

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## &lt;2018年度採択&gt;

令和2年4月13日

日本大学学長 殿

氏 名 大嶽 真人



所属・資格 文理 学部・ 教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 文理 学部 人文科学研究所

## 1 研究課題

視覚障害者スポーツの持続可能な強化と社会的環境モデルの構築～東京2020とその先へ～

## 2 研究期間

◎ 平成 30 年度 ～ 令和 元 年度

## 3 研究組織

氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 大嶽 真人	文理学部／教授	研究統括・渉外・トレーニング立案・評価の検討
○研究分担者 橋口 泰一 伊佐野 龍司	松戸歯学部／准教授 文理学部／准教授	渉外・心理学的評価・内省分析 運動学的評価・トレーニング立案・実践

## 4 現在までの達成度

当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。  
 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

(区分 ② ) ・ (達成度 80 %)

※研究期間全体（2年計画の場合は2年間）を100%としてください。

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（ ・ 否）いずれかを○で囲んでください。  
 否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：文理学部 人文科学研究所

氏名：大嶽真人

## 5 研究目的

現在の障害者スポーツでは、東京 2020 パラリンピックに向けて国をあげての強化策が取られているが、メダル獲得が期待される一部のアスリートの待遇に留まっている。選手の活躍がマスメディア等で報道により身近となっているが、その背景には複数の課題がある。障害のある選手を強化する場合は、健常者と比べて様々な課題が報告され、視覚障害選手がトレーニングする場合「通い慣れた場所」「情報交換が容易くできる場所」「安心して集中できる場所」「信頼できるスタッフ」「使い慣れた器具」などが挙げられる。トレーニング環境の整備のみならず、視覚障害者のトレーニングでは、筋力など身体機能そのものを高めるトレーニングのほか、聴覚など知覚認知能力を高めるトレーニングも重要視される。このような能力の向上に近年では、大学組織として障がいのあるアスリートへの強化策がとられている。

このような視覚障害者スポーツ課題を克服し、持続可能な強化と社会的環境モデルの構築に向けて、本研究においては、視覚に障害のあるサッカー選手を対象として、以下の課題を解決することが目的である。

- ①視覚に障害のあるサッカー選手を対象として、空間・動作認知を継続的に測定し、これまで様々な場で行われた実験並びに評価を日本ブラインドサッカー協会と完全な連携のもとに拠点を構築する。
- ②トレーニング環境だけではなく、性別、年代、性格を超えた視覚障害者同士、視覚障害者と健常者といったコミュニケーションを構築することを目的としたインクルーシブな環境の提供を通して、社会心理的な要因について向上を図る。
- ③ブラインドサッカー協会が提供している晴眼者向けプログラム（スポ育事業）及び視覚障害者向けプログラム（ブラサカキッズキャンプ）における多様性適応能力を測定する。

この目的を達成することで、希薄な非視覚下での知覚-身体運動情報処理過程のシステムに基づいた視覚障害スポーツのトレーニングの開発に先鞭をつけることが可能となる。このことは、東京 2020 パラリンピックを迎える中で、これまでの本学のスポーツ科学研究並び支援に加え、日本大学発信のパラリンピック競技への研究・支援体制の構築の可能性が高まる。

また、相互理解やイメージの共有等、健常者の指導においても有効な知見となり、独創的かつ、本学における様々な学生への教育に応用することの可能性が高まる。インクルーシブ教育等が求められる中で、スポーツを通じて指導可能となることは、パラリンピックレガシーにも貢献し、社会的に大きな意味をもつ。

## 6 研究概要

障害者スポーツの強化と待遇の限定が露呈する今日において、大学の研究機関としてアスリートの強化に貢献するばかりでなく、障害を有するための心理・社会的課題についても解決を図りながら、2020年以降も持続可能な強化と社会的環境モデルを構築するために以下の課題を解決することを目的としている。

- ①視覚に障害のあるサッカー選手を対象として、空間・動作認知を継続的に測定し、これまで様々な場で行われた実験並びに評価を日本ブラインドサッカー協会と完全な連携のもとに拠点を構築する。
- ②継続的にトレーニング並び成果を測定するとともに、環境設定の効果について検証を行う。
- ③新たな試みである視覚障害者同士、視覚障害者と健常者といったトレーニング施設だけではないコミュニケーションを構築することを目的としたインクルーシブな環境の提供を通して、協会が実施しているプログラムと多様性適応能力について社会心理的な要因の観点から検証を行う。



実施研究所：文理学部 人文科学研究所

氏名：大嶽真人

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください)

## 研究課題①

## 【問題の所在と目的】

## 「ブラインドサッカー選手を対象としたトレーニング拠点の構築」

リハビリテーションの一環として開始された障がい者スポーツは、東京パラリンピックを翌年に控え、強化費や補助金も含め、競技スポーツとして大きく発展している。障害者スポーツ普及促進に関する有識者会議(2016)では、様々な障がい特性を鑑みた継続的な研究や医科学サポートの必要性が叫ばれている。国際的なパラアスリートの強化は著しく、その中で日本は出遅れている感が否めない。ブラインドサッカー選手(全盲)に焦点化すると、国際大会に向けた個人および代表チームにおける課題と目標を達成するための周囲への要望について分析を行った結果、個人では身体的要素が一番多かったのにもかかわらず、チームでは心理的要素が多かったことが興味深い(橋口2014)。競技において視覚障害選手は、他者から視覚情報の言語的サポートを受けることが多くある。その場合、選手とスタッフとの関係を円満に機能させるために、ソーシャルスキルのアプローチが重要になる。視覚障害者スポーツに限らず障害スポーツでは、健常者のスポーツとは異なり、指導者(介助スタッフ)の方々へのサポートや心理スキル(コミュニケーション)の獲得、連携が重要になる。そのため視覚障害選手にとって、自主練習におけるトレーニングパートナーの確保や練習環境の整備は重要な課題となる。そして、選手を取り巻く環境が、指導を「与えすぎず」「与えなさすぎない」適度な言葉かけやコーチングが求められる。さらに、サポートするトレーニングコーチも誰でもよいのではなく「障がいかがわからない」「接したことがない」といったサポートにもバリアがあることも問題視されている(荒木, 2011)。このようにブラインドサッカー選手に対するトレーニングの課題が山積しているが、それは氷山の一角に過ぎない。実際、東京2020パラリンピックに向けて国をあげての強化策が取られているが、メダル獲得が期待される一部のアスリートへの待遇である。しかも視覚障害選手がトレーニングする場合、ブラインドサッカー協会への調査において、「通い慣れた場所」「情報交換が容易くできる場所」「安心して集中できる場所」「信頼できるスタッフ」「使い慣れた器具」といった項目があげられ、整備が急務であった。これらの問題を解決するために、上記項目をクリアするブラインドサッカー協会内にトレーニング施設を設け、2年弱に渡りトレーニングを実施した(一部成果については昨年度に報告)。本報告は、トレーニング環境を設置した場所に在籍するトレーニング管理者への調査結果を示す。

## 【方法】

ブラインドサッカーチーム代表者・監督1名(対象者A)とブラインドサッカー協会と東京パラリンピック組織委員会に所属する者1名(対象者B)を対象に半構造化インタビューを実施した。対象者の選定理由は、選手のトレーニングに帯同しているとともに、組織運営にも関わっていることが筆頭であった。さらに、両者は中等教育過程に在籍する生徒に教育にも携わっているため、言語発表能力を有していることも理由の1つにある。対象者には、研究概要、調査の拒否権があることについて説明を行い、参加の同意を得た。なお、本研究は日本大学文理学部に帰属する研究倫理審査委員会の承認を得て実施している。

## 【調査内容】

調査内容は、成果の確認と課題の抽出として、「①トレーニング環境が設置されたことによる成果はありましたか?」、「②今回の取り組みの課題や改善点はありますか?」、その他の「社会システム・人的資源・TR 機材など広範囲に渡る要望や展望を調査する意図として、「③ブラインドサッカー選手のトレーニング環境を設置する上で整備することはありますか?」を取り上げた。さらに、日本大学としての社会実装的な調査の所感を取り入れるために「本学の取り組みに対する意見」を調査した。

## 【結果】

対象者Bから①を「パワープレートを用いたトレーニングの導入に当たって、これまでの実践で得



実施研究所名：文理学部 人文科学研究所

氏名：大嶽真人

## 研究結果（つづき）

られた客観的な根拠を提示いただいた上で開始できたことに選手・スタッフともに安心してトレーニングに取り組むことが可能になったと思う。トレーニング環境が整備されるまでは、スペースも限られており複数人が同時かつ効率的に取り組める環境ではなかった。パワープレート導入を機に安全にトレーニングに取り組める環境が整い、選手たちも「特殊な機器」を使用することに興味を示し、意欲的かつ持続的にトレーニング取り組むモチベーションの向上にも繋がった。身体的な効果としては、攻守が切り替わった一瞬の反応の素早さや間合いの詰めの速さなど導入前後で比較するとピッチ内でのパフォーマンスに大きく影響していることが選手の声の中に挙がっており、チームの戦術的な特色とも合致した効果が得られた。」との回答を得られている。さらに、同氏は、②について「トレーニング内容については今回下肢と体幹を中心に組まれた内容であったが、今後は上肢も含めたプログラムの実施や別の器具の活用などを行い、サッカーやフットサルで行われているトレーニングを参考にしつつ、ブラインドサッカー選手のプレー特性も鑑みてプログラム開発に着手できるのではないかと。また先天盲の選手の中には身のこなしのぎこちなさを抱えて青年期を迎えることも多く、手足を協調させて動きを表現したり、新たな動きの獲得に時間がかかってしまうケースなどが見られるため、(可能な限り発達段階の早期で)フィジカルの強化の中に身のこなしの改善を図るようなトレーニングや動きづくりも組み込めると効果的であると考えている。」とさらなる向上を見越していた。さらに、③については「設置場所として練習拠点に設置したことも選手たちが継続的にトレーニングに取り組むことができた要因であると考え。設置場所まで安全に移動することができ、それぞれが動線を把握している場所にてトレーニングルームにすることで特に全盲選手が単独で向かうことができる点も選手たちにとってはストレスなくスムーズにトレーニングを導入できたことに繋がった。今後別会場で実施していくことを検討する際には、安全に会場まで移動できることが最も重要であり最優先事項として配慮すべき点である。対象となる選手に対して適切な説明や事前の聞き取り、安全に移動するための練習や必要に応じて移動介助の体制づくりなどを適切に行った上で個々に応じた環境を整備していく必要があると考える。」との回答を得ている。また、対象者Bからは①に対して選手からの主観的な身体の動きやすさの報告を受けていること、②スケジュールの調整単位に課題があること（1ヶ月単位での調整）、③について選手個人での実施の安全性を確保すること、④について、「強化指定の選手は、トレーニング、パーソナルトレーニング以外の貴重な場として貴重な場になったと思います。強化指定選手は代表のトレーニング、パーソナルトレーニングでチーム以外の練習ができるが、強化指定選手以外に対する取り組みは協会で行えないため、そのフォローができると日本代表の底上げになると思います。」と練習拠点以外で場所の確保、グラスルーツの練習拠点としての価値を有することの示唆を得た。

## 【考察】

対象者Aのチームは、チームの練習拠点内にトレーニング環境を整備し、下肢・体幹筋群の強化を目的としたプログラムを週2回実施してきた。その身体的な成果は昨年の通りであるが、チームとしても継続的なサポートを続けた結果、ブラインドサッカーチームで唯一のフィジカルトレーニング環境を整備したチームとなった。なお、同チームは全選手がトレーニングに参加していたため、2019年東日本リーグ優勝、2019年日本選手権準優勝の成績を納めている。Aの回答にもあるように、自身のことを理解する「スタッフ」と「使い慣れた場所」「単独で移動できる」ような「安心・安全」の要素を取り入れたことが効果を示したと考えられる。また、この度のトレーニングサポートには本学体育学科生を中心に支援を実施した。学生も支援しすぎないこと、安心して取り組めうるような環境づくり、具体的な指示な障がい特性に応じた支援を行うことで、学生にも障がい者スポーツに対する認識変容が生じた。こうした総合的な取り組みをA氏は、ブラインドサッカーのモデルケースにしたいと述べている。また、B氏の言においても、当該拠点が強化指定選手にとっては自らの更なる強化の使用となり、他の選手にとっては貴重な練習の場となることが示唆された。第二次スポーツ基本計画（文部科学省、2017）では、



実施研究所名：文理学部 人文科学研究所

氏名：大嶽真人

## 研究結果（つづき）

トップアスリートのニーズに対応できる拠点づくりの推進や、地域の障害者スポーツの拠点づくりに向けて全ての特別支援学校を対象に準備を進めている。確かに、これらの施策は必要であろうが、トップでなければ使用することができないこと、また「障がい者スポーツ」という大枠でなく障がいの特性を理解した拠点が必要であることを考えると、両者以外の方策も必要と言わざるを得ない。そうした観点から捉えた場合、本研究の取り組みは、スポーツ基本計画の枠組みを補佐する実践となり、障害者スポーツの運営の様態を示すことことができた。以上の考察を統合すると、2020大会を迎える今日においては、もはや障がい者スポーツの参加の機会確保（ブラインドサッカーに限定すれば）の時期は終焉を迎え、グラスルーツ・強化・情報交換・人的交流を図れる「インクルーシブ地域スポーツクラブ」のフェーズに移行する必要性が強く示唆されていると言えよう。もちろん、全ての種目において実現することは困難であるが、ブラインドサッカー協会とともに本研究で示した成果はその実現の先駆けとなる。当該モデルの実践については一部成果物として示しているが、インタビュー結果を概念化するなどして早急に研究論文として投稿することを予定している。

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## &lt;30年度 採択&gt;

令和 2年 4月 16日

日本大学学長 殿

氏 名 安原 徳子



所属・資格 文理 学部・ 准教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 文理 学部 自然科学 研究所

1 研究課題 動物細胞における核-細胞膜間の情報流通ネットワークの解析		
2 研究期間 ◎ 平成30年度～令和元年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 安原徳子	文理学部／准教授	研究の統括と実施，細胞核輸送因子の解析，細胞がん化モデル作成
○研究分担者 日臺智明 北野尚孝	医学部／准教授 医学部／准教授	研究の実施，細胞骨格の解析，血管内皮細胞の核輸送基質の解析 研究の実施，細胞骨格の解析
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について，以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ② ) ・ (達成度 90 %)		

※「7 研究結果」について，ホームページ等での公開（ 可 ・ 否 ）いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は，理由書を添付して下さい。



実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：安原徳子

## 5 研究目的

真核細胞は細胞外部の環境変化を核に伝え、遺伝情報を引き出して対応する。細胞核輸送は、核の遺伝情報を適切に利用するのに必要であり、細胞活動の多くの場面で働いていると考えられる。核輸送因子の代表例である importin  $\alpha$  分子には複数のファミリー分子が存在する。それぞれに運ぶ分子に対する特異性があるため、機能も異なることが予想されているが、どのように異なるのか、その全容は明らかではない。一方、細胞接着は組織形成において重要であり、細胞種特異的に調節されている。細胞が自らの位置情報や外部環境に応じて適切に活動するには核輸送と細胞接着がクロストークし、遺伝情報に基づいた反応系を通して周りの細胞と協調しなければならない。また、細胞骨格は膜で構成された細胞の区画を裏打ちして補強するだけでなく、情報伝達物質や細胞小器官などを運ぶレールの役割を果たす。安原は予備的に、核輸送因子の発現上昇により細胞接着による増殖停止が抑えられることをつかんでおり、核輸送と細胞接着に相関があると考えられる。日臺、北野は上皮成長因子 EGF モチーフを用いたマウス移植腫瘍の遺伝子治療を行った際、細胞質内の細胞骨格分子アクチンが減少し、また核の形態が変化することを示した。一方、細胞膜に存在するレセプターなどについて、リガンドとの結合が核へ情報を伝達する仕組みなど、個々のシグナル伝達系の研究はあるものの、核輸送のように多くの分子を一括して制御する反応系や、様々な細胞活動に関与する細胞接着を結びつけた情報伝達機構の解析例はほとんどない。そこで、本研究は、動物細胞の細胞膜から細胞核へのグローバルな情報流通を解析する手法を確立し、がん細胞の形質転換および幹細胞分化、個体発生、組織形成における細胞内情報伝達機構を明らかにすることを旨とする。

## 6 研究概要

細胞核の内外への分子輸送を担う核輸送因子、細胞質を走る細胞骨格分子、細胞どうしの結合を担う細胞接着分子の3者の相互作用を、細胞生物学的実験、分子生物学的実験を用いて定量的に解析する手法を確立する。具体的には、マウスとヒトのがん細胞、幹細胞、動物胚および組織を用い、以下の項目の達成を目指す。確立した技術を用い、がん細胞の形質転換、幹細胞分化、個体発生および組織形成をモデル系として、細胞核と細胞膜の情報流通の分子ネットワークとその役割の解明に向けた研究に着手する。

- (i) 細胞接着、細胞骨格形成と核輸送の定量化
- (ii) 細胞接着、細胞骨格重合に関与する核輸送基質の同定
- (iii) 核輸送因子、細胞骨格分子、細胞接着分子の分子イメージング

核輸送、細胞骨格形成、細胞接着は様々な細胞活動に広く関与するため、本研究の達成により細胞核と細胞膜のグローバルな情報流通の理解が進む。達成後は、他の動物種や個体発生、疾患モデルなどに研究対象を広げ、新たな発見へとつなげる。

実施研究所：文理学部自然科学研究所

氏名：安原徳子

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

本研究では細胞核の内外への分子輸送を担う核輸送因子，細胞質を走る細胞骨格分子，細胞どうしの結合を担う細胞接着分子の3者の相互作用を，細胞生物学的実験，分子生物学的実験を用いて定量的に解析する手法を確立することを計画していた。研究実施期間中、これらを遂行するとともに，新たな成果を得た。これらの新たな成果を世界に先駆けていち早く発表するため，遺伝子発現解析，タンパク質相互作用解析を最優先課題として早急に，重点的に行うことにした。すなわち，安原は上皮・間葉系細胞への核輸送因子の発現誘導が細胞骨格を変化させ，細胞運動を促進して腫瘍形成を引き起こすこと，さらに核輸送因子が解糖系に関わる酵素と細胞質で相互作用すること，核輸送因子は細胞質から核へと移行したのちにクロマチンとユニークな様式で結合することを見出した。日臺，北野は血管内皮細胞を用いて，細胞外因子による抗がん作用に核輸送因子が関与し，細胞骨格を介して特定の基質の活性を変化させることを見出した。

安原らは，細胞核輸送を担う輸送受容体 importin  $\alpha$  が細胞接着による増殖停止を抑えるという発見を基軸に，細胞接着，細胞骨格形成に関与する核輸送基質の同定を目指した。importin  $\alpha$  は哺乳類において複数種類のファミリー分子を有するが，importin  $\alpha 2$  はマウスの未分化胚性幹細胞で高く発現するものの，分化が進むと発現量が低下し，生体組織を構成する大半の分化細胞では，他の importin  $\alpha$  ファミリー分子に比べて発現量が低い。一方，多くのがん細胞では高発現していることが多数報告されており，importin  $\alpha 2$  は増殖が活発な未分化細胞において機能することがうかがえる。我々は importin  $\alpha 2$  の発現が特に低く，接触阻害がかかりやすいマウス繊維芽細胞を用い，importin  $\alpha 2$  の過剰発現が接触阻害を乗り越えることを見出した。importin  $\alpha 2$  の過剰発現により，マウス繊維芽細胞は接触阻害を起こさず，単一細胞層が破たんして細胞塊を形成する。importin  $\alpha 2$  の過剰発現により，マウス繊維芽細胞は細胞密度に依存せず，コントロールに対して増殖が盛んになる。その際，細胞周期関連因子の転写量を調べると，G1 から S 期，G2 から M 期への移行に関わる因子群の発現が顕著に活性化することが明らかになった。これらより，importin  $\alpha 2$  が細胞周期関連因子の調節に関与することがうかがえる。次に，importin  $\alpha 2$  の過剰発現により，細胞骨格分子であるアクチンが変化し，マウス繊維芽細胞の形態が変化することを見つけた。このマウス繊維芽細胞は，importin  $\alpha 2$  の過剰発現により通常よりも細胞サイズが小さくなり，繊維状形態がより顕著になる。さらに，増殖中は単一細胞層を形成せず，立体的な細胞塊を形成する。このような状態で，アクチンの発現量が増加すること，ならびに接触阻害時の細胞接着領域に形成される上皮系細胞様のアクチンファイバー形態から，間葉系細胞に特徴的な形態へと変化することが分かった。importin  $\alpha 2$  の過剰発現により形成される細胞塊は，マウス繊維芽細胞にがん遺伝子を発現させた際の形態変化に酷似している。これまでに，importin  $\alpha 2$  を過剰発現したマウス繊維芽細胞をマウス個体に移植すると，顕著な腫瘍を形成することを見つけており，多くのがん組織で importin  $\alpha 2$  が高発現していることと合わせ，importin  $\alpha 2$  がマウス繊維芽細胞をがん化に導いている可能性がある。

