

肥満と関連する受容体GPCR5BによるATP合成制御シグナルの解明

東北医科薬科大学 薬学部 黒田 喜幸

1. 研究の目的

GPCR5B (5B) は、リガンド不明のGタンパク質共役受容体 (GPCR) である。近年、ヒトにおける5Bの遺伝子多型は、肥満度を表す指数であるBMIと関連することが報告された。これを支持するように、5B欠損マウスは体格が小さく、脂肪や肝臓が小さい。さらに、糖尿病患者の膵島細胞では5Bの発現が亢進しており、膵島細胞の生存を制御していることも報告されている。これらの現象に関わる5Bのリガンドやシグナル伝達機構の詳細は未だ不明であるが、これを明らかにする基礎研究の成果は、肥満や糖尿病などの病因解明や治療に向けた応用研究への発展が期待できる。

これまでの実験で、5Bを強制発現した細胞でATP量が低下するという結果を得ている。TORシグナルやサーチュインは、細胞のATP量を制御していること、また肥満やインスリン感受性に関わることが示唆されていることから、5BによるATP量の低下という現象に関与するシグナルおよび分子となり得ると考えた。5B、TORシグナル、サーチュインという3因子の相互作用を検討することで、肥満や糖尿病に関わる新たなシグナル伝達経路の発見につながるのではないかと考えた。

2. 研究の計画・方法

(1) 5B発現細胞の生存・増殖における栄養環境の影響

培養細胞のATPは、主に培養液中のグルコースを代謝することで合成されると考えられる。ATPは生命活動のエネルギー源であることから、5B発現細胞におけるATP合成量低下が、生存や増殖に与える影響を評価した。

5B遺伝子を導入した培養細胞 (HEK293) を、グルコース不含培地またはグルコース含有培地で培養し、MTTアッセイを用いて細胞数の変化を経時的に測定した。

(2) 代謝関連遺伝子の発現解析

ATP合成との関与が考えられる遺伝子について、5B発現細胞における変化を解析した。グルコースの取り込みに関与するグルコース輸送体 (GLUT)、ATP合成酵素などの脱アセチル化を通してATP合成を制御するサーチュイン、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化とATP合成を脱共役するタンパク質 (UCP) を解析の対象とした。

グルコース不含培地またはグルコース含有培地で24時間培養した5B発現細胞からRNAを抽出し、リアルタイムPCRにより遺伝子発現量を解析した。

3. 研究の特色

糖尿病、高脂血症、高血圧症などの生活習慣病に起因する疾患は、日本人の死因の上位を占め、国の医療費増大の原因ともなり、社会的な医療健康問題となっている。肥満は生活習慣病のリスク因子であり、肥満の予防および改善への対策が必要である。本研究の対象としている5Bは、既にヒトの肥満や糖尿病との関連が指摘されている。5Bから発せられるシグナルが、どのような経路をたどって肥満や糖尿病を誘発するのかを解明し、この経路を遮断しうる化合物等を見出すための基礎的研究は、将来の肥満予防および改善に向けた新規薬剤の開発を見据えた応用研究に発展することが期待できる。

4. 研究の成果

(1) 5B発現細胞の生存・増殖における栄養環境の影響

5B遺伝子を導入した細胞をグルコース含有培地で培養し、24時間および48時間後にMTTアッセイをおこなった。24時間および48時間のどちらの時点においても、5B発現細胞の細胞数は、対照細胞の細胞数と差を認めなかった。しかし、グルコース不含培地を用いて同様の実験をおこ

なったところ、5B遺伝子導入48時間後において、5B発現細胞の細胞数が、対照細胞の細胞数と比較して多いことがわかった。グルコースは細胞の生存や増殖に必須の栄養素であるが、5Bを発現した細胞は、生存や増殖におけるグルコースへの依存度が低下すると考えられる。

また、この現象に関わるシグナルを調べるため、細胞の生存や増殖と関わりのあることが知られているホスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼ (PI3K) シグナルとラパマイン標的 (TOR) シグナルを阻害剤により抑制し、同様の実験をおこなった。その結果、どちらのシグナルを阻害しても、グルコース不含培地における5B発現細胞数の増加が抑制された。このことから、5B発現細胞では、PI3K-Akt-TORシグナルが亢進しており、低栄養環境における細胞の生存性が上昇していると考えられた。

(2) 代謝関連遺伝子の発現解析

5B発現細胞を、グルコース不含培地またはグルコース含有培地で24時間培養し、グルコース代謝やATP合成に関与するGLUT、サーチュイン、UCPのmRNAの変化をリアルタイムPCRにより解析した。グルコース含有培地では、5Bを発現しても、いずれの遺伝子の発現量にも変化が見られなかった。一方、グルコース不含培地で培養された5B発現細胞では、対照細胞に比較して、GLUT1およびGLUT3遺伝子の発現が亢進していた。サーチュインおよびUCPについては、変化が認められなかった。5Bが直接あるいは間接的に、細胞外のグルコース濃度を感知し、グルコースの取り込みに関わるGLUTの遺伝子発現を上昇させていることが示唆された。

次に、5B発現細胞のグルコース不含培地での培養によるGLUT遺伝子の発現亢進にも、PI3KやTORシグナルが関与するのかを調べるため、阻害剤を用いた実験をおこなった。その結果、TORシグナルを阻害した場合、GLUT遺伝子の発現亢進が抑制されることがわかった。しかし、PI3Kシグナルの阻害では、発現が亢進したままであった。5B発現細胞におけるGLUT遺伝子の発現誘導は、PI3K以外のシグナルがTORを活性化させることで起こる可能性が示唆された。

本研究により、5Bはグルコース不足時にPI3K-Akt-TORシグナルを亢進し、細胞のグルコースへの依存度を低下させるとともに、GLUT発現を亢進させることでグルコース取り込み能を上昇させ、飢餓状態における細胞の生存性を高める役割をもつ可能性が示唆された。今後、5Bを発現した脂肪細胞が、低栄養状態で生存性が上昇するか、それが個体の肥満につながるかを検討していきたい。

スーパーピクセルを用いた病理画像中の構造認識法の開発 —マルチスペクトル画像による高精度化の検討—

埼玉医科大学 保健医療学部 石川 雅浩

1. 研究の目的

肝細胞がんの確定診断には、病理診断が重要な役割を担っている。しかし病理診断は、専門医の経験に基づいて診断される部分があり定量性の低さが指摘されている。これに対して、画像処理による病理組織学的所見の定量化への期待が高まりつつある。病理医の診断に合致した定量化情報を精度良く算出するためには、病理画像中の組織構造の抽出技術が必須である。

本研究では、スーパーピクセルごとにスペクトル波形を求め、各構造へ分類することで病理画像中の構造認識実現を目指す。また、基礎的研究としてRGBよりも空間の広いMultispectral Image (MSI) を使用し、より頑健で高精度な構造認識技術の開発を行う。

2. 研究の計画・方法

まず、HE肝病理画像のMSIを撮影する。次に、MSIからRGB画像を生成し、スーパーピクセルを算出する。得られた、スーパーピクセルごとに形状特徴やMSIから特徴量を算出する。最後に、機械学習を用いてスーパーピクセルごとに各構造へ判別することで病理画像中の構造認識を目指す。

3. 研究の特色

本申請の特色として、第一にスーパーピクセルを用いた病理画像に適した構造認識技術の開発があげられる。第二に、MSIによる識別精度の高精度化の導入があげられる。病理画像の構造認識法として、スーパーピクセルとマルチスペクトルを組み合わせた研究は世界的にも新しい視点からのアプローチである。

4. 研究の成果

(1) MSIによる色補正 (スペクトル補正)

本研究では色素量推定に基づいてスペクトル波形を補正する手法を実装した。

① スペクトル画像の取得

本研究では所有するエバ・ジャパン社製のマルチスペクトルカメラを制御するソフトウェアを購入し、MSIを取得することとした。

② 色素量に基づくスペクトル波形の補正

まず、基盤技術となる色素量推定について述べる。ランバート・ベールの法則より、ある点の波長 λ における吸光度 $a(\lambda)$ は、色素量 c_k と各色素に対応した吸収係数 ε_k の線形和により表すことが可能である。この時、 k は色素の数である。それぞれ波長方向に151次元でサンプリングされており、行列を用いた離散モデルで表すと次式のように表せる。

$$\begin{bmatrix} a(\lambda_1) \\ a(\lambda_2) \\ \dots \\ a(\lambda_{151}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \varepsilon_2(\lambda_1) & \varepsilon_3(\lambda_1) \\ \varepsilon_1(\lambda_2) & \varepsilon_2(\lambda_2) & \varepsilon_3(\lambda_2) \\ \dots & \dots & \dots \\ \varepsilon_1(\lambda_{151}) & \varepsilon_2(\lambda_{151}) & \varepsilon_3(\lambda_{151}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C(\lambda_1) \\ C(\lambda_2) \\ \dots \\ C(\lambda_{151}) \end{bmatrix}$$

従って、 $\mathbf{a} = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{C}$ と表すと色素量 \mathbf{C} は $\boldsymbol{\varepsilon}$ の擬似逆行列を吸光度ベクトル \mathbf{a} に乘算することによって求めることが可能である。色素量推定により得られた色素量 c_k に補正係数 w_k をかけることにより補正した吸光度 \bar{a} を得ることができる。本研究では、補正係数 w_k を基準画像の色素量を各画像の色素量で除算して決定することとした。提案法により補正した波形からRGB画像を構成した結果を図1に示す。図1(a)が基準画像であり、図1(b)が補正対象画像であり、補正係数を求めて補正した結果が図1(c)である。図1(c)を確認すると基準画像の色素量に補正できていることが確認できる。

