さらに、16世紀以降の遺物もみられた。イスラーム・ガラスは淡緑色、淡青色などの色調をおびたもので、碗や瓶の破片であろう。このなかには、イスラーム初期時代に特徴的な内側に折り返した口縁部をもつものがあり、8世紀後半にさかのぼる可能性がある。イスラーム陶器は青緑釉貼付文壺の破片であろう。これらと共伴した無釉の陶器、土器の一部は同時代のチャンパー製品である。そのため、チャンパー陶磁器の特徴を確認することができ、これまで不明であったチャンパー陶磁器の実態を解明できることになった。また、ガラス小玉は東南アジア産と考えられるものも含まれている。

今回の発掘地点では、12世紀以降の遺物はほとんど確認することができず、12世紀以降の居住域の移動が考えられ、島のなかでの居住域の変遷などを理解するうえで重要なデータをえることができた。

- ② 2019年3月にイギリス・ノッティングダム大学のヘンダーソン教授とともに、クーラオチャム島出土イスラーム・ガラスの化学分析を実施するため、試料の採取をおこなった。

(2) 観光アプリの開発

- ① 旧市街地がユネスコの世界遺産に登録されているホイアンの歴史概要とクーラオチャム島の概要をまとめたアプリに着手した。

4. 研究の反省・考察

(1) クーラオチャム島での日越共同考古学調査

- ① 研究の反省：クーラオチャム島での発掘調査は大変大きな成果をえることができた。発掘組織は、日越の2か国間とラオス国立大学の教員も参加することになり、国際共同調査の広がりという点で評価できるものである。また、イスラーム・ガラス研究の世界的権威であるイギリス・ノッティングダム大学ヘンダーソン教授がイスラーム・ガラス分析にかかわることになり、国際的な研究に発展させることができた。

- ② 研究の考察：今回の調査によって、海のシルクロード上のクーラオチャム島の歴史的位置がより明確になった。とくに、イスラーム・ガラス器の東アジア地域への流入に関して、東南アジアの他地域、タイ中部のコー・コ・カオ（Koh Kho khao）、ラエム・ポー（Laem Pho）、マレーシアのブジャン溪谷などが知られていたが、さらに重要な資料を追加した。このことは、東南アジアの海上を経由してガラス器が東アジアにもたらされたことを意味する。また、イギリス・ノッティングダム大学ヘンダーソン教授にクーラオチャム島出土イスラーム・ガラスの化学分析調査を依頼し、化学組成の分析中である。この分析によってイスラーム・ガラスの生産地推定が可能となり、西アジア世界とクーラオチャム島の海のシルクロード上での歴史的関係が明確になる。

同時に、初期貿易陶磁器を伴わない下層からイスラーム・ガラスが出土しており、8世紀後半にさかのぼる可能性が確認できた。また、共伴した無釉陶器や土器は同時代のチャンパー陶磁器の可能性があり、これまで知られていなかった当該期の考古資料をえることができた。今後、編年を組み立てるうえで基準資料として活用ができよう。

さらに、同時代の遺構が検出されたこと、12世紀頃から15世紀頃の遺物がほとんどないことなどから、時期によって島内での居住地の移動などが考えられる。

(2) 観光アプリの開発

- ① 研究の反省:3か年計画でアプリ開発を考えていたためアプリはまだ開発中であり、クーラオチャム島の文化遺産すべてが網羅されているわけではない。この点は、当初からの計画をみなおすことも必要であったかもしれない。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①なし

(2) 口頭発表

- ①山岸良二・菊池誠一・大橋康二・Lam Thi My Dung・Dang Hong Son・Vo Hong Viet・昭和女子大学ベトナム考古学チーム・ハノイ国家大学人文社会科学大学チーム・ラオス国立大学チーム「ベトナム・クーラオチャム島の発掘調査-海のシルクロードの要衝」『一般社団法人日本考古学協会第85回総会・研究発表要旨集』2019年5月

(3) 出版物

- なし

学 校 名	聖 心 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	記憶方略に及ぼすステレオタイプの影響に関する検討 －無関連思考の抑制能力とワーキングメモリ容量の個人差からの実験的検討－		研究分野	文 学
キ ー ワ ー ド	①記憶方略 ②ステレオタイプ ③無関連思考 ④ワーキングメモリ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 橋 雅 延	文 学 部	教 授	研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
清 水 寛 之	神戸学院大学心理学部	教 授	実験の実施・データ分析・論文作成
齊 藤 智	京都大学大学院 教育学研究科	教 授	実験の実施・データ分析・論文作成
佐 藤 眞 一	大阪大学大学院 人間科学研究科	教 授	老年心理学者としての研究の全過程での助言
唐 沢 穰	名古屋大学大学院 環境学研究科	教 授	社会心理学者としての研究の全過程での助言
平 井 美 佳	横浜市立大学 都市社会文化研究科	准 教 授	ジェンダー心理学者としての研究の全過程での助言

記憶方略に及ぼすステレオタイプの影響に関する検討 —無関連思考の抑制能力とワーキングメモリ容量の個人差からの 実験的検討—

1. 研究の目的

(1) 問題と目的

ステレオタイプ（否定的な固定観念）には、「高齢になると記憶力が減退する」という年齢差に関するものや、「女性は自動車に関する記憶力が悪い」という性差に関するものがある。本研究の目的は、これら2種類のステレオタイプのうち、後者の性差ステレオタイプを取りあげ、この性差ステレオタイプを基にしたマインドセットが効率的な記憶方略の自発的使用を阻害している可能性を確認することであった。

(2) 仮説

本研究の仮説は、ステレオタイプが喚起されることで、自我を脅かす評価懸念が生じ、①これが記憶課題とは無関連な思考を誘発し、②記憶方略の（自発的）使用時に必要となる（容量に限界のある）ワーキングメモリの負荷（妨害）となり、その結果、③効率的な記憶方略が使用できず、記憶パフォーマンスが悪くなるというものであった。

2. 研究の計画

(1) 本研究では女性（若齢者と高齢者）の参加者だけを対象に、2つの実験を行った。

- ①実験1では、若齢者だけを対象に、ステレオタイプを打ち消す教示を与えることによって、ステレオタイプを喚起する場合よりも、記憶成績が良くなるかどうかを調べることで、ステレオタイプがもともとの能力差を反映しているのではなく、ステレオタイプに基づくマインドセットの効果にすぎないかどうかを調べた。
- ②実験2では、実験1と同様の方法に加えて、若齢者と高齢者を対象に、ワーキングメモリ容量の測定を行うことによって、いずれの年齢群でも上位群と下位群に分けて、記憶成績の差が認められるかどうかを調べることで、本研究の仮説の検証を行った。

(2) 実験の方法

- ①実験1では、60名の若齢者（年齢の平均は19.5歳）をランダムに30名ずつの2群に分け、統制群には「過去の研究で認められた性差の確認が研究目的である」と伝え、実験群には「性差が認められないことの確認が研究目的である」と伝え、引き続き、スクリーンに1枚あたり7秒ずつの自動車の写真10枚を見せた。その直後に、再認テストとして、実験中に見せたターゲット写真（10枚）と見せていないディストラクター写真（10枚）をランダムな順序で1枚ずつ見せて、再認判断を求めた。再認記憶の指標としては、ヒット数と虚再認数をもとにしたdプライムを算出した。
- ②実験2では、参加者が98名の若齢者（年齢の平均は19.8歳）と44名の高齢者（年齢の平均は74.6歳）である点と、ワーキングメモリ容量をリスニングスパンテストによって測定し、それぞれの年齢群ごとに上位群と下位群に分けた点（あわせて無関連思考の抑制能力のテストも行った）以外は、実験1とまったく同じであった。リスニングスパン得点が1.5以上を上位群、1以下を下位群とした。

3. 研究の成果

(1) 2つの実験の教示の効果（実験1と実験2）

- ①実験1では、統制群（dプライムの平均は-.55）よりも実験群（dプライムの平均は-.30）の方が、その成績がよくなる傾向が認められ（ $t=1.71$, $df=58$, $p<.10$ ）、ステレオタイプを打ち消す教示の効果が得られた。したがって、ステレオタイプがもともとの能力差を反映しているのではなく、ステレオタイプに基づくマインドセットの効果にすぎないことが示唆された。
- ②実験2では、若齢者の統制群（dプライムの平均は-.46）と実験群（dプライムの平均は

-.54) の間に有意差は認められなかった。これに対して、高齢者の統制群 (dプライムの平均は-.72) よりも実験群 (dプライムの平均は.024) の方が、その成績がよくなる傾向が認められ ($t=2.69$, $df=42$, $p<.05$)、ステレオタイプを打ち消す教示の効果が得られた。したがって、高齢者においてのみ、ステレオタイプがもともとの能力差を反映しているのではなく、ステレオタイプを基にしたマインドセットの効果にすぎないことが示唆された。

(2) 教示の効果とワーキングメモリ容量の関係 (実験2)

- ①若齢者の統制群のワーキングメモリ容量の下位群23名 (dプライムの平均は-.36) と上位群26名 (dプライムの平均は-.56)、実験群のワーキングメモリ容量の下位群34名 (dプライムの平均は-.51) と上位群15名 (dプライムの平均は-.61) について、 2×2 の分散分析を行った。その結果、いずれの主効果、交互作用ともに有意ではなく、若齢者に関しては、本研究の仮説が支持されなかった。なお、統制群と実験群ともに、ワーキングメモリ容量とdプライムの相関 (統制群は-.281、実験群は-.072)、ワーキングメモリ容量と無関連思考の抑制能力の相関 (統制群は.153、実験群は.235)、無関連思考の抑制能力とdプライムの相関 (統制群は-.047、実験群は-.214) を求めたが、いずれも有意ではなかった。
- ②高齢者の統制群のワーキングメモリ容量の下位群25名 (dプライムの平均は-.73) と上位群8名 (dプライムの平均は-.66)、実験群のワーキングメモリ容量の下位群5名 (dプライムの平均は-.07) と上位群6名 (dプライムの平均は.09) について、 2×2 の分散分析を行った。その結果、教示の主効果だけが有意であり (すなわちステレオタイプがもともとの能力差を反映しているのではなく、ステレオタイプを基にしたマインドセットの効果にすぎないことが示唆されたが)、高齢者に関しても、本研究の仮説は支持されなかった。なお、若齢者と同様に、ワーキングメモリ容量とdプライムの相関 (統制群は-.035、実験群は.504)、ワーキングメモリ容量と無関連思考の抑制能力の相関 (統制群は-.038、実験群は.600)、無関連思考の抑制能力とdプライムの相関 (統制群は.304、実験群は.316) を求めたが、いずれも有意ではなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 得られた知見と考察

- ①実験1と実験2の結果から、「女性は自動車に関する記憶力が悪い」というステレオタイプは、もともとの記憶能力の差を反映しているのではなく、若齢者でも高齢者でも、根拠のないステレオタイプに基づくマインドセットのために、効率的な記憶方略の自発的使用が阻害されていることが示唆された。
- ②実験2の結果から、「ステレオタイプが喚起によって、自我を脅かす評価懸念が生じ、これが記憶課題とは無関連な思考を誘発し、記憶方略の (自発的) 使用時に必要となるワーキングメモリの負荷となり、その結果、効率的な記憶方略が使用できず、記憶パフォーマンスが悪くなる」という本研究の仮説は支持されなかった。おそらく、その理由の一つとしては、小集団実験であったため「自我を脅かす評価懸念」がそれほど強く生じなかったことが考えられるかもしれない。

(2) 研究の問題点と今後の展望

- ①上に述べたように、「自我を脅かす評価懸念」がそれほど強く生じなかった可能性があるため、本研究と同様の実験事態であっても、たとえば衆人環視のもとで、一人ずつ実験を行うなどして、「自我を脅かす評価懸念」を強める操作が必要であると考えられよう。
- ②本研究では、リスニングスパンテストによりワーキングメモリを測定したが、小集団実験であったことや、音質の不明瞭な箇所が少なからずあったことで、(とりわけ高齢者の中にはテスト方法の理解が不十分な者も認められ) 得られたスパン得点の信頼性に疑問が残らなくもないので、個人式のリーディングスパンテストを使うなどして、スパン得点の信頼性を高める必要性が考えられよう。
- ③実験の実施にあたった研究協力者の手続きミスのため、高齢者の実験群が11名と少数となってしまう、結果の信頼性に問題が残っているため、引き続き、高齢者のデータを収集して、得られた結果の再検討が必要であろう。
- ④本研究の仮説 (「ステレオタイプが喚起によって、自我を脅かす評価懸念が生じ、これが記憶課題とは無関連な思考を誘発し、記憶方略の (自発的) 使用時に必要となるワーキン

グメモリの負荷となり、その結果、効率的な記憶方略が使用できず、記憶パフォーマンスが悪くなる」)を検討するにあたり、今後は、仮説を構成する4つの下位過程(「自我を脅かす評価懸念」「記憶課題とは無関連な思考」「ワーキングメモリの負荷」「効率的な記憶方略」)の一つずつを丁寧に分けて検討していくことが重要であると思われる。

5. 研究発表

なし

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 ア ジ ア 研 究 セ ン タ ー	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 そのための具体的な方法として、初年度は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。今年度は主に、居住地を持ちながら、複数社会を往来する存在を対象に調査研究を行った。
- (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 次年度も、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に努め、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仮説採択の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世代差や性差に留意しながら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

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開催し、現地調査報告の成果を共有し、比較検討することを試みた。
 - ② 6月、7月、10月、1月に通常の研究会を開催し、3月の研究会は、ご自身が複数社会をつなぐ実践者である歴史哲学者内山 節氏を招聘して公開シンポジウムを開催し、今年度までの研究成果の検証作業を行った。

3. 研究の成果

- (1) 現地調査
 - ① 計画的に現地調査を実施した。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。
 - ② 本研究プロジェクトは、家や家業の継承が前提ではなくなった地域社会が直面している課題を、主体となる地域社会に生きる人びとと所与の諸環境との関係を包摂的に把握

することで検証し、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となる新たな関係性を再構築するための集団形成の論理を明らかにすることを到達目標としている。

初年度は、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。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。その結果、第二次世界大戦後の家族法の改正やそれにともなう家業の消滅により顕在化した居住者と他出者との関係性に対する視座を確認した。

さらに今年度、検討を試みたのは、居住者や他出者により形成される複数社会の可能性である。今年度の研究成果のひとつとして、居住地を持ちながら複数社会を往来する人びとの存在により地域社会が維持されていることが明らかになった。このことを、現在の地域社会の成りたちを理解する視座と位置付け、複数世代にわたる定住を前提としなくなった現代社会における地域社会形成の論理について、年度末に開催した公開シンポジウムのテーマに設定し、検討を行った。

次年度以降の研究活動の視座として、地域社会の現状を理解するためには複数社会をつないでいく関係性の存在に留意していくことの必要性がプロジェクト参加者全員で共有されることになった。併せて、当該課題に対して複数世代の分担者で取り組む意義を再確認されることになった。

(2) 研究会

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5回研究会は2年間の研究活動の成果を検証する目的で、公開シンポジウムとして開催した。