加えて，安原らは個々の importin  $\alpha$  ファミリーが細胞質内で特徴的な分布を示すことを掘りこんでいる。importin  $\alpha$  は細胞内では拡散により自由に移動できるが，他のタンパク質との相互作用により一定の構造体に結合することも可能である。importin  $\alpha$  の細胞質での結合タンパク質を調べたところ，解糖系に関わり，ガンの増殖に働く因子を同定できた。現在，importin  $\alpha$  とこの因子の相互作用が細胞骨格に与える影響を調べている。さらに，importin  $\alpha$  は細胞質から核へ入ったのちにクロマチンと広く相互作用することを見出した。これまでに importin  $\alpha$  が熱ショックなどのストレス応答化で核内へ蓄積し，と相互作用することが占め鎖 r ていたがその作用機序は明らかではなかった。今回，我々は importin  $\alpha$  には DNA に直接結合する活性があることを見つけ，その分子機構まで明らかにすることができた。importin  $\alpha$  はこれまでに importin  $\beta$  と相互作用することが分かっていた機能ドメインに，DNA にも結合する活性を有していた。



実施研究所名：文理学部自然科学研究所

氏名：安原徳子

## 研究結果（つづき）

この結合部位は $\alpha$ ヘリックス構造を取り、その内部に塩基性アミノ酸が帯状のクラスターとして並ぶというユニークな配位を取る。この塩基性アミノ酸のクラスターがDNAの塩基配列非依存的に二重らせんのmajor grooveにはまり、広くクロマチンに相互作用できることが分かった。我々はin vitro、in vivoの両側面からこの結合様式を解明し、さらに数理モデルをとりいれ、importin  $\alpha$ が細胞質でとらえた積み荷分子をDNA上にまで運びえるという、全く新しい機能を示しつつある（4月現在論文投稿の手続きに入っている）。

日臺らは、急性反応時の「細胞膜-核情報伝達の制御」について検討した。生体に加えられた創傷や感染などの急性ストレスは、生体に防御的応答を引き起こす。この反応は、急速かつ強力である必要があり、数分以内に十分な変化を引き起こす必要がある。こうした急速な反応は、時間のかかるタンパク合成を必要とせず、既存のタンパクの反応を中心とした細胞内情報伝達系を利用する。日臺らは、血液凝固第IV因子（FIX）のEGF（上皮成長因子）1ドメイン（以後、EGF-F9）が、細胞の急性反応を増強することを発見し、その興味深い機序についての予備的なデータを得、FIXのEGF1ドメインがトロンビンの反応を増幅することを発見した。トロンビンは、血管内皮細胞細胞膜に存在するPARに結合してRho-ROCK系を活性化し、ROCK活性の亢進により、ミオシン軽鎖のリン酸化が進む。結果として、細胞骨格のg-actinの重合によりf-actinが形成され、stress fiberが目立つようになる。この実験系にEGF-F9の組み替えタンパクを添加すると、stress fiberの形成がさらに促進した。また、ミオシン軽鎖リン酸化による細胞骨格の収縮は、遊走する血管内皮細胞の尾部の張力を高めるため、尾部を前方に引き寄せる力となり、結果的には細胞の遊走能を上げることに繋がった。

急性反応時に働く転写因子としてSRF（serum responsive factor）が知られており、トロンビンによる刺激は血管内皮細胞においてSRFを活性化し、急性期反応に必要な蛋白の発現を促す。SRFには転写・翻訳を介して、細胞の遊走と増殖を刺激する作用がある。遊走と増殖は特異的に制御されており、SRFがMKL1と協働的に働くことと遊走を、ELKと働くことと増殖を誘導する。MKL1は通常は細胞質に分布しており、g-actinに結合している。g-actinと結合したMKL1は細胞質に留められているため、核内に移行することができない。EGF-F9の使用によりf-actin量が増加することから、同時にg-actinが減少している可能性があると考えた。実験の結果、EGF-F9の刺激によりg-actinが減少していることが判明した。MKL1に対する抗体を用いて免疫染色を行なったところ、MKL1の細胞質から核への移行が認められた。したがって、EGF-F9の添加はg-actinの重合を促進してf-actinの形成を促すこと、それによりMKL1が核に移動することが判明した。つまり、EGF-F9はg-actinの量を減らすことにより、フリーのMKL1の核内への移動を増やし、細胞遊走を誘導すると考えられた。すでに合成されてg-actinにより細胞質に留め置かれているMKL1を一気に核内へ移動させることで、急速で強力な反応を引き起こすという理にかなった方法により、細胞が急性反応を制御していることが分かった。

本研究では、EGF-F9がトロンビンの反応を増強するもう一つの機序の存在が示唆された。トロンビン受容体のPAR1の活性化には細胞膜のラフトが必要とされる。ラフトはコレステロールを多く含む細胞膜上のドメインで、多くの受容体がそこで機能すると報告されている。日臺らはEGF-F9の添加がトロンビンに対する反応を増強するのは、ラフト内のPAR1が増加するからではないかと考えた。血管内皮細胞にEGF-F9を添加し、CTxBを用いてラフトを観察すると、EGF-F9によりラフトが集積するのが観察された。次に、内皮細胞からラフト分画を抽出し、その中に含まれるPAR1の量を測定したが、PAR1の量は変化していなかった。そこで、ラフト量を反映すると推察される細胞のコレステロール含有量を測定したところ、EGF-F9は細胞のコレステロール含有量を約30%も減少させることがわかった。EGF-F9は細胞の総ラフト量を減らすすが、総ラフト内のPAR1量は変わらないことから、ラフト内のPAR1濃度が高まっていると推察された。また、細胞に含有されるコレステロール量の低下が、ラフトの集積を促すことが報告されている。したがって、EGF-F9によるラフトの集積は、一つのラフト内のPAR1の数を増やすことになると推察され、情報伝達の効率化につながる可能性がある。コレステロールは細胞にとって非常に重要な物質であり、細胞内に含まれるコレステロール含有量が短時間で大きく変化することは知られていなかった。また、それにより膜受容体を介する情報伝達が増強することも新たな知見である。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

課題番号	総18-004
------	---------

注：課題番号を記入してください。

令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

<30年度 採択>

令和2年4月20日

日本大学学長 殿

氏 名 児玉 充



所属・資格 商学部・教授

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 商学部 情報科学研究所

1 研究課題 異なる専門領域を横断した「創造性開発と知識融合」に関する学際的研究		
2 研究期間 ◎ 平成30年度～令和元（平成31）年度 / ◎ 令和元（平成31）年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科枝・資格	役割分担
○研究代表者名 児玉 充	商学部・教授	研究全般の総括、データ収集、分析、論文・書籍執筆
○研究分担者 所 伸之	商学部・教授	経営学の視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
安田 武彦	商学部・教授	経済学の視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
岡 隆	文理学部・教授	心理学の視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
木村 政司	芸術学部・教授	デザイン学の視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
高野 良紀	理工学部・教授	実験手法の視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
水上 祐治	生産工学部・教授	POMの視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
合計 7名		
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ①) (達成度 100%) ※研究期間全体（2年計画の場合は2年間）を100%としてください。		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開 (  ・ 否 ) いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。



実施研究所：商学部情報科学研究所

氏名：児玉 充

## 5 研究目的

本研究は経営学、経済学、心理学、芸術学、理学、工学という異なる研究分野を横断した「創造性開発」に関する研究である。本研究の基礎理論の構築と実証的研究の成果は本学の教育理念である「自主創造」型人材の育成にもつながるものである。企業組織だけでなく広く社会的組織、更には人間個々人が世代を超えて創造性を高め、様々な社会活動に貢献していく重要性は言うまでもない。特に近年においてはビジネスの世界では他社と差別化した新たな製品開発や異分野に向けての新規事業開発の指針として、異なる技術やサービスの「知識融合 (knowledge convergence)」による新たな新製品・新サービス開発の関心が高まっている。この理由は従来にない独創的な発想の新製品・新サービスが、異なる分野の知識と融合することで実現していくケースが多いからである。異なる技術やサービスの融合や異なる産業を横断した製品・サービス開発やビジネスモデル構築という融合に対応したビジネス戦略の必要性が益々高まっている。逆に企業サイドにおいても創造的思考を有した人材育成や採用に対して強化しているのが現状である。本研究は社会に大きく貢献（さらには変革:イノベーション）できる「創造的人材の育成」を視野に入れつつ、異なる研究分野（経営学、経済学、心理学、芸術学、理学、工学）を横断した「知識融合」を生み出す「創造性開発」に関する学際的研究を目指すものである。

これまで経営学や心理学を中心として、「創造性(creativity)」を高める要素として、「内発的動機づけ (intrinsic motivation)」の重要性が指摘されてきた (e.g., Elsbach and Hargadon, 2006)。「内発的動機づけ」は個人の興味、好奇心、学習意欲、さらには認知的柔軟性や持続性を高め、「創造性」を高めると言われてきた (Ryan and Deci, 2000; Shalley, et. al., 2004)。しかし「創造性」の考え方について、「新規性」又は「有用性」を重視するかにより、過去の実証研究では必ずしも「内発的動機づけ」が「創造性」を高めるとは言えないとの結果も報告されてきた (e.g., George, et. al., 2007; Amabile, 1996)。従来の「動機づけ情報処理論」からは「内発的動機づけ」は「新規性」に重点が置かれており、必ずしも「有用性」ではないことが明らかとなっている。一方で、Amabile (1996) は「内発的動機づけ」により生まれたアイデアである「新規性」は、後に次のステージである「有用性」(役に立つ) にシフトするという心理的作用が働くことを言及している。このような視点から「創造性」とは「新規性」かつ「有用性」であることが重要であり、「新たな物やコト」を実現し、広く社会にインパクトを与える視点 (つまり、「イノベーション」) から議論されなければならない。

このような研究の流れから、近年では「内発的動機づけ」が「創造性」を促進する要素として、人の「向社会的動機づけ (Prosocial motivation)」、「視点取得 (perspective taking)」、「視点提供 (perspective giving)」の機能が注目され、幾つかの実証的研究が報告されている (Grant, et. al., 2011)。しかし先行研究からは、「内発的動機づけ」、「向社会的動機づけ」さらには「視点取得」等がどのような「実践的プロセス」で人や組織が創造的活動をしていくかが未だブラックボックスである。本研究はこのようなブラックボックス化している「創造的実践プロセス」を異なる研究分野の学術的知見と実務家としての実践的知見から明らかにしようとするものである。

## 6 研究概要

本研究は2年計画とし、経営学、経済学、心理学、芸術学・理学・工学分野における「創造性開発」に関する質的・量的方法論による事例研究と定量研究を中心とした理論的・実証的研究である。以下に研究計画と方法の流れを示す。

**平成30年度 [文献レビューと新たな理論的命題・仮説の導出・精緻化およびフィールド調査と事例研究]**

平成30年度は文献レビューと新たな命題・仮説の導出に取り組む。新たな理論的コンセプトである「境界視野」による「知識融合」のダイナミックなプロセスを明らかにするために、主に「内発的動機づけ」、「向社会的動機づけ」、「視点取得」、「視点提供」という4つの研究ストリームに関わる先行研究からの分析とこれらの関連性について考察した。これら4つの要素 (ならびにこれらの各要素間での相互作用) が「境界視野」の獲得と促進を加速するという理論的命題・仮説の精緻化を行い、新たなオリジナルな理論化を試みる。さらに「境界視野」と「知識融合プロセス」との関係性について、導出された命題・仮説など理論的フレームワークの精緻化と事例研究ならびに定量研究に取り組んだ。さらに、理論の精緻化を図るため、さらなる文献研究とインタビュー調査やアンケート調査を実施し、質的かつ定量的分析からの実証研究を深めた。

**平成31年度 [研究内容の精緻化と総括および対外発表 (学術書・学術論文などへの準備)]**

平成31年度は前年度での結果を踏まえ、理論と実証の精緻化を図ると同時に、研究全般の分析・考察と新たなインプリケーションを導出する。また同時に主に海外での発表に向けての学術論文および学術書の執筆とそのための補足調査を行うと同時に国際学会などでも発表することで研究成果の普及を図る。前年度で得られた精緻化された命題・仮説の一般性を確認するため、さらなる事例分析を追加し実証分析を行う。ここでは新たに精緻化された命題・仮説を、定量的に実証可能レベルまでにブレークダウンすることが重要となる。ここで注意を払う点は主要な先行研究の命題・仮説に対して新たな理論的貢献が可能なオリジナルかつ独創的な知見を提供することにある。このような分析をベースに質問調査票の設計を行う。さらに人や組織が「境界視野」の発揮によりいかなる「知識融合プロセス」を実行し成功 (あるいは失敗) しているのか、などの相関関係を明らかにすることが当該年度の研究目標となる。このため更なる追加インタビュー調査を実施し理論的かつ実証的研究を深める。そして研究全般の考察と新たな学術的および実践的インプリケーションを導出する。

実施研究所：商学部情報科学研究所

氏名：児玉 充

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

各研究者が平成30年度内にて国内外のフィールド調査によりビジネス分野などにおける本研究テーマに関わる多様なデータを収集した。そしてこれら質的・量的データを基に各種データの分析・考察を行い、理論的フレームワークの精緻化と実証研究を推進した。特にコンバージェンスによるイノベーションプロセスや組織能力に関して新たなデータと知見が得られた。さらにこの作業と並行して、研究代表者による海外での1本の国際ジャーナルペーパーの掲載が決定した。さらに平成31年度では本研究テーマに関わる理論的知見ならびに質的・量的分析からの実証的結果を取りまとめ、1冊の海外での学術書の出版に向けての検討を行った。この結果、社会科学系分野で著名な海外での学術出版社(Edward Elgar Publishing)にて研究者全員の成果を取りまとめた以下の英文モノグラフの出版が決定した。

Developing Boundaries Knowledge for Innovation (Book Proposalの段階で査読あり) (出版契約を締結) Edward Elgar Publishing, UK. (2020年9月出版予定)

## [本書の概要]

本書では人間間や組織間さらには多様な「異なるものやこと」の間に生じる「knowledge difference」という新たなコンセプトに着目し、このようなdifferenceを捉える人間の物事の見方・気づき・発見から生じる「新たな知識」を「境界知(boundaries knowledge)」(あるいは「境界を知ること(boundaries knowing)」)と命名する。このような「boundaries knowledge(knowing)」はこれまで過去、knowledge management や business & management 分野だけでなく、さらには他の学術分野(他の社会科学系や人文科学系)でほとんど議論されてこなかった(取り上げられてこなかった)。このような「boundaries knowledge(knowing) through boundaries vision」は、人や組織が有する創造性やイノベーションに影響を与えることを指摘する。つまり、人や組織が挑戦する新たな knowledge creation に向けたイノベーション活動や直面するあるいは目標とする課題や問題点の解決という最適なソリューションやプロセスを実現する capabilities となることを提示する。

以下に本書の目次(論文タイトルと執筆者)

## Contents

---

List of figures

List of tables

List of boxes

Acknowledgement

Preface and Introduction

Mitsuru Kodama

1. Innovation through Boundaries Vision and Dynamic Capabilities - The Strategic Management Perspective

Mitsuru Kodama

2. Developing Boundaries Knowledge (Knowing) - The Knowledge Creation Perspective

Mitsuru Kodama

3. Knowledge Convergence and Design-Driven Innovation through Boundaries Knowledge - New Knowledge from the Knowledge Convergence and Design-Driven Innovation Perspectives

Mitsuru Kodama and Masashi Kimura

4. Product and Service Innovation through Boundaries Vision and Boundaries Knowledge - New Knowledge from the Corporate Strategy and Innovation Perspective

Mitsuru Kodama and Yoshiki Takano



実施研究所名：商学部情報科学研究所

氏名：児玉 充

## 研究結果 (つづき)

5. Interpersonal Cognitive Traits and Interactional Traits that Support Boundaries Vision, the Basis of Group Creativity  
Takashi Oka and Mana Yamamoto
6. The Process of Creating Knowledge between Different Actors in Co-Creation Ba - A Case Study of the Panasonic Smart City Project  
Nobuyuki Tokoro
7. Regional Revitalization through Cultural Innovation and Creativity Development  
Takehiko Yasuda
8. Product Innovation through Boundaries Vision and Boundaries Knowledge - New Knowledge from the Corporate Transformation and Innovation Perspective  
Mitsuru Kodama and Yuji Mizukami
9. Boundaries Knowledge through Boundaries Vision Creation - Driving Dynamic Capabilities and the SECI Process  
Mitsuru Kodama
10. Implications and Conclusion  
Mitsuru Kodama

## Index

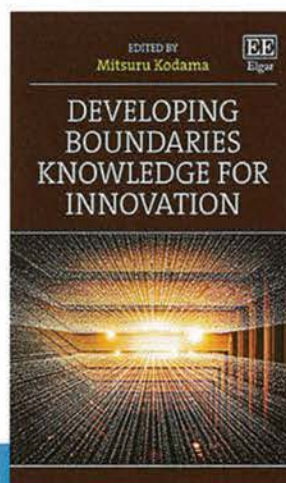
また、本出版のエビデンスとして出版社のWebサイトで以下のように告知されている。


[www.e-elgar.com](http://www.e-elgar.com)

## Developing Boundaries Knowledge for Innovation

Edited by Mitsuru Kodama, Professor of Innovation and Technology Management, College of Commerce and Graduate School of Business Administration, Nihon University, Tokyo, Japan

Illustrating the interdisciplinary implications for research on creativity development, this book focuses on the new concept of 'knowledge differences' that arise between people, organizations and various phenomena. It describes how these key differences create boundaries knowledge, a dynamic process that accelerates innovation.



