

感覚野に多数存在する皮質脊髄路ニューロンの投射・機能解析

帝京大学 医学部 亀田 浩司

1. 研究の目的

脊髄頸膨大の第7頸髄（C7）の灰白質には主として上肢の運動に関与する運動ニューロンが存在するが、そこへ軸索を投射する皮質脊髄路（CST）ニューロンは一次運動野（M1）や二次運動野（M2）といった領野の他にも、一次体性感覚野（S1）や二次体性感覚野（S2）にも多く存在することがげっ歯類において明らかになってきた。CSTニューロンの重要な機能に随意運動の実行があり、主にM1に存在するCSTニューロンがその役割を担っていると考えられるが、体性感覚野に存在するCSTニューロンも同様に随意運動の実行に直接関与しているのか、それとも別の機能を有するのかは不明である。よって本研究ではこれら広範囲に分布するCSTニューロンの機能解明をめざし、（1）運動野・体性感覚野から脊髄C7灰白質への軸索分布様式にどのような違いがあるのか、（2）体性感覚野からの脊髄内軸索分布と、皮膚からの一次求心性線維の分布領域にどのような関係性があるのか、を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の計画・方法

（1）運動野・体性感覚野からの脊髄内軸索分布の解析

- ①感染細胞にチャネルロドプシン2（ChR2）-EYFPを発現させるアデノ随伴ウイルス（AAV）をマウス大脳新皮質の特定の部位に局所注入し、そこに存在するCSTニューロンにChR2-EYFPを発現させる。
- ②AAV注入2週後、マウスを灌流固定し、大脳新皮質・脊髄の切片を作製する。その後抗GFP抗体（EYFPも認識する）を用いてChR2-EYFP発現細胞体・軸索を検出し、正確な注入部位の同定と脊髄C7灰白質内での軸索分布領域の解析を行う。

（2）体性感覚野からの脊髄内軸索分布と、皮膚からの一次求心性線維の分布領域の解析

- ①感染細胞にChR2-EYFPを発現させるAAVをS1内の特定の部位に局所注入し、そこに存在するCSTニューロンにChR2-EYFPを発現させる。
- ②AAV注入8日後、マウスの特定の体部位の皮膚内にコレラ毒素Bサブユニット（CTB）を注入し、皮膚からの一次求心性線維を標識する。
- ③CTB注入6日後、マウスを灌流固定し、脊髄の切片を作製する。その後、抗GFP抗体・抗CTB抗体を用いてChR2-EYFP発現軸索とCTB標識一次求心性線維を検出し、それらの脊髄C7灰白質内分布の関係性を解析する。

3. 研究の特色

CSTニューロンの主要な機能は随意運動指令の出力であり、その機能を担うCSTニューロンは主としてM1に存在すると理解されてきた。随意運動の実行は日々の生活に非常に重要であり、M1のCSTニューロンに関する研究はさかんに行われてきたが、その他の領野の機能に重点を置いた研究報告はほとんどない。本研究ではまさにその未知機能解明をめざし、新たな研究分野を開拓しようとするものである。また、錐体路障害では随意運動の実行が困難になることが知られているが、その他のCSTニューロンの機能も失われているはずである。本研究で得られた成果は、今まで見過ごされてきた病態側面の理解、その機能の回復法（リハビリテーション）の発展につながることで期待される。

4. 研究の成果

（1）運動野・体性感覚野からの脊髄内軸索分布の解析

CSTニューロンの脊髄内軸索分布を調べるためには、その軸索を可視化させる必要がある。そのために、感染細胞内でChR2-EYFPを発現させるAAVをマウスの各新皮質領域に微量注入した（図1）。注入部位はC7灰白質に軸索投射する新皮質領域を網羅するように選んだ（図1A）。注入2週後、マウスの脊髄を薄切し、抗GFP抗体で可視化して軸索分布を観察したところ、M1からの軸索は主に灰白質の中間帯・腹側に、S1前方部（S1r）は背内側に、S1後方部（S1c）は背外側に分布することがわかった（図2A-C）。興味深いことに、これらの分布領域はほとんど重複しなかった（図2D）。加えて、M2からの軸索はM1からのそれと同様に中間帯・腹側に、S2からは背側に分布することもわかった（図2E,F）。このような軸索分布様式の多様性は、それぞれの皮質脊髄路ニューロンが担う機能の多様性を反映しているものと考えられる。

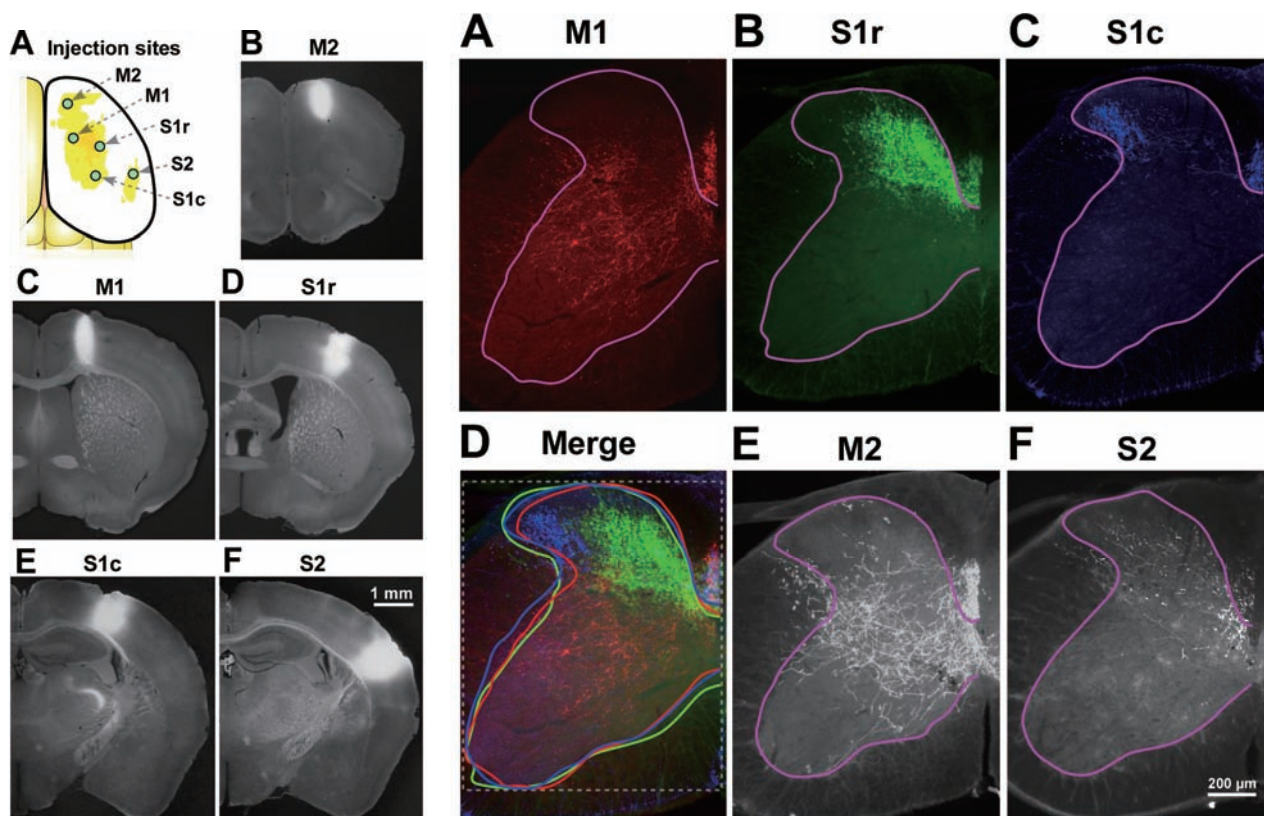


図1. 新皮質へのAAV注入。C7灰白質へ投射する新皮質領域（A内のヒートマップ）を広く網羅するように注入部位を選択した。

図2. C7灰白質における各新皮質領域からの軸索分布の様子。

（2）体性感覚野からの脊髄内軸索分布と、皮膚からの一次求心性線維の分布領域の解析

上述のように、S1rからの軸索はC7灰白質の背内側に、S1cは背外側に分布することがわかった。PaxinosとFranklinのmouse brain atlasによると、S1rとS1cはそれぞれ上肢と体幹からの感覚情報を処理する新皮質領域にあたる。また、脊髄灰白質の背側は体部位からの一次求心性線維の投射を受ける場所でもある。これらのことから本研究では次に、上肢と体幹皮膚からの一次求心性線維がC7灰白質に分布するのを検証した。異なる蛍光物質の付加されたCTBをマウスの手背と背中へ皮内注入し（図3A）、注入6日後にマウスの脊髄を薄切・観察したところ、どちら由来の一次求心性線維もC7灰白質の背側に分布することがわかった（図3B）。さらに、手背からの線維は背中からの線維に比べてより内側に分布することもわかった（図3B）。次に、S1rからの軸索と手

背からの一次求心性線維の分布領域の関係を明確にさせるために、同一個体で両方の線維を可視化させたところ、それらの分布領域が重なることがわかった（図3C）。同様の解析をS1cと背中でも行ったところ、やはり分布領域が重なった（図3D）。これらの結果から、体部位ごとに皮膚由来の上行性の情報と新皮質由来の下行性の情報が集約される区画が脊髄灰白質背側部に存在することが示唆された。今後、脊髄灰白質背側部の細胞がこれらの情報をどのように処理するのかを解析することにより、体性感覚野からの情報の意義を明らかにしていく。