第1回研究会

日時 6月22日(金) 18:00-20:30
報告 伊豆諸島新島における社会集団の関係性—19世紀を中心に— 山崎 久登
議事 (1) 今期プロジェクトの研究計画等について
(2) 分担研究計画について

第2回研究会

日時 7月27日(金) 18:00-20:30
報告 女相撲と観客論 亀井 好恵
議事 (1) 今期プロジェクトの研究計画等について
(2) 分担研究計画について

第3回研究会

日時 10月26日(金) 18:00-20:30
報告 調査研究の進捗状況について 全員
議事 (1) 第4回研究会(シンポジウム)の開催について
(2) 2020年度の研究結果刊行にむけての研究計画について

第4回研究会

日時 1月12日(土) 15:00-18:00
報告 市をめぐる新たなネットワークの構築と現代社会における可能性 山本 志乃
調査研究の進捗状況について(2) 加藤 幸治 亀井 好恵
高木 大祐 俵木 悟
議事 第5回研究会(シンポジウム)の開催について

第5回研究会

日時 3月2日(土) 13:00-17:00
シンポジウム
テーマ ともに生きる—地域社会における結び合いの可能性—
趣旨説明・進行 小島 孝夫
基調講演 「自分の村を持つ—結び合う世界を求め続けて—」 内山 節
事例報告 「地域社会と学校の『共有』」 高木 大祐

- 事例報告 「大正～昭和戦前期の地域社会における青年の生き方
：いちき串木野市大里の事例から」 俵木 悟
- 事例報告 「はたらく仲間の関係性と地域コミュニティ
—宮城県・牡鹿半島における災害復興と産業復興から—」 加藤 幸治
- コメント 田口 さつき

4. 研究の反省・考察

(1) 現地調査に関する反省

- 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) 研究会に関する反省

- ① 5回の研究会を開催したが、今年度も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。
また、最終年度にむけて、より多くの研究成果を比較研究する機会を設けることも課題となった。
- ② 前者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できるようになったことは、今年度も有効であった。後者の課題については、次年度の成城大学全学共通教育科目「成城学Ⅰ—柳田國男と民俗学—」の連続講義の機会を利用して、各研究成果の共有を図ることを試みることにした。研究の総括に向けて、分担者間の研究の深化を確認する機会となることが期待できる。

(3) 考察

今年度までの研究成果をふまえた研究分担者の仮説採択を前提とした考察内容は次のとおりである。最終年度となる次年度に仮説検証のための実証的研究を実施し、研究の総括を行なう。

- 小島孝夫 施策と地域社会
加藤幸治 捕鯨と震災復興をめぐる資源利用と関係性の変容
亀井好恵 おんな相撲と女性のネットワーク（仮）
玄蕃充子 ミツバチ飼養を介した関係性の諸相（仮）
今野大輔 嫌煙の時代におけるタバコと人（仮）
関根康正 下からの創発的連結（仮）
高木大祐 愛知県西尾市佐久島を題材とした研究
田中宣一 地域社会における民俗行事の変化、不変化
俵木 悟 地域社会における若者／青年という存在について
丸尾依子 集団離村による移住者を取りまく関係性—八丈小島を事例として
山崎久登 19世紀新島社会—相互依存関係と自律
山本志乃 市をめぐる新たなネットワークの構築と現代社会における可能性

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 玄蕃充子 「都市部におけるミツバチ飼養の再検討—ミツバチプロジェクトAの日記を事例に—」『民俗学研究所紀要』第43集 成城大学民俗学研究所
2019年3月
- ② 小島孝夫 「民具実測図作成の意義と課題」『民具マンスリー』第51巻12号
神奈川大学日本常民文化研究所 2019年3月
- ③ 田中宣一 「伝承文化の比較研究と追跡調査—塩尻市洗馬地区小曾部において—」

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

① 山本志乃 2019『市に立つ一定期市の民俗』創元社

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	准 教 授	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	立 教 大 学 学 部 現 代 心 理 学 部	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 部 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 学 部 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 学 部 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) 既に各チームでの原稿化が進んでいる以下①～③について仕上げと全体の調整をおこなうとともに、原稿化の遅れている箇所にも集中的に取り組む。
 - ① 現代における能楽の経済的基盤、人材育成等の問題の分析。
 - ② 比較演劇的な視点を踏まえた能楽論・脚本構造・演出の特徴についての研究。
 - ③ 時代の転換期や能楽の多様な担い手の存在を視野に入れた新しい能楽史の記述。
- (2) 新たに進展した研究の成果をシンポジウム、研究セミナー、講演、展示等で発信するとともに、英語版能楽全書の記述にも取り込んでいく
 - ① 面装束・楽器等、能道具の歴史、謡本の出版状況、能の絵画等、能に関わるモノの文化史的研究。
 - ② 能楽に関する貴重資料のデジタルアーカイブ、能楽に現れる仏教用語データベース、能の音楽、面装束の画像等、ウェブ上での発信に向けてのデータ集積と分析。
 - ③ 能楽資料に基づく言語学、脳科学や医療と能の関係等、学際的な研究。
- (3) ロンドンでの脳科学と芸術に関する催し（6月）、テルアビブ大学での比較演劇に関する国際学会（11月）で、それぞれ研究成果の一部を発表する。

3. 研究の成果

- (1) 英語版能楽全書の刊行およびウェブ発信に向けての成果
 - ① 伊達家旧蔵能楽資料デジタルアーカイブ（全171点。ただし100冊揃本も1点と数える）を解題付きで公開した。謡曲に見える仏教関連語句のデータを集積した（試験公開のためのプログラム検討中）。
 - ② 能楽の演出（謡・所作・囃子・替演出・舞台・装束等）、現代の能楽を成り立たせているシステム（経済基盤、興行のルール、修行過程、観客、素人と玄人等）、能の楽器（構造と歴史）、能と絵画（演技図・役者絵・風俗画・舞台絵等）、狂言（作品の成立、演技・演出の特徴、修行過程等）に関する英語原稿をほぼ完成した。
 - ③ 能の戯曲構造や演劇としての特徴、能面の作者、能のトレーニング、世阿弥の芸論等に関する最新の研究成果を英語または日本語の論文として発表した。
- (2) 能楽研究のフィールド拡大、国際的な研究発信等の成果
 - ① ロンドンで行われたNoh Reimagined 2018において、脳科学、神経美学の研究者らとともに、夢幻能で描かれる夢やイリュージョンについて多方面から検討・発表（英語）した。能の仮面、所作、独特の表現様式についてのレクチャー（英語通訳付き）もおこなった。
 - ② テルアビブ大学での国際学会に参加し、能の演技・演出についての研究成果2本を発表（英語）した。
 - ③ 夢幻能のテーマである記憶・回想・夢・無意識等々について、哲学、医学の専門家を交えてのシンポジウムを開催し、新たな視点での学際研究の可能性を探った。

- ④ 立命館大学アート・リサーチセンター、京都産業大学、京都市立芸術大学、東京文化財研究所、コーネル大学、スタンフォード大学、シンガポール国立大学等の研究者と協同で、日本の古典芸能に関して情報を発信するJPARC (Japanese Performing Art Research Consortium) を創設し、能の、特に演出・演技に関する情報の集約・発信に協力した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 「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、実演者に向けて発信」するという目的のため、最終的に研究成果を英語版能楽全書の形で刊行する計画を進めているが、研究グループにより進捗に差が生じている。ただし、国内外の研究者による研究成果自体は次項に掲げるとおり確実に挙がっており、学会発表・論文等で公開した成果をわかりやすい形でまとめるところに時間がかかっている状況である。
- (2) 最初に本共同研究の計画を立てた時点（2013年）で、書籍の刊行とウェブ発信のどちらに重点を置くかについて、研究者の国籍によって意見が割れた。最終的に、まずは書籍で刊行し画像や音源など活字では説明しにくい事柄をウェブで補うことにしたが、時間の経過とともに、ウェブ上での公開の重要性や要望は確実に増している。当初の計画通り2019年度中に書籍での刊行を目指しつつ、本研究の過程で強化された内外の研究者の連携を活かし、前記のJPARC等を利用して、書籍とウェブ両輪での発信を行っていく必要があると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 高橋悠介、散逸曲〈仏頭山〉の題材と環境、『能と狂言』16、pp. 130-137、能楽学会、2018年6月。
- ② 高桑いづみ、能の囃子の成立過程、国立能楽堂会場35周年記念企画展図録『囃子方と楽器』、pp. 18-24、独立行政法人日本芸術文化振興会、2019年1月。
- ③ Diego Pallecchia、Time in noh theatre performance and training、Time and Performer Training、pp. 43-49、2019年2月。
- ④ アダム・ゾーリンジャー、面打大光坊と「井関明息斎」、『能楽研究』43、pp. 25-39、能楽研究所、2019年3月。
- ⑤ 宮本圭造、面打井関備中守追考、『能楽研究』43、pp. 41-58、能楽研究所、2019年3月。
- ⑥ 山中玲子、*Mugen nô: Dreams, Memories and Recollections*、『能楽研究』43、pp. 158(1)-152(7)、能楽研究所、2019年3月。

(2) 口頭発表

- ① Fusion of Narration and Characters' Speeches in Noh: Its Socio-religious Function in Deity Plays、竹内晶子、Japanese Literature and Historical Narratology、2018年5月3日。
- ② Seminar "Noh Mask, Noh Movement: Illusory Devices" Noh Reimagined 2018、山中玲子・宮本圭造、ロンドン Kings Place、2018年6月29・30日。
- ③ Variant stage directions in Noh: signs of creativity or authority?、山中玲子、Creation, Preservation and Transformation of Theatre Traditions: East and West、2018年11月20日。
- ④ Repression of Free Acting in Noh: Media that Describe Kata(patterns) in Modern Times、横山太郎、Creation, Preservation and Transformation of Theatre Traditions: East and West、2018年11月20日。

(3) 出版物

- ① 宮本圭造編集、『近代諸藩能役者由緒書集成』能楽資料叢書5、459頁、能楽研究所、2019年3月。
- ② 宮本圭造監修、伊達家旧蔵能楽資料デジタルアーカイブ、能楽研究所、2019年4月よりウェブ公開
[https://nohken.ws.hosei.ac.jp/nohken_material/htmls/dateke-htmls-201903/index.html]

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 京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 国際文化資料館	教 授 研 究 員 館 長	研究統括、考古学資料整理・分析、博物館活動の実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
市 川 彰	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 名古屋大学高等研究院	客員研究員 特 任 助 教	考古学資料分析(とくにメソアメリカ太平洋側土器との比較研究)、生業研究(製塩など)
嘉 幡 茂	京都外国語大学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	考古学資料分析(とくにメソアメリカ中央部～ユカタン半島土器との比較研究)先スペイン期建造物の研究
村 野 正 景	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所 京都府京都文化博物館	客員研究員 学 芸 員	考古学資料分析(とくにホンジュラス、ニカラグア中央部土器との比較研究)、土器の移動、製作技法の研究、博物館活動の実施
Kevin Ernesto González Hodgson	Centro Arqueológico de Documentación e Investigación de UNAN-Managua	Lecturer	カリブ北自治区出身ということで、現地コミュニティとの連携を担当。考古学調査に協働する。

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) 北カリブ海岸自治地域を対象とした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。
 - ①ニカラグア・カリブ自治大学 (URACCAN) に収集されている当該地域の考古資料を分析することで、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。
- (2) 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とともに住民主体による文化遺産を活用した内発的開発を促す。
 - ①プエルトカバサス自治体や博物館との交流を行いプロジェクトへの理解を深める。
 - ②先住民であるミスキートのコミュニティを訪問しプロジェクトへの理解を深める。

2. 研究の計画

- (1) カリブ北自治区における現地調査（平成31年2月25日～3月6日の10日間）の実施
 - ①事前調査（ケビン・ホドソン、研究協力者深谷岬／京都外国語大学院博士課程）
 - ②3月1日～3月2日 研究機関と先住民村落訪問（研究代表査南ほか全員）
 - ③3月3日～3月6日 各機関収蔵遺物のカタログ作成（嘉幡茂、フリエタ・ロペス、市川彰、深谷）
- (2) マティグアス郡ティエラブランカ地区ラスベガス遺跡調査（平成31年2月24日～3月15日）との連携
 - ①3月7日～3月15日 平成30年度科研費B海外調査によるプロジェクト・マティグアスに連携した研究（南、深谷、研究協力者植村まどか／京都外国語大学院博士課程）

3. 研究の成果

- (1)URACCAN ビルウィ校における交流活動
 - ①副学長ジュリ・サパタ氏、人類学部フィデル・センターノ氏、自治振興研究課セシア・デイビス氏とディクシー・リー氏が参加し、「アメリカ地中海文化圏」研究の展望と学術交流の可能性について話し合った。4つある分校の一つ、カリブ南自治区にあるヌエバ・ギネア校では、コミュニティミュージアムに関する活動も行われており、2016年からは生徒らの手によって遺物の収集・保管も行われるようになった。また、URACCANでは一般教養として考古学の授業が開講されており、歴史や文化財に興味を持っている学生も多い。またビルウィ校では、言語学や環境学、地域開発など先住民に関する研究が重視されており、先住民文化に対する関心は強い。
 - ②社会環境学研究科にてレニン・グリーン氏との協議の場を得た。社会環境学研究科では、カリブ海岸地域の動植物相や海洋資源の利用、環境保護などに関する研究が行われている。水上交易は「アメリカ地中海文化圏」研究の一つのテーマであるので、特に海洋学の分野では共同研究の可能性があると思われる。また、3月1日には同研究科長マルコス・ウィリアムソン氏との協議の機会を得た。環境学に加え、社会人類学的調査も行っており、特に植民地時代の民族分布などに関する研究が進められているとのことである。
 - ③ビルウィ校副学長のエンリケ・コルドン氏と特に博物館活動について協議をした。コルドン氏は、いずれはURACCAN 4 分校に付属する博物館を設立したいと考えられており（ヌエバ・ギネアでは既に設立済）、文化財保存の方法や、マティグアスの博物館学的活動にも興味を示された。

(2) URACCANビルウィ校管理の考古資料の実測調査

図書館に保管されている遺物の写真撮影と図面作成を実施した。太平洋側に見られる靴形土器が収蔵されていたが、この地に出土したものか、それとも最近持ち込まれたものなのかは確定できなかった。こうした資料の評価には注意を要するところである。なお、調査成果は大学側に提出済である。

(3) BICU-CIDCAにおける活動

ビルウィには、ブルーフィールドズインディアンカリビアン大学大西洋研究所の北カリブ自治地域支部がある。所長のメルバ・マククリーン氏と調査について協議する機会を得、遺物の写真撮影や図面作成を実施した。いずれは2階のスペースを利用して博物館を開設したいと考えており、民族資料や考古遺物の収集・保管に努めたいとのことであった。