### How To Order

#### Online

[www.e-elgar.com](http://www.e-elgar.com)

Get up to 20% discount when you order online

#### By Email

UK/ROW: [sales@e-elgar.co.uk](mailto:sales@e-elgar.co.uk)

N/S America: [elgarsales@e-elgar.com](mailto:elgarsales@e-elgar.com)

#### By Phone

UK/ROW: +44 (0) 1242 226934

N/S America: +1 413-584-5551

2020 224 pp: Hardback 978 178990 192 4 ~~£76.50~~ £85.00 ~~¥12,000~~ \$130.00

Elgaronline 978 1 78990 193 1

Edward Elgar Publishing Ltd. is registered in the UK at: The Lypiatts, 15 Lansdown Road, Cheltenham, Glos GL50 2JA. Registered number: 2041703

### Connect With Us

#### Find us on Facebook

[facebook.com/EdwardElgarPublishing](https://facebook.com/EdwardElgarPublishing)

#### Follow us on Twitter

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## &lt;30年度 採択&gt;

令和 2年 4月 14日

日本大学学長 殿

氏 名 浅井 朋彦



所属・資格 理工学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 理工 学部 理工学 研究所

1 研究課題 プラズマ生成および観測技術の応用による乳癌診断法および非侵襲性治療法の開発		
2 研究期間 ◎ <input type="checkbox"/> 平成・令和 30年度～平成・ <input type="checkbox"/> 令和 元 年度 / ◎ 平成・令和 年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 浅井 朋彦	理工学部・教授	総括, プラズマ生成装置開発, 電磁場解析
○研究分担者 長山 好夫	理工学部/特任教授	実験装置開発・CT 実験
増田しのぶ	医学部/教授	模造乳房の調整・CT 撮影条件の検討
越永従道	医学部/教授	培養系における AGP の作用機序の検討
上原秀一郎	医学部/准教授	AGP 照射の条件検討・装置の最適化
藤原恭子	歯学部/准教授	培養系における AGP の作用機序の検討
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ② ) ・ (達成度 90 %)		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開 (  是 ・ 否 ) いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。



実施研究所：理工学研究所

氏名：浅井朋彦

## 5 研究目的

本研究は、プラズマ生成および観測技術を応用することで、特に「乳がん」を対象とした被爆リスクや痛みのない診断法と非侵襲性の治療法を開発することを目的として実施された。

日本人女性の乳がん罹患者数は直線的に増加しており、部位別罹患者数では一位を占める。乳がんは早期発見により完治が期待できることから、定期診断における発見が重要であるが、特に乳腺が発達している若年女性のマンモグラフィによる乳がん検診が難しく、乳腺とがん組織の区別が可能な画像検査法が切望されている。本研究が対象とする「マイクロ波 CT (MWCT) マンモグラフィ」はその最有力候補の一つである。また、乳がんでは原則的に外科治療が行われ、特に若年層においては、補助的に行われる放射線治療、薬物治療などによる不妊リスクなどと合わせ、診察を躊躇う心理的な要因となっている。このため、大気圧プラズマを用いた非侵襲的ながん治療法 (K. Saito, T. Asai, K. Fujiwara et al., *Oncotarget* 7, 19910-27, 1-18 (2016)) の乳がんへの効果を検証する。これらの実現のため、具体的には以下の目標に取り組んだ。

(1) MWCT マンモグラフィの実用化に必須である多チャンネル、広帯域マイクロ波アンテナを開発する。これを FBTS 法を用いて CT 画像再構成し、がん組織の判別に要求される分解能および解析速度を実現する。

(2) 悪性黒色腫などへの効果が確認されている AGP (Atmospheric Gas Plasma) について、乳がんへの効果を確認する。また、その効果を向上するため、照射時にアルゴン(Ar)に加え少量の酸素を混ぜる「酸素ドーブ」を行うことで殺細胞効果を検討する。このため、活性酸素種の生成量の変化と殺細胞効果を評価する。また、細胞の増殖や細胞死の誘導に関係する遺伝子の発現に変化が観察されるか検討する。

## 6 研究概要

特に令和元年度に実施した研究の概要を以下に示す。

## (1) MWCT マンモグラフィの開発

MWCT は、測定対象物に多方向からマイクロ波を照射し、測定データからコンピュータにより電気定数(比誘電率, 導電率)の3次元画像再構成を行うものである。乳房の各組織の比誘電率は、3 GHz のマイクロ波に対し、皮膚で 37~42、脂肪は 4~6、乳腺は 40~45、乳がんは 52~58 であり、MWCT では組織の電気定数値の空間構造から癌組織を判別する。

マイクロ波周波数帯域が 1~6 GHz という広帯域性能を持つ平面ダイポールアンテナの開発を進めた。このアンテナは、1 平面に多数並べ乳房を囲む 5 面に設置することでマイクロ波 CT 測定アンテナアセンブリを構成することができる。FBTS 法によるコンピュータ計算法では計算領域が直方体であることから、今回開発した平面ダイポールアンテナは FBTS 法に最適と考えられる。さらに、ダイポールアンテナとベクトルネットワークアナライザを用いて、プラスチック中空円柱のマイクロ波 CT 実験を行い、実験データについて FBTS 法による演算処理を行うことで、CT 像再構成を行った。この結果、多少の劣化は見られたが、これまでに最も精度の高い画像再構成結果が得られた。

## (2) AGP による癌特異的細胞死の作用機序の解明と乳癌への応用

近年新規のがん治療法として注目されている低温大気圧プラズマ (AGP) は、正常細胞に影響を与えず腫瘍特異的に細胞死を誘導することから、副作用の少ない癌治療として期待が大きい。研究の歴史は浅くその作用機序の解明には至っていない。医学部と理工学部では、平成 25 年よりこの AGP を用いた癌治療法について共同研究を開始し、肺癌、悪性黒色腫などに効果を持つこと、また AGP により照射により生じるミトコンドリアの形態変化が、腫瘍特異的な細胞死のカギを握る可能性を発見した。この作用機序についてさらなる検討を行い、AGP の効果を高める技法についての探索も試みるとともに、乳がんの非侵襲性治療法としての可能性を検証した。

実施研究所：理工学研究所

氏名：浅井朋彦

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

以下に、令和元年度（平成31年度）に得られた結果を示す。

## (1) マイクロ波 (MW) コンピュータトモグラフィ (CT) マンモグラフィの開発

本研究では、長崎大学工学部が開発した MWCT の計算法である Forward-Backward Time-Stepping method (FBTS) 法を用いた、MWCT 装置の実現を目指した研究を行った。MWCT は乳房にマイクロ波を照射し散乱波を他のアンテナで受信する測定を、乳房を取り囲むように置かれた多数のアンテナを用いて行い、測定値と計算値とが一致するように物体の電気定数（誘電率や導電率）分布を求める画像計測法である。FBTS 法は、Finite Difference Time Domain (FDTD) 法を用い、仮定した電気定数分布について入力マイクロ波パルスから受信マイクロ波パルスの時間変化を計算、計算値が測定値と一致するように電気定数分布を推定する。自乗誤差が最小になるように推定を行う方法であるが、一般的には極小値に落ち着き、ローカルミニマムに落ちるリスクがある。FBTS 法では低い周波数で画像再構成を行うことで、粗い画像を作り、それを初期状態としてより高い周波数で CT 画像再構成を行うことで、このローカルミニマムに落ちるリスクを解消した。一般に CT 画像再構成では、微小な測定誤差やノイズから大きな CT 画像エラーが発生するという逆問題特有のリスクがある。FBTS 法では複数の周波数を用いることにより、よりロバストな CT 画像再構成法となっている。したがってこの手法をマンモグラフィに用いるには、乳房を透過する 1～6 GHz という広帯域マイクロ波の使用が必要である。しかし 6 倍もの広帯域でフラットな放射（受信）特性を持つアンテナ開発は極めて困難な課題である。

本研究では、最初に有名な広帯域アンテナ配位であるビバルディアンテナの試作から研究を開始したが、ビバルディアンテナは電極面積が大きく隣接するアンテナ同士は広い電極部分が隣り合うため、大きなクロストークが発生すること、また三次元構造を持つことから FBTS 法の計算領域が乳房領域の数十倍にもなり、計算時間が長くなるという問題があることが判明した。そこで、独自のアイデアによる「平面ダイポールアンテナ」を開発し、その特性を評価した。最初の平面ダイポールアンテナは長さ 49 mm と大きいですが、1～6 GHz でフラットな特性を有することがわかった。さらに本研究経費で購入したベクトルネットワークアナライザ (VNA) を用いて周波数特性を測定したところ、計算通りの優れた周波数特性であることが実験的に確かめられ、NUBIC を通して特許申請を行った（浅井 他 3 名、「アンテナ、アレイアンテナ及びコンピュータ断層診断装置用アンテナ装置」特願 2019-037834）。

シミュレーションにより乳腺に埋もれた小さながん組織を十分判別できる 5 mm の分解能が達成できたことから、アンテナ開発と並行して FBTS 法の実証実験を行った。誘電率が空気とほぼ同じ発泡プラスチック板に 8 個のダイポールアンテナを放射状に配置し、中心部に中空円筒プラスチックという単純な構造体を置き、VNA を用いて 28 通りのアンテナペアについてマイクロ波の入出力周波数特性 (S21) を測定したが、解析と実験の間に十分な一致が得られなかった。

今回開発した平面ダイポールアンテナは 1 平面に多数並べ、乳房を囲む 5 面に設置することでマイクロ波 CT 測定アンテナアセンブリを構成することができる。FBTS 法によるコンピュータ計算法では計算領域が直方体であることから、今回開発した平面ダイポールアンテナは FBTS 法に最適であると考えられる。しかしアンテナ長 49mm では多数並べることができず、また幅を狭くすると感度を 1 GHz まで下げることができない。これを解決するため、乳房と同じサイズのアンテナアセンブリとすることで、正確な初期条件与えることを提案し、アンテナ長 35mm の平面ダイポールアンテナを製作した。これを 62 個配置したマイクロ波 CT 測定アンテナアセンブリを試作した。このアンテナアセンブリを用いてマイクロ波 CT 実験を行った。この実験は、学外協力者である核融合研および関西大との共同で実施した。各アンテナには本研究経費で購入したマイクロ波用同軸ケーブルを接続し、関西大で開発された高周波スイッチでアンテナペアを切り替え、前述の VNA で S21 を測定した。



実施研究所名：理工学研究所

氏名：浅井朋彦

## 研究結果（つづき）

実験結果は得られたものの、現在のワークステーションではこの測定値の FBTS 計算はメモリー容量、計算速度などの制限により、実行不可能であることが判明した。このため、現在、令和2年7月に運転開始予定の核融合研のスーパーコンピュータで、FBTS 法の CT 画像再構成計算を実施するべく準備を進めている。

## (2) AGP を用いた乳がん細胞の細胞死誘導実験

先行研究において、悪性黒色腫などへの細胞死誘導効果が確認されている AGP について、乳がんへの応用を試みた。AGP による腫瘍細胞の細胞死には活性酸素種 (ROS) が関与していることが知られているため、プラズマ生成に用いるアルゴン (Ar) に加え、少量の酸素を混ぜる「酸素ドープ」を行うことで殺細胞効果が上昇するか、以下の実験により検討した。

## (2-1) 酸素ドープ AGP により生じる酸素系ラジカルおよびオゾンの定量

Ar または Ar に 1% の  $O_2$  を混合したガス (Ar+ $O_2$ ) を用い、印加電圧 10 kV、予備電離印加電圧 10 kV、ガス流量 3L/min の条件で AGP 照射を行った。分光測定の結果、Ar+ $O_2$  の条件において Ar のみの場合と比べて酸素系ラジカルの生成量が増加していることが確認できた。さらに、Ar+ $O_2$  の条件では、オゾンの生成量が Ar のみの場合と比べて顕著に上昇していた。AGP の照射時間を変化させて検討したところ、Ar のみおよび Ar+ $O_2$  のいずれの条件においても、AGP の照射時間が長いほどオゾンの生成量は増加したが、Ar のみの場合は、照射時間が 30 sec の条件でもオゾン濃度は  $10^2$  ppm 以下に留まったのに対し、Ar+ $O_2$  の場合は照射時間 30 sec の際に 10ppm 近い濃度を示した。

## (2-2) 酸素ドープ AGP による乳がん細胞への障害性の検討

Ar または Ar+ $O_2$  存在下で印加電圧 10 kV、予備電離印加電圧 10 kV、ガス流量 3L/min の条件で、AGP 照射を行った。照射時間は 0, 50, 100, 200, 300 sec とした。照射を行った培地と非照射培地を 1 対 1 の濃度で混合し、乳がん細胞 MCF7 に添加した。添加後 24 時間後に Countess II FL を用いて生存率を調べたところ、Ar および Ar+ $O_2$  いずれの条件でも、100 sec かそれ以上の時間照射した場合は細胞の生存率が 20% 前後まで抑えられた。一方、照射 50 sec の条件では、Ar のみを用いた AGP 照射培地では生存率が 30% 前後であったが、Ar+ $O_2$  を用いた場合は 100% となり、殺細胞効果は観察されなかった。また、照射時間を 300sec に固定し、通常培地との希釈率を変化させる実験においても、Ar のみを用いた AGP 照射培地は 6.75% かそれより高い濃度の際に殺細胞効果を示したが、Ar+ $O_2$  を用いた場合は 12.5% 以上の濃度で初めて殺細胞効果を示した。

以上の結果は、酸素ドープを行うことで AGP による酸素ラジカルやオゾンの生成は増えるが、先行研究から予想される結果とは逆に、乳がん細胞に対する殺細胞効果は減弱することを示す。現在その詳細なメカニズムの検討を行っている。

## (2-3) AGP 照射培地を用いた培養により発現が変化する遺伝子の解析

Ar または Ar+ $O_2$  存在下で AGP 照射を行い、照射培地と非照射培地を 1:1 で希釈した培地を用いて乳がん細胞 MCF7 を培養した。AGP 培地添加後 24 時間目に細胞を回収し、RNA およびタンパク質を抽出した。iScript を用いて RNA を逆転写し cDNA を作成、これを鋳型として real time PCR により p21 や p53 の発現レベルを調べた。またタンパク質は電気泳動しウエスタンブロッティングを行った後、anti-TFAP2E 抗体等を用いて細胞増殖や細胞死の誘導に関係する分子の発現レベルを調べた。解析した分子の中では Ar と Ar+ $O_2$  の間で発現レベルの異なる分子は見つからなかった。

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## &lt;30年度 採択&gt;

令和 2 年 5 月 19 日

日本大学学長 殿

氏 名 岡山 吉道



所属・資格 医学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 医学部 総合医学研究所

1 研究課題 自己免疫・アレルギー疾患の難治化におけるマスト細胞の役割の解明		
2 研究期間 ◎ 平成 30 年度 ～ 平成 31 年度 / ◎ 平成・令和 年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 岡山吉道	医学部/准教授	マスト細胞実験, 総括
○研究分担者 照井正	医学部/教授 (令和2年3月31日退職)	慢性蕁麻疹臨床研究指導
高橋恭子	生物資源科学部/教授	動物実験指導, マスト細胞実験, microRNA 実験
斎藤修	医学部/准教授 (令和元年10月1日退職)	ヒト滑膜細胞実験
葉山惟大	医学部/助教	慢性蕁麻疹臨床研究
合計5名		
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ② ) ・ (達成度 90 %)		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（○可 ・ 否）いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。



実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：岡山 吉道

## 5 研究目的

免疫・アレルギー疾患の難治化の病態解明、さらには難治例の治療薬の開発には、疾患モデル動物の解析のみならず、重症患者の組織、血液、関節液や鼻汁などを用いた病変部の直接的な解析が必須である。慢性特発性蕁麻疹(CSU) および関節リウマチ(RA)の難治化は、患者の QOL を著しく低下させることから社会的な問題となっており、高額な医療費が掛かる点から医療経済学的にも解決すべき課題となっている。私達は、CSU に関しては、substance P の新規受容体 MrgX2 が重症 CSU 患者のマスト細胞に高発現していることや高親和性 IgE 受容体(FcεRI) α鎖に対する IgG 自己抗体 (抗 FcεRIα抗体) および IgE に対する IgG 自己抗体 (抗 IgE 抗体) がマスト細胞の FcεRI を架橋する能力があることを見出した。平成 30 年度は、CSU 患者群の抗 IgE 抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、健常人と比較して有意に高値であり、CSU の病態に関与していること、および CSU 患者において自己血清皮内反応(ASST)陽性と血清 IgE 値が低値であることがシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーになることを報告した。RA に関して、平成 30 年度は、免疫複合体刺激でマスト細胞から prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>)が多量に産生されることを見出した。平成 31 年度においても本研究課題では、難治例の疾患に特異的なマスト細胞の活性化機序とマスト細胞の役割を解明し、新規の治療薬の開発に資する研究を行うことを目的とした。具体的には、平成 31 年度は、CSU における研究としては、1. FcεRI 刺激に対する好塩基球の正常な反応性を示す患者と低下した反応性を示す患者の臨床的な特徴を比較解析すること。2. リピドミクスを用いて、CSU における脂質メディエーターのプロファイルを明らかにし、病態や重症度に関連する脂質メディエーターを探索することを目的として研究を行った。RA における研究としては、RA において、関節液中の脂質メディエーターの量的、質的な変化をリピドミクスの手法を用いて解析し、プロファイルを明らかにすることを目的とした。

## 6 研究概要

**研究概要 1. 慢性特発性蕁麻疹(CSU)におけるマスト細胞活性化機構の解明**

CSU の患者の約半分の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応が低い。しかし、FcεRI を介した刺激に対して好塩基球の反応性が正常の患者の群と低下している群の臨床的な特徴は明らかになっていない。また、好塩基球の FcεRI を介する刺激に対する反応性の低下を引き起こす要因についても明らかになっていない。そこで平成 31 年度の研究課題では、以下の項目を目的とした。

1. FcεRI 刺激に対する好塩基球の正常な反応性を示す患者と低下した反応性を示す患者の臨床的な特徴を比較すること。
2. リピドミクスを用いて、CSU における脂質メディエーターのプロファイルを明らかにし、病態や重症度に関連する脂質メディエーターを探索することを目的とした。

その結果、1. CSU 患者の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応性が低下している群と反応性が低下していない群に分けられた。反応性が低下していない群では反応性が低下している群と比較し、Urticaria Control Test のスコアが統計学的に有意に高値であり、オマリズマブの治療が効きにくい傾向が見られた。

2. CSU 患者では、血漿中の炎症性脂質メディエーターである 5-HETE および LTE<sub>4</sub> が健常人と比較し有意に高値である一方で、抗炎症性脂質メディエーターである LXA<sub>4</sub>、PD1 および RVD2 が有意に低値であった。炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が CSU の病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETE と LXA<sub>4</sub> においては、CSU の重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

**研究概要 2. 関節リウマチ(RA)におけるマスト細胞活性化機構の解明**

RA は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、結果として慢性的な炎症が複数の滑膜組織に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている。エイコサノイド経路は、RA の病態において重要な役割を果たしている。そこでリピドミクスの手法を用いて重症 RA 患者の関節滑液中の脂質メディエーターの脂質メタボローム解析をし、重症変形性関節症(OA)の患者の関節滑液中の脂質メディエーターと比較解析を行い、重症 RA 患者の病態を解析することを目的とした。重症 OA 患者と比較すると、RA 患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。



実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：岡山 吉道

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

**研究概要 1. 慢性特発性蕁麻疹(CSU)におけるマスト細胞活性化機構の解明****1. CSU 患者の好塩基球における FcεRI を介する反応性の差異とオマリズマブに対する治療効果について**

[要旨] CSU 患者の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応性が低下している群と反応性が低下していない群に分けられた。反応性が低下していない群では反応性が低下している群と比較し、Urticaria Control Test のスコアが統計学的に有意に高値であり、オマリズマブの治療が効きにくい傾向が見られた。

[背景] CSU の患者の約半分の好塩基球は FcεRI を介した刺激に対して反応が低い。<sup>1)</sup>しかし、FcεRI を介した刺激に対して好塩基球の反応性が正常の患者の群と低下している群の臨床的な特徴は明らかになっていない。また好塩基球の FcεRI を介する刺激に対する反応性の低下を引き起こす要因についても明らかになっていない。

[目的] FcεRI 刺激に対する好塩基球の正常な反応性を示す患者と低下した反応性を示す患者の臨床的な特徴を比較解析すること。

**[対象および方法]**

(1) 倫理的考慮: 生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

(2) 対象: 2017年4月から2018年8月の間に、日本大学付属板橋病院でオマリズマブによる治療を受けていた CSU 患者 22 人(女性 15 人、男性 7 人、年齢範囲 24~87 歳)を対象とした。また、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、喘息、アレルギー性疾患、または自己免疫疾患の病歴のない人を 20 人(女性 8 人、男性 12 人、年齢範囲 23~64 歳)を正常コントロール群(NC)とした。

(3) 重症度: 7-days Urticaria Activity Score(UAS7)とは患者の痒みの程度と(0 = none、1 = mild、2 = moderate、3 = severe)膨疹の数(0 = none、1 = 1~20、2 = 21~50、3 = 50 以上)によるスコアを 1 日ごとに合計し(スコア: 0~6)、さらにそのスコアを 1 週間分合計したものである(スコア: 0~42)。<sup>2)</sup> Urticaria Control Test(UCT)は、過去 4 週間の蕁麻疹の状態について、4 つの質問を 0~4 点、計 16 点満点で評価する質問票である。<sup>3)</sup>

(4) 好塩基球活性化試験(BAT): 好塩基球での CD203c の発現を定量化するために、Allergenicity Kit(Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA)を使用した。ヘパリン添加全血を抗 FcεRI 抗体(clone; CRA1, 3 μg/mL)、抗 IgE 抗体(clone; E124-2-8D, 10 μg/mL)、N ホルミル-L-メチオニル-L-ロイシル-L-フェニルアラニン(fMLP)(1 μg/mL)または陰性コントロール(リン酸緩衝生理食塩水)で 15 分間 37°C で刺激した。CD3-PC7、CRTH2-FITC、CD203c-FITC は反応中に添加した。サンプルは、Gallios フローサイトメーターおよび FlowJo(TreeStar, Woodburn, OR, USA)を使用して分析した。活性化した好塩基球は、刺激されていない好塩基球と CD203c の発現を比較して、活性化を評価した。各サンプルで少なくとも 500 個の好塩基球を分析した。

