

注：課題番号を記入してください。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成31年4月18日

日本大学学長 殿

氏 名 高瀬 浩一



所属・資格 理工学部・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 理工学部 理工学 研究所

1 研究課題 金属ナノ材料／半導体複合系に基づく太陽光エネルギーの安定供給技術の開発		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 高瀬浩一	理工学部物理学科・教授	<ul style="list-style-type: none"> 研究統括 金属ナノ粒子／酸化チタン複合系の構築と水素発生試験 光／熱／電気エネルギー変換素子の開発
○研究分担者 加藤隆二	工学部・教授	<ul style="list-style-type: none"> 研究分担者 金属ナノ粒子／酸化チタンの水素発生機構の解明（超短時間分光計測） 金属ナノ粒子の液相合成
須川晃資	理工学部物質応用化学科・准教授	<ul style="list-style-type: none"> 研究分担者 金属ナノ粒子の液相合成 金属ナノ粒子／酸化チタン複合系の構築と水素発生試験
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
平成31年度 科学研究費助成事業 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）(B) （高瀬申請分）———不採択 平成31年度 二国間交流事業 共同研究 （高瀬申請分）———不採択 平成31年度 二国間交流事業 共同研究 （須川申請分）———不採択		

※「6 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：理工学部理工学研究所

氏名：高瀬浩一

4 研究目的

現在、太陽光エネルギーの社会・産業利用の根本は、光/電気エネルギー変換現象を基とする半導体太陽電池の利用が主流である一方、コスト面で課題が多く、安定供給のためには更に高価な蓄電デバイスを更に要する。一方、もう一つの有力候補技術として、半導体光触媒による水から水素エネルギーへの変換がある。光エネルギーを容易に貯蔵可能な次世代エネルギーである水素に変換することによって、安定なエネルギー供給が望める。しかし、水素発生に必要なプロトン (H^+) の還元には、 TiO_2 などの広バンドギャップ材料を必要とし、太陽光に僅か(6%)にしか含まれない紫外光でしか駆動できない。しかし最近、この半導体に金属ナノ粒子を複合化させることで、太陽光の約半分を占める可視光を照射することで水素が発生することが報告された。¹これは**金属ナノ粒子に特有な局在型表面プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)**の励起によって光触媒活性が可視光応答化した結果であり、この原理を積極的に活用すれば、理論的には**可視～近赤外に渡る太陽光全波長によって水素発生が可能な光触媒を実現**できる。すなわち**水素を太陽光から高効率生産でき、必要な時に必要なだけ必要な場所でのエネルギー供給が可能**となる。一方、有名な半導体デバイスの一つに、バルク半導体内の両端の温度差を利用して発電する**熱電変換現象**があり、**廃熱発電**などへの応用が期待されている。

金属ナノ粒子のLSPR現象は、他の光機能性材料を遥かに凌駕する光吸収能を有し、それ故、この現象に伴う熱失活過程において多大な局所熱が生じることが知られている。すなわち、**熱電変換半導体/金属ナノ粒子の複合システムを創出することで、熱エネルギーへの変換を介した高効率な太陽光/電気エネルギー変換システムの創出が実現**できる。このシステムは、光エネルギーを熱容量媒体に蓄えることが可能な熱エネルギーに変換するプロセスを含めることで、安定なエネルギー供給を可能とする。

5 研究概要

金属ナノ粒子/半導体複合材料を作成するために、vapor-liquid-solid (VLS)法による半導体単結晶作成と、陽極酸化ポーラスアルミナのナノ細孔をテンプレートとした金属ナノワイヤーの作成を行った。まず、VLS法による半導体単結晶作成については、酸化亜鉛ナノワイヤーの作成を分子線エピタキシー装置を用いて試みた。高真空に保たれた真空チャンバーに亜鉛と酸素を同時に供給し、金を触媒として、単結晶ができるのであるが、今回は、粒子状の酸化物しか得られなかった。これは、酸素の供給量が装置限界のため少なかったためである。

そこで、金ナノ粒子/半導体単結晶ナノワイヤー構造を諦め、金ナノワイヤーを半導体で包んだコアシェル構造を作成することにした。金ナノワイヤーの作成には、陽極酸化ポーラスアルミナのナノ細孔をテンプレートに用い、この細孔中に金を埋め込むことで金ナノワイヤーを作成することができた。ナノワイヤーの典型的な大きさは、直径50nm、長さ1000nmである。次に、コアシェル構造を作るために、ポーラスアルミナに埋め込まれた金の露出をポーラスアルミナを化学的に除去することで行った。ナノワイヤーを支持していたアルミナがなくなることで、ナノワイヤー同士が凝集してしまうと同時に、長さが長い場合、ワイヤーが倒れてしまう結果となった。また、成長したナノワイヤーの長さが空間的に一定でないため、現在、基板をアルミニウム板からAl/Au/Ti/SiO₂/Siに代えてナノワイヤー作成を行っている。

さらに、高効率な集光能力、および高い光熱変換効率を有する金属ナノ粒子の開発を行った。設計指針としては、ナノ粒子の形状の異方的な制御、およびナノ粒子の集合化によってプラズモン共鳴の発現波長の広帯域化を狙った。

まず、金ナノアイランド集合体をシリカ微粒子上に担持させた構造を作製した。アイランド構造間のプラズモンカップリングによって、可視から近赤外域にわたる広い波長域で光消失バンドを示すことが確認された。また、このバンドは下地のシリカ微粒子径が大きくなると共に長波長シフトしていく様子が確認され、バンドの広帯域化のみならず、バンドの発現波長も制御可能であることが実証された。また、安価なプラズモニック金属種による光熱変換ナノ材料の開発を指向し、シリカ微粒子上にアルミニウムから成るナノアイランド構造を担持させた。このナノ粒子はやはり可視から近赤外域において強いプラズモンバンドを発現することが実証され、安価なアルミニウム金属種による集光ナノ材料が開発可能であることが示された。次に、異方性銀ナノプリズムを合成したところ、環境耐性が低いことが検証されたため、白金をドーピングして安定化を図った。結果、可視から近赤外域で発現するプラズモンバンドの特性を失うことなく環境耐性の向上に成功した。

実施研究所：理工学部理工学研究所

氏名：高瀬浩一

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

本研究では、図1のような金ナノ粒子/酸化半導体単結晶ナノワイヤーの作成を目指した。半導体直上の金ナノ粒子は、局在表面プラズモンの発現により可視光を吸収し、ホットエレクトロンが生成される。その電子が酸化半導体に移動することで水の分解が促進されると期待される。この構造の作成には、vapor-liquid-solid法を用い、金ナノ粒子を触媒として酸化半導体原料を溶かしこみ、これらが金から析出することで半導体単結晶ナノワイヤーが得られる。今回は、我々の研究室が所有している分子線エピタキシー装置を用い、酸素量の上限等のパラメータをチェックするために、テストケースとして亜鉛の酸化物を試みた。単結晶ナノワイヤーの作成には比較的高い圧力の酸素ガスが必要であるが、ガス圧を高くすると、装置の排気装置であるターボ分子ポンプに大きな負荷がかかり、装置破壊につながるので、 10^{-4} Torr程度のガスしか導入できない。このため、小さな酸化亜鉛ナノ粒子の成長はできたが、ナノワイヤーの成長には至らなかった。そこで、今回、分子線エピタキシー装置の使用を諦め、別の方法を用いることにした。

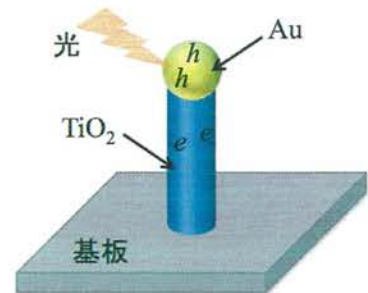


図1 金ナノ粒子/酸化半導体単結晶ナノワイヤーの模式図

局在表面プラズモンを利用したホットエレクトロンの利用のためには、必ず、金のナノ粒子もしくはナノワイヤーを作成しなければならない。上述の方法が装置の使用限界を超えていたので、一つの装置でいきなりナノ粒子/半導体ナノワイヤー複合体を作るのではなく、一つ一つをそれぞれ別の方法で作成する方法を採用する。

陽極酸化ポーラスアルミナは、基板に直行するナノ細孔を有する多孔質膜で、いろいろなナノ物質を作成するテンプレートとして用いられている。図2は、ポーラスアルミナの典型的な断面走査型電子顕微鏡(SEM)写真である。ポーラス底部には電気を通さないバリア層があり、このままでは、このナノ細孔には金属を埋め込むことはできない。電解メッキによる金属の埋め込みを可能にするために、陽極酸化時の電圧を徐々に低下させていき、バリア層に亀裂を入れる電流降下処理を施し、その後、更に化学的に酸化膜を除去すれば、金ナノワイヤーを作成できると期待される。この方法で金ナノワイヤーを作成し、周りのポーラスアルミナを除去することで、露出した金ナノワイヤーを実現することができ、このナノワイヤーのTiO₂薄膜を堆積させることで、図3のような、光触媒酸化半導体薄膜/金ナノワイヤーコアシェル構造を実現できる。ここで、TiO₂のバンドギャップは約3.2eVであり、このため、金ナノワイヤーが吸収する可視光は、TiO₂膜を透過する。この新しいアイデアでは、金ナノ粒子に代えてナノワイヤーを採用しており、これにより、直径方法と長手方法の2つの方向に対してプラズモン吸収が起きると考えられ、金ナノ粒子の場合に比べて、太陽光を幅広く利用出来るメリットがある。

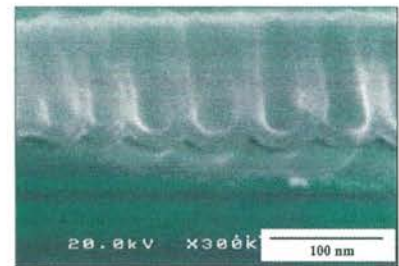


図2 ポーラスアルミナの断面SEM像

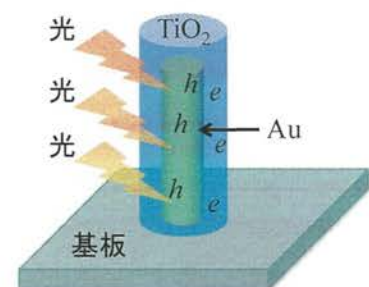


図3 酸化半導体薄膜/金ナノワイヤーコアシェル構造の模式図

表1は、今回、ポーラスアルミナに電解メッキにより金を埋め込むにあたり、試した試料作成条件で、主に、バリア層を除去するための処理と電解メッキ処理に関するパラメータを幾つか変えてある。なお、メッキ法には、交流法と直流法を合わせて用い、金メッキ液は、田中貴金属製のものを用いている。

図4は、今回作成したナノワイヤーの断面SEM像である。Sample1とSample2の違いは、メッキ法の交流メッキ時間だけで、Sample3とSample4では、Sample1とSample2にくらべてポーラスアルミナの底部の化学エッチングの時間が少し長くしてある。Sample1とSample2を比較すると、Sample1の方が交流メッキ

研究結果（つづき）

時間が短いにも関わらず、 $1\mu\text{m}$ を超える長さのナノワイヤーが埋め込まれていることがわかる。ただ、ここには、示していないが、ナノワイヤーの埋め込みには、空間的なバラつきが見られた。Sample 2では、埋め込まれたナノワイヤーの長さは短い、比較的均一な埋め込みができた。Sample 3と Sample 4では、どちらも長さには多少のバラつきはあるが、 $2\mu\text{m}$ 以上の長い金ナノワイヤーの埋め込みができています。これは、電圧降下処理後の化学エッチングの時間を長くしたため、十分バリア層が除去され、基板のアルミニウムと良好な電気伝導性が得られたため良好な電解メッキが実現できたためと考えられる。

	電圧降下処理	PW処理	メッキ時間
Sample1	40V~20V:2V/min 20V~1V:1V/min 1Vを10min一定	10min	交流:30second 直流:10min
Sample2	40V~20V:2V/min 20V~1V:1V/min 1Vを10min一定	10min	交流:1min 直流:10min
Sample3	40V~30V:2V/min 30V~5V:1V/min 5Vを10min一定	12min	交流:30second 直流:10min
Sample4	40V~30V:2V/min 30V~5V:1V/min 5Vを10min一定	12min	交流:1min 直流:10min

表1 ポーラスアルミナのバリア層処理とメッキ条件

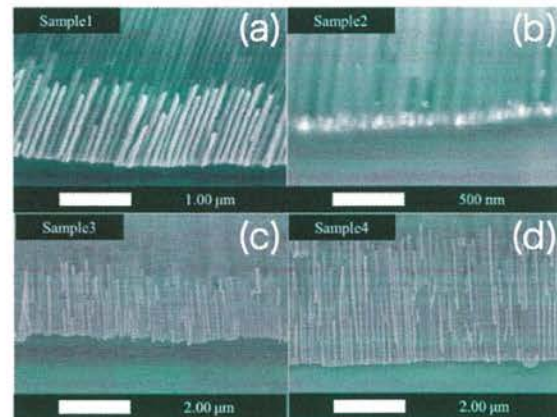


図4 ポーラスアルミナに埋め込まれた金ナノワイヤーの断面SEM像

図5は、これら試料の反射スペクトルである。一般に金ナノ粒子のプラズモン吸収は約 530nm で発現すると報告されているが、今回の場合、金ナノワイヤーがポーラスアルミナに包まれているせいなのか、 530nm で吸収を示すものはなかった。しかしながら、それぞれの反射スペクトルには明確な吸収（反射率の極小構造）が確認されており、プラズモンは発現しているものと考えられる。

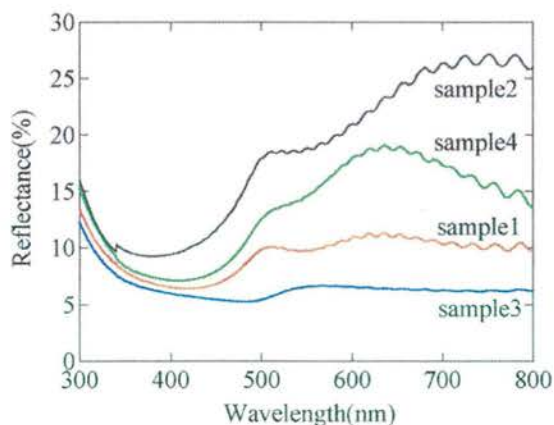


図5 金ナノワイヤーの反射スペクトル

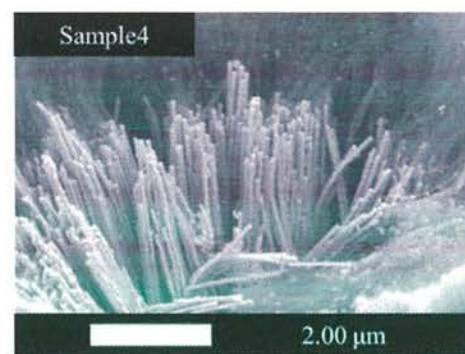


図6 アルミナ除去後の金ナノワイヤーのSEM像

図6は、図4(d)の Sample4 のポーラスアルミナを化学的に除去して得られた金ナノワイヤーのSEM像である。長さが長いためにナノワイヤーだけで自立できず倒れている様子がわかる。また、ナノワイヤー先端は互いにあつまり、凝集している様子も見て取れる。目標とする構造を実現するには、自立したナノワイヤーが必要であるため、今後、自立できる長さの調査が必要である。

研究結果（つづき）

次に、太陽光を効果的に熱に変換可能なプラズモニック光熱変換材料の開発を目指した。戦略として、

- ・ナノ粒子の集合構造の形成によって、プラズモンバンドを広帯域化させること
- ・ナノ粒子を異方的に合成することで、プラズモンバンドを広帯域化させること

の二つを試みることにした。

【ナノ粒子の集合構造の形成】

ナノ粒子の集合構造は、2次元的に配列されたシリカ微粒子膜上に、熱蒸着法によってAuから成るナノアイランド集合構造を形成させ、水中に超音波処理によって分散させることで合成した。下地に用いたシリカ微粒子の平均直径は、90、222、399 nmの3種類を採用した。図7(A)に示されたTEM像の通り、いずれのシリカ微粒子径に関しても、シリカ微粒子の半球面にAuナノアイランド集合構造が担持された構造形態をとっていることが確認された。これら微粒子の分散水溶液の消失スペクトルを測定したところ(図7(B))、いずれの粒子も可視域から近赤外域にわたる広い波長域でプラズモンバンドを発現することが確認された。通常の球形Auナノ粒子は530 nm付近にのみプラズモン

バンドを発現するゆえ、このような広い波長域にわたってプラズモンバンドが発現したのは、Auナノアイランド間で発現するプラズモンカップリング現象によってバンドの広帯域化が誘起された結果であると考えられた。さらに太陽光スペクトルを鑑みると、これらスペクトルは太陽光を効果的に集光可能であることが分かる。また、シリカ微粒子の粒子径が大きくなると共にプラズモンバンドが長波長シフトしていく様子が確認された。すなわち、プラズモンバンドの広帯域化のみならず、バンドの発現波長をも制御可能であることが示唆された。さらに、分光測定器に積分球をとりつけて吸収スペクトルを測定したところ、シリカ微粒子径が小さいほど集光成分中の光吸収成分比率が高いことが実証された。集合体構造を形成するAuナノアイランドの構成要素数が少ないために誘起された結果であると推察された。以上の結果より、より小さいシリカ微粒子上に担持されたAuナノアイランド集合構造が最も効率的に太陽光を集光し、かつ高い光熱変換能を有することが実証された。

【ナノ粒子の集合構造の形成：安価な金属種の活用】

Auナノアイランドによる広帯域集光に成功したので、この技術を利用して、安価なプラズモニック金属種による光熱変換材料の開発に着手した。Al金属は主に深紫外域にてプラズモン共鳴を発現することが知られており、太陽光の集光には不向きである一方、ナノ粒子集合化に伴うプラズモンカップリング現象により、Alであっても可視から近赤外域にてプラズモンバンドの発現が可能であると考えた。

一例として、110 nm直径のシリカ微粒子上にAlナノアイランド構造を担持させたTEM像を図8(A)に示す。Auナノアイランドと同様に、シリカ微粒子の半球面上にAlアイランド構造と思われる半透明な物質が観察されるが、シリカの主成分であるSiとAlの原子番号が近いため不明確な像しか得られなかった。そこでTEM観察時に元素分析を行い、マッピング像を観察した(図8(B))。

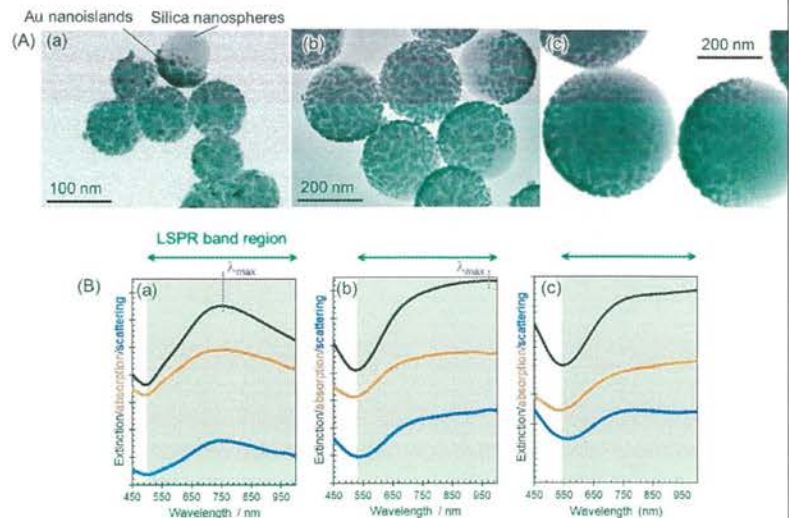


図7 (A)90、222、399 nm 粒子径のシリカ微粒子上に Au ナノアイランド集合構造を形成された際の TEM 像、および(B)それぞれの粒子の分散水溶液の消失・吸収・散乱スペクトル。

研究結果（つづき）

結果、シリカ微粒子の半球面上にのみ、Al成分が局在していることが確認された。次にこの微粒子の消失スペクトルを図8(C)に示した。期待した通り、プラズモンバンドは400 nm から近赤外域にわたる広い波長域で発現した。これは上述の通り、本来 Al ナノ構造は深紫外域にプラズモンバンドを発現するが、Al のナノアイランド間のプラズモンカップリングが誘起された結果、太陽光スペクトルと良い相関のあるプラズモンバンドが得られたと考えられた。

