

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さうのか、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さうのか、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が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

①Shinohara, 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ているとされている。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면을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。

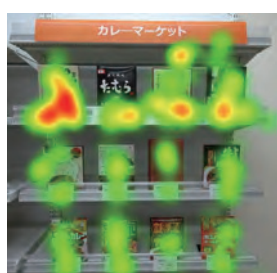


図 1 商品棚に対する注目の集計結果

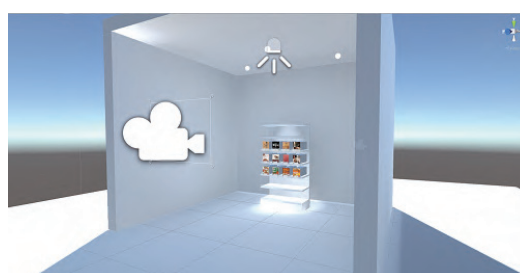


図 2 仮想空間の例

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 ー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ー

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、臨床で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を期待される。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を期待され、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。

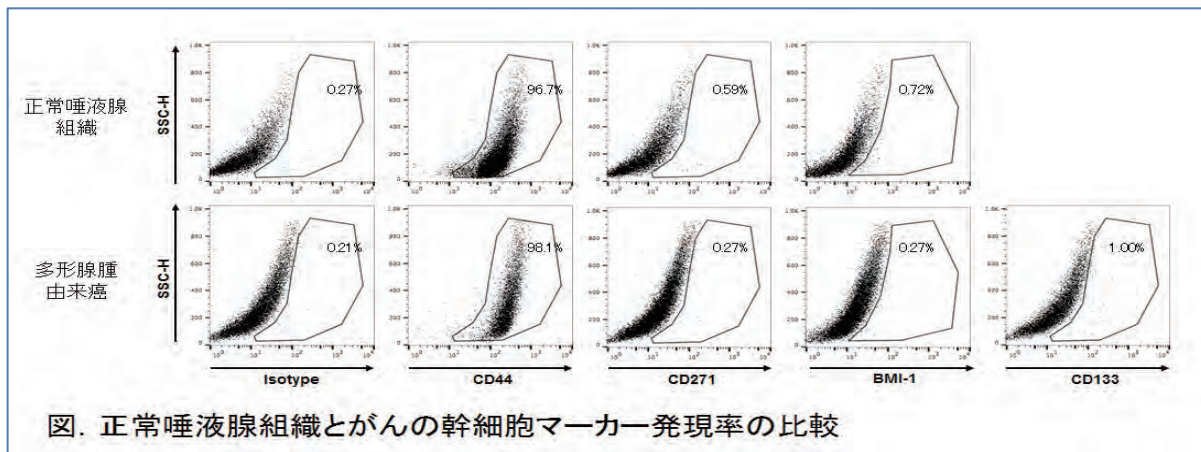
4. 研究の成果

(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。トリパンプ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）。



(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かったため、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 ーバイオインフォマティクスを用いた新規探索ー

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起こされている。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の手法（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類より血液を採取し、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*, *Ccl15* 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*, *Gpnm5* 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、次第にあきらかに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。

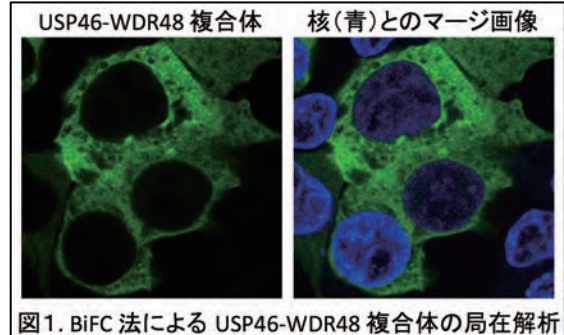


図 1. BiFC 法による USP46-WDR48 複合体の局在解析

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 α 1-6、 β 1-3、 γ 1-3、 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、 α 2 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、 α 1、 α 3、 α 5 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 α 1、 α 3、 α 5 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 α 1、 α 3、 α 5 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 α 1-FLAG/ β 3-MYC/ γ 2-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 α 3-FLAG/ β 3-MYC/ γ 2-MYC、 α 5-FLAG/ β 3-MYC/ γ 2-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 α 1、 α 3、 α 5 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 α 1、 α 3、 α 5 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

- ① *there* 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 ković (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も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** を補部を取る **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 Δ **P** 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 Δ **P** はそのままではラベル決定が行われないため、 Δ は、 Δ **P** 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 Δ **P** 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 ković (1997) で指摘された例を説明できる。一方、 Δ が Δ **P** 内から移動しない場合は、 Δ **P** 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 Δ **P** 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 Δ **P** 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、 Δ **P** 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、 Δ **P** 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 一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的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 (Colla1、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、コラゲナーゼ灌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 μ M) 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

