

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 岩井奉信



所属・資格 法学部 教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	憲法の制度的枠組みが経済に与える影響に関する比較研究	
3 研究目的	憲法が提供する制度枠組みが経済に与える影響を与えているかについて、先進諸国間の比較を通じて、理論的、実証的に明らかにすることを第一の目的とする。同時に、日本国憲法の制度枠組みがどのように経済発展の阻害要因となっているかを検証することを通じて、憲法改正論議について、経済発展という観点から、あるべき方向性を提言しようとするものである。	
4 研究概要	本研究は、法学部及び経済学部の政治学、経済学、行政学、憲法学など研究者が学際的な研究体制を作り、理論的、制度的、実証的など多面的で体系的な研究を行うことに大きな意義があると同時に、単なる研究にとどまらず、憲法改正論に新たな論点を提供する提言的な研究であることが大きな特徴であり、社会科学における学術研究が、いかに実社会に貢献できるかの可能性を探る研究でもある。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 法学部 教授 岩井奉信 政治学 (研究統括、議会政治研究) ・研究分担者 (役割分担) 経済学部 教授 浅田義久 経済学 (憲法と税制) 法学部 教授 池田実 憲法学 (憲法と公平性・効率性) 法学部 教授 岩崎正洋 政治各 (制度の国際比較) 法学部 教授 坂井吉良 経済学 (民主主義と経済政策) 法学部 准教授 高畑英一郎 憲法学 (憲法構造の比較研究) 法学部 教授 外山公美 行政学 (憲法と行政組織) 経済学部 教授 中川雅之 経済学 (憲法と公共部門) 	

※ホームページ等での公開の 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。

部科校名：法学部

氏名：岩井奉信

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究は、憲法が提供する制度的枠組みが、経済にいかなる影響を与えているかを、先進諸国間の比較を通じて、理論的、実証的に明らかにすることを第一の目的としている。同時に、現代における政治経済状況が激変する中で、わが国の憲法枠組が経済発展にとって、いかなる阻害要因になっているか、また、もし、そうだとしたら、憲法をいかに改訂していくべきであるかについて、提言しようとするものである。

このような問題意識の下、法学部と経済学部から憲法学、経済学、政治学、行政学の中堅、若手研究者により、研究組織を編成し、この課題について、多面的な研究を学際的に進めている。

本研究は、平成 21 年度、22 年度の 2 年間で予定するものであるが、初年度にあたる平成 21 年度は、本研究の基本認識を前提とし、各研究者が、それぞれの立場から独自の研究を進めることに重点を置いた。まず、開始に際し、研究組織に属する全研究者が一同に会する研究会を開催し、本研究の基本アイデアの提案者である坂井吉良法学部教授が本研究の意義や目的などについて、報告を行い、本研究に関する基本認識を研究者全員が共有することを行った。その上で、制度と経済に関する書籍や論文を収集し、これらを通じて、各研究者の基本認識を深めると同時に、それぞれの専門的学問分野において、いかなる研究が可能になるかについての検討を行った。かかる共通認識を前提に、平成 21 年度は、参加する 8 名の研究者が、それぞれ、独自の立場から研究を進めていった。

個々の研究と並行して、全員が同じ土俵の上で研究を進めていくために、基本データベースを構築することにも努力を行った。このデータベースの作成は、岩崎正洋法学部教授が、ゼミナールの学生を用いて作成にあたった。ここでは、坂井教授の指導の下、1970 年代にブルース・ラセットが行った国際的な「国力比較」に用いたデータを参考にし、本研究が比較対象として想定している西欧先進諸国のみにとどまらず、発展途上国まで含めた 150 以上の国について、可能な限り統計データを収集し、エクセルを用いた一覧的なデータベースの作成を進めた。このデータベースの特徴は、単なる統計的なデータのみならず、制度や憲法、政治体制など定量的ではないものも、カテゴリー化して同一のデータベースを作成したことにある。このような制度や体制にかかわるカテゴリー・データは、今後、多変量解析を用いた分析において、外的基準となるものであり、たとえば、制度の違いが経済成長などにいかなる程度、関連性を持つかを検証する上で、大いに寄与することが期待される。このデータベースの作成は、22 年度も引き続き行なわれ、分析に必要なデータの追加や修正を行った上で、法学部に導入されている SPSS や SAS などの統計ソフトを用いて、主成分分析、因子分析、クラスター分析を始めとする、さまざまな多変量解析の手法を駆使することにより、経済発展に何がどのように関わっているのかを、計量的な実証方法により、明らかにしていくことが期待される。

一方、その他の研究者は、平成 21 年度、文献や資料などにより、それぞれの分野における独自の研究を進めた。具体的には、岩井は政治学の立場、特に政治改革に関わった経験から、憲法によって規定されている政策決定過程のあり方について、先進諸国と日本との比較研究を進めた。

浅田は、経済学、特に税制の立場から租税制度のあり方に関し、日本を軸に各国の比較を行い、日本の税制の固有性や問題点を明らかにする研究を進めた。

池田は、憲法学の立場から、日本国憲法において、経済発展に関わる制度がいかなるものであり、憲法にもとづく諸制度の構造がいかに構成されているかを明らかにする研究を進めた。岩崎正洋は、データベースの作成を行う一方で、政治学の立場から民主主義理論やガバナンスに関する、これまでの研究にもとづき、憲法による制度の枠組みが政治過程や民主主義に影響を与えていくメカニズムに関する理論的な研究を進め、研究全体の理論的支柱となる理論モデル構築に向けた研究を進めた。同時に平成 21 年夏にチリで行われた世界政治学会で民主主義と政党政治の理論に関する研究報告を行い、また、同地において、関係分野の研究者との交流により、民主主義と経済発展との関係についての研究を深めた。

