

2019年度（第44回）
学術研究振興資金

The Science Research Promotion Fund

学術研究報告

令和2年10月

はじめに

この報告書は、2019年度（第44回）学術研究振興資金を配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年度に配付を開始して以来、令和2年5月末までに配付した資金総額は、3,377件、79億4,768万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2年9月末で、54億1,510万8,000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2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	2019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 研究分野別配付状況	2
IV	2019年度学術研究振興資金 研究課題一覧	3
V	2019年度（第44回）学術研究振興資金 学術研究報告	5

I 2019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)	配付額(千円)	
	合 計	142	307,400	41	81,100	28.9%
新規・継続別	新 規	111	232,600	21	42,000	18.9%
	継 続 2 年 目	17	40,100	12	23,100	70.6%
	継 続 3 年 目	14	34,700	8	16,000	57.1%
学校種別	大 学	136	302,300	40	80,500	29.4%
	短 期 大 学 (高等専門学校を含む)	6	5,100	1	600	16.7%
研究区分別	人文・社会科学系	35	35,300	10	8,800	28.6%
	理工系、農学系	45	125,700	14	37,800	31.1%
	生物学系、医学系	62	146,400	17	34,500	27.4%

Ⅱ 学術研究振興基金 年度別受領状況

(単位：千円)

年度 区分	1975(昭和50)～ 2013(平成25)年度	2014年度 (平成26年度)	2015年度 (平成27年度)	2016年度 (平成28年度)	2017年度 (平成29年度)	2018年度 (平成30年度)	2019年度 (令和元年度)	合 計
経済団体	2,117,328	5,000	5,000	5,000	0	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	198,352	1,022	213	0	90	0	270	199,947
合 計	5,398,513	6,022	5,213	5,000	90	0	270	5,415,108
基金保有額	5,398,513	5,404,535	5,409,748	5,414,748	5,414,838	5,414,838	5,415,108	-

Ⅲ 学術研究振興資金 研究分野別配付状況

(単位：千円)

年度 研究分野	1976(昭和51)～ 2013(平成25)年度	2014年度 (平成26年度)	2015年度 (平成27年度)	2016年度 (平成28年度)	2017年度 (平成29年度)	2018年度 (平成30年度)	2019年度 (令和元年度)	合 計
医 学	2,766,180	47,600	36,900	28,400	29,100	27,000	29,100	2,964,280
環 境 科 学	214,240	2,000	1,000	3,000	3,000	4,500	0	227,740
理 学	873,310	19,200	20,700	9,500	13,000	19,800	20,900	976,410
工 学	1,618,260	5,100	2,600	4,400	10,700	9,700	12,400	1,663,160
農 学	278,300	8,200	11,500	16,100	8,300	6,500	9,900	338,800
文 学	706,160	10,000	7,000	11,400	9,500	7,400	4,100	755,560
法 学	104,320	0	2,300	500	300	0	0	107,420
経 済 学	234,380	2,200	1,400	900	900	1,900	1,400	243,080
家 政 学	210,760	3,500	3,000	3,200	3,000	0	0	223,460
体 育 学	26,800	0	0	1,000	2,000	2,000	0	31,800
教 育 学	183,070	2,200	3,400	1,700	800	1,800	3,300	196,270
小 計	7,215,780	100,000	89,800	80,100	80,600	80,600	81,100	7,727,980
若手研究者 奨励金	63,200	18,900	19,400	19,400	18,400	-	-	139,300
合 計	7,278,980	118,900	109,200	99,500	99,000	80,600	81,100	7,867,280

(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」の配付は、平成20年度から平成29年度までである。

IV 2019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	配付額 (千円)	頁
1	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	2,300	6
2	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	2,300	10
3	北里大学	医学	筋ジストロフィーの中樞神経障害におけるBRAG分子の役割	1,500	14
4	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	2,300	18
5	昭和大学	医学	腸内細菌叢の解析による妊娠・分娩予後の検討	1,000	23
6	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	2,300	26
7	東京歯科大学	医学	マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立	1,500	29
8	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	700	34
9	自治医科大学	医学	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用	3,000	38
10	北陸大学	医学	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	900	42
11	広島国際大学	医学	革新的乳癌転移阻害剤セマフォリンペプチドの開発と応用	700	46
12	関西医科大学	医学	弾性線維の再生技術の開発	3,000	51
13	兵庫医科大学	医学	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明	3,000	55
14	福岡大学	医学	iPS細胞由来オータプス培養標本によるシナプス機能評価法開発	4,600	59
15	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	3,000	63
16	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	4,600	67
17	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	1,500	74
18	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	900	79
19	名城大学	理学	革新的合成戦略による海洋創薬分子の合成研究	2,300	83
20	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	3,000	88
21	関西学院大学	理学	高性能次世代有機系二次電池の開発	4,600	93
22	神戸女子大学	理学	新規バイオメタル錯体の糖尿病治療効果に関する作用機構解明	1,000	97
23	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	1,900	102
24	成蹊大学	工学	ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む	2,100	107
25	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	1,100	111
26	同志社大学	工学	宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究	3,000	116
27	立命館大学	工学	光-化学エネルギー変換デバイスの材料設計	3,700	122
28	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	600	126
29	工学院大学	農学	不活性化酵素, 偽遺伝子からの活性化酵素の作成	3,000	130
30	東京農業大学	農学	妊娠を支えるエクソソーム由来miRNAの解明とその制御	4,600	134

IV 2019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	配付額 (千円)	頁
31	東洋大学	農学	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	2,300	138
32	多摩美術大学	文学	日本とアジアの群島を結ぶ文様研究	700	143
33	愛知大学	文学	蓬左文庫所蔵典籍の調査および史料研究	300	147
34	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	1,300	151
35	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	1,800	155
36	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	800	159
37	城西大学	経済学	世界史からみる銘仙：デジタルアーカイブ化と国際発信	600	163
38	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	900	166
39	文教大学	教育学	ペアレンティングによる親子介入支援の長期的効果検証とマニュアル作成	700	171
40	白梅学園大学	教育学	性的問題行動を示す発達障害の青少年と保護者向けySOTSEC-ID支援	1,100	175
41	追手門学院大学	教育学	外国人の子どもの保育・教育環境の改善	600	180
配付額計				81,100	

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

V 2019 年度（第 44 回）

學術研究振興資金 學術研究報告

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
色 川 隼 人	薬 学 部	助 教	臨床研究の推進・取り纏め
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
高 橋 庄 太	東北医科薬科大学病院部 薬 剤 部	薬 剤 師	臨床データの収集と解析

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）の持続感染は肝がんの主要なリスク因子である。HCV特異的抗ウイルス薬によりキャリア体内からHCVを排除しても発がんのリスクは残存することから、HCV持続感染時の持続的な細胞ストレスに起因した炎症などのDNA損傷に至る過程が肝細胞がんを発症につながる可能性が考えられる。HCVのゲノムRNAと結合し内核を構成するCoreタンパク質（Core）が肝発がん発症に寄与することが報告されている。そこで本研究ではCoreの性状とCore発現にตอบสนองした細胞ストレス誘導機構を解明することを目的とした。

2. 研究の計画

CoreのC末端がシグナルペプチドペプチダーゼ（SPP）により切断され成熟型Coreへとプロセスされる。これまで、肝がんを発症した患者血清より分取したRNAを鋳型としてHCV cDNAを合成しCore部分の配列を決定した結果、複数の点変異バリエントが存在することを明らかにした。そこで次の2点にフォーカスして変異による影響を検討した。

- (1) 各Coreバリエントを細胞内に発現してその性状と細胞に与えるストレスの解析。
- (2) Coreによる小胞体ストレス誘導機構の解明。

本研究の臨床研究に関しては、東北医科薬科大学倫理審査委員会の審査の後承認を受けた上で東北医科薬科大学病院の患者さんの同意を得て実施した。

3. 研究の成果

- (1) 各Coreバリエントを細胞内に発現させてCoreの細胞内プロセッシングとSDS-PAGE上の移動度の変化があることを見出した。
 - ① HCVは1本の長い読み取り枠からポリプロテインを合成する。N末端に位置するCore部分は、細胞質に存在し引き続き合成されるエンベローブタンパク質（E1）を小胞体内腔に輸送した後に小胞体膜のシグナルペプチダーゼにより切り離される。次に、CoreのC末端に存在するE1のシグナルペプチドとして機能したC末端14アミノ酸が小胞体膜のSPPによりトリミングされ成熟型Core（1-177aa）に変換される。我々はCoreのC末端のプロセッシングに着目して、肝がんを発症した7例の患者から取得した未成熟型Core（1-191aa）部分の塩基配列を決定した後、培養細胞に発現して細胞内におけるプロセッシングをCoreのN末端認識する抗体（Core抗体）を用いたウエスタンブロッティング法で解析した。その結果、それぞれのCoreには異なった塩基置換があること、ほとんどのCoreバリエントはSDS-PAGE上で移動度を異にすることが判明した。
 - ② 肝がん患者由来のCoreバリエントのSPPによるプロセッシングが正確に行われているかを検討する目的でCoreのC末端を認識するウサギポリクローナル抗体（Core-CT抗体）の取得を試みた。177番目のアミノ酸をC末端としたペプチドを免疫して得られたウサギ抗血清を用いて、CoreのC末端の177aa近辺で長さを改変したCoreシリーズ発現細胞をウエスタンブロッティング法で検証した結果、得られた抗血清（Core-CT抗体）は177aaがC末端となった成熟型Coreのみを検出する抗体であることが明らかになった。
 - ③ 肝がん患者由来のCoreバリエントをCore-CT抗体を用いて解析した結果、検討した7名のCoreの末端はCore-CT抗体と反応することから、SPPによるプロセッシングは177番目の後ろで正確に行われていることが判明した。したがって、肝がん患者由来の成熟型Coreの移動度の違いはプロセッシング部位の違いではなく何らかの翻訳後修飾が寄与している可能性が考えられた。脱リン酸化酵素を用いて検証したところ、移動度に変化は与えなかったことからリン酸化以外の修飾が考えられた。
- (2) CoreのC末端のシグナルペプチド部分に変異したバリエント（Core-Cmut）を見出した。このCoreバリエントはこれまでの報告から、肝がん患者の血清中あるいは肝臓のがん部から見いだされていることが分かったため、このバリエントによる細胞影響を検討した。
 - ① Core-Cmutを発現した細胞においては、Core-CT抗体には反応しない移動度が低下した（分子量の大きい）Coreが3分の1程度存在した。これはSPPを薬剤で阻害したときに検出

される分子と同様の移動度であることから、SPPによるプロセッシング効率が低下し未成熟型Core (Core1-191) が残存したものと考えられた。また、成熟型Coreのレベルが低下していることから、未成熟型Coreの安定性が低いことが全体量を低下させて可能性が考えられた。

- ② 小胞体ストレスによる転写誘導系 (ATF6, XBP1, ATF4) レポーター遺伝子を用いて変異のないCoreおよびCore-Cmutによる小胞体ストレス応答を検討したところ、3種のすべての転写を誘導することが判明した。特にCore-Cmut によるATF6とXBP1レポーター遺伝子の誘導が顕著であった。一方、変異のないCoreを発現した細胞をSPP阻害剤で処理した場合も小胞体ストレスを誘導するが、Core非発現細胞をSPP阻害剤で処理しても小胞体ストレスの誘導は全く誘導がないことから、未成熟型のCoreが小胞体ストレスを誘導すると考えられた。
- ③ 前述の結果から、Core-Cmutの「SPPによるプロセッシング効率の低下」、「不安定化」が「小胞体ストレスの誘導」に寄与する可能性を考えた。最近、SPPは小胞体膜上のE3ユビキチンリガーゼであるTRC8とMARCH6と複合体形成することが報告されていることから、変異Coreがこれらの因子に影響を与え、小胞体ストレスへの寄与につながる可能性を考えCRISPR/Cas9を用いてMARCH6ノックアウト細胞の取得を試み、MARCH6欠損細胞を取得した。TRC8のノックアウト細胞は分取できなかったためテトラサイクリン誘導型のmiRNA発現ノックダウン細胞を取得した。今後、これらの細胞を用いてCore-Cmutによる小胞体ストレスの誘導機構の解明を目指す。

4. 研究の反省・考察

(1) 肝がん患者の Core の性状解析

肝がん患者由来のCoreのほとんどはSDS-PAGEにて移動度が変化することを初めて見出した。これまでに、このSDS-PAGEの条件はCoreのC末端を4アミノ酸短くしたCore(1-173)の移動度の違いを見分けることが可能であることから、肝がん患者のCoreのアミノ酸置換がSPPによるプロセッシングを変化させる可能性が考えられた。成熟型CoreのC末端を認識する抗体を作成し検証した結果、肝がん患者由来のバリエーションはSPPによる切断部位の変化ではなく翻訳後修飾である可能性が示唆された。本研究で得られたCore-CT抗体はCore-Cmutの未成熟Coreは反応しないことから、N末端側の抗Core抗体と組み合わせることで未成熟型Coreを同定するツールとして有用である。

アミノ酸変異による構造変化はSPPの切断部位には影響しなかったことから、アミノ酸置換は翻訳後修飾を起こすCoreの移動度を変化させた可能性がある。リン酸化ではない修飾が移動度を変化させた可能性が考えられたが、今回は同定するまでには至らなかったため、今後マスマス法などを用いて検討する必要がある。数か所のアミノ酸置換がCoreの立体構造に変化を与え、これが翻訳後修飾に影響した可能性が考えられる。構造変化がウイルス感染細胞への影響を変化させる可能性も考えられる。移動度の変化が病態に与える影響に関しては今後の課題である。

(2) Core の C 末端のバリエーション (Core-Cmut) の解析

小胞体ストレス応答は小胞体内腔に蓄積した変性タンパク質を、小胞体に分布するIre1およびPERKが感知して誘導する。変性タンパク質により活性化されたIRE1は細胞質側でXBP1 mRNAのスプライシングを行い、その結果XBP1転写因子の合成を誘導する。また、PERKが活性化されるとeIF2 α のリン酸化とATF4転写因子などの特異的合成誘導を行う。また、小胞体膜に分布するATF6は小胞体ストレスによりゴルジ体に輸送され活性化体となり特異的転写誘導を担う。本研究により未成熟型のCoreがATF6およびXBP1を誘導することが判明した。C末端の変異は複数の論文により肝がん患者より分離されていることから、肝がん発症の一要因である可能性がある。

小胞体ストレスはCa²⁺の漏出とミトコンドリア呼吸鎖からの活性酸素種の産生に寄与する。したがって、Coreによる小胞体ストレス誘導機構を解明することがHCVの持続感染による発がん機構の解明につながると考えられ、本研究から、Coreが小胞体膜上でプロセスされる過程で小胞体ストレス応答機構に影響を与えることが強く示唆され、そのプロセッシングに寄与するSPPおよび不安定化に寄与するTRC8-MARCH6の活性に与えるCoreの影響を解析する今後の研究の方向を与えた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Circulating extracellular vesicle-encapsulated HULC is a potential biomarker for human pancreatic cancer.
Takahashi K, Ota Y, Kogure T, Suzuki Y, Iwamoto H, Yamakita K, Kitano Y, Fujii S, Haneda M, Patel T, Ota T.
Cancer Sci. 2020 Jan;111(1):98-111. doi: 10.1111/cas.14232. Epub 2019 Dec 5.
- ② Case reports of latent HBV hepatitis in patients after neurosurgical treatment for hypothalamic and pituitary tumors.
Niizuma K, Ogawa Y, Kogure T, Tominaga T.
BMC Infect Dis. 2020 Mar 18;20(1):230. doi: 10.1186/s12879-020-04971-2.

(2) 口頭発表

- ① ピルビン酸キナーゼM2 (PKM2) レドックス制御におけるCys 残基翻訳後修飾の解析、色川隼人、沼崎賢史、加藤慎、久下周佐、生化学会東北支部第85回例会、仙台、2019年5月、演題番号P51
- ② C型肝炎ウイルスCoreタンパク質による小胞体ストレスの誘導
久下周佐、色川隼人、高橋庄太^a、小暮高之^b、佐藤賢一^b (東北医科薬科大学病院薬剤部^a、東北医科薬科大学医学部^c) 第31回微生物シンポジウム、京都、2019年8月、演題番号022
- ③ ピルビン酸キナーゼM2 型 (PKM2) のシステイン残基翻訳後修飾の多様性とその意義の解析、色川隼人、沼崎賢史、加藤 慎、久下周佐、衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム、京都、2019年9月、演題番号P051
- ④ HSP70 コシャペロンBAG-1 による酸化ストレス応答機構の解析
武田洗樹、色川隼人、久下周佐、衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム、京都、2019年9月、演題番号P076
- ⑤ Bag-1はGSH合成阻害剤BSO存在下における細胞増殖と細胞内GSHレベルの低下に寄与する
猪瀬一丸山敦史^a、田口恵子^b、守田匡伸^c、山本雅之^b、久下周佐、(日本薬科大学薬学部生命科学薬学分野(現住所)^a、東北大学大学院医学系研究科医化学分野^b、東北大学大学院医学系研究科環境医学分野^c) 第92回日本生化学会大会、横浜、2019年9月、3P-189
- ⑥ 翻訳開始因子eIF2 α を介した酸化ストレス感知機構の解析
武田洗樹、色川隼人、久下周佐、第58回日本薬学会東北支部大会、仙台、2019年10月、演題番号PB-14
- ⑦ ピルビン酸キナーゼM2 に存在するシステイン残基の酸化修飾の多様性
色川隼人、沼崎賢史、加藤 慎、久下周佐、第58回日本薬学会東北支部大会、仙台、2019年10月、演題番号PC-05

(3) 出版物

なし

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	①dopamine D2 receptor agonist ②tannic acid ③galloyl group ④inflammatory bowel disease			

○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 (皮膚科領域(乾癬))
佐 藤 毅	医 学 部	准 教 授	組織学的評価 (歯科領域(歯周病))
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) 本研究では、ドーパミンやドーパミン D2 受容体アゴニストシグナルによるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎、腸炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供することを目的としている。我々は、獲得免疫応答において、未熟 T 細胞が成熟 T 細胞に分化する際に、Th1, Th2, または Th17 に選択的に分化誘導させる物質をスクリーニングする系を構築し、この系を利用して、複数の試薬や上市薬をスクリーニングした結果、免疫活性化の際に Th2 および Th17 を顕著に抑制する物質として、ドーパミン受容体関連薬を同定した。Th2 および Th17 が、アレルギー、喘息、自己免疫疾患に関与していることから、ドーパミン受容体関連薬がこれらの疾患の発症を抑制する予防的効果があると期待された。実際、種々の自己免疫病マウスモデルにパーキンソン病の治療薬を予防的に投与すると、病勢を抑制した。
- (2) さらに 2017 年度の御財団の第 43 回学術研究振興資金による援助により、自然界に存在する物質からドーパミン D2 受容体アゴニストとして新規にタンニン酸 (TA, tannic acid) を同定し、期待した通り TA は、炎症性サイトカイン分泌、および、IL-8 分泌を抑制し、大腸炎、乾癬、歯周病の病態を著しく改善させるという結果を取得した。また、自然免疫におけるドーパミン受容体シグナルによる抗炎症作用のメカニズムを解明し、特にドーパミン D2 受容体アゴニストが炎症性サイトカインの分泌を抑制することを示した。
- (3) 本研究では、ドーパミン D2 受容体アゴニスト作用を有する物質の様々な好中球性の炎症性自己免疫疾患に対する効能を解析した。抗炎症作用のメカニズムとしてはドーパミン D2 受容体アゴニスト作用による、炎症性サイトカインの分泌段階での抑制機構を解明した。既存の天然物である TA に炎症性自己免疫疾患に劇的な効能があることを示し、その抗炎症作用を解明することは、安価で顕著な抗炎症作用を有する新規治療薬を提供に繋がるものと考えられるため、近年問題になっている医療のコストの削減にも寄与できるものと期待される。

2. 研究の計画

- (1) 免疫細胞に対する TA の作用解析を行った。ドーパミンは、サイトカインの分泌を制御し、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、natural killer (NK) 細胞からの Interferon (IFN)- γ , TNF- α , LL-1 β , IL-8 の放出を抑制する一方、好中球、単球、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞からの IL-10 の分泌を促進する。そこで、TA がサイトカイン分泌を制御することを詳細に解析した。
 - ① ドーパミンD2L受容体 (D2L, D2受容体long isoform) 強制発現細胞株 (ドーパミン D2L受容体は、作動薬 (agonist, アゴニスト) 作用による活性化によって、下流のcAMPシグナルを抑制するために、cAMPを分解することでcAMP濃度を下降させる) を用いて、そのcAMPの分解率から、TAの詳細な50%効果濃度 (EC₅₀, half maximal effective concentration) を算出した。
 - ② マウスリンパ球に、TAを投与した後、サイトカインの分泌をlipopolysaccharide (LPS)、および、抗CD3/CD28抗体 (CD3/CD28) で誘導して24時間後に培養上清を回収して、そこに含まれる、IFN- γ , TNF- α , LL-1 β , IL-8, IL-10の分泌量をELISA法で解析した。
 - ③ マウスリンパ球より、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、NK細胞、好中球、単球、B細胞、マクロファージ、樹状細胞を調製し、上記と同様の方法でサイトカインの分泌量を解析した。
 - ④ TAが未熟CD4⁺ T細胞 (naive CD4⁺ T細胞) からのTh1、および、Th17分化を抑制することを解析した。
 - ⑤ 選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬が、TAによって、誘導、および、抑制されるサイトカイン分泌を無効にすることを解析した。

3. 研究の成果

- (1) TA が免疫細胞からのサイトカイン分泌を制御することを詳細に解析し、以下の成果を得た。
 - ① TAのドーパミンD2L受容体に対するアゴニスト作用は、 EC_{50} (half maximal effective concentration) として 3.23 ± 1.20 (μM) (one standard deviation) であった。
 - ② LPS刺激によってマウス脾臓細胞からのIFN- γ 、IL-1 β の放出をTAは抑制する一方、TNF- α 、および、IL-10の放出をTAは促進した。
 - ③ CD3/CD28刺激によってマウス脾臓細胞からのIFN- γ 、IL-17の放出をTAは抑制する一方、IL-4、および、IL-10の放出をTAは促進した。
 - ④ TAはLPS刺激やCD3/CD28刺激で誘導されるマウス脾臓細胞におけるextracellular signal-regulated kinase 1/2/ (ERK1/2). c-jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) の活性化を抑制することはなかった。
 - ⑤ CD3/CD28刺激によってマウスCD4⁺ T細胞からのIFN- γ 、IL-17の放出をTAは抑制する一方、IL-4、および、IL-10の放出は促進した。
 - ⑥ CD3/CD28刺激によってマウスCD8⁺ T細胞からのIFN- γ の放出をTAは抑制した。
 - ⑦ LPS刺激によってマウス好中球、単球、腹腔マクロファージ、および、骨髄由来樹状細胞からのTNF- α 、IL-1 β の放出をTAは促進した。また、LPS刺激によってマウスB細胞、好中球、および、腹腔マクロファージからのIL-10の放出をTAは促進した。さらに、LPS刺激によってマウス腹腔マクロファージからのIL-6の放出をTAは促進した。
 - ⑧ TAは、マウス未熟CD4⁺ T細胞のTh1、および、Th17への分化を抑制することが示唆された。
 - ⑨ 選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬は、TAによるLPS刺激マウス脾臓細胞からのIFN- γ 産生の抑制を解除した。また、選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬は、TAによるCD3/CD28刺激マウス脾臓細胞からのIFN- γ 産生、および、IL-17産生の抑制を解除し、一方、TAによるCD3/CD28刺激マウス脾臓細胞からのIL-4産生の促進を解除した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究では、ドーパミンやドーパミン D2 受容体アゴニストシグナルによるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎、腸炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供することを目的とした。実際、TA の詳細なドーパミン D2L 受容体に対するアゴニスト作用を解析し、 EC_{50} として 3.23 ± 1.20 (μM) (one standard deviation) という値を取得した。TA は、水に可溶のポリフェノールで、ガロタンニンとも呼ばれる。他には、エラジタンニン、TA とエラジタンニンが複合体となったもの、および、縮合型タンニン、が知られている。TA は、5つのポリガロイルエステルがエステル結合で中心のグルコース分子と結合して放射状に広がっている構造を有していることから、ガロイル基がドーパミン D2 受容体に作用してアゴニスト活性を発揮しているものと示唆された。
- (2) 本研究ではさらに、好中球性炎症疾患に有効な薬剤として、我々が新規に同定しドーパミン D2L 受容体アゴニストである TA を取り上げた。TA の薬剤の作用メカニズムとしては、ドーパミンの免疫細胞への作用メカニズムと比較した。その結果、ドーパミンと同様に、TA は LPS 刺激によってマウス脾臓細胞からの IFN- γ 、IL-1 β の放出を抑制する一方、IL-10 の放出を TA は促進することを明らかにした。さらに、ドーパミンと同様に、TA は LPS 刺激によってマウス B 細胞、好中球、および、腹腔マクロファージからの IL-10 の放出を促進した。加えて、ドーパミンと同様に、TA は LPS 刺激によってマウス腹腔マクロファージからの IL-6 の放出を促進した。このことから、TA は、ドーパミンと似たパターンのサイトカイン分泌の転調を促すことによって、好中球性の炎症性自己免疫疾患を含む好中球性炎症疾患に効能を発揮する可能性を提案することができた。その一方で、ドーパミンとは異なり、TA は LPS 刺激によってマウス好中球、単球、腹腔マクロファージ、および、骨髄由来樹状細胞からの TNF- α 、IL-1 β の放出を TA は促進した。このことは、TA 作用によって転調したヘルパーT 細胞の非存在

下では、TA は好中球、単球、腹腔マクロファージ、および、骨髄由来樹状細胞の活性化、および、炎症誘導を惹起してしまう可能性が示唆された。一方で、シグナル伝達経路への作用としては、ドーパミンと同様に、TA はLPS 刺激で誘導されるマウス脾臓細胞における ERK1/2、JNK、p38MAPK の活性化を抑制することはなかった。このことから、本研究の目的であった、ドーパミンやドーパミン D2 受容体アゴニストシグナルによるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎、腸炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供するという目的は達成されたと考えられる。

(3) 一方、TA のドーパミン D2 受容体へのアゴニスト作用がどのような分子メカニズムでサイトカイン分泌を制御するのかは今回の研究では明らかにできなかった。この分子メカニズムを解明することで、ドーパミン D2 受容体の活性化が炎症性の好中球性自己免疫疾患を含む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 D2 受容体活性化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である TA 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、好中球性の自己免疫疾患を含む炎症性疾患に有効であることを解析したが、生体内でも神経伝達物質であるドーパミンが免疫細胞に発現しているドーパミン D2 受容体を活性化することでサイトカインの分泌を制御していることを解析する必要があると思われる。本研究では、自己免疫疾患モデルマウスとしては、硫酸デキストランを投与することで腸炎を誘導し、TA の投与がその腸炎誘導を抑制することを示した。このことは、TA がドーパミン D2 受容体を発現している腸に存在する免疫細胞、および、腸における神経系に作用して腸炎を抑制する可能性を示唆していると考えられる。腸の神経系は脳神経系とも密接な相互作用があることが知られており、また、TA がアルツハイマー病にも効能があるという報告もあるため、TA の腸神経系への作用が、脳神経系にも作用し、結果として、アルツハイマー病の病態の改善にも繋がっている可能性が考えられる。これらの可能性を示すためには、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と共に、その系における TA の投与がどのようなサイトカイン分泌制御の転調を誘導するかを解析することが必要だと考えられる。また、この系への TA の投与が神経細胞からの他の神経伝達物質の放出の誘導、および、転調にも関わっていることを解析することが必要だと考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Tannic acid acts as an agonist of the dopamine D2L receptor, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis in mice. Kawano M., Saika K., Takagi R., Matsui M., Matsushita S. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 査読有り, 5:100071, 30 April. 2020.

② 発明の名称：活性化T細胞からのIL-8産生を抑制するための組成物 発明者：松下祥、川野雅章、高木理英 特許第6562332号 特願2017-106234 PCT/JP2018/020696 特許登録日：2019年8月2日

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	筋ジストロフィーの中樞神経障害におけるBRAG分子の役割		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①シナプス ②可塑性 ③小胞輸送 ④エンドソーム ⑤低分子量GTP結合タンパク質		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阪 上 洋 行	医 学 部	教 授	研究の総括と論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
深 谷 昌 弘	医 学 部	准 教 授	実験・データの解析、論文作成
菅 原 健 之	医 学 部	助 教	実験・データの解析、論文作成

筋ジストロフィーの中樞神経障害における BRAG 分子の役割

1. 研究の目的

シナプスにおける細胞接着分子や神経伝達物質受容体の発現は、エンドソームを介する細胞内小胞輸送経路を介して厳密に制御され、神経回路形成やシナプス可塑性に深く関与している。ADP リボシル化因子 6 (Arf6) は、細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送を制御する低分子量 G 蛋白質で、グアニンヌクレオチド交換因子である BRAG 分子ファミリーにより活性化を受け、小胞輸送を介したグルタミン酸受容体や GABA 受容体のシナプス発現を調節し、シナプス形成やシナプス可塑性に関わることが近年明らかになっている (D'Souza and Casanova, 2016; Um, 2017)。BRAG 分子ファミリーは、異なる遺伝子から生じる 3 種のアイソフォーム (BRAG1、BRAG2、BRAG3) が存在し、研究代表者はこれまでの研究により、① 網膜視細胞のリボンシナプスにおいて、BRAG2 がジストロフィンと複合体を形成して局在すること (Sakagami et al., J. Comp. Neurol. 2013; Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2017)、② 網膜型ジストロフィン遺伝子欠損マウスにおいて、視細胞シナプスにおける BRAG2 のシナプス集積が著明に減少すること (Sakagami et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2017)、③ BRAG3 がジストロフィンと複合体を形成し、海馬神経細胞の抑制性シナプスに特異的に局在すること (Fukaya et al., J. Neurochem. 2011) を見出し、シナプス機能における BRAG ファミリー分子とジストロフィンと機能的関連の可能性を明らかにしてきた。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、ジストロフィン欠損による進行性の筋萎縮・変性を主症状とする X 連鎖性遺伝病である。ジストロフィン分子は骨格筋とともに脳や網膜にも豊富に発現し、筋ジストロフィーは、筋症状とともに知的障害、精神症状 (自閉症、うつ病)、網膜電図の異常などの中枢神経障害を合併する。近年のエキソンスキッピングを始めとする革新的治療法の開発や合併症の管理などの医療技術の向上により、患者の平均寿命は飛躍的に伸びている。しかしながら、従来の研究の多くは筋変性の機序に着目されたものであり、中枢神経症状の機序の解明は立ち遅れ、患者が高年齢化するなかで今後克服すべき新たな課題となっている。近年、ジストロフィンが神経細胞の抑制性シナプスの後膜において局在し、抑制性シナプス伝達に関与すること (Wada et al., Brain 2009)、網膜の視細胞においてジストログリカンを介して細胞外基質ピカチュリン分子と複合体を形成し、網膜の神経回路形成・維持に関与することが明らかになってきた (Sato et al., Nat. Neurosci. 2008)。しかしながら、ジストロフィンによる抑制性シナプスや視細胞でのシナプスの形成機構や機能的役割について未だ不明な点が多い。

本研究はこれらの研究背景をもとに BRAG 分子のシナプス神経機能の解明、特に BRAG-ジストロフィン間の相互作用に着目した機能的役割の解明を目指し企画した。

2. 研究の計画

(1) ジストロフィンの神経系における免疫組織学的検出法の確立

モノクローナル抗体を用いた中枢神経系におけるジストロフィンの局在に関する従来の免疫組織学的解析の結果は必ずしも一定しておらず、ジストロフィンの機能を考える上で、免疫組織学的検出法の確立が重要である。パラフィン包埋の脳標本を用いて、抗原賦活法などの条件検討を行いジストロフィン検出法の最適化を目指す。

(2) BRAG ファミリー分子の神経系における分子ネットワークと機能解明

BRAG ファミリー分子の神経系における分子ネットワークを明らかにするため、酵母ツーハイブリット法を用いて BRAG ファミリー分子の新規結合タンパク質の網羅的な単離を試みる。特に、スクリーニングにより BRAG2 の新規結合分子をして見出したエンドフィリンとの相互作用の機能的役割に関して、海馬初代神経細胞を用いてジストログリカンやグルタミン酸受容体などの膜タンパク質のシナプス発現の小胞輸送における機能関与の観点から解析を行う。

3. 研究の成果

(1) ジストロフィンの神経系の免疫組織学的検出法の確立

4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定を施した脳のパラフィン切片に対して、TE バッファーやクエン酸バッファーなどを用いた種々の条件での抗原賦活処理を行い、マウス抗ジストロフィン抗体を用いて免疫染色法を行い、免疫反応の検出方法の最適化を行った。その結果、TE バッファー(pH 9.0)を用いた抗原賦活処理により、海馬アンモン角の錐体細胞とその樹状突起分布領域において、明瞭な点状の免疫陽性反応が検出された。また、小脳皮質においてプルキンエ細胞の細胞体とその樹状突起が存在する分子層において明瞭な点状の免疫陽性反応が検出された。一方、パラフィン切片に対して抗原賦活処理を行わなかった場合、これらの免疫陽性反応はほとんど検出できなかった。また、二重蛍光免疫染色により、海馬や小脳で観察された点状の免疫陽性反応が抑制性シナプス後膜に局在するゲフィリンやBRAG3 陽性反応と一致することより、ジストロフィンの抑制性シナプスでの局在が確認できた。

(2) BRAG2 の分子ネットワークと神経機能の解明

① BRAG2 の細胞内局在解析

BRAG2 の2つのバリエーション BRAG2a と BRAG2b に対する特異的な抗体を作製し、中枢神経系における局在を免疫組織学的に解析した結果、BRAG2a が興奮性シナプスのシナプス後肥厚部に特異的に局在する一方、BRAG2b は細胞質に顆粒状に存在し、BRAG2a と BRAG2b の相異なる細胞内局在を示すことを見出した。

② BRAG2a の結合タンパク質の同定

BRAG2a のシナプス後肥厚部への局在機構とシナプス機能を明らかにするために、BRAG2a に特異的な PDZ 結合部位とプロリン・リッチ領域を含む C 末端領域を餌として、酵母ツーハイブリット法により脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、シナプス後肥厚部の主要な足場蛋白質である PSD-95 とエンドサイトーシス関連分子であるエンドフィリン 2/3 の単離に成功した。さらに結合責任部位を検討した結果、BRAG2a は、C 末端部の PDZ 結合部位を介して PSD-95 の PDZ 領域 23(PDZ2)と、プロリン・リッチ領域を介してエンドフィリン 3 の SH3 領域と結合することが明らかになった。また、脳抽出液を用いた免疫沈降法により、BRAG2a が PSD-95 およびエンドフィリンと複合体を形成することが確認できた。

③ BRAG2a のシナプス局在機構の解明

BRAG2a の種々の領域を欠損した変異体と EGFP 融合タンパク質を初代海馬神経細胞に発現させて BRAG2a のシナプス局在機構を検討した結果、野生型 BRAG2a(EGFP-BRAG2a) は、内因性 BRAG2a と同様にシナプスに特異的に局在するのに対して、PSD-95 との結合に必要な C 末端部の PDZ 結合部位を欠損させた変異体(EGFP-BRAG2a-ΔSTVV)は樹状突起と棘突起に均一に分布し、シナプス局在能が消失した。以上の結果から、BRAG2a は PSD-95 との相互作用を介してシナプスに局在する可能性が強く示唆された。

④ BRAG2a のエンドフィリンとの相互作用を介した機能解明

BRAG2a は、シナプス可塑性のひとつである長期抑圧(LTD)において AMPAR のエンドサイトーシスを制御することが報告されている(Scholz et al., 2010)が、その詳細な分子機構は不明である。代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)依存的 LTD での AMPAR のエンドサイトーシスにおける BRAG2a とエンドフィリン 3 間の相互作用の機能的な役割を検討するために、RNA 干渉法を用いて BRAG2 を発現抑制した初代海馬神経細胞に、BRAG2a の種々の変異遺伝子を発現されて、mGluR 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスへの影響を検討した。その結果、BRAG2 のノックダウンにより、mGluR 依存的な AMPAR のシナプス発現の減少が阻害されるのに対して、野生型 BRAG2a の発現により表現型が回復した。一方、エンドフィリンとの結合能を欠落した変異体(BRAG2a-P956/957A)の発現では、BRAG2 のノックダウンにより観察された表現型のままで野生型 BRAG2a の発現されたようには回復できないことが明らかになった。以上の結果から、BRAG2a は、エンドフィリンとの相互作用を介して mGluR 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

4. 研究の反省・考察

(1) ジストロフィンの神経系の免疫組織学的検出法の条件検討

本研究により、パラフィン切片を用いた中枢神経系におけるジストロフィンのマウスモノクローナル抗体による免疫組織学的検出法を確立することができた。今後、中枢神経系におけるジストロフィンの安定した発現解析の結果を得るために非常に有益と考えられる。

(2) BRAG2によるグルタミン酸受容体のシナプス発現調節機構の解明

シナプス可塑性のひとつである長期抑圧(LTD)は、記憶の消去や概念化に関与することが知られ、活動依存的な AMPAR エンドサイトーシスが細胞レベルで中心的な現象であると考えられているが、その分子制御機構の解明は長期増強に比較して立ち遅れ未解明な点が多い。本研究は、長期抑圧において、BRAG2a がエンドサイトーシスの積荷タンパク質となる AMPAR とエンドサイトーシス制御分子であるエンドフィリンとを繋ぎ合せ、Arf6 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスを制御していることを見出し、Scholz ら(2020)が提唱した BRAG2-Arf6 による AMPAR のエンドサイトーシスの分子制御機構モデルをさらに進展させた(Fukaya et al., J. Neurosci., 2020)。また、これらの研究と同時に本研究のきっかけとなった BRAG 分子とジストロフィン複合体との機能的連関に関する機能解析に関しては年度内には研究成果の報告には至らなかったが、今後さらに機能解析を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Saegusa S, Fukaya M, Kakegawa W, Tanaka M, Katsumata O, Sugawara T, Hara Y, Itakura M, Okubo T, Sato T, Yuzaki M, Sakagami H. Mice lacking EFA6C/Psd2, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, exhibit lower Purkinje cell synaptic density but normal cerebellar motor functions. *PLoS One* 14: e0216960 (2019)
- ② Kikuchi K, Ihara D, Fukuchi M, Tanabe H, Ishibashi Y, Tsujii J, Tsuda M, Kaneda M, Sakagami H, Okuno H, Bito H, Yamazaki Y, Ishikawa M, Tabuchi A. Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the Arc gene. *J Neurochem.* 148: 204-218 (2019)
- ③ Tatsumi Y, Matsumoto N, Iibe N, Watanabe N, Torii T, Sango K, Homma K, Miyamoto Y, Sakagami H, Yamauchi J. CMT type 2N disease-associated AARS mutant inhibits neurite growth that can be reversed by valproic acid. *Neurosci. Res.* 139:69-78 (2019)
- ④ Khrongyut S, Rawangwong A, Pidsaya A, Sakagami H, Kondo H, Hipkaeo W. Localization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) α , β , γ in the three major salivary glands *in situ* of mice and their response to β -adrenoceptor stimulation. *J. Anat.* 234:502-514 (2019)
- ⑤ Sakai Y, Kassai H, Nakayama H, Fukaya M, Maeda T, Nakao K, Hashimoto K, Sakagami H, Kano M, Aiba A. Hyperactivation of mTORC1 disrupts cellular homeostasis in cerebellar Purkinje cells. *Sci. Rep.* 9(1): 2799. (2019)
- ⑥ Takabatake S, Ohtsuka S, Sugawara T, Hatano N, Magari M, Sakagami H, Tokumitsu H. Regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase β by cAMP signaling. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 1863: 672-680 (2019)
- ⑦ Moriguchi S, Kita S, Inagaki R, Yabuki Y, Sasaki Y, Ishikawa S, Sakagami H, Iwamoto T, Fukunaga K. Aberrant amygdala-dependent cued fear memory in $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 1 heterozygous mice. *Mol. Neuropharmacology.* 56:4381-4394 (2019)
- ⑧ Imaizumi N, Takeuchi Y, Hirano H, Torii T, Seki Y, Morimoto T, Miyamoto Y, Sakagami H, Yamauchi J. Data on the effects of Charcot-Marie-Tooth disease type 2N-associated AARS missense mutation (Arg329-to-His) on the cell biological properties. *Data Brief* 25:104029 (2019)

(2) 口頭発表

- ① 井瀧貫太、深谷昌弘、阪上 洋行、神経細胞におけるArf6活性化因子EFA6AとKalirin-7との新規相互作用の機能的役割、第107回日本解剖学会関東支部学術集会(東京女子医科大学) 2019年11月2日

(3) 出版物

なし

学 校 名	慶 應 義 塾 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	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自己免疫系疾患 ②関節リウマチ ③酪酸 ④濾胞制御性T細胞			

○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 我が国では少子高齢化に伴い、65歳以上の高齢者人口が2025年には約30%、2050年には約40%にも達する超高齢化社会の到来が予想されている。この社会構造や生活習慣の変化により、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど何らかの自己免疫疾患を有する患者の増大が予想されている。このうち、特に慢性関節リウマチは、現時点でも国内患者数は約70万人と患者数が多く、毎年1.5万人が新たに患者として認定されている。さらに、「手足の関節が痛む」という疾患予備群は560万人（人口の4.5%）におよび、国民病となりつつある。慢性関節リウマチは、リウマトイド因子を始めとする自己抗体の産生を特徴とし、関節の滑膜に炎症が生じることで病態が進行する。その病因・病態は未だ十分に解明されたとはいえず、効果的な対症療法はあるものの、根治療法は確立されていないのが現状である。
- ② 近年、腸内細菌の異常が関節リウマチなど自己免疫疾患の発症に関わることが示唆されている。腸内細菌のヒトの大腸には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。しかし、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。

(2) 研究目的：

- ① 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。申請者は初年度までの成果として、関節リウマチ患者の便中において実際に酪酸産生量が低下しており、自己免疫性関節炎モデルにおいて、酪酸は関節炎の発症を顕著に抑制することを見出した。さらに、酪酸は、リンパ濾胞内に存在する濾胞制御性T (follicular regulatory T: Tfr) 細胞を誘導することで、自己抗体の産生を抑制していることを明らかにした。
- ② これら一連の研究成果は、『Tfr細胞を増加することで全身性の自己免疫応答を制御することができる』という新たな疾患制御法の同定につながるものであった。その実現に向け、2年目には、Tfr細胞の*in vitro*誘導条件を世界に先駆けて確立するとともに、Tfrレポーターマウスを用いてTfr細胞分化誘導活性のハイスループットスクリーニング系の構築を試みた。

2. 研究の計画

(1) Tfr細胞分化誘導スクリーニング系の構築

- ① 2018年度までの研究成果に基づき、自己免疫疾患の新たな制御療法確立を目指し、新規Tfr細胞誘導物質の探索に着手した。そのためにまず、Tfr細胞のマーカー分子であるBcl-6レポーターマウスから調整したナイーブT細胞をTfr分化条件で培養した。
- ② 上記培養系にポジティブコントロールとして酪酸を添加し、Tfr誘導活性が見られることを検証した。

(2) Tfr細胞誘導活性を有する低分子化合物の探索

- ① (1) で構築した *in vitro*スクリーニング系に腸内代謝物ライブラリーを添加し、Tfr細胞誘導活性を有する代謝物の探索を行った。

3. 研究の成果

(1) *In vitro*にて誘導した Tfr 細胞の性状解析

- ① Tfr細胞を分化誘導する *in vitro*培養条件を確立し、その性状解析を行った結果、本細胞はFoxp3, Bcl-6, CXCR5といったマーカー分子や、PD-1のような免疫抑制分子を発現しており、生体内のTfr細胞と同様の特徴と自己免疫抑制作用を持つことが示唆された。
- ② さらに本培養系に酪酸を添加することで、Tfr細胞の割合が有意に上昇することが判明した。そのメカニズムを検証したところ、酪酸はHDAC阻害作用を介してTfr細胞の分化を促進することが判明した。酪酸によって *in vitro*で誘導したTfr細胞を、コラーゲン誘導性関節リウマチマウスに移入したところ、病態の発症が抑制された。このことから、*in vitro*で誘導されたTfr細胞は機能的にも自己免疫抑制効果を保有していることが明らかとなった。

(2) Tfr 細胞分化誘導スクリーニング系の構築

- ① *In vitro*で機能的なTfr細胞が誘導できることを検証できたことから、続いて、Tfr細胞誘導活性を持った化合物のスクリーニング系の構築に着手した。これまではTfr細胞に対する特異的抗体を用いて染色を行った後、フローサイトメーターを用いてTfr細胞の検出を行ってきたが、操作が煩雑でスループット性に欠けることから、レポーターマウスを用いることとした。すなわち、Tfr細胞のマスター転写因子であるBcl-6遺伝子プロモーターの顆粒にtdTomatoを発現するレポーターマウスよりナイーブT細胞を取得し、Tfr細胞分化条件で培養を行った。酪酸の添加によりtdTomato発現細胞の上昇が観察されたことから、スクリーニング系として使用可能であることが明らかとなった。以上の知見をまとめて、特許出願を行った（特願2019-185826）。

(3) Tfr 細胞誘導活性を有する低分子化合物の探索

- ① (2) で構築したTfr細胞分化誘導スクリーニング系を用いて、Tfr誘導物質の探索に着手した。まず腸内代謝物ライブラリー（協同乳業株式会社研究所・松本光晴博士より供与）に含まれる化合物を添加した結果、2種類の化合物に誘導活性が認められた。
- ② Tfr細胞分化に影響を与えるシグナルパスウェイを明らかにするために、分子標的が既知であるSCADキット（文科省・新学術領域・化学療法基盤支援活動）に含まれる97種の合成化合物のスクリーニングを実施した。その結果、いくつかの化合物に誘導活性が見られたが、これらはいずれもT細胞受容体の下流で調節されるシグナル分子を標的とするものであった。

4. 研究の反省・考察

(1) *In vitro*にて誘導した Tfr 細胞の性状解析

- ① これまで *in vitro* においてTfr細胞を分化誘導したという報告は無く、今回の研究で初めて誘導することに成功した。そのため、*in vivo*のTfr細胞とどの程度類似しているのかが重要であるが、少なくともマーカー分子（Bcl-6, CXCR5, PD-1）や自己免疫応答抑制機能においては類似性が高いと判断できた。
- ② ただし、エピジェネティックな状態がどの程度類似しているかどうかは不明である。また、生体に細胞移入した際の安定性については今後の検討課題である。

(2) Tfr 細胞分化誘導スクリーニング系の構築

- ① Bcl-6-tdTomatoレポーターマウスを用いることで、Tfr細胞の検出が容易になった。一方で、スループット性を高めるために、Cell Insight CX5 (Thermo Fisher) を用いて、tdTomatoを発現するTfr細胞の定量を試みた。その結果、定量解析は可能であるものの、機器の操作自体が煩雑であるという問題点が判明した。そこで、オールインワン蛍光顕微

鏡 (Keyence) を用いたところ、簡便な定量解析を行うことが可能となった。今後は、様々な化合物を用いてハイスループットスクリーニングを実施していく。

(3) Tfr 細胞誘導活性を有する低分子化合物の探索

- ① これまでに複数の化合物について Tfr 細胞誘導活性が見られていることから、今後、2次スクリーニングとしてフローサイトメトリーを用いて再現性を確かめる。さらに、マウスに投与して同様の活性が認められるかどうかを検証する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① *Kimura I, Miyamoto J, Ohue-Kitano R, Watanabe K, Yamada T, Onuki M, Aoki R, Isobe Y, Kashihara D, Inoue D, Inaba A, Takamura Y, Taira S, Kumaki S, Watanabe M, Ito M, Nakagawa F, Irie J, Kakuta H, Shinohara M, Iwatsuki K, Tsujimoto G, Ohno H, Arita M, Itoh H, and *Hase K, Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype. **Science**, 367: eaaw8429, 2020.
- ② *Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi N, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, and *Hase K. Osteoprotegerin-dependent M-cell self-regulation balances gut infection and immunity. **Nat. Commun.** 11: 234, 2020.
- ③ Nakamura Y, Mimuro H, Kunisawa J, Furusawa Y, Takahashi D, Fujimura Y, Kaisho T, Kiyono H, *Hase K. Microfold cell-dependent antigen transport alleviates infectious colitis by inducing antigen-specific cellular immunity. **Mucosal Immunol.** 13: 679-690, 2020.
- ④ Hino S, Mizushima T, Kaneko K, Kawai E, Kondo T, Genda T, Yamada T, Hase K, Nishimura N and *Morita T. Mucin-derived O-glycans act as endogenous fiber and sustain mucosal immune homeostasis via short-chain fatty acid production in rat cecum. **J. Nutr.** 2020, in press.
- ⑤ Isobe J, Maeda S, Obata Y, Iizuka K, Nakamura Y, Fujimura Y, Kimizuka T, Hattori K, Kim YG, Morita T, Kimura I, Offermanns S, Adachi T, Nakao A, Kiyono H, *Takahashi D, *Hase K. Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T cell-independent IgA response in the colon. **Int. Immunol.** 32: 243-258, 2020.
- ⑥ Yamada T, Hino S, Iijima H, Genda T, Aoki R, Nagata R, Han KH, Hirota M, Kinashi Y, Oguchi H, Suda W, Furusawa Y, Fujimura Y, Kunisawa J, Hattori M, Fukushima M, Morita T, *Hase K. Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. **EBioMedicine.** 48:513-525. 2019.
- ⑦ Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, Kimura S, *Hase K. The roles of Peyer's Patches and microfold cells in the gut immune system: Relevance to autoimmune diseases. **Front Immunol.** 10:2345, 2019.
- ⑧ Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura YI, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, *Hase K. Fasting-refeeding impacts immune cell dynamics and mucosal immune responses. **Cell** 178: 1072-1087, 2019.
- ⑨ *Nishida K, Hasegawa A, Yamasaki S, Uchida R, Ohashi W, Kurashima Y, Kunisawa J, Kimura S, Iwanaga T, Watarai H, Hase K, Ogura H, Nakayama M, Kashiwakura JI, Okayama Y, Kubo M, Ohara O, Kiyono H, Koseki H, Murakami M, Hirano T. Mast cells play role in wound healing through the ZnT2/GPR39/IL-6 axis. **Sci Rep.** 9:10842, 2019.
- ⑩ Ohashi W, Hara T, Takagishi, Hase K, *Fukuda T. Maintenance of intestinal epithelial homeostasis by zinc transporters. **Dig. Dis. Sci.** 64:2404-2415 2019.
- ⑪ Xiong E, Li Y, Min Q, Cui C, Liu J, Hong R, Lai N, Wang Y, Sun J, Matsumoto

R, Takahashi D, Hase K, Shinkura R, Tsubata T, *Wang J-Y. MZB1 promotes the secretion of J chain-containing dimeric IgA and is critical for the suppression of gut inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 116:13480-13489, 2019.

- ⑫ *Kimura S, Mutoh M, Hisamoto M, Saito H, Takahashi S, Asakura T, Ihshii M, Nakamura Y, Iida J, Hase K, Iwanaga T. Airway M cells arise in the lower airway due to RANKL signaling and reside in the bronchiolar epithelium associated with iBALT in murine models of respiratory disease. **Front. Immunol.** 10:1323, 2019.

(2) 口頭発表

- ① 長谷耕二, 栄養シグナルによる免疫バリアの制御, 東邦大学研究ブランディング事業最終シンポジウム, 2020/1/23, 国内.
- ② 長谷耕二, 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御, Science Pioneers Consortium (SPC) 2019, 2019/12/21, 国内.
- ③ Koji Hase, Nutritional Signals regulate lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue, The 48th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 2019/12/12, 国内.
- ④ 長谷耕二, 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御, 日本食品免疫学会設立 15 周年記念学術集会, 2019/11/20, 国内.
- ⑤ 長谷耕二, 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御, 30th Forum in DOJIN “Nutrio-Metabolomic Pathology”, 2019/11/11, 国内.
- ⑥ 長谷耕二, 腸管における免疫監視機構, 第 22 回 日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 2019/9/14, 国内.
- ⑦ 長谷耕二, 腸内細菌を標的とした創薬イノベーション, JASIS2019 ライフサイエンスイノベーション, 2019/9/3, 国内.
- ⑧ 長谷 耕二, 自己免疫疾患の発症を制御する短鎖脂肪酸, 神奈川歯科大学研究談話会, 2019/7/5, 国内.
- ⑨ 長谷 耕二, 食物アレルギーの発症に及ぼす腸内代謝物の影響, 第 68 回日本アレルギー学会, 2019/6/15, 国内.
- ⑩ 長谷耕二, 腸内エコシステムの異常と炎症性腸疾患, 第 6 回日本母子栄養懇話会学術集会. 2019/6/1, 国内.