(4) 市役所との協議

市役所渉外課のリサ・リンド氏と協議をする機会を得た。渉外課は観光開発の部門も担っており、以前はティニニスカ博物館と協力して先住民文化に関する活動も行っていた。また、彼女の計らいで、副市長、市政代行官と調査について話す機会を設けてもらった。今後プエルトカベサスで本格的な調査をおこなう場合は、リンド氏を通して市役所に調査計画書を提出することで円滑に調査を進めることができるとのことだったが、考古学調査の先例はない。また、先住民村落を訪問する際には、車両の手配と通訳の依頼の面で協力をしていただいた。調査に対しては協力的な姿勢を見せてくれており、具体的にどのような援助をしてほしいのかということを繰り返し尋ねられた。なお、現在プエルトカベサスでは、先住民文化の保存や観光開発に関するプロジェクトはあるものの、考古学調査はおこなわれていない。

(5) ティニニスカ博物館における活動

ティニニスカ博物館では主にミスキートの民俗資料を展示しており、先住民文化の継承・保存を目指している。以前は先住民文化を紹介する雑誌「TININISKA」の制作もおこなっていた。館長のアナ・ロサ氏はRACCN北部のワスパン (Huaspan) から移住してきたため、ワスパンの資料が多く展示されている。アナ・ロサ館長からは、同じヒカラの容器でも用途によって呼び名が異なっていることや、衣服などに用いられるトゥノ (Tuno) の敲き方など、民族学的に興味深い説明をしていただいた。博物館考古遺物の数は少ないが、メタテや土器片数点が保存されており、メタテに関しては写真撮影と3D化作業を行った。

以前は市役所や民間と共同で活動を行っていた時期もあるが、資金不足や管理人による窃盗などが原因で、施設の老朽化や展示品保存などの問題を抱えている。現在はTININISKA Italiaのボランティアであるジュリア・トロビアーニ氏や現地ボランティア数名が博物館活動に携わっている。

(6) 先住民村落の訪問

ミスキートの村であるトゥアピ村、クルキーラ村を訪問した。村落内ではスペイン語はほとんど用いられていないため、通訳として市役所職員のエルメル・ジョンソン氏に同行していただいた。

① トゥアピ村 (Tuapí)

トゥアピ村は、ビルウィの北東約9kmに位置し、トゥアピ川の河口付近にある。現在は約1000人がこの村で暮らしている。住民のアルバロ・テイラー氏から、村の歴史などについてお話を伺った。トゥアピはミスキート語で「羽毛が生えた」という意味である。この村には、1033年に最初のイギリス人が到達し、主に3つの家族が中心となって医療や教育を普及させたとのことだった。また植民地時代にはベネズエラから黒人も流入し、ミスキートとの混血が進んだ。ドイツ系移民も一定数存在する。トゥアピ川がカリブ海岸に注ぐ場所ということもあり、植民地時代には海賊との接触もあった。

② クルキーラ村 (Krukira)

クルキーラ村は、ビルウィの北東約15kmに位置するクルキーラ湖畔にある。クルキーラは、ミスキート語でグァバの一種を意味している。ラニアド・ビルバーノ氏とケル・ビルバーノ氏からお話を伺った。この村の成立は比較的新しく、1838年に3つの共同体が合併して成立した。イギリス系移民が最初に到達したのは1840年頃である。漁業が主産業であるが、牧畜や果実栽培も行われている。また、1967年頃からは村の近郊で石油採掘が行われるようになった。

漁業は昔から盛んで、かつては鉛漁が中心だったが、現在は釣竿や網を使用している。

使用するカヌーは全長約4m、幅1m程度で四人乗りが多い。大体半日ほど漁に出る。スズキをはじめとする魚やエビなどを取っている。1年に2回ほどマナティと遭遇するらしい。クルキーラ湖畔からカヤックで約1時間漕ぐとカリブ海へ出る。

(7) プロジェクト・マティグアスに連携した研究

- ①ティエラブランカ地区ラスベガス遺跡マウンド1の発掘調査出土遺物の分析を通して、マタガルパ川によるカリブ海側との関連を探る研究である。今回の調査では十分な土器資料を確認できなかったが、マウンド1の調査では建物も建築時と設けられたと思われる遺構から年代測定のための良好な炭化物を採取できた（現在、C14年代測定中）。これによってカリブ海側との時期的平行関係を明らかにできる指標を得たと考えている。

4. 研究の反省・考察

(1) 遺物カタログの作成を通して

- ①各機関の所蔵品を調査した結果、出土場所や寄贈者が不明なものが多く、また予備知識が欠如しており出土地の推定も困難であることが判明した。また遺跡の踏査も行うことができなかつたため、今回は調査報告書という形ではなく、カタログとして収蔵遺物をまとめるに留まった。出土コンテキストや採集地が分からない遺物がほとんどであったが、祭祀メタテや杓形土器など、中間領域に特徴的な遺物が収蔵されていることが分かった。
- ②カタログに掲載した遺物は、URACCAN 図書館所蔵の土器9点と石彫2点、ティニニスカ博物館所蔵のメタテ5点とマノ1点、BICU-CIDCA 所蔵の土器脚部8点と魚尾型尖頭器1点、メタテ1点、磨石1点である。主に、写真撮影と3D 図面の作成を嘉幡、顕微鏡分析をフリエタ、実測と図面作成を市川と深谷が担当した。作成した遺物カタログは既に遺物所蔵機関へ提出済みである（2019年度報告書刊行予定）。

(2) 考古学調査に関する今後の展望

- ①現在ビルウィ近郊では考古学的調査は実施されておらず、遺跡や遺物の情報もほとんど得ることができなかった。しかしながら、先住民ミスキートが現在でも民族構成の多くを占め、言語や文化も生活の中に根付いており、先住民文化への理解と保存の意識は当然のごとくある。したがって、考古学的調査や博物館活動をはじめると、URACCANをはじめとする研究機関の協力は比較的得やすいと思われる。一方で住民の間では考古学や遺跡、遺物そのものが何を指しているのか伝わらないことも多かつたため、今後はマティグアス調査報告書を持参したり、遺物の写真を見せたりと、プロジェクトの目的や収集したい情報をより簡潔に説明するための工夫が必要であると感じた。
- ②次期調査では、おなじく北カリブ自治地域に位置し、既に遺跡登録がなされているロシータ（Rosita）やボナンサ（Bonanza）で遺跡踏査をおこなう予定である。また、URACCANヌエバ・ギネア校ではコミュニティミュージアム活動に並行して考古学的調査も視野に入れた活動がはじまっており、将来的には技術的な協力や共同調査も可能であると思われる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Minami, Hiroshi, Uemura, M., Balladares, S. y Lechado, L. (2018) Proyecto arqueológico Matiguás -Informe Final Jornada 2017-, Museo de Culturas Internacionales, Universidad de Estudios Extranjeros de Kyoto.

(2) 口頭発表

- ①Minami, H., ¿A quiénes sirve la Arqueología Pública? - Un vínculo entre la arqueología y el público local, I SIMPOSIO DE ARQUEOLOGÍA PÚBLICA EN EL SALVADOR “Más allá de la arqueología: Arqueología Pública”, Museo Nacional de Antropología Dr. David J. Guzmán, San Salvador, Oct. 26 2018.
- ②南博史「先スペイン期アメリカ地中海の交流に関する考古学的研究」、第18回ラテンアメリカ研究講座『京都外国語大学ラテンアメリカ研究所の現在』、京都外国語大学、12月7日

(3) 出版物

なし

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

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 原 克 博	神 学 部	教 授	研究代表者、総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
Michel Mohr	ハワイ大学宗教学部	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 Noh	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

「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のみにとどめれば、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質

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歩踏み出して、共通の課題領域としての「良心学」を意識すること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。特に、上記「良心の科学的実証研究」プロジェクトでは、良心に多角的にアプローチする隣接概念として「共感」を取り上げ、研究会で議論を重ねた。共感のポジティブな面と同時にネガティブな面にも光を当てることによって、閉ざされた（科学）コミュニティの中で、良心に安住することの危うさや、良心の脆弱さを確認することができた。

(2)良心学研究センター編『良心学入門』（岩波書店、2018年7月）の刊行

①これまでの研究成果として上記単行本を刊行し、広く一般社会に良心学の取り組みを伝えることができた。その目次は以下のようになっている。

総説 良心学とは何か

- I 思想・信条における良心：第1章 キリスト教と良心、第2章 イスラームと良心、第3章 哲学と良心、第4章 法と良心、第5章 新島襄と良心
- II 社会生活における良心：第6章 社会福祉と良心、第7章 経済学と良心、第8章 環境問題と良心、第9章 ビジネスと良心、第10章 スポーツと良心
- III 科学の時代における良心：第11章 科学技術と良心、第12章 医療と良心、第13章 脳科学と良心、第14章 心理学と良心、第15章 人工知能と良心

本書は「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5章「新島襄と良心」において、本学の建学の理念やその歴史的背景に触れているが、それが本書全体を通じて、より普遍的な課題と結びついており、そのことは上述の「1. 研究の目的」における「(4) 私立学校の建学の精神の学問的展開のモデル作り」に対応している。

また、この本の内容や背景を知ってもらうために、2018年10月25日、公開シンポジウム「良心学を展望する——『良心学入門』から見える世界」を開催した。執筆者のほぼ全員が登壇し、それぞれの専門領域から良心の定義を語り、良心概念の多面的な意義を明らかにした。

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。上記『良心学入門』は、その期待に対する一つの応答であるが、まだ道半ばである。「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。その課題を認識した上で、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きた。自校の伝統の内に完結する研究ではなく、変化する世界の現実に応答可能な「具体的な」良心の研究を継続していく必要がある。

(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（公開シンポジウムや本学での授業）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「エネルギー問題をめぐる倫理的課題と宗教——持続可能な社会のための指針としての「不在者の倫理」」、『電気評論』第660号（第103巻第12号）、10-15頁

(2) 口頭発表

- ①公開シンポジウム「生物進化における良心」、2018年6月12日、同志社大学 京田辺キャンパス。コメンテーター：貫名信行
- ②公開シンポジウム「良心学を展望する——『良心学入門』から見える世界——」、2018年10月25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、櫻井芳雄、貫名信行、武藤崇
- ③公開シンポジウム「子育てと良心」（赤ちゃん学研究センターと共催）、2018年11月29日、同志社大学 今出川キャンパス。コメンテーター：内山伊知郎、小原克博
- ④公開シンポジウム「AI・ロボット時代における良心」、2019年1月17日、同志社大学 今出川キャンパス。発表者：小原克博

(3) 出版物

- ①良心学研究センター編『良心学入門』岩波書店、2018年7月。
- ②小原克博『ビジネス教養として知っておきたい 世界を読み解く「宗教」入門』日本実業出版社、2018年10月。

学 校 名	天 理 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	古代東地中海地域における都市文化の変容とその背景		研 究 分 野	文 学
キ ー ワ ー ド	①東地中海 ②イスラエル ③考古学 ④都市 ⑤青銅器時代 ⑥鉄器時代 ⑦国際関係 ⑧テル・レヘシュ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
桑 原 久 男	文 学 部	教 授	研究総括 都市遺跡の比較研究 テル・レヘシュ遺跡の調査成果の整理分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 田 木 治 太 郎	文 学 部	教 授	ユーラシアにおける青銅器文化の展開と都市形成の比較研究、テル・レヘシュ遺跡における出土遺物の調査研究
橋 本 英 将	文 学 部	准 教 授	西アジアにおける金属製遺物の研究、テル・レヘシュ遺跡における出土建築遺構・遺物の調査研究
日 野 宏	天理大学附属天理参考館	学 芸 員	鉄器時代における建築遺構の比較研究 発掘調査成果の整理分析、関連資料の収集
巽 善 信	天理大学附属天理参考館	学 芸 員	青銅器時代～ローマ・ヘレニズム時代の工芸品の比較研究
山 内 紀 嗣	文 学 部	非 常 勤 講 師	青銅器～鉄器時代の宗教関連遺物の研究、テル・レヘシュ遺跡出土遺物の調査研究
岸 田 徹	文 学 部	非 常 勤 講 師	テル・レヘシュ遺跡における建築遺構の物理探査
長 谷 川 修 一	立 教 大 学 文 学 部	准 教 授	古代都市文化の聖書考古学的研究
小 野 塚 拓 造	東 京 国 立 博 物 館 学 術 研 究 部	研 究 員	後期青銅器時代～鉄器時代の物質文化の研究

古代東地中海地域における都市文化の変容とその背景

1. 研究の目的

- (1) 本研究の目的は、イスラエル、テル・レヘシュ遺跡の第3期発掘調査を開始し、以下の点の解明を行い、考察を深めることである。
 - ①都市が最も栄えた後期青銅器時代の遺構・遺物の様相を明らかにし、東地中海ならびに西アジア各地域との交流・交易の実態を解明すること。
 - ②「下の町」に存在が想定される大形建築遺構の構造を明らかにすること。
 - ③テル・レヘシュにおける都市文化や都市構造の変容が、東地中海地域全体を巻き込む国際情勢の変動とどのように連動するのか、実証的に検討を行い、歴史的な理解を深めること。

2. 研究の計画

- (1) テル・ゼロール遺跡出土遺物と調査記録の再検討
 - ①天理参考館所蔵のイスラエル、テル・ゼロール遺跡の出土遺物と調査記録を再検討する。
 - ②これにより、「海の民」との関連が指摘される同遺跡の歴史的な位置付けを再検討する。
- (2) テル・レヘシュ遺跡出土資料の調査研究と報告書作成作業
 - ①テル・レヘシュ遺跡出土遺物について、データベース作成や図版作成などの作業を行う。
 - ②第1期・第2期発掘調査の調査記録を整理し、報告書作成作業を集中的に行う。
- (3) テル・レヘシュ遺跡の第3期発掘調査の準備と関連資料の調査
 - ①翌年度に予定されている第3期調査に向けて準備を行う。
 - ②青銅器時代～初期鉄器時代の関連資料の収集を行う。
- (4) テル・レヘシュ遺跡の歴史的な位置づけの検討
 - (1)～(3)を通して、各時代におけるテル・レヘシュ遺跡の歴史的な位置づけを追求する。

3. 研究の成果

- (1) イスラエル、テル・ゼロール遺跡出土遺物と調査記録の再検討
 - ①天理参考館所蔵のテル・ゼロール遺跡出土遺物については、今年度は、常設展示の継続を行ったほかは、特段の研究成果が得られていない。調査記録の再検討については次年度以降の本格的な作業に向けた準備を進めた。
 - ②同地における青銅器時代～鉄器時代の移行に関しては、「海の民」の再評価を含め、近年、関心が高まっていて研究も進展しているので、今年度は、関連遺跡の報告書などの文献や研究書などの書籍、データ収集などを進めた。
- (2) イスラエル、テル・レヘシュ遺跡出土資料の調査研究と報告書作成作業
 - ①テル・レヘシュ遺跡出土資料については、第2期発掘調査(2013～2017年)による出土資料について、研究代表者(桑原)の監督のもと、研究協力者(アルバイト)の助力を得て、すべてのローカス(出土地点と層位)に対して、その出土資料の総体が把握できるような資料を作成することをめざし、ローカス別の遺物図版の作成と遺物観察表の作成を進めた。その結果、それぞれ予定していた作業を年度内にほぼ完了することができたが、全体をまとめる作業が今後に残されている。第1期発掘調査(2006～2010年)による出土資料については、同様に、ローカス別の遺物図版の作成と遺物観察表の作成に着手したものの、年度内に完了することができず、次年度以降に継続することとなった。
 - ②テル・レヘシュ遺跡の発掘調査報告書作成
懸案事項となっている第1期発掘調査の発掘調査報告書については、研究代表者・研究分担者が手分けをしつつ、年間を通して作業を継続し、また、天理大学において執筆者による数度の集中作業を行った。その結果、発掘調査報告書については、一部を除き、基本的に完成させることができたので、それを受け、オストラコン出版社との交渉を開始した。未完となっている後期青銅器時代～鉄器時代の土器の章については、担当の小野塚拓造氏が、2018年12月に開催されたイスラエル考古学研究会において、「テル・レヘシュ