(5) 抗 IgE 自己抗体濃度の測定<sup>4)</sup>: Ab-Rapid SPiN EX を用いて、患者の血清から IgG 分画を精製した。maxisorp plate に 1 μg/mL のヒト IgE、myeloma を 100 mL 添加し、4°C で一晩静置して固相化した。洗浄液(Tween 20 を 0.1% になるように加えた TBS)でプレートを 4 回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため、100 mL のブロッキング液(FBS を PBS に溶解し 10% FBS とした)を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した。PBS で 10 倍に希釈した精製 IgG 分画を 100 μL 加え、室温で 2 時間静置した。洗浄液でプレートを 4 回洗浄し、PBS で 1 万倍に希釈した horseradish peroxidase(HRP)標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 100 μL 加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄液でプレートを 4 回洗浄した後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate system を用い発色させた。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で反応を停止させ、Multiskan Go microplate spectrometer を用いて、450 nm の吸光度を測定した。また定量的に行うた



実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：岡山 吉道

## 研究結果（つづき）

めに、ヒト IgG を倍々希釈し、HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し、基準となる精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を ELISA で測定した。プレート間の補正のため、この基準となる精製 IgG の抗 IgE 抗体で毎回検量線を作成し、検体の精製 IgG に含まれる抗 IgE 抗体濃度を算出した。

(6) 抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度測定<sup>4)</sup>: 過去の報告の方法に従い精製 IgG に含まれる抗 FcεRIα 鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp plates に 1 μg/mL のリコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖を 100 μL 加え、4°C で一晚静置し固相化した。固相化以降は、抗 IgE 自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗 FcεRIα 抗体 (clone CRA2) を用いて作成した。

(7) FcεRIα 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能の測定<sup>4)</sup>: IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法を用い、CSU 患者群と NC 群の抗 FcεRIα 鎖抗体および抗 IgE 抗体による FcεRI の架橋能 (マスト細胞活性化能) を測定し、それぞれを比較した。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性 IgE 受容体 FcεRI と NF-AT-responsive ルシフェラーゼ reporter 遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗 FcεRIα 鎖自己抗体による FcεRI の架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗 IgE 自己抗体の場合、IgE で感作した後、患者の精製 IgG を添加した。

(8) 統計解析: 統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney U test, Wilcoxon matched-pairs signed-rank test, 非連続変数は 2-sided Fisher's exact test を行った。*p* 値は、0.05 未満の場合、統計学的に有意な差があると判断した。

[結果] CSU 患者は BAT の結果で抗 FcεRIα 鎖モノクローナル抗体による刺激後の好塩基球活性化率に従って 2 つのグループに分けられた。好塩基球の CD203c の発現の割合が ≤10% である患者を陽性群 (BAT-positive) (*n* = 9) とし、> 10% である患者を BAT 陰性群 (BAT-negative) と定義した。BAT 陰性群と BAT 陽性群の間で UAS7 に有意差はなかったが、UCT スコアは BAT 陽性患者よりも BAT 陰性患者で有意に高かった (*p* = 0.010)。年齢、性別、疾患期間、自己血清皮内テストの陽性率、末梢血好酸球数、末梢血好酸球数、血清総 IgE 値、抗核抗体の陽性率、抗 IgE 自己抗体の濃度と FcεRI 架橋能力、抗 FcεRIα 鎖自己抗体の濃度と FcεRI 架橋能力に両群において有意差はみられなかった。<sup>5)</sup> これら患者全員にオマリズマブ 4 週間隔で 3 回の皮下注射を行った。UAS7 が 6 以下になった場合を治療に反応した日とした。84 日間の治療終了時に、UAS7 は 16 人の患者で 6 以下 (73%) であった。UAS7 は、BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の両方で、0 日目と比較して 7 日目、35 日目、および 84 日目に大幅に減少した。35 日間のオマリズマブ治療後、すべての BAT 陰性患者で UAS スコアが 15 未満に減少したのに対し、BAT 陽性患者 13 名中 6 名ではスコアが 16 以上であった。オマリズマブによる治療後の末梢血好塩基球数の有意な増加は、BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の両群でみられた。オマリズマブ治療後に、両群好塩基球において FcεRI 刺激に対する CD203c の割合は有意に増加した。<sup>6)</sup>

[考察] BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の間で ASST の陽性率や抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖自己抗体の血清濃度、およびこれらの自己抗体による FcεRI 架橋能力は、両群の間で有意差はなかった。したがって、抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖自己抗体は、FcεRI 刺激に対する好塩基球の弱い反応性を誘発するには十分ではない可能性がある。別の血清学的因子が FcεRI 刺激に対する好塩基球の弱い反応性を誘発する可能性が考えられる。

オマリズマブ治療後の CD203c の割合の有意な増加は両群でみられた。さらに、多くの BAT 陰性患者はオマリズマブによる治療後に BAT 陽性患者となった。オマリズマブ治療後に FcεRIα 鎖の好塩基球表面発現レベルは減少することが報告されている。<sup>7)</sup> これら 2 つを合わせて考えると、オマリズマブは、細胞内シグナル伝達を変化させることにより、FcεRI 刺激に対する好塩基球の反応性を高めることが推測される。

[結論] CSU 患者において BAT 陰性患者と BAT 陽性患者の間でオマリズマブへの反応性が、両群で異なる可

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

研究結果（つづき）

能性があることを示唆された。FcεRI を介した弱い好塩基球の活性化を誘発する因子は抗 IgE 自己抗体や抗 FcεRIα 鎖自己抗体ではなかった。<sup>6)</sup>

【参考文献】

- 1) Vonakis BM, Vasagar K, Gibbons SP Jr, Gober L, Sterba PM, Chang H, Saini SS: Basophil FcεRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 441-448.
- 2) Mathias SD, Crosby RD, Rosén KE, Zazzali JL: The minimal important difference for measures of urticaria disease activity: updated findings. *Allergy Asthma Proc.* 2015; 36: 394-398.
- 3) Weller K, Groffik A, Church MK, Hawro T, Krause K, Metz M, Martus P, Casale TB, Staubach P, Maurer M: Development and validation of the Urticaria Control Test: a patient-reported outcome instrument for assessing urticaria control. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 1365-1372. 1372.e1-1376.
- 4) Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Nakamura R, Akiyama H, Ra C, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcεRI crosslinking, as compared to anti-FcεRIα AAbs. *Allergol Int.* 2019; 68: 342-351.
- 5) Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Patients who have anti-FcεRI nonreactive basophils do not represent patients with severe chronic spontaneous urticaria. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020; 8(2): 824-825.e2.
- 6) Endo T, Toyoshima S, Hayama K, Tagui M, Niwa Y, Ito M, Terui T, Okayama Y: Relationship between changes in the 7-day urticaria activity score after treatment with omalizumab and the responsiveness of basophils to FcεRI stimulation in patients with chronic spontaneous urticaria. *Asia Pac Allergy.* 2020; 10(2). e12.
- 7) Metz M, Staubach P, Bauer A, Brehler R, Gericke J, Kangas M, Ashton-Chess J, Jarvis P, Georgiou P, Canvin J, Hillenbrand R, Erpenbeck VJ, Maurer M: Clinical efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria is associated with a reduction of FcεRI-positive cells in the skin. *Theranostics.* 2017; 7: 1266-1276.

2. リポドミクスを用いた CSU 患者血漿中の脂質メディエーターのプロファイル

[要旨]: CSU 患者では、血漿中の炎症性脂質メディエーターである 5-HETE および LTE<sub>4</sub> が正常コントロール群(NC)と比較し有意に高値である一方で、抗炎症性脂質メディエーターである LXA<sub>4</sub>、PD1 および RVD2 が有意に低値であった。炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が CSU の病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETE と LXA<sub>4</sub> においては、CSU の重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

[背景]: 近年、リポドミクスを用いた解析によって、脂質メディエーターの量的・質的な変化が生体の恒常性やアレルギー疾患の発症に関与していることが明らかになってきている。蕁麻疹とは、そう痒を伴う一過性の紅斑と膨疹が出没を繰り返す皮膚疾患であり、特定の誘因がなく 6 週間以上症状が続くものを CSU という。その重症度は、患者自身が膨疹の数と痒みの程度をスコア化することで決定されており、重症度を示す客観的なバイオマーカーは存在しない。

[目的]: リポドミクスを用いて、CSU における脂質メディエーターのプロファイルを明らかにし、病態や重症度に関連する脂質メディエーターを探索することを目的とした。



実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：岡山 吉道

## 研究結果（つづき）

## [対象および方法]

- (1) 倫理的考慮: 生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-15908-12 および RK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。
- (2) 対象: CSU 患者 67 例、正常コントロール群(NC)27 例の血漿から固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、LC-MS を用いて脂質メディエーターの解析を行った。
- (3) リピドミクス: 血漿は 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)にて 10 倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC]; NexeraX2 system; Shimadzu)を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transition のピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した<sup>1)</sup>。
- (4) 統計解析: 臨床データの 2 群間の統計学的解析は、Mann-Whitney *U* test を用いた。相関の評価には、Spearman の順位相関係数を用いた。*p* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。

[結果]: CSU においては、アラキドン酸(AA)代謝産物の 5-HETE, LTE<sub>4</sub> が NC と比較して有意に高値であった。また、PGF<sub>2α</sub>, LXA<sub>4</sub> は NC と比較して有意に低値であった。エイコサペンタエン酸(EPA)とドコサヘキサエン酸(DHA)の代謝物では 5-HEPE, PD1, RVD2 が NC と比較して有意に高値であった。12-HETE と LXA<sub>4</sub> では CSU の重症度(UAS7 と UCT 両者)と有意な相関関係が認められたが、12-HETE が高値ほど軽症であり、LXA<sub>4</sub> が高値ほど重症であった。5-HETE および 12-HETE と末梢血好塩基球数との間には正の相関が認められた。

[考察]: CSU で高値であった LTE<sub>4</sub> は、CysLT3 受容体を介して気管支収縮作用や血管透過性作用を及ぼす炎症性脂質メディエーターである。また Th2 細胞の活性化を増強し、好中球の機能を亢進させる。<sup>2)</sup> 5-HETE は、IgE 依存性の刺激で好塩基球およびマスト細胞が産生することが報告されている。<sup>3)</sup> リポキシン(LX)は、好中球、好酸球の遊走抑制、樹状細胞における炎症性サイトカインの産生抑制等の抗炎症作用を持つ。<sup>4)</sup> これらのことから、CSU では、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が病態に関与している可能性が示唆された。CSU の重症度と有意な相関があった 12-HETE は、好塩基球数とも有意な正の相関関係があり、好塩基球数の減少(basopenia)は重症であるとの報告<sup>5)</sup> があり、今回の私達の報告とも合致している。今後好塩基球数と 12-HETE の関連について検討していく。

[結論]: CSU 患者の血漿においては、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が CSU の病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETE と LXA<sub>4</sub> においては、CSU の重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

## [参考文献]

- 1) Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. *Asia Pacific Allergy*. 2020; 10(2):e21.
- 2) Taketomi Y, Murakami M: Immunological Regulation by Bioactive Lipids. *Yakugaku Zasshi*. 2017; 137: 503-515.
- 3) Warner JA, Peters SP, Lichtenstein LM, Hubbard W, Yancey KB, Stevenson HC, Miller PJ, MacGlashan Jr DW: 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *J Leukoc Biol*. 1989; 45(6): 558-71.
- 4) Seran C, Maddox J, Petasis N, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady H, Colgan S, Madara J: Design of lipoxin

注：必要に応じて、このページをご使用ください

研究結果（つづき）

A<sub>4</sub> stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*. 1995; 34: 14609-14615.

<sup>5)</sup> Magen E, Mishal J, Zeldin Y, Schlesinger M: Clinical and laboratory features of antihistamine-resistant chronic idiopathic urticaria. *Allergy Asthma Proc*. 2011; 32: 460-466.

3. 重症関節リウマチ(RA)患者の膝関節滑液中の炎症性および抗炎症性脂質メディエーターは、重症変形性関節症(OA)患者に比較して活性化が亢進している

[要旨]: OA 患者と比較すると、RA 患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。これら脂質メディエーターの中で 5-HETE、12-HETE、8,9-EET、LXA<sub>4</sub>、PD1、12-HEPE、4-HDoHE および 17-HdoHE は、RA と OA を区別するバイオマーカーとなることが示唆された。

[背景]: RA は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、結果として慢性の炎症が複数の滑膜組織に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている。エイコサノイド経路は、RA の病態において重要な役割を果たしている。RA 患者の滑液中の PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> および LTB<sub>4</sub> は OA 患者と比較して有意に高いこと、<sup>1)</sup> PGE<sub>2</sub> と LTB<sub>4</sub> は炎症の増悪に関与していること <sup>1)2)</sup> が報告されている。RA の病態においては、cyclooxygenase (COX) と 5-lipoxygenase (5-LO) の経路の過剰な発現認められ、これらの過剰発現は、methotrexate などの DMARDs、抗 TNF- $\alpha$  抗体治療や B 細胞除去療法では、抑制できないことが報告されており、<sup>3)4)</sup> 亜臨床的な炎症や再発に関与していると示唆されている。また、抗炎症性脂質メディエーターの関節炎への関与が示唆されるが、DHA や EPA 代謝物に関しては解析がほとんどされてなく、OA 患者と比較した脂質メディエーターの網羅的比較解析はなされていない。

[目的]: RA において、関節液中の脂質メディエーターの量的、質的な変化をリポドミクスの手法を用いて解析し、プロファイルを明らかにすることを目的とした。

[対象および方法]

(1) 倫理的考慮: 生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-160112)。

(2) 対象: 人工膝関節置換術時に 18 例の RA 患者の関節滑液と 26 例の OA 患者の関節滑液を採取し、滑液をヒアルロニダーゼで処理した。

(3) リポドミクス: 関節液は 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)にて 10 倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC]; NexeraX2 system; Shimadzu)を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transition のピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。

(4) 統計解析: 臨床データの 2 群間の統計学的解析は、Kruskal-wallis test を用いた。相関の評価には、Spearman の順位相関係数を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。

[結果]: アラキドン酸由来の脂質メディエーターでは、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、5-HETE、LTB<sub>4</sub>、12-HETE および 8,9-EET が、OA 患者よりも RA 患者において有意に高値であった。抗炎症性の脂質メディエーターである AA 由来の脂質メディエーターでは、LXA<sub>4</sub> および LXB<sub>4</sub>、DHA 由来の脂質メディエーターでは、PD1、RvD2 および 10-HDoHE 等が、EPA 由来の脂質メディエーターでは、5-、8-、および 12-HEPEs および LTB<sub>5</sub> が OA 患者よりも RA 患者において有意に高値であった。



実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：岡山 吉道

## 研究結果（つづき）

[考察]: ROC 曲線から特異度、感度を検定したところ 17 の脂質メディエーターが OA 患者よりも RA 患者において有意に高値であった。陽性尤度比が 10 以上を示す脂質メディエーターは、5-HETE、12-HETE、8、9-EET、LXA<sub>4</sub>、PD1、12-HEPE、4-HDoHE および 17-HdoHE であった。これらの脂質メディエーターが重症 RA の病態に関与していることが示唆された。OA 患者と比較すると、RA 患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。

[結論]: OA 患者と比較すると、RA 患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。これら脂質メディエーターの中で 5-HETE、12-HETE、8、9-EET、LXA<sub>4</sub>、PD1、12-HEPE、4-HDoHE および 17-HdoHE は、RA と OA を区別するバイオマーカーとなることが示唆された。<sup>5)</sup>

## [参考文献]

- <sup>1)</sup> Korotkova M, Jakobsson PJ: Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10: 229-241.
- <sup>2)</sup> Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, et al: Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med.* 2006; 203: 837-842.
- <sup>3)</sup> Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR, af Klint E, Trollmo C, Ulfgren AK, Klareskog L, Jakobsson PJ: Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3439-347.
- <sup>4)</sup> Gheorghe KR, Thurlings RM, Westman M, Boumans MJ, Malmström V, Trollmo C, Korotkova M, Jakobsson PJ, Tak PP: Prostaglandin E2 synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression. *PLoS One.* 2011; 6: e16378.
- <sup>5)</sup> Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. *Asia Pacific Allergy.* 2020; 10(2):e21.

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## &lt;2018年度 採択&gt;

令和 2年 5月 23日

日本大学学長 殿

氏 名 松田 裕之



所属・資格 医学部・ 助教

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 医学部 総合医学研究所

1 研究課題 新規腎保護因子 HCaRG/COMMD5 を標的とした腎臓病及び腎癌の治療法の開発		
2 研究期間 ◎ 平成 30年度 ~ 令和 元年度 / ◎ 平成・令和 年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 松田 裕之	医学部・助教	研究の総括、動物実験（腎障害）、血液・尿中 HCaRG タンパクの測定
○研究分担者 舩廣 義和	生物資源科学部・准教授	HCaRG タンパクの合成、細胞におけるタンパク活性の評価
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ③) ・ (達成度 80%)		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（ ・ 否）いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。



実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：松田裕之

## 5 研究目的

日本における高血圧症、糖尿病、高脂血症患者を合わせると、延べ 9000 万人以上と言われ、これらの生活習慣病は心血管系臓器障害や腎臓障害を引き起こすことが知られている。特に、進行性腎臓障害は、未だ有効な治療法が確立されていないアンメット・メディカル・ニーズ疾患である。また、生活習慣病の患者は2~4倍も腎癌のリスクが高く、腎癌の危険因子であることが報告されている。

HCaRG/COMMD5 は、2000 年に初めて報告された新規遺伝子で、腎臓の近位尿細管に強く発現しており、細胞の増殖・分化・移動などに関与している。HCaRG 高発現遺伝子改変マウスを用いて作製した腎虚血再還流モデルの実験では、HCaRG は p21 の発現誘導を介して、障害を受け脱分化した尿細管上皮細胞の間葉上皮移行を促し、尿細管の修復を促進し、腎障害後の生存率を 2.5 倍も改善させることが明らかになった。そこで、HCaRG の間葉上皮移行促進作用に着目し、癌細胞と正常細胞で HCaRG の発現を比べたところ、癌細胞で HCaRG の発現が低下していることが分かった。次に、腎癌患者の病理標本を用いて HCaRG の発現を解析したところ、腎癌だけでなく、腫瘍径が大きく予後不良であった患者の正常尿細管でも HCaRG が低下しており、正常尿細管の HCaRG レベルが高いほど5年生存率が良いことが分かった。また、HCaRG を腎癌細胞に高発現させたところ、癌細胞の分化が促され、細胞周期が抑制され、細胞死が誘導された。この HCaRG 高発現癌細胞を野生型マウスの皮下に移植したところ、腫瘍増大や腫瘍血管新生が抑制された。メカニズム的には、正常尿細管上皮細胞から分泌された HCaRG が、腎癌細胞の ErbB 受容体の発現を抑制し、腫瘍細胞の生存・増殖の主要伝達経路である MAPK や PI3K/AKT シグナルの活性化を抑制していることが明らかになった。

これらの知見より、生活習慣病患者の腎臓は、慢性的なストレスに曝されており、常に尿細管の保護と修復のため HCaRG の発現が亢進している。しかし、過度な障害による尿細管上皮細胞の脱落で HCaRG の発現が失われた場合に、尿細管上皮バリアー機構が失われ慢性腎臓病に進展し、障害細胞の癌細胞化が起こるのではないかと推測した。本研究計画は、HCaRG による細胞の間葉上皮移行やオートファジー促進作用の検証に加え、残腎機能を評価するバイオマーカーとして、また腎癌における予後予測因子としての HCaRG の可能性を検討する。さらに、腎尿細管保護と発癌抑制メカニズムを明らかにし、新規の分解耐性膜透過性 HCaRG タンパクを利用した新しい腎臓病や腎癌の治療への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