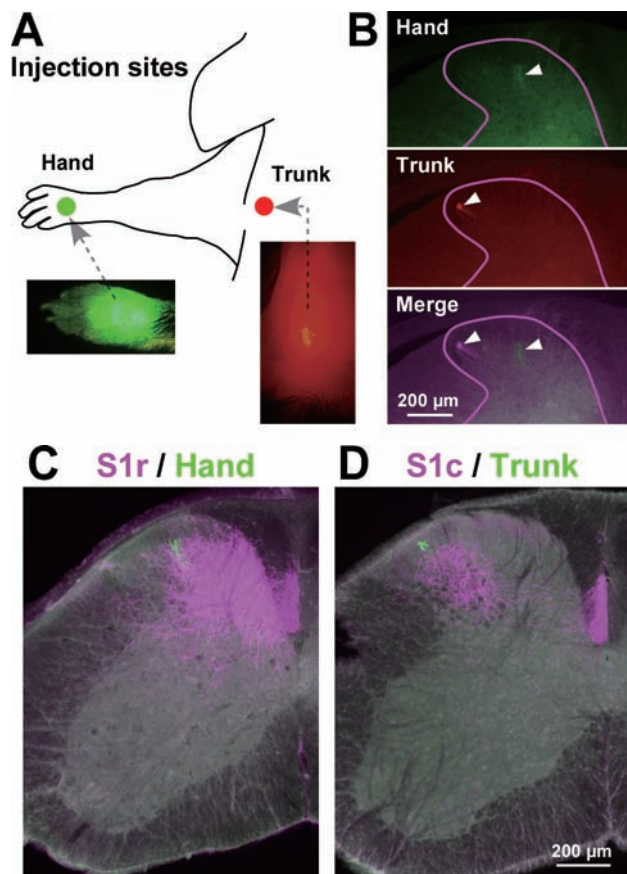


図3. 皮膚からの一次求心性線維のC7灰白質内分布と、体性感覚野からの軸索分布の関係性。

末梢への刺激は脳皮質興奮性を制御するか？ －皮質興奮性抑制機序の解明と臨床応用の検討－

東海大学 基盤工学部医療福祉工学科 佐藤 綾

1. 研究の目的

本研究は、末梢に対する刺激が、脳の第一運動野の皮質興奮性に与える影響を調査するとともに、磁気刺激のリハビリテーションへの新たな応用の可能性を見出すことを目的とする。

経頭蓋磁気刺激（TMS: Transcranial magnetic stimulation）は、被験者に苦痛を与えることなく、脳深部まで刺激ができる刺激法として開発された。先行研究において、TMSによる運動皮質の皮質興奮性の抑制機構は、TMSに誘発された脳の神経活動により生じる筋肉の興奮情報が、脳へフィードバックすることで生じる可能性があると考えられている。しかしながら、運動皮質の皮質興奮性の抑制機構と神経活動のフィードバックの関連性については明らかにされていない。運動皮質の皮質興奮性の抑制機構は、脳皮質を制御するために重要な役割を担う機能であり、そのメカニズムの解明は、脳神経・精神疾患の治療や症状軽減、リハビリテーションへの新たな応用につながると考えられる。このメカニズムについて、申請者のこれまでの研究を更に進展させるため、末梢神経・筋に対する刺激方法や刺激の周波数・強度などのパラメータを変更させ、運動皮質の皮質興奮性の影響を詳細に調査する。この研究は、末梢に対する刺激が運動皮質の皮質興奮性に与える影響の有効性を明らかにし、脳皮質の皮質興奮性の抑制のメカニズムの解明に近づけたいと考える。さらに、運動機能障害の治療およびリハビリテーションへの応用の可能性を検討する。

2. 研究の計画・方法

本研究は、TMSにより誘発される運動誘発電位（MEP: Motor evoked potentials）の振幅により、運動皮質の皮質興奮性の変化を捉える。末梢に対する刺激（末梢刺激）の刺激方法（磁気刺激および）刺激強度、刺激周波数を変更させることにより、脳運動皮質の皮質興奮性の抑制機構が発動する刺激方法や筋興奮の大きさ、それに伴う刺激強度、刺激周波数などについて検証する。実験工程を図1に示す。

被験者は健康な成人とし、インフォームドコンセント後に実験を実施する。実験は、3工程で構成される。まず、第1工程として、末梢刺激による運動皮質の皮質興奮性の影響を評価するため、左大脳半球の一次運動野に対してTMSを施行し、その際に誘発される右第一背側骨間筋のMEPを計測する。磁気刺激装置はMagstim社製 Super Rapid Stimulatorを用い、磁気刺激コイルは8の字コイルを使用する。TMSの刺激強度は、脳に磁気刺激の影響を与えないとされる静止運動閾値の105%、周波数は0.1Hzとする。TMSにより誘発されるMEPは、振幅が50 μ V peak-to-peakを超える10回の波形を評価の対象とする。第2工程では、磁気刺激（1Hz/100回、10Hz/500回）または電気

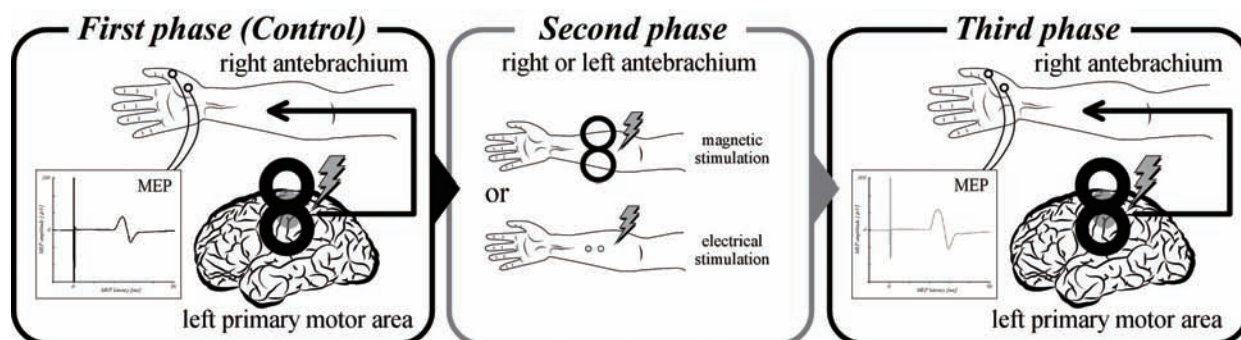


図1. 実験工程

刺激（1Hz/100sec、10Hz/50sec）を利用し、末梢刺激を実施する。末梢刺激の刺激部位は、左または右前腕とし、刺激強度は、各被験者の中指が振れる程度とする。第3工程では、第1工程と同様に、一次運動野に対してTMSを実施し、その際に誘発されるMEPを計測する。これらの実験工程は末梢刺激ごとに実施する。大脳運動皮質の皮質興奮性に対する評価は、末梢刺激前後で計測されたMEPの振幅（第1工程と第3工程）を比較することで検証する。

3. 研究の特色

TMSにより運動皮質の皮質興奮性の変化を捉える研究は、開発当時から盛んに実施されており、近年では運動機能回復に利用されている。先行研究では、運動皮質に対する高頻度のTMSは、皮質興奮性の促進、低頻度TMSでは抑制が生じると報告されている。しかし、その効果のメカニズムに関しては、未だに統一した見解が得られていない。近年、TMSの効果を利用した大脳皮質興奮性の制御が注目されている。脳卒中後の運動機能回復には脳の両側のバランス改善が必要であると考えられており、TMSの効果と運動機能回復訓練を組み合わせたりハビリテーションが試みられている。しかしながら、TMSを施行できる患者は限定される。さらに、大脳皮質興奮性の制御において、抑制機構のメカニズムの解明が重要となるが、抑制機構に関する報告はほとんどなされていない。そこで申請者は、運動皮質における皮質興奮性の抑制機構に着目し、末梢に対する刺激により求心性神経の興奮を誘発することで、大脳皮質興奮性の制御を実現することを提案する。

4. 研究の成果

本研究は、末梢に対する刺激（末梢刺激）の刺激方法と刺激部位、刺激周波数を変更することにより生じる運動皮質の皮質興奮性の変化を捉えることを目的とした。研究の結果、左運動皮質の対側前腕に対する1 Hzの末梢刺激（電気刺激および磁気刺激）では、末梢刺激後のMEP振幅は、末梢刺激前と比較して減少を示した。すなわち、1Hzの末梢刺激により運動皮質の皮質興奮性が抑制したと考えられる。対称的に、左運動皮質の同側前腕に対する1Hzの末梢刺激では、末梢刺激後のMEP振幅は増大を示し、運動皮質の皮質興奮性が促進したと考えられる。MEP振幅の増大は、対側または同側前腕に対する10Hzの末梢刺激においても確認された。以上の結果から、本研究では、前腕に対する末梢刺激により、運動皮質の皮質興奮性の制御の可能性を示す成果を得た。

以下の学会（1）、（2）において、本研究の成果発表を行った。さらに、申請者は本研究の成果の一部を学位論文として発表した（学位取得日：2017年4月30日付、九州大学大学院システム生命科学府）。

（1）6th International Conference on the Development of Biomedical Engineering（平成28年7月）

（2）38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society（平成28年8月）

牛白血病ウイルス感染牛はなぜ増え続けるのか — 遺伝子配列解析による感染経路の解明 —

東京農業大学 農学部 小林 朋子

1. 研究の目的

牛白血病ウイルス(Bovine Leukemia Virus:BLV)は、届出伝染病である地方病性牛白血病の原因ウイルスである。BLV感染牛の大部分は無症状で経過するが、数年の潜伏期間を経て約5%が発症し、悪性リンパ肉腫、消瘦、乳量減少、下痢などの症状を示す。牛白血病の発症牛は、と畜場において法律に基づき全廃棄処分となることから、畜産農家にとって経済的損失が極めて大きい疾病である。BLVの主な感染経路は、吸血昆虫の吸血や除角、直腸検査などにより感染する水平伝播と母乳や胎盤を介して感染する垂直伝播が知られている。日本国内におけるBLVの抗体検査は1980年に初めて行われ、全国的に1%未満の抗体保有率であった。その後、動物衛生研究所が行った2010年の全国調査では約35%の抗体保有率であり、BLV感染率は増加の一途をたどっている。BLVに一度感染すると、生涯ウイルスを持ち続け、無症状のまま新たな感染源となる。また、感染や発症を防ぐワクチンや治療法も実用化されていない。そのため、BLV対策としては、新たにBLVが感染することを防ぐとともに、感染牛を非感染牛に更新していくことが重要である。これまでに、農場内でのBLV感染拡大リスク要因として、放牧場における吸血昆虫の存在や、出血を伴う処置の際の不衛生な管理が挙げられている。一方、農場間の感染拡大においては、BLV感染牛が非感染農場に導入されることが主要なリスク要因となることが報告されている。本研究では、神奈川県A市をモデルとし、感染牛の保有するBLVの遺伝子配列の解析により、農場間におけるBLV流行動態の解析を目指した。

