

DNAメチル化反応を触媒する機能性核酸の同定 —高感度メチル化DNA検出法開発に向けた基礎研究—

東京工科大学 応用生物学部 吉田 亘

1. 研究の目的

DNAメチル化とはCG配列中のシトシン塩基がメチル化される現象であり、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。一方ゲノムの異常なメチル化は癌など様々な疾患に関連しており、癌関連遺伝子のDNAメチル化レベルは癌のバイオマーカーとして期待されている。DNAメチル化レベルを検出する方法としては、メチル化シトシンには反応しないが、非メチル化シトシンをウラシルに化学置換させる亜硫酸水素ナトリウムを用いる方法がある。しかしこの手法は亜硫酸水素ナトリウム処理により9割以上のゲノムが分解されるため、この方法を用い数個の癌細胞を対象としてDNAメチル化レベルを測定することは困難である。PCRを用いれば数個の癌細胞から標的遺伝子を増幅できるが、合成されたPCR産物にはメチル基が維持されないため、通常のPCRでDNAメチル化レベルを測定することは不可能である。そこで本研究ではヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeを同定し、それをPCR中に加えればメチル基が維持されたまま標的遺伝子を増幅できるのではないかと考えた。つまり亜硫酸水素ナトリウムを用いずに、PCRを用いて高感度にメチル化レベルを測定できるのではないかと考えた。本研究ではランダムDNAライブラリーからヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeを同定することを試みた。

2. 研究の計画・方法

ヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeを同定するために下記のスクリーニングを実施した(図1)。

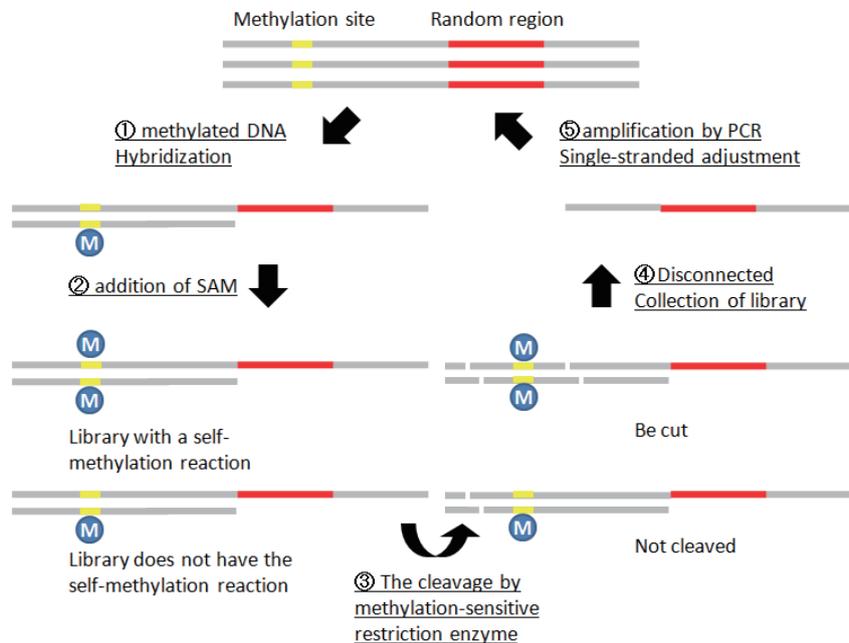


図1. DNAメチル化反応を触媒する機能性核酸の同定方法

(1) 5'側にメチル化サイト(CG配列)と3'側にランダム配列を含むDNAライブラリーに、5'側の配列と相補的な配列であり、かつメチル化したCG配列を含むDNAをハイブリダイゼーションさせた。

- (2) 調製したDNAライブラリーにメチル基のドナーとなるS-アデノシルメチオニン (SAM) を加え、一晚インキュベートした。
- (3) メチル化反応を触媒する機能性核酸は分子内の5'側のメチル化サイトをメチル化すると考えられる。そのため、両ストランドともメチル化されたDNAのみ切断する制限酵素MspJIを用いてDNAメチル化反応を触媒したDNAライブラリーのみ切断した。
- (4) MspJIにより切断されたDNAライブラリーを電気泳動法により回収した。
- (5) 回収したライブラリーをビオチン修飾プライマーによりPCRにより増幅し、アビジンビーズを用いて一本鎖DNAを調整した。

上記ステップを3回繰り返す、ヘミメチル化反応を触媒するDNAライブラリーが濃縮されたか検討した。

3. 研究の特色

本研究で開発する手法により癌関連遺伝子のDNAメチル化レベルを高感度に測定できれば、マーカー蛋白質や画像診断では発見が難しい癌の早期診断に多大な恩恵をもたらすと期待できる。亜硫酸水素ナトリウムを用いない方法としては、メチル化シトシンと反応する分子を修飾させたDNAプローブを用いる方法やメチル化DNA結合蛋白質を用いる方法が報告されている。しかし、これらの方法は検出シグナルをPCRにより増幅することができないため、高感度なメチル化DNA検出方法への応用ができないという問題点がある。一方、本研究で開発する方法はメチル化状態を維持したまま標的遺伝子をPCRで増幅するため、高感度に標的遺伝子のメチル化を検出できる方法である。

4. 研究の成果

合成したライブラリーにメチル化したDNAをハイブリダイゼーションさせ、SAMを加えた後にMspJIで切断した結果を図2(左)に示す。これまでの研究により切断していないライブラリーのバンドは約250bp付近に、MspJIで切断されたライブラリーのバンドは約150bp付近に得られること示している。1ラウンド目では150bp付近にバンドが得られなかったが、この領域にメチル化反応を触媒するライブラリーが存在すると仮定し、この領域を切り出し精製した。この精製産物を鋳型にPCRを行った結果、正確にDNAライブラリーを増幅することができたことから、切り出し精製を行ったサンプル中に目的のライブラリーが含まれることが示された。

そこで、1ラウンド目で回収したライブラリーをPCRで増幅し、一本鎖DNAを調整後、同様にスクリーニングを実施した。ライブラリーにSAMを加え、MspJIで切断した結果を図2(中央)に示す。2ラウンド目では若干150bp付近にバンドが観察されたことから、ヘミメチル化反応を触媒するライブラリーの濃縮が確認された。

最後に3ラウンドのスクリーニングを同様に実施した。ライブラリーにSAMを加え、MspJIで切断した結果を図2(右)に示す。第1ラウンド、第2ラウンドと較べて、ヘミメチル化反応を触媒したライブラリーである150bp付近のバンドが濃くなっていることが観察された。またヘミメチル化反応を触媒していないライブラリーである250bp付近のバンドは第1ラウンド、第2ラウンドと比較して薄くなっていることから、ヘミメチル化反応を触媒するライブラリーが濃縮できていることが確認できた。今後このライブラリーの配列を解析することによりヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeが同定できることが期待できる。

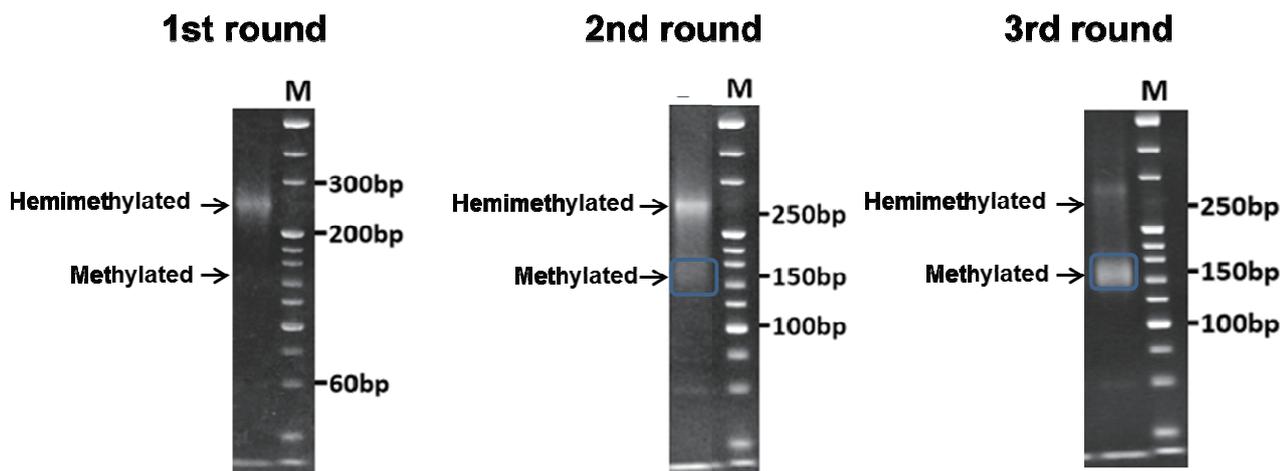


図2. ヘミメチル化反応を触媒するDNAzymeのスクリーニング結果
 左：第1ラウンド、中央：第2ラウンド、右：第3ラウンド

中枢神経系持続感染ウイルスによるオートファジー調節機構の解明

麻布大学 獣医学部 藤野 寛

1. 研究の目的

ボルナ病ウイルス (BDV) はヒトを含む多くの哺乳動物に感染し、一部の動物では非化膿性脳脊髄炎を引き起こすことが知られているウイルスである。これまでに、BDVは様々なヒト中枢神経系疾患と関連すると報告されている。加えて、牛などの産業動物においても、リピートブリーダーといった繁殖障害との関連が報告されている。BDVは高い神経親和性を示し、非細胞傷害性に中枢神経系に持続感染を成立させるという特徴を持つウイルスである。神経細胞という特殊な環境において、宿主への影響を抑えながら効率的にウイルスが増殖するためには、ウイルスタンパク質の量を制御することが重要であると考えられる。過去の網羅的研究においてBDVのPタンパク質はオートファジー関連因子との結合が示唆されている。そこで、Pタンパク質は宿主オートファジー関連因子と結合し、その局在あるいは機能を変化させることで宿主タンパク質分解系を制御するのではないかと予測される。

本研究では、BDVのPタンパク質と結合する宿主オートファジー関連タンパク質の同定及び結合領域の決定、結合の有無による宿主因子の挙動の変化、そしてウイルス増殖時のオートファジー調節機構の意義の解明を試みる。BDVによる宿主オートファジー調節機構の解明により、ヒトの健康を害し、産業動物の生産性を損なわせるBDVの病原性解明に役立つと共に、中枢神経系における異常タンパク質分解に関する新たな知見を得られるものと考えられる。