の初期鉄器時代層」と題した研究報告を行い、討議を行った。その後、図版作成などの基本作業の完了をめざして集中的に作業を行うとともに、原稿執筆を進めているところである。また、第2期発掘調査の発掘調査報告書についても、現地協力者とも相談を行いつつ、内容や章立ての検討を進めるなど、基礎作業を開始することができた。

(3) テル・レヘシュ遺跡の第3期発掘調査の準備と関連資料の調査

①第3期発掘調査の準備

8月に研究分担者3名（橋本、長谷川、小野塚）がイスラエルに渡航し、出土資料を保管しているキブツ・エンドールにおいて、土器、石製品など各種の遺物について再検討を行った。合わせて、来夏に予定をしているテル・レヘシュ遺跡の第3期調査の開始に向けた「下の町」の調査について、調査場所の選定など、現地協力者（イスラエル考古局、イツハク・パズ博士）とともに、予備的な検討を行った。また、次年度の調査に向けて、遺構や遺物の3次元計測に対応するための機器やソフトの導入を行った。

②地中海地域における関連資料の調査

イスラエルにおける現地作業の終了後、研究代表者が合流し、トルコ、ギリシアを訪問し、マルマリス考古学博物館、ロドス考古学博物館、アテネ国立考古学博物館、リンドス遺跡、カミロス遺跡、アクロティリ遺跡、において、東地中海地域における後期青銅器時代の国際的な交流に関連する遺跡と考古資料の調査を行った。また、9月に、研究分担者2名（橋本、長谷川）が、スペイン、バルセロナで開催されたEAA2018年次大会において、東地中海地域の考古学的調査研究に関する研究動向に関する情報収集を行った。さらに、同大会終了後、スペイン南部に点在するフェニキア人植民地遺跡（Toscanos、Almunecar、Chorreras、Morro de Mezquitilla）の現地踏査をおこない、現地の博物館（マラガ博物館、セビリア考古学博物館、カディス博物館）での資料見学を行った。

(4) テル・レヘシュ遺跡の歴史的な位置づけの検討と情報発信

①テル・レヘシュ遺跡の歴史的な位置づけの検討

上記(1)～(3)を通して、各時代におけるテル・レヘシュ遺跡の歴史的な位置づけについての追求を行うとともに、関連遺跡の報告書などの文献や研究書の収集を進めた。

②研究成果の公開と情報発信

9月にスペイン、バルセロナで開催されたEAA2018年次大会で、テル・レヘシュ第1期発掘調査で発見されたローマ期の石製擦り石とその歴史的意義について報告を行った。また、テル・レヘシュの発掘調査ホームページをリニューアルし、英語での発信を強化するとともに、コンテンツの更新に務めた。

4. 研究の反省・考察

(1) テル・ゼロール遺跡出土遺物と調査記録の再検討

①青銅器時代～鉄器時代の海岸平野の諸遺跡の調査が進むことで、古く調査が行われたテル・ゼロール遺跡の再評価が求められている。次年度以降、実質的な作業を進めるとともにその成果の公開が課題となる。

(2) テル・レヘシュ遺跡出土資料の調査研究と報告書作成作業

①テル・レヘシュ遺跡第2期発掘調査の出土遺物に関して、図版作成や観察表などの作業を完了させることができたのは成果であった。第1期発掘調査の調査記録についても同様の作業を進めることが課題である。また第1期の発掘調査報告書の刊行が次年度における喫緊の課題となる。

(3) テル・レヘシュ遺跡の第3期発掘調査の準備と関連資料の調査

①翌年度に予定されている第3期調査に向けた諸準備は、事前の検討が進み、課題を整理することができたので、次年度の春期に集中的に行う必要がある。

②青銅器時代～初期鉄器時代の関連資料の収集については、概ね、計画通り進めることができたものの、当初計画をしていたトルコ、ボドルム水中考古学博物館での資料調査は、同博物館が長期閉館となり、実施することができなかった。

(4) テル・レヘシュ遺跡の歴史的な位置づけの検討

①テル・レヘシュのこれまでの歴史的な位置づけについて、今年度の関連調査により、東地中海地域全体に視野を広げた検討を行うことができたが、とくに、後期青銅器時代～鉄器時代への移行期の様相について、より考察を深めてゆく必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shuichi Hasegawa, Hisao Kuwabara and Yizhak Paz ‘Tel Rekhesh 2015: Preliminary Report’ “ Hadashot Arkheologiyot 130” , 2018年

(2) 口頭発表

- ① Hasegawa Shuichi, ‘Hopper-rubber mills in the eastern Mediterranean and its historical implications’ EAA Annual Congress 2018 (European Association of Archaeologists) (University of Barcelona, Barcelona), 2019年9月8日
- ② 小野塚拓造「テル・レヘシュの初期鉄器時代層」第25回イスラエル考古学研究会、2019年12月22日

(3) 出版物

- ① 長谷川修一2018『謎解き 聖書物語』（ちくまプリマー新書）、筑摩書房、2018年12月

学 校 名	北 海 商 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	地域経済強靱化に向けた「物流体系の再構築」に関する研究 －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に対し、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30年度には、前年度までの成果に基づき「研究目的(2)北海道物流における課題と対策の検討」の一部と「研究目的(3)北海道物流システムの在り方の検討」を行う。

(2) 計画

平成30年度には、主に以下の3項目(①～③)について実施する。加えて、④の「北海道物流実態把握調査(平成29年度実施)」の分析・報告書の作成を行う。

① 貨物駅、港湾の駅勢圏・後背地の分析を行う。

② トラック輸送力の低下、鉄道ネットワークの縮小可能性等を踏まえ、物流システムの

在り方を検討する。

- ③シンポジウム、講演会、学术论文などにより成果を広く公開する。
- ④「北海道物流実態把握調査(平成29年度実施)」の分析・報告書の作成を行う。

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)貨物駅、港湾の駅勢圏・後背地の分析

①貨物駅の駅勢圏などについて

日本貨物鉄道株式会社より貸与を受けた輸送実績に基づき貨物駅の駅勢圏を把握した。また、同データを基に1納入当りのコンテナ個数について、納品地点、納品回数、コンテナ個数別構成比率を分析した。この成果は、新規性に富む成果として、講演会(5. 研究発表(3)②、③)、学术论文(同(2)②)を通じ、広く公表した。

②港湾の後背地について

まず、国土交通省によるユニットロード調査に関するデータから港湾の後背地を分析した。得られた結果の妥当性の確認を目的に、同データと(一社)長距離フェリー協会から貸与を受けた輸送実績から地域間の流動量を推計し、貨物地域流動調査と照らし合わせたところ、両者の乖離が認められた。よって、流動量からの後背地の特定を断念し、「地域別の登録トラック台数」と「地域から各港湾への車両の分配率」等を用いた物流力に基づく分析方法を検討した。この物流力に基づく分析方法を「北海道物流の分析基盤の整備」に向けた取り組みの一つとして、北海道交通・物流連携会議 物流対策WG(5. (3)②)において提案した。

(2) 環境の変化を踏まえた物流システムの在り方の検討

まず、富良野地域を対象とし物流システムの在り方を検討した。富良野地域は、食料基地北海道の一大産地であり、農産品を関東・関西方面に移出している。大凡、7割を鉄道貨物輸送により移出し、他をトラック・シャーシ輸送により移出している。JR北海道の営業区間の見直しによる鉄道貨物輸送の存続、SO_x排出量規制強化によるトラック・シャーシ輸送運賃の上昇などが懸念される。同地域における物流の課題、生産性向上に向けた取り組み、物流システムの在り方の提案を取りまとめ、学术论文等で公表した(5. (2)①、③)。次いで、北海道全体の農産品輸送を対象として、課題、生産性向上にむけた提案等を取りまとめ、シンポジウム(5. (1))、学术论文で公表した(5. (2)②)。平成30年10月6日に北海道農業経済学会との共催で開催したシンポジウムでは(5. (1))、研究成果の報告・議論の深化を図った。ホクレン農業協同組合連合会・児玉卓哉氏、JAきたみらい・河田大輔氏、富良野通運株式会社・永吉大介氏、聴講者らと北海道からの移出輸送の在り方を中心に、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が報告者・パネリストを務め、阿部秀明がシンポジウムの座長・パネルディスカッションの司会を務めた。

(3)北海道物流実態把握調査の分析と報告書の作成

国土交通省北海道運輸局、公益社団法人 北海道トラック協会、日本物流学会北海道支部、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、平成29年度に道内でトラック運送事業を営む企業を対象として実施した「北海道物流実態把握調査」の分析、報告書の作成を行った。報告書では、「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」について、各々の状況と課題を明らかにし、今後の在り方について、行政、荷主、消費者、トラック運送事業者に向け提言をした。

(4)学会・シンポジウムを通じた成果の公開

シンポジウムの開催(共催1回)、講演会・公的行事での話題提供など(3回)、学術誌への掲載(3編)、学会での口頭発表(3件)などを通じて成果を公表した。

4. 研究の反省・考察

当初の研究計画に準じ順調に遂行された。「2.研究の計画(2)」のテーマ②について、研究当初は、北海道全体について検討した後に各地域への展開を図る計画であったが、個別の地域に関する検討を優先した。それまでの研究成果により、想定以上に物流に関する地域格差が大きいことが判明したためである。

5. 研究発表

(1)シンポジウムの開催

シンポジウム「食料基地北海道を支える物流の役割」(共催:北海道農業経済学会,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,平成30年10月6日,北海商科大学)

(2)学術論文(査読付)

- ①永吉大介,相浦宣徳: 農業に関連した物流における生産性向上の取り組み-北海道のへそ・富良野から提言-, 日本物流学会誌 第27号, 2019 (掲載決定)
- ②相浦宣徳, 阿部秀明,他: 北海道物流の課題と農業分野への影響 ~物流分野から農業への問題提起~, フロンティア農業経済研究 第22巻 第1号, 2019 (掲載決定)
- ③相浦宣徳, 阿部秀明,他: 新たな物流課題が農業生産地域・富良野に及ぼす影響について, フロンティア農業経済研究 第22巻 第1号, 2019 (掲載決定)
- ④阿部秀明: 座長解題「食料基地北海道を支える物流の役割」フロンティア農業経済研究, 第22巻 第1号,2019(掲載決定)

(3)講演会・口頭発表など

- ①相浦宣徳: 物流分野から農業分野への北海道物流に関する問題提起~北海道農業における物流の課題,北海道農業ジャーナリストの会 研究会,2018年12月14日
- ②相浦宣徳: 『生産者と消費者にとって望ましい形』と「モノの運び方」と「運ばれ方の選ばれ方」,平成30年度 北海道交通・物流連携会議物流対策ワーキンググループ(第3回),2019年1月30日
- ③相浦宣徳: 食料基地北海道を支える物流の役割と課題~物流分野からの問題提起とお願い,北海道地域農業研究所 総会特別講演,2019年5月29日
- ④相浦宣徳,他: 地域物流における生産性向上への取り組みに関する一考察 ~富良野地域を事例として~, 日本物流学会 第35回全国大会,2018
- ⑤相浦宣徳,他: 北海道のトラック運送事業における人材不足の状況と課題~北海道物流実態調査から~, 日本物流学会 第35回全国大会,2018
- ⑥相浦宣徳,他: 北海道物流実態調査に基づく北海道トラック運送事業における輸送機能

の生産性向上にむけた取り組みと課題, 日本経営工学会2018年 秋季大会,2018

(4)その他

- ①阿部秀明：潮流'18物流問題の現在地「課題が重なり環境は急激に悪化-輸送コスト上昇が競争力低下にも-」ニューカントリー, No.771, June.2018, pp.28-30

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

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
二階堂 有子	経 済 学 部	准 教 授	研究の総括、アンケート調査やフィールド実験の準備と実施

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 健 太	経 済 学 部	教 授	フィールド実験の実施、データ分析
高 橋 徳 行	経 済 学 部	教 授	GEM調査を用いた女性起業家の動向の国際比較
海 老 原 崇	経 済 学 部	教 授	上場企業の経営財務データを用いた分析
根 元 邦 朗	経 済 学 部	准 教 授	政治家の発言のテキスマイニング、政治計量分析

アジアにおける女性の経済・政治活動への参加拡大と そのインパクト

1. 研究の目的

(1) 本研究の学術的・社会的貢献

これまでの様々な研究により、社会での女性の積極的な参加が経済の活性化や経済成長に結び付くことが明らかになっている (Duflo, 2012)。現在、日本においても、女性役員・管理職の登用拡大など、女性の社会進出をより積極的に促す政策的な取り組みが行われており、女性はその潜在能力や可能性を十分に発揮し、企業や行政など社会のあらゆる場で活動することが期待されている。

西欧諸国ではすでに女性の登用・活躍推進に向けて、アファーマティブ・アクションが積極的に展開されている。たとえば、フランスやノルウェーでは、大企業の取締役会の一定数を女性とするクォータ制が導入されており、取締役会や上級管理職における女性の存在が企業の業績に正の影響を与えているという研究もある (McKinsey, 2008; Denzo and Ross, 2011)。また、国政・地方議会レベルで議員候補者のクォータ制を導入している国では、クォータ制を導入していない国と比して、社会サービスや福祉により多くの財源が割かれていること (Chen, 2011)、女性の政治家の方が男性の政治家よりも汚職が少ないこと (Brolloa and Troianob, 2016)、なども明らかになっている。

このように、欧米諸国における女性登用・推進政策やその効果については研究蓄積がある一方で、アジア諸国が採用している政策やその効果についての研究はまだ少ない。本研究ではそのギャップを埋めることを目的としている。特にアジアの人材不足は深刻化しているのにも関わらず、女性の活用が進んでいない。日本のように高齢化に向かっている国では、女性の労働参加の拡大により労働力減少の影響を緩和することを通じて、インドのような途上国では、女性の活躍促進により社会変革を通じて、長期的な成長がもたらされる可能性がある。

(2) 何を明らかにするのか？

本研究では、アファーマティブ・アクションをすでに導入し、その政策的な影響を分析可能である韓国やインドなどの国々を中心に、女性のエンパワメントが社会にもたらす影響について、経済的側面と政治的側面から分析を行う。経済的側面では、①上場企業の経営財務データを用いて、女性経営者・管理職の存在が企業の業績に与える影響を明らかにする。また②女性を取り巻く環境（制度や規制、市場）や女性の起業活動が経済に与える影響について、Global Entrepreneurship Monitor (GEM 調査) を用いて国際比較を行う。さらに、③実際に企業経営者を対象に、各種選好や競争心の男女差に焦点をあてた経済実験を行う。そして、それをアンケート調査のデータと結合させることにより、女性経営者の増加や企業の成長を促す要因を明らかにする。政治的側面として、国政や地方議会議員がソーシャル・ネットワークなどを通じて発信したメッセージのテキストマイニングや計量政治学的な分析を通じて、政策的嗜好の男女差やアファーマティブ・アクション導入の影響について明らかにしていく。