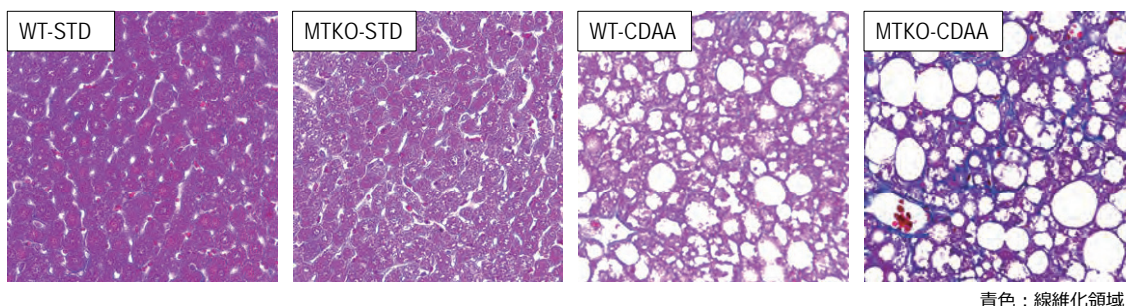


Fig. 1B

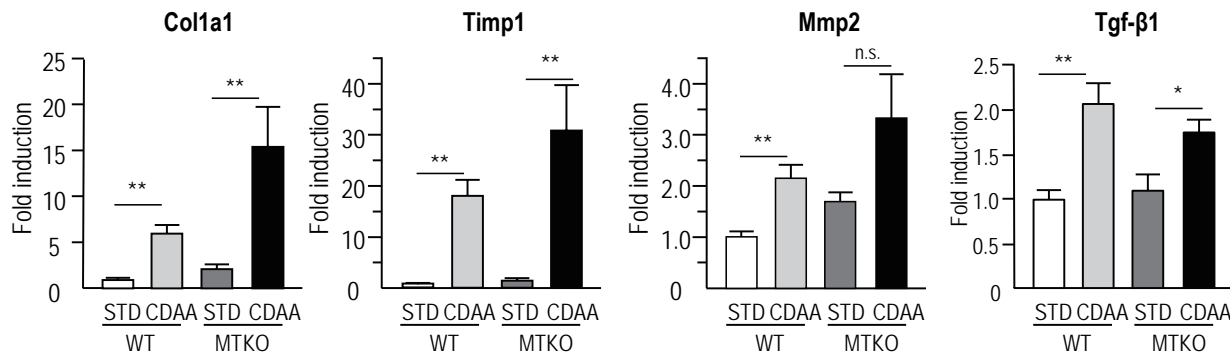
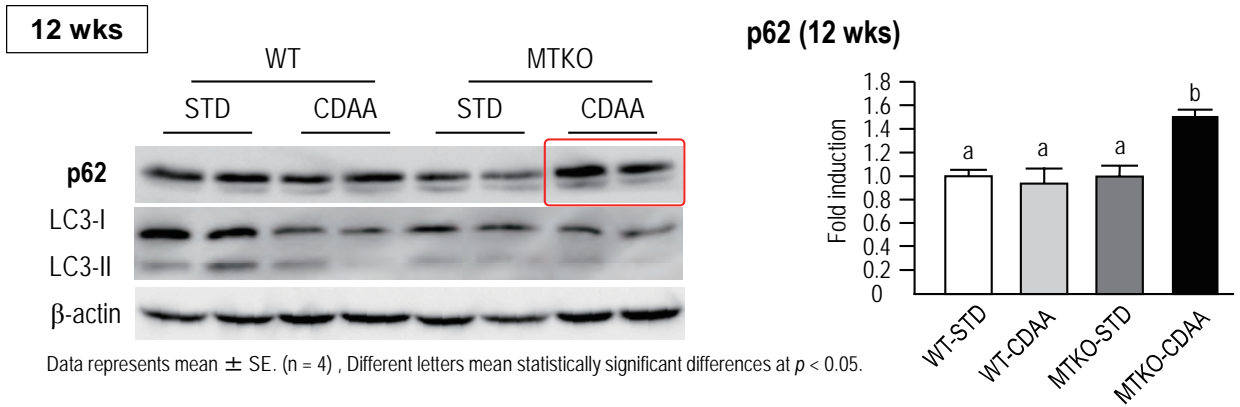


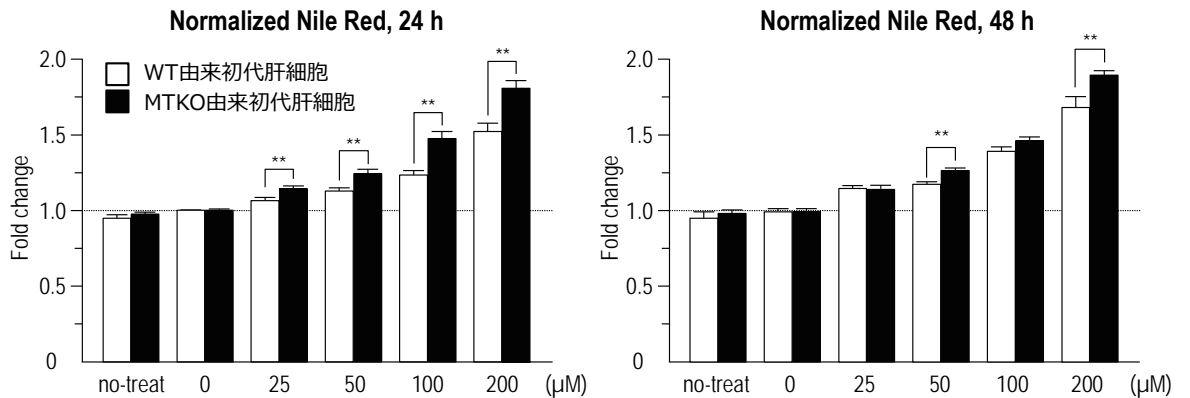
Fig. 2



(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 μ M で、48 時間後では 50 および 200 μ M 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

