

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ぬ。

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たものであり、この試みはまれなものといえる。

(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、すなわち企業的意思決定は、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的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、より企業的意思決定の中核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攪乱作用の研究 —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、薬剤耐性を獲得しやすく、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、好中球機能を攪乱し、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-ミリストート 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のが期待できる。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のが期待できる。
- (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 traps 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 ーフォールディング病治療薬開発を目指してー

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。

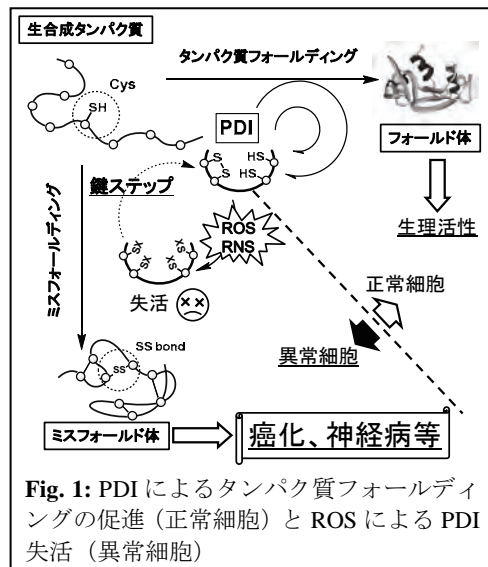


Fig. 1: PDI によるタンパク質フォールディングの促進（正常細胞）と ROS による PDI 失活（異常細胞）

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。

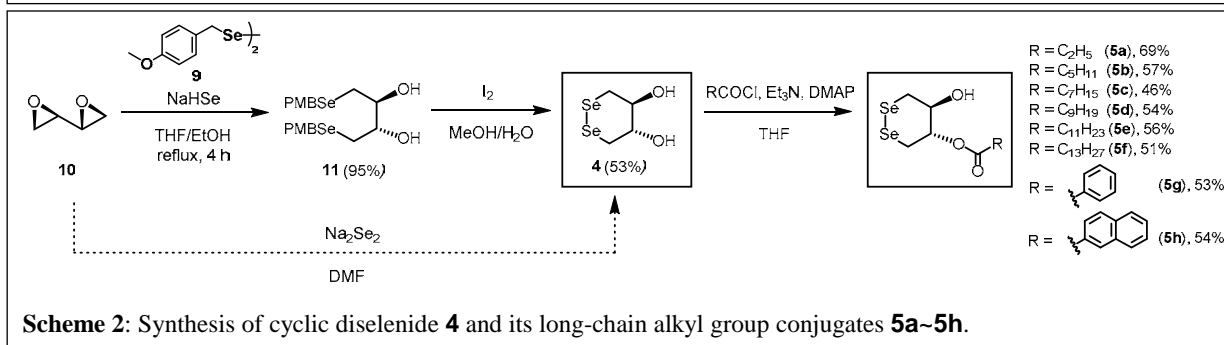
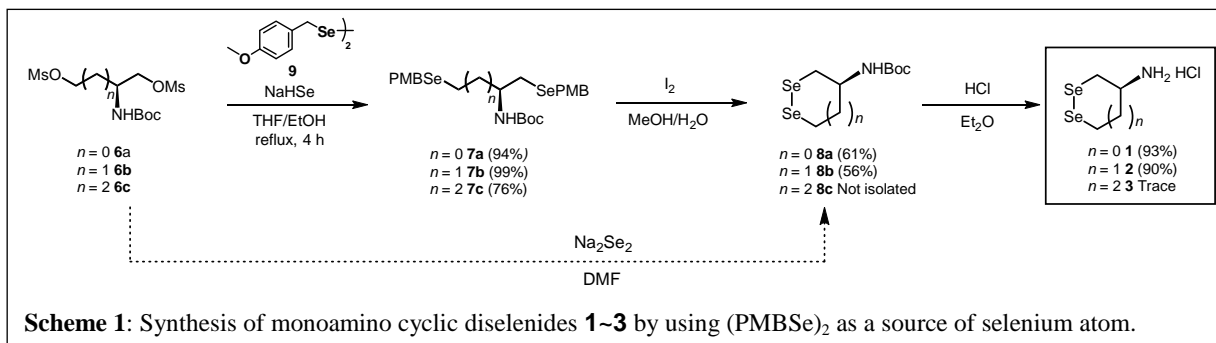
3. 研究の特色