(3) 出版物

なし

学 校 名	昭 和 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	腸内細菌叢の解析による妊娠・分娩予後の検討 —腸内細菌叢の子宮内細菌叢への影響と 妊娠予後への関与—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①腸内細菌叢 ②子宮内細菌叢 ③次世代シーケンサー		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
関 沢 明 彦	医 学 部	教 授	研究総括、検体採取

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
角 田 卓 也	医 学 部	教 授	NGSデータの解析
吉 村 清	医 学 部	教 授	細菌叢の分析、データ管理
小 出 馨 子	医 学 部	講 師	検体採取

腸内細菌叢の解析による妊娠・分娩予後の検討 — 腸内細菌叢の子宮内細菌叢への影響と妊娠予後への関与 —

1. 研究の目的

- (1) 妊娠初期（4～7週）の妊婦の腸内および腔内細菌叢と妊娠予後の関連を検討する
- (2) 子宮内細菌叢と腸内細菌叢の関連を検討する

2. 研究の計画

- (1) 妊娠初期（4～7週）の妊婦の腸内および腔内細菌叢と妊娠予後の関連を検討する
 - ① 妊娠初期の女性の腔分泌物・便を採取し、各部位の細菌叢を分析する

研究協力の同意を得られた妊娠初期（妊娠4～7週ころ）の妊婦から腔分泌物、便を採取しDNAを抽出した。16SrRNA遺伝子をPCRで増幅し、次世代シーケンサーにより各部位の細菌叢を分析した。

- ② 正期産群と流産群とでは妊娠初期の腸内細菌叢パターンは異なることを確認するとともに、【自然流産に至った女性に特徴的な腸内細菌叢パターン】、【自然早産に至った女性に特徴的な腸内細菌叢パターン】、【妊娠が成立し、かつ生児を獲得できる女性に特徴的な腸内細菌叢パターン】を把握する

(1)-①の妊婦の妊娠終了後に①自然流産群、②自然早産群、③正期産群の3群に分類し、細菌叢の相違と妊娠予後との関連を解析する。また、妊娠初期の腔内細菌叢と腸内細菌叢ではどちらがより妊娠予後に影響を及ぼすのかについても検討する。

- (2) 子宮内細菌叢と腸内細菌叢の関連を検討する

- ① 生殖補助医療（体外受精）を実施する女性、習慣流産患者もしくは妊娠中期流産の既往のある女性の子宮内腔細菌叢と腸内細菌叢を分析する

研究協力の同意を得られた原因不明な習慣流産患者もしくは妊娠中期流産の既往のあり、かつ検査前1ヶ月の間に抗菌薬を投与されていない女性を対象に、排卵期に子宮内膜組織と便を採取しDNAを抽出した。16SrRNA遺伝子をPCRで増幅し、次世代シーケンサーにより各部位の細菌叢を分析した。

- ② 腸内のdysbiosisにより、子宮内腔細菌叢における乳酸桿菌属の占める割合が低下する可能性について検証する

(2)-①の症例を子宮内細菌叢におけるLactobacillusの占める割合により以下の3群（90%以上をLacto高率群、30%以上90%未満をLacto中等度群、30%未満をLacto低率群）に分類し、3群の腸内細菌叢を比較する。Lacto高率群、Lacto低率群のそれぞれに特徴的な腸内細菌叢パターンを把握することで、挙児希望女性における適正な腸内細菌叢パターンを解明するとともに、dysbiosisな状態である女性への介入法（食事指導など）の開発の一助となる知見を得る。

3. 研究の成果

(1)

- ① 2020年6月時点での本検討への協力者数は44名で、便検体を採取できたのは34名であった。この34名の妊娠予後の内訳は生児獲得群22名、妊娠中10名、流産群2名であり、全ての検体からDNAを抽出し-80℃で保管した。生児獲得群、流産群に分類された症例においては16SrRNA遺伝子をPCRで増幅し、次世代シーケンサーにより各部位の細菌叢を分析した。
- ② 2020年6月時点で便検体を採取できた34名を妊娠予後により分類したところ、自然流産2名、妊娠中10名、生児獲得22名（うち早期前期破水→自然早産3名、前期破水4名、適時破水15名）であった。全ての妊婦の妊娠が終了後に、【早期前期破水→自然早産群】と【適時破水群】の2群間の腸内細菌叢、膣内細菌叢を比較し、妊娠初期の腸内・膣内細菌叢の相違と妊娠予後との関連を解析する予定である。自然流産の症例数が比較解析を実施するのに十分数に至った際には【自然流産群】と【正期産群】との比較解析も実施する予定である。

(2)

- ① 2020年6月時点で本検討への協力者数は24名であった。全ての検体からDNAを抽出し-80℃で保管した。全ての症例の子宮内腔細菌叢、腸内細菌叢の解析を実施した。
- ② (2)-①の症例を子宮内腔細菌叢におけるLactobacillusの占める割合により以下の3群（90%以上をLacto高率群、30%以上90%未満をLacto中等度群、30%未満をLacto低率群）に分類した結果、Lacto高率群は12名、Lacto中等度群は4名、Lacto低率群は8名であった。Lacto高率群、Lacto低率群のそれぞれの腸内細菌叢パターンの特徴について解析を行っている。

4. 研究の反省・考察

(1)

- ① 本研究への参加を同意したにもかかわらず予定通りに便検体を回収できなかった症例の大半が自然流産に至った症例であった。自然流産に至ると予約外受診をすることが多く、このことが便検体回収率低下の要因であったと思われる。
- ② 一般の自然流産率と比較すると本研究参加者における自然流産率は低かったこと、さらに、上述の理由から自然流産症例における便検体回収率は低かったため、2020年6月時点の自然流産群は2名と少なく、比較解析を実施できる人数に到達していない。

(2)

- ① 生殖補助医療（体外受精）を実施する女性は、子宮鏡検査などの検査に伴い抗菌薬を投与されていることが多く、本研究計画時に推定した参加人数よりも少なくなった。
- ② Lacto高率群、Lacto低率群と比較しLacto中等度群の割合は少なかったため、Lacto高率群とLacto低率群を比較することとした。計画したペースで検討を実施できず、2020年6月時点で解析終了に至っていない点は反省すべき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
なし
- (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 —がん幹細胞の治療高感受性化の実現—		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	所 長	PAI-1阻害薬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

—がん幹細胞の治療高感受性化の実現—

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こと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

申請者らが開発した PAI-1 阻害剤が白血病に対して治療効果を発揮することをモデルマウスによる治療実験にて検証した。申請者らはすでに、白血病モデルマウスに抗がん剤と PAI-1 阻害剤を併用投与すると白血病細胞が著明に減少することを見出している。しかし、がん治療においてはいかにして再発を防ぐかが重要であり、再発の根本的な原因であるがん幹細胞に対する効果は明確にされていない。そこで、がん幹細胞に PAI-1 阻害剤が作用してニッチからの離脱を促すだけでなく、がん幹細胞が体内から排除され、抗がん剤治療による生存率の向上や再発の予防を達成できることを実証するために、以下の研究課題に取り組んだ。

- (1) 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
- (2) PAI-1 阻害剤と抗がん剤との併用によるがん幹細胞に対する効果の検討
- (3) PAI-1 阻害剤併用投与群でのがん再発率の検討に取り組み、本剤による白血病幹細胞の排除機構を明確にすることを試みた。

3. 研究の成果

- (1) 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
 - ・ 白血病モデルマウスに PAI-1 阻害剤を投与すると、がん幹細胞がニッチから離脱し末梢血に動員されることを、組織学的あるいはフローサイトメトリーで確認した。
- (2) PAI-1 阻害剤と抗がん剤との併用効果の検討
 - ・ 抗がん剤単独投与群と比較して、PAI-1 阻害剤併用投与群では白血病幹細胞の細胞死が誘導され、効率よく排除されることを確認した。
- (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
 - ・ 抗がん剤を一定期間 (2週間～4週間) 投与後に中止し、PAI-1 阻害剤併用投与群では再発率が有意に減少されることを確認し、本剤による白血病幹細胞の排除機構を明確にした。

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。また、本剤は白血病治療に有効であることが証明できた。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

- ① Ibrahim AA, Yahata T*, **, Muguruma Y, Miyata T, Ando K. Blockade of plasminogen activator inhibitor-1 empties bone marrow niche sufficient for donor hematopoietic stem cell engraftment without myeloablative conditioning. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 516:500-505. IF: 2.56. *co-first author, **corresponding author
- ② Katahira Y, Higuchi H, Matsushita H, Yahata T, Yamamoto Y, Koike R, Ando K, Sato K, Imadome KI, Kotani A. Increased Granulopoiesis in the Bone Marrow following Epstein-Barr Virus Infection. *Sci Rep.* 2019; 9: 13445. IF: 4.53.
- ③ Yahata T*, Ibrahim AA, Hirano KI, Muguruma Y, Naka K, Hozumi K, Vaughan DE, Miyata T, Ando K. Targeting of plasminogen activator inhibitor-1 activity promotes elimination of chronic myeloid leukemia stem cells. *Haematologica.* 2020; pii: haematol.2019.230227. IF: 7.57. *corresponding author
- ④ Imai J, Yahata T, Ichikawa H, Ibrahim AA, Yazawa M, Sumiyoshi H, Inagaki Y, Matsushima M, Suzuki T, Mine T, Ando K, Miyata T, Hozumi K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates against intestinal fibrosis in mice. *Intest Res.* 2020; 18: 219-228.
- ⑤ Watanabe N, Kidokoro M, Tanaka M, Inoue S, Tsuji T, Akatsuka H, Okada C, Iida H, Okada Y, Sato T, Yahata T, Hirayama N, Nakagawa Y, Inokuchi S. Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial- to- mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells. *Cancer Cell Int.* 2020; 20:263. IF: 2.41.

(2) 口頭発表

- ① 今井 仁、八幡 崇、他7名、Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)制御による腸管線維化抑制の検討、第47回日本潰瘍学会、2020年1月

(3) 出版物

- ① 八幡 崇、PAI-1阻害剤の造血再生と白血病治療への応用、日本血栓止血学会誌、2020; 31: 791-796.

学 校 名	東 京 歯 科 大 学	研究所名等	口腔科学研究センター
研 究 課 題	マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬 基盤の確立 —象牙芽細胞賦活シグナルネットワーク解析—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①象牙芽細胞 ②象牙質再生 ③TRPチャネル ④細胞分化 ⑤分化誘導因子 ⑥細胞間シグナル ⑦分子創薬		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澁 川 義 幸	歯 学 部	教 授	研究の総括、生理学的実験、生理学的象牙質形成と象牙芽細胞機能の分子細胞学的評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
東 俊 文	歯 学 部	教 授	象牙芽細胞の分化誘導実験
松 永 智	歯 学 部	准 教 授	再生象牙質の物理化学的物性の評価
溝 口 利 英	歯 学 部	准 教 授	Coll-Cre/flox-stop-flox-ジフテリア毒素受容体マウスを用いた「象牙芽細胞枯渇」による本細胞の機能評価
中 村 貴	歯 学 部	講 師	DMP1-Creマウスを用いた象牙芽細胞分化と誘導された象牙芽細胞の機能評価

マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立 ー象牙芽細胞賦活シグナルネットワーク解析ー

1. 研究の目的

- (1) 象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質活性化シグナル因子、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、これらの標的受容体を同定し、象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する事を目的とする。
 - ①象牙芽細胞分化の制御と修復象牙質形成の機能連関を明らかにし、センサータンパク質の活性化シグナル因子、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。
 - ②これら因子の象牙芽細胞・歯髄幹細胞に対する薬理学的効果を検討し、象牙芽細胞の機能と分化を制御するマルチシグナルネットワークに対して直接的な作用を有する次世代型薬剤の創出を目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定・修復象牙質の形成促進機構の解析
 - ①DMP1-Cre/DTR/GFPマウスの作出：薬剤投与で象牙芽細胞の死滅を生じ、GFPによる象牙芽細胞分化がモニタリング可能なマウス系統の作出を行う。
 - ②象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定：DMP1-Cre/DTR/GFPマウスから歯髄細胞を培養し、神経ペプチド・成長増殖因子・細胞内シグナル因子・細胞外化学因子などを投与し、Dmp1遺伝子の発現を蛍光でモニタリングすることで、象牙芽細胞分化を促進する因子の特定を行う。
 - ③象牙芽細胞分化促進因子の時空間的作用の検討：上記マウスのGFP蛍光を指標に、特定された因子の象牙芽細胞分化に対する時間依存性を検討する。
 - ④象牙芽細胞分化促進因子の薬理学的効果の検討：分化促進因子と、それによって発現上昇する受容体・細胞内シグナルのヒト培養象牙芽細胞に対する効果、その象牙質形成能を検討する。

3. 研究の成果

- (1) 象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化する候補物質を同定した。
 - ①ヒト象牙芽細胞のセンサー受容体を活性化させ、象牙質形成を促進させる物質をin Vitroで同定した。
 - ②マウスを用いた実験で、象牙芽細胞が象牙質の感覚受容細胞である事が確かめられた。本マウスを用いた象牙芽細胞の枯渇実験系では、切歯でも象牙芽細胞が枯渇していることを確認できた。
 - ③Dmp1-T2A-Creマウスの2Aシステムが生体レベルで正常に機能し、硬組織細胞特異的にCreが発現している事を確認した。またアルカリホスファターゼが骨形成系細胞の分化を促進する事を見出した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化するシグナル因子の候補物質を同定について
 - ①2019年度内の特許出願を検討していたが、COVID-19の感染拡大により申請が遅れている。研究再開後、速やかに提出を検討する。
 - ②DTRマウスとDmp1-T2A-Creマウスの交配で作出されるDMP1-Cre/DTR/GFPマウスの作製が遅れている。同様にCOVID-19の感染拡大の影響もあり、研究再開後、実験を再開したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

澁川義幸

- ① Higashikawa A, Kimura M, Shimada Y, Ohyama S, Ofusa W, Tazaki M, Shibukawa Y. Merkel Cells Release Glutamate Following Mechanical Stimulation: Implication of Glutamate in the Merkel Cell-Neurite Complex. *Front Cell Neurosci*, 13: Article 255, 2019. doi: 10.3389/fncel.2019.00255
- ② 木村麻記、東川明日香、村松敬、石原和幸、齋藤淳、国分栄仁、柴山和子、菊池有一郎、櫻井敦朗、喜田大智、大野建州、澁川義幸、歯学の進歩・現状「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」、細胞膜タンパク質を標的とする石灰化機構の解明と応用 歯科学報, 119:301-306, 2019
- ③ Satou R, Shibukawa Y, Kimura M, Sugihara N. Light Conditions Affect Rhythmic Expression of Aquaporin 5 and Anoctamin 1 in Rat Submandibular Glands. *HELIYON*, in Press, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02792.
- ④ 村松敬、木村麻記、東川明日香、大野建州、菊池有一郎、喜田大智、国分栄仁、柴山和子、櫻井敦朗、澁川義幸、齋藤淳、石原和幸、歯学の進歩・現状「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」9. 根尖部歯周組織の病態生物学、歯科学報, 119:365-370, 2019
- ⑤ Tanaka A, Shibukawa Y, Yamamoto M, Abe S, Yamamoto H, Shintani S. Developmental studies on the acquisition of perception conducting pathways via TRP channels in rat molar odontoblasts using immunohistochemistry and RT-qPCR. *Anat Sci Int*. 95(2):251-257, 2019 Dec 17. doi: 10.1007/s12565-019-00517-y.
- ⑥ Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sato M, Shibukawa Y, Masuhiro Y, Kano K, Matsumoto T, Sugiya H. All-trans retinoic acid induces reprogramming of canine dedifferentiated cells into neuron-like cells. *PLOS ONE*, 15(3), e0229892, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0229892
- ⑦ 澁川義幸、なぜ「歯が痛くなるの？」歯痛発生のメカニズム、公益財団法人8020推進財団会誌、19:26-29、2019

東 俊文

- ① Odashima A, Onodera S, Saito A, Ogihara Y, Ichinohe T, Azuma T. Stage-dependent differential gene expression profiles of cranial neural crest-like cells derived from mouse-induced pluripotent stem cells. *Med Mol Morphol*. 2020;53(1):28-41. doi: 10.1007/s00795-019-00229-2.
- ② Zujur D, Kanke K, Onodera S, Tani S, Lai J, Azuma T, Xin X, Lichtler AC, Rowe DW, Saito T, Tanaka S, Masaki H, Nakauchi H, Chung UI, Hojo H, Ohba S. Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers. *Regen Ther*. 2020;14:19-31. doi: 10.1016/j.reth.2019.12.010.

松永 智

- ① Furukawa, T., Matsunaga, S., Morioka, T., Nakano, T., Abe, S., Yoshinari, M., Yajima, Y. Study on bone quality in the human mandible -Alignment of biological apatite crystallites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(3): 838-846, 2019. (doi: 10.1002/jbm.b.34180. 30296354.)
- ② Takano, N., Takizawa, H., Ito, K., Odaka, K., Matsunaga, S., Abe, S. Study on compressive property on aluminum alloy lattice structure additively manufactured by 3D printing technology. *Journal of the Society of Materials Science Japan*, 68(4):351-357, 2019.
- ③ Tasaka, A., Matsunaga, S., Odaka, K., Ishizaki, K., Ueda, T., Abe, S., Yoshinari, M., Yamashita, S., Sakurai, K. Accuracy and retention of denture base fabricated by heat curing and additive manufacturing. *Journal of Prosthodontic Research*, 63(1):85-89, 2019. (doi: 10.1016/j.jprior.2018.08.007.)

- ④Matsunaga, S., Yamada, M., Kasahara, N., Kasahara, M., Odaka, K., Fujii, R., Miyayoshi, N., Sekiya, S., Sako, R., Sugiuchi, A., Abe, S., Furusawa, M. Tooth root cross-section variations of significance for endodontic microsurgery and predicted risk of concealed canal isthmus based on cross-sectional morphology: three-dimensional morphological analysis of Japanese maxillary first molars using micro-CT. *Journal of Hard Tissue Biology*, 28:1-5, 2019.
- ⑤Tasaka, A., Uekubo, Y., Mitsui, T., Kasahara, T., Takanashi, T., Homma, S., Matsunaga, S., Abe, S., Yoshinari, M., Yajima, Y., Sakurai, K., Yamashita, S. Applying intraoral scanner to residual ridge in edentulous regions: in vitro evaluation of inter-operator validity to confirm trueness. *BMC Oral Health*, 19(1):264, 2019
- ⑥高野直樹、瀧澤英男、伊藤幸太、小高研人、松永 智、阿部伸一、3Dプリンティング技術により積層造形されたアルミ合金ラティス構造の圧縮特性に関する研究、*材料*、68(4): 351-357、2019
- ⑦Arakawa, K., Matsunaga, S., Nojima, K., Nakano, T., Abe, S., Yoshinari, M., Sueishi, K. Micro- and nanostructural characteristics of rat masseter muscle entheses *JHTB*, 28(4):365-370, 2019.

溝口利英

- ①Yang M., Arai A., Udagawa N., Zhao L., Daisuke N., Murakami K, Hiraga T., Takao-Kawabata R., Matsuo K., Komori T, Kobayashi Y., Takahashi N., Isogai Y., Ishizuya T., Yamaguchi A., and Mizoguchi T. Parathyroid hormone shifts cell fate of a leptin receptor-marked stromal population from adipogenic to osteoblastic lineage. *Journal of Bone and mineral Research*, 34(10):1952-1963, 2019
- ②Nguyen HT., Ono M., Oida Y., Hara ES., Komori T., Akiyama K., Nguyen HTT., Aung KT., Pham HT., Tosa I., Takarada T., Matsuo K., Mizoguchi T., Oohashi T., and Kuboki T. Bone marrow cells inhibit BMP-2-induced osteoblast activity in the marrow environment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(2):327-332, 2019
- ③溝口利英、硬組織維持に働く幹細胞の新たな研究手法と最近の知見、*日本歯科医師会雑誌*、72(8):17-25、2019
- ④溝口利英、日本骨代謝学会 Hot Paper、海外文献紹介：骨量減少を改善するために血管内皮細胞を標的にする、*THE BONE*、32(3): 116、2019
- ⑤溝口利英、日本骨代謝学会 Hot Paper、海外文献紹介：SIRT7はSP7/Osterixにおけるリンのアシル化を調節することにより骨形成に重要な役割を担う、*THE BONE*、32(3): 116、2019

中村 貴、東 俊文

- ①Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;524(3):702-709. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.136. Epub 2020 Feb 5. PubMed PMID: 32035618.

(2) 口頭発表

澁川義幸

- ①Shibukawa, Y. Intercellular Communication Between Odontoblast and Neuron Explains Sensory Transduction Mechanism for Dentinal Sensitivity Symposium, Neural and Non-neuronal Cell Communication in Homeostasis and Disease: 97th General session & exhibition of the IADR, June 19-22, 2019, Vancouver, Canada 97th General session & exhibition of the IADR Program book 230, 2019
- ②澁川義幸、歯内療法における痛みの分子細胞基盤、メインシンポジウム II 「歯内療法後の難治性疼痛をどうするか」、第24回 日本口腔顔面痛学会学術大会、2019年9月29日(日)、川崎市

松永 智

- ①松永 智、是澤和人、奥寺元、鈴木正史、吉成正雄、矢島安朝、阿部伸一
歯科インプラント周囲に新生された顎骨のマイクロ/ナノ構造特性
49回日本口腔インプラント学会、2019年9月21日、福岡市

溝口利英

- ①Toshihide Mizoguchi (招待講演), Hard tissue imaging analysis using genetically modified mice June 1, 2019, The7th Seoul Symposium on Bone Health in conjunction with the 31th Spring Scientific Congress of Korean Society for Bone and Mineral Research. 2019年, 6月1日 ソウル, 韓国 (Seoul Dragon City), The 7th Seoul Symposium on Bone Healthプログラム抄録集, 167, 2019
- ②溝口利英 (招待講演)、 遺伝子改変マウスによるイメージング手法を用いた硬組織研究 第71回再生医療カンファランス、 2019年7月18日、 東京都(東京大学)
- ③溝口利英 (招待講演)、 Maintenance of hard tissue homeostasis by mesenchymal stem cells. The16th Meeting of Bone Biology Forum、 2019年、 8月16日 千葉市 (セミナーハウス クロス・ウェーブ幕張)、 The16th Meeting of Bone Biology Forumプログラム抄録集、 8、 2
- ④溝口利英 (招待講演)、 歯と骨の幹細胞の話、 インプラント研究会、 2019年10月6日、 東京都(住友化学株式会社 参宮寮)
- ⑤溝口利英 (招待講演)、 間葉系幹細胞が司る硬組織維持機構の解析、 第61回歯科基礎医学会学術大会、 アップデートシンポジウム4、 象牙芽細胞・骨芽細胞のcell differentiationアップデート、 2019年、 10月12日 東京都 (東京歯科大学)、 第61回歯科基礎医学会学術大会プログラム抄録集、 92、 2019
- ⑥溝口利英 (招待講演)、 In vivo Dynamics of Mesenchymal Stem Cells Maintaining Hard Tissue Homeostasis、 Japan Bone Academy 2019、 2019年、 12月14日 東京都 (セラトロン都ホテル東京)

(3) 出版物

澁川義幸

- ①澁川義幸、口腔顎顔面痛の神経生理、In: 口腔外科のレベルアップ&ヒント (片倉朗編著)、デンタルダイヤモンド社、2019、pp. 48-49

松永 智

- ①松永 智 (分担加筆) : やさしくわかる歯と口腔のビジュアルガイド、医歯薬出版株式会社、2020、(ISBN: 978-4-263-46154-9)

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 (A-AhR) KO 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) AhR アンタゴニストによる糖尿病改善作用

昨年度までの検討により脂肪細胞 AhR の不活性化が、全身の代謝機能を改善することを明らかにした。そこで当該年度は AhR アンタゴニスト (CH223191) を用いて、その糖尿病改善薬としての効果を検討する。すなわち高脂肪食負荷した野生型 C57BL/6 マウスに対して CH223191 を4週間経口投与(10mg/Kg 体重)し、糖尿病の改善効果を以下の項目により検証した。

① CH223191投与マウスにおける耐糖能並びにインスリン感受性の評価

CH223191投与マウスならびにVehicle投与マウスにブドウ糖負荷(2g/kg体重)を行い、その後2時間に渡って血糖値ならびに血中インスリン量を測定する。またインスリン負荷試験(0.75U/kg体重)を行い、負荷後2時間に渡る血糖値の変化を測定する。

② 高脂肪食負荷時における CH223191 投与マウスの病態生化学的・病理学的解析

ア. 体重、摂餌量、呼吸商(酸素吸入量・二酸化炭素排出量)、脂肪組織重量、血液パラメーター量を常法に従い測定する。

- イ. 白色並びに褐色脂肪組織をそれぞれ精巣上体、腸間膜、皮下及び肩甲骨周辺より採取し、その組織を固定、切片化、そして染色（ヘマトキシリン・エオシン）し、脂肪細胞数並びに大きさを中心に定性的に観察する。
 - ウ. 病理切片の確認時には、併せてマクロファージ等の免疫担当細胞の染色並びに遺伝子発現を解析し、炎症の有無とその程度についても検討する。
- ③ CH223191投与マウスのインスリン感受性亢進に関わる責任臓器の同定
肝臓、骨格筋並びに精巣上体脂肪組織におけるインスリンシグナル伝達活性を解析するため、短時間の絶食後、マウスに対してインスリン(0.5 U/Kg 体重)を投与する。一定時間後、各臓器を摘出し、ウエスタンブロット法によりインスリンシグナル伝達因子の活性を評価する。

3. 研究の成果

(1) CH223191投与マウスにおける耐糖能並びにインスリン感受性の評価

耐糖能並びにインスリン感受性への AhR アンタゴニストの作用を耐糖能試験/インスリン負荷試験により検討した。通常食で飼育した Vehicle 投与マウスと CH223191 投与マウス間において耐糖能並びにインスリン感受性の違いは認められなかった。しかしながら高脂肪食で飼育した両群を比較した場合、CH223191 投与マウスは Vehicle 投与マウスよりも良好な耐糖能ならびにインスリン感受性を示した。その一方でグルコースに依存したインスリン分泌能に違いは認められなかった。

(2) CH223191 投与マウスの病態生化学的・病理学的解析

体重並びに各組織重量に関して、CH223191 投与マウスと Vehicle 投与マウスとの間に有意な違いは認められなかった。

次いで血液生化学パラメーターについて検討した。その結果、血中インスリン、アディポネクチン、トリグリセリドおよびコレステロール濃度において両群間に違いは認められなかったが、血中遊離脂肪酸濃度は CH223191 投与により低下を示した。

精巣上体周囲および皮下脂肪組織切片の病理組織学的解析を行ったところ、いずれの脂肪細胞の大きさにも違いは見られなかった。精巣上体周囲脂肪組織での遺伝子発現を解析したところ、炎症性サイトカイン IL-6、IL-1 β および Mcp1 の発現量が CH223191 群において Vehicle 群に比較して減少を示した。この炎症の程度の違いを検討するために、接着関連遺伝子の発現量を解析したが、それらの発現量に違いは認められなかった。

(3) CH223191 投与マウスのインスリン感受性亢進に関わる責任臓器の同定

前年度までの脂肪組織特異的遺伝子ノックアウトマウスとは異なり、低分子化合物を投与した場合、目的とする脂肪組織だけではなく、他臓器にも分布・作用して耐糖能やインスリン感受性に影響を与える可能性がある。そこで脂肪組織と同様にインスリン感受性組織である肝臓並びに骨格筋に与える CH223191 投与の影響を検討した。まず高脂肪食下で飼育した Vehicle 投与マウス並びに CH223191 投与マウスより肝臓を摘出し、病理組織学的解析を行ったところ免疫担当細胞の浸潤や大滴性の脂肪滴に差が認められなかった。また、炎症関連遺伝子、糖新生および脂肪酸酸化に関わる遺伝子の解析を行ったが、CH223191 投与の影響は認められなかった。さらに、高脂肪食誘発性の肝障害を評価する目的で逸脱酵素 (GOT、GPT) の測定を行ったが、両群間に差は認められなかった。骨格筋における遺伝子発現解析を行ったところ、炎症性サイトカインおよび脂肪酸酸化関連遺伝子の発現量において両群間に顕著な差は認められなかった。

インスリン感受性を示す責任臓器を解析するために、各組織の AKT 活性を検討した。AKT はインスリンシグナル伝達の仲介分子であり、その活性はインスリンシグナル活性と連動している。CH223191 投与マウスの精巣上体周囲脂肪組織において AKT 活性の増加が認められた。さらに、骨格筋においても CH223191 により AKT 活性の増加が認められた。一方、肝臓においてはインスリンを投与することにより、AKT 活性の増加が認められるものの、CH223191 投与の影響は見られなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 考察

前年度までの A-AhR KO マウスの結果をもとに、AhR アンタゴニスト (CH223191) の糖尿病治療薬としての可能性を検討した。CH223191 投与マウスは A-AhR KO マウスとほぼ同様の表現系を示し、本化合物が AhR アンタゴニストとして作用していることが示唆された。CH223191 投与は食事誘導性肥満マウスの耐糖能並びにインスリン感受性を改善したことから糖尿病治療薬として可能性が期待できる。また脂肪組織における炎症性サイトカイン量の減少が示されたことから、本化合物の作用メカニズムとして、肥満に伴う脂肪組織への免疫担当細胞のリクルートの抑制並びに炎症の軽減が示唆された。

(2) 今後の課題

AhRが如何にして免疫担当細胞を脂肪組織にリクルートするのか明らかにする。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 榛葉繁紀 「体内時計の破綻による糖尿病発症とその分子メカニズム」

第 18 回小樽糖尿病循環器カンファレンス 2019/11/08

(3) 出版物

なし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 —深層学習による中枢神経薬の効果判定—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①依存症 ②医療用麻薬 ③マシンインテリジェンス ④深層学習 ⑤受容体 ⑥バゾプレシン ⑦創薬			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
興 水 崇 鏡	分 子 薬 理 学 部 門	教 授	深層学習、データベース作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
谷 口 淳 一	分 子 薬 理 学 部 門	令和2年3月 31日 退職	細胞モデルの解析、薬物候補スクリーニング
土 屋 裕 義	分 子 薬 理 学 部 門	講 師	動物行動解析、動物モデルの解析
東 森 生	分 子 薬 理 学 部 門	学 内 講 師	組織学的評価、個体での化合物評価
藤 原 葉 子	分 子 薬 理 学 部 門	令和2年3月 31日 退職	遺伝子発現解析、受容体複合体解析

マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 — 深層学習による中枢神経薬の効果判定 —

1. 研究の目的

(1) 薬物や行為の習慣性が過度となる「依存症」の治療が求められている。本研究では、近年進歩が目覚ましいコンピューター科学の力、特にその目であるコンピュータービジョンと学習能力を世界に先駆けて依存症の理解に導入し、対処法を開発する。病態の理解に加えて、麻薬鎮痛薬を含む中枢神経薬について、依存を避けながら鎮痛効果を安全に得るための信頼度の高い評価方法を確立する。この際には動物モデルとして、申請者らが開発したユニークな麻薬感受性を示す遺伝子改変マウスを最大限利用する。

(2) この研究では、依存症がもたらす社会的問題の解決に寄与することも大きな目的の1つである。米国では、連日100人に及ぶ命がオピオイド依存による過量投与で失われている。この数は、米国の銃と交通事故による死者を合わせた数よりも多く、米国大統領令により危機的状況クライシスが宣言され、英国でも同様にプレクライシスとされる。今年に入り新型コロナウイルスによる感染症は依存症の患者を直撃し、依存症患者の死亡率を平時よりもさらに高めることに繋がっている。よって、麻薬を含む物質依存症は、鎮痛治療に伴う現代の世界的難題と言える。この難題への突破口と、安全で先進的痛み治療の確立が我が国でも求められており、本研究において基礎科学の知見からこの問題の解決に寄与することを目的とする。

特に、本研究において麻薬性鎮痛薬の慣れによる効果の減弱から依存に至る過程を、正しく判断できる目と思考力を機械学習インテリジェンスを用いて確立し、依存症を避ける方法と依存症治療薬の開発を効率よく迅速に推進する。

2. 研究の計画

(1) 最新のコンピューター科学の力である深層学習を最大限活用した、麻薬依存症の治療薬開発を推進する。

(2) そのために、マウスの行動から依存症を判定できる深層学習数式モデルを作成する。依存症マウスを作成においては、野生型マウスに麻薬性鎮痛薬の典型であるモルヒネを連日投与し、この過程をビデオ記録する。続いて深層学習のために、OSがUbuntu 16.04または18.04で動作し、TensorflowとKerasソフトウェアを導入した計算環境を構築する。GPU用グラフィックボードは、Nvidia社のドライバーソフトとCUDA10を導入し並列計算に用いる。

(3) 続いて教師付き深層学習の環境を構築する。そのために、Googleが提供する物体検出アプリケーションであるObject detection APIを改変し、マウスの行動パターンを5Dテンソルデータとして学習させる。その際、140万枚の最新画像データベースImageNetV4からも訓練画像を取得する。また、すでに深層学習を終えたリカレントニューラルネットワークモデル(f-RCNN 2017+ResNet)を転用し学習効果を向上させる。

(4) 得られた計算結果を用い、新たな依存マウスを検出できるか検証する。以上より、信頼度が高く依存状態を検出する計算モデルを作成する。また同一マウスでも、依存症モデル作成後にのみ検出されることを確認する。さらに深層学習し判断した根拠を、中間層の可視化、判断フィルター、heat mapで明らかにする。

(5) 依存の分子基盤の理解を進める。申請者らは最近、下垂体ストレスホルモンであるバゾプレッシンが、V1bタイプ受容体を介し麻薬の鎮痛効果を抑制し、依存形成を促進することを見出した。さらにV1b受容体を欠失させ、鎮痛麻薬による身体的依存が軽減されるユニークなマウスを得る事に成功している。本研究において、V1b受容体を含むと考えられる、依存形成の分子基盤について解析を進める。具体的には、V1b受容体は、鎮痛麻薬の受け皿である μ -オピオイド受容体や、シグナルタンパク質アレスチンと高次の複合体を形成していることが判明したことより、受容体を含む高次複合体分子の働きを解明し、依存シグナルが受容体複合体から起こる機序を解明する。さらに、V1b- μ 受容体- β アレスチン複合体に働く化合物を、治療薬候補として見出す。

3. 研究の成果

- (1) 我々はこれまでに、今日の代表的な実験動物であり、各種の毛色、大きさ、性、週齢の異なるマウスについて、写真上の分類と物体としての同定、位置座標の検出までを可能にする、コンピュータビジョンのモデルパラメーターを得ることに成功した。この過程においては、画像前処理のプロトコルを確立し、3000枚の画像中に検出されるマウスの座標とラベルを付与した。続いてTensorflowとKerasプログラムにより、既に140万枚の画像に対して学習を終えたResNet+f-RCNNモデルを転用学習に用いた。この結果、マウスの依存形成過程を含む行動は、ホームケージにおいて全て記録され、深層学習による評価を通じ解析可能となった。麻薬依存の形成過程は、従来のプロトコルでモルヒネを漸増する場合、10日間を要する。予備実験では、この間に130万枚の連続画像からマウスの行動解析を実施することが可能となっている。すなわち、1枚のグラフィックボードと1セットのCPUを用いた場合に、既に現在利用可能なハードウェアと計算モデルの限界の能力を発揮することに成功している。今後は並列計算の環境を整え、さらなる解析の高速化と効率化を目指す。
- (2) マウスの行動解析からは、基礎となる行動量が遺伝子欠損マウスで変化しているという意外な結果を得た。この結果はこれまでの報告では指摘されておらず、長時間の観察が可能となった本研究で立ち上げた実験系の利点と考えられた。この基礎値を考慮に入れて今後の実験結果を考察する必要があると考えられた。
- (3) これまでに我々が成果を挙げてきたV1b受容体を含む高次複合体の理解について、さらなる機能解析と治療薬の開発を進め、新たな成果を得た。特に申請者らは、V1b受容体が β アレスチン2と恒常的に結合しているという、700種類ある受容体の中でも特異な性質を世界で初めて報告していたが、この恒常的結合のために薬物による刺激の効果を検出することが不可能であり、化合物のスクリーニングが出来ないという課題に直面していた。今回の研究課題の取り組みの中でこのオープンクエスチョンに挑戦し、測定系の工夫により問題を解決することに成功し、薬物刺激で β アレスチン2を介する構造変化を検出することに成功した。これにより、V1b受容体複合体を介して依存を促進する化合物の特徴や、依存を防ぐ化合物のスクリーニングが可能となった。そこで我々は、薬物の化合物ライブラリーを入手して依存症治療薬を探すための大規模なスクリーニングを推進している。

4. 研究の反省・考察

- (1) 依存に関わる脳内V1b受容体の発現部位の検索は、この期間内には達成できなかった。しかし我々は、c-fos遺伝子発現パターンが野生型と遺伝子欠損動物の間で異なる脳部位を同定することに成功した。すなわち、V1b受容体活性の違いがもたらすと考えられる依存に関係する脳部位が新たに明らかになっており、今後は組織化学的な検索を進める。さらに、c-fos発現部位での遺伝子発現プロファイルを得ることを計画しており、1細胞レベルでの依存症成立メカニズム解明に挑む準備が整っている。また機能的な解析を進めることができた。すなわち、c-fos発現部位がV1b受容体を介する依存形成に関与する可能性について、部位特異的V1b欠損動物作成のためのloxP配列挿入マウスの作成に成功し、チャンネルロドプシン発現マウスの開発を進めた。
- (2) 受容体遺伝子欠損の効果を受容体拮抗薬で再現する実験系を立ち上げた。拮抗薬を脳部位特異的に作用させて、遺伝子欠損と同じ効果を得ることができるとして、投与すべき脳部位が明らかになってきたことより、解析の計画が明確となった。既に脳部位得意的薬物投与の手技は確立している。
- (3) 新たな受容体拮抗薬開発の測定系を樹立した。V1b受容体を発現させた場合、 β アレスチンと無刺激で相互作用してしまうため、依存形成に重要なステップであるアレスチンと受容体との結合を、刺激薬探索の指標とすることが困難であった。我々は今回の研究成果により、これまでは不可能であった刺激薬に依存する受容体— β アレスチン結合の検出系をV1b受容体において樹立することに成功した。この測定系を用いて、依存シグナルを活性化する、あるいは抑制する化合物のスクリーニングが可能となった。

以上、時間的な制約によって達成できなかった部分に関しては、次の段階の実験系や解析を準備することができたため、本研究の今後の大きな成果が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Vasopressin Increases Urinary Acidification via V1a Receptors in Collecting Duct Intercalated Cells. Giesecke T, Himmerkus N, Leipziger J, Bleich M, Koshimizu TA, Föhling M, Smorodchenko A, Shpak J, Knappe C, Isermann J, Ayasse N, Kawahara K, Schmoranzler J, Gimber N, Paliege A, Bachmann S, Mutig K. J Am Soc Nephrol. 2019 Jun;30(6):946-961. doi: 10.1681/ASN.2018080816.

(2) 口頭発表

- ① Nuttawadee Ngamlertwong et. al. mu-オピオイド受容体-V1bバゾプレシン受容体複合体と相互作用するbeta-アレスチンの解析 第140回日本薬理学会関東部会、2019年7月
- ② Nuttawadee Ngamlertwong et. al. Opioid-promoted complex involves mu-opioid and V1b receptors and beta-arrestin 2 第63回日本薬学会関東支部大会、2019年9月
- ③ 興水崇鏡、Chortip S、Fujianti C、Nuttawadee N、藤原葉子、東森生、土屋裕義、谷口淳一 オピオイド鎮痛耐性におけるV1bバゾプレシン受容体複合体の機能解析 第93回日本薬理学会年会、2020年3月
- ④ Nuttawadee Ngamlertwong et. al. Analysis of interaction between dimerized receptor and beta-arrestin 第93回日本薬理学会年会、2020年3月

(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
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 大 学 ・ 聖 路 加 国 際 病 院 眼 科	副 医 長	生物化学実験・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提案を目指している。

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経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

光エネルギーを感受して作動する分子群のうち、Hsp70 (HSPA-1A、6)、DNAJB1 や BAG3 に加えて、新たに CXCL8 の上方制御が DNA マイクロアレイで検出され、定量リアルタイム PCR では 10 倍を超える一過性の発現上昇が確認できた。その一方で、標的分子の 1 つと考えていた AMTN の増強は胎児由来の細胞でのみ生じる現象であることがわかった。

(1) 恒常性を維持する仕組みの解析

① Hsp70 は DNAJB1 や BAG3 と共役する

経時的に HSPA1A と連動する DNAJB1 と BAG3 の上方制御を示せた。温熱ストレスに耐性する網膜色素上皮細胞の恒常性が、Hsp70・DNAJB1・BAG3 複合体に依拠するオートファジー体系であることがわかった。

② オートファジー体系が恒常性を担う

閾値下レーザー条件下であっても、HSF1、Hsp70、オートファジーそれぞれの活性阻害剤 BB11、PES、CQ の処置によって、細胞傷害性アデニル酸キナーゼの放出増加を示せた。転写因子 HSF1 を介する Hsp70 の発現誘導とオートファジー体系の関係性がわかった。

(2) 微細構造を改変する仕組みの解析

① タイト結合は開閉する

一過的な経上皮電気抵抗値の減少を示せた。傍細胞輸送を調整する網膜色素上皮細胞の微細構造が、タイト結合の一時的な開口として変化することがわかった。

② CXCL8 タンパク質の存在

出力依存的閾値下レーザーによる CXCL8 の発現増強を示せた。頂端部と基底部の発現量が同程度であることがわかった。

③ ZO-1 に先立つアクチンの脱局在

閾値下かつ低出力の条件下にもかかわらず、レーザー照射部位からアクチンが脱局在することを示せた。比較的高出力であって、はじめて ZO-1 が脱局在することがわかった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 恒常性を維持する仕組みを、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、明確化しなければならないが、種々のレーザー出力で発現増強するオートファジー体系のタンパク質分子全体を Py-Tag 誘導体で安定同位体標識し、液体クロマトグラフ質量分析計の多重反応モニタリングによる相対定量法で調べる予定である。

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) 微細構造を改変する仕組みを、タイト結合の開閉やアクチンの再構築の観点から明確化しなければならないが、生細胞での脂質二重膜の張力やアクチン重合体をリアルタイムに観測できるプローブを利用し、細胞間隙やアクチン繊維の変化を光寿命顕微鏡法で調べる予定である。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

① 稲垣圭司、周尾卓也、大越貴志子

iPS 細胞由来網膜色素上皮における低侵襲マイクロパルスレーザー後の HSP70 の発現
第25回日本糖尿病眼学会総会 2019年9月

② 稲垣圭司、周尾卓也、大越貴志子

細胞障害を引き起こさないマイクロパルス波がヒト網膜色素上皮細胞に与える効果
第123回 日本眼科学会総会 2019年4月

(3) 出版物
なし

学 校 名	広 島 国 際 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	革新的乳癌転移阻害剤セマフォリンペプチドの 開発と応用 —乳癌転移阻害ペプチドの開発と応用—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①乳がん ②転移 ③軸索誘導因子 ④セマフォリン ⑤細胞内シグナル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 山 寛 尚	保 健 医 療 学 部	講 師	実験の立案と遂行

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
東 山 繁 樹	愛媛大学 プロテオ サイエンスセンター	教 授	ペプチド合成
中 原 正 子	保 健 医 療 学 部	講 師	細胞内シグナル解析

革新的乳癌転移阻害剤セマフォリンペプチドの開発と応用

－乳癌転移阻害ペプチドの開発と応用－

1. 研究の目的

これまでに申請者は、神経軸索伸長を制御している軸索誘導因子に着目して研究を行ってきた。なかでも、分泌タンパク質である『セマフォリン 3F (SEMA3F)』はもともと、軸索伸長を負に制御する因子として同定されたが、その後の解析により様々な癌種において腫瘍血管新生、転移抑制因子として機能することが明らかになってきた (Bielenberg, JCI, 2004; Shimizu, JBC, 2008, 2013)。そこで私は脳腫瘍細胞を用いて SEMA3F による細胞内シグナル解析を行なったところ、SEMA3F は細胞増殖、遊走に重要な PI3K/Akt/mTOR 経路を抑制することを明らかにした (Sci Rep, 2015)。しかも、SEMA3F の効果は脳腫瘍細胞のみならず、癌抑制遺伝子である PTEN を欠損した脳腫瘍細胞、メラノーマ、血管内皮細胞、T 細胞を含む様々な細胞においても観察され、生理活性物質でありながら強力な Akt-mTOR シグナル阻害剤となりうることが分かってきた。

以上の知見を基に、愛媛大学 (東山繁樹教授) と共同で、乳癌における分子標的薬剤ハーセプチン耐性化問題を解決すべく研究を開始している。乳癌治療においては PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化がハーセプチン薬剤耐性化機序に重要とされており、ハーセプチン処置に加えて PI3K/Akt/mTOR 経路の遮断が乳癌治療に効果的であることが報告されている。そこで私は、SEMA3F による PI3K/Akt/mTOR 抑制効果を利用して、乳癌治療におけるハーセプチン耐性化問題を克服し、新たな乳癌治療戦略の提示ができるのではないかと考えた。

これまでに私は、基礎実験としてマウス由来乳癌細胞株 4T1 にヒト SEMA3F を遺伝子導入して安定発現株を作成し、Balb/c マウス乳腺に同種移植して腫瘍増殖への影響を検討した。その結果、SEMA3F-4T1 細胞移植マウスでは腫瘍増殖と血管新生が有意に低下するとともに、肝臓および肺への遠隔転移が SEMA3F 群で強力に抑制されることが明らかとなった。腫瘍内部では Akt, mTOR, S6K (mTOR シグナル下流因子) のリン酸化が抑制されていることを確認しており、SEMA3F が乳癌増殖、転移を阻害する可能性が示唆された。よって、SEMA3F をハーセプチンと併用することによって、より強力かつ効果的に乳癌治療に望めるのではないかと考えている。その一方で、我々を含む、これまでの研究では SEMA3F の効果の判定には、遺伝子導入やウイルスが用いられており、生理活性物質を用いた臨床応用を目指すためには *in vivo* 環境下で、より安定なペプチドを作成することが求められる。

そこで本研究 (研究期間 3 年を想定) では、1) SEMA3F がどのようなメカニズムで乳癌の転移を抑制したのか、2) SEMA3F を利用して乳癌ハーセプチン薬剤耐性化を克服できるか否か、3) 全長 SEMA3F タンパク質に代わる安定構造を持つセマフォリンペプチド開発を行う。以上の検討から、PI3K/Akt/mTOR 阻害効果を持つ『セマフォリンペプチド』の開発が達成できれば、SEMA3F が持つ乳癌抑制効果の分子機構を解明するとともに、ハーセプチン耐性化を克服して、より効果的・安全な革新的乳癌治療法が提示できるものと考えている。

2. 研究の計画

(1) 乳癌モデル動物の作成と解析

乳癌モデル動物 (異種移植) は、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 をヌードマウス乳腺に移植することで作成した。まず、MDA-MB-231 細胞にヒト SEMA3F 遺伝子を導入し過剰発現細胞を作成した。さらに細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して *in vivo* imaging に使用できるようにした。作成した親株および SEMA3F 過剰発現細胞はヌードマウス (メス 6 週齢) 乳腺に 1×10^6 個の細胞を移植した。移植後、*in vivo* imaging によってサイズ、転移の状況をモニターした。移植後、各マウスから腫瘍を摘出してパラフィン包埋したのちに、免疫組織染色によって評価を行った。

(2) PTEN 欠損細胞の作成と解析

MDA-MB-231細胞に対して、遺伝子編集技術であるCRISPR/Cas9を用いてPTENノックアウトを行った。MDA-MB-231細胞に遺伝子導入試薬を用いて、PTEN遺伝子を標的とする2種類のCRISPRベクター（#1、#2）をそれぞれ導入した。その後、フローサイトメーターによってCRISPR遺伝子が導入された細胞（GFP陽性細胞）を確認し、それぞれ単離して培養を行った。各クローンは、ウェスタンブロット法により解析を行い、PTENが欠損していることを確認した。

(3) セマフォリンペプチドの合成

セマフォリンペプチドの合成は、小麦胚芽を利用した無細胞タンパク質合成システムによって行った。合成したタンパク質はアクリルアミドゲル電気泳動にて、分子量や精製度を確認した。

3. 研究の成果

(1) SEMA3F が乳癌細胞に与える影響を細胞レベルおよび移植モデルで評価する

まずSEMA3Fの乳癌細胞に対する効果を *in vitro* 系で評価を行った。乳癌細胞株MCF7とMDA-MB-231細胞にSEMA3F（640 ng/ml）を処理して15、30分後に細胞を回収した。その後、ウェスタンブロットによって細胞内シグナルを観察した。その結果、AktとmTOR下流分子であるS6Kのリン酸化が抑制されることが分かった。これは、これまで脳腫瘍細胞、血管内皮細胞で観察されたのと同様に乳癌細胞においてもSEMA3FがAkt-mTORシグナルを抑制することが明らかになった。

次に、SEMA3Fの効果をマウス乳癌細胞移植モデルによって検討した。まず、マウス乳癌細胞株4T1を用いる同種移植モデル（allograft model）によって検討を行った。4T1細胞にヒトSEMA3F遺伝子を導入して安定発現株を樹立した。親株4T1あるいは作成したSEMA3F-4T1細胞をそれぞれ、Balb/cマウスの乳腺に移植し経時的に腫瘍サイズを計測した。その結果、SEMA3F-4T1移植群で有意に腫瘍サイズが低下していることが明らかとなった。さらに、移植24日後に腫瘍および各種臓器を摘出して細胞内シグナル、転移の有無を検討した。乳癌の転移好発部位として肺と肝臓が知られているため、これらの臓器における結節（nodule）の数を評価した。その結果、SEMA3F-4T1移植群では肺、および肝臓ともに転移が抑制されていることが明らかとなった（図1）。また腫瘍における細胞内シグナルを見ると、*in vitro* 系で確認した結果と同様にAkt-mTORシグナルのリン酸化が抑制されていることを確認した。さらに私はヒト乳癌細胞MDA-MB-231をヌードマウスに移植し、SEMA3Fの腫瘍抑制効果を検討した（xenograft model）。MDA-MB-231細胞にヒトSEMA3F遺伝子を導入して安定発現株を作成した。親株あるいはSEMA3F発現細胞をヌードマウス乳腺に移植し経時的に腫瘍サイズを測定した。移植後10週まで計測したが、両群に有意な差は認められなかった（図2A）。さらにMDA-MB-231細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して *in vivo* imaging の手法を用いて腫瘍サイズを測定したが、上記と同様に両群に差は認められなかった（図2B）。一方で、MDA-MB-231細胞をヌードマウス尾静脈より投与して肺への生着を *in vivo* imaging で観察した。その結果、コントロールでは肺への生着が確認されたが、SEMA3F-MDA-MB-231細胞では肺への生着が抑制されることが明らかとなった（図2C）。

以上の検討から、SEMA3Fは乳癌細胞の転移を抑制する効果を有していることが明らかとなった。この時、腫瘍の細胞内シグナル解析結果からAkt-mTORシグナルのリン酸化が抑制されていることから、この現象はSEMA3FのAkt-mTORシグナル抑制効果が発現していることが示唆された。

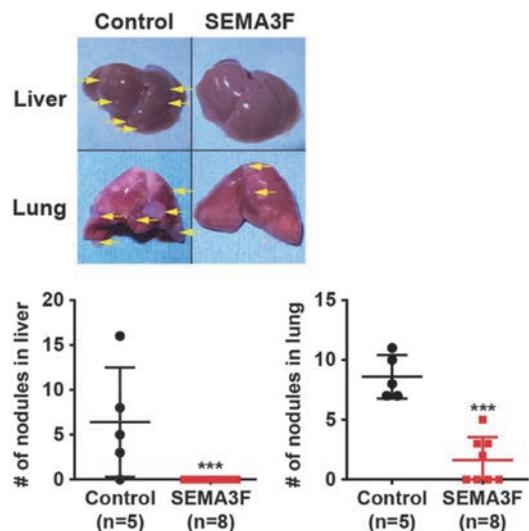


図1: 乳癌細胞同種移植モデルによる検討結果
マウス乳癌細胞4T1にSEMA3Fを導入した細胞をBalb/cマウスに移植して腫瘍の転移を評価した。

(2) SEMA3F がハーセプチン耐性 HER2 陽性乳癌に対する効果を評価する

まずはハーセプチン耐性形成に重要である PI3K/Akt/mTORシグナルを活性化するため、CRISPR-Cas9技術を用いてPTENノックアウト細胞を作成した。その結果、AktとS6Kのリン酸化が親株に比べて上昇していることを確認した(図3A)。この細胞にSEMA3Fを処理したところ、AktおよびS6Kのリン酸化を抑制することが明らかとなった(図3A)。つまり、乳癌細胞においてSEMA3FがPTEN非依存的にAkt-mTORシグナルを阻害することを示唆している。さらに細胞浸潤能を評価するためにトランスウェルを用いてSEMA3Fの効果を検討した。その結果、SEMA3Fは親株とPTENノックアウト細胞の細胞浸潤を抑制していることが明らかとなった(図3B)。つまり、SEMA3FはPTEN欠損乳癌細胞においても効果を有していることが分かった。

4. 研究の反省・考察

(1) 考察

以上の検討結果から、SEMA3Fが乳癌細胞に対してAkt-mTORシグナルを抑制する効果を有することを確認した。さらにその効果は、in vivo系においても同様に確認され、SEMA3Fが乳癌の増殖、転移、血管新生を阻害する新たな治療標的となりうることが示唆された。一方で、本研究の目的であるハーセプチン耐性化に関する実験は現在進行中である。図3に示すようにSEMA3FはPTEN欠損細胞においてもAkt-mTORシグナルを抑制し、細胞浸潤能を阻害した。つまりハーセプチン耐性化を獲得した細胞においても効果を有している可能性が示唆される。今後は、HER2を過剰発現したSKBR3細胞を用いて同様な検証を行い、薬剤耐性乳癌に対するSEMA3Fの効果を詳細に検討したい。

(2) 今後の展開

上記の結果を基に、in vivo環境下で安定なSEMA3Fペプチドの作成を進めている。まずは全長SEMA3Fにビオチンタグをつけた遺伝子を作成し、共同研究先である愛媛大学 東山繁樹教授の協力の下、コムギ無細胞タンパク質合成技術によってSEMA3Fタンパク質合成を開始している。蛋白質の可溶化条件を再検討し、大量合成できる条件を決定する予定である。その後、全長SEMA3Fを断片化していき、NRP2(SEMA3Fレセプター)に結合する最小単位のペプチドを同定し生理活性を評価する。その結果、より安定的なセマフォリンペプチドが作成できるものと考えている。

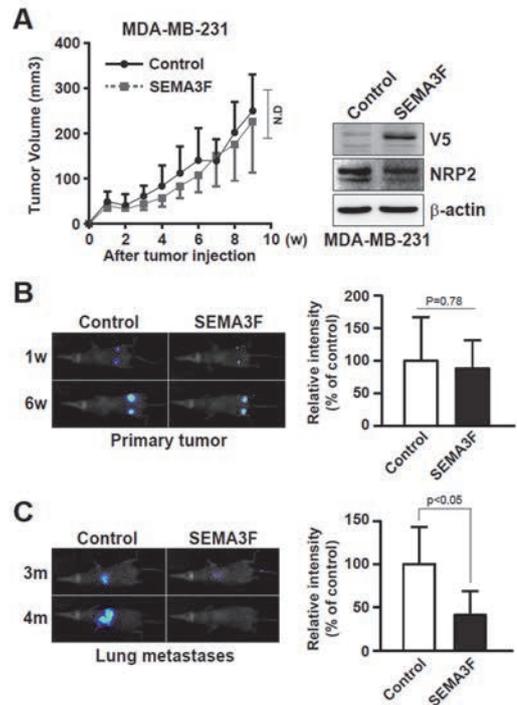


図2: 乳癌細胞異種移植モデルによる検討結果

- (A) ヒト乳癌細胞MDA-MB-231にSEMA3Fを導入した細胞をヌードマウス乳腺に移植して腫瘍のサイズおよび転移の様子を観察した。
 (B) 腫瘍細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入してin vivoイメージングによって評価した。
 (C) 腫瘍をマウス尾静脈に投与して肺へ生着したものを観察した。

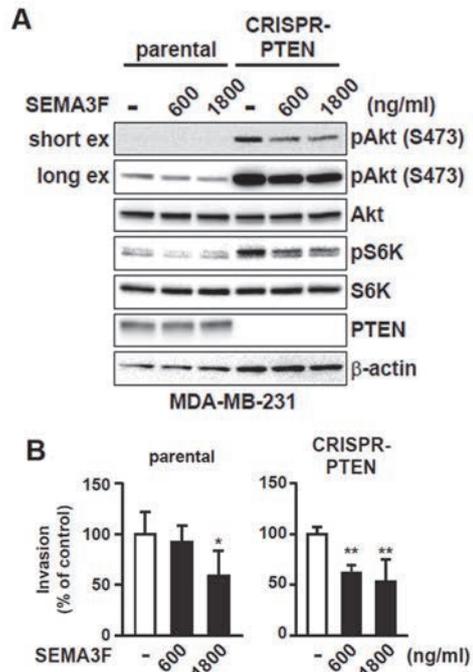


図3: PTENノックアウト細胞に対するSEMA3Fの効果

- (A) MDA-MB-231細胞にCRISPR-Cas9技術によってPTEN発現をノックアウトした。SEMA3Fを処理してAkt-mTORシグナルに対する影響を検討した。
 (B) PTENノックアウト細胞を用いて、細胞浸潤能をトランスウェルアッセイによって評価した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①和田恵理子、松木依理奈、中原正子、楠本智章、藤原章、中山寛尚 遺伝子編集技術CRISPR-Cas9を用いた薬剤耐性乳癌株の作成とその評価 日本臨床検査自動化学会第51回大会 2019年10月4日 第1回JACLaS Award 2019 優秀演題賞（学部生部門）を受賞

②和田恵理子、松木依理奈、中原正子、楠本智章、藤原章、東山繁樹、中山寛尚 軸索誘導因子セマフォリン3FはNRP2レセプターを介して乳癌細胞の浸潤を阻害する 第14回日本臨床検査学教育学会 2019年8月21-23日

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	弾性線維の再生技術の開発		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①弾性線維 ②細胞外マトリックス ③老化 ④再生		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 邨 智 之	医 学 部	教 授	研究の統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 間 智 也	医 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウスの作成と解析
平 井 希 俊	医 学 部	講 師	培養細胞の遺伝子改変と解析
三 木 貴 雄	医 学 部	講 師	リコンビナントタンパク質の作成と解析
楠 本 健 司	医 学 部	教 授	皮膚組織の採集
塩 島 一 朗	医 学 部	教 授	培養組織弾性線維の解析

弾性線維の再生技術の開発

1. 研究の目的

弾性線維は、伸び縮みする組織（皮膚・動脈・肺など）に多くあって、その伸縮性を担う細胞外マトリックスである。皮膚のたるみだけでなく、心疾患予後悪化因子である動脈中膜硬化、高齢者の重要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・分解が直接原因と考えられているため、弾性線維の劣化予防と再生は高齢化社会における極めて重要な課題である（図1）。しかし弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、加齢組織では新たな弾性線維形成は起こらないため、弾性線維の再生は困難と考えられてきた。

弾性線維形成には、①マイクロフィブリル線維束形成 ②エラスチンの凝集 ③エラスチンのマイクロフィブリルへの沈着 ④エラスチンどうしの架橋 といったプロセスがあることがわかりつつある。研究代表者らは、②③のプロセスに必須の分泌タンパク質 **Fibulin-5** を同定した (*Nature* 2002, *J Cell Biol* 2007) のを皮切りに、**LTBP-2** (プロセス①)、**LTBP-4** (プロセス③)、**Fibulin-4** (プロセス④) といった弾性線維形成因子を同定・機能解明してきた (*EMBO J* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 2013, *Hum Mol Genet* 2014, *Sci Rep* 2017 など)。ここにきてこれらがつながり、弾性線維形成機構の全容が姿を現しつつある。

本研究では、これら弾性線維形成因子の中で加齢組織において不足するものを見出し、弾性線維の再生に必要な条件を明らかにすることを目指す。本年度は、ヒト加齢皮膚、および露光部加齢皮膚にみられる無秩序なエラスチン凝集体である日光弾性線維症のサンプルを収集し、弾性線維形成因子の増減を検討した。

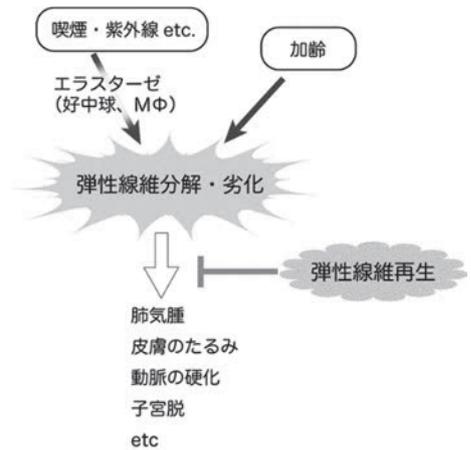


図1. 弾性線維の分解と劣化が多くの老化関連疾患の直接原因となる。

2. 研究の計画

(1) 加齢皮膚で弾性線維再生がおこらない原因の特定

富山大学および関西医科大学における医学倫理審査委員会より承認を受けた後、富山大学附属病院および関西医科大学附属病院にて採取された加齢皮膚18例（平均73歳、露光部7例、非露光部11例）およびコントロールとして若年皮膚5例（平均22歳）の凍結切片を作成し、抗エラスチン抗体 (Millipore)、抗Fibrillin-1抗体 (Elastin Products Company)、抗Fibulin-4抗体 (自作)、抗Fibrillin-5抗体 (自作)、抗LTBP-2抗体 (自作)、抗LTBP-4抗体 (自作) を用いて蛍光免疫染色を行った。

(2) 日光弾性線維症でエラスチンが無秩序な沈着をおこす原因の特定

日光弾性線維症の皮膚サンプル8例（平均76歳）の凍結切片を作成し、上記の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、上記サンプルと比較した。

3. 研究の成果

(1) 加齢皮膚で弾性線維再生がおこらない原因の特定

①加齢皮膚においては抗エラスチン抗体で染色される弾性線維のフラグメンテーションが多く観察された。弾性線維形成の鋳型となるマイクロフィブリル（抗Fibrillin-1で染色される）も減少していたが、マイクロフィブリルがあってもエラスチンが沈着していない線維が多く認められた。真皮直下より垂直に走るマイクロフィブリルであるオキシタラン線維も

抗エラスチン抗体で染色されることがわかったが、減少しているサンプルと正常なサンプルがあり、真皮の弾性線維の減少とは独立していた。

- ②今回調べた弾性線維形成因子（Fibulin-4, 5, LTBP-2, 4）は総じて若年皮膚よりも減少していたが、特にLTBP-4の減少程度が強く、一貫していた。

(2) 日光弾性線維症でエラスチンが無秩序な沈着をおこす原因の特定

- ①日光弾性線維症の皮膚サンプルでは、真皮浅層に抗エラスチン抗体で強く染色される厚い構造物（弾性線維の塊）を認めた。弾性線維形成の鋳型となるマイクロフィブリルは増えているもの、正常なもの、フラグメンテーションをおこしているもの、と様々であった。
- ②弾性線維形成因子のうち、LTBP-2とFibulin-4はエラスチンと共局在して増えていた。Fibulin-5は5例で増えていたが3例で減少していた。LTBP-4の発現は全例で消失していた。

4. 研究の反省・考察

(1) 加齢皮膚で弾性線維再生がおこらない原因の特定

弾性線維のターンオーバーは極めて遅いことが知られており、特に加齢組織では弾性線維が再生されることはない。今回、その原因を探るためにエラスチン、マイクロフィブリルの本体であるFibrillin-1、我々がこれまで同定してきた弾性線維形成因子Fibulin-4, 5, LTBP-2, 4の染色パターンをヒト加齢皮膚18例と若年皮膚5例で比較した。これだけの弾性線維形成因子をこれほどの数のヒト皮膚サンプルで調べた研究はこれが最初である。

まず、エラスチンの分布は加齢とともに線上の連続性を失い、フラグメンテーションを来しているように見えるが、エラスチン沈着の鋳型となるマイクロフィブリルはフラグメンテーションを来していないものが多く、「弾性線維が分解された」だけでなく「新たに形成されたマイクロフィブリルにエラスチンが正しく沈着できていない」ことを示している可能性がある。エラスチンをマイクロフィブリルに沈着させるための因子として我々はFibulin-5とLTBP-4を同定しているが、これらは加齢皮膚で減少しており、特にLTBP-4は一貫して加齢とともに大きく減少していた。すなわち、これがエラスチンのマイクロフィブリル上への沈着を妨げている原因であると考えられる。

また、Fibrillin-1の染色そのものも減少している加齢皮膚が多く、マイクロフィブリルの形成が加齢によって減っていると考えられた。

(2) 日光弾性線維症でエラスチンが無秩序な沈着をおこす原因の特定

日光弾性線維症では、露光部の加齢皮膚（真皮）に多量の弾性線維様の塊が生じる。加齢皮膚で弾性線維再生能が失われることと一見矛盾する現象であるため、その発生機序に興味を持たれているが、未だ定説はない。紫外線がエラスチン遺伝子のプロモーターを活性化するという報告はあるが、機能的な弾性線維ではなくてエラスチンの無秩序な沈着物が形成される理由はわかっていない。

今回解析した8例の日光弾性線維症の皮膚サンプルでは、真皮浅層に多量のエラスチン沈着を認め、同時に多量のFibulin-4の沈着を認めた。LTBP-2は8例中7例、Fibulin-5は8例中5例でエラスチンと同部位に多量の沈着を認めた。しかし、興味深いことに全例でLTBP-4の染色が消失しており、エラスチンとは全く別の発現調節がされていることがわかった。これらのことから、紫外線によりエラスチンの発現が増加するものの、エラスチンの正しい沈着に必須のLTBP-4が加齢皮膚では発現しないため、エラスチンの無秩序な沈着がおこることが日光弾性線維症の発症機序であると推察した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Mori H, Yamada H, Toyama K, Takahashi K, Akama T, Inoue T, Nakamura T: Developmental and age-related changes to the elastic lamina of Bruch's membrane in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 257(2):289-301, 2019. doi: 10.1007/s00417-018-4184-5.