## 6 研究概要

本研究計画では、HCaRG の持つ腎保護作用と発癌抑制メカニズムを明らかにするための基礎研究を行い、HCaRG が腎癌の予後予測因子や、残腎機能を評価するためのバイオマーカーとして有用であるかを検討し、HCaRG を利用した新たな診断・治療法の開発と臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する目的で、以下の項目を予定した。

1. 血液及び尿中 HCaRG レベルと腎機能、腎癌の進展や予後との関係 これまでの研究で、正常尿細管から分泌された HCaRG が癌の進展を抑制している可能性が示唆されたことから、モデル動物やヒトの血液や尿中 HCaRG を ELISA キットを用いて測定し、腎臓組織内の HCaRG 発現レベルや腎機能、病理組織像との相関を解析し、HCaRG が残腎機能や癌のリスクを評価するためのバイオマーカーとして有用であるのかどうかを明らかにする。
2. 分泌型 HCaRG タンパクが腎癌の進展を抑制する 近位尿細管特異的 HCaRG 高発現マウスを用いて、マウスの腎皮膜下に癌細胞を移植し、近位尿細管上皮細胞から分泌された内因性 HCaRG が、腎癌の進展を抑制するのかどうかを明らかにする。また、HCaRG による Sphere formation の抑制が癌幹細胞の減少を引き起こし、発癌や再発のリスクが低下するのかどうかを明らかにする。
3. HCaRG は腎尿細管上皮バリアー機構を維持し、急性腎障害を抑制する 虚血や薬剤に曝露された尿細管では、ミトコンドリア機能不全が引き起こされ、酸化ストレスが上昇し上皮細胞が障害を受ける。そこで、HCaRG を高発現させた細胞や、ノックダウンした細胞に、抗癌剤であるシスプラチンの投与や、過酸化水素曝露による酸化ストレス負荷を行い、尿細管上皮細胞間の構造変化やオートファジーを介した HCaRG の腎保護効果を検討する。
4. 分解耐性膜透過性 HCaRG タンパク質の合成 細胞内タンパク質安定化タグ(Stabilon)や、細胞膜透過性タグ[11R(アルギニン)]を用いることで、細胞内で安定的に発現可能なタンパク質を合成することができる。HCaRG は我々の研究グループが初めて報告した遺伝子であり、タンパク質は販売されていない。そこで、Stabilon や 11R を結合させた分解耐性膜透過性ヒト HCaRG タンパクの合成を行う。その後、合成 HCaRG タンパクが、尿細管上皮細胞や癌細胞内に取り込まれ、安定的に発現し、内因性 HCaRG と同様に間葉上皮移行やオートファジー誘導作用、癌細胞の増殖抑制作用などを示すのかどうかを検討し、HCaRG タンパク治療の可能性を探索する。

実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：松田裕之

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

## 1. 組織、血液及び尿中 HCaRG レベルと腎障害の進展や腎予後との関係

これまでの先行研究において、腎細胞癌摘出手術を受けた患者の病理検体で HCaRG の発現を比較すると、正常尿細管と比べ、癌では HCaRG の発現が低下していた。また、正常尿細管で HCaRG の発現が高い患者群では、HCaRG の発現が低い患者群よりも腫瘍径が小さく、予後も良好であった (Matsuda *et al.* Oncotarget. 2017)。尿細管上皮細胞の培養液中に、HCaRG タンパクが分泌されていることが確認でき、正常尿細管から分泌された HCaRG が、パラクリンの的に癌の進展を抑制しているのではないかと考えた。本研究では、薬剤性腎障害モデルと糖尿病性腎症モデルのマウスの血液や尿検体を用いて HCaRG を測定し、HCaRG と残腎機能の関係を明らかにしようとして試みた。薬剤性急性腎障害モデルとして、抗がん剤であるシスプラチンを HCaRG 高発現遺伝子改変マウスに腹腔内投与し、腎障害の程度を確認した。シスプラチン投与 5 日後の血清クレアチニンは、HCaRG 高発現マウスで  $0.70 \pm 0.34SD$  mg/dl、野生型マウスで  $2.73 \pm 0.96SD$  mg/dl と有意な低下が見られた。組織学的にも尿細管障害は、野生型マウスに比べ HCaRG 高発現マウスにおいて軽減されていた。腎組織中の HCaRG mRNA 及びタンパク発現は、尿細管上皮細胞の障害とともに低下していた。これらのマウスの血液・尿サンプルを回収し、市販の ELISA キットを用いて、HCaRG タンパクの測定を試みた。腎障害後に 24 時間蓄尿で採取できた尿が  $500 \mu\text{l}$  以下と少なく、尿中 HCaRG タンパク測定のためには希釈する必要があり、検出することが出来なかった。次に、ストレプトゾシンを用いて I 型糖尿病マウスを作製した。ストレプトゾシン投与 6 ヶ月後では、糖尿病性腎症の発症を確認出来なかったため、ストレプトゾシンを投与し、糖尿病発症後 12 ヶ月経過したマウスでの評価を行った。多くのマウスで血糖値の上昇は継続し、多尿を認めたが、乏尿期に進行したマウスはおらず、腎機能の悪化や尿中タンパクの上昇は認めなかった。現在、組織学的検討を、我々のグループと独立した病理専門家に依頼しているが、糖尿病性腎症モデルを用いた慢性腎障害に対する検討は困難であると考えた。そこで、虚血再還流モデル及び、シスプラチン腎症の急性腎障害モデルの 6 ヶ月後の腎予後について評価し、HCaRG の慢性腎臓病への進展抑制効果を明らかにし、残腎機能の評価するためのバイオマーカーとしての可能性を引き続き検討している。また、日本大学医学部附属板橋病院と研究協力施設において、急性腎障害の患者 (10 名)、透析患者 (120 名) 及び、腎癌にて手術を受けた患者 (20 名) の同意を得、血液検体を確保した (臨床研究 RK-170912-4)。これらのヒト検体における血中 HCaRG タンパクの測定を行い、残腎機能の評価するためのバイオマーカー、及び腎細胞癌の予後予測因子としての有用性を今後の研究計画に引き継ぎ、検討を行う。

## 2. 分泌型 HCaRG タンパクによる腎癌抑制効果

先行研究において、HCaRG は遺伝子導入した癌細胞の腫瘍増大や、腫瘍血管新生を抑制することが分かった (Matsuda *et al.* Oncotarget. 2017)。この研究において、正常尿細管上皮細胞から分泌された HCaRG タンパクが、癌細胞の EGFR を含む ErbB 受容体の発現を抑制する可能性が示唆された。メカニズム的には、HCaRG が細胞骨格の構成因子であるアクチンと Rab5 に結合し、EGFR の細胞内輸送及びリサイクリングをコントロールしていることが分かった (Campion, Matsuda *et al.* Cell Report. 2018)。本研究では、分泌型 HCaRG が癌の発生や再発、治療抵抗性に関与しているとされる癌幹細胞の機能を抑制しているのかを検討した。癌細胞株に HCaRG を遺伝子導入し、腎癌の癌幹細胞表面マーカーである CD133 の陽性細胞数の変化を測定したが、同定することが出来なかった。そこで、腎癌幹細胞の評価を、Sphere formation assay と Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) activity assay の組み合わせを用いて行った。HCaRG 導入癌細胞や、分泌型 HCaRG タンパクを多く含む培養液中で培養した癌細胞では、コントロール細胞に比べ Sphere formation が抑制され、HCaRG ノックダウン癌細胞では、コントロール細胞に比べ Sphere formation が促進した。さらに、HCaRG 導入癌細胞では、ALDH activity が低下していることが分かった。以上の結果から、内因性 HCaRG 及び分泌型 HCaRG は、*in vitro* において腎癌幹細胞を減少させることが明らかになった (論文投稿中)。次に、腎細胞癌患者の病理検体を用いて、腎癌の癌幹細胞表面マーカーである CD133 の免疫組織染色を行った。市販の 2 種類の抗体を、条件を変更し行ったが、癌幹細胞を同定するに至らなかった。そこで、正常尿細管における HCaRG 発現と、患者の 5 年及び 10 年後の癌再発率を解析し、HCaRG と癌の再発率から癌幹細胞のとの関係を検討した。男性では女性に比べ、有意に HCaRG が低いと癌が再発する事が分かった。分泌型 HCaRG の癌抑制効果を



実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：松田裕之

*in vivo* 検討するために、HcArG 高発現遺伝子改変マウスの腎皮膜下にマウス癌細胞株である Renca 細胞を移植した。このマウスの腎皮膜下に異なる細胞数の Renca 細胞を移植したが、Renca 細胞は生着しなかった。これは、使用するマウスと Renca 細胞の系統が異なることが原因であると考えられた。そこで、今年度に合成した分解耐性膜透過性 HcArG の生理活性を検討後、Renca 細胞を同系統のマウスの皮下に移植したモデルを用いて、HcArG タンパクの腎癌に対する治療薬としての可能性を、今後の研究計画に引き継ぎ検討を行う。

### 3. HcArG の尿細管上皮バリアーを介した腎保護効果及び、分解耐性膜透過性 HcArG タンパク質の可能性

これまでに、HcArG が障害により脱分化した尿細管上皮細胞の再上皮化を促進し、腎機能障害や生存率を改善させることを報告した (Matsuda *et al.* J Am Soc Nephrol. 2011)。初年度は、尿細管上皮細胞に薬剤暴露を行い、HcArG の細胞保護メカニズムを検討した。HcArG は、シスプラチン暴露下の尿細管上皮細胞において p21 の発現を増強させ、p21 の発現増強後に E-cadherin の発現が上昇した。この遺伝子発現の経過中に、p21 の転写因子である FoxO タンパクのリン酸化が抑制され、FoxO タンパク量が増加していることが分かった。HcArG を抑制すると E-cadherin の発現は抑制され、この HcArG をノックダウンした尿細管上皮細胞のタイト結合を、電気抵抗指数を用いて測定したところ、電気抵抗は低下していた。本年度は、培養尿細管上皮細胞に HcArG を高発現させ、酸化ストレス下におけるミトコンドリア機能について検討した。コントロール細胞では、過酸化水素暴露後のミトコンドリアの障害が強く、ミトファジーが遷延し、アポトーシスが増加していた。HcArG 高発現細胞では、活性酸素の増加が抑制され、ATP 産生能も保たれ、ミトコンドリアの障害は軽度であった。ミトファジーの反応は、過酸化水素暴露後 3 時間以内に収束し、アポトーシスは抑制されていた。以上より、HcArG は E-cadherin の発現を介して細胞間結合を増強し、ストレス抵抗性の尿細管上皮細胞にしていると考えた。また、HcArG は、アクチンや Rab5 と相互作用を持っていることを報告しているが、HcArG の相互因子や受容体の存在など、まだ明らかになっていない点が多い。HcArG の関わる新たな伝達経路を明らかにする目的で、HcArG の相互因子の探索を行った。Flag タグを結合させた 2 種類の HcArG タンパク発現プラスミドを作製し、HEK293 細胞に遺伝子導入した。この遺伝子導入された細胞のタンパク質を用いて免疫沈降と質量分析を行ったところ、HcArG の結合タンパクの候補として、新たに 23 のタンパク質が同定された。その中には HcArG 以外の COMMD ファミリーや、細胞内輸送に関わるタンパク複合体、遺伝子制御に関わる核内分子などが含まれていた。そこで、E-cadherin のエンドサイトーシスに関わるタンパク複合体である VPSs タンパク質に注目し、検討した。HcArG ノックダウン尿細管上皮細胞にシスプラチンを投与したところ、VPS35 と 29 の発現抑制が認められた。VPS35, 29 には、E-cadherin のリサイクリングに関与しているとの報告がある。次に、HcArG 高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの実験では、HcArG 高発現マウスの腎臓において、細胞死やミトコンドリア障害、酸化ストレスが、野生型マウスに比べ軽減していた。E-cadherin や  $\beta$ -catenin の発現は、特に HcArG 高発現マウスの尿細管で保たれていた。近位尿細管由来の HcArG は、近位尿細管だけでなく遠位尿細管や間質の障害も軽減しており、遠位尿細管由来の腎保護因子である Klotho や BMP-7、間質由来の造血因子であるエリスロポエチンが HcArG 高発現マウスにおいて保たれていることが分かった。また、野生型マウスでは、VPS35 と 29 の発現が低下していたが、HcArG 高発現マウスでは、E-cadherin と合わせて保たれていた。以上より、近位尿細管における HcArG は、障害を受けた近位尿細管上皮細胞の修復を促進するだけでなく、尿細管が障害またはストレスを受けた際に、E-cadherin の発現増強を介して、近位尿細管細胞のアドヘレンス結合を強固にし、上皮バリアーを維持することで間質や遠位尿細管の障害を軽減し、急性腎障害の発症や慢性腎臓病の進展を抑制しているのではないかと考えられた。HcArG の E-cadherin 発現制御メカニズムとしては、① p21 の誘導を介して、E-cadherin の発現誘導を行っている可能性と、② VPS タンパク質との相互作用により、E-cadherin のリサイクリングを促進している可能性が考えられた。現在、近位尿細管における HcArG コンディショナルノックアウトマウスの作製を、タモキシフェン誘導性 Cre を発現する NDRG1-CreERT2 マウスと HcArG floxed マウスの交配により行っており、近位尿細管の HcArG を特異的にノックダウンした際の、近位尿細管の上皮バリアーや、遠位尿細管及び間質の組織障害を観察する予定である。今回 2 種類の細胞透過性ヒト HcArG タンパク発現プラスミドを合成しており、このタンパクの生理活性を確認を、E-cadherin 発現制御メカニズムと合わせて、検討を行っている。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

注：課題番号を記入してください。

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## ＜平成30年度 採択＞

令和 2 年 4 月 1 日

日本大学学長 殿

氏 名 岩田 幸一



所属・資格 歯学部・（教授）

退職、転出の場合は、（ ）書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 歯学部 総合歯学研究所

1 研究課題 承認薬を用いた三叉神経障害性疼痛の新規治療法の開発		
2 研究期間 ◎平成 30 年度～令和 1 年度 / ◎令和 年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 岩田 幸一	歯学部・教授 (令和2年3月31日退職)	研究の計画と総括 動物の作成と疼痛関連行動解析
○研究分担者 深谷 親	医学部・准教授	各種薬剤の臨床的解析
大久保 昌和	松戸歯学部・専任講師	各種薬剤の臨床的解析
野間 昇	歯学部・准教授	各種薬剤の臨床的解析、脊髄および三叉神経節 の電気生理学的解析と免疫組織学的解析
○研究協力者		
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ②)・ (達成度 90 %)		
※研究期間全体（2年計画の場合は2年間）を100%としてください。		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（◎・否）いずれかを○で囲んでください。

否の場合は、理由書を添付して下さい。



実施研究所：歯学部 総合歯学研究所

氏名：岩田 幸一

## 5 研究目的

抜歯や歯髄神経処置あるいは様々な口腔顔面領域への外科処置により三叉神経が損傷を受けると、口腔顔面領域に強い慢性疼痛が発症することが知られている。これは、神経が損傷を受けることによって発症する疼痛であることから、神経障害性疼痛と呼ばれている。特に、口腔顔面領域に発症する神経障害性疼痛は、三叉神経系の解剖学的特殊性から激しい痛みを伴うことが多い。口腔顔面領域に発症した神経障害性疼痛は、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) のような鎮痛薬が奏功せず、治療に苦慮することが多い。一方で、最近、神経障害性疼痛に対する鎮痛薬として、カルシウムチャンネルブロッカーであるプレギャバリンあるいはギャバペンチンが開発され、歯科領域においても処方できるようになった。しかし、これらの薬剤は副作用が非常に強く、また、鎮痛効果が安定していないなどの理由により、しばしば処方が困難な場合がある。そのため、神経障害性疼痛の治療にはより副作用が少なく安定した効果が得られる鎮痛薬の開発が急がれる。

本プロジェクトでは、損傷を受けた神経が痛覚を含めた感覚の異常を生じることなく、神経の再生を促進する治療法を開発することを目的とした。そのために、まず、ミノサイクリン、プレギャバリン、ギャバペンチン、トラニラスト、オキシトシン、オレキシシン、QX-314 など、すでに臨床で様々な目的で使用されている薬物をエコファーマとして、神経再生治療における異常疼痛発症の予防目的で使用できるかどうかについて、動物を用いて三叉神経損傷時に単回投与し、効果の有無に関するスクリーニングを行い、予防効果があることが確認された薬物に関して、ヒトへの投与を視野に入れて最適な投与用法、投与時期、投与回数、投与方法を確定した。そして、動物実験で確認された使用方法を臨床に応用し、より効果的に損傷神経の再生を促し、さらに異常疼痛を引き起こさない新規予防的治療法の開発を目指した。その結果、1) ミノサイクリン、2) トラニラストおよび3) オキシトシンが口腔顔面領域の神経障害性疼痛に対して鎮痛効果がある可能性が高いことが明らかになった。そこで、本プロジェクトでは、これらの薬物にターゲットを絞って基礎データの集積を図り、新たな治療法を開発することを計画した。

## 6 研究概要

本プロジェクトではミノサイクリン、トラニラストおよびオキシトシンにターゲットを絞り、それぞれの薬物の使用量、使用するタイミングおよび他の治療薬との併用等について、モデル動物を用いた実験により、基礎データを集積した。モデル動物としては、これまでに我々の研究室で用いてきた上顎神経部分結紮 (PNL) モデル動物および口蓋粘膜切開モデル動物を用いた。PNL モデルラットおよび口蓋粘膜切開モデルラットにおいて、顔面皮膚あるいは口蓋粘膜への機械刺激に対して、数グラムの弱い刺激に対して、逃避行動が誘発された。上記のモデルラットを用いて、以下に示した3プロジェクトに関する研究を行った。1. PNL ラットにおけるミノサイクリン投与の効果：PNL モデルラットにミノサイクリンを投与し、逃避閾値の変化を測定した。ミノサイクリンは PNL 処置を行う前日から投与、直後に投与および PNL 後に投与する群に分け、逃避閾値の変化を測定した。その結果、ミノサイクリンは神経損傷前から投与することによって強い逃避閾値の低下を抑制する効果が認められた。また、投与量に関しても、ヒトで用いることが可能な最小用量である 3mg/kg 投与により疼痛抑制が認められた。さらに、同モデルラットへのミノサイクリン術前投与によって、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) における ERK のリン酸化も有意に抑制された。このことから、Vc に存在する侵害受容ニューロン活動もミノサイクリン投与によって抑制されることが明らかになった。2. 口蓋粘膜切開ラットへのトラニラスト投与の効果：切開部位近傍の口蓋粘膜に機械刺激を与え、逃避反射閾値を測定した。トラニラストは切開部近傍に投与することにより、逃避反射閾値低下の有意な抑制が認められた。このことからトラニラストは、神経損傷後に慢性化する異常疼痛に対しても用いることが可能であると判断された。3. PNL モデルラットに対するオキシトシンの投与効果：PNL ラットの神経切断部位へオキシトシンを局所投与することによって、顔面皮膚刺激によって引き起こされる逃避閾値の低下を有意に抑制することができた。さらに、神経損傷部位へのレーザー照射によっても異常疼痛が抑制されることも確認できた。

