平成 29 年度
学 術 研 究 振 興 資 金
若手研究者奨励金 研究報告

平成 30 年 10 月

日本私立学校振興・共済事業団
Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan

はじめに

この報告書は、平成29年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）を配付した研究課題について、その研究成果を取りまとめたものです。

「若手研究者奨励金」は、私立の大学、短期大学、高等専門学校の学術研究の振興のために、私学事業団が広く一般から寄付を集めて、これを「学術研究振興基金」として運用し、その運用益から私立大学等における社会的要請の強い学術研究に対して助成を行う「学術研究振興資金」の一部を、優れた研究能力を有する若手研究者の研究意欲を高め、研究の発展を支援するために、平成20年度から平成29年度まで設けられた制度です。

平成29年度は、人文・社会科学（「人文・社会科学系」）13件の研究に対して各30万円、自然科学（「理工系、農学系」「生物学系、医学系」）29件の研究に対して各50万円、計42件の研究に対して1,840万円の奨励金を配付しました。

平成20年度に配付を開始して以来、これまでに配付した件数は311件、奨励金総額は、1億3,930万円となっております。これも、深いご理解を示された経済界をはじめとする多くの方々のご協力の賜物と心から感謝し、ご寄付くださった皆様に研究者の方々とともにお礼申しあげる次第でございます。

なお、本事業団では、「学術研究振興資金（若手研究者奨励金）」に替わりまして、私立大学等の若手研究者と女性研究者の研究を支援する「若手・女性研究者奨励金」（平成29年度から公募、平成30年度より配付）を新たに立ち上げました。平成30年度では、若手研究者奨励金31件の研究に対し各40万円、女性研究者奨励金31件の研究に対し各40万円、計2,480万円の奨励金を配付しております。

本事業団では私立大学等における学術研究の発展を願い、さらに支援を充実させたいと考えておりますので、一層のご支援とご協力を賜りますようお願い申しあげます。

おわりに、研究に携わる皆様におかれましては、この貴重な資金を有効にご活用いただき、特色ある学術研究の充実発展に寄与し、社会の要請に応えられますことを心からお祈りいたします。

平成30年10月

日本私立学校振興・共済事業団

理事長　清　家　　篤

目　　次

Ⅰ　学術研究振興資金（若手研究者奨励金）応募状況及び
採択状況‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥ 1

Ⅱ　平成 29 年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）
研究課題一覧‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥ 2

Ⅲ　平成 29 年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）
研究報告‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥ 4

Ⅰ　学術研究振興資金（若手研究者奨励金）応募状況及び採択状況

分野＼年度		20年度			21年度			22年度			23年度			24年度			25年度			26年度		
		応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）
合　計		32	20	6,000	53	24	7,200	49	21	10,500	63	20	10,000	79	30	15,000	77	29	14,500	108	41	18,900
内訳	人文・社会科学系	32	20	6,000	53	24	7,200	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	25	8	2,400
内訳	理工系、農学系	－	－	－	－	－	－	49	21	10,500	63	20	10,000	－	－	－	－	－	－	33	11	5,500
内訳	生物学系、医学系	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	79	30	15,000	77	29	14,500	50	22	11,000

分野＼年度		27年度			28年度			29年度			合計		
		応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）	応募件数（件）	採択件数（件）	交付額（千円）
合　計		114	42	19,400	92	42	19,400	82	42	18,400	749	311	139,300
内訳	人文・社会科学系	21	8	2,400	20	8	2,400	22	13	3,900	173	81	24,300
内訳	理工系、農学系	37	14	7,000	29	13	6,500	15	6	3,000	226	85	42,500
内訳	生物学系、医学系	56	20	10,000	43	21	10,500	45	23	11,500	350	145	72,500

注1．研究対象分野は、平成20、21年度は「人文・社会科学系」、平成22、23年度は「理工系、農学系」、平成24、25年度は「生物学系、医学系」の分野について、それぞれ募集・採択を行った。
注2．若手研究者奨励金の採択件数からは、採択決定後に交付辞退のあった学校を除外している。
　　辞退の内訳は、次のとおりである。（平成20年度：3件、平成21年度：4件、平成23年度：1件、平成25年度：1件、平成26年度：3件、平成27年度：2件、平成28年度：1件、平成29年度：2件）

Ⅱ　平成29年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）研究課題一覧

	学校名	研究者名	研 究 課 題	交付額（千円）	頁
1	北海道医療大学	鹿 内　浩 樹	新しい作用機序の注意欠如/多動性障害治療薬の開発	500	5
2	岩手医科大学	高 木　英 誠	逐次近似再構成法を用いた超低被曝冠動脈CT撮影法の開発	500	7
3	盛岡大学	長 谷 川　和 哉	急速減量による水分代謝応答の分子機構の解明	500	9
4	東北医科薬科大学	長 沼　史 登	中枢神経系ヒスタミンクリアランスの役割の検討	500	11
5	奥羽大学	横 田　　理	微小粒子の胎仔期曝露が大脳皮質発達過程に及ぼす影響	500	13
6	上武大学	堤　ひ ろ ゆ き	近代日本におけるエリート・ネットワーク形成に関する実証的研究	300	15
7	獨協医科大学	沢 登　祥 史	ヒト・ラット・マウスの胸腺上皮細胞新規サブセットの比較解析	500	18
8	秀明大学	中 園　長 新	教科「情報」教員の採用・配置に対する学校現場の意識	300	20
9	学習院大学	安 部　健 太	オリンピック・パラリンピック競技に共通する誤認知の研究	300	22
10	東京慈恵会医科大学	千 葉　明 生	RNAの新機能の解明	500	25
11	創価大学	村 田　大 学	ドイツ上場企業における指名委員会の独立性に関する研究	300	27
12	帝京大学	鴨 志 田　剛	アシネトバクター バウマニの好中球機能撹乱作用の研究	500	30
13	東海大学	荒 井　堅 太	酸化ストレス性タンパク質変異を抑制する環状ジセレニドの合成	500	32
14	東京女子大学	鵜 飼　祐 江	『源氏物語』の呼称表現の体系的分析	300	35
15	東京薬科大学	藤 川　雄 太	GSTP1特異的活性検出プローブの開発と生物応用	500	37
16	日本獣医生命科学大学	三 浦　亮 太 朗	ウシの同一卵巣内での第1卵胞波主席卵胞と黄体との共存の発生要因に関する研究	500	39
17	日本医科大学	石 野　孔 祐	がん代謝の抗酸化代謝物プールへの寄与と抗がん剤感受性への影響	500	41
18	文京学院大学	西 尾　美 和 子	家族性免疫不全／骨髄異形成症候群由来iPS細胞による病態解明	500	43
19	帝京平成大学	清 水　芳 実	ビフィズス菌を利用した上皮ガンに対する新規治療法の開発	500	45
20	立教女学院短期大学	大 野　志 郎	インターネット依存をもたらすウェブアプリケーション使用動機の検証	300	48
21	神奈川大学	田 邉　豊 和	太陽光エネルギー変換を可能にする可視光応答性光触媒の創製	500	50
22	神奈川工科大学	安 倍　和 弥	人工症例画像のCAD開発への応用に関する研究	500	52
23	金沢医科大学	市 川　壮 彦	MDCKシスト回転運動メカニズムの解明と癌転移への寄与	500	54
24	修紅短期大学	蛯 名　正 司	植物の概念形成に及ぼす動物概念の影響	300	57
25	藤田保健衛生大学	福 村　和 宏	mRNA スプライシングの保証機構とその破綻による癌化の解明	500	59
26	中部大学	三 上　仁 志	英作文教育におけるPlagiarism Educationの効果の検証	300	62
27	愛知淑徳大学	中 村　紘 子	モラルジレンマ判断における直観的な競合検知の検討	300	65
28	愛知医療学院短期大学	草 川　裕 也	手関節動作筋の張力低下が肩周囲筋筋活動に及ぼす影響の解析	500	67
29	京都産業大学	藤 田　明 子	神経精神疾患モデルマウスの代謝産物の研究	500	69
30	同志社大学	土 山　　玄	統計手法を用いた源氏物語54巻の成立過程についての検討	300	72

Ⅱ　平成29年度学術研究振興資金（若手研究者奨励金）研究課題一覧

	学校名	研究者名	研 究 課 題	交付額（千円）	頁
31	立命館大学	片　山　将　一	Rett症候群の病態解明を目的とするCDKL5の機能解析	500	74
32	立命館アジア太平洋大学	篠　原　欣　貴	人工知能がもたらす社会への負の影響と企業が実行できる解決策	300	76
33	関西大学	石　橋　　健	アイトラッキングデータを用いた店頭広告コンテンツの効果検証	300	79
34	関西医科大学	鈴　木　健　介	ヒト唾液腺悪性腫瘍におけるがん幹細胞の検討	500	81
35	近畿大学	佐　藤　文　孝	心筋炎の病期特異的バイオマーカーおよび血中代替マーカーの同定	500	83
36	関西学院大学	村　田　知　弥	脱ユビキチン化酵素USP46によるうつ様行動制御機構の解明	500	85
37	神戸女子大学	本　田　隆　裕	虚辞の派生とラベル問題に関する研究	300	88
38	徳島文理大学	川　上　隆　茂	メタロチオネイン欠損マウスを用いた脂肪肝発症メカニズム解析	500	90
39	久留米大学	阪　上　尊　彦	膵癌患者腹水中エクソソーム由来CD133の臨床・基礎的検討	500	93
40	第一薬科大学	古　賀　貴　之	アトピー性皮膚炎におけるアミノ酸補給療法の有効性の検討	500	95
41	福岡大学	吉　原　直　記	選択的なアルコール生成を可能とする金属単結晶積層電極の創製	500	97
42	福岡歯科大学	吉　本　尚　平	口腔癌における高浸透圧刺激による増殖促進機構に関する研究	500	100
			交付額計	**18,400**	

（注） 人文・社会科学の研究については30万円、自然科学の研究については50万円を、一律交付している。

Ⅲ　平成 29 年度学術研究振興資金
（若手研究者奨励金）研究報告

新しい作用機序の注意欠如/多動性障害治療薬の開発
―前頭前野 NMDA 受容体 glycine 結合部位の可能性―

北海道医療大学　薬学部　鹿内　浩樹

1. 研究の目的

注意欠如/多動性障害（attention-deficit/hyperactivity disorder: AD/HD）は、主として幼児期から学齢期の児童に認められる「不注意」「多動性」「衝動性」を中核症状とし、時に認知機能障害を伴う、男児優勢の軽度発達障害と位置づけられる精神疾患である。特に学齢期の児童の 5-10%において認められ、近年では教育現場における「学級崩壊」の要因となることが指摘されている。MRI などの脳機能画像診断の結果から、疾患の病因としては「前頭前野（prefrontal cortex: PFC)」の機能形態的異常が想定されている。現在 AD/HD 治療薬としては、神経伝達物質ドパミンの細胞外遊離量を増大させる目的で、各種モノアミン再取り込み阻害薬が使用されている。しかしこれらの AD/HD 治療薬は、アンフェタミンなどの覚せい剤と同様の薬理作用機序を持つため、その副作用や依存性が薬理学的な問題を引き起こし、加えて乱用などの社会的な問題となることがある。これらの背景を踏まえても、本疾患の病態生理解明・新規作用機序の治療薬開発は急務であると言える。

申請者はこれまでに AD/HD 疾患動物モデルを用いて、AD/HD の示す行動変容の神経基盤解明に取り組んできた。その結果、疾患動物モデルには PFC における興奮性シナプスに機能形態学的な異常が存在することを突き止め、さらに近年は、興奮性シナプスのグルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体の glycine 結合部位に注目している。本研究では、NMDA 受容体 glycine 結合部位リガンドが AD/HD の新規治療薬となる可能性について、薬理学的に追究することを目的とした。

2. 研究の計画・方法

NMDA 受容体は、NR1 ならびに NR2A～2D サブユニットからなるヘテロ 4 量体であることが知られており、特に NR1 サブユニットには抑制性アミノ酸である glycine の結合部位が存在している。電気生理学的な実験結果より、glycine はグルタミン酸による興奮性神経伝達を増強させる機能を有することが示されている。従って glycine は NMDA 受容体の co-agonist として様々な脳機能の発現・調節に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。

そこで申請者は、これまでの研究で用いてきた AD/HD モデル動物である脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(stroke-prone spontaneously hypertensive rat: SHRSP/Ezo)の PFC 脳領域の NMDA 受容体機能が glycine などの co-agonist により改善する可能性を、放射標識リガンド([^{3}H]MK-801: NMDA 受容体選択的 antagonist)を用いた NMDA 受容体 binding assay を用いて検証した。

さらに、得られた結果を基に NMDA 受容体 glycine 結合部位に対するリガンドを SHRSP/Ezo に単回全身投与し、PFC が関与する短期記憶・作業記憶(working memory)を評価するために広く用いられている Y 迷路試験を行い、不注意行動(inattention)への効果を評価した。

3. 研究の特色

国内外において AD/HD に関する基礎研究は、主として神経伝達物質ドパミンに焦点を当てた研究が進められてきた。ドパミン神経毒投与ラット(Davids et al., 2002) やドパミントランスポーターノックアウトマウス(Trinh et al., 2003)など、ドパミン作動性神経の機能を擾乱させたものが AD/HD 疾患モデルとして広く用いられている。一方、申請者の所属する北海道医療大学薬学部で継代繁殖している SHRSP/Ezo が、AD/HD 疾患モデル動物として高い妥当性を示す。特に、代表的な AD/HD 様行動（不注意・多動・高い衝動性）が雄性 SHRSP/Ezo の幼若期特異的に見られるため、臨床で見られる AD/HD 患者の所見と高い相同性を示す（Ueno et al., 2002)。この AD/HD 疾患の表現型をすべて反映している疾患モデルは SHRSP/Ezo 以外に報告がなく、本研究ではこの

モデル動物を使用して AD/HD の疾患病態を明らかにしていく点が特色である。

4. 研究の成果

(1)[^{3}H]MK-801 を用いた PFC 領域 NMDA 受容体 binding assay

NMDA受容体の機能亢進に対するco-agonistとしてglycineとD-serineを用いて、それぞれNMDA受容体binding assayに対する用量依存性を検証した。Glycineは100 μMの濃度においてのみ、対照群(WKY/Ezo)より有意にNMDA受容体bindingを亢進させた(図1)。D-serineでは、1、10、100 μMの濃度において、有意なNMDA受容体binding亢進効果を示した（図2）。

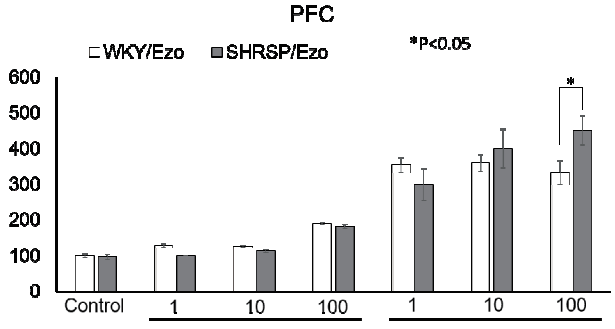


図１．Glycine 添加による[^{3}H]MK-801 の NMDA 受容体結合能の用量依存的変化。

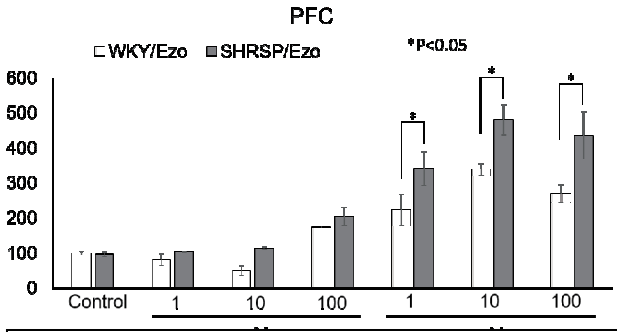


図 2．D-serine 添加による[^{3}H]MK-801 の NMDA 受容体結合能の用量依存的変化。

(2)NMDA 受容体 glycine 結合部位リガンド D-cycloserine 投与による SHRSP/Ezo の注意機能への影響

上記の実験により、glycineならびにD-serine共にNMDA受容体機能を改善することが示された。しかしながらこれらのリガンドは末梢から投与しても、血液脳関門の透過性が低く中枢への移行率が悪いため、そのまま全身投与することが出来ない。そこで、脂溶性を高く比較的中枢へ移行しやすいD-cycloserine(DSC:15 mg/kg)をAD/HDモデル動物であるSHRSP/Ezoに単回全身腹腔内投与し、Y迷路試験を実施した。その結果、有意な差ではないものの、注意機能（Y迷路試験における自発交替行動率:alternation）の改善傾向を示した（図3）。

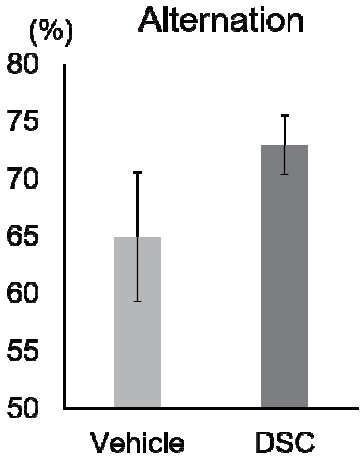


図 3．D-cycloserine 投与による SHRSP/Ezo の不注意行動の変化

(3)結果の総括と今後の展望

以上の結果から、行動薬理学的に有意な差は検出されなかったもののNMDA受容体glycine 結合部位に対するリガンドがAD/HDに対する新規作用機序の治療薬である可能性を支持した。今後、DSCについては投与量の検討や投与計画の変更（反復投与など）を検討していきたい。また、脳内glycineやD-serineの遊離量を増大させるなど、なんらかの方法でPFCのNMDA受容体glycine 結合を刺激し、AD/HDの治療につなげる方法についても検討していきたい。精神疾患の症状・程度は遺伝的要因や環境要因に大きく左右されるため個体差が存在する。そのため、単純一律化された治療方法では疾患の治療は困難である。出来るだけ多くの治療方法を見出し活用するためには、疾患の全容解明は不可欠である。本研究は、新規治療薬の創薬ターゲットを提示することで治療選択肢を広げ、新たな治療戦略を見出す一助となることが期待されるものである。

逐次近似再構成法を用いた超低被曝冠動脈 CT 撮影法の開発
－ファントムを用いた基礎検討および臨床応用－

岩手医科大学　医学部　高木　英誠

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

冠動脈狭窄の診断は、従来はカテーテルを用いた侵襲的な経皮的冠動脈造影が唯一の検査であったが、多列検出器CTの進歩と普及により非侵襲的に冠動脈の形態情報を得ることが可能となった。大規模臨床研究から冠動脈CTの高い臨床的有用性が示され、本邦における冠動脈CTの検査件数は2015年で42万件/年と急速に増加している。 一方で、冠動脈CTによる若年患者における遠隔期の肺癌や乳癌の発症リスク上昇が指摘されており、20～40代の女性における発癌リスク上昇は、80代患者の10～20倍とも言われ(Andrew JE et al. *JAMA* 2007;298:317-23)、冠動脈CTの低被曝化が必要である。

近年、CT画像の再構成法として逐次近似再構成法(FIRST; Forward projected model-based Iterative Reconstruction SoluTion, キャノンメディカル)が開発された。この方法は従来の画像再構成法に比べ、画像ノイズを大幅に低減(画質向上)可能である。そこで逐次近似再構成法を冠動脈CTに応用することで、診断可能な画質を保ちつつ、放射線被曝の低減が期待できると考えたが、FIRSTを応用した冠動脈CTの被曝低減法やその効果は分かっていない。

(2) 研究の目的

研究計画時には面検出器CTを用いて0.5 mSv以下の撮影プロトコル作成を目標としていたが、研究開始時にCT画像に流体構造連性解析を用いて非侵襲的に冠血流予備能比を算出する方法（CT-FFR; Computed tomography-derived Fractional Flow Reserve）が開発、導入されたため、冠動脈CT撮影時に心電図拡張末期のデータも収集する必要が生じた。そのため、被曝の目標値は2 mSv以下と再設定した。本研究の目的は以下の3つである。

①冠動脈CTにおける超低被曝撮影法のパラメータの最適化を行う。
②狭心症疑いで冠動脈CTを撮影した患者の径狭窄率の診断精度への影響を検証する。
③FIRSTを用いた低被曝冠動脈CTでのCT-FFRの診断精度を検証する。

2. 研究の計画・方法

(1)低被曝撮影法のパラメータ最適化

過去に本学附属病院で撮影された冠動脈CT画像を2つの画像再構成法（FIRSTおよび従来型の画像再構成法）で再構成する。両者の画像を盲検化し画質評価し至適な画像ノイズを決定する。

(2)低被曝冠動脈 CT の冠動脈狭窄診断精度

本学附属病院で撮影された低被曝冠動脈CT画像を2つの画像再構成法（FIRSTおよび従来型の画像再構成法であるFBP: filtered back projection）で再構成し、侵襲的なカテーテル冠動脈造影の診断を真とした時の診断精度を比較する。その際、ステント治療や冠動脈バイパス治療後の患者は除外する。また狭窄率の定量値をカテーテル冠動脈造影での狭窄率と比較し、バイアスを算出する。またその冠動脈CTの実効線量の平均、標準偏差を算出する。

(3)低被曝冠動脈 CT の CT-FFR の診断精度

本学附属病院で撮影された冠動脈CT画像をFIRSTで再構成し、その画像からCT-FFRを算出し、侵襲的な冠血流予備比(FFR: Fractional Flow Reserve)の診断を真とした時の診断精度を算出する。また、CT-FFRと侵襲的FFRの値の誤差、バイアスを算出する。その冠動脈CTの実効線量の平均、標準偏差を算出する。

3. 研究の特色

(1)研究の社会的貢献性

低被曝冠動脈CT撮影法は、小児～若年患者など長期予後の見込める患者の遠隔期発癌のリスク低減に貢献する。またFIRSTはすでに市販されている画像再構成アルゴリズムであり汎用可能であることから、国内外の研究機関と連携し、超低被曝冠動脈CTの診断精度のエビデンスを構築するための資源となる。

(2)特色・独創的な点

本研究で用いる逐次近似再構成法FIRSTは2016年に市販されたばかりである。FIRSTに関する大規模な研究は行われておらず、冠動脈CTにFIRSTを応用した被曝低減効果やその方法は分かっていない。本学には面検出器CTおよび FIRSTを搭載したCT画像再構成端末が設置されており、既に冠動脈CTの撮影経験を有しており、さらにそれ以前にも面検出器CTで心臓血管領域のCT撮影法に関する研究実績がある。

4. 研究の成果

(1)低被曝冠動脈 CT のパラメータ最適化

従来型の逐次近似再構成法で、スライス厚0.5mm,field of view 200mmの条件下でターゲットノイズを28ハンスフィールドユニットで撮影条件を設定すると概ね良好な画像が得られた。日本人の標準的体格の成人であれば、体軸方向の撮影範囲をなるべく狭くし、撮影時に高心拍の患者に対し、β遮断薬を投与し心拍を下げ、拡張期のみの撮影にすることで、実効線量2mSvは達成できることが分かった。

(2)低被曝冠動脈 CT の冠動脈狭窄診断精度

低被曝下での冠動脈CTでは、カテーテル冠動脈造影の診断を真とし、50%狭窄以上の病変を有意狭窄と定義した際に、従来型の再構成法(FBP)に比べ特異度、精度が上昇することがわかった。狭窄率の定量性に関して誤差の許容範囲は約20%で同程度であったが、誤差平均が小さくなることがわかった(-3% ± 9% vs. -7% ± 9%, $p<0.01$)。対象集団における冠動脈CTの平均実効線量は1.7±0.7mSvであり、過去の同様のCT-FFR対応の撮影方法を行った研究(平均4.9mSv)と比べると低被曝で撮影できていた（Ko BS, et al. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;10:663-673）。これらの成果をRadiological Society of North America (RSNA)annual meeting 2017で発表した。

(3)低被曝冠動脈 CT の CT-FFR の診断精度

低被曝下での冠動脈CTを用いたCT-FFRは、侵襲的なFFRの診断を真とし、FFR≤0.8を有意な病変と定義した際に、冠動脈狭窄50%で診断した時と比較して、感度は同等だが(感度, 81% vs. 81%, $p = 0.62$)、特異度や曲線下面積が改善する傾向が見られた（特異度40% vs. 73%, $p = 0.07$; 曲線下面積,0.61 vs. 0.77, $p = 0.07$）。FFRの値の誤差平均は0.01と小さかったが、誤差の許容範囲が-0.25-0.26と大きく、相関もピアソンの相関係数0.36であり、良好と言えるものではなかった。冠動脈CTの平均実効線量は2.3 mSvであり、過去の同様のCT-FFR対応の撮影方法を行った研究(平均4.9mSv)と比べると低被曝で撮影できていた（Ko BS, et al. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;10:663-673）。これらの成果をEuropean Congress of Radiology (ECR) 2018で発表した。

急速減量による水分代謝応答の分子機構の解明

盛岡大学　栄養科学部　長谷川　和哉

1. 研究の目的

レスリングや柔道、ボクシングなどの体重階級制競技選手の多くは、試合前の計量に向けた極度の食事や飲水の制限、およびサウナなどを用いた脱水により、比較的短期間に体重を減らす“急速減量”を伝統的に行っている。しかしながら、過度の急速減量は生体の恒常性機能の破たんを引き起こし、過去には死亡事故も報告されている。急速減量は、体脂肪減少を目的として行われる減量とは異なり、脱水を伴うのが特徴である。これまでにヒトを対象とした研究により、急速減量が脱水、低血糖や免疫機能低下などの身体機能障害を引き起こすことが報告されているが（Mendes et al. 2013）、生体内における分子応答については、ほとんど明らかにされていない。

生体内の水分代謝は、主に脳と腎臓の連関によって制御されている。飲水制限などによって生体における水分量が低下すると、脳下垂体後葉から抗利尿ホルモンである Vasopressin が分泌され、腎臓の水チャネルの Aquaporin-2 に作用することで、腎臓における水の再吸収を促進し、尿量が低下する。一方、絶食時には、腎臓の Aquaporin-2 の発現は低下し、多尿を呈することが報告されている（Hassane et al. 2001）。急速減量は、運動習慣を伴いながら、食事と飲水を同時に制限することが特徴だが、急速減量によって水分代謝制御機構がどのような挙動を示すかについては、十分に明らかにされていない。さらに、運動トレーニングが慢性心不全モデルラットの腎臓における Aquaporin-2 に作用することで腎機能障害を改善させることが報告されていることから（Lin et al.2011）、運動習慣を持つアスリートと一般人では、急速減量における水分代謝応答が異なることが予想される。

そこで本研究では、脳と腎臓を中心とした水分代謝機構に着目し、急速減量による水分代謝応答を分子レベルで解明することを目的とした。加えて、運動習慣の有無が急速減量による水分代謝応答に与える影響についても明らかにすることとした。

2. 研究の計画・方法

Sprague-Dawley ラットを 4 群（安静群、安静＋急速減量群、運動群、運動＋急速減量群）に分け、運動群および運動＋急速減量群には、1 日 15 分 3 セットのクライミング運動を週 5 日、6 週間行わせた。その後、安静＋急速減量群および運動＋急速減量群には、3 日間の絶食を実施し、さらに絶食 3 日目には 1 日間の絶水を合わせて実施することで急速減量を行った。

3. 研究の特色

本研究のアイディアは、ラットを用いた動物実験により、急速減量による水分代謝応答を分子レベルで明らかにする点にある。ヒトを対象とした急速減量研究では、選手に競技大会の合間を縫って被験者になってもらい、体重・血液・尿・唾液などを解析するため、大会に向けた減量に加えて、さらなるストレスを選手に与えてしまうことや、臓器レベルで水分代謝機構を解析することが難しい。これまでに国内外で精力的に行われてきた急速減量研究をさらに発展させ安全な急速減量方法を確立していくには、動物実験が必要不可欠であるが、動物を用いた急速減量モデル研究は、ほとんど報告されておらず、さらには水分代謝応答については全く報告されていない。

現在、体重階級制を設けている競技は、我が国のお家芸であるレスリングや柔道を始めとして少なくとも 15 種目以上存在し、全世界に数多くの競技者が存在する。過度な急速減量は、身体機能障害を引き起こす危険性がある。しかしながら現在の急速減量は、科学的根拠よりも指導者や選手の経験則に基づいて実施されているのが実情である。その背景には、急速減量についての科学的な根拠が未だ不十分である現状が存在する。本研究の遂行によって、急速減量による水分代謝応答の分子機構の一端を明らかにすることは、より安全で効果的な急速減量法の確立のために貢献できるものと確信する。

4. 研究の成果

ラットの体重は運動習慣によって変動しなかったが、安静群および運動群ともに急速減量によって有意に減少した。尿量は安静群および運動群ともに急速減量によって有意に減少し、尿中の浸透圧は両群ともに急速減量によって有意に上昇した。腎臓の重量は、安静群では急速減量によって変動しなかったが、運動群では有意に減少した。視床下部における Hetero Vasopressin mRNA 発現量は運動習慣によって有意に増加したが、急速減量では変動しなかった。同様に、Mature Vasopressin mRNA 発現量も運動習慣によって有意に増加したが、急速減量によって変動しなかった。さらに、腎臓の集合管主細胞における管腔側細胞膜の水透過性に関与する Aquaporin-2 の mRNA 発現量は、安静群に比べて運動群で有意に増加していたが、安静群および運動群ともに急速減量によって発現量は変動しなかった。同様に、基底側壁部細胞膜の水透過性に関与する Aquaporin-3 および Aquaporin-4 の mRNA 発現量も安静群に比べて運動群で有意に増加していたが、安静群および運動群ともに急速減量によって発現量は変動しなかった。

以上の結果から、運動習慣は Vasopressin- Aquaporin 経路の水分代謝機構の遺伝子発現量を増加させることが示唆された。また、急速減量による体水分量の減少に対しては Vasopressin-Aquaporin 経路以外の水分代謝応答が関与している可能性が示唆された。今後、Renin–angiotensin–aldosteron 経路を介した水分代謝調節機構についても併せて検討していく予定である。

中枢神経系ヒスタミンクリアランスの役割の検討
－睡眠覚醒、攻撃性への役割の解明を目指して－

東北医科薬科大学　医学部　長沼　史登

1. 研究の目的

脳内においてヒスタミンは、神経伝達物質として覚醒の維持や、学習記憶など多彩な生理作用に関与している。これに加え、様々な中枢疾患においてヒスタミン神経系の活動異常が報告されている。しかしながら、これらの活動異常が病態に対して直接的に寄与しているのか、それとも代償的に生じているものなのかは未だ不明なままである。そのため、中枢ヒスタミン神経系の役割を詳細に明らかにすることは、ヒスタミン神経系の関与する様々な病態の理解、および新規治療標的の開発に繋がることが期待される。これまでの研究で、脳内の主要なヒスタミン代謝酵素である histamine *N*-methyltransferase (HNMT) の欠損マウスを解析し、脳内におけるヒスタミン量の上昇は、睡眠覚醒サイクルの異常と、高い攻撃性を引き起こすことを明らかにした。特に、不眠症、過眠症、およびナルコレプシーのような睡眠障害におけるヒスタミン神経系の活動異常は多数の臨床研究により報告されている。さらに、高い攻撃性を伴う治療抵抗性の統合失調症において、ヒスタミン受容体遮断薬が有効であることが報告されている。これらのことから、HNMT 欠損マウスで確認されたヒスタミン神経系の活動亢進による表現型の理解は、睡眠障害で認められる睡眠覚醒調節機構の破綻や、統合失調症において攻撃性が増加する機構の解明につながり得るのではないかと考えられた。これに加え、病態における各神経系の異常は、病態によってそれぞれ異なる脳部位で起こっている場合が多い。そのため、病態における神経系の活動異常を理解するためには、各脳部位における機能解析が必須である。そのため本研究は、ヒスタミン神経系の活動と、これらの表現型との関連をさらに理解するため、ウイルスベクターを用いた条件的遺伝子改変技術により、どの脳部位におけるヒスタミン神経系の活動亢進が睡眠覚醒や攻撃行動の調節に寄与しているかを明らかにすることを目的としている。

2. 研究の計画・方法

本研究では Cre-LoxP システムを用いた条件的遺伝子欠損法を利用する。そのため、まず HNMT-flox マウスを作製する。作製したマウスに Cre を発現させる AAV ベクターを脳内局所にマイクロインジェクションし、投与部位のみで HNMT を欠損させる。これにより、AAV ベクター投与部位のみでヒスタミン量が増加し、ヒスタミン神経系を亢進させることが可能である。その後、自発運動量の測定および、resident-intruder test による攻撃性の評価を行うことで、HNMT 全身欠損マウスで認められた睡眠覚醒サイクルの破綻、および攻撃性の増加がどの脳部位のヒスタミン神経系の亢進により引き起こされているのかを検討する。

3. 研究の特色

これまでヒスタミン神経系の機能解析は、合成酵素や、受容体に着目した研究が中心となり、様々な役割が解明された。しかしながら、他の神経伝達物質に目を向けると、合成酵素や、受容体だけでなく、代謝酵素などが関与する消失系に着目した研究も併せ行われたことで、病態の更なる理解や、新規治療法の開発に大きく貢献した例が多数存在する。事実、アルツハイマー病や精神疾患などにおいては、アセチルコリンやセロトニンなどの消失系が現在においても主要な治療標的とされている。しかしながら、ヒスタミンの消失系に関する研究は乏しく、実際に HNMT 欠損マウスを用いて機能解析した研究は、我々グループを除いては現時点で一報も報告はない。そのため、従来の合成酵素や、受容体の欠損マウスを用いた「機能抑制型」の研究と異なり、消失系に着目し、「機能亢進型」の表現型を解析する研究であることが当該研究と先行研究とで、大きく異なる点である。さらに先行研究は、全身欠損マウスを用い、脳全体でのヒスタミン神経

系の機能を観察することに限られていた。そのため本研究のように、AAV ベクターと、条件的遺伝子改変技術を併用し､各脳部位におけるヒスタミン神経系の役割を明らかにする試みも当該研究の特色である。

4. 研究の成果

(1)研究に使用するAAVベクターの作製とマイクロインジェクション法の確立

Cre とマーカータンパクである mCherry を発現させる AAV ベクター (AAV-Cre-mCherry) および、対照群に投与するための mCherry のみを発現する AAV ベクター (AAV-mCherry) を発現するプラスミドを作製し、HEK293 細胞を用いてパッケージングを行った。得られた AAV を精製し、十分な力価が得られたことを定量 PCR 法にて確認した。作製した AAV ベクターをそれぞれマウスに投与し、2 週間後に脳切片を作成し、mCherry の発現を確認したところ、標的脳部位のみでの mCherry の発現を確認することが出来た。

(2)睡眠覚醒サイクル調節機構に関する検討

AAV ベクター投与部位として睡眠覚醒､自発運動量の調節に重要な視床下部を標的にした。HNMT-flox マウスの視床下部に AAV-Cre-mCherry を投与し、約 2 週間後に自発運動量の測定を行った。その結果、AAV-mCherry 投与を投与した対照群と比較し、暗期の自発運動量が増加傾向を示した。

(3)攻撃行動調節機構に関する検討

AAV ベクター投与部位として、感情、攻撃行動の調節に重要な扁桃体を標的にした。HNMT-flox マウスの扁桃体に AAV-Cre-mCherry を投与し､約 2 週間後に resident-intruder test による攻撃行動の評価を行った。その結果、AAV-mCherry 投与の対照群と比較し、AAV-Cre-mCherry 投与群において攻撃時間が長い傾向が認められた。

これまでの研究により、AAVベクターの作製とマイクロインジェクション法の確立、および、AAVベクター注入後の表現型の解析まで、一連の研究体制を整えることが出来た。さらに、実際に自発運動量、および攻撃行動に関する検討をしたことにより、ヒスタミンは、視床下部において自発運動量の調節、扁桃体において攻撃行動の調節にそれぞれ関与していることが示唆された。今後サンプル数を増やし、これらの役割を明確にすること、および、他の脳部位におけるヒスタミン神経系の役割についても明らかにすることが今後の課題である。

微小粒子の胎仔期曝露が大脳皮質発達過程に及ぼす影響
－DOHaD 仮説に基づいた影響メカニズムの検証－

奥羽大学　薬学部　横田　理

1. 研究の目的

自閉症や学習症、注意欠如多動症などの神経発達障害のメカニズムは未解明な部分が多く、我が国は、基礎医学・薬学・生命科学分野を中心にそれらの原因究明に日々注力している。その中でも、神経発達障害の共通病態は大脳皮質を中心とした神経回路の形成および維持の障害であることが明らかになってきている。胎児期における発生過程において、大脳皮質ではいくつかの特徴的なイベントが起こることが知られている。具体的には、神経細胞への分化およびアポトーシスによる胎生後期から生後初期にかけた劇的な細胞数変化や、先に産生された神経細胞ほど皮質の深層に遊走されるという様式（インサイド・アウトパターン）に従った層形成などがある。この現象は、遺伝的に厳密なプログラム制御を介しておこるものである。これまでの考えでは、このような脳発達障害の発症には遺伝的要因が強く関連するというのが我々の共通認識であった。しかし、近年、ダイオキシンやビスフェノール A などの環境由来化学物質の胎仔期曝露が大脳皮質の発達過程に影響を及ぼすことが報告され、環境要因と遺伝要因の複合的な作用による発症の可能性が濃厚と考えられている。衛生学分野や胎児医学分野においては、Developmental of Health and Disease（DOHaD 説）に基づき、妊娠期の環境要因が引き金となって、次世代の後天的な影響を誘発することが疫学調査をはじめ、動物実験からも多くの知見が集積され始めている。しかし、評価された化学物質には限りがあり、超微小粒子を対象に詳細な研究は進んでいないのが実情である。

これまでに、ディーゼル排ガスを含む超微小粒子の胎仔期曝露が後世の行動異常や神経伝達物質の放出異常を引き起こすことを、私は国内外ではじめて明らかにしてきた（Yokota S *et al.*）。対照的に、プレリミナリーなデータではあるが、生体期にディーゼル排ガスを慢性曝露しても脳神経系への影響は認められなかった。自動車産業の技術革新（高性能フィルターを用いて排気される微粒子の濃度の大幅な削減など）や我が国での環境整備の成果もあって、一部を除く現在の大気汚染レベルでは、一般的にディーゼル排ガス曝露の健康影響を危惧する必要も少なくなるほど、大気中の微小粒子の濃度は低減してきた。しかし、低濃度曝露においても、”妊娠期間”に曝露されると、子どもの脳神経系が撹乱されるいくつかのデータを得ていることから、影響には臨界期が存在し、大人では見られない機序で子どもには影響が生じることが想定された。そこで私は、何故、このような特徴的な毒性フェノタイプが生じるのか、詳細に検討を行う必要があると考えた。本研究では、胎仔期に超微小粒子を曝露させ、仔の大脳皮質の細胞移動に焦点を当てて検討を進めることとした。

2. 研究の計画・方法

(1)動物

①実験には、ICR 系マウスを用いた。自家繁殖後、プラグの確認を持って妊娠日（GD: gestational day）0.5 とした。GD 7.5 と 14.5 それぞれに、大気環境中のナノサイズの超微小粒子（15-20 nm リッチな粒子）を生理食塩水に懸濁後、気管内投与を行った。高濃度群（50μg/injection）、低濃度（5μg/injection）、対照群（生理食塩水投与）の 3 群に分けた。なお、懸濁した超微小粒子は、調整後およそ1ヶ月間安定な状態であった。

②投与直後（GD14.5-15の間）にブロモデオキシウリジンを腹腔投与（15 mg/kg）し、その日に産生された神経細胞をチミジンアナログにて標識した。出産後、新生仔期から離乳期にかけて、経時的に灌流固定・脳サンプリングを行い、スクロース置換後、包埋を

行いマイクロスライサーにより切片の作成を行った。また、生体期に行動解析（自発運動量の測定・強制水泳試験）を行い、マウスの基本的な運動量とモチベーションの評価を行った。

(2)影響評価

①行動解析：自発運動量の測定には、オープンフィールド装置を用いた。マウスを馴化した装置内に置いてから、5分間の運動奇跡を解析した。次に、強制水泳試験を行った。水温 24 ℃に制御された水の中にマウスを投入し、6分間の無動状態（floating time）を測定した。

②組織学解析：離乳時に、曝露を行った母マウスの肺をサンプリングし、切片作成後、粒子の沈着を顕微鏡下で行った。一方、脳組織は、抗ブロモデオキシウリジン抗体を用いて新生ニューロン数、ならびに、その分布を解析した。神経細胞分化マーカーとして抗 NeuN 抗体を、未成熟神経細胞マーカーとして抗 DCX 抗体を、アストロサイト分化マーカーとして抗 GFAP 抗体を用い、免疫組織化学染色を行い定量解析を行った。