(2) 口頭発表

- ①Nakamura, T.: Essential function of Fibulin-4 in lysyl oxidase activation. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 21 - July 25, 2019, Manchester, NH, U.S.A.).
- ②中邨智之: 「弾性線維形成のしくみ ～弾性線維形成タンパク質と日光弾性線維症の発症メカニズム」 第41回日本光医学・光生物学会 招待講演 (ホテルグランテラス富山、富山、2019年7月19日)

(3) 出版物

なし

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 —抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①炎症性腸疾患 ②腸内細菌叢 ③腸管免疫 ④ノバイオート			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医学部 病原微生物学講座	主 任 教 授	研究統括、細菌叢解析、細菌数解析、動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	医学部 病原微生物学講座	助 教 授	細菌叢解析、細菌数解析、動物実験
池 内 浩 基	医学部 炎症性腸疾患学講座 外 科 部 門	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
内 野 基	医学部 炎症性腸疾患学講座 外 科 部 門	准 教 授	臨床データの収集・解析
大 野 博 司	理化学研究所生命医科学研究センター 粘膜システム 研 究 チ ー ム	チ ー ム リ ー ダ ー	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析の指導
加 藤 完	理化学研究所生命医科学研究センター 粘膜システム 研 究 チ ー ム	研 究 員	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析
中 西 裕 美 子	理化学研究所生命医科学研究センター 粘膜システム 研 究 チ ー ム	研 究 員	臨床サンプルの代謝産物解析

細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 — 抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道 —

1. 研究の目的

- (1) 現在、潰瘍性大腸炎 (UC) の患者は増加の一途であり、若年者層に広がっていることから、国家レベルにて対策が行われている。平成 25 年度末の統計では、人口 10 万人あたり 100 人程度の患者数とされており、男性では 15 から 25 歳に、女性でも 20 から 30 歳に患者が集中している。UC 発症における腸内細菌叢の関与について多くの研究がなされており、様々な細菌叢変化の関与が推察されている。しかしながら、細菌叢の量的、質的变化がどのように UC 発症に関連するのかは現在においても明らかになっていない。共同研究者である兵庫医科大学 炎症性腸疾患学講座外科部門の池内浩基らは、UC による回腸嚢造設後の回腸嚢炎発症率と、家族性ポリポーシスによる回腸嚢造設後の回腸嚢炎発症率を検討し、UC による回腸嚢造設後において顕著に回腸嚢炎が起こることを報告した (Dig Surg 2004, Ikeuchi et al.)。このことから、UC による回腸嚢造設後の回腸嚢炎は、UC の病態を反映しており、その解析は UC 発症の原因解明に繋がるものと考えられ、池内らによる提案は、全世界にて認められている。したがって、我々は、池内グループと、細菌叢研究を世界的にリードしている理化学研究所の大野グループと有機的に連携し、UC の病態を反映しているとされている UC 術後回腸嚢炎患者の糞便サンプルを解析することにより、UC 発症に関する腸管細菌叢の関与を明らかにすることを目的として 2017 年度から研究を開始している。その中で、ある種の腸内細菌数の増加が UC 増悪の原因となっている可能性を示す preliminary な結果を得、新たな仮説を得るに至った。したがって、細菌叢解析、代謝産物解析から得られる結果を総合することによって、新たな UC の治療戦略を提唱することを目的とした。具体的には、
- ①患者糞便サンプル中の細菌数測定方法の確立と、解析を行う。
 - ②次世代シーケンサーによる細菌叢解析、質量分析による代謝産物解析を行うことにより、回腸嚢炎発症時の細菌叢変化、代謝の変化を明らかにする。
 - ③患者糞便サンプルを抗菌剤投与により無菌化したマウスに投与し、腸内環境変化 (主に炎症について) の解析を行う。これからの解析を総合することにより、仮説の検証を行うことを目的とした。

2. 研究の計画

- (1) 炎症性腸疾患外科における回腸嚢炎患者は、治療経過観察を受けているものを含めて週に 1-4 人来院する。それら全ての患者の情報から臨床スコアを算出し記録する。
- (2) 細菌数解析方法を確立させる。具体的には、便サンプルを Nycodenz の密度勾配にかけ、細菌層を回収しフローサイトメトリー (FACS) にて解析する。FACS への前処置として核酸染色を行う (すでに、ThermoFisher から Bacteria Counting kit for flow cytometry として入手することができる)。あるいは、全ての細菌にて one copy しか存在しない遺伝子数を qPCR にて測定することによって細菌数を測定する。この方法は富山大学 臨床分子病態検査学講座の仁井見 英樹 先生が開発者であり、その方法を導入する。
- (3) それぞれの便サンプルを内視鏡にて収集し、(2) にて確立させた方法にて細菌数解析、すでに確立された方法を用いて細菌叢解析、代謝産物解析を行う。患者の便サンプルを抗菌剤にて腸内を無菌化したマウスに投与し、腸における炎症状態をマウス便中の Lipocalin-2 を指標に検討する。また、便投与を受けたマウスの糞便細菌叢を調べる。炎症が疑われた場合、腸管粘膜固有層の炎症細胞、CD4⁺ T 細胞を FACS にて解析する。前述の方法にて炎症の兆候が認められない場合は、腸炎を起こし易いと考えられるマウス (IL-10 欠損マウスなど) をレシピエントとして用いて検証する。すでに、これらの方法にて炎症性腸疾患患者の便サンプルがレシピエントマウスに腸炎を起こすことが報告されている (Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2016;2:468-481)。
- (4) (1) から (3) を総合し、どのような細菌叢の異常 (どのような属の細菌群の量的な異常) が回腸嚢炎の原因となっているのかを明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 潰瘍性大腸炎(UC)にて回腸囊が増設された患者 82 サンプルにおける細菌叢解析を行った。

①治療前後における検討

現在まで治療経過を追うことが出来ている患者12人をシプロキササン(CPFX) 著効(Very good)、効果あり(Good)、効果なし(Poor)に分け検討した。患者IDは#にて標記、サンプル採取時期(開始時、2週間後、4週間後、再燃時)はIDの下に標記した。著効、効果ありでは、Bifidobacteriaceaeが治療後に増加しているものが4例、Bacteroidaceaeが治療後に顕著に増加(2倍以上しているもの)が4例あった。著効の2例にてFusobacteriaceaeが顕著に減少、再燃時にErysipelotrichaceaeが出現していた。さらに、著効、効果ありの中で、Prevotellaceaeが優位なものが、3例あった(図1)。

②mPDAIスコアにおける検討

抗菌剤にて未治療であった患者の細菌叢を、初診時でのmPDAIスコア(5以上が回腸囊炎と診断される)別にて検討した。mPDAI \leq 4とmPDAI \geq 5にて比較すると、Bifidobacteriaceae、LachnospiraceaeがそれぞれP=0.0269、0.0484と優位にmPDAI \geq 5にて減少していた。さらに、mPDAI \geq 5で、Fusobacteriaceae、Pasteurellaceae、Enterobacteriaceaeを多く持つ患者があり、mPDAI \leq 4で、Bacteroidaceae、Clostridiaceaeが優位である患者が多かった(図2上参照)。さらに、Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceae、Bacteroidaceae、Clostridiaceaeの割合を個々の患者にて検討したところ、mPDAI \leq 4では、前記の4種類のうち3種類を10%以上持つもの(図2下の”□”にて示されている)が多かった(図2下図参照)。

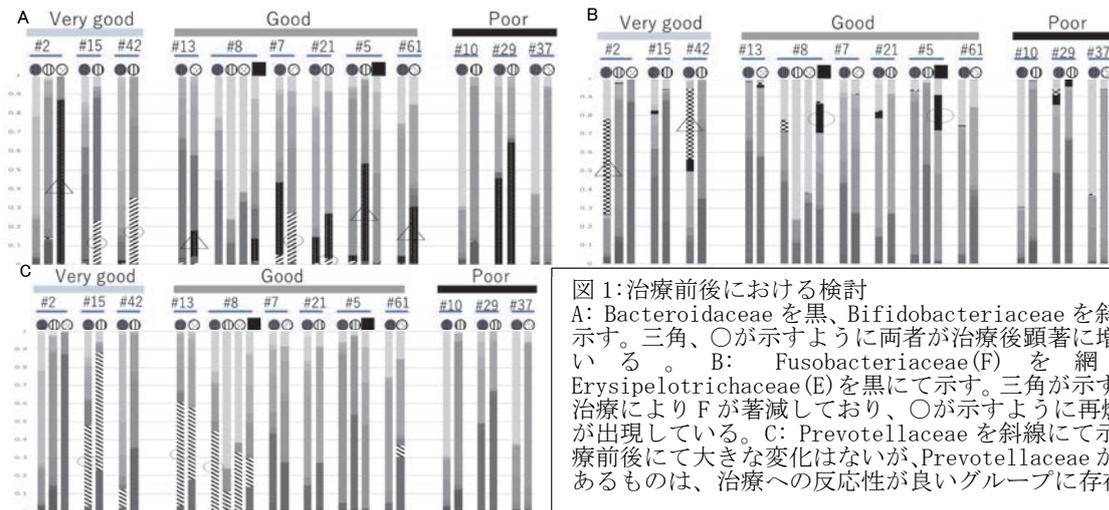


図1: 治療前後における検討
 A: Bacteroidaceae を黒、Bifidobacteriaceae を斜線にて示す。三角、○が示すように両者が治療後顕著に増加している。 B: Fusobacteriaceae(F) を網目、Erysipelotrichaceae(E) を黒にて示す。三角が示すように治療によりFが著減しており、○が示すように再燃時にEが出現している。 C: Prevotellaceae を斜線にて示す。治療前後にて大きな変化はないが、Prevotellaceaeが優位であるものは、治療への反応性が良いグループに存在する。

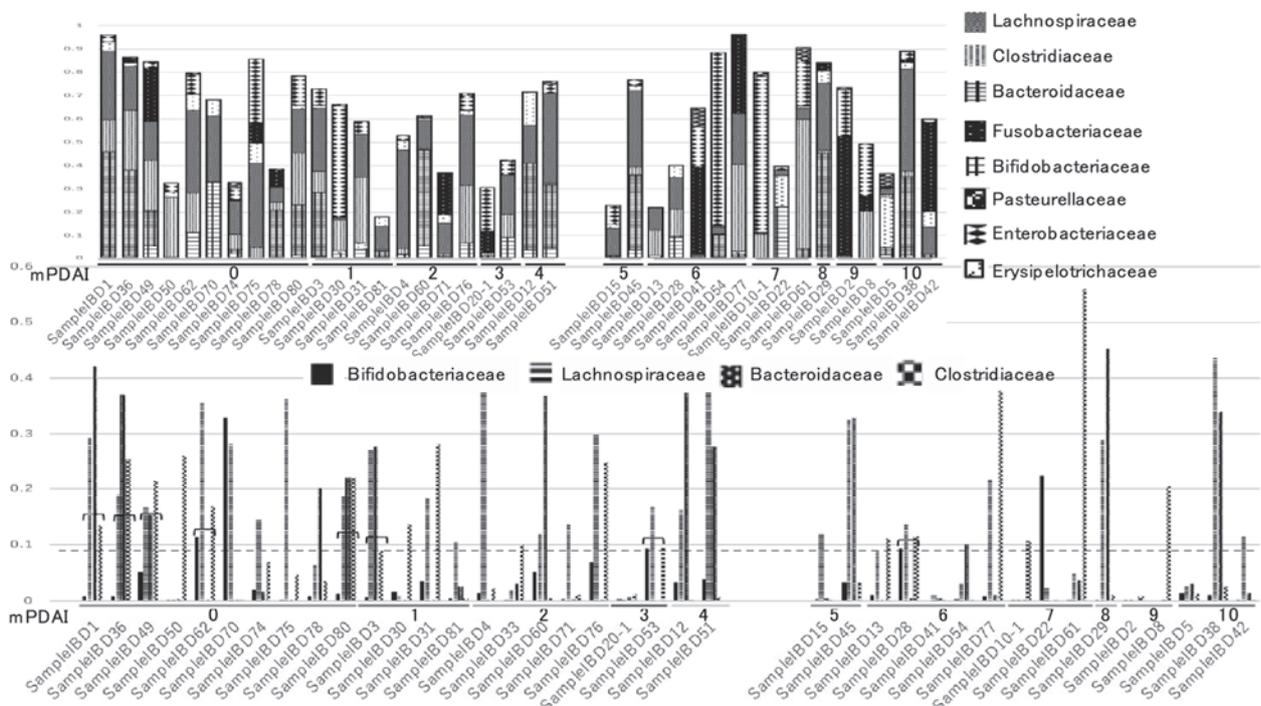


図 2:mPDAI スコアにおける検討

上：それぞれの患者（グラフの下に ID を標記）サンプル中における凡例に示された細菌の割合を mPDAI 別にグラフ化している。mPDAI \geq 5（回腸囊炎患者）にて Fusobacteriaceae を多く持つ患者が存在する。下：上に示した患者個々のサンプルにおける、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Clostridiaceae の割合を示す。点線は 10%のラインを示し、“┌” は前述の 4 種類のうち 3 種類が 10%を超えている患者を示す。“┐”にて示された患者は mPDAI \leq 4にて明らかに多い。

4. 研究の反省・考察

(1) UC 術後回腸囊炎患者の便サンプルの形状は個々においてかなり差があり、腸内細菌数をサンプル間にて正確にカウントすることが困難であることが明らかとなった。したがって、細菌叢構成の詳細を検討することを主眼にして解析を行った。UC 術後回腸囊炎患者 82 サンプルについて 16SrRNA アンプリコンによる解析を行い、腸管環境の恒常性維持に関与していると考えられる”Balanced microbiota”の候補、さらに、病原性常在細菌の候補を見出した仮説図、「研究成果」の図 2 の下図参照)。また、UC 術後回腸囊炎の通常治療である抗菌剤（シプロキササン(CPFX)）治療に対する反応性が治療開始時における Prevotellaceae の優位性によって規定されるとの仮説を得るに至った（仮説図、「研究成果」の図 1C 参照)。したがって、①さらに、解析サンプル数を増やすことにより、前述の傾向を統計学的に明らかにすること、そして、②マウスを用いて仮説の証明する必要があると考えられる。さらに、③前述の結果をもとに潰瘍性大腸炎患者へ検討を拡大し、同様の傾向が認められるかも検討する必要があると考えられる。

現段階における仮説



仮説図

UC 術後回腸囊では Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Clostridiaceae のうち 3 種類が少なくとも 10%存在することで、炎症あるいは病原性常在細菌(Pathobiont) (Fusobacteriaceae, Pasteurellaceae, Enterobacteriaceae, Erysipelotrichaceae 等) の増殖が抑制され恒常性が保たれている。これらの恒常性維持に関わる細菌群を”Balanced microbe”と名付けた。さらに、Prevotellaceae が優位であるとシプロキササン(CPFX)の代謝の抑制、あるいは、回腸囊細菌叢への CPFX の浸透が促進され抗菌剤の効果が向上するのではないかと考えた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①石戸聡、加藤完、大野博司、小椋英樹、内野基、池内浩基、潰瘍性大腸炎術後の回腸囊炎と腸内細菌叢の関連性に関する検討、第38回 近畿腸管微生物研究会、平成30年6月9日

(3) 出版物

なし

学 校 名	福 岡 大 学	研究所名等	てんかん分子病態研究所	
研 究 課 題	iPS細胞由来オータプス培養標本による シナプス機能評価法開発 —シナプス対象の神経疾患治療薬創製法開発—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①オータプス ②シナプス ③微小電極アレイ ④iPS細胞			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
廣 瀬 伸 一	医 学 部 てんかん分子病態研究所	教 授 所 長	研究代表者 総括 iPS細胞樹立・維持 ドラッグスクリーニング

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
桂 林 秀 太 郎	薬 学 部	准 教 授	オータプス標本作成 ドラッグスクリーニング
安 田 隆	九州工業大学大学院生命体工学 研究科 生体機能応用工学専攻 生体メカニクス講座	教 授	シリコン窒化膜を用いたマイクロデバイス開発

iPS 細胞由来オータプス培養標本によるシナプス機能評価法開発 ーシナプス対象の神経疾患治療薬創製法開発ー

1. 研究の目的

(1) 目的

本研究の目的はシナプス機能の詳細な解析に適した培養標本であるオータプス培養標本をヒト iPS 細胞より調製し、ハイスループットでニューロンの電氣的活動を評価できる次世代微小電極アレイシステムを用いてシナプス機能のスクリーニング法を開発することにある。具体的には微小孔アレイデバイスを用いてオータプス培養標本を作製する技術を構築するとともに、デバイス上の微小電極アレイを用いてオータプス培養標本の電気活動を計測する技術を構築する。

(2) 背景

アストロサイトがシナプス機能を制御することは既に分かっている。しかし、アストロサイトの密度が変化した際のシナプス動態は、未知な部分が多い。例えば、1) ニューロンがシナプスを投射する場所(位置)は影響を受けるのか、2) 個々のシナプスにおける開口放出メカニズムの変化はどうなっているのか、3) その生理的意義は何か、などである。本研究で用いた培養標本は、従来の神経生理学研究で用いられる脳スライス標本や分散培養標本とも異なる、全く新しいコンセプトに基づいた再構築型単一ニューロン培養モデルである。この特徴を活かした解析的研究の成果を基に、共存するアストロサイトの密度環境とシナプス動態の相関関係を理論的にモデル化することによって、アストロサイトの密度依存的な環境変化を基軸として高次脳機能の獲得原理を理解することが必要であった。

2. 研究の計画

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

半導体加工技術を利用して、窒化シリコン製の自立膜に微小孔をアレイ状に形成した培養膜を製作する。この培養膜の裏面にアストロサイトを、膜のオモテ面にニューロンを培養することで、微小孔アレイを通じたアストロサイトとニューロンの細胞間コミュニケーションを実現し、オータプス培養標本を作製し得る培養環境を構築する。次に、微小孔アレイを有する窒化シリコン製培養膜のオモテ面に微小電極アレイを形成する。培養膜の裏面にアストロサイトを、オモテ面の微小電極アレイ上にニューロンを播種して共培養を行いながら、微小電極アレイによりニューロンの細胞外電位を計測する技術を構築する。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

まず初めに自己にシナプスを投射する海馬オータプス初代培養標本の作製を行う。続いてこの海馬オータプス初代培養標本を用いてパッチクランプ法を用いたシナプス伝達の解析を行う。さらに、蛍光イメージング法によるシナプス数の解析を行うことで、シナプス数の解析を実施する。

3. 研究の成果

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

膜厚約 $1\mu\text{m}$ の窒化シリコン膜に、直径約 $3\mu\text{m}$ の微小孔をピッチ $7.5\mu\text{m}$ でアレイ状に形成した。この膜を挟むようにしてアストロサイトとニューロンの共培養を行った。アストロサイトの播種数が異なるサンプルを用意し、ニューロンのシナプスマーカーを蛍光染色することでシナプス数をカウントし、ニューロンの活性を評価した。その結果、アストロサイトの播種数が多いほど、ニューロンの活性が高いことが分かった。これにより、微小孔アレイを通じて細胞間コミュニケーションを構築し得ることを実証した。次に、膜厚約 $1\mu\text{m}$ の窒化シリコン膜に、直径約 $6\mu\text{m}$ の微小孔をアレイ状に形成するとともに、一辺約 $54\mu\text{m}$ の微小電極を 8×8 個のアレイ状に形成した。この膜の裏面にアストロサイトを、オモテ面にニューロンを培養し、微小電極アレイによりニューロンの自発活動に伴うスパイク状の電位変化を計測した。その結果、培養 7 日目には $20\mu\text{V}$ 程度のスパイクが観察され始め、14 日目にはスパイクの大きさが $100\mu\text{V}$ 程度に増加した。以上の実験により、構築した計測システムの有用性を実証した。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

アストロサイトが高密度になるほど、単一ニューロンにおける興奮性シナプス後電流は大きかった。単一ニューロンあたりの即時開口放出可能シナプス小胞のサイズと自発的シナプス伝達の頻度も、アストロサイト高密度群のほうが大きかった。形態学的に同定されたグルタミン酸作動性シナプスの数は両者で有意な差は認めなかったが、伝達物質を放出できる興奮性シナプス(アクティブシナプス)の比率はアストロサイト高密度群では増加しており、逆にシナプス前サイレントシナプスの比率は低い結果であった。

4. 研究の反省・考察

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

すでに本研究の窒化シリコン多孔膜を用いることでオータプス培養標本を構築できることは確認済みであるが、歩留まりが極めて低いいためその改善を行うとともに、微小孔のピッチなどの最適化を行う必要がある。また、微小電極によるオータプス培養標本の電位計測を実現するために、微小電極上でのオータプス培養標本の作製を目指す。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

ニューロン1個あたりに必要なアストロサイトの最適数が分かったので、次年度はその結果に基づいてアストロサイトを播種し、iPS細胞由来オータプス培養標本の構築を目指す。ただし、マウス海馬ニューロンと、iPS細胞由来ニューロンが同じ挙動を示すかは全く不明なので、慎重に解析を行う必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Yoshitomi S, Takahashi Y, Yamaguchi T, Oboshi T, Horino A, Ikeda H, Imai K, Okanishi T, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Yoshimoto J, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Quinidine therapy and therapeutic drug monitoring in four patients with KCNT1 mutations. *Epileptic Disord.* 2019;21(1):48-54.
- ②Yoshitomi S, Takahashi Y, Yamaguchi T, Imai K, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Efficacy and tolerability of perampamil in pediatric patients with Dravet syndrome. *Epilepsy Res.* 2019;154:34-8.
- ③Yoshitomi S, Takahashi Y, Imai K, Koshimizu E, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Kato M, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Different types of suppression-burst patterns in patients with epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS). *Seizure.* 2019;65:118-23.
- ④Okumura A, Shimojima K, Kurahashi H, Numoto S, Shimada S, Ishii A, Ohmori I, Takahashi S, Awaya T, Kubota T, Sakakibara T, Ishihara N, Hattori A, Torisu H, Tohyama J, Inoue T, Haibara A, Nishida T, Yuhara Y, Miya K, Tanaka R, Hirose S, Yamamoto T. PRRT2 mutations in Japanese patients with benign infantile epilepsy and paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Seizure.* 2019;71:1-5.
- ⑤Hirabayashi K, Uehara DT, Abe H, Ishii A, Moriyama K, Hirose S, Inazawa J. Copy number variation analysis in 83 children with early-onset developmental and epileptic encephalopathy after targeted resequencing of a 109-epilepsy gene panel. *J Hum Genet.* 2019;64(11):1097-106.
- ⑥Goto A, Ishii A, Shibata M, Ihara Y, Cooper EC, Hirose S. Characteristics of KCNQ2 variants causing either benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2019;60(9):1870-80.
- ⑦日暮憲道, 廣瀬伸一, PCDH19 関連症候群, 日本医師会雑誌 指定難病ペディア 2019, 2019;148(特別号(1)):128.

(2) 口頭発表

- ① てんかんと遺伝子／廣瀬伸一，／第 14 回日本てんかん学会九州地方会（2019. 7. 13 沖縄）
- ② 安田隆，細胞解析デバイスで創薬・医療に貢献する，第42回日本バイオロロジー学会年会・第37回バイオロロジー・リサーチ・フォーラム，北九州市，2019.
- ③ 桂林 秀太郎、構成論的に神経ネットワークを作る～人工脳を作るための細胞レシピ～、第20回ブレインサイエンス研究会、2019年（熊本）
- ④ Shutaro Katsurabayashi, Kohei Oyabu, Kotomi Takeda, Kaori Kubota, Takuya Watanabe, Katsunori Iwasaki, Glial assembly for regenerative medicine and brain transplant, 2nd Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research, 2020年（福岡）

(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	①がん ②免疫療法 ③自然免疫型T細胞 ④MAIT細胞 ⑤iPS細胞 ⑥細胞治療 ⑦Proof-of-concept ⑧マウス		

○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	准 教 授	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

本研究ではがんにおける MAIT 細胞の機能を新規マウスモデル創生によって解明する。

生まれながらに持っている自然免疫と生後さまざまな異物と接触することで獲得される獲得免疫は生体防御の要であり、がんの発生と進展においても重要である。現在のがん免疫研究は免疫チェックポイント阻害剤とキメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T 細胞) などを使用した細胞傷害性 T 細胞が中心であるが、がん免疫療法をさらに普遍的・効果的な治療法に発展させるためには、獲得免疫系の T 細胞のみに焦点をあてるのではなく、自然免疫系を含めたさまざまな免疫細胞の機能を総合的に理解する必要がある。申請者は自然免疫と獲得免疫の両方の性質を持つ自然免疫型 T 細胞である NKT 細胞に着目し、NKT 細胞核移植によるクローン胚の樹立、ここから分化誘導した NKT 細胞移植によるがん細胞の増殖抑制を報告した (Wakao et al Current Biol 2005, FASEB J 2008)。これら一連の研究により自然免疫型 T 細胞移植によるがんの細胞治療の可能性を示した。

MAIT 細胞は近年注目されている新規の自然免疫型 T 細胞であり、ヒトにおける最大の T 細胞亜集団で、微生物・ウイルス感染、自己免疫疾患、生活習慣病、がん等の疾患に関与する。特に種々のがんにおいて MAIT 細胞は患者の末梢血から消失し、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殆ど未解明である。MAIT 細胞は細胞傷害性 T 細胞と異なりペプチドではなく、ビタミン B2 代謝中間物等の化合物を抗原として認識する。MAIT 細胞は様々ながんの TIL 中に存在することから、固形がんにおいても抗がん活性を発揮すると期待でき、その作用機能解明は新規治療法開発を可能とする。

MAIT 細胞の機能解析上の問題点は、①生体から分離した MAIT 細胞は増殖能が弱く、細胞死を起こしやすいこと、②現行マウスには MAIT 細胞が微量すぎて解析が難しいことである。申請者はヒト iPS 細胞から MAIT 細胞を選択的に分化誘導・増幅することで、この課題を克服した (Wakao et al Cell Stem Cell 2013)。

本研究では上記研究成果を応用して「MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウス」と「マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞」を構築・誘導し、これを用いてがんにおける MAIT 細胞機能を解明する。

2. 研究の計画

本提案では MAIT 細胞がいかなる作用機序で抗がん活性を発揮するのかを解明することを目指し、以下の研究を行う。

(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

移入細胞をレシピエント (C57BL/6 CD45.2) マウス由来細胞と免疫学的に区別するためコンジェニックマウス (C57BL/6 CD45.1) 由来 MAIT 細胞から iPS 細胞を樹立する。iPS 細胞から m-reMAIT 細胞を分化誘導し、C57BL/6 CD45.2 マウスに移植し、その性状・機能を明らかにして、がん移入時の m-reMAIT 細胞の機能解析に供する。

(2) m-reMAIT 細胞による抗がん活性とその作用機序解明

移入 m-reMAIT 細胞が試験管内・生体内でがん増殖抑制能や細胞傷害活性などの抗がん活性を発揮するのか明らかにし、抗がん活性を担う分子を特定し、その作用機序を解明する。

(3) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスの作製

C57BL/6 CD45.2 由来 MAIT 細胞をゲノム修飾せずに iPS 細胞化し、これら iPS 細胞を用いてキメラマウスを経由し、MAIT 細胞特異的にその T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の再構成が終了したゲノム配置を持つ対立遺伝子を有するマウスを作製する。

(4) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスを用いた抗がん活性とその作用機序解析

上記 (3) で作製したマウスにがんを移植し、野生型マウスと比較して生存期間の有意な延

長がみられるのかを評価し、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の成果

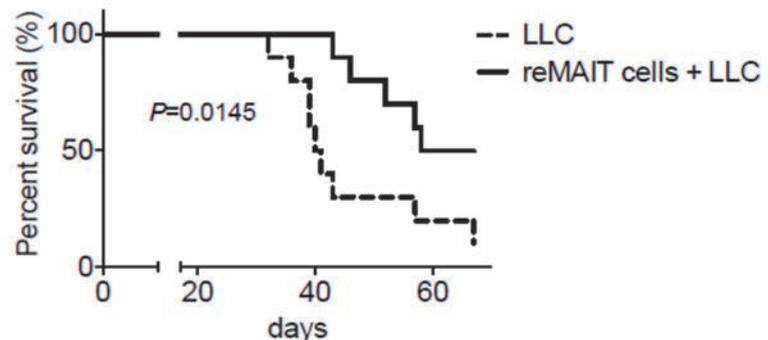
(1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立

① マウスMAIT細胞のiPS細胞化とMAIT細胞の分化誘導・大量産生：iPS細胞をOP9とOP9に Notchリガンドであるdelta-like 1を強制発現させたOP9/DLというフィーダー細胞上で培養することでMAIT細胞(m-reMAIT細胞)を分化誘導・大量産生する技術を確認した。

② m-reMAIT細胞養子移入後の動態解析：Ly5.1由来m-reMAIT細胞をLy5.2マウスに移入して肺、脾臓、肝臓、腸管上皮、腸管粘膜固有層、腸管膜リンパ節に存在するLy5.1+細胞をフローサイトメーターで測定・解析した。その結果、肺、脾臓、肝臓、腸管粘膜固有層でLy5.1+細胞の存在を確認した。現在、各組織から精製したMAIT細胞をRNA-seqにて解析中である。この解析によりin vitroで作製したm-reMAIT細胞のトランスクリプトームがマウスへの養子移入によってどれだけ生体内に存在するMAIT細胞のトランスクリプトームに近づくのかが明らかになる。

(2) m-reMAIT細胞による抗がん活性とその作用機序解明

① 肺原発性がんに対する生存期間の評価：野生型マウスと m-reMAIT 細胞を養子移入したマウスに肺原発性がん Lewis Lung Carcinoma (LLC) を移植し、マウス生存期間を測定した。その結果、m-reMAIT 細胞を移入したマウスでは野生型マウスに比して有意な生存期間延長が認められた (右図、m-reMAIT 細胞は reMAIT cells と表記。有意差検定は Log-rank 試験による)。



② MAIT細胞による抗がん効果の作用機序解明：m-reMAIT細胞移入による生存延長がNK細胞もしくは細胞傷害性T細胞である

CD8細胞を介しているのかを明らかにするため、NK細胞を選択的にマウスから除去する anti-asialo-GM1抗体、ならびにCD8細胞を選択的に除去するanti-CD8抗体をマウスに投与し、その抗がん効果への影響を(1)肺へのがん転移、(2)生存期間の延長という視点から検討し始めた。なお、m-reMAIT細胞はLLCやメラノーマであるB16F10に対して直接的な細胞傷害活性を発揮しないことを予備実験にて確認済である。

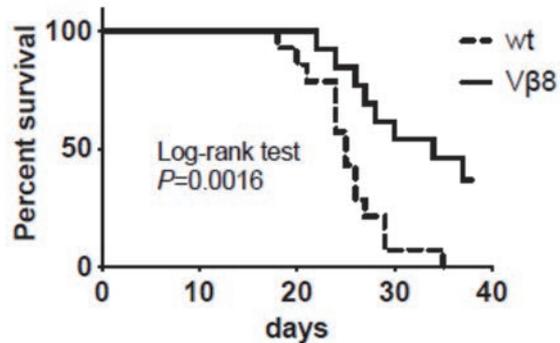
(3) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスの作製

① MAIT 細胞由来 iPS 細胞からのキメラマウス作製：MAIT 細胞由来 iPS 細胞(C57BL/6 CD45.2)を ICR マウスの胚盤胞にマイクロインジェクションしてキメラ率の異なるキメラマウスを複数匹得た。キメラ率が最も高いマウス(キメラ率 90%)を C57BL/6 メスマウスと交配させ、MAIT 細胞特異的に TCR 遺伝子再構成が終了したゲノム配置を有する産仔を PCR 法にて同定した。これら産仔を再び C57BL/6 と交配させ、片方の対立遺伝子中に遺伝子再構成済み MAIT 細胞特異的 TCR α 鎖 (以下 $V\alpha 19$ マウス) もしくは β 鎖 (以下 $V\beta 8$ マウス) を有する産仔を選択し、以下の実験を行なった。

② 新規モデルにおける MAIT 細胞の存在割合:MAIT 細胞を特徴つける TCR は α 鎖 (TRAV1-TAJ33) と β 鎖 (TRBV8) の組み合わせから成り立っているが、これらをヘテロで対立遺伝子に有する $V\beta 8$ マウス血中での MAIT 細胞の存在割合は全 $\alpha\beta$ 型 T 細胞の 0.5%、 $V\alpha 19$ マウスでは 30%以上であった。なお、野生型マウス血液中では MAIT 細胞量は検出限界以下であった。

(4) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスを用いた抗がん活性とその作用機序解析

① V β 8 マウスにおける抗がん能の亢進：V β 8 マウスを用いて LLC を移植してその生存期間に及ぼす影響を評価した。野生型マウスと比較して V β 8 マウスでは有意な生存期間延伸が観察された（右図、野生型マウスは wt、V β 8 マウスは V β 8 と表記）。



② V β 8 マウスにおける抗がん効果の作用機序解明：V β 8 マウスにおける生存延長が NK 細胞もしくは細胞傷害性 T 細胞である CD8 細胞を介しているのかを明らかにするため、NK 細胞を選択的にマウスから除去する anti-asialo-GM1 抗体、ならびに CD8 細胞を選択的に除去する anti-CD8 抗体をマウスに投与し、その抗がん効果への影響を(1)肺へのがん転移、(2)生存期間の延伸という視点から検討し始めた。

(5) その他：m-reMAIT 細胞の養子移入がいかなる作用機序によって抗がん効果の発揮につながるのかを明らかにするため、m-reMAIT 細胞をマウスに養子移入後、LLC を移植して経時的に m-reMAIT 細胞を取り出してセルソータにより精製し、RNA-seq 解析を行なった。この解析からがんという異物の侵入に対して m-reMAIT 細胞がトランスクリプトームをどの様に変化させるのか、NK 細胞や CD8 細胞との相互作用を担う m-reMAIT 細胞由来のメディエーターは何かを同定する。

4. 研究の反省・考察

- (1) m-reMAIT 細胞や新規モデルマウスを用いた抗がん効果の作用機序解明：学術研究振興資金により、CD45.1 マウス由来の m-reMAIT 細胞ならびにトランスジェニックでもノックアウトマウスでもない、新たなカテゴリーの新規マウスが樹立できたことは今後の MAIT 細胞の機能解析のためのツールの確立として特筆できる。しかし、抗がんの作用機序解明という点では MAIT 細胞が CD8 T 細胞の様に直接的にがんを認識・攻撃する様式でないため、その解明に時間を要しており、3 年目の資金補助が得られなかったのは誠に遺憾である。本研究結果は iPS 細胞由来 MAIT 細胞を用いた、「がんの再発防止」に臨床応用可能である。
- (2) 新規モデルマウスの有用性：今回、樹立した MAIT 細胞豊富なマウスは従来の遺伝子改変動物とは全く異なる概念で作製されたものである。MAIT 細胞がヒトで最大の T 細胞亜集団であり、微生物・ウイルス感染、自己免疫疾患、生活習慣病、喘息、アレルギー、がん等の疾患に関与することを鑑みれば、これらマウスにて様々なヒト疾患モデルを樹立し、新たな知見や治療法開発に有益であると考えられる。特に MAIT 細胞は従来研究で使用されているマウスには極微量にしか存在しないことから、この新規モデルマウスは今後の生命科学の進展に寄与するものと期待できる。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
①先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2020年2月4-5日琵琶湖ホテル
- (3) 出版物
なし
- (4) その他
①特許願2019-199603(2019) マウスMAIT様細胞及びMAIT細胞豊富なマウス
発明者 若尾 宏、 杉本 智恵

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
中 田 明 伸	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

従来のエネルギーキャリア(EC)からの水素の吸蔵と放出は高温を必要とすることから、新しい技術が必要とされている。本研究では、申請者らが見出したアミノフェレート(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ECシステムの構築を目指す。本研究では、錯体化学、有機化学、光材料化学、光化学を専門とする新たなグループを立ち上げ、室温下での「光」エネルギーの入力により、効果的に水素を利用できる材料を得るための基礎学理を構築する。

2. 研究の計画

光による EC の活性化のためには副反応、プロセス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。平成 30 年には、平成 29 年に得られた種々の重要知見を基に、EC (特に MeOH) からの脱水素を引き起こす活性水素種の発生効率を向上すべく、金属種及び配位子骨格の置換基の最適化を進め水素発生量(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。また現在の反応系は液相の均一系で行われている一方、光応答型触媒を担体へと担持することで不均一系光駆動型 EC システムの構築も併せて遂行する。均一系により分子レベルの詳細な触媒設計と反応機構解明を行い、これを不均一系触媒の設計へと有機的にリンクすることで、耐久性や触媒活性の飛躍的向上を図る。均一及び不均一系において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高活性触媒の設計にフィードバックする。

検討項目

(1) 分子性(PRC)触媒の設計

我々が *Nature Commun.*(2016)に発表した PRC 触媒の肝は、電子及びプロトンをプーリング可能な有機骨格(Proton/Electron Pooling Ligand, PEPL)と、Fe(II)等の非貴金属イオンとの融合にある。これらは UV 光照射により水素ラジカルを発生(実証済)し、続く MeOH からの水素引抜きにより H₂ と HCHO を触媒的に与える。本研究では初報の Fe(II)系に加え、Mn(II)錯体も活性を示し、且つ量子収率が 4.8% (Fe(II))から 6.8% (Mn(II))へと上昇することを確認している。この知見を基に、s ブロック及び 3d 金属を中心に、dd 及び無輻射失活を抑制しつつ高活性を示す金属イオンを選定する。また、これらの基本骨格を利用した PEPL の最適化を図る。置換基の導入やヘテロ環への変換は、HOMO-LUMO ギャップや S₁ 状態及び N-H を活性化する励起状態への円錐公差確率を変調し、均一系・室温における MTF 反応活性を最適化する化学因子を見いだす。

(2) PRC の無機担体への固定化

HCHO は 130°C 以上では MeOH との付加体を生成せず分離側に反応が進行する。そのため、本研究では本 PRC を中低温での MTF 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 (*Chem. Rev.*, 2016, 116, 323 他) 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その新規合成法の開発も含め検討する。

3. 研究の成果

(1) 実験方法

窒素雰囲気下、[M^{II}(H₂O)₆](ClO₄)₂ (M = Mg, Fe, Co, Zn) と二当量の apH₂ および水酸化テトラブチルアンモニウム (TBAOH) を MeOH 中、混合することで各金属の apH 錯体 MapH を得た。また、MapH と補助配位子(ホスフィン (-PR₃), アミン (-NR₃), イソシアニド (-RNC), カルボニル (-CO), シアノ (-CN⁻)) の MeOH 溶液を種々の濃度 (0.66-6.6 mM) で混合し、UV-vis および ¹H NMR スペクトルにより分析した。これら MeOH 溶液に光照射 (λ_{ex} = 289 ± 10 nm) を行い、気相成分を GC により分析した。

続いて分子性触媒を担持する多孔性担体の合成においては、ゼオライト骨格中に見出される Al と六つの Si からなるスピロ環状型骨格から構築される [pyH] [Al {OSiPh₂ (OSiPh₂)₂O}]₂ (pyH = pyridinium, **AlSi₆**) 及び double 4-Ring (D4R) 型骨格を有し、かつ加水分解を起こし得る末端 OH 基を持つ (NMe₄)₄ [Al₄Si₄(OH)₈O₁₂] · 24H₂O (**TMA-Al₄Si₄**), を KOH 共存下にて水熱反応させた。生成物の同定は PXRD, ICP, IR, TG-DTA 等により行った。

(2) 研究成果

① PRC 触媒の設計

MeOH-*d*₄ 中での ¹H NMR スペクトルにおいて、**MapH** (M = Fe, Co) はフリーの apH₂ とは異なる、常磁性錯体種の形成を示すブロードニングしたシグナルを与えた。一方、**MapH** (M = Mg, Zn) は apH₂ より低磁場側にシグナルを示し、錯形成による apH の電子密度の低下を示唆した。また、結晶構造解析により **CoapH** は **FeapH** と同様の分子構造を示した。

MapH (M = Fe, Co) と ^tBuNC を *x* : 1-*x* (0 < *x* < 1) の濃度比で混合した際の UV-vis 吸収スペクトルにおいて、350-600 nm に複雑な変化が現れたことから、^tBuNC と Fe, Co の相互作用による複数の錯体種の形成を示唆した。一方 M = Co の場合、315 nm の吸光度における Job プロットが *x* = 0.5 で一つの頂点を示した事から、Co : ^tBuNC = 1 : 1 での新たな錯体の形成が示唆された。一方 M = Fe の場合の Job プロットから、単純な置換反応に加え apH の脱離などの複数の反応が競合していることが明らかとなった。その他の M と L の組み合わせでは、**FeapH** + ^tBuNC と同様に複数の競合反応の進行が示された。

CoapH と ^tBuNC の MeOH-*d*₄ 混合溶液は芳香族領域にブロードな ¹H NMR スペクトルを与え、**CoapH** 単独とは異なることから新たな錯体種は常磁性であることを示唆する。一方 **FeapH** は ^tBuNC と混合するとフリーの apH₂ 配位子のシグナルに加え、**FeapH** とは異なるシャープなシグナルを芳香族領域に示した。apH 配位子と ^tBuNC 配位子由来のシグナルの積分比から、apH と ^tBuNC 配位子が 1 : 1 で配位した反磁性錯体種を形成する事が明らかになった。一方 PEt₃ および NBu₃ を用いた場合はブロードなスペクトルが得られた事から、^tBuNC が Fe(II) の配位子場分裂を拡大し、低スピン電子状態を安定化するのに適当であることを示す。また、**MapH** (M = Mg, Zn) においては ^tBuNC との反応後、apH の脱離に由来するスペクトルを示した。apH の脱離は ^tBuNC > NBu₃ > PEt₃ の順で促進される傾向にあったが、M の d 電子数には単純に依存せず、Zn (*d*⁰) > Mg (*d*⁰) ~ Fe (*d*⁷) > Co (*d*⁷) の順で起こりやすいことが明らかになった。

各 MeOH 溶液に六時間の紫外光照射を行うと、apH₂ は 0.4 mol、**MapH** (M = Mg, Fe, Co, Zn) はそれぞれ 2.7, 1.2, 0.7, 1.1 mol の水素を生成した。apH₂ は光反応後に全て 2, 3-ジヒドロベンゾオキサゾールへと分解していたのに対し、**MapH** を形成することで分解が一部抑制されたことが水素生成の高活性化の要因と考えられる。特に遷移金属錯体ではない **MgapH** の場合に水素生成量が大きく向上した。同様の光反応を **MapH** (M = Mg, Zn) と ^tBuNC の混合溶液で行うと、混合時点における apH の脱離により **MapH** のみの場合に比べ水素生成量が低下した。一方、**CoapH** に ^tBuNC を添加してもほとんど水素生成活性は向上しなかったのに対し、**FeapH** では水素発生量が 3.9 倍増大した。光反応後も反磁性錯体の残存が ¹H NMR により確認されたこと、および反磁性化しない PEt₃ や NBu₃ の添加では ^tBuNC の場合より水素発生量の向上が小さかったことから、反磁性種形成による光安定性の向上が水素生成の高活性化に重要であることが示唆された。

② PRC の無機担体への固定化

分子性前駆体として **AlSi₆** を用い塩基および酸条件下での水熱反応を行なった。塩基として KOH を添加し 160-200°C で反応させるとアルミノケイ酸塩ゼオライトである K 型 Zeolite L と Zeolite W、およびアルミノケイ酸カリウム的一种である Megakalsilite がそれぞれ選択的に生成することを明らかにした。KOH を共存させると **AlSi₆** が AlO₄⁵⁻ あるいは SiO₄⁴⁻ 単位まで完全に分解される機構か、Si-Ph 結合のみが選択的に開裂しシラノールを経て縮合する二つの機構が推定された。また酸として HCl を共存させ水熱反応を行なったところ、ゼオライトなどの結晶性無機酸化物は得られず Ph 基が残存したポリシロキサン系の重合体が生成したことが示唆された。酸共存下では **AlSi₆** 中の Al-O 結合が優先的に開裂し、生成したシラノールを経て重合体が形成される機構と、一部の Si-Ph 結語のみが選択的に開裂して **AlSi₆** 骨格を保持した Ph 基残存重合体が形成される機構の二つが推定された。本研究で得られたゼオ

ライトは従来法に比べ、前処理を必要としないばかりでなく、ゼオライト L, W の選択的形成という観点でも優位点を有す。また得られたゼオライトは従来法と同等の比表面積を持つことも確かめられたこと、またその表面に分子性錯体と反応しうる活性サイトを持つことが知られているため、メタノールの脱水素触媒を担持しうることも期待された。

一方、**MA-Al₄Si₄**とそのカチオン交換体 **K-Al₄Si₄**及び**Na-Al₄Si₄**を合成し、**Na-Al₄Si₄**は 800°C の加熱により *carnegieite* を、一方 **TMA-Al₄Si₄**は NaOH 及び KOH 共存下での水熱反応により LTA, SOD 及び EDI 型ゼオライトを与えることを明らかにした。以上の結果及び LTL 及び MER 型ゼオライトを与える先行研究から、MP 種により生成するアルミノシリケートを制御可能であることが示される。

最後に、本研究課題を三カ年に渡り遂行して得られた研究成果を広く公開するために「*Symposium on Materials Chemistry for Sustainable Energy in Chuo University*」と題したシンポジウムを 2020 年 3 月 6 日に中央大学にて開催した。当初は外国からの招聘を計画したもののコロナウィルスにより国内招聘者に限定し開催をした。研究実施者である芳賀、片山、張の発表に加え、速水先生（熊本大）、宮坂先生（東北大）、藤井先生（北大）、酒井先生（九大）による招待講演を実施し、50 名を超える参加者と共に本申請課題である光駆動型ハイドライドに関する研究成果に加え関連する光化学やエネルギー変換化学、錯体材料に関する研究について議論を行った。これにより本申請課題の成果の一部を公開できた。

4. 研究の反省・考察

本研究ではまず、MeOH 中におけるアミノフェノラート錯体骨格への補助配位子 L の効果に加え、MeOH の光脱水素化に与える影響を明らかにした。**MapH** と L を混合すると、M と L の組み合わせに依存して L の配位による新たな錯体種の形成と apH 配位子の脱離平衡が存在することが明らかとなった。また、常磁性 **FeapH** と補助配位子 ^tBuNC の組み合わせが新たな反磁性錯体種を与えるとともに、この反磁性錯体種の形成は光安定化に寄与し、**FeapH** 単体よりも水素生成活性を 3.9 倍向上することを見出した。以上の結果は、apH 配位子を脱離させず、反磁性化する錯体設計が MeOH の光脱水素化に有効であることを示す。3 年間の研究を通じて、金属、ap 配位子上の置換基及び補助配位子が光脱水素活性に与える影響を定量的に明らかにできたことは今後の触媒設計の糧になる。一方、触媒の不安定性については今後十分な検討が必要である。特に溶液中における暗条件及び明条件下における十分な安定性の獲得は実用性を高めるためにも避けて通れない課題である。これを克服すべく、本研究遂行期間に分子性触媒を担持しうる多孔性担体の新規合成法の開発に取り組んだ。その過程に分子前駆体を用いた直接的かつ簡便で選択的なゼオライト合成に世界で初めて成功した。以上の成果は、今後多孔性担体及び分子性触媒との複合化によるシングルサイト触媒とそれを用いた反応開発を展開できる礎になると期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Molecular Insights into the Ligand-Based Six-Proton and -Electron Transfer Processes Between Tris-ortho-Phenylenediamines and Tris-ortho-Benzoquinodiimines
Takeshi Matsumoto, Risa Yamamoto, Masanori Wakizaka, Akinobu Nakada, Ho-Chol Chang
Chem. -Eur. J., 2020, in press (10.1002/chem.202001873).
- ② Impact of Group 10 Metals on the Solvent-induced Disproportionation of o-Semiquinonato Complexes
Shota Yamada, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang
Chem. -Eur. J., 2019, **25**, 8268-8278.
- ③ Photo-controllable rotational motion of cholesteric liquid crystalline droplets in a dispersion system
Y. Sakai, W. Y. Sohn and K. Katayama
RSC Adv., 2020, **10**, 21191-21197.
- ④ Cooperative effects of surface and interface treatments in a hematite (α -Fe₂O₃) photo-anode on its photo-electrochemical performance

M. Inaba, K. Katayama and W. Y. Sohn

Sustain. Energy Fuels, 2020, **4**, 2174-2183.

- ⑤Molecular Orientation Change Nearby Topological Defects Observed by Photo-Induced Polarization/Phase Microscopy
H. Sakanoue, W. Y. Sohn and K. Katayama
ACS Omega, 2019, **4**, 13936-13942.
- ⑥Optical motion control of liquid crystalline droplets by host-guest molecular interaction
Y. Sakai, W. Y. Sohn and K. Katayama
Soft Matter, 2019, **15**, 7159-7165.
- ⑦An initial estimation method using cosine similarity for multivariate curve resolution: application to NMR spectra of chemical mixtures
Y. Nagai, W. Y. Sohn and K. Katayama
Analyst, 2019, **144**, 5986-5995.
- ⑧Lifetime mapping of photo-excited charge carriers by the transient grating imaging technique for nano-particulate semiconductor films
M. Ebihara, W. Y. Sohn and K. Katayama
Rev. Sci. Instrum., 2019, **90**, 073905.
- 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 and K. Katayama
J. Phys. Chem. C, 2019, **123**, 6693-6700.
- ⑩Origin of optical nonlinearity of photo-responsive liquid crystals revealed by transient grating imaging
K. Katayama, D. Kato, K.-I. Nagasaka, M. Miyagawa, W. Y. Sohn and K.-W. Lee
Sci. Rep., 2019, **9**, 5754.
- ⑪Electrochemical interfacing of Prussian blue nanocrystals with an ITO electrode modified with a thin film containing a Ru complex
H. Sato, M. Ide, R. Saito, T. Togashi, K. Kanaizuka, M. Kurihara, H. Nishihara, H. Ozawa and M. Haga
J. Mater. Chem. C, 2019, **7**, 12491-12501 (Inside Cover)
- ⑫Mie Resonance-Enhanced Light Absorption of FeS₂ Nanocubes in a Near-Infrared Region: Intraparticulate Synergy between Electronic Absorption and Mie Resonances
K. Sugawa, M. Matsubara, H. Tahara, D. Kanai, J. Honda, J. Yokoyama, K. Kanakubo, H. Ozawa, Y. Watanuki, Y. Kojima, N. Nishimiya, T. Sagara, K. Takase, M. Haga, and J. Otsuki
ACS Appl. Energy Mater., 2019, **2**(9), 6472-6483
- ⑬A Peanut - Shaped Polyaromatic Capsule: Solvent - Dependent Transformation and Electronic Properties of a Non - Contacted Fullerene Dimer
K. Matsumoto, S. Kusaba, Y. Tanaka, Y. Sei, M. Akita, K. Aritani, M. Haga, M. Yoshizawa
Angew. Chem. Int. Ed., 2019, **58**, 8463-8467
- ⑭Synthesis, X-ray structure, photophysical properties, and theoretical studies of six-membered cyclometalated iridium (III) complexes: revisiting Ir(pnbi)₂(acac)
K. Yamada, H. Mori, T. Sugaya, M. Tadokoro, J. Maeba, K. Nozaki, M. Haga
Dalton Trans., 2019, **48**(40), 15212-15219
- (2) 口頭発表
- ①H.-C. Chang, New Challenges in the Molecular Functional Chemistry of Redox-active Ligands, 12th China-Japan Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, 2019.10.25-28. China (Invited talk).