実施研究所：歯学部 総合歯学研究所

氏名：岩田 幸一

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

全身麻酔下にてSDラットの右頬粘膜を1cm切開し、上顎神経を露出した。その後、4-0絹糸にて上顎神経の約1/3を強く結紮することにより、上顎神経半結紮(PNL)モデルラットを作製した(Shinoda et al., J Pain 2007)。皮膚の機械痛覚の変化に関しては、実際に臨床において感覚機能の評価に用いられるvon Frey filament(The Semmes-Weinstein monofilament, Stoelting, Wood Dale, IL, USA)を使用し、熱痛覚の変化に関しては輻射熱刺激装置(Intercross, Tokyo, Japan)を使用し、眼神経および上顎神経支配領域への刺激に対する逃避閾値を経時的に計測した。さらに、口腔内の機械および熱痛覚の変化に関しては、熱刺激用プローブ(Intercross, Tokyo, Japan)および機械刺激用ホーセップスを使って舌および頬粘膜への機械および熱刺激に対する逃避反射閾値を経時的に計測した。覚醒下での口腔内痛覚閾値の計測は不可能なため、イソフルランを用いた浅麻酔下にて行った。日本大学歯学部生理学講座では顎顔面領域における機械および熱刺激に対する逃避閾値の計測に関して、浅麻酔下にて頭板状筋のEMGの変化を指標とした計測法を確立しており、多くの研究実績がある(Honda et al., Mol Pain, 2008, Urata et al., J Dent Res, 2016)。この計測法によって、より正確で客観的な逃避閾値の計測が可能となった。まず、上顎神経損傷後、頭頸部に発症する神経障害性疼痛に対する、ミノサイクリン、トラニラストおよびオキシトシンの効果を解析するため、①上顎神経損傷1日前から投与群、②上顎神経損傷同時投与群、③上顎神経損傷1日後から投与群、④上顎神経損傷5日目から投与群、⑤上顎神経損傷のみ群、を作製して単回投与後、経時的に逃避閾値を計測し比較検討した。予防効果があることが確認された薬物に関して、ヒトへの投与を視野に入れて、さまざまな投与用法(スクリーニングの段階で効果が確認された用量の1/100、1/10、10、100倍量)、投与回数(単回、複数回、持続投与)、投与方法(全身、神経損傷部投与)を試み、候補エコファーマの最適化を行った。さらに、免疫組織化学的および分子生物学的手法により、三叉神経節およびVc領域における各種免疫細胞の動態変化を解析するとともに、各療法に対する疼痛関連分子動態、それにともなう侵害受容ニューロンの可塑的变化をパッチクランプ法と細胞外記録法を用い電気生理学的に解析した。

## 1. 三叉神経障害性疼痛に対する行動学的解析

PNL後1、3および7日目のミノサイクリン投与(30mg/kg)による口髭部の機械アロディニアに対して、有意差な逃避閾値の上昇は認められなかった。さらに、PNL前1日目よりミノサイクリン投与による上顎神経損傷後3日目の口髭部機械アロディニアの抑制程度は、30mg/kg、3mg/kgと0.3mg/kgとで有意差は認められなかった。一方、PNL直後から5日目までの上顎神経損傷部への連日オキシトシン投与(5mg/day)により、損傷後5日目から15日目まで口髭部機械アロディニアが有意に抑制された。また、トラニラストに関しては口蓋粘膜切開モデルラットを用いて解析を行った。トラニラスト(20%、25 $\mu$ l)は切開部の近傍に投与した。その結果、オキシトシンおよびトラニラストは神経損傷後に慢性的に引き起こされた痛覚異常に対して強いと痛覚抑制効果があるのに対し、ミノサイクリンはPNLのよって顔面皮膚に生じた機械アロディニアに対して、術前から予防的に投与する必要があることが判明した。

## 2. 三叉神経節および三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)への影響

承認薬投与による三叉神経障害性疼痛緩和効果の責任疼痛関連分子の探索と並行して、三叉神経損傷後の承認薬および責任疼痛関連分子による三叉神経節およびVc侵害受容ニューロンの興奮特性変化を解析を行った。特に本プロジェクトでは、三叉神経節およびVcに存在するニューロンおよびグリア細胞の動態について解析を行った。

確定したVcにおける責任疼痛関連分子の侵害受容ニューロンに対する効果を免疫組織学的に解析し、同モデルにおいて、薬物投与に対するVc侵害受容ニューロンの応答性変化を解析した。



実施研究所名：歯学部 総合歯学研究所

氏名：岩田 幸一

## 研究結果（つづき）

さらに、行動学的解析において確定した三叉神経節における責任疼痛関連分子の一次侵害受容ニューロンに対する効果をパッチクランプ法にて解析し、各種薬物投与における一次侵害受容ニューロンのイオンチャネル特性の可塑的变化を明らかにすることを試みた。以上の研究により、責任疼痛関連分子がどのレベルで侵害受容ニューロンの異常興奮を調節しているかが明らかになった。本研究では Vc ニューロンの活動性マーカーとして、extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を指標に解析を行った。ERK のリン酸化は口腔顔面領域への侵害刺激によって誘導されることが分かっているため、本研究では三叉神経損傷モデルラットの顔面皮膚に対して、侵害的機械刺激を与え、それによって誘導されるリン酸化 ERK (pERK) 陽性細胞の動態について解析を行った。その結果、PNL3 日目、Vc において多くの pERK 陽性細胞が検出された。また、この Vc ニューロンにおける ERK のリン酸化は、口髭部または三叉神経節内への承認薬であるトラニラスト (TRPV2 拮抗薬) 連日投与 (1.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) により有意に抑制された。以上のことから、責任疼痛関連分子である TRPV2 が一次侵害受容ニューロンレベルでの異常興奮を調節していることを明らかにした。この成果に関しては、現在投稿に向けた準備を行っている。

また、ニューロンの興奮性に対して重要な働きがあると考えられているグリア細胞に対する、これらの薬物の影響についても解析を行った。PNL ラットの Vc および上部頸髄の切片を作成し、免疫組織学的解析を行った結果、Vc および上部頸髄においてミクログリアおよびアストログリアの活性化が顕著であることが明らかになった。我々の研究では神経損傷後 1 日目からミクログリアの著しい活性化が誘導され、それに引き続いてアストログリアが活性化され、この活性化は 2 週間程度で活性化がピークに達することが判明した。また、ミクログリアの活性化はミノサイクリンの全身投与によって有意に抑制され、さらに、これに引き続くアストログリアの活性化も抑えられた。活性型ミクログリアおよびアストログリアからは様々なサイトカインが放出され、これによって侵害受容ニューロン活動が亢進することが、これまでの我々の研究で明らかにされている。このメカニズムとしてミノサイクリンによりグリア細胞の活性化が抑制され、それによってグリア細胞からサイトカインの放出が抑えられることによってニューロン活動が抑制され、結果的に異常疼痛が抑えられると考えられた。

また、PNL ラットの三叉神経節では、単離した神経節細胞からのパッチクランプ記録によって、活動性の著しい亢進があることが明らかになった。また、この活動性の亢進には K 電流の低下が関与することが判明した。この K 電流の低下はオキシトシン投与によって有意に抑えられたことから、オキシトシンは神経節細胞の K 電流を増大させることによって神経活動を低下させる可能性が考えられた。また、同モデルの三叉神経節においては多くのサテライト細胞の活性化が誘導されることも判明した。活性型のサテライト細胞からは様々なサイトカインや神経ペプチド、あるいは ATP が放出され、これらの物質によって神経節細胞の活動性が増強すると考えられる。神経節細胞とサテライト細胞は機能的に密な関係を持っており、ミノサイクリンによる神経節細胞の活動性低下はサテライト細胞の活性化を低下させると考えられる。おそらくこのメカニズムによって、より強い鎮痛効果が発揮されるものと考えられる。

さらに、本研究では Vc および上部頸髄、また三叉神経節において、神経損傷後に多くのマクロファージの集積が確認された。マクロファージは損傷神経の食食作用を発揮すると考えられているが、我々のこれまでの研究で、マクロファージからも多くのサイトカインが放出されることが明らかになっている。マクロファージから放出されるサイトカインには神経活動を直接増大させる働きがあるが、我々はマクロファージの集積をコントロールすることによって異常疼痛を抑えることができると考えている。現在その候補薬として臨床でも使用されている Clophosome-A (LCCA)に関する研究を進めており、LCCA 投与によって疼痛異常が緩和されることを見出している。今後はさらに研究を進め、鎮痛薬として LCCA の臨床応用を目指す。

実施研究所名：歯学部 総合歯学研究所

氏名：岩田 幸一

研究結果（つづき）

### 3. 承認薬投与に対するレーザー照射併用効果

さらに、より効果的で強力な鎮痛作用を得ることを目的に、臨床で使用されているレーザーによる鎮痛作用の各種薬物との併用効果に関する検討も試みた。その結果、上顎神経損傷部への連日レーザー照射により、機械アロディニアが有意に抑制されることが明らかになった。一方で、ミノサイクリンとレーザー照射の併用効果の有無を調べた。その結果、アロディニアの抑制は認められるものの両者の併用効果は認められなかった。このことから、上顎神経損傷部へのレーザー照射は、単独で Vc ニューロン興奮性増大を抑制できることが示された。しかし、今回はミノサイクリンとの併用効果にのみに注目しており、他の薬物との併用効果については検討を加えていない。今後は他の薬剤との併用効果の有無等についても検索を試みる予定である。

当初本プロジェクトでは、最終的にヒトへの応用を目指したが、2年間の研究ではヒトへの応用を試みるころまでは到達することができなかった。現在までに、ミノサイクリンに関しては、投与方法および投与量がほぼ決定されたので、今後はさらに本研究プロジェクトを発展させ、ヒトへの応用を目指したいと考えている。特にミノサイクリンは術前投与により強い鎮痛効果を得ることが明らかになったので、抜歯等の外科処置に対する鎮痛予防薬としての臨床応用の可能性について、臨床研究を進めていく予定である。



注：課題番号を記入してください。

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## &lt;30年度 採択&gt;

令和2年 4月 16日

日本大学学長 殿

氏 名 バワール ウジャー所属・資格 松戸歯学部・専任講師

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 松戸歯学部口腔科学研究所

1 研究課題 骨老化過程における転写因子 DEC1-成長因子 FGF23 経路の役割		
2 研究期間 ◎ 平成 30 年度 ~ 令和 元 年度 / ◎ 平成・令和 年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 バワール ウジャー	松戸歯学部・専任講師	研究の計画の総括 動物の作成と病理学的解析 生化学・分子生物学的解析
○研究分担者 槇島 誠	医学部／教授	生化学・分子生物学的解析
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ②概ね順調に進展している) ・ (達成度 100%)		
※研究期間全体（2年計画の場合は2年間）を100%としてください。		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（）・ 否（）いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所名：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名：パワーール ウジャール

## 5 研究目的

転写因子である Differentiated embryonic chondrocyte gene 1 (Dec1) は、全身で発現しており、様々な生理現象に関与し、老化の中心的な役割を担っていると考えられる。線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーであるエンドクリン FGF (FGF19, FGF21, FGF23) は、生体における代謝調節を担い、FGF21 は肝臓、FGF23 は骨の代謝に関与し、また老化抑制遺伝子として機能している。申請者はこれまでに、生後3ヵ月齢、24ヵ月齢の C57BL/6 および *Dec1* ノックアウトマウスの肝臓組織を用いて、*Dec1* が FGF21 を負に制御することを報告している。また、申請者はこれまでに、老齢マウスにおいて、*Dec1* が FGF23 の発現を負に調節することを明らかにし、*Dec1* が細胞機能を調節するメカニズムの重要な因子であることを明らかにした。本研究では、骨代謝の *Dec1*-FGF23 の細胞調節機構に焦点を置き、骨の老齢化過程に関わる新たな分子機序の解明を目的とする。

## 6 研究概要

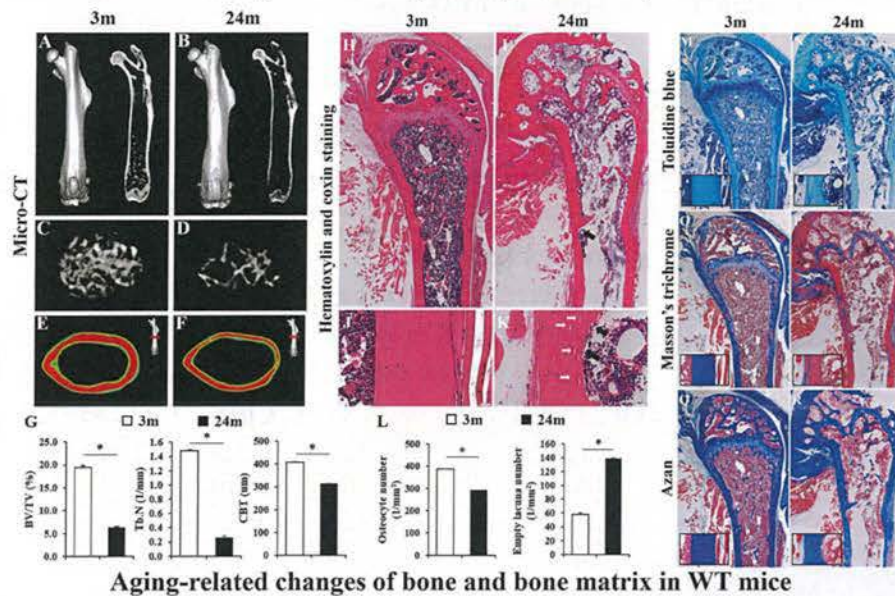
老化は、時間の経過とともに生体の生理機能の低下する現象である。老化の進行により、骨密度の低下、骨折や骨粗鬆症など日常生活に大きな支障を呈する。FGF23 は骨の代謝を制御する遺伝子であり、FGF23 を過剰発現させたマウスでは寿命が延長するため、老化を抑制する因子の可能性がある。これらのことから、老化モデルマウスにおける老化促進や抑制の分子メカニズムの解明することは、今後の高齢化社会における骨折や骨粗鬆症の防止に向けて極めて重要な研究課題である。時計遺伝子でもある *Dec1* は、老化および細胞調節機能に関与していることが報告されているが、*Dec1* ノックアウトマウスにおける FGF23 の調節機構については明らかではない。申請者は現在、マウス大腿骨を用いて *Dec1*-FGF23 の調節機能に関係する遺伝子発現の解析を検討している。本研究により、*in vivo* および *in vitro* 実験での *Dec1* の FGF23 を介した制御機構を明らかにすることで、大腿骨における骨代謝に関する新たな病態解明に繋がる。申請者は、すでに *Dec1* が FGF23 を制御する予備的なデータを得ていることから、先進的で独創的な研究結果が期待される。



7 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

1. 骨の老齢化過程に及ぼす効果 (DNA マイクロアレイおよび microRNA マイクロアレイ解析)

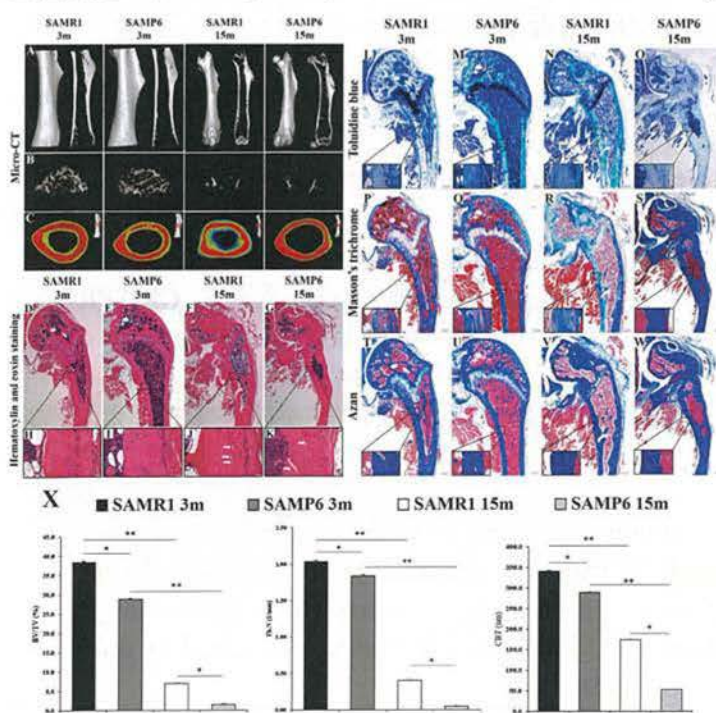
Differentiated embryo chondrocytes 1 (以下: *Dec1*) KO マウス



加齢は、複数の臓器、特に肝臓と骨の機能障害に関連している。加齢に骨折など骨密度の低下は、転写因子 *Dec1* の発現異常に起因する可能性がある。我々は miRNA の発現プロファイルを探索し、大腿骨の加齢の分子メカニズムへの洞察を得ることを目的とした。3ヶ月齢および24ヶ月齢の C57BL/6 (WT) マウスおよび *Dec1* KO マウスを使用し、total RNA をそれら的大腿組織から単離した。マイクロ RNA (miRNA) 発現をマウス

miRNA アレイ分析によって分析し、続いて定量的 RT-PCR で検証した。我々の研究グループではこれまでに、マイクロ RNA の発現量が組織に依存して著しく異なり、非常に組織特異的に機能することが判明していた。本研究では、ゲノムワイド関連解析の結果とマイクロ RNA-標的遺伝子ネットワークを比較 (バイオインフォマティクスリソース: GeneSpring, Ingenuity Pathways Analysis, TargetScan) して、高い発現量を示した6個の miRNA、および5個の miRNA が低い発現量を示したことから、老化の発症を予測するバイオマーカーとしての臨床応用が期待される。

老化促進モデルマウス (senescence accelerated mouse, 以下: SAM)



SAM マウスを用いた研究により、生物の老化機構や老化関連疾患の核心に迫ることができるのではと期待されている。本研究では、3ヶ月齢および加齢モデルの15ヶ月齢の SAM マウスを使用し、トータル RNA を大腿骨組織から分離した。それらの遺伝子発現および miRNA 発現所見は、GeneSpring および Ingenuity Pathways Analysis と組み合わせ、DNA マイクロアレイおよび miRNA アレイを用いて解析した。遺伝子オントロジー (GO) 分析は、miRNA を標的とした遺伝子の極めて重要な転写関連プロセスと細胞内シグナル伝達を組み込んでいることを明らかにした。老化による miRNA の発現低下に関して、その発現制御機構を調べるために、ルシフェラーゼ・アッセイにより miRNA のプロモーター活性を測定した。

Aging-related changes of bone and bone matrix in SAMR1 and SAMP6 mice



研究結果 (つづき)

Flow cytometry 法による骨髄単核球細胞の評価

頸椎脱臼により安楽死させたマウスより大腿骨を単離した。PBS を使い 25G の注射針を用いて骨髄をフラッシュすることにより骨髄細胞を回収した。骨髄細胞は PBS で二回洗浄した後、さらに PBS, 5% FCS, 0.05%NaN3 (Staining Solution)で洗浄し、FITC-抗 CD34 抗体, PE-抗 Sca-1 抗体, Biotin 化抗 Lineage 抗体(B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119)をそれぞれ加え、氷上で 30 分以上反応させた。

遺伝子欠損マウスを用いたビタミン D 受容体, Dec1, FGF23 機能解析

CD3<sup>+</sup> T cell in aged DEC1 KO mice

Tissue	Mouse	% of Lymphocytes		
		% of CD3 <sup>+</sup> Lymphocytes		
		CD3	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
Spleen	C57BL/6 3m	34.08 ± 2.35	56.08 ± 0.38	03.22 ± 0.23
	C57BL/6 24m	11.03 ± 2.2	38.55 ± 7.15	27.18 ± 3.6
	DEC1KO 24m	51.81 ± 6.59	61.41 ± 0.15	15.95 ± 1.73

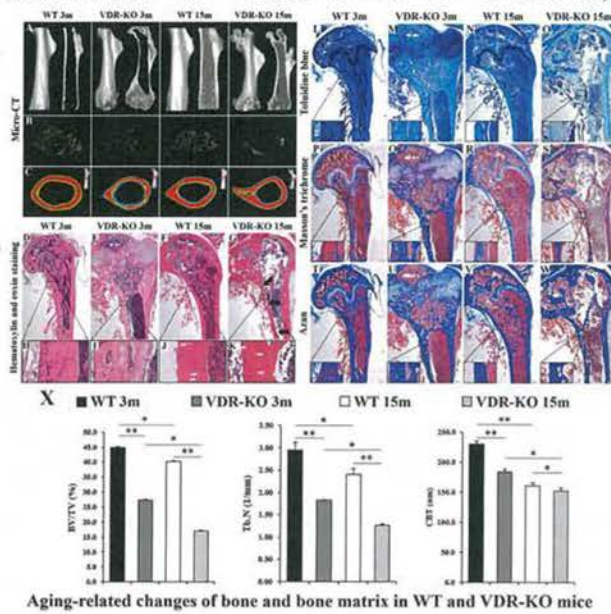
B220<sup>+</sup> B cell in aged DEC1 KO mice

Tissue	Mouse	% of Lymphocytes		
		B220 <sup>+</sup> /IgA <sup>+</sup>		
		B220	B220 <sup>+</sup> /IgD <sup>+</sup>	B220 <sup>+</sup> /IgA <sup>+</sup>
Spleen	C57BL/6 3m	19.34 ± 0.06	86.81 ± 0.7	03.81 ± 1.1
	C57BL/6 24m	04.99 ± 0.19	55.52 ± 6.45	19.34 ± 2.0
	DEC1KO 24m	31.53 ± 0.2	89.92 ± 1.62	10.1 ± 2.44