こうした研究を通じ、日本におけるアファーマティブ・アクションの在り方に一定の知見を得ることができるとともに、アジアにおいて、今後の持続可能な開発の鍵となる女性の活用促進に向けて政策的インプリケーションを得ることができる。

2. 研究の計画

下記の通り、4つのグループに分かれて研究を行う。

(1) 女性の登用拡大と企業パフォーマンス（ガバナンス）に関する文献の整理とデータの整理 ＜海老原、二階堂＞

取締役会や上級管理職における女性の存在が女性の雇用や企業の業績に与える文脈について、先行研究の整理を行う。また、すでに海老原が所有している日本企業の経営財務データについて最近年のデータの追加を行う。インドについては約40,000企業の経営財務データベース「Prowess」を購入し、データの整理を行う。さらに、インドの上場企業への訪問や会計士・研究者など専門家との面会を通じ、取締役会に少なくとも一人の女性の登用を義務付けた2013年会社法施行の影響について、今後の分析を頑健なものにしていく。

(2) 女性を取り巻くビジネス環境（制度や規制、市場）の整理と分析 ＜高橋、二階堂＞

女性を取り巻く、インフォーマル・フォーマルな制度や規制といったビジネス環境についての文献整理を行う。また、GEM調査のデータベースを用い、アジアにおける女性の起業活動の特徴・動向を分析する。さらに、女性の起業活動の状況やそれを取り巻く社会的、文化的、政治的背景についてまとめる。

(3) 中小経営者に関する「アンケート調査」の実施 ＜田中、二階堂＞

女性の経営者が相対的に多い南インドのカルナータカ州において、中小企業経営者を対象にアンケート調査を行う。調査地域の選定や調査の実施にあたっては、地域の女性議員比率も考慮しながら、インドの研究所（Society for Social and Economic Research: SSER）の研究者と補助学生の協力を得て行う。アンケートでは、企業の属性や経営状況、企業における女性従業員や女性役員比率のほか、起業家精神や企業の成長に影響を与える経営者の属性、すなわち宗教、カースト、学歴、家族関係、ネットワークなどを把握する。

(4) 国政・地方議員に関するデータの収集 ＜根元、二階堂＞

インドや他のアジア諸国における国政・地方議会における女性議員比率などの基礎的な政治データの収集を行う。また、議員のフォーマルな言説データ（ツイッターなど）での発言を収集し、女性議員特有の政治的メッセージや政治的な立場、政策的嗜好の特性を明らかにするためにテキストマニングによる分析を行う。

3. 研究の成果

(1) 女性の登用拡大と企業パフォーマンス（ガバナンス）に関する文献の整理とデータの整理 ＜海老原、二階堂＞

上級管理職や取締役会における女性の存在が女性の雇用や企業の業績に与える文脈について、先行研究の整理を行った。海老原は日本企業の経営財務データについて、最近年のデータ追加を行い、2003年度から2014年度までの全上場企業における女性役員（取締役・監査役/社内・社外/代表権者・非代表権者）の分布状況を作成した。2019年2月にはインド出張を行い、インド国立証券取引所やインディラガンジー会月研究所などを訪問し、資料収集と新会社法導入の影響についてヒアリングを行った。出張を通じ、比較研究の前提となる日本とインドのコーポレート・ガバナンスなど法体系への理解を深めることができた。

(2) 女性を取り巻くビジネス環境（制度や規制、市場）の整理と分析 ＜高橋、二階堂＞

女性を取り巻くビジネス環境についての文献整理を行った。高橋は、GEMからデータの取得が可能なフィリピンやベトナム、インド、マレーシア、インドネシア、タイ、中国、韓国における女性の起業活動の特徴と動向を分析するためデータの整理を行った。二階堂は、8月に女性起業家研究で有名なDiana Project (Bobson College)の年次国際会議に参加し、インドの小規模女性経営者の文化的背景（宗教やカースト、ビジネス環境）がいかに企業の成長に影響を与えているかについての論文を発表した。

(3) 小規模企業家に対するトライアル調査 <田中、二階堂>

2018年8月下旬に、インド・マイソール地域において、現地の研究機関（SSER）と学生、NGOの協力・補助を得て、小規模企業家を対象（計80名）にパイロット調査を行った。まず、企業の属性や経営状況ほか、経営者の属性（宗教やカースト、学歴、家族・ネットワーク、社会的制約）などを把握するため、質問票調査を行った。次に、企業の成長に重要と考えられるリスクや信頼心、競争心を測るための経済実験を行った。今後はデータの分析を進めるとともに、来年度の本調査に向けて、トライアルを通じて明らかになった問題点の改善や質問票の見直しを行う。

(4) 国政・地方議員に関するデータの収集 <根元、二階堂>

2018年度は、ニュージーランドにおける国会議員の発言を word embedding という機械学習の手法を用いて分類し、その分析結果をアメリカ政治学会にて発表した。選挙制度改革により比例代表制が導入されて以降、特に与党議員の発言が攻撃的でなくなっていること、女性議員ほど攻撃的な発言を避けていることが分かった。

4. 研究の反省・考察

上記の「3. 研究成果」において、(1)～(4)に分かれた研究グループの研究成果並びに今後の課題についても言及した。次年度の研究において、より考慮すべき点として下記が挙げられる。

- ① インドのような宗教・言語・人種が多様な国では「女性」も多様であることを考慮して分析をする必要がある。
- ② アファーマティブ・アクションのネガティブな効果や逆差別についても、よりレビューを行い、多角的な視点を考慮に入れた分析を行うことが必要である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yuko Nikaido and Jesim Pais (2018) “Women owning small firms in India: Analysing social and cultural diversity” Musashi University Discussion Paper Series, No. 90
- ② 高橋徳行 (2018年) 「日本は起業が難しい国なのか」アド・スタディーズ 第66号、吉田英雄記念事業財団発行、8-12頁
- ③ 赤塚尚之・海老原崇 (2018年) 「地方銀行単体の業績指標の価値関連性－業務純益を明示しない損益計算書の様式の妥当性に関して－」『現代ディスクロージャー研究』17:17-47頁

(2) 口頭発表

- ① Yuko Nikaido and Jesim Pais. “Women owning small firms in India: Analysing social and cultural diversity” Diana International Research Conference 2018, 1st August 2018
- ② Nemoto, Kuniaki, and Pedro Franco de Campos Pinto. “Civility and Hostility in Parliamentary Politics” the 2018 APSA Annual Meeting and the 6th Asian Political Methodology Meeting, January 2019

(3) 出版物

- ① なし

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
上 山 仁 恵	名 古 屋 学 院 大 学 経 済 学 部	准 教 授	データ解析担当
洪 澤 博 幸	豊 橋 技 術 科 学 大 学 工 学 研 究 科	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、就学・就労・結婚・出産・相続など人生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っている。本研究は、家族内の所得・リスク移転か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、実地調査に基づく実証分析を行う。

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、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)。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、地縁・血縁に基づく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。事業主の高齢化が進むわが国では近年、「承継円滑化法」の施行、商工会・商工会議所による支援拠点の整備、地域金融機関等の金融支援が実施されてきた。現状、第三者承継など市場を通じた事業承継は稀であり、小規模法人・個人事業の事業承継候補の90%以上が、親族である。事業承継に直面する企業の70%以上が小規模法人・個人事業である沖縄県では、親族内承継はさらに重要である。

事業承継に関する先行研究は、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ことが期待される。

これまで、本研究の参加メンバーを中心にして、関連するテーマについて以下の二つのプロジェクトを実施してきた。

- ① 全国10大学の学部生を対象に2014年に実施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、集合的意思決定モデルが日本の大学生に当てはまることを示した。
 - ② 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」)。アンケートでは、事業主のみならず、事業を引き継ぐ可能性のある後継候補に対しても同時に調査を行った。理論としては、経済組織における権限の配分と代理人による情報生産の相互作用に関するモデル(Aghion and Tirole, 1997)をファミリー企業に応用した。経営者が名目権限を後継者に委譲すれば、名目権限を失う一方、後継者の実質権限の誘因が引き上げられる。経営者が名目権限を維持すれば、後継者の新プロジェクトを拒否できる一方、後継者の情報生産の誘因は低くなる。こうした名目権限と実質権限のトレードオフについて、アンケート調査に基づき実証分析を行い、経営者が後継候補を事前に明確にすることが、後継候補の努力インセンティブを高め、経営者と承継候補の間の「信頼」が、事業承継の確率を高めることが示された(日本応用経済学会2017年度春季大会(久留米大学)での報告)。
- (2) 平成29年度においては、以下の通りの研究成果を達成した。
- 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係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。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。
- (3) これらの先行研究にもとづき、本研究は以下の二点について明らかにする。
- ①親子間の事業承継に関するAghion and Tiroleモデルをさらに発展させる。具体的には、不特定多数のステークホルダーである市場への名目権限の委譲の可能性を付加した上で、家族紐帯の進化論的安定性(Alger and Weibull, 2010)について議論する。
 - ②沖縄県商工会連合会・那覇商工会議所、沖縄銀行等の支援機関・地域金融機関と連携し、ファミリー企業を対象としたアンケート調査を沖縄県全体に対して実施し、上記の理論モデルの含意について、実証的に分析する。

2. 研究の計画

- (1) 平成30年度の研究計画は、以下の通りである。
- ①理論モデルを拡張し、親子間の事業承継に関する新たな仮説を提示する予定である。具体的には、不特定多数のステークホルダーである市場への名目権限の委譲の可能性を付加した上で、家族紐帯の進化論的安定性(Alger and Weibull, 2010)について議論する。理論モデルの構築には、竹田陽介理論モデル・リーダーを中心にして検討を行う。
 - ②データ集計・解析については、沖縄県商工会連合会、那覇商工会議所で行った共同アンケート調査（詳細版）の実証分析を進めたいと考えている。また、沖縄県下で事業承継アンケートを実施していない商工会議所である浦添商工会議所、沖縄商工会議所等と共同でアンケート調査を実施したいと考えている。今後、沖縄県商工労働部・内閣府沖縄総合事務局等の公的機関と、事業承継に関する有効な中小企業政策を提示するよう連携したいと考えている。地域金融機関との連携し、事業承継後の経営状況に関するアンケート調査を共同で実施したいと考えている。これまでは、事業承継前のデータの収集に力を入れていたが、事業承継後の企業経営に関する実証分析を行う予定である。アンケート調査・集計については、小巻泰之データ解析・リーダーを中心に検討を行う。アンケート調査の集計については、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30年度の研究成果については、以下の通りである。
- ①理論モデルの拡張については、Alger and Weibull, 2010の動学モデルをベースとして拡張したモデルを統計研究会金融班夏合宿（竹田陽介、打田委千弘、上山仁恵）“Evolutionary Stability of Family Business Succession: A Theory and Some Evidence”、2018年9月21日）で報告を行った。
 - ②データ集計・解析については、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に関する論文を日本応用経済学会春季大会（打田委千弘、上山仁恵、島袋伊津子、竹田陽介「沖縄那覇での事業承継の現状と課題についてー那覇商工会議所共同アンケート調査からー」、2018年6月23日）で報告を行った。
 - ③コザ信用金庫と共同でアンケート調査を実施した。これは、コザ信用金庫の各支店を通して20社以上のデータを回収し、合計389社からなるデータを収集した。当研究プロジェクトでデータベース化と解析作業を進め、コザ信用金庫主催の事業承継セミナーで報告を行った（コザしん事業承継セミナー、10月24日（あやかりの杜多目的ホール：北中城村）10月25日（沖縄県教職員共済会館八汐荘屋良ホール：那覇市））。報告を行った結果は、打田委千弘、上山仁恵、島袋伊津子、富村圭「沖縄県における事業承継の現状と課題についてーコザ信用金庫との共同アンケート調査からー」、『経済環境研究』、第8号、2019年3月にて発表した。これらの共同研究から、コザ信用金庫は「第10回全国信用金庫事業

承継・M&A研究会」において「顧客支援賞」を受賞した。

また、これらのデータを用いて、那覇商工会議所主催のファミリービジネス講演会(2019年2月8日、沖縄商工会議所)や三遠南信地域連携センター主催の越境地域政策研究フォーラム分科会4「リニア時代と越境地域整備」で報告(打田委千弘「産業基盤整備としての事業承継ー沖縄県と愛知県の比較ー」、2018年12月22日、愛知大学)を行った。

- ④内閣府沖縄総合事務局、沖縄県、沖縄県事業承継ネットワーク、沖縄県下の若手経済団体、沖縄県商工会連合会、沖縄県商工会議所連合会等と共同で「沖縄事業承継フォーラム」を開催した。第一部は、沖縄事業承継推進会議として開催し、研究代表者の打田委千弘氏がモデレーターとして「親子間、兄弟間での対話の重要性」をテーマに対話形式の講演を行った。第二部では、愛知大学も主催に加わり、「沖縄県における事業承継とM&A」というテーマでパネルディスカッションを行った。モデレーターとして研究分担者の竹田陽介氏が参加し、沖縄県下の事業承継に係る支援機関・地域金融機関と活発な議論を展開した。

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理論モデルの拡張については、平成30年度中にセミナー報告をするところまで達成できたが、論文作成までには至らなかった。今後は、理論モデルの更なる拡張や実証分析を付けることで国際的なジャーナル等に投稿を行いたいと考えている。
- ②平成30年度では、コザ信用金庫や沖縄県事業引継ぎ支援センターと共同でアンケート調査を実施できたが、それ以外の支援機関・地域金融機関とは共同でアンケート調査が出来なかった。更に、那覇商工会議所・沖縄県商工会連合会と共同で行ったアンケート調査については、今後、更なる計量経済学的な分析を行い、国際的なジャーナル等に投稿したいと考えている。
- ③内閣府沖縄総合事務局、沖縄県、事業承継ネットワークなど沖縄県下の事業承継に係る機関と共同で事業承継フォーラムを開催し、一定の政策提言が出来たことは大きな成果であると考えている。今後、関係機関との更なる連携を考えたい。

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、富村圭「沖縄県における事業承継の現状と課題についてーコザ信用金庫との共同アンケート調査からー」、『経済環境研究』(沖縄経済環境研究所)、第8号、2019年3月、pp37-56