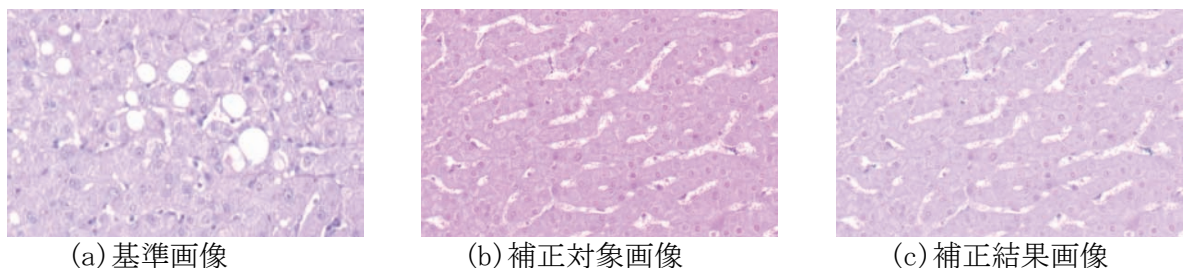


図1 提案法による色素量補正結果

③ 補正した各画素のスペクトル波形を用いた組織構造の分類

提案法を用いることで色情報のみで組織の判別精度が向上するかについて検討を行った。分類には、基準画像に脂肪滴、細胞核、細胞質、類洞、リンパ球のアノテーションを与え、各組織から100個の波形をランダムに選択し基準波形とした。様々な染色状態の画像を6枚(A~F)撮像し基準画像に合わせて色素量を補正してから、基準波形と各画素の波形の差の二乗和が最小になる組織へラベル付けすることとした。加えて、再構成したRGB画像からスーパーピクセルを算出し、スーパーピクセルごとに平均吸光度を求め、再度ラベリングすることとした。スーパーピクセルの算出にはSimple Linear Iterative Clustering(SLIC)を用いた。分類結果を表1に示す。波形補正を行うことで、平均精度が50%から70%に20%改善した。また、スーパーピクセル単位で平均波形を代表値とした場合6枚の画像で平均精度87%の精度が得られた。本研究成果は参考文献[1]にて発表済みである。

表1 色素量補正による画素単位の識別精度

	A	B	C	D	E	F
補正無し	0.55	0.25	0.69	0.11	0.81	0.59
補正有り	0.57	0.71	0.66	0.73	0.79	0.72
Superpixel	0.65	0.86	0.86	0.98	0.89	0.97

(2) MSIを使用した器械学習による肝病理画像の組織分類

画素単位の分類とスーパーピクセルを組み合わせ、色素量補正無しに機械学習により組織推定が可能かを検討した。機械学習にはSupport Vector Machine(SVM)を使用し、スーパーピクセルの算出にはSLICを用いた。分類のクラスは細胞核、細胞質、類洞、リンパ球、線維を対象とした。機械学習の精度評価として10fold-cross validationを用いた。分類結果を表2に示す。結果として、RGB画像よりもマルチスペクトル情報を用いることにより、全体の分類精度が69%から87%に18%改善した。これは、色素量による違いは非線形な機械学習法を用いることで、ある程度は吸収可能な事を示していると考えられる。本研究成果は参考文献[2]にて発表済みである。

表2 機械学習による分類精度

	16バンド	RGB3値
細胞核	0.92	0.83
類洞	0.82	0.80
リンパ球	0.92	0.92
線維	0.79	0.85
細胞質	0.88	0.63
全体	0.87	0.69

参考文献

- [1] 石川雅浩ほか、「マルチスペクトル画像による色素量補正を用いたHE染色肝病理画像中の構造認識」、2016年電子情報通信学会総合大会、2016年3月15日～18日
- [2] 橋本江美、石川雅浩ほか、「マルチスペクトル画像を使用した肝病理組織標本の組織分類の検討」、2016年電子情報通信学会総合大会、2016年3月15日～18日

身体活動分析システムを用いた行動パターン分析

和洋女子大学 家政学群 難波 秀行

1. 研究の目的

身体活動の維持・増進は生活習慣病のリスクを下げ、メンタルヘルス不良の一次予防としても重要視されている（厚労省、身体活動基準2013）。しかし、日本人の身体活動はこの10年で減少傾向が報告されている（厚労省、国民健康栄養調査2012）。我々は1台数万円の3軸活動量計と同等の測定精度を持つ身体活動測定システムを開発してきた（特開2013-085611、難波秀行）。そこで、スマートフォンでも利用可能なアプリ版の身体活動分析ツールを開発し、ICT（情報通信技術）を用いた行動パターン分析を行うことを目的とした。

- (1) 身体活動パターンの分析により身体活動が高い人、低い人の特徴を明らかにする。
- (2) 身体活動のドメインを運動・スポーツ、移動、余暇活動、仕事（職業、家事）、睡眠に分類し階層化ニューラルネットワークを用いて特徴を明らかにする。
- (3) 身体活動とメンタルヘルスの関係について、ストレス対処能力として首尾一貫性（SOC: Sence of Coherence）、うつ病の自己評価尺度（CES-D Scale）を用いて明らかにする。

2. 研究の計画・方法

- (1) システムの試験運用、PCおよびスマートフォン画面での動作確認
- (2) データ集収および分析
 - ① 一般的な成人男女20～60歳代を居住地、職業、学歴、年収等、幅広く募集する。
 - ② 心理社会的要因（気分プロフィール、ストレス対処能力、主観的健康感、性、年齢、婚姻状況、職業、教育歴、世帯収入、居住地など）をデータベース化する。
 - ③ 心理的指標と身体活動の特徴を明らかにする。

3. 研究の特色

- (1) ICTを用いた仕組み
 - ① インターネットにつながる環境さえあれば世界中どこにいても利用できる。
 - ② 低コストで数万人規模の身体活動量の測定が可能。
 - ③ 活動内容と強度含めたライフスタイル分析が可能。
 - ④ 測定結果をインタラクティブ（双方向）にフィードバックできる。
- (2) 多人数の行動パターンの分析とメンタルヘルスの関係
 - ① 身体活動の強度別および内容別にその特徴や相互関係を検討する。
 - ② 心理的指標に優れている人、そうでない人の身体活動の特徴について検討する。

4. 研究の成果

- (1) 身体活動パターン分析

男女2738人を対象に24時間行動記録を週7日行わせた。表1には、分析対象者の身体的特徴および身体活動レベル、平均METs、活動強度別時間を示した。全体の平均年齢は44.0±10.7歳（20～69歳）、平均BMI 22.4±3.4、身体活動レベルは1.75±0.32であった。本研究の対象者の身体活動レベルは、食事摂取基準で示された値とほぼ同様であったことから平均的な日本人の活動レベルであったといえる。活動強度別の時間では、平均睡眠時間が387分（26.8%）、座位行動1.1～1.5METsが622分（43.2%）、低強度1.6～2.9METsが122分（8.5%）、中強度3.0MET以上が151分（10.5%）、4.0METs以上が36分（2.5%）であった。

表1 対象者の身体的特徴および身体活動につ

	全体 (n = 2738)	男性 (n = 1450)	女性 (n = 1288)
年齢 (year)	44.0 ± 10.7	45.6 ± 9.1	42.2 ± 12.0
体重 (kg)	61.1 ± 12.4	68.2 ± 10.1	53.0 ± 8.4
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 3.4	23.4 ± 3.4	21.2 ± 3.1
年代 (人)			
20~29歳	174 6.4%	0 0.0%	174 13.5%
30~39歳	760 27.8%	430 29.7%	330 25.6%
40~49歳	1050 38.3%	591 40.8%	459 35.6%
50~59歳	540 19.7%	304 21.0%	236 18.3%
60~69歳	214 7.8%	125 8.6%	89 6.9%
身体活動レベル (PAL)	1.75 ± 0.32	1.71 ± 0.37	1.79 ± 0.26
平均METs	1.43 ± 0.27	1.40 ± 0.30	1.47 ± 0.21
活動強度別時間 (分)			
睡眠	387 26.8%	376 26.1%	398 27.6%
1.1~1.5METs	622 43.2%	662 46.0%	576 40.0%
1.6~2.9METs	122 8.5%	107 7.4%	140 9.7%
3.0METs以上	151 10.5%	125 8.7%	180 12.5%
4.0METs以上	36 2.5%	47 3.3%	24 1.7%

図1には1日（睡眠を除く）に占める活動強度別時間と身体活動レベルの関係について示した。身体活動レベルと座位行動（1.1~1.5METs未満）、低強度（1.5~2.9METs未満）、中高強度（3METs以上）の間にそれぞれ、 $r=-0.581$ ($p<0.01$)、 $r=0.226$ ($p<0.01$)、 $r=0.766$ ($p<0.01$)の関連が見られた。本研究の結果から、座位行動時間は、中高強度と同じように身体活動レベルに影響すると考えられた。特にグラフ右下に着目すると1日の80%程度を座位行動で過ごすとは身体活動レベルは1.5程度に多く分布している。一方、中高強度が20~30%を占めると1.75~2.0に多く分布している。低強度活動時間と身体活動レベルの関連は弱かったが、思い出し法の限界点として、低強度活動の記憶想起の曖昧さと15分区切りの方法に課題があった可能性が考えられる。