2. 研究の計画・方法

本研究では、ボルナ病ウイルス (BDV) によるオートファジー調節機構の解明を目指している。BDV感染によるオートファジー経路の活性化の有無、BDVタンパク質と結合する宿主オートファジー関連タンパク質の同定及び結合領域の決定、結合ドメイン欠損及び宿主因子のノックダウンによるBDVに対する影響を確認し、BDVの生活環におけるオートファジー調節機構の意義の解明を試みる。これらの解明のため、ウェスタンブロット法によるLC3-1・LC3-2タンパク質の比率の確認、IFAによるウイルス・宿主タンパク質の細胞内局在の確認、今日免疫沈降法によるウイルス・宿主タンパク質の相互作用の確認、リアルタイムPCRによるウイルスゲノム・mRNAの変動の確認を行う。

3. 研究の特色

本研究では中枢神経系に持続感染するRNAウイルスが宿主のオートファジー経路を操るという新しいモデルを提唱している。細胞新生の少ない神経系において、持続感染するウイルスのタンパク質を除去する機構は、強く細胞の生存に関わると考えられる。それにもかかわらず、これまでにBDV感染によるオートファジー経路に対する影響を解析した報告は存在しない。

ウイルスのポリメラーゼ補因子であるPタンパク質と非構造タンパク質であるXタンパク質の相互作用がウイルスのポリメラーゼ活性調節することが判明している。このポリメラーゼ活性の制御はXタンパク質によるPタンパク質の局在の変化が関係すると予測されている。感染初期には核内に存在するPタンパク質が、感染後期にはXタンパク質と共に細胞質へ移行することが解っている。一方で、Pタンパク質は複数の宿主因子との結合が報告されている。Pタンパク質との結合が示唆されているLC3タンパク質は細胞質においてオートファゴソーム形成に関わるタンパク質であり、オートファジーの成立に必須の因子である。以上の背景より、Pタンパク質が感染段階に応じて局在を変化させる際、同時にLC3タンパク質の局在を変化させることで、宿主のオートファジー経路を調節するのではないかという発想に至った。

本研究により新たなBDVの生活環を解明することで、BDV治療・予防に関する新たな知見を得

ることが出来る。また、BDVはヒトの脳からも分離されているウイルスであり、複数の精神疾患との関連が指摘されている。中枢神経系に持続感染するBDVによるオートファジー調節経路を知ることによって、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症のような神経細胞における異常タンパク質蓄積に関する新たな知見を得られるものと考えられる。

4. 研究の成果

初めに、Pタンパク質及びXタンパク質によるLCタンパク質の局在変化を蛍光抗体法により確認したところ、コントロールでは細胞質に局在しているLC3-GFPタンパク質が、Pタンパク質の共局在で細胞核内に移動することが明らかとなった。また、この時にXタンパク質を発現させると、既知のX-Pタンパク質相互作用によりPタンパク質が細胞質に移動し、LC3-GFPタンパク質もPタンパク質と同様に細胞質に局在を変えることが判明した。次に、これらの局在の移動に関与する領域を決定するために、今日免疫沈降法によりPタンパク質とLC3-GFPタンパク質との相互作用を確認したところ、これらのタンパク質の相互作用は認められなかった。この結果から、Pタンパク質は間接的にLC3-GFPタンパク質の局在を変化させている可能性が示唆された。P及びLC3の結合が確認出来なかったため、次にBDV感染細胞におけるオートファジーの影響を確認した。BDVの持続感染したOL細胞（ヒトオリゴデンドログリア由来培養細胞）をHBSSによる飢餓処理、バフィロマイシンA1及びクロロキシンによるリソソーム阻害処理を行ったところ、いずれの処理においても宿主遺伝子発現が著しく減少するような条件下においても、BDVのmRNA及びゲノムRNAに有意な減少は認められなかった。リアルタイムPCRの結果から、BDVは宿主環境の変化に関わらず、持続的なウイルス遺伝子の発現が可能であると考えられる。以上より、BDVが宿主のオートファジー関連タンパク質の局在を変化させる可能性が示された。その一方で、それらの局在の変化が直接的なタンパク質相互作用に依らない可能性が示唆された。また、BDVは宿主遺伝子発現の抑制がかかる条件下でも、一定のポリメラーゼ活性を維持することが明らかとなった。

教員養成段階におけるレジリエンスの向上を図る心理教育教材の開発

岐阜女子大学 文化創造学部 佐々木 恵理

1. 研究の目的

(1) 研究の学術的背景

教員の疲労度・負担感は高く、公立学校教員の精神疾患による病気休職者数の在職者に占める割合は増加傾向にある(文部科学省, 2013)。文部科学省(2013)は、教員のメンタルヘルス対策として第一に予防的なメンタルヘルスケアの取組が重要であるとし、教員本人、校長等、教育委員会でのセルフケアの促進を強調している。そのため教員養成段階から教職生活を意識した予防的取組が急務である。

本研究では、ストレスへの防衛因子や抵抗力を表す概念として「レジリエンス(resilience)」に注目する。レジリエンスとは、「困難な出来事を克服し、その経験を自己の成長の糧として受け入れる状態に導く特性(Grotberg, 2003)」や、「ストレッサーを経験しても心理的な健康状態を維持する、あるいは不適応状態を一時的なものとして乗り越え、健康状態へと回復していく力や過程(齋藤・岡安, 2011)」として捉えられている。レジリエンスのもつ困難な経験を自己の成長の糧として受け入れ成長・成熟する能力や心理的特性は、教師にとって教職生活全体を通じた資質能力の成長の基盤として重要な要因の一つである。

国内において教員のレジリエンス研究はわずかであり、教員養成段階のレジリエンス育成を検討した報告は見受けられない。また、大学による教育と現職教育との連携が十分ではなく、これらはメンタルヘルス対策についても同様であり、教職生活を意識した実証的な研究が求められる。

(2) 研究の目的

本研究の目的は、教師のメンタルヘルスへの予防的取組の視点から、教員養成段階におけるレジリエンス育成のための心理教育教材を開発することである。

そこで、平成27年度については、教員養成段階における学生のレジリエンスの特徴と機能を明らかにし、心理教育教材を開発することの示唆を得ることとした。

2. 研究の計画・方法

平成27年度は、上述した目的に基づき、教員養成段階におけるレジリエンスの特徴と機能の概念モデル化を行った。学部生を対象に、レジリエンスと学生の教職能力や成長感の関係について検討した。

○調査方法：個別記入式質問紙調査

○調査対象者：教職課程を受講する女子大学生140名

○調査内容：①大学生用レジリエンス尺度(齋藤・岡安, 2011)；「ソーシャルサポート」「肯定的評価」「コンピテンス」「重要な他者」「親和性」5因子25項目、4件法。②学生の教職能力に関する項目；秋光(2011)の教育実習における学習内容尺度の「教職意欲の向上」因子を参考に作成(8項目、5件法)。③理想の教師像と教師像の明確さについて尋ねる項目(4項目、4件法)。④心理的well-being尺度(西田, 2000)のうち「人格的成長」因子(8項目、6件法)。

3. 研究の特色

レジリエンスを発揮することにより、心理的ストレス反応を低減させ心理的・身体的well-beingが導かれる可能性が示唆されている(山下・甘佐・牧野, 2011)。また、レジリエンスが高い教

師に指導された児童・生徒は、そうでない教師が担当する生徒以上に、学力を伸ばし、目標を達成しやすいことが報告されている (Day, 2008)。これらのことから、ストレス緩衝効果や精神的健康の維持だけでなく、児童・生徒に対して肯定的影響を与えることが推測され、教員養成段階のレジリエンス育成を検討していくことには意義があると考えられる。

4. 研究の成果

(1) 教員養成段階における学生の教職能力がレジリエンスに与える影響

レジリエンス向上の要因を把握し、学生の教職能力がレジリエンス、人格的成長に与える影響を検討するために、強制投入法による重回帰分析を行った (図1)。その結果、教師になるために必要な向上心や探究心を持っていることや教師を目指す自覚が身につけている、子どもを教育することへの使命感が身につけているほど、レジリエンスの各因子に低～中程度影響を与えていた。また、レジリエンスを構成する因子の中でも、自己の能力に対する肯定的な評価を持っていたり、家庭外に情緒的サポート源があると、様々な面で成長し続けたり、自分自身を高めていきたい傾向が高まることが明らかになった。

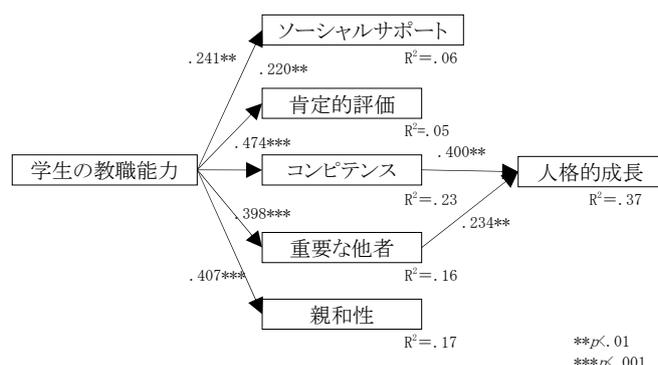


図1 学生の教職能力がレジリエンスに与える影響

(2) 目標・理想の教師像とレジリエンスの関連

目標となる教師の有無によるレジリエンスの差異を明らかにするために、目標となる教師がいる、どちらかというものを目標教師有群、どちらかというといない、いないを目標教師無群とし、対応のないt検定を行った。その結果、目標教師有群は、目標教師無群に比べて、有意にレジリエンス得点が高かった (表1)。目標となる教師がいたり、理想とする教師がいる学生のほうが、経験を肯定的に評価し、克服しようとする傾向があることが明らかになった。

表1 目標となる教師の有無によるレジリエンス得点差

	目標教師・有 (n=116)		目標教師・無 (N=21)		t値	p値
	M	(SD)	M	(SD)		
レジリエンス合計	78.36	(10.48)	71.95	12.56	2.50	*