3. 研究の特色

超微小粒子曝露の、脳神経系への影響を検討した報告は国内外ともに少なく、また、後世の脳神経疾患発症の機序について in vivo 組織レベルで検討した報告はない。本研究の特色は、脳発達の要となる神経細胞の分化・移動を捉えること、また、層構造が明確な大脳皮質を標的に組織学的に層形成への影響を明らかにすることである。大脳皮質の神経回路構築は、胎仔期後期から生後初期にかけて行われる。従って、大脳皮質の神経回路形成は周産期環境の影響を受けやすいと考えられる。この時期に影響を受けると、精神･神経疾患のリスク増加につながる可能性が懸念される。本研究は、超微小粒子の胎仔期曝露により生じる行動変化や脳機能低下の原因となり得る脳神経発達への影響について明らかにすることで、胎生期環境要因による精神･神経疾患発症の脆弱性のメカニズムについて新たな結果を導く点からも独創性が高いと言える。

4. 研究の成果

(1)行動解析

①自発運動量：自発運動量の測定を行ったところ、高濃度曝露群と対照との間でほとんど同じ運動量を示した。

②強制水泳試験：強制水泳試験を行ったところ、高濃度曝露群では有意に floating の時間が長くなったことから、うつ様行動を示す可能性が示唆された。

(2)組織学解析

①肺組織解析：離乳時に、曝露を行った母マウスの肺をサンプリングし、粒子の沈着を顕微鏡下で確認したところ、対照の肺組織では認められない、粒子の存在が曝露群の肺では検出され、気管内投与の妥当性も併せて確認することができた。

②脳組織解析：高濃度曝露群、低濃度曝露群の胎齢 14.5-15 日目に新生された大脳皮質ニューロンの分布は対照群と比較して、その分布にバラツキが認められた。また、大脳皮質ニューロンの移動は対照群と比べて遅い傾向にあった（インサイドアウトパターン形成が正常に行われていない）。

(3)総括

以上の結果より、胎仔期超微小粒子曝露（低濃度・高濃度）は次世代の脳神経発達に影響を及ぼすことを明らかにした。大脳皮質の細胞移動異常が神経回路形成異常を引き起こしうつ様行動を惹起した可能性が考えられる。今後は、引き続き組織解析を進め、細胞移動・分化・回路形成の全貌を明らかにし、同時に、うつ様行動のトリガーとなる分子基盤を明らかにし、脳神経疾患の発症を未然に防ぐ防御策を検証する。

近代日本におけるエリート・ネットワーク形成に関する実証的研究
－旧制高等学校卒業生の出身校の量的比較－

上武大学　ビジネス情報学部　堤　ひろゆき

1. 研究の目的

(1)エリート・ネットワーク形成における異動の影響を実証するための資料残存状況等の調査

①中等・高等教育接続によるネットワーク形成を検討するために、高等教育機関の中でも、「正系」とされた高等学校（旧制）の同窓生名簿から、その出身中学校（旧制）を割り出して全国的な進学の動向を明らかにする。旧制高等学校同窓会の組織状況を明らかにする。

②旧制高等学校を前身とする高等教育機関における資料の残存状況及びアクセスについて調査する。

(2)エリート・ネットワークの質的、空間的展開についての発展性を明らかとする調査

①帝国大学、旧制大学の卒業生によるネットワーク組織の存在の有無を確認し、その組織の広がりや影響力を明らかにする。その際、卒業後の社会的地位と学校ネットワークとの関係を明らかにできるように努める。とりわけ、教員ネットワークに注目した。

②日本国内にとどまらず、留学などによる高等教育を通じたエリート・ネットワーク形成の可能性について、日本の学校を中心として明らかにする。

2. 研究の計画・方法

(1)旧制高等学校関係の同窓会名簿、個人資料などへのアクセス

①長野県松本市に所在する旧制高等学校記念館に所蔵されている旧制高等学校同窓会名簿を中心として、出身中学校などの基礎的情報を収集する。加えて、旧制高等学校卒業生とのコネクション形成を試み、可能であれば質的な調査も実施した。

②現存する高等教育機関の所有する学籍簿等の資料へのアクセスについて調査し、可能であれば現物を確認しながら出身中学校を確認した。

(2)帝国大学を中心とした現地調査及び文献調査

①帝国大学を中心としたナショナル・エリートのネットワーク形成を検討するため、帝国大学を中心として文献調査を行った。とりわけ、卒業生数の点から大きな勢力を誇っていたのは東京帝国大学であり、東京帝国大学を中心として文献調査を実施した。

②ナショナル・エリート・ネットワークを検討するため、日本への留学生と日本の学生とのネットワークを対象とした。適切な対象国を、両世界大戦においても独立国の地位を保ち続けたタイに設定して日本国内での文献調査を実施するとともに現地での資料へのアクセス、残存状況等についてのヒアリング等調査を実施した。

3. 研究の特色

(1)中等・高等教育を通じたエリート・ネットワーク形成に関する実証的調査

①本研究の特色は、中等高等教育接続の形成過程と展開を、資料に基づき量的に明らかにすることにある。中等高等教育接続といっても、それぞれの学校は個別の地域に立地していた。そのため、各学校間の移動を検討する必要があり、本研究はそれを明らかにしようとするものである。これによって、本研究はローカル／ナショナルなエリート・ネットワークを中等教育の段階から可視化する基礎的研究である。

(2)教育関係者ネットワークという視点の提示

①中等教育以上の教育機関では、地理的に近接している学校であってもその卒業生ネットワークは学校ごとに大きく異なるものであり、地域性に還元できないものである。地域

性に加えて、学校独自の紐帯を持つものと考えられる。学校独自の紐帯は、生徒においては学校内部で完結する側面が強いが、教員は異動によって複数の学校で学校関係者ネットワークに関与し、教育者として卒業生ネットワークの形成に寄与する。生徒／教員というカテゴリーで分割するのではなく、学校関係者として見ることで、広く近代日本の社会における学校関係者ネットワークを検討することが特色である。同時に、学校を通じた国際的ネットワークの形成にも注目する。

4. 研究の成果

(1) 資料の残存状況と各校の特徴

①資料の残存状況

ア　旧制高等学校記念館では、第二次世界大戦以前に創立された官公私立旧制高等学校（大学予科を含む）41校中39校の同窓会名簿が確認された。個人情報等保護の観点から複写等は実施していないが、名簿に掲載されている全卒業生の情報について閲覧した。その結果、13校の同窓会名簿に出身中学校等の入学以前の経歴が掲載されていることが確認された。中でも、第一高等学校から第八高等学校までの高等学校では、すべての同窓会で出身中学校の記載がなかった。第一高等学校では学校一覧に在校生の出身中学校が記載されており、また、第七高等学校では、公式の同窓会名簿とは別に有志によって編纂された名簿『七高造士館で学んだ人々（名簿編）』が存在しており、この名簿では出身中学校が記載されている

イ　1918（大正7）年の高等学校令以降に設置された高等学校では、近隣府県からの進学者が多数を占めていた。ナンバースクール卒業生の出身中学校は第一高等学校および第七高等学校の二校について調査し、全国各地から進学していることが確認された。また、長野県長野中学校からは初代校長が第二高等学校教頭へ異動したため、第二高等学校への進学志向が強い時期があったことが長野中学校の学校史で言及されている。このことから、教員を通じた進学志向が存在していたことが示唆される。

②旧制高等学校を前身とする大学への調査として、第一高等学校（東京大学）と第四高等学校（金沢大学）への調査を試みた。学籍簿等の資料を閲覧するには個人情報等の観点から相当程度の制約と時間を要するため、今後の継続的な調査が必要である。

(2) ローカル／ナショナル・エリート・ネットワークの構築

①東京帝国大学出身教育関係者ネットワーク

調査の過程で、中学生の進学志向に教員の影響が強いことが示唆された。旧制高等学校出身者は大半が帝国大学へと進学しているため、帝国大学出身者教員のネットワークに範囲を拡大して調査を実施した。その結果、新史料として東京帝国大学出身教育関係者の組織である「東大倶楽部」の『東大倶楽部員名簿』（昭和8年10月末現在、昭和14年10月1日現在、昭和15年10月1日現在、昭和17年10月1日現在）を発見した。先行研究において「東大倶楽部」についての言及はほぼ存在せず、『東大倶楽部員名簿』の存在は今回初めて確認されたといってよい。当該組織は東京帝国大学文学部学友会内に事務所を置き、帝国大学をはじめとする教員のみならず、教育行政関係者、軍関係学校教員、会社員等も含めて教育に関係している卒業生を包括的に組織する意図を有していた。組織の内実や活動は今後さらなる分析が必要となるが、ナショナル・エリートの養成機関であった東京帝国大学の卒業生とローカル・エリートとのつながりを検討する際に重要な意味を持つものであると考えられる。

②国際的なエリート・ネットワーク構築の可能性

旧制高等学校卒業生を調査した結果、複数の留学生卒業生の存在が確認された。ナショナル・エリート・ネットワーク構築を検討するために、旧制高等学校の存在した時期において独立国であったタイを対象として検討した。とりわけ、日本との関係も深いチェンマイにおいて、当該期における日本－タイ間の留学生交流についての史資料の残存状況およびアクセスを調査した。私費留学生として多数のタイ人が留学していたとの情報を得たが、タイの大学や行政機関では手続き上非常に多くの時間を要することが判

明したため、タイとの国際的なネットワーク構築については今後さらなる調査が必要である。

(3)成果発表状況

得られた知見に基づいて、Asian Studies Conference Japan 2018（国際基督教大学）にて報告することが決定している。また、そこでの議論をもとに論文を投稿準備中である。

ヒト・ラット・マウスの胸腺上皮細胞新規サブセットの比較解析

獨協医科大学　医学部　沢登　祥史

1. 研究の目的

本研究は、申請者の過去の論文（PLoS One. 2014;9(10):e109995.）で発表された、マウス及びラットに見出された胸腺上皮細胞の 2 つのサブセットに関して、(1) ヒトにおけるその存在、(2) その機能のさらなる解析、の 2 点からさらに深めた研究を行うものである。

(1) ヒト髄質胸腺上皮細胞のサブセット解析。

申請者らが以前新規抗体と既存抗体を組み合わせて用い報告した、ラット、マウスにおける新規髄質胸腺上皮細胞サブセット mTEC1 と mTEC2 がヒトにも存在するかを確認し、機能分子発現と相関するかを確認する。

(2) 新規髄質胸腺上皮細胞サブセット mTEC1 と mTEC2 の機能の解析。

①動物を用い、免疫抑制剤でありながら、動物実験では自己免疫の誘導が報告されるシクロスポリン A 投与時の mTEC1/mTEC2 の数や機能の変化を観察する。

②シクロスポリン A 投与時の T 細胞新生の変調を解析し、胸腺上皮細胞サブセットの役割を同定する。

2. 研究の計画・方法

(1) ヒト髄質胸腺上皮細胞のサブセット解析。

獨協医科大学の生命倫理委員会の認可を受け（2014 年 11 月 11 日）、胸腺摘出を伴う外科的治療を必要とする患者のインフォームドコンセントを得て得られた胸腺検体を、申請者らの過去の論文にて使用された新規抗体 ED18 と ED21、さらに抗サイトケラチン 5 及び抗サイトケラチン 8 抗体を用いた蛍光多重免疫染色で観察することにより、齧歯類と同様に mTEC1、mTEC2 を同定できるかを確認する。さらに、それぞれの画分での CD40、CD80、involucrin の発現を観察することにより、その機能を類推する。

(2) 新規髄質胸腺上皮細胞サブセット mTEC1 と mTEC2 の機能の解析。

①ラットにシクロスポリン A を 16 日間投与し、数日のインターバルで胸腺を採取、その新鮮凍結切片を蛍光多重免疫染色する。定量的な検出のため、撮影画像をコンピューターで画素解析し、mTEC1、mTEC2 の数や比率を算出する。

②シクロスポリン A 投与ラットの末梢リンパ節より調製した T 細胞と、同系ラットの樹状細胞で混合リンパ球反応試験（Mixed lymphocyte reaction: MLR）を行い、シクロスポリン投与により自己応答性が上昇するかを確認する。

③自己免疫疾患では、T 細胞受容体を構成するセグメントの発現比率に正常に比べ偏りがあることが報告されている。これに着想を得て、シクロスポリン投与による T 細胞の自己応答性の変調が、胸腺で選択される T 細胞のレパトアに変調が起きたためかどうかを検討するため、シクロスポリン A 投与ラットの胸腺内で産生されつつある T 細胞、末梢リンパ節の T 細胞、MLR で増殖した T 細胞の T 細胞受容体の Vb セグメントの発現比率を、リアルタイム PCR を用いて解析することにより調べる。

3. 研究の特色

(1) ヒト髄質胸腺上皮細胞のサブセット解析。

ヒト髄質胸腺上皮細胞のサブセット解析を試みた報告はいくつかあるが、複雑であり機能との相関を見た研究は少ない。我々の先行研究でマウス及びラットにおいて判明した mTEC1 と mTEC2 の分類のような比較的シンプルなサブセット分類が可能であり、それが機能との相関を見るならば、主に齧歯類で研究されている胸腺上皮細胞、ひいては胸腺全体の発生と成熟に関する知見をヒトに応用することが可能となる。

(2) 新規髄質胸腺上皮細胞サブセット mTEC1 と mTEC2 の機能の解析。

これまでの解析により、マウス、ラットではmTEC1に髄質胸腺上皮細胞の機能分子であるMHC IIやAIREが発現しており、高い機能を持ったサブセットであり、mTEC2は幼若もしくは機能を失いハッサル小体へと変化しつつあるサブセットである可能性が高いと申請者らは予測しているが、直接的な証拠はない。T 細胞を選別する胸腺の機能を低下させるシクロスポリンAの投与中のこれらサブセットの変化と新生したT細胞を解析することにより、より直接的にこの仮説を検証する。

4. 研究の成果

(1)ヒト髄質胸腺上皮細胞のサブセット解析。

ED18 と ED21 を用いた免疫染色により、マウス及びラットと異なりこれらの抗体は常に同一の胸腺上皮細胞を染めることが明らかとなり、これらによりマウス及びラットにおけるmTEC1やmTEC2に相当するサブセットを見分けることはできないことが明らかとなった。さらにED18+ED21+細胞はHLA-DR+細胞およびHLA-DR-細胞の双方を含んでおりED18-ED21-である胸腺上皮細胞もあったため、ヒト胸腺細胞はさらに細かなサブセットに分かれると思われる。また、獨協医科大学で得られたヒト胸腺検体はいずれも高齢であったため、教科書的な胸腺の構造が失われており、今回見出された胸腺上皮細胞サブセットが皮質胸腺上皮細胞なのか、髄質胸腺上皮細胞なのかも不明瞭であった。

(2)新規髄質胸腺上皮細胞サブセットmTEC1とmTEC2の機能の解析。

シクロスポリン A 投与ラットは投与日数に相関した髄質の縮小を見せた。それに応じ、mTEC1 と mTEC2 は減少したが、mTEC1/mTEC2 比はコントロールラットに比べシクロスポリンA投与ラットで有意に低くなり、シクロスポリンA投与により特にmTEC1が抑制されることが明らかとなった。

シクロスポリンA投与ラットの末梢リンパ節からT細胞を単離し、同系ラットの樹状細胞に対してMLRを行ったところ､コントロールラットに比べて有意に高い細胞増殖を見せ、自己免疫の増強を示唆した。また予備検討ではシクロスポリン A 投与ラットでは制御性 T 細胞が特に減少することが明らかとなっていたため、これが自己免疫応答の増強の原因かを検証するために制御性T細胞を除いたMLRを行ったところ、制御性T細胞の関与は部分的であること明らかとなり、シクロスポリンAにより自己応答性のT細胞が増えることが示唆された。

自己応答性 T 細胞の増加と T 細胞受容体のセグメント発現比率の関係をリアルタイムPCRで調べるため、ラットのVbセグメント全24種に対するプライマーを設計し、非特異的検出を防ぐためにPCRの条件決定のための試行を繰り返し、安定的にPCR反応を行える系を構築した。現在、この系を用いた解析を進めるため、シクロスポリン投与動物やMLR後のウェルからのT細胞をセルソーターを用いて単離し、RNAサンプルを得る作業中である。

教科「情報」教員の採用・配置に対する学校現場の意識
－「生きる力」を育む情報教育の推進に向けて－

秀明大学　学校教師学部　中園　長新

1. 研究の目的

本研究では、教科「情報」教員の在り方、特に採用と配置について学校現場がどのような意識を持っているのかを明らかにすることで、情報教育推進のために教員人事の面からどのような働きかけが可能であるか検討することを目的とする。学校現場が教科「情報」教員の採用・配置を肯定的にとらえているのか、あるいは否定的であるとすれば、それは何に起因するものであり、改善するためには何が必要となるのかを明らかにすることで、教科「情報」担当教員および教科そのものの存在意義を高め、情報社会を生きる子どもを育てる教育の質向上に寄与できる点に有用性がある。

1999（平成 11）年の高等学校学習指導要領改訂で普通教科「情報」（必履修）が新設され、2009（平成 21）年改訂の現行学習指導要領および 2018（平成 30）年改訂の次期学習指導要領においてもその重要性は継承されている。しかしながら現在に至るまで、教科「情報」担当教員の採用は十分になされてはいない。教科「情報」の教科担任の現状を調査した先行研究においても、教科「情報」において臨時免許状や免許外教科担任の制度による担当が、他教科と比べて多いことが指摘されている。教科「情報」の専任教員採用が進まない背景には、教科「情報」やその担当教員を軽視する意識の問題が潜んでいる可能性がある。

教科「情報」を核とした情報教育は「生きる力」の重要な要素のひとつである。本研究では教科「情報」教員の採用と配置について、学校現場がどのような意識を持っているのか、高等学校等の学校現場への質問紙調査で明らかにした。

2. 研究の計画・方法

情報教育に携わる学校現場の意識を把握するため、本研究では高等学校ならびに中等教育学校後期課程（以下、高等学校等という）における教科「情報」の担当教員を対象とする。文献調査では、既存の調査や先行研究等から教科「教員」教員の採用試験実施状況を確認し、現場の教員が置かれている現状を把握する。質問紙調査では、高等学校等で教科「情報」を担当する教員に対し、主観的な意識を回答してもらう。

(1) 文献調査

①各都道府県教育委員会が公開している教員採用試験情報を参照し、高等学校教科「情報」の教員採用状況を調査する。

②先行研究や調査結果を参照し、文献調査①で得られた調査結果を補完する。

(2) 質問紙調査

①A県およびB県の高等学校等633校に質問紙を郵送し、教科そのものや教科を取り巻く状況等について、教科「情報」担当教員の意識を調査する。

②今後の研究への接続を企図し、各学校において実践されている授業についての資料（年間計画等）を提供していただく。なお、本研究においてこの資料は調査結果を補完する目的で用いるものとする。

3. 研究の特色

本研究は、学校現場における教員の「意識」そのものを研究対象とすることに特色がある。先行研究において教育制度の在り方を論じる際は、制度そのものの変遷や成立過程、あるいは運用による結果と課題等を明らかにするものが主であった。しかし、制度を運用するためには運用にあたる現場の意識が重要であり、現場の意識が低ければ、制度は適切に運用されないことが危惧される。本研究で対象としている教科「情報」担当教員の採用・配置は、まさにそのような「制

度と現場の意識の乖離」によって適切な運用がなされていない事例と考える。高等学校等における必履修教科でありながら専任教員が少なく、臨時免許状や免許外教科担任を多用している現状では、我が国の後期中等教育の質の低下を招きかねず、「生きる力」の要素のひとつである情報活用能力の育成に支障を来すことが懸念される。情報活用能力の育成（情報教育）推進のためには、現場の意識そのものを改革していく必要があるが、本研究はその第一段階として、現在の現場の意識を明らかにする点で萌芽的であり、他に類を見ない独創的な研究である。

4. 研究の成果

(1)教科「情報」担当教員の採用状況

教科「情報」の教員採用が開始された 2003 年度（2002 年夏実施）から、最新の 2018 年度（2017 年夏実施）までの教員採用試験について、各都道府県の採用状況を調査した。政令指定都市等で独自の教員採用を行っている自治体もあるが、高等学校等を持たない自治体もあるため、今回は 47 都道府県のみを調査対象としている。調査の結果、47 都道府県中 13 自治体が、これまで一度も教科「情報」専任教員の採用を実施していないことが明らかになった。その他の 34 自治体は採用実績があるものの、長期間にわたって採用を継続している自治体は少ない。各年度の採用実施自治体数は一定ではないものの、2005 年度以降は 12～18 自治体の間を推移しており、おおむね横ばいである。最新情報となる 2018 年度については、18 自治体のみが採用を行っていることが明らかになった。

教科専任が不在である学校では、他教科の教員が兼任したり、非常勤講師等が担当したりしていることが考えられる。兼任や非常勤講師を否定する必要はないものの、教科専任教師ならではの教育の質向上が難しい可能性が考えられる。

(2)教科「情報」担当教員の意識

調査した意識の中から特に、教科「情報」に理解や支援について期待すること、要望したいことについて分析を行った。その結果、管理職、他教科教員、自治体・国（文部科学省）に対する様々な意見が明らかになった。

①管理職に対する期待・要望

管理職に対しては、教科「情報」の重要性・必要性理解、教科「情報」教員が校内ICT管理者であるという認識の払拭（教科に専念できる環境）、研修会の実施・充実等の期待・要望が見いだされた。学校のトップが教科「情報」を正しく理解することが、意識改革の第一歩といえる。

②他教科教員に対する期待・要望

他教科教員に対しては、教科を超えた協力体制・連携の模索、各教科でのICT活用の推進、TTとしての協力、情報モラルの向上等が確認された。教科の縦割りではない連携協力を期待する一方で、他教科教員に対しても情報モラル等の知識向上を求める声があった点は興味深い。

③自治体・国（文部科学省）に対する期待・要望

自治体・国（文部科学省）に対しては、特に多くの期待・要望が寄せられた。教科専任教員の採用を義務化し、情報免許のみで採用試験受験可能にすることは行政として急務と考えられる。また、大学できちんと「情報」を学んだ者を採用することへの要望等、教員の資質向上に関するものも多く見受けられた。また、補助金等予算面の支援、設備の充実、研修会の実施・充実等に関しても、教育委員会等の行政が主導することで充実を図ってほしい旨の要望があった。

オリンピック・パラリンピック競技に共通する誤認知の研究

学習院大学　計算機センター　安部　健太

1. 研究の目的

本研究では、スポーツ場面を対象に広く浸透している信念を調査し、その事象が誤認知であるか分析し、誤信念が生起するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

(1)研究 1 では、オリンピック・パラリンピックの複数の競技に共通して認知されている信念について調査することを目的とした。

(2)研究 2、3 では、調査した信念が正しい事象か明らかにするため、実際のデータを収集して比較を行った。信念の通りの現象が起きていない場合には、実際の結果とは相反するデータが得られることが期待された。

2. 研究の計画・方法

(1)オリンピック・パラリンピック競技に共通する誤認知（研究 1）

信念の調査にあたっては、新聞記事において結果の因果関係に言及している内容を調査し、最も指摘される頻度の高い信念を対象とした。具体的な記事としては、「××が起きたから□□の結果となった」というように、因果関係が指摘される文章を調査した。新聞記事の調査から、スポーツ選手の会見では、「勝てたのは皆さんのお陰です」という発言がしばしばなされる。これはボート競技の国内トップ選手にもあてはまり、2017 年 11 月に開催された第 85 回全日本選手権大会で優勝した実業団ボート部の漕手は「皆様の応援のおかげで、レースでは 200%の力が出ました！」というコメントを残していた。そこで研究 2、3 では、観衆が選手のパフォーマンスに与える影響について検討することを目的とした。

(2)競技経験者を対象とした調査（研究 2）

研究 2 では、ボート競技の経験者を対象に、観衆の声援の影響についての信念を尋ねる質問紙調査を実施した。対象は都内の私立一貫校のボート部に所属する高校生、大学生、卒業生だった。研究 2 で採用した調査質問紙は、無記名方式によるフェイスシートと参加者の信念を測定する質問項目から構成した。質問項目には「あなたは競技中に岸から声援を送る人がいることで、漕手のパフォーマンスが良くなると思いますか」などが含まれていた。

(3)実際の競技結果による分析（研究 3）

研究 3 では、観衆の影響が実際に認められるか検討するため、実際の結果を対象に分析した。

無観客試合を対象とした報告の結果は一貫しておらず、いずれも外的要因に左右される状況下でのスキルが求められる競技が対象とされた（たとえば Moore & Brylinsky, 1993; 安部, 2017)。オープンスキル競技では、相手選手との関係性によっても影響を受けてしまうため、外的要因に左右されない状況下で発揮されるクローズドスキル競技を対象とした研究が求められる。

当初は特定した誤信念が浸透している原因を特定し、その過程を明らかにすることを目的とし、映像刺激を用いた実験を行うこと計画していた。調査の中で、国内ボート競技の主要大会開催にあたっては、2013 年に施行された特別ルールによって観衆(伴走者)の制限がなされた(Figure 1 参照)。スポーツ競技の試合を観衆が観戦するのは一般的であり、純粋な観衆の影響を分析する研究は難しく、大多数の先行研究が観衆の人数や密度に注目してきた。

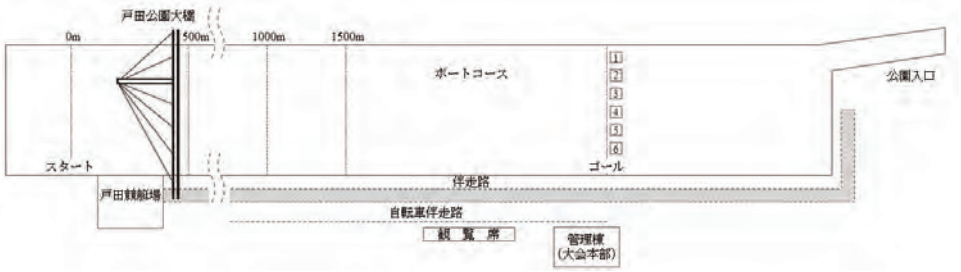


Figure 1. 戸田ボートコースの模式図、自転車伴走路の使用する台数が制限された。

非実験的な環境において、観衆によるパフォーマンスへの影響を比較する最適なケースといえる。そこで本研究では、ボート競技の特別ルールについて確認したことから、実際の競技結果を対象とした調査を実施した。

3. 研究の特色

東京オリンピック・パラリンピックのボート競技開催にあたっては、会場の選定にあたって課題が浮き彫りになった。最終的に東京オリンピックのボート競技は、東京港中央防波堤内側及び外側埋立地間の水路に新しく整備される海の森水上競技場での開催が決定した。会場の選定にあたってはメディアをとおして競技関係者以外にも注目された。本研究の成果は、会場を新設することに伴う対策についても示唆する成果が期待された。

4. 研究の成果

(1)競技経験者を対象とした調査

研究 2 では、ボート競技の経験者を対象に、観衆の声援による影響を信じているか、質問紙調査を実施した。分析の結果、競技経験者は役割にかかわらず観衆の声援によって漕手のパフォーマンスが向上すると信じていることが認められた。

メディアに対する発言から、スポーツ選手の発言は、日本人の文化規範的な背景に基づくといえる。そして「声援のお陰で」、「声援を送ったから」勝ったというもっともらしい事実は、声援とパフォーマンスの関係を支持する情報として集積され、信念が構成されたと考える。

(2)実際の競技結果による分析

研究 3 は、実際の競技結果から観衆の影響について検討するため、特別ルールによる観衆の大小が比較できた全日本選手権大会を対象に分析を行った。

分析の結果(Figure 2 参照)、0m～500m 地点間において、特別ルール施行後、すなわち伴走者が制限されたほうが特別ルール施行前よりも速いタイムが認められた。この結果は、男子種目と女子種目に共通していた。特別ルール施行前後に競技会場となったボートコースの周囲の環境に大きな変化はなく、特別ルールの施行による伴走者の制限が、パフォーマンスに影響したものと推測される。

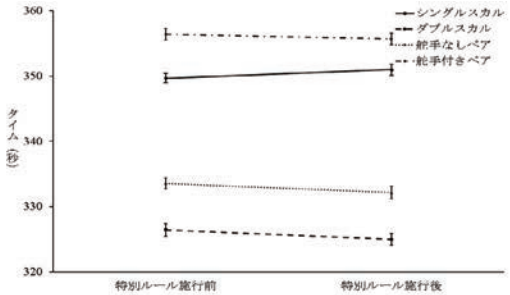


Figure2. 分析結果の一部。

前述のとおりボート競技は新設される海の森水上競技場に決定した。東京オリンピックの会場には、ゴール地点付近に主要観客席が設置されるほか、1000m 地点からゴールラインまでに観戦エリアが建設中である。ゴール付近のメインスタンドに 2 千人、バックスタンドに 1 万人の観客席が設けられ、多数の観衆が見込まれる。ホームゲームであっても、観衆がネガティブな影響を与えるかもしれない点に留意する必要がある。

(3)本研究の課題

①研究２の限界として、有効回答率が6%であり経験者の信念を十分に表せていない可能性がある。実験は母集団に周知した上での調査であったが、参加者数が少ないため、実際よりも過大評価された可能性を考慮する必要がある。

②研究３においては、出場選手のレベル差を考慮して、出場するために制限を設けている種目に限定した。ボート競技に広範的にあてはまる研究成果であることを示すためにも、今後のルール変更があれば追加の分析が必要といえる。

(4)主な発表論文

①Abe, K. (2017a). Investigation of the significance of sports participation for rowing. 2017 *International conference, education, psychology, learning*, 88.

②安部健太 (2017b). ボート競技における声援の効果の信念と実際の結果 日本心理学会第79回大会発表論文集, 1046.

RNA の新機能の解明
－バイオフィルムによる細胞外 RNA の捕捉メカニズムの解明－

東京慈恵会医科大学　医学部　千葉　明生

1. 研究の目的

細菌はバイオフィルムと呼ばれる構造体を形成し、環境からのストレスや宿主免疫、抗菌薬などに対する抵抗性を獲得する。バイオフィルムは一度形成されると完全な除去は困難であり、医療の現場では、黄色ブドウ球菌などが形成したバイオフィルムが原因となる難治性感染症であるバイオフィルム感染症が問題となっている。この感染症に対しては有効な治療法がないため、時に感染巣の物理的な除去といった侵襲性の高い治療が行われており、新規の治療・予防法の開発が喫緊の課題となっている。現在、世界中でバイオフィルム感染症の治療・予防法の開発のため、バイオフィルム形成メカニズムの解明に向けた研究が展開されているが、バイオフィルムの構成成分ですら、未だに全容の解明には至っていない。

申請者はこれらの難問を解決するために、バイオフィルムから細菌の細胞外のタンパク質、核酸、多糖などのバイオフィルムマトリクスのみを簡便かつ迅速に抽出する方法を開発した（Chiba et al. *Microb Biotechnol* 2015）。この手法により黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリクス内、つまり細胞外に RNA が存在することを発見した。形成されたバイオフィルムは RNA 分解酵素で処理をすることで分解されたため、RNA がバイオフィルムの構造維持に重要な成分であることを見出した。しかし、バイオフィルム内で、なにが RNA を保持しているのか、どこに RNA が局在しているのか、どんな塩基配列の RNA なのか、といった点は明らかではない。本研究は、これらを“バイオフィルムによる細胞外 RNA の捕捉メカニズム”と捉え、その解明を目的とする。本課題を遂行することで将来的には、RNA を標的としたバイオフィルム感染症対策の開発に繋がる新しい知見を得ることができる。

2. 研究の計画・方法

(1)RNA の捕捉因子の探索

申請者は、ブドウ球菌の臨床分離株のうちバイオフィルム内に細胞外 RNA が存在する株のマトリクスの成分を解析したところ、多くの株で多糖が主要な成分であった。以上から、多糖が細胞外 RNA の捕捉に関連していることが示唆された。そこで、多糖と RNA の結合の有無を調べる。バイオフィルムマトリクス内の多糖以外の成分を酵素処理で分解し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより多糖を精製する。RNA は、すでに取得している塩基配列の情報をもとに化学合成する。そして、表面プラズモン共鳴法により多糖と RNA の結合能を評価する。

(2)バイオフィルム内の RNA の局在と機能の解析

化学合成によって蛍光色素を標識した RNA を培地に添加する。そこで形成されたバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡で観察し、3 次元画像による詳細な RNA の局在を調べる。さらに、他のバイオフィルムの構成成分を含めた多重染色を行い、RNA との共局在の観察することで結合する因子の推定も可能となる。つまり、局在が一致する因子に関しては、RNA の捕捉に関連している可能性がある。捕捉に関連すると考えられる因子に関しては、上述の方法で RNA との結合能を評価する。

(3)RNA 捕捉機構の普遍性の解析

細胞外 RNA の塩基配列の特徴を調べるために、バイオフィルムマトリクスから精製した細胞外 RNA の塩基配列情報を次世代シーケンサーによって取得する。得られたデータは、黄色ブドウ球菌のゲノムをリファレンスゲノムとしてマッピングを行う。また、特徴的な

塩基配列については化学合成を行い、培養液に添加し、その促進効果について検討する。

3. 研究の特色

細胞外 RNA については未知の点が多いが、近年になり真核生物を中心に細胞間の情報伝達などの機能が明らかになりつつある。しかし、細菌の細胞外 RNA については、分泌小胞を介した分泌機構などが報告されているが、RNA そのものの機能については分かっていない。申請者は、細菌が RNA をバイオフィルムの構成成分として利用するという RNA の新しい機能を見出した。今後、細菌の細胞外 RNA の塩基配列の特徴を見出せればバイオフィルム形成における普遍性的な分子メカニズムの解明に繋がる。

本研究によりバイオフィルム形成メカニズムの一端を明らかに出来れば、RNA を標的とした新しい概念のバイオフィルム感染症対策の開発に繋がる。すわなち、RNA アプタマーやアンチセンス RNA に抗菌活性のある化合物を結合させた高い選択性の抗菌療法の開発が可能になる。また、診断を目的として、特定の塩基配列の RNA を検出・測定によるバイオフィルム形成細菌のマーカーとしての利用などさまざまな波及効果があると考えられる。さらに、病原性細菌だけでなく、自然界に存在する細菌のバイオフィルムへの応用によって、医療だけでなく、食品の安全や清潔な飲料水の確保などにも貢献できる。

4. 研究の成果

(1) 細胞外 RNA の捕捉因子の同定

多糖と RNA の結合を表面プラズモン共鳴法で解析した。アナライトとしてバイオフィルムマトリクス中に存在する多糖をゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。取得した細胞外 RNA の塩基配列解析をもとに、化学合成した RNA をリガンドとした。その結果、RNA と多糖が結合できることを確認した。また、バイオフィルム内での RNA の局在観察のため、細胞外 RNA の塩基配列をもとに蛍光標識化 RNA を合成し、培養液中に添加し、そこで形成されたバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡観察した。その結果、RNA は多糖と共局在していた。また、菌体周囲にも RNA による蛍光が観察されたため、菌体周囲の構造であるタイコ酸も RNA の捕捉因子として考えられた。そこで、タイコ酸合成遺伝子欠損株を作成し、バイオフィルムの観察したところ、RNA の局在がなくなった。さらに、多糖同様に、表面プラズモン共鳴法により、タイコ酸をアナライトとし、RNA との結合を確認した。以上は、RNA のバイオフィルム内の捕捉には、多糖とタイコ酸が重要な因子であることを示している。

(2) 細胞外 RNA の構造の特徴

次世代シーケンサーで取得した細胞外 RNA の塩基配列を、黄色ブドウ球菌をリファレンスゲノムとしてマッピングすると、tRNA や rRNA といった二次構造を形成しうる RNA の位置に集中した。このことから、細胞外に存在するためには 2 次構造の必要性が示唆された。さらに、データをもとにいくつかの RNA を化学合成しバイオフィルムの形成促進効果の有無を調べた。その結果、2 次構造の形成できない RNA では促進効果がないこと、ウラシルの存在が促進に重要であることが分かった。以上は、細胞外 RNA とバイオフィルム形成の関係で、塩基配列の特徴を示した新規の知見である。また、一定の条件を満たす RNA であればバイオフィルム形成を促進できることを示唆し、実際にヒト血液から抽出した RNA もバイオフィルム形成を促進した。これらの結果は、黄色ブドウ球菌は感染宿主の RNA も利用しバイオフィルム感染症の発症に寄与している可能性を示している。

ドイツ上場企業における指名委員会の独立性に関する研究

創価大学　経営学部　村田　大学

1. 研究の目的

(1)問題意識

これまでドイツにおける共同決定制度と二層式の取締役会構造の下での取締役会改革の展開の不明を問題意識としてきた。本研究では、コーポレート・ガバナンス改革の根幹の１つといわれる後任の取締役の指名機関たる指名委員会の展開の解明に取り組んだ。

(2)指名委員会の一般的な目的

企業の支配者である経営者から独立したプロセスで後任の経営者を指名すること。

(3)研究課題

研究開始時は、指名委員会の一般的な設置目的に鑑み、指名委員会構成員の出自からドイツの指名委員会の独立性を解明していくことを課題とした。しかしながら、本研究計画を遂行していく中で、またその他の研究の成果もあり、ドイツでは指名委員会の独立性よりも共同決定制度の維持が重視されることが判明した。そこで、ドイツの指名委員会の独立性の根幹にかかわる、ドイツにおける共同決定制度の指名委員会の独立性に対する優先状況の解明を最重要課題とし、研究を進めた。すなわち、「共同決定完遂のためならば指名委員会の独立性など問題ではない」という状況が明らかになれば、ドイツの指名委員会の性格に対する認識を、コーポレート・ガバナンスの研究者は根本から見直さなければならない。

2. 研究の計画・方法

(1)当初の研究計画の修正

指名委員会構成員の出自を表にまとめることでその独立性を解明していこうとした当初の計画を修正し、共同決定制度と指名委員会の関係の分析を優先した。

(2)制度分析

共同決定制度と指名委員会の関係を、制度分析によって解明していく。指名委員会の権限を問うことで、制度設計の段階での指名委員会の機能性を論じることができる。

(3)企業の経営行動の分析

共同決定制度と指名委員会の関係を、企業における指名委員会の展開を分析することで解明していく。分析対象企業は、DAX（30 社）、MDAX（50 社）、TecDAX（30 社）の銘柄企業 110 社である。

(4)文献サーベイ、ピア・レビュー、インタビュー

文献サーベイ、ピア・レビュー、インタビューの実施による、研究の体系化、考察の充実化を図った。これらは、上記の研究計画の修正、研究成果報告のまとめなどにおいて、大きな助けとなった。

3. 研究の特色

(1)ドイツの監査役会内委員会に焦点を当てた研究は、わが国では十分になされていない。

(2)とりわけ、本研究は（資本家側代表監査役の）指名委員会に焦点を当てるものであり、この試みはまれなものといってよい。

(3)従来の取締役会内委員会の国際比較の研究は、その制度や設置率の比較が中心であったが、本研究ではその背景にある文化的、社会的、制度的要因にかなり踏み込んだ考察を行った。

(4)指名委員会の普及は、わが国のコーポレート・ガバナンス改革の主な課題の１つであり、わが国との制度比較にまで踏み込むことで、わが国のコーポレート・ガバナンス改革の在り方の模索も視野に入れた研究である。

4. 研究の成果

(1)「日本とドイツにおける取締役会内委員会の現状比較」

①学会名：2018 KJEM Spring Economics Joint Conference

※KJEM：The Korean-Japanese Economics & Management Association

（招聘報告）

②開催校：江原大学校（韓国）

③日時：2018年2月2日

④主な内容

ドイツの指名委員会の制度分析上の研究成果の一部をまとめ、日本とドイツにおける取締役会内委員会の現状を比較した。以下は、予稿集より、本研究テーマと直接関係のある内容をまとめたものである。

ドイツでは、共同決定制度、すなわち企業の意思決定は、資本家と労働者が共同で行う。これは、監査役会内委員会を含めたあらゆる面で監査役会制度の前提となっており、企業における展開もこれに従うものである。監査役会の決定権のうち監査役会に移譲してはならない権限も法律で規定されている。執行役ならびに執行役会会長の任免権、執行役の報酬決定権、株主総会への監査結果報告権などである。そして、監査役報酬の決定権は、その割り当て権も含め、監査役会にはない。したがって、ドイツでは、監査役報酬においても執行役報酬においても、日本のように報酬決定権を持った報酬委員会を設置することはできない。