2. 研究の計画・方法

神奈川県A市において、家畜伝染病予防法第5条に基づく牛のブルセラ病等の検査の際、管轄する家畜保健衛生所の協力により、BLV検査に同意の得られた農家（27戸）において飼養されている乳牛、全頭のEDTA血を採取した。定期検査の残血清を用いて、ELISAによる抗BLV抗体検査を行い、抗体陽性牛が10頭以上存在する農家（15戸）について、抗体陽性の牛から乱数表を用いて配列解析検体を抽出し、血球中のBLVプロウイルスのenvSU領域（913bp）について、PCRによる増幅とダイレクトシーケンス法による配列決定を行った。配列決定した222配列に加えNCBIのデータベースに登録されているBLVenv遺伝子配列（日本国内27配列、国外29配列）を用いて、ベイズアン・マルコフ鎖モンテカルロ（MCMC）法によって時系列系統解析を行った。次に、得られた配列情報を用いて、Network5.0.によるmedian-joining(MJ)network algorithmによる感染ネットワーク解析を行った。さらに、同じく222配列を用いてMEGA7を用いた農場内での配列多様性解析を行った。また、抗体調査を行った全頭の牛について、個体識別番号情報から過去の移動歴と、最終移動後の農家における滞在時間を独立行政法人家畜改良センターのホームページから検索した。

3. 研究の特色

従来の抗体検査や遺伝子検査では一時点のBLVの感染率しか取得できる情報はなかった。そのためBLVの流行動態の把握は難しく、また、実際の農場において、具体的に「どこから」「どの程度」BLVの侵入があり、「どのように」感染を広めているのか、BLVの感染動態は明らかになっていない。本研究では、実際にBLVに汚染されている農場において流行しているウイルスの配列を分子疫学・分子系統学的に解析することにより、BLVの感染ネットワークを明らかにした。

4. 研究の成果

抗体調査を行った農家27戸の牛871頭のうち、抗BLV抗体陽性牛は409頭（46.9%）であった。抗体陽性牛が10頭以上存在する農家のうち、PCRによるBLVenv配列の増幅が難しい検体が多数含まれていた農家1戸を除いた14戸において飼養されている抗体陽性牛222頭の血液からDNAを抽出し、58種類のBLVenv配列が得られた。時系列系統解析により、神奈川県A市14農場から得られた222のBLVenv配列は、221配列が遺伝子型1型および残りの1配列が遺伝子型3型であった。また、神奈川県A市の乳用牛とNCBIのデータベースに登録されている九州の肉用牛は相同配列および近縁クラスターに属するBLVに感染していた。さらに、国内の遺伝子型1型の最も古い共通祖先配列が1970年ごろに存在していた。神奈川県A市のBLVが属するクラスターの分岐年代は2003年付近であり、そこを起点に多くの配列に分岐していた。Network5.0.によるmedian-joining(MJ)network algorithmの結果、同じ配列を持つ牛のクラスターのうち、10頭以上の感染牛を含むクラスターは4つあり、ほぼ全て同一の農場由来の感染牛が占めるクラスターと、多数の農場の牛が占めるクラスターが存在していた。また、MEGA7を用いた多様性解析の結果、各農場におけるBLVenv配列の多様性は、各農場の牛の平均移動回数と正の相関があり、最終移動農場での飼養期間と負の相関があることが明らかとなった。具体的には「自家産・自家育成」の農家の感染牛は同じ配列のBLVもしくは近縁配列のBLVに感染しており、逆に、牛を外部農場から入れる「導入」や「預託」を行う農場の感染牛は異なる配列のBLVに感染していることが多かった。これらの結果より、①飼養牛の移動回数が多い農家ほど、牛群へのBLVの侵入が何度も起きている、②いったん農場内に持ち込まれたBLVは、水平感染、あるいは垂直感染により大きく広がっている、ことが示唆された。こうした感染動態の把握は、感染牛のBLV遺伝子配列を大規模に解析したことにより初めて明らかとなり、将来的にBLV感染拡大への対策に有用な情報となると考えられる。本研究成果をまとめた平成28年度日本獣医疫学会における口頭発表は、優秀学会発表賞を受賞した。

新規アイソトポマーによるサンゴ礁の 高精度降水量復元手法の開発 — 高感度レーザー方式同位体比分光法での打開 —

東邦大学 理学部 嶋 康輝

1. 研究の目的

近年の気温上昇は降水量を変化させて、社会・経済活動に大きな影響を与える可能性があるため、地域ごとの降水量変化を予測することは非常に重要である。しかしながら、未だ信頼性の高い地域ごとの降水量予測モデルは確立していない。その原因の1つは、降水量変化の予測に必要な物理モデルの妥当性を評価するための、実測の降水量情報が地域ごとに不足しているためである。この問題を解消するため、炭酸塩骨格(CaCO_3)で年輪を形成する造礁性サンゴ骨格が有用である。 CaCO_3 の酸素安定同位体比($\delta^{18}\text{O}$)は、 CaCO_3 が生成する時の海水温と水の酸素同位体比にコントロールされ、水の酸素同位体比は降水量と相関する。つまり、サンゴ骨格 CaCO_3 の $\delta^{18}\text{O}$ と、精度の高い海水温情報があれば、過去の降水量を高精度で復元できる。なお、 CaCO_3 の $\delta^{18}\text{O}$ はサンゴ骨格を酸で反応させた時に発生する二酸化炭素のアイソトポマーで定量化する。高精度海水温復元方法として、申請者は二酸化炭素の新規アイソトポマーである $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ （質量数47）の $[\Delta 47]$ 計測に着目した。 $\Delta 47$ は理論的には海水温だけに依存する。しかしながら、質量47は $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ 以外の分子種を含むため、既存の装置で $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ だけを純粋に抽出し、議論することが困難であった。

本研究は、 $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ だけを計測できる新規に開発されつつある高感度レーザー方式同位体比分光法を用いて、サンゴ骨格の $\Delta 47$ と $\delta^{18}\text{O}$ を計測して、実際の降水量と比較し、高精度の降水量復元手法確立を目指すことを目的とした。

2. 研究の計画・方法

本研究では、下記の3つの手順によって、サンゴ骨格中の $\delta^{18}\text{O}$ と $\Delta 47$ から過去の降水量を復元する手法を開発することを目指し、以下の研究計画と方法を立案した。

(1) 研究試料の収集:

- ① 自然環境下で成長している塊状サンゴから直径約8cmの円柱状試料（サンゴコア）を採取する。サンゴ骨格は、数年程度の成長部位に相当する粉末試料と、季節時間分解能（約1–2mm/試料）で10年程度の成長部位（約10cm）の粉末試料を用意する。
- ② 幼生サンゴの水温・塩分をコントロールして飼育した試料を用いる。骨格の $\Delta 47$ 計測は、1測定で約0.1mgの試料量を必要とする。3回繰り返し計測を行うために、0.3mgの試料を用意する。

(2) 化学計測:

(1)で用意した試料の $\delta^{18}\text{O}$ と $\Delta 47$ を測定する。なお、 $\Delta 47$ 計測の前段階として、 Sr/Ca （従来の海水温指標）を計測する。

(3) 高精度の降水量復元指標の検証:

$\Delta 47$ から復元した高精度海水温、 $\delta^{18}\text{O}$ と降水量（気象庁記録）を比較検討して、高精度の降水量復元指標の有用性を検証する。

3. 研究の特色

本研究の特色は、高い有用性が知られていながら高精度での定量化が困難であった二酸化炭素

のアイソトポマーである $\Delta 47$ に着目した点である。さらに、海水温が測定されている海域のサンゴ骨格中アイソトポマーを用いて高精度海水温計を確立したあと、降水量復元指標を開発することである。

4. 研究の成果

(1)

- ① 本年度は、当初琉球列島でサンゴコア採取を計画していたが、2016年に起きたサンゴの大規模白化のため、淡水流入がある海域でのサンゴコアを、パラオ共和国アイライで2016年3月に採取された12本の試料を利用した(図1)。
- ② 2016年5-6月に*Acropora*属サンゴのプラヌラ幼生を沖縄県瀬底島で採取した。その後、東京大学大気海洋研究所にて、15mLのプラスチック容器内でプラヌラ幼生の飼育実験を行った。プラヌラ幼生は、初めに神経ペプチドを添加して変態させ、プラスチック容器内で定着させた。定着後、26℃の恒温槽で2週間程度飼育してサンゴ幼生に骨格形成を促した。その結果、 $\Delta 47$ の計測に十分な試料量を採取できた。

(2)・(3)

サンゴコアの化学計測を行うため、最初に高知大学海洋コア総合研究センターに設置されているX線コンピューター断層撮影法(CT)スキャナーで骨格構造を解析した。その後、パラオで採取したサンゴコアの成長先端から6 cm程度の骨格成長部位の一部を、デンタルドリルで平均的に粉末化した。 $\delta^{18}\text{O}$ (海水温と塩分の指標)は国立研究開発法人海洋研究開発機構に設置されている安定同位体比質量分析計で、本年度までに1つのサンゴコアにつき最大3回の繰り返し計測を実施した。 $\Delta 47$ 計測前に必要なSr/Ca比は東京大学大気海洋研究所に設置されている誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)で、本年度までに1つのサンゴコアにつき1回の計測を実施した。

図2は $\delta^{18}\text{O}$ とSr/Caの全サンゴコア平均値から各サンゴコアの偏差を示す。またサンゴ骨格の $\delta^{18}\text{O}$ とSr/Ca比に基づいた復元海水温は、1ヶ月ごとの $\delta^{18}\text{O}$ -海水温の関係式である $-0.2\text{‰}/^{\circ}\text{C}$ (Juillet - Leclerc and Schmidt 2001)、1ヶ月ごとのSr/Ca-海水温の関係式である $-0.06\text{mmol/mol}/^{\circ}\text{C}$ (Corrège 2006)を採用した。

$\delta^{18}\text{O}$ はSite 1(最も河口に近い場所)で最も低い値(高水温/低塩分)であったが、Sr/Caは同様の結果ではなかった。サンゴ骨格の $\delta^{18}\text{O}$ は塩分と海水温の影響を受ける。河口では淡水流入に伴う塩分低下に伴い水の $\delta^{18}\text{O}$ が低下する。そのため、サンゴ骨格の $\delta^{18}\text{O}$ の低下は、塩分の影響を示唆している。一方で、各サンゴコア、各サンプリングサイトでの $\delta^{18}\text{O}$ とSr/Ca比は $\pm 1\text{--}2^{\circ}\text{C}$ 程度相当のバラツキが見られた。サンゴ骨格の化学・同位体比組成は、生物学的要因に影響を受けることが報告されている。本研究結果は、 $\Delta 47$ 計測前に各サンゴコアの生物学的要因に関して更に検討を要することを示唆する。