* p < .05, ** p < .01, *** p < .001

(3) 教師像の明確さとレジリエンスの関連

教師像の明確さとレジリエンスの関連を明らかにするために、相関係数を算出した。その結果、教師像の明確さ ($r = .345, p < .001$)、教師像の具体性 ($r = .339, p < .001$) とレジリエンス間にある程度の有意な相関がみられた。どのような教師になりたいか、明確であればあるほど、具体的に考える機会が多いほど、レジリエンスも高い傾向があることが明らかになった。

以上の結果から、レジリエンス向上を図る心理教育は、これまで心の健康やセルフケア、バーンアウト予防の観点から取り組まれがちであるが、教員養成段階においては、このような教材の中で、これまで学修してきた教職に関する使命感や自覚、能力を伸ばし、それらをさらに発揮し、自身の強みとなる観点を踏まえた取り組みが必要であると考えられる。

最適な部分床義歯設計を目指した解析システムの創成

愛知学院大学 歯学部 神原 亮

1. 研究の目的

部分床義歯は、基本的に機能力に対して歯根膜粘膜負担様式を主体とするため、口腔内に残存した歯を含めた諸々の組織の特性を十分に把握し、安全の確保、かつ義歯自体の機能を十分に発揮させることは、極めて重要な事項である。そして、これらの事項を十分に把握するためには、口腔内において部分床義歯が、負荷される機能力に対して残存組織にいかなる影響を与えるのか検討することは必要不可欠である。これらの事象は歯科治療における臨床成果や臨床術式にも直結し得る根本的な問題として、詳細に解明されなければならない。近年では、コンピューターの性能の向上に伴い、有限要素法解析は、医療分野においても多くに用いられるようになってきた。

我々は、従前より有限要素法解析を用いてこれら部分床義歯に関する様々な力学的検討を行い、これ迄、CTデータおよび研究用模型を用いた細部再現性の高いモデル構築法に加え、最大の難関とされてきた顎堤粘膜および歯根膜の粘弾性挙動を可及的に忠実に再現させる手法を開発してきた。本研究は、これまでの研究成果を基盤として、実際の臨床の現場において、患者個人に最適な部分床義歯設計について三次元有限要素法を用いてシミュレートする解析システムを構築し、これら解析結果を歯科補綴臨床における義歯設計の力学的根拠とすることを最終目的としたものであり、多様な症例に対する多くの知見の収集は必要不可欠である。

そこで、今回、歯の欠損のみならず、顎顔面領域における腫瘍や外傷による広範な顎骨欠損に対して顎義歯を適用する場合、上顎顎義歯設計および支台歯周囲歯槽骨量の違いが、支台歯周囲歯槽骨にもたらす力学的影響を三次元有限要素法を用いて詳細に検討を行い、有用な顎義歯設計の一助となることを目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) 有限要素モデルの構築

解析の対象とする上顎欠損は、Aramany class1とした。解析モデルの構築には、デンタルウイングス社製3Dスキャナー、三次元画像処理・編集ソフト (Mimics12.11, Materialise) を用いてモデル形状データをSTLフォーマットにて作成し、それらデータをCAE環境統合プリ・ポスト総合ソフト (Patran2010 windows64bit, MSC Software) にインポートすることにより有限要素モデルの構築を行った。本研究に用いた基本モデルを図1に示す。

(2) 解析項目

解析項目とした上顎顎義歯設計は、上顎左側中切歯に直接支台装置としてレスト付ワイヤークラaspを付与し、第一、第二小臼歯、及び 第一、第二大臼歯には間接支台装置として双子鉤を設計したモデルを基本モデルとし、上顎左側中切歯から犬歯までを連結し、基本モデルと同様の設計を行った支台歯連結モデル、そして、上顎左側中切歯に直接支台装置として磁性アタッチメントを適用した磁性アタッチメントモデルの計3種とした。(図2) さらに、本研究では直接支台装置が適用される支台歯周囲歯槽骨量の違いにおける力学的検討も行うため、前述した3種の義歯設計に対して、上顎左側中切歯近心歯槽窩辺縁部を基準とし、歯槽骨量を5段階に変化させて検討を行った。歯槽骨量としては、構築した上顎モデルの近心歯槽窩辺縁部から顎骨最近心部までの距離が水平的に5mmの骨量であった為、基本モデルを5mmモデルとし、基本モデルから歯槽骨量を水平的に2mmずつ変化させ、3mmモデル、1mmモデル、さらに、近心歯槽窩辺縁部を超えて骨欠損した-1mm

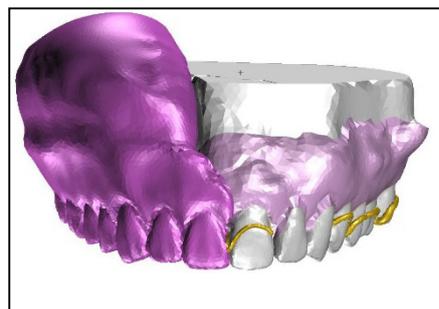


図1 基本モデル

モデル、-3mmモデルの合計5種類の歯槽骨モデルとした。(図3)

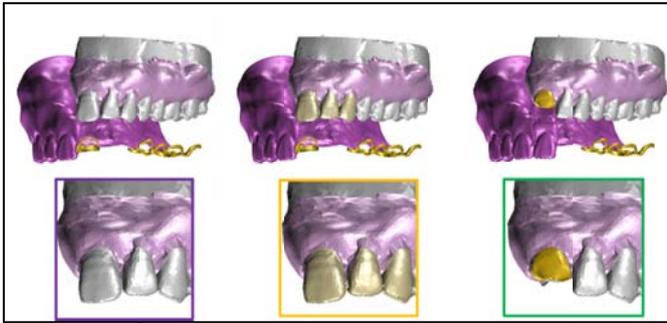


図2 解析項目 (上顎顎義歯設計)

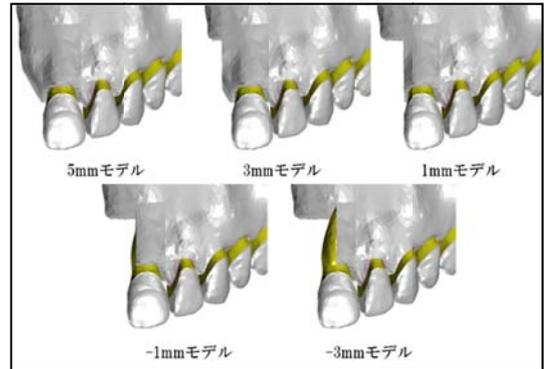


図3 解析項目 (支台歯周囲歯槽骨量)

(3) 解析条件の設定

モデルの各構成要素における物性値の設定に関しては、全て様々な文献を参考にして設定した。歯根膜、顎堤粘膜の軟組織の材料特性に関しては、予備実験を行い材料定数変換プログラムにより材料定数を複数自動変換させることにより解析モデルに最適な生体挙動を示す材料非線形性を導入した。荷重条件としては、荷重部位を顎義歯咬合面 第一、第二小臼歯、第一、第二大臼歯相当部とし、荷重方向は咬合平面に対して垂直に付与した。荷重量については文献値を参考にし、合計120Nの荷重量とした。拘束条件は解析結果に影響のない、上顎モデル上縁部をX、Y、Z方向に完全拘束とし、接触条件は、顎義歯と接触する歯および顎堤粘膜部に接触関係をクーロン摩擦にて加えた。

3. 研究の特色

本研究は、三次元有限要素法を用いて、複雑な挙動を示す顎義歯および支台歯周囲組織に対して、可及的に詳細にシミュレートすることにより、広範囲な顎骨欠損に対する顎義歯設計に対して、顎骨欠損隣接歯に適用される直接支台装置の形態を検討し、さらに、顎骨欠損隣接歯周囲に残存する歯槽骨における力学的検討も同時に行ったものである。今回、有限要素法解析に設定した解析条件に関しては、可及的に臨床に即した文献値を参考に設定し、軟組織挙動に対しても生体挙動に近似した設定が可能となった。そのため、本研究結果は、顎義歯設計における直接支台装置の選択基準として有益な成果を得ることができたと考えられる。

4. 研究の成果

本研究にて得られた解析結果としては、上顎顎義歯設計における顎骨欠損部隣接歯への磁性アタッチメントの適用は、支台歯近心歯槽骨が水平的に1mmの厚みの場合に、直接支台装置にレスト付きワイヤークラaspを適用した基本モデルと比べ、近心歯槽骨に発生する応力を大幅に減少させ、また、支台歯を連結処置した場合と同等の力学的効果を示すものであった。また、支台歯近心歯槽骨が水平的に喪失した場合、基本モデルと比べ、支台歯変位量を減少させ、また、支台歯連結処置した場合と比べ周囲歯槽骨への発生応力を抑制する効果を示すものであった。

なお、本研究結果は第25回日本磁気歯科学会学術大会にて発表を行ったものである。

パーキンソン病の脳深部刺激療法術後の就労支援に関する研究

日本福祉大学 健康科学部 宮田 美和子

1. 研究の目的

パーキンソン病(PD)は振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などの運動機能障害を伴う進行性疾患である。PDの治療は内服薬療法が主体になるが、長期内服により薬剤効果の持続時間が短縮し、日内変動を伴う様々な合併症を認め、内服薬治療では限界が生じてくる。近年、進行期PDの治療として脳深部刺激療法(DBS)が注目されている。DBSは外科手術により脳深部に刺激電極を埋め込み電気刺激を行う療法で、内服薬の減量や振戦の軽減、オフ時の底上げに効果を示す治療法である。我が国でも2000年の保険適応以降、DBS術件数は飛躍的に増えている。運動機能に効果を示すDBSだが、手術後の遂行機能の低下や抑うつ気分なども報告されている。遂行機能は、目標設定、それに到達できる計画立案、必要な方略の選択、さらに同時進行で物事を処理しながら、自己や周囲の環境に配慮し、臨機応変に柔軟な対応をするなど、就労をはじめとする社会生活を行う上で必要不可欠な役割を担っている。

そこで本研究では、DBS治療を受けているPD患者を対象者に、就労に関する基礎調査を行った。さらにインタビューによる就労状況の調査結果から、PD症状により就労場面で困難になりやすい項目について調査し、DBS術後のPDに必要な就労支援について考察した。