ドイツでは、共同決定こそが企業の意思決定に関する政策、法律、制度、仕組み、そしてそれらの実践における大前提である。共同決定が企業決定のゆるがぬ根幹であり、その下では、労働者側代表監査役よりも（一般）株主のための独立監査役（諸外国の独立取締役に相当）の権限を高めようとすることは不可能である。

また、ESG投資の世界的広がりなど、株主たる機関投資家は資金提供者である一般市民のために行動する動きが高まってきている。このような中で、ドイツでは、既に株主総会での議決権行使やステークホルダーからの圧力を超え、より企業の意思決定の中枢である監査役会レベルでステークホルダー（労働者）が経営参画している。これらの状況から、ドイツにおいて今後も独立取締役の議論が諸外国程活発化していくことは起こりにくいと思われる。

(2)「ドイツ上場企業の監査役指名委員会と共同決定制度」

①学会名：経営行動研究学会第28回全国大会

②開催校：日本大学経済学部

③日時：2018年8月4日（予定）

④主な内容

ドイツの指名委員会の企業の経営行動分析上の研究成果の一部をまとめたものである。DAX（30 社）、MDAX（50 社）、TecDAX（30 社）の銘柄企業 110 社における現状を分析した。以下は、予稿集より、本研究テーマと直接関係のある内容をまとめたものである。

第 1 の課題は、指名委員会について規定したドイツ・コーポレート・ガバナンス規範（Deutscher Corporate Governance Kodex, 以下 DCGK と表記）の原則の非準拠状況を解明することであった。指名委員会の設置率は DAX30 社で 10 割、MDAX50 社で 9 割、TecDAX30 社で 7 割であった。企業規模が大きいほど、指名委員会の設置率が高い。

しかし、指名委員会を設置しているからと言って、これが DCGK の求める指名委員会の勧告に則ったものであるとは限らない。第 2 の課題は、各社の指名委員会について規定した DCGK の原則の非準拠理由を分析し、労働者側代表監査役をメンバーに含む指名委員会の設置状況を解明することであった。

労働者側代表監査役を含めているために準拠していない企業は 3 社ある。これら 3 社ともに、銀行であり、そして共同決定制度への配慮から労働者側代表監査役を含んでいない。2014 年改正ドイツ銀行法は、規模や活動の範囲等に応じて、（執行役の）指名委員会の設置を義務付けている（2016 年ドイツ銀行法第 25d 条第 7 項および同第 11 項）。そ

して、この指名委員会は、監査役の指名の兼務が可能である。

非準拠企業 3 社は、執行役の指名プロセスにおける共同決定の実現を DCGK の遵守よりも優先し、それゆえに準拠していないのである。さらに、このうちの 2 社が、資本家側代表監査役の指名は、資本家側代表監査役の指名委員会メンバーのみによってなされると明記している。このことは、資本家側代表監査役の指名プロセスに、労働者側代表監査役が関与しないことをステークホルダーに説明しているということである。

(3)研究の考察

ドイツの指名委員会は、制度設計上もその実践上も、共同決定制度の存在故に、経営者を監視するため、すなわちコーポレート・ガバナンスのための制度としての性格がかなり弱い。ドイツの企業の意思決定は共同決定制度を根幹とし、いまだどのような取締役会改革も共同決定制度を揺るがすものとはなっていない。このことは、ドイツの監査役会では、経営者の監視強化よりも共同決定の維持が優先されていることを意味し、それゆえに指名委員会もまた共同決定の維持の方が優先される。その結果、DCGK における指名委員会は資本家側代表監査役の指名過程からの労働者側代表監査役の排除を明確化したものに過ぎず、そしてこの委員会が共同決定制度を侵害する際には DCGK の原則には準拠しないという事態が起きている。

アシネトバクター バウマニの好中球機能撹乱作用の研究 —新規細菌移動メカニズムの解析—

帝京大学　医学部　鴨志田　剛

1. 研究の目的

(1) *Acinetobacter baumannii* は、自然界に広く分布する環境菌であるが、いったん院内に定着すると院内感染の原因菌となりやすい。本菌は、薬剤耐性を獲得し易く、多剤に耐性を獲得した本菌は、スーパー耐性菌として近年世界中で問題になっている。通常は無害であるが、易感染宿主に感染した場合は高頻度に肺炎や敗血症を引き起こし、死亡率も高い。このような薬剤耐性菌の問題は、先の伊勢志摩サミットでも重要議題として話し合われ、日本のみならず世界的に解決が求められている。しかし、新規抗菌薬の開発は現在暗礁に乗り上げており、このままでは、上記のような細菌に対する有効な治療薬がなくなる可能性が極めて高い。そこで、従来の抗菌薬開発や治療戦略とは異なった視点からの新規感染症治療戦略の開発が求められている。

(2) 我々はこれまで、*A. baumannii* と好中球の相互作用を研究してきた。その結果、*A. baumannii* は好中球に貪食されにくく、好中球機能を撹乱し、感染防御機構を回避していることを報告した。 さらに、*A. baumannii* が好中球に接着し、好中球をタクシーのように利用することで高い浸潤/移動能を獲得する新規細菌移動メカニズム“Bacterial immunity taxi”の存在を世界にさきがけて明らかにした（Kamoshida et al., *J Leukoc Biol*）。このように *A. baumannii* は、宿主免疫細胞の生体防御機構を回避し、逆に利用することで敗血症、感染拡大を引き起こすことを示した。本研究では、さらに詳しく *A. baumannii* と好中球の相互作用を解析し、*A. baumannii* の新規病原性の解明とその性状の詳細を明らかにすることで、*A. baumannii* 感染症の新規治療、感染制御の開発に繋げることを目的とする。

2. 研究の計画・方法

(1) 近年、好中球がこれまで知られていたような感染防御機構に加え、核の放出を伴う細胞死を引き起こし、好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular traps: NETs）とよばれる網目状のトラップを形成し、効率よく細菌を捕捉し、殺菌するという生体防御機構が明らかとなった。これまで多くの病原性細菌で NETs 形成を誘導することが示されてきたが、その抑制作用はほとんど報告されていない。これまでの我々の研究から、*A. baumannii* は、様々な宿主免疫回避機構を有していることが考えられる。そこで本研究では、*A. baumannii* の NETs 形成に与える影響を検討した。

(2) 好中球を NETs 誘導剤の 1 つであるホルボール 12-ミリスタート 13-アセテート（PMA）で 3 時間刺激し、NETs 形成を誘導した。その際、好中球を *A. baumannii* と共培養することによって、*A. baumannii* の NETs 形成に与える影響を評価し、解析した。

3. 研究の特色

(1) 抗菌薬の発明により、20 世紀で人類が勝利したかに思えた感染症問題だが、21 世紀になり、再び世界的な問題になっている。これまでのような病原体をターゲットにした抗菌薬開発では、有効な抗菌薬が出来ても、すぐにまた耐性菌が生まれてしまい、人類と菌の“いたちごっこ”は終わらない。*A. baumannii* は近い将来有効な薬剤がなくなる可能性の極めて高い細菌である。 欧米に比べると、日本国内での多剤耐性菌株の検出はまだ稀であるが、国際化の進む昨今、いつ大規模なアウトブレイクが起こっても不思議ではない。実際、本学附属病院では 2010 年に多剤耐性 *A. baumannii* のアウトブレイクを起こし社会問題となった経緯もあり、我々が日本での研究をリードしなければならないと考えている。 また、薬剤耐性アシネトバクター感染症は、2014 年に 5 類定点報告疾患から 5 類全数報告疾患に変更され、

日本でも注視され始めている。

(2)*A. baumannii* は薬剤耐性が問題になっているため、耐性獲得機序や抗菌薬の使用方法ばかりが注目され研究されているが、これでは根本的な解決には至らない。*A. baumannii* が高い免疫回避能を有し、逆に宿主細胞を利用し感染拡大を引き起こす“Bacterial immunity taxi”は、我々が世界にさきがけて証明した新規病原性であり、本菌感染症の新規治療戦略のターゲットとして期待できる。

(3)好中球の NETs 形成に対する細菌の作用については、これまで多くの病原性細菌で NETs 形成を誘導することが示されてきた。近年、興味深いことに、プロバイオティクス細菌である *Lactobacillus rhamnosus* が、好中球の活性酸素産生を抑えることによって NETs 形成を抑制することが報告された。しかし、未だ病原性細菌による NETs 抑制作用は報告されていない。

(4)細菌-宿主細胞の相互作用は細菌感染において非常に重要であるが、これまで理解に乏しく、それら相互作用をターゲットとした薬剤の研究/開発は数少ない。従って、本研究の成果がこれまでにない感染症の治療戦略の開発に繋がることが期待できる。さらに、これまでの菌自体をターゲットにした治療法とは異なる作用点をターゲットとするため、現在世界中で問題となっている薬剤耐性菌の出現も抑制できる。

4. 研究の成果

(1)本研究では、*A. baumannii* が好中球の新規感染防御機構である NETs 形成に与える影響を解析した。その結果、好中球を *A. baumannii* と共培養することによって、PMA 誘導性の NETs 形成が阻害されることが明らかとなった。この NETs 阻害作用は、本学附属病院で分離された多剤耐性 *A. baumannii* でも認められたが、加熱およびホルマリン処理による死菌体、また同じアシネトバクター属菌でも *A. calcoaceticus*、*A. haemolyticus* など他の菌種では認められなかった。このことから、我々は生きた *A. baumannii* に PMA 誘導性の NETs 形成を阻害する新規病原性を見いだした。

(2)次に、この NETs 阻害のメカニズムを明らかにするため、好中球の接着に注目し解析した。その結果、好中球の接着能は、PMA で刺激することによって増強するが、*A. baumannii* との共培養によりその接着増強が顕著に抑制された。 さらに、この接着抑制には、好中球の細胞表面に発現する細胞接着分子 CD11a (LFA-1) の発現変化を本菌が抑制することが重要であることも明らかにした。

(3)これまで多くの病原性細菌が NETs 形成を誘導することが報告されてきたが、その抑制作用は報告がなく、本研究は、病原性細菌が NETs 形成を阻害することを示した最初の報告である。

(4)また、今回の研究で驚くべきは、*A. baumannii* が、NETs を阻害することで、好中球の寿命を延長させた点である。我々はこれまで、*A. baumannii* が好中球をタクシーのように利用することで生体内を移動し、敗血症や感染拡大を引き起こす新規細菌移動メカニズム“Bacterial immunity taxi”を明らかにし、解析してきた。今回新たに明らかになった NETs 形成阻害機構により、生存が延長された好中球を *A. baumannii* が利用し、Bacterial immunity taxi を引き起こしていることが考えられる。今後これら免疫回避機構が感染症の新規治療ターゲットとなることが期待できる。

(5)我々は、この成果を学会発表、投稿論文の形で報告した (Go Kamoshida*, Takane Kikuchi-Ueda, Satoshi Nishida, Shigeru Tansho-Nagakawa, Tsuneyuki Ubagai and Yasuo Ono. Pathogenic bacterium *Acinetobacter baumannii* inhibits the formation of neutrophil extracellular taps by suppressing neutrophil adhesion. *Frontiers in Immunology*, 9, 178 (2018). *Corresponding author)。

酸化ストレス性タンパク質変異を抑制する環状ジセレニドの合成
－フォールディング病治療薬開発を目指して－

東海大学　理学部　荒井　堅太

1. 研究の目的

(1)学術背景

生合成されたタンパク質は小胞体（ER）内で正しい立体構造を構築（フォールディング）することで生理活性を発現する。その際、システイン残基間での酸化的ジスルフィド（SS）架橋が必須であり、この反応は Protein disulfide isomerase（PDI）が促進する（Fig. 1、正常細胞）。しかし、ER 内の活性酸素種（ROS）あるいは活性窒素種（RNS）の除去システムに異常をきたすと、PDI 活性中心のチオール基が酸化的に修飾（-SH→-SX）されて失活し、タンパク質のミスフォールディングを助長する（Fig. 1、異常細胞）（*Nature Lett.*, **2006**, *44*, 513）。ミスフォールド体（以下、MF 体）はアルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症などの致命的な神経変性疾患の原因となると考えられている。

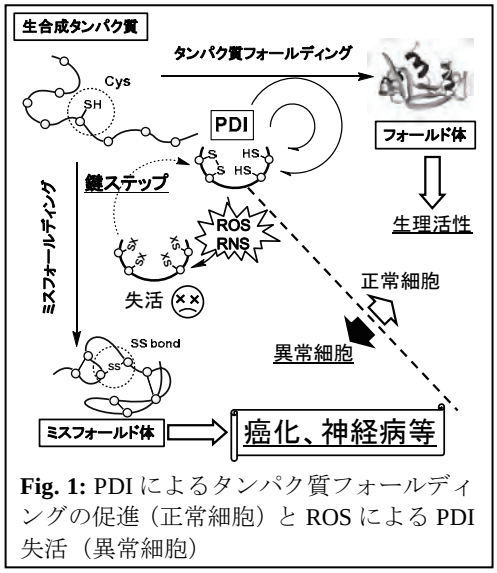


Fig. 1: PDI によるタンパク質フォールディングの促進（正常細胞）と ROS による PDI 失活（異常細胞）

このような疾患への有効な治療・予防薬の開発は超高齢化をむかえる我が国にとって喫緊の課題である。そのために、**Fig. 1** より、ROS や RNS の捕捉・分解、失活 PDI の再活性化の両方を促すような薬理活性を有する分子種を創生する必要があると考えられる。

(2)本研究の目的と取り組み

本研究では、脂肪族環状ジセレニド化合物がフォールディング病の医薬製剤開発において有用な構造モチーフになり得ることを示す。これを達成するために、

①高い還元ポテンシャルを有すると予測される水溶性および両親媒性のジセレニド化合物を合成する。

②合成化合物を ROS および RNS の還元分解と失活 PDI の還元的再活性化反応に応用し、当該化合物の生理作用に関する基礎的な知見を得る。

上記２点に注力し、以下の実験に取り組んだ。

2. 研究の計画・方法

本研究は、大まかに以下の 3 工程に分けて段階的に取り組むことにした。

①環状ジセレニド化合物の合成

②合成したジセレニド化合物の抗酸化活性の評価

③酸化的に失活した PDI の再活性化

①については、当研究室で確立した合成ノウハウを駆使して、官能基や環サイズの異なる環状ジセレニド化合物を合成した。さらに、化合物の細胞親和性も考慮し、長鎖アルキル基を導入した両親媒性化合物へと導いた。②については、すでに当研究室で確立されている GPx（グルタチオンペルオキシダーゼ）様触媒活性測定法を適用した。さらに培養細胞を用い、酸化ストレス性細胞死の抑制効果についても検討を行った。③では、合成化合物を触媒とし、失活型モデル酵素とする *S*-ニトロソ化 PDI（SNO-PDI）の触媒的再活性化反応を行った。反応の進行率を電気泳動によるバンドシフトによって確認するとともに、再活性化反応後の PDI 溶液をリボヌクレアーゼ A の酸化的フォールディング反応に添加することで酵素活性回復率を定性的に評価した。

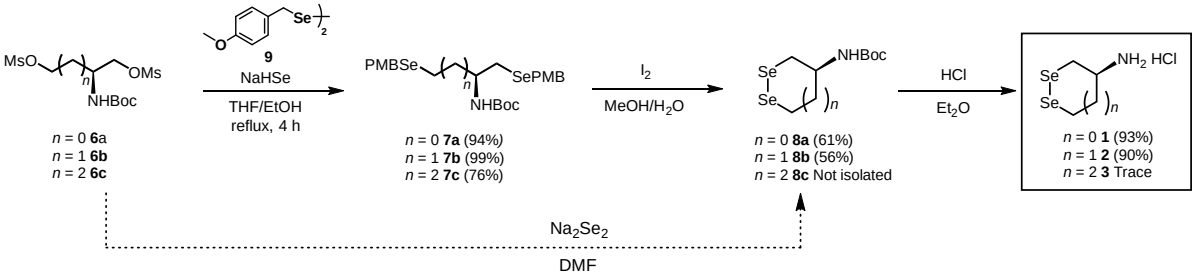
3. 研究の特色

最近、ピペラジン誘導体が認知症モデルマウスの脳内神経細胞に沈着した MF 体（アミロイドβ）を分解することで、認知症が改善されることが報告された（*Nat. Commun.*, **2015**, *7*, 10755）。このように従来は MF 体の直接分解・除去に主眼が置かれてきた。一方で、今日では MF 体生成機構も解明されつつあり、根本のとなる MF 体生成の原因を除去することで、予防、早期治療、再発防止の策を講じることが可能であると考えられる。本研究では従来の世界的な研究動向とは異なる切り口から戦略を築き、「MF 体を生成させない」ポテンシャルを有する新規環状ジセレニド化合物の創生を行う。合成化合物の試験管内生理活性を本研究にて明らかにし、その後は細胞実験やモデル動物実験による薬効検証、将来的には臨床試験まで展開させる。

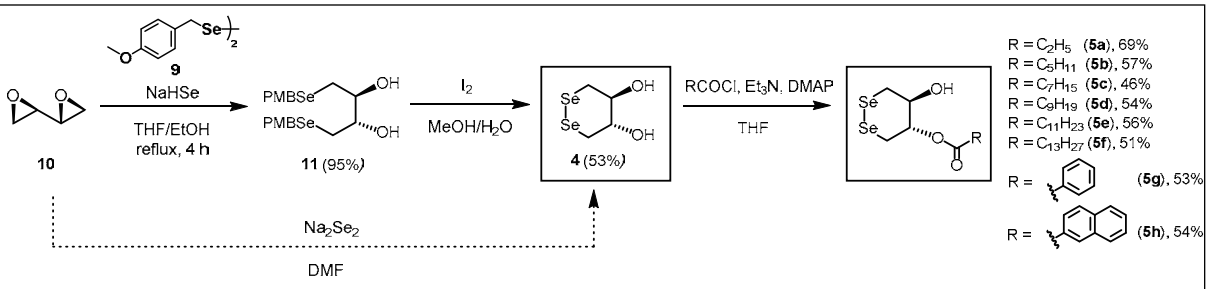
4. 研究の成果

(1) 本研究で合成した化合物

はじめに Scheme 1 に従って、目的化合物 **1**～**3** を合成した。出発物質（**6**）は以前に我々が報告した手法を応用して調製した（*Chem. Asian J.* **2014**, *9*, *3464*）。**6** に対して Na_2Se_2 を反応させることでセレン化と環化反応を同時に行う既知ルートでは、分離困難な副生成物を与えるため効率的ではないことが分かった。そこで、代わりとなるセレン原子ソースとして *p*-methoxybenzyl (PMB) diselenide (**9**)を用いた新規ルートを検討した。**9** を用いて、二つの PMBSe 部位を導入した **7** を得た後、I_2 によって酸化的に PMB 基を脱保護したところ、環化体 **8** を高純度で得ることができた。さらに塩酸処理によって目的物 **2** を得た。ただし、7 員環化合物 **3** は生成物が不安定であり、前駆体 **8c** ともに十分な収率で得ることはできなかった。同様の反応を利用して（Scheme 2）、ジセレニド **4** を合成した。さらに、**4** に対して各種カルボン酸塩化物を反応させることで非イオン性の両親媒性化合物 **5a**～**5h** を得た。本研究成果により分子内ジセレニド結合を有する低分子脂肪族化合物の新しい合成法を開拓できた。



Scheme 1: Synthesis of monoamino cyclic diselenides **1~3** by using $(PMBSe)_2$ as a source of selenium atom.



Scheme 2: Synthesis of cyclic diselenide **4** and its long-chain alkyl group conjugates **5a~5h**.

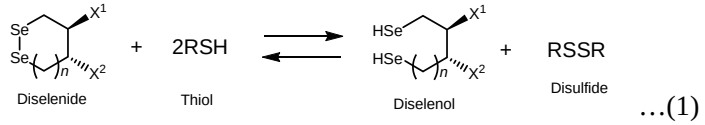
(2) 合成化合物の抗酸化活性

合成した化合物について、水中およびメタノール中での GPx 様触媒活性を評価したが、いずれの化合物も、期待したほどの良好な抗酸化触媒活性を示さなかった。一方、**4** および **5** のリポソーム抗脂質過酸化活性を TBARS 法によって評価したところ、長いアルキル鎖を有するジセレニド化合物（**5c~f**）が優れた抗脂質過酸化活性を有することが明らかとなった。さらにこれらの化合物（**4** および **5**）の酸化ストレス性細胞死の抑制効果について、HeLa 細胞を用いて検証した。培養細胞（1×10^4 個）に 0~100 μM のジセレニド化合物

含有培地中で 37 ℃、5% CO_2 加湿条件下で 15 h 培養した後、0.4 mM H_2O_2 を添加してさらに 3 h 同条件で培養した。MTT 法によって死細胞率を各化合物について測定したところ、その細胞生存率は、より長いアルキル鎖を有するジセレニド化合物で前処理したものほど高い傾向にあり、TBARS 法による抗脂質過酸化活性順位と強い相関関係があることが明らかとなった。つまり、細胞における抗酸化活性の作用機序はリポソーム内のそれと同様のものであると予想される。

(3) 脱ニトロソ化触媒活性評価

PDI は、酸化的フォールディングを触媒する代表的な酸化還元酵素であるが、活性窒素種の一種である一酸化窒素（NO）によって PDI の活性中心におけるチオール（SH）基がニトロソ化されることで、酵素機能を失う。ところで、SeSe 結合はグルタチオンなどのチオール系還元剤（RSH）によって高い還元活性を有するセレノール種（ SeH）へ変換される（eq. 1）。



…(1)

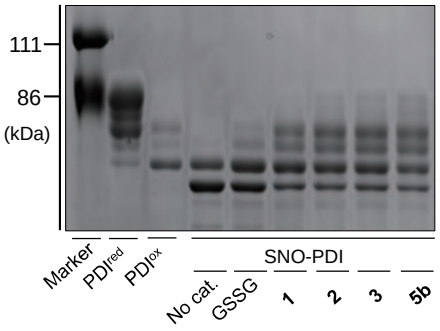


Fig. 2: Gel-band shift assay during the denitrosation of SNO-PDI. $[GSH]^0$=100 μM, $[Catalyst]^0$=50 μM, [PDI]=5 μM at 30 °C, pH 7.5 for 60 min. PDI^{red} and PDI^{ox} mean reduced PDI and oxidized PDI, respectively.

セレノール種は、その高い還元力から SNO 基を SH 基へ変換することが知られている。この特性を利用し、*S*-ニトロソ化した失活 PDI（SNO-PDI）の再活性化におけるを合成化合物 **1**~**4** および **5b** の触媒活性について評価した。触媒量のジセレニド化合物と GSH および SNO-PDI を混合し、一定時間後、脱ニトロソ化によって生じたフリーの SH 基を PEG 化剤でブロックし、SDS-PAGE により反応進行率を観測した（Fig. 2）。いずれのジセレニド化合物も SNO-PDI の脱ニトロソ化に伴うバンドシフトが確認された。現在、SNO 化に起因する小胞体ストレスの緩和作用を細胞レベルで評価中である。

(3) 総括

本研究期間において、当初計画していた前項 2.①～③の検討項目を全て完了した。細胞系および無細胞系の種々の実験により、当該化合物群の薬剤利用を目指すうえでの重要な基礎データを得ることが出来た。

(4) 発表論文

①**K. Arai**†, T. Takei†, R. Shinozaki, M. Noguchi, S. Fujisawa, H. Katayama, L. Moroder, S. Ando, M. Okumura, K. Inaba, H. Hojo*, M. Iwaoka*, Characterization and Optimization of Two-Chain Folding Pathways of Insulin via Native Chain Assembly, *Communications Chemistry*, **2018**, 1, Article number: 26. (doi:10.1038/s42004-018-0024-0) †Contributed equally to this work

②**K. Arai**, H. Ueno, Y. Asano, G. Chakrabarty, S. Shimodaira, G. Mugesh*, M. Iwaoka*, Protein Folding by Water-Soluble Cyclic Diselenides with Novel Oxidoreductase and Isomerase Activities. *ChemBioChem*, **2018**, *19*, pp.207-211.

③P. Verma, A. Kunwar, **K. Arai**, M. Iwaoka, K. I. Priyadarsini, Mechanism of radioprotection by dihydroxy-1-selenolane (DHS): Effect of fatty acid conjugation and role of glutathione peroxidase (GPx), *Biochimie*, **2018**, pp. 122-133.

④**K. Arai***, S. Ueda, S. Tamura, Rapid Electrochemical Conversion of Thiol and Disulfide into Difluoro- and Trifluoromethyl Thioethers in a Microfluidic Reactor. *Curr. Green Chem.*, **2017**, *4*, pp. 137–143.

⑤S. Shimodaira, Y. Asano, **K. Arai**, and M. Iwaoka*, Selenoglutathione Diselenide: Unique Redox Reactions in the GPx-Like Catalytic Cycle and Repairing of Disulfide Bonds in Scrambled Protein, *Biochemistry*, **2017**, *56*, pp. 5644–5653.

『源氏物語』の呼称表現の体系的分析
－物語構築と「語り」に寄与する呼称の研究－

東京女子大学　人間科学研究科　鵜飼　祐江

1. 研究の目的

(1)『源氏物語』の呼称を表現方法として評価する

①『源氏物語』では作中人物を実名で呼ぶことは稀で、官職や家族関係などで呼び分ける。こうした多種多様な呼称表現に注目し、呼称が作中人物たちの心の機微や人間関係を描き出す表現方法となって、物語世界の構築に寄与していることを明らかにする。

②従来の研究は個々の呼称の意味を探るにとどまっているため、体系的に分析することで『源氏物語』の表現方法としての「呼称」の様相を明らかにすることを目的とする。

(2)呼称表現から『源氏物語』の「語り」の特徴を探る

①呼称選択は、誰の視点や心情を反映するかと深く関わり、作品世界を「語る」際の重要な表現手法である。主語を省略した文が成り立ち得る日本語において、人物を呼ぶ「語り」がいかに物語世界の構築に関わるのかを考察する。

②『源氏物語』の主人公は光源氏であるが、むしろ源氏と関わる女君たちにこそ多様な呼称を確認できる。彼女たちの呼称の多くは、源氏の視点や心情を反映して選び取られており、女君たちの呼称を手掛かりに、『源氏物語』が源氏と女君たちの物語をどのように紡いでいるのかを考える。

2. 研究の計画・方法

(1)呼称用例の整理

①呼称用例をデータ化する。一つの呼称、一人の呼称を個別に取り上げるのではなく、呼称という現象の全体像を体系立てて捉え、総合的な分析を目指す。人物毎、あるいは同じタイプの呼称のグループ毎に呼称の用例をデータ化して、『源氏物語』の呼称の総体を体系づける。

②呼称用例を叙述に照らし、個々の呼称がどの立場（語り手、作中人物）に寄り添って選び取られているか、あるいは『源氏物語』固有の呼称がどのような表現を可能としているかを検証する。

(2)物語構築に関わる呼称の分析

①『源氏物語』独自の呼称の型であり、物語に描かれた恋の場面を一語に集約して呼称とする「エピソード型呼称」を有する人物に特に着目し、その人物造型や場面構成、物語世界の紡ぎ方に、呼称表現がどのように寄与しているかを考究する。29年度の研究では、明石の君の「明石」呼称を取り上げる。

②直接的に「語り」に関わる呼称と考えられる「～人」呼称（「恥づかしかりし人」＝光源氏、などの長短の修飾部を伴う「人」呼称）に注目する。「～人」呼称は、光源氏などの作中人物の意識に自在に寄り添う「語り」を可能とする表現方法であるため、修飾部の表現を整理し、分類を試みる。

3. 研究の特色

(1)体系的分析

①これまで漠然と捉えられてきた『源氏物語』の呼称を、「官職」「居所」「家族関係」「人生行程」「場面」「エピソード」「特性」など、何に因むかをもとに独自に分類し、使用傾向や頻度、優先順位、複合の仕方に目を向け、体系的に分析する方法をとる。

②呼称表現の特徴や内実を体系的に分析し位置づけることによって、『源氏物語』の主題とその語り方にまで言及する。

(2)呼称表現の再評価

①従来の呼称研究は、個々の呼称の意味の考究にとどまり、呼称を体系的に分析する意識は希薄であった。本研究は、複数の人物の複数の呼称を相互に関連づけ、多様な呼称から一つの呼称が選び取られることで可能となる、物語世界の「語り」方を分析する点に大きな特色がある。

②体系的な呼称研究は、日本の呼称表現の特徴を掴む作業であり、古典をはじめとする日本の他の文学作品に応用できる。源氏の藤壺への心情を切り取る「限りなう心を尽くしきこゆる人（限りなく深い思いをお寄せ申し上げているお方）」という呼称が、英訳では「Fujitsubo」と訳されるのに比し、関係性や心情の機微を語る多様な呼称表現を利用する日本文学の感性を評価する指標ともなる。

4. 研究の成果

(1)エピソード内容に因む呼称の研究

①明石君の「明石」呼称を取り上げ、『源氏物語』独特の呼称であるエピソード型呼称（物語内容を一語に集約して呼び名とする呼称）の一つとして評価した。研究の成果は、「「明石」という呼称―― 一族の物語を内包する呼称」（原岡文子・河添房江編『源氏物語煌めくことばの世界Ⅱ』、共著（依頼原稿）、翰林書房、2018年）として発表。「明石」呼称は、従来地名に因む呼称として捉えられてきたが、「明石」という一語が呼称となってゆく過程を追うと、源氏の流離と再起の物語を内包するかたちで創作されているものと考えられる。物語を通過することで「明石」が単なる地名ではなく、光源氏の流離と再起の物語、及び明石一族の宿願の物語を内包すること、それが繰り返し使用されてゆく中で、源氏の栄達の鍵となる姫君を生む女君自身の呼称となってゆくことを読み解いた。

②エピソード型呼称の多くは脇役に用いられているが、主要な人物である明石君の呼称と光源氏の人生や宿願が結びついていることは興味深い。同じく主要人物である紫の上の呼称においても、彼女の呼称によって光源氏の超越的なあり方が表現されている様子が読み取れるため、紫の上・明石君両者の呼称のあり方を関連づけて、光源氏の妻たちの呼称のあり方の考察を進めている。更にもう一人、源氏の妻であり主要人物である花散里の「花散里」呼称についても、エピソードを内包する呼称の一つとして読み解けるものと考え、呼称用例の整理に着手している。

(2)「～人」呼称の研究

①『源氏物語』に見られる「～人」呼称に注目して、用例のデータ収集と一覧化の作業を行った。『源氏物語』には約160人に「～人」呼称が用いられ、800余例が確認できる。かなりの用例数がありながら修飾部の多岐に渡る表現については、整理・分類が未だ行われておらず、はっきりとした特徴は明らかにされていない。29年度の研究では、「～人」呼称用例のデータの一覧化を行い、修飾部の分類方法については、内容からの分類、構成からの分類、使用される文の種類からの分類、使用者からの分類など、多層的な分類が可能であるという着想を得た。

②既に確認した用例から、会話文や心中思惟での使用が多いことが認められた。今後は、発話者や発話の受け手、あるいは思考主を特定し、「～人」呼称の対象者を確認する。地の文についても、作中人物の視点に寄り添う文ではないかを検討し、語り手と作中人物の視点や心情の移行と呼称の関わりを整理してゆく。これを踏まえ、「語り」の問題に言及し、『源氏物語』の「語り」の特徴を探る手がかりとしてゆきたい。

GSTP1 特異的活性検出プローブの開発と生物応用

東京薬科大学　生命科学部　分子生物化学研究室　藤川　雄太

1. 研究の目的

グルタチオンS-転移酵素(GST)は、薬物や生体分子の代謝によって生じる活性代謝物をグルタチオン化し、その解毒を担う薬物代謝酵素の一種である。様々なサブタイプからなるGSTのうち、PiクラスであるGSTP1は正常細胞に比べて数多くのがん細胞で過剰発現している。がん細胞で過剰発現しているGSTP1は、その薬物代謝活性やタンパク質間相互作用によりアポトーシスを抑制することで、がんの多剤耐性化をもたらす。そのため、がんで高発現したGSTP1活性を生きた細胞内で評価することができれば、多剤耐性化のメカニズムや、GSTP1を高発現したがん細胞の診断やそれに基づく薬剤の効果の判定へと応用することができると考えられる。そこで本研究では、これらの応用を目指し、生きた細胞でGSTP1活性を選択的に検出できる蛍光プローブの開発を目指す。

2. 研究の計画・方法

(1)GSTP1 選択的な基質の探索とそれを用いた蛍光プローブの開発

①GSTP1 選択的な吸光基質の探索

既存の GST 活性検出蛍光プローブ（Fujikawa et al 2008 JACS、Fujikawa et al 2015 Chem. Commun.）を元に、GST によるニトロ基のイプソ置換を念頭に置いたニトロ化合物群をデザイン・合成した。合成した種々のニトロ化合物について、数種類の GST 分子種（GSTA1, GSTM1, GSTP1）に対する反応性を評価することで、高い GSTP1 選択性を持つ分子を探索した。

②蛍光プローブの合成・評価

得られた GSTP1 選択的基質を蛍光制御団として、既存の蛍光団を結合させた蛍光プローブを合成した。合成した分子について、反応前後の蛍光特性、酵素反応性を精査した。また、生体内還元性分子との反応性についても評価した。

(2)開発した蛍光プローブを生細胞内で評価する。

開発した蛍光プローブの有用性を以下の方法によって評価した。

①内在的に GSTP1 を発現していない乳がん由来 MCF7 細胞に対して、細胞質型およびミトコンドリア型 GST 合計 17 種類をそれぞれ強制発現させた。各 GST 分子種を発現した細胞に対して、蛍光プローブを投与し、蛍光イメージングによりその活性を評価した。

②内在的な GSTP1 発現プロファイルの異なる数種類の培養細胞を用いてイメージングをおなった。また、GSTP1 陽性がん細胞に対し RNAi によりタンパク発現を抑制した後、プローブを負荷し、GSTP1 活性を評価した。

③ MCF7 細胞などのある種のがん細胞では、GSTP1 プロモーターにおける DNA メチル化によタンパク発現が見られない。そこで MCF7 細胞に対し、DNA メチル化阻害剤である 7'-deoxyazacytidine（DAC）を 6 日間処理し、再発現した GSTP1 の活性を Ps-TAc で評価した。また、並行してタンパク発現をウエスタンブロット法によって確認した。

3. 研究の特色

これまで数多くの酵素活性検出蛍光プローブが開発されており、そのいくつかは患者由来のが

ん検体を用いて有用性が検討されている（Mizushima et al BMC Cancer 2016, Onoyama et al Sci. Rep. 2016)。しかしながら、多くは一般性のあるプローブデザイン法が確立している加水分解酵素が主であり、GST をはじめとした酸化還元酵素を標的とした蛍光プローブの開発法は確立されていない。本研究は、反応点を蛍光団に組み込む既存のデザイン法とは異なり、酵素基質部位と蛍光団をいったん分けて考え、分子デザインを行う。このように蛍光プローブ分子を要素に分けその特性を調べたのち、再び分子の構築を行うことで、汎用性のあるデザイン戦略を実現する。そのため、本研究によって見出された GSTP1 選択的基質に対し、異なる蛍光団を付与することにより、多色の GSTP1 蛍光プローブを容易に創製することができる。すでにいくつか微小がんを検出できる蛍光プローブが報告・市販されていることから、本研究で開発するプローブをこれらと併用することで、より感度良く検出することが可能となると考えられる。

4. 研究の成果

(1)GSTP1 活性検出蛍光プローブ Ps-TG の開発

既存の GST 活性検出蛍光プローブの構造を元に、ニトロ化合物をスクリーニングし、GSTP1 選択性の高い分子として 5-メシル-2-ニトロ安息香酸アニリド（化合物 6）を得た。各種解析から、化合物 6 は GSTP1 選択的にグルタチオン化されることが明らかとなった。次に、化合物 6 を蛍光制御団として、TokyoGreen（TG）骨格を蛍光団として用いた蛍光プローブ Ps-TG を開発した。Ps-TG は GSTP1 活性によってグルタチオン化され、１００倍程度の蛍光強度上昇を示した。Ps-TG は、GSTP1 非存在下および各種還元性分子との共存下においても非特異的な蛍光上昇を示さなかった。ゆえに Ps-TG は優れた特異性を持つ GSTP1 プローブであることが示唆された。

(2)細胞内 GSTP1 活性検出プローブ Ps-TAc の開発・生物応用

Ps-TG を培養細胞へ適用するため、Ps-TG がアセチル化された分子 Ps-TAc を開発した。Ps-TAc は予想通り、GSTP1 発現細胞内でのみ強い蛍光が観察された。開発した蛍光プローブを利用して以下の現象を検出できることが示唆された。

①細胞質およびミトコンドリア型 GST 全 17 種類を発現するプラスミドをそれぞれ MCF7 細胞へ導入し、その活性をイメージングしたところ、GSTP1 を発現した細胞のみで強い蛍光が見られた。すなわち、Ps-TAc は細胞内において GST 分子種のうち GSTP1 に高選択的に検出できる蛍光プローブであることが示唆された。

②内在的に GSTP1 を高発現した数種類のがん細胞に適用し、その染色パターンが細胞によって異なること、さらに一つの細胞腫においても個々の細胞間で蛍光強度が大きくばらつくことが明らかとなった。免疫組織化学染色の結果、これらの細胞腫では個々の細胞に GSTP1 は均一に発現していることが示唆された。すなわち、GSTP1 活性を検出する本プローブの適用により、一細胞ごとのヘテロ性を可視化していることが示唆された。

③前立腺がんをはじめとする DNA が高メチル化状態にあるがん細胞では、GSTP1 プロモーターのメチル化が頻繁に見られ、タンパク発現が抑制されている。そこで、MCF7 細胞に対し 5-デオキシアザシチジン（DAC）処理を行い、再発現した GSTP1 を本プローブで捉えることができるか検討した。DAC 処理後、2,3 日程度ではその発現を確認することはできなかったが、6 日間処理した群においては、Ps-TAc によって GSTP1 発現を可視化することに成功した。

ウシの同一卵巣内での第 1 卵胞波主席卵胞と黄体との共存の発生要因に関する研究

日本獣医生命科学大学　獣医学部　三浦　亮太朗

1. 研究の目的

(1) ウシでは発情周期中に卵巣内で 2～3 回の卵胞群の発育が観察され、これを卵胞波という。この中で、発情・排卵直後から発育する卵胞波は第 1 卵胞波と呼ばれ、その中で最も大きく発育した卵胞を第 1 卵胞波主席卵胞という。この第 1 卵胞波は全てのウシで必ず発育することが知られているが、この第 1 卵胞波がウシの繁殖生理においてどのような意義を持つのか十分に明らかになっていない。申請者はこの第 1 卵胞波がウシの繁殖生理、特に人工授精後の受胎性におよぼす影響を明らかにするために、泌乳牛を用いて、排卵後に形成される黄体と第 1 卵胞波主席卵胞が同一卵巣内で発育する（共存）あるいは別々の卵巣で発育する（非共存）で区別し、その後の受胎率を比較した。その結果、共存群（40.2%）は非共存群（69.3%）に比較して受胎率が著しく低いことを発見した。申請者が発見した、「第 1 卵胞波主席卵胞と黄体が同一卵巣内に共存した場合に受胎性が低下する」という現象は、泌乳経産牛と未経産牛で共通してみられ、さらに、泌乳量、年齢、分娩からの日数および季節の影響を受けないことから、牛の受胎に普遍的に関わる全く新しい要因であると考えられる。しかしながら、受胎性の低下と関連する共存状態がどのような要因で引き起こされるのか明らかではない。高い受胎性をもたらす要因として、発情時の血中エストラジオール濃度が高いこと、黄体退行から排卵までの卵胞成熟の期間が長いことが報告されている。これらのことから、乳牛の生殖内分泌、そして発情時の卵胞の発育および成熟の状態が受胎性に大きく寄与することが知られている。また、第 1 卵胞波主席卵胞へ発育する卵胞は、卵胞群の中で最初に 1.0mm に達した卵胞と報告され、この時期は排卵直前であるため、排卵時には、どちらの卵巣で主席卵胞が発育するか決定していることになる。以上のことから、乳牛の発情前後の卵巣内構造物の発育動態や生殖内分泌が、排卵後の第 1 卵胞波主席卵胞と黄体との共存状態あるいは非共存状態の発生制御に関与する可能性が高いと推測される。本研究では、発情前後の卵巣内構造物の発育動態、泌乳量、分娩後日数、と「共存」および「非共存」の発生との関連を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の計画・方法