本年度までに、試料の選定とその用意が整った。現在、高感度レーザー方式同位体比分光法の開発が最終段階にある。引き続き、高精度の降水量復元手法確立に関する研究を進めていく。



図1 パラオ共和国でのサンゴコア試料採取場所

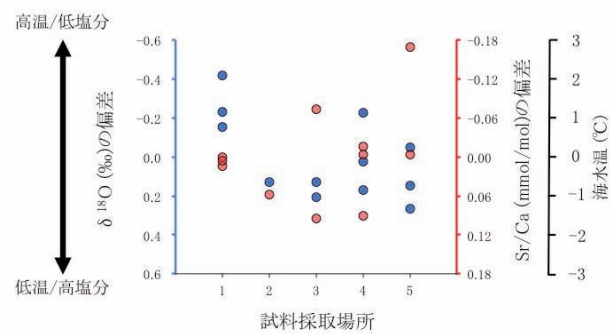


図2 サンゴコア上部6cm骨格成長部位の $\delta^{18}\text{O}$ と Sr/Ca比。値は、全サンゴコア平均値から各サンゴコア値の偏差と換算温度を示す。

血糖調節における翻訳調節因子YB-1の役割 —YB-1は糖尿病治療の標的となるか？—

日本大学 薬学部 田中 融

1. 研究の目的

グルコースなどの糖質は、Glucokinase (GCK)をはじめとする様々な酵素により代謝され、エネルギーを生み出したり、グリコーゲンとして蓄えられたりする。特に肝臓は糖代謝が盛んに行われる組織である。肝臓における糖の取り込みはインスリン依存性と非依存性の両方の経路を介して行われる。糖代謝に関わる酵素の発現は血糖値に応じて調節を受けるが、転写レベルでの解析は数多く行われているのに対し、翻訳レベルでの調節に関する研究はほとんど行われていない。

翻訳調節因子YB-1は組織ごとに異なる時期に発現し、細胞状態に応じて特異的なmRNAの翻訳を調節している。私はこれまでに、YB-1が成長期に多くその後急激に減少する脳や骨格筋で、それらの組織に特異的なmRNAの翻訳を神経活動に応じて調節していることを明らかにしてきた。一方、肝臓ではYB-1は生涯を通して高度に発現が続く。そこで、YB-1のターゲットmRNAを調べたところ、GCKをはじめとしてhexokinase 1 (HK1) やpyruvate kinase (PK)、GAPDHなどの糖代謝関連酵素のmRNAやインスリン受容体のmRNAが同定された。このことから、YB-1が翻訳を通じて血糖値の調節に関与していることが示唆された。本研究では、糖やインスリンなどの刺激に対する血糖値調節の新たなメカニズムの解明を目的として、糖代謝において同じ反応を触媒するGCKとHK1に注目して、糖濃度あるいはインスリン依存的なYB-1によるこれらのmRNAに対する翻訳調節機構の解析を行う。本研究で用いる遺伝子組換え体は平成25年3月27日に日本大学遺伝子組換え実験安全委員会により承認を得ている。マウスを用いた実験に関しては、平成26年9月29日日本大学実験動物委員会の承認を得ている。

2. 研究の計画・方法

まず、肝由来の培養細胞であるHepG2細胞に対して、YB-1発現プラスミドやYB-1特異的siRNAを用いて細胞内のYB-1量を変化させ、そのときのGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳活性を調べて、YB-1が実際にこれらのmRNAに対して翻訳調節を行うことを確かめる。また、糖やインスリンなどの刺激に応じてGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳が変化することを解析する。さらに、YB-1をノックダウンした細胞に対しても同様の刺激を加え、これらmRNAの翻訳活性への影響を調べる。刺激を与えた細胞から細胞質を抽出し、ショ糖勾配遠心を行いYB-1のpolysome結合性とGCK mRNA、HK1 mRNAに対するYB-1の結合比率を解析する。この時の糖の吸収、代謝効率についても解析する。培養細胞で翻訳に影響を与えた刺激をマウスに与えて、GCK、HK1の翻訳活性を解析するとともにYB-1のポリソーム結合性を解析する。さらに、糖尿病モデルマウスを用いてYB-1の発現量や刺激によるGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳活性の変化、YB-1のpolysome結合性の変化を調べる。

3. 研究の特色

本研究は、これまで注目を集めてこなかった翻訳調節による血糖値の調節について、翻訳調節因子YB-1と糖代謝律速酵素のGCKおよびHK1に着目し解析するものである。遺伝子の発現は転写と翻訳の両方のレベルで調節されているが、翻訳調節の方が転写調節よりも下流に位置し、外部からの刺激に対して速やかに応答することができる。糖は消化管から吸収され血中に速やかに移行するため、血糖値の過剰な上昇を防ぐためには短時間で応答しなければならない。そのような迅速な反応には、翻訳調節の寄与が大きいと考えられる。

血糖値はインスリンによる糖の細胞内への取り込みや代謝の促進を通して、厳密にコントロールされている。2型糖尿病はインスリンの分泌不足だけでなく、細胞応答の不調によるインスリン抵抗性の出現によっても起こっている。現在使用されている糖尿病治療薬は、前者に注目してイ

ンスリンの血中濃度を増加させることに重点を置いたものが大半を占めるのに対し、後者のインスリン抵抗性に対するものは少ないのが現状である。経口血糖降下薬は患者の病態に応じて、複数組み合わせた併用療法を行うケースが多く、インスリン抵抗性改善薬はインスリン分泌促進薬と相乗的に働くことが期待できる。このようなことからインスリン抵抗性改善薬の開発は今後さらに加速していくことが予想される。インスリン抵抗性は肥満によって引き起こされるが、未だ不明な点が多く、治療薬開発のためにその分子基盤を明らかにすることが喫緊の課題である。現在、開発段階にあるインスリン抵抗性改善薬は、代謝酵素や転写因子をターゲットにしたものがほとんどで、翻訳調節をターゲットにしたものはない。YB-1はGCKやHK1、PK、GAPDHなど、多くの糖代謝関連酵素のmRNAに相互作用していることから、YB-1の活性を調節することにより血糖値のコントロールが可能になると考えられる。本研究によって、血糖調節における翻訳調節の重要性およびインスリン抵抗性と翻訳調節の関連性が明らかになり、YB-1を分子標的とした新たな糖尿病治療薬の開発に貢献することが期待される。

4. 研究の成果

GCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳に対するYB-1の影響を調べるために、肝臓由来の培養細胞であるHepG2に、YB-1を過剰に発現させた場合とYB-1をノックダウンさせた場合のGCKおよびHK1のタンパク質の量とmRNA量の変化を解析した。YB-1を過剰に発現させた細胞では、興味深いことにGCKタンパク質の量は減少したのに対して、HK1タンパク質は増加していた。このとき、どちらのmRNAの量も大きな変化は見られなかった。反対にYB-1をノックダウンさせた場合にはGCKタンパク質の量が増加し、HK1タンパク質の量が減少していた。このときもどちらのmRNAについても大きな変化はなかった。このことは、YB-1による翻訳調節がGCK mRNAとHK1 mRNAに対して反対の影響を及ぼすことを示している。

次に、糖やインスリン刺激に応じてGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳活性に変化が起こることを調べた。まず糖刺激による変化を解析した。HepG2細胞にGlucoseの濃度を通常の10倍濃度である10 mg/mLで30分から6時間処理し、GCK mRNAおよびHK1 mRNAの翻訳活性を解析したが、ほとんど変化がみられなかった。Glucoseの濃度をさらに増やし20 mg/mLでも調べたが大きな変化はなかった。この結果から、YB-1によるこれらのmRNAの翻訳活性は糖濃度による影響を受けないことが示された。インスリンによる刺激を加えた場合では、興味深いことにHK1 mRNAの翻訳はやや減少傾向であったがほとんど変化しなかったのに対し、GCK mRNAの翻訳活性は処理1時間から増加するのが観察された。空腹時におけるGlucoseの6位のリン酸化は主にHK1によって行われているが、食後の血糖値が上昇した状態ではHK1の働きは抑制され、反対にGCKがこの反応を行うようになる。この現象は通常、糖代謝産物によるHK1のアロステリック阻害とGCKのGlucoseに対する親和性の低さによって説明されるが、この実験から得られた結果は、血糖値の上昇によるインスリン濃度の増加を介して、GCKの翻訳量を増加させることによって血糖値の調節が行われることを示唆している。YB-1によるGCK mRNAとHK1 mRNAの翻訳調節は反対の動きをすることから、HK1の翻訳活性はインスリンによって抑制されることが予想されるが、実際には大きな変化はなかった。これはHK1の半減期が長く、翻訳が抑制されても分解が進行しなかったためだと思われる。また、GCKはインスリン刺激によって転写レベルでも増加することが報告されているが、興味深いことに転写阻害剤を加えずにインスリン刺激を与えても、処理3時間後まではmRNAの増加を伴わずにGCKのタンパク質の増加が観察された。これはインスリン刺激後の短い時間では転写レベルの発現増強に先行して翻訳活性化が起こることを示しており、肝臓においても外部からの刺激に素早く応答するために翻訳調節が重要であることを示唆している。インスリンによるこのGCKの翻訳活性化は翻訳阻害剤であるcycloheximideによって抑制された。さらに、インスリン刺激を与えたときのYB-1のporisome結合性をショ糖勾配遠心によって調べた。YB-1を含むporisomeはインスリンによって高分子量側にシフトし、この高分子フラクションにおけるGCK mRNAの存在量の増加が観察された。この結果はインスリンによるGCKタンパク質の発現量の増加と相関している。また、このフラクションにおけるHK1 mRNAの量に大きな変化はなかった。

培養細胞を用いた以上の結果から、YB-1はインスリン刺激によってGCK mRNAの翻訳活性化を介して血糖値を調節していることが示唆された。本研究では当初計画していた動物を用いた解析まで進むことができなかったが、今後は動物を用いて実際の生体内においてもYB-1によるGCK mRNAの翻訳活性化がおこることを確認し、さらに糖尿病モデルマウスを用いてこの翻訳調節が糖尿病とどのように関わっているか解析を行う予定である。