2. 研究の計画・方法

(1) 対象

発症年齢が20代～50代のPD患者で、両側視床下核刺激療法術が施行され、術後1年以上のフォローアップのできた22例(男性18例、女性4例、手術時平均年齢50.6歳)である。

(2) 方法

対象者に対し職業歴について調査し、現在の就労状況により就労を継続している群(就労群)と離職した群(離職群)の2群に分類した。2群の手術時の年齢、性別、発症年齢、罹患年数を含む基礎情報、運動機能、日常生活動作、高次脳機能、抑うつ気分について、術前と術後1年の評価結果の比較を行なった。

さらに対面インタビューによる調査に協力が得られた6例のインタビュー結果から、PD症状により就労場面で困難を感じている事柄について症状別にまとめた。

3. 研究の特色

PDのDBSに関する研究は近年多く報告されているが、運動機能や高次脳機能、気分に関する報告が大半で、生活の質(QOL)や社会生活に関する報告は少ない。本研究により、DBS治療を受けているPDの就労の現状と課題を把握し、就労支援の方法を検討することができると考える。

4. 研究の成果

(1) DBS術後の離職率について

対象者22名中、術後5年以内に退職している者が11名で、DBS術後の離職率は50%であった。

(2) 就労群と離職群の基礎情報の比較について

就労群と離職群を比較した結果、手術時年齢には有意な差を認めなかった($P=0.075$)が、就労群の発症年齢が離職群よりも有意に低く($P=0.001$)、罹患年数が有意に高かった($P=0.005$)。術前後の内服薬量(術前: $P=0.06$ 、術後1年: $P=0.21$)、運動機能(術前: $P=0.06$ 、術後1年: $P=0.09$)、日常生活活動(術前: $P=0.13$ 、術後1年: $P=0.28$)、遂行機能(術前: $P=0.43$ 、術後1年: $P=0.19$)、抑うつ気分(術前: $P=0.30$ 、術後1年: $P=0.33$)については、いずれの項目でも2群間で有意な差を認めなかった。

(3) PD症状における就労時に困難さを感じている状況とPD症状との関係

① 運動機能に関する問題

ア. 姿勢反射障害のため通勤ラッシュ時、人にぶつかったりするとふらついたまま転倒してしまう。

イ. 構音障害のため、顧客対応の窓口業務が困難となり別の部署に異動になった。

ウ. 警備の仕事だが、構音障害のため同僚とのトランシーバーを使ったやり取りの際に、何を言っているのか分からないと言われ、険悪になることがある。

② 遂行機能障害

ア. 工場のラインにいたが、1時間毎の精算数などの計算ができなくなり、度々ラインを止めてしまうことがあり、最終的には退職することになった。

イ. 今まで出来ていた仕事の段取りが上手くできない。優先順位をつけるのが難しくなった。

③ 気分障害

ア. 意欲低下(アパシー)の症状では、朝の通勤が億劫になった。仕事に行ってしまうと、いつも通り働けるが、家を出るまでが動けない。

イ. 抑うつ気分の症状では、休日に何かしようという気持ちにはとてもなれない。仕事ができるように、しっかり休養をとることしか考えられない。楽しみがないし、気分も晴れない。

④ その他

ア. 嚥下困難で食事に時間がかかる。昼食時には時間がかからないように食べやすい簡単なもので済ませる。

イ. 職場の人からこの病気について理解を得るのは難しい。手術前は手が震えたり、周囲に明らかに分かる症状で気遣ってもらえたが、術後は目に見えて分かる症状が減り、姿勢反射障害など見えにくい症状で困っているが、そのことを理解してもらいにくい。周囲は病気が治って良かったくらいに思っている。

(4) 考察

本研究の結果から、DBS後の離職率が50%であることが判明した。離職率の高い要因として周囲からの病気に対する理解が得られにくいことが考えられた。DBS前に振戦や薬剤性ジスキネジアなど第三者から見ではっきりと分かっていた症状がDBS後は改善されるため、就労における課題は内服薬治療時と異なる可能性が示唆された。DBS後は姿勢反射障害や遂行機能障害などのDBSでは改善しにくい症状と、先行研究でも報告されているDBS後に悪化しやすい構音障害が、就労を阻む要因となる可能性が高い。これらの症状へのリハビリテーションを行うと共に、就労場面での支援が必要と考える。

また雇用者側では、部署替えをするなど対象者への配慮がみられた。今後、雇用者側が抱える課題を抽出することで、対象者と雇用者の双方にとって有益な就労支援を検討することができると思われる。

セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築

名城大学 理工学部 鈴木 秀和

1. 研究の目的

世界ではPC向けのアプリケーションよりスマートフォンやタブレット向けのモバイルアプリケーションのリリースを先行する「Mobile First」の潮流が強くなっており、新たなモバイルアプリケーションの登場によりビジネス・ライフスタイルを大きく変えるイノベーションの促進が期待されている。しかし、次の2つの課題がモバイルアプリケーションの普及を阻害している。

- (1) 高性能なサーバシステムの導入の必要性
- (2) サーバからの情報漏洩リスク

そこで本研究の目的は、これまで申請者が開発してきたエンドツーエンドで移動透過性を実現するNTMobile (Network Traversal with Mobility) を基盤とした、セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築を行うことである。モバイルアプリケーションはサーバを介さずにエンドツーエンドで暗号化通信を実現することにより、上記2点の課題を解決する。

2. 研究の計画・方法

- (1) ユーザ認証機構とNTMobileサーバ群の拡張

従来のNTMobileシステムにAS (Account Server) を新たに導入し、OpenIDと連携させることにより、ユーザ情報をNTMobileシステムから分離する。これにより、OpenIDサービスを提供するGoogleやFacebookなど頑健で高性能なシステムを利用することが可能になり、モバイルアプリケーション開発者からユーザ情報を管理するリスクを排除する。

- (2) セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築 (図1)

モバイルアプリケーションが (1) で拡張したユーザ認証機構を容易に利用できるようにするために、従来実装してきたNTMobileフレームワークを拡張する。NTMobileのシグナリング処理、パケットカプセル化機能および暗号化機能を共通ライブラリとしてC言語で開発するが、iOSおよびAndroidアプリケーションからは直接このライブラリを利用することができないため、Objective-CおよびJava用のラッパークラスを実装する。これにより、NTMobileシステムはアプリケーション開発者から隠蔽され、エンドツーエンド通信の実現や暗号化通信に関する専門的な知識が無くても、セキュアなモバイルアプリケーションを容易に開発できるようになる。

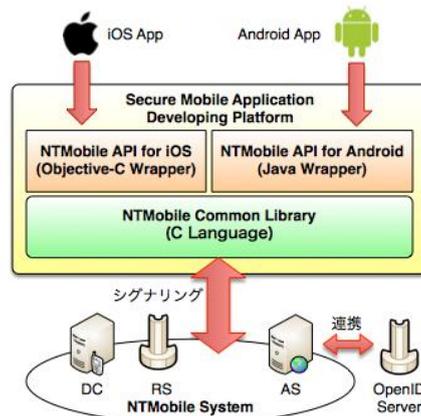


図1 本研究で構築する開発プラットフォーム

3. 研究の特色

移動透過性を実現する技術を応用して安全なモバイルアプリケーションを開発するプラットフォームを構築することは独創的であり、他に例はない。本研究で構築するプラットフォームを利用したモバイルアプリケーションが普及することにより、次のような効果が期待される。

(1) アプリケーション開発モデルの転換によるイノベーションの促進

モバイルアプリケーションはエンドツーエンドでデータ交換が可能になるため、サーバが不要となる。これにより開発資金が乏しい個人開発者の裾野が広がり、独創的なアプリケーションの登場が期待される。

(2) 安全・安心なモバイルアプリケーションの普及

エンドツーエンドで暗号化通信が可能になるため、サーバからの情報漏洩リスクを排除でき、ユーザは安心して利用することができる。

(3) モバイルネットワークトラフィックの抑制

NTMobileの機能により、モバイルネットワークへ流れるトラフィックをWi-Fiを経由してインターネットへオフローディングすることができ、モバイルネットワークの負荷を抑制できる。

4. 研究の成果

(1) ユーザ認証機構とNTMobileサーバ群の拡張

ASを導入し、OpenID Connectと連携して認証及び暗号化通信に必要な共通鍵を配付するために、NTMobileのシーケンスおよびDCの仕様を拡張した(図2)。本仕様の動作検証を行うために、CentOS 6.6を利用してASを構築し、OpenID ConnectとNTMobileの連携を実現するWebアプリケーションをPHPで開発した(図3)。動作検証用Androidアプリケーションを開発し、実環境にて認証処理時間を測定した結果、約10秒で完了することがわかった。この処理時間は初回の認証時だけに発生するものであり、十分に許容できるものである。

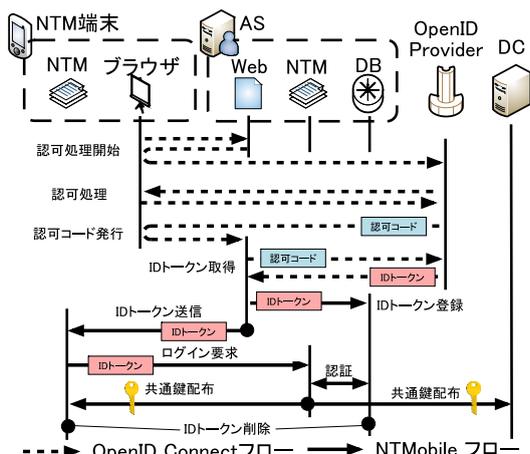


図2 OpenIDと連携した認証方法

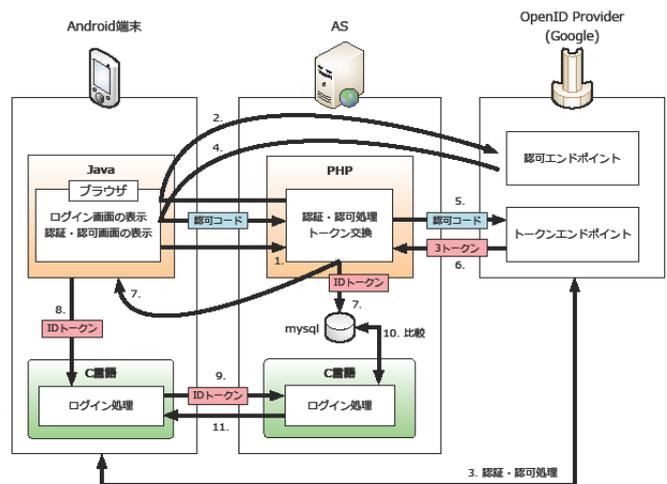


図3 ASの実装

(2) セキュアモバイルアプリケーション開発プラットフォームの構築

NTMobileシステムにおける共通ライブラリをC言語で開発した。通常のソケット通信アプリケーションの開発作法に合わせて、標準ソケットライブラリに対応したNTMobileソケットライブラリを実装した(表1)。また、NTMobileソケットライブラリをiOSおよびAndroidから呼び出せるようにするために、それぞれObjective-CおよびJavaラッパーを実装した。