(1) 本試験は、「同一卵巣内での第 1 卵胞波主席卵胞と黄体の共存あるいは非共存」の発生に、発情前後の生殖内分泌と卵胞の発育動態がどのように関わるのかを明らかにするものであり、共存と非共存を制御する生理メカニズムの解明につながることが考えられ、受胎率向上の処置法の開発および排卵前からの共存状態の誘導を可能とする臨床応用研究の基礎的な知見として重要であると考えられる。

①供試牛

ホルスタイン種経産泌乳牛：n=361

［平均分娩後日数: 113.9 ± 2.9日、平均産次: 2.0 ± 0.1、平均泌乳量: 34.4 ± 0.4 kg/日、平均ボディ・コンディション・スコア（BCS）: 2.88 ± 0.02、平均体重: 637.4 ± 3.9 kg; 平均 ± 標準誤差］

②試験方法

ア　人工授精（AI）実施の 4 日前から超音波画像診断装置により卵巣観察を行なった。

イ　AI 時の排卵卵胞と退行黄体の位置関係を記録した。

ウ　AI 後 7 日目に超音波画像診断装置により「共存」または「非共存」を確認した。

エ　AI 時の分娩後日数、産次および AI 日と同月の BCS、体重および泌乳量を記録した。

オ　「共存」または「非共存」の発生を目的変数とし、AI 時の排卵卵胞と退行黄体の

位置、分娩後日数、季節、産次、BCS、体重および泌乳量を目的変数とする多変量ロジステック回帰分析を行なった。

3. 研究の特色

(1)本研究は、「第 1 卵胞波主席卵胞と黄体が同一卵巣内に共存した場合に受胎性が低下する」という、新たに発見したウシの受胎性に関わる現象について、「共存」および「非共存」の発生を制御するメカニズムを明らかにすることを目的とした研究である。受胎率と第 1 卵胞波主席卵胞と黄体が同一卵巣内で発育するか否かを観察した、非常にシンプルな発想を元にした研究であるが、現在に至るまでこのような視点で研究が行われたことはなく、独創的かつ新規性に富む研究である。ウシの受胎性に関わる新たな繁殖生理の解明につながることから、学術的に高い価値を持つとともに、本研究から得られる知見は、受胎性の高い卵巣状態を人為的に誘導し、受胎性向上を図る臨床研究に応用・展開することが可能であり、繁殖成績改善による畜産経営の向上に寄与する可能性が高く、社会的貢献度の高い研究である。

4. 研究の成果

(1)共存および非共存の発生に関わる要因として、

①発情時の排卵卵胞と退行黄体の位置関係：

発情時に排卵卵胞と退行黄体が同一卵巣内に存在すると有意に共存発生率が低くなり（共存発生率；44.9%）、排卵卵胞と黄体が別々の卵巣に存在すると有意に共存発生率が有意に高くなる（共存発生率；64.4%）となることが明らかとなった（$P < 0.05$）。

②泌乳量：

個体泌乳量が高いほど共存の発生率が高いことが示された（30kg＜ ： 30-40kg ：≧40kg = 47.3% ： 55.2% ： 61.6% ； $P < 0.05$）。

これらの結果から、発情時の卵排卵卵胞と退行黄体の発育動態、また栄養代謝状態が共存または非共存の発生に関連する要因であることが示された。

がん代謝の抗酸化代謝物プールへの寄与と抗がん剤感受性への影響

日本医科大学　医学部　石野　孔祐

1. 研究の目的

(1)がんが好気的解糖を中心にエネルギー産生を行うことがワールブルグ効果として古くから知られているが、k-ras や p53、c-myc など発がんに深くかかわるドライバー遺伝子が細胞の代謝を好気的解糖優位に再構築することがわかっており、がんに特異的な代謝（がん代謝）が生じるメカニズム解明と治療への応用が期待されている。そうした中、近年、ドライバー遺伝子 k-ras が解毒酵素 Nrf2 の発現を増強し、がん細胞内の活性酸素種（ROS）の消去を促進し、がん細胞の増殖・転移を促進していることが報告された（DeNicola et al, 2011, Nature)。さらに、k-ras などを介した Nrf2 の発現が、細胞内抗酸化代謝物であるグルタチオン（GSH）や NADPH の産生を促すよう代謝系をリプログラミングすることが示され（Mitsuishi et al, 2012, Cancer Cell)、がん代謝が ROS 消去系をバックアップしている関係性が明らかとなった。

(2)本研究では、後述するように、解糖系を強く抑制する 2-デオキシ-D-グルコース（2DG）が引き起こす GSH レベルの減少と増殖抑制が、がん細胞株に対し効果があるかを調べ、2DG の抗がん剤としての有用性を調べることを目的とする。

2. 研究の計画・方法

(1)2DG が種々の臓器由来の細胞株の増殖に影響するか。

①膵がん細胞株に2DGを投与し、細胞の生存率への影響を調べる。

(2)2DG と抗がん剤を同時に投与し、がん細胞株への影響を調べる。

①膵がん細胞株に2DGと薬剤を共投与し、細胞の生存率への影響を調べる。

3. 研究の特色

(1)これまでに申請者は、2DG を投与した膵がん細胞株の代謝物の変化を解析したところ、予想通り解糖系やクエン酸回路、グルタミン代謝に係わる代謝中間体の減少がみられただけでなく、NADPH や GSH などの抗酸化代謝物の大幅な減少が認められた（未発表)。これらのことから 2DG による細胞毒性は、抗酸化代謝物を減少させ、細胞内 ROS を増加させることによるものと推測された。

(2)2DG の細胞毒性は、膵がんや肺がん、脳腫瘍、乳がんなど多くの細胞株で実証されている。また、がん細胞に対する抗がん剤の作用を 2DG が相乗的に増強することが知られており、様々な薬剤による細胞死の誘導を 2DG が増強する（Zhang et al, 2014, Cancer Lett)。それらの報告では、2DG との相乗効果の機序として小胞体ストレスやオートファジー、ATP 産生能への影響について議論されていた。つまり、シスプラチンやメトホルミンなどの細胞内 ROS を生じさせることが知られている薬剤についても、ROS 産生については触れられていなかった。そこで本研究では、2DG 単独または“2DG+種々の薬剤”をがん細胞株に投与し、その毒性として細胞内の ROS 消去能がどの程度関与したかを調べる。これにより、2DG が様々ながん細胞に効果があるかどうか、さらにその効果が ROS 消去機構への影響かどうかを調べる。

(3)2DG の細胞毒性は比較的低いことが phase I 試験により明らかとなっており（Raez et al, 2013, Cancer Chemother Pharmacol)、抗がん剤との二剤投与が有用であることが明らかとなれば、xenograft 動物実験などののち、臨床試験への展開が期待できる。

4. 研究の成果

(1)2DG による膵がん細胞株に対する細胞死メカニズムの網羅解析

①2DGを膵がん細胞に24時間投与し、プロテオミクス解析を行った。その結果、解糖系か

ら派生するヘキソサミン合成経路や細胞死誘導タンパク質、グルタチオン合成経路のタンパク発現量が変動していた。一方で解糖系酵素については変化が認められなかった。このうち、ヘキソサミン合成経路タンパク質の発現増加に着目し、糖鎖修飾が抑制されることにより小胞体ストレスが引き起こされ、細胞死が誘導されることを明らかにし論文発表した（Ishino K et al, 2018, Biochem Biophys Res Commun)。

②上記サンプルについて、これまでにメタボローム解析も実施しており、上述の通りグルタチオンなど抗酸化代謝物の大幅な減少が認められることから（未発表データ)、2DGが解糖系を阻害することで何らかの機序でグルタチオン合成経路のタンパク発現が低下し、細胞内グルタチオン量が減少したことが推察された。

(2)2DG 投与および 2DG/シスプラチン共投与における細胞死抑制の検討

①膵がん細胞株 MIAPaCa2 細胞に 5 mM 2DG を投与すると、細胞死を引き起こす（69%生存)。この際に 10 mM NAC を投与することで細胞死を抑制した（77%生存)。このことから、2DGによる細胞死の一部は、活性酸素種などによる酸化ストレスを介して誘導されることが確認された。

②MIAPaCa2 細胞にシスプラチン単独では 91% の細胞が生存するのに対し、5 mM 2DG と同時に 1μg/mL シスプラチンを投与すると、細胞死が相乗的に引き起こされた（22%生存)。これに対し、20 mM NAC を投与すると、細胞死が抑制された（37% 生存)。このことから、膵がん細胞に対するシスプラチンの殺細胞作用は、がん細胞で促進された好気的解糖により強く抑制されており、好気的解糖の抑制が既存の抗がん剤感受性を高めるための新たな治療標的となる可能性が示唆された。

(3)以上のことから、2DG による細胞死には抗酸化代謝物の関与が示唆され、膵がん細胞におけるシスプラチン感受性においても抗酸化代謝物の重要性が予想された。その一方で、2DG 投与や 2DG/シスプラチン共投与、またそれらに NAC を投与し細胞死を抑制した際に、抗酸化代謝物の減少が酸化ストレスを引き起こし細胞死に関わったかどうかを真に明らかにするためには、グルタチオンや NADPH などの抗酸化代謝物を定量する必要がある。さらに、シスプラチンを化学療法に用いる膵がん以外の臓器のがん細胞株に関して、2DG とシスプラチンを共投与し、抗がん剤感受性の変化を確認することで、新たな治療薬としての 2DG の利用が今後期待できる。

家族性免疫不全／骨髄異形成症候群由来 iPS 細胞による病態解明
－再生医療技術による分化と発がん機構の解明－

文京学院大学　保健医療技術学部　臨床検査学科　西尾　美和子

1. 研究の目的

(1)これまでに、急性骨髄性白血病（AML）や骨髄異形成症候群（MDS）多発家系の遺伝子解析から germline 変異による MDS/AML が同定されている。

①常染色体優性遺伝の家族性MDS/AMLの原因として、GATA2、RUNX1、CEBPAやDDX41の体細胞遺伝子変異が同定され、単独遺伝子変異による若年発症家族性MDS家系が明らかになってきた。

②これらのgermline変異だけではMDS/AML発症には至らないが、遺伝子異常の積み重ね、あるいは何らかの抑制機構の破綻など、発症に至るまでにはいくつかの段階を経ることがわかってきている。

(2)GATA2 の germline 変異は、家族性 MDS/AML の原因となるだけでなく、孤発性・家族性に発生する原発性リンパ浮腫「Emberger 症候群」、単球減少により Mycobacterium avium complex（MAC）感染症を繰り返す「MonoMAC 症候群」、あるいは樹状細胞（dendritic cell)、単球（monocyte)、B- および NK- リンパ球（lymphocyte）の減少により MAC・真菌・ウイルス易感染症を示す「DCML 欠損症」といった免疫不全症候群を呈する。

①GATA2は血管形成と造血幹細胞分化に重要な役割を担っていることから、変異によりこれらが障害されて発症すると推測される。GATA2変異を有する家族性MDSの造血幹細胞はいわば前MDS幹細胞であるといえる。

②このGATA2変異造血幹細胞を様々な環境下で長期間培養し、生化学的・生物学的機能解析を行うことによってMDSの分子発症機序を解明できると考えられる。

(3)家族性免疫不全／骨髄異形成症候群の原因遺伝子である GATA2 変異が、「MDS 幹細胞」を規定する遺伝子異常であることを証明し、GATA2 変異を有する幹細胞が遺伝子異常を積み重ねていくことで MDS 発症に至る過程を明らかにし、MDS 発症メカニズムを解明する。

2. 研究の計画・方法

(1)家族性 MDS 由来 iPS 細胞から造血幹細胞への再分化と長期培養

①家族性にMDSや白血病発症を認める家系において、未発症家族性MDS患者の末梢血リンパ球からiPS細胞を樹立した。

②造血幹細胞へと再分化させて正常細胞との分化能の違いを解析し、長期培養を行う。

(2)GATA2 変異 iPS 細胞由来造血幹細胞からの MDS 発症誘導

①GATA2変異を有する未発症患者末梢血リンパ球から樹立したiPS細胞を用い、造血幹細胞へと再分化させて長期培養を行う。

②様々な刺激によりMDS発症を誘導し、GATA2変異による家族性免疫不全／MDS発症に至る過程を追跡する。

(3)MDS 発症に関わる遺伝子の同定

①GATA2変異iPS細胞から家族性免疫不全／MDS発症に至る過程の様々な段階で遺伝子異常を解析する。

②遺伝子（正常または異常）の発現増強・減少による影響を解析し、MDS発症に協調して働く遺伝子を同定する。また、遺伝子変異を網羅的に解析する。

3. 研究の特色

(1)白血病を発症していない MDS/AML 患者や未発症の家族性 MDS 患者のリンパ球から iPS 細胞を樹立し、造血細胞に分化させて MDS 発症の機序の解明を試みる。

①単独遺伝子変異であるgermline変異だけではMDS/AML発症には至らず、発症に至るまでにはいくつかの段階を経ることがわかってきている。しかし、その発症メカニズムの解明には至っていない。

②そこで再生医療技術を用いてMDS発症メカニズムを解明する。iPS細胞を用いて造血器腫瘍の発症機序を解明しようという試みは既に始まっており、これはiPS細胞が凍結保存可能で、未分化性を維持したまま増幅可能であることを利用し、iPS細胞を再分化させることによって、患者から直接採取することの出来ない量の疾患細胞を用いた各種解析を行うというものである。

(2)単一遺伝子異常のみを有すると考えられる未発症家族性 MDS 症例のリンパ球から樹立した iPS 細胞を用い、iPS 細胞から再分化させた造血幹細胞が遺伝子異常を獲得して MDS 発症に至る経過を長期培養期間に観察していく。

①これまでにマウス・ヒト細胞に過剰発現させ検討してきたGATA2変異体の生物学的役割を、正常発現レベルで生理学的に近い状態で検討できる。

②他にはない新たな手法であり、MDS発症機序を解明するうえで有用であると考えられる。

(3)GATA2 変異体の生物学的活性に依存した発症機序や協調遺伝子の相違などが想定される。

①GATA2変異体のタイプにより異なる結果が予想されるため、できるだけ多くの家系から、様々なタイプのGATA2変異を有するiPS細胞を樹立することを試みる。様々な協調遺伝子を導入して、その生物学的活性を比較することで、MDSの分子病態が明らかになるものと期待される。

②遺伝子異常が明らかになることで、治療戦略にも有用な情報をもたらすと考えられる。

③MDS発症に関わる遺伝子が同定できれば、iPS細胞由来造血幹細胞、および協調遺伝子導入した細胞をNOGマウスに移植して世界で初めてのヒト化MDSモデルマウスを作成し、MDSの治療開発につなげることを考えている。

④この研究によってMDS発症機序を明らかにし、新規分子標的治療の開発に役立てることを目指す。

4. 研究の成果

(1)GATA2 変異を有する 2 家系の家族性 MDS の MDS 患者から末梢血リンパ球を無菌的に単離し、確立されている方法により 2 種類の GATA2 変異 iPS 細胞（R396W と P250A）を樹立した。

①GATA2変異iPS細胞をiPS-SAC法で造血前駆細胞まで分化させたところ、正常iPS細胞と比較して有意にCD34陽性細胞が減少していた。

②また、骨髄移植モデルマウスを作製し、GATA2変異をマウス造血幹細胞に過剰発現させると、分化した顆粒球系細胞が著減していた。

③このことからGATA2変異単独ですでに造血幹細胞の分化障害が生じていることが明らかとなった。

(2)先天的な GATA2 変異に後天的な付加的遺伝子変異が加わって MDS が発症すると考え、MDS 発症家族性 GATA2 変異患者の骨髄 DNA と頬粘膜 DNA を用いて全エクソン解析を行った。

①MDSの進展に関わる複数の遺伝子変異を同定した。その中に一つであるGene Xについて、付加異常としての機能解析を開始した。

②GATA2変異iPS細胞から誘導したCD34陽性細胞にGene Xを遺伝子導入し、OP9細胞上で長期培養を行い、MDSの血液学的特徴を獲得するかを検討している。

③同時に両遺伝子をマウス造血幹細胞に導入した骨髄移植モデルマウス作成に着手した。

ビフィズス菌を利用した上皮ガンに対する新規治療法の開発
－菌の腫瘍内送達量向上に向けた検討－

帝京平成大学　薬学部　清水　芳実

1. 研究の目的

悪性腫瘍の 90%以上が上皮由来であることから、上皮由来ガンの克服がガン治療における重要な課題の 1 つであることがわかる。ガン組織はガン細胞とそれらを取り巻く間質組織から構成されている。腫瘍細胞同士の細胞間接着や間質は免疫細胞の浸潤や抗ガン剤に対する抵抗性の要因となっている。

ビフィズス菌は、静脈内に投与した場合、非常に高い選択性を持って腫瘍部位で増殖する（Cancer Res. 1980）。この理由としては、ビフィズス菌は酸素が存在すると生育できない偏性嫌気性菌であり、腫瘍部位は先に述べたように間質に取り込まれており、腫瘍組織の中心部には嫌気的環境（低酸素領域）を有すると考えられている。既に当研究室では、ビフィズス菌に腫瘍細胞に細胞死を誘導する抗体を分泌させることにより、腫瘍組織を退縮させることに成功している。ビフィズス菌を薬剤キャリアーとして考えた場合、腫瘍組織以外で増殖することがないので非特異的な分布による副作用の発現防止や腫瘍効果を発揮する蛋白質を分泌するビフィズス菌を導入することで単回投与でのガン治療が可能となるという利点がある。

本研究では、上皮間接着に関与する Claudin（CLDN）分子に結合する細菌毒素であるウェルシュ菌下痢毒素の C 末断片素（C-CPE）を用いて、遺伝子組換えビフィズス菌の更なる腫瘍組織への送達量を向上させる検証を行った。CLDN4 結合分子である細菌毒素の毒素ドメインを除いた C-CPE は、上皮バリアを可逆的に制御することが可能である。興味深いことに、CLDN4 はガン細胞の遠隔転移部位での接着に必須な因子として知られており、CLDN4 陽性ガン細胞を用いた担癌モデルマウスの検討では、C-CPE を投与することによりガン細胞の転移を有意に低下させることを報告している（J Pharmacol Exp Ther.2010）。そこで本研究では、上皮バリア制御分子 C-CPE に着目し遺伝子組換えビフィズス菌と併用投与する事で更なる抗腫瘍効果が期待できるか評価した。

2. 研究の計画・方法

膵臓ガン細胞の Xenograft モデルマウスを用いて、C-CPE と遺伝子組換えビフィズス菌の併用による抗腫瘍活性の評価を行った。また、新たに発光ビフィズス菌の作製を行った。

(1)組換え蛋白質の精製

細菌毒素である C-CPE について、発現ベクターを導入した大腸菌で大量培養した後、タグを利用した Affinity カラム精製で精製を行った。活性の評価は、Flow cytometry を用いた結合性解析を行った。エンドトキシン除去キットを用いて大腸菌由来のエンドトキシンを除いた。

(2)担癌モデルマウスを用いた組換えビフィズス菌と C-CPE の併用効果の検証

膵臓ガン細胞移植マウスに対して、細胞死誘導抗体を分泌する組換えビフィズス菌を尾静脈に単回投与し、バリア制御分子に関しては腹腔内に週 3 回投与して抗腫瘍果を調べた。具体的には、ヌードマウス KSN-Slc に 3x106 個/匹の Mia-PaCa2 細胞を移植した。腫瘍移植から 5 日後に腫瘍径を測定し群分けを実施した。組換えビフィズス菌を単独投与する群、C-CPE を併用投与する群、無処置（PBS）の群の 3 群（n=5-7）に分けた。投与する菌数は 2x108 個/匹とした。安全性を評価する目的で、体重、および血清マーカー（ALT、AST、BUN）の測定を行った。

(3)腫瘍内へのビフィズス菌移行量の評価系の構築

大腸菌とビフィズス菌のシャトルベクターである pKKT427 ベクターにホタル由来の発光遺伝子 Luciferase を組換えた。得られたプラスミドを、ビフィズス菌に遺伝子導入し、

単一コロニーをピックアップし培養した。培養した菌液に発光基質である D-Luciferin を加えて発光量をルミノメーターで評価した。

3. 研究の特色

既存の化学療法及び分子標的治療法は、正常組織に作用してしまうことにより副作用を引き起こす。これは、薬剤が目的とする腫瘍組織以外に分布し作用することにより引き起こされる。またこれらは維持療法であり、定期的な薬剤投与が不可欠である。当研究室で進めているビフィズス菌を用いた薬剤治療法では、ビフィズス菌が生体内の腫瘍中で特異的に増幅し、それ以外の正常組織には分布せず体内からすみやかに排泄される。これは、ビフィズス菌が嫌気的環境下でのみ生存及び増殖できるという性質を利用している。またビフィズス菌は、グラム染色陽性の細菌であるため、リポ多糖などのエンドトキシンを持たず、エキソトキシンも分泌しないので生体の血管内に投与しても安全と考えられている。

これまでに、細菌毒素であるウェルシュ菌下痢毒素の C 末断片（C-CPE）は CLDN4 に特異的に結合し、ガンターゲティングや吸収促進剤、ワクチン開発など様々な分野に応用できることを示してきた（Yakugakuzassi.2014）。本研究では、*in vitro* と *in vivo* において、腫瘍の周辺環境に着目し、優れた腫瘍送達性とワンショットで抗腫瘍効果を有する組換えビフィズス菌に更なる改良を加え、より効果的な治療薬開発を目指す。我が国における死因第一位であるガンに対して、新たな治療戦略を提示することで社会に貢献できると考えている。

4. 研究の成果

(1)C-CPE の精製

大腸菌より精製した C-CPE の純度を CBB 染色で評価した。その結果、目的の分子量に単一のバンドを確認することができた。また、活性を評価するために、CLDN４非発現細胞である HT1080 と CLDN4 を過剰発現させた HT1080 細胞を用いた Flow cytometry を行った。精製した C-CPE は、HT1080 細胞には結合せずに、CLDN4 発現 HT1080 細胞特異的に結合した。以上のことから、精製した C-CPE は純度並びに活性に問題ないと判断した。また、エンドトキシン除去したサンプルにつては、Limulus 試験で陰性であることを確認した。

(2 担癌モデルマウスでの抗腫瘍効果の検証

ヌードマウス KSN-Slc にすい臓ガン細胞株 Mia-PaCa2 細胞を皮下移植し、経時的な腫瘍の大きさと体重を測定した。腫瘍径が十分な大きさになったことを確認した後、組換えビフィズス菌と C-CPE の投与を行った。組換えビフィズス菌単独で、腫瘍体積の増加の抑制が確認された。一方、C-CPE と組換えビフィズス菌でも抗腫瘍効果は確認されたものの単独群と有意な差は確認できなかった。この時、体重に関してはコントロール群、単独投与群、併用群で有意な差は認められなかった。また血清中の肝障害マーカーである ALT、AST 及び腎障害マーカーである BUN についてすべての群で正常値の範囲内であった。

(3 発光ビフィズス菌の作製

作製したルシフェラーゼ遺伝子発現ビフィズス菌は、D-luciferin を加えると非常に高いシグナルを発していた。また、作製したビフィズス菌は、*in vivo* イメージング装置 IVIS でも発光シグナルを検出できることを確認した。

今回の結果から、C-CPE と遺伝子組換えビフィズス菌の併用による抗腫瘍効果の増強を確認することはできなかった。しかしながら今回行った検討では、C-CPE と組換えビフィズス菌を同時に投与していたため、C-CPE を前処理することで、ビフィズス菌の腫瘍内移行性が増加する可能性がある、一方、新たに作製した発光ビフィズス菌は、*in vivo* 評価系でビフィズス菌の体内動態を評価する上で強力なツールとなることが示唆された。今後は、腫瘍径の評価だけでなく、実際に腫瘍内に移行する菌数が C-CPE を加えることで増加するか評価する予定である。本研究で得た知見を活かし引き続き研究を進めることで、ビフィズス菌を用いた上皮ガンに対する新規治療法開発につながることが期待される。

本研究の意義をご理解いただき、研究助成をご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団の関係各位にこの場をお借りして心より御礼申し上げます。

ｲﾝﾀｰﾈｯﾄ依存をもたらすｳｪﾌﾞｱﾌﾟﾘｹｰｼｮﾝ使用動機の検証

立教女学院短期大学　現代ｺﾐｭﾆｹｰｼｮﾝ学科　大野　志郎

1. 研究の目的

(1)ネット依存傾向者が直面している、ネットへの逃避の現状を明らかにし、その対処や予防方法を提示する

①これまでの研究から、逃避という媒介変数が、インターネット依存形成を理論付けるために非常に有力な候補であることが示されている。しかし量的調査による研究の限界として、具体的な逃避の様体を把握することは難しい。インターネット依存傾向者が、どのようなストレスを抱え、どのようにして逃避し、どのような問題に直面しているのか、そしてインターネットの過剰使用を軽減する展望はあるのか、インタビュー調査によって詳細な情報を把握する。

②インターネットの過剰使用を避ける方法（生活習慣や正しいストレス対処）を探索する。

2. 研究の計画・方法

(1)オンライン・インタビューの実施

①高いインターネット依存傾向を持つ、20代・30代の男女19人に対し、半構造化グループインタビューを実施した。はじめに、株式会社マーシュのオンラインモニター を対象に、ウェブアンケートによるスクリーニング調査を行った。スクリーニング条件は、ネットやスマートフォンの使用時間が平日1日5時間以上であること、ネット・アプリ依存傾向尺度への高度な該当、ネットやアプリ使用による重大な問題の経験があること、やめられないと感じているサービスやアプリがあること、適切な速度でタイピングを行うことができることの全てに該当することとした。

②インタビュイーは3グループ（各6～7人）に分け、2017年12月8日（金）13時、12月9日（土）15時30分、同日18時に、それぞれ90分間のオンライングループインタビューを実施した。複数人がオンラインでテキストチャットを行う手段として、チャットミーティングシステム「sgmeeting」を用いた 。質問内容は、ネットの使用状況や使用動機、経験した重大な問題の詳細、ネットを使用する際のストレスの詳細と、解消・逃避の手段などである。

(2)データの分析

①逃避的使用の実態と、使用アプリケーション、過剰仕様の抑制方法について、その実態と関係性を明らかにするため、修正版グラウンデッド・セオリー・アプローチ（以下、M-GTA）を用いて分析を行った。インタビュイーの発言を内容に応じて解釈を行い、抽象化できるグループごとに概念化し、概念のまとまりをカテゴリーとしてまとめた。

3. 研究の特色

(1)オンライン・インタビュー調査によりインターネット依存の主要因を明らかにする

①近年のインターネット依存研究においては、アンケート調査により心理社会的変数とインターネット依存との関連を検証するための量的調査が主であった。実際の依存者に対する質的研究はわずかであり、その内容の多くはインターネット依存の要因を特定するためのものではなく、認知行動療法などによるインターネット依存の解消を試みるためのものであった。本研究は、より広範で身近な対処方法や予防方法を探索するため、インターネット依存問題につながりやすい使用動機である逃避に焦点を当て、ネットへの逃避の現状を把握し、その対処方法についての見解を得るものである。

②通常のインタビュー調査では、被験者の移動を伴うため、外出しにくい状態にあるインターネット依存者の協力を得ることが難しいが、本研究はオンライン・インタビューであるため、この問題は生じず、依存者による率直な回答を得ることができる。

4. 研究の成果

(1) SNS による共感への逃避の問題化

①ネットによる気分調整に関連して、ストレッサーからの逃避行動として、現実では得にくい共感や承認に逃避する＜共感による安心＞、ネガティブな気分や感覚を遮断する＜現実的感覚の遮断＞の概念が見出された。

②＜共感による安心＞に分類された9人の発言のうち6人の発言はSNS使用に関するものであり、その他の発言は、検索に関するものであった。SNSや検索アプリケーションにより、共感や承認を得ることで安心するという、いわば共感への逃避の現象は、SNS流行後に顕現化しつつあるインターネットならではの逃避手段として、注目すべきである。

(2) 恒常的ストレスへの対処としてのネット使用の問題化

①対人関係、仕事、学業、その他日常生活において生じる＜日々生じるストレス＞と、長期的で問題解決し難い、身体・精神的な＜恒常的ストレス＞の概念が見出された。

②ストレッサーが＜日々生じるストレス＞である場合には、ストレッサー自体の解消のための方法を考えることができるが、＜恒常的ストレス＞である場合、ストレッサーの解消は困難であることが多いと考えられるため、問題が深刻化しやすい可能性がある。

(3) ネットによる気分調整のタイプとアプリケーションとの関連性の発見

①気分調整を動機としてネットを用いる際の詳細な概念として、＜リラックス＞と、＜発散・高揚＞が見出された。

②＜リラックス＞に分類された8人の発言のうち5人の発言は動画閲覧に関するものであり、その他の発言は、ブログやネットサーフィンなど閲覧系のコンテンツ使用に関するものであった。

③＜発散・高揚＞に分類された12人の発言のうち7人の発言はゲーム使用に関するものであり、その他の発言は、動画閲覧とSNSへの投稿であった。

④動画コンテンツは主に気分の維持や安らぎのために用いられ、ゲームは主に気分を高めたり発散させるために用いられるといった関係性が見出された。

(4) ネットの過剰使用への対処方法の概念化

①ネット使用を軽減するために、インタビュイーが実践した行動、または有効だと考えられる対処方法として、＜運動＞、＜生活・人間関係の充実＞、ネット以外の趣味を持つ＜他の趣味＞、＜飲食＞、＜休息＞、ネット環境を遮断する＜遮断＞、軽減方法は無いとする＜対処なし＞の概念が見出された。

②＜運動＞には8人が、＜生活・人間関係の充実＞には6人が該当したが、その他の概念においては2～4人の該当であり、使用者によって対処の適不適があることが示唆された。

③5人は、ネット使用の軽減のために有効と考えられる対処はないとしており、問題解決への意識付けの難しさや、軽減のための具体的な行動指針の欠如が、問題解決を困難にしているものと考えられる。

太陽光エネルギー交換を可能にする可視光応答性光触媒の創製
－光水分解による水素製造のための基礎研究－

神奈川大学　工学部　田邉　豊和

1. 研究の目的

(1) ドーピングを必要としない可視光応答性の錫酸化物とチタン酸化物を組み合わせた新規タンデム型の光触媒の合成

地球エネルギー問題の根本解決には無尽蔵の再生可能エネルギーである太陽エネルギーの変換システム構築が必須である。現在、太陽電池やバイオマス等の太陽エネルギー関連の研究が盛んに行われている中で米国エネルギー省DOEの試算では「光触媒を用いた水分解による水素製造」は実用化への課題とされるエネルギーコストの壁（約2円/メガジュール≒石油レベル）をクリアできる数少ない経済性を確保できる太陽エネルギー変換技術の代表として位置づけている。光触媒による水素製造は太陽エネルギーを工業的に利用価値の高い水素エネルギーとして直接変換・貯蔵できる大きな利点があり、「太陽光+水+光触媒」のみという非常にシンプルかつ究極的にクリーンなシステムである。従来のドーピング系光触媒では異種元素ドープによる欠陥サイトも同時に導入されるため電荷の再結合を誘発し、高効率での水素製造は難しい。そのため水分解の高効率化には、ドーピングや置換に頼らない新規の可視光応答型光触媒の開発が必要である。そこで本研究では水熱合成法によりドーピングを必要としない可視光応答性の錫酸化物とチタン酸化物を組み合わせた新規タンデム型の光触媒の創出を目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) 水熱合成法による可視光応答性錫酸化物の合成

キレート剤を用いた水熱合成反応は、可視光応答性の錫系酸化物光触媒の合成に用いられる手法である。これまでの研究報告からSn^{2+}酸化物とSn^{4+}酸化物がそれぞれ形成しやすいキレート錯体が存在することが分かり、両方のキレート錯体が安定的に共存（平衡）する溶液条件下において、可視光応答性の酸化物の単相が得やすいことが分かっている。これらの知見をもとに、ナノロッド状のチタン酸化物を水熱合成における前駆体溶液中に分散させ可視光応答性の錫酸化物が形成する条件下（キレート/Sn^{2+}=2.5, 180℃-12h）において錫酸化物/チタン酸化物のタンデム光触媒の合成を行った。

3. 研究の特色

(1) 水素エネルギー社会への貢献と多大な CO_2 削減効果

水素は化石燃料に変わる新しいエネルギーであり多くの化学工業品の原材料であることから将来大量生産が必要となる。現在の水素製造法では化石燃料を使用しCO_2を多量に排出している。錫酸化物/チタン酸化物のタンデム型光触媒による水素製造が実現することで年間約200～300万トンもの膨大なCO_2削減効果が見込まれる。

(2) 学術的な独創性

光触媒反応効率は[光吸収率]×[量子効率]によって決定されるが、従来はバンドギャップの広い半導体酸化物（主にTiO_2）に異種元素をドープし、バンドギャップを狭める手法で[光吸収率]を向上させる手法が用いられてきた。一方で、錫含有の酸化物はドーピングを用いずに適度なバンドギャップ幅を実現させ、これまで困難であった高いレベルでの[量子効率]が期待できる革新的な光触媒材料である。

(3) 材料の特色

従来の水分解用光触媒の多くは希少元素や毒性金属を大量に含むが、開発した錫酸化物/チタン酸化物系の光触媒は、安価で毒性の殆どない元素のみで構成され、水素燃料の大規模製造に利用した場合、対人・対環境負荷が極めて低く、先進国以外でも十分に製造可能である。実用範囲の広いエネルギー材料としてメリットが多い。

4. 研究の成果

(1) 錫酸化物/チタン酸化物コンポジットの創出

光触媒における水分解反応では同一粒子表面で水素発生と酸素発生が同時に起こる。錫酸化物光触媒においては他の酸化物系光触媒と比較して水素発生能力（水の還元）が非常に強力であるのが大きな特徴である。一方で酸素発生能力（水の酸化）は特段に高いわけではない。そこで、錫酸化物の強力な水素発生能を活かすために、酸素発生用光触媒として代表的なチタン酸化物と組み合わせてタンデム型の光触媒システムを構築することで錫酸化物単独よりも飛躍的に水分解反応効率を向上させることが期待できる。図1に水熱合成法により合成した錫酸化物/チタン酸化物のタンデム型光触媒のSEM及びSTEM観察の結果を示す。ナノロッド形状のチタン酸化物の表面を覆うように錫酸化物が析出しているコンポジット型の光触媒が得られた。STEM-EDSによる元素マッピング像によりチタン酸化物表面の析出物が錫酸化物であることを確認した。詳細なSTEM及び電子回折像の解析により錫酸化物と下地のチタン酸化物は特定の結晶方位を有していることが明らかになった。すなわちランダムにチタン酸化物表面に析出するのではなく、特定の結晶面から選択的に錫酸化物が結晶成長していることが分かった。このような特定方位関係を有した錫酸化物/チタン酸化物のコンポジットはこれまで報告がなく光触媒だけでなく無機酸化物の合成手法としても興味深い知見を得たものと言える。

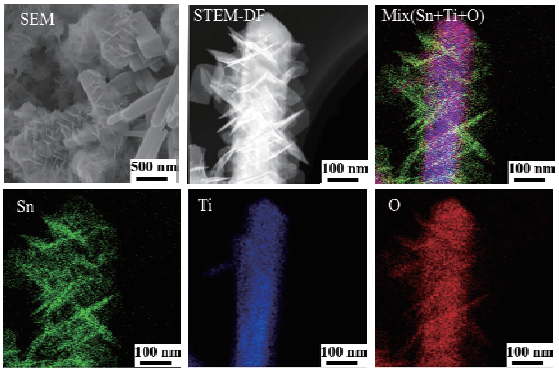


図 1 錫酸化物/チタン酸化物コンポジットの SEM および STEM 像

(2) 錫酸化物/チタン酸化物コンポジットの材料評価

①光吸収特性評価

図２に本研究で合成した錫酸化物/チタン酸化物コンポジットの紫外−可視光吸収スペクトルを示す。錫酸化物/チタン酸化物コンポジットはチタン酸化物単体よりも長波長側の光吸収が観察され可視光領域（λ>400nm）の光を吸収可能であり太陽光エネルギーを利用可能な光触媒系であることが分かった。

また pH を変化させると吸収波長が変化しており、わずかの幅であるが pH 制御によって吸収波長制御の可能性を示唆する結果を得た。

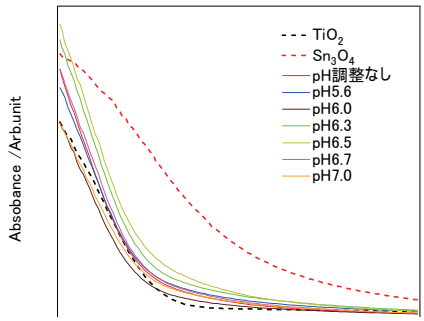


図２　錫酸化物/チタン酸化物コンポジットの紫外−可視光吸収スペクトル

②光触媒反応評価

Xeランプ（λ＞350nm）照射下における10%メタノール水溶液からの水素発生反応について光触媒反応の評価を行った。錫酸化物/チタン酸化物コンポジットを光触媒として用いた場合には５マイクロmol/hの水素発生を観察し光水分解による水素発生用の光触媒として機能していること確認した。しかしながら錫酸化物単独(10マイクロmol/h)やチタン酸化物単独(20マイクロmol/h)よりも水素生成速度が低下しており有意なタンデム型の相乗効果は得られなかった。これらの知見から析出した錫酸化物の露出表面が水素発生に高活性な結晶面でないと予想される。今後の展開として下地のチタン酸化物の露出面を制御することで錫酸化物の露出結晶面を制御し高活性な表面を選択的に結晶成長させることで高活性なタンデム型光触媒の創出が可能であると考える。

人工症例画像の CAD 開発への応用に関する研究

神奈川工科大学　工学部　電気電子情報工学科　ポスト・ドクター　安倍　和弥

1. 研究の目的

(1)近年、医療の現場では CT や MRI など撮影装置の高精細化により生成される医用画像の量が増大している。撮影される画像の枚数は患者一人あたり数百枚にもおよび、それを読影する医師の負担も急増している。そのため診断の補助を行うコンピュータ画像支援診断（Computer Aided Diagnosis/Detection：CAD)システムの開発が非常に重要視されている。

CAD システムの開発においては、サンプルデータの不足が長い間、問題とされてきた。システムの有効性を示すためには多くの臨床画像を使う必要性があるが、プライバシの配慮などにより症例画像の入手が困難になっている。そこで現在、3 次元腹部 CT 画像において、実症例からの腫瘍の埋め込みを行い、腫瘍の存在する CT 画像を人工的に作成する研究を行っている。人工症例の研究は、日本医用画像工学会の CAD コンテストのテーマとしても取り上げられるなど注目されているテーマである。この研究は、実症例と全く見分けがつかない人工腫瘍の作成方法を確立し、大きさ、コントラストを変更しながら、無数に人工腫瘍を含む模擬的な症例画像を生成することによって、CAD システムの開発におけるサンプルデータ数を補完することを目的としている。

①本研究では、様々なバリエーションの人工症例データベース（DB）を作成し、実運用を視野に入れ、CAD システムの未知データへの判別性能向上が見込める最適な組み合わせ法や生成方法を検討する。サイズの大小やコントラストの濃淡を様々に変化させることにより、埋め込む病変を強調した人工症例を学習データとして作成する。その人工症例画像と肝腫瘍の実症例の混ぜ合わせたデータ群をもとに機械学習（例えば SVM：サポートベクタマシン)による判別器を作成し、別途用意した未知データによる評価により CAD システムの開発に最適な学習データ作成法を検証、その有効性を確認する。

(2)さらに汎化性の確認のため、他部位への応用として、乳がん腫瘤 CAD システムに適用し、有効性がある事を確認する。

2. 研究の計画・方法

(1)本研究の主目的は、様々なバリエーションの人工症例データベース（DB）を作成し、実運用を視野に入れ、CAD システムの未知データへの判別性能向上が見込める最適な組み合わせ法や生成方法を検討すること、および他部位応用による汎化性の確認にある。そのため以下の流れで研究を行う。

①バリエーションに富んだ人工症例の作成

人工症例は正常 CT 画像に腫瘍を埋め込むことによって作成する。腫瘍サイズの大小やコントラストの濃淡を様々に変化させることにより、埋め込む病変を強調した人工症例を学習データとして作成する。

②機械学習を用いた判別器作成による CAD システムの開発

人工症例と実症例を混ぜ合わせたデータ群をもとに機械学習（例えば SVM：サポートベクタマシン）による判別器を作成する。

③①、②より最適な画像 DB の検討

別途用意した未知データによる評価により CAD システムの開発に最適な学習データ作成法を検証、その有効性を確認する。

(2)人工症例画像の汎化性確認のための乳がん腫瘤への適用を行う。乳がん腫瘤の人工症例も肝腫瘍と同様に腫瘤の存在する症例より腫瘤を切り取り、正常な乳房に埋め込むことにより人工症例画像を作成する。データ群を基に機械学習による判別器し、肝腫瘍と同様に未知データによる評価でその有効性を確認する。