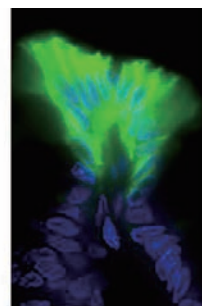
肥満誘発性便秘症における大腸アクアポリンの生理的意義の解明

星薬科大学 薬動学教室 講師 五十嵐信智

1. 研究の目的

近年、食生活の欧米化や社会環境の変化に伴い、肥満患者が増加の一途をたどっている。肥満の発症メカニズムについては、これまでに分子生物学的観点から様々なアプローチがなされており、その治療法の開発に向けて多くの新知見が見出され始めている。その一方で、肥満患者は種々の合併症を誘発することが知られており、その対策も重要な課題となっている。例えば、肥満患者は便秘症を併発するケースが多いことが報告されている。便秘症は直接生命にかかわる疾患ではないため、その治療は軽視されがちであるが、患者のQOLを考えると、発症機序に基づいた適切な対応を行うことが重要となる。これまで、肥満誘発性便秘症は腸管蠕動運動の低下により発症するものと考えられており、このような患者に対しては、瀉下剤を用いた対症療法が行われている。しかしながら、その治療効果は十分なものではなく、新たな治療法や予防法が切望されている。

このような中、近年、体内の水輸送において水チャネル「アクアポリン（AQP）」が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。ヒトにおいては、AQP0からAQP12までの13種類が同定されており、その発現や活性の変化により種々の疾患が誘発されることが報告されている。我々はこれまでに、便の水分量を最終的にコントロールしている大腸の粘膜上皮細胞にはAQP3が優位に発現していること（右図）、大腸のAQP3の発現や活性が低下すると下痢が誘発されることが報告されている。AQP3の発現が増加すると便秘が誘発されることを明らかにした。これらの結果から、大腸ではAQP3を介して水が管腔側から血管側へ輸送され、便が濃縮されることがわかった。本研究では、肥満誘発性便秘症の新たな治療法や予防法を見出すことを目的に、大腸のAQP3に焦点を当て、その発症メカニズムを解析した。



大腸におけるAQP3の発現分布
(Green; AQP3, Blue; Nuclei)

2. 研究の計画・方法

ラットにコントロール食（10%kcal脂肪含有）あるいは高脂肪食（60%kcal脂肪含有）を1週間あるいは3ヶ月間自由摂取させた。肥満の程度を確認後、排便状況および糞中水分量を調べた。また、大腸を摘出後、粘膜を採取し、AQP3のmRNA発現量およびタンパク質発現量をそれぞれリアルタイムRT-PCRおよびウェスタンブロッティングにより解析した。

3. 研究の特色

便秘症は直接生命にかかわる疾患ではないため、その治療については軽視されがちであるが、大腸癌や腸イレウスなどの原因になるばかりではなく、患者のQOLを著しく低下させることから、その緩和や治療は重要な課題である。本研究は、これまでほとんどわかっていなかった肥満誘発性便秘症の発症メカニズムについて、大腸の水輸送タンパク質であるAQP3に焦点を当て、解析したものである。本研究結果は、肥満誘発性便秘症におけるAQP3の生理的意義が言及できるばかりではなく、便秘症に対する新規治療戦略の研究基盤として重要な知見と考える。

4. 研究の成果

(1) 肥満誘発性便秘症モデルラットの作製

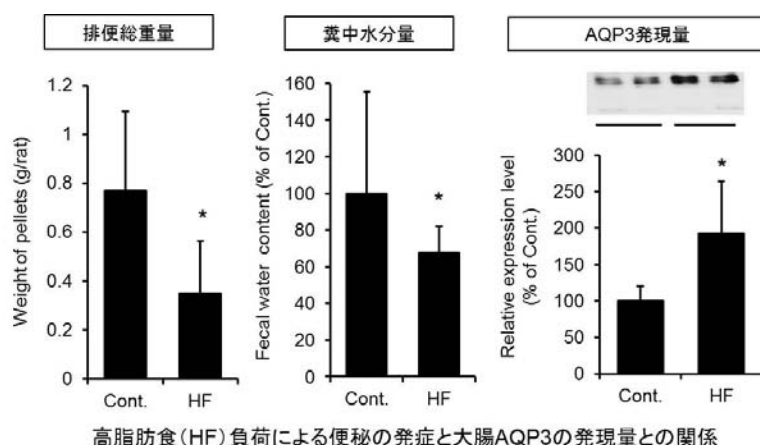
高脂肪食を3ヶ月与えたラットの体重および白色脂肪重量は、いずれもコントロール群と比べて有意に増加した。また、高脂肪食群の排便総重量および糞中水分量は、いずれもコントロール群と比べて有意に低下していた。

以上のことから、ヒトと同様に、高脂肪食を摂取して肥満が誘発された場合、便秘が発症することが確認できた。

(2) 肥満誘発性便秘症モデルラットにおける大腸AQP3の発現解析

高脂肪食を3ヶ月与え、肥満誘発性便秘症が認められたラットにおいて、大腸のAQP3の発現量を解析した。AQP3のmRNA発現量は、高脂肪食群ではコントロール群と比べて有意に増加していた。また、タンパク質発現量についても同様に、高脂肪食の3ヶ月摂取により、コントロール群と比べて約2倍有意に増加していた。

以上のことから、肥満誘発性便秘症発症時には、大腸のAQP3の発現量が増加し、大腸からの水の吸収が亢進し、便が硬くなり、その結果、便秘症が誘発された可能性が考えられた。



(3) 高脂肪食と大腸AQP3の発現増加との関係

ここまでの結果から、高脂肪食の摂取により肥満が誘発された際に、大腸のAQP3の発現量が増加し、便秘症が誘発されることがわかった。次に、このAQP3の発現増加が肥満によって生じたものであるのか、それとも高脂肪食そのものの直接的な影響によるものであるのかどうかを調べた。具体的には、高脂肪食を1週間与え、肥満が生じていないラットについて、大腸のAQP3の発現量を解析した。その結果、高脂肪食を1週間与えたラットでは、糞中水分量およびAQP3のタンパク質発現量は、いずれもコントロール群と比べて変化は認められなかった。

以上の結果から、高脂肪食を3ヶ月与えた際に認められたAQP3の発現増加は、高脂肪食そのものの影響ではない可能性が示唆された。

本研究の結果から、高脂肪食を長期間摂取し、肥満を呈した場合には、大腸におけるAQP3の発現量が増加し、これに伴って大腸での水の吸収が亢進し、便秘症が誘発される可能性が考えられた。また、高脂肪食を与えた際の便秘および大腸におけるAQP3のタンパク質発現量の増加は、高脂肪食による直接的な影響によるものではなく、肥満に起因した変化である可能性が示唆された。肥満時には、様々な生体内成分が大きく変化していることが知られている。今後、大腸AQP3の発現を増加させた成分やその増加メカニズムを明らかにすることにより、AQP3をターゲットとした肥満誘発性便秘症に対する新たな治療法や予防法の提案が可能となるであろう。

視床下部室傍核オキシトシンニューロンのシナプス可塑性と摂食・エネルギー代謝調節

自治医科大学 医学部 生理学講座 須山成朝

1. 研究の目的

シナプス可塑性、すなわちシナプス伝達の可逆的な調節は、外界からの入力に応じて最適な神経回路網を取捨選択・強化するための基礎過程である。視床下部の摂食・満腹中枢の神経回路網は全身の栄養・代謝状態によりダイナミックに変動し、司令を発して摂食・エネルギー代謝を調節する。この変動においてもシナプスの可塑的変化が報告されているが、現象の観察に留まり、機序は未解明である。

光遺伝学を含む最近の研究から、一次中枢→Oxytocin ニューロンの神経伝達が、摂食調節の中核の回路であることが明らかにされた (Atasoy et al., Nature 2012)。申請者は24時間絶食したラットにおいて、満腹を司る室傍核 Oxytocin ニューロンへの興奮性シナプス伝達の減弱を発見し、その機序として、NMDA 型グルタミン酸受容体（シナプス伝達増強の引き金）の減少を伴うAMPA型グルタミン酸受容体の減少を報告した(図1) (Suyama et al., Neuropeptides 2015)。室傍核は摂食抑制を司令する中枢であり、その中でOxytocinが中心的役割を担うことが申請者 (Maejima, Suyama et al., Cell Metabolism 2009) および内外の研究 (Takayanagi et al., 2009) により明らかにされている。

本研究は、＜摂食・代謝状態→OxytocinニューロンNMDA 型受容体調節→Oxytocinニューロンシナプス可塑性→摂食行動・エネルギー代謝調節＞の仮説を立て、これを検証することを目的とした。具体的に、①絶食で増加する摂食関連シグナルからNMDA 受容体変動を誘導するシグナルを同定し、細胞内シグナル伝達機構の解析を行った。②絶食-再摂食によるOxytocinニューロンのシナプス可塑性変化の回復過程を経時的に検討した。

2. 研究の計画・方法

8週齢雄性Oxytocin-mRFP transgenic rat (オキシトシン産生細胞で赤色蛍光タンパク質を発現するラット) から室傍核を含む急性脳スライスを作製し、Voltage clamp下で蛍光陽性細胞の興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) の測定を行い、興奮性シナプス伝達の強度を評価した。

(1) 室傍核オキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱を誘導する摂食関連因子の同定

①絶食で増加する摂食関連因子として、摂食亢進ペプチドであるNeuropeptide Y (NPY) 10^{-8} Mを急性脳スライスに3時間以上暴露し、miniature EPSC, AMPA/NMDA電流比を測定した。間接的な効果を避けるため、tetrodotoxinを添加し、活動電位の発生を阻害した。

②NPYの下流の細胞内シグナル伝達を薬理的に調節し、miniature EPSCを測定した。

(2) 絶食-再摂食によるOxytocinニューロンのシナプス可塑性変化の回復過程と摂食量

①24時間絶食後、1日摂食量を1週間測定した。

②24時間絶食後、再摂食させたラットのminiature EPSCを、再摂食後24, 72時間、1週間後に測定した。

3. 研究の特色

(1) 本研究は、この重要なOxytocin ニューロンの空腹/満腹に応じたシナプス可塑的調節、それを介した摂食調節機構の解明を、世界に先駆けて行うもので、独創的である。