【異方性金属ナノ粒子による光熱変換現象の発現】

異方形状の金属ナノ粒子のプラズモンバンドは、形状パラメータによってその発現波長を大きく変化させる。本研究では三角形プレート形状の銀ナノ粒子（銀ナノプリズム）を光熱変換材料として活用することにした。当該粒子は、プリズムに辺長と厚さの比で容易にプラズモンバンドの発現波長を調整可能である。液相合成法による種々の条件検討によって、銀ナノプリズムの合成に成功したが、遠心分離による精製操作によって形状が崩れる（ひいては消失スペクトルも変化する）ほどの脆弱性を有することが明らかになった（図9(A)）。そこで、ガルバニ置換現象を利用することによって、予め合成した Ag ナノプリズムの表面上に Pt 原子を微量ドーピングした。結果、精製による形状崩壊が劇的に抑制され、形状安定性の高い銀ナノプリズムが得られた（図9(A)）。Pt 原子のドーピングは粒子の XPS スペクトル測定によって明らかにした（図9(B)）。さらに、これら微粒子のコロイド水溶液の消失スペクトルでは、Pt 原子をドーピングすることによってわずかな消失強度の減衰とプラズモンバンドの長波長シフトが観察されたものの、Ag プリズムの高い光消失特性は維持されていることが確認された。

以上の結果をもって、太陽光を効率的に集光し、熱変換可能な複数のナノ粒子の合成に成功したと言える。

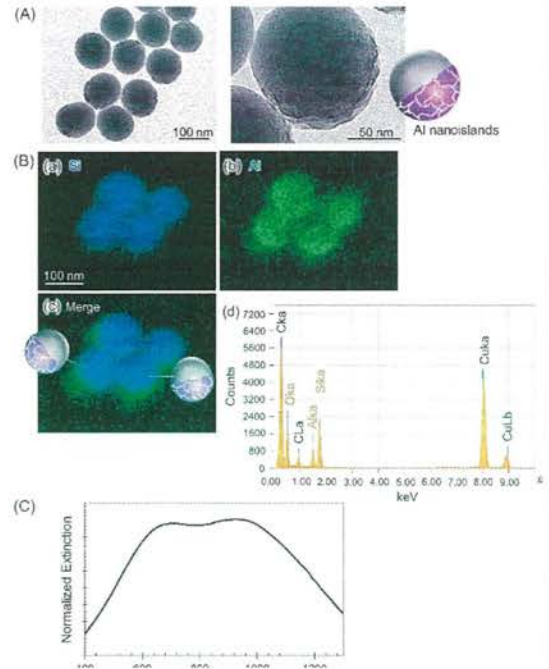


図8 (A) 110 nm 粒子径のシリカ微粒子上に担持された Al ナノアイランド集合構造の TEM 像、および(B) 元素分析マッピング。(C) Al ナノアイランド集合体の消失スペクトル。

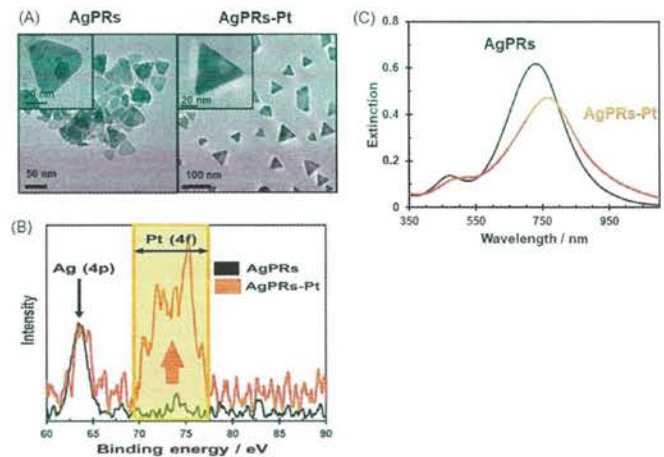


図9 (A) Ag ナノプリズムおよび Pt ドープ Ag ナノプリズムの TEM 像、(B) Ag ナノプリズムおよび Pt ドープ Ag ナノプリズムの XPS スペクトル結果、(C) Ag ナノプリズムおよび Pt ドープ Ag ナノプリズムのコロイド水溶液の消失スペクトル。

注：課題番号を記入してください。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成31年4月8日

日本大学学長 殿

氏 名 高 寄 正 樹



所属・資格 生産工学部・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 生産工学部 生産工学研究所

1 研究課題 トップアスリートの視覚ストラテジーと脳機能評価による運動制御の解明		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 高 寄 正 樹	生産工学部／専任講師	脳活動評価，研究の統括
○研究分担者 佐 藤 佑 介	商学部／准教授	視覚ストラテジーの解明
深 見 将 志	商学部／専任講師	アスリートの内省報告の解析，トレーニングプログラム作成への応用を検討
佐 藤 秀 明	法学部／専任講師	アスリート（個人競技）の動作分析と評価
平 木 貴 子	経済学部／専任講師	アスリートの内省報告の解析，統計解析
城 間 修 平	文理学部／助教	アスリート（団体競技）の動作分析と評価
合計 6名		
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
基盤研究（C）平成30年度～平成32年度「運動負荷が反応抑制・変更機能に関わる大脳皮質活動に及ぼす影響の解明」（代表者：高寄正樹，4,940千円），不採択		
基盤研究（C）2019年度～2021年度「運動負荷が反応抑制・変更機能に関わる大脳皮質活動に及ぼす影響の解明」（代表者：高寄正樹，4,995千円），採択		
基盤研究（C）2019年度～2021年度「後方かかえ込み宙返り中の視線行動と身体運動の協応関係」（代表者：佐藤佑介，4,999千円），不採択		

※「6 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：生産工学部生産工学研究所

氏名： 高 寄 正 樹

4 研究目的

ヒトは適切な運動を遂行するために、運動制御に対して視覚情報を利用している (Land, 2004)。スポーツ競技においてもアスリートは最適なパフォーマンス発揮のために視覚ストラテジーを駆使している (Heinen, 2011)。視線行動に関する研究は、これまでさまざまなスポーツ種目を対象として行われており、本プロジェクトメンバーも体操競技の視線行動による研究成果を報告している (Sato et al., 2017)。これらの研究によって、一般アスリートが競技中に「どこ」へ「いつ」視線を向けているのかということが明らかにされているのである。

しかしながら、「どのように」見ているかということについては、生理学実験的に検討されたものは少ない。つまり、対象に視線を向けているが、注視しているのか、それともぼんやりと見ているだけなのかを議論するための定量的な証拠は十分に得られていないのである。加えて、国際大会に日本を代表して出場するトップアスリートの視覚ストラテジーと脳機能に関するデータはほとんどないため、一流選手が行う運動制御は完全に解明されていない。

そこで本研究は、運動制御を極めたトップアスリートが最適なパフォーマンス発揮のために ①「どこ」を「どのように」に見て、視覚情報を得ている (視覚ストラテジー) のか、②その視覚ストラテジーがどのようにパフォーマンスに影響を及ぼすのかを、視線解析と脳波解析を中心とした自然科学的実験手法によって明らかにすることを目的とした。初年度はより実際の場面に近い、試合形式中の視線活動と脳活動から検討し、2年目は、基礎的研究との比較ができるように実験室における反応課題から検討する。将来的には、本研究で得られた成果をもとにトレーニング方法の開発を見据えており、本研究はその基盤的研究として位置付けている。2020年には東京オリンピック・パラリンピックが控えており、“スポーツ日大”の本学所属トップアスリートのパフォーマンス向上に寄与したい。

5 研究概要

本研究は、実際の競技場面ならびに反応課題を実施した際の視線活動ならびに脳活動の記録から、トップアスリートの視覚ストラテジーと最適なパフォーマンスを発揮するための運動制御機構について明らかにすることを目的としており、2カ年計画で進める。

まず初年度は、「トップアスリートが競技中に行う視覚ストラテジーの解明」を目的に、トップアスリートと一般アスリートを実験参加者とし、その選手が競技中に「どこ」を「どのように」見ているのかという視覚ストラテジーを明らかにする。参加者は、本研究の目的および方法について十分な説明のうえ、同意が得られた本学に所属する (もしくは出身の) トップアスリート (日本代表の経験を有する選手) および、日本代表経験のない一般アスリートとする。アスリートのスポーツ種目はオープンスキル (環境が変化する) 競技で対人競技とする。実験課題は、各アスリートの競技における試合形式とする。そして、実験時には視線活動をアイマークレコーダにより、脳活動および筋活動を脳波計により、動作映像についてはハイスピードカメラを用いて記録する。さらに実験後には、アスリートよりインタビュー形式にて内省報告を記録する。これらの指標をもとにトップアスリートと一般アスリートの比較を行い、トップアスリート特有の視覚ストラテジーを明らかにしていく。

2年目は、「トップアスリートの視覚ストラテジーがパフォーマンスに与える影響の解明」を目的に、視覚性の反応抑制・変更課題を用いて、トップアスリートの実行する視覚ストラテジーが、最適なパフォーマンス発揮のための認知機能を含めた運動制御に及ぼす影響について明らかにする。実験課題の視覚性反応課題は、大型のディスプレイを用いて、アスリートの試合時における視角全体について評価できるようにする。実験時に記録する指標は、初年度と同様とする。実験参加者は初年度と同じトップアスリートと一般アスリートにノンアスリートを加えて比較する。それらの参加者群の反応課題時の視覚ストラテジーならびに脳活動様式を比較検討する。これによりアスリートよりも高水準なパフォーマンスを発揮しているトップアスリートが運動制御に視覚ストラテジーをどのように役立てているのかを明らかにする。

6 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

競技中に行う視覚ストラテジーの解明

平成 29 年度においては、トップアスリートと一般アスリートを実験参加者とし、アスリートが競技中に「どこ」を「どのように」見ているのかという視覚ストラテジーを明らかにすることを目的とした。実験参加者は、フェンシングとボクシングのアスリートであった。アスリートは国際大会において日本代表として出場経験のあるトップアスリートと、日本代表の経験を有しない一般アスリートとした。実験は 2 課題を実施した。まずは、静的な状態において、視対象に対して注視している場合と、視線を向けているが焦点をあわせずぼんやり眺めているような場合には、脳活動および視線行動でどのような活動様式がみられるかについて検討を行った。2 つ目の課題は、実験参加者の競技における相手と対峙した試合と同形式による攻防とした。実験においては視線活動、脳活動、筋活動、動作映像、内省報告および実験者の主観的感覚を評価する Visual Analogue Scale (VAS) を記録した。視線行動の記録にはウェアラブル型のアイトラッカー Tobii Pro グラス 2 (Tobii 製) を参加者に装着させた。脳活動の記録には、モバイル多チャンネル脳波アンプ eego sports (ant neuro 製) を用い脳波を記録した。筋活動は、利き腕側の上腕三頭筋と動作の動き出しに使用される部位より脳波計へ導出した。プレー中の実験参加者の身体動作については、2 台のハイスピードデジタルカメラ (カシオ製) で撮影し、動作分析ソフトウェアにより、動作に関する定量データ (動作開始のタイミング等) を算出した。実験時の内省報告についてはプレー映像を見ながらのインタビュー形式で行った。VAS は測定機器による実験参加者への主観的な干渉度合いを測るため、紙面上にて記録した。

【課題 1】の静的な状態での固視およびファジー視では、脳波のスペクトル解析の結果、大脳皮質の視覚領域では、Gaze 条件では α 帯域にピークがあるのに対して、Fuzzy 条件においては θ 帯域にピークが出現していた。眠気を催しているなど意識レベルが低下しているような大脳皮質活動が低下している場合は、低い周波数帯域の割合が高まることが知られている。つまり、アスリートが対象物に対してしっかりと焦点をあてているときよりも、ぼんやりと眺めるように視線を向けている状態では、大脳皮質視覚領域では低い周波数帯域による活動が大きくなっており、大脳皮質における情報処理活動のレベルとしては低減していることが示唆された。

【課題 2】相手と対峙した試合形式での攻防におけるアタック局面では、記録された脳波の解析結果、アタック局面における大脳皮質視覚領域は θ 帯域の活動性が高まり、 α 、 β 帯域の活動性は低下していた。課題 2 のアタック局面 (Attack 条件) における各帯域の含有率を課題 1 の Gaze 条件ならびに Fuzzy 条件と比較したところ、Attack 条件における θ 帯域の含有率は 3 条件の中で最も高く、 α 帯域においては 3 条件の中で最も低かった。Attack 条件における β 帯域の含有率は、Gaze 条件よりも低く、Fuzzy 条件と同等であった。これらの結果より、アタック局面における大脳皮質視覚領域の活動は、対象に焦点を合わせず視線を向けている時と同水準であることがわかった。そして、その時の視線の方向は、対戦相手の頭部や胴体、サーベル等に向けられていた。アスリートはアタック局面においては、しっかりと対象に焦点を当てるように注視しているのではなく、ぼんやりと視

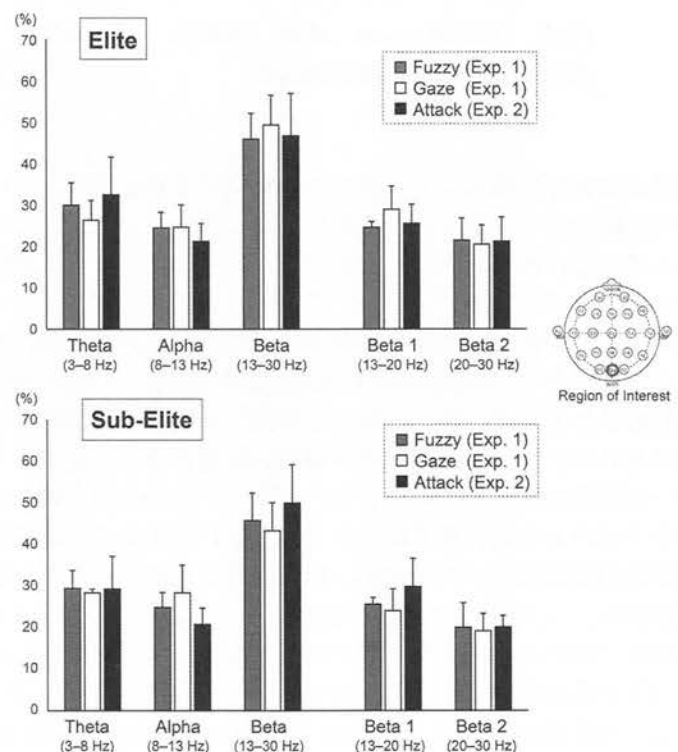


Fig.1. The mean percentage of each frequency band in the total power (3-30 Hz) during each condition.

研究結果 (つづき)

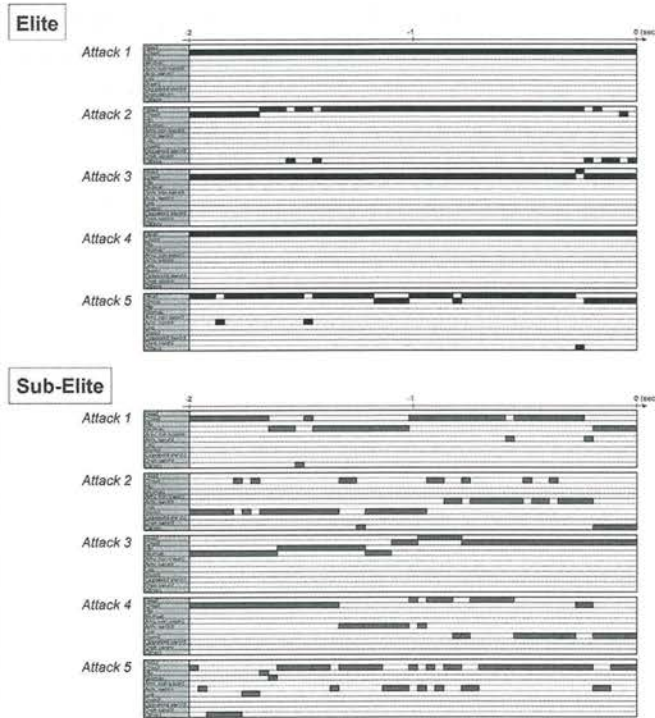


Fig.2. Typical gaze shift patterns of each participant during attack phase.

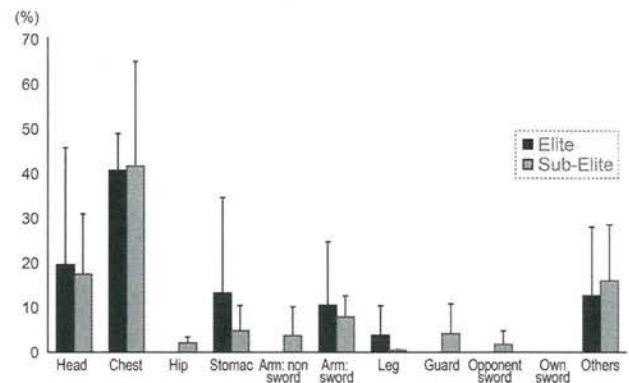


Fig.3. The mean percentage of the gaze duration of each location for elite and sub-elite group during attack phase.

周辺視野を利用してより多くの視覚情報を得ようとしていること、また、攻撃を仕掛けてくる相手への対応や攻防の戦略の組み立てなど多くの事象に対して、限られた注意資源が配分されているということを示している可能性が考えられる。0~10ポイントで評価されるVASの値は、「普段どおりできた」については、いずれの項目もトップアスリートと一般アスリートには有意な差はみられなかった。測定機器の装着による干渉については、事前から予想されていたため、測定機器の装着後に視線計測のキャリブレーションを行うなどして実験環境への順応を図ったが、「プレー中にグラスが気になった」については、やや高い値が記録されてしまった。これは本研究における研究の限界であると考えられる。一方で、これまでほとんど発表されていない動的運動時の脳活動を捉えられたということは、大きな意義がある。また、視線戦略の研究では、「いつ」「どこ」を見ているかという問いに対しては多くの研究報告がなされているが、それを「どのように」見ているかという問いに対して、定量的なデータで示したものはない。本研究では、視線活動の定量的データに加え、脳活動の定量的データから視覚戦略を検討することで、アスリートが競技中、「どのように」視対象を見ているかということをはっきりとすることができた。なお、これらの研究成果の一部であるフェンシング競技アスリートを対象とした結果については、桜門体育学会平成29年度大会(第8回大会)において、「フェンシング競技選手のアタック局面における視覚戦略」として、さらに、北米神経科学会(Society for Neuroscience 48th Annual Meeting)において「Visual strategies of elite athletes during attacks」報告した。

研究結果（つづき）

視覚ストラテジーがパフォーマンスに与える影響の解明

平成 30 年度は視覚性の反応抑制・変更課題を用いて、トップアスリートの実行する視覚ストラテジーが、最適なパフォーマンス発揮のための認知機能を含めた運動制御に及ぼす影響について明らかにすることを当初目的としていた。しかしながら、平成 29 年度の成果において、トップアスリートは周辺視により視覚情報を収集するため、ぼんやりと視線を向け、なおかつ少ない箇所に停留させていること明らかになった。これは注意資源の配分を広範囲に広げるための方略であると考えられる。つまり、視覚ストラテジーの違いは注意配分のストラテジーとの関連があることが推察される。

当初、反応抑制・変更機能を検討するために実験課題として、Stop-signal paradigm, Change paradigm, Stop-change paradigm を用いる予定であったが、上記の理由により、空間的注意機能を評価する Spatial cueing paradigm (SCT) を採用することとした。実験参加者はフェンシングのトップアスリート、一般アスリートと特別な運動経験のノンアスリートの 3 群とした。なお、トップアスリートに関しては、日本代表合宿等の都合により予定していた実験が大幅に遅れ、データがまだ出揃っていないため、一般アスリートとノンアスリートの結果について報告する。SCT では、座位姿勢の実験参加者の約 65 cm 前方に大型ディスプレイを設置して、視覚刺激を行なった。まず固視点 (+) を中心として同心円状に視角 2° の円を 8 つ並べた画面 (Fix) を 1 s 呈示したのち、固視点のあった場所に矢印もしくは線を太くした「+」を表示した画面 (Cue) を 50 ms 呈示した。その後、Fix と同じ画面 (Delay) を 200~800 ms 呈示したのちに、8 箇所ある円のうち 1 つが塗りつぶされた画像 (Target) を呈示した。実験参加者は Target 提示後すばやく利き手手指でスイッチを押すように指示された。Cue で呈示された矢印と同じ方向の円が塗りつぶされた条件 (valid 条件) と、矢印と異なる方向の円が塗りつぶされた条件 (invalid 条件)、線を太くした「+」が呈示された条件 (neutral 条件) は、それぞれ、70 : 20 : 10 の割合でランダムに呈示された。固視点「+」から Target が呈示される円までの距離は、視角 5° と 15° の 2 種類を採用した。視角 5° は SCT において一般的に用いられる距離である。一方、視角 15° はフェンシングのアスリートが試合中に対戦相手と対峙した際の距離 (約 3 m) で、対戦相手の全身が入る視野の角度として採用した。また、当初はより実際のパフォーマンス発揮状況に近付けるために、実験時の参加者の姿勢は、立位姿勢にて実施する予定であった。しかし、前年度成果を学会にて発表した際に、多くの研究者より、まずは基礎実験のデータから積み上げたほうがより有効であるとのコメントをもらった。これについて研究組織内で協議し、平成 30 年度はもう少し基礎研究に近い条件で実験を実施することを確認し、座位姿勢による実験とした。