- ②H.-C. Chang, New Challenges in the Molecular Functional Chemistry of Redox-active Ligands, China-Japan Symposium of Functional Coordination Chemistry, 2019.4.11-14. China (Invited talk).
- ③H.-C. Chang, Molecular lattice engineering for valence tautomerism, 錯体化学会第69回討論会, 2019.9.18-20. 名古屋 (Invited talk).
- ④A. Nakada, Photochemical H₂ Evolution and CO₂ Fixation Using an ortho-Phenylenediamine Fe(II) Complex, 7th Asian Conference on Coordination Chemistry, 2019.10.15-18. Malaysia (Invited talk).
- ⑤小池 翔太、松本 剛、中田 明伸、張 浩徹、2-アミノフェノラート錯体によるメタノールの光脱水素化に対する軸配位子効果、第69回錯体化学討論会 名古屋・2019/9/21-23
- ⑥Kenji Katayama, A New Microscopy for Charge Carrier Mapping of Photocatalytic Materials, International Symposium on Materials Chemistry for Sustainable Energy Mar, 2020, Tokyo, Japan
- ⑦Kenji Katayama, Phase Transition Dynamics of Liquid Crystals Observed by Pattern-Illumination Phase Imaging, Optics of Liquid Crystals 2019, Sep, 2019, Quebec city, Canada
- ⑧Kenji Katayama, Photo-induced charge dynamics in photo-devices -sphotocatalysis, water splitting, solar cells, Chemistry Lecture at McMaster University, Sep, 2019, Hamilton, Canada
- ⑨Kenji Katayama, Direct imaging of phase transition of liquid crystals by nanosecond time-resolved transient grating phase imaging, SPIE Liquid Crystals XXIII, Aug, 2019, San Diego, USA
- ⑩Kenji Katayama, Photo-induced charge dynamics in photo-devices -solar cell, photocatalysis, water splitting, Chemistry Seminar at San Diego State University, Aug, 2019, San Diego, USA
- ⑪Kenji Katayama, Photo-controllable active liquid crystalline droplet, The 23th International Symposium on Advanced Display Material and Devices (ADMD), Jul, 2019, Guangzhou, China
- ⑫Kenji Katayama, Photo-induced charge dynamics in photo-devices -solar cell, photocatalysis, water splitting, Physics Seminar at Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Science, Jul, 2019, Shenzhen, China
- ⑬Kenji Katayama, Photo-controllable active liquid crystalline droplet, The 40th PIERS Jun, 2019, Roma, Italy
- ⑭Masa-aki Haga, Electrochemical Functions of Surface Coordination Network Films on ITO Electrode, 24th International Society of Electrochemistry Topical Meeting 2019 "Electrochemical Assembling at the Meso, Nano and Molecular Scale", 10 April, 2019 Merida, Mexico
- ⑮Masa-aki Haga, Coordination Chemical Approach to Molecular Functional Devices on Surface, Lecture Series at Beijing Normal University, June, 2019, Beijing, China, June 11, 2019
- ⑯Masa-aki Haga, Luminescent Cyclometalated Ir Complexes, Lecture Series at Beijing Normal University, June, 2019, Beijing, China, June 18, 2019
- ⑰Masa-aki Haga, Luminescent Cyclometalated Ir Complexes, Lecture Series at Beijing Normal University, Development of Scalable Coordination Network Films Based on Ruthenium Complexes Toward Energy Storage Devices, June 22, 2019
- ⑱Masa-aki Haga, Development of Coordination Network Films on an ITO Electrode: Heterojunction and Electrochemical Interfacing, Chemistry Lecture at Institute of Chemistry Chinese Academy of Sciences, Beijing China, June 18, 2019
- ⑲Masa-aki Haga, Molecular Functions of Surface Network Films based on Ru Complexes on ITO Electrode, Chemistry Lecture at Xiamen University, Xiamen, China, June 20, 2019
- ⑳Masa-aki Haga, Electrochemical interfacing with Prussian blue nanocrystals through

redox-active Ru complex on an ITO electrode, The 17th International Symposium on Electroanalytical Chemistry & the 3rd International Meeting on Electrogenerated Chemiluminescence, 25 August 2019. Changchun, China

② 芳賀正明、表面錯体ナノ化学の機能創成、Surface coordination nanochemistry based on functional metal complexes、錯体化学会第69回討論会学会賞受賞講演, 9月22日, 2019 名古屋大

(3) 出版物

① Kenji Katayama and Woon Yong Sohn, Unconventional Liquid Crystals and their Applications, edited by Wei Lee and Sandeep Kumar, Chapter 6, Time-resolved dynamics of dye-doped liquid crystals and the origin of their optical nonlinearity

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	実験・データ整理・論文作製
林 康 広	薬 学 部	助 教	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と脂肪酸からなるセラミドに、ホスホリルコリンや糖鎖等の極性頭部が結合した構造をとり、脂肪酸と極性頭部が多様であることから、様々な分子種が存在する。しかし個体が多様なスフィンゴ脂質を有する意義は不明な点が多い。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、ゲノム編集技術を用いてスフィンゴ脂質代謝を担う酵素類の細胞内における基質特異性を解析し、また、高速液体クロマトグラフィー質量分析系（LC-MS）によるメタボローム解析を用いた各スフィンゴ脂質分子種の網羅的分析方法を確立することにより、スフィンゴ脂質の新しい生物学的機能を解明する。

- 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、極長鎖脂肪酸の一定量がスフィンゴ脂質の一部として組み込まれる過程に注目し、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の過剰な蓄積によって生じる生体の恒常性維持機構への影響を解析する。具体的には、ゲノム編集技術を用いて極長鎖脂肪酸をスフィンゴ脂質等に組み込む酵素群をノックアウトした培養細胞を樹立し、そこに極長鎖脂肪酸を添加して細胞内極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質を変動させることにより、そ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。しかし、診断基準である血中の極長鎖脂肪酸値の測定方法は煩雑であり、新生児マススクリーニングに適用することが困難である。多くの臓器においてスフィンゴミエリン(SM)は最も含有量の多いスフィンゴ脂質であり、かつイオン化が容易なホスホリルコリンを有していることから、LC-MSによる高感度分析が期待できる。そこで申請者は、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：スフィンゴ糖脂質の主要な産生・代謝酵素は同定されているが、各スフィンゴ糖脂質量の制御機構についての解析はほとんどされていない。申請者はLC-MSを用いて、スフィンゴ糖脂質のクラスごと、分子種ごとの定量系の確立をし、生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の網羅的解析を行う。
- 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ホスホリルコリンかグルコースのいずれかが結合することで産生される。一方、SMとスフィンゴ糖脂質は機能的に大きく異なることから、両脂質をどの程度のバランスで産生するかは、各々の細胞および臓器の恒常性維持において重要と思われる。申請者はSMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分けを担う二つの酵素（SM合成酵素とセラミドグルコシルトランスフェラーゼ）に注目し、詳細な産生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含有スフィンゴ脂質量を減少させる細胞を作出する。特に、極長鎖脂肪酸を様々な複合脂質に導入する酵素群に着目する。申請者はゲノム編集技術を用いてこれらの酵素群に関する単独もしくは複数同時欠損体を作成する。加えて本年度は、X-ALD病態発症における極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の病理的意義を解析する為の実験系を構築する。
- 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：濾紙血を用いて、夾雑物から目的の極長鎖脂肪酸含有SM分子種を分離検出する

条件を検討する。超微量噴霧法の専用機器を用いた検討過程において、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することができるか検証する。

- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ糖脂質は多様な構成脂肪酸、およびスフィンゴイド長鎖塩基のため、脂質部分も考慮した糖脂質の構造や機能解析は、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、測定する系を確立する。さらに、確立した測定系を用いて、生体サンプルから抽出した総脂質画分中の中性および酸性スフィンゴ糖脂質の網羅的な分子種解析を行う。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：本研究に係る昨年度までの研究によって、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。そこで、近位依存性ビオチン標識法を用いて、SM合成酵素の近接タンパク質を網羅的に同定する。

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：ゲノム編集技術を用いて副腎白質ジストロフィー（X-ALD）の原因遺伝子である ABCD1 遺伝子のノックアウト（KO）細胞株を確立し、極長鎖脂肪酸を含有する脂質分子種が増加することを確認した。このKO細胞株に対して、幾つかの脂肪酸転移酵素の機能を、ゲノム編集技術を用いて更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た結果、極長鎖脂肪酸含有リン脂質量の変動に関与する候補遺伝子を見出した。また、極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質量を変動する化合物を探索した結果、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor（PPAR）作動薬が極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質を有意に増加させることを見出した。
- 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：メタノールを用いて濾紙血から極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリンを効率良く回収可能であることを確認した。しかし、試料中の大量のホスファチジルコリン等の夾雑物が原因と考えられるイオン化抑制効果の為、当初予定したインフュージョン法では十分な検出感度が得られず、試料のアルカリ処理などによって改善を試みたが、安定的な抽出効率が得られなかった。そこで新たに、ポリエーテルエーテルケトン樹脂でカラム内壁を処理した HPLC カラムを用いることで、夾雑物を排除し、かつHPLC カラムとSMの非特異的な吸着を抑制する高感度な分析系を構築した。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：マウス脳から抽出した総脂質画分を用いて網羅的解析を行った結果、多量のリン脂質存在下で中性、および酸性のスフィンゴ糖脂質の検出が可能であることがわかった。また各種スフィンゴ糖脂質の脂肪酸プロファイルを解析したところ、糖脂質系列によりセラミド部分の比率が異なっていることが示唆された。さらに、構成スフィンゴイド長鎖塩基を解析したところ、動物組織で広く存在するC18長鎖脂肪酸を持つスフィンゴイド長鎖塩基(d18:1)以外に、C20長鎖脂肪酸を持つスフィンゴイド長鎖塩基(d20:1)も検出された。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：大腸菌由来ビオチンリガーゼTurboと融合するSM合成酵素のキメラタンパク質を安定発現するヒト由来のHEK293T細胞を樹立した。共焦点顕微鏡で細胞内局在を調べたところ、全てのキメラタンパク質が野生型と同様の局在を示した。細胞をビオチン含有培地で培養し、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで回収し、溶出タンパク質をOrbitrap LC-MS/MSを用いて解析し、SM合成酵素と近接する約800個のタンパク質を同定した。

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: 極長鎖脂肪酸代謝に関与する候補分子について、*in vitro* の酵素学的解析を行うことで、基質特異性を詳細に検証する。その為に、様々な基質を用いる必要があるが、商業的に得られる基質は限られていることから、必要に応じて有機化学的に基質を合成する。一方、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質の産生・代謝の異常が、X-ALDの病態の進展においてどのように寄与するかを検証するためには、X-ALDの病態を反映する評価系が必要である。X-ALDの原因遺伝子である ABCD1 のノックアウトマウスは脱髄等が見られず、X-ALD の病態モデルとして不十分な要素がある。そこで申請者は、ヒトオリゴデンドロサイト、ヒトミクログリア、ヒト副腎皮質細胞等の培養細胞株を用いた *in vitro* の X-ALD 評価系の構築を目指す。
- 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: ポリエーテルエーテルケトン樹脂でカラム内壁を処理した HPLC カラムを用いた方法は、インフュージョン法に比べて一検体あたりの測定時間が長い。このため、安定的な測定結果を得る為に必要な、最小の測定時間を検証する。
- 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用いて、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、水酸基が結合したものも存在することが分かっている。これらの分子種についても溶出時間を決定し、生体サンプル中における網羅的解析を行う必要がある。
- 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 合成酵素に近接する約800個のタンパク質を同定した。今後は、同定した近接タンパク質の中からSM合成酵素の酵素活性、および細胞内局在に影響するタンパク質を探索し、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。さらに、SM合成酵素のみならず、スフィンゴ糖脂質の合成酵素であるセラミドグルコシルトランスフェラーゼの近接タンパク質も同定し、詳細なSMとスフィンゴ糖脂質の産生制御機構の解明を目指す。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hama K*, Fujiwara Y, Takashima S, Hayashi Y, Yamashita A, Shimozawa N, Yokoyama K. Hexacosenoyl-CoA is the most abundant very long-chain acyl-CoA in ATP-binding cassette transporter D1-deficient cells. *J Lipid Res*, 61(4):523-536, 2020 (*corresponding author)
- ② Fujiwara Y*, Hama K, Yokoyama K. Mass spectrometry in combination with a chiral column and multichannel-MRM allows comprehensive analysis of glycosphingolipid molecular species from mouse brain. *Carbohydr Res*, 490:107959, 2020 (*corresponding author)
- ③ Murakami C, Hoshino F, Sakai H, Hayashi Y, Yamashita A, Sakane F. Diacylglycerol kinase δ and sphingomyelin synthase-related protein functionally interact via their sterile α motif domains. *J Biol Chem*, 295(10):2932-2947, 2020
- ④ Karasawa K, Tanigawa K, Harada A, Yamashita A. Transcriptional Regulation of Acyl-CoA:Glycerol-*sn*-3-Phosphate Acyltransferases. *Int J Mol Sci*:20(4):964, 2019
- ⑤ 林 康広, スフィンゴミエリン合成酵素のホモおよびヘテロ複合体の解析. 生化学会誌ミニレビュー 91(4) 523-528, 2019

(2) 口頭発表

- ① 林 康広 「スフィンゴミエリン合成酵素のホモ・ヘテロ複合体の機能解析」
第63回日本薬学会 関東支部大会 若手シンポジウム「最先端の若手脂質研究」
(招待講演)、東京、2019年9月14日
- ② 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明 「BezafibrateはABCD1欠損条件下において極長鎖脂肪酸CoAを上昇させる」第61回日本脂質生化学会、札幌、2019年7月
- ③ 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明 「キラルカラムを用いたLC-MS法によるスフィンゴ糖脂質一斉分析系の構築」第38回日本糖質学会、名古屋、2019年8月
- ④ 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明 「キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質一斉分析系によるヒドロキシ脂肪酸分子種の解析」第38回日本糖質学会、名古屋、2019年8月
- ⑤ 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明 「Lorenzo's oilとBezafibrateの極長鎖脂肪酸脂肪酸CoAに対する影響」第61回日本先天代謝異常学会、秋田、2019年10月
- ⑥ 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明 「キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質のLC-MS一斉分析系によるマウス脳解析」第61回日本先天代謝異常学会、秋田、2019年10月

(3) 出版物

- ① Hama K*, Fujiwara Y, Yokoyama K., 'Lipidomics of peroxisomal disorders' *In* Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease, Eds Imanaka T. Shimozawa N. Springer, 2019
(*corresponding author)
- ② 林 康広, セラミド研究の新展開-基礎から応用へ
(担当:分担執筆, 範囲:ヒト免疫不全ウイルスとスフィンゴミエリン合成酵素)
セラミド研究会編, 食品化学新聞社 2019

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一		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

2019 年度は動いている蛍光標識した生体分子 1 分子の定常・時間分解蛍光検出を、より高精度な蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系も用いて行う。

(1) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系を用いた定常・時間分解蛍光検出

① 蛍光 2 色同時検出による動く生体分子 1 分子の構造変化の検出

ミオシン上で滑走する、ドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチンフィラメントに対して蛍光 2 色同時検出を行う。そして、蛍光色素の蛍光強度や蛍光寿命から 1 分子 FRET 効率を見積もり構造変化の検出を試みる。

② 蛍光偏光 2 成分同時検出による動く生体分子 1 分子の配向の検出

蛍光標識した動いている脂質とタンパク質 1 分子に対して、蛍光偏光 2 成分同時検出を行い分子の配向変化の検出を試みる。

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 の蛍光寿命測定を継続した。そして、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して、pH 変化をドナーである Qdot1 分子の蛍光寿命変化として検出した。個々の Qdot の蛍光寿命変化のばらつきの定量を試みた。また蛍光分光光度計によって pH 変化を Qdot の蛍光強度変化としてもとらえた。

② 温度変化系による蛍光プローブの定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出

平成 30 年度に導入した顕微鏡ステージの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、Qdot、蛍光ダイヤモンドナノ粒子に対して蛍光強度、蛍光寿命の温度変化をとらえることを試みた。

(2) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系を用いた定常・時間分解蛍光検出

① 蛍光 2 色同時検出による動く生体分子 1 分子の構造変化の検出

ミオシン上で滑走する、ドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチンフィラメントに対して蛍光 2 色同時検出を行った。

(3) 蛍光偏光 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

① 2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光強度測定.

平成30年度に構築した蛍光偏光2成分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Qdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光強度測定を行った (図1)。

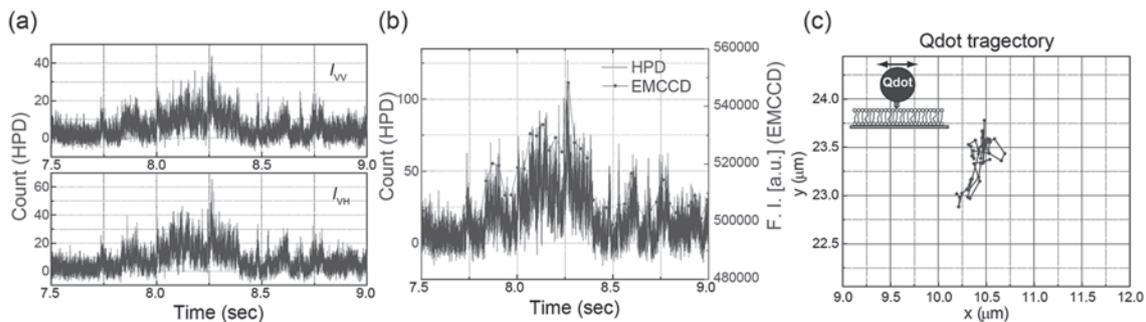


図 1 : 平面上を 2 次元自由拡散する脂質分子に標識した Qdot1 分子の蛍光偏光 2 成分の蛍光強度の同時測定. (a) HPD による Qdot の蛍光偏光 2 成分の蛍光強度の時間変化の同時測定. (b) Qdot の蛍光偏光 2 成分強度から得られた総蛍光強度 (HPD) と EMCCD で蛍光像から得られた蛍光強度の時間変化同時測定. (c) Qdot の軌跡 (EMCCD).

②2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光寿命測定

また蛍光偏光2成分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Qdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光寿命測定（図2）を行った。

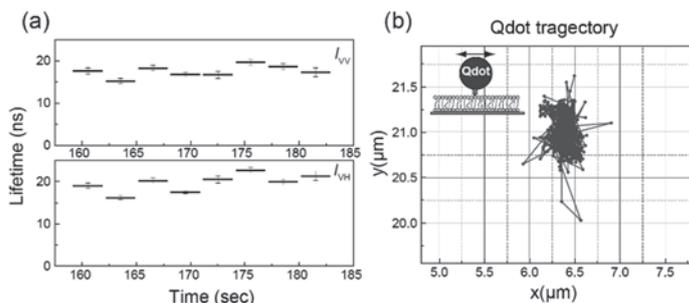


図2：平面上を2次元自由拡散する脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光寿命の同時測定。(a) HPDによるQdotの蛍光偏光2成分の蛍光寿命の時間変化の同時測定。(b)Qdotの軌跡(EMCCD)。

4. 研究の反省・考察

(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

①pH感受性蛍光色素標識Qdotの蛍光寿命変化測定

pH感受性蛍光色素の標識、無標識にかかわらずQdot1分子の蛍光寿命がばらつきを見だし、そのばらつき具合を定量化した。またpH感受性蛍光色素の標識Qdot1分子については、pH変化による蛍光寿命変化量にもばらつきがあることを見いだしている。これらのばらつき具合を定量化し、pH変化を蛍光寿命によってより高精度に検知できるようにしていきたい。また蛍光分光光度計によって明らかとなったpH変化によるQdotの蛍光強度変化をQdot1分子の蛍光強度変化としてとらえられるようにしたい。

②温度変化系による蛍光プローブの定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出

Qdot、蛍光ダイヤモンドナノ粒子に対して蛍光強度、蛍光寿命の温度変化をとらえることを試みた。これらに関するデータはほとんど報告されていないため、研究を継続し温度依存性を定量化したい。

(2) 蛍光2色同時検出・蛍光偏光2成分同時検出系を用いた定常・時間分解蛍光検出

ミオシン上で滑走する、ドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチンフィラメントに対して蛍光2色同時検出を行った。視野中にドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチン1分子のみが存在する状態を作るのが簡単ではなかった。今後はドナー・アクセプター蛍光色素の蛍光強度とドナーの蛍光寿命からアクチンの構造変化を検出したい。

(3) 蛍光偏光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

2次元自由拡散を行う脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光強度測定（定常蛍光検出）および蛍光寿命測定（時間分解蛍光検出）が行えることを実証した。今後は蛍光異方性が大きい蛍光プローブを用いて、生体分子の配向変化の高時間分解能検出を行う。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①横田浩章：生体分子1分子の蛍光イメージング～DNA結合タンパク質の1分子直視～ 第16回バイオオプティクス研究会 山口大学（山口市）2019年12月（招待講演）

②Yokota, H.: 大腸菌非六量体型DNAヘリカーゼUvrD C末端欠損変異体の1分子イメージング 第57回日本生物物理学会年会 熊本大学（宮崎市）2019年9月

(3) 出版物

①Yokota, H.: DNA unwinding dynamics of *Escherichia coli* UvrD lacking the C-terminal 40 amino acids *Biophysical Journal* 118(7) 1634-1648 (2020).

②Yokota, H.: Fluorescence microscopy for visualizing single-molecule protein dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1864(2) 129362 (2020).

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	革新的合成戦略による海洋創薬分子の合成研究 —ポリ環状エーテル海産毒ギムノシン-Bの合成—		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①オキシラニルアニオン ②ポリ環状エーテル ③ギムノシン-B ④合成 ⑤ギ渦鞭毛藻 ⑥赤潮		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 裕 二	総 合 学 術 研 究 科	教 授	総括

○研究分担者

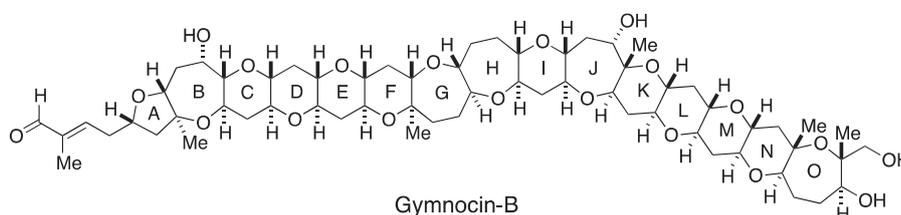
氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 井 健 男	薬 学 部	准 教 授	実験・論文作成

革新的合成戦略による海洋創薬分子の合成研究 —ポリ環状エーテル海産毒ギムノシン-Bの合成—

1. 研究の目的

(1) 海洋生物由来の天然物は特異な化合物の宝庫である。進化の過程で生存競争というふるいに掛けられて「最適化された構造と機能」を獲得し、人知を越えた新奇な化学構造と強力な生物活性を持つものが数多く存在し、これまでに多くの医薬素材や生化学用試薬となる有用物質が見出されてきた。ギムノシン-Bは、瀬戸内海を中心として西日本で赤潮を形成し、魚貝類の大量斃死を引き起こす代表的な有毒渦鞭毛藻*Karenia mikimotoi*から単離されたポリ環状エーテルである。14個のエーテル環が連続的に縮環した巨大構造を持つことから合成化学的に興味を持たれている。ギムノシン-Bはマウスリンパ腫細胞に対して細胞毒性(IC₅₀=1.7 µg/mL)を示すことから、海産創薬シーズ分子として期待される。

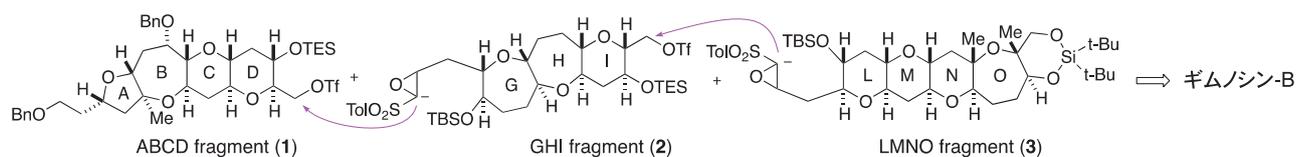
- ①本研究では、ギムノシン-Bを効率的に合成するために収束合成法を反復的に用いる合成戦略を確立する。
- ②上記合成戦略基盤としたギムノシン-Bの全合成研究を行う。



2. 研究の計画

(1) 研究代表者はこれまでにオキシラニルアニオン法を基盤とする[X+2+Y]型新規収束合成法を開発しており、この合成戦略を繰り返し用いることによって縮環システムを統一的手法によって構築し、ギムノシン-Bの効率的全合成を目指す。

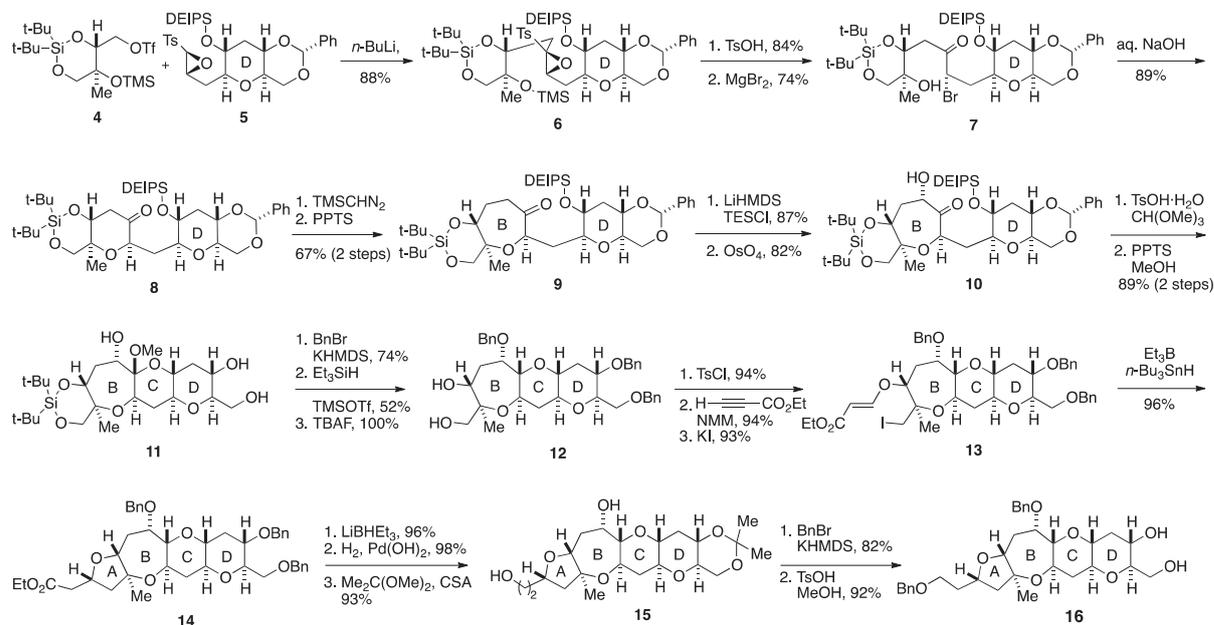
- ①ギムノシン-Bのフラグメント合成：全合成に必要な三種類のABCD環、GHI環、LMNO環フラグメントを合成する。
- ②ギムノシン-B全合成：はじめにGHI環フラグメント(2)とLMNO環フラグメント(3)からGHIJKLMNO環を構築後、ABDC環フラグメント(1)を結合してギムノシン-Bの全合成を行う。



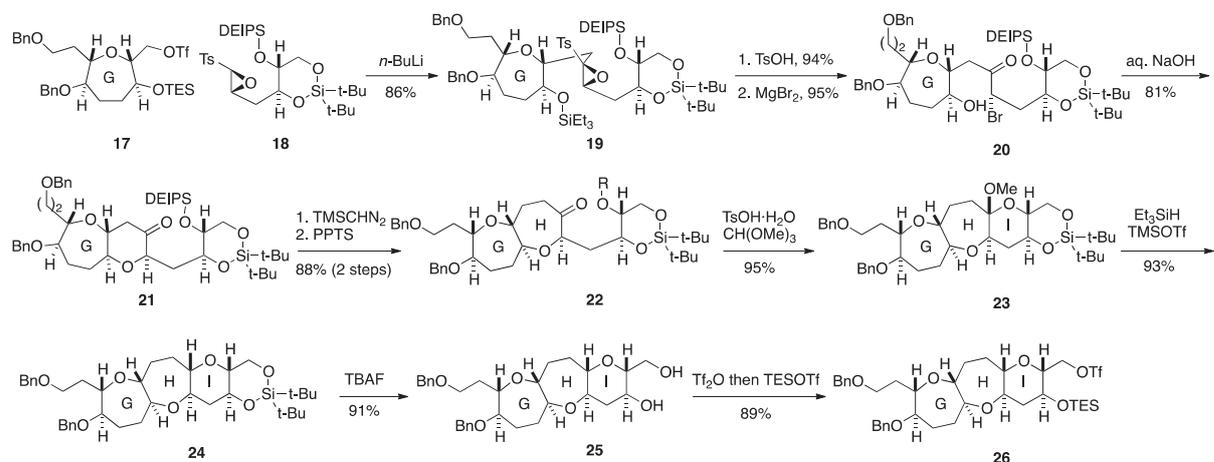
3. 研究の成果

(1) ギムノシン-Bのフラグメント合成

①ABCD環フラグメント(1)の合成：トリフレート4とD環エポキシスルホン5をカップリングして6を合成し、MgBr₂との反応によって得られるプロモケトン7をNaOHで環化して6員環ケトン8を得た。これを環拡大して7員環ケトン9とし、シリルエノールエーテルに誘導後OsO₄で酸化してヒドロキシケトン10を合成した。アセタール環化と保護基の着脱によりBCD環ジオール12を合成した。選択的トシル化したのち不飽和エステルを導入、ヨウ素化により13に変換し、ラジカル環化反応、エステルの還元、ベンジル化、脱アセトニド化反応を経てABCD環フラグメント(1)の前駆体であるジオール体16を合成することができた。



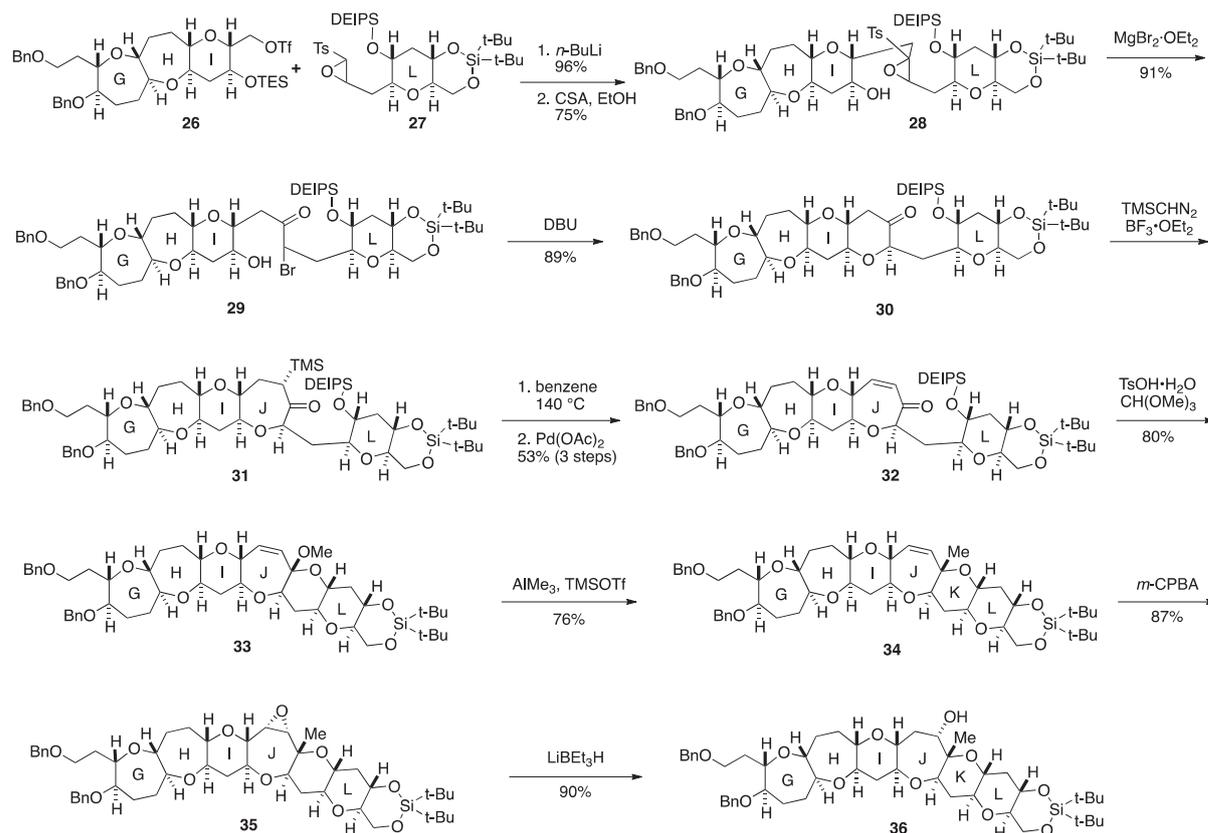
②GHI環フラグメント(2)の合成: G環トリフラート**17**とエポキシスルホン**18**をオキシラニルアニオン法でカップリングして**19**を合成した。酸処理後、 MgBr_2 を作用させてプロモケトン**20**とし、 NaOH によるエーテル環化で6員環ケトン**21**を構築した。トリメチルシリルジアゾメタンで7員環に環拡大してGH環ケトン**22**に変換後、環状アセタール化と還元的エーテル化、脱シリレン化、トリフラート化反応によりGHI環フラグメント(2)の前駆体**26**を合成した。



(2) 6環性GHIJKLフラグメント合成

①GHI環フラグメントとL環フラグメントの連結によるIJ環構築法の確立: GHI環フラグメント前駆体**26**とL環エポキシスルホン**27**をオキシラニルアニオン法で反応させ、カンファースルホン酸(CSA)で脱トリエチルシリル化すると、高収率でカップリング体**28**が得られた。 MgBr_2 を反応させてプロモケトン**29**に誘導後、塩基DBUで処理すると、分子内エーテル環化反応が進行し、6員環エーテル**30**が立体選択的に構築された。ついで、 BF_3 存在下トリメチルシリルジアゾメタンを反応させると、環拡大反応が進行し7員環エーテル**31**が生成し、これを精製することなく、ベンゼン中で加熱するとBrook転位反応が起こり、シリルエノールエーテルが生成し、これを直ちに三枝酸化して不飽和ケトン**32**に誘導した。**32**を酸処理してアセタール**33**に変換後 AlMe_3 を反応させると、メトキシ基の脱離によるオキソニウムイオンの生成とメチル基の付加が立体選択的に起こり**34**が得られた。その二重結合を立体選択的にエポキシ化して**35**に変換後、 LiBET_3H で還元するとエポキシドが位置選択的に開環して目的とするGHIJKL環フラグメント**36**を合成することができた。本法に

よりJK環の立体選択的な構築法を確立することができた。現在、全合成に向けて他のフラグメントを合成中である。



4. 研究の反省・考察

(1) ギムノシン-Bのフラグメント合成における問題点

① ABCD環フラグメントの合成について：今回の合成では、ラジカル環化反応によってA環を最後に構築するために、BCD環合成で保護基をベンジリデン基→ベンジル基→アセトニド基→ジオールへ変換する工程が含まれ、保護基の着脱に多くの工程数を要した。合成のさらなる効率化を考えると、より短ルートの第2世代合成法を考案する必要がある。

② GHI環フラグメントの合成：この合成ルートは問題がない。しかしFG縮環部のメチル基を導入する工程が全合成の中盤以降になるので、合成効率の低下が懸念される。初めからG環にメチル基が導入されたフラグメントを用いるルートも検討に値する。構造活性相関研究のための類縁体合成を考えると、合成の後半でメチル基を導入するルートも捨てがたい。

(2) 6環性GHIJKLフラグメント合成について

① この合成はギムノシン-Bの中央部分のフラグメント合成、とくにJK環部位の構築法を確立するためのモデル合成である。水酸基とメチル基が置換したJK環部位を、不飽和オキソニウムへのメチル基の立体選択的1,2-付加、立体選択的エポキシ化、位置選択的エポキシドの還元開環という無駄のない合成ルートで達成できたことは、全合成を進める上で重要な成果であった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Sakai, T.; Sakakibara, H.; Omoto, Y.; Tsunekawa, M.; Hadano, Y.; Kato, S.; Mori, Y.
Synthesis of the GHIJKL Fragment of Gymnocin-B.
Org. Lett. **2019**, *21*, 6864–6868. 令和元年8月

② Sakai, T.; Hata, K.; Kitamura, Y.; Ishibashi, R.; Mori, Y.
Synthesis of the ABCD fragment of gymnocin-B.
Tetrahedron Lett., **2019**, *60*, 151261. 令和元年10月

(2) 口頭発表

- ① 曾根章貴、堀 泰子、坂井健男、森 裕二：
Gymnocin-B の NO 環システムの合成研究
第 65 回日本薬学会東海支部大会（名古屋）令和元年 7 月 6 日

- ② 坂井健男、常川真里菜、尾本弓実、榊原英晃、森 裕二：
Gymnocin-B の合成研究 –GHIJKL フラグメントの合成–（ポスター発表）
第45回反応と合成の進歩シンポジウム（倉敷）令和元年10月28日

- ③ 青木優奈、喜久山舞、江崎雄都、坂井健男、森 裕二：
Gymnocin-B の ABC フラグメントの第二世代合成法に向けた研究（ポスター発表）
日本薬学会第140年会（京都）令和2年3月27日

- ④ 水野佐映、曾根章貴、堀泰子、坂井健男、森裕二：
7-endo環化による *syn*-2,7-dimethyloxepane 環形成における置換基効果（ポスター発表）
日本薬学会第140年会（京都）令和2年3月27日

(3) 出版物

なし

学 校 名	近 畿 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	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		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①有機太陽電池 ②半透明太陽電池 ③非フラーレンアクセプター ④無機・有機複合ポリマー		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 久 保 貴 志	理 工 学 部	教 授	研究統括、複合材料の合成、薄膜太陽電池の作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 仙 君	理 工 学 部	准 教 授	半透明薄膜太陽電池の作製と評価
須 藤 篤	理 工 学 部	教 授	ドナー性ポリマーの合成
松 本 浩 一	理 工 学 部	准 教 授	非フラーレンアクセプターの合成

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) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化
- (2) 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
- (3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成
- (4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

2. 研究の計画

- (1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化
本研究ではこれまでPTB7やPTB7-Thといったドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターITIC、およびフラーレン誘導体の三成分の有機半導体を組み合わせた高効率薄膜太陽電池の開発を行ってきた。その結果、PTB7-Th:ITIC:PC71BMの組み合わせにより8.6%の高い変換効率を示す有機薄膜太陽電池を実現した。そこで、2019年度は更なる高効率化を実現するためにPBDB-Tなど他のドナーを用いた三元系有機薄膜太陽電池の開発を目指すこととした。
- (2) 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
研究代表者らは有機・無機複合ポリマーをバッファ層で利用することで有機薄膜太陽電池の高効率化が実現できることを見いだしている。2019年度はこの有機・無機複合ポリマーが汎用的なバッファ層として利用可能かどうかを検証することとした。
- (3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成
実用可能な半透明有機薄膜太陽電池の実現に向けて可視領域の透過性の高い新規ドナー性ポリマーの開発は必要不可欠である。今回、ポリマー合成の専門家である須藤との共同開発により有機薄膜太陽電池に応用可能なドナー性ポリマーを新たに合成することとした。また、ITICに代わる強い光吸収特性と高いキャリア移動度を併せ持つ、新たな非フラーレンアクセプターの合成も行う。現在強い光吸収特性を有するジオキサジン誘導体を中心に合成を行っているが、それと平行して2019年度から研究分担者として加わった松本との共同研究を開始し、トリチオフェンを骨格に持つ新たな非フラーレンアクセプターの合成を行うこととした。以上の分子は第一原理計算を利用して有機薄膜太陽電池材料として有望であると判断したうえで実際の合成に取りかかっている。
- (4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価
研究分担者の田中はこれまでの半透明太陽電池の実用化に向けた研究において、カーボンナノチューブシートを上部透明電極、共役高分子とフラーレン誘導体の混合膜を発電層として用いた半透明有機薄膜太陽電池の作製に成功している。2019年度は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

材料の更なる探索と作製条件の最適化を進める。

3. 研究の成果

(1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

本研究では上述の様に 2018 年度に PTB7-Th を用いた三元系有機薄膜太陽電池で 8.6%の光電変換効率を実現している。そこで、新たなドナー材料として PBDB-T と non-fullerene アクセプターである ITIC を組み合わせた有機薄膜太陽電池の作製を行った。その結果、素子構造を最適化することで 7.20%の有機薄膜太陽電池が作製でき、PTB7-Th と ITIC を用いた二元系薄膜太陽電池の効率を上回ることを確認した (図 1)。ただし、今回三元系太陽電池の作製まで行うことができず、2018 年度の結果を超える薄膜太陽電池を作製するに至らなかった。

(2) 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

PTB7-Th:PCBM を活性層とした有機薄膜太陽電池においてバッファ層として無機・有機複合ポリマー $[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$ ($m = 3$ or 6)、酸化モリブデン MoO_3 、 $\text{HAT}(\text{CN})_6$ 、 CuBr を用いた太陽電池を作製した。無機・有機複合ポリマーをバッファ層とした薄膜太陽電池において $m = 6$ の $d-\pi$ 複合体の方が $m = 3$ の無機・有機複合ポリマーを用いた場合より短絡電流密度 J_{sc} が増大した。これは上述の通り $m = 6$ の方が高い伝導性を持っていることに起因していると考えている。また、 $m = 6$ の素子は酸化モリブデン MoO_3 をバッファ層にした素子よりも高い短絡電流密度とそれに伴う高い光電変換効率を示した。すなわち、本研究で開発した無機・有機複合ポリマー $[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$ は有機薄膜太陽電池のバッファ層として利用可能であり、またその性能はハロゲン化銅 (I) と π 共役配位子の混合比で制御可能であることが明らかとなった。

(3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成

今回、新規非フラーレンアクセプターとして図 3 に示すトリベンゾチオフェン誘導体を中心骨格に有する BTT-OT-ORD (1) と BTT-OT-OTZDM (2) を合成した。トリベンゾチオフェンは三回対象構造を有する平面性のドナー性ユニットであり、その末端にアクセプターユニット ORD と OTZDM を縮合させた。BTT-OT-ORD (1) および BTT-OT-OTZDM (2) はともに可視領域で強い光吸収を示し、また優れた発光特性を示した。これらの非フラーレンアクセプターとドナー性材料 P3HT を混合することで、有機薄膜太陽電池を作製し、その光電変換特性を評価した。その結果、いずれも光電変換特性は示したものの BTT-OT-ORD (1) を用いた素子の光電変換効率は 0.47%、BTT-OT-OTZDM (2)

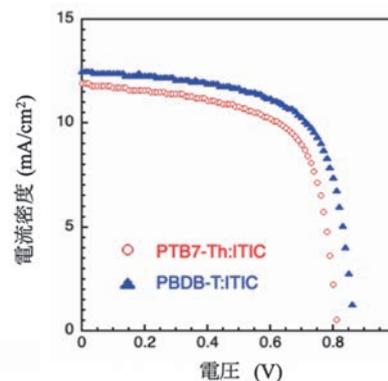


図 1, non-fullerene アクセプターを用いた有機薄膜太陽電池の J-V 特性

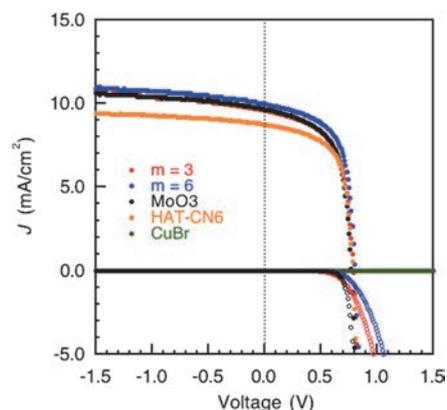


図 2, 異なるバッファ層を用いた有機薄膜太陽電池の J-V 特性

表 1, 異なるバッファ層を用いた有機薄膜太陽電池の光電変換特性

	$[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$ $m = 3$	$[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$ $m = 6$	MoO_3	$\text{HAT}(\text{CN})_6$	CuBr
J_{sc} (mA/cm ²)	9.526	9.956	9.636	8.678	0.000
V_{oc} (V)	0.802	0.796	0.771	0.780	-1.465
FF	0.603	0.611	0.612	0.634	-0.295
変換効率 (%)	4.610	5.021	4.542	4.345	0.0
変換効率 _{ave.} (%)	4.555 ± 0.040	4.720 ± 0.131	4.256 ± 0.287	4.243 ± 0.104	—

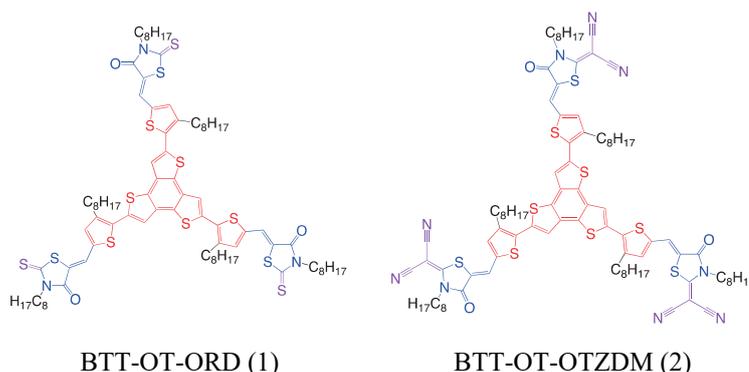


図 3, 新規非フラーレンアクセプターの分子構造

を用いた素子の光電変換効率は1.13%であった。

(4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

今回初めて非フラーレンアクセプターITICを用いた有機薄膜太陽電池にカーボンナノチューブシートを用いた透明電極を適用し、半透明太陽電池を作製した。ドナーとしてPTB7-ThおよびPBDB-Tを用いた活性層を成膜し、その上にカーボンナノチューブシートを貼り付け、銀ナノ粒子を含む溶液を滴下して乾燥させた。得られた半透明太陽電池の光電変換効率は0.50%、0.98%といずれも低かったものの、可視領域で60%を超える透過率の薄膜太陽電池が作製できることが明らかになった。

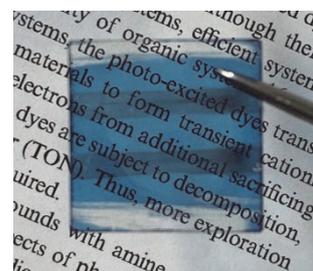


図4. 非フラーレンアクセプターを用いた半透明太陽電池

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PBDB-Tを用いることでより高効率な三元系有機薄膜太陽電池を作製することを目指したものの、研究期間中はPBDB-TとITICを組み合わせた二元系太陽電池の条件検討までしか行うことができなかった。ただし、二元系太陽電池においてもPTB7-Th:ITICを上回る7.20%の太陽電池を実現できたことから今後三成分系に拡張することで更なる高効率化が可能であると考えている。

(2) 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

本研究では、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、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うことで、有機薄膜太陽電池における汎用的な技術となり得ると考えている。実際に今回従来とは異なる有機半導体を用いた太陽電池を作製してその特性を評価したが、従来同様短絡電流密度の増大が確認されている。

(3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成

今回新たにトリベンゾチオフェンを中心骨格に含む非フラーレンアクセプターを合成し、太陽電池の作製と評価を行った。今回の材料に関しては光電変換効率は低かったものの、今後その誘導体を合成することで、高効率有機薄膜太陽電池の実現を目指す。

(4) 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°C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ている。実際、非フラーレンアクセプターを用いた有機薄膜太陽電池に適用したところ、光電変換効率の著しい低下が確認された。今後、より低負荷な電極形成技術の開発に取り組む必要があり、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する必要があると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① “Intermolecular Carbon–Carbon Bond Formation Followed by Intramolecular Cyclization of Electrochemically Generated Magnesium Anthracenes and Esters in the Presence of Chlorotrimethylsilane”, K. Matsumoto, M. Matsumoto, T. Hayashi, M. Maekawa, K. Nishiwaki, S. Kashimura, *Electrochemistry*, **2020**, 88, 314-320.

(2) 口頭発表

- ① “Crystal structures and carrier transport properties of coordination polymers including copper(I) halides”, Takashi Okubo, China-Japan Symposium of Functional Coordination Chemistry 2019, Guangzhou, China
- ② “ドナー・アクセプター型小分子を含む3元ブレンド有機薄膜太陽電池の作製” 玄野 航、中川 雄太、近藤 里奈、大久保 貴志、前川 雅彦、黒田 孝義、山口 仁宏、第80回応用物理学会秋期学術講演会、20a-PB2-52、2019年9月
- ③ “ベンゾトリチオフェン骨格を有する共役系化合物の合成と有機電子材料への応用” 山下和大、福田三四郎、佐古田祐綺、大久保貴志、田中仙君、柏村成史、松本浩一、1E01、

電気化学会第87回大会 2020年3月17日～19日

- ④ “アルデヒド類の可視光駆動型還元的カップリングにもとづく架橋反応系” 伊藤 大将、松本 教介、須藤 篤、第68回高分子討論会、3Pc001, 2019年9月27日
- ⑤ “可視光駆動型還元的カップリング系を基盤とするネットワークポリマーの合成” 須藤 篤、松本 教介、岡本 衆資、伊藤 大将、田中 秀弥、第68回高分子討論会、2V17, 2019年9月26日
- ⑥ “イミン類の可視光駆動型還元的カップリングにもとづく高分子合成” 田中 秀弥、岡本 衆資、須藤 篤、第68回高分子討論会、3Pd002、2019年9月27日
- ⑦ “半透明太陽電池の光電変換特性における光照射方向依存性の原因” 田中 仙君, 塚 昌樹, 義富 卓也, 第80回応用物理学会秋季学術講演会, 20p-E307-7, 2019年9月20日, 北海道大学
- ⑧ "Origin of Asymmetric Photovoltaic Properties on Semi-Transparent Organic Photovoltaics" Senku Tanaka, Takuya Yoshitomi, Masaki Tsuka, 2019 MRS (Materials Research Society) Spring Meeting, ES18.07.01, 2019年4月, Phoenix, USA

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高性能次世代有機系二次電池の開発 —有機 π 電子系物質を基盤とする正極材料創製—		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①二次電池 ②金属有機構造体 ③X線吸収微細構造分析 ④ナノグラフェン ⑤キノン ⑥正極			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 川 浩 史	理 工 学 部	准 教 授	研究の統括と電気化学測定

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
羽 村 季 之	理 工 学 部	教 授	酸化還元活性な有機分子の合成
畠 山 琢 次	理 工 学 部	教 授	ホウ素含有有機分子の合成
田 中 大 輔	理 工 学 部	准 教 授	有機金属構造体の合成

高性能次世代有機系二次電池の開発 —有機 π 電子系物質を基盤とする正極材料創製—

1. 研究の目的

- (1) 近年、資源問題やエネルギー問題などから、環境にやさしい高性能なエネルギーデバイスの開発が求められている。とりわけ、携帯型電子機器、電気自動車、大容量スマートグリッドなどへの需要から、クリーンなエネルギーデバイスとしての二次電池の高性能化は重要な研究課題の一つである。現在汎用的な二次電池であるLiイオン電池は、その正極材料にリチウムコバルト酸などの遷移金属酸化物が用いられているが、希少元素の利用や構造が分解するために理論容量の半分程度しか容量を得ることができないといった問題を有しており、代替の正極材料の探索・創製および新しい原理・現象の開拓が必要不可欠である。
- (2) このような状況の下、2000年代以降、環境や資源問題、低コスト、ファブリケーションのし易さといった観点から、有機ラジカル電池や分子スピン電池といった酸化還元活性な有機分子・高分子を正極活物質とした有機系二次電池が数多く報告されるとともに注目を集めてきた。しかしながら、これらは容量およびサイクル特性といった面で必ずしも現状のLiイオン電池に対して優位性を持つものではなかった。
- (3) これまでに我々のグループでは、高容量と急速充電の両方を可能にする新しい正極材料として、多電子レドックス特性を示す多核金属錯体分子（分子クラスター）を手始めに、クラスターと酸化還元活性な π 電子系有機配位子（キノンなど）から成る多電子レドックスアクティブ金属有機構造体（Metal-Organic Framework: MOF）を創製し、これを正極材料とすることで、有機配位子と金属イオン両方の酸化還元による高容量とMOFの強固な空孔構造に由来した安定なサイクル特性が実現可能なことを提示した。
- (4) また、このような酸化還元活性な π 電子系分子が集積したMOF電池の研究を行うだけでなく、上述の有機ラジカル電池や分子スピン電池とは異なる観点で、特異な構造や多電子の酸化還元能を有する π 電子系有機分子の蓄電特性開拓を進め、例えば、ホウ素ドーパナノグラフェン分子や反芳香族性ノルコロール分子について検討したところ、高容量や全有機電極電池といった各分子に特徴的な興味深い電池特性を見出した。このことは、高性能な有機電池を実現するうえで様々な π 電子系有機物質の検討が今なお重要なことを意味する。
- (5) 以上より、酸化還元活性な π 電子系分子は、次世代蓄電材料として非常に魅力的な物質群であり、本研究では、これまでの研究を基に、様々な酸化還元活性な π 電子系有機分子及び集積体を基盤とした実用化に向けた高性能な蓄電特性の開拓を目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 酸化還元活性 π 電子系有機分子に特異な電池特性の開拓を計画する。
 - ① 初年度は、多電子の酸化還元活性な有機分子として、特徴的な構造を有するポリキノン分子を創製し、その電池特性を検討する。
 - ア 一つのユニットで2電子のレドックス反応を示すキノン部位を複数有する分子の開発・合成を行う。例えば、3つのテトラセンキノン部位を有する分子1の合成とこれを正極活物質とするリチウム電池の作製及び蓄電特性の計測を行う。
 - イ 予備実験の結果ではあるが、テトラセンキノン分子2よりも大きな電池容量を示すことを見出しつつあり、キノン部位のみに由来する分子1および2の理論容量がそれぞれ146 Ah/kg（6電子の酸化還元）と208 Ah/kg（2電子の酸化還元）であることを考えると、分子1の放電容量は非常に大きく、キノン部位以外の π 電子系が酸化還元に関与していることが示唆される。本研究では、これらの電池特性について、電流密度や電圧範囲を変えるなどして、より詳細に検討する。
 - ウ 上述の研究について、より重量当たりの電池容量を大きくするために、周縁部のアルキル鎖長が短い分子を合成し、その電池特性を検討する。
 - エ 最後に、DFT計算などによりHOMO-LUMOレベルなどを解析し、その本質を解明して分子設計へのフィードバックを行う。
 - ② 多孔隙性を有する酸化還元活性 π 電子系有機分子集合体の電池特性開拓を計画する。
 - ① 初年度は、応募者のこれまでの研究に基づき、酸化還元活性な π 電子系有機分子が集積し

た多電子レドックス MOF の作製と電池特性の開拓に取り組む。

ア これまでに 2 電子の還元を示すアントラキノンジカルボン酸配位子 2,7-H₂AQDC と Cu や Mn イオンからなる MOF が、配位子単体よりも容量およびサイクル特性において圧倒的に優れていることを見出し、これが酸化還元活性な有機分子が集積した MOF における構造安定性と多孔性のためであることを明らかにした。本研究では、これに基づき、金属イオンを Cu や Mn から Fe などに置換した MOF を作製し、より大きな容量とサイクル安定性を実現する。

イ 上述の配位子に加え、重量当たりの容量が増大するように、分子量が小さくかつ 2 電子以上の酸化還元反応を示す他の様々な配位子についても合成し、各種金属塩（元素戦略的観点から Cu, Fe, Mn など）と反応させることで、多電子レドックス MOF を作製する。

ウ 得られた MOF について、これを正極とするリチウム電池の充放電特性を計測するとともに、その基礎物性（構造、表面積、空孔、伝導性）と電池特性の相関を明らかにする。その結果、 π 電子系有機分子の集積化に基づいたより良い電池特性を実現する。

3. 研究の成果

(1) 酸化還元活性 π 電子系有機分子に特異な電池特性を開拓した。

① 多電子の酸化還元活性な有機分子として、特徴的な構造を有するポリキノ分子やホウ素含有ナノグラフェン類似分子を創製し、その電池特性を検討した。

ア まず、一つのユニットで 2 電子のレドックス反応を示すキノン部位を複数有する分子として、3 つのテトラセンキノン部位を有する分子 1 を合成し、これを正極活物質とするリチウム電池の蓄電特性を計測したところ、テトラセンキノン分子 2 よりも大きな電池容量を示すことを見出し、分子 1 では、キノン部位以外の π 電子系が酸化還元に関与しているためである可能性を明らかにした。

イ 次に、ホウ素含有ナノグラフェン類似分子として、非平面四配位ホウ素化合物を新規に合成し、その二次電池正極特性を初めて明らかにし、論文として報告した (Org. Lett. 2019)。

(2) 多孔性を有する酸化還元活性 π 電子系有機分子集合体の電池特性開拓

① 酸化還元活性なジスルフィド部位を含有する有機配位子が集積した多電子レドックス MOF の作製と電池特性の開拓に取り組んだ。

ア ジスルフィド含有配位子を有する、様々な次元と空孔サイズを持つ MOF (DS-MOF) を複数作製し、その基礎物性の探索とこれらを正極材料とするリチウム電池を作製し、その充放電特性を計測した。

イ その結果、三次元構造を持つ DS-MOF がもっとも安定なサイクル特性を示すことを明らかにするとともに、空孔を有する DS-MOF のみが電池特性を示すことを明らかにした。

ウ 通常、ジスルフィドは、充電放電（酸化還元）に伴い、S-S 結合の再結合と開裂を示すため、サイクル特性の不安定性や低い電池容量につながっているが、DS-MOF 骨格内へのジスルフィドの集積化により、充放電で可逆な S-S 結合の開裂と再結合（電気化学的動的共有結合）を引き起こすことに成功し、ジスルフィドの電池特性改善につながったことを S K-edge X 線吸収微細構造 (XAFS) 測定などより明らかにした。

4. 研究の反省・考察

(1) 上述したように、2 つのテーマにおいて、様々な有機分子及び集積体の電池特性を明らかにするとともに、その反応機構や、次年度に計画していたホウ素含有分子の電池特性も調べることができており、論文発表までを達成した。よって、「当初の計画以上に進展している」といえる。