3. 研究の特色

(1)人工症例画像は少量の症例画像からサイズ・コントラストの変更などにより実質無数の症例画像を作り出すことが可能であり、サンプルデータの不足という CAD システムの開発に長年付きまとっていた問題へ一石を投じることが可能なものであると考えている。さらに、我々は予備実験という形で人工症例画像を用いた CAD 開発に挑戦し、一定の成果を得ることができた。この技術を検討し、汎化性を持ったものに押し上げることで、実際の医療現場で実用が可能な CAD システムの開発へとつなげることが可能と考えている。

①実症例と同等の人工症例が実質無限に生成可能

現在模擬的な画像生成にはファントムが用いられているが、本手法では実症例を埋め込むことにより実症例と同等かつファントムでは困難な症例などが生成可能である。また、大きさやコントラストを調整することで高品質の症例画像を実質無限に生成することが可能となり、症例データの不足を補うことが可能となる。

②複数の病院との協力体制

過去の共同研究などの実績から複数の病院との連携が可能であり、データの収集や人工症例および CAD システムの評価などが可能である。また、評価を依頼する医師らはいずれも放射線診断専門医であり高い読影技術を有している。評価を依頼することにより信頼性の高い人工症例の作成、および CAD システムの開発が行える。

③人工症例作成の技術力

人工症例の作成手法は、日本医用画像工学会主催の CAD コンテストにおいて優勝をした実績を持つ手法であり、医師の評価においては実症例に勝るとも劣らないものであると自負している。また、上記②の経験より、バリエーションに富んだ人工症例の作成も可能であるものと考えている。

4. 研究の成果

(1)サイズの大小、腫瘍の明暗を意図的に強調した人工症例を作成し検討を行った。検討のために作成した人工症例の内訳として、明暗を考慮せずに腫瘍の大きさが 15mm を超えるもの、明暗を考慮せずに腫瘍の大きさが 15mm を下回るものを作成した。また、腫瘍の CT 値の平均が 40HU 以上（大きさはほぼ均等）となるもの、腫瘍の CT 値の平均が 40HU を下回るもの（大きさはほぼ均等）として作成した。これらの人工症例を均等に混合し、実症例 50%・人工症例 50%の比率にて判別器を作成した。これと実症例のみで作成した判別器を比較すると、Az（ROC カーブの下面積）が実症例のみの判別器で 0.892、人工症例を含む判別器で 0.890 と同等の判別性能が得られ、これにより人工症例の CAD 開発への有効性が確認できた。

現状においてはサイズの大小・コントラストの濃淡の 4 分類にて人工症例を作成した。更なるバリエーションとして、これらを組み合わせた特徴の人工症例（例えば濃くて大きい、淡くて小さいなど）を作成し学習を行うことなど、更なる判別性能の向上に向けた検討が必要である。

(2)同様に乳がん腫瘤に対しても特徴を強調した人工症例画像を作成し、上記(1)と同様の比率で混合して判別器を作成した。こちらも実症例のみの判別器と比較を行った結果、どちらの判別器においても Az が 0.87 と高い判別性能が得られた。これにより，人工症例画像の他部位における汎化性が確認できた。

乳がん腫瘤の人工症例については作成数及び評価に用いた実症例数共にまだ少なく、今後より多量・多彩な人工症例を作成し多数の未知データによる検証を行い、判別性能を評価することが望ましい。

肝腫瘍・乳がん腫瘤共に判別器を設計するための学習サンプルを可能な限りたくさん用いて上記課題へと対応を行う方法で検討した。しかし、まだ決して十分であるとはいえないと思われるため、今後はより多くの試行セットを用いるなど検証レベルを上げ、より信頼性を向上させる必要がある。

MDCK シスト回転運動メカニズムの解明と癌転移への寄与

金沢医科大学　医学部　市川　壮彦

1. 研究の目的

固形がんによる死因の 90%以上は浸潤もしくは転移によるものである。浸潤現象は転移現象と並んでがんの悪性化を特徴付けている性質の１つであり、もしこれを防止することができれば多くのがんの治療効果が上昇し結果として医療費の削減にも繋がると考えられる。しかし、未だにがんが浸潤を起こすメカニズムは明らかではなくこれらに関わる遺伝子についても未だ研究途上にある。研究が進まない原因の１つは生体内で現象を観察することが難しいことが挙げられる。*in vivo* でがんの浸潤を観察するためには顕微鏡の高い深部到達性が必要であるが、現在のところ体外から直接観察できかつ数細胞を分離可能な分解能を持つ顕微鏡はない。さらに浸潤現象を観察するには長期で観察をする必要があり同一部位の観察が難しいといった問題もある。

生体内での観察は依然として困難であるものの、近年別のアプローチとして組織から単離した細胞を用いて元の器官や器官様の組織（類器官）を培養皿中で再構成しそれを用いて形態形成や機能解析研究を行うといった手法が用いられつつある。Z. Werb らのグループは単離したマウス乳腺細胞を細胞外マトリックスを含むゲル中で培養することにより乳腺類器官を再構成し、腺管構造形成時の詳細な観察を行った（A. Ewald et al. Dev. Cell 2008）。その結果、腺管が伸長する時の先端付近の細胞が集団で回転するように移動しており、この回転運動が腺管の伸長に必須であることを明らかにした。さらに、既に形成した腺管中で細胞が移動しようとする力ががん化した細胞の浸潤を促す可能性を示唆した。

類器官が回転する現象についてはいくつか報告がされており、X. Zhang らのグループはイヌ尿細管由来の MDCK 細胞が 3 次元培養中で球形のシスト構造を構成しそれが回転すること報告した（Q. Guo et al. Eur J Cell Biol 2008）。M. Bissell らのグループは単離したマウス乳癌細胞も 3 次元培養中で回転すること、継続的に一方向へ回転するためには正常な細胞の極性と骨格が必要であることを報告した（K. Tanner et al. PNAS 2012）。また、S. Muthuswamy らのグループは 3 次元培養中でマウス乳癌由来細胞の成熟度（単離からの経過日数）によって回転速度やパターンが変わること、基底側にラミニンとコラーゲンの集積が必要であることを報告した（H. Wang et al. PNAS 2013）。また、申請者のグループは予備的な実験から低分子量 G タンパク質 K-Ras を MDCK 細胞で活性化すると成熟して回転が止まった MDCK シストを再び回転させることを発見した（未発表）。K-Ras の活性化型変異は多くの癌、特に膵癌では約 9 割に見られることから K-Ras ががん化に何らかの寄与をしていることは明らかである（K. Bryant Trends Biochem Sci 2014）。申請者は K-Ras の活性化が上皮内で運動しようとする力を生じ、それががんの浸潤を促すのではないかと考えた。そこで、本研究では類器官シストを腺管の試験管内モデルとして採用しその回転運動を制御している因子をスクリーニングすることによりがんの浸潤に関わる因子を探索することを目的とする。

2. 研究の計画・方法

本研究計画は、類器官シストの回転運動を検出するスクリーニングシステムを構築し回転運動に関わる因子を特定することによりがんの浸潤に寄与する因子の同定を行う。

以下の計画を立て、順に行った。

(1) MDCK を用いた類器官シスト回転運動を定量化するためのイメージングシステムの構築

これまで微分干渉顕微鏡等を用いてシストが回転する様子が観察されてきたが、これらは 2 次元での観察であるために回転運動の正確な定量化は難しかった。そこで、シストの 1 細胞のみを標識しそれを 3 次元＋タイムラプスで追跡することにより回転運動の 3 次元イメージングを行う系を構築する。1 細胞のみの標識には Kaede（R. Ando et al. PNAS 2002）や KikGR（H. Tsutsui et al. EMBO Rep. 2005）といった紫外線照射により発光波長が変化する蛍光タンパク質を用いる。ウイルスベクターを用いてこれらの遺伝子を MDCK 細胞

に導入し、3 次元培養によってシスト形成を行う。共焦点顕微鏡（LSM710, Zeiss, 導入済）や申請者が博士研究員時代に組み立てたライトシート型顕微鏡（基礎生物学研究所との共同研究により使用、T. Ichikawa et al. PLoS One 2013, T. Ichikawa et al. Nat Protoc 2014）を用いて標識した 1 細胞を 3 次元的に追跡する。

(2) シスト回転運動に寄与する因子を明らかにするためのハイスループット評価システムの構築

シスト回転運動に関わる因子を同定するために、ハイスループット細胞機能探索システム（Cell Voyager, 横河電機, 共通機器として導入済）を用いて 96 穴ベースで多数のサンプルを同時に観察可能な系を構築する。z 間隔や時間間隔を最適化し一度に可能な限り多くのサンプルを観察できるように条件を検討する。

また、MATLAB と解析用コンピュータを導入し得られた画像データを自動的に解析し定量化を行うプログラムを作製する。アルゴリズムとしては、データの取り込み→フィルタリング・2 値化→標識細胞のセグメンテーション→各タイムポイントでの標識細胞の中心点測定→中心点を繋げてトラッキング→3 次元表示といったプロセスを追う。

(3) シスト回転運動に関わる責任因子の追求

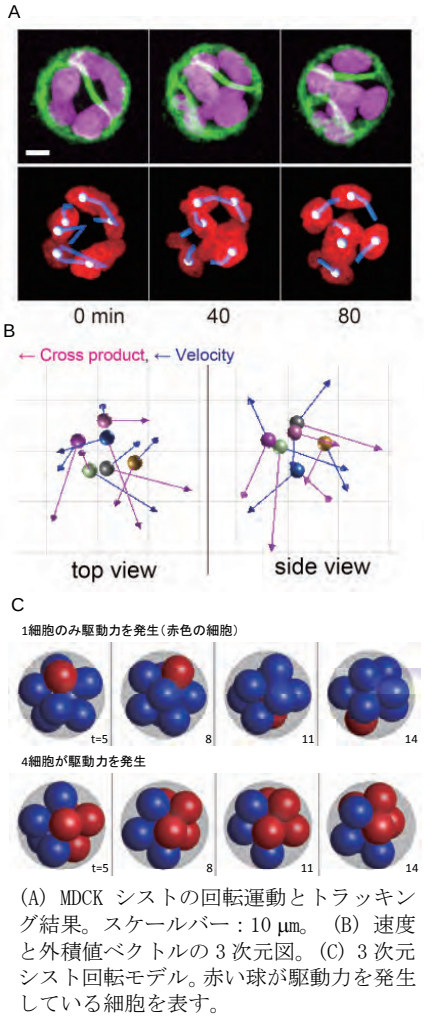
がんで変異や過剰発現が多くみられる遺伝子群（Myc、EGFR、p53 など）や、細胞骨格を制御する分子群（Rho ファミリーG タンパク質群や myosin、kinesin、dynein などモータータンパク質群）、極性形成に関わる分子群（Wnt、β-catenin、PAR、aPKC、integrin ファミリー）を個別に阻害・ノックダウンもしくは活性化・過剰発現させることによりシスト回転運動に関わる因子をスクリーニングする。

3. 研究の特色

本研究の最も大きな特徴は3次元器官培養技術を用いることによって、これまでスクリーニングの難しかった浸潤に関わる因子を試験管内の系に置き換えハイスループット化し網羅的に因子を調べる点である。本研究に用いる系の構築には近年発達しつつある類器官の培養技術に加え顕微鏡システムの立ち上げ、解析に関する技術と経験が必要であるが、申請者の所属する研究室では類器官形成の研究を行ってきており培養技術の蓄積があること、また、申請者はこれまで顕微鏡の立ち上げや解析ソフトの開発を行ってきておりスクリーニングや解析に関する知識と技術を擁している（T. Ichikawa et al. PLoS One 2013, T. Ichikawa et al. Nat Protoc 2014）ことから本研究が申請者にとって十分に遂行可能である点が本研究の強みである。

4. 研究の成果

(1) 薬剤によるシスト回転運動を定量化するためのスクリーニングシステムの構築を行った。ヒストン H1 に蛍光タンパク質 mCherry を融合させ核を標識し、炭酸ガス供給下で共焦点顕微鏡を用いて三次元タイムラプス観察を行った。得られたデータを ImageJ を用いてクロッピング、Imaris を用いてトラッキングし、Excel VBA を用いて半自動で各細胞の回転速度を計測するプロトコルを構築した（図 A）。さらに、シストの回転運動には全ての細胞が同じ方向へ回転するコヒーレント運動と各細胞が入れ替わりながら運動するランダム運動があり、後者とがんの悪性度との関連性が指摘されていることから、外積値を指標として用いることで回転運動のコ



(A) MDCK シストの回転運動とトラッキング結果。スケールバー：10 μm。 (B) 速度と外積値ベクトルの 3 次元図。(C) 3 次元シスト回転モデル。赤い球が駆動力を発生している細胞を表す。

ヒーレント性を定量化する手法を考案した（図 B)。これらの方法を用いてがん細胞において高頻度で見られる K-Ras 活性型変異体（K-RasG12V）を発現する MDCK シストの回転運動を定量化した結果、通常の MDCK 細胞と比べ K-RasG12V を発現する MDCK シストでは速度・外積値共に有意な上昇が観察された。また、阻害剤を用いたスクリーニングの結果から、Blebbistatin や Nocodazole といった細胞骨格に関わる阻害剤と細胞周期阻害剤の一部が速度・外積値を減少させることを明らかにした。

(2)シスト回転運動メカニズムを明らかにするためにシミュレーションモデルを用いてシストを構成する細胞の多様性が回転運動に与える影響を調べた。3 次元回転モデルではシスト中で駆動力を持つ細胞が少ない場合により回転運動を示すことが示唆された（図 C)。また、実際のシスト回転運動は断続的に運動する様子が見られるが、モデルにおいても移動空間が制限されると移動速度が周期的になることが示され、移動空間の制限のみで運動の断続性を再現可能であることが分かった。

3 次元シスト回転運動の定量化系の構築は完了し、系を用いて阻害剤による速度・外積値への影響を定量化する段階に入っているが、がん浸潤に関わる因子はまだ同定できていない。今後さらに阻害剤を用いたスクリーニングを進めると同時に siRNA を用いたノックダウンや CRISPER/Cas9 を用いたノックアウト・ノックイン細胞を用いて回転運動を制御している因子を同定する。さらに、同定した回転運動制御因子を活性化・不活性化させた細胞をマウスに移植することによりがん浸潤への影響を明らかにする。

植物の概念形成に及ぼす動物概念の影響
－植物の種子と動物の卵の類似性に着目して－

修紅短期大学　幼児教育学科　蛯名　正司

1. 研究の目的

科学的概念を形成する前の子どもは、自分の経験に基づいた素朴理論（naïve theory）を形成することが知られている。認知発達研究において、子どもがどのような素朴理論を保持しているか、あるいはどのような要因が概念変容をもたらすのかなどが検討されてきた（e.g. Goswami、1998）。そのような背景のもと、本研究では生物に関する素朴理論に焦点をあてる。幼少期の子どもの多くは植物を生きていないと判断することが知られており（Cary、1985）、そのような素朴理論が科学的な認識に変容するには、どのような環境が条件となるのであろうか。この点について筆者は、これまで植物の種子（e.g. 緑豆・ひまわり）の生命認識の変容を促す要因として、緑豆もやしの発芽場面を観察させたり（蛯名、2015）、ひまわりの栽培活動を実施したりしたが（蛯名、2016）、植物の種子について「生きていない」から生物学的根拠に基づいた「生きている」に判断が変化した幼児は多くはなかった。また、幼児は未知の事項を理解する際に人間をベースとした類推が可能であることを踏まえ（Inagaki & Hatano、2002）、中村・宇野・蛯名（2018）では、栽培活動に加えて人間の赤ちゃんと種子を対応づけた教示を行った。しかし、人間をベースにした類推はほとんど見られなかった。この要因として人間の赤ちゃんと植物の種子の見かけ上の類似性が低いことが考えられた。

そこで本研究では、類推のためのベースとして「卵から孵化する動物」を取り上げる。卵から動物が孵化する様子は、球形に近い物体から別な物体が出現するという点で、植物の種子からの発芽と類似しており、人間の赤ちゃんよりも見かけ上の類似性は高い。以上から本研究では、卵から孵化する動物を観察することで、卵が生きていること（卵の中の動物が生きていること）、さらには卵と知覚的に類似している植物の種子も同様に生きていることに気づくようになるか検討する。また、本研究では年長児に加え、小学 1 年生～小学 3 年生の児童を対象として生命認識の実態を調査し、変容過程について探索的に検討する。

2. 研究の計画・方法

(1) 調査対象者　岩手県内の私立認定こども園に通う年長児 10 名、同一地域内にある公立小学校 1 年生 39 名、2 年生 47 名、3 年生 41 名を対象とした。

(2) こども園の年長児に対して、2017年7月及び2018年3月の2度にわたって筆者による個別インタビューを実施した。7月の調査では、女王アリとその女王アリが生んだ卵をアリの飼育ケースに入れた状態で対象児に提示した。その際、アリの卵を見やすくするために、デジタル顕微鏡を使用して女王アリやアリの卵を拡大した。その上で、「卵の中にアリの赤ちゃんがいると思うか（質問①）」を質問した。「いる」と回答した対象児には、「アリの赤ちゃんは卵の中で大きくなっていると思うか（質問②）」、「アリの赤ちゃんは卵の中で生きていると思うか、その理由は何か（質問③）」を質問した。さらに、ヒマワリの種子の実物を提示して「ヒマワリの種子は生きていると思うか、その理由は何か（質問④）」を質問した。3月の調査も、同様の手順で②～④を質問した。なお、3月調査では、女王アリが産んだ卵から孵化した働きアリも提示して、働きアリは女王アリの子どもであることも対象児とともに確認した。また、7月調査の終了後、こども園の中にアリの飼育ケースを設置し、園児が自由に観察できる環境を構成した。小学生の対象児に対しては、質問紙法による一斉テスト形式で実施した。質問項目は、幼児とほぼ同様で、女王アリ、アリの卵、ヒマワリの種子の写真を提示して、②～④の質問に回答してもらった（ただし、協力校の都合により判断理由の回答欄は削除した）。質問紙の配布・回収は2017年11月に担任教員によって実施された。

3. 研究の特色

幼稚園教育要領や小学校学習指導要領（生活）の教育内容には、「生命を大切にすること」、あるいは「生命をもっていることに気づくこと」が記されている。しかし、従来の教育現場での生物の扱われ方は、「心の教育」のような情緒的な側面のみが強調され、生物学的な内容は軽視される傾向にあった（大谷・椙原・高井、2007）。しかし、そもそも生命の大切さ・尊さを理解するには、まずは生物に生命が宿っていることに気づく必要がある。それゆえ、生物の生命は、種子や卵を含めたライフサイクルのどの時期においても連続していることに気づくこと、及びその気づきを促す環境作りは、生命の大切さ・尊さを理解する上で基盤となりうるといえ、教育上の意義は大きいといえる。

4. 研究の成果

(1) 年長児の縦断的調査　対象児全員が質問①（卵の中にアリの赤ちゃんはいるか）に対して「いる」と回答した。質問②～④の回答結果を Figure1 に示す。卵の中でアリの赤ちゃんが大きくなると判断した対象児は 7 月時点と 3 月時点で人数は同数であったものの、卵の中の赤ちゃんは生きていると判断した対象児は 7 名から 9 名に増加した。また、ヒマワリの種子について生物学的根拠（e.g.「芽が出るから」「花が咲くから」）に基づいて「生きている」と判断した対象児は3名から2名へとやや減少した。以上の結果は、人数が少数であるため、一般化には限界があるものの、アリの卵、アリの卵から孵化した赤ちゃんの観察によるだけでは、植物の種子に関する生命認識に影響を及ぼさない可能性が示唆されたといえる。

(2) 小学生の横断的調査　質問①に対して「いる」と回答した対象児を抽出した（1 年生 27 名、2 年生 34 名、3 年生 32 名）。質問②～④の回答結果を Figure2 に示す。年長児と比較すると、卵の中のアリの赤ちゃんに関する認識（②③）は年長児とほぼ同様の傾向であったといえる。また、ヒマワリの種子の認識は判断理由まで考慮していないため、単純に比較できないが、年長児よりは「生きている」と判断する者の割合は高い可能性が示唆された。

(3) 今後の課題　本研究では卵と種子の形態の類似性に着目して、アリの卵の観察が植物の種子の認識に影響を及ぼす影響を見ようとした。しかし、機能的な類似性について、対象児に積極的に働きかけは行わなかったこともあり、十分な関連づけがなされなかったと考えられる。今後は、機能的類似性への着目を促進させることが、科学的な生物概念を形成する上で有効かどうかを検討していきたい。また、本研究では小学生の認識について実態調査にとどまったため、今後は具体的な飼育活動などを通じて年長児から小学生にかけて認識の変容過程を明らかにしたい。

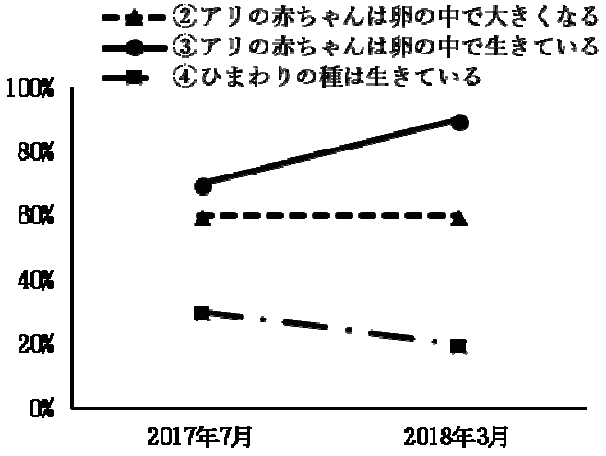


Figure1　年長児の生命認識に関する縦断的調査

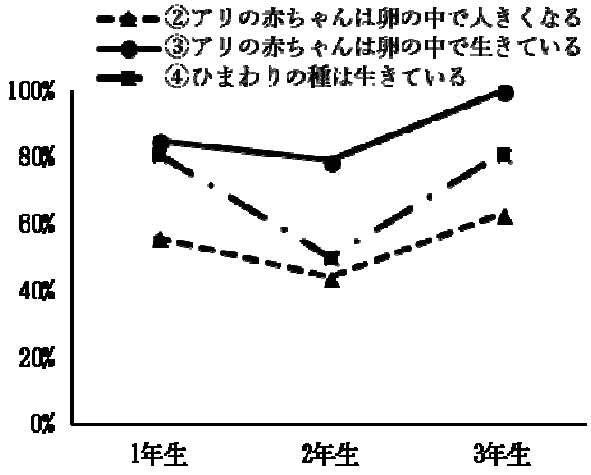


Figure2　小学生 1 年生～3 年生の生命認識に関する横断的調査

mRNA スプライシングの保証機構とその破綻による癌化の解明

藤田保健衛生大学　総合医科学研究所　福村　和宏

1. 研究の目的

ヒトを含めた高等真核生物において、長大なイントロンに分断された小さなエキソンを認識し、正確にイントロンを取り除く mRNA スプライシング(以下スプライシング)は、正常な遺伝子発現に必須である。加えて、発生段階、組織特異的、細胞環境に応答して特定のエキソンを選び出し、１つの遺伝子から多種類のタンパク質を作り出す選択的スプライシングは生命の高次性を生み出す重要な原動力となっている。高等真核生物における複雑な選択的スプライシングを可能にする要因の１つはスプライス部位の配列保存性である。イントロンに分断された真核生物の遺伝子のエキソン／イントロン境界は 5’スプライス部位、3’スプライス部位と呼ばれる配列によって分けられており、エキソン認識のための主要な目印となる(図１)。スプライス部位の配列保存性は、生物が高等になるにつれて低くなり、エキソン認識に大きな自由度が与えられる（図 1)。そのため高等生物ほど複雑な選択的スプライシングが可能になり、１つの遺伝子から多くの情報を引き出すことができるのである。しかしながら、スプライス部位の配列保存性の低さは同時に、エキソン内、イントロン内にスプライス部位と似た配列『偽スプライス部位』を生み出す諸刃の剣となる。興味深いことに、多くの癌細胞では本来使用されるはずのないエキソン内やイントロン内に散在する偽スプライス部位を使用した mRNA が産生されることが知られている。さらに近年、乳癌組織や卵巣癌組織のトランスクリプトーム解析からスプライシングパターンの約半数に異常がみられることが報告されており、異常スプライシングが癌化に関与していることが強く示唆される。これら癌細胞における現象は、裏を返すと正常細胞では正確に真のスプライス部位を認識し、正確なスプライシングを保証するメカニズムの存在を示唆する。しかしながら、正確なスプライシングがどのようなメカニズムで保証されるのかという一見当たり前に思えるこの問いに明確な答えをだした研究は、国内外に存在しない。そこで本研究では、pre-mRNA スプライシングを保証する分子基盤の実態とその作用機序、そしてその破綻によって引き起こされる異常スプライシングと癌化の関連性を明らかにすることを目的とする。具体的には以下の通りである。

我々は、これまでの研究から選択的スプライシング制御因子である RNA 結合タンパク質 RNPS1 の発現阻害を行うとオーロラ B キナーゼの正確な pre-mRNA スプライシングが阻害され、異常スプライシング産物が生じることを見出した。結果、オーロラ B キナーゼのタンパク質量が著しく低下する。オーロラ B キナーゼは、細胞周期の分裂期にのみ発現量が増加・活性化するリン酸化酵素で、染色体を娘細胞に正常分配する為に必須である。しかしながらオーロラ B キナーゼは、癌細胞において過剰発現や発現減少することで、癌細胞に共通した特徴であるゲノム不安定性を生み出す。本研究では RNPS1 によるオーロラ B キナーゼの正確なスプライシングを保証するメカニズムと癌化についての関連性を明かにすることを目的とする。

図1　脊椎動物と酵母のスプライス部位の配列保存性
それぞれ5’スプライス部位と3’スプライス部位の配列を示す。Yはピリミジン塩基、Rはプリン塩基を表す。

2. 研究の計画・方法

(1) RNPS1 発現阻害時の細胞の表現型を明かにする。RNPS1 の発現阻害により、オーロラ B キナーゼの発現量が低下する。オーロラ B キナーゼの発現阻害では、正常な染色体分離が行われずゲノムの不安定化が起き、多核になることが知られている。そこで、RNPS1 の発現阻害によっても、オーロラ B キナーゼの発現阻害と同様に多核の表現型が生じるのではないかと考えられる。

(2) RNPS1 がオーロラ B キナーゼ mRNA の正常なスプライシングをどのように保証するか、その分子メカニズムを明かにする。具体的には、RNPS1 がオーロラ B キナーゼ mRNA のどの領域に結合するのか、どのスプライシング基本因子と相互作用するかを RNPS1 の免疫沈降実験などによって明らかにする。細胞レベルでの解析後、スプライシング反応を *in vitro* で再現できる実験系である *in vitro* splicing 系を用いて解析を行うことで、より詳細な分子機構

を明らかにしたいと考えている。

(3)RNPS1 が正常なスプライシングを保証するグローバルレギュレーターであるかを明らかにする。現状 RNPS1 の発現阻害によって、異常スプライシングが生じる mRNA はオーロラ B キナーゼ遺伝子と、MDM2 遺伝子のみである。しかしながら、RNPS1 がさらに多くの遺伝子の正確なスプライシグを保証している可能性がある。そこで、RNPS1 のノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析を行い、その可能性の検証を行う。

(4)(1)-(3)の研究を時間内に遂行できた場合、(4)の研究を進めたい。先行研究から肝細胞癌において、RNPS1 のノックダウンによって検出されるオーロラ B キナーゼ mRNA の異常スプライシング産物が検出することが知られている。加えて、我々の解析から肝細胞癌では RNPS1 の発現が著しく低いことも明らかになった(未発表データ)。これらの知見から、肝細胞癌における RNPS1 の発現減少のメカニズムと癌化の原因についての関連を明らかにする。まずは肝細胞癌検体を用いて、RNPS1 ノックダウン細胞と同様な表現系が検出できるか確認を行う。

3. 研究の特色

これまでのスプライシング制御研究は、エキソンがどのようなメカニズムで選択され、どのような生物学的機能を持つタンパク質を生み出すのかということに焦点が当てられてきた。そのため、**『正確にスプライシングが行われること』**は当然の事象として受け取られ、見過ごされてきた。本研究は、癌細胞でみられる異常スプライシングという現象に着目し、正確なスプライシングの破綻が癌化を引き起こす要因になる可能性を明らかにする世界に先駆けた研究である。

我々は、スプライシング保証機構を明らかにするために、RNPS1 に着目し、本研究を進める。

これまで RNPS1 がスプライシング保証機構に関与する知見は存在していないが、我々は、すでに培養細胞を用いた予備実験により RNPS1 の発現阻害によってオーロラ B キナーゼ遺伝子に異常スプライシングが起きることを見いだしており、世界の研究者に先駆けた着眼点であると言える。また、本研究では、どのような遺伝子群が異常スプライシングをうけるのかを明らかにするために、次世代シーケンサを用いて解析を行う計画である。これまでの癌研究において、異常スプライシングに着目した網羅的遺伝子解析を行った研究例はなく、本研究の大きな特色である。加えて、*in vitro* splicing 系などの生化学的実験手法も加えることで正確なスプライシング保証機構の分子メカニズムを明らかにすることで、総合的にスプライシング異常と癌化について理解することを目的としている。本研究の成果は、分子生物学分野だけでなく、癌化メカニズムの理解、癌細胞の診断のためのマーカー探索や新たな創薬ターゲットの同定など医療応用の分野にも大きな波及効果をもたらすものと期待される。

4. 研究の成果

(1)本研究のこれまでの研究結果

RNPS1 の発現阻害によりオーロラ B キナーゼ mRNA の異常スプライシングが起こり、タンパク質発現量が低下することを見出した。培養細胞においてオーロラ B キナーゼの発現阻害を行うと、正常な染色体分裂が阻害される為に多核の表現型を示すことから、RNPS1 ノックダウン細胞の核の観察を行った。結果、RNPS1 のノックダウン細胞は、多核の表現型を示した。また、その表現型はオーロラ B キナーゼの cDNA を発現することによって回復することから、RNPS1 の発現阻害によって生じる異常スプライシングが原因であることが示唆された(図２)。

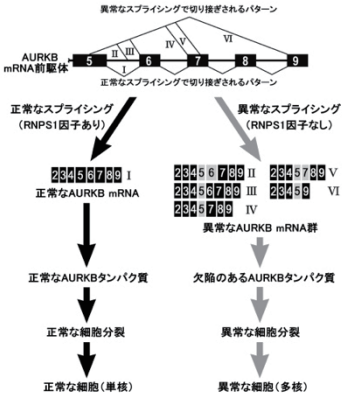


図 2. RNPS1 はオーロラ B キナーゼの正確なスプライシングを保証することで正常な細胞分裂に寄与している

さらに、RNPS1 は RNA 結合タンパク質であることからオーロラ B キナーゼ mRNA に結合することで、正確なスプライシングを保証していると考えられる。その結合領域を決定するために、オーロラ B キナーゼのレポーターミニ遺伝子を用いて、解析を行った。その結果、第 5 エキソンの 5'スプライス部位上流に結合することが明らかになった。このことから、RNPS1

がこのシス配列に結合し、第 5 エキソンの正確な 5'スプライス部位認識に重要な働きを示していることが示唆された。我々は、RNPS1 は 5'スプライス部位認識を行う U1snRNP の構成因子 U1-70K と相互作用することも合わせて見出しており、この相互作用が正確なスプライシングを保証していると考えられる。

RNPS1 がグローバルに正常スプライシングを保証しているか、検証するために、RNPS1 ノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析を現在行っている。本研究助成金の研究期間内には、結果を得ることができなかったが、今後さらに発展させていく予定である。

肝細胞癌における RNPS1 の発現減少とオーロラ B キナーゼの異常スプライシングについての解析も本助成金期間内には行うことができなかった。しかしながら本大学の医学部との共同研究という形で、肝細胞癌検体の供与について協議を開始しようとしている段階である。今後、本研究で明らかになった異常スプライシングと癌化との関連を引き続き明らかにしていきたいと考えている。

(2)本研究の成果は、以下の学会で口頭発表に採択され、発表を行った。

RNPS1 は細胞周期に合わせてオーロラキナーゼ B 遺伝子の正確なスプライシングを制御する日本 RNA 学会年会 2017 （富山国際会議場）

(3)本研究の成果は、以下の学術論文を筆頭著者として出版した。

Fukumura K, Inoue K, Mayeda A (2018)
Splicing activator RNPS1 suppresses errors in pre-mRNA splicing: A key factor for mRNA quality control Biochem Biophys Res Commun 496(3):921-926

英作文教育における Plagiarism Education の効果の検証
－大学生英語学習者を対象に－

中部大学　人文学部　三上　仁志

1. 研究の目的

近年の日本における英語教育では、実用的言語能力の育成が重要視されており、なかでも英作文技術は、代表的な実用的言語能力の 1 つとされている。日本において効果的な英作文能力の育成を考える場合、以下に示す理由から、剽窃教育(Plagiarism Education)(PE)の早期実施が重要となる。

剽窃とは、Council of Writing Program Administration の 2003 年の定義によれば「(公知ではない) 他人の考えや文章、そのほかの開発物について出典を明らかとしないまま使用すること（筆者訳)」である。剽窃行為は、特に英語圏ではいちじるしく非倫理的な行為であるとされる。現在、日本でも剽窃は広く罰則の対象となっている。しかし、日本語を母語とする平均的な大学生英語学習者（JEFL 学習者）が、剽窃の概念や剽窃が適用される範囲について明確な理解を有していることは、稀である（Mikami & Kawaguchi, 2017）(左記の論文は、以下の URL から入手可能：https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi_Mikami)。剽窃行為に関する知識の不足は、意図しない剽窃行為を誘発するため、短期的には学業に失敗するリスクを、長期的には国際的に受け入れられない英作文技術を身に付けるリスクを増大させる。また、剽窃に関する知識だけを与える教育は、JEFL 学習者にとって十分に有効なものとならない可能性が指摘されている（Mikami & Kawaguchi, 2017)。

上記のとおり、大学における英作文教育の初期段階で PE を実施することの重要性は、グローバル人材の育成という観点から見て高い。このような理由から、本研究は、JEFL 学習者にとって有用な PE をデザインし、その有効性を検証することとした。

2. 研究の計画・方法

(1)評価基準

以下の 2 点から PE の効果を評価した。

①英文要約における文章の借用が、PE実施後に減少すること。ここでは、情報源となる文章で使用された文言や表現を借用する行為（いわゆるコピペ）の減少を目指す。

②自らの書いた要約文がコピペに該当するか否かを自己判断する能力が、PE実施後に向上すること。

(2)PE の実施手順

76 名の大学生が受講するクラスで、PE を 5 回実施した（実施頻度は、週に 1 回)。以下、学生が取り組んだ課題、課題の評価、学生へのフィードバック、PE の内容について報告する。

①学生は、2種類の課題（課題A・B）に5回ずつ取り組んだ。学生は、課題Aで300 wordsの英文（テキスト）を読み、その内容を100 words前後で要約した（以下、学生の提出物を要約文と呼称する）。英文要約課題には、ヨーロッパ言語共通参照枠でA1レベルの難度のテキスト2種類（テキストA・B）を使用した。第1・3・5回の課題でテキストAを、第2・4回の課題でテキストBを使用した。課題Bで、学生は、要約文を書く際に元の文から文言や表現を借用した割合を自己推定した（以下、この自己推定をコピー率推定と呼称する）。例えば、100 wordsの要約を書く際にテキストから30 wordsを借用した（と見積もった）場合のコピー率推定は、30%となる。

②全ての要約文について、テキストからの借用部分を同定し、要約文全体での文章借用率（コピー率)を算出した。分析・計算方法の詳細については、Mikami and Kawaguchi (2017)を参照のこと。また、コピー率推定とコピー率の残差値を算出した。たとえば、コピー率推定が10%、コピー率が50%の場合の残差値は、-40となる。マイナスの残差値は、

学生が文章借用の程度を過小評価していたことを、プラスの残差値は、文章借用の程度の過大評価を意味する。残差値が0に近いほど、自己モニタリングは正確である。

③第2～4回のPEで、学生に(a)コピペと判定された記述、(b)コピー率、(c)残差値に関する情報をフィードバックした。

④第1回のPEで、文章要約の意義と活用法を解説した。第2回のPEで、フィードバック情報を用いながら、剽窃の定義と問題点を解説した。第3回のPEで、テキストの表面的な書換えが特定の種類の剽窃（Patch Writing）と判定され、コピー率の低下に繋がらないことを解説した。第4・5回のPEで、剽窃に該当しない要約を作成する技術（例.句構造の書き換え）について解説し、書換え練習を実施した。

(3)データ分析

第 4 回までの全ての要約課題に取り組んだ JEFL 学習者 59 名のデータを使用し、データ分析を実施した。まず、第 1 回と第 4 回のコピー率データを使い、その変化を検証した。次に、第 1 回と第 4 回の残差値を使用し、その変化を検証した。歪度/歪度の標準誤差の割合が±1.0 を超える指標が多数あったため、Wilcoxon signed-rank test を検定に使用した。p 値の調整には、Bonferroni 法を用いた。Cohen(1988, 1992)の基準に従い効果量を解釈し、0.80 以上を十分な検定力とした。

3. 研究の特色

先行研究では、「剽窃行為をおこなってしまう書き手の特徴は何か？」もしくは「剽窃に該当する文章の言語的な特徴は何か？」という点について多くの調査がおこなわれてきた。しかし、どの様な教育的介入が特定の学習者集団の剽窃行為の低減につながり、かつ英作文教育として有効となるかを調査した研究は、数が限られており、JEFL 学習者を対象に PE の効果を検証した研究は、管見の限り存在しない。

4. 研究の成果

(1)文章の借用（＝コピー率）

①表1は、コピー率に関する記述統計である。

②コピー率について、第1・4回のデータの間で有意差があり、十分な検定力と大きな効果量が得られた（z = 6.42, p < .001, 1-β > .99, r = .59 [95% CI = .39, .74]）。統制群を設けた上で追試をする必要はあるが、検定の結果は、PE実施後の要約文でテキストからの借用が減少したことを認めた。

(2)残差値

①表1は、残差値についての記述統計である。

②残差値について、第1・4回のデータの間で有意差があり、十分な検定力、大きな効果量に近い数値が得られた（z = 5.24, p < .001, 1-β > .99, r = .48 [95% CI = .26, .66]）。統制群を設けた上で追試をする必要はあるが、検定の結果は、PE実施後の残差値の変化を認めた。表1のデータと本結果を併せて解釈すると、PE実施後も文章借用の程度は過小評価されがちであるものの、PE実施前は要約文の大部分を占めるテキストからの借用が自覚的に行われており、その意味においてPEの実施に意義があったことが分かる。

表 1. コピー率と残差値の記述統計

指標	提出回	*M*	*Mdn*	*1stQ*	*3rdQ*	*SD*	*Skew*
コピー率	第 1 回	67.60	69.60	50.66	90.14	26.36	-0.66
	第 4 回	11.72	6.35	0.00	17.27	17.91	2.73
残差値	第 1 回	0.65	-1.71	-17.04	19.99	27.80	0.16
	第 4 回	-30.14	-29.82	-49.53	-15.00	19.25	3.71

注. N = 59;歪度を除きすべてパーセント単位。

(3)学会発表

Mikami, H. (2018, February). *Patchwriting in Japanese freshmen's English summary writing: The basic data*. Poster presented at the Association for Reading and Writing in Asia Conference 2018, Tsukuba, Japan.