(2) 「環境変化に応じて複数の回路網からどの回路を選択・強化し、情報伝達が行われるか」を担うのはシナプス可塑性である。本申請は摂食・代謝調節の中核を担う Oxytocin ニューロンのシナプス可塑性調節機序を明らかにし、当該分野の発展の先駆けとなることが期待される。

- (3) Oxytocin ニューロンのシナプス可塑性機序の解明は、**過食・肥満の是正**に繋がると期待できる。

4. 研究の成果

- (1) 室傍核オキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱を誘導する**摂食関連因子**の同定
- ① NPY添加によりminiature EPSCの振幅は顕著に減弱し、AMPA/NMDA電流比は有意な増加を示した。Miniature EPSCの振幅はAMPA電流を反映すると考えられるため、AMPA/NMDA比の増加は、NMDA電流の減少を示唆した。
- ② 細胞内シグナル伝達系の探索のため、IBMX（phosphodiesterase阻害剤）を添加し、cAMP濃度上昇を誘導し、NPYによるminiature EPSCへの作用を検討した。NPY添加によるminiature EPSC振幅減弱作用は、NPY+IBMX添加により消失した。

NPY添加によるAMPA電流、NMDA電流の減少は、先行研究における絶食によるAMPA電流、NMDA電流の減少と一致する。また、NPYはcAMP減少を介して、NMDA受容体、AMPA受容体の低下を誘導することが示唆された。以上から、絶食によるオキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱の機序として、＜絶食→NPY上昇→cAMP減少→NMDA受容体由来Ca流入の減少→AMPA受容体低下＞が示唆された。

- (2) **絶食-再摂食によるOxytocinニューロンのシナプス可塑性変化の回復過程と摂食量**
- ① 24時間絶食-再摂食群の摂食量は、再摂食後3日目まで有意な増加を示し、1週間後には自由摂食群と同程度に回復した。
- ② 24時間絶食-再摂食群のminiature EPSCの振幅は、再摂食後3日目まで有意な減少を示し、1週間後には自由摂食群と同程度に回復した。

絶食-再摂食による過食とオキシトシンニューロンの興奮性シナプス伝達減弱は相関を示した。オキシトシンニューロンの活性化は摂食抑制を示すことから、興奮性シナプス伝達減弱による神経活動の抑制が過食の原因である可能性が考えられる。今後、絶食によるシナプス伝達減弱からの回復機序を明らかにし、絶食後のリバウンド過食への介入し、肥満是正の端緒となることが期待できる。

低次元有機導体の超伝導状態とバンド構造の関係

神奈川大学 工学部 相澤 啓仁

1. 研究の目的

超伝導体の多くはスピン一重項超伝導と呼ばれる状態に分類され、反平行スピンの電子が重心運動量ゼロのクーパー対を形成することで発現する。近年、本研究で注目する低次元有機導体 $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ では、平行スピンを持った電子対によるスピン三重項超伝導やクーパー対の重心運動量が有限となる Fulde-Ferrell-Larkin-Ovchinnikov (FFLO) 超伝導などの可能性が報告されている。このような超伝導状態が報告されている物質は数種類しかなく、その発現機構の解明は物性物理学の重要な課題のひとつである。

この物質群の特徴のひとつは擬一次元的な電気伝導性にある。これを反映して、電子のバンド構造は擬一次元的になり、物性に重要な寄与をするフェルミ面の形状が非連結なものとなる。もうひとつの特徴として、圧力-温度相図上で超伝導相が磁性相と隣接していることが挙げられる。磁性状態は電子相関効果と密接に関係することから、対象物質の超伝導状態を理解するためには電子相関も重要と考えられている。これらを背景として、本研究では、低次元有機導体 $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ の超伝導状態に注目し、電子相関を考慮した計算により、その発現機構とバンド構造の関係を解明する。

2. 研究の計画・方法

本研究の計画・方法の概略図を図1に示す。まず、対象物質の第一原理計算を行い、電子のバンド構造を決定した。その後、TMTSF分子上の最局在ワニエ軌道を計算し、一電子有効モデルを導出した。得られたモデルに電子間相互作用を考慮し、電子相関に起因する超伝導状態を解析した。これにより、対象物質の超伝導状態に対するバンド構造の影響を明らかにする。

- (1) 第一原理計算を用いて、対象物質における電子のバンド構造を求めた[図1(a)]。この際、異なる計算法(WIEN2kとPWscf)を適用し、結果の妥当性を確認した。
- (2) 第一原理計算の結果を踏まえ、TMTSF分子上の最局在ワニエ軌道をwannier90により求めた[図1(b)]。これにより、対象物質の有効モデルを非経験的計算により導出した。
- (3) 第一原理計算で考慮されていない電子間クーロン相互作用を有効モデルに導入した。これにより生じる電子相関効果を二粒子自己無撞着(Two-Particle Self-Consistent, TPSC)法で取り扱い[図1(c)]、磁気的性質と超伝導状態の関係を解析した。
- (4) 有効モデルの中で超伝導状態に強く影響する値を変数として扱い、バンド構造と超伝導状態の関係を解析した。

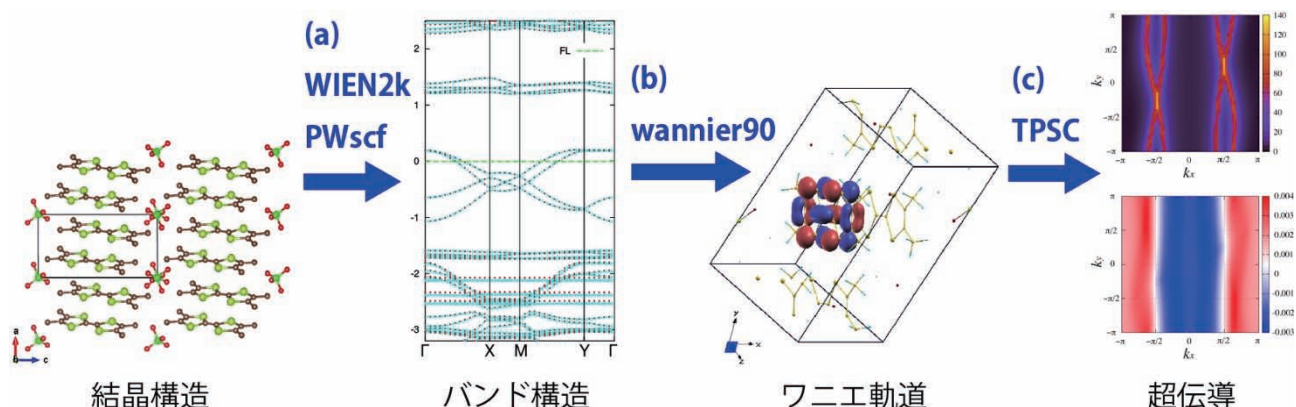


図1：本研究の計画・方法の概略図。

3. 研究の特色

無機物に比べて有機導体は多くの原子で構成されるため、第一原理計算は困難であった。しかし、近年の計算技術の発達により、第一原理計算を用いた有機導体の研究が世界的に活発化しつつある。本研究の特色のひとつは、それに加えて、最局在ワニエ軌道により有効模型を導出したことである。これにより、対象物質のバンド構造と有効模型を非経験的計算により定めることができた。電子相関の計算にTPSC法を用いた点も特色であり、このような複雑な有効模型での研究は少ない。本研究で見積もられた超伝導転移温度は、先行研究の測定値と近い値で得られた。微視的理論の結果が測定値と同程度になるかは自明ではなく、本研究の手法が対象物質とその現象を適切に扱っているものと予想される。この手法は他の物質でも適用可能なため、今後、様々な物質研究への適用が期待される。

4. 研究の成果

- (1) 第一原理計算で得られた有機導体 $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ のバンド構造は図2(a)である。ただし、フェルミ準位を基準として表示されている。WIEN2kとPWscfの結果はフェルミ準位から離れたエネルギー領域でもよく一致しており、妥当な計算結果が得られていると考えられる。フェルミ準位近傍の実線は、最局在ワニエ軌道から導出された有効模型のバンド構造である。図2(a)から、有効模型を用いて求めたバンド構造がフェルミ準位近傍の第一原理バンド構造をよく再現することがわかる。図2(b)に示す第一原理計算で得られたフェルミ面の結果から、左右のフェルミ面がそれぞれ接触することがわかった。対象物質の初期のバンド計算では、これらのフェルミ面は離れており、今回の結果とは異なるものである。本研究で非経験的に導出された有効模型から、このような差異がTMTSF分子のエネルギー差の大きさに起因することがわかった。
- (2) 得られた有効模型にTMTSF分子上で作用する近距離の電子間クーロン斥力相互作用を導入し、電子相関効果をTPSC法で取り扱った。超伝導の発現機構として、磁気ゆらぎ媒介機構を仮定し、超伝導状態を解析した。図3は超伝導状態と磁気ゆらぎの強さの温度依存性である。通常、これらの値は低温化により増加し、1に到達する温度で超伝導や磁気秩序へ転移する。低温化にともない、磁気ゆらぎの発達は徐々に抑制される一方、超伝導状態は発達し続けることがわかった。温度依存性を外挿することで、超伝導転移温度は約 $1.6 \times 10^{-4} \text{ eV}$ (約2K) と見積もられ