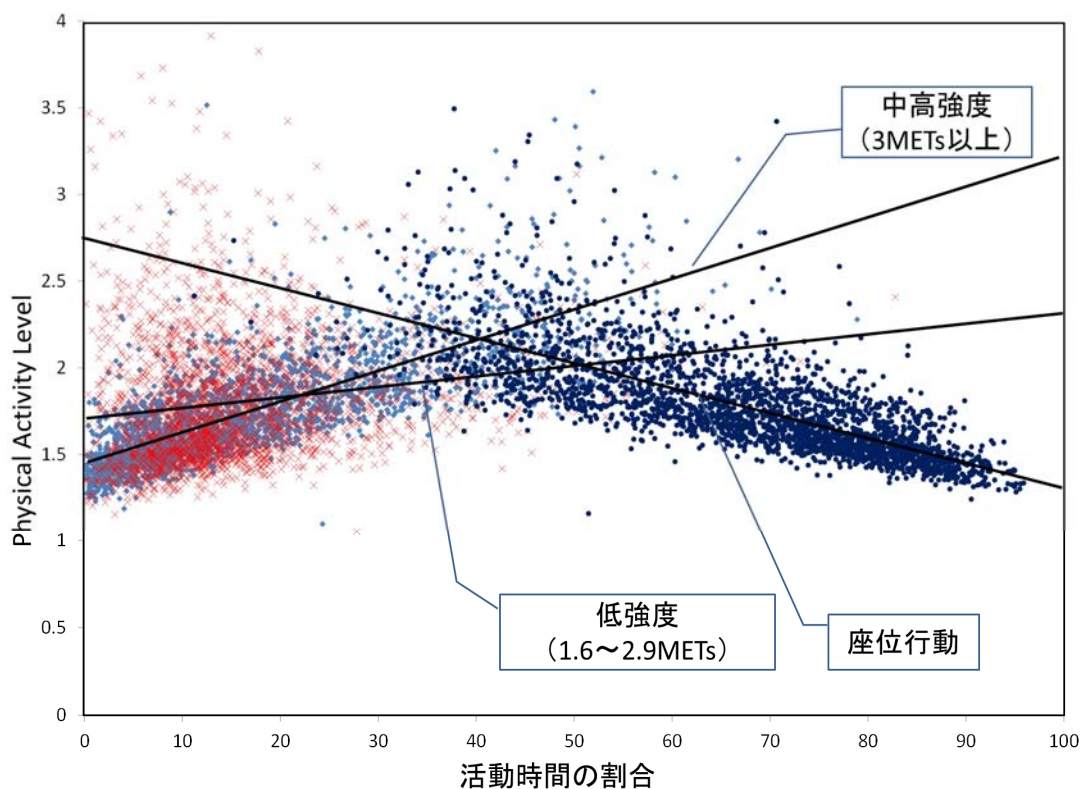


図1 1日に占める活動強度別時間と身体活動レベルの関係

(2) 身体活動のドメイン分析

階層化ニューラルネットワークの結果を図2に示した。身体活動レベルの予測に睡眠時間、日常生活時間、移動時間、仕事時間、スポーツ活動時間を独立変数にしたところ、これらの因子が複合的に隠れ層に影響しプラス方向にはスポーツ、移動、日常生活が影響し、マイナス方向には仕事、日常生活が影響していることが示された。独立変数の正規化した重要度はスポーツ100%、仕事63.2%、日常生活58.1%、移動58.1%、睡眠41.2%の順であった。

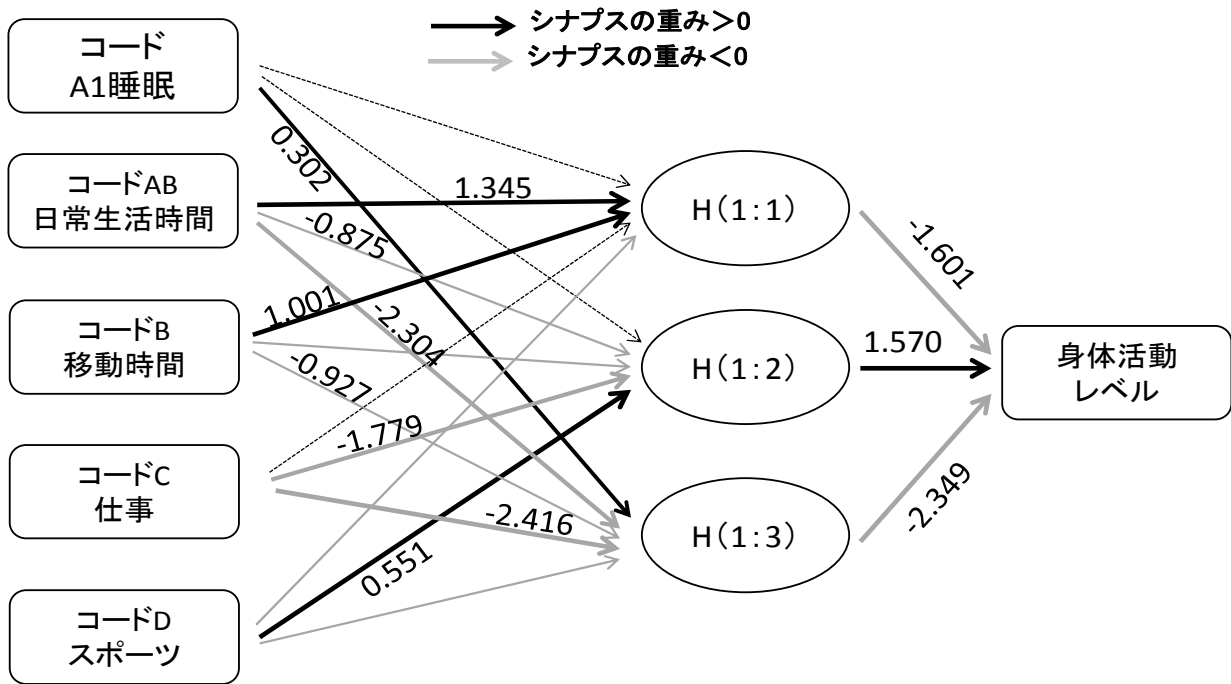


図2 身体活動レベルの階層化ニューラルネットワーク分

(3) 身体活動とメンタルヘルスの関係

メンタルヘルスと身体活動の関係について、96人を対象に検討したところ平均METsとSOC得点およびSES-D得点の間の相関係数はそれぞれ $r=0.083$ ($p=0.421$)、 $r=-0.033$ ($p=0.747$)でいずれも身体活動との間に有意な相関関連は見られなかった。SES-Dのうつ傾向がある群はない群に比較して中強度の活動時間が1日当たり30分程度短い傾向 ($p=0.157$)であったが、低強度の活動時間には差が見られなかった。今回の結果から、身体活動とメンタルヘルスについて明確な関連を示すことはできなかったことから、今後さらに対象者を増やした上で詳細な分析が必要と考えられた。

(4) 総括

スマートフォンでも利用可能なアプリ版の身体活動分析ツールを用いてデータを収集することができた。2738人のデータ分析により身体活動レベルに影響する活動強度別の時間、身体活動のドメインについて3METs以上の活動、スポーツが与える影響が強いことが示された。メンタルヘルスと身体活動については、今回の結果からは更なる検討が必要なが示された。

参考文献

1. Westerterp KR. Pattern and intensity of physical activity. Nature 410:539. 2001. PubMed PMID: 11279482.
2. 多変量解析によるデータマイニング. 石村貞夫ら. 共立出版 pp16-35, 2010.
3. Namba H, Yamada Y, Ishida M, Takase H, Kimura M. Use of a Web-Based Physical Activity Record System to Analyze Behavior in a Large Population. J Med Internet Res2015;17(3):e74.

胎仔性皮膚の再構築からの皮膚パターン形成のメカニズムの解析

青山学院大学 理工学部 石田 研太郎

1. 研究の目的

本研究は、単一化したニワトリ胚の皮膚細胞を生体外で立体的に配置することにより、皮膚付属器官の羽毛原基を含む皮膚を再構築する独自の技術を実験モデルとして、器官の大きさ・位置・数の決定と、その集積としての皮膚パターンを制御する仕組みの解析を目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) 再生羽毛原基誘導場の再構築における細胞の挙動解析

はじめに、皮膚細胞の再構築から0.5、1.0、2.0、3.0日後において、羽毛原基の誘導期に発現する遺伝子の発現のパターンを*in situ* hybridization法により解析した。この解析により、ランダムに配置された組織幹細胞がどのようなステップを経て秩序立てられているのかを明らかにした。また、蛍光試薬により細胞を標識した再生皮膚の発生を蛍光顕微鏡で観察・追跡することによって、再生羽毛原基誘導時の細胞の由来や移動を細胞レベルで検討した。

(2) 羽毛原基パターン形成におけるFGF/ERKシグナルの機能解析

FGF/ERKシグナルは外胚葉性器官発生で重要な役割をもつシグナル経路の一つである。再生羽毛原基の誘導時期にFGF/ERKシグナルを抑制すると羽毛原基が肥大化することを見いだしていた。そこで、FGF/ERKを阻害したときの羽毛原基形成過程における遺伝子発現の変化を解析した。

(3) 羽毛原基パターン形成を制御する遺伝子の機能解析

(2)の解析で発現に変化が見られた遺伝子またはシグナル経路は、FGF/ERKシグナルの下流で羽毛原基パターン形成を直接的に関与している可能性が期待された。そこで、Wnt/ β -catenin、Notch、BMPシグナルの各種阻害剤を用いて、再生羽毛原基の形成とパターン形成への影響を解析した。

(4) 羽毛原基パターン形成制御のシミュレーションモデルの構築

物理シミュレーションソフトCOMSOLを用いて、数学的にランダムな初期条件（皮膚細胞の再構築直後）から安定状態（羽毛原基パターン形成の決定）に自律的に到達するまでの遺伝子発現と細胞動態の経時変化の数理シミュレーションモデルの構築を試みた。

3. 研究の特色

(1) 細胞工学・分子生物学・数理生物学による器官原基誘導の仕組みへのアプローチ

本研究では、操作性の高い単一化した細胞から、羽毛原基誘導の場としての皮膚を細胞工学的に再構築し、羽毛原基が誘導される過程を顕微鏡下で観察できる。また、数理生物学的手法と組み合わせることにより、モデル上のパラメーターを実験的に操作し、結果と比較検証できる。以上のことから、本研究は皮膚上の器官原基の仕組みの解明に向けた、複数の切り口からの新しいアプローチになると考えられる。

(2) 器官再生技術の応用による構成的発生生物学への展開

近年、多能性幹細胞や組織幹細胞を分化誘導することによって、培養レベルで立体的な器官の構築を達成した研究が相次いで報告されている。現在は複数の細胞種で構成される1種類の器官の誘導が主流であるものの、近い将来、関連した複数の器官、あるいは、ある性質を有する場と付随する複数の器官による複合体を誘導する方向に研究が展開すると予測される。単一化細胞集団の再構築によって皮膚と羽毛原基の複合体を再生させ、羽毛原基誘導の分子機構の解明を目指す本研究は、上記の一連の研究の展開における1つのマイルストーンになることが期待される。

4. 研究の成果

(1) 再生羽毛原基誘導場の再構築における細胞の挙動解析

はじめに、胚齢7日目の背中の皮膚細胞を再構築し、器官培養0.5、1.0、1.5、2.0、3.0日後の遺伝子発現パターンを解析した。その結果、再構築直後は上皮・間葉境界面にランダムに発現していた遺伝子が、時間経過に伴い自律的にパターン形成し、羽毛原基の形成に至ることが明らかとなった（図1）。次に、再生皮膚・羽毛原基の細胞の由来を解析するため、PKH67とPKH26で上皮・間葉細胞をそれぞれ標識した再生皮膚を作製した。その結果、再生羽毛原基の上皮と間葉は、もともとの細胞の由来を維持したまま発生することが明らかとなった（図2）。