表1 ソケットAPIに関する共通ライブラリとJavaラッパーの一例

処理	標準ソケット関数	NTMobileソケット関数 (C言語)	Javaラッパーメソッド
名前解決	getaddrinfo	ntm_getaddrinfo	NTMobile.getaddrinfo
ソケット作成	socket	ntm_socket	NTMobile.socket
バインド	bind	ntm_bind	NTMobile.bind
送信	sendto	ntm_sendto	NTMobile.sendto
受信	recvfrom	ntm_recvfrom	NTMobile.recvfrom
切断	close	ntm_close	NTMobile.close

開発したプラットフォームを用いて、UDPチャットアプリケーションをiPhone用とAndroid用を試作した。動作検証を行った結果、NTMobileシステムを利用してエンドツーエンド通信できることを確認した。なお、今回試作した開発プラットフォームには(1)で実現したユーザ認証機構は組み込まれておらず、今後継続してプラットフォームを実装し、完成させる必要がある。

(3) 研究成果の発表

下記の学会において、計6件の研究成果を発表した。

- ① 平成27年度電気・電子・情報関係学会東海支部連合大会 (2015年9月) 2件
- ② 情報処理学会第77回MBL研究発表会 (2015年12月) 1件
- ③ 第13回情報学ワークショップ (2015年12月) 2件
- ④ 第78回情報処理学会全国大会 (2016年3月) 1件

哺乳類初期胚の細胞内膜ダイナミクスによるシグナル伝達制御

同志社女子大学 薬学部 川村 暢幸

1. 研究の目的

哺乳類初期胚では、胎盤が形成される以前の時期において、Visceral endoderm(VE)と呼ばれる細胞グループできわめて活発にエンドサイトーシスが起きており、かつ、様々なシグナルが行き交い細胞の分化がダイナミックに行われる。本研究では、様々なシグナル伝達が行き交う初期胚を用いて、膜動態の制御によるシグナル伝達の制御についての解明を目指す。

マウス初期胚発生において、様々なシグナル伝達が正確にコントロールされることが、正常な発生に必要である。近年、細胞外からの膜を通じたシグナル伝達経路の調節においてRabタンパク質等の関与する膜動態制御機構の関与が指摘されている。私は、*rab7*遺伝子ノックアウトマウス胚において、いくつかのシグナル伝達経路の異常が、中胚葉の形成異常を引き起こしている可能性を見いだしている^{1,2}。そこで、マウス初期胚を用いて解析を行い、マイクロオートファジー等の膜動態制御による、細胞内シグナル伝達経路の制御について明らかにすることを旨とする。

2. 研究の計画・方法

- (1) *rab7*遺伝子ノックアウトマウス(*rab7^{ko/ko}*)のwhole mount *in situ* hybridization法や蛍光抗体法による正常発生に必要なシグナル伝達経路の解析：*rab7^{ko/ko}*マウスが胎生致死となる胎生6~7日近辺で重要な働きをしていることが報告されている因子についてその発現量や発現パターンをwhole mount *in situ* hybridization法、蛍光抗体法により解析した。
- (2) *rab7*遺伝子欠損細胞での解析：*rab7*遺伝子の必須エキソンを*loxP*配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウス(*rab7^{lox/lox}*)胚から、胚性線維芽細胞を樹立し、刺激因子で刺激した際のシグナル伝達についてWestern blot法を用いて解析した。
- (3) 部分特異的*rab7*遺伝子ノックアウトマウスを用いた胚発生過程の解析：*rab7*遺伝子の必須エキソンを*loxP*配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウス(*rab7^{lox/lox}*)に、さらに、VE細胞特異的に*Cre*遺伝子を発現する組み替えアレル(*Ttr-cre*)、Epiblast細胞特異的に*Cre*遺伝子を発現する組み替えアレル(*Villin-cre*)を導入し、各々の細胞群で特異的に*rab7*遺伝子をノックアウトさせた場合に胚発生過程にどのような変化が見られるかwhole mount *in situ* hybridization法、蛍光抗体法により解析した。

3. 研究の特色

本研究は、膜動態の調節によるシグナル伝達の制御を明らかにすることを旨とする。私は、VE細胞におけるエンドサイトーシス経路の終着点が頂端液胞 (Apical vacuole) という巨大な液胞であることを見いだしている。また、通常、小胞同士がひとつの空胞になる場合、小胞同士が接着し、互いの膜が融合して一つの連続した膜をつくるCanonical membrane fusion (図・上) 様式を経るが、初期胚の液胞では、大きな液胞が小さな前駆体を飲み込んだ後、液胞内で膜を分解してひとつの小器官になる、Microautophagy like fusion (図・下) で示した独特な様式を取ることを見だしこれまでに報告した。哺乳類細胞におけるマイクロオートファジーは報告が少なく非常にユニークな現象であり、マイクロオートファジーに着目したシグナル伝達の制御機構の解明は新しい視点をもたらすと考えている。また、これまで初期エンドソームがシグナル伝達の間として重要であるとされてきたが、私は、新たに、後期エンドソーム〜リソソームおよびそこに至る膜動態もまたシグナル伝達の調節に重要であることを提唱できると考えている。

*rab7*遺伝子はリソソームの機能不全に起因する「ライソゾーム病」と呼ばれる一連の希少疾患の原因遺伝子との指摘がある。本研究において、遺伝子ノックアウトマウスを作成し解析を行うことにより、それら疾病の病態解明・薬物治療などを用いた治療方法の開発などにも応用することが可能と考えている。

4. 研究の成果

- (1) *rab7*遺伝子ノックアウトマウスの whole mount *in situ* hybridization法や蛍光抗体法による正常発生に必要なシグナル伝達経路の解析

rab7^{ko/ko}マウス胚では、原腸陥入期に発生が停止するため、原腸陥入が起こる際に必要となるEMT（上皮間葉転移）現象が起こっているか否かについて検討したところ、原腸陥入の起こるprimitive streak領域の細胞のE-cadherin発現量が低下せず、EMTを阻害していることが明らかとなった。EMTはFGF8、BMP4、Wnt3、Nodalといった因子により誘導されるが、whole mount *in situ* hybridization法により検証したところ、これらの因子の発現量には変化が見られなかったのに対し、Wnt3とNodalの下流の因子の発現量が低下していることを見だし、Wnt3とNodalのシグナル伝達に異常を来していると考えられ、現在さらに解析を進めている。

- (2) *rab7*遺伝子欠損細胞での解析

rab7^{lox/flox}胚から、胚性線維芽細胞を樹立し、Cre発現アデノウイルスを感染させることにより、*rab7*遺伝子ノックアウト細胞を作製した。ウイルス感染後48時間でほぼ完全にRab7タンパク質の発現が消失することをWestern blot法により確認した。この細胞に対して、BMP、TGFβ、EGF刺激を行い、そのシグナル伝達を下流因子のリン酸化フォームを検出することにより解析したところ、細胞レベルではBMP、TGFβ、EGF刺激によるシグナル伝達には、野生型と*rab7*遺伝子ノックアウト細胞間で変化が見られなかった。胚レベルでは、TGFβスーパーファミリーに属するNodalのシグナル伝達に異常が見られたが、この違いは、線維芽細胞ではマイクロオートファジーという膜動態が見られないことに起因する可能性を考えている。

- (3) 部分特異的*rab7*遺伝子ノックアウトマウスを用いた胚発生過程の解析

*rab7*遺伝子の必須エキソンをloxP配列で挟むようにデザインした組み替えアレルを持つマウスに、さらに、VE細胞特異的にCre遺伝子を発現する組み替えアレル(Ttr-cre)、Epiblast細胞特異的にCre遺伝子を発現する組み替えアレル(Villin-cre)を導入した。VE細胞特異的に*rab7*遺伝子を欠損したマウス胚は、*rab7*^{ko/ko}胚と良く似た表現型を示したのに対し、Epiblast細胞で*rab7*遺伝子をノックアウトしたマウス胚は、胎生6~7日より後の段階で発生が停止することが明らかになった。この結果から、胎生6~7日における原腸陥入の停止という表現型は、VE細胞における*rab7*遺伝子機能が欠損したことにより引き起こされたことが示唆され、発生初期のVE細胞におけるRab7によるマイクロオートファジー制御の重要性が示唆された。今回新たに、Epiblast細胞で*rab7*遺伝子をノックアウトした場合は、発生中期程度まで発生が進行し胎生致死となることが明らかになった。これは、発生シグナルの伝達異常や栄養供給の異常などの可能性が考えられ、今後の検討課題である。

引用文献

1. Kawamura, N. *et al.* Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun* **3**, 1071, doi:10.1038/ncomms2069 (2012).
2. Kawamura, N., Sun-Wada, G. H. & Wada, Y. Microautophagy in the visceral endoderm regulates nutritional provision and differentiation signals during mouse early development. *Seikagaku* **86**, 778-782 (2014).