(2) 一方で、真に実用化するうえでは、さらなる改善が必要である。

① 現状、正極中の活物質濃度は、30wt%程度であるが、これを80wt%程度まで上げる。

② 負極をLiとしているが、これを炭素材料などの安全なものに取り換える必要がある。

(3) 上述のような反省点を生かして、次年度以降に、実用化につながるような有機二次電池の開発を実現したい。

(4) また、どのような有機分子や有機分子集合体が良いかを包括的に明らかにする研究へと展開したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Zhenxin Zhang*, Heng Wang, Hirofumi Yoshikawa*, Daiju Matsumura, Syuya Hatao, Satoshi Ishikawa, Wataru Ueda*, Zeolitic vanadomolybdates as high performance cathode-active materials for sodium ion battery, *ACS Applied Materials & Interfaces* (2020) 12(5), 6056–6063 (DOI: 10.1021/acsami.9b19808)
- ② Kensuke Nakashima, Takeshi Shimizu, Yoshinobu Kamakura, Akira Hinokimoto, Yasutaka Kitagawa, Hirofumi Yoshikawa* and Daisuke Tanaka*, A new design strategy for redox-active molecular assemblies with crystalline porous structures for lithium-ion batteries, *Chemical Science* (2020) 11(1), 37–43 (DOI: 10.1039/C9SC04175C)
- ③ S. Oda, T. Shimizu, T. Katayama, H. Yoshikawa*, T. Hatakeyama*, Tetracoordinate Boron-Fused Double [5]Helicenes as Cathode Active Materials for Lithium Batteries, *Org. Lett.* (2019), 21(6), 1770–1773 (DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00337)
- ④ Yoshinobu Kamakura, Pondchanok Chinapang, Shigeyuki Masaoka, Akinori Saeki, Kazuyoshi Ogasawara, Shigeto R. Nishitani, Hirofumi Yoshikawa, Tetsuro Katayama, Naoto Tamai, Kunihiisa Sugimoto and Daisuke Tanaka*, Semiconductive Nature of Lead-Based Metal-Organic Frameworks with Three-Dimensionally Extended Sulfur Secondary Building Units, *J. Am. Chem. Soc.* (2020) 142(1), 27–32 (DOI: 10.1021/jacs.9b10436)

(2) 口頭発表

- ① Hirofumi Yoshikawa, Rechargeable Batteries Using Redox-Active MOFs as Cathode Active Materials, 7th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC7), Putra World Trade Center, Kuala Lumpur, Malaysia Oct 15–18, 2019, Invited Talk
- ② 吉川 浩史、分子および分子集積体の蓄電機能開拓、エネルギーデバイスの新潮流をつくるサステイナブル・機能レドックス化学（日本化学会第100春季年会）、東京理科大学野田キャンパス、2020年3月22日、招待講演

(3) 出版物

- ① 吉川浩史、清水剛志、他102名、『PCP/MOFおよび各種多孔質材料の作り方、使い方、評価解析』（技術情報協会）、総ページ数639ページ、2019年10月30日刊

学 校 名	神 戸 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規バイオメタル錯体の糖尿病治療効果に関する 作用機構解明 — 生物無機化学的アプローチを基盤として —		研究分野	理 学
キ ー ワ ー ド	①錯化合物 ②抗糖尿病作用 ③インスリンシグナル ④セレン含有タンパク質			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 川 豊	健 康 福 祉 学 部	教 授	研究総括・動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
加 来 田 博 貴	岡 山 大 学 大 学 院 医 歯 薬 学 総 合 研 究 科	准 教 授	合成実験アドバイザー
糸 井 亜 弥	健 康 福 祉 学 部	准 教 授	動物実験・動物実験データ解析
内 藤 行 喜	京 都 薬 科 大 学 部 薬 学	助 教	分子生物学データ解析

新規バイオメタル錯体の糖尿病治療効果に関する作用機構解明 —生物無機化学的アプローチを基盤として—

1. 研究の目的

生命科学において、生体内に存在する微量元素、すなわち、バイオメタルが持つ役割は幅広く、かつ、必要不可欠なものであるため、生体内でどのような機能を発揮し、また、そのバイオメタルを我々人類がどのように有効利用できるのかを明らかにしていくことに注目が集まっている。

平成28年の5690万人の死亡者のうち、半数以上は死亡原因のトップ10の疾患によるものである。トップ10の死亡疾患には、糖尿病などの生活習慣病が多く含まれており、先進国はもとより発展途上国においても多くの人々が生活習慣に関わる疾患と戦っている。そのため、生活習慣病の助けとなるサプリメントや医薬品の開発が望まれている。現在使用可能な無機医薬品としては、Pt含有のもの、As含有のもの、Se含有のもの、Au含有のもの、Zn含有のもの、およびCo含有のものなどが存在する。その数は約18,000種の薬価基準収載医薬品数からみるとわずかな数であるが、有機化合物とは異なる作用メカニズムで疾患を治療できるため、無機医薬品への注目は高まっている。特に近年、酢酸亜鉛（ノベルジン）が低亜鉛血症治療への適応追加になった事は記憶に新しい。

申請者らは、生体とZnとの相互作用についての研究を続けてきており、副作用の少ない糖尿病治療薬の開発を目指し、配位子となりうる多数の有機化合物やメタル錯体を合成し、それらのインスリン様作用の探索を行ってきた。そして、実験動物を対象とした研究から、経口投与したZn錯体が血糖値降下作用を示す事実を世界で初めて明らかにした。つまり、Zn錯体というバイオメタルを用いた2型糖尿病治療という、新たな可能性を提供できる内容の研究を遂行してきたが、「なぜ疾患に対して効果を示すのか？」という観点から、特に動物レベルでの作用機構は、未だ解明できていない。そこで本研究では、生活習慣病の中でも患者数やその疾患の予備軍が未だ増加する傾向にある糖尿病に焦点を絞り、

- ①従来の合成薬剤に代わり得る新しいバイオメタル錯体を合成すること
- ②その糖尿病治療に及ぼす分子機構を細胞・動物レベルで解明すること
- ③①②の成果にもとづいて、治療や予防で使用可能となる新規バイオメタル錯体を提案することを目的とした。

人への適用を視野に入れた無機医薬品の合理的な評価のためには、詳しい作用機構の解明、および、バイオメタルの生体内挙動の解析が必須である。糖尿病の治療ができ、安全に長期的に経口摂取可能な化合物の開発は、早急な実現が待ち望まれている。本研究によって効率的な錯体合成経路の開発と、高活性な化合物の選択ができれば、疾患治療可能なバイオメタル錯体の使いみちがひろがることが期待される。

2. 研究の計画

「バイオメタル（特に亜鉛）」と「糖尿病治療に影響する生体との相互作用」に着目することを最も重要な研究計画とし、

- ①新規錯体の探索を行う。さらに亜鉛は硫黄（S）との親和性が高いため、Sが配位元素となる錯体の合成に着手し、大量合成可能なルートの提案を行う。
- ②肝臓をターゲットとした新規糖尿病治療効果の評価系を立ち上げ、既存の錯体と併せて糖尿病治療効果の評価を行う。
- ③選抜された錯体を2型糖尿病モデル動物に投与し、解剖後の組織を用いての糖尿病に関連するタンパク質の変動を評価する。

3. 研究の成果

(1) 新規亜鉛錯体の合成ならびに硫黄含有亜鉛錯体の大量合成への着手

- ①新規バイオメタル錯体の合成

配位子に糖鎖が入ることで生体内の糖輸送体に認識される可能性が高くなり、生体へのメタルの輸送が高まることが期待される。そのため、アミノ糖を用いて新規糖含有亜鉛錯体の合成に着手した。具体的には、D(+)-グルコサミン塩酸塩をメタノール中に溶解し、メタノール中に溶解させたカリウム α -ブトキシドと8-ヒドロキシ-2-キノリンカルボアルデ

ヒドを加え、室温で24時間攪拌した。反応混合物は、減圧条件下において蒸発させ、残渣物はメタノール中で再結晶化させ、淡黄色の化合物1（収率40%）を得た。得られた化合物は、(E)6-(ヒドロキシメチル)-3-(((8-ヒドロキノリン-2-イル)メチレン)アミノ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2,4,5-トリオールのカリウム塩であり、NMR・MS・元素分析から同定した。この化合物のメタノール溶液に塩化亜鉛を加え、カリウムと亜鉛の置換反応を起こさせ、目的の化合物((E)6-(ヒドロキシメチル)-3-(((8-ヒドロキノリン-2-イル)メチレン)アミノ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2,4,5-トリオールの亜鉛錯体)を得た。得られた化合物は、元素分析により確認した。

②硫黄を配位原子に持つバイオメタル錯体の大量合成への着手

硫黄を配位元素にもつ配位子として、今までにマルトール、トロポロン、ヒノキチオールなどの酸素原子を硫黄原子に置き換える方法で合成をしていたが、合成経路が複雑で、誰もが簡単に合成できる状況ではなかった。そのため、硫黄含有の上記化合物を大量合成することができる新たな合成ルートの開拓を行った。

ア) 亜鉛チオマルトール錯体の合成；マルトールの溶液にローソン試薬を加えて窒素下、80°Cで加熱還流を行った。得られた黄色の油状物質を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離を行った。チオマルトールの溶出部分を濃縮し、得られた油状物質を減圧下で乾燥させチオマルトールを得た。チオマルトールと水酸化リチウムメタノール下で混合し、硫酸亜鉛を加え反応させた。得られた析出物を洗浄し、減圧下で乾燥させ、得られた黄色粉末を亜鉛チオマルトール錯体とした。得られた錯体は、質量分析と元素分析から合成できたことを確認した。

イ) 亜鉛チオトロポロン錯体の合成；トロポロンのキシレン溶液に五硫化二リンを加え、反応促進剤を加えたのち、加熱還流した。濃縮後、カラムクロマトグラフィーを用いて分離し、減圧下で乾燥させチオトロポロンを得た。チオトロポロンと水酸化リチウムメタノール中で反応させた後、硫酸亜鉛を加え、得られた析出物を洗浄し、減圧下で乾燥させ、亜鉛チオマルトール錯体とした。得られた錯体は、質量分析と元素分析から合成できたことを確認した。

ウ) 亜鉛チオヒノキチオール錯体の合成；ヒノキチオールのトルエン溶液にローソン試薬を加え加熱攪拌後、減圧下で濃縮し、クロロホルムに溶解させた。水酸化ナトリウム水溶液を加え分液後下層を除去した。水酸化ナトリウム層にクロロホルムを加え、中和のため塩酸を加え、分液後下層を減圧下で濃縮した。濃縮残渣をメタノールで溶かし、酢酸亜鉛を加え、1時間攪拌した。沈澱物をグラスフィルターで回収し、シリカゲルカラムで分離し、濃い茶色の部分を濃縮し、亜鉛チオヒノキチオール錯体とした。得られた錯体は、質量分析と元素分析から合成できたことを確認した。

(2) 肝臓をターゲットにした新規糖尿病治療効果の評価系の構築と亜鉛錯体の効果

糖尿病に関する研究の中で、2型糖尿病患者の血中セレノプロテインP (SeP) 濃度が上昇することが近年報告され、過剰なSePの分泌がグルコース代謝を悪化させ、2型糖尿病を進行させることが明らかとなっている。SePは肝臓に蓄えられたセレン輸送タンパク質として機能しており、インスリン抵抗性を誘導し高血糖を発症させる機能も発見され、近年SePへの注目が高まっている。そこで、本研究では合成した亜鉛錯体の抗糖尿病効果の指標として、ヒト肝腫瘍細胞由来のHePG2細胞によるSePの発現量をリアルタイムPCR法を用いてmRNA量の変動から評価する新たな系を構築し、亜鉛錯体の評価を実施した。

方法は、細胞密度が $1.0\sim 2.0\times 10^5$ 個/mlになるように培地を加え、細胞懸濁液を作成した。12 wellのディッシュに培地と細胞懸濁液を播種し培養し、24時間後、培地を取り除き、PBSを加えて細胞を1回洗浄し、無血清培地を加えさらに培養した。20時間後、ディッシュに無血清培地で調整した錯体を4時間作用させた。4時間後、total RNAを抽出し、TaKaRa One step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)を用い、シグマアルドリッチジャパン合同会社より購入したプライマーから、リアルタイムPCR法によりSePのmRNA量の評価を行った。

その結果、ポジティブコントロールとして使用したインスリンは濃度依存的にSePの発現量を抑制し、50%抑制する濃度のIC50値は $15.1\mu\text{M}$ であった。また、評価した錯体は、マルトール

ルを配位子に持つ亜鉛錯体 ($\text{Zn}(\text{mal})_2$)、マルトールの酸素原子一つを硫黄化した $\text{Zn}(\text{S-mal})_2$ 錯体、トロポロンを配位子に持つ亜鉛錯体 ($\text{Zn}(\text{trp})_2$)、トロポロンの酸素原子一つを硫黄化した $\text{Zn}(\text{S-trp})_2$ 錯体であり、硫酸亜鉛も同時に評価した、これらの錯体の中で、SePの発現量を低下させたものは、 $\text{Zn}(\text{S-mal})_2$ 錯体と $\text{Zn}(\text{S-trp})_2$ 錯体のみであり、SePのmRNA発現量を50%抑制する濃度は、それぞれ17.1 μM 、17.5 μM であり、それ以外の亜鉛化合物ではSePの発現に影響を及ぼさなかった。一方、他のバイオメタルの中では、硫酸銅が21.4 μM となり、バイオメタルの中でもSePの発現量は異なることが明らかとなった。

(3) 動物モデルを用いた糖尿病治療に関わるタンパク質の変動評価

亜鉛はインスリン合成、インスリン分泌に関与することが知られている。以前より、亜鉛と糖尿病の関係を示す研究が報告されており、糖尿病治療に亜鉛を用いる可能性が示されていた。In vitro系3T3-L1脂肪細胞を用いた検討から、亜鉛化合物がインスリン標的組織のうち脂肪細胞においてインスリンとは独立したメカニズムによってインスリンシグナル経路に作用し、末梢におけるインスリン抵抗性を改善する可能性があることを明らかにしており、今回の検討では、in vivo系において、亜鉛錯体がインスリン標的組織に対してどのような作用メカニズムを示すのかを解明することを目的とした実験を実施した。

その結果、雄性ICRマウスをコントロール群、インスリン投与群、 $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群に分け、化合物を腹腔内投与した。各薬剤投与40分後及び90分後に解剖を行い、肝臓、骨格筋および脂肪を摘出した。同様に、2型糖尿病モデルKK-A^yマウスに対しても、ICRマウスと同様、各薬剤を腹腔内投与し、臓器摘出を行った。摘出した肝臓、脂肪、骨格筋はウエスタンブロッティング法によりAktのリン酸化の程度を評価した。ICRマウスを用いた検討では、インスリン投与群および $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群においてのみ有意なリン酸化促進作用が認められた。特に、脂肪組織において、投与後40分ではコントロール群に対して有意なAktリン酸化促進作用が認められた。投与後90分では、インスリン投与群、 $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群共にAktリン酸化促進傾向を示すことが認められたが、インスリンによる効果は40分時よりも弱い一方で、 $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群はコントロール群に対して有意な促進作用が認められた。肝臓と骨格筋においては、インスリン投与群においてのみAktリン酸化促進作用が認められた。一方、2型糖尿病モデルKK-A^yマウスに対する $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群の肝臓、骨格筋、脂肪組織に対するインスリンシグナル経路への影響を検討すると、ICRマウスとは異なり、KK-A^yマウスでは、いずれの臓器においても $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与によるAktリン酸化促進作用は認められなかった。以上のことから、2型糖尿病モデルでは $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与に対する感受性・応答性がICRマウスに比べて低下しているという結論が得られた。

4. 研究の反省・考察

(1) 今回新規の亜鉛錯体と高活性が期待できる亜鉛錯体の特別な装置を有さず、簡単な合成ルート確立を目指した実験を実施した。

- ①糖鎖含有の亜鉛錯体は現在までほとんど報告がなく、今回合成できた錯体は新規性のあるものである。本来であれば、この錯体を用いても各種生理活性、メカニズム解明を実施したかったが、その検討までは到達できなかった。予想以上に配位子の精製に時間がかかったことがその一因であると考えている。現在、糖鎖含有の亜鉛錯体の大量合成を実施中であり、今年度には生理活性のデータを取得する予定である。
- ②酸素原子を硫黄原子に簡易な方法で置換する方法を、文献情報をもとに検討し、いくつかの錯体でその手法を確立することができた。小スケールであれば簡単に合成できても、大スケールになると合成できないという事象も出てきたため、大量合成できるような合成経路を考えるのに時間を有してしまった。今回の研究で、動物に投与して各種作用を評価できる量は、普通の化学実験室があれば合成可能となったため、今後動物に投与する実験を実施し、バイオメタル錯体の抗糖尿病作用の解明につなげたい。

(2) 抗糖尿病効果の評価として、当初はラット脂肪細胞へのグルコース取り込み活性での方法を検討していたが、動物倫理の縛りが厳しい昨今、細胞を用いた評価に切り替えることになった。そのため、今回購入したリアルタイムPCRを用いての評価方法の検討を行い、SePのmRNAの発現レベルから比較することに成功した。その結果S化した亜鉛錯体は、イン

スリンと類似の作用を有していることが明らかとなり、SeP の発現量から亜鉛錯体の抗糖尿病作用の機構を解明したのは、本研究が初めてである。また、今までに申請者らが報告してきた糖尿病治療効果の指標として用いていた脂肪細胞に対する亜鉛錯体の効果と比較すると、いずれの場合も S 化された配位子を持つ亜鉛錯体の方が高活性であり、これらのデータには相関性が認められた。この SeP 発現量からの評価系が確立できたことより、今回合成が成功した、糖鎖を有する亜鉛錯体においても、SeP の発現量を測定すべく、現在鋭意検討中である。

- (3) 抗糖尿病作用を評価する上で、メタル関連化合物の評価は多くのものが *in vitro* 実験や細胞実験であり、動物を用いたメカニズム解明はほとんど行われていない。今回の研究で、Zn(mal)₂ 錯体を用いて、健常動物と糖尿病モデル動物の両方を用い、生きた動物での作用メカニズムの違いが評価できたことはとても有益なことである。一方、研究環境を選ばず最低限の設備で合成できる方法を確立した硫黄を配位子にもつ亜鉛錯体の *vivo* における評価にまでは、2019 年度では到達できなかった。現在、KK-A^y マウスに Zn(S-mal)₂ 化合物を投与する実験計画をたて、学内で動物倫理審査を申請中であり、2020 年度には糖尿病モデル動物における、硫黄化した亜鉛錯体の SeP 発現量の結果が出る予定であり、学会などで発表していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Crystal Structure of Zinc(II) Complexes with 2-Ethyl-3-hydroxy-4H-pyran-4-thione and 2-Ethyl-3-hydroxy-4H-pyran-4-selenone, Takayuki Nishiguchi, Masayuki Yamashita, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui, Crystallography Reports, 64, 1099–1102 (2019)
- ② In Vivo Effect of Bis(Maltolato)Zinc(II) Complex on Akt Phosphorylation in Adipose Tissues of Mice, Yuki Naito, Hiroaki Yamamoto, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui, Biol Trace Elem Res, 192, 206-213 (2019).

(2) 口頭発表

なし

(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睡眠薬 ③電気活動 ④薬効評価			

○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

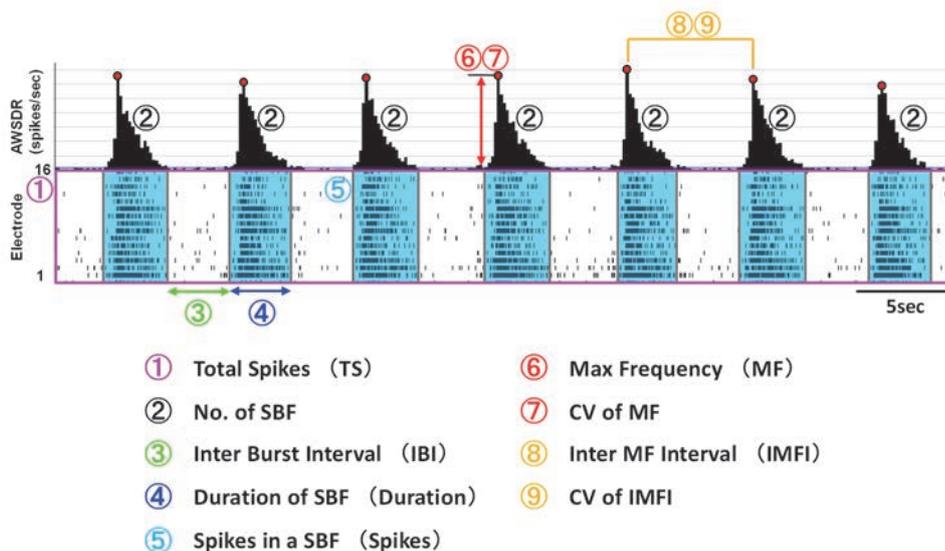
睡眠覚醒リズムを持つヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの創生 — 生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築 —

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、開発技術を用いた創薬開発および安全性・毒性評価法への展開を目指している。令和元年度は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした既存睡眠薬の応答を明らかにし、主な作用機序が同様の薬剤においても神経ネットワーク活動の違いにより、神経機能の実態に基づいた精度の高い睡眠薬スクリーニング法の開発を目的とした。

2. 研究の計画

平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来ニューロン (Mixed Neurons; Elixirgen Scientific) を 7.0×10^5 cells/cm² の密度で培養し、培養 5 週目に、睡眠薬 6 種類、痙攣陽性化合物 2 種類と DMSO を用いた用量依存的な神経活動を取得した。睡眠薬は、非ベンゾジアゼピン系であるゾルピデム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ベンゾジアゼピン型であるトリアゾラム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、エチゾラム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ロルメタゼパム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、フルニトラゼパム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ニトラゼパム (1, 3, 10, 30, 100 μ M)、メマトニン MT1/2 受容体アゴニストであるラメルテオン (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M) を使用し、陰性化合物として DMSO (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%)、比較対照として痙攣陽性化合物である 4-アミノピリジン (0.3, 1, 3, 10, 30 μ M)、クロルプロマジン (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M) を使用した。各濃度 10 分間の自発活動計測を行い、下図に示す 9 個のパラメータを導出し、得られたパラメータを用いたクラスタリング解析により、各薬剤が神経ネットワーク活動に及ぼす影響、および主な作用機序が同様の薬剤における神経活動の差異を調べた。

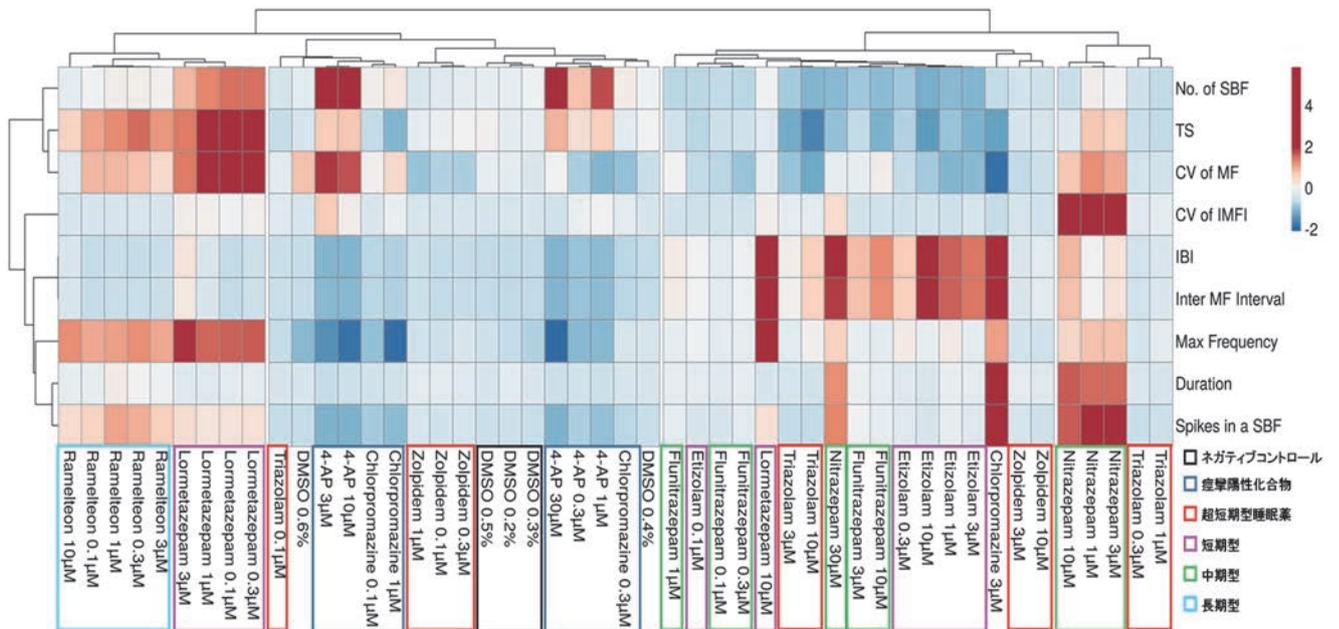


9個の解析パラメータを用意

3. 研究の成果

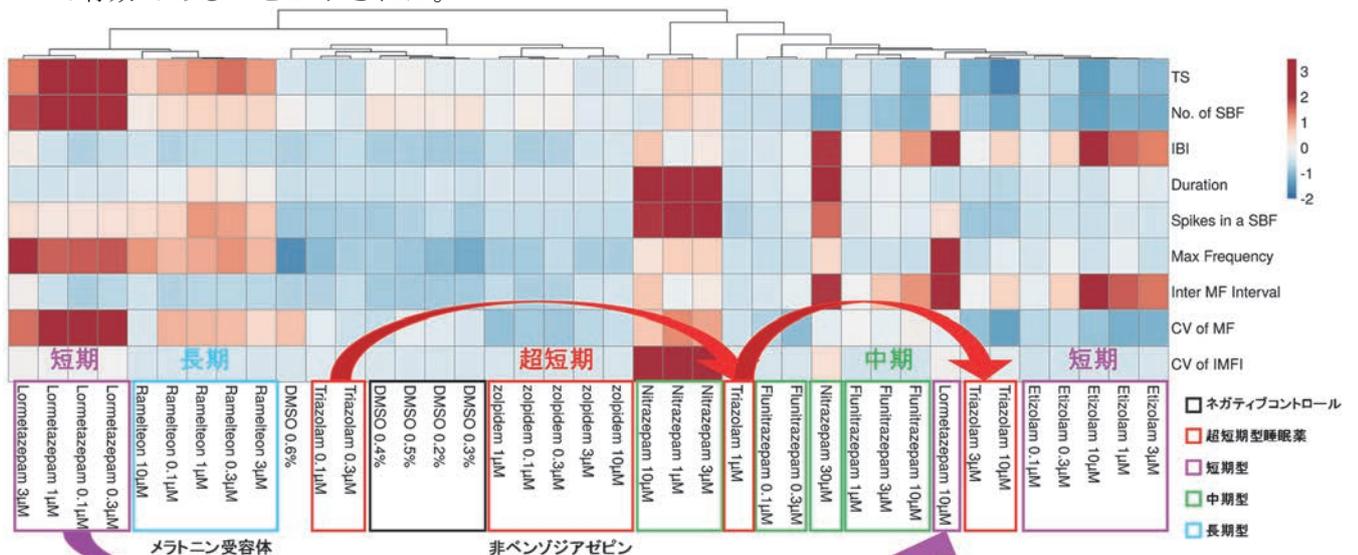
(1) 睡眠薬の応答は、比較対照とした痙攣陽性化合物の応答とは全く異なる

9個のパラメータを用いた全薬剤全濃度のクラスタリング解析の結果を次頁に示す。比較対照として用いた痙攣陽性化合物4-アミノピリジンとクロルプロマジンは、睡眠薬の応答とは異なり、睡眠薬と比較するとDMSOに近い結果となった。クロルプロマジン3、10 μ Mは、同期活動が消失した為、解析パラメータが揃わないことからクラスタリング解析から除外している。睡眠薬の応答は、痙攣陽性化合物の応答とは全く異なる神経活動を示すことがヒト iPS 細胞由来ニューロンのMEA計測で確かめられた。



(2) 睡眠薬毎の神経応答を検出した

睡眠薬7種類とDMSOのクラスタリング解析結果を以下に示す。ゾルピデムは、 $10\mu\text{M}$ においても顕著な変化を示さなかったが、その他の睡眠薬は大きく2群に分かれた。ベンゾジアゼピン型のロルメタゼパム ($0.1, 0.3, 1, 3\mu\text{M}$)、メラトニン受容体アゴニストのラメルテオンは、TS・NoB・PS・CV-MSが顕著に増加（発火を増大する変化）を示した。また、クラスタリング解析の結果、ロルメタゼパムとラメルテオンは別クラスターに分類されたことから、作用の違いも検出された。一方、フルニトラゼパム、エチゾラム、トリアゾラムは、対称的にTS・NoBが減少（発火数を減少させる変化）を示した。フルニトラゼパム、エチゾラムは別クラスターに分類されたことから、神経活動の差異が検出された。ニトラゼパムは、最高濃度 $30\mu\text{M}$ でTS・NoBの減少が顕著になったが、Duration・Spikes・IMFI・CV of IMFIのパラメータが顕著に増大する特徴的な変化を示した。トリアゾラムは、低用量はDMSOに近い応答を示し、濃度が高くなるにつれて、右側にシフトした。高用量 $3, 10\mu\text{M}$ は同クラスターであり、他の睡眠薬との差異も見られた。以上の結果により、睡眠薬毎に特徴的な神経活動を示すことがわかった。特に、主の作用機序が同様であるベンゾジアゼピン系睡眠薬6種類の差別化が得られた点は興味深く、神経活動に基づいた本評価系は、睡眠薬のプロファイリング法として有効であることが示された。



4. 研究の反省・考察

本研究により、主作用が同じ睡眠薬においても神経ネットワーク活動の応答は異なることがわかった。同じ主作用を持つ睡眠薬を神経活動を指標に分類できたことから、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法と本解析法は、未知の睡眠薬化合物がどの既知化合物の応答に近いのか、異なる神経活動を誘発するものなのかを評価でき、新たな睡眠薬のフェノタイプスクリーニング法として有効であると考えられる。睡眠薬は、その作用期間から超短期、短期、中期、長期に分類されている。作用期間での明確な分離は見られなかったが、長期計測を行えば、作用期間の分類も可能であると考えられる。ゾルピデムは 10 μ M 投与においても顕著な差が見られなかった。同じく超短期に分類されるトリアゾラムとバインディングアフィニティを比較した報告からは、ゾルピデムはトリアゾラムと比較して、GABA-A 受容体のサブタイプである $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ について数十倍以上、結合親和性が低いことが報告されている (Psychopharmacology 164.2 (2002): 151-159)。また、ゾルピデムは、 $\alpha 1$ への作用が最も強く、10mg の経口投与時の血中最高濃度は約 0.5 μ M である。今回使用したヒト iPS 細胞由来ニューロンの $\alpha 1$ の発現を調べる必要があると共に、ゾルピデムの脳室内濃度が高い可能性も考慮する必要がある。ゾルピデムで反応性が低い理由を今後調べてゆく予定である。ただ、ゾルピデムは、他の睡眠薬と異なり、睡眠の構造を乱すことなく睡眠を誘発する特徴を持っている為、その特徴が現れている可能性もある。ロルメタゼパムとラメルテオン投与で発火数が増大した現象は、睡眠リズムを整える作用として他の睡眠薬とは神経作用が異なることを示している。そのメカニズムについても今後調べて行きたい。

現在、計測したサンプルの各種受容体発現を RNA sequence により、調査中である。各種受容体の発現と電気活動との相関を引き続き調べる。睡眠薬を電気活動を指標としてプロファイリングできた成果は、睡眠薬スクリーニング法を目指した今後の研究を加速する成果であるが、前年度までに開発した電気刺激法などを睡眠薬のプロファイリングに取り込むところまで進まなかった点が反省点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- [1] Shirakawa T, Suzuki I* “Approach to Neurotoxicity using Human iPSC Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells”, Current Pharmaceutical Biotechnology, 20, 2019, 1-7, doi: 10.2174/1389201020666191129103730.
- [2] Yokoi R, Okabe N, Matsuda N, Odawara A, Karashima A, Suzuki I*. “Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons.”, Frontiers in Neuroscience, 2019 May, 13:554,1-15, DOI: 10.3389/fnins.2019.00554.
- [3] Sasaki T*, Suzuki I*, Yokoi R, Sato K, Ikegaya Y, “Synchronous spike patterns in differently mixed cultures of human iPSC-derived glutamatergic and GABAergic neurons” Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019 May, Volume 513, 300-305, DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.161.

(2) 口頭発表

1. 鈴木郁郎, 基調講演:ヒト iPS 神経の機能を指標とした医薬品アッセイの有用性 細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」, 2020/1/20、国内、招待
2. 鈴木郁郎, 浜松フォトリクス企業セミナー: in vitro 神経ネットワークの電気活動から薬効を予測する, 第 10 回スクリーニング学研究会, 2019/11/20-22, 東京、国内、招待
3. 鈴木郁郎, ヒト iPS 由来ニューロンを用いた薬効予測, 日本バイオマテリアル学会東北ブロック 講演会, 2019/10/2 仙台 招待

4. 鈴木郁郎, iPS 細胞を用いた痙攣・てんかん研究への挑戦, さいたま神経生理 てんかん研究会, 2019/6/7 さいたま 招待
5. 鈴木郁郎, iPS 細胞を用いた抗てんかん薬の評価と今後の展望, 第3回 Kinki epilepsy summit, 2019/5/11 京都 招待
6. I. Suzuki. Investigators Workshop: Recent Advances in Microelectrode Array Technology and Its Applications, American Epilepsy Society 2019, Dec.6-10, Baltimore, USA 口頭招待
7. I. Suzuki. AI Utilization in MEA data of hiPSC Neurons. Symposium “Recent Trends in High Performance Computing for Safety Pharmacology”, Safety Pharmacology Society 2019, Sep.23-26, Balcelona, Spain 口頭招待

(3) 出版物

- [1]鈴木郁郎, 医薬品開発における創薬スクリーニング関連技術開発, 第5章第3節 MEA 計測機器を利用した安全性評価・創薬スクリーニング p153-163, 情報機構 2019年12月

学 校 名	成 蹊 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む —対破壊電流密度にどれだけ近づけられるか?—		研究分野 工 学
キ ー ワ ー ド	①超伝導 ②臨界電流密度 ③対破壊電流密度 ④ナノ組織制御		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 浦 正 志	理 工 学 部	教 授	研究総括および超伝導薄膜の創製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
作 間 啓 太	理 工 学 部	助 教	超伝導薄膜の創製
神 原 陽 一	慶應義塾大学理工学部	教 授	キャリア制御技術の開発
Harold Hwang	米国スタンフォード大学	教 授	新超伝導材料開発
Boris Maiorov	米国ロスアラモス国立研究所	研 究 員	超高磁場中特性評価
Serena Eley	米国コロラド鉱山大学	助 教	磁化測定による熱擾乱の評価

ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む —対破壊電流密度にどれだけ近づけられるか?—

1. 研究の目的

安価かつ無尽蔵である液体窒素温度下 $\text{REBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ (RE123) 超伝導線材は、発電機、MRI(磁気共鳴画像)、NMR(核磁気共鳴)装置など次世代エネルギー及び医療機器応用に期待されている。これらの応用上最も重要となるのが臨界電流密度(J_c)である。現状の J_c 値は、 J_c の限界値である対破壊電流密度(J_d)の 10%程度であり応用に適さない状況となっている。これは、RE123 超伝導内に侵入したナノサイズの量子化磁束が①ローレンツ力($F_L=J_c \times B$)及び②熱擾乱($S \propto k_B T$ (k_B 及び T は、ボルツマン定数及び温度))により運動し、 J_c が低下するためである。我々は、これまで J_c の低下の原因である量子化磁束運動を抑制するために、非超伝導相をナノサイズ・ナノ間隔に導入することにより量子化磁束の運動を抑制し J_d の 10%程度の世界最高 J_c を得ることに成功してきた。また、我々は、すべての超伝導材料において、ギンツブルグ数(G_i)が小さいほど量子化磁束の熱擾乱(S)を抑制でき、 J_c が向上することを明らかにした。

独自のインコヒーレント非超伝導相導入技術に加えて、本研究で開発する高キャリア注入による熱的臨界磁場(B_c)向上技術を融合することで J_c を最大限に活かす超伝導材料設計の指針を確立し、未だ誰も実現していない 100 MA/cm² 以上の J_c を目指す。

近年、申請者らが構築した独自 J_c 理論モデルをもとに J_c 向上には『キャリア密度向上による B_c 向上が鍵』であると考えた。そこで革新的 J_c には 4 つの課題を解決する必要がある。本研究では、特に高キャリア注入技術を開発し、以下の課題を解決し、目標達成を目指す。

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加

2. 研究の計画

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
 - ① 金属有機酸塗布(MOD)法を用いインコヒーレントナノ粒子導入RE123薄膜創製
 - ② パルスレーザ蒸着(PLD)法を用いたインコヒーレントナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜創製
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
 - ① 密度・サイズの異なるナノ粒子がRE123薄膜の熱擾乱に及ぼす影響の解明
 - ② 密度・サイズの異なるナノ粒子が鉄系超伝導薄膜の熱擾乱に及ぼす影響の解明
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
 - ① 化学圧力・キャリア制御技術によるナノ粒子導入RE123薄膜の高 T_c 維持
 - ② 化学圧力・キャリア制御技術によるナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の高 T_c 維持
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加
 - ① 高キャリアがナノ粒子導入RE123薄膜の熱的臨界磁場に及ぼす影響の解明
 - ② 高キャリアがナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の熱的臨界磁場に及ぼす影響の解明
- (5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価
 - ① 高キャリア注入がナノ粒子導入RE123薄膜の J_c 特性に及ぼす影響の解明
 - ② 高キャリア注入がナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の J_c 特性に及ぼす影響の解明

3. 研究の成果

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
 - ① MOD法を用い独自のナノ粒子導入技術(特許第5270176号)を活かし、RE123薄膜の T_c や結晶性を低下させずに、5-10nmの直径を有するBaHfO₃ナノ粒子を 100×10^{21} [nm³] 導入することに成功した。
 - ② PLD法を用い独自のナノ粒子導入技術(特許第5757587号)を活かし、鉄系超伝導薄膜の T_c や結晶性を低下させずに、5-10nmの直径を有するBaZrO₃ナノ粒子を 65×10^{21} [nm³] 導入することに成功した。
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制

- ① 高密度なBaHfO₃ナノ粒子を導入するほどRE123薄膜の磁束の熱擾乱が抑制された。
- ② 高密度なBaZrO₃ナノ粒子を導入するほど鉄系超伝導薄膜の磁束の熱擾乱が抑制された。
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
 - ① (Y,Gd)Ba₂Cu₃O_y ((Y,Gd)123)薄膜に変え、酸素熱処理条件(圧力、温度)を制御することで、高キャリア密度と高 T_c を維持することに成功した。
 - ② BaFe₂(As_{0.66}P_{0.33})₂(Ba122:P)のAs/P組成を制御することで、高キャリア密度と高 T_c を維持することに成功した。
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加
 - ① キャリア注入したナノ粒子導入(Y,Gd)123薄膜の B_c を評価した結果、高キャリア密度であるほど B_c が高いことが明らかになった。
- (5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価
 - ① キャリア注入したナノ粒子導入(Y,Gd)123薄膜の J_d の約25%まで J_c を向上させることに成功した。この特性は、本研究の目的である未だ誰も実現していない100 MA/cm²以上の J_c を実現したことになる。
 - ② キャリア制御したナノ粒子導入Ba122:P薄膜は、 J_d の約15%まで J_c を向上させることに成功した。この特性は、従来の薄膜特性の約2倍の特性である。

4. 研究の反省・考察

2019年度に得られた成果は、2019年度内に行われた国際学会10報、国内学会3報で成果報告した。また、新聞発表1報および受賞が1件あった。研究成果としては、3.研究の成果に記した通り計画以上の成果が得られている。

その一方で、2019年度に得られた研究成果をまとめて投稿した学術論文は、いくつかの論文に投稿中や再投稿準備中の状態にあり2019年度内に掲載された論文がないことは反省すべき点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

投稿中および再投稿準備中

(2) 口頭発表

- ① M. Miura, “Recent results on flux pinning in nanoparticle-doped TFA-MOD REBa₂Cu₃O_y Coated Conductors” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ② G. Tsuchiya, J. Kawanami, **M. Miura**, M. Kiuchi and T. Matsushita “Film thickness dependence of in-field J_c in (Y,Gd)BaCuO+BaMO₃ (M=Zr, Hf) nanoparticle CCs” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ③ K. Miyata, J. Nishimura, S. Anno, **M. Miura**, A. Ibi and T. Izumi “The in-field J_c in RTR-PLD EuBa₂Cu₃O_y+BaHfO₃ coated conductors” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ④ J. Ohta, K. Shimizu, **M. Miura**, A. Ibi, K. Nakaoka and T. Izumi “The influence of carrier density on the in-field J_c of (Y,Gd)BCO+BZO CCs” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ④ T. Furuya, Y. Kamada, K. Sakuma and **M. Miura** “Enhanced critical current density in TFA-MOD (Y_{0.77}Gd_{0.23})Ba₂Cu₃O_y films on CeO₂ buffered R-Al₂O₃ substrates” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ⑤ G. Tsuchiya, J. Kawanami, **M. Miura**, M. Kiuchi and T. Matsushita “Film thickness dependence of in-field J_c in (Y,Gd)BaCuO+BaZrO₃ nanoparticle CCs” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑥ K. Miyata, S. Anno, J. Nishimura, **M. Miura**, A. Ibi and T. Izumi “The influence of BaHfO₃ nanorods on the in-field J_c for RTR-PLD EuBa₂Cu₃O_y CCs” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑦ J. Ohta, K. Shimizu, **M. Miura**, A. Ibi, K. Nakaoka and T. Izumi “The influence of O₂ annealing condition on the in-field J_c of (Y,Gd)BCO+BZO CCs” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland

- ⑧ T. Furuya, Y. Kamada, K. Sakuma and **M. Miura** “The enhanced J_c in TFA-MOD (Y,Gd)BCO+BZO films on $CeO_2 / R-Al_2O_3$ substrates” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑨ T. Harada, G. Tsuchiya, **M. Miura**, K. Tanabe, M. Kiuchi and T. Matsushita “Enhanced J_c in $BaZrO_3$ nanoparticles doped $BaFe_2(As_{0.66}P_{0.33})_2$ films” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑩ K. Sakuma, Y. Kamada, and **M. Miura** “High J_c TFA-MOD-($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ films on CeO_2 buffered $R-Al_2O_3$ substrates” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑪ 土屋豪, 原田工夢, 川浪隼也, **三浦正志**, 木内勝, 松下照男 “ $BaMO_3$ ナノ粒子(M = Hf, Zr) 導入($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ 線材における磁場中臨界電流密度の膜厚依存性” 2019年第67回応用物理学会 春季学術講演会, 2020年3月12日～15日, 上智大学, 東京
- ⑫ 太田順也, 清水一輝, **三浦正志**, 中岡晃一, 和泉輝郎 “酸素アニール温度がTFA-MOD法($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ + $BaMO_3$ 線材のキャリア濃度及び超伝導特性に及ぼす影響” 2020年第67回応用物理学会 春季学術講演会, 2020年3月12日～15日, 上智大学, 東京
- ⑬ 古谷大起, 鎌田哲徳, 作間啓太, **三浦正志** “TFA-MOD法($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ + $BaMO_3/CeO_2$ / $R-Al_2O_3$ 薄膜の臨界電流密度” 2020年第67回応用物理学会 春季学術講演会, 2020年3月12日～15日, 上智大学, 東京

(3) 出版物
なし

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間葉系幹細胞 ④細胞足場			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 澤 重 仁	理 学 部 第 一 部	嘱 託 助 教	高分子設計、細胞機能評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 塚 英 典	理 学 部 第 一 部	教 授	高分子設計、細胞機能の評価
橋 詰 峰 雄	工 学 部	教 授	細胞機能の評価、材料物性評価
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

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、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(MSC)が注目を集めている。MSC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可能であり、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るため、間葉系幹細胞を用いた組織再生は広く検討されている。しかし、こと膝関節軟骨組織の再生に関しては、硝子軟骨への選択的分化手法が未だ確立されておらず、大きな障壁となっている。

細胞は細胞足場材料とともに患部へ移植することで組織形成能を制御できると知られている。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り、関節軟骨においては、線維軟骨化を抑制し、耐摩耗性に優れた本来の硝子軟骨を修復・形成させることが重要で、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。申請者らはこれまでに、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-RADARADARADA-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)型ゲルを関節軟骨組織再生足場材として開発してきた。これは、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が高機能化する設計である。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。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を示した。さらに、IPNゲル内にてMSCを培養し、軟骨分化挙動を解析したところ、MSCは効率的に硝子軟骨組織に分化していることがわかった。また、ポリ乳酸(PLA)部を組み込んだPEG-PLA-PEGをPEGの代わりに用いることで、組織再生足場材として安全面の観点からも必須な機能である生分解性の付与も達成している。

(2) 目的

本IPNゲルは軟骨組織再生足場材として、臨床応用がなされているアテロコラーゲンゲルと比較しても優れた結果を示している。これが実際の現場で使われる技術となるためには、簡便且つ再現よく本IPNゲルが作成可能であることなど、使い勝手の良さも備える必要がある。よって本年度は、本IPNゲルの社会実装への展望を広げるため、IPNゲルの調製条件、形成過程についての基礎知見や、分解過程のゲルが細胞に与える影響について精査した。

2. 研究の計画

(1) IPNゲルの調製条件、形成過程の評価

IPNゲルの成分であるCHI、PEG、RADA16、CHI溶液について、様々な濃度で調製し、これらを混合した時のゲル化挙動及びCDスペクトルをそれぞれ確認した。また、この実験で決まったゲル前駆体溶液において、CHI、RADA16溶液の濃度はそのまま、PEG溶液の濃度を変化させたものを混合し、ゲル化挙動を比較することで、ゲルの形成過程についても考察した。

(2) 生分解性ゲル中でのウシ膝軟骨細胞の挙動解析

これまでの軟骨マーカー遺伝子発現解析より、生分解性IPNゲル中においてMSC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。本年度ではこの分解性 IPN ゲルの効果について、ゲル分解性が MSC の分化を促進するためか、それとも軟骨細胞に分化したのちの組織形成に有利に働くためなのか、掘り下げて考察する。具体的には PLA リンカーにより、生分解性が付与されたゲルとそうでないゲル中でウシ膝軟骨細胞を培養し、細胞の細胞外基質産生量、及び硝子軟骨マーカーの遺伝子発現量を経時的に評価した。

3. 研究の成果

(1) IPN ゲルの調製条件、形成過程の評価

IPN ゲルの調製条件であるが、4 wt%の CHI の 300 mM PBS 溶液と、4 wt%の PEG、1 wt%の RADA16 水溶液を 2:1:1 の体積比で混合して CHI/PEG/RADA16=2.0/1.0/0.25 wt% の前駆体溶液とすることが、ゲル前駆体の粘度、細胞の内包効率、またゲル化までの所要時間の観点から総合的に好ましいことを見出した。この時のゲル前駆体溶液をレオメーターで評価すると、IPN ゲル化に必要な時間は、貯蔵弾性率 G' の変化から 220 秒であり、これは同濃度条件の CH/PEG ゲルの形成時間と相関した (図 1 上)。これは RADA16 の有無によらず CH/PEG が独立にネットワークを形成していることを示唆している。このことは、PEG の含有量を増やして CH/PEG のネットワーク形成を早めると、 G' の変化点も対応して早まることから支持される (図 1 中段、下段)。また完成後のゲルについて CD スペクトルを評価すると、RADA16 ペプチドの β シート由来のシグナル強度が、RADA16 単独ゲルのそれと同じであったことから、CH/PEG の有無によらず RADA16 物理架橋ゲルが形成されていることが確認された。またゲル前駆体混合溶液においては、RADA16 ペプチド単独より G' の初期の値が高く、CHI と PEG のゲルが構築されてゲルが完成することが回転式レオメーターを用いた。この条件においては、ただ溶液を混合するだけ、すなわち one-pot で IPN ゲルが作製可能で、実際に硝子軟骨を形成する足場として有用であることも確認した [S. Ishikawa et al., *Chem. Mater.*, 2020, 32(6), 2353-2365]。

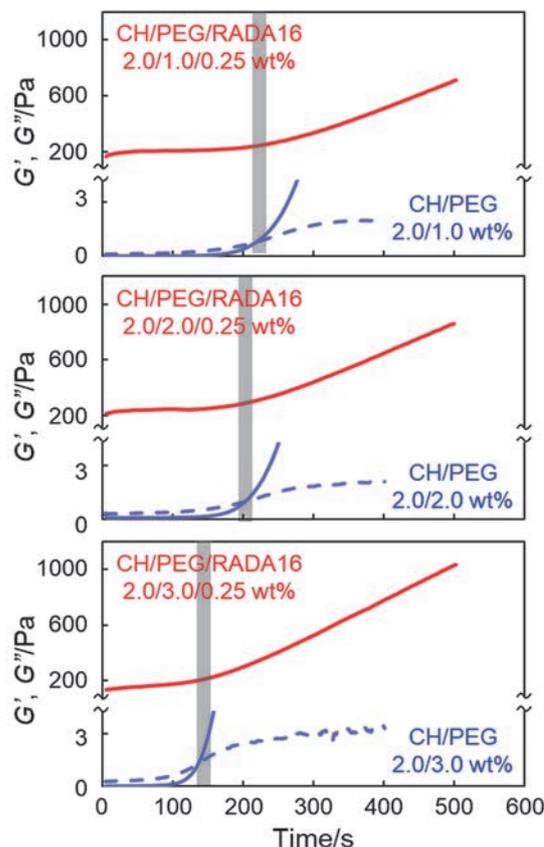


図 1. 回転式レオメーターによるゲル前駆体溶液の動的粘弾性の時間変化の評価。

(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 [S. Ishikawa et al., *Biomater. Sci. and Eng.*, 2019, 5(11), 5759-5769]、またさらに、内包した軟骨細胞のグリコサミノグリカン、コラーゲンといった細胞外基質の生成能が向上することが見出された (図 2)。また、遺伝子発現の評価から、分解性ゲル内で細胞が生産したコラーゲンは硝子軟骨の基質である II 型のコラーゲンであることが見出された。ゲルへの分解性の付与は、安全性のみならず、細胞外基質の産生及び蓄積

を促進し、軟骨細胞からの関節軟骨主要成分である硝子軟骨の形成の促進にも重要であることが見出された。

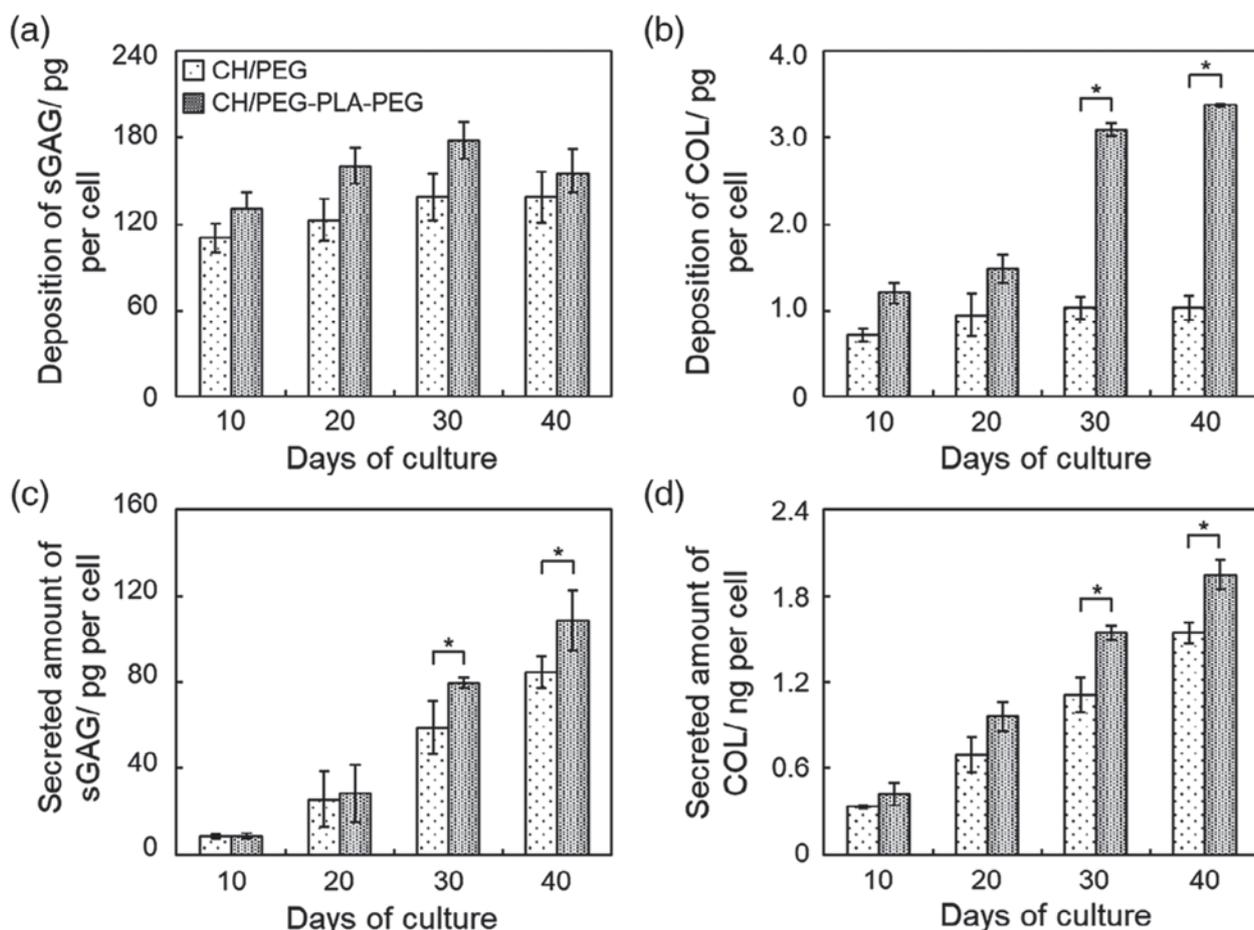


図 2. ウシ膝軟骨細胞の分解性ゲル (CH/PEG-PLA-PEG)、及び非分解性ゲル (CH/PEG) 内の培養にて産生された細胞外基質量。ゲル内に蓄積された(a)グリコサミノグリカン(b)コラーゲン。ゲル外に分泌された(c)グリコサミノグリカン(d)コラーゲン。

4. 研究の反省・考察

これまで、IPN ゲルを用いることによって、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た。一方、IPN ゲルを汎用性の高いものとするためには、例えば医学部などの外部研究機関で作製しても再現性高くかつ高機能を出すためには、より調製条件、形成過程、ゲル分解に対する細胞応答について深く考察し、いかにノウハウの部分を科学的に説明するかが重要であった。本年度はこの点を特に重視した検討を行い (特筆すべきこととして、これらの成果は国際誌 *Chemistry of Materials* の supplementary cover、*Journal of Applied Polymer Science* の front cover に選出)、IPN ゲルの社会実装への展望を広げることに注力した。今後は、医学部との共同研究により移植前臨床、臨床実験に着手していき (長崎大学医学部、東京大学医学部)、IPN ゲルを用いた軟骨再生の実用化に向けた研究体制を整えていく。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, Daisuke Matsukuma, Yukiyo Asawa, Kazuto Hoshi, Shigehito Osawa*, Hidenori Otsuka*. Interpenetrating Polymer Network Hydrogels via a One-pot and in Situ Gelation System Based on Peptide Self-Assembly and Orthogonal Cross-Linking for Tissue Regeneration. *Chemistry of Materials*, **2020**, 32, 2353-2364. **Supplementary Cover**.
- ② Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, Daisuke Matsukuma, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa*,

Hidenori Otsuka*. Enhanced function of chondrocytes in a chitosan - based hydrogel to regenerate cartilage tissues by accelerating degradability of the hydrogel via a hydrolysable crosslinker. *Journal of Applied Polymer Science*, **2020**, 137(19), 48893. *Front cover*

- ③ Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Kazutoshi Iijima, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa*, Hidenori Otsuka*. *N*-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. **2019**, 5(11), 5759-5769.
- ④ 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, *Biomaterials Science and Engineering*. **2019**, 5(11), 5688-5697.