骨髄をフラッシュすることにより骨髄細胞を回収した。骨髄細胞は PBS で二回洗浄した後、さらに PBS, 5%

FCS, 0.05%NaN3 (Staining Solution)で洗浄し、FITC-抗 CD34 抗体, PE-抗 Sca-1 抗体, Biotin 化抗 Lineage 抗体(B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1, Ter119)をそれぞれ加え、氷上で 30 分以上反応させた。

遺伝子欠損マウスを用いたビタミン D 受容体, Dec1, FGF23 機能解析



活性型ビタミン D はビタミン D 受容体(Vitamin D receptor; VDR)を活性化し、骨において老化抑制因子である FGF23 を標的として発現誘導する。FGF23 関連因子である VDR 欠損マウスにおいても、加齢による影響を検討するため、12 週齢 (若年成熟マウス) の野生型及び VDR 欠損マウス、60 週齢 (高齢成熟マウス) の野生型及び VDR 欠損マウスにおける老化関連臓器 (腎臓、骨など) での VDR の役割について検討中である。

遺伝子発現および miRNA 発現所見は、GeneSpring および Ingenuity Pathways Analysis と組み合わせ、DNA マイクロアレイおよび miRNA アレイを用いて解析した。遺伝子オントロジー (GO) 分析は、miRNA を標的とした遺伝子の極めて重要な転写関連プロセスと細胞内シグナル伝達を組み込んでいることを明らかにした。

2. 老化による Dec1 の発現増加における miRNA の作用機序の解明

miRNA アレイ解析の結果、老化により 5 種の miRNA が発現低下、6 種の miRNA が発現増加した。これらの老化により発現が変化した miRNA について、Targetscan により Dec1 遺伝子を標的としうるか分析した結果、miR-21-5p を見出した。ルシフェラーゼ・アッセイにより、Dec1 遺伝子の 3'UTR 活性を調べた結果、老化により遺伝子の 3'UTR 活性は増加したが、miR-21-5p 結合部位に変異を加えた場合、老化による増加が緩和された。次に、miR-21-5p を過剰発現させた場合の Dec1 の発現変化を測定した。その結果、老化により Dec1 の mRNA 発現量、およびタンパク質産生は増加したが、miR-21-5p の過剰発現により、この発現増加が抑制された。さらに CRISPR-Cas9 システムを用いて、miR-21-5p をノックアウト(KO)したマウスモデルを樹立し、この miR-21-5p KO マウスの大腿骨の Dec1 の発現について調べた結果、老化による Dec1 発現の増加が、さらに増していた。これらの結果から、老化による Dec1 の発現増加には、miR-21-5p が関与することが考えられる。

論文：

1. Potential role of DEC1 in cervical cancer cells involving overexpression and apoptosis. Sato F, Bhawal UK (co-first author), Sugiyama N, Osaki S, Oikawa K, Muragaki Y. *Clocks & Sleep* 2020, 2(1), 26-38.  
 2. Dec1 deficiency suppresses cardiac perivascular fibrosis induced by transverse aortic constriction. Le HT, Sato F, Kohsaka A, Bhawal UK, Nakao T, Muragaki Y, Nakata M. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(19). pii: E4967. doi: 10.3390/ijms20194967.

注：必要に応じて、このページをご使用ください。



## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## ＜令和元年度 採択＞

令和 2 年 5 月 8 日

日本大学学長 殿

氏 名 羽尾 裕之



所属・資格 医学部・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 医学部 総合医学研究所

1 研究課題 術中迅速病理診断における遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究		
2 研究期間 ◎ 平成31年度～令和2年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 羽尾 裕之	医学部 / 教授	研究の統括・論文執筆
○研究分担者（学内）		
橋本 伸哉	文理学部 / 教授	SATIC 法における検出法開発
吉野 篤緒	医学部 / 教授	脳腫瘍症例の検体提供
角 光一郎	医学部 / 助教	脳腫瘍症例の検体提供・解析
相澤 信	医学部 / 教授	血液腫瘍症例の検体提供・解析
吉田 研一	医学部 / 助教	骨軟部腫瘍の解析
浅野 正岳	歯学部 / 教授	口腔腫瘍症例の検体提供
久山 佳代	松戸歯学部 / 教授	口腔腫瘍症例の検体提供
末光 正昌	松戸歯学部 / 助教	口腔腫瘍症例の解析
以下2名（令和2年 3月31日退職）		
本間琢	医学部 / 准教授	脳腫瘍症例の解析
尾曲大輔	歯学部 / 助教	口腔腫瘍症例の解析
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ③) ・ (達成度 40%) ※研究期間全体（2年計画の場合は2年間）を100%としてください。		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（ ・ 否）いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：羽尾 裕之

## 5 研究目的

Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC) 法により、迅速かつ簡便に病理組織切片上で遺伝子変異の同定やマーカー分子の発現を検出する。

- 1) これまで日本大学板橋病院・日本大学病院・日本大学歯学部付属歯科病院・日本大学松戸歯学部付属病院にて手術により採取・保管されている悪性リンパ腫や口腔内悪性腫瘍の病理組織検体を用いて、SATIC 法による既知の遺伝子変異やマーカー分子の発現の検出を試みる。
- 2) 多様な悪性度を示す脳腫瘍(神経膠腫)においては 1p19q 共欠失, isocitrate dehydrogenase 1/2 gene (*IDH1/2*), *TP53*, *ATRX*, *TERT* などの遺伝子変異が知られている。これらの遺伝子変異がすでに同定されている日本大学板橋病院・日本大学病院における過去の脳腫瘍の手術標本を用いて、SATIC 法での遺伝子変異の検出感度を検証する。
- 3) 以上の検証を踏まえて、悪性リンパ腫・口腔内悪性腫瘍・脳腫瘍の術中迅速病理診断において、術中に提出された検体を用いて SATIC 法にて遺伝子変異やマーカー分子の検出を行う。

## 6 研究概要

手術中に行われる術中迅速病理診断(医学部・羽尾 本間, 歯学部・浅野, 松戸歯学部・久山 末光)は、手術によって採取された検体から 10~20 分程度の時間内で凍結組織切片を作製し、形態学的な所見から診断を行うものである。脳腫瘍など手術前に生検が困難な症例においては、迅速病理診断によって悪性度の評価が行われ、術式決定の重要な情報となる(医学部・吉野)。しかし神経膠腫など一部の脳腫瘍は腫瘍の発生源細胞や悪性度の判断が形態学のみでは困難であることが知られている。また悪性リンパ腫などの血液腫瘍や口腔内悪性腫瘍も術中迅速診断での形態学的評価に限界がある(医学部・相澤, 歯学部・浅野, 松戸歯学部・久山, 末光)。さらに迅速診断で作製される凍結組織切片は通常ホルマリン固定パラフィン包埋切片と比較し、標本の品質の低下が不可避である。そのため、時として診断に苦慮する症例も経験される。病理診断の精度の向上には従来の形態学的検索とともに、バイオマーカーの発現や遺伝子変異が重要な情報となる。しかし、これらの分子生物学的解析にはシーケンサーなどの高額で大型の機器が必要で、解析にも一定の時間がかかり、現在の技術では術中迅速診断という限られた時間内で結果を得ることは不可能である。

我々は、本学で研究・開発が進められている Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC) 法(文理学部・栗原、橋本、藤田)を術中迅速病理診断に応用することを考えた。SATIC 法は分析対象物と検出試薬を混ぜ等温下で放置するだけで標的となる分析対象物を蛍光発色によって検出が可能な測定系である。

この SATIC 法による標的分子の検出を病理診断に提出された検体に対して行い、検体中の遺伝子変異やマーカー分子の存在を同定する。SATIC 法の検出には大掛かりな機器や高額な試薬は不要であるため、本技術の開発によって装置化と術中迅速診断における普及が大いに期待できる。



実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：羽尾 裕之

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

1. 本研究の推進にあたり、日本大学医学部「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」審査申請を行った。本申請では対象疾患として以下の疾患と遺伝子を挙げた。審査により許可番号 275-0 として令和元年7月24日に許可された。承認された研究期間は令和元年7月24日から令和3年3月31日までである。

脳腫瘍：diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, diffuse midline glioma, pilocytic astrocytoma

骨軟部腫瘍：giant cell tumor, nodular fasciitis, solitary fibrous tumor, low-grade fibromyxoid sarcoma, myxofibrosarcoma, liposarcoma

口腔内腫瘍：squamous cell carcinoma, leukoplakia,

唾液腺腫瘍：adenoid cystic carcinoma, mucoepidermoid carcinoma, acinar cell carcinoma

*H3F3A, IDH1 R132H, BRAF V600E, H3 K27M, telomeric associations, MYH9-USP6 fusion gene, NAB2-STAT6 fusion gene, FUS-CRE-B3L2 fusion gene, NF1, MDM2, CDK4, FUS-DDIT3 fusion gene, tp53, tp16, CDKN2A, PIK3CA, NOTHC1, FAT1, KRAS, EGFR*

また本申請に当たっては研究協力依頼書により文理学部 化学科 バイオ分析化学 栗原研究室、歯学部 口腔科学系 病理学分野研究室、松戸歯学部 病理学 研究室を共同研究施設として申請し承認された。

2. 研究目的（1）悪性リンパ腫や口腔内悪性腫瘍の病理組織検体を用いて、SATIC 法による既知の遺伝子変異やマーカー分子の発現の検出を試みる。

口腔内悪性腫瘍において約半数で認められる p53 遺伝子変異について、SATIC 法での遺伝子変異の検出が可能かどうか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS, Ca9-22, HSC4 を用いて変異の検出感度について検討している。これらの細胞株での結果を受けて、今後は動物モデルや共同研究施設である歯学部および松戸歯学部保存されている検体を用いて、SATIC 法での病理組織切片上での変異の検出の可能性を検討する。これらの検討結果により術中迅速診断の際に形態学的に反応性変化か腫瘍性変化か判定が困難な症例について、より精度の高い診断が可能となる。

3. 研究目的（2）日本大学板橋病院・日本大学病院における過去の脳腫瘍の手術標本を用いて、SATIC 法での遺伝子変異の検出感度を検証する。

脳腫瘍において生じる遺伝子変異の検出の可能性について検討するため、ヒト由来脳腫瘍細胞株 T98G (p53 変異型), A172 (p53 野生型) を用いて、遺伝子シーケンスによる変異の確認を検討している。これらの細胞株を用いて、脳腫瘍細胞株においても SATIC 法で遺伝子変異の検出が可能かを今後文理学部と共同で研究を推進する。さらに、これらの細胞株での結果を受けて、今後は過去に採取され保存されている脳腫瘍検体 30 症例の腫瘍検体の一部から組織切片を作製し、免疫染色にて検出可能なものの遺伝子変異の有無について検討する。これらの染色結果を検証するため、保存検体から DNA を抽出して遺伝子シーケンスにて変異の確認を行う。これらのヒト検体から、組織切片上での SATIC 法による遺伝子変異の検出感度を検証する。

実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：羽尾 裕之

## 研究結果（つづき）

## 4. 骨軟部腫瘍における遺伝子変異の検出の可能性について

さらに今回、骨軟部腫瘍の遺伝子変異の検出として、骨巨細胞腫で高率に認められる遺伝子変異 H3F3A の SATIC 法による変異検出の可能性を検討する目的で、手術症例の選別とこれらの腫瘍の変異の有無について免疫染色でスクリーニングした。今後、さらに遺伝子シーケンスにて変異の確認を行ってから、SATIC 法での病理組織切片上での変異の検出の可能性について検討する。



## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## ＜令和元（平成31）年度 採択＞

令和 2 年 4 月 16 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 鈴木 豊 史



所属・資格 薬 学部・ 教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 薬 学部 薬 学 研究所

1 研究課題 鼻から脳への薬物移行経路を介した経鼻投与製剤の基盤技術の開発と中枢疾患治療戦略		
2 研究期間 ◎ 令和元（平成31）年度～令和2年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 鈴木 豊史	薬学部・教授	研究総括・鼻から脳薬物移行機構解明
○研究分担者		
柏田 歩	生産工学部・教授	経鼻送達ナノキャリアーの創製
石毛 久美子	薬学部・教授	中枢疾患に対する経鼻的治療効果の解析
小林 俊亮	薬学部・教授	樹状突起タウとアルツハイマー病発症との関連の解析
橋崎 要	薬学部・准教授	ナノファイバーゲルの経鼻用基剤への最適化
田中 融	薬学部・助教	高リン酸化タウ出現機構の解析
鈴木 直人	薬学部・助教	経鼻用基剤の物性評価と製剤設計
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ②) ・ (達成度 45 %)		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（ ・ 否）いずれかを○で囲んでください。  
否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所： 薬学部薬学研究所

氏名： 鈴木 豊 史

## 5 研究目的

本研究は、血液脳関門 (BBB) を迂回する効率的な Nose-to-Brain (N2B) 薬物標的化のための基盤技術の確立を目指すものである。すなわち、(1) 経鼻投与による N2B 経路を定量的に明らかにすること、(2) 小動物での経鼻投与による治療効果の実証、および (3) ヒト鼻腔の付着滞留性を付与した機能性 N2B ドラッグデリバリー製剤の基盤技術を開発することである。

現在の超高齢化社会における薬物医療の問題点として、高齢者における中枢神経疾患 (アルツハイマー型認知症、パーキンソン病等) の発生率は、指数関数的に上昇していくが挙げられる。世界の国々が未経験な段階に突入していると言っても過言ではない。そのため、中枢神経疾患をターゲットにした創薬開発は、現在の製薬企業にとって、今後の成長が見込まれる疾患領域であることから、重点的かつ魅力的な疾患領域である。しかしながら、脳と血液との間には異物の侵入を制限するための BBB が存在している。そのため、中枢での作用が期待される候補化合物の 98% 以上は、BBB の存在が、低い脳移行性の要因となっており、市場への開発への道が閉ざされている。事実、中枢神経領域の創薬開発においては有望なシーズであっても、最終的に医薬品として承認されて、医療現場に提供される成功確率は心血管疾患系や抗腫瘍薬に比べて、極めて低い。さらに、その開発には 20 年もの長期間を要する場合もあることから、膨大な開発費も必要となる。したがって、この BBB の存在、すなわち低い脳移行性を克服するための脳への効率的な薬物送達技術が待望されている。

これまで、生体に適用する薬物の投与経路のうち、経鼻投与は経皮および経肺などの経路と比較して、それほど注目されてはなかった。経鼻投与は、自己による投与の容易さ、注射針による侵襲性が少なく、静脈内注射と同等程度の作用発現、透過性に優れた鼻粘膜吸収表面、小腸粘膜を通過しないことから酵素による代謝の影響がなく、肝臓での初回通過代謝を回避できることから、高齢者にとっては、全身性副作用の低減も含め数多くの利点を有している。したがって、本研究は、鼻から脳への経路に着目し、超高齢化時代において高齢者にとって望ましい薬物の投与形態である有用性と経鼻投与製剤技術の優位性を明らかにすることを目的としている。

## 6 研究概要

研究計画書に記載したとおり、研究組織は 7 名の研究者から構成されることから、下記にある 3 つの研究ユニットを形成し、研究代表者と各研究ユニット間で連携をとりながら、実験試料の授受と研究技術的な相互のサポート支援を行った。

**1 : 鼻から脳への移行経路の有用性と分子標的の探索**

実験動物における、経鼻投与後の脳への薬物移行量を定量化し、静脈内投与した場合と比較することから、脳移行経路における経鼻投与の有用性ならびに、経鼻投与後の脳脊髄液への移行量を明らかにした。認知症の 60% 以上を占めるアルツハイマー病 (AD) において、シナプスの脱落を誘発する高リン酸化タウタンパク質の樹状突起発現に注目し、核酸を用いたタウ mRNA の人為的な輸送・翻訳とタウのリン酸化・凝集の制御による AD 予防/治療の可能性を念頭におき、シナプス近傍へのタウ mRNA 輸送機構、過剰な刺激による翻訳、リン酸化の活性化機構に関与する因子を同定した。

**2 : 鼻から脳への薬物送達ナノキャリアーの創製と有効性の実証**

鼻から脳への薬物送達ナノキャリアー (ナノ運搬体) としてリポソームを調製し、リポソームと膜透過ペプチドを組み合わせ、脳疾患領域に標的化を可能にする系の構築をした。鼻から脳に送達される薬物の有効性を実証するために、光増感反応を利用した血栓性閉塞を利用した脳梗塞モデルを作成し、脳梗塞誘発に伴う細胞内の変化について検討した。さらに、鼻から投与可能な脳梗塞治療薬のターゲット分子の探索をした。

**3 : 経鼻投与製剤に適した基剤の最適化と製剤設計**

ナノファイバゲルを経鼻的新規基剤に最適化する目的のために、ゲル基剤のレオロジー特性 (動的粘弾性) を明らかにした。経鼻投与における鼻粘膜付着特性などの物理化学的特性を最適化した製剤を設計するために、3 次元ヒト鼻腔透明モデルを用いて、チキソトロピー性あるいは鼻腔環境下でゲル化する温度感受性ゲル化剤と粘膜付着性を示す機能性ポリマーを混合した試料溶液について、経鼻噴霧デバイスからの物理化学的特性 (粘膜付着滞留性と噴射角度・噴霧液滴径) を明らかにした。



実施研究所： 薬学部薬学研究所

氏名： 鈴木 豊 史

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

**1：鼻から脳への移行経路の有用性と分子標的の探索**

経鼻投与による水溶性高分子デキストラン（分子量 10,000）の脳内送達に及ぼす脳虚血再灌流（IR）障害の影響を明らかにすることを目的に、虚血障害後の経過時間による脳内移行性について検討した。IR 障害マウスは、ナイロン栓糸による一過性中大脳動脈閉塞法を用いて作製した。その結果、経鼻投与によるデキストランの脳内分布量は 0.5 時間の虚血直後群に比べ、IR 障害群では低下した。経鼻投与による水溶性高分子の脳内送達は脳虚血障害の進行に応じて変化する可能性が示唆された。メラトニン（MT）は、アルツハイマー病（AD）モデルマウスにおける酸化ストレスや炎症時の神経障害に対する保護効果があることから、MT の BBB 透過性ならびに経鼻投与による脳内移行性を検討した。その結果、MT の BBB 透過性は低かった。これに対して、経鼻投与後の MT は脳内に移行し、経鼻投与後の脳組織/血漿中濃度比は静脈投与に比べて高かった。MT の経鼻投与は AD に対する効率的な脳への送達経路であることがわかった。さらに、代表的なナノキャリアであるリポソームについてマウスに経鼻投与後の脳・脊髄内分布について定量的に検討した。ポリエチレングルコール（PEG）脂質を含む中性脂質/[<sup>3</sup>H]-Cholesterol を基本組成とし、正電荷脂質や負電荷脂質を加えることで、表面電荷の異なる PEG リポソームを調製し検討した結果、嗅球への分布は正電荷リポソームが最も高く、脳・延髄および脊髄においては中性電荷リポソームが最も高い分布を示した。経鼻投与では PEG 修飾した中性電荷リポソームを選択することで、脳・脊髄に送達できる可能性が考えられた。

AD 治療の分子標的を設定するために、AD におけるシナプス毒性の本体と考えられる高リン酸化タウオリゴマーの樹状突起内出現のメカニズムを解析し、ヒト神経芽腫細胞（SH-SY5Y）を用いて、AD の進行と関わりが深い神経過活動によって過剰なタウ翻訳が起こることを生化学的に証明した（*Frontiers in Aging Neuroscience* 11, 322, 2019）。さらに、マウス海馬ニューロンのグルタミン酸刺激によって樹状突起内で増加したタウが過剰にリン酸化されるメカニズムについて解析を行った。その結果、高リン酸化タウの生成に重要なリン酸化酵素 GSK3 $\beta$  の mRNA もまた、樹状突起に輸送されており、刺激に応じて翻訳されることを見出した。しかし、GSK3 $\beta$  の翻訳活性化はタウに比べてわずかであり、増加したタウの過剰リン酸化を説明できない。そこで、GSK3 $\beta$  が Ser9 のリン酸化により活性阻害を受けることに注目し、既存の不活性型 GSK3 $\beta$  の樹状突起における存在と刺激に応じたリン酸化状態を調べたところ、神経過活動によって Ser9 の脱リン酸化が誘発されて活性型 GSK3 $\beta$  が倍増することがわかった（第 42 回日本分子生物学会年会 2019）。そのメカニズムには、シナプス可塑性を調節する複数のタンパク質因子の活性変化が関与していることが明らかになってきたので、現在、詳細な解析を行っている。