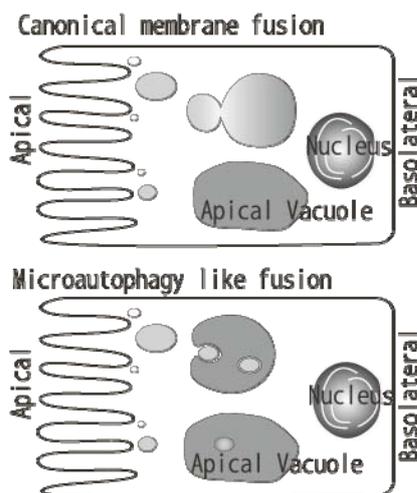


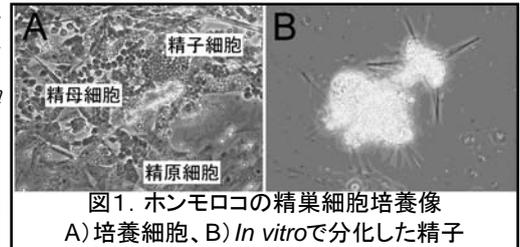
図 2 Canonical membrane fusionと Microautophagy like fusion

絶滅危惧種ホンモロコにおける *in vitro*精子生産技術の開発 — 季節および性成熟段階に依存しない精子生産 —

立命館大学 薬学部 檜垣 彰吾

1. 研究の目的

申請者らは、琵琶湖固有種であり絶滅危惧IA類に指定されているコイ科魚ホンモロコを対象とし、遺伝資源の保存および将来的な資源量の回復を目標に、繁殖季節および性成熟段階に依存しない、*in vitro*精子生産技術および精巣細胞の凍結保存法の開発に着手しており、これまでに魚類では初めて、凍結保存した非繁殖期の成魚および稚魚の精巣細胞から、*in vitro*において、受精・発生能を有する精子を生産することに成功(図1)している。しかし、開発済みの培養法・凍結保存法では、生産される精子数が少なく、また、短期間(約1ヶ月)しか精子生産を維持できていない。



そこで本研究では、(1) 効率的な *in vitro*精子生産技術の確立と (2) 精巣細胞凍結保存法の至適化を行う。(1) では、*in vitro*生産精子数の増加と精子生産期間の長期間化に焦点を置く。

(2) では、魚類精巣細胞に適したガラス化凍結保存液の作製に焦点を置き、精原細胞生存率が高く、活発な精子分化が進行する条件を明らかにする。

2. 研究の計画・方法

(1) 効率的な *in vitro*精子生産技術の確立

開発済みの培養方法では、精巣細胞培養時に共培養状態にある体細胞の過剰な増殖が、生殖細胞の増殖を抑制し、*in vitro*生産精子数の低下を招いていることが示唆されていた。また、同様の理由から、精子形成に伴い精原細胞数が減少し、精子形成開始後約1ヶ月で精原細胞はほとんど認められなくなるとともに精子形成はほぼ停止することから、精原幹細胞の再生分裂が活発に行われていないことが示唆されていた。そこで、本項では、体細胞の過剰な増殖を抑制し、かつ精子分化を促進し得るような培養法として、浮遊培養を試みた。

(2) 精巣細胞低温保存法の確立

予備実験において、ホンモロコ精巣細胞の凍結保存には、凍結(緩慢冷却)法よりもガラス化(急速冷却)法が適しているとの結果を得ていることから、ガラス化法を軸に研究を行った。凍害防止剤としては、エチレングリコール(EG)、グリセロール(GC)、ジメチルスルフォキシド(DMSO)、プロピレングリコール(PG)、ブチレングリコール(BG)を用いガラス化凍結保存した後、細胞生存率および精子への分化能を調べることで、ホンモロコ精巣細胞に適し凍害防止溶液を明らかにした。

3. 研究の特色

最新の国際自然保護連合(IUCN)の報告では、調査済みの淡水魚のうち約1/3が絶滅の危機に瀕しているとされている。そのような中、遺伝資源の保存として精子の凍結保存が試みられているが、野生の魚類の中には、季節繁殖性を示す種が多く存在し、精子形成を行っていない非繁殖期の成魚や稚魚は、利用可能な遺伝資源として見做されず、その多くが未利用のまま失われている。

そこで、申請者らは、それら非繁殖期の成魚や稚魚の精巣細胞から、*in vitro*において精子を生産することで、遺伝資源として利活用可能とすることを着想し、培養系の開発を行った。非繁殖期の成魚および稚魚の精巣細胞から、*in vitro*において、受精・発生能を有する精子の生産に成功しているのは申請者らのみである。本研究で得られた知見を、ホンモロコと同様に季節繁殖性を示す他魚種に応用することで、絶滅危惧種の遺伝資源保存が大幅に進むと考えられる。

4. 研究の成果

(1) 浮遊培養法の確立

浮遊培養に適した培養皿を検討した結果、これまで使用していた接着培養用培養皿（細胞が接着しやすいように表面処理したもの）とは異なる、比較的細胞接着性の弱い培養皿（ペトリ皿：表面処理していないもの）上でホンモロコ精巣細胞の培養を行うことで、細胞が自発的に凝集することが観察された（図2）。

この凝集塊を経時的に回収後、固定・パラフィン包埋することで組織切片を作成し、生殖細胞特異的なタンパク質である vasa に対する免疫染色を行ったところ、体細胞を核としており、その表面で生殖細胞が増殖・分化していることが明らかとなった。

また、この凝集塊の培養を継続し、核 DNA 含量をフローサイトメトリー法により解析した結果、接着培養（Adhesion culture）に比べて浮遊培養（Suspension culture）では、体細胞を示す 2 倍体（2c）が著しく少ない一方、精子や精子細胞を示す 1 倍体（c）が劇的に増加することが明らかとなった（図3）。また、同様の傾向が培養開始 2 ヶ月後においても認められたことから、浮遊培養により、長期間活発な精子分化が進行することが示唆された。

さらに、凍結保存した非繁殖期成魚の精巣細胞をこの培養法で培養した後、人工授精に用いることで、接着培養では 1%未満であった受精率が約 25%へと大幅に改善され、非常に多くの稚魚が得られることを確認した。

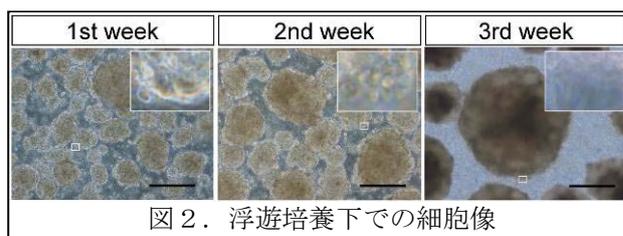


図2. 浮遊培養下での細胞像

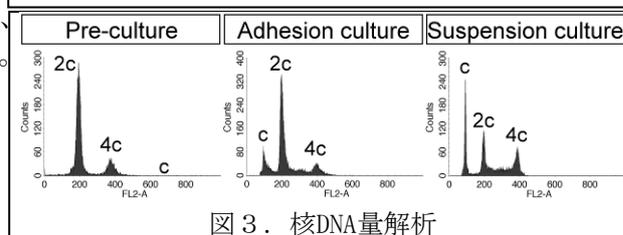


図3. 核DNA量解析

(2) 精巣細胞低温保存法の至適化

5 種の凍害防止剤（EG、GC、DMSO、PG、BG）について、ガラス化に必要な最小濃度を調べた結果、それぞれ 7M、6M、5M、5M、4M であった。そこで、それら濃度の凍害防止剤を含むガラス化液を用いてホンモロコ精巣細胞をガラス化凍結保存した後、7 日間培養を行い、生殖細胞特異的なタンパク質である vasa に対する免疫染色をすることで生殖細胞の生存性を調べた。その結果、GC 以外の凍害防止剤を用いた場合で、多くの生殖細胞コロニーが確認された。それら生殖細胞の占める面積を測定・比較したところ、PG を含むガラス化液を用いて凍結保存した精巣細胞で、最も生殖細胞の生存性が高く、凍結保存しなかった精巣細胞に比較して、約 50%の生殖細胞が生存していることが示唆された。以上の結果から、ホンモロコの生殖細胞の凍結保存には、PG を用いたガラス化が適していることが明らかとなった。現在、上記方法により凍結保存した精巣細胞から分化した精子の受精・発生能を確認中である。

学会発表

- ① 檜垣彰吾・藤東貴昭・手島黎子・島田愛美・酒井則良・高田達之、琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)における全精巣ガラス化低温保存の試み、第108回日本繁殖生物学会大会
- ② 高田達之・藤東貴昭・檜垣彰吾・手島黎子・島田愛美、フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 精巣細胞の解析、第108回日本繁殖生物学会大会

血液疾患における線維化の機序の解明

大阪医科大学 医学部 中山 聖子

1. 研究の目的

(1) 古典的ホジキンリンパ腫における線維化の機序の研究

古典的ホジキンリンパ腫は、比較的予後が良いと言われているが、化学療法や放射線療法に抵抗性の難治例がある。古典的ホジキンリンパ腫の病理組織像は少数の腫瘍細胞であるホジキン細胞と Reed-Sternberg (RS) 細胞の出現と、背景のリンパ球、形質細胞、好酸球、組織球などの炎症細胞からなる。腫瘍細胞が分泌するサイトカインは様々な炎症細胞浸潤に関与していると考えられている。古典的ホジキンリンパ腫は、さらに結節硬化型、混合細胞型、リンパ球豊富型、リンパ球減少型に分類されるが、約 80%を結節硬化型と混合細胞型が占める。結節硬化型は密な線維性隔壁によりリンパ節が分割される特徴的な組織像を呈する。古典的ホジキンリンパ腫における線維化の病態を解明することは、組織像の多彩性の解明、しいては古典的ホジキンリンパ腫の病因の解明および新たな治療法の開発に寄与するものと考えられる。本研究の目的は古典的ホジキンリンパ腫の線維化に関与するサイトカイン、炎症細胞の役割を研究することである。

(2) 骨髄線維症における線維化の機序の研究

難治性血液疾患の一つである骨髄線維症は、原発性骨髄線維症の場合は3年生存率が約50%と予後不良である。基礎疾患に続発する二次性の場合も骨髄腔内の線維化を起し、本来の骨髄の造血機能を障害する。骨髄の線維化を抑制することが、本疾患の治療に重要である。古典的ホジキンリンパ腫で得られた線維化の機序の知識を基に、骨髄線維症の線維化の病態を解明することを目的とする。

2. 研究の計画・方法

古典的ホジキンリンパ腫におけるリンパ節の線維化の程度と、線維化に関与するといわれているマスト細胞および制御性 T 細胞など炎症細胞の浸潤との関係を調べ、どの細胞が線維化と密接な関係にあるかを検討した。さらに、線維化に関与する種々のサイトカインを分泌する細胞を同定した。同様に、骨髄線維症においても、骨髄における線維化に関連するサイトカインや炎症細胞浸潤を調べた。

