

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を接着した後、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。

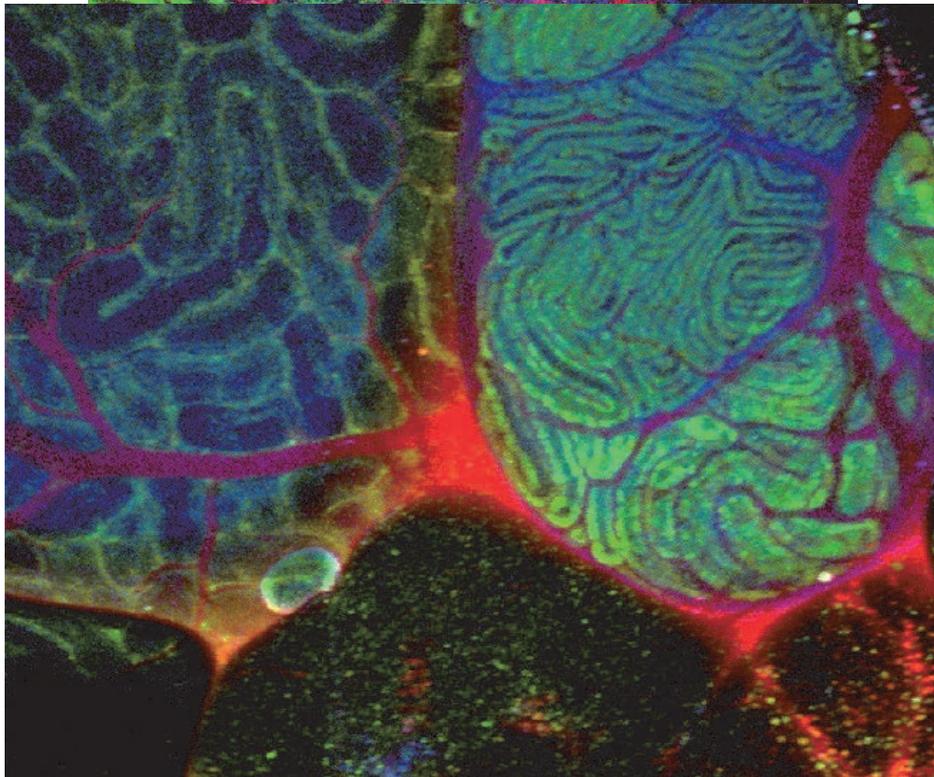
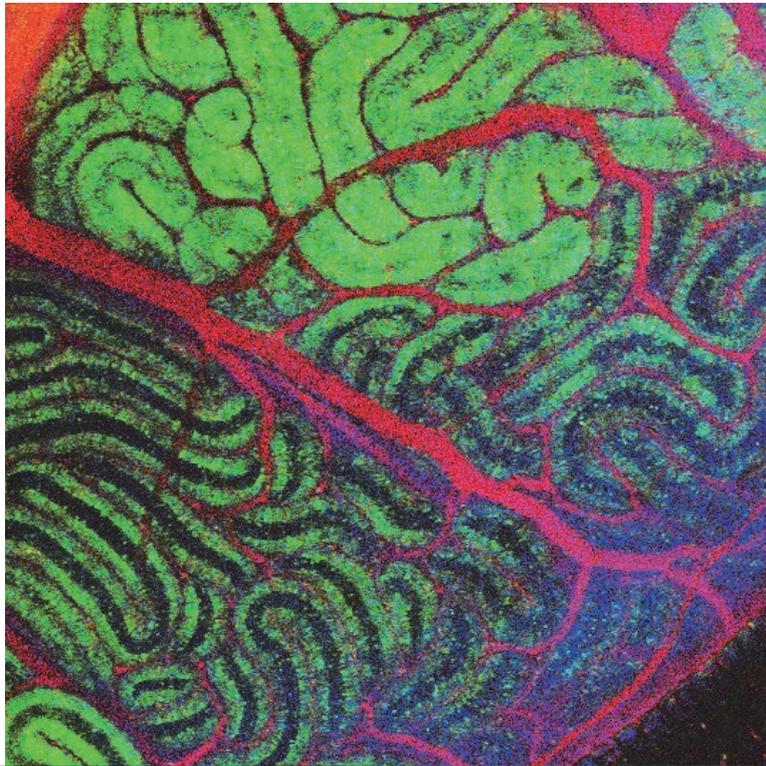