- ① 2014 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。
- ② CD133 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立脚して、膵癌悪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られる。
- (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
 - ① Nanoparticle 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。
 - ② Transmission 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) 膵癌悪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悪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) 膵癌悪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 —CO₂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 CO₂ 濃度の低減に向けてこれまで CO₂ 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、CO₂ 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 (CO₂ERR) は室温大気圧下において CO₂ 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 CO₂ERR では、電極となる金属表面と CO₂ 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、CO₂ から炭化水素、特にメタン (CH₄) やエチレン (C₂H₄) 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、CO₂ERR 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 CO₂ 吸着力をその表面にて発現させ、CO₂ERR 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 CO₂ERR メカニズムの実現を目指して、CO₂ 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 CO₂ERR 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 CO₂ERR 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 CO₂ERR 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 (¹³C) 炭酸ガスを用いた CO₂ERR メカニズムの解明

炭素同位体 (¹³C) を有する ¹³CO₂ ガスと一酸化炭素ガス (¹²CO) 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 (¹²CO/¹³CO₂) 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、CO₂ERR メカニズムを明らかにする。

3. 研究の特色

CO₂ERR は、電極表面での CO₂ 吸着力が CO₂ERR の生成物選択性に関わる因子になる。例えば、CO₂ 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 CO₂ 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、CO₂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 CO₂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 CO₂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 CO₂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。

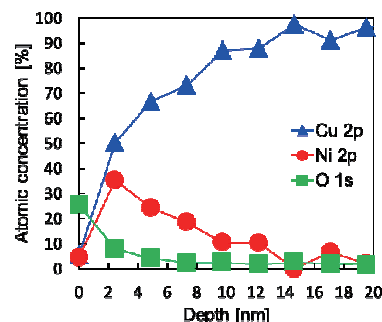


図1 銅箔上に電位差-1.0 V, 電着時間3 minにてニッケルを電着させた積層電極における深さ方向の元素プロファイル

(2) 金属単結晶積層電極上での CO₂ERR 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CO₂ERR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CO₂ERRによる生成物の組成変化について調査した。

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CO₂ERR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CO₂ERR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/cm²を超えたところからCO₂ERR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CO₂ERRを促進させていることを示唆しており、積層電極構造がCO₂ERR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CO₂ERR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(CH₄)やエチレン(C₂H₄)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CO₂ERR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。

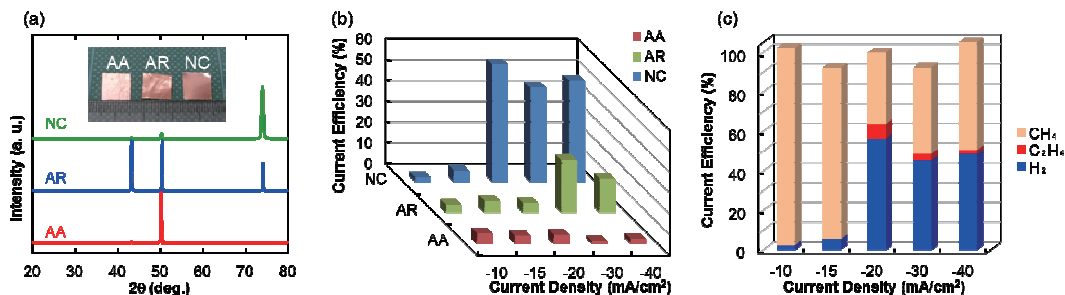


図2 (a)使用した市販銅箔のXRDパターン、(b)各市販銅箔上に電位差-0.2 V, 電着時間1 minにてニッケルを電着させた積層電極上でのCO₂ERRにおける炭化水素生成物の電流効率の比較、(c)NC銅箔によるニッケル/銅積層電極におけるCO₂ERRの電流密度と各生成物の電流効率の依存性

(3) 炭素同位体 (¹³C) 炭酸ガスを用いた CO₂ERR メカニズムの解明

金属単結晶積層電極上におけるCO₂ERR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CO₂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CO₂には炭素同位体(¹³C)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CO₂ERR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(C₂H₄)やエタノール(C₂H₅OH)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CO₂ERRメカニズムの解明につながる事が期待される。

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 2×10^7 cells/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、生着した癌細胞腫瘍の近傍にポンプを埋入し、腫瘍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」に対する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。2×10⁷cells/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。