(方法)

過去に生検された古典的ホジキンリンパ腫患者のパラフィン固定されたリンパ節の病理検体を用いて、トルイジンブルー染色や c-kit の免疫染色を施行しマスト細胞を検出し、浸潤頻度を調べた。さらに、線維化をおこすサイトカインである transforming growth factor- β (TGF- β)、線維化をもたらすマスト細胞の誘導及び増殖因子でもある interleukin-13 (IL-13)、マスト細胞の誘導および増殖因子の stem cell factor (SCF) や interleukin-3 (IL-3)、制御性 T 細胞のマーカーである forkhead box P3 (FOXP3) や CD25 の免疫染色を施行し、TGF- β 、IL-13、SCF や IL-3 分泌細胞を同定し、制御性 T 細胞の浸潤頻度を調べた。さらに、マッソントリクローム染色を行い、線維化領域を検出し数量化し、TGF- β 陽性細胞、IL-13 陽性細胞、IL-3 陽性細胞、SCF 陽性細胞、制御性 T 細胞、マスト細胞の分布と線維化領域との比率の関係を統計学的に、古典的ホジキンリンパ腫のタイプ別に比較検討した。

同様に、骨髄線維症においても、過去に生検されたパラフィン固定後の骨髄の病理検体を用い、抗 mast cell tryptase 抗体を用いてマスト細胞を検出し、浸潤の程度を正常の骨髄組織と比較検討した。線維化に関与するサイトカインである TGF- β や IL-13 の免疫染色を実施した。マスト細胞浸潤、サイトカイン、線維化の程度との関係性を調べた。

3. 研究の特色

マスト細胞はヒスタミンを分泌しアレルギー反応を起こす原因細胞だけではなく、多彩なサイトカインを産生する能力を有する免疫担当細胞の一つであることが分かってきた。マスト細胞が TGF- β を産生し、IgG4関連疾患や間質性腎炎などの線維化に関与していることが最近報告された。古典的ホジキンリンパ腫では、発疹などのアレルギー症状がしばしば見られることから、古典的ホジキンリンパ腫の病態にマスト細胞が関与している可能性がある。ホジキン細胞やRS細胞が分泌するサイトカインには tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが知られている。しかし、マスト細胞に着目した古典的ホジキンリンパ腫の研究は未だなされていない。ホジキン細胞やRS細胞が分泌するサイトカインとマスト細胞の浸潤の関連性、マスト細胞自身が分泌するサイトカインに焦点をあてて古典的ホジキンリンパ腫の病態解明を行うことは、化学療法とは異なる新たな治療法の開拓に繋がり、難治性古典的ホジキンリンパ腫の予後を改善すると思われる。

骨髄線維症の線維化の機序については、骨髄巨核球に関する報告が多いが病態解明は未だに不十分である。マスト細胞に注目した研究はなく、新たな視点から骨髄線維症の病態や組織像を研究することは、新たな治療法の開拓に繋がる。

4. 研究の成果

(1) 古典的ホジキンリンパ腫における線維化の機序の研究

リンパ節内の線維化比率は、結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫 (nodular sclerosis subtype of classical Hodgkin lymphoma; NSCHL) が、非結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫 (non-NSCHL) (混合細胞型、リンパ球豊富型) より有意に線維化比率が高かった (Figure 1a)。また、腫瘍細胞であるホジキン細胞や RS 細胞が IL-13 を産生する症例ほど、有意に線維化比率が高かった (Figure 1b)。マスト細胞数浸潤は、結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫では、非結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫より有意に多く (Figure 1c)、腫瘍細胞が IL-13 を産生している症例ほど有意に多かった (Figure 1d)。さらに線維化比率は、マスト細胞浸潤数に正比例していた。連続切片を作製し、トルイジンブルー染色と抗 TGF- β 抗体又は抗 IL-13 抗体の免疫染色を施行した結果、マスト細胞が線維化を誘導するサイトカインである TGF- β や IL-13 を産生し、線維化に関与している可能性が示された。また、IL-3 陽性細胞は検出できなかったため、古典的ホジキンリンパ腫の病態に IL-3 が関与している可能性は低かった。制御性 T 細胞の浸潤程度と線維化比率に関連性は無く、さらに制御性 T 細胞は線維化に関与する TGF- β や IL-13 を産生していなかった。

本研究で、1) 結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫症例では、腫瘍細胞が線維化に関与するサイトカインの IL-13 を産生し線維化をもたらす、2) 腫瘍細胞が産生する IL-13 により、マスト細胞の増殖および浸潤が誘導され、さらにマスト細胞から線維化のサイトカインである TGF- β や IL-13 が産生されることで線維化が進行する、というメカニズムを示した。マスト細胞を介したメカニズムが結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫の病態に関与していると示されたことは、今後の古典的ホジキンリンパ腫の病態解明に繋がる。

ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞における SCF の異常発現 (Figure 2) は、結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫と非結節硬化型古典的ホジキンリンパ腫間で有意差は見られなかったが、約 45% の古典的ホジキンリンパ腫の症例で認めた。ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞が SCF を発現するという報告は未だなく、新たな知見であった。SCF は古典的ホジキンリンパ腫の新たな治療ターゲットとなり得る可能性が示され、今後の新たな治療法の開拓に繋がると考える。

本研究の成果は、*International journal of immunopathology and pharmacology* (Nakayama S, et al; Role of mast cells in fibrosis of classical Hodgkin lymphoma, 2016, in press) に報告した。また、2016 年第 78 回日本血液学会学術集会にても発表予定である。

Figure 1

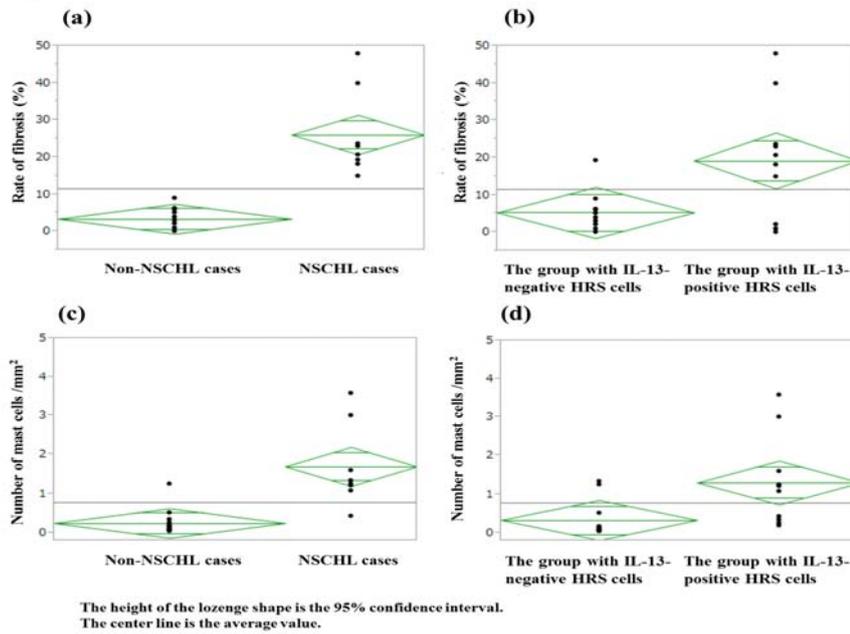
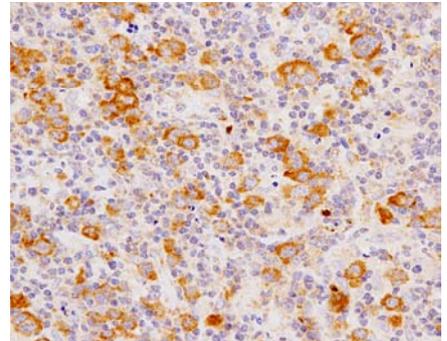


Figure 2



(2) 骨髄線維症における線維化の機序の研究

骨髄線維症患者（①原発性骨髄線維症、②真性多血症/本態性血小板血症からの二次性骨髄線維症、③骨髄異形成症候群を伴う骨髄線維症）の骨髄組織では、①-③の各群いずれにおいても、骨髄組織におけるマスト細胞数浸潤が、正常骨髄組織と比較して優位に多かった。①群では②群に比較してマスト細胞浸潤が多かった。また、線維化の程度は、マスト細胞浸潤数に正比例していた。抗 mast cell tryptase 抗体と抗 TGF- β 抗体を用いた蛍光抗体を用いた二重免疫組織染色を施行した結果、マスト細胞は TGF- β や IL-13 が陽性であった。以上より、骨髄組織に浸潤したマスト細胞が、線維化をもたらすサイトカインである TGF- β や IL-13 を産生し、骨髄の線維化に関与していることが示された。

線維化の改善は、輸血依存の改善に繋がり、患者様の QOL の改善に寄与するため、線維化を抑制する治療法の開拓が望まれている。本研究により、マスト細胞を介した骨髄の線維化のメカニズムが示されたことで、骨髄線維症に浸潤したマスト細胞は、骨髄線維症における線維化抑制の治療ターゲットになり、新たな治療法の開拓に繋がると考える。

脳卒中後片麻痺者の自立歩行を阻害する身体的認知的特性の研究 — 一時系列カオス解析による軌道安定性の評価 —

広島国際大学 総合リハビリテーション学部 山崎 貴博

1. 研究の目的

歩行の自立は、脳卒中後片麻痺者の日常生活動作の自立に影響を与える最大の要因である。歩行の自立の判断は、しばしば臨床のセラピストの経験的判断に委ねられているが、特に歩行の要監視レベルから自立レベル移行時の判断に明確な基準は存在しない。歩行能力の程度を示す指標は、歩行スピードテストやtimed up & go testといった遂行時間で評価するものが多く、脳卒中後片麻痺者の歩行安定性に着目した定量的指標を用いた評価法は確立していない。

先行研究によると、歩行の自立に影響を与える要因は、麻痺側下肢機能、下肢筋力やバランス能力などの身体的因子および注意機能などの認知的因子があるとされている。しかし、これらの因子は、歩行が自立している片麻痺患者を対象とした場合の研究結果であり、歩行が自立するための阻害因子としての影響は不明である。