(2) 羽毛原基パターン形成におけるFGF/ERKシグナルの機能解析

再生羽毛原基のパターン形成におけるFGF/ERKシグナルの機能を解析するため、阻害剤によってパターン形成を阻害した時の遺伝子発現を解析した。その結果、再生羽毛原基の間葉細胞の融合が観察された。以上の結果から、FGF/ERKシグナルは羽毛原基の間葉細胞のパターン形成の制御に関わることが示唆された（図3）。

(3) 羽毛原基パターン形成を制御する遺伝子の機能解析

さらに、天然の羽毛原基の発生に関与することが知られているWnt/ β -catenin、Notch、BMPシグナルの、再生羽毛原基の発生における機能を解析した。Wnt/ β -cateninシグナルを阻害すると、再生羽毛原基の誘導が抑制され、羽毛原基の形成が完全に阻害された（図4）。Notchシグナルを阻害すると、再生羽毛原基は誘導されるものの原基の伸長が有意に抑制された（図5）。また、BMPシグナルを阻害すると、羽毛原基のサイズが抑制レベルに相関して大きくなった（図6）。以上の結果から、再生羽毛原基の形成とパターン形成はこれらの主要なシグナル経路群によって厳密に制御されていることが示唆された。

なお、ここまでの研究成果は論文にまとめて学術雑誌で発表した。

Kentaro Ishida* & Toshiyuki Mitsui (*corresponding author)

Generation of bioengineered feather buds on a reconstructed chick skin from dissociated epithelial and mesenchymal cells

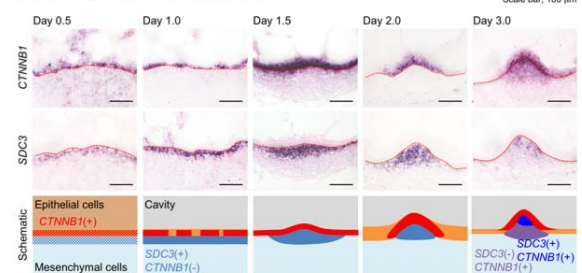
Development, Growth & Differentiation 58(3), 303-314, 2016

(4) 羽毛原基パターン形成制御のシミュレーションモデルの構築

(1)で明らかにしたように、再生皮膚における羽毛原基の再生は、遺伝子発現がランダムな初期条件から時間経過に伴い自律的にパターン形成した結果として起こる。この特徴から、様々な生物パターンの記述に用いられる反応拡散理論を土台としたGierer-Meinhardt type modelが適用可能だと考えられた。また、人為的に再構築して限定された面積の羽毛原基形成場の端から一定の距離を保持した羽毛原基の形成は、Painterら(2012)によって報告された境界条件における分子拡散条件を取り入れた。その結果、ランダムな初期条件からの時間経過によって形成場の面積に相関した数のスポットパターンを自律的に形成する数理モデルを構築した。

図1：羽毛原基誘導過程の自律的パターン形成

皮膚の再構築から羽毛原基が誘導されるまでの遺伝子発現の経時変化を *in situ* hybridization により解析した

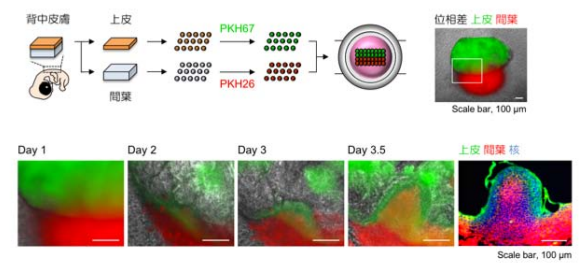


皮膚細胞を実験的に再構築することにより、羽毛原基誘導に関与する上皮・間葉の遺伝子発現が自律的にパターン形成した

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図2：蛍光標識再生皮膚による細胞の由来の解析

単一化した上皮・間葉細胞を蛍光色素で標識した再生皮膚を作製した

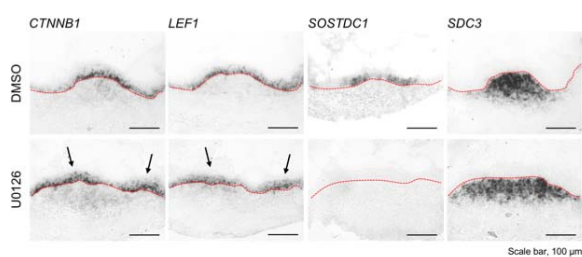


再生皮膚・羽毛原基の上皮・間葉組織は、それぞれ単一化上皮・間葉細胞に由来していることが明らかとなった

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図3：FGF/ERK経路の機能解析

FGF/ERK経路を阻害したときの羽毛原基パターン形成過程の遺伝子発現を *in situ* hybridization によって解析した

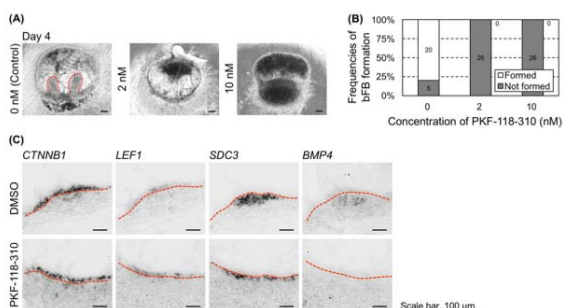


FGF/ERK経路の阻害によって羽毛原基の間葉細胞のパターン形成が阻害され、羽毛原基が融合することが示唆された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図4：Wnt/ β -catenin経路の機能解析

再生皮膚・羽毛原基を用いてWnt/ β -catenin経路の機能解析を試みた

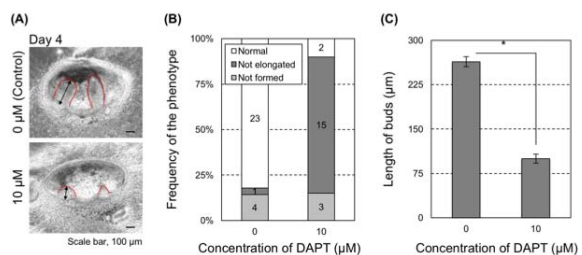


Wnt/ β -catenin経路は羽毛原基の形成に必須であることが示された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図5：Notch経路の機能解析

再生皮膚・羽毛原基を用いてNotch経路の機能解析を試みた

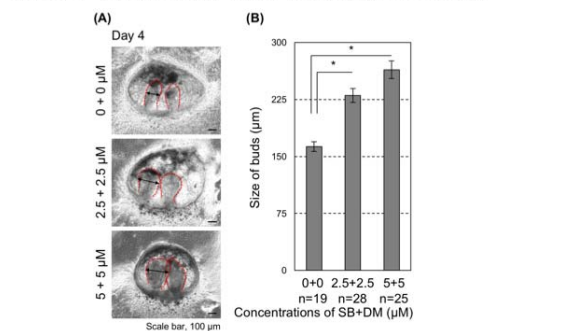


Notch経路は羽毛原基の伸長に関与するが示された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

図6：BMP経路の機能解析

再生皮膚・羽毛原基を用いてBMP経路の機能解析を試みた



BMP経路は羽毛原基の大きさの制御に関与するが示された

Ishida, Dev. Growth Differ. (2016)

新規遺伝子編集ツールを用いた遺伝性疾患の細胞治療の試み

北里大学 医学部 長尾 和右

1. 研究の目的

難治性疾患の多くを占める遺伝性疾患において、有効な治療法が開発されている疾患は少ない。その中で遺伝子治療は有望な治療手段として社会の注目を集めてきた。最近注目を浴びているiPS細胞は遺伝性疾患を始めとする疾患に対する再生医療に向けた切り札と考えられているものの、遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常は、iPS細胞でも保持されたままであることが再生医療の障壁と考えられている。そこで本研究では、当研究室で以前より遺伝子解析を行っている常染色体優性の高発癌遺伝病である母斑基底細胞癌症候群(NBCCS、Gorlin症候群)由来不死化リンパ芽球株(LCL)及びiPS細胞のもつ遺伝子変異を新規の遺伝子編集ツールであるCRISPR/Cas9システムを用いて正常配列に戻すことにより新たな細胞治療への足がかりを築くことを目的とする。

2. 研究の計画・方法

当研究室で集積されているNBCCS患者由来線維芽細胞およびLCL、もしくは患者由来線維芽細胞から作製したiPS細胞を用いてCRISPR/Cas9システムによる遺伝子編集を行う。CRISPR/Cas9システム発現用プラスミドベクターはaddgene社から購入したpX330を使用し、原則症例毎に遺伝子編集の標的となる配列を組み込んだベクターを構築する。作製したプラスミドベクターをこれらの細胞にリポフェクション法もしくは電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行う。遺伝子導入後の細胞を96ウェルプレートなどに限界希釈し、クローン化された細胞のコロニーが出現するのを待つ。得られたクローン化細胞からゲノムDNAを抽出し、標的とした部位をPCRで増幅後、塩基配列を解析し、スクリーニングを行う。

3. 研究の特色

CRISPR/Cas9システムは強力な遺伝子編集ツールとして基礎医学分野で急速に普及しつつあるが、ヒト細胞に応用した例は少ない。さらに遺伝性疾患患者由来の不死化リンパ芽球株(LCL)あるいはiPS細胞から、遺伝子変異が修復された正常遺伝子型の細胞を作製する試みは極めて独創的である。NBCCSは*PTCH1*遺伝子の変異によって生ずる常染色体優性遺伝病であり、小奇形と高発癌を特徴とする。NBCCSにおいては様々な腫瘍が発症するが、その代表は顎骨内に発生する角化嚢胞性歯原性腫瘍と皮膚癌である基底細胞癌である。いずれも直ちに致命的なものではないが、繰り返される外科的摘除術によって顎骨や皮膚に障害が生じQOLの低下が進行する。これに対して正常遺伝子型に編集された自己iPS細胞を用いた細胞治療は極めて有効な治療法となる可能性がある。更に本研究で用いる方法は他の遺伝子の編集にも応用可能であるため、広範囲な遺伝性疾患の細胞治療に貢献する手技となることが期待される。