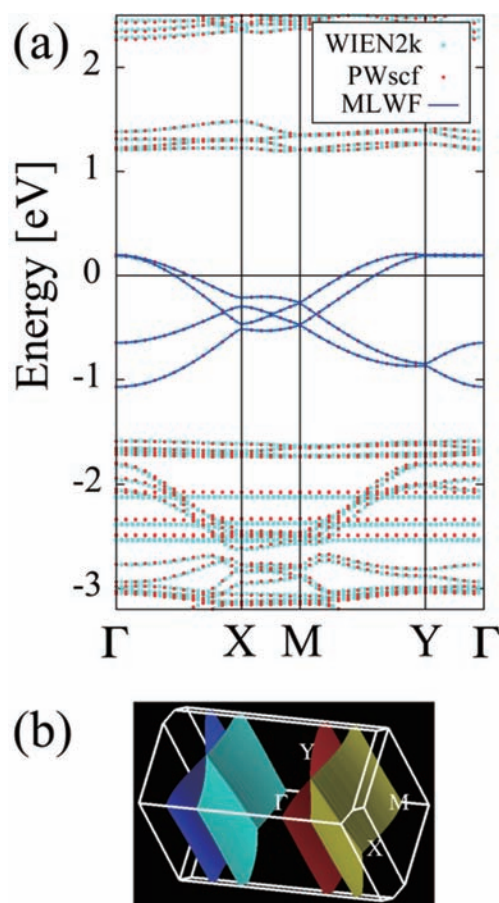


図 2 : (a) 第一原理計算によるバンド構造（点線）と最局在ワニエ軌道から導出された有効模型のバンド構造（実線）、(b) フェルミ面。

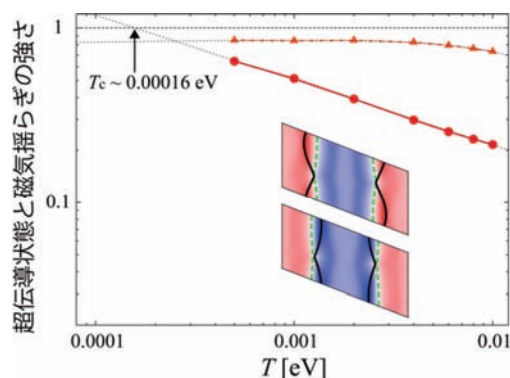


図 3 : 超伝導状態と磁気ゆらぎの強さの温度依存性。挿入図は各フェルミ面の超伝導ギャップ関数。

た。現実の物質の超伝導転移温度が約1Kであることから、本研究の手法は妥当な結果を与えていると考えられる。

- (3) 最近行われた超伝導ギャップの形状に関する実験は、初期のバンド計算の結果に基づいて解釈されている。これを踏まえ、TMTSF分子のエネルギー差を変数とみなした仮想模型を用いて、それが超伝導状態と磁気ゆらぎに与える影響を調べた。図4は、TMTSF分子のエネルギー差がそれらの強さに与える影響の結果である。エネルギー差の増加により、超伝導状態も磁気ゆらぎも抑えられることがわかった。磁気ゆらぎは、バンド構造の変化により異なる磁気構造のゆらぎが競合し始めるために抑制されることがわかった。さらに、この競合が超伝導状態に対して不利に寄与し、超伝導状態も抑制されることを解明した。

(4) 研究成果の公表

- ① Hirohito Aizawa and Kazuhiko Kuroki, “Superconductivity in an effective model derived from Wannier orbitals for an organic conductor $(\text{TMTSF})_2\text{ClO}_4$ ”, Physics Procedia, Vol. 81, pp. 21 (2016). (査読付き)
- ② 相澤啓仁、黒木和彦、「有機導体(TMTSF) $_2\text{ClO}_4$ の超伝導ギャップに対するアニオン秩序化ポテンシャルの関係」、日本物理学会 2016年秋季大会（金沢大学）
- ③ 相澤啓仁、黒木和彦、「擬一次元有機導体(TMTSF) $_2\text{ClO}_4$ における超伝導ギャップとアニオン秩序化ポテンシャルの関係」、平成28年度物性研究所短期研究会「パイ電子系物性科学の最前線」（東京大学）

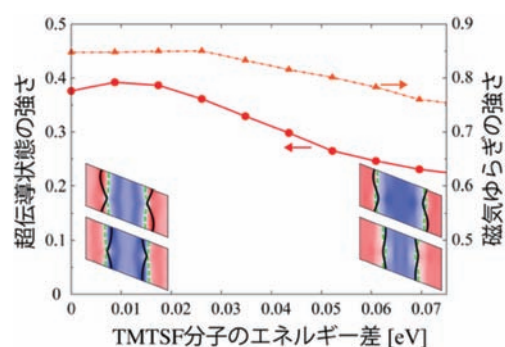


図 4：超伝導状態（左軸）と磁気ゆらぎ（右軸）の強さに対するTMTSF分子のエネルギー差の影響。挿入図はエネルギー差が小さい時と大きい時での超伝導ギャップ関数。

多発性嚢胞腎の疾患管理：尿バイオマーカーL-FABPの可能性

聖マリアンナ医科大学

医学部(内科学(腎臓・高血圧内科))市川 大介

1. 研究の目的

(1) 多発性嚢胞腎の腎障害進展に関して

- ① 遺伝性腎疾患である多発性嚢胞腎(PKD)は、両側腎臓に多数の嚢胞が発生して増大し、進行性に腎機能が低下する疾患である。
- ② PKDは、遺伝性腎疾患としてもっと頻度が高く、透析導入原因疾患の第5位である。毎年約7800人のPKD患者が、末期腎不全へと進行し、血液透析導入となっている。
- ③ PKDの診断は、画像診断により容易に行えるが、PKD進行の疾患管理(モニタリング)法は、十分に確立されていない。
- ④ 現在の診療では、血清クレアチニン(Cr)や画像から算出した腎容積を指標に、PKDの進行度を評価しているが、血清Crは、嚢胞が相当の大きさに腫大しないと増加せず、感度が低い事が問題である。CTやMRI検査などの画像検査から測定された腎容積が、PKD進行を予測する指標として広く認知されているが、画像からの腎容積算出は、専門機関でないと測定できず、また放射線被ばくや高額な検査費用の面から、頻回な測定は困難である。
- ⑤ 最近、PKD治療薬として、トルバプタンが保険適応となった。さらに、様々なPKD治療薬が開発途上にある。このような状況において、PKDの疾患管理を早期から頻回に行うための、簡便で、感度精度が高い有能なバイオマーカーが、必要不可欠である。

(2) 尿中L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)に着目して

- ① PKDは、尿細管上皮細胞の増殖、尿細管腔の拡大から始まる。尿細管腔拡大は、尿細管周囲毛細血管の狭窄をも惹起させるため、PKDの尿細管は低酸素ストレス下にあり、腎内では微小循環障害が生じている可能性がある。
- ② 尿中L型脂肪酸結合蛋白(L type fatty acid binding protein; L-FABP)は、最近保険収載された尿細管障害マーカーであり、急性腎障害や慢性腎臓病における早期診断、腎疾患重症度診断、腎疾患進行予測さらには、心血管疾患発症予測に有用であることが報告されている。
- ③ ヒト腎近位尿細管の上皮細胞に発現しているL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は、その発現調節領域に、低酸素で誘導される転写因子が結合する低酸素応答領域が存在する。基礎実験では、低酸素刺激により、腎臓でのL-FABP発現が増加し、尿中への排泄が増加する事が報告されている。
- ④ 臨床研究では、尿中L-FABPは、腎内血流量の低下や貧血の進行に伴い増加する事が報告されており、尿中L-FABPは、既存のマーカーと異なり、腎内微小循環障害を鋭敏に反映するため、PKDのモニタリングマーカーとして有用である可能性がある。

(3) 本研究では、基礎的研究により下記の点について明らかにする事を目的とする。

自然発症突然変異PKDモデルのラットを使用し、PKD進行過程におけるL-FABPの腎動態を明らかにする。

2. 研究の計画・方法

（1）多発性嚢胞腎（PKD）モデル

①多発性嚢胞腎（PKD）モデルとして、PKD/CrljCrl-Pkhd1PKD/CrlCrljラットを使用する。このラットは、日本チャールス・リバー（株）のCDラット生産コロニーから発見され、Pkhd1遺伝子突然変異が同定されている自然発症突然変異PKDラットである。集合管由来嚢胞が初期に発生し、その後、嚢胞が腎組織全域に達し、1年で腎不全に進行、死亡する。コントロールとして、CDラットを使用する。

②4週齢のラットを購入し、8週、12週、16週で採尿、採血、腎臓摘出を行う。

（2）組織学的評価

①摘出した腎臓をカルノア固定し、形態学的検討（PAS染色）で尿細管間質障害を評価する。

②間質への炎症細胞浸潤は、マクロファージおよびTリンパ球の表面抗原であるED1、CD3に対する抗体を用いた免疫染色で評価する。

③尿細管間質の線維化は、マッソン染色、抗コラーゲンtype Iおよびtype 3を用いた免疫染色で評価する。

④染色された標本は、光学顕微鏡（対物レンズx10）で無作為に10視野観察され、障害および線維化部位や免疫染色で陽性となった部位の定量解析を専用ソフト（WinRoof）を使用し行う。

（3）血液・尿パラメーター測定

各種パラメーター測定を市販されているキットを用いて行う。

①血清：血清クレアチニン、

②尿：クレアチニン、L-FABP、

③腎機能評価：尿量、血清クレアチニン、尿クレアチニンから糸球体濾過量を算出する。

3. 研究の特色

（1）PKDは、胎児期より嚢胞が確認されるものの30-40歳代までの長期間無症状で経過するため、早期診断が困難な疾患である。また、PKD進行を簡便にモニタリングできる有用な尿中モニタリングマーカーが確立されていない。

（2）本研究では、新規尿細管障害マーカー尿中L-FABPに着目し、尿中L-FABPのPKDモニタリングにおける有用性を基礎的側面から明らかにする。

（3）基礎的研究では、自然発症突然変異PKDモデルを使用し、腎臓におけるL-FABP発現解析および尿中L-FABP測定を行う。このような検討は、未だかつて行われていない。

4. 研究の成果

（1）PKD ratの週齢とともに、嚢胞肥大、尿細管間質障害（炎症細胞浸潤、間質線維化）の進展を認めたが、有意な腎機能低下は認められなかった。

（2）PKD ratの尿中L-FABPは、コントロールのCD ratと比較し、12週齢、16週齢より有意に増加し、嚢胞肥大および尿細管間質障害の進行とともに、その値は増加した。

（3）尿中L-FABPと嚢胞肥大、尿細管間質障害の程度は、有意な相関を認めた。

（4）PKD ratでは、著明な肝障害をみとめたが、血清L-FABPは、PKD ratとCD ratで同程度であった。

（5）尿中L-FABPは、PKDの組織障害と強い相関を認めており、PKD疾患モニタリングに有用である可能性が示された。

グラフト型高分子を担体とした高活性固定化触媒によるフロー合成 —TEMPO担持触媒を用いた高効率酸化反応—

横浜薬科大学 薬学部 奥野 義規

1. 研究の目的

生態系に与える影響を最小限に留めるなど、新しい化学工業のあり方を模索する中で、グリーンサステナブルケミストリーという概念が生まれ、我が国においても化学製品に対する環境政策としてリサイクルを中心とした活動や法整備などが進められている。