図 広視野・高解像度イメージングにより得られた生体血管画像
赤:デキストラン、緑:CAG-eGFP、青:核染色

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。

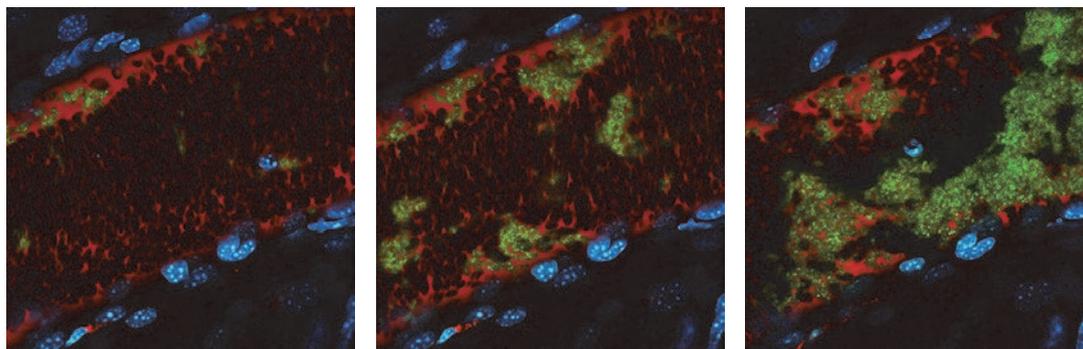


図 どんどん育つ血栓画像 緑が血小板
赤:デキストラン、緑:CAG-eGFP、青:核染色

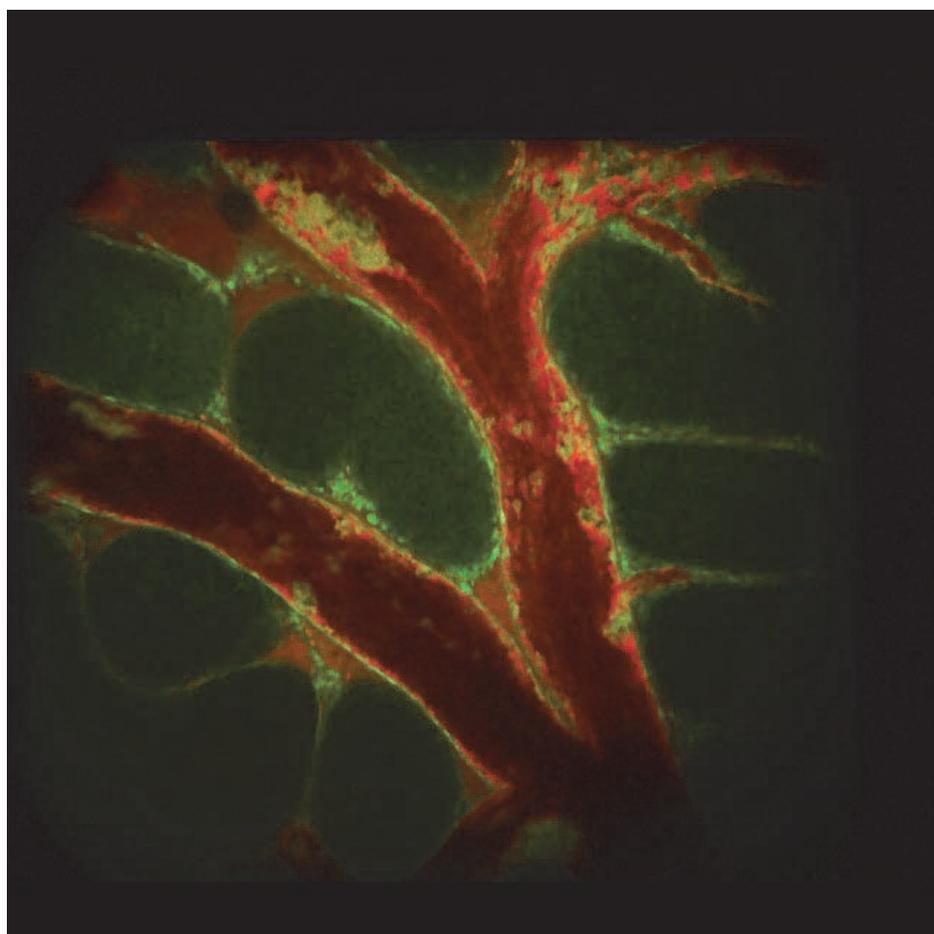


図 視野のひろい8K CMOS 共焦点イメージング
赤:デキストラン、緑:CAG-eGFP、青:核染色

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が備わっている。その仕組において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現を目指している。

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 クリニカル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、という作業仮設・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。

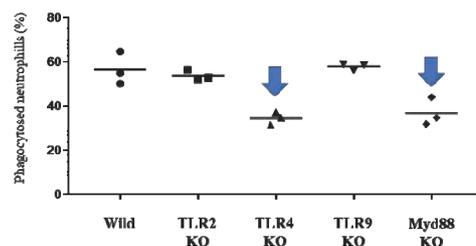
(4) 付着物質の気管内投与

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

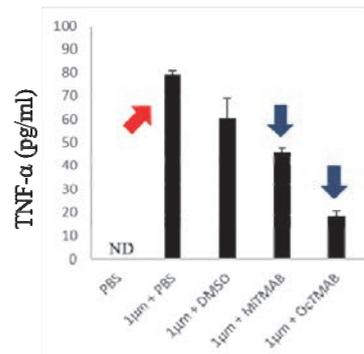
(1) 各種 TLR-KO マウスでの解析

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。



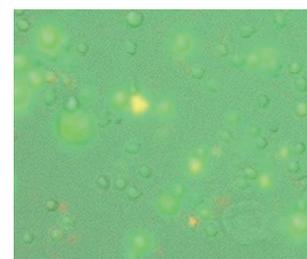
(2) サイトカイン産生

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。

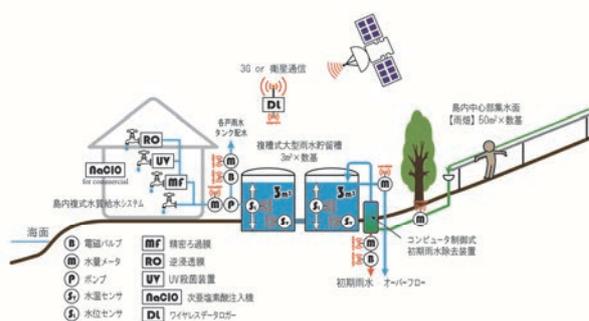


図1 雨水を水源とした小規模集落給水システム

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考えられる、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