実験においては視線活動、脳活動、内省報告を記録した。視線行動の記録にはウェアラブル型のアイマーカーレコーダ EMR-9 (ナックイメーজテクノロジー製) を参加者に装着させた。平成 30 年度に購入した EMR-9 は、より広い視野に対する視線活動を精度良く記録することができる。脳活動の記録には、モバイル多チャンネル脳波アンプ eego sports (ant neuro 製) を用い脳波を記録した。脳波は、Target 呈示時点をトリガーとし加算平均処理を行い、事象関連電位 (Event-related Potential; ERP) を求めた。ERP 成分のうち Target 呈示後約 140~190 ms に前頭葉を含む広い範囲に出現する陰性成分 (N1) は、空間に注意を向けているときに増大することが知られている。この N1 成分の振幅を注意機能の評価に用いた。視線活動においては、視線の移動速度と注視点距離を求めた。実験の結果、反応時間はいずれの条件ならびにいずれの視角においても、ノンアスリートよりも一般アスリートの方が早かった。また、いずれの視角においても、矢印と同じ方向に Target が出現した valid 条件時が最も早く、次に線を太くした「+」を呈示した neutral 条件となり、矢印と異なる方向の円を塗りつぶした invalid 条件時が最も遅かった (Table 1)。一般アスリートの中には、課題後の内省報告のインタビューにおいて、Cue (矢印) の呈示には全く影響を受けなかったと回答した者もいたが、反応時間では、valid と invalid では差がみられたことから、無意識的に矢印の方法に注意を向けていたことが推察される。

この際の視線の移動速度に着目すると、その最大速度はノンアスリートの方が一般アスリートよりも高かった (Fig. 4)。一般アスリートは眼球を大きく回転させることなく、視野の周辺部分を利用してターゲットを

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)

Table 1. Behavioral data

Angles	Conditions	Sub-Elite	Non-Athlete
5°	Valid	263.8 ± 37.5	285.5 ± 52.2
	Invalid	284.7 ± 43.6	335.8 ± 74.1
	Neutral	274.2 ± 39.4	324.1 ± 42.5
15°	Valid	262.8 ± 31.3	305.4 ± 60.3
	Invalid	296.5 ± 38.5	386.3 ± 71.4
	Neutral	286.1 ± 30.9	365.6 ± 48.5

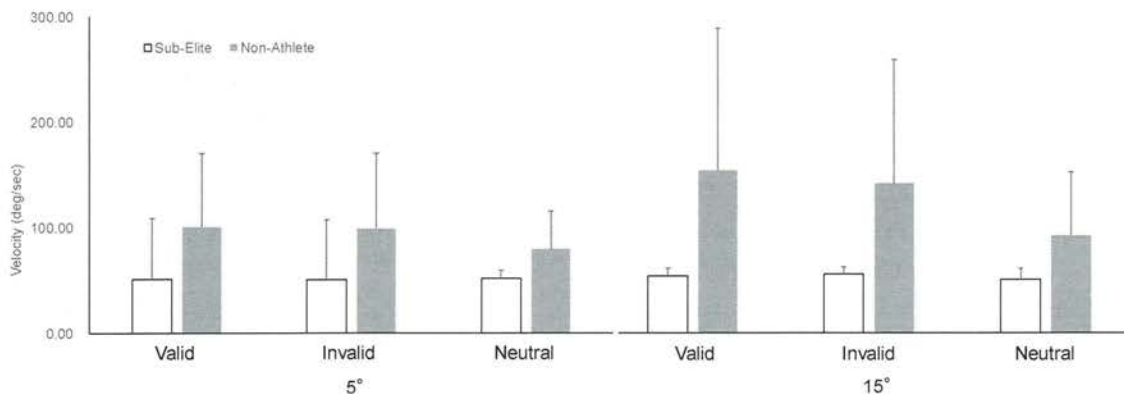


Fig.4. Means and standard deviations of gaze velocity in each condition for sub-elite and non-athlete.

知覚している可能性がある。他方、一般アスリートは Cue や Target の出現に合わせて眼球を大きく回転させ、視野の中心部分で情報を収集しようとしている可能性がある。それぞれ 1 名の参加者の典型的な視線速度パターン (Fig. 5) からもそれらのことが推察される。ノンアスリートにおいて 15° の方が 5° よりも移動速度が高いことも、ターゲットまでの距離が大きいため視線を大きく移動させていることの表れだろう。注視点距離においても両者に違いがみられた。一般アスリートの方が参加者とディスプレイの距離と同等の注視点距離であったのに対し、ノンアスリートは注視点をディスプレイよりも遠くに配置していた。一般アスリートにおいては 5° よりも 15° の方が、その値は小さかった (Fig. 6)。これらのことから、一般アスリートは本課題を成功させるために Cue を注視しながら視野周辺部分から得られる情報を利用する方略を採用していることが示唆される。

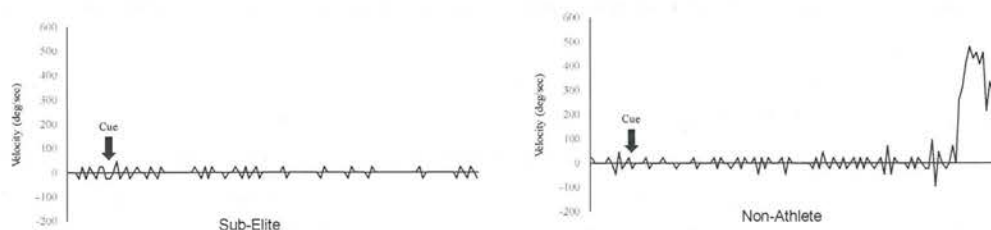


Fig.5. Example of eye movements during task in sub-elite and non-athlete.

研究結果（つづき）

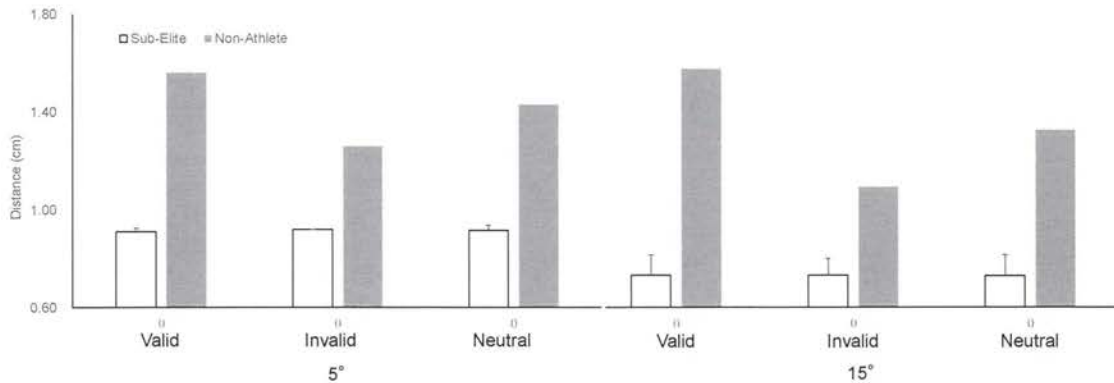


Fig. 6. Mean Gaze point distance in each condition for sub-elite and non-athlete.

ERP の N1 成分の振幅の結果、いずれの条件ならびに視角においても、おおむねノンアスリートより一般アスリートのほうが、振幅が大きかった (Fig. 7)。これは、ノンアスリートよりも一般アスリートの注意資源の量 (能力) が大きく、空間的注意機能が高いことが考えられる。また、5° と 15° で比較すると、一般アスリートは neutral 条件時に振幅が大きくなっているのに対して、ノンアスリートは振幅が小さくなっている。5° と 15° で比較では、手がかりがある valid 条件および invalid 条件時には、ノンアスリートも振幅が大きくなっている。視野が広く (15°)、手がかりがない場合 (neutral 条件)、一般アスリートは注意資源の配分を空間的注意に大きく割くことができるが、ノンアスリート

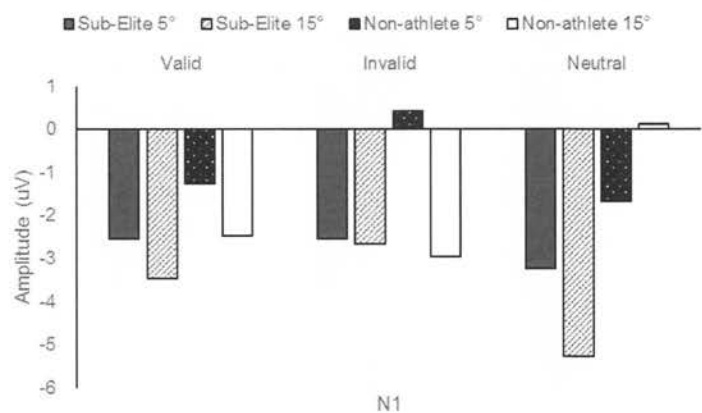


Fig. 7. The mean amplitude of the ERP N1 at Fz in each condition for sub-elite and non-athlete.

は注意資源をうまく対象空間に分配できていない可能性がある。これは保有している注意資源の量 (能力) が異なることに起因しているものと推察される。今回得られた結果より、アスリートは、より広範な空間に注意資源を配分することで、広視野内の視覚情報をすばやく得て、それを高次元なパフォーマンス発揮に活かしていることが分かった。なお、これらの研究成果の一部結果については、European Conference on Visual Perception (ECVP 2019)において、「Differences in the spatial attention of fencers and non-athletes」として報告する。以上、2か年の研究成果については、競技力向上を目指したトレーニング法の開発やスポーツタレントの発掘テストの手法へとつなげていきたい。具体的には、バーチャルリアリティ (VR) を利用したトレーニング方法も提案され始めており、本プロジェクトメンバーも VR を利用したトレーニング法の構築を進めているため、本研究成果をそのプログラム作成につなげることを目指して研究を進める。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31 年 4 月 8 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 今 井 健 一



所属・資格 歯学部 ・ 教授

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 EBV 関連難治性疾患の発症機序の解明と新規治療法開発に向けた研究拠点形成		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 今井 健一	歯学部/教授	研究の立案と統括
○研究分担者 武井 正美 金子 忠良 八田 善弘 武市 収 北村 登 神尾 宜昌 高井 英樹	医学部/教授 歯学部/教授 医学部/教授 歯学部/准教授 医学部/准教授 歯学部/准教授 松戸歯学部/専任講師	関節リウマチの臨床及び動物モデル研究 EBV 関連リンパ腫と歯周病の免疫組織学的解析 腫瘍化機序の解明と臨床データ解析 EBV 感染細胞の生化学的及び免疫組織学的研究 関節リウマチ関連リンパ腫の臨床研究 EBV の分子生物学的研究 歯周病の臨床及び動物モデル研究
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
1) 今井 健一 基盤研究 C 採択(2019-2021 年): EB ウイルス感染制御を基盤とした新規歯周病予防・治療戦略の確立		
2) 神尾 宜昌 基盤研究 C 採択(2018-2020 年): 口腔細菌の制御を基盤としたインフルエンザ予防戦略の確立に向けた基礎的研究		
3) 高井 英樹 基盤研究 C 採択(2018-2020 年): miRNA の発現調節による歯周組織構成細胞の分化誘導析		
4) 今井 健一 研究助成金 (2018-2019 年) (一丸ファルコス株式会社)		

※「6 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：今井 健一

4 研究目的

歯周疾患と関節リウマチは、共に骨破壊を伴う難治性の炎症性疾患であるが、その病因は未だよく解っていない。申請者らはこれまでに、Epstein-Barr virus (EBV)が両疾患の発症に関与していることを報告してきた。また、本邦で初めて見出された老人性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫においては、EBV 陽性例が予後不良であること、さらに、メトトレキサート(MTX)投与中の関節リウマチ患者に認められるリンパ腫の発症においても、EBV が関与していることを明らかにしてきた。昨年からは新たに、血管内大細胞性リンパ腫の発症と EBV の関連についても研究を進めている。

世界に類を見ない早さで高齢化が進むとともに EBV 感染が多いわが国では、いずれの疾患においても罹患率の上昇と重症度の高い患者が増加することは確実で、病因の解明をはじめとする早期の対策が求められている。しかし、EBV によって上記の疾患がどのように発症・進行するのかはほとんど解っていない。EBV は霊長類にしか感染しないため通常の動物実験が行えないことから、EBV 感染症の個体レベルでの解析や治療法開発に関する研究は世界的に遅れている。

本プロジェクトでは、加齢とともに増加する EBV 関連難治性疾患の病因解明と新規治療法の開発を目指すことを目的とし、ウイルス学、歯周病学、リウマチ学及び血液・腫瘍学の専門家が研究グループを形成、基礎から動物、臨床研究に至るまで一貫性を持って EBV 研究を進めている。1つの病原微生物に焦点を当てた新規性の高い研究のため、本学が EBV 感染症研究の拠点となり得る。さらに、研究の推進を通して、大学院生を含む若手研究者の育成と国民の健康増進、ならびに EBV が関与する胃癌等他の悪性腫瘍や潰瘍性大腸炎などの難病研究の発展にも貢献できると考える。

5 研究概要

EBV 感染症という共通の特徴を踏まえ、歯学部、医学部、及び松戸歯学部の研究者が共同または連携して研究を進め、今年度は主に以下の結果を得た。

1) 歯周病と根尖性歯周炎発症における EBV 関与の解明 (特に EBV LMP1 と細菌との相互作用について)

申請者らは、本邦で初めて歯周病及び根尖性歯周炎患者の患部から EBV が検出されること、また世界に先駆けて歯肉と滑膜組織に EBV の RNA(EBER)が認められることを発見し、EBV と両疾患との因果関係を示してきた。しかし、EBV がどのように炎症性疾患の発症に関与をしているのかについては報告がない。今回、歯周病、インプラント、及び根尖性歯周炎患部の EBV LMP1 量と病気の進行度との関連性が明らかとなり、EBV の関与がより明確となった。また、LMP1 が炎症性サイトカインを強く誘導すること、LMP1 による NF- κ B 活性化に、LMP1 の CATR2 領域が必須であることを新たに見出した。歯周疾患の予防と治療戦略を考える上で、細菌のみならずウイルスをターゲットにする必要性を提示することができた。

2) 血管内大細胞性リンパ腫 (IVL) 発症と EBV との関連研究

IVL は血管内に浸潤し腫瘤を形成しないため発熱などの非特異的症状を呈する稀な悪性リンパ腫で予後不良であるが、その臨床病理学的背景は明らかとなっていない。また、EBV の関連する血球貪食症候群はしばしば悪性リンパ腫に進展しその予後も不良である。血球貪食症候群を合併する「日本型」を含む IVL について EBV との関連を検討した結果、解析した症例においては MYC 遺伝子関連の染色体転座と EBV EBER が認められないことを示した。

3) ヒト免疫化マウスを用いた関節リウマチ研究及び新規治療法に関する基礎的研究

MTX 投与により発症するリンパ増殖性疾患(LPD)における EBV の関与を調べた結果、MTX 投与により、程度は軽い EBV 感染 NOG マウスが LPD を発症することが解った。また、Daudi 細胞をもちいた分子生物学的研究から、MTX により EBV が再活性化する可能性を示した。

実施研究所：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

①歯周疾患における EBV 感染と病気発症との関連性の解明

申請者はこれまでに、EBV 感染、及び EBV の Latent membrane protein 1 (LMP1；細胞増殖、及びがん化促進に関与する蛋白) が、歯肉や歯槽骨の破壊を促進する炎症性サイトカインを大量に誘導することを見出している。LMP1 の発現レベルは EBV の感染状態に深く関与している。従って、LMP1 に着目し歯周疾患発症と進行における EBV の重要性を明確にするための研究を進め、以下の結果を得た。

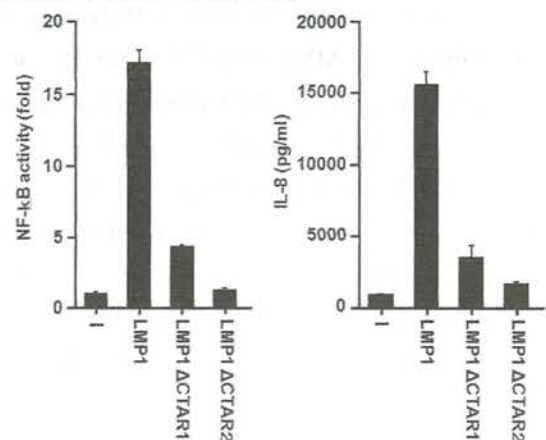
1) 歯周病、人工の歯根 (インプラント)、及び根尖性歯周炎の患部からから EBV の DNA を通法に従い抽出しリアルタイム PCR にて LMP1 量を定量した。その結果、病気の進行程度 (出血や歯の揺れ具合) と LMP1 量との関連性が明らかとなった。また、EBV 感染細胞を分離し、LMP1 特異抗体を用いた免疫組織学的解析を行った結果、患部において LMP1 陽性細胞が多数認められた。

我々は以前の報告で、歯周病原菌の代謝産物が潜伏感染 EBV を活性化することを報告している。今回、実際の歯周病患者の唾液において、潜伏 EBV が再活性化されるか否かの検討を行った。EBV 潜伏感染細胞株 B95 細胞に、健常者及び歯周病患者から採取した唾液 (10 検体ずつ) を添加した結果、歯周病患者の唾液により、ウイルスの再活性化状態を示す EBV の転写因子：BZLF1 の発現がウェスタンブロット及びリアルタイム PCR において認められた。現在、検体数を増やすと共に、唾液中の代謝産物と歯周病原菌の解析を進めている。

2) LMP1 による炎症性サイトカイン (IL-8, TNF- α , IL-6 等) の発現には NF- κ B が重要な役割を演じていることが、NF- κ B 阻害剤、及び NF- κ B レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ、さらにはウェスタンブロットによる NF- κ B p65 の核内移行と I κ B α の分解から明らかとなった。さらに、LMP1 による詳細な NF- κ B 活性化機構について種々の変異型 LMP1 を用いて検討した。実験の結果、LMP1 中の C-terminal activating region (CATR) domains、特に TRADD 結合領域である CATR2 領域が NF- κ B の活性化のみならず、炎症性サイトカイン産生に必須であることが明らかとなった (右下図参照)。さらに、LMP1 及び EBV を治療標的とした基礎的研究も進めた。申請者らが新たに発表し特許申請も行った植物由来の抗炎症物質：シナロピクリンの効果を検討した結果、シナロピクリンは濃度依存的に LMP1 誘導性の炎症性サイトカイン産生を抑制した。また、シナロピクリンは NF- κ B P65 のリン酸化と I κ B α の分解を阻害することが解った。

3) 臨床研究から、日本人の慢性歯周炎部位で高い EBV および *P. gingivalis* ゲノムコピー数が認められ、EBV と *P. gingivalis* が共存して歯周組織の破壊に関与する可能性を報告してきた。今年度は、*P. gingivalis* と EBV の歯周治療前後の変化と臨床パラメータとの関係についての研究を行った。初診時、慢性歯周炎患者 17 名の同一口腔内からアタッチメントロスのない 3 mm 以下の PPD (ポケット深さ) 部位 (健常部位) と、5 mm 以上の PPD が有り、エックス線上で骨吸収を認める部位 (歯周病変部位) から、滅菌ペーパーポイントで 30 秒間、3 回歯肉溝滲出液 (GCF) を採取した。

また、初診から約 6 か月後の歯周基本治療終了時に、同部位から再度 GCF を採取し、DNA を抽出した。基本治療前後における *P. gingivalis* および EBV DNA ゲノムコピー数を real time PCR で定量した。その結果、歯周基本治療後に、健常部位と比較して歯周病変部位での *P. gingivalis* および EBV DNA ゲノムコピー数の減少



実施研究所名：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

研究結果（つづき）

が認められた。一方、BOPまたはPPDの改善が認められなかった症例では、*P. gingivalis* と EBV の減少も認められなかった症例が複数例あった。興味深いことに、EBV は健常部位において、初診時 9 部位(52.9%)から基本治療終了時 5 部位(29.4%)、病変部位においては初診時 13 部位(76.5%)から基本治療終了時 9 部位(52.9%)といずれも検出率が減少した。*P. gingivalis* は、健常部位において初診時 14 部位(82.3%)から基本治療終了時 13 部位(76.5%)、病変部位においては初診時 14 部位(82.3%)から基本治療終了時 10 部位(58.8%)であった。