4. 研究の成果

当研究室で遺伝子解析を行ったNBCCS患者症例の中から3症例を選択し、保存されていた患者由来線維芽細胞に4因子(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC)をコードしたセンダイウイルスを感染させ、iPS細胞株を複数樹立した(国立成育医療センター研究所との共同研究)。これらのiPS細胞株を用いた遺伝子編集が可能かどうかを検討するため、まず*PTCH1*遺伝子座を含む約1.1 Mbの領域を欠損した症例のiPS細胞株を用いて遺伝子編集を試みた。*PTCH1*遺伝子のエキソン6上にCRISPR/Cas9システムの標的配列を設計し、pX330プラスミドベクターに組み込んだ。構築したベクターとピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミドをLonza社4D-nucleofector装置を用いて電気穿孔法により共遺伝子導入した。遺伝子導入48時間後にピューロマイシンによる薬剤選択を24時間行い、クローン化されたコロニーが出現するまで培養を続けた。得られた各クローン細胞79

株からゲノムDNAを抽出し、標的配列を含む領域をPCRで増幅後、塩基配列を解析したが、遺伝子編集されたクローンを得ることができなかった。そこで、標的配列を複数設計し、同様の実験を行ったところ、配列によって編集効率に大きな差があることが明らかとなった。最も効率よく編集を行えた標的配列では解析した21クローン中5クローンで編集されていた。同じ標的配列を用いてHeLa細胞で同様の実験を行ったところ、iPS細胞で編集が見られなかった標的配列でもHeLa細胞では比較的効率良く編集が行われており、他の配列に関してもiPS細胞に比べ編集効率が高かった。このことからiPS細胞では同一の標的配列を用いた場合でも遺伝子編集が起こる確率がHeLa細胞に比べ低いことが確認された。現在のところ標的配列から編集効率の差を判断する方法が発表されていないため、使用する標的配列で効率よく遺伝子編集が行えるかどうかは、実際に遺伝子導入を行ってみるよりほかない。そこで現在は標的配列を複数種類設計してベクターを構築し、遺伝子導入を行ってクローンの解析を続けているところである。本研究課題において遺伝子編集により突然変異を正常配列に戻したクローンを得るには至らなかったが、iPS細胞を用いた遺伝子編集と細胞治療の実践に向けて貴重な知見を得ることができた。

γδ T細胞によるマラリア免疫記憶制御機構の解明 —マラリア感染防御機構解明のための基礎研究—

杏林大学 医学部 井上 信一

1. 研究の目的

マラリアは、全世界で年間約2億人の罹患者と100万人近い死亡者を出し、エイズや結核と並び世界三大感染症の一つとされている。マラリア根絶のためにワクチンの開発が待望されているものの、現在のところ開発成功に至っていない。この現状を打破するためには、マラリア原虫が感染した際の防御免疫機構を詳細に解明することが重要となる。これまでに、マラリア患者の末梢血や脾臓でγδ T細胞が増加しているとの報告があったことから、γδ T細胞とマラリアの関連性が示唆されてきた。我々は、マラリア原虫初感染において、γδ T細胞が樹状細胞の活性化を促進することによりマラリア防御免疫の亢進に寄与していることを報告してきた。しかしながら、脾臓でγδ T細胞の増加が見られるのは、樹状細胞の活性化が起こる感染初期より後の時期であった。つまり、このγδ T細胞の増加がマラリア原虫感染防御においてどのような意味をもっているのかは謎のままである。

そこで我々は、γδ T細胞がマラリア免疫記憶の形成や維持に働いているのではないかという仮説を立てた。本研究では、マウスマラリア原虫感染モデルを用いて、自然免疫様リンパ球の一つであるγδ T細胞が、マラリア原虫に対する免疫記憶細胞の分化や維持にどのような影響を及ぼしているのかについて解明することを最終目標としている(図1)。

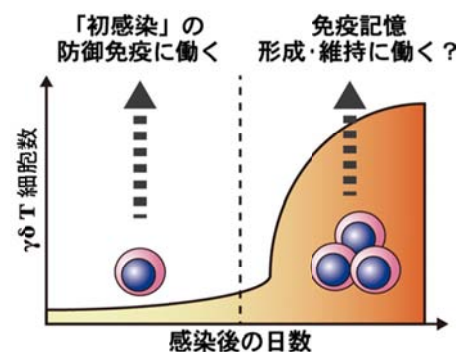


図1：感染経過とγδ T細胞機能の関係性

2. 研究の計画・方法

γδ T細胞によるマラリア免疫記憶の制御機構を解明するために、マウスマラリア原虫感染モデルを利用して以下の実験をおこなった。

- (1) マラリア原虫の感染赤血球 1×10^4 個を野生型C57BL/6Jマウスの尾静脈に接種し、感染させた。
- (2) マラリア原虫の感染状況を調べるために末梢血塗抹標本をギムザ染色して感染赤血球率を算出した。
- (3) マラリア原虫免疫記憶モデルを確立した。(弱毒株マラリア原虫である*Plasmodium berghei* XAT株に感染した後に自然治癒したマウスは、強毒株マラリア原虫である*Plasmodium berghei* NK65株を感染させても死亡することなく原虫を免疫的に排除出来るようになる。)
- (4) γδ T細胞の重要性を調べるために、γδ T細胞を欠損させる抗体GL-3を腹腔内投与した。
- (5) γδ T細胞の遺伝子発現を網羅的に調べるためにマイクロアレイ解析をおこなった。

3. 研究の特色

マラリア流行地域の住民は、幼児期に繰り返しマラリア原虫に感染するものの、再感染を免れる防御免疫を獲得することはまれで、せいぜい重篤な症状が抑制される程度の免疫を獲得するのみである。これらのことから、マラリアにおいては免疫記憶細胞が分化・維持されにくいと考えられており、マラリア原虫に対する宿主の免疫記憶細胞の分化とその維持機構の解明は喫緊の課題である。しかし、免疫記憶研究は精力的に研究が行われているものの、免疫記憶細胞の分化や維持の機序は未だ多くの謎に包まれている。弱毒株マウスマラリア原虫を感染させたマウスでは、強いマラリア防御免疫が誘導され長期の免疫記憶が維持されることがわかっている。そして極めて最近、申請者は、γδ T細胞がマラリア免疫記憶に強い関連性があるとのデータを得た。γδ T細胞

がマラリア免疫記憶に関与しているという報告はないことから、このマウス感染モデルを用いて $\gamma\delta$ T細胞機能を詳細に検討することにより、新規の免疫記憶制御機構が紐解かれることとなる。本研究の完遂によって、 $\gamma\delta$ T細胞による免疫記憶細胞に対する制御機序が明らかになれば、マラリアワクチン開発にとって有用な多くの情報が得られるはずである。

4. 研究の成果

強毒株マラリア原虫(*P. b.* NK65株)を野生型マウスに接種すると、高原虫血症を呈して死亡した(図2; ○)。一方、弱毒株マラリア原虫(*P. b.* XAT株)をWTマウスに感染させると、末梢血中の感染赤血球の割合が3回ほどの上昇下降を繰り返した後に自然治癒した。この*P. b.* XAT株感染耐過マウスに*P. b.* NK65株を感染させると、マウスは死亡することなく原虫を免疫的に排除できたことから、マラリア原虫に対する免疫記憶が形成されていることが示された(図2; ●)。我々は、このマラリア原虫感染の免疫記憶実験系を用いることで、 $\gamma\delta$ T細胞と免疫記憶の関連性の手がかりを探った。まず、*P. b.* XAT株をWTマウスに感染させて免疫的に排除させて120日後、GL-3抗体によって $\gamma\delta$ T細胞を除去した。そして、コントロール群には非特異的IgGを投与した。その60日後に、各群のマウスに強毒株*P. b.* NK65を感染させて経時的に末梢血中の感染赤血球の割合を算定して比較することで、マラリア免疫記憶における $\gamma\delta$ T細胞の影響を調べた。その結果、一過性の $\gamma\delta$ T細胞欠損を引き起こしたマウスは*P. b.* NK65感染により死亡することはないものの、コントロールよりも原虫の排除効率が悪く、免疫記憶機能が低下していることが分かった(図2; ▲△)。

$\gamma\delta$ T細胞においてマラリア免疫記憶の制御に関連する遺伝子を探索するため、Naïveマウスと*P. b.* XAT株感染90日目のマウスより $\gamma\delta$ T細胞を採取して、マイクロアレイ解析をおこなった。現在、解析したデータからマラリア免疫記憶に関連する遺伝子の特定を進めている。*P. b.* XAT株感染90日目になると、CD40LやBAFFなどといったB細胞刺激因子の発現上昇はみられなかった。現在、いくつかのマラリア免疫記憶に関与すると想定される候補因子を選定し、その解析を進めている。

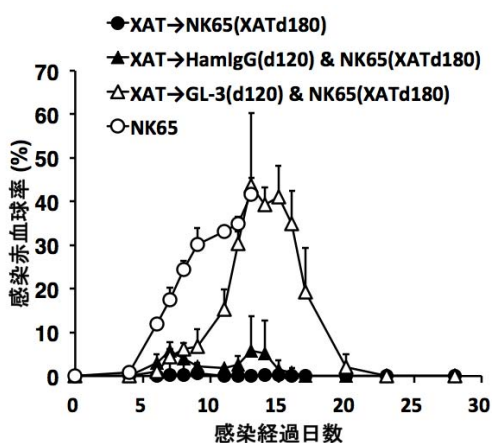


図2: $\gamma\delta$ T細胞除去によるマラリア免疫記憶能の低下

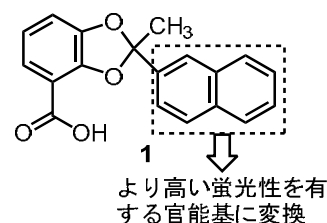
酵素触媒を活用した不斉誘導体化試薬の創製 — 超高感度化と効率的供給法の開発 —

慶應義塾大学 薬学部 花屋 賢悟

1. 研究の目的

不斉誘導体化試薬は1つ以上の不斉中心を有し、一对の鏡像異性体をジアステレオマーに誘導し、微量生体成分や天然由来の生理活性化合物立体構造の解析ならびに鏡像異性体比の決定を容易にする。現在用いられている蛍光不斉誘導体化試薬の検出感度は 10^{-15} molオーダーであるが、超微量成分の立体構造の解析、鏡像異性体比の決定のために、より高い検出感度をもつ蛍光不斉誘導体化試薬の開発が望まれている。