(2) 口頭発表

- ①打田委千弘、上山仁恵、島袋伊津子、竹田陽介「沖縄那覇での事業承継の現状と課題についてー那覇商工会議所共同アンケート調査からー」、日本応用経済学会春季大会(京都大学)、2018年6月23日
- ②竹田陽介、打田委千弘、上山仁恵” Evolutionary Stability of Family Business Succession: A Theory and Some Evidence”、統計研究会金融班夏合宿(雲仙市)、2018年9月21日
- ③打田委千弘「沖縄県における事業承継の現状と課題についてーコザ信用金庫との共同アンケート調査から」、コザしん事業承継セミナー(北中城会場、那覇会場)、2018年10月24、25日
- ④打田委千弘「産業基盤整備としての事業承継ー沖縄県と愛知県の比較ー」、越境地域政策研究フォーラム分科会4「リニア時代と越境地域整備」(愛知大学豊橋キャンパス、愛知大学三遠南信地域連携センター主催)、2018年12月22日
- ⑤打田委千弘「沖縄における事業承継のかたちをもとめてー沖縄県と愛知県の比較からー」、ファミリービジネス講演会(沖縄商工会議所、那覇商工会議所主催)、2019年2月8日

(3) 出版物

なし

平成30年度（第43回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	関 西 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	災害移民に関する国際比較研究		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①避難 ②移住 ③水害 ④原子力事故 ⑤復興 ⑥帰還 ⑦ロジットモデル ⑧費用便益分析		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
永 松 伸 吾	社 会 安 全 学 部	教 授	研究統括・南カリフォルニア大との折衝

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
土 田 昭 司	社 会 安 全 学 部	教 授	リスク情報に関する分析
越 山 健 治	社 会 安 全 学 部	教 授	居住地選択に関するモデル分析

災害移民に関する国際比較研究

1. 研究の目的

「災害移民」(disaster migration)とは災害を契機として移住した人々を指す。移住が自発的か非自発的かは問わず、国境や州をまたぐ移住もあれば、郡や市町村をまたぐ程度の移住も様々である。本研究の目標は、2011年福島第一原発事故後の避難者データを用いて、原発事故後の居住地移動の理論モデルを構築する。こうしたモデルを構築することは学術的のみならず政策的な意義も高い。例えば、巨大災害の発生後の人口移動を予測することで、早期の生活再建の政策的支援に資することができる。また被災地への帰還行動を予測することで、被災地の人口回復促進のための政策を検討することもできる。

2. 研究の計画

福島第一原子力発電所事故により避難行動を行った人々へのアンケート調査結果(2012年3月実施、N=10,089)を用いて、帰還の意思決定行動に関する分析を行う。このアンケートは、原発事故当時に避難指示区域に居住し、それぞれの市町村に避難者登録をした人々、あるいは総務省に避難者登録をした人々の合計41,754人を対象として、2012年3月に実施したものである。回収率は24.1%であり、原発避難者を対象として実施された調査としては我が国で最も大きなデータセットである。

これらの分析は、ランダム効用モデルを用いて定式化する。個々の被災者の避難先の決定行動は、必ずしも一様ではない。我々は、個々の被災者の効用は避難先によって決定されるものと考え、実際にはどこに避難すればどの程度の効用が得られるのかを個々人が前もって完全に把握することは困難であり、そのために、被災者の効用は確率変数であると仮定する。こうした仮定のもと、人々が避難先*i*を決定する確率は、それ以外のすべての避難先*j*を選んだ場合の効用を上回る確率であると定義する。これにより、人々の避難行動の決定は多項ロジットモデルとして定式化することが可能になる。

本研究は、さらにこうした分析結果を踏まえ、海外の事例との比較から共通点や原発事故の特異点を明らかにすることである。このため、共同研究パートナーである南カリフォルニア大学のアダム・ローズ教授らとともに、2018年7月にボルダーにて開催される自然災害ワークショップにおいて、研究発表を行う。また、CGPプロジェクトの一環として10月にロサンゼルスにて開催される研究成果発表会に研究メンバーで出席し、米国側の研究者らと議論をする。

3. 研究の成果

研究の成果として、帰還の意思決定行動の分析結果は次のとおりである。まず、被説明変数を将来的な帰還意思を持つ回答者について1、帰還意思がない、もしくはわからない回答者については0として、単純なロジットモデルを推計した。その結果、(1)男性、および世帯内に60歳以上の高齢者のいる者については、帰還意思が高い、(2)世帯内に子どもがいる人については帰還意思が低い、ことが明らかになった。

また、(3)住宅を所有している人については帰還意思が高いこと、(4)災害による住宅被害がある人については帰還意思が低いことも明らかになった。この結果は、先行研究や理論的予測とも整合的であった。加えて、もともと居住していた地域の放射線量が高いほど帰還意思が下がるということも明らかになった。

加えて、所得が高ければ高いほど帰還意思が下がる傾向にあることも明らかになった。これは福島に関する先行研究であるMunro and Managi(2017)とは異なる結果であった。これは、所得の低い人は他の地域で生活するという選択肢が制約されるからであると解釈できる。

これらの分析結果は、避難指示区域内から避難した人と、警戒区域外から避難した人(いわゆる自主避難者)とは傾向が異なる。自主避難者の帰還意思決定構造はより単純で、ほとんどが地元の放射線量で説明できた。それゆえ、年間放射線量1ミリシーベルトの低下により増加する帰還意思確率(放射線量の限界効果)は、強制避難者で0.0029%、自主避難者では0.0053%と計算されたが、自主避難者の方が帰還意思に対する線量低減効果が大きいことがわかる。自主避難者

と強制避難者を明示的に区別していない Munro and Managi (2017) ではこの値は 0.0031-0.0034 と推計されており、我々の分析と整合的であった。

これらの分析結果を用いて、2016年10月時点での線量を与えることで、避難者の帰還意思のシミュレーションを行った。その結果を表1に示す。ここでは、帰還意思を示す確率が0.5を上回る個人について帰還すると仮定している。また、このシミュレーション結果を実際の値と比較している。実際の値とは、避難指示が解除された市町村については2016年時点での実際の帰還率を、まだ解除されていない地域については2016年時点での住民意向調査の結果である。これによれば、実際の帰還意思とモデルは一部の自治体を除きかなりの程度当てはまっている。但し、田村市、南相馬市、川俣市、葛尾村の実際の値は、自治体内部の一部の住民に限定したものであることが、シミュレーションとの差を大きくしている原因であり、その意味でもこのモデルの精度はかなりの程度高いことがわかる。

表1 避難者の帰還行動シミュレーション結果

自治体名		平均放射線量 (mSv/year)			帰還希望者割合				
		2012年3月	2016年10月	変化率%	推計結果			実際の値 2016 [C]	差 [B]-[C]
					20123月 [A]	2016年10 月 [B]	[B]-[A]		
田村市	P	3.582	1.414	-60.5%	75.5%	76.1%	0.6%	73.7% ^{a) c)}	2.4%
南相馬市	P	13.181	4.344	-67.0%	19.4%	27.7%	8.3%	50.8% ^{a) c)}	-23.1%
川俣市	P	8.222	2.418	-70.6%	8.6%	12.9%	4.3%	43.9% ^{b) c)}	-31.0%
檜葉町	P	6.826	1.903	-72.1%	25.6%	27.1%	1.5%	29.3% ^{a)}	-2.2%
富岡町	T	25.584	5.643	-77.9%	4.9%	19.5%	14.6%	16.0% ^{b)}	3.5%
川内町	P	6.795	2.295	-66.2%	61.3%	71.4%	10.1%	63.7% ^{a)}	7.7%
大熊町	T	44.729	12.365	-72.4%	0.2%	12.1%	11.9%	11.4% ^{b)}	0.7%
双葉町	T	62.456	19.817	-68.3%	0.0%	8.8%	8.8%	13.4% ^{b)}	-4.6%
浪江町	T	59.155	20.140	-66.0%	0.1%	11.3%	11.2%	17.5% ^{b)}	-6.2%
葛尾村	T	22.235	7.670	-65.5%	10.3%	25.9%	15.5%	43.4% ^{a) c)}	-17.5%
飯舘村	T	23.650	6.911	-70.8%	10.2%	29.3%	19.2%	33.5% ^{b)}	-4.2%
福島県					15.2%	27.0%	11.8%		
避難指示区域					6.2%	16.4%	10.2%		
避難指示区域外					30.2%	37.6%	7.5%		

注: "T" は全域が、"P" は一部が避難指示区域内であることを示す。

a) すでに帰還したか、まもなく帰還すると回答した者(復興庁, 2017)

b) 帰還するつもりと回答した割合(復興庁, 2017)

c) 意向調査の直前に避難指示が解除された山木屋地区550世帯に限定した調査である。

この研究結果を元に、政府が行った除染がどの程度人々の帰還意思に影響したかの推計を試みる。福島第一原発事故による避難者の総数はおよそ 164,000 人であり、そのうち 81,000 が強制避難者、83,000 人が自主避難者であると見積もられている。線量低下による帰還率の増加量(表1における[B]-[A])をこれらの避難者に乗ずることによって、除染による2012年から2016年にかけての線量低減効果で帰還意思を固めた避難者は、避難指示区域で8,262人、避難指示区域外で6,225となり、合計14,487人と求められた。他方で除染にかかった費用は中間貯蔵施設の建設も含めると4兆8000億円と見込まれ、一人当たりの帰還者に対して3.36億円投じた計算となる。

これらの成果は2018年11月15日に南カリフォルニア大学にて開催されたシンポジウム「大規模災害からの人口移動と帰還」にて発表された。このシンポジウムでは、米国側からコロラド大学Lori Peek教授、パーデュー大学Brigitte Wladorf教授、カリフォルニア州立工科大学のRyan Alaniz教授らの参加を得て、災害と人口移動に関する議論を行った。

4. 研究の反省・考察

福島第一原発の復興政策において、除染の効果が限定的であることは、非常に衝撃的な結果となった。もちろん、このことをもって、除染コストが過大であったということは必ずしも正しくないが、この金額は代替的な方法について十分検討の余地がある数字であることは間違いのないであろう。

他方で、本研究が示したことは、ハリケーンカトリーナなどの自然災害からの復興過程における人々の帰還行動と、原発災害の帰還行動については、それほど根本的な違いがみられるわけではないということである。とりわけ Paxson and Rouse (2008)が示した、住宅、土地、雇用、人間関係などの「特定の場所に帰属する資本」(Location Specific Capital)をどれくらい有しているかが帰還意思に大きく依存するという理論は、福島第一原発の事故でも同様に実証された。

本研究の限界は、使用したデータが避難者を対象としたものであるという点である。避難指示区域外で、避難しなかった人のデータは存在しないため、なぜ避難しなかったのかを分析することができない。このため、本研究では避難した人の帰還行動に限定した分析を行ったが、今後は避難しなかった人のデータも含め、災害時の避難行動をより包括的に明らかにすることが求められる。

参考文献

Munro, A. and S. Managi (2017). "Going Back: Radiation and Intentions to Return amongst Households Evacuated after the Great Tohoku Earthquake." *Economics of Disasters and Climate Change* 1(1): 77-93.

Paxson, C. and C. E. Rouse (2008). Returning to New Orleans after Hurricane Katrina. *American Economic Review* 98(2): 38-42.

5. 研究発表

(1) 学術論文

- ① Shingo Nagamatsu, Adam Rose, and Jonathan Eyer (2018) Return Migration and Decontamination after the 2011 Fukushima Nuclear Power Plant Accidents, CREAT discussion paper, University of Southern California, Los Angeles, United States (現在投稿中)

(2) 口頭発表

- ① Shingo Nagamatsu, *Population Repatriation of Migrants Following the 2011 Fukushima Nuclear Power Plant Disaster*, Japan Foundation, Kansai University, and University of Southern California, Bedrosian Center on Governance, "Symposium on Population Migration and Repatriation Following Major Disasters," University of Southern California, Los Angeles, United States, 2018年11月15日.
- ② Shingo Nagamatsu, *Population Repatriation of Migrants Following the 2011 Fukushima Nuclear Power Plant Disaster*, Japan Foundation, Kansai University, and University of Southern California, Bedrosian Center on Governance, "Symposium on Population Migration and Repatriation Following Major Disasters," University of Southern California, Los Angeles, United States, 2018年11月15日.

(3) 出版物

なし

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	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	保 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	保 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) 超高齢社会に突入した我が国日本における「健康長寿社会」実現の意義

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) 高齢者の骨格筋機能

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) 血中アディポネクチン濃度の変化とサルコペニア

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 Cardiol 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) 本研究の目的

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

初年度の培養細胞を用いた実験結果を踏まえ、研究計画の2年目となる2018年度は、血中アディポネクチン濃度の上昇が、加齢性の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について、in vivo 実験モデルを用いて検証している。当初は、①血中アディポネクチンの増加が骨格筋の肥大を抑制するか、ならびに②血中アディポネクチンの増加が骨格筋の萎縮

を増強するか、の2点から加齢性の骨格筋萎縮を検討する予定であったが、①血中アディポネクチンの増加が骨格筋を萎縮させるか、および②血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋量の変化と加齢の影響、について検討することとした。そして、血中アディポネクチン濃度増加に対する応答が速筋と遅筋で異なるかあわせて検討した。

(1) 血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋量の変化

血中アディポネクチン濃度増加が骨格筋萎縮をもたらすか検討した。生後10週齢雄性マウス (C57BL/6J) にアディポネクチン受容体アゴニストAdipoRonを尾静脈より投与し、人為的な血液中のアディポネクチン濃度上昇モデルを作成した。このモデルを用いて、血中アディポネクチン濃度上昇が骨格筋を萎縮させるか、また速筋である足底筋と遅筋であるヒラメ筋における適応変化に際があるか検討した。

(2) 血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋量の変化と加齢の影響

血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋萎縮に加齢の影響があるか検討した。生後10週齢および100週齢の雄性マウス (C57BL/6J) にアディポネクチン受容体アゴニストAdipoRonを尾静脈より投与し、人為的な血液中のアディポネクチン濃度上昇モデルを作成した。このモデルを用いて、血中アディポネクチン濃度上昇による骨格筋萎縮における加齢の影響を検討した。また、この加齢の影響に、速筋である足底筋と遅筋であるヒラメ筋における適応変化に差異があるかあわせて検討した。

3. 研究の成果

(1) 血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋量の変化

血中アディポネクチン濃度上昇が骨格筋を萎縮させるか検討したところ、遅筋であるヒラメ筋には変化が認めなかったが、速筋である足底筋に萎縮が認められた。また、高濃度アディポネクチンはヒラメ筋のAMP依存性タンパクキナーゼ (AMPK) には影響を与えないが、足底筋のAMPKを活性化することが確認された。したがって、高濃度アディポネクチンはAMPKを活性化することでサルコペニアを引き起こすことが強く示唆された。

(2) 血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋量の変化と加齢の影響

血中アディポネクチン濃度上昇による骨格筋萎縮に対する加齢の影響を検討したところ、加齢マウスでも高濃度アディポネクチンによる速筋の萎縮が生じたが、遅筋にも萎縮が認められた。この結果は、アディポネクチンによる骨格筋萎縮作用は速筋に顕著に出現するが、加齢は遅筋にもアディポネクチン感受性をもたらすことが示唆された。

4. 研究の反省・考察

(1) 本研究の結果より、血中アディポネクチン濃度増加はAMPKを活性化させることで、速筋である足底筋を萎縮させることが強く示唆された。しかし、遅筋であるヒラメ筋ではAMPKの活性化や萎縮など血中アディポネクチン濃度増加の影響は認めなかった。したがって、血中アディポネクチン濃度の増加の影響には、筋線維タイプ選択性があることが明らかになった。サルコペニアの症状は、遅筋に比べて速筋に顕著であることから、サルコペニア発症要因として血中アディポネクチン濃度の増加が強く示唆された。