**2：鼻から脳への薬物送達ナノキャリアーの創製と有効性の実証**

経鼻投与において有効と考えられるリポソーム担体に膜透過性ペプチドである Tat ペプチドのような脂質膜と親和性が強いペプチドをモチーフとした人工ペプチドを設計合成し、疾患領域での高効率な薬物徐放を実現可能にする系を構築し、生理条件下における薬物担持リポソームへの相互作用挙動を評価した。その結果、リポソームの粒径には大きな影響は認められなかったが、リポソーム内水相に担持したモデル薬物（カルセイン）の経時的な漏出が観測された。さらに、ペプチドの二次構造の評価などから、ペプチド鎖のリポソーム膜への侵入を示唆された。以上の結果から、設計合成した人工ペプチドを用いた、リポソーム非破壊的な内封物放出系の構築が実現できたといえる。さらに、ペプチドのリポソーム膜との相互作用と侵入過程への pH 応答性の付与を目的とした人工膜透過ペプチドの改変を行った。その結果、設計したペプチドの一部は細胞内エンドソーム環境に匹敵する弱酸性 pH における顕著な膜透過活性とリポソーム内封物放出活性を示した。このような知見をもとに、薬物送達と薬物放出過程において、より実用的な系を提供するために弱酸性応答性膜透過ペプチド誘導体を中性条件下で薬物送達リポソーム上に提示させ、系の pH 低下に伴う自発的な薬物放出を可能にする担体を調製した。得られた担体は血中あるいはサイトゾルに相当する pH7.0 付近では内封薬物放出活性を示さなかったが、系の pH を 5.0 まで低下させると放出活性が認められた（*Liposome Research Days* 2019）。本系における新規な自発的な薬物放出担体は、その応答性における鋭敏さなどの課題は多く残されているものの、脳への薬物送達における新たなアプローチとなりうるものと考えられる。

実施研究所名： 薬学部薬学研究所

氏名： 鈴木 豊 史

## 研究結果 (つづき)

**2：鼻から脳への薬物送達ナノキャリアーの創製と有効性の実証 (つづき)**

脳梗塞モデルとして、ローズベンガル (RB) の光増感反応を利用した血栓性閉塞モデルである Photochemically Initiated Thrombosis (PIT) モデルを用い、脳梗塞誘発に伴う細胞内の変化について検討した。PIT モデルは、イソフルラン麻酔下のマウスの左側頭部の皮膚を切開し、硬膜下に中大脳動脈 (MCA) 確認後、RB (80mg/kg, i.v.) を投与し、投与直後からレーザー光を MCA に 10 分間照射して作成した。照射後、切開部を縫合した。照射を行わないマウスを Sham とした。モデルマウスでは梗塞巣 (細胞死領域) が、左側前部に観察され一部後部に達したが、右側には認められなかった。また、梗塞体積は、光照射 1 時間後より 24 時間後に大きくなったがそれ以降は変化しなかった。モデルマウスにおいては、自発運動量の低下等の行動障害が認められた。行動障害は、調べた時間の中では、光照射 1 時間後に最も強く、その後、徐々に回復したが、72 時間後においても正常レベルには回復しなかった。Sham では、梗塞巣は全く認められず、行動障害も観察されなかった。そこで、脳梗塞治療薬のターゲット分子の探索を目的として、モデルマウスにおいて Western blot を行い、タンパク質レベルでの変化を検討した。この検討は、モデルマウスから摘出した脳を 4 分割 (左前部、左後部、右前部、右後部) した。まず、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 発現量について検討した。脳梗塞誘発には、酸化ストレスが深く関与することが報告されており、それに対する生体内防御機構の 1 つとして Nrf2 経路が知られている。梗塞誘発 1 時間後において、左前部の Nrf2 発現量は、他の部位に比較し、上昇傾向を示したが、有意差は認められなかった。これは、本モデルにおいては、細胞死保護に働く Nrf2 経路の活性化が十分でないことと考えられることから、Nrf2 経路活性化因子が細胞死保護に働く可能性があると考えられた。また、モデルマウス脳左側において、マウス IgG 抗体で検出される 71~75 kDa のタンパク質の顕著な上昇が認められた。このタンパク質発現は、右側に比較し、左側で非常に高く、後部よりも前部で特に高かったこと、及び Sham では 4 部位間でその発現に全く差が認められず、モデルマウス右側と同レベルと低かったことから、梗塞誘発に深く関与すると考えられた。これまでの検討結果からは、IgG そのものと考えられ、本タンパク質は治療薬の新規ターゲットとなる可能性があり興味深い知見である。

**3：経鼻投与製剤に適した基剤の最適化と製剤設計**

経鼻投与製剤の開発では粘性を付与することで鼻腔上部に製剤を滞留性させることが極めて重要である。そこで、3 次元ヒト鼻腔透明モデル (3D モデル) に経鼻投与製剤を投与デバイスにより噴霧した後、製剤の鼻腔面積に対する付着率を経時的に測定することで得られる時間-付着率曲線下面積 (AUCadh) を鼻腔内滞留性の指標として検討した。その結果、粘膜付着剤の添加により、AUCadh の顕著な増加が認められたことから、鼻腔内滞留性を評価可能なことを明らかにした。また、鼻腔表面においてゲル化挙動の異なる粘膜付着剤による AUCadh が大きく異なったことから、本評価法では物性の異なる粘膜付着剤の評価が可能であることを見出した。界面活性剤が溶媒中で形成する紐状のミセルは、ゲル状態であっても汎用されている経鼻投与デバイスで噴霧が可能となる。これは、高剪断を印加した際に紐状ミセルの切断が起こり、粘度が急激に低下するためと考えられている。そこで、モデル製剤として各種紐状ミセルを用い、製剤のレオロジーパラメータと 3D モデルにおける噴霧時の広がり具合との関連性を検討した。その結果、製剤の付着面積は“プラトー弾性率”との間に強い負の相関があることを突き止めた。また、新たな創薬モダリティとして開発が進む水溶性中分子を紐状ミセルに搭載するため、ミセル内部に水溶性中分子を含む水相、分散相に油である流動パラフィンを用いて、逆紐状ミセルを設計した。汎用される経鼻投与デバイスで噴霧可能な逆紐状ミセルとなる比率をスクリーニングしたところ、水相比率を最適化することで水と同等の噴霧特性を有する逆紐状ミセルの組成を見出した。さらに、新規基剤としてリポソームと水溶性高分ゲルの特性を併せ持ったリポソーム架橋ゲルを開発した。リポソーム架橋ゲルは、疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースをリポソーム懸濁液に作用させて調製した。得られたリポソーム架橋ゲルは、リポソームとゲルの特性を併せ持つ興味深い材料であることから、新たな製剤基剤としての利用が期待される。



注：課題番号を記入してください。

## 令和元（平成31）年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

## ＜平成31年度 採択＞

令和 2 年 5 月 30 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 古賀 徹



所属・資格 通信教育 部 ・ 教授

退職、転出の場合は、( ) 書きで受領時の資格を記入

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 通信教育 部 通信教育研究所

1 研究課題 戦後教育改革期における政官民アクターの三者関係に関する研究		
2 研究期間 ◎ 平成31・令和元年度～令和2年度 / ◎ 平成・令和 年度		
3 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者 古賀 徹	通信教育部／教授	全体のとりまとめ、史料デジタル化、速記史料復元担当
○研究分担者		
末富 芳	文理学部／教授	史料の閲覧と複写、史料整理の作業管理、研究会担当
古川 隆久	文理学部／教授	教育—社会関係の理論的整理
中澤 瞳	通信教育部／准教授	人物研究・政治思想面の考察
富士原 雅弘	国際関係学部／准教授	史料の閲覧・複写、史料整理
香川 七海	法学部／助教	史料の閲覧・複写、史料整理
合計 6名		
4 現在までの達成度 当初の研究目的に達する達成度について、以下の区分より自己評価を行ってください。 ＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。		
(区分 ②) ・ (達成度 40%)		
※研究期間全体（2年計画の場合は2年間）を100%としてください。		

※「7 研究結果」について、ホームページ等での公開（◎・否）いずれかを○で囲んでください。

否の場合は、理由書を添付して下さい。

実施研究所： 通信教育研究所

氏名： 古賀 徹

## 5 研究目的

本研究では、1945年から50年代にかけての戦後教育改革期における政官民（政党・文部省・諸教員団体）の三者（間）関係に注目して分析を進めることで、戦後日本の教育発展の歴史を捉え直すことを試みる。具体的には、(A) 政治家・政党関係史料、(B) 官僚・文部省関係史料、及び(C) 教職員組織関係史料の3種類の史料を突き合わせていくことで、教育改革をめぐる諸事件に関する政治過程を描き出していく。

戦後教育改革期に関する先行研究としては既に通史的刊行物や個別のテーマ毎の著作・論文等が数多く編まれている。しかし通史著作の多くは「教育政策史」中心であり、本研究で注目する政官民の関係については考察の対象とされてなかった。

もちろん「政」の教育政策に関する叙述であるから「官」（文部省）の文教行政や教育委員会など地方行政まで含め取り上げられることになるので、「政—官」の二者間についてはすでに研究はある。しかしその過程における教育現場からの陳情や協議、交渉、あるいは反発や衝突などについては、二次史料（新聞記事等）を用いて断片的に扱った論考が散見されるのみであった（大田編 1976、貝塚・藤田 2015 など）。つまり、1945～50年代における、戦後の教育改革とその見直しの過程において、現場の教員側の声が「どのように／どこまで反映したのか」については、これまで十分に考察されてきていないのである。

政官民アクターの3つの関係性に注目した研究を進めることは、従来にない研究視点・方法論上の提起ともなり、その結果として戦後教育の発展の歴史を新たな像で書き直すことにもなるという大きな意義がある。

## 6 研究概要

本研究では、1945年から50年代にかけての戦後教育改革期における政官民（政党・文部省・諸教員団体）の三者（間）関係に注目して分析を進める。従来の戦後教育史研究において、この政官民アクター三者関係を含めた「よりリアルな歴史像」を描くに至らなかった理由は三つある。(1)「現在」との連続性の問題があり「過去の出来事」として客観的に整理されるに至っていなかったという難しさと、(2)史料の公開・活用が未だ十分に進んでいないという史料制約、(3)教育学研究者の教育学的な関心のせいで、当時の政治（政治的事件や政治構造）や社会（社会意識やイデオロギー）との関連があまり考慮されてこなかったこと、である。

本研究では、(2)史料制約の問題を（質・量ともに）解決することを通して説得力ある分析を進めていく。

(A) 政治家・政党関係史料については憲政資料室所蔵資料の中から文教行政関連資料を抽出・整理を行い、

(B) 官僚・文部省関係史料については国立教育政策研究所教育図書館所蔵資料を中心に考察を進めていく。

(C) 教職員組織関係史料は、本研究では特に重要であり、日本教育会館教育図書館所蔵史料を主なものとするが、そのうち多くは現時点で未整理のものである。戦後期に政府・行政機関と対峙した「組織資料・文書」類の発掘・整理という基礎作業から研究を推進していくことになる。また日本教職員組合のみならず、日本教育会、日本教育者連盟、信濃教育会など、多様な教職員団体の動きを把握すべく、全国各地の関連史料収集にもつとめている。

なお、本研究では三者（間）関係を「政府対運動」や「正義対悪」というふうな単純な図式にはあてはまらない、多様なグラデーションで存在する諸アクターの相互作用と、その意図せざる帰結としての制度改革、という構造を明らかにしていくことになる。3種類のアクターの一次史料群を突き合わせていくことで、多種多様なアクターが相互にどう協議や対話、交渉や妥協を行ったのか、そしてその結果、どういう選択肢が消え、どういう選択肢が残ることになったのかを明らかにすることが、本プロジェクトの中心的な「問い」になる。



実施研究所： 通信教育研究所

氏名： 古賀 徹

## 7 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

一年目の研究成果を以下に報告する。なお当初の計画に比して40%(2年間の研究計画のため1年間を50%と換算して)と評価した理由についても述べておく。

本研究の核となるのは「三者」関連の史料の収集と整理、相互の史料の対照の作業である。1年目は所蔵のわかっている史料のデジタル化と地方史料の収集を進め、そのデータベース化を中心として計画通りに進めてきた。しかし、その所蔵のわかっている史料(日本教育会館教育図書館所蔵史料)の未整理史料を書庫で整理し、デジタル化の可否を判断する作業がなかなか困難であった。嬉しい悲鳴として膨大な量があり、そのデジタル化の順序や量の制限を考えながら進めざるを得なかった。そのために、通信教育研究所に研究プロジェクト専従の研究者(松嶋哲哉氏)を雇用し、また秋期以降はアルバイトの大学院生も雇用して、地道なデジタル化とデータベース化作業を手伝ってもらうことで、なんとか40%の位置まで進めてきたという評価になる。

なお、研究分担者、研究所研究員、アルバイト大学院生も動員して地方に点在する史料調査も進めることができた。しかし信濃教育会関連史料の調査など、収集(撮影)が追いつかず次年度に延ばしたものもある(なお新型コロナウイルス感染症の問題で、本年度春期から夏までと計画していた調査がスタートできていない点も「次年度」の研究計画であるが申し述べておきたい)。

一方で速記録の分析読解のために書記専門家(日本速記協会)に依頼することができ、読み解くのが難解な史料の多くを活かすことができるようになった点は大きな成果であると考えている。上記の「膨大な量」の中には速記者が記した判読難解な史料も多く含まれている。その史料を活かしていく可能性が開けてきた点は当初の計画よりも進んだ点といえる。

他の史料のうち、(A)政党・政治に関する史料、(B)文部省(官庁)史料の収集は2年目以降に延ばし、1年目は議事録や人物史・政治史など文献類の整理を中心に据えた。既に記したように、本研究は単純な図式にはあてはまらない、多様なグラデーションで存在する諸アクターの相互作用として構造的にとらえていくとするものである。そのためこの時期の政治・文教行政、とくに文部大臣と文部省関係者の名簿作成と年譜上で整理するという地道な作業から進めていくこととした。なぜなら(C)教職員組織関係史料にのこされた記述と、対抗するアクター(A)(B)側史料の記述を突き合わせ、その交渉の実状と裏付けを確認して、その背景を整理することで、はじめて多様な可能性の結果としての政策(としての登場)を明らかにできると考えているので、そのための構図を整理しておく必要があるからである。

以上のように、計画通りに進まず残された課題もあり40%と評価している。

以下は、史料の整理・分析を進めながらみてきたことを記しておきたい。

デジタル化した教職員組織資料のうち前掲箇所「組織資料」と呼称している史料についてであるが、その一つに「公文書綴」と題され束ねられたものがある。「公文書」という名称のとおり、その多くが「外部機関」との公文書の交換が記録されたものである。その中には文部大臣や文部省(他の大臣や省庁等)との交渉も記されている。いわゆる政府機関・行政機関の「公文書」と性格は類似する。年代ごとに綴じられた発議文書の草案や原記録類である。本年はデジタル化した史料のうち、本研究の射程内となる「昭和二十四年度 公文書綴」から昭和27年度分までの分を整理することができた。例えば昭和24年度分の目次として綴じられた整理記簿には横罫線で区切る形で「番号」「件名」「提出先」「月日」「備考(以下省略)」と情報分類のための題名が記されて印刷されている。「印刷した」というのはその後の目次も同じ様式に「資料の綴じた順」に書き込まれ、整理されているということである。ちなみに、「整理(文書)番号」(頭注)の付されたものもあり、その多くが公的機関を相手(発信・受信)とする文書類となっている。その頭注も「教発官」「教発官文」「教発単組」(その後に「第〇号」と号数が記される)とされていたものが後半になって「日教組」「日教組発」(号数明記が続く)と様式が整えられていくようにも読める。(つづく)

実施研究所名： 通信教育研究所

氏名： 古賀 徹

## 研究結果（つづき）

この「公文書綴」に文部大臣や文部省との交渉の過程を示す資料が含まれている。なお、昭和24年度には目次の件数で116件示されているが、実際の文書の件数は209件となっている。おそらくこの「綴り」が始まった当初であるので、その最初期のものが個別ではなく、あとからある程度一斉に綴じられ、まとめた標題が付されたためと考えられる。現在、この「公文書綴」の性格について論文を作成中であるが、例えば昭和24年度には文部大臣高瀬荘太郎宛の文書が47件、文部省部局長宛が17件、他にも内閣総理大臣吉田茂や社会党等の政党宛のものまで多数の交渉文書が複数綴じ込まれている。

もちろん「公文書綴」以外にも、同様の性格の資料は「他の史料群」の中に点在する可能性がある。日本教職員組合の「他の史料群」の一つとしては議事録等の会議関係資料（大会議事録や中央委員会議事録や配付資料、戦術会議、代表者会議、中執会議等の記録類）があり、これを活用することによって運営や方針を決定するやりとりを分析することが可能となる。二つ目は運動資料の類いで、例えば組織内の「教育文化部」がどのようなことを検討し運営していこうとしていたのか、「総務関係」として団体交渉してきた記録などがここに含まれるはずである。また三つ目として「未分類」の資料群の中にも受領した公文書や団体交渉の記録文書などが綴じ込まれている可能性が高い（これはいわゆる公文書館の資料も同様である）。四つ目は日教組が発行していた情報機関誌に報じられた記事であるが、これらからも外部との交渉関係を判断するという方法をとることができる。

また、本年度には地方に点在する資料として主に森戸辰男関係文書（広島大学文書館所蔵）を調査した。森戸辰男は、日本社会党に属しており、1947年6月に成立した片山内閣に文部大臣として就任し、1948年10月まで文部大臣を務めた。したがって、森戸は本研究課題である「三者」関連の結節点にいた人物といえる。このような森戸の私文書が森戸辰男関係文書として広島大学文書館に所蔵されているため、本年度はその調査と収集をおこない、本研究に関連する資料群を収集することができた。

本年度の森戸辰男関係文書調査では、主に「社会党時代」、「文部大臣時代」という資料群を調査・収集することができた。前者は、文部大臣就任前以前の社会党における資料群であり、後者は文部大臣就任以後の資料群である。これらの資料群に加え、森戸辰男関係文書の中に点在する関係資料を調査し収集することも行ったが、全ての資料群を調査・収集することができず、若干の課題を残した。

特に本研究課題において重要となる「文部大臣時代」についての資料群は、今年度で調査・収集することができ、研究を行う前提を整えることができた。森戸が文部大臣に就任していた時期は、日教組が成立（1947年6月）する時期と政令201号（1948年7月）によって日教組が運動方針を転換せざるを得なくなる時期と重なっており、本研究課題における政（社会党）と官（文部省）と民（日教組）の三者関係が大きく変更し、その後を方向付けたという意味で重要な時期である。

そして、森戸辰男関係文章の中には、それに関係する文章がいくつか残されていることを本年度の調査で明らかにすることができた。特に本研究で注目すべき点は、日教組と文部省による労働協約の締結交渉と政令201号に関する交渉である。前者は、文部省と日教組の関係をどのように位置づけるか模索をしたものであり、後者はその関係を決定的に決裂させたできごとであった。このようなできごとについて、森戸辰男関係文書の中には、閣議にかかわる㊟文書を含め、日教組との交渉関係の資料が残されている。

また、本研究では、日教組に所蔵している資料も調査・収集・デジタル化を行っている。そのような、日教組所蔵の資料の中にも、労働協約の締結交渉と政令201号に関する資料が残されていることも明にすることができた。そのことによって、森戸辰男関係文書と日教組蔵の資料を合わせて研究することができる前提を整えることができたのであり、今後の研究課題としたい。

以上のように、個別の組織内の文書を丁寧に位置付け、資料批判（史料批判）評価を行うという考察を併せて行い、二年目で本研究をその目指す位置へと着地させていきたい。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。