申請者は、大類らによって開発された蛍光不斉誘導体化試薬MNBカルボン酸(1)のリパーゼを用いる速度論的分割による簡便調製法を報告した(*J. Mol. Catal. B: Enz*, 2014)。本研究では、1,3-ベンゾジオキソールを母骨格とするMNBカルボン酸(1)のナフチル基を、より高い蛍光性を有する分子に置換した高感度蛍光不斉誘導体化試薬を設計・合成し、さらにその大量供給法を確立する。これら分子の合成の鍵段階は、色素またはその前駆体が結合したラセミ体アセタールの酵素触媒による速度論的分割である。

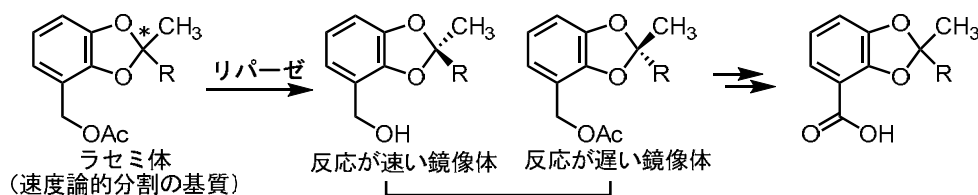


2. 研究の計画・方法

(1) 蛍光不斉誘導体化試薬の設計・合成

不斉誘導体化試薬は、それ自身が純粋な鏡像異性体でなければならない。しかし、アセタール上の不斉中心は化学合成による直接的な構築が困難である。そこで本研究では、ラセミ体を合成し、酵素触媒を用いた速度論的分割により両鏡像体を作り分ける。

速度論的分割の基質は、メチルカテコールと、アセチル基が結合した種々の色素またはその前駆体の縮合反応を含む数工程で得る。リパーゼによるエステル交換で両鏡像体を分離後、それぞれ不斉誘導体化試薬へ誘導する(Scheme 1)。このラセミ体基質の速度論的分割の結果を計算化学により考察し、ラセミ体基質の設計に活かす。



Scheme 1. 速度論分割を活用した高感度蛍光不斉誘導体化試薬の調製

(2) 蛍光不斉誘導体化試薬の性能評価

合成した不斉誘導体化試薬をアミノ酸の鏡像異性体分析に応用し、その性能を評価する。カルボン酸を酸クロリドとし、D-およびL-アミノ酸を結合する。得られたジアステレオマーをHPLCで分析し、ピークの分離度、すなわち鏡像異性体分離能、および検出限界を評価する。

3. 研究の特色

酵素触媒、特にリパーゼの遠隔不斉認識能(反応点から遠く離れた不斉中心を認識する能力)を活用する速度論的分割を鍵反応とする。通常、リパーゼはトリグリセリドのように反応点から

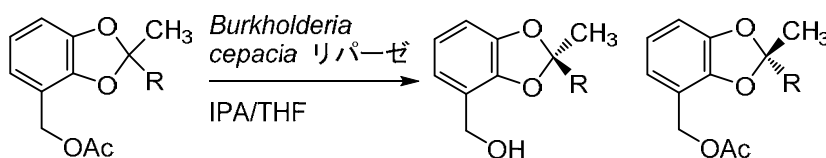
不斉中心まで2~3原子程度離れた不斉中心の立体化学を識別する。しかし、上述のMNBカルボン酸前駆体の速度論的分割では、リパーゼは反応点から6原子も離れたアセタール上の不斉中心を認識して鏡像選択的な反応を触媒する。遠隔位不斉中心認識においては、通常の基質の速度論的分割と異なるため立体選択性の経験則モデルが適用できない。そこで、実験的考察に加え、計算化学も積極的に活用し、高い親和性・触媒活性を酵素にもたらすようなラセミ体基質を設計する。

4. 研究の成果

(1) 各種ラセミ体アセタート、アルコールのリパーゼを用いた速度論的分割

アセタール上に種々の置換基を有するラセミ体基質を合成し、エステル交換の条件下、*B. cepacia*リパーゼを作用させた。*t*-Bu基やフェニル基を有する基質の速度論的分割はほとんど選択性を示さなかった。一方、ナフチル基や*p*-置換芳香環を有する基質の速度論的分割は高い選択性を示した (Table 1)。以上の結果から、アセタール上の置換基は、周囲のアミノ酸と立体反発を生じる多環芳香族や置換ベンゼンが適していることがわかった。

Table 1. アセタール上に種々の置換基を有する基質の速度論的分割



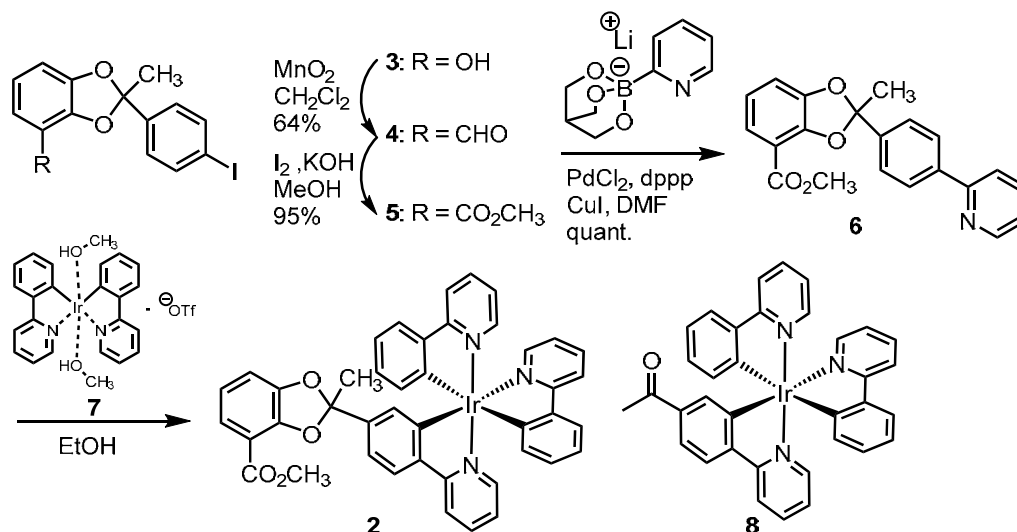
R	ee(P) (%)	ee(S) (%)	conv. (%)	E
<i>t</i> -Bu	14.4	2.7	15.9	1.4
phenyl	23.6	7.9	25.1	1.7
naphthyl	94.5	74.4	44.3	72
biphenyl	>99	27.5	21.4	>200
<i>p</i> -iodophenyl	85.1	69.2	44.8	26
<i>p</i> -bromophenyl	84.9	89.7	51.4	37

(2) *p*-ハロゲン化フェニル基を側鎖に有する基質を活用した蛍光不斉誘導体化試薬の合成とその機能評価

① イリジウム (Ir) 錯体構造を有する蛍光不斉誘導体化試薬の創製

Ir錯体Ir(ppy)₃は高い発光量子収率 ($\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$, $\Phi = 0.40$)を示す。アセタール上にIr(ppy)₃を結合した蛍光不斉誘導体化試薬2の合成を試みた。

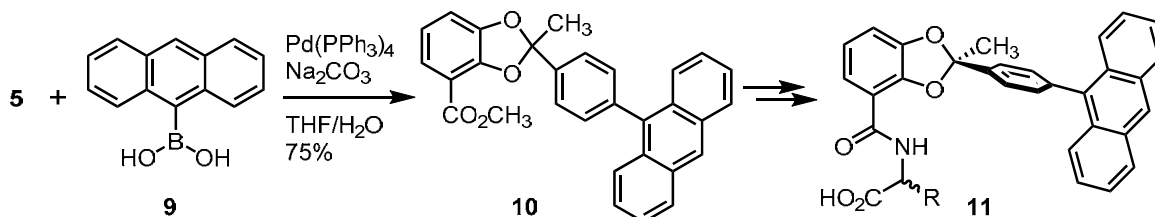
速度論的分割で得られた鏡像純度の高いアルコール3を、段階的な酸化によりエステル5へ誘導した。得られたエステル5とトリオールボレートの鈴木-宮浦カップリングにより、フェニルピリジン6を得た。フェニルピリジン6とIr錯体7を反応させると目的のIr錯体2が痕跡量得られた。2の生成はESI-MSによって確認した。しかし、主生成物は反応系中で生成するトリフルオロ酢酸によりアセタールが分解してしまったケトン8であった (Scheme 2)。



Scheme 2. Ir錯体2の合成

② アントラニル基を有する新規キラル分析試薬の創製

アントラセンはそれ自体蛍光量子収率 Φ が0.36 (λ_{em} : 382 nm in シクロヘキサン)と強い蛍光性を示し、9-フェニルアントラセンにすることにより、 Φ が0.49 (λ_{em} : 387 nm in シクロヘキサン)に上昇する。上述の方法で得た鏡像体過剰率の高いヨージド5と市販のボロン酸9の鈴木-宮浦カップリングによりアントラセン誘導体10を調製した (Scheme 3)。



Scheme 3. アントラセン誘導体の調製とアミノ酸の鏡像異性体比の分析

アントラセン誘導体を加水分解後、酸クロリドとしたのち、アラニンとフェニルアラニンの2種類のアミノ酸と縮合して、それぞれジアステレオマー対 z へと誘導し、逆相カラムを用いるHPLCによる分析条件を検討した。MNBカルボン酸と比較して蛍光強度は上昇した。今回検討した条件ではフェニルアラニン誘導体の両ジアステレオマーはベースライン分離したものの、アラニン誘導体の両ジアステレオマーを分析できる条件は見いだせなかった。今後、アラニン誘導体を含め、複数アミノ酸を一挙に分析できるよう、展開溶媒の比率、グラジエントを検討する。

以上の成果は、第107回有機合成シンポジウム2015年 (東京)、Biotrans 2015 (Vienna, Austria)、Pacifichem 2015 (Honolulu, Hawaii) で発表した。

音場浮遊液滴の非線形ダイナミクスに関する研究

工学院大学 工学部 長谷川 浩司

1. 研究の目的

(1) 研究背景(有用性)

近年、分析化学分野や生物・医学分野をはじめとした幅広い分野において、非接触流体制御技術が着目されている。特に、流体制御技術の1つである音場浮遊法は、容器壁面からの汚染の影響を抑制することや流体次第では人体への危険を回避することが可能であるというメリットに加え、静電浮遊法や電磁浮遊法などのその他の浮遊法と比較した場合に、制御対象流体に制約がないことから積極的な活用が望まれている。