(2) 口頭発表

- ① 山口紘、石川昇平、大澤重仁、飯島道弘、大塚英典 インシュリン様成長因子を化学固定した IPN ゲルの作製と固定化剤の長さ制御による軟骨細胞機能向上 第 68 回高分子討論会 2019 年 9 月 27 日
- ② 大澤重仁、石川昇平、飯島一智、飯島道弘、大塚英典 加水分解性リンカーを用いたハイドロゲル構築とその分解性が誘起する軟骨細胞足場材としての機能向上 第68回高分子討論会 2019年9月26日
- ③ 石川昇平、山口紘、飯島一智、大澤重仁、飯島道弘、大塚英典 成長因子固定型分解性インジェクタブルIPN ゲル中における軟骨組織再生機能 第68回高分子年次大会 2019年5月31日
- ④ Shigehito Osawa, Yukino Fukuda, and Hidenori Otsuka. Design of cationic glycopolymers and surface coating of nanoparticles for effective cellular uptake through glycoprotein receptor. 第68回高分子年次大会 2019年5月29日

(3) 出版物

- ① 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	同 志 社 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す 統合的研究	研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①抗重力筋活動 ②メタボリックネットワーク ③リハビリテーションデバイス ④健康寿命 ⑤脳活動 ⑥活性酸素 ⑦宇宙放射線		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 内 伸 好	理 工 学 部	教 授	抗重力筋活動促進装置の開発

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 平 充 宣	研 究 開 発 推 進 機 構	客 員 教 授	神経・筋の適応機構・抑制策の追究
井 澤 鉄 也	ス ポ ー ツ 健 康 科 学 部	教 授	骨格筋—脂肪組織間のメタボリックネットワークの 解明
櫻 井 芳 雄	脳 科 学 研 究 科	教 授	抗重力活動と脳・神経系関連の追及
加 藤 久 詞	研 究 開 発 推 進 機 構	特 別 研 究 員	骨格筋—脂肪組織間のメタボリックネットワークの 解明
河 野 史 倫	松本大学 健康科学研究科	准 教 授	神経・筋の適応機構・抑制策の追究
大 平 宇 志	研 究 開 発 推 進 機 構	特 定 任 用 研 究 員 学 術 研 究 員	神経・筋の適応機構・抑制策の追究

宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究

1. 研究の目的

(1) 超高齢社会を迎えた我が国においては、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）や骨粗鬆症など運動器障害によるロコモティブシンドローム（運動器障害）の増加が見られ、また身体の不活動やエネルギー消費のアンバランスにより糖尿病や高血圧を発症するメタボリックシンドローム（代謝障害）も増加している。それらの予防と改善のためにはこれらの身体諸機能の低下が起こる原因の解明と対処策の構築が必須である。ロコモティブシンドロームの最大の原因は抗重力筋活動の低下・抑制にある。抗重力筋活動抑制は筋萎縮のみならず、脳における遺伝子やタンパク質発現の変化等も誘発するとされている。さらに、抗重力筋などの骨格筋は脂肪組織の代謝と相互作用していることから、骨格筋の萎縮はメタボリックシンドロームやサルコペニア肥満に繋がっている。一方、身体諸機能の低下は宇宙環境滞在などの微小重力環境下で助長されることが分かっており、微小重力環境暴露によってロコモティブ・メタボリック両シンドロームの進展過程が増幅されることも分かっている。すなわち、微小重力環境を利用した研究は、両シンドロームの原因と対応策を追究するうえで格段に優れており、地球上での微小重力の模倣環境下や宇宙空間での身体諸機能を追究する「宇宙生体医工学」を応用することで、地球上における健康長寿の獲得を目指した研究が可能となることから、次の各分野において研究に取り組む。

- ① 生理学：ラットやマウスにおける重力レベルに応じた発育や老化、日常生活における抗重力筋の張力発揮、運動神経活動や代謝活性レベルが、抗重力筋、脳・運動神経の可塑性に及ぼす機構を追究する。老化や身体活動抑制は、生体に悪影響を及ぼす活性酸素産生を助長し、宇宙環境では、長期間飛行中の宇宙放射線被曝も憂慮される問題である。そこで、マンガン・スーパーオキシド・ディスムターゼ (MnSOD) 等を使ったこれらの抑制処方の解明も目指す。
- ② 生化学：骨格筋-脂肪組織間のクロストークを仲介する生理活性物質の発現・分泌に及ぼす抗重力筋活動や不活動、老化が及ぼす影響を追究し、その調節機構の詳細と新規調節物質の同定、ならびに脂肪組織の脱分化・形質転換や体脂肪量・分布を決定する因子を明らかにするための、脂肪由来幹細胞の分化調節に及ぼす影響を解明する。こうした知見から、肥満症の予防や治療（新規運動療法の提案や創薬）に貢献する基盤的知見を提供し、メタボリックシンドロームを防止・抑制する処方策の開発に繋げる。
- ③ 神経科学：抗重力筋活動抑制や運動が脳や神経系に及ぼす影響を解明する。動物の筋活動や運動機能の計測と神経回路の活動を測定する電気生理学および免疫組織化学を組み合わせることで、身体機能と脳機能の相互作用を明らかにし、身体運動の負荷により生じる神経細胞の活動や新生を解析することで、衰えた脳機能を活性化するための身体トレーニング法や新たな運動療法、リハビリテーション方策を提案する。
- ④ 生体医工学：アメリカ航空宇宙局ジョンソンスペースセンター（NASA JSC）保有の重力免荷能動制御システム（ARGOS）や反重力トレッドミル、弾道飛行実験による微小・低重力模擬環境下で、歩行やランニングの実験を行い、ウェアラブルな歩行解析システムを使って、下肢抗重力筋の活動状態と機能発揮状況をより詳細に解明する。下肢抗重力筋に有効な刺激や負荷を与え、足首を積極的に動かすことで、自分の意思で歩行面を蹴ることが可能な自走式トレッドミルを開発し、有人探査時の宇宙飛行士の運動処方や飛行前歩行訓練に役立つ新規トレーニング方法の提案、リハビリテーション処方や装置の開発に繋げる。

2. 研究の計画

- (1) ①②③で行う動物実験による基礎研究での検証と④での歩行解析などによるヒトの活動状況の研究により新規の運動療法や装置の開発を目指す。
 - ① ジェノヴァ大学（イタリア）との共同実験によりヨーロッパ宇宙技術研究センター（オランダ）にて動物用遠心機を用いた実験を行い、過重力負荷に対する生理的特性の適応を追求する。2009-2010年実施の宇宙飛行実験等と同種のマウスを30日間、3-G環境で飼育した場合の各種臓器特性を、1-G環境飼育群と比較する。また、老化促進マウスを用いて、老化、活性酸素産生、X線照射に対する生体反応をMnSOD投与が抑制するか否か追求する。
 - ② ①と共同で作製した3-G負荷マウスの骨格筋組織ならびにADSCに発現するmRNA発現変化をDNAマイクロアレイ法によって網羅的に解析し、3-G負荷に応答する標的候補遺伝子（群）を探索する。さらに、脂肪組織-骨格筋のメタボリックネットワークを仲介する脂肪細胞の新規アディポカインを探索するため、ADSCを脂肪細胞に分化させた後に培地を回収し、2次元電気泳動法によって脂肪細胞から分泌されるタンパク質全体の発現状況に及ぼす3-G負荷の影響を検討する。
 - ③ ①、②と共同で作製する運動負荷装置を用いてマウスとラットに自発的運動を一定時間行わせる。そして運動中と運動前後の抗重力筋の変化をリアルタイムで測定すると同時に運動野と大脳基底核の神経細胞の活動も測定する実験システムを開発する。
 - ④ NASA JSC保有の重力免荷能動制御システム「ARGOS」と申請者らの開発した「ウェアラブルな歩行解析システム」を用いて床反力など周囲環境との相互作用情報の計測を行う。空間的な制約を受けることなく負荷状態や関節角度、表面筋電位に基づく下腿骨格筋群の筋活動量を計測し、生体力学的データ解析を行うことで定量的な運動評価指標となる特徴量を抽出する。

3. 研究の成果

- (1) ①生理学、②生化学、③神経科学、④生体医工学の4つの研究テーマ毎に、個々の成果を導出した。
 - ① ヨーロッパ宇宙技術研究センター（オランダ）での動物実験の予定がジェノヴァ大学の都合で延期となった。ジェノヴァ大学での研究計画や実験マウスの変更について打ち合わせを実施した。その結果、2019年7月に本実験のpre-testとして、15日間連続の3-G負荷を行い、アムステルダム大学（オランダ）で解剖・サンプリングを実施した。足底筋におけるタンパク質発現の分析を進行中である。

老化促進マウスにおける老化に伴う活性酸素産生およびX線照射による生体への悪影響がMnSOD投与で抑制できるか追求する実験も行った。ヒラメ筋における遺伝子発現の網羅的解析から着手した結果、コントロールとしてrMnSODに変えてphosphate-buffered saline (PBS)を投与した群では、実験前に比べて3か月間の実験後には2倍以上発現が増えたり、半分以下に減った遺伝子発現が認められたが、rMnSOD投与により顕著にその数が減少した。老化現象がrMnSOD投与により、抑制されたことが示唆された。しかし、X線照射の影響のみに対する効果については大きな変化がみられなかった。

骨格筋は抗重力活動の抑制で萎縮し、その促進で肥大するが、そのメカニズムを解明する目的で学外の共同研究者たちと長年骨格筋の萎縮・肥大における筋温の影響を追求してきた。2019年には、ブピバカインの注入による筋損傷の回復が温熱刺激で促進する機構に72-kDa heat shock protein (HSP72)が関与するという成果を論文にこぎつけることができた。筋損傷の誘発に伴い顕著にup-またはdown-regulationした遺伝子発現が、温熱刺激で顕著に抑制された。この現象には、損傷筋の毛細管内に発現が増えるHSP72がkey factorとなっているという示唆を得た。

- ② ヨーロッパ宇宙技術研究センターにて作製予定だった3G負荷マウスは、上記によりに実施に至らなかった。しかし、微小重力・過重力環境細胞培養装置 (Zeromo) を使用した研究は概ね順調に進み、ラット皮下脂肪組織から単離したADSCの脂肪細胞への分化能に及ぼす重力の影響を検討した。加えて、9週間の運動トレーニング (TR) を実施したラットから同様のADSCを単離し、重力の影響に対する運動効果も検証した。その結果、微小重力により脂肪細胞への分化が促進するものの、TRを課した個体から得たADSCでは、模擬微小重力による分化能促進効果が消失することを発見した。また、過重力 (3G) はADSCの脂肪細胞分化能に大きな影響を及ぼさない可能性も示唆された。現在、RNA-seq解析を委託しており、ADSCに及ぼす模擬微小重力の影響を網羅的に解析し、標的候補遺伝子を探索中である。こうした成果の一部は、国際学会で発表し、さらに追試を行なった後、論文公表の予定である。

脂肪組織-骨格筋のメタボリックネットワークを仲介する脂肪細胞の新規アディポカイン探索については、運動トレーニングを実施したラット皮下脂肪組織から単離したADSCとマウス由来筋芽細胞株C2C12を共培養した結果、インスリン刺激によるインスリンシグナルの増強がみられた。しかし、2次元電気泳動を実施するまでは至らず、次年度に持ち越すこととなった。この2次元電気泳動法はRNA-seq解析による方法に変更する予定である。

- ③ ラットに自発的運動を一定時間行わせるコンピュータ制御の実験システムを開発した。また、3D深度カメラによりラットの全身運動をリアルタイムで観察し記録すること、および頭部に取り付けた加速度センサーとジャイロセンサーにより頭部の動きを方向と速度も含め詳細に検出することも可能となった。さらに運動野や大脳基底核の神経細胞の活動と抗重力筋の活動を同時計測できる記録システムも開発した。運動負荷装置については、これら実験システムおよび記録システムと組み合わせ可能な装置の設計を進めている。

- ④ NASA JSCとの共同研究をすすめるためにNASA eIRBの承認を受けたが、共同研究契約の途中で契約の見直しが行われ、またJSCの共同研究者の担当部署異動などの要因が重なり、それ以降契約が進んでいない。低重力環境を模擬可能な「反重力トレッドミル Alter-G」を使用した低重力環境下の歩行状態をウェアラブル計測装置によって計測し、歩容の変化と下肢抗重力筋の活性化度を実験運動解析とシミュレーションによって明らかにした。

低重力環境下で下肢三頭筋の筋活性度が低下することが確認されたので、計画通り自走式トレッドミルを試作し運動計測と表面筋電位計測を実施して、抗重力筋に及ぼす影響を検証した。負荷を制御することにより、下肢三頭筋の活性度が向上することが明らかとなった。検証結果に基づき、スプレッド型のトレッドミルをシングルベルト型に改良し適切な負荷制御法を検討する。

NASA-JSCの「ARGOS」の使用に係わる契約が進まないため、上下方向と進行方向に自由度を有する重力免荷能動制御システムの開発に着手した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究プロジェクトは学内において運営委員会をおき、自己評価、外部評価をふまえ研究の進捗を点検、次年度の計画に反映させる体制をとっており、研究計画の変更などにも応じた研究のマネジメントを実施している。

今年度は、生理学チームとジェノヴァ大学 (イタリア) の共同研究の予定が大きく変更となった。これはジェノヴァ大学と共同でヨーロッパ宇宙技術研究センター (オランダ) にて実施予定であったマウスの実験の実施時期をイタリア側が延期することになったことが要因である。しかしながら、ジェノヴァ大学への出張を経て、計画の見直しを行い、共同実験のメンバーであるアムステルダム大学 (オランダ) での解剖とサンプリングを実施することができた。当初予定のヨーロッパ宇宙技術研究センターの施設を利用した共同実験については、新型コロナウイルス感染症の影響等で実施の目途がたたない状況であるが、海外連携機関とは情報交換を引き続き実施し、国内でオス Wistar Hanover ラットにおける老化および身体活動現象に伴う活性酸素産生増大による生体諸機能への悪影響の抑制が、骨格筋等の特性に及ぼす影響を追求する。

また、NASA-JSC との共同研究の実施についても、上述の状況で計画変更が必要になっている。当初の計画から研究の遅れが懸念されるが、NASA-JSC での実験に替えて、国内での負荷制御の実験に対応する重力免荷能動制御システムの開発に着手するなど、多方面から研究の方法を検討する機会となった。

新型コロナウイルス感染症拡大の影響により、海外研究機関に出向いて実験する方法は、次年度においても厳しい状況が続くことが懸念されるため、国内での研究に重点を置き、プロジェクト内の成果の導出につなげる予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①

Ohno, Y., T. Egawa, S. Yokoyama, H. Fujiya, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, and K. Goto. MENS-associated increase of muscular protein content via modulation of caveolin-3 and TRIM72. *Physiol. Res.* 68: 265-273, 2019.

Kami, K.*, T. Ohira*, Y. Oishi*, T. Nakajima, K. Goto, and Y. Ohira. Role of 72-kDa heat shock protein in heat-stimulated regeneration of injured muscle in rat. *J. Histochem. Cytochem.* 67: 791-799, 2019.

②なし

③

Takamiya, S., Yuki, S., Hirokawa, J., Manabe, H. and Sakurai Y. (2019) Dynamics of memory engrams. *Neuroscience Research*, In press.

Song, K., Takahashi, S. and Sakurai, Y. (2019) Reinforcement schedules differentially affect learning in neuronal operant conditioning in rats. *Neuroscience Research*, In press.

Yuki, S., Sakurai, Y. and Okanoya, K. (2019) The utility of internal cognitive states as discriminative cues affecting behavioral adaptation in humans and animals. *Animal Behavior and Cognition*, 6(4), 262-272.

Nakazono, T., Takahashi, S. and Sakurai, Y. (2019) Enhanced theta and high-gamma coupling during late stage of rule switching task in rat hippocampus. *Neuroscience*, 412, 216-232.

Murata, K., Kinoshita, T., Fukazawa, Y., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Miyamichi, K., Okuno, H., Bito, H., Sakurai, Y., Yamaguchi, M., Mori, K and Manabe, H. (2019) GABAergic neurons in the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice. *Scientific Reports*, 9(article7132), 1-14.

Ohnuki, T., Osako, Y., Shiotani, K., Sakurai, Y. and Hirokawa, J. (2019) Single-neuron and population codings in a higher-order cortical area. *The Proceedings of the 29th Annual Conference of the Japanese Neural Network Society*, pp.89-90.

④

北野敬祐、伊藤彰人、辻内伸好「慣性センサを用いた前腕および手指運動計測システムの開発」
[設計工学, Vol.54, No.4 [DOI:10.14953/jjsde.2018.2815], (2019年4月) 231~244頁]

H.Oshima, S.Aoi, T.Funato, N.Tsujiuchi and K.Tsuchiya “Variant and Invariant Spatiotemporal Structures in Kinematic Coordination to Regulate Speed During Walking and Running” *Frontiers in Computational Neuroscience*, Vol.13 [DOI:10.3389/fncom.2019.00063], (2019.9), pp.1~11

(2) 口頭発表

①

Ohira, Y. Neuromuscular responses to gravitational load levels. Doshisha Week, Tubingen University, Germany, November 25, 2019. (招待講演)

大平充宣、同志社宇宙 DREAMプロジェクト、第 65 回日本宇宙航空環境医学会大会、特別セッション SS-1、2019 年 11 月 30 日、松本大学、2019 (招待講演)

②

加藤久詞、前田優希、大澤晴太、大平充宣、井澤鉄也、脂肪由来間葉系細胞の脂肪細胞への分化能に及ぼす微小重力および運動の影響、第 65 回日本宇宙航空環境医学会大会、特別セッション SS-3、2019 年 11 月 30 日、松本大学、2019 (招待講演)

Kato H., Osawa S., Imai K., Takakura H., Ohira Y. and Izawa T. Effect of exercise training on neurogenesis of adipose-derived stem cells isolated from fat-depot in high-fat diet-fed rats. *Cell Symposia: Exercise Metabolism Conference 2019*, Stiges, Spain, May 5-7, 2019.

井澤鉄也、脂肪組織の質と量を転換させる運動療法の分子基盤、第 74 回日本体力医学会大会、つくば国際会議場 (茨城)、2019 年 9 月 19-21 日 (招待講演)

加藤久詞、大澤晴太、只野愛美、前田優希、高倉久志、井澤鉄也、運動トレーニングに伴う体重・体脂肪量調節に及ぼすメラトニンの影響、第 74 回日本体力医学会大会、つくば国際

会議場（茨城）、2019年9月19-21日

Ohira, Y., Y. Ozaki, H. Kato, and T. Izawa. Effects of inhibition of reactive oxygen species on the properties of rat soleus muscle during hindlimb suspension. Doshisha Session in the 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology, May 27, 2019, Nagoya University, Japan, 2019. (招待講演)

③

櫻井芳雄・宋基燦 (2019) ラットの身体運動と脳神経活動それぞれを増強する条件づけ訓練、第65回日本宇宙航空環境医学会大会、松本大学（長野県・松本市）、2019年11月30日

櫻井芳雄 (2019) 心を知るために神経細胞の活動を記録する－文魂理才の脳研究、滋賀大学データサイエンス学部文理融合探求ワークショップ/データサイエンスセミナー、彦根 (2019年11月15日)

櫻井芳雄 (2019) セル・アセンブリの実験的検出－なぜ、どのようにして、玉川大学先端セミナー、町田 (2019年10月28日)。

Sakurai, Y. (2019) Brain freedom from body: Enhancement of neuronal activity by brain-machine interface (BMI) in the rat. 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology (ISGP). 名古屋大学野依記念ホール（愛知県・名古屋市）、2019年5月27日

(3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	光 — 化学エネルギー変換デバイスの材料設計 — 半導体工学と電気化学の協奏 —		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①エネルギー変換 ②半導体工学 ③電気化学 ④太陽電池 ⑤化学電池 ⑥バンド構造			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
荒 木 努	理 工 学 部	教 授	研究代表者総括 半導体材料設計

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
稲 田 康 宏	生 命 科 学 部	教 授	実験 放射光測定
今 田 真	理 工 学 部	教 授	データ整理 界面反応機構の解析
滝 沢 優	理 工 学 部	教 授	データ整理・論文作成 界面電子状態の理論的解析
折 笠 有 基	生 命 科 学 部	准 教 授	実験・論文作成 電気化学測定
片 山 真 祥	総合科学技術研究機構	准 教 授	実験 材料合成

光－化学エネルギー変換デバイスの材料設計

－半導体工学と電気化学の協奏－

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

再生可能エネルギーは発電量が一定でなく、発電比率の劇的な向上が難しい。そのため、蓄電池を利用し、発電した電力を貯蔵することや、水素エネルギーに変換する技術開発が進んでいる。太陽光発電の場合は、光→電気→化学エネルギーへとエネルギーを変換する。一般に、エネルギー変換効率は100%ではなく、ロスが生じるため、変換の回数は少ないことが望ましい。そこで本研究では、光エネルギーから化学エネルギーに直接変換可能なデバイスを実現し、再生可能エネルギーの劇的な普及の端緒となることを目的とした基礎研究を行う。

光－化学エネルギー変換の現象自体については1983年にTributschが報告しており、光エネルギーを駆動力として、イオンの挿入脱離反応が発現することが知られている[1]。しかし、この分野の研究は、光－電気エネルギー変換（太陽電池）、電気－化学エネルギー変換（電池）と比較すると、顕著な研究の発展に至ってはいない。近年では、電池材料の研究成果を利用した、光エネルギーによる電池の直接充電が報告されるようになったが、その変換効率は1%に満たず、充電時間が十数時間必要とされる[2]。従って、変換効率と入力特性を劇的に向上させる新たなアプローチが必要である。

(2) 本研究の特徴

光エネルギーの工学的利用には、太陽電池の研究を代表とする「半導体工学」の基礎学理が必須であり、化学エネルギー利用では、電池関連を取り扱う「電気化学」の研究が求められる。そこで本研究では、それぞれの分野で専門知識を有する研究者が共同して光－化学エネルギー変換のブレークスルーを目指す。ブレークスルーを引き起こすために、電池を構成する正極・負極をどちらも光エネルギーによって応答する材料を見だし、「ダブルアシスト」型の光充電機構を実現させる。従来型の光－化学エネルギー変換デバイスでは、正極・負極どちらか一方の電極を光エネルギーにより、イオンを挿入脱離させることで、充電反応を発現させていた。電池反応では、正極・負極どちらも、イオンの挿入脱離反応が進行して初めて充電反応が実現する。そのため、光エネルギーによる駆動力を片方の電極のみに与えても、別の電極での反応に駆動力が無ければこれが律速反応となる。この仮説を検証して、作動原理を明らかにした上で、光エネルギーによる充電反応の高効率化と高入力特性を実現させる。

(3) 本研究の概要

本研究では次の3項目から構成される。1) 既存材料を用いて光－化学エネルギー変換の発現機構を、半導体工学の考え方に基づいて検証する。特に、電極材料のバンドギャップに着目して整理する。これはデバイス設計のために必要不可欠な基盤情報となる。2) 光エネルギーを駆動力とするイオンの挿入・脱離反応の変換効率と入力特性を、単極の場合と、二電極による場合で比較する。「ダブルアシスト」型の原理検証を行う。3) 光－化学エネルギー変換の反応場である電極・電解質界面における電子構造を解明した上で、更なる反応速度の向上を目指す。上記で得られた研究成果により、実用面では、光－化学エネルギー変換による新規デバイスの実現、学術面では、半導体・イオン伝導体界面の新しい科学の創出につながることを期待できる。光エネルギーによる充電反応が実用化されると、資源の乏しい我が国の社会・産業面に有益な、環境負荷の小さい低コストなエネルギー貯蔵が実現できる。

[1] H. Tributsch, *Solid State Ionics*, **9-10**, 41-58 (1983).

[2] A. Paolella *et al.*, *Nature Comm.*, **8**, 14643 (2017).

2. 研究の計画

(1) 本研究の基盤となる、モデル試料の作製とキャラクターリゼーション、電気化学測定データを取得するとともに、リチウム対極を用いて、単一電極の光充電に関する情報を取得し、光－化学エネルギー変換の発現機構を、半導体工学の考え方に基づいて検証する。

①モデル試料の作製

キャリアイオンとしてリチウムイオンを用い、挿入・脱離が可能なホスト構造を電極材料として用いる。充電反応では正極にリチウムイオンが挿入し、負極から脱離する。n型半導体の場合、光エネルギーによりリチウムイオンが挿入し、p型半導体の場合、脱離する。したがって、n型半導体を正極、p型半導体を負極に用いる。既存のリチウムイオン電池材料系を参考にし、酸素欠損型の LiMn_2O_4 をモデル正極、ボロン置換のシリコンをモデル負極として電極を作製する。反応場は電極・電解質界面であり、反応を正確に規定するために、薄膜モデル電極を作製する。

②試料のキャラクタリゼーション

作製した薄膜試料は、X線回折測定による結晶構造解析、X線光電子分光およびX線吸収分光測定による電子構造解析、透過型および走査型電子線顕微鏡による形態観察、ホール測定とゼーベック測定によるn型-p型半導体の判別と移動度の計測、光吸収測定によるバンドギャップの算出を行い、それぞれの基礎物性を測定する。

③薄膜試料の電気化学測定

薄膜試料の電気化学測定を行う。3極式のセルをアルゴン雰囲気下のグローブボックスで作製する。対極、参照極はリチウム金属、電解質に LiPF_6 をカーボネート系の有機溶媒に溶解した液体を用いる。サイクリックボルタモグラム、定電流充放電測定により、リチウムイオン電池としての特性を計測するとともに、間欠充放電測定や交流インピーダンス測定により、リチウムイオン拡散係数や熱力学パラメーターの情報を得る。

④光充電の特性試験

光透過型の3極式セルを新たに設計する。電位と電流をモニターしながら、キセノンランプによりモデル電極の光応答性を計測する。光-化学エネルギー変換における入力特性と変換効率の解析方法について、一連の測定・解析手法を確立する。

3. 研究の成果

(1) モデル試料の作製

計画を大幅に上回る種類のモデル試料を作製して、その効果を検証した。より具体的には酸素欠損型 LiMn_2O_4 やp型シリコン単結晶以外にも、色素混入型 LiFePO_4 、n型半導体の MoS_2 を作製した。

(2) 試料のキャラクタリゼーション

作製したモデル試料について、X線回折測定等により、基本的なキャラクタリゼーションを行った。

(3) 試料の電気化学測定

電気化学測定により、リチウムイオンの挿入脱離挙動について検証した。

(4) 光充電の特性試験

①測定系の確立

光透過型の3極式セルを新たに設計した。また、キセノンランプを用いた実験系を新たに組み上げて、光充電反応が検証できるシステムを確立した。

②各種試料の測定

電位と電流をモニターしながら、キセノンランプによりモデル電極の光応答性を計測した。電解質にリチウムイオンを含むセルを用いて、正極・負極に挿入脱離しない金属板上では、光応答が観測されないことを確認した後に、各モデル電極の光応答性を検証した。その結果、p型シリコンでは、光照射時に明確な応答を示す電流が観測された。一方で、 LiMn_2O_4 では、観測された電流値は一桁程度小さい値であった。

③光充電試料のキャラクタリゼーション

光応答電流の反応機構解析を立命館大学SRセンターでのX線吸収分光測定により実施した。より大きな電流が観測されたp型シリコンにおいては、光照射のみでリチウムがシリコンとの合金化反応を進行させていることを明確に示した。一方で、より光電流が小さかった試料については、リチウムイオンの明確な寄与が確認できなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 光充電のメカニズム

本研究では、光照射により、電極・電解質界面における電荷移動反応が進行して、光充電反応が可能であることを実証した研究として、非常に有用である。そのメカニズムを図1に示す。p型半導体のシリコンと電解質の界面においては、異なるフェルミ準位の差を埋めるようにバンドの屈曲が起こる。この状態で光が照射されると、励起された伝導帯中の電子と電解質中のカチオンによる電荷移動反応が進行して、半導体中にリチウムイオンが挿入される。今回、リチウムイオンの反応を検出した X 線吸収分光では、測定する深さ領域はサブマイクロメートル以上あり、これはキャパシターの反応ではない。したがって、本研究では、シリコン電極の光充電を初めて実証したケースであり、その研究手法は今後のデバイス創製へ向けて極めて有用である。

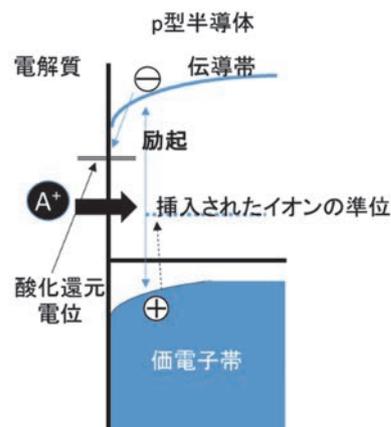


図1 p型半導体と電解質の界面における描像

(2) 今後の課題

本研究では、革新的なデバイスの構築をターゲットにして、光エネルギーから化学エネルギーへの直接変換反応の実証を行った。本研究結果から、リチウムイオン電池シリコン負極における明確なリチウム合金化反応が検出された点は、極めて有用な成果であると言える。しかしながら、この反応は、一般的な認知度が低く、研究を継続する審査過程においては残念ながらその有用性が認められなかった。今後は、本研究の先駆性と、理論面の強固なサポートをよりわかりやすく説明して、この現象の認知度を広めることが重要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

- ①Nur Chamidah, Yuki Orikasa, “Electrochemical Response in Photo-charging for Lithium-ion Battery” The 8th International Conference of The Indonesian Chemical Society, 2019年8月
- ②S. Mouri, Y. Komichi, K. Shinokita, K. Matsuda, and T. Araki, “Photoluminescence Properties of MoS₂/GaN Hetero Structure”, Recent Progress in Graphene & 2D Materials Research (RPGR 2019), 2019年10月
- ③Nur Chamidah, Yuki Orikasa, “Electrochemical Response in Photo-charging for Lithium-ion Battery using LiFePO₄ and Si Semiconductor” The 10th Asian Conference on Electrochemical Power Sources, 2019年11月
- ④Nur Chamidah, 折笠有基, “Electrochemical Response in Photo-assisted Lithium-ion Battery”, 2019年度 第3回 関西電気化学研究会 2019年12月

(3) 出版物

なし

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 工 学 部	教 授	ナノファイバー物性評価と組織親和性評価

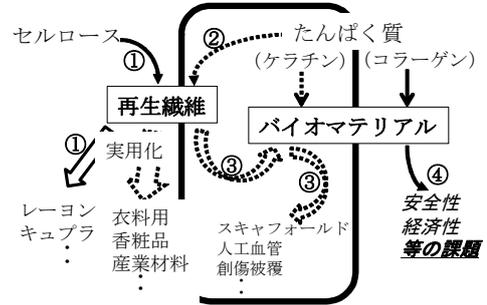
動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用

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”に精製抽出されたケラチンを利用し、エレクトロスピンニングにより形成された成型物の物性評価と生体材料化の可能性を評価することである。その応用化ターゲットとして、癒着防止膜にターゲットを絞った。

(2) 研究項目

今年度実施した項目は以下の通りである。

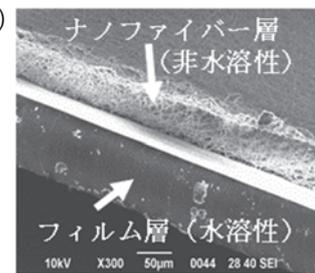
- ① 異種類ヒト毛髪ケラチンを用いたエレクトロスピンニングにおける条件パラメータの設定
- ② 作成ナノファイバー（フィルムを含む積層膜）の物性評価とそれを受けた改善検討
- ③ ナノファイバーシート（積層膜）の生体親和性評価（in vivoおよびin vitro）

3. 研究の成果

上記研究項目について検討を実施した成果は以下の通りである。

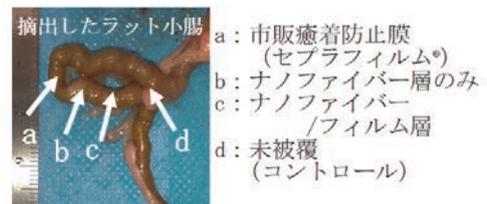
①について：研究開始当時の当初予定から実施内容を一部変更し当該項目を追加で実施した。その経緯は、研究の進捗に伴い応用化対象を具体的に絞り込んだことが挙げられる。本申請者の先行研究で得られた羊毛由来の酸化抽出ケラチンによる応用化(人工血管、創傷ドレッシング材等)に対し、本研究で得られたヒト毛髪由来還元抽出ケラチンの特性は、細胞接着性や増殖性において異なることが判明した。そして、その特性を活かしたバイオマテリアル応用例として、癒着防止膜への応用展開に着想した。その応用展開に向け、本年度に実施した当該項目では、細胞との接着性に差をつけるため、ナノファイバーに配向性を持たせ、異方性を持つナノファイバーの積層化を達成した。同様に、ナノファイバーとフィルムの積層化も達成した。

②について：当該項目では、力学特性を中心に積層膜の物性評価を行い、①にフィードバックしながら物性の向上を図った。具体的には、癒着防止膜としてハンドリングと強度を評価の対象とした。ナノファイバー、フィルム単独での特性と、それらの複合化の際の差異について力学試験を中心にデータを蓄積した。(データ詳細は、論文化のために省略) 右写真はそれの検討を行い制作した複合体の一例であり、膜厚の調整、組成の調整を行い、後述するように癒着防止膜として最も優れた効果が得られたナノファイバー/フィルム積層膜の例である。



③について：両表面の特性に変化を持たせることが、強度・分解・細胞親和性の観点から癒着防止膜に有効であった。この検討と並行して、(D)に相当するナノファイバーやフィルム上での繊維芽細胞を用いた細胞培養評価では、概ねフィルム層では細胞接着性が高い一方、ナノファイバー層ではそれが低く表面形体の変化で細胞増殖性を制御することも可能であった。これら in vitro での基礎データとの相関を検証するため、同じく(D)に相当する事項として、ウイスター(WI)系ラットを用いた in vivo 評価の一部を先行実施した。

右写真は、ラット小腸に対し癒着モデルを作成し、創傷部を種々の被覆材で覆い、所定期間後に摘出した例である。ナノファイバー層のみ(b)、及びコントロール群(d)で強い癒着が認められる。一方、ナノファイバー/フィルム積層膜(c)を被覆した創傷部は、市販癒着防止膜(a)に匹敵する癒着防止効果を示した。



このように、当該年度の成果として得られたことは、ヒト毛髪由来ケラチンから作成した積層膜が癒着防止膜として有効である可能性を示す基礎的知見である。今後、ナノファイバーやフィルムの分解性制御や物性コントロール等を実施すると共に、生体反応を詳細に評価する必要がある。

4. 研究の反省・考察

現時点までに得られたデータは、癒着防止膜に応用化可能か否かの基礎判定に用いるだけのデータに過ぎない。今後、更に詳細に評価するために必須なことは以下の事項である。

① 膜構造と癒着防止効果の関連性

現時点では、結果的に良好な成果が得られたまでの内容に過ぎず、その考察が不十分である。膜厚、膜の表面微細構造、膜の分解性、等、癒着防止に関連するパラメーターの影響を系統的に評価していく必要がある。

② 組織学的評価

現時点での癒着防止評価は、目視的な判定のみであり、不十分である。その正しい評価のためには、組織学的評価を行い、免疫組織染色により内膜の再生過程を追跡していく必要がある。

以上の反省点は、2020年度研究検討項目において取り入れ、改善を図る。

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*、72(7)、459-73、2019

(2) 口頭発表

- ① Kazuya Sawada, Yuya Tanaka, Toshiya Fujisato, Biological Fiber Processing Utilizing Supercritical Fluid, ATC-14 (Shaoxing/Hangzhou, China), 2019.9.26-29
- ② Kazuya Sawada, Yuna Kume, , Toshiya Fujisato, Fabrication of an Antiadhesive Material Using Human Hair Kerati, TERMIS AM (Orlando), 2019.12.2-5
- ③ 岸田晶夫、藤里俊哉、澤田和也、生体組織の超臨界流体処理とその組織工学への応用、生体医工学共同研究拠点 成果報告会、新型コロナウイルスの影響にて要旨の発刊のみ。P. 14
- ④ 平井彩香、澤田和也、藤里俊哉、動物毛由来ケラチンタンパクを用いた癒着防止膜、ライフサポート学会、新型コロナウイルスの影響にて要旨の投稿のみ

(3) 出版物

なし

学 校 名	工 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	不活性化酵素、偽遺伝子からの活性化酵素の作成 —酸性キチナーゼの構造、活性と進化—		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①酸性キチナーゼ ②不活性化酵素 ③偽遺伝子 ④活性化酵素の作成			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 山 文 隆	先進工学部生命科学科	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

不活性化酵素、偽遺伝子からの活性化酵素の作成 —酸性キチナーゼの構造、活性と進化—

1. 研究の目的

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、カニなどの甲殻類、昆虫、真菌類などの多様な生物 (これらをキチン含有生物と呼ぶ) の主要な構成成分である。このため、キチンは、セルロースの次に豊富に存在するバイオマスである。

昆虫は、良質なタンパク質、脂質、糖質、そして様々なミネラルに富むので、高栄養価である。そのため、現在、世界的に「昆虫の飼料化」が注目されている。しかし、キチン含有生物を家畜飼料として利用する試みは進んでいない。これは、昆虫の主要な構成成分のキチンが、動物体内で、難消化性の食物繊維である、と長い間考えられてきたことによる。

ヒトとマウスは内在性のキチンを持たないが、キチンを加水分解する酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia; 別名称 acidic mammalian chitinase, AMCase) を発現している。最近、研究代表者らは、マウス、ブタ、ニワトリ (雑食性動物) の胃で、Chia タンパク質が多量に発現し、胃や腸の条件下で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し、キチンを、炭素、窒素そしてエネルギー源である (GlcNAc)₂ へと分解することを報告した [Ohno et al., (2016) *Sci Rep.* 6, 37756; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 6662; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 12963]。これに対し、イヌ、ウシなどの肉食性と草食性動物の Chia は、雑食性動物の Chia と比べ、キチンの分解活性がとて低かった (図1)[Tabata et al., (2018) *Sci Rep.* 8, 1461]。さらに、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマでは Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた (Tabata et al.,未発表データ)。

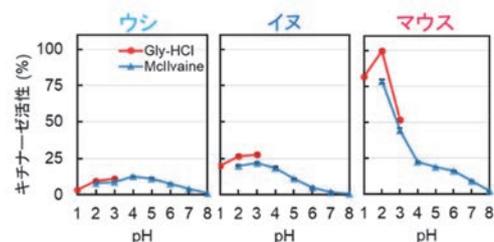


図1. ウシ、イヌ Chia のキチナーゼ活性測定。縦軸はマウス Chia の値を 100% とした相対活性。

これまでの研究で提示された問題点は以下の 2 点である。

- ① イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia のキチナーゼ活性は、なぜ低いのか？
- ② 肉食性動物のネコ科で見つかった Chia の偽遺伝子化の意義はなにか？

研究代表者らのこれまでの研究で提示された問題は、「肉食性と草食性動物における Chia の不活性化と偽遺伝子化」である。本研究は、「不活性化酵素、偽遺伝子からの活性化酵素を作成し、Chia の不活性化、偽遺伝子化のメカニズムを明らかにする」ことを目標とする。以下の 2 項目を研究した。

研究項目①：キチナーゼ活性の低いイヌ (肉食性動物) あるいはウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする。

研究項目②：活性化 Chia の遺伝情報を参考に、Chia の偽遺伝子から活性化キチナーゼを作成し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする。

2. 研究の計画

研究項目①：マウス、ウシ、イヌの Chia の一次構造は、同一性が 79-80% で、良く似ている。しかし、ウシ、イヌ Chia のキチナーゼ活性は、マウスのそれぞれ 1/10、1/4 であり、不活性化していた (図1)。そこで、活性の高いマウス Chia と活性の低いウシあるいはイヌ Chia 間で 6 種類のキメラ体を作製した (図2)。キメラ体の構造と酵素活性の関係から活性低下に関わる領域を絞り込み、アミノ酸置換体を導入することで原因アミノ酸を同定した。そして、肉食性動物全体で、Chia 遺伝子におけるそのアミノ酸の保存性を検討した。

研究項目②: 活性が高いマウス Chia の遺伝情報を参考に、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマの Chia 偽遺伝子から活性化 Chia 酵素の作成を試みた。

3. 研究の成果

研究項目①: キチナーゼ活性の低いイヌ (肉食性動物) あるいはウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする

1. イヌ Chia の活性化

今年度はイヌ Chia について研究を進めた。

イヌ vs. マウスのキメラタンパク質 6 種 (図 2) を大腸菌で発現した。活性の高いウス Chia の配列を、イヌ Chia に導入することで、イヌの Chia を活性化させ、活性低下の原因を同定することを試みた。

イヌ Chia およびその C 末からエクソン 8-12 をマウスに交換したキメラ体 (キメラ 4、5) では活性が上昇しなかったが、エクソン 6-7 がコードする領域を組換えさせたキメラ 6 ではキチナーゼ活性が上昇した (図 3)。

逆に、活性が高いマウス Chia にイヌのエクソン 6-7 がコードする領域を導入したキメラ体 (キメラ 3) では活性が低下した (図 3)。

以上のことから、イヌ Chia のエクソン 6-7 がコードする領域が不活性化の原因であることが分かった (図 3)。

2. イヌ Chia 不活性化アミノ酸の同定

原因領域をさらに絞り込むため、40 種類以上のキメラ体と変異体を作製し、解析を行った。イヌ Chia は、マウスのエクソン 6-7 コード領域上の 13 アミノ酸の導入により活性化した。数アミノ酸に絞り込むため、多数の変異体の作製、解析を行い、7 アミノ酸へと限定できた。さらなるアミノ酸の絞り込みの結果、イヌ Chia で特異的に保存される 4 アミノ酸が、不活性化の原因であることを明らかにした。

3. 食性に適応した Chia の分子進化の解明

イヌ Chia の活性低下に関わるアミノ酸置換の生物化学的、進化的意義を解明するため、イヌ以外の食肉目 (動物の分類群の 1 つであり、主に肉食性動物が属す) 42 種の Chia 遺伝子を塩基配列レベルで解析した。その 4 アミノ酸はイヌ科 (ディンゴ、キツネ) の Chia で特異的に保存されていた。さらに、他の大多数の肉食性動物の Chia 遺伝子では、数塩基の欠損や置換により、未成熟終止コドンが出現し、Chia が偽遺伝子化されていた (図 4)。

研究項目②: 活性化 Chia の遺伝情報を参考に、Chia の偽遺伝子からキチナーゼを設計し、活性化酵素の作成を試みる

活性の強いマウス Chia の遺伝情報を参考に、ネコ、ピューマ、トラの Chia 偽遺伝子から活性を有するような Chia を設計し、大腸菌で発現した (これらを創製-ネコ、ピューマ、トラと名付けた)。キチナーゼ活性を測定したが、活性は認められなかった。現在、活性を有するキチナーゼの構造を参考に、各種アミノ酸置換を導入し、活性化を試みている。

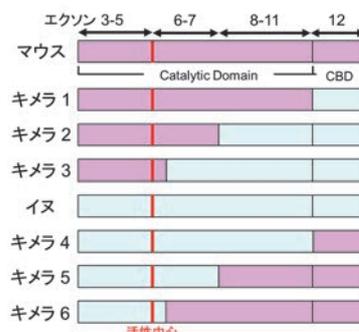


図 2. マウス Chia とのキメラ体の作製。

イヌ Chia の不活性化の要因となる領域を、大まかに特定するため、4 つの領域に分けた。

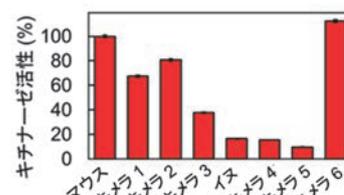


図 3. イヌ vs. マウス Chia キメラ体 1-6 のキチナーゼ活性。縦軸は、マウス Chia の活性を 100% とした相対活性。



図 4. Chia の偽遺伝子化。食肉目動物の Chia の多くで、数塩基の欠損(左)や置換(右)により、未成熟終止コドンが見られた。

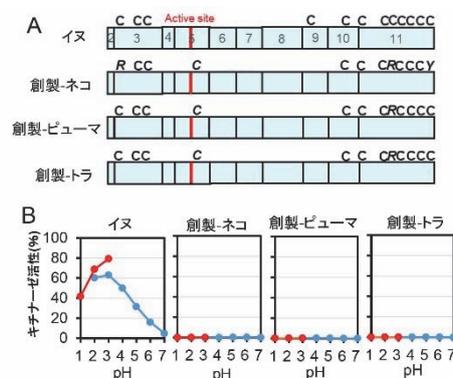


図 5. 偽遺伝子からの活性化キチナーゼ創製の試み。ネコ、ピューマ、トラの Chia 偽遺伝子から創製し、活性を測定した。

4. 研究の反省・考察

研究代表者らは、「昆虫のキチンが、動物体内で分解され得るか？」との観点から、Chia のアミノ酸配列とキチン分解活性を検討してきた。そして、キチンの分解性は、動物の食性と大きく関わることを示した (図1)。2019 年度の研究で、イヌ Chia の活性化を行い、不活性化の原因の解明を行った。イヌ Chia が、進化の過程でアミノ酸 (塩基) レベルで置換し、酵素活性が低下したことを明らかにした (図2)。現在、ネコ、ピューマ、トラの Chia 偽遺伝子から作製した分子について、Cys 残基数に着目して活性化を進めている。その結果がまとめ次第、原著論文として投稿する予定でいる。

ここまで、本研究を申請時に計画した研究目標①について、ほぼ順調に進んでいる。2020 年度は、ウシChia の活性化を試みたい。研究目標②について、偽遺伝子からの Chia の創製には成功したが、活性化酵素の作成には至っていない。さらに Chia の構造変化とその酵素活性への影響の可能性を考え、活性化酵素の作成をしたい。

最近、Chia 遺伝子が、ほ乳類の進化と密接に関わることが報告された (Emerling et al., *Sci Adv* 4, eaar6478,2018)。研究代表者らのこれまでの結果と合わせると、「動物の食性が、進化の過程で、Chia の構造と機能に影響する」と結論できる。

持続的な食糧生産のため、国連食糧農業機関 (FAO) は昆虫の飼料化を推奨している。研究代表者らは、ほ乳類・鳥類の Chia の解析から、昆虫を飼料として積極的に与えるべき動物、控えるべき動物を提案した (Tabata et al., (2018) *Sci Rep.* 8, 1461)。以上の研究成果は、昆虫の飼料化促進にとっての重要な基礎的データとなる。

5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2019) Residues of acidic chitinase cause chitinolytic activity degrading chitosan in porcine pepsin preparations, *Sci Rep.* **9**, 15609.
- ② Kimura, M., Umeyama, T., Wakita, S., Okawa, K., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2019) Direct comparison of chitinolytic properties and determination of combinatory effects of mouse chitotriosidase and acidic mammalian chitinase, *Int J Biol Macromol.* **134**, 882-890.

(2)口頭発表

- ① **Oyama, F.**, Kashimura, A., and Tabata, E. The American Society of Human Genetics 2019 Annual Meeting (Houston, TX, USA), Gene loss and functional decline of chitinases and chitinase-like proteins in dog, 2019年10月18日
- ② Tabata, E., Kashimura, A., and **Oyama, F.** The American Society of Human Genetics 2019 Annual Meeting (Houston, TX, USA) Functional recovery of dog acidic chitinase, 2019年10月18日
- ③ **小山文隆**、榎村明德、脇田悟誌、菅原康里、田畑絵理、第 33 回日本キチン・キトサン学会大会 (神奈川) イヌとウシの酸性キチナーゼの遺伝子発現解析とその機能解析、2019年8月29日
- ④ 田畑絵理、榎村明德、上原麻衣子、脇田悟誌、菅原康里、坂本晃海、佐々木えりか、**小山文隆**、第 33 回日本キチン・キトサン学会大会 (神奈川) 食虫性非ヒト霊長類、コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) の胃における、酸性キチナーゼの高い発現とキチンの消化性、2019年8月29日
- ⑤ **小山文隆**、榎村明德、脇田悟誌、**坂口政吉**、菅原康里、田畑絵理、日本農芸化学会 2020 大会、イヌとウシの酸性キチナーゼの不活性化、2020年3月27日
- ⑥ 田畑絵理、榎村明德、上原麻衣子、脇田悟誌、菅原康里、坂本晃海、佐々木えりか、**小山文隆**、日本農芸化学会 2020 大会、食虫性非ヒト霊長類、コモンマーモセットの消化酵素としての機能解析、2020年3月27日

(3)出版物

なし

学 校 名	東 京 農 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	妊娠を支えるエキソソーム由来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 ②miRNA ③卵子 ④胚			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 田 尚 孝	農 学 部	教 授	研究代表者・総括

○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	マウス実験解析
下 井 岳	生 物 産 業 学 部	准 教 授	マウス実験解析
白 砂 孔 明	農 学 部	准 教 授	ウシ実験解析

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

1. 研究の目的

(1) 妊娠と加齢

近年の社会情勢やライフスタイルの変化に伴い、30代後半で挙児を希望する女性が増加している。しかし、母体の加齢によって卵子数が減少するだけでなく、卵子内の活性酸素種の蓄積・ミトコンドリアの機能異常・異常受精の増加など複合的な原因で卵子の質が低下し、妊孕性が急激に低下する。加齢に伴う妊孕性の低下は現代社会で少子化問題の一大要因とされており、いかにして妊孕性を維持するのか、加齢に伴い妊孕性を低下させている原因を明らかにするのは喫緊の課題である。

(2) 卵子・胚の周囲環境の重要性

これまでの加齢の研究では主に卵子や胚そのものの質的低下に焦点が当てられている。一方で卵子は長期間母体内で発育・受精し、受精卵・胚は卵管や子宮などの母体との相互作用を行い、胎児として娩出される。これらのプロセスは、卵子・受精卵の周囲の細胞や体液との高次な相互作用の下で実施される。我々はこれまで、加齢に伴い母体の体液（卵胞液）および卵子や初期胚の周囲の環境（顆粒層細胞や卵管細胞）が大きく劣化し、これが卵子や胚の質を低下させている要因であることを示す知見を得ている。

(3) 以上から、①卵子・胚および周辺細胞（顆粒層・卵管・子宮細胞）はエクソソームを介して miRNA を伝達することで互いの機能を制御する、②加齢に伴い適切な miRNA による制御機構が破綻し、周囲環境が悪化することで胚発生が低下する、という仮説を想定した。本研究では、卵巣・卵管・子宮内のエクソソームを介した卵や胚の発育制御機構とこれに加齢が及ぼす影響を検証し、加齢に伴う妊娠成立機構の破綻を改善する手法の開発を目指す。

2. 研究の計画

(1) 卵子の発育に影響を与える miRNA

- ①卵胞液と顆粒層細胞からの推測とその評価
- ②加齢がmiRNAの構成に及ぼす影響とその卵子発育に対する効果

(2) 胚の発育に影響を与える miRNA

- ①卵管液と胚からの推測とその評価

(3) エクソソーム分泌の分子背景

3. 研究の成果

(1) 卵巣から異なるステージの卵胞を回収し顆粒層細胞のRNAseqを行った。また発育能力が高かった卵子と低かった卵子の顆粒層細胞のRNAseqも行い両者から卵胞発育や質に重要な上流因子をバイオインフォマティクスにより推測した。さらに、これらの卵胞液中に含まれるmiRNAをsmall RNAseqによって推測した。上流因子としてのmiRNAと卵胞液に実在するmiRNAを比較し、候補miRNA(miR-17, -27, -92a, -145等)を推測した。これら候補miRNAのmimicを培地に添加すると、卵胞液が卵子発育に及ぼす効果として確認した卵子直径の増大、ヒストンのアセチル化の亢進、脂質の増加や発育能力の改善が観察された。また、若齢のウシと加齢のウシの卵胞液を調べ、加齢により変動するmiRNAを同定した。同定したmiRNAからmiR-19b(若齢個体で多い)を選択し添加すると卵子の増大やアセチル化の亢進など卵子の質改善が得られたため、卵子発育はmiRNAによって影響され、さらに加齢によってmiRNA構成が変化し、これが卵子の質低下に関与しているという結論を得た。

(2) 卵管液に含まれる miRNA を small RNAseq によって測定した。また卵管上皮の細胞を培養して培養液中から得たエクソソームに上記の miRNA が含まれていること、生殖周期により影響を受けることを確認した。さらに、体内で発育した胚と体外で発育した胚の RNAseq から発現変動遺伝子を見つけ、これらの上流因子を推測し、これと卵管中に存在している miRNA を比較することで胚発育に影響する miRNA を同定した。これらの miRNA を胚培養環

境に外挿すると胚の発育を有意に改善した。

- (3) 卵胞液や顆粒層細胞の培養液、胚の培養液に含まれる細胞外小胞中に miRNA のほか核酸が大量に含まれていることを見いだした。特に、ミトコンドリアゲノムに由来する DNA を内包した細胞外小胞の測定系を構築し、これをモデルに分泌に関わる因子を検討した。細胞を培養する条件（酸素濃度）や細胞中でのミトコンドリアの質によってこれらの細胞外核酸の量が大きく変動した。プロテアソームや細胞内小胞形成を抑制する細胞外核酸の量が減り、オートファジーを抑制すると細胞外核酸の量が増えることから、細胞質内での小胞管理が関与していることが明らかになった。特に加齢はこの分泌量を増やした。細胞外核酸を胎盤細胞や卵子、そして顆粒層細胞の培養条件に外挿する試験によって、これらが細胞に炎症用の反応を引き起こし、その生理機能を損なっていることが明らかになった。miRNA の構成に影響する飼養条件としてウシをモデルに牧草殖、穀物食区を設定し、血液中の miRNA 量を比較したところ飼養条件で変わることが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

- (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、miR-92a は解糖系を亢進し、卵胞の発育を促進する結果を得たことは大きな発見であると考えている。ウシで行った解析ではブタと同様の miRNA が卵胞発育に関与していることが示唆された。また、加齢に伴い減少もしくは増加する miRNA があること、それらのうち若齢に多い miRNA は卵子の発育促進効果があることが明らかになった。
- (2) ウシの卵管液と卵管細胞の培養液、そして胚から推測したところ、miRNA が胚発育に関与する結果が示唆された。これらの miRNA は発情周期によって変動し、それらの一部(miR-17)を胚の培養条件に外挿すると胚発育を促した。また、ターゲットとしているタンパク質の発現を抑制している結果が得られており、胚は母胎との miRNA を介したコミュニケーションのもと発育していると考えられる。
- (3) 細胞外核酸には核やミトコンドリアゲノム由来のDNAが内包されているが、これらの量は加齢によって変化する結果となった。特に、ミトコンドリアのゲノム由来のDNAは細胞の生存に関係なくミトコンドリアの状態や合成や分解を反映していることが示された。オートファジーやDNase、そしてプロテアソームの活性が加齢によって変化することが知られているが、この変化は細胞外への核酸の放出量を左右することがわかった。また、この細胞外核酸量は細胞の恒常性に大きく影響することが明らかになった。さらに、繁殖に良いまたは悪い影響を及ぼす飼養環境では血液中のmiRNAが変化することから、母体の栄養状態などもこの構成に影響すると考えられた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hara S, Aoki S, Nagata S, Shirasuna K, Noguchi T, Iwata H. Xanthan gum and locust bean gum substrate improves bovine embryo development. *Reprod Domest Anim* 2020; In press
- ② Ito J, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Resveratrol treatment increases mitochondrial biogenesis and improves viability of porcine germinal-vesicle stage vitrified-warmed oocytes. *Cytobiology* 2020; 93: 37-43
- ③ Sano M, Shimazaki S, Kaneko Y, Karasawa T, Takahashi M, Ohkuchi A, Kurosawa A, Torii Y, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Palmitic acid activates NLRP3 inflammasome and induces placental inflammation during pregnancy in mice. *J Reprod Dev* 2020; 66: 241-248
- ④ Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reprod Med Biol* 2019; 19: 95-103

- ⑤Munakata Y, Sugimoto A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Xanthan gum and locust bean gum gel supports in vitro development of porcine oocytes derived from early antral follicles. *J Reprod Dev* 2019; 65: 551-554
- ⑥Kansaku K, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells. *Zygote* 2019; 27: 272-278
- ⑦Shibahara H, Ishiguro A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Follicular factors determining the developmental competence of porcine oocyte. *Reprod Med Biol* 2019; 18: 256-262
- ⑧Nakamura Y, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. S100A8, which increases with age, induces cellular senescence-like changes in bovine oviduct epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2019; 82: e13163
- ⑨Ozeki A, Tani K, Takahashi H, Suzuki H, Nagayama S, Hirashima C, Iwata H, Kuwayama T, Ohkuchi A, Shirasuna K. Preeclamptic patient-derived circulating cell-free DNA activates the production of inflammatory cytokines via toll-like receptor 9 signalling in the human placenta. *J Hypertension* 2019; 37: 2452-2460

(2) 口頭発表

- ①伊藤洵、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. レスベラトロール処理がガラス化したブタ卵細胞期卵子の生存性に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ②宗像祥久、柴原秀典、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. MicroRNA-92aは顆粒層細胞の代謝を変化させブタ未発育卵子の体外発育を改善する 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ③立松薫、永田修大、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. microRNA-92aがウシ初期胞状卵胞由来卵子の体外発育に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ④市川佳奈、柴原秀典、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. ブタ卵胞液中のcell-free DNA量と卵子の能力の関係 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ⑤青木漱吾、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. 加齢がウシ胚の発生培地中ミトコンドリア由来cfDNA量に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ⑥中村悠稀、野口龍生、坂上信忠、岩田尚孝、桑山岳人、白砂孔明. 老化関連因子IL-1 α やIL-1 β がウシ卵管上皮細胞の炎症応答に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019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	立教大学理学部	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・費用面での問題がある上に、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んでおり、既に角化細胞のミクروس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2項目について研究を遂行することとした。

- (1) 炎症モデルの構築と評価
- (2) トリコテセンの影響評価

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) 炎症モデルの構築と評価：昨年度に構築したマイクロ皮膚モデルに起炎物質を加え、炎症モデルを構築する。蛍光試料を用いた細胞層の物質透過性評価により、炎症による透過性亢進を実証する。
- (2) トリコテセンの影響評価：トリコテセンの表皮細胞、単球、及び炎症モデルに対する影響を評価する。

3. 研究の成果

(1) 炎症モデルの構築と評価

昨年度に構築したマイクロ皮膚モデルに起炎物質を加え、炎症モデルの構築に取り組んだ。昨年度に構築したモデルは、細胞遊走の評価は容易であるものの、デバイスの構造上の理由により、デバイス内の多孔膜上で培養された HaCaT 細胞の顕微観察が困難であった。そこで構造を改善し、物質透過性の評価に加えて膜上に培養した細胞の顕微観察が可能なデバイスを開発した。このデバイスを用いて HaCaT 細胞を培養したのち、蛍光免疫染色を行い、細胞間結合に関連するタンパク質の局在を確認できた。

炎症状態における角化細胞層の透過性は以下の手順で評価した。起炎物質として既知アレルゲンであるニクロム酸カリウムを、トレーサーとして蛍光試料であるフルオレセインを用いた。まず、上述のデバイスで HaCaT 細胞を培養したのち、フルオレセインを加えて細胞層の物質透過性を評価した。評価基準として、フルオレセインの蛍光輝度変化を基に、透過係数を定法により求めて用いた。その後、ニクロム酸カリウムを加えて培養を続け、一定時間後に同様に評価したところ、透過係数はニクロム酸カリウムの添加前と比べて優位に上昇し、炎症に伴う物質透過性の亢進を実現できていることがわかった。

(2) トリコテセンの影響評価

トリコテセンの表皮細胞、単球、及び上記の炎症モデルに対する影響を評価した。昨年度に強い炎症阻害活性を示した 7-hydroxy T-2 toxin (7-H T-2 toxin) の類縁体をさらに 4 種類作製し、その構造決定を試み、成功した。さらに、昨年度までに生産してきた約 50 種類のトリコテセンに加え、これら 5 種類の類縁体について、表皮細胞および複数種の単球への影響評価を行った。その結果、各トリコテセンの毒性については、複数の培養細胞間で顕著な相関が観察された。さらに、7-H T-2 toxin とその新規類縁体すべてに、細胞毒性を生じない濃度で、炎症性ケモカイン TARC に対し高い阻害活性が見られた。また、HT-2 toxin にも TARC 誘導阻害能がはっきりと観察された。構造活性相関については、やはり T-2 toxin と 7-H T-2 toxin の類縁体に阻害活性が顕著であることが示された。

7-H T-2 toxin を HaCaT に添加し RT-PCR を行い、この化合物がどの遺伝子の発現を制御するかについて検証した。その結果、TARC のみならず、別の炎症性ケモカインである CCL-5/RANTES の発現誘導阻害を行うことが示された。すなわち、本物質は毒性を示さない濃度で、皮膚炎症、特にアトピー性皮膚炎の痒みを惹起させるケモカインの発現誘導を阻害できることが示され、重要な抗炎症剤候補物質であることが裏付けられた。

炎症モデルへの影響評価では、代表的な抗炎症剤であるデキサメタゾン (Dex) 処理後に上記 (1) で述べた透過性評価の実験を行った。Dex の濃度を変えて実験を行ったところ、100 nM 以上で透過係数の上昇が抑制された。これは Dex が HaCaT の炎症反応を抑制したためと考えられる。一方、代表的なトリコテセンであるデオキシニバレノールは 0.3 nM という低濃度で同様の抑制効果を示した。これらの結果は、本モデルがトリコテセンの機能評価系として利用できるのみならず、トリコテセンが既存の抗炎症剤に比べ優れている可能性を示す、極めて重要な結果である。

4. 研究の反省・考察

(1) 炎症モデルの構築と評価

本年度の研究では角化細胞を用いて実験を行ったが、実際の炎症状態にある皮膚には血管内皮細胞や免疫細胞が存在しているため、これらの影響も併せて評価していく必要があると考えられる。特に、実際の皮膚炎ではまず角化細胞が刺激を受け、そこから連鎖的に細胞応答が進んでいくと考えられるため、このようなカスケードに着目した検討を今後進めていきたいと考えている。

(2) トリコテセンの影響評価

本研究では代表的なトリコテセン1種のみを用いたが、トリコテセンは既に100種類以上知られており、それぞれ異なる毒性を示すことから、炎症性サイトカインの発現抑制を始めとする生理活性についても異なると考えられる。トリコテセンはその構造から4タイプに分類できるため、今後は各タイプの代表的なトリコテセンを同様に評価するなどして、化学構造と生理活性の相関について明らかにしていきたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Tanaka N, Takushima R, Tanaka A, Okada A, Matsui K, Maeda K, Aikawa S, Kimura M, Takahashi-Ando N. Reduced toxicity of trichothecenes, isotrichodermol and deoxynivalenol, by transgenic expression of *Tri101* 3-*O*-acetyltransferase gene in cultured mammalian FM3A cells. *Toxins*, 2019 Nov; 11 (11), E654. doi: 10.3390/toxins11110654.