歩行を自立させるためには、転倒につながる身体的バランスの崩壊を生み出さないような安定性が必要である。先行研究では、高齢者の歩行時足圧中心位置の軌道不安定性は、身体能力の低下と相関があると報告されている。そして、身体能力は課題依存型であることと、足圧中心の軌道と身体重心の軌道には相関関係があること、加えて、身体重心は、身体機能や認知機能によって制御されているため、複合的な機能協調性の程度を評価することができることから、歩行時の身体重心移動の軌道に着目した安定性の評価が必要である。本研究の目的は、脳卒中後片麻痺者の歩行要監視レベルと歩行自立レベルの境界となる客観的指標として従来の評価である身体的認知的因子の影響に加え、身体重心移動の軌道安定性を反映する歩行安定性評価の定量的指標を開発し、臨床応用に発展させることである。そこで本研究では、①脳卒中後片麻痺を伴う歩行自立者と歩行要監視者の歩行安定性を比較すること、②歩行安定性の定量的指標の妥当性と歩行自立を達成するための理学療法治療介入の新たな視点を模索することとした。

2. 研究の計画・方法

(1) 被験者

被験者は、脳卒中後片麻痺者23名であった。そのうち、歩行補助具や補装具を用いて歩行が自立している者が19名（男性12名、女性7名、年齢 71.3 ± 11.4 歳）、歩行に監視が必要な者が4名（男性1名、女性3名、年齢 73.0 ± 4.6 歳）であった。全ての被験者に研究の目的と内容を説明し、文書による同意を得た上で実験を行った。

(2) 評価項目

生活自立度の評価は、日常生活自立度判定基準と機能的自立度評価表（以下、FIM）を用いた。歩行スピード能力の評価は、10m歩行スピードテスト（以下、10m歩行）とTimed Up & Goテスト（以下、TUGT）、二重課題歩行スピードテスト（以下、二重課題歩行）を行った。バランス能力の評価は、バーグバランステスト（以下、BBS）と予測最大1歩幅テスト（以下、最大1歩幅）を行った。運動機能障害の評価は、脳卒中機能障害評価法（以下、SIAS）とアシュワーススケール（以下、アシュワース）、ブルンストロームテスト（以下、BRS）を行った。心理・認知機能の評価は、ミニメンタルスケール（以下、MMSE）と転倒に対する自己効力感スケール（以下、FES）、Trail Making Test（以下、TMT）を行った。歩行安定性の評価は、歩行時の仮想重心軌道の安定性と麻痺側下肢の軌道安定性を評価するために時系列カオス解析のリアプノフ指数を用いた。

(3) 歩行時の加速度データの収集

被験者の歩行時の仮想重心軌道の安定性と麻痺側下肢の軌道安定性を評価するために、小

型無線加速度計（MVP-RF8-GC-500, マイクロストーン株式会社）を腰背部中央（L3棘突起上）にベルトを用いて固定し、麻痺側下肢の腓骨外果上方には小型加速度計（MP-M6-02/500C, マイクロストーン株式会社）をテープで固定し取り付けた。両加速度計のサンプリング周波数は100Hzとした。被験者は加速度計を身に着けたまま、16m歩行路で10m歩行スピードテストと二重課題歩行テストを行い、その時の進行方向、左右方向、鉛直方向の加速度データを収集した。

(4) データ解析

歩行テストから得られた加速度データは、数値解析ソフトウェアMATLAB（Mathworks社製）を使用し、誤り近傍法を用いて再構成状態空間の次元を算出した。また、時間遅れ値は、最適な時間遅れ値を求めるために相互情報量を用い最初に極小値をとる時間とした。これら算出された再構成状態空間の次元値と時間遅れ値を、カオス時系列解析システムSunday Chaos Times（株式会社あいほら社製）を用いて最大リアプノフ指数を算出した。最大リアプノフ指数は、上下方向（以下、LEv）、左右方向（以下、LEm1）、前後方向（以下、LEap）それぞれ算出した。

3. 研究の特色

本研究の特色は、脳卒中後片麻痺患者の日常生活に影響を与える歩行の自立可否に着目することによって、歩行自立を阻害する要因を抽出することや自立歩行基準の作成の一助となることである。これまでの研究は、歩行自立した者を対象としているため、その研究結果は、歩行自立者の歩行能力の程度を示すにとどまっていた。また、従来の身体的因子と認知的因子に加え、歩行安定性を評価することによって、身体的因子が歩行安定性に与える影響だけではなく、認知的因子が身体的因子または歩行安定性に与える影響も踏まえた多角的な歩行自立評価が可能となる。よって、本研究結果から、臨床のセラピストの経験的判断に委ねられていた歩行自立の主観的基準から、科学的根拠に基づく歩行自立の客観的基準へと移行することができる可能性がある。また、自立歩行許可の不明確な基準によって起こる医療事故を減少する可能性がある。さらに、転倒による骨折治療などの医療経済的負担の減少につながる可能性があると考えられる。

4. 研究の成果

各群の基本属性と最大リアプノフ指数は表1と表2に示す。

本研究の目的は、①脳卒中後片麻痺を伴う歩行自立者と歩行要監視者の歩行安定性を比較すること、②歩行安定性の定量的指標の妥当性と歩行自立を達成するための理学療法治療介入の新たな視点を模索することとした。①の目的において、歩行自立群と歩行監視群の最大リアプノフ指数の各成分の比較では、有意な差は認められなかったが、10m歩行体幹LEm1は、歩行監視群の方が低値を示す傾向があり、10m歩行下肢LEm1は、歩行監視群の方が高値を示す傾向があった。歩行自立レベルを歩行安定性の指標から検討するには、体幹及び下肢の左右方向の安定性に着目する必要があると考えられる。②の目的において、各群の10m歩行と二重課題歩行の最大リアプノフ指数の各成分の比較では、歩行自立群の二重課題体幹LEm1は、10m歩行体幹LEm1より有意に低いことが認められた。その他の変数においては有意な差は認められなかった。脳卒中後片麻痺者の歩行は、下肢の振り出しを確認する認知的歩行制御をする者が多いとされている。歩行自立群の歩行能力の高さを判定する指標としては、難易度の高い二重課題歩行が適していると考えられるが、歩行自立の可否を判定するには、認知的歩行制御下の10m歩行テストの体幹左右方向の安定性に着目する必要があると考えられる。また、興味深い結果として、歩行自立群の10m歩行体幹LEm1は、歩行監視群のそれよりも高く、歩行自立群の10m歩行下肢LEm1は、歩行監視群のそれよりも低い傾向があり対照的な結果となった。一般的にリアプノフ指数の値が高いほど軌道安定性は不安定であり、またその値が低いほど画一的なパターン化されていることになる。人間の歩行を捉えるうえでパターン化しすぎる場合は、外力への応答が困難となり、一定パターンからの逸脱によって制御不

能になる可能性も考えられるため、極端なリアプノフ指数の高低は問題となるのではないかと考えられる。そのため、歩行安定性の許容範囲を明確にしていく必要がある。

本研究の限界は、歩行監視群の被験者数が少ないため、統計学的解析を行っても信頼性に欠けるため、傾向にとどめておかなければならないことである。今後は、歩行監視レベルの被験者数を増やすことと、歩行自立の基準となる定量的指標を確立できるよう研究を進めていく必要がある。本研究では、体幹及び下肢の左右方向の軌道安定性が歩行自立を見極める指標としてなりうる可能性があるため、その左右方向の安定性を向上させる治療介入や歩行自立の可否の判断として活用できるよう継続して研究を進める価値があると考えられる。

表1. 各群の基本属性

	歩行自立群	歩行監視群	
年齢 (歳)	71.3±11.4	73.0±4.6	p=0.957
身長 (cm)	160.2±11.1	156.1±5.6	p=0.574
体重 (kg)	58.7±11.8	55.0±8.1	p=0.728
麻痺側 (右/左)	8名/11名	3名/1名	
歩行補助具 (有/無)	4名/15名	4名/0名	
下肢装具 (有/無)	3名/16名	0名/4名	
FIM (点)	121.0±5.5	111.0±6.2	p=0.006
10m歩行 (秒)	13.0±5.9	17.3±3.8	p=0.067
TUGT (点)	14.7±6.6	21.9±8.8	p=0.090
二重課題歩行 (秒)	16.6±9.0	24.9±8.5	p=0.162
BBS (点)	47.6±7.7	46.0±4.1	p=0.603
最大1歩幅 (cm)	64.6±20.3	57.8±22.0	p=0.574
SIAS (点)	60.3±11.9	64.8±8.4	p=0.564
アシユワース	0:9名、1:7名 3:1名、4:1名	0:1名、1:3名	
下肢BRS	Ⅲ:1名、Ⅳ:2名 Ⅴ:4名、Ⅵ:12名	Ⅴ:2名、Ⅵ:2名	
MMSE (点)	26.8±3.8	27.5±1.7	p=0.845
FES (点)	95.9±25.9	83.8±33.0	p=0.438
TMT (秒)	180.2±64.8	183.7±53.8	p=0.876

表2. 10m歩行と二重課題歩行時の最大リアプノフ指数

	歩行自立群	歩行監視群	
10m歩行体幹LEap	0.59±0.27	0.41±0.20	p=0.208
10m歩行体幹LEml	0.50±0.23 [#]	0.25±0.09	p=0.063
10m歩行体幹LEv	0.39±0.22	0.50±0.21	p=0.505
10m歩行下肢LEap	1.06±0.51	1.26±0.06	p=0.505
10m歩行下肢LEml	0.77±0.45	1.34±0.58	p=0.067
10m歩行下肢LEv	0.73±0.44	0.78±0.41	p=0.785
二重課題歩行体幹LEap	0.52±0.36	0.73±0.42	p=0.286
二重課題歩行体幹LEml	0.37±0.18 [#]	0.64±0.31	p=0.216
二重課題歩行体幹LEv	0.47±0.21	0.35±0.14	p=0.376
二重課題歩行下肢LEap	1.00±0.47	0.78±0.25	p=0.465
二重課題歩行下肢LEml	0.82±0.34	0.68±0.25	p=0.785
二重課題歩行下肢LEv	0.69±0.27	0.57±0.24	p=0.468

: 10m歩行体幹LEml vs 二重課題歩行体幹LEml、p<0.05