以上の結果から、基本治療前後の *P. gingivalis* と EBV のコピー数、及び検出率の減少が臨床パラメータの改善に関与していると考えられ、歯周病の予防と治療戦略を考える上で、細菌のみならずウイルスをターゲットにする必要性を提示することが出来た。

4) 根尖性歯周炎の発症と進展における EBV 関与に関する研究も進めた。歯周病同様、患部において細菌とウイルスの微生物間相互作用、すなわち細菌による EBV 活性化が考えられたため、*Fusobacterium nucleatum* (ATCC25586 株)、*Staphylococcus epidermidis* (IID886 株)、*Streptococcus mitis* (ATCC49456 株)、*Prevotella intermedia* (ATCC25611 株)、*Actinomyces naeslundii* (ATCC12104 株) の培養上清を調整し、EBV BZLF1 の発現を Real-time PCR とウェスタンブロットにて、BZLF1 活性化はルシフェラーゼアッセイを行い検討した。その結果、*F. nucleatum* と *P. intermedia* の培養上清において BZLF1 の発現が認められ、その活性化量は細菌量と比例していることが解った。また、*F. nucleatum* は EBV 潜伏感染細胞 Daudi の H3 アセチル化を促進することで、クロマチンのリモデリングを誘導していることも明らかとなった。

以上、歯周病と根尖性歯周炎における EBV 関与機構の解明は、これまで細菌感染のみでは説明が困難であった両疾患発症機序の解明に繋がる可能性がある。

② 血管内大細胞性リンパ腫(intravascular large B cell lymphoma, IVL)発症と EBV との関連研究

血管内大細胞性リンパ腫は、診断困難でさらに中枢神経浸潤などもともなうため予後不良なリンパ腫である。血球貪食症候群を合併する「日本型」を含む血管内大細胞性リンパ腫について、EBV との関連を含めて臨床病理学的解析を以下の方法で行った。2004 年から 2018 年までに診断された血管内大細胞性リンパ腫を対象とし、血球貪食症候群の診断は HLH-2004 の基準に従った。MYC、BCL2、CD10、BCL6、MUM1、CD5 の免疫染色を行い、MYC 陽性率は 40%未満、40-60%、60%以上をそれぞれ-、+、++と判定した。EBV については EBV early RNA(EBER) in situ hybridization を施行した。その結果、10 例 (59%) に血球貪食症候群が合併していた。全例に R-CHOP 化学療法を行い 71%の症例に完全寛解を得た。無進行再発期間は 26 ヶ月であり、中枢神経再発は 5 例(29%)に認められた。MYC-、+、++はそれぞれ 3 例 (18%)、7 例 (41%)、7 例 (41%) であった。検索した範囲では MYC 遺伝子関連の染色体転座は認められなかった。興味深いことに今回の症例では EBER は全例で陰性であり、MYC-の 3 例は寛解を持続していた。EBV が MYC を活性化することや血球貪食症候群を生じることが周知の事実であるため、検体数を増やし血管内大細胞性リンパ腫の発症や血球貪食症候群の合併における EBV 関与の解明を進めて行く。

実施研究所名：歯学部総合歯学研究所

氏名：今井 健一

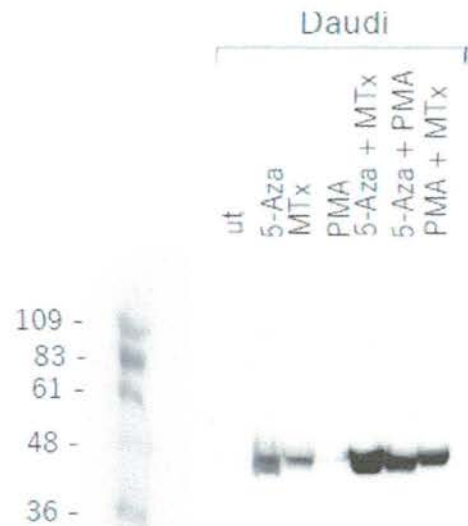
研究結果（つづき）

③ ヒト免疫化マウスを用いた関節リウマチ研究及び新規治療薬に関する基礎的研究

EBVは霊長類のみにしか感染しないため、動物実験が困難である。この点を克服するため我々は、ヒト臍帯血由来幹細胞を免疫不全マウス(NOGマウス)に移植し、ヒト化した後EBVを感染させる事でびらん性関節炎や歯周炎の発症を引き起こし、病気の発症のみならずメソトレキサート(MTX)をはじめとする薬剤の効果等の解析を進めてきた。今年度は、本マウスを用いてLMP1や炎症性サイトカインの中和抗体及び、新規の抗炎症物質を投与することにより、EBVを治療標的とする新規治療法開発の分子基盤を得るための基礎的研究を進めた。また、関節リウマチにおけるMTXとEBVの関係について以下の結果を得た。

MTXは関節リウマチの第一選択薬として知られているが、MTX投与によりリンパ増殖性疾患(LPD)が発症する事が報告されている。その発症にEBVが関与していると言われているが、現在そのメカニズムを直接証明した報告はない。そこで、昨年来からNOGマウスを用いた免疫組織学的研究、及びEBV細胞株を用いた分子生物学的研究を進めた。その結果、EBVがLPDを発症する事が種々の実験系から明らかとなった。また、MTX投与により現状では程度は軽いEBV感染NOGマウスがLPDを発症する事も証明することができた。MTXが実際にどれくらいEBVを再活性化するか否かを、EBVの細胞株を用いて再活性化度合いを検討した。具体的には、Akata、Raji細胞では抗ヒトIgGで刺激をした後、MTXを添加した共培養を、Daudi細胞では5-Azaで刺激した後、MTXを添加する共培養を行い、EBVの再活性化の指標である抗EBV EA IgGが発現するか否かをWestern Blottingを用いて検討した。その結果、AkataとRaji細胞では抗ヒトIgGで刺激をすると、EBV EA IgG発現が誘導されたが、MTX添加によりその発現は増強されることはなかった。一方、Daudi細胞では5-Azaで刺激によるEBV EA IgG発現は、MTX添加により増強されたことから、MTXによりEBVが再活性化される可能性があることが示唆された(右図参照)。

今後RT-PCRを用いてEBV RNAの発現の有無を検討することで、MTX添加によるEBVの再活性化を詳細に検証する予定である。また、細胞株によるEBV再活性化発現の相違についての検証についても今後の検討課題として引き続き検証していく。



注：課題番号を記入してください。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成31年 4月 22日

日本大学学長 殿

氏 名 小方 頼昌



所属・資格 松戸歯学部・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 松戸歯学部口腔科学研究所

1 研究課題		
歯周病の発症と進行への miRNA の役割の解明		
2 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 小方 頼昌	松戸歯学部・教授	研究立案、細胞培養と総括
○研究分担者		
鈴木 直人	歯学部・教授	パスウェイ解析、遺伝子データベース解析
中山 智宏	生物資源科学部・教授	遺伝子データベース解析
田邊 奈津子	歯学部・准教授	ELISA、ウェスタン解析
中山 洋平	松戸歯学部・准教授	免疫組織化学的解析、リンフェラーゼアッセイ
鈴木 由紀	生物資源科学部・准教授	マイクロアレイ解析、DNA 抽出
神尾 宜昌	歯学部・准教授	トランスフェクション実験、ELISA
目澤 優	松戸歯学部・専任講師	免疫組織化学、リアルタイム PCR、細胞培養
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
糖尿病でのフルクトース過剰摂取が歯周病増悪因子となる可能性を調べる研究 田邊奈津子 基盤研究(C) 2018~2021 (採)		
アメロチンによる歯肉接合上皮を介した歯面接着作用の歯周病治療への応用 中山洋平 基盤研究(C) 2018~2021 (採)		
miRNA の発現調節による歯周組織構成細胞の分化誘導 高井英樹 基盤研究(C) 2018~2021 (採)		
口腔細菌の制御を基盤としたインフルエンザ予防戦略の確立に向けた基礎的研究 神尾宜昌 基盤研究(C) 2018~2021 (採)		
NP を巻くインフルエンザウイルスの vRNA 分節はどのように相互作用を起こすのか 鈴木由紀 基盤研究(C) 2018~2021 (採)		
鳥インフルエンザウイルスのダイナミックなゲノム深化機構の解明 鈴木由紀 新学術領域研究 (研究領域提案型) 2019~2021 (採)		

※「6 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：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名： 小方 頼昌

4 研究目的

細菌因子、宿主因子、環境因子は、歯周病のリスク因子であり、相互作用により歯周病の発症と進行に関与する。MicroRNA (miRNA) は、標的遺伝子の発現を抑制する長さ約 22 塩基の 1 本鎖ノンコーディング RNA で、発生、形態形成、細胞増殖、ガン、炎症等の様々な疾患に関与する。Toll-like receptor 4 (TLR4) 遺伝子の+3725 塩基対部位に存在する 1 塩基多型が、日本人の慢性歯周炎に関係する可能性が報告された (Fukusaki *et al.*, J Periodont Res, 42: 541-545, 2007)。我々はこの結果から、TLR4 遺伝子の+3725 塩基対部位の 1 塩基多型は、3'側非翻訳領域 (3'-UTR) に存在し、同部位への miRNA の結合を介して TLR4 の発現と歯周炎の発症に関連する可能性を報告した (Sato *et al.*, J Biol Chem, 284: 25163-25172, 2012)。本研究では、歯周炎の発症と進行に関与する miRNA の解析とそのメカニズムを解明するために、炎症歯肉と健康歯肉で発現する遺伝子の違いをマイクロアレイで検索する。*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学を併用して、歯周炎発症と進行に関与する遺伝子と miRNA を同定し、新たな診断基準となる病因論の解明と新規治療法開発に向けた分子基盤を構築する。

miRNA マイクロアレイと DNA マイクロアレイに、同じ全 RNA を使用して、歯周炎歯肉組織で発現が変化する miRNA と遺伝子を網羅的に解析し、歯周炎の発症と進行に関与する miRNA と遺伝子を同定して、相互関係を明らかにすることが、本研究の学術的な特徴である。また、炎症性歯肉中の miRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで、関連タンパク質発現を、免疫組織化学で解析することで、miRNA と炎症関連タンパク質の局在および発現細胞を明らかにできると考える。miRNA は、遺伝子発現を抑制するため、どのようなメカニズムで歯周病に関与するのか (直接的、間接的に種々の遺伝子発現を介して関与するのか?) を解析することは困難であると予想される。しかし、miRNA と DNA マイクロアレイ解析後に、GeneSpring GX を用いてデータ解析し、さらに、遺伝子ネットワーク、情報伝達系のデータベースである Ingenuity Pathways Analysis (IPA) で解析することで、歯周炎の発症と進行に重要な遺伝子ネットワークおよび情報伝達系を解明することを最終的な目的とする。歯周病と miRNA の関係に関する研究は少なく、独創的で、意義は大きく、成果が期待できると思われる。

5 研究概要

miRNA と歯周炎の関係を解明するため、多角的に系統立った研究を以下の様に進める。

1. 歯周炎で発現が変化する miRNA を、炎症および非炎症性歯肉を用いた miRNA マイクロアレイで解析し、その解析結果を、リアルタイム PCR で定量的に再確認する。
2. miRNA マイクロアレイ解析と同じ全 RNA を使用して、DNA (エクソン発現解析用) マイクロアレイを行い、その結果をリアルタイム PCR で定量的に再確認する。
3. 2つのマイクロアレイの結果から、歯周炎で発現が変化する miRNA と関連遺伝子を、GeneSpring GX ソフトウェアおよび遺伝子ネットワーク、情報伝達系を解析できるデータベースの Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いて炎症と関連する遺伝子ネットワーク、情報伝達系を解析する。
4. 炎症歯肉組織で増加または減少した miRNA 遺伝子を挿入した発現プラスミドを構築し、細胞内で miRNA を過剰発現させる。または、miRNA インヒビターを用いて miRNA の発現を抑制し、さらに炎症性サイトカインで刺激することで、炎症歯肉組織内の環境を再現し、炎症関係遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で解析する。タンパク質発現に関しては Western Blot を用いて解析する。
5. 歯周外科手術時に切除除去した炎症性歯肉中の miRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) で解析する。miRNA の作用で発現が変化する関連タンパク質発現は、免疫組織化学で解析する。歯肉組織中での miRNA と炎症関連タンパク質の局在および発現する細胞を明らかにする。

以上の研究成果を総合して、歯周病の診断基準の基となる新しい病因論の解明と新規治療法開発に向けた分子基盤を構築したいと考える。

実施研究所：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名： 小方 頼昌

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

我々のグループは、骨芽細胞の分化に関与する転写因子の働きとその発現変化に興味を持ち、研究を続けてきた。その中で、骨芽細胞の分化に重要な働きを持つ塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF2) と cAMP 刺激による、細胞内転写因子と骨シアロタンパク質 (BSP) の発現変化に関して報告した (Shimizu *et al.*, *J Biol Chem*, 276: 5459-5466, 2001. Samoto *et al.*, *J Biol Chem*, 278: 28659-28667, 2003. Shimizu *et al.*, *Bone*, 39: 42-52, 2006)。さらに、DNA マイクロアレイを用いて、骨芽細胞に対する FGF2 と cAMP の効果を網羅的に解析して報告した (Nakayama *et al.*, *J Oral Sci*, 54: 251-259, 2012)。これらの研究を通して、マイクロアレイの研究手法を習得した。また、歯周外科手術時に切除除去した炎症性歯肉とインプラント手術時に切除した非炎症性歯肉から全 RNA を抽出し、両歯肉組織での miRNA の発現量の違いを miRNA マイクロアレイで解析した。炎症性歯肉で最も発現が増加した3つの miRNA は、miR-150、miR-223 および miR-200b であった。一方、最も発現が減少した3つの miRNA は、miR-379、miR-199a-5p および miR-214 であった (Ogata *et al.*, *J Oral Sci*, 56: 253-260, 2014)。韓国のグループから、炎症および非炎症性歯肉を比較した同様の解析結果が報告されたが、炎症性歯肉組織で発現が増加または減少した miRNA は、我々の解析結果と全く異なる結果であった (Lee *et al.*, *Biocell*, 35: 42-49, 2011)。一方、中国と米国のグループからの解析結果は、miR-223 に関して我々の解析結果と共通していた (Xie *et al.*, *Int J Oral Sci*, 3: 125-134, 2011, Stoecklin-Wasmer *et al.*, *J Dent Res* 91; 33-38, 2012)。miR-223 は、血小板から分泌され、終末糖化産物により誘導される血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、ガン、炎症、2型糖尿病、リウマチ、自己免疫性疾患等に関与することから、歯周病への関与が示唆される。miR-150 の過剰発現は、インバリアント NKT (iNKT) 細胞の減少を引き起こす。リウマチ、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症等の自己免疫性疾患では、iNKT 細胞の減少が認められることから、miR-150 の自己免疫性疾患への関与が示唆される。2型糖尿病マウスの血管平滑筋細胞 (VSMC) では、炎症性サイトカインと miR-200 の発現が増加しており、miR-200b は E-box 結合転写抑制転写因子である Zeb1、NF κ B 複合体の阻害剤である I κ B タンパク質をリン酸化する IKK β を抑制し、炎症反応を調節することが報告されている。

miR-223 または miR-200b 発現プラスミドをヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に導入し、IL-1 β (1 ng/ml) または TNF- α (10 ng/ml) で 24 時間刺激後、全 RNA およびタンパク質を抽出した。炎症性サイトカインである IL-1 β および IL-6、miR-223 の標的遺伝子である I κ B kinase α (IKK α) および mitogen-activated protein kinase phosphatase 5 (MKP-5)、miR-200b の標的遺伝子である IKK β 、Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1)、Cadherin1(CDH1)、Cyclooxygenase 2 (COX-2) の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR で、タンパク質発現レベルを ELISA またはウエスタンブロット法で検索した。

HGF を IL-1 β 、IL-6 または TNF- α で刺激すると、miR-223 の発現量が有意に増加した。この結果は、炎症歯肉と健康歯肉を比較した miRNA マイクロアレイの結果と一致した。

HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、IL-1 β と IL-6 の mRNA 量は増加し、miR-223 を過剰発現させると、IL-1 β と IL-6 の mRNA 量はさらに増加した。HGF での IL-1 β と IL-6 の mRNA 量は、IL-1 β または TNF- α 刺激で増加し、miR-223 インヒビターを導入すると、IL-1 β および IL-6 の mRNA 量は有意に減少した。HGF を IL-1 β 刺激すると IL-1 β および IL-6 タンパク質が増加し、miR-223 を過剰発現させると、IL-1 β および IL-6 タンパク質さらに増加した。

miR-223 の標的遺伝子である MKP-5 の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現させると減少したが、IKK α の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現しても変化しなかった。しかし、Western blot の結果から、miR-223 を過剰発現させると IKK α のタンパク量は減少した。また、miR-223 の過剰発現で、p38MAPK のリン酸化が促進された。以上の結果から、miR-223 は IKK α の発現を、mRNA の分解ではなく、翻訳阻害のプロセスで発現を抑制すると考えられた。IL-1 β と TNF- α 刺激で増加した IL-1 β および IL-6 の発現は、miR-223 が NF- κ B の活性を抑制する IKK α と p38MAPK のリン酸化を抑制する MKP-5 を阻害することでさらに増加したと考えられた (Matsui and Ogata, Effects of miR-223 on expression of IL-1 β and IL-6 in human gingival fibroblasts. *J Oral Sci*, 58: 101-108, 2016)。

実施研究所名：

氏名： 小方 頼昌

研究結果 (つづき)

HGF を IL-1 β 、IL-6 または TNF- α で刺激すると、miR-200b の発現量の有意な増加が認められ、この結果は、炎症歯肉と健康歯肉を比較した miRNA マイクロアレイの結果と一致した。

HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、IL-6 と IL-1 β の mRNA 量は増加し、両刺激と同時に miR-200b を過剰発現させると、増加した IL-1 β と IL-6 の mRNA 量は有意に抑制された。HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、IL-6 のタンパク質発現量は増加し、両刺激と同時に miR-200b を過剰発現させると、増加した IL-6 のタンパク質発現量は有意に抑制された。HGF を IL-1 β または TNF- α 刺激すると、IL-6 の mRNA 量およびタンパク質発現量は増加し、miR-200b インヒビターを導入すると、IL-6 の mRNA 量およびタンパク質発現量はさらに増加した。

HGF を IL-1 β または TNF- α で刺激すると、miR-200b の標的遺伝子である IKK β の mRNA 量は有意に増加するが、miR-200b の過剰発現で減少し、miR-200b インヒビターの導入では有意に増加した。IKK β のタンパク質量をウェスタンブロットで解析した結果、IKK β のタンパク質量は miR-200b の過剰発現で減少し、miR-200b インヒビターの導入で増加した。ZEB1 mRNA 量およびタンパク質発現量は、miR-200b の過剰発現で減少し、E-カドヘリン mRNA 量およびタンパク質発現量は、miR-200b の過剰発現で増加した。また、COX-2 mRNA 量は、IL-1 β または TNF- α で刺激すると有意に増加し、miR-200b を過剰発現させると、有意に抑制された。

以上の結果から、miR-200b は IKK β 、ZEB1 および COX-2 の発現を抑制し、E-カドヘリンの発現を増加させた。IL-1 β と TNF- α 刺激で増加した IL-1 β および IL-6 の発現は、miR-200b が NF- κ B の活性化を促進する IKK β を抑制したこと、減少したと考えられた。さらに、ZEB1 および COX-2 の発現が減少することで、炎症反応が抑制されると考えられた (Matsui *et al.*, MicroRNA attenuates Il-6 production through IKK β and ZEB1 in human gingival fibroblasts. *Inflammation Res* 67 965-973, 2018)。

接合上皮は、ヘミデスモゾームを介してエナメル質に付着する非角化の歯肉上皮であり、ポケット底部に位置するため、細菌感染のバリアーとしての機能を有すると考えられる。接合上皮に発現するタンパク質やそれらの機能についてはほとんど解明されていなかったが、近年、接合上皮に発現するタンパク質として amelotin (AMTN)、odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM)、follicular dendritic cell secreted protein (FDC-SP) 等が発見された。我々は、炎症性歯肉と非炎症性歯肉から全 RNA を抽出し、両歯肉組織での遺伝子発現量の違いを DNA マイクロアレイで解析した結果、AMTN と ODA M の遺伝子発現が炎症歯肉で有意に増加したことを報告した (Nakayama *et al.*, Proinflammatory cytokines induce amelotin transcription in human gingival fibroblasts. *J Oral Sci*, 56: 261-268, 2014)。さらに、接合上皮での AMTN、ODAM および FDC-SP の発現と局在が炎症に伴い変化することを免疫組織化学的に解析した (Nakayama *et al.*, *Odontology*, 105: 329-337, 2017)。