(2) 問題意識

申請者による強力超音波による液滴浮遊実験により、液滴の回転や振動、さらには分裂・微粒化に加え、大変形を伴う界面変形や内外流動など、非線形でダイナミックな挙動が発生することが明らかとなっている。このような非定常な界面大変形や内外流動の非線形ダイナミクスが、非接触流体制御の安定性にあたる影響、さらには、より高精度な流体制御技術への応用可能性については、理論的や解析的な知見は拡充されてきたものの、実験技術上の困難が主な理由となって、実験的知見が乏しいのが現状である。

(3) 当該研究の到達点

本申請は、このような浮遊液滴の強い非線形性を示す挙動を流体力学の視点から解明し、現状では整備が不十分である浮遊液滴の非線形現象に関する定量的実験情報を拡充することで、浮遊液滴の非線形特性を活用した従来にはない高精度な非接触流体制御技術の確立に資するものであると考えられる。具体的には、申請者がこれまで蓄積してきた実験技術、知見を基に、浮遊液滴に生じる不安定性の1つである並進運動に着目し、その水平方向保持力の発生条件を検討した。研究のアプローチとしては、これまでの申請者の実験で主に使用してきた純水に加え、エタノール(表面張力の影響)、グリセリン(粘性の影響)およびそれら流体の水溶液を用いて実験を行うことで、流体物性が浮遊安定性に及ぼす影響を明らかにした。

2. 研究の計画・方法

本研究では、これまでに作製および実績のある実験装置を用いて、流体物性が音場浮遊液滴の並進運動に与える影響を実験的に検討した。液滴は、下部ホーンと上部反射板中に形成される音響定在波中の任意の節の位置付近に浮遊することが可能である。実験装置は、従来の一般的な装置中では平面であった上部リフレクターを曲面にするように独自の改良を加えることによりテスト部内の音場形成を強化させ、それにより浮遊液滴の安定保持の達成が期待される。浮遊液滴は、高速度カメラを用いて収録および観察され、得られた画像群に対して画像処理等を施し、その動的挙動等を解析した。試験流体としては、純水に加え、表面張力の影響を確認するためのエタノール、粘性の影響を確認するためのグリセリン、さらにはそれらの水溶液を用いて実験を実施した。おおよその研究遂行スケジュール(実績)は以下の通りであった。

(研究遂行スケジュール)

- 2015年～3月： 試験流体および実験条件表の精査(準備作業)
- 4月～7月： 予備実験(各種試験流体を基に傾向調査)
- 8月～2016年1月： 実験条件表の最終化および本実験(仮説検証)
- 2月～3月： 研究成果のまとめ(学会発表等含む)

3. 研究の特色

高精度な非接触流体制御技術の基礎を確立するにあたり、超音波浮遊液滴と音場の相互作用による非線形かつダイナミックな並進運動の発生メカニズムに関する定量的実験情報を収集する。これらの動的挙動は、流体制御の安定性に影響を与える可能性が指摘されている。本研究はこれまでは実験技術上の困難から対象とされることは少なく、避けられてきた非線形かつダイナミックな浮遊液滴の挙動に対して焦点をあてており、理論的、解析的な知見が中心的な分野において、定量的実験情報を収集蓄積することで、音場浮遊法を用いた高精度な非接触流体制御技術の基礎を確立するための科学的知見を提供する点において独創性があると考えられる。

4. 研究の成果

(1) 音場浮遊液滴の動的挙動の可視化計測および定量評価

Fig. 1には流体物性が液滴の並進運動に及ぼす影響を示す。3種類の試料を比較し、体積等価直径 d 、音圧 P_{rms} はそれぞれ2.5 [mm]、1.5 [kPa]とした。水とエタノールでは水平方向および鉛直方向で非定常な並進運動が確認された。特に鉛直方向ではその挙動に顕著な違いが見られた。固体球の場合、水平方向および鉛直方向でその並進運動が水・エタノールよりも抑制されていることが分かる。これらの浮遊試料の物性を考えると、固体球では内部流動や周囲への相変化が起きないことや、水とエタノールではその外部流動や蒸発過程が異なることから、流体に生じる流動性（外部流動・内部流動）は、浮遊液滴の並進運動の非定常性およびその挙動の変化を促進する1つの要因であることが考えられる。

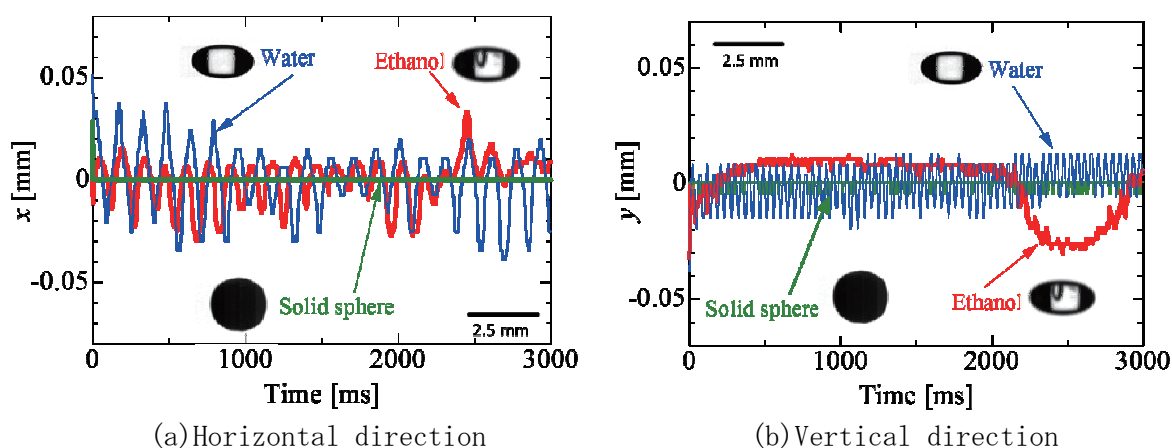
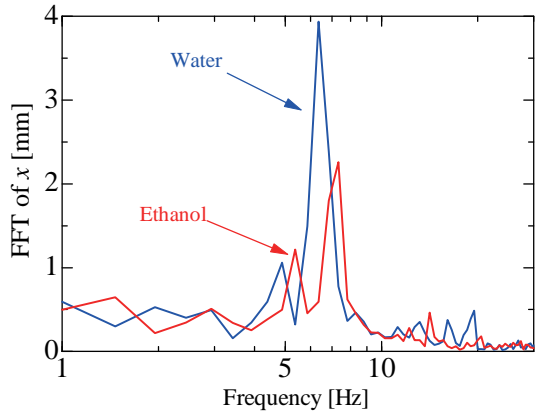


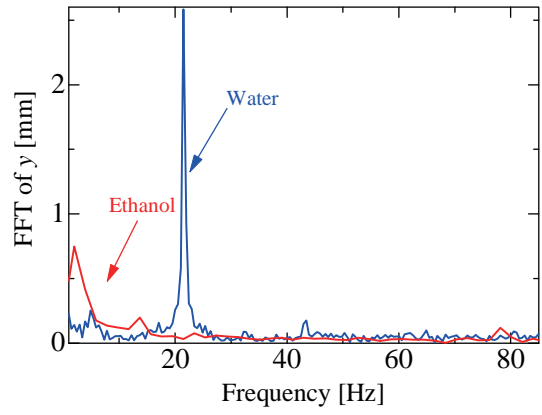
Fig.1 Effect of liquid property on translational motion of the droplet
($d = 2.5$ [mm]、 $P_{rms} = 1.5$ [kPa])

(2) 音場浮遊液滴の動的挙動の周波数解析

Fig. 2にはFig. 1で示された水・エタノールの水平方向および鉛直方向の並進運動のFFT解析の結果を示す。Fig. 2(a)に示す水平方向では、両者ともにピークが6.5 [Hz]付近となっている。一方、Fig. 2(b)に示す鉛直方向では、水が21.5 [Hz]、エタノールでは2 [Hz]にピークが確認された。また、浮遊液滴に非線形挙動が生じていることが、これらの高調波成分が確認されたことにより示されたと考えられる。今後は、バネ-マス系モデルを基にした浮遊液滴の動的挙動の更なる理解が必要であると考えられる。



(a) FFT of x



(b) FFT of y

Fig.2 FFT of translational motion of the droplet ($d = 2.5$ [mm], $Prms = 1.5$ [kPa])

統合失調症関連遺伝子によるミクログリアの機能修飾に関する研究

順天堂大学 医学部 小川 文昭

1. 研究の目的

生涯有病率約1%である統合失調症は、環境要因に加え、遺伝的要素がその発症に大きく寄与することが知られている。発症リスクに関与する遺伝子は複数報告されているが、中でも統合失調症などの精神疾患が多発するスコットランドの大家系から同定され、精神疾患発症と強く相互作用する均一性染色体転座によりに分断されていた*Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1)*は、そのユニークなクローニングの経緯から大きな注目を集めてきた。これまで私は、神経細胞におけるDISC1の機能解析に携わり、DISC1が神経細胞軸索内のミトコンドリア順行性輸送の促進因子であること(Ogawa et al., Hum Mol Genet 2014)、更に、統合失調症との関与が示唆されるNDE1やGSK3 β といったDISC1結合分子もミトコンドリア輸送制御に関与していることを明らかにした(Ogawa et al., ACS Chem Neurosci 2016)。これらの研究成果は、エネルギー需要の高いシナプスや軸索終末といった箇所へのミトコンドリアの適時的確な輸送がDISC1をはじめとする複数の精神疾患関連因子により制御されており、そして、その制御機構の破綻は精神疾患発症のリスクをもたらすのではないかという可能性を初めて示したものである。

一方、統合失調症は「脳の機能障害」という概念の下、病態の根本に存在すると考えられている神経伝達の異常、神経発達障害といった点にフォーカスが当てられ、研究の視点は主に神経細胞に向けられている。しかし、脳の発生成熟、その高次機能の発揮には、グリア細胞の存在が必要不可欠である。中でもミクログリアは、中枢神経系の免疫細胞として他のグリア細胞とは異なる由来及び性質を持ち、シナプスの刈り込みや食作用による死細胞の除去を行うことで、脳内恒常性維持に重要な役割を果たしている。近年、統合失調症患者脳内におけるミクログリアの過剰な活性化、また、異常に活性化したミクログリア数の上昇が、死後脳解析及びPET解析から報告されており、病態の一因としての「統合失調症におけるミクログリア機能障害仮説」が注目を集めている。興味深いことに、統合失調症様フェノタイプを示すことが知られているDisc1-L100P変異体マウスを用いた最近の報告から、環境リスク要因の一つであるウイルス感染による母体免疫活性化がこの変異体マウスの統合失調症様フェノタイプを増悪させるということが示され(Lipina et al., J Neurosci 2013)、免疫系-すなわち脳内免疫細胞ミクログリアにおけるDISC1の機能的な重要性が示唆されている。