このような背景のもと、グラフト型高分子[幹ポリマーに別の機能を有する枝ポリマーを接ぎ木（グラフト）した高分子のこと。以降GPと略する。]触媒が従来の汎用性高分子触媒と比べ、収量、収率、反応時間、TON（触媒回転数）、TOF（触媒回転頻度）、また、フロー反応への利用効率など、ほとんどすべての反応効率において格段に優れていることを世界に先駆け初めて証明した（*ChemSusChem*, 2015）。

その理由は、これまでの高分子には無い、グラフト鎖の優れたフレキシビリティにある。すなわち、既存の高分子はほとんどが架橋構造であり、高分子内部における基質-触媒-試薬の接触効率が低いいため収率、反応時間に悪影響を与える（Fig. 1b）。一方、GPでは、触媒を担持したグラフト鎖が自由に動けるため、フロー反応などの流動環境下において基質-触媒-試薬の接触効率を高く保つことが可能である（Fig. 1a）。

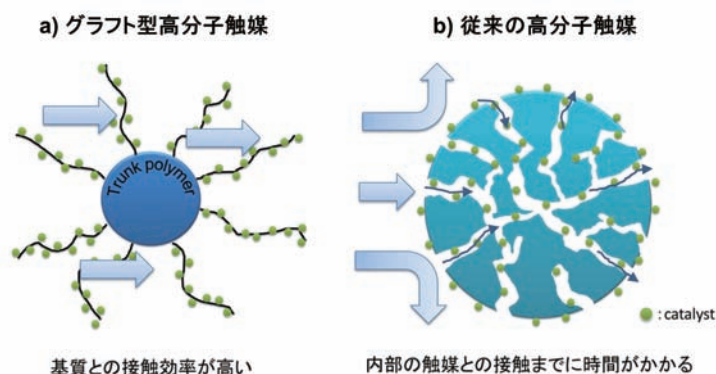


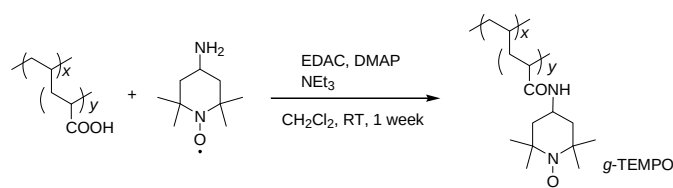
Figure 1 フロー反応における接触効率

以上の背景と知見から、GPを担体として用いることで、新規固定化触媒反応の開発とフロー反応への展開を実施し、次世代の環境調和型有機合成プロセスの構築を目指している。今回注目した酸化反応は様々な合成で用いられているが、例えば医薬品製造において、クロム酸酸化、Swern酸化、IBX酸化、Dess-Martin酸化などは、毒性廃棄物の処理、悪臭や爆発性、そして金属の残存など大きな問題を抱えている。そこで、NaOClなどの安価で安全な共酸化剤を用いることができ、プラントへの応用も可能な酸化触媒TEMPOに着目した。

2. 研究の計画・方法

(1) GP固定化TEMPO (*g*-TEMPO) の合成

高分子担体には、耐久性に優れたpolyethylene (PE) にpolyacrylic acid (PAA) を接ぎ木（グラフト重合）したPE-*g*-PAAを利用する。これは、高極性なPAAによる溶媒や基質との親和性の向上を目的としている。そこで、Scheme 1に従いPE-*g*-PAAに4-aminoTEMPOをアミド結合で担持させた*g*-TEMPOを合成した。



Scheme 1

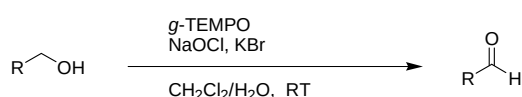
(2) *g*-TEMPO触媒的酸化反応（バッチ反応）

g-TEMPOを用いた有機溶媒中での様々な2級アルコール酸化（Scheme 2b）において一般試験を行った。

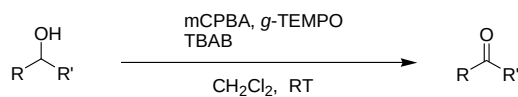
(3) フロー反応への応用

g-TEMPO を本研究室で開発したフロー反応システムに応用した。TEMPO を触媒とする場合、再酸化剤が必要となる。様々な再酸化剤が報告されている中、Scheme 2 に示した酸化方法のフローシステムへの適応試験を行った（一般試験）。更に、架橋構造や多孔性の既存の高分子固定化 TEMPO（Silica-TEMPO、PS-TEMPO）との触媒活性の比較検討を行った（優越性試験）。

a) 一級アルコール → アルデヒド



b) 二級アルコール → ケトン



Scheme 2

3. 研究の特色

固定化触媒は、経済性、実用性、省資源、省エネルギーにつながる環境負荷の小さい反応系として期待される。そこで、自由度、親水性、そして、接触効率の高い枝高分子を持つGPを固定化触媒の担体として利用することで、これまでの固定化触媒の持つ欠点を大幅に改善でき、フローシステムに最適で実用性の高い新規な固定化触媒を開発できる。また、フロー反応による医薬品製造の自動化の研究が進む中、この触媒をフローリアクターに適応することで次世代の医薬品製造プロセスとなることが期待できる。

4. 研究の成果

(1) 有機相 - 固相の二相系酸化反応

①バッチ反応（Table 1）

有機溶媒（CH₂Cl₂/ *t*-BuOH=1:1）中、再酸化剤（*m*CPBA）を用いて、2級アルコール酸化反応を行った。ベンジル位のアルコールでは中程度の収率を得ることができた（Entry 1, 2, 3）が、脂肪族アルコールの場合、収率の低下が見られた（Entry 4, 5, 6）。

Table 1

$\text{R-CH(OH)-R'} \xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{t-BuOH (1:1), RT}]{\text{g-TEMPO (0.3 mol\%), mCPBA (1.2 equiv.), TBAB (2 mol\%)}} \text{R-CO-R'}$											
Entry	Product	Reaction Time [h]	Yield [%] ^{*1}	TON ^{*2}	TOF ^{*3} [h ⁻¹]	Entry	Product	Reaction Time [h]	Yield [%] ^{*1}	TON	TOF [h ⁻¹]
1		22h	77%	145	6.6	4		51h	4%	10	0.2
2		24h	84%	156	6.5	5		40h	71%	132	3.3
3		24h	87%	163	6.8	6		51h	2%	5	0.1

^{*1} Isolated Yield
^{*2} Turn Over Number
^{*3} Turn Over Frequency

②フロー反応（Table 2）

①のバッチ反応条件を用いて、フロー反応を行った。立体的に込み入ったベンジル位酸化（Entry 3）に関してはバッチ反応よりも収率の低下が見られたが、その他のベンジル位（Entry 1, 2）においては、収率の改善が確認できた。さらに、脂肪族アルコールの酸化反応（Entry 4）では、バッチ反応の4%から98%へと劇的に向上した。このことから、*g*-TEMPOが流動環境下、効率的な反応を実行できることを証明した。しかし、立体的に込み入ったアルコールでは酸化反応が進行しなかった（Entry 6）。今後は、条件設定など各化合物に合った最適条件を模索する必要があると考える。

Table 2

•Alcohol (0.26 - 0.37 M)
•TBAB (2 mol%)

•mCPBA (1.2 eq.)

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
1		>99%	12.6	2.5
2		91%	9.1	1.8
3		73%	11.3	2.3

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
4		98%	9.2	1.8
5		76%	8.7	1.7
6		nd*2	—	—

*1 Assay conversion was calculated by HPLC using an internal standard
*2 not determined

(2) 有機相 - 水相 - 固相の三相系酸化反応

① 三相系フロー反応（比較試験）

一般的に水溶媒と固定化触媒は接触効率が低下する。そこで、接触効率改善のため、GPを担体とした *g*-TEMPO にて、NaOCl 水溶液を再酸化剤として用いる Montanari Oxidation (*J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2559-2562) へ応用した。さらに、この反応系において、GP 担体の性能を比較する為に、架橋型ポリスチレンとシリカゲル担持 TEMPO とフローリアクターシステムにおいて比較検討を行った。その結果、流動環境下では、Table 3 で示すように、*g*-TEMPO が最も効率よく反応を進行させていることが判明し、GP 担体の高い接触効率を証明することができた。

Table 3

Syringe A
•Benzyl alcohol (0.2 M)
In CH₂Cl₂
flow rate: 50 μL min⁻¹

Syringe B
•NaClO (0.25 M)
•KBr (0.5 M)
In H₂O (NaHCO₃ pH 9.1)
flow rate: 50 μL min⁻¹

Entry	Catalyst	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
1	<i>g</i> -TEMPO ^(b)	94%	12.1	4.0
2	PS-TEMPO*2	75%	9.6	3.2
3	Si-TEMPO*3	60%	7.7	2.6

*1 Assay conversion was calculated by HPLC using an internal standard method.
*2 Polystyrene-Supported TEMPO
*3 Silica-Supported TEMPO

② 三相系フロー反応（一般試験）

フロー反応一般試験において、ベンジル位の酸化反応は効率よく進行した。しかし、パラ位にメトキシ基（電子供与基）を有するベンジルアルコールの酸化では、収率11%となり、電子密度に大きく影響されることが判明した。また、ベンジル位以外の1級、2級アルコールでは、中程度の収率となり、(1)-②と同様に各々の最適条件を検討する必要があると考える。

Table 4

Syringe A
•Alcohol (0.2 M)
R-OH In CH₂Cl₂
flow rate: 50 μL min⁻¹

Syringe B
•NaClO (0.25 M)
•KBr (0.5 M)
In H₂O (NaHCO₃ pH 9.1)
flow rate: 50 μL min⁻¹

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
1		>99%	12.9	4.3
2		68%	8.7	2.9
3		51%	6.6	2.2

Entry	Product	Conversion [%] *1	TON	TOF [h ⁻¹]
4		93%	12.0	4.0
5		11%	1.4	0.3
6 *2		85%	10.9	3.6

*1 Assay conversion was calculated by HPLC using an internal standard method.
*2 Solvent: EtOAc / H₂O (1:1)