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。



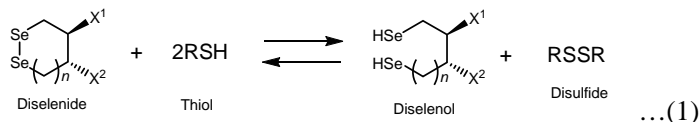
(2) 合成化合物の抗酸化活性

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 °C、5% CO₂ 加湿条件下で 15 h 培養した後、0.4 mM H₂O₂ 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、活性窒素種の一つである一酸化窒素 (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)。



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. Muges*, M. Iwaoka*, Protein Folding by Water-Soluble Cyclic Diselenides with Novel Oxidoreductase and Isomerase Activities. *ChemBioChem*, **2018**, 19, pp.207-211.
- ③ P. 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.
- ⑤ S. Shimodaira, Y. Asano, **K. Arai**, and M. Iwaoka*, Selenogluthathione Diselenide: Unique Redox Reactions in the GPx-Like Catalytic Cycle and Repairing of Disulfide Bonds in Scrambled Protein, *Biochemistry*, **2017**, 56, pp. 5644-5653.

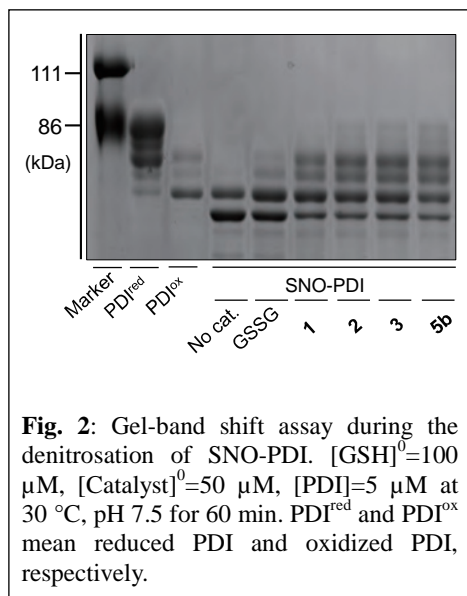


Fig. 2: Gel-band shift assay during the denitrosation of SNO-PDI. [GSH]⁰=100 μM, [Catalyst]⁰=50 μM, [PDI]=5 μM at 30 °C, pH 7.5 for 60 min. PDI^{red} and PDI^{ox} mean reduced PDI and oxidized PDI, respectively.

『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 鶴飼 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

① GSTP1 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こなった。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、プローブを投与し、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 メチル化により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 亮太郎

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を考えられ、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ィ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（ $30\text{kg} < : 30\text{-}40\text{kg} : \geq 40\text{kg} = 47.3\% : 55.2\% : 61.6\% ; P < 0.05$ ）。

これらの結果から、発情時の卵排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) がんが好氣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 など発がん深くかかわるドライバー遺伝子が細胞の代謝を好氣的解糖優位に再構築することがわかっており、がんの特異的な代謝（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 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
 - ① 2DG 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 1 μ g/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氣的解糖により強く抑制されており、好氣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。
 - ① GATA2 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
 - ① GATA2 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
 - ① GATA2 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。
 - ① GATA2 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。
 - ③ MDS 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。
 - ① GATA2 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。
 - ① MDS の進展に関わる複数の遺伝子変異を同定した。その中の一つである Gene X について、付加異常としての機能解析を開始した。
 - ② GATA2 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气的環境（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-S1c 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 ベクターにホテ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 β -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いては、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-S1c 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、 β -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を期待される。

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ブアプ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、ストレス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、インタビューイヤーが実践した行動、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。
- ③ 5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。