(2) 口頭発表

- ①鈴木 将、貞松 和樹、岡田 彩希、小豆畑 隼、小泉 慶明、松井 宏介、木村 真、安藤 直子「異属トリコテセン生産菌を利用した新規トリコテセン類の創製」日本マイコトキシン学会 第 84 回 学術講演会 帝京大学宇都宮キャンパス、2019 年 8 月 23 日.
- ②岡田 彩希、小豆畑 隼、安藤 直子「7-hydroxy T-2 toxin 系トリコテセンの性状解析と炎症抑制能の検証」日本マイコトキシン学会第 84 回学術講演会 帝京大学宇都宮キャンパス、2019 年 8 月 23 日.
- ③貞松 和樹、小豆畑 隼、鈴木 将、松井 宏介、中嶋祐 一、木村真、安藤 直子「Feeding、酵素反応による A 型トリコテセン類縁体の生産及び MS/MS データライブラリーの構築」日本マイコトキシン学会第 84 回学術講演会 帝京大学宇都宮キャンパス、2019 年 8 月 23 日.
- ④佐々木直樹、Organ-on-a-chip による臓器機能再現 (招待講演)、第 32 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、武蔵野大学武蔵野キャンパス、2019 年 8 月 24 日.
- ⑤Marika Sugimoto, Keisuke Yanagisawa, Naoki Sasaki, "Evaluation of permeability of keratinocyte layers using a two-way membrane-integrated microfluidic device", RSC Tokyo International Conference 2019, 2-21, Makuhari, JAPAN, 2019.09.04-05.
- ⑥杉本茉莉花、佐々木直樹、二方向観察可能なマイクロ流体デバイスを用いる細胞層の透過性評価、日本分析化学会第 68 年会、Y1012、千葉大学西千葉キャンパス、2019 年 9 月 11-13 日.
- ⑦杉本茉莉花、佐々木直樹、二方向観察可能な膜集積マイクロ流体デバイスを用いる角化細胞層の透過性評価、第 9 回 CSJ 化学フェスタ 2019、P3-004、タワーホール船堀、2019 年 10 月 15-17 日.
- ⑧Marika Sugimoto, Keisuke Yanagisawa, Naoki Sasaki, "A TWO-WAY MEMBRANE-INTEGRATED MICROFLUIDIC DEVICE FOR PERMEATION ASSAYS", The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2019), Basel, Switzerland, 2019.10.27-31.
- ⑨杉本茉莉花、佐々木直樹、二方向観察可能な skin-on-a-chip による抗炎症剤評価、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 40 回研究会、1P29、アクトシティ浜松、2019 年 11 月 19-21 日.
- ⑩Azuhata, H., Sadamatsu, K., Takahashi-Ando, N. Optimization of production efficiency of 4-deoxy 7-hydroxy T-2 toxin. The 17th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology. Kawagoe. 2019. 12. 06.
- ⑪Sadamatsu, K., Matsui, K., Kato, K., Takahashi-Ando, N. Establishment of quantitation method of auraptene using LC-MS/MS. The 17th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology. Kawagoe. 2019. 12. 06.
- ⑫安藤直子、松井宏介、鈴木 将、貞松和樹、小豆畑隼、岡田彩希、小泉慶明、武田博音、木村 真「トリコテセン耐性に関わる側鎖修飾と異種異属のトリコテセン生産菌を利用したトリコテセンライブラリーの構築」日本マイコトキシン学会第 85 回学術講演会 名古屋大学東山キャンパス、2020 年 1 月 10 日 (招待講演).
- ⑬小豆畑 隼、貞松 和樹、鈴木 将、松井 宏介、揚原 佑、高野 翼、中嶋 佑一、相川 俊一、木村 真、安藤 直子「*Fusarium sporotrichioides* の遺伝子破壊株を用いた 4-deoxy 7-hydroxy T-2 toxin の生産と同定」日本マイコトキシン学会第 85 回学術講演会 名古屋大学東山キャンパス、2020 年 1 月 10 日.

- ⑭貞松 和樹、鈴木 将、松井 宏介、小豆畑 隼、深澤 修平、大澤 祐奈、木村 真、安藤 直子「*Fusarium graminearum* 遺伝子破壊株を用いたトリコテセン前駆体の生産・同定」日本マイコトキシン学会第 85 回学術講演会 名古屋大学東山キャンパス、2020 年 1 月 10 日.
- ⑮杉本茉莉花、安藤直子、佐々木直樹、二方向観察可能な skin-on-a-chip による抗炎症剤評価 (2) : トリコテセン類への応用、日本化学会第 100 春季年会、2H3-34、東京理科大学野田キャンパス、2020 年 3 月 22-25 日.

(3) 出版物

なし

2019年度（第44回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	多 摩 美 術 大 学	研究所名等	アートアーカイブセンター	
研 究 課 題	日本とアジアの群島を結ぶ文様研究 —先端メディアによるデザインアーカイブ構築—		研究分野	文 学
キ ー ワ ー ド	①文様 ②デザイン ③アジア ④アーカイブ			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
深 津 裕 子	美 術 学 部	教 授	研究統括、資料収集

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐々木 成明	美 術 学 部	教 授	資料収集、映像制作、アーカイブス制作
伊藤 俊治	東 京 芸 術 大 学	教 授	資料収集、アートディレクション
山形 季央	美 術 学 部	教 授	グラフィックデザイン
村尾 静二	清 泉 女 学 院 大 学 人 間 学 部	講 師	資料収集、映像人類学
岳 明	美 術 学 部	助 手	アーカイブス制作、コーディネート、通訳

日本とアジアの群島を結ぶ文様研究

—先端メディアによるデザイナーアーカイブの構築—

1. 研究の目的

- (1) 日本とアジアの群島で特徴的な文様を収集しアート&デザイン研究のための芸術資源とする。
 - ① 日本の本土から南西諸島、台湾、フィリピン諸島、インドネシア諸島に至る群島に根差文様の収集を行う。
 - ② 群島から収集した文様に関する情報を整理した上で比較研究を行い、アジアの芸術文化の諸相を文様から考察する。
- (2) 先端的なデザインやアートを含む芸術資源に関する研究拠点を構築する
 - ① プログラミング技術の進化や AI 応用を踏まえたインタラクティブな創造支援ツールを構築し、デザイナーやアーティストのアイデアやインスピレーションの源泉となるアーカイブを制作する。先端的なデザインやアートの展開のために新たな文様を生成する独自のナリソース・システムの構築、公開、教材開発を目指す。
 - ② 文様資源を単なる形としての図案やデザインでなく、人と文化と社会の諸相を具現化したメディアとして捉え、様々な可能性を秘めた芸術資源として美術教育に活用する。

2. 研究の計画

- (1) 先行研究のデジタルアーカイブス化と資料の管理・保存
 - ① 染織・写真資料、植物標本などの保存作業の実施
 - ② 染織資料(188点)、写真資料(500点)のデジタルデータ化
- (2) フィールド調査の実施
 - ① 研究対象地域のうち1地域における基礎調査の実施

3. 研究の成果

- (1) 先行研究のデジタルアーカイブス化と資料の管理・保存
 - ① 染織・写真資料、植物標本などの保存作業の実施
インドネシア染織品188点のデジタルイメージ撮影を行い、全体図と部分図を撮影するとともに各資料に関する情報(名称・収集地・制作地・制作年代・寸法・文様名称・材質・制作技法)を整理した(図1)。インドネシア染織資料の収集に関連した写真資料(スライドフィルム・紙焼き)のスキャニングを行い整理し、その他、書簡や植物標本についても確認作業を行った(図2)。1970年代に発行された日光東照宮の建築装飾調査報告書のスキャニングと関連する写真資料の整理を行った(図3)。
 - ② 染織資料(188点)、写真資料(500点)のデジタルデータ化
 - ① で撮影およびスキャンしたデジタルイメージと付随する文字情報を、アーカイブに取り込むためのデータ処理を行うと同時に、アーカイブのデザインと構築を行い、webサイト「多摩美術大学文様アーカイブ&データベース」を立ち上げ、情報を掲載するとともに、染織資料と写真資料の一部を、2019年11月に開催した研究経過報告展「新世紀アジアの潮流 文様の創造力」で公開した(図4)。
- (2) フィールド調査の実施
 - ① 研究対象地域のうち1地域における基礎調査の実施
本年度はインドネシア共和国のバリ島とジャワ島を中心とした基礎調査を実施した。収集した文様は伝統的な建築・美術・芸能に加え現代社会におけるものも加えた。
バリ島では中部の寺院や集落、ジャワ島東部のジョグジャカルタの王宮等で約1000点の文様収集(MONYOハンティング)を行った。4Kカメラに加えスマートフォンを活用し各自が効率よく調査を実施することができた。収集物は(1)-①、②と同様にデジタルデータ化しデータベースに入力できる情報を整理し、webサイト「多摩美術大学文様アーカイブ&データベース」<https://www.tamabi.ac.jp/research/tamamon22/>に掲載した。これらの一部を大判プリントしたものを図4に示す展覧会で公開した。



図1 インドネシア染織資料188点の写真撮影 天井に設置したカメラによる全容の撮影と部分的な文様撮影を含む



図2 インドネシア染織資料の収集に関連する写真資料と文書資料の整理 公開に向けた写真資料のデジタル化の実施

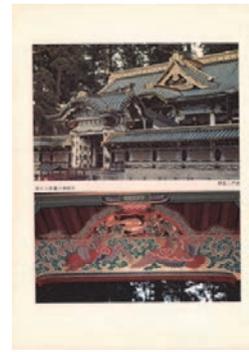


図3 日光東照宮の装飾文様に関する報告書 公開に向けたデジタル化の実施



図4. 研究経過報告「新世紀アジアの潮流 文様の創造力」展の実施 会期：2019年11月 場所：多摩美術大学八王子キャンパス内アートテークギャラリー2階

4. 研究の反省・考察

(1) 先行研究のデジタルアーカイブ化と資料の管理・保存

①染織・写真資料、植物標本などの保存作業の実施

今年度は染織資料の全容を把握するための写真撮影ができたため、今後写真資料を含めた情報の多面的な活用が見込まれた。また写真資料については撮影地域を調査することにより染織資料との関連性の検証が見込まれた。一方、染織資料・写真資料の清掃と収納を全て完了することができなかつたため、随時進めたい。

②染織資料(188点)、写真資料(500点)のデジタルデータ化

染織資料は全点のデジタルデータ化が完了したが、写真資料については200点のみ完了したため引き続き作業を行い完了する予定である。本年度は様々な資料をデータ化して並列した状態で比較研究を行うことのできる基盤的環境を整えることができた。試行錯誤しながらの取り組みとなるが、アーカイブスの完成度を上げていきたい。

(2) フィールド調査の実施

①研究対象地域のうち1地域における基礎調査の実施

本年度にインドネシアで収集した約1000点の文様を考察した結果、伝統的な建築、美術、文化、芸能から収集したものと、現代的な都市空間や生活空間で収集したものを比較することにより文様の発生と展開を考察することができた。インドネシアは研究者らが以前から調査対象としてきた地域であるため比較的順調に調査を進めることができた。次年度の調査対象地域については本年度培った調査手法を活用、効率良く調査を進めたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 山形季央、佐々木成明、深津裕子、伊藤俊治「アジアの装飾文様のアーカイブ化と教育活用に関する研究から日本とアジアの群島を結ぶ文様研究へ」多摩美術大学紀要(2019)

(2) 口頭発表

- ① トークセッション「文様の創造力」2019年11月22日14:30-16:30 多摩美術大学八王子キャンパス内アートテークギャラリー2階

(3) 出版物

なし

(4) その他

- ① 展示発表：「新世紀アジアの潮流 文様の創造力」展 2019年11月20-22日
多摩美術大学八王子キャンパス内アートテークギャラリー2階（内容：展示・映画上映・トークセッション・パフォーマンス・公開授業など）<https://k.tamabi.ac.jp/activity/kikaku/2489110/>
- ② Web サイト：TAMA MON 22 on Web
多摩美術大学文様データベース&アーカイブにおいて本研究成果を公開
<https://www.tamabi.ac.jp/research/tamamon22/>
- ③ Web サイト：アジアの群島を結ぶ文様アーカイヴ(多摩美術大学アートアーカイヴセンター)で
本研究成果を公開
https://aac.tamabi.ac.jp/archive_monyo.html

2019年度（第44回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	愛 知 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	蓬左文庫所蔵典籍の調査および史料研究 —古代を中心に—		研究分野 文 学
キ ー ワ ー ド	①名古屋市蓬左文庫 ②駿河御譲本 ③データベース ④目次記		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
廣 瀬 憲 雄	文 学 部	教 授	研究代表者 全体の統括 古代関係典籍の写本系統の調査

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
浅 岡 悦 子	文 学 部	非 常 勤 講 師	古代関係典籍の基本情報の整理
吉 田 一 彦	名 古 屋 市 立 大 学 大学院人間文化研究科	教 授	古代関係典籍の写本系統の調査
丸 山 裕 美 子	愛知県立大学日本文化学部	教 授	古代関係典籍の写本系統の調査
鳥 居 和 之	名 古 屋 市 蓬 左 文 庫	文 庫 長	蓬左文庫所蔵典籍の伝来
木 村 慎 平	名 古 屋 市 蓬 左 文 庫	学 芸 員	蓬左文庫所蔵典籍の伝来
手 嶋 大 侑	名 古 屋 市 立 大 学 大学院人間文化研究科	大 学 院 生	古代関係典籍の基本情報の整理
芝 田 早 希	名 古 屋 大 学 大学院人文学研究科	大 学 院 生	古代関係典籍の基本情報の整理

蓬左文庫所蔵典籍の調査および史料研究 —古代を中心に—

1. 研究の目的

(1) 研究の内容と目的

- ① 本研究では、名古屋市蓬左文庫（以下、「蓬左文庫」）が所蔵する日本古代史関係の典籍（約120件）の基礎的な学術調査を行う。
- ② 本研究の最終的な目標は、1：調査の成果を新たな目録・解題として出版すること、2：特に重要なものについては写本系統の分析や他機関所蔵の関係写本との比較検討等を実施すること、3：調査結果に基づいて蓬左文庫ウェブサイト上のデータベースの内容を修正・増補し、可能ならば各典籍の画像を検索可能な形で公開することである。

(2) 研究の背景と特徴

- ① 蓬左文庫には、徳川家康の没後に分与された「駿河御譲本」や、初代尾張藩主義直が収集した蔵書類など、学問的・文化的に価値のある典籍が豊富に所蔵されている。しかし従来は、金沢文庫本『続日本紀』や『侍中群要』以外の古代史関係典籍の調査はほとんど行われておらず、蓬左文庫所蔵の典籍は十分に活用されているとは言い難い状況であった。
- ② そこで本研究では、蓬左文庫が所蔵する日本古代史関係の典籍を悉皆調査することで、その全貌を明らかにするとともに、蓬左文庫蔵書の形成過程を追究していく。最終的には、これらの成果を書籍として刊行し、あわせて蓬左文庫ウェブサイト上のデータベースを充実させることで、蓬左文庫所蔵の典籍が容易に活用できるようにすることを目指す。

2. 研究の計画

(1) 2019年度の調査対象

- ① 2019年度には、古代史関係の典籍として最も重要である、六国史・『類聚国史』・『日本紀略』等の編年体史書20件を調査する予定であった。
- ② このうち、計画立案時において詳細な調査が必要と考えられていた写本は、「御本」の印記（徳川義直の蔵書印）を持つ、江戸初期に遡る写本である『類聚国史』・『日本紀略』（従来の研究では写本系統の全体像は明らかにされていない）、および2017年度の調査において、古写本である尊経閣文庫所蔵本と数日違いの奥書を持つ写本が発見されていた『釈日本紀』の3点であった。

(2) 2019年度の講演会・シンポジウム

- ① 本研究では、研究成果の社会還元を図るため、一般向けに講座やシンポジウムを開催し、研究成果の公表を行うとともに、蓬左文庫が所蔵する典籍の重要性を周知させるための活動も進めることを特徴としている。
- ② 2019年には、6月に講演会を1件、年明けにシンポジウムをそれぞれ計画した。講演会は外部から講師を招聘し、シンポジウムでは研究代表者をはじめ、本研究に関わる方々が登壇することにした。

3. 研究の成果

(1) 調査成果

- ① 2019年度は、幸いにもシキシマ学術・文化振興財団からも助成金を得ることができた。これにより、当初計画では2年目に予定されていた古記録類の調査も進めることが可能になり、本研究で申請した調査内容は3年間ではなく、2年間で完了する見込みとなった。
- ② 個別写本の調査成果としては、『小右記』など、従来は江戸時代中期の成立とされていた典籍のうちいくつかは、江戸時代初期の初代藩主義直・二代藩主光友時代に成立していたことが明らかになった。このような典籍は、今後も何点か発見されることが予想され、個別典籍の写本系統の問題としても、蓬左文庫所蔵典籍の形成過程の問題としても重要であろう。ただし、これとは逆に、『類聚国史』のように、江戸時代初期に遡る写本は現在では蓬左文庫には存在せず、かわりに江戸時代後期に書写された写本が所蔵さ

れている場合も見受けられた。『類聚国史』に関しては、江戸時代中期に徳川吉宗が全国から蒐集した本を書写させ、紅葉山文庫に収めているが、この時尾張藩は『類聚国史』を幕府に差し出しているため、この時点まで当該典籍が存在していたことは明らかである。今後、関係の情報に注意していかなければならない。

- ③ 2017年度から継続的に研究を進めていた『日次記』については、写本系統をほぼ解明することができた。また、昨年度のシンポジウムの際に情報提供していただいた、慶應義塾大学図書館所蔵の初二条家本『日次記』の調査を行い、江戸時代中期に幕府から二条家に贈られたものであることを確認することができた。さらに、天皇家・将軍家・徳川御三家以外に、収書家として有名な加賀藩主前田綱紀も、徳川光国を通じて『日次記』を入手していたことや、現在国立国会図書館が所蔵する東方朔占書分類本『日次記』は、明治初年に石川県から移管された典籍であったことなどが判明した。水戸徳川家本・加賀前田家本『日次記』の所在はまだ明確ではないが、江戸時代における武家文庫の形成を論じる上では、『日次記』は重要な素材であると思われる。

(2) 講演会・シンポジウム

- ① 2019年度の講演会は、6月30日に愛知大学車道校舎において、国立歴史民俗博物館准教授の小倉慈司氏をお招きして、「江戸時代における古代典籍の伝来 ―政治要略を中心に―」との演題でご講演いただいた。あいにくの悪天候であったが、40名程度の参加者を得ることができた。
- ② 2019年度には、研究成果の発表の場も兼ねて、シンポジウム「蓬左文庫本『日次記』をめぐる公家と武家Ⅱ ―『日次記』写本調査の成果から―」を、2月1日に愛知大学車道校舎で開催した。研究組織からは、廣瀬憲雄氏「『日次記』諸写本の比較と写本系統」、芝田早希氏「『日次記』の派生と展開 ―国立国会図書館所蔵本を中心に―」の2本の報告を準備し、さらに慶應義塾大学図書館所蔵の初二条家本に関しては、同大学の中島圭一氏をお招きして、「慶應義塾図書館所蔵『日次記』の紹介と若干の考察」という報告をしていただいた。このシンポジウムの報告内容は、昨年度と同様に、論文としてまとめ公表する予定である。

4. 研究の反省・考察

(1) 蓬左文庫ウェブサイト上のデータベースへの調査成果反映に際する問題

- ① 今年度より、蓬左文庫ウェブサイト上のデータベースに、昨年度までの調査成果を反映させる作業を開始した。
- ② ところが、調査成果の項目とデータベースの仕様が合致せず、成果を十分に反映することができない部分はいくつか見つかった。中でも最も問題となるのは、写本系統・関連写本などの調査知見が、項目の字数制限内でしか記述できないことである。そのため、現状では修正できるところのみを修正することとして、調査成果の全面的な公開は、紙媒体の目録・解題、ないし新たに設計されたデータベースを期すこととした。

(2) 新型コロナウイルス流行の影響による調査の遅れ

- ① 前述の通り、今年度はシキシマ学術・文化振興財団からも助成金を得て、当初計画の1年目と2年目に相当する部分を進めていた。シキシマ学術・文化振興財団の助成分となる2年目相当部分は無事終了したが、新型コロナウイルス流行の影響により、蓬左文庫が閲覧を停止したため、本助成金にかかる当初計画の1年目部分を終わらせることができなかった（20件のうち、『日本紀略』・『類聚国史』（版本）など5件が未了）。また蓬左文庫同様、宮内庁書陵部・国立公文書館・前田育徳会尊経閣文庫なども閲覧を停止したため、本年2月～3月の調査はほとんどが中止を余儀なくされた。これらの調査は、2020年度に持ち越すこととなった。
- ② 2020年度の調査においても、新型コロナウイルス流行の影響は避けられない。本研究では、研究組織の構成員が蓬左文庫に集まり、情報交換を図りつつ調査を進めてきたが、今後は個別に調査を行い、成果や疑問点をメール等で共有していく予定である。また、講演会やシンポジウムの開催にあたっては、蓬左文庫の関係者とも相談した上で、慎重に判断したい。調査の遅れは避けられない状況ではあるが、本研究は、2021年以降においても、日本古代史関係の典籍全点が調査されるまで継続していくので、2020年度は計画通りの点数が調査できるよう努力していきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①吉田一彦「権力と本 ―蓬左文庫本『日次記』の書写・伝来をめぐって―」（『蓬左』第97号、名古屋市蓬左文庫、2019年6月）
- ②木村慎平「徳川光国書状」（『蓬左』第97号、名古屋市蓬左文庫、2019年6月）
- ③吉田一彦・廣瀬憲雄・木村慎平・手嶋大侑・松菌斉・鳥居和之・丸山裕美子・浅岡悦子・芝田早希「蓬左文庫本『日次記』の基礎的考察 ―書物の書写・贈与・相続をめぐる公家と武家―」（『名古屋市立大学大学院人間文化研究科人間文化研究』第32号、名古屋市立大学大学院人間文化研究科、2019年7月）
- ④手嶋大侑「権力と本 ―蓬左文庫本『日次記』の書写・伝来をめぐって―」（『蓬左』第98号、名古屋市蓬左文庫、2019年12月）

(2) 口頭発表

- ①廣瀬憲雄「『日次記』諸写本の比較と写本系統」（シンポジウム「蓬左文庫本『日次記』をめぐる公家と武家Ⅱ ―『日次記』写本調査の成果から―」蓬左文庫典籍研究会主催、2020年2月）
- ②芝田早希「『日次記』の派生と展開 ―国立国会図書館所蔵本を中心に―」（同上）

(3) 出版物

なし

学 校 名	京 都 外 国 語 大 学	研究所名等	京都外国語大学ラテンアメリカ研究所
研 究 課 題	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コスタリカオサ半島 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 研 授 研 究 員 長 館	研究代表者・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	ラテンアメリカ研究所 名古屋大学人類文化遺産テキスト学 研 究 セ ン タ ー	客員研究員 研 究 員	考古学資料分析 生業の研究
嘉 幡 茂	国 際 言 語 平 和 研 究 所	嘱託研究員	考古学資料分析 先スペイン期建造物の研究
フリエタ・マルガリー タ＝ロペス・フアレス	ラテンアメリカ研究所	客員研究員	考古学資料分析(とくに土器の科学分析)
村 野 正 景	ラテンアメリカ研究所 京都文化博物館学芸課	客員研究員 学 芸 員	考古学資料分析、土器の移動、製作技法の研究 博物館活動の実施

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に考古学調査によって光をあて、先住民文化の生業・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。さらに、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。平成 29 年度から継続している当該研究の 3 年目である。
 - ①アメリカ地中海東部、とくにニカラグアのカリブ海側における人と物の交流関係を明らかにするために、岩刻画の分布、土器系統、ヒスイなどの遺構・遺物の研究を行う。また、内陸部および太平洋側との河川交流を実証的に検証する。
 - ②北カリブ自治大学 (URACCAN) シウナ校との交流活動として、岩刻画分布調査、および先住民マヤグナのコミュニティを調査する。
- (2) コスタリカの太平洋側を中心として、アメリカ地中海南部に区分した太平洋岸南部を調査対象とし、当時の生業やその技術力を考察し、社会発展レベルを解明する。交流協定を結んだコスタリカ国立博物館と協働する。ニカラグアのプロジェクト・マティグアスで実践している「考古学と博物館を仲介者とする実践的研究」方法を導入し、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「世界遺産と地域社会～中米コスタリカ太平洋側オサ半島に位置する世界文化遺産ディキス遺跡周辺の考古学遺跡と連携したまちづくり～」を開始。
 - ②コスタリカ太平洋側に突き出すオサ半島のプエルトヒメネスにおける考古学と博物館を仲介者とする実践的地域研究を実施する。

2. 研究の計画

- (1) ニカラグア現地調査：2020 年 3 月 3 日～17 日
 - ①マナグアにて、ニカラグア国立博物館での共同研究に向けた協議、JICAニカラグアでのカリブ海側コミュニティ活動への支援についての協議。
 - ②マティグアスにてプロジェクト・マティグアスの2020年度調査に向けての協議。ティエラブランカ村住民との交流。
 - ③カリブ海側シウナにて、URACCANシウナ校と京都外国語大学・国際文化資料館との交流について協議、および周辺の岩刻画分布調査。
- (2) コスタリカ現地調査：2019 年 7 月 16 日～7 月 23 日
 - ①サンホセにて、黄金博物館・ヒスイ博物館博物館調査の実施。およびコスタリカ国立博物館にて共同研究協議。
 - ②太平洋側に突き出したオサ半島プエルトヒメネスのガジャルド村と、その近郊カンタレロ遺跡を中心とした考古学と博物館を仲介者とする実践的地域研究の開始に向けた調査。

3. 研究の成果

- (1) 北カリブ海岸自治地域シウナ周辺に岩刻画分布調査
 - ①当該研究の 1 年目、南カリブ海岸自治地域ブルーフィールズにおいて、資料分析にあわせてエルコンディード川下流域ソンプレロ・ネグロ遺跡の現地踏査を実施した。遺跡は、葬送儀礼に関連する土器資料など、他地域との比較、つまり文化的交流関係に有益な遺物系統の研究が可能な考古学価値の高い遺跡であり、今後の発掘調査候補地として考えていた。さらに、遺跡およびその周辺からは多くの岩刻画を確認し、カリブ海沿岸交流、内陸部との交流を実証的に調査できる可能性を示唆していた。

今回、シウナでは、URACCANシウナ校の支援を得て、周辺の岩刻画の分布調査を行うことができた。その結果、川と岩刻画の位置、文様（系統）とその位置（配置）に何らかの

関係性があると考えた。一方、周辺にはほかにも岩刻画があるとのことであったが、集落址などの遺跡の確認はできていない。今後、遺跡の確認にむけた踏査、住民からの情報収集が必要になる。

- ②先住民マヤグナのコミュニティの訪問、交流によって、コミュニティが直面するいくつかの課題を確認できた。とくに彼らが模索している伝統的な生活文化の保存・継続については、プロジェクト・マティグアスで積み上げてきた実績にもとづく博物館活動を実施できればコミュニティにとってもプラスになると思われる。
- (2) 太平洋側に突き出したオサ半島プエルトヒメネスのガジャルド村と近郊のカンタレロ遺跡を中心とした考古学と博物館を仲介者とする実践的地域研究の開始に向けた調査
 - ①カンタレロ遺跡：ティグレ川沿いにある遺跡である。ジャングルの中に複数の大きなマウンドが確認できた。また、周辺にも建造物址らしい痕跡も確認できた。しかし、考古学調査はほとんどされていない。

コスタリカ国立博物館の研究者からの指摘によれば、太平洋側の沿岸交流および世界遺産デキスとの関連など考古学的成果が期待できることがわかった。とくにティグレ川では砂金が取れることもあって、南米古代アンデス地域との交流も視野に入れる必要がある。
 - ②プエルトヒメネス・ガジャルド村コミュニティとの交流：カンタレロ遺跡の調査・保存・活用にあわせて、できれば砂金探し体験（かつては採掘されていたが今は禁止されている）など、地域を巻き込んだ観光開発につながるような活動を考えたいとのことだった。

カンタレロ遺跡へは、川を渡るなどアクセスは決して良くないが、周りの自然環境の活用も含めたフィールドミュージアム化が可能と感じた。

4. 研究の反省・考察

- (1) ニカラグア・カリブ海側の古代社会復元に向けた研究
 - ①当該研究を3年継続してきた結果、カリブ海側の遺跡の状況、考古学調査の現状を一定具体的に明らかにできた。これには南カリブ自治区のブルーフィールズに拠点をもつブルーフィールズ・インディアン・カリビアン大学（BICU）と附属研究所（CIDCA）および、北カリブ自治区プエルトカベサス、シウナに拠点をもつ北カリブ自治大学（URACCAN）との交流関係を持つことができたことが大きい。

具体的な成果としては、当該地域の交流に河川が大きな役割を果たしていたという仮説も持っていたが、先のソンプレロ・ネグロ遺跡の調査成果もあわせて、岩刻画の分布的系統的調査によってこれが実証できる可能性が高いことがわかった。

また、先住民マヤグナのコミュニティとの交流を通して、岩刻画が集中している河川流域が聖地として守られていることを知った。先住民文化とこれを直結させて評価することはできないが、彼らが守りたいと考えている伝統的な生活文化の中に、岩刻画が位置付けられていることは大きな発見といえよう。カリブ海側の古代社会復元に向けたヒントになることは間違いない。
 - ②一方、研究のテーマとして当初から掲げてきた沿岸交流に関しての考古学情報は、まったく得ることができなかった。とくにURACCANの各分校などに収蔵されている考古学資料については、原位置がわかるものはなく、形態・特徴からも他の地域から持ち込まれた可能性が高い。

また、沿岸部の遺跡についての新しい情報もなかった。沿岸部は河川からの土砂の堆積および海流による砂帯の発達によって、遺跡が深く潜っているためであろう。また、遺跡の発見が期待できたマヤグナのコミュニティ周辺でも確認されていないことから、住民の遺跡に対しての意識、知識が低いことが原因であると考えられる。

今後は、コミュニティ・ミュージアム活動を先行させていくことを考えたい。
- (2) 「世界遺産と地域社会～中米コスタリカ太平洋側オサ半島に位置する世界文化遺産デキス遺跡周辺の考古学遺跡と連携したまちづくり～」に向けた研究
 - ①2018年に国際文化資料館と交流協定を結んだコスタリカ国立博物館との共同調査として、2018年に予備調査を実施、今年度から本格的な調査を開始した。共同調査の目的は二つあった。一つは、世界文化遺産デキス遺跡周辺の考古学遺跡を活用した博物館活動によって地域活性化させることである。二つ目は、太平洋側オサ半島における考古学遺跡と連携したまちづくりである。

一つ目については、今期は現地見学調査に留まるが、遺跡保存に関わるチームと意見交換し、日本側の知見を提供できた。一方、現地の多雨がもたらす遺跡への影響の大きさをあらためて知った。今後の遺跡の保存と活用にむけ情報を交換していく必要がある。

二つ目については、対象となるカンタレロ遺跡を踏査し、その考古学的価値の高さを確認できたことである。近郊のガジャルド村コミュニティとの協議が出来たことによって、今後の具体的な考古学調査、博物館活動のイメージが持てたことが大きい。とくに住民の意識が高いことがプロジェクトの今後に期待できる。

- ②研究の反省としては、やはり日本とコスタリカ、さらには太平洋側という距離がもたらす共同研究のレスポンスの悪さに対応した調査体制などが構築できなかったこと、現地の考古学レベル、博物館レベル、環境問題に関してのレベルの高さに対応する知識・方法がまだまだ十分でないことである。今後の考古学調査、博物館活動を考えると、リモートを利用した研究情報収集、研究協議、恒常的な調査ベースの構築、多分野を包摂する研究方法の構築を目指したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ①南博史「シンポジウム総括」「ICOM2019京都大会記念国際シンポジウム『中米地域社会と博物館・2』」京都外国語大学、2019年9月8日。

(3) 出版物

なし

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	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・レヘシュ遺跡の第三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う連動するのか、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
附属天理参考館収蔵のテル・ゼロール遺跡出土遺物と調査記録の再検討を継続する。
- (2) テル・レヘシュ遺跡の発掘調査
8月にテル・レヘシュの発掘調査(第12次)を実施する。研究代表者の桑原を団長とし、現地協力者や分担者が手分けをして、各種の作業にあたる。地中レーダ探査によって大規模な建築遺構の存在が想定される「下の町」の発掘調査を実施する。
- (3) 発掘調査の事後作業と調査成果の検討
秋以降は、発掘調査の事後作業、調査記録の検討や分析を重点的に行う。
- (4) 出土資料の比較検討
テル・レヘシュにおける建築遺構に関する外的な影響を探り、歴史的な理解を深めるため、広く西アジア全体に視野を広げた比較研究を行い、関連資料の収集を進める。
- (5) 調査成果の報告
西アジア考古学会やイスラエル考古学研究会において、調査成果の発表を行う。

3. 研究の成果

- (1) 日本調査隊による過去の発掘調査記録の再検討
今年度は、過去におけるテル・レヘシュの調査記録の再検討に集中して作業を行った。第Ⅱ期調査(2013-2017年)の出土遺物については、地点ごとの出土遺物の概要を冊子にまとめる作業をほぼ完了させることができた。第Ⅰ期調査(2006年-2010年)の出土資料についても、作業を進めたが、資料数が膨大なこともあり、なお作業の継続が必要である。今年度は、テル・レヘシュの調査記録に集中して作業を行ったため、附属天理参考館収蔵のテル・ゼロール遺跡出土遺物と調査記録については、作業が進捗していない。
一方、附属天理参考館所蔵のヘラクレス像について、X線CT撮影を行い、構造を明らかにすることができた。
- (2) テル・レヘシュ遺跡の発掘調査
 - ① 研究代表者の桑原を団長とし、日本とイスラエルの研究者を加えた発掘調査団を組織し、イスラエル考古局からテル・レヘシュ遺跡の発掘調査ライセンスの交付を得た。4～7月にかけて現地調査に向けた諸準備を整え、8月に現地に渡航し、同遺跡の第12次発掘調査を実施した。
 - ② テル・レヘシュ遺跡の現地調査においては、「上の町」では、2016年にローマ時代の初期シナゴグが発見された周辺区域において、トータルステーションを用いた地表露出遺構の記録作業を行った。その結果、初期シナゴグと隣接する集落に対する今後の調査のための基礎的なデータを取得することができた。
 - ③ 「下の町」では、2015年に実施した地中レーダ探査によって大規模な建築遺構の存在が想定されていた。今年度は、その区域に「J地区」として7グリッドの調査区を設定し、後期青銅器時代～初期鉄器時代の遺構・遺物の状況を探ることを目的として、発掘調査を実施した。
 - ④ その結果、2か所において鉄器時代初期に属すると見られる遺構を確認することができた。

一つは、斜面に近いグリッドで確認されたタブンを伴う建物であり、一般の住居遺構の一部の可能性もある。もう一つは平坦部から出土した石壁であるが、幅も深さも90 cm程度あることから、大規模な建物の一部である可能性が考えられる。

- (3) 「下の町」の発掘調査で出土した遺物については、現地で図面の作成や写真撮影などの作業を行った。また出土遺構については、図面や写真による記録と合わせて、ドローンによる上空からの遺構の記録、3次元モデルの作成などを行った。

(4) 出土資料の比較検討

テル・レヘシュの出土遺構や遺物に対する歴史的な理解を深めるため、広く西アジア全体に視野を広げた比較研究を行う必要がある。そのために関連図書の収集を進めた。

(5) 調査成果の報告

12月に開催されたイスラエル考古学研究会において、調査成果について報告を行った。3月に予定されていた日本西アジア考古学会発掘報告会は、新型コロナウイルス感染症の拡大防止のため、開催が中止となった。それに代えて、YouTubeに開設されたチャンネル「西アジアオンライン講義」のコンテンツとして、テル・レヘシュの調査成果についての動画を配信した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 第Ⅱ期調査(2013-2017年)の出土遺物について、出土遺物の概要を冊子にまとめる作業を完了したことは、大きな進展であった。第Ⅰ期調査(2006年-2010年)の出土資料についても、作業を継続することが課題となる。

(2) テル・レヘシュの発掘調査

①2006年に開始されたテル・レヘシュの発掘調査も、既に13年が経過し、調査回数も12次に及ぶことになった。こうした地道な調査の継続が、日本とイスラエルの学問的な交流として注目を集め、発掘調査期間中には、共同通信からの現地取材があった。取材の内容は、「遺跡発掘 日本が存在感」として、現地発の記事として各紙に配信された(たとえば、新潟日報9月30日付け記事)。発掘調査には、日本・イスラエルからのボランティアの参加があり、地に足のついた文化交流ともなっている。

②テル・レヘシュの「上の町」において、地表に露出しているローマ時代の建築遺構についてデータを取得できたことは、今後、「初期シナゴグ」と隣接する集落の関係を探る上で、非常に重要な基礎資料となるであろう。ローマ時代の建築遺構の発掘調査を行うためには、体制を整えて、資金を得る必要がある、今後の課題となる。

③テル・レヘシュにおいて「下の町」の発掘調査を開始することは、日本調査団にとって大きな課題となっていた。今年度の学術研究振興資金の補助を得て、テル・レヘシュの第Ⅲ期調査として、「下の町」の発掘調査に着手できたことは、それ自体が大きな成果であった。

④今年度に着手した「下の町」の調査区については、後期青銅器時代の居住層まではまだ到達しておらず、今後、調査を継続する必要がある。確認された2つの建物間の時期差なども依然不明であり、その解明には両者を繋ぐ箇所に位置するグリッドの調査を進めなければならない。

- (3) テル・レヘシュの発掘調査においても、ドローンや3次元モデルの作成といった新たな手法を導入しているが、その公開の方法について検討を行う必要がある。テル・レヘシュの発掘調査については、webページも存在しているが、その内容をより充実させる必要もある。

- (4) 調査成果をより広い歴史的コンテクストの中に位置づけてゆくためには、最新の研究動向を把握しておく必要がある。国内外での学会への参加を怠らず、また、導入した文献の活用をはかってゆく必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 桑原久男・間舎裕生「アナハラの歴史解明へ向けて—イスラエル、テル・レヘシュ第12次発掘調査（2019年）—」『第27回西アジア発掘報告会報告集』日本西アジア考古学会、2020年
- ② 桑原久男「遺跡からのメッセージ9～15」『みるとす』No. 163～169、2019年～2020年

(2) 口頭発表

- ① 橋本英将「テル・レヘシュ第12次（2019年）発掘調査報告」（第26回イスラエル考古学研究会、2019年12月21日）

(3) 刊行物

- ① テル・レヘシュ発掘調査団／桑原久男『イエス時代のガリラヤ地方と一神教の系譜を探る』2020年3月
- ② テル・レヘシュ発掘調査団『新発見の初期シナゴグと謎の要塞建築』2020年3月

2019年度（第44回）学術研究振興資金 学術研究報告

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	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	教 授	政治家の発言のテキストマイニング、政治計量分析
赤 塚 尚 之	滋賀大学経済学部	准 教 授	アジア諸国のコーポレート・ガバナンス関連法体系の比較

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

ジェンダー平等（女性のエンパワメント）と経済発展との強い正の関係があることが多くの研究で明らかになっている（Pande and Ford 2011; Duflo 2012）。アジアでは過去半世紀に渡り、女性に対する教育の普及や参政権の拡大において大きな改善・進歩がみられた。しかし、ビジネスや政治の分野において、代表的な立場にある女性はいまだに少ない。そのため、日本を含む多くの国が女性の登用・活躍推進に向けて、様々な施策を導入するか、導入に向けて検討を始めている。

女性の登用・活躍推進に向けて、積極的にクオータ制を導入してきたのは欧州諸国である。会社役員や議員などの女性の割合をあらかじめ一定数に定めることを通じて、女性の社会進出を後押しするものである。ただし、欧州諸国のクオータ制に関する研究では、管理職としての経験や適性を有する女性の蓄積が十分でない状況でクオータ制を導入すると、むしろ女性役員の存在が企業の業績に負の影響を与えるという研究（Denzo and Ross 2011 ; Smith 2014）もあり、クオータ制のデザインやセレクションプロセスが重要であることが示唆されている。他方、政治分野のクオータ制については、女性議員は社会サービスや福祉により多くの財源を割く傾向にあることや、女性の政治家の方が男性よりも汚職が少ない傾向がある、といった正の影響を示している研究も多い（Chen 2011; Brolloa and Troianob 2016）。

このように、欧州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が蓄積してきているが、アジア諸国についての研究はまだ乏しい。特にアジア諸国の人材不足は深刻化しているのも関わらず、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、インドのように男児選好が強い国では、女性が社会で活躍することを通じて、経済成長ばかりか社会変革をももたらす可能性がある。アジアの女性の登用・活躍を阻んでいる要因としては、家事・育児負担が良く指摘されているが、フォーマル・インフォーマルな制度（例えば、女性への相続不平等）の影響で、女性の行動が制限されている場合もある。また、女性の能力に対する固定概念が女性のビジネスや政治への参加拡大を妨げている可能性がある。

その一方で、アジア諸国にもクオータ制をすでに導入している国々がある。例えば、韓国では、2004年以降、国政・地方議会の議員候補者に占める女性割合を定めている。インドでも、上場企業の取締役会に少なくとも一人の女性を登用すること（2013年会社法）や地方議会の議席数の三分の一を女性とすること（1993年第73次憲法改正）を義務付けており、政策のデザインやその影響について分析可能である。

本研究の目的は、インドや日本、韓国などアジア諸国において、ビジネスや政治分野における女性のエンパワメントが個人や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ことである。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) Global Entrepreneurship Monitor (GEM 調査) を用いて、女性を取り巻く環境（制度や規制、市場）が女性の起業活動や経済に与える影響について国際比較を行う。さらに、(3) 実際に小規模企業経営者を対象に、リスクや信頼、競争心といった各種選考の男女差に焦点をあてた経済実験を行う。そして、それを質問票調査のデータと結合させることにより、女性起業家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、(4) 国政・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分析を通じて、政策的嗜好の男女差やアフーマティブ・アクション導入の影響について明かにしていく。こうした研究を通じ、日本におけるアフーマティブ・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提示することができると思われる。

2. 研究の計画

2019年度は各作業を下記のように分担しながら研究プロジェクトを進める。

- (1) 上場企業における女性の登用拡大と企業パフォーマンスに関する実証分析 <海老原、赤塚、二階堂>

赤塚は、2000年以降の日本とインドのコーポレート・ガバナンスに関わる法体系の比較を行い、研究ノートにまとめる。海老原は、日本とインド上場企業の経営財務データベースを用いて、データの整理と分析を行う。具体的には、企業のパフォーマンス指標（全要素生産性やROEなど）に女性経営者ダミー変数や女性役員比率、女性従業員数、そして会社法施行ダミーなどを説明変数とした計量分析を試みる。さらに、インド会社法の解釈や影響について、企業や実務家にインタビューを行う。

- (2) 性の起業活動を活発にする要因の分析 <高橋、二階堂>

前年度に高橋がデータの整理を行ったアジアの国々を発展水準でグループ化し、比較分析を行う。アジアにおける女性起業家の共通した特徴のほか、起業活動を活発にする要因を明らかにする。

- (3) 小規模企業家に対する本調査の実施 <田中、二階堂>

前年度のパイロット調査の経験を活かして、インド南部（マイソール）で質問票調査と経済実験を行う。まず、経営者のパフォーマンスや起業行動に影響を与える競争心や信頼性、リスク選好などを測る経済実験を実施し、経営者の各種選好に男女差があるか検定を行う。また、質問票調査から得られた企業のパフォーマンスや経営者の属性に関するデータと実験結果を接合し、計量分析を行う。本調査の実施にあたって、引き続きインドの研究所（SSER）へ協力を依頼する。

- (4) 国政・地方議員に関するデータの分析 <根元>

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ならびにSNSでの発言データを収集し、分析のためのモデルを構築する。

3. 研究の成果

- (1) 女性の登用拡大と企業パフォーマンスに関する分析 <海老原、赤塚、二階堂>

赤塚は、インド出張での資料収集とヒアリングを活かし、女性取締役登用とCSR支出を義務付けるインド新会社法に関する概要を研究ノートとしてまとめた。並行して、海老原はインド上場企業の経営財務データベースを購入し、日本の場合と同様に各種変数を作成した。

- (2) 女性の起業活動を活発にする要因の分析 <高橋>

まず、高橋が2019年4月に日本経済新聞「やさしい経済学」に『日本の起業意識と起業活動』というタイトルで6回連載した。次に、高橋は前年度に整理したGEMデータを用い、アジアの女性起業家に共通した特徴のほか、起業活動を活発にする要因を明らかにした論文を『武蔵大学論集』で公表した。

- (3) 小規模企業家に対する本調査の実施と分析 <田中、二階堂>

二階堂は10月上旬の国際学会において、インドの女性や雇用をキーワードとして、パネルセッションをオーガナイズし、共同研究者とともに発表を行った。また、昨年度のパイロット調査で収集した、経営者やその関係者の各種選好や競争心を測った実験データと彼らの属性データを接合し、分析を開始した。その一方で、2019年3月に、サンプルサイズを拡大した小規模企業家の本調査を行う予定であったが、コロナウイルスによる渡航禁止

で調査自体を延期した。

(4) 国政・地方議員に関するデータの分析 <根元>

インドやアジアにおける女性議員の国政や地方議会での比率や発言データをもとに、それらの国々に適用可能なモデル設計を行っている。

4. 研究の反省・考察

- (1) インドの新会社法では上場企業に取締役のうち一人を女性とすることを義務付けているが、家族やプロモーターからの登用や、罰則が緩いため登用がなされていない場合も多いことがわかった。また、女性が取締役や管理職に登用される業種としては、サービス業が多い。さらに、インド会社法は改正が度々行われており、法律自体が落ち着くまでに時間が掛かると思われる。以上より、どの時点でのデータを用い計量分析すべきか、慎重に見極めた。
- (2) インドでは、宗教や社会階層を考慮すると「女性」は単一でなく、宗教的マイノリティーのムスリム女性は、女性とムスリムという二重の差別や制約のもとで、事業活動を行っていることがわかった。また、ヒンドゥー教の下位カーストの女性は、上位カーストの女性に比べ、労働者や信用といった資源へのアクセスに制約があり、持続的な企業成長に障害があることがわかった。そのため、起業促進という短期的な支援政策だけでなく、長期的な支援政策が必要だと思われる。
- (3) コロナウイルスの影響で、インドでのフィールド調査や海外での学会発表を延期せざるを得なくなった。今後は、リモートでどのように研究計画を遂行していくかが課題である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 赤塚 尚之 (2019) 「インドのMandatory CSR－関連法規と会計指針」『彦根論叢』No.420
- ② 田中 健太 (2019) 「持続可能な資源利用のためのコミュニティマネジメントー共有資源問題を解決するための協力的行動の分析」『組織科学』第53巻、第2号
- ③ 高橋 徳行 (2020) 「新しい創業支援政策の誕生とその背景」『武蔵大学論集』経済学部70周年記念論文集
- ④ Sarma, M and Nikaido, Y. “Financial Inclusion in India: analyzing regional, social and gender disparities” Musashi University Discussion Paper Series, No.86.