ヒト上皮細胞での AMTN の遺伝子発現は炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β で上昇すること、FDC-SP の遺伝子発現は、ヒト上皮細胞では TNF- α で増加するが IL-1 β ではほとんど増加しないことを報告した (Yamazaki *et al.*, *Inflamm Res*, 67: 351-361, 2018. Iwai *et al.*, *Genes Cells*, 23: 161-171, 2018. Noda *et al.*, *J Oral Sci*, in press, 2018. Yamazaki *et al.*, *FEBS Open Bio*, in press, 2018)。現在、接合上皮発現タンパク質の機能を解析するために、炎症時の AMTN、ODAM、FDC-SP 遺伝子およびタンパク質の発現が miRNA によってどの様に調節されているかの解析を行っている。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和元年 5月 9日

日本大学学長 殿

氏 名 福田 昇



所属・資格 総合科学研究所・教授

下記のとおり報告いたします。

実施研究所 総合科学研究所

1 研究課題 日本大学方式 iPS 細胞誘導法と疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発					
2 研究組織					
氏 名	所属部科校・資格	役割分担			
○研究代表者名 福田 昇	総合科学研究所・教授	研究の総括、疾患特異的 iPS 細胞を用いた腎疾患診断法の臨床試験			
○研究分担者 舩廣善和	生物資源科学部応用生物科学科・准教授	スタビロンによる iPS 細胞誘導			
阿部雅紀	医学部腎臓高血圧内分泌内科・教授	TGF-β1PI ポリアミドによる高効率 iPS 細胞誘導法の確立			
合計 3 名					
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況					
制度名	研究課題名	研究者	研究費	申請年度	採・否
科学研究費新学術領域研究	線維性疾患への PIP の創薬開発研究	福田昇 (代表)	3,000 万円/年	令和 1-5 年度	申請中
科学研究費国際共同研究強化 (B)	TGF-β1 に対するピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドの日中共同創薬開発	福田昇 (代表)	650 万円/年	令和 1-3 年度	申請中
AMED 腎疾患実用化研究事業	進行性腎障害に対する TGF-β1 ピロール・イミダゾールポリアミド (PIP) の創薬開発	福田昇 (代表)	800 万円/年	令和 1-3 年度	不採択
科学研究費基盤研究 (B)	副腎 Functional zonation 異常による特発性アルドステロン症の発症	福田昇 (代表)	600 万円/年	令和 1-3 年度	不採択
科学研究費基盤研究 (C)	多発性嚢胞腎の疾患特異的 iPS 細胞由来腎集合管細胞の機能解析と治療薬の探索	福田昇 (分担) 阿部雅紀 (分担)	150 万円/年	平成 30-令和 2 年度	採択
科学研究費基盤研究 (C)	胎児期低栄養による腎障害および高血圧発症メカニズムの解明	福田昇 (分担)	150 万円/年	平成 30-令和 2 年度	採択
科学研究費基盤研究 (C)	糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬 TGF-β1 PI ポリアミドの抑制効果の検討	阿部雅紀 (代表) 福田昇 (分担)	150 万円/年	平成 29-令和 1 年度	採択
科学研究費基盤研究 (C)	日焼けによるがん予防法の確立に必要な指標となる分子機構の解明	舩廣善和 (代表)	165 万円/年	令和 1-3 年度	不採択
科学研究費基盤研究 (C)	抗酸菌の防御における細胞性免疫応答の解析と新規ワクチン開発	舩廣善和 (分担)	150 万円/年	令和 1-3 年度	採択

※「6 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：総合科学研究所

氏名：福田 昇

4 研究目的

1) 日本大学方式 iPS 細胞誘導法開発

iPS細胞はウイルスとプラスミド遺伝子にて誘導される為、発癌の問題が解決出来ていない。我々はこれまでウイルスとプラスミド遺伝子を用いない安全なiPS細胞誘導法を医学部と生物資源科学部との共同研究を行っており、福田が特許化したTGF- β 1に対するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドにて高効率iPS細胞誘導に成功した(Saito K, Fukuda N et al. Int J Biochem Cell Biol 2015に掲載)。また舩廣らが開発した高効率蛋白導入因子スタピロンにてiPS誘導山中4因子を蛋白としてヒト線維芽細胞に導入し、iPS化を検討しマウスのiPS細胞化に成功した。今回、この総合研究ではTGF- β 1に対するPIポリアミドとスタピロンの組み合わせにより安全な日本大学方式のヒトiPS細胞誘導法を確立し、進行性腎障害への再生医療に繋げる。

2) 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発

遺伝性疾患の患者からのiPS細胞は遺伝子異常を保ったまま目的の細胞に分化出来る。我々は遺伝性尿細管疾患患者から疾患特異的iPS細胞から尿細管上皮細胞に分化させ、その機能を検討する診断法の確立を目的に、医学部附属臨床研究審査委員会に「腎尿細管疾患患者末梢血T細胞から樹立したiPS細胞由来腎尿細管細胞の機能解析研究」で申請し、患者のiPS細胞由来腎尿細管細胞の確立を行っているが、問題は未分化iPS細胞が残っている。今回の研究では分化尿細管上皮細胞で特異的糖鎖を指標に未分化iPS細胞除去を確立し、偽性副甲状腺機能低下症患者から誘導したiPS細胞を尿細管細胞に分化させ、PTH負荷でのcAMP増加とリン酸の細胞内取り込みを検討し、実際に臨床応用出来るか評価する。さらに常染色体優性遺伝多発性嚢胞腎、腎性尿崩症患者からのiPS細胞を腎集合管を含むオルガノイドに分化させ、このオルガノイドにて多発性嚢胞腎に対する薬剤の効果、腎性尿崩症に対する薬剤の効果を見出し、それぞれの遺伝子型と合わせて、遺伝性腎疾患の個別医療を確立する。

5 研究概要

1. 日本大学方式 iPS 細胞誘導法開発

iPS細胞はウイルスとプラスミド遺伝子にて誘導される為、生体に対する安全性、発癌の問題が解決出来ていない。我々はこれまでウイルスとプラスミド遺伝子を用いない安全なiPS細胞誘導法を医学部と生物資源科学部との共同研究を行っており、福田が特許化したTGF- β 1に対するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドにて高効率iPS細胞誘導に成功した(Saito K, Fukuda N et al. Int J Biochem Cell Biol 2015に掲載)。また舩廣らが開発した高効率蛋白導入因子スタピロンにてiPS誘導山中4因子を蛋白としてヒト線維芽細胞に導入し、iPS化を検討しマウスのiPS細胞化に成功した。これらの背景から今回、この総合研究ではTGF- β 1に対するPIポリアミドにより高効率iPS細胞化を誘導し、舩廣らが開発したスタピロンを用いてiPS細胞の初期化因子を細胞内に蛋白で導入する事により、より安全な日本大学方式のヒトiPS細胞誘導法の確立を試みた。今後は進行性腎障害への再生医療に繋げていく。

2. 疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝疾患診断法の開発

遺伝性疾患の患者からのiPS細胞は遺伝子異常を保ったまま目的の細胞に分化出来る。我々は遺伝性尿細管疾患患者から疾患特異的iPS細胞から尿細管上皮細胞に分化させ、その機能を検討する診断法の確立を目的に、医学部附属臨床研究審査委員会に「腎尿細管疾患患者末梢血T細胞から樹立したiPS細胞由来腎尿細管細胞の機能解析研究」で申請し、患者のiPS細胞由来腎尿細管細胞の確立を行っているが、問題は未分化iPS細胞が残っている。今回の総合研究では分化尿細管上皮細胞で特異的糖鎖を指標に未分化iPS細胞除去を確立し、偽性副甲状腺機能低下症患者から誘導したiPS細胞を尿細管細胞に分化させ、PTH負荷でのcAMP増加とリン酸の細胞内取り込みの上昇を確認した。次に我々はADPKD患者の末梢血単核球細胞から人工多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立し、腎臓オルガノイドを分化誘導し、腎臓オルガノイドの増殖に対するin vitroでの有効薬剤の評価を行い、遺伝子解析結果との照合により個別医療の確立を目指した。

実施研究所：総合科学研究所

氏名：福田 昇

6 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

1. スタビロンと PI ポリアミドによる日本大学方式 iPS 細胞誘導法開発

平成 29、30 年度渡りに福田、阿部はヒト TGF- β 1 転写抑制 PI ポリアミド(GB1101)によるヒト iPS 細胞誘導の高率化を目的に、ヒト iPS 細胞誘導効率を iPS 細胞様コロニーの割合、遺伝子発現解析、免疫組織化学により評価し、比較検討し、結果として初期化因子を入れる前に充分内因性 TGF- β 1 を抑制することにより、アルカリフォスファターゼ染色での iPS 細胞化効率が約 2 倍になる事を認めた。さらに舩廣との共同で、MTM-Stabilon-初期化因子 (Glis1, Sox2, Oct4, Klf4) の融合タンパク質発現系を確立する為、精製した融合タンパク質とヒト TGF- β 1 プロモーターに特異的な PI ポリアミドを直接細胞に投与し、導入しヒト iPS 細胞を誘導し、得られた iPS 細胞様コロニーの割合をコロニーの作製率、遺伝子発現解析、免疫細胞化学により評価し、既存のヒト iPS 誘導法によるヒト iPS 細胞と比較検討し MTM-Stabilon-初期化因子による iPS 細胞コロニー形成率の向上を確認した。さらに誘導法において、投与するヒト TGF- β 1 シグナリング関連分子特異的 PI ポリアミドの使用濃度や投与のタイミングを検討した結果、事前の PI ポリアミドの投与にて内因性 TGF- β 1 を抑制する事による iPS 細胞コロニー形成率の向上を確認した。さらに作成できたヒト iPS 細胞を何代か継代しつづけ、自己増殖能の維持を確認した。

平成 29、30 年度に舩廣等は、分解耐性型 (Stabilon 融合) 細胞膜透過性山中因子 (Sox2, Oct4, Klf4, Glis1, nanog) の大腸菌による発現系の構築を試みた。発現・精製量は因子によって異なり、Klf4, nanog は発現がよかったが、Sox2, Oct4, Glis1 は発現が悪かった。全体的な傾向としては、スタビロン融合体は発現量が少なかった。また膜透過性タグ (CPP; Cell-penetrating peptide) に関しては、当初 MTM タグ (AAVLLP-VLLAAP) を使用したが、この場合ほとんど細胞膜透過性を示さなかった。これは、MTM タグが脂溶性のため、タンパク質内部に内包され機能しにくいためではないかと考えられた。そこで、次に塩基性アミノ酸のアルギニンからなる 11R を使用した。しかし、これらは大腸菌内での発現が極めて低かった。現在、細胞膜透過性タグに関してはポリヒスチジンタグ (16xHis や 25xHis) に切り替えている。今回発現が低かった Sox2, Oct4, Glis1 に関しては、大腸菌発現系では人工合成遺伝子によるコドンの最適化や、細胞内部発現ではなくペリプラズムへの局在化を検討する。また、プレバチルスによる分泌タンパク質発現系や、動物培養細胞での発現が必要かもしれない。いずれにせよ、発現精製がうまくできたタンパク質から分化細胞 (ヒト線維芽細胞を予定) に導入し、いくつかのケミカル (2i [MAPK 阻害剤, GSK3 β 阻害剤] を中心に) と同時添加で最も簡易かつ効率のよい誘導法の確立を試みたい。

実施研究所名：総合科学研究所

氏名：福田 昇

研究結果（つづき）

2. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝性腎疾患の診断法および治療法の開発

日本大学板橋病院臨床試験審査委員会での承諾の基、遺伝性腎疾患として偽性副甲状腺機能低下症、常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎の患者から同意を得て採血し、末梢血から単核球を分離し、PBMC CM 培地に播種、培養し、翌日山中4因子センダイウイルスベクターを感染させた。その後毎日、ベクターの感染/細胞数のカウントを行った。21日目までにES培地を添加しアルカリホスファターゼ染色でiPS形成の評価を行い、iPS細胞コロニー形成能を確認し、iPS細胞コロニーを液体窒素にストックした。

偽性副甲状腺機能低下症の疾患特異的 iPS 細胞を用いた診断法の開発

Narayana et al. *Kidney Int* 2013; 83:593 の ES 細胞からの尿細管細胞への分化誘導法を基に尿細管細胞誘導をおこなった。方法としては、マトリゲルを氷冷 DMEM と 1:50 で混合し培養液(REGM)と 0.5% FBS、BMP2 (10 ng/ml)、BMP7 (2.5 ng/ml)、activin-A (10 ng/ml)、retinoic acid (0.1 mmol/l) で培養を行い、10日目に尿細管細胞への分化確認 Aquaporin 1 mRNA の real time PCR にて分化を確認した。Aquaporin 1 の発現にて尿細管に分化していたが、未分化マーカーである Nanog の発現が残存未分化 iPS 細胞を示唆し、未分化 iPS 細胞の混入を除去するため、iPS 特異的細胞表面糖鎖を認識する rBC2LCN (Stem Cell Report 2016) に細胞毒(PE23) を結合した試薬を添加し、rBC2LCN-FITC で染色し、染色性の消失にて未分化 iPS 細胞の混入を除去を確認した。尿細管培養細胞への PTH 負荷による cAMP 増加と ³²P-リン酸の細胞内取り込み評価は、予備実験として尿細管細胞に PTH(0,10, 50, 100 nM) を添加し、cAMP の濃度を測定した。PTH は時間依存性に cAMP 濃度を増加した。リン酸の取り込みは PTH 負荷にて、近位尿細管培養細胞で時間依存性、濃度依存性の cAMP 増加と ³²P-リン酸の取り込みを確認した。現在、日大板橋病院に通院中の2名の偽性副甲状腺機能低下症の患者の疾患特異的 iPS 細胞を確立し、PTH 負荷の評価を行う予定である。

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎(ADPKD)の疾患特異的 iPS 細胞を用いた個別医療の開発

ヒト iPS 細胞株からの腎集合管細胞を含む腎臓オルガノイドの誘導 ADPKD は腎集合管細胞が Vasopressin に対し、過剰な増殖を示す疾患を示す疾患であるが、iPS 細胞からの腎集合管細胞の単離培養は技術的に困難である。そこで我々は ADPKD 患者の末梢血単核球細胞から人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を樹立し、腎臓オルガノイドを分化誘導し、腎臓オルガノイドの増殖に対する in vitro での有効薬剤の評価を行い、遺伝子解析結果との照合により個別医療の確立を目指した。同意の得られた ADPKD 患者より末梢血 10 ml を採血した。採取した末梢血より単核球細胞を分離し、Cyto Tune-iPS 2.0 を用いて山中4因子を導入し、ADPKD 疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞より Takasato ら (Nature 2015) の方法に基づき腎臓オルガノイドを分化誘導した。未分化 iPS 細胞を除去する為、rBC2LCN (Stem Cell Report 2016) に細胞毒 (PE23) を結合した試薬を添加した。集合管の構築を確認するため、E カドヘリン、アクアポリン 2、バソプレシン 2 型受容体の免疫染色を行った。結果として採取した血液から単核球を分離、培養し4日後に遺伝子導入し iPS 細胞を樹立できた。iPS 細胞より分化誘導後、18日目に腎臓オルガノイドが形成された。rBC2LCN-FITC 染色陰性、Nanog、OCT4 染色の消失で iPS 細胞の除去を確認した。E カドヘリン、アクアポリン 2、バソプレシン 2 型受容体の各免疫染色は陽性であった。このように ADPKD 患者の末梢血単核球細胞より iPS 細胞を樹立し、腎臓オルガノイドの分化誘導に成功し、形成された腎臓オルガノイドには集合管の構築が確認できた。今後は腎臓オルガノイドへのバソプレシン添加によるサイズの増大を定量し、オルガノイドの増大抑制に有効な薬剤の評価を行っていく。PKD1、PKD2 遺伝子のゲノム解析結果と照らし合わせ、症例数を増やしていくことで ADPKD の個別医療の確立につながると考えられた。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成31年4月18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 研究組織

氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 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（学内） 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

3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

--

※「6 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

4 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・動作認知を継時的に測定し、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者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。

5 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・動作認知を継時的に測定し、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

6 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て、空間・動作認知の継時的測定とトレーニング拠点の構築」

ブラインドサッカーは、アテネ 2004 パラリンピックより「Football 5-a-side」として正式種目となり、日本では 2002 年から強化・普及を行い、パラリンピック出場に向けた研究支援が続けられている。日本のブラインドサッカーに関する研究については、これまでゲーム分析（橋口ほか、2013：坂本ほか、2014）、コーラー・ガイド（大嶽ほか、2013：橋口ほか、2018）、心理的競技能力（橋口、2014：橋口ほか、2018）、筋力・持久力（松井、2015）、鍼刺激の効果（櫻庭ほか、2018）、PK 精度（木下、2018）等の研究成果が蓄積されているが選手のトレーニングに焦点を当てた報告は見当たらない。

この現状から大嶽ほか（2018）は、ブラインドサッカー選手が装着した GPS データから低速度によるプレーが継続していることを明らかにした上で、今後の課題として、短距離での移動速度の向上であることを指摘している。こうした動作の改善が空間・動作認知にも改善を与えると考え、本研究では動き出しの動作、特に 1 歩目と 2 歩目の動作に着目し、その速度向上を目指すことから着手した。その上で、「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」等の観点に加えて、選手の安全を配慮した上で効果的な実現を図る観点から全身振動刺激（Whole Body Vibration :以下、WBV）によるトレーニングを採用した。そこで、本研究はブラインドサッカー選手に対する WBV によるトレーニングがステップ運動の成果に及ぼす影響を検討した。

【方法】

対象者はブラインドサッカークラブに所属する選手 2 名であった（トレーニング施設を利用する選手は他にもいたが、研究発表には 2 名を選定した）。身体特性は表 1 の通りである。対象者には、研究概要、WBV の基本情報、トレーニング課題、ステップ運動課題測定、データの取り扱い、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医師を含めた研究倫理審査委員会の承認を得て実施している。

【トレーニング内容】

本研究は、及び先行研究（安藤ほか、2013）を参考にスクワット、フォワードランジ、サイドランジ、カーブス、フロントプランク、ラテラルプランクの 6 課題と実施時間、周波数、振り幅を設定した。第一段階から第二段階への漸進性は PowerPlate Training Manual を参考にした。実施期間は、前田ほか（2013）を参考に 2 回/週で 8 週間実施した。なお、漸進性を踏まえて、4 週間毎に各課題の実施時間、周波数、振り幅を変更した。トレーニング前後に、スタート音声合図からマットセンサー（DKH 社製）までの各足の到達時間及び接地から離地までの時間を計測した。実施に際して、トレーニング間隔は、Power Plate 社が示す 48 時間以上を厳守した。

表1 選手の身体的特徴

被験者	年齢(歳)	身長(cm)	体重(kg)	筋量(kg)	競技歴(年)
A	28	175.0	87.3	59.2	14
B	20	162.5	57.8	45.2	2
M±SD	24.0 ± 4.00	168.8±6.25	72.6±14.75	52.2±7.00	8.0±6.00

表2 各段階におけるトレーニング課題

○第1段階(4週間)	
1. スクワット	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:L × 2set
2. ランジ	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:L × 2set
3. サイドランジ(左右)	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:L × 2set
4. カーブス	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:L × 2set
5. フロントプランク	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:L × 2set
6. ラテラルプランク(左右)	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:L × 2set
○第2段階(4週間)	
1. スクワット	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:H 上下動 × 3set
2. ランジ	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:H 上下動 × 3set
3. サイドランジ(左右)	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:H 上下動 × 3set
4. カーブス	:30秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:H 上下動 × 3set
5. フロントプランク	:45秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:H × 3set
6. ラテラルプランク(左右)	:45秒・休憩30秒 周波数35Hz 振り幅:H × 3set

研究結果（つづき）

【測定内容】

トレーニング前後で、前方のステップ動作を音刺激とマットスイッチを用いて時間を計測した。測定は図1の方法で実施した。スタート合図音を鳴らし、被験者は前方にあるマットセンサーに素早く移動させ、素早く元の位置に戻るようにした。その際に1歩目の足の指定はせず、被験者自身に任せて測定を行なった。測定項目はスタート合図から1歩目及び2歩目の時間と各足のマットセンサーの接地から離地までの時間を測定した。実施の際、選手が通過したことが自身で把握できるように、投受光器を通過した際には、音が鳴るように設定した。なお、実施の際は周囲の環境に留意した上で、測定を実施した。

【測定機器】

身体組成には Biospace 社製の体組成分析装置 (InBody570) を使用した。また、全身振動刺激装置には Power Plate International 社製の Plate Pro6 を用いた。また、トレーニング成果を評価するためのステップ動作反応には刺激呈示部、マットセンサー、投受光器で構成されるマルチパスシステムII (DKH 社製) を採用した。