(2) また、加齢により血中アディポネクチン濃度増加による骨格筋萎縮は速筋に顕著に認められるが、遅筋も萎縮することが確認された。このことは、サルコペニア発症段階の初期では、速筋の萎縮が亢進するが、サルコペニア発症後は筋線維タイプとは無関係に骨格筋は血中アディポネクチン濃度増加により萎縮することを示唆しているものと考えられた。

(3) 当初の研究計画とは異なる検討を実施したが、当初の目的である「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」はかなり進んだものと考えている。今後、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という課題が残るものの、ここまでの研究は順調に進んだと評価している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ito R, Higa M, Goto A, Aoshima M, Ikuta A, Ohashi K, Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Miyata H, Goto K: Activation of adiponectin receptors has negative impact on muscle mass in C2C12 myotubes and fast-type mouse skeletal muscle, PLoS ONE,

13 (10): e0205645、2018

(2) 口頭発表

- ① 伊藤理香、朝倉実生子、江川達郎、大野善隆、横山真吾、中村晃大、藤本理沙、山下智大、Huascar Pedro Ortuste Quiroga、宮田浩文、後藤勝正：アディポネクチン受容体の活性化はC2C12筋管細胞およびマウス骨格筋を萎縮させる。第82回日本体力医学会中国・四国地方会、2018年12月
- ② Goto K: Adiponectin and skeletal muscle - new insights and potential implications、The 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress、The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan、2019年3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
鈴 木 さ と み	カ ウ ン セ リ ン グ 研 究 所	研 究 員	テキスト解析・インタビューまとめ

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）を対象地域とし、市で開催する1歳6ヶ月児・3歳6ヶ月児乳児健康診査（以下、健診）に参加した児童の乳幼児健康調査票（以下、問診票）質問項目（222項目）の調査は、これまでに発災時（H23年度）前後のH22-27年度分のデータの収集と解析を行った。

H30年度は、親子のメンタルヘルスや行動面の問題、困り感、支援ニーズ等の経時的変化を把握することを目的とし、発災前のH22年度の1歳6ヶ月児・3歳6ヶ月児健診受診児童の保護者を対象に、現在の子どもの保護者のメンタルヘルスや子育て環境について質問紙調査を実施した。質問紙は、フェイスシート、日本語版子どもの強さと困難さアンケート（Strength and Difficulty Questionnaire：SDQ）、うつ病・不安障害のスクリーニング調査票（K6）、健康関連QOL（HRQOL：Health Related Quality of Life）：SF8、筆者らが独自に作成した環境と避難状況に関する4種類を用いた。フェイスシートは、性別、年齢、学年、学校での支援状況、医療機関受診の有無等に関して記載を求めた。SDQ（Goodman1997）は子どもの情緒や行為などの精神保健上の問題を評定する尺度であり信頼性と妥当性が検討されている。K6は抑うつ・不安を評価する6項目から成る尺度である（Kessler .et. al., 2002、川上 .et. al., 2004）。環境に関する質問は筆者らがICF（International Classification of Functioning:WHO）の環境因子を基に作成したオリジナル項目で環境やサポート状況が良いことを表す。回答の対象はSDQは児童の評定を保護者に求め、その他の質問紙は保護者自身及び家族の状況について回答を求めた。

質問紙の配布は、2019年2-3月にA市教育委員会に協力いただき、市内の全ての小学校の対象学年に配布し、郵送にて回収を行った。対象者は約700名であり、書面による研究説明において協力の同意が得られた146名から回答を得た。回収率は約21%である。

発災前に1歳6か月健診を受診したと見込まれる幼児は本調査時に小学2年生であり、男児34名、女児33名、回答なし1名で計68名、平均年齢は7.9歳であった。3歳6か月健診を受診したと見込まれる幼児は小学校5年生であり男児40名、女児37名で計77名、平均年齢は11.0歳

であった。特別支援学級や支援学級、通級指導教室や支援員の配置など教育上の支援を受けていた児童は2年生群は6名(8.8%)、5年生群は9名(11.7%)、医療機関の受診は2年生群は5名(7.8%)、5年生群は2名(2.8%)であった。

震災後の避難状況と現在の住まいについては、震災後の避難回数の平均は2年生群は2.7回(0-7回)、5年生群は3.0回(0-10回)であった。現在の住まいについては「震災以前と同じ」が小学2年生群は28名(41.2%)、小学5年生群は38名(50.0%)、仮設や借り上げ住宅などへ「避難中」が小学2年生は1名(1.5%)、5年生群は5名(6.8%)、「震災後に新築または家を購入」が小学2年生群は26名(38.2%)、小学5年生群は20名(27%)、「震災後に新たに部屋/家を賃貸」は小学2年生群は11名(16.2%)、小学5年生群は10名(13.5%)であった。現在の住まいや遊び場の環境については2年生群は4.2点、5年生群は4.8点、大気環境や生活音については2年生群は3.4点、5年生群は3.2点、周囲のサポートについては2年生群は10.4点、5年生群は10.3点、2年生群の合計は18.1点、5年生群は18.3点であった。SDQ全体のニーズ別結果はSomeNeedsは2年生は15名(22.1%)、5年生は13名(17.1%)、High Needsは2年生は19名(27.9%)、5年生は19名(25.0%)であった。下位項目は表1-aの通りであった。

(表1-a)

Needs	情緒		行為		多動		仲間関係		向社会性	
	Some	High	Some	High	Some	High	Some	High	Some	High
2年生群(%)	4(5.9)	7(10.3)	12(17.6)	13(19.1)	1(1.5)	1(1.5)	8(11.8)	8(11.8)	15(22.1)	14(20.6)
5年生群(%)	3(3.9)	5(6.6)	7(9.2)	7(9.2)	1(1.3)	0	6(7.9)	15(19.7)	15(19.7)	15(19.7)

保護者のメンタルヘルスと健康関連QOLについては、K6のカットオフ9点を超えた保護者は2年生は12名(17.6%)でそのうち5名が臨床域のカットオフ13点を超えていた。5年生は8名(10.5%)そのうち5名が13点を超えていた。SF8の結果は「身体的健康度」は2年生群は49.0点、5年生群は48.9点で、精神的健康度は2年生群が45.3点、5年生群は47.9点であった。下位項目は(表1-b)の通りであり、1サンプルのt検定を用いて国民標準値と比較したところ、小学2年生群の保護者では「全体的健康感」、「日常生活機能(精神)」、「心の健康」が有意に低く、小学5年生群では「心の健康」が有意に低かった。

(表1-b)

	PF(身体機能)	RP日常役割機能(身体)	BP身体の痛み	G全体的健康感	VT活力	SF社会生活機能	RE日常生活機能(精神)	MH心の健康
2年生群	49.3	49.3	49.6	46.4	48.8	48.9	47.2	45.5
5年生群	49.1	49.7	50.9	48.3	50.0	49.0	49.7	47.9

SDQの総スコアと下位項目それぞれについてK6ならびにSF8とで相関分析を行ったところ、K6では情緒、行為、多動、仲間関係において相関が認められ、特に子どもの「情緒」と保護者のK6との相関が強かった。SF8では身体的健康度との相関は認められなかったものの精神的健康度において情緒、行為、仲間関係において相関が認められた。環境因子とでは養育者の「家族のサポート」・「友人のサポート」と「仲間関係」・「向社会性」の間で、「福祉や医療機関の職員のサポート」と「向社会性」の間で相関が認められ、支援関係の重要性が示唆された。

保護者のK6の得点の高さ(抑うつ・不安が強い)と「家族のサポート(不十分)」や「地域のサポート(不十分)」、「友人のサポート(不十分)」と相関しており、孤立している状況がうかがえた。なお、これまでの避難回数は子どものSDQや保護者のK6と相関を示さなかったが、「学校のサポート(不十分)」と相関を示していた。

今後は同意の得られた者について、過去の健診と紐づけをして分析を行う予定である。

(2) 質的調査

東日本大震災後の原発事故の影響を受けた双葉郡8町村とその近隣自治体を対象地域とし、母子保健事業や発達障害支援に携わる「専門職(保健師、保育士等)」と「発達障害の子ども」の保護者を対象として、インタビュー調査を実施した。実施期間はH29~H30年度である。

インタビューは、個別またはグループで約1~2時間、質問項目(表1-1、表2-1参照)を基に半構造化面接で行う。記録は、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文章化の作業を行った。その後、質問項目ごとに主要なコメントを抜粋した(表1-2、表2-2参照)。今回は、保護者の分析結果について詳細に報告する。専門職の結果については、次年度に報告を行う予定である。

表1 専門職インタビュー対象者

実施地	実施年度	町村名	参加者の職種と人数
1	H29	大熊町	保健師 1名
2	H29	大熊町	保育士 1名
3	H29	葛尾村	保健師 1名
4	H29	川内村	保健師 2名
5	H29	広野町	保健師 1名
6	H30	大熊町(会津支所)	保健師 1名、行政 1名
7	H30	檜葉町	保健師 2名
8	H30	双葉町	保健師 3名
9	H30	浪江町	保健師 3名
10	H30	富岡町(いわき支所)	保健師 2名
11	H30	南相馬市	保健師 1名
12	H30	福島県	心理職 2名
13	H29	いわき市内 (県事業被災した障害児の相談支援事業委託先)	看護師(管理者) 1名
14	H30	相馬市内 (県事業被災した障害児の相談支援事業委託先)	保育士 1名
15	H30	相馬市内 (県事業被災した障害児の相談支援事業委託先)	保育士(管理者) 1名

表2-1 保護者インタビュー対象者

ID	避難元	被災・避難状況	現居住	対象者	子どもについて		
					性別	学年	福祉サービス
1	富岡町	原発・生活再建	建設中	父	男	中学生	放課後等デイサービス
2	広野町	原発・帰還	戸建て	母	男 女	高校生 中学生	放課後等デイサービス
3	檜葉町	原発・生活再建	戸建て	母	男	未就学	避難者のための療育機関
4	檜葉町	原発・避難中	仮設住宅	母	男	未就学	避難者のための療育機関
5	大熊町	原発・生活再建	戸建て	母	男	未就学	避難者のための療育機関
6	浪江町	原発・生活再建	戸建て	母	男	小学生	避難者のための療育機関
7	双葉町	原発・津波 生活再建	戸建て	母	男	小学生	避難者のための療育機関
8	広野町	原発・津波 帰還	戸建て	母	男 男	小学生 小学生	避難者のための療育機関等
9	大熊町	原発 検討中	アパート	母	女	小学生	放課後等デイサービス

表2-2 保護者インタビュー質問項目と回答まとめ

質問項目	回答
① 震災後の避難や転居に関する履歴(いつ、どこで、誰と生活されていたか)	<ul style="list-style-type: none"> ・車が津波で流され保育園にいた子どもを迎えに行けず祖父に頼った【ID9】 ・はじめは津波の避難であったが、翌日は原発事故による避難となった【ID7】 ・震災直後は家族で避難所を転々とするが、人も多く周囲の目もあり、子ども自身も落ち着きやすいために車中泊だった【ID1・3・4・7】 ・役場機能の方針(避難先)に同意しかねるため、別行動となった【ID6】 ・避難所はほとんど利用せず、親せき宅やアパート、宿などを利用して避難生活した【ID1・5・9・7・8】 ・体育館での避難所生活が1か月ほど続いたが、広さがありスペースが区別されていたのがよかった【ID2】 ・父親は仕事の関係で単身赴任となり母子だけでの生活の期間もあった【ID1・3・6・9】 ・アパート生活が初めてで、とてもストレスだった【ID6】 ・妊婦であり、自分で避難に産院を見つければならず大変だった【ID6・8】 ・震災後は震災パブルで家を建てるまでに2年もかかった【ID7】
② 子どもとともに避難・転居で困ったこと、必要だった支援	<ul style="list-style-type: none"> ・避難所では、自閉症であることを伝えると、理解ある職員がいるところでは個別のスペース、物資の支援が得られた【ID3・4】 ・避難所では子どもの行動面の特徴や奇声に対し、母親が冷たい視線を受けることも多く、精神的負担が大きい【ID1・3・4】 ・避難先の生活スペースは狭いため、きょうだい児と本児共に配慮が必要であり、両者の時間・空間・アイテムについて配慮や工夫が必要だった【ID1】 ・トイレ未自立のため、夜尿の対応や扉を開けたままトイレを使用することが難しかった【ID2】 ・避難所の共用テレビは普段通りに使えないうえに混乱し対応が大変だった【ID2】 ・仮設住宅は狭いため騒音で迷惑をかけないように、または聴覚過敏があるために角部屋を希望した【ID2・3・8】 ・仮設住宅は狭いため騒音で迷惑をかけないように、または聴覚過敏があるために角部屋を希望した【ID2】 ・借り上げ住宅のアパートは2階だったので、下階の人に迷惑をかけたが、自閉症であると大家さんに伝えていたため、配慮してもらった【ID3】 ・仮設住宅は窓を開けるとすぐに外なので危ないこともあった【ID3】 ・他県での避難生活は、母子だけの生活になり、ヘルパーなどの子育てサービスが欲しかった【ID3】 ・避難元近隣地域に生活再建した。子どもが安全に生活しやすいことを優先し、土地を選んだ(田舎で車通りが少なく広いスペースがある)【ID3】 ・父親は叱ることが多かった【ID4】 ・避難中は土地勘がないため、子どもの遊び場を探すだけでも一苦労だった【ID5】 ・きょうだい児は、幼児であるがストレス症状が出た【ID6】 ・借り上げ住宅では、ナンバープレートが「いわき」であるため、周囲の目を気にした【ID8】 ・子どもは避難を旅行のように感じて気にしていないが、母は今でも津波のTV映像は消す、警報でドキとする【ID9】 ・避難元の学校再開の連絡があったが、帰還するか悩んだ【ID2】
③ 福祉、医療、教育、行政、民間事業所等の支援について	<ul style="list-style-type: none"> ・震災前に診断を受けていた。他県の避難先では放課後等デイサービスは中断の状態だったが、県内の避難先に来てからは通えるようになり、母自身の時間が少し持てるようになると(母自身の)ストレスも改善した【ID1・3・4】 ・震災後に診断を受けた。療育機関につながり、これまで長く悩んできたことが解決した気持だった【ID7・9】 ・相談支援専門員とのつながりは知り合いがいなければ自助努力【ID1・2】 ・きょうだいそれぞれの学校の送迎時間が重複し、対応が大変だった【ID2】 ・療育機関では、家庭訪問をして生活の工夫を教えて、育児のサポートをしてくれた【ID3】 ・避難中に就学を迎え、避難先の教育委員会に支援について相談した【ID4・2・9】 ・検査を希望すると医療支援を紹介して診断に至る療育機関につながったので良かった。避難後の方が医療と福祉とも充実している【ID4・5・6・9】 ・避難先の保健師に子どもの様子伝えたが様子を見るようにと言われ相談できず悩んでいた。避難元保健師に相談できた【ID5・6・7・9】 ・医療支援を紹介され、診断に至ったが非常に落ち込んだ【ID7】 ・就学先を避難者であることを伝えていない【ID6】 ・震災前は、周囲に自閉症であることを伝えていなかった。避難中は、相談してトータルサポートがしてもらえようになった。普段も震災時も愚痴や相談できる人がいればよかった【ID4】。 ・福祉サービス(療育機関)の避難先の待機、帰還先の不足が問題【ID7・9】
④ 避難や転居による地域の人のつながり、サポートの変化	<ul style="list-style-type: none"> ・母だけが子育て負担を抱えないよう父は仕事を調整・転職してサポート【ID1・9】 ・在籍している支援学校から安否確認があり、そこで避難中に通学できる学校の紹介等を受けた【ID1】 ・震災前に利用していた児童発達支援で、時々、前利用児の集会が企画され、それをきっかけにサービス利用につながった【ID2】 ・同じ境遇のママ友の存在が必要【ID2・3・5・6・7】 ・避難者のための療育機関や遊びの広場(避難元夜場主催)は、子どもだけでなく同じ境遇のママ友と知り合える場としての意味も大きい【ID6・7】 ・親身になってくれる人だけに自閉症であることを伝え、普段は言わない【ID3・6】 ・夫婦で帰還に関する意見が異なる。住民票をとるようにするか悩む【ID3】 ・子どもが避難前のお友達に会いたいと不安定になったため、避難元の行政機能と仮設小学校がある地域に避難先を移動した【ID4】 ・地元保健師の訪問で、はじめて自分の気持ちや子どもの悩みを相談できた【ID5】 ・これまでのネットワークは、生活再建後は近くの人は今もつながりがあるが、遠方に避難した人とは途切れていた【ID6】 ・学校・幼稚園では、避難者であることは隠している【ID7】 ・近隣住民から避難者であるために無視をされる【ID7】 ・避難中は同居家族(祖父母)もメンタル面の悪化がみられた【ID7】 ・被害妄想かもしれないが、賠償金のことがあり新車やバッグの購入も周囲の目を気にした。会話中に「避難の人?」と言われる現状もある【ID7】 ・子どもは新しい園のお友達と遊びたいが、大人の方がママ友付き合いに距離を置いており、遊ばせてあげられなかった。苦しかったと思う【ID9】 ・いずれは帰還を考えていたので、連絡を取り合う相手は変わらない【ID9】
⑤ 今後の大規模災害時に必要となる支援	<ul style="list-style-type: none"> ・避難所では、本人のためのスペースが必要だった。奇声、行動面で白い目で見られたりする。それが嫌で避難所を転々とする【ID1】。 ・イヤーマフの準備【ID1】 ・両親がお互いに話し合っていて、子育ての中心となる母親の意見を尊重しながら避難先や生活環境などを決定すること大切【ID1】 ・震災後の医療や心理的支援が増え、自閉症診断に至った。様々なサービスにつながり支援が受けられてよかった【ID3】。 ・子供のレスパイトが欲しいが、避難先自治体のサービスは受けられない【ID3】 ・平時から子どものことを把握してくれる人、困り感を助けてくれる人がいるとよい【ID4】 ・避難元の行政との連絡が途切れがちで、母親自身が発信をしないとけない。充足(人手不足の解消やシステム改善等)が必要【ID6】 ・子どもの発達に気がなるときの110番のような相談窓口があるとよい【ID6】 ・保育士以外の専門職を役場でも雇用してほしい【ID6】。 ・未診断の子もだけでなく、診断後も通える遊びの広場事業があるとよい【ID6】 ・ママサークルの事業を増やしてもハードルが高く行けない。訪問サービスを増やしてほしい【ID6】 ・発達遅れについて、避難中は3者子どもを見てもらう機会がなく気が付きにくいので、同じ人が何度か訪問してくれるとよい【ID7】。 ・普段から妊婦はマタニティマークを付けていると避難所でも支援を受けやすいと思う【ID8】。