モラルジレンマ判断における直観的な競合検知の検討

愛知淑徳大学　人間情報学部　中村　紘子

1. 研究の目的

モラルジレンマ判断課題とは、多数の利益のために少数を犠牲にすることの是非を問う課題である。少数の権利を優先する義務論的判断には犠牲者への同情心といった感情的な過程が関わり、多数の利益を優先する功利的判断には利益と対価の計算といった熟慮的な過程が関わることが示されている(Greene, 2015)。認知的熟慮性や認知容量と功利的判断が関連するなど(Moore, Clark, & Kane, 2008)、多くの研究が道徳判断に直観的・熟慮的な二過程が関わることを示しているが、直観的な義務論的反応を抑制し認知負荷の高い熟慮的過程を喚起するメカニズムについては不明な点が多い。

近年の推論研究では、直観的過程においても論理や確率的規範に従った反応が生じることが示されている (De Neys, Rossi & Houde, 2013; Nakamura & Kawaguchi, 2016)。Thompson & Johnson (2014)は、推論課題においてヒューリスティック反応と論理的反応が競合する場合、直観的な判断に対する正しさの感覚 (Feeling of Rightness, FOR)が低くなること、および、回答に対する FOR が低いとその回答に対して再考しやすい傾向を示した。この研究は、直観的過程でヒューリスティックと論理的反応が生じ、2 つの反応の間の競合が検知されると FOR が低くなり熟慮的過程が駆動する可能性を示している。

本研究では、直観的過程において功利的反応が生じるか、および、義務論的反応と功利的反応の競合と熟慮的な判断との関連を検討する。Bialek & De Neys (2016a)は道徳判断の直観的過程で義務論的反応だけではなく功利的反応が生じ、この２つの反応の競合が熟慮的過程を駆動させる可能性があるとしている。よって、推論課題と同様、直観的な道徳判断に対する FOR は義務論的反応と功利的反応が競合するモラルジレンマ課題で高くなり、また、FOR が低いほど直観的な回答を再考し、熟慮的に回答することが考えられる。

2. 研究の計画・方法

実験は Thompson & Johnson (2014)の手続きを参照し実施し、道徳判断課題の直観的回答に対する FOR が務論的反応と功利的反応が競合するシナリオで高くなるか、および、FOR がその後の熟慮的判断に影響するかを検討した。

実験材料として Greene et al., (2008)のモラルジレンマシナリオから義務論的反応と功利的反応が強く競合する High Conflict (HC)シナリオ 3 種、義務論的反応が優勢な Low Conflict(LC)シナリオ 3 種、功利的反応が優勢な Impersonal(IP)シナリオ 3 種を用いた。モラルジレンマシナリオについて、功利的な行動が適切かどうかを「1. 適切ではない」から「6.適切である」の 6 段階で回答するように求めた。

実験参加者は 107 名であり、実験は PC 上で Qualtrics ソフトウェアを用いて行った。はじめに全てのジレンマシナリオを「直観的に素早く」回答するよう求め、次いで、直感的な回答に対する FOR を「1.絶対に間違っていると思う」から「6.絶対に正しいと思う」の 6 段階で回答させた。その後、モラルジレンマシナリオを再度提示し「じっくりと熟慮して」回答するように求めた。併せて、参加者の熟慮性の指標として日本語版情報処理スタイル尺度 (内藤・鈴木・坂本、2004)と Cognitive Reflection Test (CRT: Frederick, 2005)を行った。

3. 研究の特色

本研究では、推論研究の知見から、道徳判断の直観的過程において感情的な反応だけではなく、功利の計算といった規範に基づく反応が生じるか、および、直観的過程における反応の競合が熟慮的過程を喚起させるかを検討する。本研究により、①道徳判断の直観的過程において功利的判断が生じるか、②直観的過程での反応の競合によって熟慮的過程が喚起するか、および、③推論と道徳判断の二重過程は共通したプロセスを持つか、について示唆を与えることが可能である。

4. 研究の成果

モラルジレンマ判断の結果について(Figure 1)、2 (回答：直観、熟慮) * 3 (シナリオ:HC, LC, IP)の２要因分散分析を行った。その結果、HC シナリオと比べ、LC シナリオでは義務論的判断、IP シナリオでは功利的判断が増加することが示された $F(2, 212) = 135.1$, $p < .001$, $\eta^2_p = 0.56$。一方、どのシナリオにおいても直観的な回答と熟慮的な回答で評定値の違いは見られなかった $F(2, 212) = 1.54$, ns, $\eta^2_p = 0.01$。FOR について(Figure 2)、1 要因分散分析(シナリオ:HC, LC, IP)を行ったところ、HC は LC, IP と比較して FOR が低くなることが示された $F(2, 212) = 4.95$, $p < .01$, $\eta^2_p = 0.05$。また、相関分析の結果、FOR とモラルジレンマ判断の回答、および FOR と情報処理スタイル、CRT の成績に有意な相関は見られなかった。

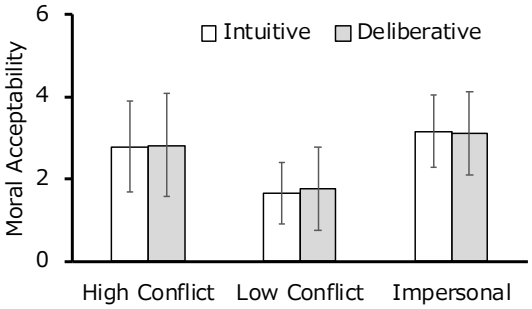


Figure 1. 道徳判断課題における功利的反応の受容度の平均値と SD

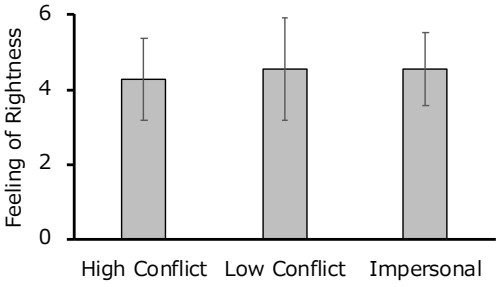


Figure 2. 道徳判断課題での直観的判断に対する FOR の平均値と SD

義務論的判断と功利的判断が競合する HC シナリオで、直観的な回答に対する FOR が低下したことから、先行研究と同様、直観的過程において義務論的反応と功利的反応の競合が生じ、競合によって FOR が低くなる可能性が示された。FOR と認知的熟慮性の指標である情報処理スタイルや CRT の成績の相関が見られなかったことから、FOR は直観的過程の処理を反映していると考えられる。一方、FOR と熟慮的回答の相関が見られなかったことから、FOR が低い場合、熟慮的過程が駆動するかは明らかにできなかった。

本研究では、モラルジレンマ判断における義務論的反応と功利的反応の競合が、参加者の認知的熟慮性に関わらず、直観的判断に対する正しさの感覚を低下させることを示した。この結果は、直観的過程においても論理や規範に従った反応が生じるという、近年の推論の二重過程に対する知見が道徳判断の二重過程にも応用できる可能性を示唆している。

今後の展望として、本研究では直接的な方法で道徳判断の直観的過程を検討していないため、認知負荷をかける、SCR を測定するなど、より直接的に直観的過程での反応を明らかにする必要がある。また、FOR と道徳判断との関連が見られず、道徳判断における熟慮的過程の駆動メカニズムについては明らかにできなかった。反応時間などの指標を併せて用いることで、直観的過程における競合と熟慮的過程の喚起メカニズムについてより詳細に検討していきたい。

手関節動作筋の張力低下が肩周囲筋筋活動に及ぼす影響の解析
－肩の痛みや運動制限の解消に向けた研究－

愛知医療学院短期大学　リハビリテーション学科　草川　裕也

1. 研究の目的

手の外傷や手術の後、リハビリテーションを進めていく中で、患者に肩の痛みや運動制限、関節拘縮が生じることがある。この症状に関する報告は散見されるが、その原因を検討した報告はなく、生理学的メカニズムが未だ明らかになっていない。

そこで、著者はこれまで健常者と手関節周囲損傷患者を対象に、手関節運動時の上腕二頭筋、三角筋の筋活動を測定してきた。結果、肩に痛みや運動制限を生じた者はいなかったが、手関節周囲損傷患者には時間経過とともに、上腕二頭筋に過剰な活動が生じ、上腕二頭筋と三角筋の活動バランスに不均衡が生じることが確認された。そのため、この筋活動のバランスの不均衡が、手の外傷や手術の後に生じる肩の痛みや運動制限の原因の一つである可能性が考えられた。

筋活動については、四肢遠位部の活動が近位部の活動に影響を及ぼすことが知られており、肩周囲筋の筋活動バランスの不均衡は、上肢遠位部の筋活動バランスの不均衡によるものではないかと考えられた。そのため、上肢遠位部の筋活動バランスの不均衡を引き起こす原因を検討し、手関節周囲損傷後に生じる症状の一つである、手関節動作筋の張力低下によるものではないかという仮説に辿りついた。そこで、本研究では、手関節動作筋の張力低下による上肢遠位部の筋活動バランスの不均衡が、肩周囲筋筋活動に及ぼす影響について解析し、その 2 つの関係について明らかにすることを目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1) 対象

同意の得られた、肩関節に疾患のない右利き健常者 16 名を対象とした。

(2) 方法

図 1 の流れで、表面筋電図測定、低周波による電気刺激を実施した。

筋電図の測定肢位は、過去の研究と同様、右肩関節内外転・回旋 0°、右肘関節屈曲 90°、右前腕回旋 0° 位を共通条件に、右肩関節屈曲 0°、45°、90° の 3 肢位および、机による上肢支持の有無の 2 条件の組み合わせによる 6 つの肢位とし、それぞれにおいて右手関節掌背屈自動運動中の右上腕二頭筋、右三角筋前部の筋活動を測定した。なお、1 日目に上肢支持なしの条件で測定し、2 日目の測定は上肢支持ありの条件で実施した。筋電図測定中の手関節掌背屈運動は、対象者の可能な最大可動域で、合図に合わせて行った。

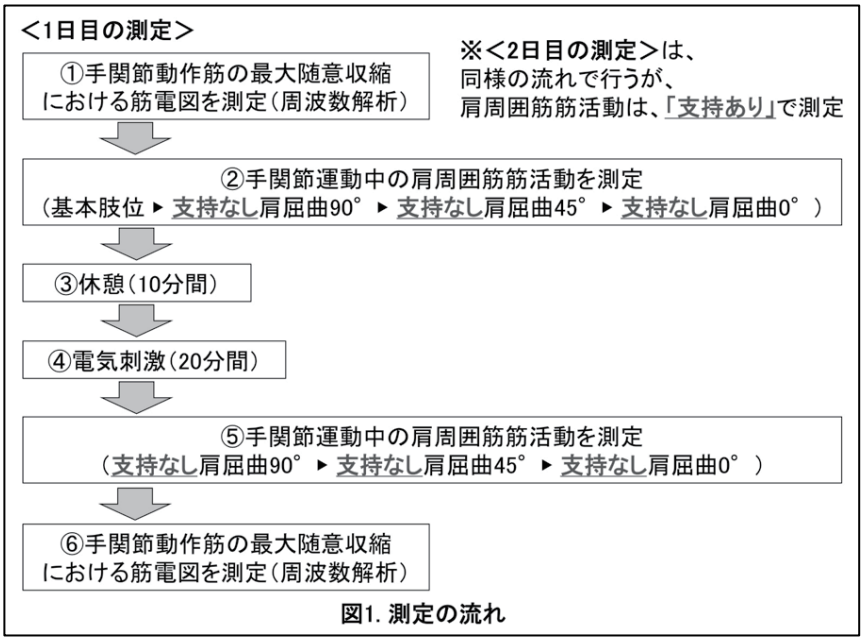


図1. 測定の流れ

低周波による電気刺激は、手関節動作筋に疲労を誘起する目的で実施した。電気刺激については、予備的実験の結

果を参考に、刺激周波数、刺激幅、刺激強度を規定し、20 分間実施した。対象筋は、筋電図学的に手関節背屈運動において主役的役割を果たすと言われる、右短橈側手根伸筋とした。電気刺激実施前後には、短橈側手根伸筋の疲労評価のために、短橈側手根伸筋最大随意収縮時の筋電図を測定した。

短橈側手根伸筋の筋電図については、周波数解析を行い、電気刺激実施前後の平均周波数の比較を行った。肩周囲筋の筋電図は、短橈側手根伸筋への電気刺激実施前後の 2 回測定し、各筋の電気刺激実施前後における筋活動の差を求めた。

3. 研究の特色

著者の過去の研究より、上腕二頭筋と三角筋の活動バランスの不均衡が、手の外傷や手術の後に生じる肩の痛みや運動制限の原因の一つである可能性が示唆された。そして、肩周囲筋の筋活動バランスの不均衡は、上肢遠位部の筋活動バランスの不均衡によるものではないかと考え、手関節周囲損傷後に生じる症状の一つである、手関節動作筋の張力低下（発揮される力が低下している状態であるため、本研究では「筋の張力低下」という表現を用いた）に着目し、手関節動作筋の張力低下が肩周囲筋筋活動に及ぼす影響について解析した。なお、手関節周囲損傷患者は手関節運動時に疼痛を生じやすく、手関節動作筋の張力測定が難しいと考えられたため、本研究では健常者を対象とし、薬物などを使用せず、できるだけ侵襲の少ない方法で、他部位の筋に影響を及ぼさず、限定的に手関節動作筋のみ疲労を誘起するために、電気刺激を使用し、手関節動作筋の張力低下を生じさせた。このような電気刺激にて筋疲労を誘起する実験は下肢筋を対象に行われているが、上肢筋を対象とした実験はほとんど行われていない。本研究は、電気刺激にて誘起した手関節動作筋の疲労による筋張力の低下が、遠隔部位である肩周囲筋の筋活動に与える影響を解析するというオリジナルな研究である。

将来的には、手関節動作筋の張力と肩周囲筋の筋活動の関係性を明らかにし、肩の痛みや運動制限などの機能障害を予防・治療する手段として、手関節動作筋の張力維持や張力強化が有効となりうるかを検討したいと考える。このように、その症状の予防・治療法確立のためにも、発生メカニズムを検討する本研究は有意義なものである。

4. 研究の成果

(1) 短橈側手根伸筋への電気刺激の効果

短橈側手根伸筋の平均周波数は、電気刺激後に有意に低下した。そのため、電気刺激により短橈側手根伸筋は疲労したと考えられた。

(2) 短橈側手根伸筋の張力低下が肩周囲筋に及ぼす影響

上腕二頭筋、三角筋ともに、短橈側手根伸筋の張力低下により筋活動量の変化が認められたが、有意差は認められなかった。本研究では、電気刺激による短橈側手根伸筋の疲労が認められたが、手関節運動に影響を及ぼすほどの張力低下は生じていなかったため、運動に影響を及ぼすような、より大きな張力低下を生じることで、上腕二頭筋、三角筋の筋活動量の変化は大きくなる可能性がある。

張力低下による筋活動量の変化としては、支持なし条件においては、上腕二頭筋の筋活動量が減少し、三角筋の筋活動量が増加した。三角筋は、外側上腕筋間中隔を介して、本研究で対象とした短橈側手根伸筋を含む前腕伸筋群との間に筋連結を持つと報告されている（河上ら、 1996)。そのため、疲労により張力低下を生じた短橈側手根伸筋に力を入れようとした際に、接続している三角筋まで活動が生じたのではないかと考えられた。また、このように三角筋の筋活動が増加したことにより、肢位保持のための上腕二頭筋筋活動の必要性が減少し、上腕二頭筋筋活動量が減少したと考えられた。

本研究において、三角筋と前腕伸筋群との間の筋連結が、手関節動作筋張力低下時の肩周囲筋筋活動量の変化に関与していることが考えられたが、手関節屈筋群を含む前腕屈筋群は、前腕筋膜を介して上腕二頭筋との間に筋連結を持つと報告されており（河上ら、1996)、前腕屈筋群は上腕二頭筋筋活動に関与しているとも考えられる。そのため、今後は前腕屈筋群の張力低下が肩周囲筋に及ぼす影響について検討したい。

神経精神疾患モデルマウスの代謝産物の研究
－亢進化合物の発現機構の解明と機能解析－

京都産業大学　総合生命科学部　藤田　明子

1. 研究の目的

難治てんかんの原因遺伝子とされるシアル酸転移酵素 St3gal4 の遺伝子欠損マウス（KO マウス）は、うつ・不安様症状を示す（*J. Neurochem.*, 2014)。生化学的解析から、KO マウスは脳および血中の成長ホルモンと関連分子 IGF1 の発現が減少すること、血中アルカリホスファターゼ値が高いことを明らかにしている。 また、多価飽和脂肪酸を多く含む餌を摂取すると、野生型マウス（WT マウス)は恐怖文脈記憶を緩和したのに対し、KO マウスは変化しない(*PLOS ONE*, 2015)。以上の結果は、KO マウスにおける精神疾患様症状が、脂質代謝異常に起因していることを示唆している。また、ヒト ST3GAL4 が脂質代謝異常と関連性のあることも、ヒト一塩基置換解析より確認されている。

以上の結果は、末梢の脂質代謝がマウスの情動に影響を及ぼすことを示している。我々は、代謝の最終産物である尿中揮発性化合物（VOC)を調べた。KO マウスの尿からヘッドスペース固相マイクロ抽出（SPME)法にて抽出し、ガスクロマトグラフィー・質量分析（GC-MS)を行った。その結果、KO マウス尿中への排出量が有意に亢進した、フェロモン様物質β-farnesene およびα-farnesene を発見した。この farnesene は、雄マウスの尿中に存在し、雌への誘引物質として機能すること、植物では捕食者や菌の感染に対する防御の役割を果たす物質であることが知られている。その合成酵素は植物、菌で同定されているが、脊椎動物では同定されていない。本研究では、この 2 種の化合物 farnesene のマウス由来合成酵素を探索し、ファルネセン発現とマウスの情動行動との関連性を検証した。

2. 研究の計画・方法

(1) βファルネセン合成を担うマウス由来酵素の選定とクローニング

植物および菌類で同定されている Farnesene 合成酵素は、‘RXR’と‘DDXXD’の二つのモチーフをもつ。菌類由来 Farnesene 合成酵素 31 種類の両モチーフからマウスに対するホモロジー検索を行い、マウスにおける Farnsene 合成酵素候補遺伝子 X を得た。本研究では、まずこの候補遺伝子 X のクローニングを行った。ポジティブコントロールとして、*Artemisia annua*（和名: クソニンジン）の葉から Farnesene 合成酵素遺伝子(Acc. No: AY835398.1)をクローニングした。

(2)酵母発現系による Farnesene 合成酵素タンパク質の調製と GC-MS による酵素産物の解析

Farnesene 合成酵素遺伝子を酵母に導入、発現したタンパク質酵素は、酵母に内在する farnesyl diphosphate を利用し、β-farnesene を合成、分泌する。揮発成分である farnesene は、培地に加えた有機溶媒ドデカンでトラップできる。クローニングにより得たマウス Farnsene synthase 候補遺伝子を酵母タンパク質発現ベクター酵母タンパク質発現用ベクター pRS424 にサブクローニングした。pRS424 に挿入した遺伝子は、ガラクトース存在下で His 標識融合タンパク質として発現する。機能解析には、酵母の系を用い、タンパク質発現誘導後 6h, 12h, 24h から毎 24h、120h まで経時的にドデカンを回収し、GC-MS で分析した。

(3)出会い行動による雄マウス尿中 Farnesene の変動

KO マウスで発現が増加する farnesene の情動行動との関連を調べるため、兄弟以外のマウスに出会ったことがない雄 KO マウス(10-15 週齢)と WT マウスをそれぞれ発情前期/発情期（P/E）または発情後期(D）の雌 ddy マウスと 30 分間同じケージに滞在させた。ケージ

に入れてから 10 分間の雄マウスから雌マウスへのアクセス数を調べた。Farnesene の変動を観察するため、雌マウスと出会う前と出会った後の KO および WT 雄マウスから採尿を行った。尿中の farnesene を GC-MS 解析し、出会い行動との関連性を検証した。

3. 研究の特色

神経精神疾患のモデル動物は種々作成されているが，St3gal4 一遺伝子の欠損により，うつ・不安症や統合失調症・陰性症状を示すモデル系は，申請者の所属する研究室で開発された独自の研究である。St3gal4-KO マウスは，脂肪の分解に関与する成長ホルモンと IGF1 の発現が減少し，摂取する油脂種の違いによる情動行動の変化を示す。本研究の特色は、末梢の脂質代謝の変化とマウスの情動行動に注目したところにある。申請者は，尿中の VOC をヘッドスペース SPME-GC-MS 法で解析し、β-farnesene およびα-farnesene が KO マウスにおいて有意に亢進することを発見した。本研究は、うつ・不安症モデルマウスにおける性行動と代謝の変動を解析することで、代謝の情動行動への影響を調べたものである。

4. 研究の成果

(1)酵母発現系による farnesene 合成酵素タンパク質の調製と GC-MS による酵素産物の解析

farnesene 合成酵素候補遺伝子 X またはクソニンジン farnesene 合成酵素遺伝子を導入した酵母にドデカンを加えて培養、ガラクトース含有培地でタンパク質発現を誘導し、farnesene 合成の経時変化を観察した。クソニンジン由来 farnesene 合成酵素遺伝子を導入した酵母を培養したドデカンからは、タンパク質発現誘導後 24 時間で farnesene のピークが検出され、48 時間に plateau に達した（図 1, (b)）。一方、マウス脳由来の候補遺伝子 X または空ベクターを導入した酵母からは、farnesene が検出されなかった（図 1, (a, c)）。導入したタンパク質発現を抗 His 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、候補遺伝子は発現が確認されたが、発現が不安定であった。酵母内の局在や安定性について、今後検証していく必要があると考えられる。

(2)情動行動 - 出会い行動による Farnesene 発現量への影響

雄の WT マウスの雌マウスへのアクセス数は、出会った雌マウスが P/E 期の場合、D 期の雌との出会いと比べて大きく増加した。一方、KO マウスは、雌の発情期のステージに対する変化はなかった。これは、KO マウスが雌の発情状態を感知しないか、性行動の最初の一歩であるアクセス行動が WT マウスと異なることを示している。

次に、P/E 期の雌マウスと出会う前と出会い後の KO マウスおよび WT マウス尿中のβ-farnesene およびα-farnesene の変動を調べた。出会い前の KO マウスの farnesene 発現量は WT マウスより多く、再現性が確認された。一方、出会い後は WT マウス尿中の farnesene 量が増加したが、KO マウスは変化がなかった。つまり、WT マウスは出会い行動により尿中代謝産物である farnesene の発現が亢進する機構があるが、St3gal4-KO マウスは、その機構に異常が生じていると考えられる。その要因として、farnesene 合成に関わる farnesene 合成酵素の発現または機能変化が挙げられるが、今後の課題である。

(3)研究の総括

雄 KO マウスは、雌マウスの発情期に対する反応に異常が生じていることが示唆された。さらに、WT マウスにおいて farnesene の発現が出会いにより亢進したのに対し、KO マウスは出会い前から発現が高く、出会い行動によっても変化が生じなかったことから、KO マウスは性フェロモンの発現制御に異常がある可能性が示唆された。

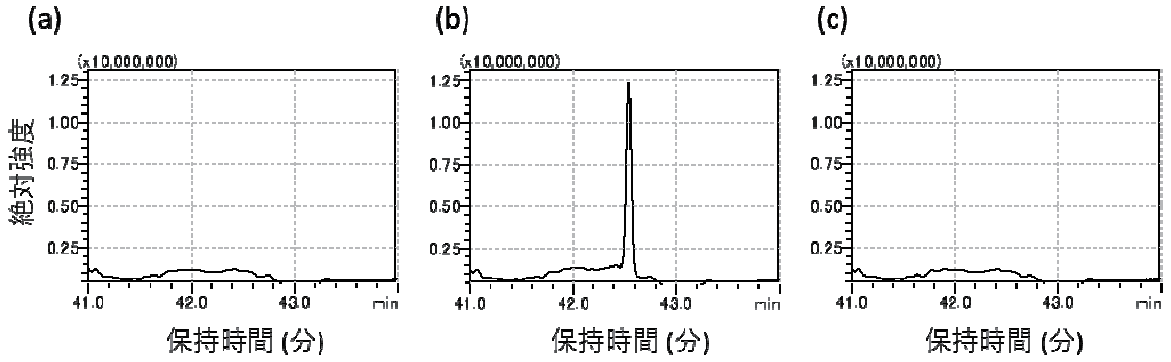


図1 酵母の培養をガラクトース培地に変換後48時間後のドデカン層を回収し、GC-MSで分析した結果
(a) pRS424ベクターのみ (b) クソニンジン由来farnesene synthase (c) マウス脳由来候補遺伝子X

統計手法を用いた源氏物語 54 巻の成立過程についての検討

同志社大学　研究開発推進機構・文化情報学部　土山　玄

1. 研究の目的

『源氏物語』は平安時代に成立した長編物語である。この物語は 54 巻から構成され、一般にこれら 54 巻は三部に分割されると考えられている。第一部には第 1 巻「桐壺」から第 33 巻「藤裏葉」までが属し、第二部は第 34 巻「若菜上」から第 41 巻「幻」の 8 巻が、第三部は第 42 巻「匂宮」から第 54 巻「夢浮橋」の 13 巻が属すとされる。この第一部の 33 巻には成立順序が現行の巻序と異なるとする見解があり、これら 33 巻は「紫上系」と「玉鬘系」という 2 つの群に分類されると論じられている。第一部 33 巻が 2 群に分類されるという見解の根拠として、登場人物の出現状況があげられる。紫上系に登場した人物は玉鬘系においても出現するが、反対に玉鬘系において初出となる登場人物は例外なく紫上系に登場することはない。このような事実に基づき、紫上系の 17 巻が成立した後に玉鬘系が成立し年立に従い紫上系に挿入されたと論じられている。しかし、第一部 33 巻が 2 群に分類されるとする見解を支持する根拠は登場人物の出現状況の他にない。

そこで、本研究では『源氏物語』第一部の成立過程を解明するために、語の出現頻度について統計的に分析を行う。文学的文章のテキストデータを用いた計量的な研究は計量文献学と称され、主に著者の文体に関わる習慣的特徴を統計的に解析する。なお、文体という概念は多様であるが、計量文献学においては文体とは計数可能な記述形式のことであり、その内容は文字や語の頻度、語や文の長さなどの文章を構成する量的な要素である。

2. 研究の計画・方法

本研究では青表紙本系の大島本を主な底本とする『源氏物語語彙用例総索引 自立語編』及び『源氏物語語彙用例総索引 付属語編』を電子化したテキストデータを分析に利用した。『源氏物語語彙用例総索引』は源氏物語の本文すべてについて、形態素解析を行ったものである。すべての語に、表記形、表記形仮名読み、終止形、終止形仮名読み、品詞コード、活用形コード、意味コードなどの情報が付与されている。なお、単語認定については、『源氏物語大成 索引篇』の単語認定基準に準拠している。

本研究では語の n-gram を分析に採り上げた。n-gram は文中において隣接する n 個の要素を 1 つの単位とする。よって、単語の n-gram は隣接する n 個の単語を 1 つの単位として頻度を集計した特徴量である。n = 1 のときは unigram、n = 2 のとき bigram、n = 3 のときは trigram と称され、本研究では unigram 及び bigram を分析に用いた。

また、文章の計量分析では品詞別に語の unigram を集計し、品詞毎に分析を行うことが多い。しかし本研究では、まず品詞別に語を集計せずに出現頻度上位の unigram 及び bigram を用いて分析を行った。次いで、機能語の unigram 及び bigram を用いて分析を行った。機能語とは文章中において語彙的意味を担わず文法的機能を担う語であることから、本研究では補助動詞、助詞、助動詞の 3 品詞を機能語として、頻度を集計した。ただし、『源氏物語』の各巻の延べ語数は一様ではないことから、各 n-gram の頻度を分析には用いず、n-gram の総度数に対する割合、すなわち各 n-gram の出現率を求め、これを分析に用いた。分析においては、このように集計した n-gram の出現率について主成分分析を行った。

3. 研究の特色

著者について議論の余地がある文章を研究対象とするとき、人文学的な手法の他に計量的な手法による研究がある。本研究の特色としては、この計量的な手法を用いる点にある。計量的に著者の推定あるいは識別を行う場合、文中において語彙的意味ではなく文法的機能を担う助詞や助動詞などの機能語が広く分析に用いられ、欧米諸語で記述された文献や日本の近現代の文献を対象に、その成果が報告されている。一方で、テキストの電子化が容易ではないことから、日本の

古典文学作品を対象とした研究は十分に展開されているとは言えない。これに加えて、『源氏物語』などの日本の古典文学作品の多くはオリジナル原稿が散逸しており、書写によってのみ受け継がれており、このため著者の特徴的な文体が希釈されている可能性が予想される。しかし、申請者は、『うつほ物語』と『源氏物語』を対象とし、現代文や欧米文学と同様に古典文においても、語の出現率、あるいは語の頻度について計量分析を行うことで著者の識別が可能であることを明らかにした。

このような著者不詳の文献を対象とした著者の識別や推定を目的とした計量的な研究では、機能語が分析項目として取り上げられることが一般的である。先にもふれたように、日本語の場合は、助詞や助動詞などが機能語に該当し、このような機能語が計量分析に取り上げられる背景には、名詞や動詞などの語彙的意味を担う実質語に比べ、機能語は研究対象となる文献の内容、すなわちストーリーの影響を受けにくく、出現する語彙に記述内容に起因すると考えられる出現傾向の偏りが生じにくい。従って、著者の識別に適していると考えられることがある。

4. 研究の成果

作家が文章を執筆する上でどのような語を多く用いるか、ということはその作家の習慣的特徴の現れであると考えられる。出現頻度上位の語の unigram 及び語の bigram は作家が文章を執筆する際の習慣的特徴であり、文体的形式的特徴を規定する要素の 1 つであると思われる。本研究において検討を加えた項目は『源氏物語』にあらわれる出現頻度上位の unigram 及び bigram、そして機能語の unigram 及び bigram である。

n-gram の出現頻度上位の変数について主成分分析を行った結果、どのような分析においても紫上系の諸巻と玉鬘系の諸巻は一部の巻が混在して付置されるものの概ね異なる傾向を有していると考えられる。従って、計量的な判断に基づくならば、紫上系と玉鬘系とでは文体的形式的特徴は相違していると言える。

Rett 症候群の病態解明を目的とする CDKL5 の機能解析
－CDKL5 によるエンドサイトーシスの制御－

立命館大学　薬学部　片山　将一

1. 研究の目的

(1)研究の背景

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)は主に脳に存在するタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ) である。CDKL5遺伝子の変異は、Rett症候群と呼ばれる、精神発達の遅れを伴う遺伝性疾患を引き起こすことが知られているが、その発症に関わる分子メカニズムは明らかにされていない。CDKL5はプロテインキナーゼであるため、真の標的基質を同定することがRett症候群発症機構を解明するための重要な課題であるが、これまでにCDKL5の生理的基質については十分に理解されていない。これまでに報告者らはCDKL5の内在性基質の探索を行い、良好な基質としてAmph1を同定することに成功した。Amph1はエンドサイトーシス関連タンパク質であり、細胞膜を湾曲させる働きを持つ。エンドサイトーシスは神経の機能において重要な役割を持ち、神経伝達や神経突起の成長に関与する。また、Amph1をノックアウトしたマウスはてんかん発作の頻発、行動異常などのRett症候群の症状と似た表現型を示す。これらのことから、CDKL5は神経細胞においてエンドサイトーシスを制御する可能性が考えられた。

(2)研究の目的

上記のように、エンドサイトーシスは神経伝達や神経突起の伸長に関わる重要な機構である。さらに近年報告者らはCDKL5がエンドサイトーシスを制御するプロテインキナーゼであるDual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1Aによってリン酸化され、その細胞内局在を制御されることを見出した。これらのことから、CDKL5がどのようなメカニズムでエンドサイトーシスを制御しているかを明らかにすることで、Rett症候群の発症機構を解き明かすことを目的とした。

2. 研究の計画・方法

(1)CDKL5 と Amph1 の相互作用がエンドサイトーシスに与える影響

CDKL5によるAmph1リン酸化機構の破綻により、エンドサイトーシスに異常が起こるかを調べるため、ATP結合部位を変異させ、不活化させたCDKL5を発現するNeuro2a細胞においてTfの取り込みを調べる。報告者らのこれまでの研究によって、CDKL5のN末端に存在するキナーゼドメインがAmph1と結合することが明らかになっている。CDKL5によるAmph1のリン酸化ではなく、CDKL5とAmph1の結合がTfの取り込みを制御している可能性も考えられるため、CDKL5のキナーゼドメインを欠損させた変異体を発現するNeuro2a細胞において、Tfの取り込みを解析する。ここまでの時点で、良い結果が得られなかった場合には、内在性CDKL5の存在によって一過的に発現させたCDKL5変異体の効果が薄れていると考えられるため、CRISPR-Cas9システムを利用し、Neuro2a細胞に発現する内在性のCDKL5をノックアウトする。

(2)Rett 症候群モデル細胞における表現型解析

報告者らはこれまでに、Rett症候群患者のゲノム解析を行い、新規の変異体Y177Cを同定している。さらに、CDKL5(Y177C)はAmph1をリン酸化することが出来ないことも明らかにしている。本研究では、Rett症候群モデル細胞としてCDKL5(Y177C)発現Neuro2a細胞を樹立し、その表現系を解析する。Neuro2a細胞はレチノイン酸で刺激されることによって、神経様突起を伸長する。このことを利用し、Rett症候群モデル細胞と野生型細胞の突起伸長能について比較解析を行う。具体的には、神経突起の本数、長さや突起伸長する細胞の割合などについて解析する。

3. 研究の特色

(1)研究の特色

CDKL5の遺伝子変異により、Rett症候群が引き起こされることが明らかにされているものの、その発症メカニズムはいまだに解明されていない。本研究では、CDKL5の良好な基質としてAmph1を同定したことにより、エンドサイトーシスという現象に着目し、Rett症候群の病態および発症機構について解析を行うことが出来るようになった。報告者はこの点が本研究の最大の特色であると考えている。

(2)独創性

CDKL5は神経細胞において軸索や樹状突起の成長に関わるとの報告こそあるものの、先行研究では変異部位のプロファイリングと症状の関連性について解析しているものがほとんどである。一方本研究は、CDKL5の機能について分子レベルの解析を行うという点において、先行研究と着眼点の異なる研究である。

4. 研究の成果

(1)CDKL5 と Amph1 の相互作用がエンドサイトーシスに与える影響

ATP結合部位を変異させたCDKL5やキナーゼドメインを欠損したCDKL5をNeuro2a細胞に発現させ、Tfの取り込みを調べた。しかしながら、Tfの取り込みの差は野生型のCDKL5を発現させたNeuro2a細胞との間に見られなかった。そこでNeuro2a細胞における内在性CDKL5をノックアウトした細胞株の取得を試みたが、良好な結果は得られなかった。そこで報告者はCDKL5遺伝子がX染色体に位置することを利用し、性染色体のタイプがXYである培養細胞株について、CRISPR-Cas9法によってCDKL5ノックアウト細胞株を樹立することに成功した。今後はこの細胞株を使用し、エンドサイトーシスの解析を行う予定である。

(2)Rett 症候群モデル細胞における表現型解析

上述の通り、Neuro2a細胞株には内在性のCDKL5が存在することが予測される。従って、単純にCDKL5(Y177C)を発現するNeuro2a細胞株を作製しただけでは、良好な結果は得られないと考えられた。そこで報告者は(1)の実験結果で得られたCDKL5ノックアウト細胞株に、CDKL5(Y177C)を発現させることを試みている。現在までに、当該の細胞において最も適したプロモーターを持つプラスミドを決定することが出来たので、安定発現株の作製に取り掛かる。

人工知能がもたらす社会への負の影響と企業が実行できる解決策

立命館アジア太平洋大学　国際経営学部　篠原　欣貴

1. 研究の目的

(1)人工知能（AI）がもたらす負の影響の解明

①AIという言葉が広く普及し、AIへの企業投資の活発化がなされてきている。一方、AIが雇用に与える影響も指摘されており、AIによる国際的な経済格差や機会の不平等の拡大といった新たな問題を発生させる可能性もある。更には、AIが予期せぬ暴走をする可能性もあり、GoogleはAIの暴走に対処するための「非常停止ボタン」の開発に着手し始めている。こうした背景を踏まえ、本研究ではAIが社会にもたらす負の影響を明らかにする。

(2)AI による社会への負の影響の緩和策の検討

①上記の問題に関して、企業が具体的にどのようなことを検討しているのか、AIの研究者がどのようなことを試みているのかを明らかにすることで、負の影響の緩和策の提示を試みる。

2. 研究の計画・方法

(1)ケーススタディ・メソッド

本研究は伝統的なケーススタディ・メソッドに基づき、triangulation の観点からデータを収集し、そこから得られた情報をテキスト化・コード化し、重要な概念の抽出を試みた。

①実務家と研究者へのインタビュー

本研究ではAIを実際に開発している研究者、およびAIのサービスを適用しているもしくは適用を検討している実務家へのインタビューを行い、研究目的に関する semi-structured interview を行った。インタビューは合計4名に対して行われ、インタビュー内容の録音をし、内容をテキストにまとめてそこから重要な概念等を導き出した。

②文献サーベイ

AIに関する論文、雑誌、新聞記事、政府刊行物等を広く収集し、現在提示されているAIの社会への負の影響およびその解決策に関するレビューを行った。

③展示会への参加

東京で開催された自動運転EXPO、ロボデックス、ウェアラブルEXPOに参加し、実際に企業がどのような製品にAIを応用しているのか、応用に関してどのような問題があるのか、それに対してどのようなことを行っているのかを観察およびインタビューを行った。

3. 研究の特色

(1)AI 開発・活用における負の影響の考慮とその解決策の提示

①本研究の特色は、企業がAIの開発・活用によってどのような社会に対する負の影響を生みだしうるのか、社会への負の影響を解消するために、企業が何をすべきかを明らかにする点にある。AIの負の影響に関しては、物理学者のスティーブン・ホーキング博士やテスラモーターズCEOのイーロン・マスク氏、マイクロソフト創業者のビル・ゲイツ氏などが指摘しており、AIの開発・活用が持続可能な社会を構築する上でどのようなリスクをもたらしうるのか、という視点での議論は活発化する兆しを見せている。日本国内においても、人工知能学会が倫理委員会を設置し、AIの社会に対する影響を専門家が議論し、その情報を発信するようになってきている。本研究はこうした背景を踏まえ、企業が何をすべきか、という企業目線での規範（すべきこと）を明らかにする点を特徴と

する。従来の議論があくまで一般的なAIの負の影響に言及していたのに対し、本研究ではその負の影響を企業がどのように対処すべきか、という異なる視点での議論を展開することで、企業の社会的責任に関する議論の発展に寄与する。

4. 研究の成果

(1)AI という言葉の持つ意味の曖昧さ

①研究者とのインタビュー、さらには分権レビューを通じて、AIという言葉がいかにあいまいに用いられているかが明らかになった。ある研究者は、世間一般に言われているAIが本当に人工的に作り出された知能と呼べるのか、疑問を呈していた。すなわち、知能と呼ぶだけ、我々人類は何が知能と呼べるのかを明確に定義することができておらず、知能の理解なくして人工知能についての議論はできないのである。

本研究ではこのインタビューの結果を踏まえ、AIを弱いAIと強いAIに明確に分けて議論することを行った。前者は知能があるようにふるまうことができる機械を意味し、後者はもっぱらそれ自身で物事を理解・思考することができる機械を意味する。インタビューや文献サーベイの結果から、後者は将来的に実現できるかもしれないAIではあるものの、その開発にはまだかなりの年月を必要とすることが指摘された。一方、弱いAIという前提は、企業がAIを用いようとしている文脈に合致し、研究者や実務家も弱いAIの前提で技術・製品の開発を行っていた。

(2)AI がもたらす負の影響

弱い AI という前提のもと、本研究では 4 つの負の影響を明らかにした。

①従業員の開発と採用に関する問題

AIの普及によって職が奪われる、という意見がオックスフォード大学の研究結果を機会に日本においても広く普及している。しかし、本研究の結果から、職が奪われるということ負の影響を持つのではなく、むしろAIによって職を変える必要の出てくる人に対して、どのような支援が必要なのか、という視点が欠如している点であることが明らかになった。AIが人に置き換われる作業の多くは単純作業であり、これは人間の退屈な仕事からの解放と考えることができる。それゆえ、より創造的な仕事に人間が集中できるようにすることが重要であることが明らかになった。とりわけ、日本の企業はより長く従業員に勤務してもらいたいと考えている。それゆえ、ヒトからAIに仕事がシフトした際、どのような支援を行う必要があるのかを企業は考えなければならないと言える。

②フィルター・バブル

AIの技術は検索エンジンやレコメンド機能に応用されている。この技術によって、人は自分の求める情報を検索しやすくなった。一方、好きな情報に囲まれるということは、自身にとって都合の悪い情報、あるいは関心の低い情報に目を向けなくなることを意味している。このように、自分の好きな情報という泡に囲まれた状況をフィルター・バブルと呼ぶ。研究者へのインタビューから明らかになったことは、検索エンジンやレコメンド機能において収集され応用されている情報（個人の検索結果や購買結果など）は相互に結びついており、単一の情報を削除したからと言って一度構築された情報網を消すのは難しいということであった。すなわち、AIによって形成されたフィルターバブルを割ることが非常に困難である、ということであった。それゆえ、AIの技術を用いたフィルタリングを利用する際には、フィルタリングを用いないその他の情報源（実際に見た情報や体験したこと）も考慮し、なるべくバイアスのかからないような仕組みを構築しなければならないことが明らかとなった。

③ビッグ・データ分析に関わる事故

AIを活用するためにはビッグ･データを用いる必要がある。なぜなら、膨大な量のデータからAIは学習し、コマンドを実行するようプログラムされるからである。それゆえ、ビッグ・データの取り扱いに関する懸念が負の影響として明らかとなった。とりわけ、企業のサービスを利用する消費者はどのような情報が提供され、それによってどのような影響を自身が受けるのかについて受け身にならざるを得ない。それゆえ、AIの学習を

目的としたデータ収集においては、消費者のデータを企業がどのように利用するのかをはっきりと明示することがより一層重要になると言える。また、それとともに技術者が顧客のプライバシーといった問題に対してより慎重になることが重要であり、技術者への倫理教育もより一層重要になると言えるだろう。

④人工知能の意味論の理解の限界

現在のAIは弱いAIであり、それ自身が完全に物事を理解・思考することはできない。あくまで決められたルール（プログラム）に従って情報処理を行い、それに応じたアウトプットを提示するものと言える。この物事の不完全な理解・思考という特徴は意味論を完全に理解できないということを意味している。例えば、自動運転の車に障害物を避けるようプログラムしたとしよう。その場合、障害物とは何かを明確に定義する必要がある。小石は障害物なのか、中くらいの石は障害物なのか、空き缶は障害物なのか、などである。こうした人が当たり前に判別することを逐一定義しなければならないことは、時にサービス開発において障害になっていた。例えば、海外からの旅行者に向けた日本の観光地案内アプリケーションを開発している企業のCTOは、例えば観光客が「女子高生」という言葉を使って検索した場合、どのような対応が最も適切なのか、非常に微妙な問題であると述べていた。つまり、その言葉で検索したことが悪意によるものなのか、そうでないのかを逐一AIが判断してレコメンドすることは難しいというのである。それゆえ、この企業では人がこのような状態に関して逐一チェックするといった対策を行っていた。善悪の関わること、あるいは人間の意図を完全にくみ取ることはAIには難しく、こうした状況に対しては人間が監視をするといったことを通じて悪意あるユーザーに対処しなければならないことが明らかとなった。

5. 研究発表

(1)学会誌

①Shinohara, Y. Ethical Issues in Applying Artificial Intelligence to Businesses in Japan, Journal of Business Ethics. (Under reviewed)

(2)学会発表

① Shinohara, Y. (2017). Ethical Problems of Artificial Intelligence: The New Challenge for Corporate Social Responsibility, 15th AP Conference, Oita, Japan.