【結果】

WBV トレーニング開始前に測定し、結果を平均値±標準偏差で示した。また、トレーニング前後の変化について対応のある t 検定と効果量を算出したスタート合図から1歩目のタイムの平均 $0.568 \pm 0.0006\text{sec}$ 、スタート合図から2歩目が $0.724 \pm 0.0008\text{sec}$ に対して8週間の WBV トレーニング終了時には、スタート合図から1歩目のタイムの平均が $0.403 \pm 0.0068\text{sec}$ 、スタート合図から2歩目が $0.495 \pm 0.041\text{sec}$ ($p < 0.10$) であった (図2, 表4)。また、効果量 (Effect size) についても測定し、スタート合図から1歩目のタイムの平均が -66.515 、スタート合図から2歩目が -61.088 であった。効果量の指標には、Koizumi,R.,and Katagiri,K.(2007)を用いた。その結果、双方共に効果量が Large であった。なお、両名共にステップ動作のタイムの減少率は1歩目は開始時より 29.1%、2歩目は 31.7% であった。また、反応速度の評価として測定したマットスイッチの設置時間は、トレーニング開始前は左足 $0.254 \pm 0.003\text{sec}$ 、右足 $0.243 \pm 0.043\text{sec}$ であったが、トレーニング終了後は、左足 $0.150 \pm 0.04\text{sec}$ 、右足 $0.114 \pm 0.015\text{sec}$ であった (表5)。さらに、継続的に実施した体組成測定を実施したところ、トレーニング開始の平均筋量が 3.2% に対して、終了後は 4.7% にまで増加していた。(表6)

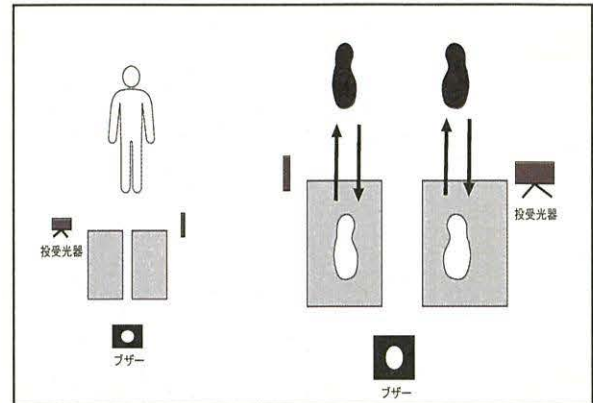


図1 前方ステップ動作の実施



トレーニング課題及び測定の様子

	トレーニング前	第2段階終了	p	Effect Size
スタート合図から1歩目	0.568 ± 0.006	0.403 ± 0.068	0.266	-66.515
スタート合図から2歩目	0.724 ± 0.008	0.495 ± 0.041	0.089	-61.088

Effect Size |20| ≤ small |50| |50| medium |80| |80| Large (Koizumi & Katagiri, 2007)

表5 マットスイッチの接地時間の検定結果

項目	トレーニング前	第2段階終了	p	Effect Size	
ステップ動作 接地から離地)	左足	0.254 ± 0.003	0.15 ± 0.04	0.221	-41.4
	右足	0.243 ± 0.043	0.114 ± 0.015	0.268	-2.97

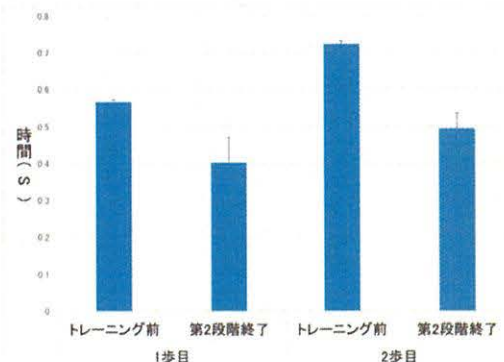


図2スタート合図から2歩目までの時間

研究結果（つづき）

【考察】

ブラインドサッカー選手を対象とした、空間・動作認知に向けて本研究においては音刺激からステップ動作を実施した。本研究では、全身振動刺激を用いたトレーニングプログラムを8週間に渡り実施したところ、音刺激からの反応速度が短縮した。その要因には、WBVの影響が考えられる。WBVには、振動刺激が神経筋活動を増加させることの表面筋電図を含む研究によって実証されている（Lienhard et al, 2014； Ritzmann et al, 2010）その他、これら神経系の反応、筋の活性化を図る上でも有効とされている。なお、Luo et al (2005)は、筋活性化を図る最も効果的な周波数を30～50Hzであると推奨している。

さらに、全身振動刺激による緊張性反動反射（伸長反射と相互抑制が連続的に発生）が筋パワーを向上させるメカニズムとして考えられている（田中ほか、2013）。その他、血流増加（Kersch-Schindl et al, 2001; Mester, 2006）も報告されており、筋への血流増加は、筋温度の上昇にもつながる。また、柔軟性の改善WBVによって筋の強い予備緊張状態で振動が開始されるとき、筋紡錘が伸長反射を賦活する一方、筋の弱い予備緊張状態で振動が開始されると、筋弛緩を賦活して柔軟性への効果が期待されている（Cochrane, D.J. et al, 2005）。

本研究において実施したWBVトレーニングにおいて上記の効果を得られたことが考えられる。特にこの度のプログラムでは下肢・体幹筋群へのアプローチを意図していたこともあり、膝伸展筋力（Petit, P.D. et al, 2010）、体幹筋群活動（Kim et al, 2016）の貢献があったものと示唆される。こうした筋活動へのポジティブな貢献が筋量の増加に現れている。これらの成果を得られたことで新たな課題も顕となった。この度は先行研究に倣い8週間の成果で研究発表を実施したが、トレーニング成果や施設の持続的使用の観点からも、トレーニング計画の遂行をより精緻に行い、長期にわたるトレーニングプログラムの実施と効果の検証を図る必要がある。また、この度は晴眼者も同様のトレーニングを実施し、比較対象群として準備していたが、成果発表までには至らなかった。今後は視覚障害の実験群・統制群も設定し、効果の検証を図る必要がある。

【結論】

本研究におけるトレーニングプログラムの結果からWBVトレーニングがステップ動作の成果に好影響を与える一要因であることが示唆された。これは成果を得られたのはWBVの特徴である筋群活動の活性化が下肢・体幹筋群に生じたものと推察される。障害者スポーツという特性から研究対象者が少なく有意差を得られてはいないが、日常的にブラインドサッカーの練習に取り組む選手に対して効果量は得られた結果が提出されたことは、今後フィールド以外において安全を確保しながら効果的なトレーニングを提供できる可能性が高まった。これは視覚障害スポーツのトレーニングに新たな視座を提供する成果といえよう。さらに、この度の成果を導出したトレーニング環境は、日本ブラインドサッカー協会内に設置された拠点において全て実行された。このような限られたスペースにおいて、効果的なトレーニングとその動作評価が実現されたことは、本研究が求める持続可能性の担保を立証した結果ともいえる。そして、研究を進めることで、多くの対象者がトレーニング拠点を訪れ、本研究が求める「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」等の要因を選手自身が構築していくことになるだろう。これらについては、質的研究方法を持ってアプローチをもって、成果を報告したい。

なお、本研究の独創性を付言すると、現状において、海外を含めた先行研究を概観する限り、ブラインドサッカー選手を対象としたWBVトレーニングは確認されていない。そのため、本学術支援研究助成を受けて提出された本研究の成果が、この方面に先鞭をつける事となる。今年度は学会発表を実施したが、次年度はこれらを早急に論文としてまとめ投稿することを予定している。

表6 各段階の筋量

筋量	A	B	Mean
TR前→第1段階終了	4.0%	2.0%	3.2%
第1段階終了→第2段階終了	0.6%	2.7%	1.4%
TR前→第2段階終了	4.6%	4.7%	4.7%

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31 年 4 月 19 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

実施研究所

自然科学研究所

下記のとおり報告いたします。

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	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
北野尚孝	医学部／准教授	研究の実施，細胞骨格の解析
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
該当なし		

※「6 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：自然科学研究所

氏名：安原徳子

4 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 α 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。

5 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：自然科学研究所

氏名：安原徳子

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

初年度は、細胞接着と細胞骨格重、核輸送の定量化、細胞接着、細胞骨格形成に関与する核輸送基質の同定に着手し、モデル細胞および個体発生、組織解析系の確立を同時に行うことを計画していた。これらを遂行するとともに、新たな成果を得た。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、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。これらの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。

安原らは、細胞核輸送を担う輸送受容体 importin α 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 α は哺乳類において複数種類のファミリー分子を有する。このうち、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 α 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、近年、新たながんマーカーとして注目されている。これらから、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。分化した細胞は一般的に細胞増殖能が盛んでなく、培養系においても一定密度に達すると増殖が低下するものが多い。特に単一細胞層を形成する培養細胞株では、培養シャーレの底面が細胞層で覆われるとそれ以上増殖しなくなる、接触阻害がかかる。我々は、このような分化細胞のうち、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。初年度はこの現象について、そのメカニズムに迫った。

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。本研究では、まずこの現象が、細胞増殖の亢進によることを掴んだ。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。本研究で用いた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。

細胞の増殖を促進し、器官のサイズを制御する因子として転写コアクチベーター YAP が知られる。YAP はアクチンファイバーの影響を受け、低密度の細胞培養系では細胞核内に蓄積し、高密度では核から排出される。importin $\alpha 2$ による表現型に YAP が関与するか調べたところ、importin $\alpha 2$ の過剰発現により細胞塊を形成したマウス繊維芽細胞では核/細胞質の YAP の存在比が変化するという予備的データが得られた。

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。今後、本年度までに得られた結果を発展させ、importin $\alpha 2$ による細胞増殖の分子メカニズムを、細胞接着、細胞骨格重合に着目して解明し、発がんとの関連性を探していきたい。

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、生体に防御的反応を引き起こす。この反応は、急速かつ強力である必要があり、

実施研究所名：自然科学研究所

氏名：安原徳子

研究結果（つづき）

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。今回、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た。

血液凝固の過程は、まさに侵襲に対する急性反応の典型例である。そこでは、多くの凝固因子とその関連因子が働いており、急速であると同時に、反応の増幅が行われる。それにより、素早い止血が可能となり、生命を救うことができる。血液凝固反応で中心的な働きをするタンパクはトロンビンであり、FIXはトロンビン活性化のために反応の上流で働くタンパクである。

日臺らは、本研究により、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PAR1-4を受容体とするが、中でもPAR1がプロトタイプとして詳しく研究されてきた。トロンビンはPAR1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。引き続き研究を行い、これらの現象の確認と検証を行いたい。また、コレステロール量が変化する機序の解明にも取り組みたい。

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。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31年 4月 24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 研究組織		
氏名	所属部科校・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 准教授	POMの視点からのデータ収集、分析、論文・書籍執筆
合計 7名		
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
現時点、特になし		

※「6 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

4 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。

5 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イ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

6 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出版が決定した。

(1) 本研究内容の理論的・実証研究の一部として、以下の学術論文が国際レフェリージャーナルに掲載が決定した。

Kodama, Mitsuru. "Boundaries knowledge(knowing) -A source of business innovation ", *Knowledge and Process Management* (Accepted for publication), Wiley. (査読あり)

(以下がエビデンスとして、校正中の論文を抜粋)

The screenshot shows the Wiley article metadata page for the article "Boundaries knowledge (knowing)—A source of business innovation" by Mitsuru Kodama. The page includes the following information:

- WILEY** logo and navigation options (Typeset PDF, Proof Corrections PDF).
- View Article Metadata** section with "Short Authors: Kodama".
- Article Title:** Boundaries knowledge (knowing)—A source of business innovation
- Author:** Mitsuru Kodama¹ (with ORCID icon)
- Footnote:** ¹ Department of Management, College of Commerce and Graduate School of Business Administration, Nihon University, Tokyo, Japan
- Contact:** Mitsuru Kodama: ✉ kodama.mitsuru@nihon-u.ac.jp
- Correspondence to:** Correspondence
- Received:** 4 August 2018 | **Accepted:** 11 March 2019
- DOI:** 10.1002/kpm.1603
- RESEARCH ARTICLE** label and **WILEY** logo.
- Abstract:** This paper focuses on knowledge differences that occur between people and organizations, and various "dissimilar things," and presents the concept of "boundaries knowledge" or "boundaries knowing" that arises from the awareness, perception, and discovery by people and organizations of such differences. Then, through in-

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）

(2) 以下の海外での学術書（研究者全員の研究成果）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. 2020/8 (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。

(以下がエビデンスとして、出版契約書を抜粋)



MEMORANDUM OF AGREEMENT

made this 14th day of November 2018

between **Professor Mitsuru Kodama**, Department of Management, Nihon University, College of Commerce, Graduate School of Business Administration, 5-2-1 Kinuta Setagaya-ku, Tokyo 157-8570, Japan, (hereinafter called "The Editor", which expression shall where the context admits include the Editor's executors administrators and assigns) of the one part and **EDWARD ELGAR PUBLISHING LIMITED** of The Lypiatts, 15 Lansdown Road, Cheltenham, Gloucestershire, GL50 2JA (hereinafter called "The Publisher", which expression shall where the context admits include the Publisher's executors, and assigns or successors in business as the case may be) of the other part.

WHEREBY it is mutually agreed between the parties hereto as follows:-

1. GRANT AND DELIVERY

The Editor hereby grants the Publisher the sole and exclusive right and licence to produce and publish in all languages, editions, in both printed and electronic form, in whole or in part, and in any media now known or later developed, throughout the world for the legal term of copyright a Work now entitled:-

Developing Boundaries Knowledge for Innovation

2. DELIVERY AND ACCEPTANCE

2.1 The Editor undertakes to deliver to the Publisher by 31st March 2020:

注：課題番号を記入してください。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31 年 4 月 9 日

日 本 大 学 学 長 殿

氏 名 浅井 朋彦



所属・資格 理 工 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 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 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 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
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
平成31年度 科学研究費補助金・基盤研究 (B) 申請者：長山好夫, 研究題目：「実用化のためのマイクロ波 CT マンモグラフィの実験的検証」【不採択】		
平成31年度 戦略的情報通信研究開発事業 (SCOPE) 申請者：浅井朋彦, 研究題目：「マイクロ波 CT マンモグラフィの研究開発」【申請予定】		

※「6 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：理工学研究所

氏名：浅井朋彦

4 研究目的

本研究は、プラズマ生成および診断技術を応用することで、特に「乳癌」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の開発を目指す。日本人の乳癌罹患者数は線形に増加しており、女性の部位別罹患者数では一位を占める。乳癌は早期発見により完治が期待でき、定期健康診断における発見が重要であるが、被爆リスクや痛みのないマンモグラフィへの要望は多い。また、乳癌では原則的に外科治療が行われ、補助的に行われる放射線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、プラズマによる非侵襲的な癌治療法の乳癌への効果を検証する。

マイクロ波コンピュータトモグラフィ(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、皮膚、脂肪、乳腺、および乳がん組織で異なることから、電気定数値の空間構造からがんを判別できる。このため、(1)痛みを伴わない、(2)数値により判別するため非専門家やコンピュータでも診断可能、(3)操作にX線などの特殊な資格がいらない、(4)照射マイクロ波は携帯電話なみの微弱電波であり人体へ影響がない等のメリットが期待される。

また、近年新規の癌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。本研究では、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、乳癌の非侵襲性治療法としての可能性を検証する。

5 研究概要

本年度の研究では、以下の研究を遂行した。

マイクロ波コンピュータトモグラフィ(MWCT)開発においては、ガラス繊維強化プラスチック(FRP)製の平面型マイクロ波アンテナを開発した。これは、平面型でアンテナ面から垂直方向にマイクロ波を放射するものである。周波数帯域は0.9~7GHzであり、マイクロ波CTアルゴリズム:Forward-Backward Time-Stepping(FBTS)法に使用可能である。特に平面型であることから、計算モデル化が容易である特徴を持ち、また深さ方向がないため、計算領域が少なく、計算時間が短いことから高速計算を実現できる可能性が高い。また、材料に用いたFRPは、乳房の脂肪組織とほぼ同じ誘電率を持つので反射が少ないという理想的なアンテナである。

この新型アンテナを54個並べたマイクロ波CTマンモグラフィ実験装置を、日本大学、関西大学共同で開発した。マイクロ波送受信機として本研究費で取得したベクトルネットワークアナライザ(VNA)を用いた。実験システムは高周波スイッチでアンテナ-VNA間の接続を切り替えるもので、LabVIEWで制御するものである。実験は連携先である核融合科学研究所の施設を借用して行なった。この実験にはFRPカップにマーガリンを充填し、中心に高誘電率ジルコニア球を入れた乳癌モデルを使用した。また、データ解析のためFBTS法のための計算モデルを作成した。

大気圧プラズマ(Atmospheric Pressure Gas Plasma:AGP)によるがん細胞の選択的細胞死誘導実験については、細胞死を誘導するために最も重要なROSである過酸化水素を特に効果的に産生できるよう、照射装置の改造を行い、また装置改造を進めた。本研究ではヘリウムガスのみを用いてAGPを産生し実験に用いているが、実用化を視野に、より安価なアルゴン、またヘリウム・アルゴン混合ガスなどいくつかの種類をテストし、産生されるROSの種類・量を発光分光分析法により解析した。また、再現性の向上を目的に、予備電離の適用など照射部の構造や電源の制御システムについても改良を行った。

この結果、装置の並列運転や、これまで大気圧中で安定なプラズマ生成ができなかった領域での運転が可能となった。酸素をドーピングしたアルゴンガスを用いて大気圧下で安定にプラズマを生成できることが確認され、ROSの産生効率が格段に向上した。

実施研究所：理工学研究所

氏名：浅井朋彦

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

平成30年度は、マイクロ波 (MW) CT およびプラズマによるアポトーシス (細胞死) 誘導に関して、以下のように研究を行い成果を得た。

(1) MWCT

MWCT 実用化への課題は、(1) 計算モデル化、(2) 広帯域受信 (1-6GHz)、(3) キャブレーション、(4) 高速測定 (10 秒)、(5) 高速計算、であり。このうち、多額の研究費が必要な(4)と(5)については本研究の成果を基に外部資金を申請することにした。平成30年度は基本となるアンテナを開発し、主に(1)と(2)について研究した。

FBTS 法の電磁界計算では Finite Difference Time Domain (FDTD) 法を用いる。そこで、アンテナ特性の計算に商用の FDTD 計算コード XFDTD を用いた。本研究の前年に広帯域アンテナとしてビバルディアンテナを研究した。ビバルディアンテナはプリント基板に成形された端放射型アンテナである。これはマイクロ波の放射方向と逆方向に長く伸びた形であり、同じプリント基板に成形されたバランを経由して同軸ケーブルに接続する。ビバルディアンテナは平坦な周波数特性を持つ優れたアンテナである。XFDTD を用いてビバルディアンテナが放射する電磁界を計算したところ、メッシュサイズを 0.2mm まで小さくすることで実測と一致することが分かった。

ビバルディアンテナは測定対象物から直角方向に長い構造を持つ。そのため、計算モデルは立体的になり、設定が極めて複雑になる。計算モデル作成が最も簡単なのは一次元のダイポールアンテナであり、次は平面型アンテナである。ただしダイポールアンテナは広帯域ではない。平面型アンテナの代表例はパッチアンテナであるが、やはり広帯域ではない。ところが平成30年度初めに、広帯域の平面型アンテナが記載されている文献を読んだ。スパイラル電極と三角形のバランの組み合わせであり、バランの端の SMA コネクタがハンダ付けされている。ただし電極間が狭過ぎるので、メッシュサイズを考えるとそのまま採用できない。そこで電極間の隙間を 0.8mm とし、メッシュサイズ 0.4mm で計算を行った。その結果、スパイラルでは低周波側にピークが現れるだけで、広帯域とはならないことがわかった。

そこで最適化を図った結果、スパイラル電極のかわりに矩形電極とした。そのため、三角形バランと矩形電極がダイポールアンテナとして働き、平面型アンテナとしては画期的に広帯域となった。また、アンテナを密集するために、プリント基板用 SMA をバランの中心に置き、矩形電極からの引出線はバランとの間でコプレーナ線路とした。乳房からの反射防止と誘電体による波長短縮を狙い、アンテナ基板は 1.6mm 厚の標準的 FRP (GR-4) 基板とし、アンテナの裏打ちとして FRP (G-10) の厚板 (15mm) を用いた。その結果、広帯域で計算モデル設定が容易でかつ計算領域が一桁小さい理想的なマイクロ波 CT 用アンテナが開発できた。今回開発したアンテナは、NUBIC より「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」として出願した (発明者：浅井朋彦、長山好夫、花島朋弥、出願番号：特願 2019-037834、出願日：2019年3月1日)。