(2) 口頭発表

- ① Nikaido, Y and Pais, J. “Women Owning Small Firms in India: Analysing Social and Cultural Diversity,” The 32nd Annual Conference of the Japanese Association for South Asian Studies, Keio University, Tokyo, October 5, 2019
- ② Sarma, M and Nikaido, Y. “Financial Inclusion in India: Analysing Regional and Socio-economic Disparities,” The 32nd Annual Conference of the Japanese Association for South Asian Studies, Keio University, Tokyo, October 5, 2019
- ③ Tanaka, K., Higashida, K., Higuchi, Y., Takahashi, R., Hossain, M. M., Sujauddin, M. “Factors affecting collusion and cheating behavior among community leaders: A lab-in-the-field experiment in Bangladeshi mountain regions,” Australasian Public Choice Conference 2019, Brisbane, Australia, December 9, 2019

(3) 出版物

なし

2019年度（第44回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	城 西 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	世界史からみる銘仙：デジタルアーカイブ化と国際発信 —地域産業と世界をつなぐ研究・教育の可能性—		研究分野 経 済 学
キ ー ワ ー ド	①銘仙 ②デジタルアーカイブ ③文化行政 ④世界史		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
井 上 直 子	経 済 学 部	准 教 授	論文執筆、撮影、HP作成取りまとめ

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
土 屋 正 臣	現 代 政 策 学 部	助 教	論文執筆、撮影、史料収集、公立文化施設との調整
三 國 信 夫	城 西 短 期 大 学 ビ ジ ネ ス 総 合 学 科	准 教 授	撮影
Ritchie Zane	現 代 政 策 学 部	准 教 授	撮影、英語監修

世界史からみる銘仙：デジタルアーカイブ化と国際発信

—地域産業と世界をつなぐ研究・教育の可能性—

1. 研究の目的

本研究は、明治期より昭和初期における、伊勢崎や秩父などにおける「銘仙（着物）」やその原料「絹紡糸」の生産・流通構造を解き明かし、その社会経済史的インパクトおよび世界史的文脈を明らかにするものである。大正期から第二次大戦後まで全国的に流行した銘仙の学術的研究は、未だ伊勢崎を対象とした経済史分析などに限られる一方で、そのデザインの先進性や当時の社会経済に与えたインパクトの大きさは国際的にも大きな関心を集めている。そこでまず、

- (1) 散逸しつつある史料（文書、銘仙、生産機械）の記録、そして関係者へのインタビュー調査を迅速に遂行し、
- (2) 産業革命以前より不断に廉価化へと進み続けた繊維産業の世界史的時代背景を踏まえ、銘仙が地域社会、日本社会に及ぼした意義を多面的に分析し、
- (3) その成果を国際社会に向けて発信しつつ、未来に向けてマルチリンガルなデジタル・アーカイブとして保存・公開すると共に、文化行政、あるいは産学官連携における活用の道を探る。

2. 研究の計画

- (1) 伊勢崎・秩父・磐梯熱海を中心に銘仙撮影を続行。経緯糸の分析・記録。
- (2) 伊勢崎市民図書館とのインタビュー調査協力。
- (3) 足利における近藤徳太郎関連史料（フランス・シネ織との関係）の整理・分析。
- (4) 伊勢崎・秩父市の文化行政、経産省などの絹関連プロジェクトとの接続。
- (5) 2017年に京都工芸繊維大学が所蔵するスフや綿を用いた「(フェイク) 銘仙」の組成分析。
- (6) 代表者は研究を総括し、2021年、名古屋大学出版より刊行予定の『糸・布・衣のグローバル・ヒストリー（仮）』において絹及び絹糸紡績、銘仙、化学繊維その他に関する執筆（全体の2割程度）に集中し、日本の経済史教育の教科書に本研究の成果を反映。
- (7) デジタルアーカイブの整備・多言語発信。

3. 研究の成果

- (1) パリ史を研究する Natacha Coquery 氏 (Université Lyon 2) とのワークショップでは、半奢侈 (demi-luxe/ accessible luxury) というキーワードを手がかりに、「絹糸紡績のエンドプロダクト」銘仙の世界史的意義を日本とヨーロッパの手工業史の流れのなかに位置付け、国際的比較の可能性を明らかにした。
- (2) 伊勢崎市民図書館との協力で、「世界史の中の銘仙」というテーマでビデオ教材を作成し、研究代表者のこれまでの研究成果を一般向けの地域史学習につなげることができた。
- (3) 繊維産業の地域史に強い関心を持つ伊勢崎市民の中には、銘仙の生産・流通に携わっていた人が多く、伊勢崎におけるワークショップ開催の準備段階で、コロナ収束後のインタビュー調査につながる人的ネットワークを形成することができた。
- (4) 産業史研究と文化行政の接続を行い、産学官連携の道を探るという意味では、宇治市における文化財保護から歴史まちづくり行政への転換を分析した土屋 (2019) は一つの可能性を示唆している。
- (5) なお 2019 年 2 月に土屋が行ったフィールドワーク (秩父) の成果として、広い意味での銘仙 (養蚕) という経済活動をベースに、俳諧ネットワークという文化的活動が村々で生まれ、それが秩父困民党事件という政治運動に発展するという考察が示され、今後の研究の進展が期待される (延期されたワークショップ『伊勢崎銘仙の技術と文化：世界から見る銘仙、銘仙から見る世界』伊勢崎市図書館 (2020 年 3 月 7 日)) で発表される予定だった)。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究はアーカイブ作成・公表と研究の成果発表・出版を軸に計画を進めていたが、年度末試験が終わって学務が一段落した2020年2月頃よりコロナの感染拡大に伴う史料館・博物館・図書館の閉館が広がり、計画を遂行する上で著しく困難な状況に見舞われた。特に、
 - ①アーカイブ作成（銘仙撮影）の停滞と、
 - ②研究成果の発表・出版（ワークショップ『伊勢崎銘仙の技術と文化：世界から見る銘仙、銘仙から見る世界』伊勢崎市図書館、2020年3月7日）の延期は本研究にとって致命的な問題であり、
- (2) 2019年度の成果は、改めて2020年度以降、ワークショップでの口頭発表・出版の順番でまとめる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①土屋正臣 単著 「文化行政における文化財保護行政の位置づけ」『月刊 考古学ジャーナル（ニューサイエンス社）』（732）51 - 53 2019年09月 [招待有り]
- ②土屋正臣 単著 「文化財保護行政から歴史まちづくり行政へ：京都府宇治市を事例として」『文化政策研究（日本文化政策学会）』12 71 - 80 2019年05月 [査読有り]

(2) 口頭発表

- ①井上直子「奢侈と半奢侈：1870-1930年代絹紡糸・レーヨンによる絹の代替から」、ワークショップ「奢侈／半奢侈とファッション」（東洋大学2019年6月16日）
- ②土屋正臣「1970・80年代の文化行政に対する文化財保護行政の立ち位置に関する試論 - 埼玉県を事例として-」日本文化政策学会第13回研究大会 2019年12月
- ③土屋正臣「縄文文化を用いた観光とまちづくり」文化経済学会<日本>サマーセミナー 2019年09月
- ④ワークショップ『伊勢崎銘仙の技術と文化：世界から見る銘仙、銘仙から見る世界』伊勢崎市図書館（2020年3月7日）→コロナ 感染防止のため延期
<http://www.e-tosho.com/Isesaki/PC/PC00903.aspx?id=527>

(3) 出版物

ワークショップ・プロシーディングの刊行予定（延期）

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

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

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自閉症スペクトラムの子どもと家族に与える影響を明らかにし、生活環境に関する支援ニーズを把握することを目的とする。さらに、今後の大規模震災のため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、双葉郡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。加えて、最終年度には、グループミーティングを行い、母子保健及び発達障害支援に関する災害時の支援について検討を行う。また、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に変化がみられたかを質問紙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

保護者のメンタルヘルスや子どもの行動面の問題、困り感、支援ニーズ等の経時的変化を把握するため、福島県A市（原発事故から30キロ圏内を含む自治体）に居住する小学2年生（平成23年度生まれ・発災時満0歳）と5年生（平成20年度生まれ・発災時満3歳）の保護者を対象に質問紙調査を行った。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）: SF12v2、筆者らが独自に作成した環境と避難状況に関する質問項目を用いた。

700名に調査票を配布し、201名から回収した（回収率28.7%）。うち、小学2年生は114名（男児53名、女児61名）で、平均年齢は7.92歳であり、小学5年生は87名（男児48名、女児39名）で、平均年齢は10.86歳であった。

- ・子どもの行動面の問題：SDQ全体のニーズ別結果について SomeNeeds は2年生群15名（13.2%）、5年生群9名（10.3%）、High Needs は2年生群18名（15.8%）、5年生群6名（6.9%）であった。下位項目は以下表1-aの通りであった。2年生群、5年生群ともに「仲間関係」が全国平均よりも高く、仲間関係において支援を要する子どもが多いことが分かった。

(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(%)	8(7.0)	9(7.9)	7(6.1)	5(4.4)	8(7.0)	2(2.3)	37(32.5)	36(41.4)	20(17.5)	20(23.0)
5年生群(%)	2(2.3)	5(5.7)	7(8.0)	1(1.1)	15(13.2)	4(4.6)	40(35.1)	17(19.5)	15(13.2)	13(14.9)

- ・保護者のメンタルヘルス：保護者のメンタルヘルスとQOLについては、K6の平均点は2年生群は3.49点、5年生群は3.18点であった。カットオフ10点を超えた保護者は2年生群は9名（8.0%）でそのうち4名（3.5%）が臨床域のカットオフ13点を超えていた。5年生群は6名（6.9%）がカットオフ10点を超えそのうち4名（4.6%）が13点を超えていた。両群ともに全国平均と比べて概ね問題のない結果であった。SF12の結果は「身体的健康度」は2年生群は

48.9点、5年生群は51.1点で、「精神的健康度」は2年生群が48.5点、5年生群は49.0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「日常生活機能(身体)」($t=-2.770, df=112, p<.01$)、「日常生活機能(精神)」($t=-2.661, df=112, p<.01$)、「心の健康」($t=-3.707, df=112, p<.001$)が有意に低く、小学5年生群では「身体機能」($t=3.701, df=85, p<.001$)が有意に高かった。

(表1-b)SF12v2スコア

	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	51.3	47.3	49.1	48.6	50.3	49.2	47.3	46.5
5年生群	52.7	49.5	49.3	48.8	49.8	51.1	49.8	49.3

- ・子どもの問題行動と保護者のメンタル：SDQのTotal Difficulties(TD)と下位項目それぞれに対して、K6ならびにSF12v2とで相関分析を行った。K6については小学2年生群ではTD ($r=.504, p<.001$)、情緒 ($r=.382, p<.001$)、行為 ($r=.332, p<.001$)、多動 ($r=.283, p<.01$)、仲間関係 ($r=.332, p<.001$) において有意な相関が認められたが、小学5年生群ではほとんど有意な相関は認められなかった。SF12v2については身体的健康度とTD ($r=-.321, p<.01$)、情緒 ($r=-.277, p<.01$) において有意な相関がみられたが、小学5年生群では有意な相関は認められなかった。
- ・子どもの問題行動と環境・避難状況の関係：SDQのTDと環境・避難状況とで相関分析を行ったところ、2年生群ではTDの高さと避難所利用数 ($r=.314, p<.05$)、最初に利用した避難所の利用期間 ($r=.386, p<.05$)、家計への影響 ($r=-.462, p<.01$) において有意な相関が認められた。また、SDQの多動と自宅のスペース ($r=.285, p<.01$)、情緒の問題と生活音 ($r=.311, p<.01$)、行為の問題と家族間のケンカ(逆転項目) ($r=-.286, p<.01$) で有意な相関が認められた。
5年生群では、多動の問題と公共の設備の満足度 ($r=.289, p<.01$)、情緒の問題と先生のサポートにおいて有意な相関が認められた ($r=.282, p<.01$)。
- ・保護者の抑うつ・不安の傾向と環境・避難状況の関係：小学2年生群では、保護者のK6の得点の高さと飲酒 ($r=-.334, p<.001$)、家族間のケンカ ($r=-.438, p<.001$)、最初に利用した避難所の利用期間 ($r=.387, p<.05$)、家計への影響 ($r=-.398, p<.01$) において有意な相関が認められた。5年生群では家族間のケンカ ($r=-.305, p<.01$)、避難回数 ($r=.296, p<.01$) において有意な相関が認められた。

(2) 質的調査

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。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発達障害の子どもへ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。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。その後、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。それらの結果を専門職2名により時系列(発災時期)及び内容でカテゴリー化し、主要なコメント(“役立った支援、良かったこと「◎”、“今後は避けたい、大変だったこと「▲””)を抽出した(表2参照)。

インタビュー結果は、いずれの時期も「行政」「母子保健(妊婦・乳幼児の状況を含む)」「発達障害支援」の3つに分類された。発災直後は、避難所を利用しない要支援者は支援を受けにくい状況になりやすく、保護者の受援力に頼る必要があった。行政内で把握する個人情報を部署間でどのようにやりとりするか等が課題となっている。避難中は、避難元と避難先とのいずれが主となって支援を行うかなどが問題になりやすく、引継ぎのための事務手続

きの負担や、現場の調整役（コーディネーター）の必要性が指摘された。帰還・生活再建後は、特に医療や療育機関等の社会資源の不足が課題となっている。

R1年では、福島県沿岸部の母子保健及び発達障害支援に携わる保健師を対象として全体ミーティングを実施した。内容は、2部構成とし、前半はこれまでの調査結果の報告、後半に災害支援に関するグループワーク（約1時間）を行った。当該市町村の母子保健業務に従事し始めた時期[A:震災前から(経験者)/B:震災以降から(非経験者)]で2グループに分類し、架空事例をもとにKJ法に準拠する形で発達の偏りのある子どもとその保護者への支援を「①発災直後」、「②避難」、「③生活再建」の時期ごとに検討した。各グループに1名のファシリテーター（地元の相談支援専門員）を配置して実施した（表3参照）。Aグループ（経験者は時間軸で支援対象者の困り感に着目し、実体験を踏まえた具体的な方法が検討された。Bグループ（非経験者）は支援には困難さがあるとの意見が出やすく、情報提供等の「間接的支援」や「平時にやるべきこと」に着目した案が中心となった。

表2 災害時の発達障害支援に関する専門職インタビュー

時期	カテゴリー	コメント（役立ったこと=◎、今後は避けたいこと=▲）
発災直後	行政の状況	<ul style="list-style-type: none"> ▲役場職員は各避難所に配属されると、その後はお互いにどこに避難しているかもわからなくなった。 ▲発災直後、役場から台帳を基に妊婦へ連絡をしたかったが、自宅の電話番号しか登録がなく携帯電話番号の登録の必要性を感じた。 ◎IP電話で役場と各家庭の固定電話は全てつながっており、その日のうちに全住民の安否確認が出来た。 ◎避難先の医療機関の医師が定期的に避難所に診療に来てくれ、役場職員にも休憩所がないことを心配し入院して休んでも良いと声をかけてくれた。
	妊産婦・乳幼児の状況	<ul style="list-style-type: none"> ▲乳児がいる家庭では、ミルクとお湯が不足し、車内で授乳し、寝かせるための平らな場所もなかった。 ▲親戚宅へ避難した母子だが、後から乳腺炎になって大変だったと聞いた。県の助産師会で乳房マッサージをやっていたが、情報を提供することが出来なかった。 ◎避難所に小児科医が週2回医療支援に来て、出産して退院間もない母子も対応してもらった。 ◎避難先の保健師が交代で毎日来てくれ、地域やサービスの情報をくれた。乳幼児健診対象者がいれば、受け入れるよと申し出てくれ、対応してくれた。 ◎避難先自治体によっては、避難先登録がある場合には妊婦の里帰り出産の対応もしてくれた。
	発達障害に関する支援の状況	<ul style="list-style-type: none"> ▲発災時、障害者手帳を持っている方、介護保険を使っている方等への連絡で、関係部署が把握している個人情報をもとに取り扱って対応するかが課題になった。 ▲住民がどこに避難しているか把握できていなかったため、連絡が来た人にしか対応できなかった。 ◎避難所に発達の気になる子どもの支援担当として幼稚園の先生が配置された。気になる子どもに連絡をしたり、避難先の療育機関につないだりした。多くの子どもが療育機関につながった。 ◎避難所で子どもの登録を行い、館内放送以外に子どもに関する情報提供を行った（同意の上、携帯電話で連絡）。 ◎避難先地域の精神科病院が避難所支援の一環で院内の空き部屋を開放し、子どもの対応や心理相談等を行った。 ◎避難前は安定していた発達障害特性や精神疾患の方が、環境の変化で症状が表れ、行動面において周囲からの苦情もあった。避難先の病院で入院対応してくれた。
発災から数か月	行政の状況	<ul style="list-style-type: none"> ▲マスコミや大学の調査依頼などの対応も多い。 ◎しばらく時間が経過すると、住民が自主的に行う避難者登録によって確認が取れるようになった。
	母子保健事業の状況	<ul style="list-style-type: none"> ▲乳幼児健診や予防接種など、行政的なやり取りの手間を省くために特例法が出来たが、震災から時間が経過すると、漏れをなくすためにも依頼文書を求める自治体が増え、事務作業が膨大になった。 ▲プリンタが壊れる等、設備が不十分な状況下での書類作成や対応は大変であった。 ▲避難先の健診結果が避難元へ情報提供されるまでに2か月以上を要すこともあり、未受診児への対応が遅れる。 ◎避難後の母子の支援では避難先の社会資源がわからないこともあり、避難先の保健師とやり取りをして対応した。 ◎交替わりで保健師派遣があり、引継ぎ資料も自主的に作成、主体的に動いてくれたのが助かった。 ◎支援チームでは、必ず運転できる方を支援チームに1名入れてくれるように要望した。 ◎支援に来た保健師が町民のスクリーニング、ピックアップされた方の対応は避難元保健師と役割分担をした。 ◎災害時に、現地に災害経験者の保健師、コーディネーターがいると良いと思う。 ◎次、もし災害が起きたら今回よりは対応出来そうな気がする（経験したことを活かそう）。
	発達の気になる子ども・発達障害児への支援	<ul style="list-style-type: none"> ▲要支援のケースは、避難先に快くケースを受け入れてもらえない場合もある。 ▲避難先の保育所に通う（障害児枠）際、加配判定の手続きでは、電話等でのやりとりになってしまうため、行政間の調整が上手くいかず、現場の調整（ケースワーク）役の必要性を感じた。 ▲療育機関の不足、避難先や帰還する地域にない。発達が気になると伝えても遠方の療育施設しかなく、保護者の負担が増えてしまう。 ▲住民票の問題から、避難先で十分に行政サービスを受けられないこともあった。 ▲自閉症児・者がいる家庭の支援物資の受け取りや買い物の代行において、配給所での理解の得にくさがあった（民間施設での取り組み）。 ◎乳幼児健診で要支援となった後の受け皿として、被災者のための療育の場が出来たのはよかった。 ◎診断の場として医療支援事業（福島県）があったのは本当に助かった。 ◎発達障害のある被災児を受け入れている療育施設には、自閉症児のための安心グッズ、CD、玩具、クレヨン、本等が届いた。
帰還・生活再建時期	母子保健事業の状況	<ul style="list-style-type: none"> ◎徐々に乳幼児健診後のフォローアップ事業を再開する避難元自治体が出てきた。同じ避難者であるということで、別の自治体の母子も受け入れるなど、町同士が連携して母子対応を行っている。
	今後の発達障害支援の課題	<ul style="list-style-type: none"> ▲支援ニーズが高い子どもが帰還した際、つなぐ場所（療育機関等の社会資源）が十分につなぎたいのにつなげられないジレンマがある。 ▲帰還せずに避難先に残って療育を利用しているケースも少なくない。・避難先での医療・療育機関の不足の問題がある。避難者を受け入れている地域（避難先）の支援も重要である。

表3 事例検討から得られた災害時の発達の偏りのある子どもと保護者への支援

時期	カテゴリー ★：経験あり(Aグループ)、 ●：非経験(Bグループ)	コメント
発災直後	★持ち物チェックリストの作成	・避難時の持参物品のチェックリストを作成しておく。防災災害時持ち出し物の作成。
	★避難場所を明確に知る、伝える	・市町村内で避難できる場所がわかるようにしておく。 ・避難先の情報提供と併せて避難先の届け出先を明確化。 ・福祉、子育て家族用の避難先の確保。
	★総合相談窓口の確保及び設置	・たらい回しにならないように、総合窓口で相談を受け、どこに相談すべきかを振り分け、つなぎをする
	●直接支援は困難	・避難先で孤立して子育てに奮闘している母子や発災後に妊娠がわかったというケースも少なくないが、発災直後や避難中に把握することは難しい。
	●平時から取り組んでおくこと	・保護者が自ら相談できるように、町以外にも国や県や児童相談所も含め、多くの相談窓口の設置とその情報提供を十分に行う。 ・親同士のつながり、親の会への参加の促し ・発達障害の子どもが利用できる避難場所の確保(安心して避難できること)
避難中	★●情報発信(提供)	・子育てに関する情報、遊び場、健診、保育所等について、避難元と避難先の両方の情報発信(HPの充実) ・遊ぶ場所、健診情報、予防接種、妊娠届 等の子育て情報の提供 ・避難元だけでなく、避難先で利用できる相談窓口や子育て支援情報の提供。
	★避難先確認	・時間の経過と共に度重なる避難先の変更や独自の避難形態があり把握しにくい。
	★専門職の訪問・支援	・近所付き合いや人づきあいが苦手な母親への声かけ、訪問支援(保健師、NPO団体、福祉機関等)。 ・避難中の生活の困り感の確認。 ・療育機関の利用のサポート。
	●電話フォロー	・幼い児をもつ家庭に定期的に電話をかけるなどしてフォローを行う。
	●役場内での情報共有	・役場内では課を超えて、横のつながりをもって世帯・家族について必要な情報を共有し円滑な支援を図る。
帰還・生活再建	★子育て支援(孤立防止)	・話せる場がないとの声があり、親子の集まる教室事業をはじめた。交流の場の提供。
	★帰還・生活再建先への保健師の訪問	・生活状況や困り感の確認 ・発達障害に関する家族内(祖父母等)の理解と協力が得られるようにサポート。
	★●発達障害支援	・療育の紹介や見学同行 ・避難先と避難元の行政職及び保健師のやり取りを円滑に。
	●学校、保育所との情報共有	・子どもの状況や支援ニーズを地域で連携して把握する。
	●子育てサポートセンターの設置	・遊び場施設一覧などを作成、紹介。 ・子育てに関する全般的な情報の提供。 ・新たな学校や医療・福祉機関の情報提供。 ・帰還の生活再建における子育て支援の拠点づくり

4. 研究の反省・考察

- (1) 量的調査では、発達障害の有無にかかわらず被災経験のある親子を対象とした。子どもの問題行動を測定するSDQは全国平均と比べて「仲間関係」に支援を要する子どもが多かったことは留意すべき点である。特に、今年度の調査対象である小学2年生(H23年度生まれ；発災当時0歳)の「仲間関係」におけるHigh Needの割合は全体の41.4%であり、昨年度の小学2年生(H22年度生れ；発災当時1歳)11.8%、今年度の小学5年生(H20年度生れ；発災当時3歳)19.5%と比較して2倍以上の結果であった。発災直後の混乱時期に周産期を迎えた母親の身体及び精神的健康や出産後の母子関係、生活状況、避難に伴う転居回数等を踏まえ、さらに検討する必要がある。また、保護者のメンタルヘルスは全国平均と比べて概ね問題のない程度であったが、発災直後に避難した避難所の利用期間や家計への影響、飲酒量、家族間のケンカと相関が強く、子どものSDQとも相関する項目が認められたことから、このような因子を持つ一群について継続的にケアを行う必要があることがうかがえた。
- (2) 質的調査では、発達障害の子どもとその保護者のための災害時支援を「発災直後」、「避難中」、「帰還・生活再建」の3つの時期で検討した。避難者の特定と居場所の確認など全般的な生活を整える行政の役割と母子の全般的なサポート、発達の遅れや偏りのある子どもの早期発見及び支援、家族支援といった平時に行う支援をいかに避難元と避難先が連携して行うことができるかが課題であり、広域化した避難先における現場の調整役の必要性が示唆された。

グループワークでは、同じ資格を有する専門職であっても、被災経験の有無、被災体験の違い(地域、担当業務、避難元、避難先など)によって、親子の支援ニーズの捉えは異なり、それぞれの意見を十分に確認し、相互に理解し合いながら防災対策及び支援の検討を行うことの重要性が明らかになった。

今後は、研究(1)及び(2)の結果を踏まえ、福島県内外向けに研究成果報告会を実施すると共に、発達障害のある子どものための災害支援ガイドブックの作成及び配布を行う。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等：内山登紀夫、トラウマ臨床の明日、トラウマケアの現場から、愛着障害と発達障害の関係、福島の親子支援の現場から、こころの科学、208、pp62-67、2019。
内山登紀夫、自分たちが住む地域の災害対応力を高める-(重症心身障害児、医療的ケア児、発達障害などの)障害児とその家族支援- 発達障害児と家族への災害時支援 東日本大震災の経験から、脳と発達 51、p179、2019。
- (2) 口頭発表 なし
- (3) 出版物 なし

学 校 名	文 教 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ペアレンティングによる親子介入支援の 長期的効果検証とマニュアル作成		研究分野 教 育 学
キ ー ワ ー ド	①ペアレンティング ②自閉症スペクトラム症 ③注意欠如多動症 ④高次脳機能 ⑤介入		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
成 田 奈 緒 子	教 育 学 部	教 授	計画と遂行、生理機能・脳機能解析、研究成果の 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 副 真 美	ルーテル学院大学 総合人間学部	教 授	被検者の選定、実験の計画と遂行、心理検査、 質問紙解析

ペアレンティングによる親子介入支援の 長期的効果検証とマニュアル作成

1. 研究の目的

- (1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証
 - ①近年、家庭におけるペアレンティング（親などが子どもに与える生活・養育環境）の質が、遺伝素因以上に子どもの思春期以降の心身機能と行動・情緒に大きく影響するという科学的根拠を集積する。
 - ②現在参加中で継続希望の被験者、および新規に募集し参加希望する被験者において、ペアレンティング効果を主観的・生理学的・心理学的・脳科学的に解析・検証することで、長期効果の実証を得る。
- (2) 得られた結果をもとにした理論の体系化とペアレンティングマニュアルの提言
 - ①この実践理論に基づいたペアレンティングマニュアルを社会に広く認知させることで、密室育児で不安を高めた親が虐待や過干渉、共依存などの不適切な育児に陥ってしまう事例を減少させ、適切な子どもの生育環境が担保され、より良い発達が促されることを目的とする。
 - ②学術発表のみならず、講演会や書籍、マスコミなどを用いて広く社会に周知し、実践を促す。

2. 研究の計画

- (1) ペアレンティング理論の家庭における長期的実践とその効果の検証

2017-2018年研究に参加し、さらに2019年度も継続参加を希望した7組と、2019年度に新規参加を希望した5組、計12組の親子を被験者として研究を行うこととした。

 - ①支援・介入開始前のデータ測定

2019年8月に、親・子それぞれに対して各種検査を行い、支援・介入前のデータを採取した。親に対してはADHDRS4（ADHD評価スケール）・PARS（自閉症スペクトラム症評価尺度）・Conners質問紙による、子の発達障害関連評価・ストループテストによる前頭葉抑制機能評価・初回参加者のみA-ADHD、A-ASDスケールによる親の発達障害関連評価・STAI（不安尺度）・TEG/PEG（性格診断・統合型HTP（描画法）・TK式親子診断検査による親自身の心理・特性検査を行った。一部被験者はNIRS・脳波測定も施行した。一方、子に対してはストループテストによる前頭葉抑制機能評価・抽象語概念テストによる語彙能力と認知発達検査・C-MAS（不安尺度）・AN-エゴグラム（性格診断）・PFスタディ（欲求不満テスト）・統合型HTP（描画法）による子自身の心理検査を行った。
 - ②親へのワークショップ教育による支援・介入

2019年8月～2020年2月の間に親は3回のワークショップ教育に参加し、途中生理学的評価として心拍 R-R 間隔を用いた自律神経機能や不安尺度を測定した。
 - ③子への子ども用プログラムによる支援・介入

2019年8月～2020年2月の間に子は3回の子ども用プログラムに参加し、コミュニケーション、言語、空間認知、ストレス対処法を意識したゲーム、学習支援を行う。その際に、臨床心理士等専門家及び大学生が行動観察による評価を行った。
- (2) 上記支援・介入の効果判定

上記継続支援を行いながら、2020年2月に以下の各種パラメーターの測定を行い、個人データの前後比較と、集団としての比較、また可能であればASD・ADHDの診断がつく発達障害群とTD群の比較などを行い、検討する予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大のため、現在までに対面での測定は延期し、以下の①主観的評価の質問紙のみ郵送で記入を行い、5月中旬までに回収を終えた。今後状況を見ながら②を行う予定である。

 - ①主観的評価

親に対してPARSやConners質問紙などを用いた子の発達障害関連評価を行う予定である。
 - ②生理学的評価

心拍 R-R 間隔を用いた自律神経機能を定期的に測定する。自律神経分析加速度脈波計パルスアナライザープラス（以下TAS9(YKC社)研究代表者・分担者共に既に所持）を用い

た自律神経活動分析結果より、期間前後での心拍・自律神経活動量、交感神経/副交感神経比を記録する。また、睡眠状態測定(オムロン睡眠計 HSL-101、研究代表者が既に所持)や唾液中アミラーゼ測定も併用して生理学的評価を行う予定である。

3. 研究の成果

(1) 2017 - 2018 年参加親子 12 組：子 12 名、(7～15 歳：平均年齢 8.9 ± 0.8 歳(2017 年 8 月時)、男児 10 名、女児 2 名) およびその保護者 12 名(30～46 歳：平均年齢 41.4 ± 1.3 歳(2017 年 8 月時)、男性 1 名、女性 11 名)の計 24 名により蓄積されたデータの集計と解析

①12名(8-16歳)の被験者子についてストループテストの正答数が実践前11.4問から実践後11.7問(12問中)に、また平均処理速度が実践前1342msecから実践後1156msecに、いずれも改善した。また、S-HTP描画の評価得点平均は実践前-0.11点から実践後0.09点と上昇した。

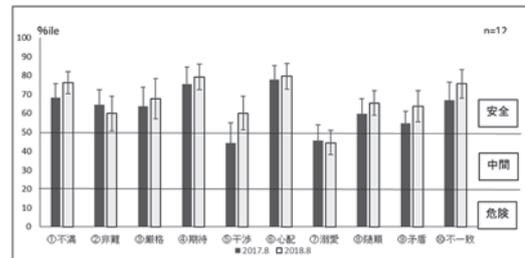


図 1A. 親被験者全 12 名における TK 式親子関係検査結果

②被験者12名の親におけるTK式親子関係検査(母→子)については、図1Aに示すように実践前後で「非難」「溺愛」以外の評価パーセンタイル値が上昇した。一方で、このうち子が発達障害の診断基準を満たす親(母8名)のみを抽出すると、図1Bに示すように実践前は「干渉」「溺愛」「随順」「矛盾」の4項目が中間域に入り、被験者全体平均よりすべての項目で平均的に低かったが、実践後は評価パーセンタイル値の平均的上昇と「溺愛」以外の項目がすべて安全域に入る結果が得られた。これらのことから、特に発達障害児とその親に対してペアレンティングによる支援・介入は親の子に対する評価を高め、子の認知・高次脳機能発達に寄与する可能性が示唆された。2019年度は、継続参加親子と新規参加親子の比較検討を加えさらに検証を深める。なお、これらのデータについては、2019年11月の日本心身医学会総会にて発表を行い、現在学会誌に原著として投稿中である。

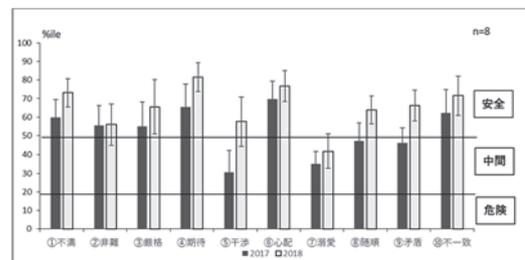


図 1B. 発達障害子の親被験者親全 8 名における TK 式親子関係検査結果

(2) 2017 - 2019 年継続参加親子 9 組：子被験者 9 名(6～13 歳：平均年齢 8.3 ± 2.0 歳(2017 年 8 月時) 男児 7 名、女児 2 名)と、親被験者 9 名(32 歳～49 歳：平均年齢 42.8 ± 4.7 歳(2017 年 8 月時) 男性 1 名、女性 8 名)の計 18 名 9 組に蓄積されたデータの集計と解析

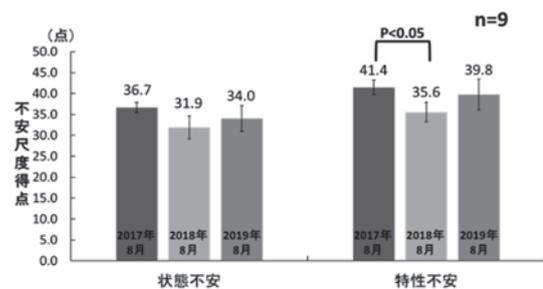


図 2A. 親被験者親全 9 名における STAI 不安尺度結果

①2017年—2018年の実践、及び2019年—2020年における実践の両方に参加した被験者親9名における、状態不安・特性不安の平均値の年度変化を図2Aに示す。2017年から2018年にかけては状態・特性いずれも低下し特性は $p < 0.05$ (Wilcoxonの符号付き順位検定)の有意差を認めた。しかし、2018年から2019年にかけては、状態・特性とも再び上昇した。

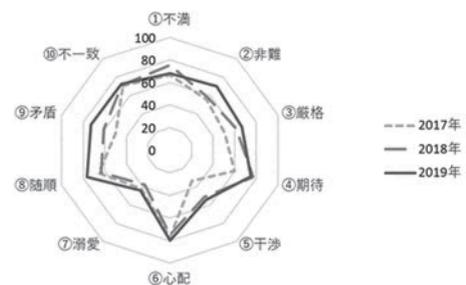


図 2B. 親被験者親全 9 名における TK 式親子関係検査結果

②2017年—2018年の実践、及び2019年—2020年における実践の両方に参加した被験者親12名における、TK式親子関係検査(親→子)の年

度変化を図2B に示す。全体として年度を経て良好な結果に変化しており、干渉・非難は平均的に中間域から安全域に変化した。不満の項目においては、2017年から2018年にかけて、 $p=0.089$ の有意傾向が認められた。随順の項目においては、2018年から2019年にかけては、 $p=0.075$ の有意傾向が認められた。矛盾の項目においては、2018年から2019年にかけては、 $p=0.091$ の有意傾向が認められた。

4. 研究の反省・考察

(1) 考察

- ①親子関係の改善と子の前頭葉機能・認知機能の改善が両輪となり年度をまたいで改善することが確認された。このことより、ペアレンティングを用いた親子同時介入支援は親子相互作用をもたらし、有効であることが示唆された。
- ②一方で、支援が中断された期間を経ても親子関係は3回の測定で継続的に改善が続けたがSTAIを用いて測定した親の不安尺度得点においては、2017年から2018年にかけては改善したが、研究期間が終了した2018年から次の研究が開始されるまでの2019年にかけては平均的に低下し、子の状態と自覚的親子関係は改善しているにもかかわらず、親の不安は増していることがわかった。

これは、ペアレンティングに基づく親子同時介入支援の有効性と持続性を示す一方で、継続的な支援が途絶えることの危険性を示唆するものであった。今後は生理機能等を含め継続的に長期効果を検証していきたい。

(2) 反省

- ①2020年2月よりコロナウイルス感染拡大の影響を受け、脳機能測定等の最終測定が延期となっている。現時点でTK式親子関係検査等、質問紙での検査データは回収済なのでこの結果解析を行い、状況を見ながら他の生理機能検査を行っていく予定である。
- ②特に小児被験者からの協力が得られず、欠損値となるデータが散見されるため、データ数が統計学的検討に値しないものがある。今後は被験者を増やすことも考慮に入れ、研究を継続したい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①成田奈緒子
親の軸が子を変える一育てにくい子ほどよく伸びます—
保育と保健 26(1):67-69, 2020
- ②成田奈緒子
脳の発達から考える子どもの睡眠と生活習慣の重要性
小児歯科臨床 24(3):22-29, 2019

(2) 口頭発表

- ①田副真美、高橋海来、山中さくら、成田奈緒子
新規ペアレンティングマニュアル作成に向けた親子支援の
客観的効果検証(1)
第60回心身医学会 2019.11.15-17 大阪
- ②成田奈緒子、川手未来、田副真美 新規ペアレンティングマニュアル作成に向けた親子
支援の客観的効果検証(2)事例検討
第60回心身医学会 2019.11.15-17 大阪
- ③成田奈緒子 親の軸が子を変える一育てにくい子ほどよく伸びます—
第25回日本保育保健学会市民公開講座(招待講演) 2019.5.19神戸

(3) 出版物

- ①成田奈緒子・上岡勇二
子どもが幸せになる「正しい睡眠」
2019.4.15 産業編集センター

学 校 名	白 梅 学 園 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	性的問題行動を示す発達障害の青少年と保護者向け ySOTSEC-ID支援 —発達支援と臨床的プログラムの開発—		研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①性的問題行動 ②知的障害 ③発達障害 ④性犯罪加害 ⑤リスクアセスメント ⑥治療アプローチ ⑦思春期 ⑧保護者支援			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
堀 江 ま ゆ み	子 ど も 学 部	教 授	全体統括 発達支援と臨床プログラムySOTSEC-IDの開発・ プログラムの実施体制の構築

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
榎 屋 二 郎	東 京 医 科 大 学 学 部 東 医 学	准 教 授	発達支援と臨床プログラムySOTSEC-IDの実施・ リスクアセスメントARMIDILOの評価
内 山 登 紀 夫	大 心 正 大 学 学 部 大 心 理 社 会 学 部	教 授	発達支援と臨床プログラムySOTSEC-IDの開発・ 保護者支援とアセスメントと対応

性的問題行動を示す発達障害の青少年と保護者向け ySOTSEC-ID 支援 －発達支援と臨床的プログラムの開発－

1. 研究の目的

(1) 「ySOTSEC-ID “Keep Safe”」日本版マニュアルの作成

①本研究は、性的問題行動を示す知的障害・発達障害のある青年期の人々に対する効果的な発達の・臨床的支援方法を研究することを目的とし、イギリスで開発された「性的問題行動（HSB）を示す知的障害・発達障害のある青少年と保護者向けのグループ治療プログラム ySOTSEC-ID “Keep Safe”」に注目した。

ySOTSEC-ID “Keep Safe”（以下、“Keep Safe”とする）とは、有害な性行動（HSB）をとる知的障害のある青少年（CYP）の現場に関わる実践者と研究者が開発したものである。成人向けの支援の中で対象者の相当数がある不適切な性行動や性犯罪行為が青少年期に始まっていることに気づき、思春期・青年期への発達の支援や臨床的アプローチが必要であることが指摘されており、青少年への対応の重要性が指摘されているにも関わらず、彼等に対するサービスはわずかであり、調査研究も少ない。

②そこで筆者らは、“Keep Safe”Project 代表のロウィーナ・ロシター博士（Rowena Rossiter）と連携して資料を整え共同研究を行うこととした。日本においても活用できる「性的問題行動を示す知的障害・発達障害のある青少年とその保護者への支援プログラム」日本版マニュアルを検討し、日本に合わせたプログラム内容の編集や適切な教材の作成を行うこととした。

(2) “Keep Safe”日本版のモデル実践と効果測定

① “Keep Safe”日本版の妥当性を検討するために、モデル実践を行うこととした。モデル実践を実施する前に、対象者の障害特性、リスクアセスメント、触法・非行分析を行うこととし、検査バッテリーを検討した。

② “Keep Safe”日本版のセッション実施を確定するために、モデルセッションのプログラム構成および実施方法を検討することとした。モデルセッションでは、どのような効果を得ることができるか、エビデンスのある予防的・発達支援の取り組みとすることとした。

これらにより、性的問題行動を示す知的障害を含む発達障害のある青少年とその家族に対して、有効な発達のおよび臨床的支援を提供することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) “Keep Safe”日本版マニュアルの作成

① “Keep Safe”イギリス版マニュアルの翻訳研究協力チーム12名を編成した。大学研究者の他、少年院教官、特別支援学校教員、弁護士、児童相談所心理士など、知的障害・発達障害の触法・非行青年の支援に関わる実践経験者を含めた。和訳ともにマニュアルに使用される認知行動療法に関する事例や知的障害・発達障害のある人向けに作成された視覚的教材が日本においても妥当であるか検討を行うこととした。

② “Keep Safe”日本版マニュアルで使用するのに妥当である事例を作成し、日本版の文化に合わせたイラストやアニメ等の視覚的教材を作成することとした。

(2) “Keep Safe”日本版のモデル実践と効果測定

① “Keep Safe”日本版マニュアルのプログラム効果を測定するために、A地区およびB地区の2地区においてモデル実践を行った。プログラム本体は週1回、2時間、全36セッションであるが、モデル実践であることから20セッションの短縮版で実施した。主要セッションの選択と焦点化を事前に検討しプログラムを実施した。

②モデル実践にあたり、事前にリスクアセスメント、知的能力、自閉スペクトラム症の特徴把握、環境状況のアセスメント等を行った。対象者は、知的障害・発達障害のある7人の青年であった。年齢は12歳～27歳、知的能力はIQ50台～80台、7人とも自閉スペクトラム症の特徴を有し、1人はADHD特徴が顕著であった。7人中6人はほぼ全セッションに参加した。

3. 研究の成果

(1) “Keep Safe” 日本版マニュアルの作成と視覚的教材の作成

知的障害・発達障害のある青少年とその家族に向けた“Keep Safe”の日本版マニュアルを作成した（全 365 ページ）。

① “Keep Safe” 日本版マニュアルの目的は次の 2 つに焦点を当てた。

A ; ウェルビーイングの向上（ニーズを、社会に適応した方法で満たす）

B ; 再犯に至るリスクの低下（ニーズを、性加害や他の不適切な方法で満たさない）

これは特に、認知行動療法に基づいた支援、保護者とのワーク主要モデルに準拠している。

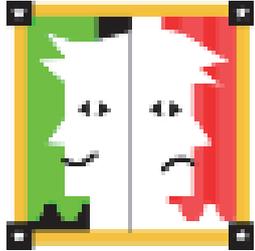
Ward らの「グッドライフ・モデル」では、性問題行動を示す者は、内的リソース（スキルや態度）と外的リソース（社会資源、社会的支援など）に欠けるために、基本的ニーズを性加害という方法によって満たそうとした結果であるとしている。このために、これらの内的・外的リソースを強化することに焦点を当て、ニーズや目標を達成するための向社会的な方法がとれるようにする。それにより性加害の再犯に至るリスクを統制することを目的としている。グッドライフ・モデルは、他のモデル、とくに「リスク-ニード-応答性モデル」(RNR モデル)との類似点と相違点が盛んに議論されている。RNR モデルによれば、効果的な犯罪者処遇を行うためには以下の 3 つが重要であるとしている。

- Risk: 再犯リスクの高低に応じた密度、
- Need: 再犯に結びつく要因に焦点を当てる、

- Responsivity: 認知行動療法に基づき、本人の学習スタイル、モチベーション、ストレングス（長所、強み）に対応した応答性の高い方法を採用する。

グッドウェイ・モデルは、1990 年代後半にニュージーランドの「Wellstop」サービス（性暴力を犯した知的障害のある青少年の支援サービス）において、Ayland たちによって、当初、クライアントとのコミュニケーションをとるために開発された。知的障害のあるクライアントの言語やコンセプトを聴き、それに合わせて支援の枠組みを適合させ開発された。グッドウェイ・モデルは、発達、アタッチメント、トラウマの問題、さらに認知行動療法、関係者の共通理解、文脈フレームワーク（contextual frameworks）の理論を統合・総合した取り組み。ナラティブを使い、自分の考えや感情を把握し、それを 1 本のストーリーとして再構築できるようにするものであり、本プログラムでも重視した。こうした問題を扱う目的は、クライアントが、自分の思考・感情・行動・価値観・脆弱性・ストレングスがどのように形成されたかを理解することを助け、自分のよい面/悪い面に関連づけ、自らの加害に直面し、自らの思考、態度、行動を適切なものに変えていくために、「こうなりたい」という目標にたどりつくための新しい物の見方を探すためでもある。

② “Keep Safe” 日本版マニュアルのモジュール構成（当事者 6 モジュール 38 セッション、保護者モジュール 7 : 16 セッション）と主要教材は以下のものであった。特に、日本の思春期・青年期の当事者に合わせたイラストやアニメも合わせて作成した。

<p>モジュール 1: キープセーフとはどのようなプログラムか? 開始にあたって</p> <p>はじめに キープセーフ開始に当たって 解説</p> <p>S1 : キープセーフとは何か、歓迎と導入</p> <p>S2 : グループを知ろう</p> <p>S3 : 「各人のグッドライフ・モデル」導入</p> <p>S4 : 「グッドライフ」「グッドサイド」「グッドウェイ」</p>	
<p>モジュール 2: 成長: 関係性, 性的関係と境界</p> <p>S1 : 私たちの体</p> <p>S2 : 成長</p> <p>S3 : 友だち、家族、恋人</p> <p>S4 : 関係性: 恋人関係</p> <p>S5 : モジュールの復習</p> <p>S6 : 同意</p> <p>S7 : 良いタッチと悪いタッチ、その結果（その後何が起こる?）</p> <p>S8 : セックス、子どもをつくるということ、子どもをつくらないということ、性感染症と性の健康</p> <p>S9 : ソーシャルメディア、インターネット、同調圧力</p> <p>S10 : ソーシャルメディア、インターネット、同調圧力: 結果（その後何が起こるか?）</p>	

<p>モジュール 3: 感情と感情のコントロール</p> <p>S1 : どんな気持ちかな</p> <p>S2 : 感情と私たちの体</p> <p>S3 : 思考と感情を関連づける</p> <p>S4 : 思考と感情と行動を関連づける</p> <p>S5 : 責任者は誰なのか? 自分か感情か?</p> <p>S6 : 私のクールダウン計画</p>	
<p>モジュール 4: 自分の行動を理解する</p> <p>S1 : グッドウェイモデル:グッドサイド/バッドサイドの復習</p> <p>S2 : グッドウェイモデルと 3 人の悪者 (Mr. 最低な奴) を紹介する</p> <p>S3 : 3 人の悪者 (Mr. 最低な奴) と私の性問題行動</p> <p>S4 : 3 人の悪者 (と Mr. 最低な奴 悪い奴) と謝罪</p> <p>S5 : 3 人の賢人 (又は安全な人) を紹介する。</p> <p>S6 : 自分のグッドサイドを強くする</p>	
<p>モジュール 5: 共感と結末の予測 (その後何が起こるか?)</p> <p>S1 : 自己と他者の感情の理解と共感</p> <p>S2 : 「共感」について理解する</p> <p>S3 : 物事の結果と性問題行動がもたらす影響</p> <p>S4 : 性問題行動の結果と謝罪の手紙</p> <p>S5 : 謝罪する理由と復習</p> <p>S6 : 謝罪の手紙</p>	
<p>モジュール 6: 私のキープセーフ・プランを作る そして前へ進む準備</p> <p>S1 : 私の「良き人生 (グッドライフ)」を組み立てる</p> <p>S2 : 古い人生と新しい人生 (PART 1)</p> <p>S3 : 古い人生と新しい人生 (PART 2)</p> <p>S4 : 私のキープセーフ計画とツール (PART 1)</p> <p>S5 : 私のキープセーフ計画とツール (PART 2)</p> <p>S6 : 振り返り・修了</p>	
<p>モジュール 7: 保護者モジュールおよびセッション概要</p> <p>S1 : キープセーフとは? / プログラムの開始</p> <p>S2 : 対人関係と境界 (保護者のみ)</p> <p>S3 : スーパービジョン (監督) と性教育 (保護者のみ)</p> <p>S4 : ピアとの対人関係、境界と性教育 (保護者のみ)</p> <p>S5 : ピアとの対人関係、境界と性教育 (保護者のみ)</p> <p>S6 : メンバーたちへの性教育と感情コントロール (保護者のみ)</p> <p>S7 : 感情のコントロール</p> <p>S8 : 行動のコントロール: 選択的関心、選択と結末</p> <p>S9 : グッドウェイモデルの導入</p> <p>S10 : 自分の行動を理解する (パート 1)</p> <p>S11 : 自分の行動を理解する (パート 2)</p> <p>S12 : 共感の理解 (保護者のみ)</p> <p>S13 : 共感の理解と謝罪 (保護者のみ)</p> <p>S14 : 謝罪と称賛の手紙</p> <p>S15 : 終わることと新たな始まり 1</p> <p>S16 : 終わることと新たな始まり 2</p>	

(2) “Keep Safe” 日本版のモデル実践と効果測定

- ① “Keep Safe” 日本版のプログラム内容の妥当性を検証するために、全国の 2 か所でモデル実践を行った。その際、知的障害・発達障害のある思春期青年期の当事者に合わせ、理解しやすいような視覚的教材や演習方法などを導入し、より効果的な認知行動療法になるようプログラムを改良した。全国 2 か所 (A 地区グループおよび B 地区グループ) でのモデル実践においては、プログラム内容の検証に加えて、知的障害・発達障害のある当事者に対するプログラム効果を測定した。

A 地区グループは児童相談所と知的障害児支援施設が把握する性問題行動を有する当

事者4人、B地区グループは発達障害者支援センターがコアになって把握していた性問題行動を有する当事者3人が対象であった。生活年齢は12歳～27歳、知的能力はほぼ軽度であり、認知行動療法が求める情報の共有やコミュニケーションを取ることが可能であった。リスクアセスメントはARMIDILO-S (The Assessment of Risk and Manageability for Individuals with Developmental and Intellectual Limitations who Offend Sexually) により行い、性問題行動において低リスク1人、中リスク4人、高リスク2人であった。7人中6人が、最終セッションまでの18セッション(9か月間)に参加した。プログラム終了後に効果が見られたのは「監督の順守」および「グッドウェイ、バッドウェイの理解」であった。生活ルールを守り他者に共感する行動や、自分に不利な事態であっても事前に身近な支援者に相談し解決しようとする姿勢が見られていた。現在、フォローアップ中であり効果測定を継続している。

② “Keep Safe” プログラム実践における事前事後的アセスメントの検討

“Keep Safe” プログラム実践において、どのような対象者に対し有効な効果が得られるかを検討するために、事前事後的アセスメントバッテリーを検討した。“Keep Safe” Group 治療の適合性スクリーニングテスト、静的リスクアセスメント Static99、動的リスクアセスメント ARMIDILO-S、ERQ-CA:感情コントロール尺度、SDQ:強みと弱み尺度、ENDCORE:ソーシャルスキル尺度、時間的展望尺度、MES:共感尺度、POMS (Profile of Mood States):気分の尺度 35項目の短縮版である。これらは引き続き検討を進めることとしている。

4. 研究の反省・考察

(1) “Keep Safe” 日本版マニュアル視覚的教材の検討および正規インストラクター養成実施

- ① “Keep Safe” 日本版マニュアルの作成と視覚的教材の検討は、おおむね目的に達した。知的障害・発達障害のある思春期青年期の当事者に合わせ、理解しやすいような視覚的教材や演習方法などを導入し、より効果的な認知行動療法になるようプログラムを改良した。
- ② 日本語版マニュアルの検討と同時に、“Keep Safe” セッションを実施するインストラクター養成を行った。理論的研修を2日間、オンライン研修にて行い、その後1日間対面演習において、各セッションの模擬演習を含めて実施方法の実務研修を行った。全国2か所で順調に実施でき、全国で70人の正規インストラクターが養成された。今後、この正規インストラクターの中で、全国3か所でプログラム実施を進めることになっている。

(2) “Keep Safe” 日本版のモデル実践と効果測定

- ① 今回、“Keep Safe” 日本版のプログラム内容の妥当性を検証するために、全国の2か所でモデル実践を行ったが、セッションは、毎週1回、2時間行うので、モデル実践の20回も約6か月を要した。2か所ともおおむね、対象者から効果的な反応を得ることができ、プログラム構成や実施方法の一定の安定性を確認することができた。今後、本プログラム全セッション38回を行うために、C地区で準備を進めている。予定する対象者は知的障害・発達障害のある性問題行動や性加害行為を起こした本人たち5人である。セッションを実施するインストラクター養成も順調に進み、全国で70人の正規インストラクターが養成された。C地区での全セッションプログラム実施は、このうち約10人がチームを組んで実施することになっている。現在、プログラム内容の精査、および教材の再作成を進めている。
- ② “Keep Safe” プログラム実践の効果測定をエビデンスある方法で実施するために、さらに、事前事後的アセスメントバッテリーを考察していく。特に、ERQ-CA:感情コントロール尺度、SDQ:強みと弱み尺度、ENDCORE:ソーシャルスキル尺度、時間的展望尺度、MES:共感尺度、POMS (Profile of Mood States):気分の尺度 35項目の短縮版については、新しく取り組み始めたアセスメントツールであり、今後もより精査して検討を進めることとしている。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等 なし
- (2) 口頭発表 なし
- (3) 出版物 ①堀江まゆみ(2019)「第5章 障害者の犯罪のアドボケーション」、『臨床発達心理士わかりやすい資格案内 第4版』, 金子書房. P38～42.
②堀江まゆみ(2019)「犯罪リスクのある知的・発達障害のある人たちを地域で支えるために」, 更生保護. 第71巻第3号, P20～23.

学 校 名	追 手 門 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	外国人の子どもの保育・教育環境の改善 —「誰も置き去りにしない」ために—		研究分野	教 育 学
キ ー ワ ー ド	①SDGs ②学習言語 ③母語 ④補習教室			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
竹 下 秀 子	心 理 学 部	教 授	研究の統括と言語習得・学習状況調査

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河 か お る	滋 賀 県 立 大 学 ・ 人 間 文 化 学 部	准 教 授	国および自治体の施策研究
別 府 悦 子	中 部 学 院 大 学 ・ 教 育 学 部	教 授	言語習得・学習状況調査
鈴 木 祥 子	認定特定非営利活動法人 NPO ぽ ぽ ハ ウ ス	職 員	プレスクール設営

外国人の子どもの保育・教育環境の改善 — 「誰も置き去りにしない」 ために —

1. 研究の目的

日本国憲法及び教育基本法は「国民はその保護する子女に普通教育を受けさせる義務を負う」としている。ただし、外国人にこの条項は適用されないという見解が長らく支配的であり、国や自治体が外国人児童生徒の教育に積極的にとりくむことがなかった。しかし、内外の子どもの人権を守る意識や制度の拡大と外国人移入増大の影響もあり、施策は徐々に前進してきている。とはいえ、子どもの発達や母語および日本語の習得状況、学力についての的確に把握されていないのが現場の実情である。そこで本研究では、外国人児童の教育体制の整備および内容充実と、外国人集住地域を含む市町、都道府県、国においてどのような支援が子どもたちと学校現場に必要であるかを検討するため(1)日本語・母語の習得状況と学習状況の調査、(2)外国人学校／就学前施設／小中学校／学童保育所の在籍および運営状況に関する調査、(3)小学校および中学校に向けたプレスクールの設営、の3つの側面から実態の解明にとりくむこととした。これらの成果を統合し、地域の子ども・子育て環境に多言語・多文化の視点を強化するための社会的発信も合わせておこなうことも含め、多言語・多文化の子どもへの就学前期から就学後6年間の支援のあり方について提言するための基礎資料を得ることをめざした。

2. 研究の計画

- (1) 「外国人児童生徒のための JSL 対話型アセスメント」に準じた調査：Q 自治体内のA小学校在籍外国人児童の参加を得て、母語および日本語の習得状況の調査を実施し、子どもの言語習得、教室での学習状況の実情を把握する。
- (2) 外国人学校／就学前施設／小中学校／学童保育所の在籍および運営状況に関する調査：外国人の子どもたちの保育環境改善をどう実現していくのか、制度的な側面を検討する。地域の就学前施設、学校や学童保育所が果たしている役割についても、教育機会確保法や放課後学習支援の観点から制度的な側面を検討する。
- (3) プレスクール：小学校に入学する保育実践所、幼稚園外国人在籍児および来年度に中学校に入学する小学校6年生の外国人児童を対象としたプレスクールを年度中、試行的に実施し、次年度以降の本格的取り組みに必要な条件を検討する。

3. 研究の成果

- (1) 外国人児童生徒のための JSL 対話型アセスメント (Dialogic Language Assessment for Japanese as a Second Language: DLA for JSL) の実施：文部科学省が開発し、公開している『話す』『書く』『読む』『聴く』の調査項目を準用し、年度中に数回に分けて実施した。調査期間に在籍していた31名のうち、27名が本調査に応じた。事前に参加児童の状況に詳しい日本語指導担当教員と内容を打ち合わせのうえ、学校長に調査実施の許可を得た。その後、保護者に調査の趣旨と方法を記載した文書(当該母語の翻訳を添付)を示しつつ、日本語指導担当教員が口頭で内容を説明し、児童の参加について口頭と文書で了承を得た。1) DLA 『話す』—母語と日本語の習得語彙数：日本語語彙と母語語彙をいずれもバランスよく習得している児童がいる一方で、日本語語彙数が多く母語語彙数が少ない児童、母語語彙数が多く日本語語彙数が少ない児童を指摘できた。2) 日本語語彙数とDLA『話す』—基礎タスク得点・対話タスク得点：日本語語彙数が多くかつ基礎タスク得点、対話タスク得点が高い児童がいる一方で、日本語語彙数が多いが基礎タスク得点、対話タスク得点が高い児童がいる一方で、日本語語彙数が少なく基礎タスク得点、対話タスク得点が高い児童がいる一方で、日本語語彙数が少なく基礎タスク得点、対話タスク得点が高い児童を指摘できた。ただしこのうち、2名の対話タスク得点は高かった、さらに、日本語語彙数が少なく基礎タスク得点、対話タスク得点が高い児童、日本語語彙数が少ないが対話タスク得点が高い児童、基礎タスク得点が高いが対話タスク得点が高い児童を指摘できた。3) 日本語習得状況の主成分分析：DLAの『話す』認知タスクの「物語口述」、『読む』の「絵本読解」、『書く』の「作文」、『聴く』の「動画視聴」に準じたやりとりから、児童のパフォーマンスを評定した。「日本語語彙数」、「対話タスク」に加えて、「物語口述」(『話す』から)、「音読」、「筋理解」、「気持ち理解」(以上

- 『読む』の「絵本理解」から)、「作文」(『書く』から)、「内容聴き取り」『聴く』の動画視聴から)の全9項目の得点を主成分分析したところ、第1主成分として「言語表出」、第2主成分として「心情理解」が抽出できた。本分析の対象となしえた児童のうち、3分の1が両面において相対的に順調に日本語習得をしていると評価できた。他方、作文の評価得点が1回目から2回目にかけて大きく上昇した者と、2回目にかけて大きく下降した者があった。
- (2) 調査地域の所在県は人口比も増加率も全国的には上位の「外国人の多い」都道府県の一つである。県内自治体の外国人人口比率は、他府県大都市に近接する自治体市街地では少ない。調査地域が所在するQ自治体の外国人人口比率は4.1% (県全体で2.04%)であり、同自治体内でも外国人集住地域の偏在がある。また、県全体では86.5%がニューカマーであるが同自治体では96.7%となっている。若年者の比率が大きいのも同自治体の特徴であるが、2013年度から実施の文部科学省「公立学校における帰国・外国人児童生徒に対するきめ細かな支援事業」に参画したのは2019年度になってからだった。教育委員会での聴き取りでは、財政規模の小さい自治体の参画には諸々の制度的障壁が指摘された。同年9月に文部科学省は外国籍児童生徒の就学状況について初めての全国調査を実施したが、県独自のフォローアップ調査で不就学と確認できたケースはなかった。ただし、家庭訪問等で就学確認できなかった9人、就学状況確認としていないため就学状況不明13人が把握された。
- (3) 研究計画では、就学前と中学校入学前の就学前施設最年長および小学校6年生を対象としたプレスクールの試行としていたが、上述(1)の進捗状況に鑑み、小学校在籍児を対象とした「補習教室」に変更して実施した。参加者はQ自治体内の2つの公立小学校に在籍する外国人児童1年生、3年生、5年生の13名、支援者は日本語支援、母語支援、適応支援の立場から7名だった。各回とも10時から昼食をはさんで16時までの活動とし、午前中は「勉強」にあて、午後は課外活動、おやつ、「遊び」を盛り込んだ。11月～3月までの全12回を企画したが、新型コロナウイルス感染症にかかわる活動自粛要請を受けて9回目以降を中止したため、全8回の実施となった。上記、日本語支援、母語支援、適応支援に専門的な知見を有する支援者を確保できたこと、子どもたちの自主性を尊重するアプローチを基本にしたことで、子どもたちの参加意欲は高く維持され、支援者との関係性も良好に構築された。「勉強」の内容は学校の宿題対応が中心となったが、各教科において、学校で学習済みの内容でも理解できていない語彙、概念が多い(算数の「割合」、お音楽の四分音符など)問題が把握された。他方、学校での在籍学級の異なる外国人児童同士が交流し、共同学習を充実させる貴重な機会となっていることが窺われ、日本での暮らしや学習の基盤を確かなものにする手立てとして子ども同士、保護者以外の大人がかかわる「補習」を軸とした場の有効性が示唆された。

4. 研究の反省・考察

本研究では、DLAによる日本語習得状況評価において日本語語彙数が20に満たない場合でも、基礎タスクはクリアできており、日本語語彙数の増加は基礎タスク得点よりも対話タスク得点と相関する傾向があった。他方、相対的に基礎タスク得点が低くても、現実の問題状況に対応する日本語能力(勧誘や説明)を問う対話タスクで得点が高い児童があった。これらの児童については、日常生活において、日本語能力が高いと理解される可能性がある。当該児童の「対話力」を適切に評価し称揚するとともに、日本語語彙数の拡大に心がけ、日本語の基礎的な運用において難がないかどうか留意した指導が実施される必要がある。また、総じて支援の不十分な環境下でありつつも日本語習得を進めることができている児童、個々に課題を有しながらも前進している児童の存在が明らかになった。これまでの個人歴とともに、当該年度の学習、生活両面の指導経過を参照しつつ、日本語習得を進捗させる要因を探っていく必要がある。「誰も置き去りにすることなく」、外国人児童の学習状況を改善していくため、個々の児童の状況の詳細な把握と、個別の課題に即した支援に向けた取り組みが一層求められる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 竹下秀子・奥村ルシア・河かおる（2020）外国人集住地域の公立小学校外国人児童の日本語習得の実情—「外国人児童生徒のためのJSL対話型アセスメント」の準用から。日本発達心理学会第31回大会、大阪国際会議場（グランキューブ大阪）、2020年3月2日～4日。

(3) 出版物

なし

2019 年度(第 44 回)学術研究振興資金 学術研究報告

令和 2 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

TEL 03 (3230) 7315・7319

FAX 03 (3230) 8223

禁無断転載