(3)出版物

なし

アイトラッキングデータを用いた店頭広告コンテンツの効果検証

関西大学　ソシオネットワーク戦略研究機構　石橋　健

1. 研究の目的

本研究の目的は、顧客の店頭における視線追跡(アイトラッキング)によって収集した注視データを用いて、購買時点（Point-of-purchase: POP）広告のコンテンツに対する注視と購買行動の因果関係を明らかにする消費者行動モデルを構築し、POP 広告の効果を検証することである。

商品や広告など様々な視覚刺激が消費者行動に与える効果は、アイトラッキング技術を用いた注視の媒介効果によって、従来より詳細な分析が可能となっている。近年では、計測機器の発達によって実店舗における注視情報の収集も可能となっており、消費者の購入プロセスを明らかにする重要なアプローチの 1 つとして研究者や実務者の注目を集めている。

POP 広告は、商品の価格や文字情報、写真など様々な形式で店頭に設置されている。POP 広告が店舗内の購入プロセスに与える効果はこれまでに様々な研究が取り組まれてきた。しかしながら、それらの検証結果は一様ではない。この理由として、従来は店頭における詳細なデータ収集が困難であったことが挙げられる。アイトラッキング技術は、この問題を解決するために有効と考えられる。店頭環境を対象とした研究は国内外共に限られており、特に POP 広告のコンテンツが与える効果は未だ明らかにされていない。

本研究では、実際の商品棚を用いた環境で POP 広告を設置した実験を行い、アイトラッキング技術を用いて定量的に測定した商品選択時の注視データによって、POP 広告のコンテンツが商品選択に与える効果を明らかにする消費者行動モデルの構築することを試みる。申請者は、これまでに実店舗においてアイトラッキングに関する試験的なデータ収集を行ってきた。その結果、商品選択の際に POP 広告は注視される傾向にあるが、広告の対象商品のカテゴリーの影響や同条件下でのデータ収集の期間に制約があるため、分析に十分なデータの収集が困難であることがわかった。よって、本研究では、実験室における限定的な環境下での POP 広告の有効性の検証と実店舗におけるデータ収集に有用な実験設計の方法を明らかにする。

2. 研究の計画・方法

本研究では、実店舗における実験では調査が困難な POP 広告のコンテンツの効果について、アイトラッカーを用いた実験室実験によってデータを収集し、消費者の商品選択に関する新しいモデルを構築して検証を試みる。平成 29 年度前半は主に実験設計、後半は調査実験と分析を行う予定である。

実験設計では、POP 広告の情報源に関する仮説を立て、データ収集に適切な商品カテゴリーと POP 広告を検討する。本研究では、消費者の広告に対する情報処理プロセスを表した精緻化見込みモデルに基づいて POP 広告のコンテンツを分類するとともに、被験者の商品関与と知識をアンケートによって調査することにより、コンテンツと被験者情報の相互関係を考慮して分析する。また、実験設計中に学生を対象とした予備実験により、設計の妥当性を確認する予定である。

調査実験では、被験者をモニター募集し、アイトラッカーを用いたデータ収集を実施する。収集したデータは期間内にデータベース化し、POP 広告のコンテンツが注視情報を媒介して商品選択に与える効果を検証した結果から、実店舗における実験設計やビジネス応用に関して得られた知見を取りまとめる。

3. 研究の特色

商品や広告の視覚刺激、および人の視線に注目したビジュアルマーケティング分野では、メリーランド大学の Wedel らを中心に、広告やオンラインショッピングを対象とした研究が行われている。既往研究のデータ収集は、主に被験者が静止した状態でモニターを注視することで実施されている。これに対して、本研究では、被験者の立ち位置の影響などを考慮するために、実際の商品棚を用いた実験室実験により、データ収集を試みる。

また、本研究は商品紹介に関するコンテンツに焦点を当てた POP 広告の効果検証を行う。特に、

広告の情報源とその内容に関する調査を試みる。従来の広告に関する研究より、店舗経営者や商品メーカーと比べて、知人や他の消費者からの口コミ情報は購買の意思決定に大きな影響を与えると言われている。さらに、オンラインショッピングでは、利用者からのカスタマー・レビューが掲載されている。しかしながら、店頭における口コミ情報の広告としての利用はあまり行われていない。この理由として、店頭における口コミ情報の効果が明らかにされていないことと、景品表示法に対するリスク回避が挙げられる。したがって、本研究では、実験室実験において、様々な POP 広告を設置した実験を行い、精緻化見込みモデルに基づいて商品選択へ与える効果を検証する。

4. 研究の成果

(1) 予備実験による調査結果

本研究の実験設計の妥当性を検討するために、学生を対象とした調査実験を実施した。図 1 に示すように商品棚へ POP 広告を設置した結果、POP 広告のある商品に被験者の注目を集めることができたが、その効果は広告の種類によって異なるだけでなく、商品カテゴリーとの組み合わせで変化することを確認した[1]。この調査では、POP 広告のコンテンツのタイプ（店舗からの推薦、商品の人気、商品紹介）に加えて、商品間の価格の差に対する認識を注目と意思決定に与える要因としていたが、生活における必要性のような商品カテゴリーに対する認識についてアンケートする必要があることがわかった。しかしながら、実験室実験では商品棚の数が限られているため、様々な商品カテゴリーに関する調査が困難であることも明らかとなった。

(2) 視線追跡機能付き VR を用いた調査実験システムの開発

予備実験の結果から、POP 広告のコンテンツのタイプと商品カテゴリーとの組み合わせを十分に検討するためには、現実の商品棚を用いた調査に限界があることがわかった。この問題を解決するために、視線追跡機能付きバーチャルリアリティ(VR)デバイスを用いたデータ収集、および調査実験システムの構築を試みた。このシステムでは、図 2 に示すような仮想空間内で被験者が移動し、商品棚を見て、購入する商品を選択するタスクを実施できる。これらの一連の行動を記録することで、商品選択時のアイトラッキングデータを収集する。仮想空間は、現実と同じ大きさで作成することで、現実の商品棚を用いた調査と同等のデータを収集できると期待される。システムのプロトタイプを用いたテスト実験により、提案システムで収集した商品選択時の視覚的注意が、既存研究と同じ傾向を持つことを明らかにした[2]。

アイトラッキング調査では、実験設計に結果が左右されることが、既存研究によって言及されている。VR を用いた調査実験では、現実の買い物に近い場面を仮想的に構築できることから、従来の実験室実験と比べて制約を緩和できると期待される。今後の研究では、VR を用いて、予備実験の結果を踏まえた調査実験を行い、POP 広告の効果を検証する予定である。

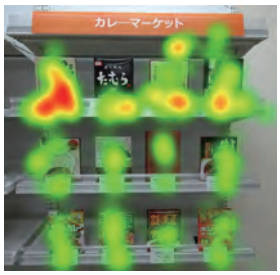


図 1 商品棚に対する注目の集計結果

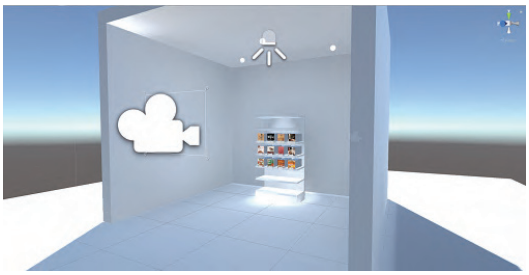


図 2 仮想空間の例

関連する研究業績

[1]. K. Ishibashi, “Assessing Effect of POP Advertising on Decision-making of Product Purchase in Supermarket – Preliminary experiment by using eye-tracking”, Proceedings of 4th Asia-Pacific World Congress on Computer Science and Engineering, pp. 1-8, 2017.

[2]. 石橋健、調査実験における視線追跡機能付き VR の利用可能性に関する研究、PACIS2018 主催記念特別全国研究発表大会予稿、経営情報学会、pp. 1-4、2018.

ヒト唾液腺悪性腫瘍におけるがん幹細胞の検討
－唾液腺がん幹細胞をターゲットにした分子標的治療開発－

関西医科大学　医学部　鈴木　健介

1. 研究の目的

耳下腺などの唾液腺に発生する悪性腫瘍は、一般的に放射線療法や化学療法に抵抗性を示すため、外科的切除が困難な症例においてはしばしば治療に難渋する。また、唾液腺腫瘍の多くが良性腫瘍であるが（60%が多形腺腫）、多形腺腫の6～10%は、がん化することが知られており、臨床上大きな問題となっている。近年、さまざまながん腫において、がん幹細胞が自己複製と分化を繰り返すことで、がん組織を維持しているとしたモデル(がん幹細胞仮説)が提唱されている。唾液腺腫瘍のがん化のメカニズムに関しては、一部の組織型を除いてはほとんど明らかになっていないが、ヒト唾液腺がん組織においてCD133あるいはCD44を発現する細胞の発現が増加しており、がん幹細胞の存在を示唆する報告がある（*Fujita S et al. J Oral Pathol Med 41:207-213, 2012*）。唾液腺がん組織中に存在するがん幹細胞が同定できれば、それを特異的に攻撃すればがん組織全体を死滅させられると考えられ、新しいがん治療戦略の柱となる可能性を秘めている。そこで、申請者は、ヒト唾液腺がん組織におけるがん幹細胞の存在を検索し、そのフェノタイプと機能的役割を解明し、唾液腺がん幹細胞をターゲットにした新しい治療法の開発に向けた研究を計画する考えに至った。

2. 研究の計画・方法

(1)ヒト唾液腺組織の分離・培養

手術で採取した唾液腺がん切除標本には、正常唾液腺組織、がん組織が混在しているため、明視下で各組織をトリミングし、トリミングした組織を酵素処理し、gentleMACS™ Dissociator を用いて細胞を分離した。正常唾液腺組織、がん組織における幹細胞を検討するため、それぞれの組織から細胞を分離し、細胞培養をおこなった。唾液腺の培養法は、ほとんど確立していないため、*Chan* らがおこなった方法を援用して（*Head Neck. 2011;33:407-14*）、培養をおこなった。培養細胞の評価法に関しては、細胞の生存率をトリパンブルー染色法、増殖能についてはMTT アッセイを用いて評価した。

(2)正常唾液腺および唾液腺がん組織におけるがん幹細胞の検討

フローサイトメトリー（BD FACS Calibur™）を用いて、正常唾液腺組織、唾液腺がん組織由来の培養細胞それぞれにおけるがん幹細胞マーカーの発現率を比較・検討した。マーカーは、CD44、CD133、CD271 および BMI-1 を用い検討した。また、死細胞を除去するため 7-AAD および AnnexinV による標識をおこない、ダブル陰性の生細胞をゲートして解析をおこなった。

(3)倫理的配慮

臨床サンプルを使用するにあたって、学内医学倫理委員会の承認のもと、全ての患者に文書での同意を得た上でおこなった（承認番号：2015103)。

3. 研究の特色

本研究では、唾液腺がん組織中のがん幹細胞が、どのようにしてがん組織の維持や増殖に寄与するかを検討することを目的としており、正常唾液腺およびがん組織におけるがん幹細胞マーカーの発現を検討することを特色としている。各組織を細胞単位に分離した後、MACS システムなどの磁気細胞分離法あるいは、セルソーターなどを用いて、幹細胞を単離し、そのフェノタイプを詳細に比較検討することで、がん幹細胞の機能的役割の解明、新しいマーカーの開発、革新

的治療法の開発などにつながることが期待される。がん幹細胞をマウスに移植したヒト化マウスモデルを用いて、分子標的薬等の効果を評価すれば、実際の臨床応用に繋がることが期待され、その社会的インパクトは計り知れないものになると考えられる。

4. 研究の成果

(1) ヒト唾液腺組織の分離・培養方法の確立

正常唾液腺組織と、唾液腺がん組織から分離した細胞の初代と継代培養に成功した。トリパンブルー染色法を用いた培養細胞の生存率は 90%以上であり、MTT アッセイによる増殖能の検討では唾液腺がん細胞において高い増殖能を有することが明らかになり、その培養法を確立した。

(2) 正常唾液腺および唾液腺がん組織におけるがん幹細胞の検討

CD133 は、唾液腺がん細胞において発現する細胞集団が 1%認められた。一方、CD44 は、正常唾液腺細胞（96.7%）、唾液腺がん細胞（98.1%）のいずれにおいても高発現であった。また、CD271、BMI-1 は、正常唾液腺、唾液腺がんの両方にその発現は認められなかった（図）。

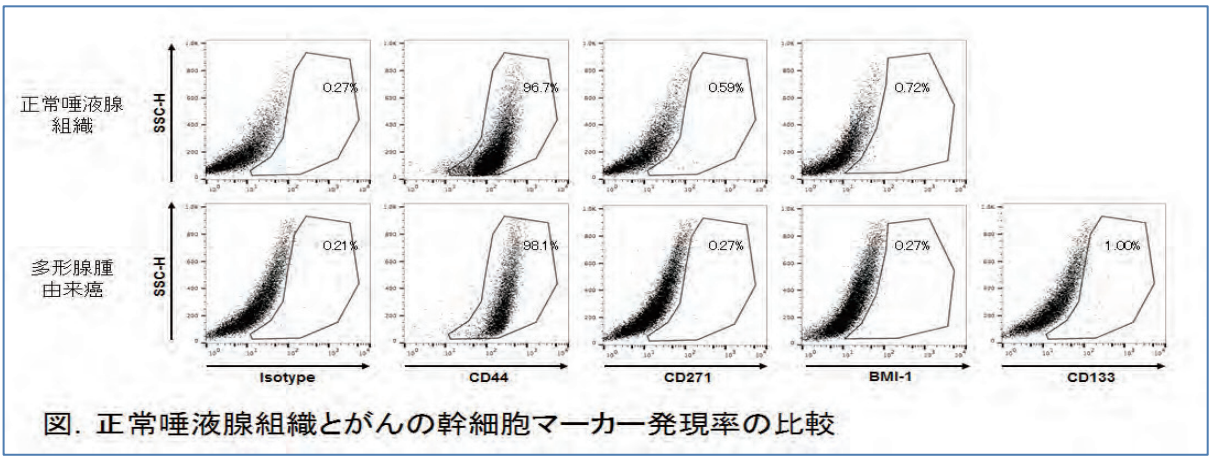


図. 正常唾液腺組織とがんの幹細胞マーカー発現率の比較

(3) 今後の展望

がん幹細胞に特異的に発現している新しいマーカーを検索するためには、まず、正常細胞とがん幹細胞に発現する幹細胞マーカーを同定する必要がある。今回の検討で得られた結果から、正常幹細胞とがん幹細胞に共通する幹細胞マーカーとして CD133 が有力な候補になり得ると期待された。しかし、正常唾液腺組織との比較ができなかったため、引き続き幹細胞マーカーの絞り込みをおこなっていきたい。また、各組織から単離した CD133 陽性細胞から RNA を抽出し、網羅的解析をおこない、がん幹細胞に特異的に発現するマーカーを検索する予定である。一方、がん幹細胞の機能的解析に関しては、候補となり得るがん幹細胞マーカーを絞り込むことが出来なったため、腫瘍増殖能や浸潤能の差異を *in vitro* および *in vivo* において検討するまでは至らなかったが、今後は、CD133 を幹細胞マーカーとして細胞を単離し、免疫不全マウスの腎被膜下に移植し、がん組織の増殖能を検討したり、分子標的薬（VEGF 阻害剤や抗 PD-L1 抗体など）の効果を検証したりすることを計画している。

心筋炎の病期特異的バイオマーカーおよび血中代替マーカーの同定
－バイオインフォマティクスを用いた新規探索－

近畿大学　医学部　佐藤　文孝

1. 研究の目的

(1)剖検の結果より、心筋炎は人口の 1-9%と高い罹患率を示す疾患であるが、診断が難しいため無症状のまま過ごしている患者も多い。しかしながら、突然胸痛に悩まされたり、心不全を起こしたりするなど、心筋炎が突然死の有力な原因の一つとなっている。例えば、40 歳以下の突然死の 20～42%が心筋炎により引きおこされている。心筋炎の主な発症要因は心筋へのウイルス感染であり、ウイルスの中でもピコルナウイルスが最も重要である。ウイルス性心筋炎の病態は未だ解明されていないが、三つの病期に分かれると提唱されている。理論的にはそれぞれの病期における心筋傷害を引き起こす要因が異なるため適切な治療を行うことが必要である。つまり、第 1 期ではウイルス感染による直接的な心筋傷害が生じるため抗ウイルス薬が有効である。抗ウイルスおよび抗心筋免疫応答が第 2 期の要因であることから、治療として第 2 期での免疫抑制剤の使用は有効であるが、第 1 期に免疫抑制剤を用いると抗ウイルス免疫を阻害してしまい心筋でのウイルス増殖を促してしまう。第 3 期では第 1 期と第 2 期による心筋傷害により、心臓のポンプ機能低下が原因であるため心機能改善薬が治療法となる。しかしながら、現在、明確にこれら三つの病期を区別する診断方法は未だ確立されていない。それゆえに、本研究では私が新規に確立したピコルナウイルス属のタイラーウイルスによるウイルス性心筋炎動物モデルを用いて、バイオインフォマティクスによる遺伝子発現の解析を行い、感受性に関与する遺伝子（群）、病期特異的バイオマーカーおよび血中代替マーカーの同定を試みる。

2. 研究の計画・方法

(1)タイラーウイルスをマウスの腹腔に接種し本モデルを誘導した後、各病期［感染後 4 日（第 1 期）、7 日（第 2 期）、60 日（第 3 期）］においてマウスより心臓サンプルを採取し、遺伝子発現解析を行った。また遺伝子発現比較検討のためタイラーウイルス非感染の同週齢のコントロールマウス心より心臓サンプルも採取し解析した。その解析結果をさらにバイオインフォマティクス的手法（目的変数あり；パスウェイ解析、k-means クラスタリング、レーダーチャート；目的変数なし；主成分分析）を用いることにより、心筋における病期特異的バイオマーカーの候補の同定を行った。

(2)上記の計画（1）において心筋サンプルを採取する前に、各病期で感染マウスおよびコントロールマウスの頬より血液を採取し、血液サンプルの遺伝子発現解析を行った。心筋サンプルと血液サンプルトランスクリプトームデータ中の個々の遺伝子発現パターンとの相関性を調べ、相関性の高い遺伝子を血中代替マーカーの候補を見出すため、パターンマッチング解析を行った。パターンマッチング解析により算出された相関係数 r を基準に血液のトランスクリプトームデータを整列し直し、相関性の高い遺伝子（群）としていくつかの血中代替マーカー候補（*XAF1*、*GVIN1* など）の同定を行った。

3. 研究の特色

(1)これまでに心筋炎の患者および動物モデルを用いて網羅的遺伝子発現解析は行われているが、ほとんどの場合個々の遺伝子発現を報告しているのみである。そこで本研究では、ウイルス性心筋炎の研究領域では最先端の手法である“バイオインフォマティクスによるビッグデータの多変量解析”を用いて、感受性に関与する遺伝子（群）、病期特異的バイオマーカーおよび血中代替マーカーの同定を行うパイプライン（解析方法）の構築を行った。このシステムは、1）群間のデータ比較、つまり目的変数あり（教師あり supervised）解析であるヒートマップ・パスウェイ解析等と、2）サンプルを各群で分けずに全データを目的変数なし（教

師なし unsupervised）で解析する主成分分析等に分けられる。本研究で構築されたこのパイプラインを応用することでヒトのウイルス性心筋炎サンプルのデータ解析に応用することで、ヒトにおけるバイオマーカー遺伝子（群）の解明や血中バイオマーカーの同定に寄与しうる。

4. 研究の成果

(1)各病期の心臓サンプルをパスウェイ解析、k-means クラスタリング、レーダーチャートを用いて解析した結果、第 1 期では自然免疫に関連した遺伝子（*Irf7*、*Ifit1*、*Ifit3* など）およびケモカイン遺伝子（*Cxcl9*、*Cxcl10*、*CCl5* など）が、第 2 期では獲得免疫に関連した遺伝子（*Cd3g*、*H2-Eaps*、*H2-Ab1* など）が、第 3 期では心臓のリモデリングに関連した遺伝子（*Mmp12*、*Gpnmb* など）およびイムノグロブリン遺伝子（*Igkv10-96*、*Igj*、*Igkv6-15* など）が高発現しており、各病期に特徴的な遺伝子発現パターンが見られた。つまり、自然免疫系遺伝子群が第 1 期の、獲得免疫系遺伝子群が第 2 期の、心筋リモデリング遺伝子群が第 3 期の心筋炎病期特異的バイオマーカーになり得ることを示唆した。また、各病期の心臓サンプルを主成分分析で解析した結果、各病期間で明確に分けることができた。つまり、主成分分析の結果は心筋病勢の違いを反映しており、その分布の違いに関わる因子の順位付けを行ったところ、としてインターフェロンにより誘導される遺伝子群が正に、心筋リモデリング関連遺伝子群が負に寄与することを見出した。

(2)心臓サンプルと血液サンプルのパターンマッチング解析により血中代替マーカー候補の探索を行った結果、第 1 期では *Xaf1*（$r = 0.98$）、*Gvin1*（$r = 0.97$）などが正に、*Ptpla*（$r = -0.82$）、*Snord118*（$r = -0.77$）などが負に相関性の高い遺伝子（群）であることを見出した。第 2 期では正に相関性が高い遺伝子として *Ifi27*（$r = 0.96$）、*Isg15*（$r = 0.95$）などが、負に相関性が高い遺伝子として *Ptpla*（$r = -0.86$）、*Lsm5*（$r = -0.81$）などを同定した。一方、第 3 期では正にも負にも相関性の高い遺伝子（群）は認められなかった。以上のことから、本研究により構築されたパイプラインを用いれば、心筋の生検を必要とせずに採血のみでウイルス性心筋炎の病期診断や治療効果の判定が可能になると期待できる。また今後の展望としては、血清中のサイトカイン様相が心筋炎病期特異血中代替マーカーになるかどうかをサイトカインマルチプレックスアッセイにて検討する。

脱ユビキチン化酵素 USP46 によるうつ様行動制御機構の解明
－USP46-$GABA_A$ 受容体系の解析－

関西学院大学　理工学部　村田　知弥

1. 研究の目的

我々はこれまでに、異常な概日リズムや睡眠パターンを示す近交系マウスである、CS マウスの解析を行ってきた。抗うつ薬の反応性を調べる尾懸垂テストにおいて、正常マウスは試験開始後に脱出を試みて“もがき反応”を示すが、次第にあきらめて無動時間が増加する（うつ様行動）。一方で CS マウスは、正常マウスに比べ著しい無動時間の減少、すなわち「うつ様行動」が欠如していることが判明し、詳細な遺伝学的解析の結果、原因遺伝子として *Usp46* の同定に成功している。さらに、*Usp46* 遺伝子欠損（*Usp46*-KO）マウスを作製し、CS マウスと同様に *Usp46*-KO マウスも無動時間が極端に減少することを見出した。また、抑制性神経伝達を担う $GABA_A$ 受容体の作用増強剤投与により、*Usp46*-KO マウスの無動時間が野生型マウスと同程度まで戻ることから、*Usp46* 遺伝子は $GABA_A$ 受容体の機能を促進することで「うつ様行動」を引き起こすことが判明した。*Usp46* 遺伝子は脱ユビキチン化酵素をコードし、主に脳神経系に高発現するが、基質や細胞内機能は不明であり、どのような機序で $GABA_A$ 受容体を制御するかは未解明である。本研究では脱ユビキチン化酵素 USP46 による $GABA_A$ 受容体機能の調節機構について遺伝子改変マウス・培養細胞を用いて検証し、USP46-GABA 系による「うつ様行動」制御の分子メカニズムを明らかにすることを目指す。

2. 研究の計画・方法

脱ユビキチン化酵素 USP46 はその細胞内機能についてはこれまで未解明であり、USP46 による $GABA_A$ 受容体機能制御機構の解明のためには、USP46 の基礎的な機能解析が必要である。また、$GABA_A$ 受容体は、GABA (Gamma Amino Butyric Acid)を受容して活性化し、抑制性神経伝達に関与している。*Usp46*-KO マウスでは $GABA_A$ 受容体機能の低下が認められるが、脳内の GABA 量は正常であることが先行解析にて判明しており、USP46 は $GABA_A$ 受容体の遺伝子発現や局在、機能を制御していると考えられる。本研究では上記の二点に着目し、以下の実験を実施した。

(1)USP46 の機能解析

USP46 に関して細胞内局在、認識するユビキチン鎖の種類を検討すると共に、新規相互作用因子を探索した。

(2)USP46 の $GABA_A$ 受容体に対する作用点の解析

Usp46-KO マウス脳における $GABA_A$ 受容体の mRNA・タンパク発現量を検証した。また、USP46 と $GABA_A$ 受容体の直接的な相互作用について検討を行った。

3. 研究の特色

これまでに他グループによって、いくつかの遺伝子改変マウスが尾懸垂テストにおいて無動時間の短縮を示すと報告されているが、*Usp46*-KO マウスはそれらに比べても著しい無動時間短縮を示す。この結果は、「うつ様行動」の制御において、USP46 が中心的な役割を果たしていることを示唆しており、「うつ様行動」制御機構を調べる上で、*Usp46*-KO マウスは非常に有用なマウスであると考えられる。また、$GABA_A$ 受容体の機能制御は複雑かつ多岐にわたり、ユビキチン化との関連も報告されているが、脱ユビキチン化による制御の存在については不明である。$GABA_A$ 受容体は抑制性神経伝達を担い、既存の $GABA_A$ 受容体作動薬は抗不安薬や抗けいれん薬、不眠症治療薬として用いられているが、眠気やふらつきなどの副作用や、依存性が問題とされている。

本研究により、USP46 による $GABA_A$ 受容体の制御機構を解明することで、創薬における新規ターゲットの発見につながる可能性を秘めている。

4. 研究の成果

(1)USP46 の機能解析

USP46 の細胞内局在を調べるため、EGFP-USP46 を HEK293T 細胞に発現させたところ、核と細胞質において蛍光が観察され、特に細胞質が強く光ることが判明した。USP46 は WDR48 と結合することで活性が制御されることが知られているため、USP46-WDR48 複合体の局在について、BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)法により解析した。その結果、USP46-WDR48 複合体由来の蛍光が細胞質のみで観察されたことから（図１）、USP46 は細胞質において機能することが示唆された。

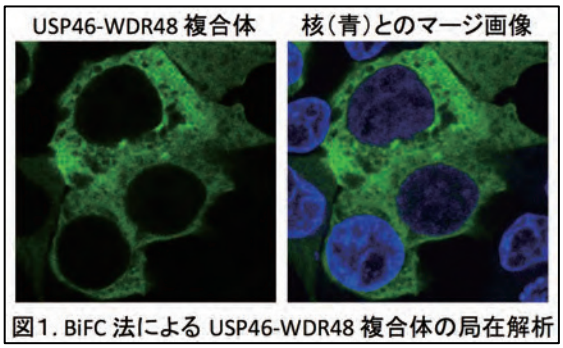


図1. BiFC 法による USP46-WDR48 複合体の局在解析

次に、脱ユビキチン化酵素である USP46 が、多様なユビキチン鎖のうち、どのタイプのユビキチン鎖を認識し切断するかについて検討した。GST-USP46 を大腸菌より精製し、Di-ユビキチン鎖（結合様式の異なる８種類を使用。K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63, M1）を用いた脱ユビキチン化アッセイを行った。しかし、GST-USP46 のみを酵素として使用した場合、これらの Di-ユビキチン鎖の切断活性は認められなかった。そこで、WDR48 の反応系への添加を計画したが、大腸菌での発現系では GST-WDR48 タンパクが十分量得られなかった。今後は、WDR48 の発現系の検討とともに、哺乳類細胞から精製した USP46-WDR48 複合体を使用することを予定している。

USP46 の新規基質や相互作用因子を同定するため、BioID アッセイの確立を行った。BioID は酵素-基質間の短時間の結合でも検出可能な、相互作用因子の解析法である。USP46-ビオチンリガーゼ融合タンパク発現ベクターを作製し、HEK293T 細胞に発現させ、USP46 の近位に存在するタンパクをビオチン化し、ストレプトアビジンビーズにて精製し、質量分析を行った。その結果、USP46 の新規相互作用因子と考えられるタンパク質の同定に成功した。現在、これらのタンパク質について、USP46 の基質となるか解析を進めている。

(2)USP46 の $GABA_A$ 受容体に対する作用点の解析

USP46 が $GABA_A$ 受容体の mRNA・タンパク質発現を制御する可能性を検証した。$GABA_A$ 受容体は 5 つのサブユニットからなる Cl^- チャネルであり、サブユニットとして α1-6、β1-3、γ1-3、δ、ε、π および θ が知られており、主に α が 2 つ、β が 2 つ、γ が 1 つで受容体が形成される。*Usp46*-KO マウス脳における各サブユニットの発現量を解析したところ、α2 サブユニットは mRNA・タンパク共に、*Usp46*-KO マウス脳において発現が上昇しており、転写レベルで USP46 による発現制御を受けていることが示唆された。一方で、α1、α3、α5 サブユニットの mRNA 発現量は野生型マウスと同様であったが、タンパク発現が有意に低下していた。この結果は α1、α3、α5 サブユニットが USP46 により脱ユビキチン化の制御を受けている可能性を示唆している。そこで、USP46 と α1、α3、α5 サブユニットが直接結合するかについて、HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降により検証を行った。HA-USP46 と α1-FLAG/β3-MYC/γ2-MYC を共発現し免疫沈降を行ったが、結合は認められなかった。同様に α3-FLAG/β3-MYC/γ2-MYC、α5-FLAG/β3-MYC/γ2-MYC を用いた場合でも結合は認められなかった。しかし、本実験系では非神経細胞である HEK293T 細胞を用いているため、実験系を変更することで USP46 と α1、α3、α5 との結合が検出できる可能性がある。今後、脳から抽出したタンパクを用い、内在性の USP46 と α1、α3、α5 サブユニットの共免疫沈降を実施し、結合を検証していく予定である。

本研究の成果は以下の学会にて発表を行った。

・2017 年度　生命科学系学会合同年次大会（2017 年 12 月）

虚辞の派生とラベル問題に関する研究

神戸女子大学　文学部　本田　隆裕

1. 研究の目的

生成文法ではヒトが生後ごく短期間で母語の文法を獲得できる事実を説明するために、ヒトには生得的な言語能力が備わっていると仮定し、ヒトが文を生成する過程においてどのような計算処理（文法操作）を行っているのかを明らかにしようとしている。本研究では、英語における there や it などの意味内容を伴わない「虚辞」と呼ばれる要素に注目し、最新の理論と言語データに基づき、虚辞 there を含む文の派生について以下の点を中心に解明することを目指した。

(1) “There {are/*is} some men here.”といった there 構文において、述語の人称・数の値がどのようにして決定されるのか。

(2) “There arose a storm here.”と“*There sank three ships last week.”の対比に見られるような、there 構文に出現可能な動詞の種類はどのように決定されるのか。

2. 研究の計画・方法

(1) 動詞分類及び there 構文に関する先行研究調査

①there構文において、等位接続された名詞句が連結詞（意味上の主語）として現れている場合、述語の数は最初の等位項と一致するというBos kovi ć (1997)で指摘されている事実について、先行研究を調査し、それらの問題点と解決策を検討した。

②虚辞thereが共起可能な動詞は、使役交替を示さない非対格動詞（appearなど）に限定され、他動詞や非能格動詞（runなど）、能格動詞（sinkなど）はthere構文に出現不可能であることが知られている。この事実に関連する先行研究を調査し、非対格動詞とそれ以外の動詞との相違点を明らかにすることで、それらの違いとthere構文の派生との間にどのような関係があるのかを検討した。

(2) 学会発表・論文の執筆

虚辞thereが共起可能な動詞が非対格動詞に限定される理由について、最新の生成文法理論であるChomsky (2013, 2015)のラベル付け（Labeling Algorithm）と藤田・松本 (2005)で提案された3層分裂動詞句構造に基づいて分析した研究成果について口頭発表を行い、そこで得られたコメントに基づいて分析を修正し、論文を執筆した。

3. 研究の特色

本研究の特色は以下の 2 点である。特に(2)については、以前から知られている事実でありながら、その事実を分析の対象とした研究はほとんど行われてこなかったと思われる。

(1) 近年の生成文法では、主語位置にある名詞句は最初からその位置にあるのではなく、文の述部内から移動してきているとする述語内主語仮説が支持されおり、この移動の理由については、これまで EPP（文には主語が存在するという原理）により説明されてきた。Chomsky (2013, 2015)は、「ラベル付け」という概念を持ち出し、主語位置への移動現象について EPP を仮定しない説明を試みている。しかし、Chomsky の説明では時制辞と一致する名詞句が主語位置に必ず現れなければならないことになり、虚辞 there が主語位置に現れる文の説明が不可能となる。この問題を「虚辞のラベル問題」として提起した。

(2) 虚辞 there が共起可能な動詞が非対格動詞に限定される事実は以前から知られていたが、その理由についてはあまり議論されてこなかった。特に、非対格動詞と同じように主語が内項として基底生成される構造を持つ能格動詞が there 挿入を許さない理由は不明のままである。そこで、本研究ではこの問題について、藤田・松本 (2005)の 3 層分裂動詞句構造に基づいて、非対格動詞と能格動詞の構造の違いを指摘することで、非対格動詞のみが there 構文に出現可能な理由を説明した。

4. 研究の成果

本研究では、名詞句の構造について、決定詞 D が名詞句本体である NP を補部に取る DP 構造を成しているとする従来の分析を修正し、名詞句は DP をさらに補部として取る機能範疇（Δ と呼ぶ）が主要部となっている ΔP 構造になっていると新たに提案した。また、Δ は解釈不可能な格素性と人称素性を持ち、D は解釈不可能な数素性と性素性を持ち、これらの解釈不可能な素性のうち、人称・数・性素性は D の補部にある NP の素性と一致して値付与されると提案した。さらに、Δ は接辞であり、Chomsky (2015)で提案されたラベル決定能力を持たない弱い主要部（weak head）に該当すると提案した。これらの提案により、名詞句である ΔP はそのままではラベル決定が行われないため、Δ は、ΔP 内からの移動か Δ が一致関係を結ぶ他の要素との素性共有を必要とすると説明した。Δ が ΔP 内から移動する場合、Δ が一致する時制辞 T の指定部（つまり、主語位置）に移動すると考えられ、この際、Δ と TP が併合した集合のラベルは両者が共有する人称素性となると説明できる。また、Δ は接辞であるため、do 挿入のように最後の手段（last resort）として there が挿入されると考えられる。これにより、虚辞が副詞 there と同形である理由について、Δ は人称素性のみを持ち数・性素性を持たないため、そのような代用表現（proform）が英語においては there しか存在しないためであると説明できる。さらに、T の解釈不可能な人称素性は Δ により値付与されるが、T の数・性素性については、補部 NP と同じ数・性素性の値を持つ D と一致するため、連結詞と述語が数の一致を示す理由を説明できる。なお、等位接続された名詞句が連結詞として現れた場合、それぞれの等位項から Δ が ATB 移動により TP 指定部へ移動し、T の数素性は T にとって最も近くにある最初の等位項の D と一致すると考えられるため、Bos　kvić (1997)で指摘された例を説明できる。一方、Δ が ΔP 内から移動しない場合は、ΔP 全体が T と一致して T の指定部へ移動し、“Some men are here.”のような there を含まない文が派生されると考えられる。この場合、Δ は接辞であるが D と PF 併合されることで形態的要請は満たされるため、最後の手段としての there 挿入は生じないと考えられる。there 挿入が Δ の形態的要請を満たすための操作であるとする説明は、“I want [there *(to be) someone here at 6:00].”といった Lasnik (1992)が指摘する事実とも合致する。よって、本研究の提案では「虚辞のラベル問題」はそもそも生じないと言える。

虚辞 there が共起できる動詞が非対格動詞に限られる理由については、藤田・松本 (2005)の 3 層分裂動詞句構造である[$_{vP1}$ Agent [v1 [$_{vP2}$ Causer [v2 [$_{VP}$ V Theme]]]]]という動詞句の構造における v2 の有無により説明可能である。藤田・松本 (2005)は能格動詞の派生については vP2 までの投射となっており、主題項（Theme）が vP2 指定部に移動して原因項（Causer）としての解釈を受け取るという派生的 θ 標示を提案している。上述のように、本研究では there 構文の派生は ΔP 内から Δ のみが TP 指定部へ移動した場合の派生であるが、能格動詞の派生においては、主題項として派生に導入された ΔP から Δ のみを TP 指定部へ移動することは次に示す理由から不可能であると言える。まず、ΔP 全体が原因項位置へ移動し、その位置から Δ のみが TP 指定部へ移動する可能性が考えられるが、この場合、{DP, vP2}という句同士から成る集合が形成される。しかし、D と v2 に共有される素性が存在せず、この集合のラベルが決定できないため、そのような派生は不可能である。もう一つの可能性として、主題項位置から Δ のみが原因項位置へ移動し、さらに Δ が TP 指定部へ移動する可能性が考えられるが、その場合、実質的な意味内容を伴わない Δ が原因項として解釈されることになるため、そのような派生は不可能であると言える。また、非能格動詞の項は、原因項位置に基底生成されるが、ΔP から Δ のみを移動する派生においては、{DP, vP2}という集合が生じてしまうため、非能格動詞も there 構文に出現不可能であると説明できる。

上記の成果は、関西言語学会第 42 回大会で口頭発表を行い、大会 proceedings（本田隆裕 (2018)「能格動詞はなぜ there 構文に現れないのか ―部分格分析の再考とラベル付け」, *KLS* 38, 49–60.）に掲載された。また、虚辞 it についての分析も加えて論文を執筆し、学術雑誌に投稿した。