ア. 専門職インタビュー

H29-30年度において、双葉8町村(広野町、檜葉町、富岡町、川内村、大熊町、双葉町、浪江町、葛尾村)と南相馬市、福島県の専門職20名(保健師16名、保育士1名、心理職2

名、行政職 1 名)、避難先市町村の発達障害の支援者 3 名 (保育士 2 名、看護師 1 名) の計 23 名にインタビュー調査を実施した。H29 年度はNo.1～5, No.13、H30 年度はNo.6～12 と No.14, 15 である (表 1 参照)。専門職インタビュー質問項目は、①発災前の発達障害支援の状況や業務、②発災後の業務、行政移転、③発達障害の子どもの避難とそれに伴う親子の変化、支援ニーズ、④避難の影響による母子保健事業の変化 (中断、継続、新規事業)、⑤今後の大規模災害に備えて何が必要か (役立った支援、役立たなかった支援) である。分析は次年度に行う。

イ. 保護者インタビュー

東日本大震災後の原発事故の影響により避難指示のある地域に震災前は居住しており、震災前または震災後に自閉症と診断された子どもをもつ保護者 9 名に対し、インタビュー調査を実施した。インタビュー時点での生活状況は、「避難元に帰還」、「避難先または新たな土地に生活再建」、「現在も避難中 (仮設住宅、借り上げ住宅等)」のいずれかに該当する。インタビューは、全て個別に実施した。調査は H29 年度に実施し、詳細な分析は H30 年度に行った。

結果は表 2-2 の通り、「①避難」においては、避難所の利用は困難であり車中泊を余儀なくされ、個別のスペースを確保できる避難所の情報は個人的なネットワークにより収集された。妊婦の産院確保は個人に任されるケースが今回の調査だけでも 3 件あった。「②避難・転居での困り感や支援ニーズ」では、時間を過ごすためのアイテム (ゲームや玩具、教材)、個別スペースの必要性があるが、そのためにもきょうだい児の対応も丁寧に行う必要があった。また、避難先で母子のみの生活のパターンになりやすく転職や家族の配慮、福祉的サービスが必要であった。避難先は馴染みのない土地であり、コミュニティが構築されていないため、母親が子育ての負担を抱え込みやすいなどの問題があげられた。物理的な問題として「避難生活のスペースが狭い」「騒音問題」が多く意見が出たが、自閉症と診断を受けている子供がいると大家や行政に伝えることが出来た場合には、角部屋を提供されるなどの配慮がなされた。「③医療・教育・福祉サービス」「④人とのつながり」では、避難者専用の療育機関の利用が親子共に大きな支えになった。支援内容は多岐にわたり、震災前よりも十分な支援が得られているとの声もあった。また、同じ境遇の母親同士のつながりを求めており、母親が一人で悩む傾向があった。避難者であることに後ろめたさを感じて避難者であることを隠しているため、母親が人間関係を発展しにくい状況があった。避難元保健師の家庭訪問の要望も出ている。学校については、就学前までに診断につながることで教育委員会にも円滑につながっていた。「⑤大規模災害への備え」は、震災前のコミュニティの重要性、子どものレスパイトや療育などの支援、平時も含めて相談できる人間関係の構築があげられた。

4. 研究の反省・考察

今回の調査結果では、避難指示区域にあった地域の現在の一般の保護者のメンタルヘルスと子どもの行動面の特徴に関連が認められ、保護者の精神面のケアの重要性が明らかとなった。特に、発達障害の子どもとその保護者の避難では、同じ境遇の親子の過ごす場や避難中であることを開示できる専門職の支援、きょうだい児の対応や家事、レスパイトなどの家族サポートが本児の快適な過ごす場の支援につながるという意見も貴重であった。量的調査と質的調査の実施地域は福島県沿岸部であるが、同自治体ではない点において研究の限界点がある。

次年度は福島県内の沿岸部の発達障害支援にかかわる専門職のミーティングインタビュー調査により多角的な視点で、現場の要望に合わせた形での成果物の作成を目指す。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 なし

(2) 口頭発表

① T. Uchiyama, K. Kawashima, Y. Karatani. The return from evacuation and the support needs of ASD children and their families after the Fukushima nuclear accident. 23rd World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions. 2018. 7.

(3) 出版物

① 前田正治, 内山登紀夫, 他. 福島原発事故がもたらしたもの. 誠信書房. 2018. 6.

学 校 名	大 阪 成 蹊 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	グローバル社会における大学生の「成熟」に関する研究 ー留学・英語教育プログラムの実証的検証からー		研 究 分 野	教育学
キ ー ワ ー ド	① 海外留学 ②成熟 ③グローバル人材 ④英語教育 ⑤キャリア			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
国 枝 よ し み	マ ネ ジ メ ン ト 学 部	副 学 長 教授・学科長	研究代表者 データ分析結果の確認と全体の進行を担当

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 井 純 子	マ ネ ジ メ ン ト 学 部	准 教 授	研究分担者 英語試験のデータ集計・取りまとめ
又 吉 弘 那	マ ネ ジ メ ン ト 学 部	准 教 授	研究分担者 英語運用メソッドの開発
金 蘭 正	マ ネ ジ メ ン ト 学 部	准 教 授	研究分担者 アンケート作成、データ収集・加工・ 検定を担当
山 崎 千 英 子	関 西 大 学 大 学 院 外 国 語 教 育 学 研 究 科	外 国 語 教 育 学 専 攻 在 籍 中	研究分担者 インタビューデータ作成・分析担当

グローバル社会における大学生の「成熟」に関する研究 －留学・英語教育プログラムの実証的検証から－

1. 研究の目的

- (1) 本研究では、海外留学経験や英語教育が学生の「成熟」度にもたらす影響を明らかにし、その影響モデルを構築することを目的とする。その研究目的を達するために
 - ①海外留学経験者と未経験者とを比較する定量的調査の実施
 - ②留学後の学生へのインタビューによる定性的調査の実施（2019年度に実施）
 - ③英語の4技能を測る定期的な試験によるスコアのチェック等の調査を入学時から3年次まで同一学生を対象に実施・検証することによって、その結果から学生の成熟度に最も強い影響を及ぼす要因を導きだすことを試みる。
- (2) 「成熟」の定義
ここでいう「成熟」とは「精神的に自立して多様な他者と折り合いをつけながら安定的、継続的な社会生活を営める状態」と定義し、モデル構築の結果得られる成熟度を「グローバルキャリア成熟度」と名付けることとする。

2. 研究の計画

- (1) 先行研究レビューと成熟度の尺度の設計
 - ①成熟度の尺度の設計；2012年に開発した5因子；「社会的自己実現」「勤勉性」「自己顕示」「集団行動」「規律性」を基本と想定した。さらに先行研究のレビューから「英語学習に対する態度」尺度とRosenberg（1965）の「自尊心」尺度による質問項目を参考に追加した。
 - ②仮説の導出；先行研究より成熟度と留学に関する7つの仮説を導出した。
仮説1：成熟度と留学の有無には関連性がある
仮説2：「社会的自己実現」の平均値に学科の差はない
仮説3：「職業意識」に学科の差は無い
仮説4：「職業意識」の高さは留学の有無に影響は無い
仮説5：「グローバル成熟度」の高さに男女差は無い
仮説6：「グローバル成熟度」の高さに学科の差は無い
仮説7：「グローバル成熟度」の高さと英語学習に対する態度には関連が無い
- (2) 成熟度調査（定量調査）実施
 - ①10月中旬より2018年度入学のマネジメント学部、教育学部、芸術学部の学部1年生約700名を対象に「成熟」に関する定量調査を実施した。国際観光ビジネス学科1年生及び海外留学を経験している学生を「留学経験グループ」とし、その他は「留学未経験グループ」と設定した。海外留学経験者と未経験間で何らかの有意差があるか、学部・学科間で何らかの有意差があるか等を分析した。
 - ②英語の4技能を測るための定期的な試験については、国際観光ビジネス学科の1年生61名を対象とし、2018年度は、4技能を測るGTEC（大学生用）を3回測定した。今後も継続して計測する予定で、2019年度は高得点グループとそれ以外のグループに分け「成熟」度に最も影響を与える要因を探索することとする。定量調査の分析；分散分析、探索的因子分析、AMOSによるモデルの構築を行う。

3. 研究の成果

- (1) 3つの学部学生を対象とした成熟度に関する調査の実施
 - ①定量調査の結果；回収数665、有効回答数546、回収率82.6%
 - ②因子分析では共通性の低い因子を取り除き「成熟」を構成する潜在変数「勤勉性」、「社会的自己実現」、「規律性」を抽出した。また英語学習に関する質問、自尊心に関する質

間により「英語への関与」、「自尊心」の2つの潜在変数を抽出した。

(2) モデルの構築と教材の開発

①分析方法 学生の属性と成熟、英語学習への態度、自尊心との関係性を明らかにするためにIBMの分析ソフトSPSS、AMOSを利用し共分散構造モデリングを試みた。

本学学部1年生「成熟」標準モデル (GFI=.957 AGFI=.918 AIC=155.751 CFI=.928 カイ2乗=103.751 自由度=29 有意確率=.000) からは、「英語への関与」が「成熟」に影響を与えているのは、「勤勉性」(.27)、「社会的自己実現」(.22)、「自尊心」(.17)であった。また、多母集団同時分析を行った結果、学部、学科等による有意差が見られたほか、高得点グループ、留学経験グループによってそれぞれのパスの影響度が異なり、モデルも変化することとなった。今後2019年度にも調査を重ね、より精緻なモデルの構築を試み、留学と「成熟」の関係性を明らかにする。

②一方で、学生の「グローバルキャリア成熟度」を高めるための教材開発を行った。

「Workplace and Hospitality English」と題し、グローバル企業やホスピタリティ産業で日常的に使用されている会話や異文化理解、文法、一般常識などに関する問題を掲載し、自主的に学習できるよう配慮した。既に在學生に配布して活用している。

4. 研究の反省・考察

(1) 定量調査に関して

①先行研究を収集するのに時間を要した。また、事前調査の結果から、設問を再構築した。

②3学部に向けた調査は順調に実施することができたが有効回答率が予想を若干下回った。中には白紙回答もかなり見られたことから、調査の実施方法に課題を残した。

(2) 分析について

①分析には予想よりも時間を要した。標準モデルから留学経験者、それ以外の学生の有意なモデル構築はさらにデータを収集することにより精度をあげる必要があると思われる。

(3) 教材の開発

長期留学に行く学生及び在學生の英語力向上を図るニーズがあったことから、実践的な教材の制作に取り組んだ。本学では、英語教育センターを有しネイティブ教員4名（2018年度は2名）が在籍していたことから、研究代表者が中心となり、研究分担者1名、ネイティブ教員2名と組んで企画、開発した。実際のエアライン、都市型ホテルで通常使用されている内容も盛り込みより実践的な内容とした。今後は、留学、英語関連のプログラムに結び付けられる教材が必要になることから、現在さらなる開発をしているところである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①2019年度に人材育成学会への投稿を予定

(2) 口頭発表

①2019年度に人材育成学会での口頭発表を予定

(3) 出版物

①国枝よしみ編著、坂井純子、Eugene Vakhnenko、Alexander Sheffrin著『Workplace and Hospitality English』,大阪成蹊大学 国際観光ビジネス学科・英語教育センター,2019.

以上

平成 30 年度(第 43 回)学術研究振興資金 学術研究報告

令和元年 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