次にこのアンテナをこの新型アンテナを 54 個並べたマイクロ波 CT マンモグラフィ実験装置を、日本大学、関西大学共同で開発した。新型アンテナを 9 個 1 枚のプリント基板に並べて成形し、その基板で FRP 製の矩形乳房容器に貼り付けた。マイクロ波送受信機として本研究費で取得したベクトルネットワークアナライザ (VNA) を用いた。により VNA の A 端子に 24ch の高周波スイッチの入力端子を、B 端子に 32ch の高周波スイッチの入力端子を接続し、高周波スイッチの各出力端子にアンテナを接続した。余った高周波スイッチの 2 端子はアンテナ用と同じケーブルで直結し、キャブレーション用とした。高周波スイッチと VNA は USB によりワークステーションに接続した。LabVIEW で両者の制御プログラムを開発した。アンテナと乳房カップは 1 m 四方の立方体の電波シールドケースの中に納め外来電波の影響を防いだ。電波シールドケースはアルミ板の内側に電波吸収体 ECCOSORB CV-6 を貼ったものである。FRP カップにマーガリンを充填し、中心に高誘電率ジルコニア球を入れた乳癌モデルを用いて実験を行った。これらのデータを FBTS 法で計算するために計算モデルを作成した。エラー防止のために、パラメータを出力し、Python で記述されたプログラムでチェックした。計算モデルの善し悪しを決めるのは給電モデルであり、今回開発したアンテナでは引出線はバランとの間でコプレーナ線路となっているため、給電点を SMA の終点の端子間とした。

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）

平成31年度はこの計算モデルを用いたFDTD計算およびFBTS計算を開始する。計算モデルが正しければ、再構成画像が得られるものと期待される。

(2) AGPによるガン細胞死誘導の乳がんへの適用

(2) AGP照射装置および照射方法の改良

(1-1) 多くの培地にAGP (Atmospheric Pressure Gas Plasma) 照射をより早く簡便に行うために、装置の改良を行った。これまでに当グループで開発し実験に用いていたものは、運転条件をPCで制御するタイプで、使用前の設定が若干複雑であった。しかし、本年度の研究で、ガン細胞のアポトーシス誘導に有効なROSの産生効率の高い運転条件が特定されてきたため、制御できる運転条件を制限し、本体のボタンやダイヤルを用いて直接制御できる形に改良した。このため、照射スピードが格段に上昇した。旧型機と新型機で生成されたAGPの量や質には大きな差は無く、同様の殺細胞効果が得られることを示した。

(1-2) 次に、より殺細胞効果の強いAGPを産生するために、生成されたプラズマを更に電離する、予備電離用電極を作成し、生成されたAGPの殺細胞効果を検討した。この結果、これまでに安定なプラズマ生成ができなかったガス種や印加電圧領域においても運転が可能となり、動作ガスへの酸素ドープにより、活性酸素種 (ROS)の産生量を格段に増大することも可能となった。また、この結果を受け、通常のAGP生成部を用いて精製したAGPと、そこから更に予備電離を生成したAGPについて殺細胞効果を評価したが、その効果に大きな違いは見られなかった。

(2) AGPによる腫瘍細胞の細胞死にはROSが関与していることは間違いないが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで、その解明を行うため、下記の実験を行った。

2-1) 細胞死を誘導するROSはAGPの照射時に直接産生されるのか、あるいは培養液の成分と反応してROSが産生されるのかを解明するために、①AGPを通常の培地照射する群、②AGPを照射した水に、2倍の濃さの培地（非照射）と1:1で混合した群、③2倍の濃さの培地にAGP照射を行い水（非照射）と1:1で混合、の3群を準備し、乳がん細胞株に投与した。24時間後に生細胞数をCountess II FLを用いて調べたところ、いずれの群においも、非照射培地で培養した細胞と比べ生存率が30%ほどに低下していたが、①～③の間では特に大きな差は見られなかった。この結果からAGPが培地中の成分と反応してROSが産生される可能性は否定され、照射プラズマ由来のROSが殺細胞効果を持つ可能性が補強された。

2-2) AGPにより産生され殺細胞効果を示すROSは、おもにH₂O₂だと考えられているが、H₂O₂自体による殺細胞効果は培養液の種類により異なっており、RPMI培地を用いた時よりもDMEM培地を用いた時に、高い殺細胞効果を示すことが判っている。AGPにも同様の差が見られるかどうか検討するために、DMEMおよびRPMIに照射を行い、その殺細胞効果を検討した。照射培地に置換後、細胞を24時間培養し、生存率をCountess II FLを用いて調べたところ、AGPの殺細胞効果には、培地ごとの差は見られなかった。RPMIでH₂O₂の殺細胞効果が減弱するのは、RPMI中に含まれるグルタチオンの濃度がDMEMよりも高いためと考えられているが、今回の結果はAGPで産生される殺細胞効果のあるROSにはH₂O₂以外のものが含まれる可能性を強く示唆した。

平成31年度は、特にAGPで産生される殺細胞効果のあるROSについて詳細な解析を行い、その分子の同定を進める。また、ガン選択的アポトーシス誘導について、その作用機序の検証を進める計画である。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31 年 4 月 24 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 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 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	慢性蕁麻疹臨床研究指導
高橋恭子	生物資源科学部/准教授	動物実験指導, マスト細胞実験, microRNA 実験
斎藤修	医学部/教授	ヒト滑膜細胞実験
葉山惟大 合計5名	医学部/助教	慢性蕁麻疹臨床研究
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
研究代表者 岡山吉道		
平成31年度基盤研究(B) 研究課題名「ヒトマスト細胞由来エクソソーム内 microRNA によるアレルギー炎症の遷延化」不採択		

※「6 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

4 研究目的

研究目的(概要):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),関節リウマチ(RA)および気管支喘息の難治化は,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.関節置換術を必要とした重症 RA に関しては,免疫複合体刺激でマスト細胞から prostaglandin D₂ (PGD₂)が多量に産生されることを見出した.気管支喘息・喘鳴に関しては,乳幼児の反復喘鳴を起こす biomarker として鼻汁中の MIP-1αが有意に高いこと,初回喘鳴の段階ですでに鼻汁中にマスト細胞のメディエーターである tryptase や RS ウイルスに対する IgE 抗体が存在している例があることを発見した.ウイルス感染は,喘息発作の誘因であり喘息の難治例では,アレルゲンの明らかでない所謂,非アトピー型喘息(感染型喘息とも言う)も多く,ウイルス感染はその重要な誘因である.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する.

5 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 患者における抗 FcεRIα自己抗体および抗 IgE 自己抗体の存在が報告されているが病態におけるその関与は不明であった.特異的 IgE によるマスト細胞の活性化を検証する感度の高い実験系である IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法の改良法を用いることが可能となった.そこで本研究課題では,以下の項目を目的とした.

1. CSU 患者と健常人の血清中抗 FcεRIα鎖抗体および抗 IgE 抗体のマスト細胞活性化能を検証し比較する.
2. CSU 患者と健常人の抗 FcεRIα鎖抗体および抗 IgE 抗体の avidity と IgG isotype を比較する.
3. 重症 CSU 患者に対するシクロスポリンの治療効果を評価するバイオマーカーの同定をする.

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

関節滑液中の脂質メディエーターの測定を行ったところ RA 患者の PGD₂が変形性関節症(OA)患者と比較して増加していた.そこでリピデオミクス手法を用いて重症 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,変形性関節症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.

研究概要 3. 感染型気管支喘息におけるマスト細胞活性化機構の解明

私達は,初回喘鳴時入院後の反復喘鳴有無に関して,初回喘鳴後1年半の経過を追ったところ対象児82例中49例に反復喘鳴がみられ,鼻汁中の各種バイオマーカーの多変量解析を行ったところ, MIP-1αにおいて初回喘鳴後の反復喘鳴因子として有意(p=0.015)なオッズ比(7.72)が得られたと報告した(J Allergy Clin Immunol, 137:774, 2016).また喘鳴のある患児や喘息の患児に RS ウイルスに対する IgE 抗体が産生されることを発見した.そこで抗ウイルス IgE 抗体が感染型喘息の病態に関与しているという仮説を立てた.本研究課題では,RS ウイルスに対する IgE 抗体の喘息での役割と抗ウイルス IgE 抗体によるマスト細胞の活性化能の有無を検討することを目的とした.

実施研究所：医学部総合医学研究所

氏名：岡山 吉道

6 研究結果 (4,000字以上記入してください。)

研究概要1. 慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞活性化機構の解明**慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα鎖(α鎖)自己抗体の臨床的意義**

[背景] CSU 患者血清の 5~10%に存在する IgE に対する自己抗体(抗 IgE 抗体)や 30~45%に存在する高親和性 IgE 受容体(Fcε RI)α鎖に対する自己抗体(抗α鎖抗体)の病的意義は明らかにされていない。これら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。

[目的] CSU 患者の抗 IgE 抗体, 抗α鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを目的とした。

[方法] CSU 患者 108 人, 健常者コントロール(NC) 56 人の血清から IgG 分画を精製した。酵素免疫測定法により, 精製 IgG 分画中の抗 IgE 抗体, 抗 α 鎖抗体濃度を測定した。抗 α 鎖抗体の IgG1 分画と IgG4 分画および avidity も測定した。IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法により精製 IgG のマスト細胞活性化能を調べた。統計学的解析は Mann-Whitney-U test または Fisher's exact test を用いた。p<0.05 を有意とした。

[結果] 抗 IgE 抗体濃度は CSU 患者群の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値だったが, 臨床的特徴とは相関がなかった。抗α鎖抗体濃度は両者間に統計学的な有意差はなかったが, EXiLE 法によるマスト細胞活性化能は CSU 患者群の抗 IgE 抗体の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値であった。抗α鎖抗体の IgG1/IgG4 比は CSU 患者群の方が NC 群よりも統計学的に有意に高値だったが, avidity には有意差はなかった。

[結語] 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が示唆された。(Izaki S, Toyoshima S, Endo T, Kanegae K, Nunomura S, Kashiwakura J-I, 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, pii: S1323-8930(19)30012-7)

慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療効果を評価するバイオマーカーの同定

[背景] CSU の一部の患者は自己の血清を皮内に注射する自己血清皮内テスト(autologous serum skin test, ASST)を行うと陽性になる。さらに IgE に対する自己抗体(抗 IgE 自己抗体)もしくは FcεRI のα鎖に対する自己抗体(抗α鎖自己抗体)も一部の患者で存在する。抗ヒスタミン薬の治療抵抗性の患者においてシクロスポリンが用いられるが, シクロスポリンの治療の効果を予測するバイオマーカーはまだ明らかになっていない。

[目的] 本研究では, CSU のシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

[方法] 抗ヒスタミン薬の 2 倍量の加療にて効果不十分の CSU 患者 34 名を対象とした。クロスポリンは約 3mg/kg/day で約 4 週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度は Urticaria Activity Score 7(UAS7)を用いて評価した。治療の効果がある群(R 群)と治療効果がない群(NR 群)にわけ, 年齢, 重症度(UAS7), 罹患期間, 血清 IgE 値, ASST, 末梢血好塩基球数, 抗核抗体陽性率, 抗甲状腺自己抗体陽性率, 抗α鎖自己抗体および抗 IgE 抗体自己濃度, これら自己抗体の FcεRI 架橋能をそれぞれ比較した。

[結果] ASST 陽性患者の R 群の割合は, ASST 陰性患者の R 群の割合よりも有意に高値であった(p=0.0048)。R 群では NR 群と比較し, 血清 IgE が有意に低値であった(p=0.0003)。ROC 曲線から得られた最適な血清 IgE のカットオフ値は 88.5 IU/mL であった。抗α鎖自己抗体および抗 IgE 抗体の自己濃度およびこれら自己抗体の FcεRI 架橋能は R 群と NR 群において, 有意な差はみられなかった。

[結語] CSU 患者において ASST 陽性と血清 IgE 値がカットオフ値以下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が新たに判明した。(Endo T, Toyoshima S, Kanegae K, Izaki S, Nishimori N, Ito M, Sugai K, Hayama K, Terui T, Okayama Y: Identification of biomarkers for predicting the response to cyclosporine A therapy in patients with chronic spontaneous urticaria. Allergol Int 2018, pii: S1323-8930(18)30142-4)

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）

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

関節リウマチ(RA)と変形性関節症(OA)患者の膝関節滑液中の脂質メディエーターの網羅的比較解析

【背景】RAの病態においては、増殖した滑膜から産生されるTNF- α やIL-6などの刺激によって骨芽細胞がRANKLを発現し、破骨細胞の分化前駆細胞に発現しているRANKに結合することにより破骨細胞の分化が誘導される。RA患者の滑液中のPGD₂、PGE₂およびLTB₄はOA患者と比較して有意に高いこと、PGE₂とLTB₄は炎症の増悪に関与していることが報告されている。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、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する。

【方法】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。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。

【結果】アラキドン酸由来の脂質メディエーターでは、PGD₂、PGE₂、PGF2 α 、15-HETE、5,6-EETおよび11-HETE等が、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DHA由来の脂質メディエーターでは、RvD2および10-HDoHE等が、EPA由来の脂質メディエーターでは、PGE₃およびPGF3 α 等がOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。

【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。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。

研究概要3. 感染型気管支喘息におけるマスト細胞活性化機構の解明

RSウイルス暴露によるヒトマスト細胞からのIgE依存性のIL-8産生の増強

【背景】RSウイルス(RSV)の下気道感染とアレルギー感作は、小児の喘鳴と喘息発症に関わる危険因子である。我々は、以前にRSV感染による急性細気管支炎によって初回喘鳴が出現した患者の中には、その喀痰中にtryptaseが検出される患者がいることを報告した。このことから、RSV感染によってマスト細胞が活性化されることが示唆されたが、その機序については不明である。

【目的】RSVによるヒトマスト細胞の活性化機序を明らかにする。

【方法】ヒト末梢血および臍帯血から、lineage negative細胞とCD34陽性細胞をそれぞれ分離し、Stem cell factorとIL-6でマスト細胞を誘導した。ヒト培養マスト細胞にRSVを添加し、RSV Fタンパク質に対する抗体を用いた免疫染色とRSV RNAの増幅をPCRによって調べ、RSVがマスト細胞に感染したかどうかを検証した。また、RSVを感染させた正常気管・気管支上皮細胞とマスト細胞を共培養した。マスト細胞はIgEで感作した後、抗IgE抗体で刺激した。ヒスタミンとIL-8濃度は、ELISAで測定した。

【結果】RSVを暴露したマスト細胞においてRSV Fタンパク質は検出されず、RSV RNAの増幅も見られなかった。RSVの暴露によってマスト細胞からのIgE依存性ヒスタミン遊離の増強はみられなかったが、刺激12時間後にIgE依存性のIL-8 mRNAの発現は増強され、刺激24時間後にIgE依存性のIL-8産生は増強された。

【結論】マスト細胞にRSVを暴露すると、おそらくRSVがマスト細胞に接着し、これによってIgE依存性のIL-8産生を増強された。このことはRSVによる急性細気管支炎罹患時にアレルギーに暴露されると気道炎症が増強されることが示唆された。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31 年 4 月 16 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 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 松田 裕之	医学部・助教	研究の総括、動物実験(腎障害)
○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
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		

※「6 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

4 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/COMM5 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。

5 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

6 研究結果 (4,000 字以上記入してください。)

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

これまでの研究において、腎細胞癌摘出手術を受けた患者の病理標本で HCaRG の発現を比較すると、正常尿細管で HCaRG の発現が高い患者群では、HCaRG の発現が低下している患者群よりも手術時の腫瘍径が小さく予後も良好であった (Matsuda et al. *Oncotarget*. 2017)。また、尿細管上皮細胞株の培養液中で HCaRG タンパク分泌されていることが確認され、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。本研究では、薬剤性腎障害モデルや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 ($P < 0.01$) 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 発現は尿細管上皮細胞の脱落とともに経時的に低下していた。現在、これらのマウスの血液・尿サンプルを回収し、購入した ELISA キットを用いて、HCaRG タンパクの測定を行っている。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。糖尿病性腎症の発症を確認するため、ストレプトゾシン投与 6 ヶ月後に血清クレアチニン及び、尿中タンパク、微量アルブミンの測定を行ったが、血糖値の上昇は継続していたものの、腎機能の悪化や尿中タンパクの上昇は認められなかった。現在、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ている。また、残腎機能を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や、術後の腎細胞癌の再発リスクを評価するバイオマーカーとしての有用性を検討するため、日本大学医学部附属板橋病院と研究協力施設において、腎機能障害の患者及び、腎癌にて手術を受けた患者約 130 名の同意を得、血液・尿検体を確保した (臨床研究 RK-170912-4)。次年度は、これらのヒト検体においても HCaRG タンパクの測定を行い、临床上の有用なバイオマーカーとして可能性を検証する。

② 分泌型 HCaRG タンパクが腎癌の進展を抑制する

これまでの研究において、HCaRG を遺伝子導入した癌細胞を野生型マウスの皮下に同種移植すると、腫瘍の増大や腫瘍血管新生が抑制されることが分かった (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 受容体ファミリーの発現を抑制している可能性が示唆された。今回、内因性 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を報告した (Campion, Matsuda et al. *Cell Report*. 2018)。次に、分泌型 HCaRG が癌の発生・維持や、再発・治療抵抗性に関係しているとされる癌幹細胞にも作用し、癌抑制効果を示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、尿細管上皮細胞から分泌された HCaRG は、培養細胞実験において腎癌幹細胞を減少させる効果があることが明らかになった (論文投稿準備中)。今後、腎細胞癌で手術を受けた患者の病理標本を用いて、正常尿細管における HCaRG 発現と癌幹細胞の関係を免疫染色法を用いて検討する予定である。

生体内における分泌型 HCaRG の癌抑制効果を検討するために、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。腫瘍形成を確認するために、先行実験として野生型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 HCaRG 高発現遺伝子改変マウスと Renca 細胞のマウスの系統が異なることが原因であると考えられた。今後、分解耐性膜透過性 HCaRG を合成した後に、Renca 細胞を同系統のマウスの皮下に移植したモデルを作製し、合成 HCaRG タンパクを投与する実験を検討している。

実施研究所名：医学部総合医学研究所

氏名：松田裕之

研究結果（つづき）

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

これまでの研究において、HCaRGが障害により脱分化した尿細管上皮細胞の間葉上皮移行を促進することや、低栄養下ではオートファジーを誘導し、細胞の生存率を改善させることを見出した（Matsuda et al. *J Am Soc Nephrol.* 2011）。本研究では、培養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速やかにp21の発現を増強させ、p21の発現増強後にE-cadherinの発現がピークを迎えた。この遺伝子発現の経過中に、p21の転写因子の一つであるFoxOタンパクのリン酸化が抑制され、FoxOのトータルタンパク量が増加していることが分かった。HCaRGを抑制したところ、核内FoxOのリン酸化が亢進し分解され、p21の低下によりE-cadherinの発現が抑制された。このHCaRGをノックダウンした尿細管上皮細胞のタイトジャンクション機能を、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。これらの知見から、HCaRGは、E-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアー機構を強化することにより、腎障害を予防している可能性が示唆された。HCaRG高発現遺伝子改変マウスを使った実験では、シスプラチン投与後の腎機能・組織障害がHCaRG高発現マウスで有意に軽減されていた。E-cadherinの発現は、特にHCaRG高発現マウスの遠位尿細管で保たれていた。各尿細管セグメントの遺伝子発現を解析したところ、HCaRGは近位尿細管だけでなく遠位尿細管の障害も抑制しており、野生型マウスではKlothoなどの遠位尿細管由来の腎保護因子が低下していたが、HCaRG高発現マウスでは保たれていた。以上より、近位尿細管におけるHCaRGは、直接近位尿細管上皮細胞の保護・修復を促進するだけでなく、パラクリン機構により遠位尿細管の障害を軽減し、尿細管相互作用による恒常性維持に寄与し、腎障害の進展を抑制していると考えられた。今後、近位尿細管HCaRGコンディショナルノックアウトマウスを作製し、近位尿細管由来のHCaRGに遠位尿細管保護作用があるのかどうかを検討する予定である。

また、HCaRGを遺伝子導入した尿細管上皮細胞に、過酸化水素処理を行い、細胞死やオートファジーに与える影響について検討した。コントロール細胞では曝露12時間後までオートファジーが遅延し、細胞死が増加していたが、HCaRGは速やかに過剰なオートファジーを抑制し、ATP産生などミトコンドリア機能を保護し、細胞生存率を改善していた。このことから、HCaRGは過剰なオートファジーを介した細胞死を抑制し、尿細管上皮細胞を保護している可能性も示唆された。今後、前述の遺伝子改変マウスやノックアウトマウスを用いて、HCaRGのオートファジー制御メカニズムを探索していく予定である。