メタロチオネイン欠損マウスを用いた脂肪肝発症メカニズム解析
－遺伝子要因に着目した脂肪肝抑制に関する研究－

徳島文理大学　薬学部　川上　隆茂

1. 研究の目的

生活習慣の変化に伴い脂肪肝の発症人口が増加している。健康的な生活を担保し、医療費の抑制のために脂肪肝の予防と治療が喫緊の課題である。肝臓は、薬物代謝、毒物の解毒や血糖値のコントロールにおいて重要な役割を担っている。非アルコール性脂肪肝（NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease）は、肝細胞において脂肪の沈着（30%以上）を認め、アルコールを要因とする脂肪肝などを除外したものをいう。NAFLD 発症は、高血糖や脂質異常による肝機能低下によっても引き起こされることから、メタボリックシンドロームのフェノタイプの一つとして捉えることができる。さらに、NAFLD の一部は、肝硬変や肝がんの原因となる非アルコール性脂肪肝炎（NASH; nonalcoholic steatohepatitis）に進展することが知られている。日本では約 1000 万人の NAFLD 患者がおり、また、約 200 万人が NASH に罹患しているとされる。NAFLD、NASH の発生の機序には遺伝的要因や環境要因が関与するが、まだ完全には解明されておらず、薬物による治療法も確立されていない。

他方、当研究室では重金属の毒性軽減や抗酸化作用を有するメタロチオネイン（MT）を欠損させた雌性マウスが、高脂肪食誘導性の脂肪肝を発症しやすいことを報告しており、MT が脂肪肝発症の遺伝要因の一つであることを明らかにしている。しかし、MT 遺伝子が関与する食餌誘発性脂肪肝発症及び肝線維化リスク増強の詳細なメカニズムは不明である。本研究では、雌性の MT 欠損マウスに脂肪肝誘発食餌（CDAA）を摂食させ経時的な肝臓の変化を追跡するとともに、MT 欠損マウスの初代肝細胞を用いた比較解析を行った。

2. 研究の計画・方法

(1)メタロチオネインが食餌誘発性脂肪肝の進展及びオートファジーに及ぼす影響

7-9週齢の雌性野生型（WT）およびMT欠損マウスに対照食餌またはコリン欠乏メチオニン減量食餌であるCDAAを2週間及び12週間、自由摂食させた。解剖時に血液を採取し、血清中のALT、AST値を測定した。組織学的検索としてHE染色及び線維化を観察する目的でアザン・マロリー染色を行った。また、リアルタイムPCR法を用いて肝臓中の線維化に関与する遺伝子（Col1a1、Mmp2、TIMP、TGF-β）及びメタロチオネイン（MT-Ⅰ、MT-Ⅱ）の発現量を測定した。さらに、近年、オートファジーと脂肪肝との関連が強く示唆されていることからオートファジー関連遺伝子（p62、LC3B）タンパク発現量をイムノブロット法にて解析した。

(2) 初代肝細胞を用いたメタロチオネインの脂肪蓄積への関与

野生型および MT 欠損マウスをイソフルラン麻酔下で屠殺し、コラゲナーゼ潅流法により初代肝細胞を得た。コラーゲンコートディッシュに肝細胞を播種し、オレイン酸（0、25、50、100 および 200 μM）を添加した。オレイン酸添加後、24 時間および 48 時間目における細胞内における脂肪蓄積の程度を Nile Red 法を用いて評価した。

3. 研究の特色

肥満、糖尿病などに合併することが多い脂肪肝を予防・克服することは、肝臓での薬物代謝を始めとする正常な機能を担保し、動脈硬化、虚血性心疾患などメタボリックシンドロームの先に存在する疾患の進展を抑止することになる。さらに、国民の健康的な生活を保障し医療費を削減する最も効果的な対策となり得る。既に述べたように NAFLD および NASH の発症機序は完全には解明されておらず、上記の疾患の克服には、食事療法や運動療法など生活習慣の改善だけではな

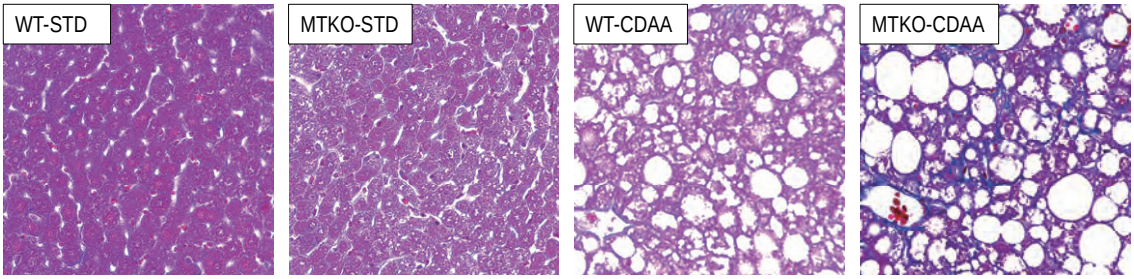
く、安全かつ効果的な薬物を用いた新治療システムの展開も期待される。本研究の結果を基盤として、MT 遺伝子および対象遺伝子によって制御される遺伝子（群）をターゲットとした医薬品開発、さらに臨床応用の可能性を目指した展開が予想される。

4. 研究の成果

(1) メタロチオネインが食餌誘発性脂肪肝の進展及びオートファジーに及ぼす影響

(A) 体重及び肝臓重量変化：MT 欠損マウスの CDAA 群は、同条件下の WT マウスと比較して、12 週間までの体重変化に統計学な有意な差は認められなかった。しかし、肝臓重量は 12 週間の CDAA 摂食により、両系統マウスとも対照群と比較して有意な増加が認められた。その増加量に関して、MT 欠損マウスの CDAA 群は同条件下の WT マウスよりも大きかった。(B) 脂肪肝及び肝線維化の感受性差：MT 欠損マウスは WT マウスと比較して、2 週間および 12 週間摂食実験とも CDAA による脂肪肝の程度が進行していた。特に、12 週目では、MT 欠損マウスの CDAA 群は同条件下の WT マウスと比較して、高値の ALT、線維化マーカーmRNA 発現量の増加（TGF-β を除く）を伴う肝線維化が認められた（Fig. 1A および 1B）。(C) MT 遺伝子発現量：WT マウスの CDAA 群は対照群と比較して、MT-Ⅰ及び MT-Ⅱ mRNA 発現量の有意な減少が認められたことから、MT 遺伝子発現量の減少が脂肪肝発症に寄与する可能性が示唆された。(D) オートファジー関連遺伝子の発現量：p62 は、オートファジーの選択的基質であり、オートファジーが阻害されたときに顕著に増加することが知られている。2 週間の摂食実験では、MT 欠損マウスは他群と比較して有意な p62 発現量低下が認められたが、12 週目では有意に増加していた（Fig. 2）。以上、MT 遺伝子は食餌誘導性の脂肪肝及び肝線維化の抑制に関与することが明らかとなり、オートファジーの制御にも関与する可能性が示唆された。今後、MT 遺伝子がどのようにオートファジーを制御するのかを検討する必要があると考えられた。

Fig. 1A



青色：線維化領域

Fig. 1B

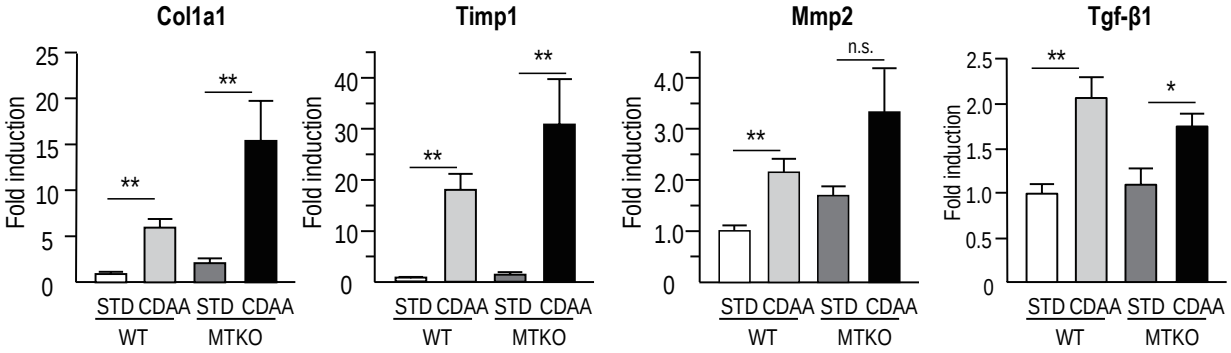
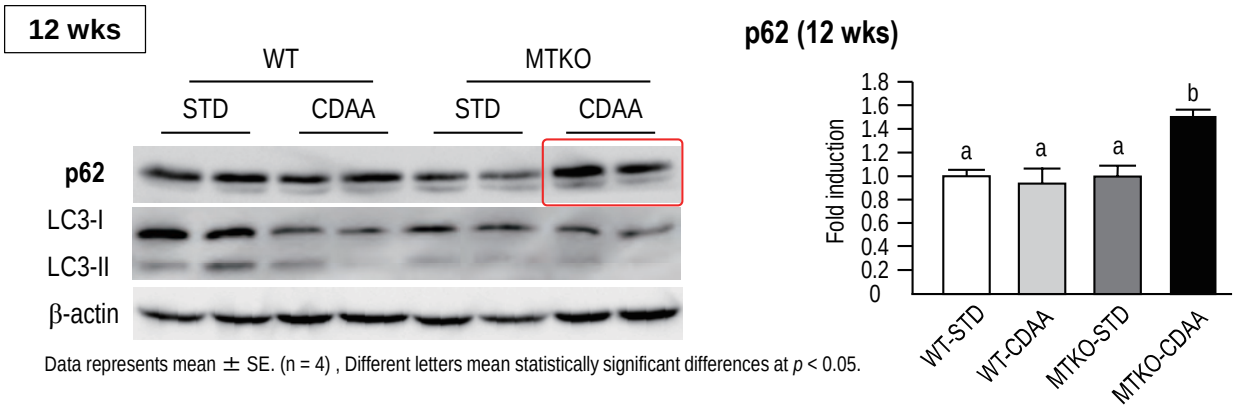


Fig. 2

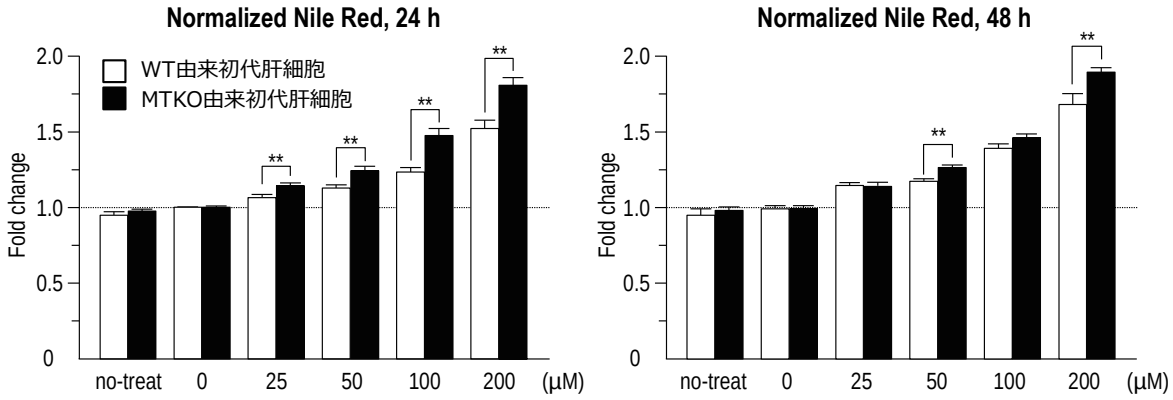


Data represents mean ± SE. (n = 4) , Different letters mean statistically significant differences at $p < 0.05$.

(2) **初代肝細胞を用いたメタロチオネインの脂肪蓄積への関与**

両系統マウス由来の初代肝細胞ともオレイン酸の濃度・処理時間依存的に脂肪滴の蓄積が認められた。一方、MT 欠損由来マウスの初代肝細胞は野生型と比較して、オレイン酸処理後 24 時間では 25–200 μM で、48 時間後では 50 および 200 μM で脂肪蓄積の有意な増加が認められた(Fig 3)。Oil Red O 染色による観察を行った結果、Nile Red 法で得られた結果と一致していた。これらの結果から、肝細胞中の MT 遺伝子は、脂肪蓄積に対して重要な役割を担っていることが明らかとなった。

Fig. 3



膵癌患者腹水中エクソソーム由来 CD133 の臨床・基礎的検討
－悪性腹水中エクソソーム内 CD133 の検討－

久留米大学医学部内科学講座　消化器内科部門　阪上　尊彦

1. 研究の目的

腹水中に浮遊し足場非依存性に生存・増殖を続けうる癌細胞は、癌幹細胞（cancer stem cell、CSC）あるいは CSC 様細胞の形質を有していることが示されている。したがって、癌性腹膜炎の腹水中エクソソームは、CSC からの未知のシグナルを豊富に内包していると考えられ、その解析は薬剤抵抗性予知や予後診断、あるいは新たな治療標的の探索に極めて有用であると考えられる。これまでの予備実験の結果より、種々の CSC マーカーの中で膵癌癌性腹水中エクソソームには CD133 の発現が多いことが確認された。本研究の目的は以下の通りである。

(1)Nanoparticle Tracking Analysis や Transmission Electron Microscopy を行い、癌性腹水中エクソソームと非癌性腹水中エクソソームの特徴を明らかにする。

(2)膵癌癌性腹水中エクソソームに含まれる CSC マーカーCD133 の臨床的意義（治療抵抗性予知や予後予測、集学的治療中止時点の決定など）を検討する。

2. 研究の計画・方法

(1)臨床研究

①2014 年 6 月から 2017 年 6 月に受診した進行膵癌患者 133 例を対象とし、そのうち 19 例の膵癌癌性腹水からエクソソームを抽出する。なお、本研究は医師主導型臨床試験として、2015 年 8 月 31 日に久留米大学倫理委員会の承認を得（研究番号：15125)、さらに UMIN-CTR に登録（試験 ID：000020296）の上で、検体を採取する。

②CD133 の発現を Western blotting および densitometry で解析する。

③上記解析結果と患者背景や化学療法 regimen、臨床経過（腫瘍マーカーの推移、全生存期間、無増悪生存期間、腹水中 IL-6 や TNF-α値など）との関連を統計学的に解析し、化学療法に対する感受性・抵抗性や予後予測におけるエクソソーム由来 CD133 の有用性を検討する。なお、統計学的解析は本学バイオ統計センター（所長：角間辰之教授）と共同で行う。

(2)基礎研究

①癌性腹水中エクソソームおよび非癌性腹水中エクソソームの Nanoparticle Tracking Analysis および Transmission Electron Microscopy による観察を行う。

②膵癌腹膜播種病変および原発巣（当院剖検症例 5 例）における CD133 の発現を免疫組織化学染色で確認する。

③ヒト膵癌細胞株（Panc-1、BxPC-3）由来エクソソームにおける CD133 の発現を確認する（*in vitro*)。

④ヒト膵癌細胞株(Panc-1、BxPC-3)を用いた癌性腹膜炎モデルマウスの腹水中エクソソームにおける CD133 の発現を確認する（*in vivo*)。

3. 研究の特色

(1)血清におけるエクソソーム解析の報告は数多くあるが、腹水中エクソソームの解析は 6 報程度と極めて少なく、悪性腹水中エクソソームに CSC 関連蛋白が内包されていることを示したものはない。このような国内外の研究状況を鑑みると、少なくとも現時点で膵癌悪性腹水中のエクソソームに CSC マーカーCD133 が含まれていることを示した点には新規性がある。

(2)腹水中に浮遊状態で足場非依存的に生存・増殖を続けうる癌細胞は、CSC あるいは CSC 様細胞の形質を有しているという事実に立脚して、膵癌癌性腹水中のエクソソーム内に今回初めてその存在が示された CSC マーカーCD133 を利用し、抗癌剤抵抗性や患者予後との関連を「前向き臨床試験」で検討することは独創的であると考える。

(3)社会貢献性として、悪性腹水中エクソソームという今後臨床応用の可能なツールを用い、CSC 由来分子の動態を捉え臨床データと関連づけることで、ブレイクスルーが求められている膵癌治療に対し、真に有用な情報をもたらすことができると考える。

4. 研究の成果

(1)癌性腹水中エクソソームと非癌性腹水中エクソソームの特徴

①Nanoparticle Tracking Analysis では、癌性腹水中エクソソームは非癌性腹水中エクソソームに比して、粒子濃度が高く、粒子径のばらつきが大きかった。

②Transmission Electron Microscopy による観察では、ともにエクソソームに特徴的な直径約 50～150nm の球状で二重膜を呈する小胞が観察された。

(2)膵癌癌性腹水中エクソソームには CD133 が強く発現し、その発現レベルは胃癌癌性腹水や非代償性肝硬変などの非癌性腹水と比較して特に強く認められる。

(3)膵癌腹膜播種病変および原発巣における CD133 の免疫組織化学染色では全症例で腹膜播種病変および原発巣とも強く発現が認められた。

(4)ヒト膵癌細胞株(Panc-1、BxPC-3)由来エクソソームおよびヒト膵癌細胞株(Panc-1、BxPC-3)を用いた癌性腹膜炎モデルマウスの腹水中エクソソームにおいても CD133 が強く発現が認められた。

(5)膵癌癌性腹水中エクソソーム由来 CD133 の十分に糖鎖修飾されている CD133 の band の density が高いほど全生存期間が有意に良好であった (p=0.0309)。さらに、2 回の腹水穿刺を行った 1 症例で、CD133 の糖鎖プロファイリング解析を行ったところ、CD133 の挙動はシアル酸などの糖鎖修飾によるものであることが示唆された。つまり、癌性腹水中エクソソーム由来 CD133 に対する糖鎖修飾が進行膵癌患者の予後予測のバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

アトピー性皮膚炎におけるアミノ酸補給療法の有効性の検討

第一薬科大学　薬学部　古賀　貴之

1. 研究の目的

(1)本研究は、以下の背景のもと、メチオニンの外部補給がアトピー性皮膚炎（atopic dermatitis, AD）発症/進行へ及ぼす影響を観察することを目的とする研究である。

①AD 発症/進行機構ならびに現在実施されている治療法について

ア　AD は代表的な皮膚疾患の一つであるが、その原因として遺伝的素因や環境因子への曝露に基づくアレルギーの過剰応答などが深く関与していると考えられている。しかし、その詳細には不明な点も多く残されている。

イ　AD の発症/進行機構に基づいた治療法や予防法の確立には現在至っておらず、AD 治療には対症療法が主として汎用されている。

②AD 発症/進行機構に関する、研究実施者がすでに得ている知見について

ア　研究実施者は AD 自然発症モデルマウスである NC/Nga マウスについて、メタボローム解析を用いた AD 症状の重症化に関与する因子の探索を行い、皮膚炎重症化と相関した血中メチオニン濃度の有意な低下を見出している。

③非 AD 性皮膚炎とメチオニンに関する、研究実施者がすでに得ている知見

ア　研究実施者は界面活性剤による皮膚バリア破壊による皮膚炎モデルマウスや化学物質誘導性アレルギー性皮膚炎モデルマウスにおいて、メチオニンの外部補給は皮膚炎症状を軽減することを見出している。

④本研究の作業仮説

本研究は上記①～③に基づき、以下の作業仮説を立て検証を行う。

ア　メチオニンは、非 AD 性皮膚炎を抑制したことから、皮膚炎抑制因子として作用することが想定され、この皮膚炎抑制因子であるメチオニンの低下を起点としてAD 重症化は惹起される。

イ　アが真であるならば、外部補給法などを用いた血中メチオニン濃度の低下の抑制は、皮膚炎発症/進行に抑制的に寄与すると考えられる。

2. 研究の計画・方法

(1)本研究計画の概要

本研究では上記作業仮説に基づいて、特に以下の 3 点に着目し、メチオニンの飲水投与による外部補給が AD 症状に及ぼす影響を観察した。

①すでに AD を発症している NC/Nga マウスへのメチオニンの投与（AD 治療としての評価）

②AD 未発症 NC/Nga マウスへのメチオニンの投与（AD 予防としての評価）

③メチオニン代謝物の NC/Nga マウスへの投与（AD 抑制作用の活性本態の探索）

(2)本研究計画で用いる実験動物、投与物質・投与経路および評価法

①使用動物

本研究では、AD 自然発症モデルマウスである NC/Nga マウスを使用した。本マウスは8 週齢前後にて AD 症状を自然発症し、週齢を重ねるごとに AD 症状が進行する特徴を持つマウスである。

②投与物質・投与経路

ア　メチオニンおよびその代謝物であるシステインならびにタウリンを使用した。

イ　投与経路は飲水による経口投与とした。WHO発表の「ヒトのメチオニン一日推奨摂取量」と同程度のメチオニンを飲水により摂取させるために、マウスの一日摂水量を基に、飲用水中のメチオニン濃度は 30 mg/L に設定した。また、システインおよびタウリンはメチオニンの投与量と同等に設定した。

③評価法

各週齢時点における皮膚症状スコアを用いて、AD 症状の発症/進行を評価した。皮膚症状スコアは、AD の主たる 4 つの徴候（①紅斑・発赤もしくは出血、②痂皮・乾燥、③浮腫、④傷・組織欠損）それぞれについて、その重症度に応じて点数をつけ（各0～3点)、それらを合算して算出した。なお客観性の担保のため、皮膚症状のスコアの算出は複数人が独立して行い、それらの平均値をもって評価した。

(3)投与スケジュール

①AD 進行に対するメチオニンの効果の検証

AD の十分な発症が確認された 10 週齢 NC/Nga マウスについて、メチオニンを 16 週齢まで投与し、メチオニンの AD 進行に対する効果を観察した。

②AD 発症に対するメチオニンの効果の検証

AD の発症が確認されていない 6 週齢 NC/Nga マウスについて、メチオニンを 16 週齢まで投与し、メチオニンのAD 発症に対する効果を観察した。

③メチオニンのAD抑制作用の活性本態の探索

6 週齢 NC/Nga マウスについて、メチオニン代謝物であるシステインもしくはタウリンを 16 週齢まで投与し、AD 抑制作用の有無を観察した。

3. 研究の特色

(1)本研究ではメチオニンの外部補給による AD 症状の改善の観察を目的とするが、得られる結果はメチオニンの AD 治療法としての基礎に関する新たな知見となると考えられる。

①メチオニンは必須アミノ酸の一種であり、食事からの摂取が基本となるため、メチオニン含有量に着目した食事療法の確立も可能になる。

ア　現在実施されている AD 治療法の中で、食事療法はアレルゲンの除去という観点でのみ行われている。

イ　高メチオニン含有食品の摂取という新しい視点からの食事療法は、現在実施されている薬物療法などの AD 治療法と比較して、患者の負担の小さな治療法になりうる。

②本研究結果は、メチオニンそのものが現在 AD 治療として汎用されている薬物とは異なる機序に基づく新規治療法に関する創薬シーズとなりうることも示唆するものである。

4. 研究の成果

(1)AD 進行に対するメチオニンの効果の検証（AD 治療としての評価）

皮膚炎発症後（10 週齢）からのメチオニンの投与は、投与終了時点（16 週齢）にかけ、いずれの週齢においても AD 症状の抑制効果は観察されなかった。この結果より、メチオニンは AD の進行そのものに対して抑制的には寄与しないことが示唆された。

(2)AD 発症に対するメチオニンの効果の検証（AD 予防としての評価）

皮膚炎発症以前（6 週齢）からのメチオニンの投与は、AD 発症週齢（8 週齢）以降投与終了時点（16 週齢）にかけ、いずれの週齢においても AD 症状の有意な抑制効果を示した。また、8 および 9 週齢時点における AD 発症頻度の抑制も観察された。これらの結果より、メチオニンは AD の発症段階において抑制的に作用することが示唆された。

(3)メチオニンの AD 抑制作用の活性本態の探索

皮膚炎発症以前（6 週齢）からのシステインもしくはタウリンの投与は、メチオニンと同様な AD 症状抑制効果を示さなかった。この結果より、メチオニンによる上記 AD 抑制作用は、少なくとも、その代謝物であるメチオニンやシステインに起因しないことが示唆された。

(4)総括

本研究の結果より、以下の 2 点が明らかになった。

①メチオニンは、AD 発症/進行のうち、AD 発症抑制因子として寄与するものの、AD 進行抑制因子としての寄与は小さい。

②メチオニンは AD に対して発症を抑制する予防薬としては有効であるが、進行を抑制する治療薬としての有効性は低い。

選択的なアルコール生成を可能とする金属単結晶積層電極の創製
－CO_2 還元反応によるアルコール生成機構の発現－

福岡大学　工学部　吉原　直記

1. 研究の目的

産業革命以降、上昇し続ける大気中の CO_2 濃度の低減に向けてこれまで CO_2 から有用物質への転換に関する様々な技術開発が提案されてきた。しかしながら、CO_2 はその強固な結合のため触媒反応を用いても高温高圧の反応場を必要とすることから、これら技術は未だ普及するには至っていない。現在、二酸化炭素の電気化学還元反応(CO_2ERR)は室温大気圧下において CO_2 から様々な分子に転換できることから注目を集めている。また CO_2ERR では、電極となる金属表面と CO_2 との吸着力の違いから生成物選択性が異なることが明らかにされている。遷移金属の中でも銅(Cu)は、CO_2 から炭化水素、特にメタン(CH_4)やエチレン(C_2H_4)へ還元可能な金属元素であるが、これら以外の炭化水素生成物への転換はこれまで報告されていない。

本研究では、CO_2ERR にて既報にない新たな化学製品(燃料、化学品)への転換を実現するため、異種原子を銅電極に積層させた金属単結晶積層電極を作製し、従来の単一金属では得られない CO_2 吸着力をその表面にて発現させ、CO_2ERR により特にアルコールやエーテルなど、より有用な化学製品への選択的転換を目指す。

2. 研究の計画・方法

本研究では、従来の単一金属電極と異なる CO_2ERR メカニズムの実現を目指して、CO_2 と電極表面との吸着力に注目し、物質の最小単位である原子サイズの厚みを有する金属膜の積層パターンを制御することで、その電極上にて既報にない新たな CO_2ERR メカニズムを発現させることを目的とする。

(1) 金属単結晶積層電極の作製技術の確立に向けた成膜条件の最適化

金属原子膜の積層は、サファイアや酸化マグネシウムなどの結晶支持基板上に異種金属を交互にスパッタリングもしくは電着させることで行い、このときの成膜操作条件が金属膜厚や積層パターンに及ぼす影響を確認する。

(2) 金属単結晶積層電極上での CO_2ERR による生成物組成との相関の把握

作製した金属単結晶積層電極上でのCO_2ERRによって排出されたガス生成物は、サンプリングし、ガスクロマトグラフにて定量分析を行う。また液体生成物は、反応後の電解液をエバポレーターにて分離抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とガスクロマトグラフ質量分析装置(GCMS)にて定量する。特に金属単結晶積層電極(金属種の組合せや積層パターン)が与える生成物組成への変化を確認し、目的物質の生成に最適な電極構造を決定する。

(3) 炭素同位体(^{13}C)炭酸ガスを用いた CO_2ERR メカニズムの解明

炭素同位体(^{13}C)を有する $^{13}CO_2$ガスと一酸化炭素ガス(^{12}CO)を含む混合原料ガスを用いた電気化学還元反応を行い、生成物の構成元素が原料炭酸ガスのどちらに由来しているかをガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)、HPLC、GCを用いた分析より明らかにする。また、原料組成比($^{12}CO/^{13}CO_2$)や電極構造(膜厚や積層パターン)といった操作条件による生成物の選択率や構成元素を精緻に分析することで、電極表面での炭酸ガスの吸着親和性および炭酸ガス転換挙動を理解し、CO_2ERRメカニズムを明らかにする。

3. 研究の特色

CO_2ERR は、電極表面での CO_2 吸着力が CO_2ERR の生成物選択性に関わる因子になる。例えば、CO_2 吸着力の強い鉛や錫は還元反応による CO 結合の切断が起こりにくいため、ギ酸(HCOOH)が選択的に生成され、また CO_2 吸着力の弱い金や銀では中間体である一酸化炭素(CO)に還元された後、

直ぐに金属表面からの脱離が起こる。一方で、CO_2や中間体 CO に対して適度な吸着力を有する銅は、その表面でCO_2が完全に還元されるため、炭化水素への転換が可能となる。そこで、異種金属の原子膜を積層させた電極を作製し、各金属原子層における異なるCO_2吸着力を相互作用させることにより、単一金属では得られない特異なCO_2吸着力をこの電極表面にて発現させ、これまでに報告されていない炭化水素の生成を実現させる。

4. 研究の成果

(1) 金属単結晶積層電極の作製技術の確立に向けた成膜条件の最適化

銅箔上への異種金属の積層条件の確立に向けて、スパッタリングや電着により金属積層膜の作製を行った。電着による銅箔上へのニッケルの積層実験では、図1に示すようにXPS分析から10 nm程度のニッケル膜の形成が明らかになった。これらの検討により、金属バルク膜の積層は可能であることが確認された。一方、スパッタリングによる金属膜積層を試みたが、原子膜厚による制御が困難であった。これは低い堆積速度に調整することがスパッタリングには不向きであったことが考えられる。これらの結果より、電着による銅箔上への異種金属の堆積により、極めて原子膜に近い金属積層構造を有する電極を構築することに成功した。

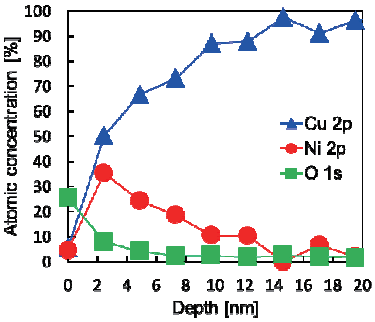


図 1 銅箔上に電位差-1.0 V, 電着時間3 min にてニッケルを電着させた積層電極における深さ方向の元素プロファイル

(2) 金属単結晶積層電極上でのCO_2ERR による生成物組成との相関の把握

銅箔上へのニッケル電着による積層条件が確立されたことから、作製した積層電極上でのCO_2ERR評価を行った。ここでは、基板となる銅箔の結晶構造の違いによって積層電極上でのCO_2ERRによる生成物の組成変化ついて調査した。

図2(a)には、使用した銅箔のX線回折(XRD)パターンを示す。本研究では三種類の市販銅箔を選定し、それぞれ異なる結晶構造を有することが確認した。次にこれら銅箔上に同一電着条件(-0.2 mA, 1 min)にてニッケルを電着した積層電極を作製し、その上でCO_2ERRを行い生成された炭化水素の電流効率を確認した。炭化水素生成物の電流効率とCO_2ERRにおける電流密度との依存性を図2(b)に示す。特に顕著な結果が現れたのは、ニラコ社製(NC)銅箔を使用した積層電極を用いた条件で、電流密度-20 mA/cm^{2}を超えたところからCO_2ERRによる炭化水素生成物の電流効率が大きく向上した。NC銅箔はXRDパターンより、Cu(110)面(2θ=74.1°)が大部分を占める単結晶に近い構造であることが分かった。一方、他の結晶構造にて形成されている銅箔上では炭化水素に係る電流効率の大きな変化は見られなかった。このことは、銅箔表面の特定結晶構造と電着されたニッケル原子膜とで形成された立体的な原子積層構造がCO_2ERRを促進させていることを示唆しており、積層電極構造がCO_2ERR転換効率を向上させるのに有効であることを明らかにした。また、このCO_2ERR生成物の炭化水素組成(図2(c))を分析したところ、大部分がメタン(CH_4)やエチレン(C_2H_4)であることが確認された。またアルコール等の液体生成物については、電解液中に存在することは確認できたものの、その生成量は他の炭化水素と比較すると極めて少なく、詳細な定量分析には至っていない。今後は、基板となる銅箔結晶構造とニッケル膜厚との相関からCO_2ERRによる選択的なアルコール生成を可能とする電極構造の検討を継続していく。

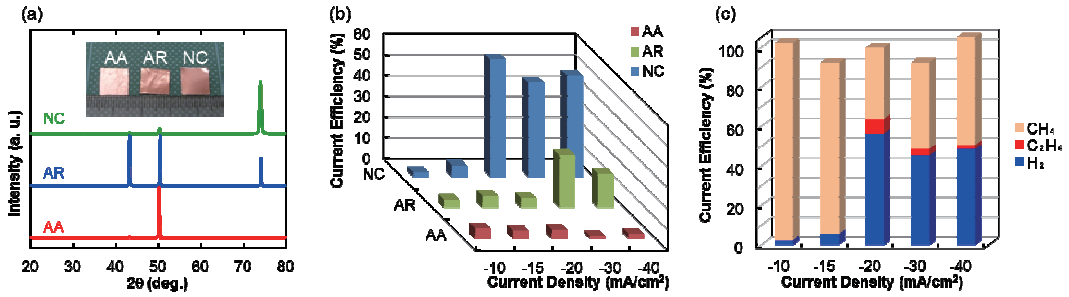


図2 (a)使用した市販銅箔のXRDパターン、(b)各市販銅箔上に電位差-0.2 V, 電着時間1 minにてニッケルを電着させた積層電極上でのCO_2ERRにおける炭化水素生成物の電流効率の比較、(c)NC銅箔によるニッケル/銅積層電極におけるCO_2ERRの電流密度と各生成物の電流効率の依存性

(3) 炭素同位体(^{13}C)炭酸ガスを用いた CO_2ERR メカニズムの解明

金属単結晶積層電極上におけるCO_2ERRでは、どのようなメカニズムで炭化水素へ転換されていくのかを実験的に明らかにするため、一酸化炭素(CO)とCO_2の混合ガスを原料ガスとし、またこれらのガスをそれぞれ区別できるようCO_2には炭素同位体(^{13}C)にて構成されたものを用いて電気化学還元反応を行い、GC-MS(島津製作所、GCMS-QP2010)を用いた定量分析から金属単結晶積層電極上でのCO_2ERRメカニズムの解明を試みた。

現在までに原料ガス組成の異なる条件にて電気化学反応による排出ガスをGC-MSを用いて分析したが、これまで原料ガス組成の違いによる生成ガス組成への影響を見出すまでには至っていない。今後、炭素二原子以上のエチレン(C_2H_4)やエタノール(C_2H_5OH)などの炭化水素の生成量を増加させることで、本手法によるCO_2ERRメカニズムの解明につながることが期待される。

口腔癌における高浸透圧刺激による増殖促進機構に関する研究

福岡歯科大学　口腔歯学部　吉本　尚平

1. 研究の目的

癌細胞膜上に発現する上皮成長因子受容体（Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR）を介した細胞内シグナル伝達は、口腔癌をはじめ種々の癌細胞増殖において重要な働きを担っている。そのため、EGFR は癌治療の標的分子となっており、その阻害剤が臨床応用され従来の抗癌剤に比し著明な治療効果を得ている。しかし、この分子標的療法においても薬剤耐性の獲得による腫瘍の再燃が問題となっている。従って、耐性獲得の問題を克服できる新機序での抗腫瘍療法の開発が求められている。

一方、癌の進展には炎症細胞、線維芽細胞など周囲組織を含めた癌微小環境が大きく影響しているとされている。癌微小環境は低酸素、低栄養という細胞の増殖に不利な状況だが、低酸素、低栄養により誘導される炎症性サイトカインが癌細胞の増殖、浸潤を促進するとされている。加えてこの環境下では炎症に伴う浸透圧上昇が起こっていると考えられるが、癌細胞の増殖、浸潤に対する浸透圧上昇の影響については十分な検証がなされていない。

そこで、我々が浸透圧上昇と EGFR を介した癌増殖について検討した結果、口腔癌細胞株を用いた in vitro 実験により、高浸透圧刺激応答転写因子:NFAT5（nuclear factor of activated T-cells 5）が小胞体における糖鎖修飾酵素:DPAGT1（Dolichol phosphate-dependent N-acetylglucosamine 1-phospho-transferase）の発現亢進に関わることを見出した。それにより、EGFR への糖鎖修飾が活性化され、小胞体から細胞膜への転移が促進されることで EGFR のシグナル伝達経路が活性化され、高浸透圧下において癌細胞の増殖亢進が起こるとの結果を得ている。

口腔癌細胞における浸透圧上昇環境での増殖機構を標的とした新規制御法の開発につなげるため、本研究では、ヌードマウスを用いた in vivo での癌細胞移植高浸透圧刺激実験系の解析による、癌細胞の浸透圧上昇下での増殖能亢進の制御機構解明を目的とした。in vivo 実験系の解析により、生体内での癌微小環境を模した条件での検討が可能である。あわせて、摘出ヒト口腔扁平上皮癌組織を用いた NFAT5 および DPAGT1 の発現解析を行う。生体内での両分子の発現動態と癌悪性度との関係を検討することで、治療標的としての有用性について検証を行うことも目的とする。

2. 研究の計画・方法

(1)腫瘍高浸透圧刺激モデルの確立と解析

ヌードマウスへの口腔癌細胞細胞移植および、浸透圧ポンプ埋め込みによる腫瘍高浸透圧刺激モデルの確立を行う。マウスに舌癌細胞株（HSC-3）を2×10^7cells/mlの濃度でマトリゲル(Corning社)もしくは生食に懸濁し、マウス皮下に移植する。移植後、生着した癌細胞腫瘤の近傍にポンプを埋入し、腫瘤内にマンニトール等の高浸透圧溶液を持続的に作用させる。癌細胞移植およびポンプ埋入時は適切な麻酔操作を行う。腫瘍を摘出、固定後はヘマトキシリン - エオジン染色、免疫染色を用いて腫瘍の増殖、浸潤、転移の様式を検討する。

(2)in vivo 腫瘍高浸透圧刺激モデルにおける NFAT5-DPAGT1 経路の抑制

埋め込みポンプ内に各種阻害剤を高浸透圧溶液とともに填入することにより薬剤の持続的な抑制効果の検討が可能である。具体的実験の一つとして、DPAGT1による糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシンの投与を行い同経路阻害による腫瘍形成に対する効果を検討する。

(3)NFAT5 および DPAGT1 の癌組織における解析

ヒト口腔癌病理組織標本を用いNFAT5、DPAGT1および関連分子について、それぞれのタンパク質発現解析を免疫組織化学的手法により行い、発現動態の解析からそれぞれの機能

とEGFR細胞膜移行の制御機構との関連についての検討を行う。

3. 研究の特色

現在、癌微小環境を対象とした研究においては、「低酸素」、「低栄養」に対した研究が広く行われているが、未だ着手されていない「浸透圧」の研究を加えることで、癌微小環境研究のブレイクスルーと成り得ると考えられる。今回の研究で、今まで我々が示してきた in vitro での浸透圧上昇による癌細胞増殖亢進という知見を、マウスモデルを用いた in vivo およびヒト癌組織において検証するということが本研究の特色である。

4. 研究の成果

(1)腫瘍高浸透圧刺激モデルの確立と解析および NFAT5-DPAGT1 経路の抑制

①ヌードマウス(BALB/cAJcl-nu)に舌癌細胞株のHSC-3移植を行った。2×10^7cells/mlの濃度で生食に懸濁した細胞を200μl背部皮下に注入した。1週間後に生着を確認し、腫瘍の近傍に浸透圧ポンプ(alzet社)を埋入した。ポンプ内には高浸透圧液としてマンニトールおよび、対照としてPBSを填入した。2、3日おきに腫瘍径を測定し体積を計算・記録していった結果、マンニトールによる高浸透圧刺激群において腫瘍体積の増大を認めた。この際の腫瘍組織の免疫染色にて、高浸透圧群においてNFAT5の発現上昇を認めた。

②高浸透圧による腫瘍体積の増大がみられたため、DPAGT1による糖鎖修飾阻害作用のあるツニカマイシンをポンプに添加し、腫瘍体積の変化を検討した。その結果、ツニカマイシン添加により高浸透圧での体積増加の抑制を認めた。

(2)NFAT5 および DPAGT1 の癌組織における解析

福岡歯科大学医科歯科総合病院口腔外科にて切除された舌扁平上皮癌組織（早期浸潤癌：3例、高分化型：5例、中分化型：6例）を用いてNFAT5、DPAGT1発現を免疫染色にて検討した。染色面積および強度をもとに評価した結果、両タンパク質ともに中分化型扁平上皮癌において有意な発現の上昇を認めた。

以上の成果より、浸透圧上昇による癌細胞増殖亢進という知見を、マウスモデルを用いた in vivo およびヒト癌組織において検証するということができた。さらに、DPAGT1 を阻害することにより浸透圧上昇依存的な腫瘍の増殖が抑制できたことから、この経路が治療標的となり得るとも考えられた。今後はさらにヒト癌組織の症例数を増やして検討を行いたい。

平成 29 年度学術研究振興資金　若手研究者奨励金　研究報告

平成 30 年 10 月作成
編　集　　日本私立学校振興・共済事業団
助 成 部　寄 付 金 課
発行所　　日本私立学校振興・共済事業団
〒102-8145　東京都千代田区富士見 1-10-12
電話　03(3230)7315・7319
FAX　03(3230)8223

禁無断転載