本研究では、神経細胞ではなく脳内恒常性維持に重要な役割を果たすミクログリアにフォーカスを当て、統合失調症関連遺伝子DISC1が有する未だ不明なミクログリアにおけるその分子機能の全容を明らかにする。ミクログリアを介した神経細胞機能修飾にDISC1がどのように関わっているのかを分子レベルで明らかにし、複雑な統合失調症病態分子機構の解明を目指す。

2. 研究の計画・方法

本研究計画では、マウス脳ミクログリア由来細胞株MG6を用いて、以下に述べる実験系により、統合失調症関連因子Disc1のミクログリアにおける機能的役割を明らかにする。

- (1) Disc1ノックダウンの影響を、ミクログリアの形態、動態(突起の動き、走行性)及び食作用に注目し、live-imagingにより解析する。
- (2) 海馬神経初代培養細胞との共培養系を用い、ミクログリアでのDisc1ノックダウンが神経細胞の軸索伸展、シナプス形成制御にどのような影響を与えるか検討する。
- (3) Imaging解析に加え、サイトカイン分泌に与える影響をELISAにより解析する。
- (4) Disc1ノックダウンによるミクログリア内遺伝子発現プロファイリングの変化を、タンパク質レベルで網羅的に解析する。
- (5) ミクログリアにおけるDisc1結合タンパク質を、免疫沈降法・LC-MS/MS解析により網羅的に同

定する。

3. 研究の特色

現在までに、統合失調症関連遺伝子は複数報告されているが、それらすべてが脳神経系特異的に発現しているわけではない。なかでも、有力なリスクファクターとして知られているDisc1は組織普遍的な発現を示し、脳神経系細胞のみならず免疫系を含む様々な細胞種にとって基本的で且つ重要な役割を果たしていると考えられる。現在までに、Disc1の免疫系への関与は示唆されているが、その分子機構の詳細は全く不明である。本研究により脳内免疫細胞であるミクログリアでのDisc1の生物学的機能が明らかにされ、ミクログリアを通じた免疫系からのアプローチといった新しい精神疾患研究の発展に寄与するとともに、従来の抗精神病薬とは一線を画した、動的なミクログリアをターゲットにした創薬研究に大きく貢献すると期待される。

4. 研究の成果

- (1) siRNAを用いたミクログリア細胞株MG6におけるDisc1ノックダウンの影響を、live-imaging及び蛍光免疫染色により検討した。その結果、Disc1の減少はMG6細胞の運動能に影響を与え、細胞はより不規則な動きを示した。更に、Disc1ノックダウンMG6細胞は、細胞運動性の指標となるラメリポディア（葉状仮足）を多く形成し、顕著な細胞形態の変化を示した。これらの結果より、Disc1はアクチン骨格の再編成を介してミクログリアの動態制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。
- (2) MG6細胞は遺伝子導入効率が低いため、Disc1安定発現株を作製し、これを用いてLarge-scaleでの免疫沈降法・LC-MS/MS解析によるDisc1複合体の精製と結合因子の同定を行った。複数同定された新規Disc1結合因子の中で、エンドソーム-ゴルジ間の細胞内小胞輸送を制御するゴルジ体局在タンパク質、及びアクチン骨格再編成制御に関与するタンパク質に注目し、現在解析を進めている。
 - ① 蛍光免疫染色により、ミクログリアではDisc1は主にゴルジ体に局在することが明らかになった。興味深いことに、ゴルジ体に局在する新規Disc1結合因子をノックダウンすると、Disc1はゴルジ体に局在できなくなることから、Disc1のゴルジ体局在はこの新規Disc1結合因子により直接的に制御されていると考えられた。
 - ② マウスモデルを用いた解析から統合失調症様表現型と相互作用することが知られているDisc1-L100P変異は、もう一方の新規Disc1結合タンパク質であるアクチン骨格再編成制御因子への結合活性を著しく上昇させることが明らかとなった。

引き続き、本研究で同定された新規因子とDisc1との結合の意義を追及するとともに、上述の研究計画に従い、ミクログリアにおけるDisc1の生物学的役割を明らかにしていく。

地域史の教育資源化をめぐる民俗学的研究 — 愛知県新城市の状況を事例として —

成城大学 グローカル研究センター 及川 祥平

1. 研究の目的

(1) 本研究の問題意識

筆者は記憶論を理論的支柱としつつ、ローカル社会における死者の「神格化」と「偉人化」の様態に民俗学の立場からアプローチしてきた。記憶論的視点のもとでは、後世の人々が過去をどのように利用するのかという問題意識から、歴史上の偉人や事件の地域社会における活用（歴史の資源化）の様態を問う必要がある。本研究はその中でも先行研究に乏しい教育資源化（教育への活用）の様態把握を試みるものであった。具体的には、愛知県新城市における長篠合戦の学校教育への活用の歴史と現状を明らかにし、歴史の教育資源化研究の理論的基礎構築を目指した。

(2) 本研究の到達目標

上記問題意識のもとで論点としたのは、①戦前的教育と現在との連続／断絶、②地域史教育を通して教師らが伝えようとするものと、児童・生徒の体験の様態、③地域史表象ないし地域史認識と教育との相関関係、④マスメディアおよびアカデミック／非アカデミックな歴史研究との関係という諸点であった。以上を貫く関心は、地域社会における記憶（歴史）の継承の実態解明、および、ローカルな場における人々の歴史認識の様態とその形成ないし媒介過程の解明であった。

2. 研究の計画・方法

(1) 調査方法

本研究では愛知県新城市の小・中学校のうち、対象校を毎年5月の「長篠合戦のぼりまつり」に参加する鳳来中部小学校、7月の「設楽原決戦場まつり」に参加する東郷東小学校に設定した。対象校の選択はフィールドでの関係者との対話をふまえて行なった。

(2) 調査計画

第1工程として対象校での教育資料の収集、歴史資料の収集を行ない、行事・郷土教育への参与観察を実施した。それらの分析結果をふまえつつ、第2工程として関係者へのインタビュー調査を試みた。第1工程においては、各校の好意により十分な資料を収集することができたが、行事については、残念ながら、設楽原決戦場まつりは雨天のため当該年度は中止であった。もっとも、そのかわりに父兄らへの学習成果披露の場を参与観察することが叶った。第2工程については、地域の教育関係者・郷土史研究関係者を中心としてインタビューを実施した。

3. 研究の特色

(1) 教育資源化への注目

地域社会における記憶や歴史の継承、そのアイデンティファイの問題を考える上で、学校教育が果たす役割は大きなものがあるが、これまでの文化的記憶論や歴史表象研究は、史蹟の形成論や観光祭等の経済資源的側面の解明に偏し、教育への言及があったとしても戦前的状況への関心が大半であった。歴史の資源化論の文脈で現代教育にアプローチする点は、本研究の特色といえる。また、教育への民俗学的接近ないし教育現場との交流は、実践的な知の構築につながり、様々な地域学が提唱される現在、高い社会貢献性を主張できる。

(2) 歴史認識論的パースペクティブ

本研究は「民俗学的歴史認識論」の構築という大きな目的のもとに位置付け得る。民俗学は、

調査の場でごく普通の人々の歴史認識に接しながらも、人々にとって「歴史」はどのようなものとしてあり、どのように取り扱われ、体験されてきたのかという問題意識は深めずにきた。人々の歴史認識と歴史体験の様態に民俗学が注目するならば、議論は私たちの日常性を規定する「歴史をめぐる文化」の解明に向かうことになる。言わば「人々が歴史を認識すること」への関心であり、ここからは、現在、社会的課題とされる歴史認識をめぐる議論に対しても、新たな視角を提供するものとなる。

4. 研究の成果

(1) 「長篠・設楽原合戦」観の再構築過程の解明

戦後、地域住民の「長篠合戦」観が大きく変容していることが確認できた。「長篠・設楽原合戦」とは、地元での長篠合戦への「名づけなおし」を踏襲したものである。長篠城の攻防に由来する「長篠合戦」という呼称が流通する一方、その名のもとでしばしばイメージされる織田・徳川軍と武田軍との衝突は長篠ではなく設楽原が主戦場であったという、名称とイメージとのズレを、地域の人びとは修正しようと試みてきた。この「ズレ」は地域の歴史認識にも影響を与えていた。かつてはかつての設楽原にあたる旧・東郷村の住民は史跡に居住していることを自覚しておらず、歴史学習の遠足で当時は別の自治体であった長篠城まで足を運んでいた。設楽原サイドからの長篠・設楽原合戦の捉え返しが、今日の東郷東小その他の地域史教育と「設楽原決戦場まつり」という新たな祭りの発生につながっている。なお、「設楽原」の史跡としての顕彰は、黒沢明の『影武者』の放映に郷土史家らが触発されたことが契機となっている。

(2) 戦前的教育と現代的教育

上記の理由により、当該地において設楽原での攻防戦は資源化されずにあつたが、長篠城での攻防戦における鳥居強右衛門は軍国主義教育にかなう忠臣として郷土教育に組み込まれていたことが確認できた。強右衛門の教育資源化は現在も継続されているが、戦前色が排除されており、今日的な教材的意義を与えられつつ、冷静な学習対象とされている。戦国期という殺伐とした時代の史跡を有す自治体の郷土教育が一般に直面する問題の位相についても見通しが得られたといえよう。

(3) 教育実践の模倣／伝播

当該地で伝統化されている長篠設楽原合戦の歴史再現劇は、他地域の教育実践を参考にしたものであることが明らかになった。かつて東郷東小に勤務していた教員が他地域で行なわれていた郷土の偉人を取り上げた寸劇に感銘をうけた経験に基づいて、長篠・設楽原合戦の劇化が構想されている。歴史劇という教育手法についてはさらに各地の実践例を収集したい。