④ 分解耐性膜透過性 HCaRG タンパク質の合成

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。今回、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。ヒトHCaRG-Flagタグ及びFlagタグ-ヒトHCaRG合成タンパク発現プラスミドを作製し、ヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞に遺伝子導入を行った。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（論文投稿準備中）。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おり、今後、細胞内でのHCaRGとの結合や、相互作用を検討して行く予定である。

また、現在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中であり、プラスミド合成後に細胞透過性ヒトHCaRGタンパクを精製し、生理活性を確認する予定である。

注：課題番号を記入してください。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

平成 31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 研究組織		
氏 名	所属部科校・資格	役割分担
○研究代表者名 岩田 幸一	歯学部・教授	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
益子 崇	薬学部・准教授 (平成30年12月7日退職)	各種薬剤の生化学的解析
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
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		
1) 野間 昇 (科研費: 基盤研究 C) バーニングマウス症候群の末梢神経機序における GABA 受容体サブユニットの関与, 平成31年度~平成33年度、(不採択)		

※「6 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

4 研究目的

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な特殊性から激しい痛みを伴うことが多い。このような神経障害性疼痛には、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バリンあるいはギャバペンチンが開発され、口腔顔面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。これまでの三叉神経損傷モデル動物を用いた基礎研究によって、臨床において鎮痛以外の目的で承認され使用されている薬物の中には様々な作用機序によって鎮痛作用を示すものが報告されている。しかし、実際に臨床の現場でこれらの薬物を鎮痛薬として用いる場合には、投与量、投与するタイミングあるいは対象となる慢性痛の誘因など、解明されなければならない問題が多く残されている。そこで本プロジェクトでは、これまでの基礎研究によって得られたデータを基に、副作用が少なく口腔顔面領域の神経障害性疼痛への臨床応用が可能と考えられる薬物に注目し、それぞれの薬物の投与方法、予防薬としての可能性、対象となる慢性痛に関する基礎データを集積し、それぞれの薬物の臨床応用を目指している。本プロジェクトでは1) ミノサイクリン、2) トラニラストおよび3) オキシトシンにターゲットを絞って解析を行う。1) ミノサイクリンについては行動学的解析、神経興奮の生理学的解析および関連する分子に関しては分子生物学的手法を用い、ミノサイクリンの投与量、投与するタイミング、また投与方法について三叉神経障害性疼痛モデル動物を用いて明らかにする。2) トラニラストについては三叉神経損傷モデル動物を作製し、同モデルに発症した神経障害性疼痛に対するトラニラスト投与の鎮痛効果について、行動学的、免疫組織学的手法、および分子生物学的手法を用いて、本薬剤の鎮痛作用機構を明らかにする。さらに3) オキシトシンについてはヒト三叉神経障害性疼痛治療薬としての有用性、および三叉神経脊髄路核に存在するグリア細胞および神経細胞に対する作用に関する基礎データを集積することを目的とした。

5 研究概要

三叉神経損傷後に発症する異常疼痛は、三叉神経損傷部、三叉神経節および三叉神経脊髄路核尾側亜核における侵害受容ニューロンの可塑的变化により引き起こされる。本研究では、侵害受容ニューロンの可塑的变化を誘導する各部位の発症関連因子の同定し、各種薬物による異常疼痛発症抑制パラダイムを探索した。

本研究では、三叉神経障害性疼痛モデルラットを作製し、免疫組織化学的および分子生物学的手法により、各領域における疼痛関連分子の同定を行うとともに、各療法に対する疼痛関連分子動態、それにとま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。

神経障害性疼痛モデル動物として、上顎神経切断（IONX）による三叉神経障害性疼痛モデルを作製した。各種薬物投与のタイミングに関して、IONX 1日前から投与群、IANX 同時投与群、IANX 1日後から投与群、IONX 5日目から投与群、IONX のみ（薬物投与なし）群に分け、経時的に頭頸部領域皮膚および口腔内における機械および熱痛覚の変調を解析した。さらに、異常疼痛抑制効果が観察された群において、三叉神経損傷部、三叉神経節および三叉神経脊髄路核尾側亜核を摘出し、免疫組織化学的および分子生物学的手法により、各領域における疼痛関連分子の同定と動態解析を行い、各種薬物投与の最も効果的なタイミングと責任疼痛関連分子を明らかにした。その結果、ミノサイクリン術前投与は強い異常疼痛抑制効果が期待できることが明らかになった。また、三叉神経障害性疼痛モデル動物の三叉神経節には多くの活性化マクロファージが遊走し、これを抑制することによって異常疼痛が消失することも突き止めた。

これまでの研究で確定した三叉神経脊髄路核尾側亜核における疼痛関連分子の侵害受容ニューロンに対する役割を細胞外記録法により電気生理学的に解析し、同モデルに対する各種薬物投与における三叉神経脊髄路核尾側亜核侵害受容ニューロンの可塑的变化の特性を明らかにするために、実験を継続中である。また、三叉神経節における疼痛関連分子の動態に関与する薬剤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ンネル特性の可塑的变化を解明した。パッチクランプ法を用いた機能解析によって、神経節細胞とそれを取り囲むように存在する衛星細胞は機能的に密な連絡を有することが明らかになった。また、両者の機能連関には神経節細胞から放出されるATPとその受容体であるP2X7発現が衛星細胞で亢進することによることが明らかになった。

実施研究所：歯学部総合歯学研究所

氏名：岩田 幸一

6 研究結果 (4,000字以上記入してください)

1. 下歯槽神経切断 (IANX) ラットの機械アロディニアに対するミノサイクリン投与の効果

本プロジェクトでは歯科臨床の外科処置の一つである下顎智歯抜歯時における下歯槽神経損傷、あるいは下顎骨へのインプラント処置による下歯槽神経損傷を想定した下歯槽神経切断 (IANX) モデルラットを用いた。これまでの方法に従ってラットを深く麻酔し、下歯槽神経を露出し、強く結紮後切断して IANX モデルラットを作製した。IANX ラットの顔面皮膚に機械あるいは温度刺激を与え、機械アロディニアおよび熱痛覚過敏の発症の有無、およびその強さについて判定した。さらに、同モデルラットに各種承認薬を投与し、機械アロディニアおよび熱痛覚過敏に対する抑制効果を評価した。ミノサイクリンは腹腔内投与、トラニラストとオキシトシンは全身投与および局所投与により、その効果を判定した。IANX 前から投与する群、切断直後に投与する群、および機械アロディニアおよび熱痛覚過敏が顕著に表れた時期に投与した群の3群について、異なる投与量および投与方法に対する効果を比較検討した。機械刺激に対する逃避閾値の測定に関してはこれまでに申請者らのグループで行ってきた方法に準じて行った。

その結果、IANX 後1日目からラットの口ひげ部への機械刺激に対する頭部ひっこめ反射閾値 (HWT) の有意な低下を認めた。HWT の有意な低下は、その後14日以上継続した。同モデル動物に対してミノサイクリンを全身投与し、HWT を測定し、ミノサイクリンの機械アロディニアに対する抑制効果について解析を行った。IANX 後にミノサイクリンを投与した群においては、機械刺激に対する HWT の有意な変化は認められなかった。一方で、IANX 処置前からミノサイクリンを投与した群においては、HWT の有意な上昇を認めた。本プロジェクトでは IANX の1週間前から連続投与した群、1日前から投与した群および IANX 直前に投与した群について検討を加えたが、いずれの群においても、同様に HWT の低下が抑制された。また、ミノサイクリンの投与量に対する効果の違いについても解析を行った。その結果、ミノサイクリン投与による鎮痛効果には投与量依存性が認められた。さらに、ミノサイクリンの異常疼痛抑制作用を増強するため、一般臨床で使用されているレーザー照射の併用効果についても検討を加えている。ミノサイクリンを IANX1 日前に投与し、損傷部位へレーザー照射を行い、HWT を測定した結果、ミノサイクリン単独投与に比べ、レーザー併用群において、より強い鎮痛効果を得ることができた。今後はさらに、レーザーの併用方法の確立に向けて、研究を進めていく予定である。

2. 口腔粘膜損傷ラットの機械アロディニアに対するトラニラスト投与の効果

トラニラストは抗アレルギー薬あるいは抗癬痕薬として一般臨床の現場で用いられている。また、このトラニラストは、これらの作用だけでなく強い熱刺激 (>52℃) によって細胞内に陽イオンの流入を引き起こすイオンチャネルとして知られている TRPV2 のアンタゴニストでもある。本研究ではまず、口腔粘膜に切開を施し、口腔粘膜損傷モデルラットを作製した。口腔粘膜損傷ラットの口ひげ部および口腔粘膜の損傷部位に逆行性神経トレーサーである DiI を注入して標識された三叉神経節細胞を同定し、それらの神経節細胞における TRPV2 発現について解析を行った。その結果、口腔粘膜損傷部位および口ひげ部に投射する三叉神経節細胞、どちらの領域に投射する神経節細胞においても TRPV2 発現の有意な増加が認められた。さらに、本研究では三叉神経節において TRPV2 タンパクの発現が増加するか否かについて、Western blot 法を用いて検索を行った。その結果、TRPV2 タンパク量も有意に増加していることが確認された。また、同モデルラットにトラニラストを単回全身投与し、口ひげ部および損傷粘膜部への機械刺激に対する HWT を測定し、機械アロディニアに対する効果についても解析を行った。トラニラスト投与30から90分後において、HWT 低下の有意な抑制を認めた。以上の結果から、トラニラストは口腔粘膜損傷後に引き起こされる機械アロディニアに対する抑制効果があることが明らかになった。今後はさらに、ミノサイクリンと同様の方法を用いて、レーザー照射の併用効果についても検索を行う予定である。

3. 口腔粘膜損傷ラットのアロディニアおよび痛覚過敏に対するオキシトシン投与の効果

オキシトシンは、下垂体後葉から分泌されるホルモンで、実際の臨床では子宮筋収縮促進剤あるいは乳汁分泌促進剤として、使用されている。生体内で合成されるホルモンであることから、副作用がほとんどない薬剤として頻用されている。さらにオキシトシンは、精神科領域でも人間関係を改善する目的で使われている。このような様々な作用を有するオキシトシンであるが、我々の先行研究では三叉神経節に直接投与することによって、三叉神経損傷によって引き起こされる痛覚過敏が有意に抑えられることを報告した (Pain 2017)。また、三叉神経損傷によって三叉神経節細胞には多くのオキシトシン受容体の合成が亢進することも報告した。しかし、実際に臨床でオキシトシンを使う場合には三叉神経節に直接投与することはできない。

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）

そこで、本プロジェクトでは、オキシトシンの全身投与および神経の損傷部位に直接投与して機械アロディニアの抑制効果があるかどうかについて検討を行った。その結果、オキシトシンの全身投与では、三叉神経損傷によって引き起こされる機械アロディニアは抑制されないが、損傷部位へ直接投与することによって機械アロディニアが有意に抑制された。しかし、局所投与によって鎮痛効果を得るには1mg/dayと投与量が非常に多い。そのため、実際にヒトに応用するには投与量および投与方法に関してさらなる検討が必要であると考えられる。

4. ミノサイクリン投与のミクログリアおよびアストロサイト活性化および神経活動に対する効果

IONX ラットにミノサイクリンを術前投与した群と術後に投与した群において、機械および熱刺激に対する逃避閾値を計測した後にラットの三叉神経脊髄路核および上部頸髄で検出される活性化ミクログリア数の発現変化について免疫組織学的および Western blot 法を用いて解析を行なった。また、ミクログリアとアストロサイトは機能連関を有することが知られているので、ミノサイクリン投与に対するアストロサイトの活性化についても解析を行った。これまでの多くの研究により、口腔顔面領域の炎症や三叉神経損傷によって活性化ミクログリアおよびアストロサイトは三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) から上部頸髄 (C1/C2) に及ぶ広い範囲で観察されると報告されていることから、本研究もグリア細胞の活性化に関しては延髄の広い範囲について解析を行った。

本年度は IONX ラットのみに関してミノサイクリン投与のミクログリアおよびアストログリア活性化に対する効果について解析を行なった。ミノサイクリンは IANX 処置の前日から投与し、3日間連続投与した。投与後、ラットを灌流固定し、通法に従って Vc および C1/C2 領域の連続組織切片を作製し、活性化ミクログリアのマーカーとして、抗 Iba1 抗体を用いて Iba1 陽性細胞を免疫組織化学的に検出し、陽性細胞数を算出した。その結果、ミノサイクリン投与によって Iba1 陽性細胞数は有意に減少していた。一方で、IANX 後ミノサイクリンを投与した群においては Iba1 陽性細胞数の減少は認められたものの、その減少率に有意差は認められなかった。同様に、本研究ではアストロサイトの活性化についても、抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織学的手法による解析を行った。その結果、IONX ラットでは多くの GFAP 陽性細胞を Vc および C1/C2 領域で検出することができた。また、ミノサイクリン投与によって、IONX ラットで多くの発現が認められた GFAP 陽性細胞数は有意に減少した。これまでの研究から、ミノサイクリンはミクログリアの活性化を抑えることが知られており、アストロサイトに対しては直接作用しないことが確かめられていることから、ミノサイクリン投与による GFAP 陽性細胞に対する抑制効果はミクログリアを介した間接的な作用によるものと考えられる。この点に関しては、まだ明確な答えが得られていないために、このメカニズムを解明するには本モデル動物を用いて、より詳細な研究が必要であると考えられる。

さらに、グリア細胞が実際に Vc から C1/C2 領域に存在する侵害受容ニューロン活動に対してどのような影響を及ぼすかを、口腔顔面領域の侵害刺激により活性化する ERK のリン酸化を指標にすることにより判定した。IONX ラットの顔面皮膚に 60g の侵害的機械刺激を与え、Vc から C1/C2 領域で検出される pERK 陽性細胞を算出した。その結果、IANX ラットにおいては Vc および C1/C2 において pERK 陽性細胞数は有意に増加した。また、この増加はミノサイクリン投与によって有意に抑制されることが明らかになった。

5. トラニラスト投与によるニューロン活動の変化

本プロジェクトでは、機械アロディニアが確認された IANX ラットを麻酔し、口腔顔面の機械および熱刺激に反応を示す神経細胞活動を三叉神経節および延髄から記録し、トラニラスト投与による神経活動の変化について解析中である。また、三叉神経節細胞に関してはモデル動物の三叉神経節を取りだし、培養後パッチクランプ法により K⁺電流および Na⁺電流に対するトラニラスト投与の効果についても解析を行う予定で、現在計画を進めている。

6. オキシトシン投与によるニューロン活動の変化

オキシトシンの鎮痛効果は明らかになったが、どのようなメカニズムで作用するかが不明であるので、三叉神経節細胞活動に対するオキシトシン投与の効果についても解析を行なっている。これまで、我々の先行研究における三叉神経損傷モデルラットから取り出した培養神経節細胞に関する解析では、K⁺電流の有意な増加が誘導されることが明らかになっている。そこで、さらにこの研究を推進し、Na⁺電流に対するオキシトシン投与の効果についても解析中である。

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。

平成30年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和元年 5月 7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・助教

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・助教	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
3 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況		

※「6 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：松戸歯学部口腔科学研究所

氏名：パワー ル ウジャー

4 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。

5 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はある。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。

6 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。しかし、*Dec1* の骨老化の病態生理学的プロセスを制御する特定のマイクロ RNA (miRNA) の変化についてはほとんど知られていない。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 をそれらの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。著しく発現の異なる miRNA の標的を miRNA 予測データベースを用いて予測し、予測された標的遺伝子の経路分析をバイオインフォマティクスリソース (GeneSpring、Ingenuity Pathways Analysis、および TargetScan) を用いて解析した。十一個の miRNA は、老齢 WT マウスと比較して、老齢 *Dec1*KO マウスの大腿骨で有意に異なっていた。アップレギュレートされた6個の miRNA (miR-100-5p, miR-181a-5p, miR-221-3p, miR-298-5p, miR-324-5p, and miR-370-3p)、および5個の miRNA (miR-1-3p, miR-30a-3p, miR-133a-5p, miR-192-5p, および miR-193a-3p) はダウンレギュレートされた。機能分析は、これらの miRNA によって潜在的に調節される多くの経路が代謝シグナル伝達、AMPK シグナル伝達、ミトコンドリア機能不全、上皮間葉転換経路、およびサーチュインシグナル伝達経路に関与していることを示した。

Flow cytometry 法による骨髄単核球細胞の評価

骨髄細胞は造血細胞と骨髄間質細胞に分けることができる。骨髄間質細胞の一部には未分化間葉系細胞 (Mesenchymal Stem Cell) が含まれており、骨や軟骨、脂肪、筋肉、腱、心筋等様々な細胞に分化誘導することができる。この細胞は上記のように多分化能を有していることから「再生医療」の分野で様々な研究が進められている。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 分反応させた。これを Staining Solution で一回洗浄後、Streptavidin-PE-Cy7 (BD-pharmingen) を加え、氷上で 15 分以上反応させた。Staining Solution で二回洗浄した後に、Staining Solution 中に細胞を 2~5×10⁷ 個/ml になるように懸濁し、BD FACSAria により細胞を分離した。

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。

シグナル経路で、cAMP 媒介シグナル、上皮接着結合シグナル、タイトジャンクションシグナル、ギャップジャンクションシグナル、カルシウムシグナル、およびサーチュインシグナルが骨老化に関与していることも明らかにした。RT-qPCR によりさらに解析したところ、加齢の制御転写因子が、

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

研究結果 (つづき)

miR-223-3p, miR-744-5p, miR-3103-5p, miR-4723-5p および miR-6825-5p の制御に関与していることを示した。多数の組み合わせが識別された mRNA と miRNA の網羅的解析は、miRNA の異常発現は骨加齢において重要であることを示唆した。そして、その機能は関連シグナル上の特定遺伝子の転写を通して誘導されることが考えられた。

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。VDR はマウスの 15 番染色体にコードされており、targeting vector を用いた相同組み換え法によってエクソン 2 を欠損させることで 1997 年に吉澤らによって作製された。エクソン 2 は VDR の機能維持に重要な zinc finger 部位をコードしており、エクソン 2 を欠損することで VDR は機能欠損となる。VDR はビタミン D の生理機能である骨カルシウム代謝恒常性を仲介する転写因子であるため、VDR 欠損マウスは著名な低カルシウム血症、低リン酸血症、骨密度の低下が認められ、寿命は 15 週程度と短命になる。低カルシウム、低リン酸血症の影響を軽減するため、レスキュー食が開発され、寿命は 48 週齢以上まで野生型に近づけることが可能となった。活性型ビタミン D は、骨や骨以外の組織に発現する VDR を介して、RANKL、FGF23 および PTH などの骨ミネラル代謝を担うサイトカインやホルモンの産生を調節することが知られる。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。平成 31 年度は、野生型マウス、VDR 欠損マウスを出産からレスキュー食にて飼育し、12 週齢におけるサンプル回収、解析を行った。12 週齢の結果において、アップレギュレートされた 2 個の miRNA [miR-34a-5p (標的遺伝子 BCL2, CCND1, CDK6, MYC, NOTCH1, NOTCH2, SIRT1, VEGFA, WNT1) および miR-129-1-3p (標的遺伝子 AR)], ダウンレギュレートされた 4 個の miRNA [miR-135a-5p (RUNX2, SMAD5), miR-208a-3p (RUNX2), miR-421-3p (CBX7, RBMXL1), miR-467a-5p (DKK1)] を同定された。次年度では、60 週齢のサンプルを回収、解析を予定している。12 週齢の結果と比較することで VDR が関与する加齢関連因子を明らかにする。

2. Dec1 による FGF23 制御機構の解明**ルシフェラーゼアッセイ、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) による転写因子結合の解析**

ルシフェラーゼアッセイで D1 強制発現による FGF 転写制御機構の解析を行った。Promoter は E-box を含む FGF promoter を使用した。培養細胞にトランスフェクションし、24 時間後、細胞抽出液を解析したところ、FGF 転写活性が Dec1 強制発現で約 3 倍抑制された。また FGF 遺伝子上流の E-box の mutation を作製し、同様の実験を行ったが、FGF 変異の転写活性は Dec1 強制発現によっても影響を受けなかった。また、Dec1 強制発現による FGF 発現を Western blot 法で明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を用いて Dec1 が FGF の E-box に影響を及ぼすか調べた。コントロールと比べ、Dec1 強制発現により FGF に対する結合量が増加した。また、ChIP assay を用いて培養細胞に Dec1 siRNA 導入することによって FGF の結合量が抑制し、Dec1 が直接 FGF とタンパク質結合し、また、転写機構をも介して、制御することを示した。

論文：

Smad3 suppresses epithelial cell migration and proliferation via the clock gene Dec1, which negatively regulates the expression of clock genes Dec2 and Per1. Sato F, Otsuka T, Kohsaka A, Le HT, Bhawal UK, Muragaki Y. *American Journal of Pathology* 2019; 189(4): 773-783.