部科校名：法学部

氏名：岩井奉信

研究結果（つづき）

本研究の基本アイデアの提供者である坂井吉良は、平成 21 年度は法学部在外派遣研究医として、ロンドン大学に留学したが、ここにおける研究活動を通じて、本研究の中軸をなす理論モデルのブラッシュアップを行うと同時に、政策計量分析に関し、新たな分析手法について、習得することも行った。また、岩崎と連携し、基本データベースのさく作成、構築にも携わり、分析、研究を有効に進めていくためのデータベースの精緻化を進めた。さらにイギリスを中心とするヨーロッパにおいて、経済発展と憲法枠組との関係がいかなるものとなっているかについて、留学中、現地において、調査や資料収集などを精力的に進めた。

高畑英一郎は、憲法学の立場から研究を進めたが、特に比較憲法学に重点を置き、日本および先進諸国の憲法構造がいかなるものとなっているか、また、その運用実態がどのようになっているのかについて、文献研究を軸にした研究に重点を置いた。その上で、平成 22 年 2 月にアメリカに出張し、アメリカにおける憲法運用の実態、特に司法制度との関係について、現地調査や資料収集、さらには現地の研究者との意見交換などを精力的に行った。

外山公美は行政学の立場から憲法が規定する制度が、地方を中心とする行政の現場において、どのように運用されているかについて、独自の研究を進めたが、特にオンブズマンについて、各国の制度や運用についての研究を進めることを重点的に行った。また、平成 21 年夏には、スウェーデンでおこなわれた国際オンブズマン学会に出席し、北欧をはじめとするオンブズマンの制度と実態について、研究を深めると同時に、リーマン・ショック以降も成長を続ける北欧諸国の経済の実態と憲法枠組との関係がいかなるものであるかについて、その実態を軸に、現地調査を行った。

中川雅之は、経済学者の立場から近年の経済発展のメカニズムについて、研究を進めると同時に、そこにおいて、国家がいかなる役割を果たすかについて、文献や資料などを通じて、研究を進めた。特に民主主義と法治主義を前提とする憲法枠組による規制と市場原理や市場メカニズムとの相克、一国主義に根ざした政治や法制度とグローバリズムにもとづく市場経済との関係性についての分析、研究を独自に進めた。

以上のように、平成 21 年度は 8 人の研究者が、基本認識を一にしつつ、それぞれのディスプリンにおいて、独自の研究を深めてきた。当然のように、個々の研究にあたっては、8 名の研究者が同じ学部内、あるいは隣接する学部にも所属することから、それぞれ密接にコミュニケーションを取り合い、研究の進展状況を確認し、あるいは相互に情報などを交換し合い、課題の目的達成に向けた効果的な研究活動を行ってきたことはいうまでもない。その結果、本研究の課題に関するそれぞれの分野における研究の基礎的な段階としては、十分な成果を収めてきていると認めることができる。

しかし、その一方で、平成 21 年度は、本研究の基本的アイデア提供者である坂井が法学部の命により、イギリスへ留学したこと、研究代表者である岩井が法学部の入試責任者として多忙を極めたこともあり、8 名が一同に会する研究会を十分に開催することができなかった。そのため、それぞれの研究者間の連絡、調整は、個別的行わざるを得ず、総合研究にふさわしい体系的な研究体制を發揮できなかったことは認めざるを得なかった。ひっきょう、研究の中心は文献研究などに限られ、坂井、外山、高畑らが海外出張し、一部、現地調査を行ったものの、その成果を 8 名の研究者全員で共有する機会が不十分であったことも認めざるを得ない。さらに課題研究に即した論文などの研究成果の公表についても、必ずしも期待通りに実現しているわけではない。

以上に示した通り、本研究の初年度としては、個別的研究については、一定の成果を上げつつあるとすることができるが、前述の通りの反省に立ち、平成 22 年度は、本研究の締めくくりの年度として、ふさわしい体系的な研究に向けた体制を構築すると共に、研究活動をさらに活発化させ、本研究の目的である、経済発展を軸とした、わが国の憲法体制の問題点を指摘し、この視点からの健忘改正論を展開

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：法学部

氏名：岩井奉信

研究結果（つづき）

するという、提言的な研究に向けた活動にも積極的に取り組んでいく。

具体的には、坂井が留学から帰国し、岩井も入試責任者の任を解かれたこともあり、坂井を中心とした8名全員での研究会の活動を活発化させる。まず、前期においては、平成21年度にそれぞれが行ってきた研究成果を発表し合い、その成果を共有すると同時に、補足的に研究すべき部分を明らかにしていく。その上で、夏期休暇を利用した現地調査などを含めた制度の運用に関する実証的な研究を深めていく。

同時に本研究の成果については、8名による共同著作としての出版物の出版を計画していることもあり、合同の研究会などにおいて、目次作成を通じ、研究の体系化の確認を随時、行っていく。さらに必要に応じて、研究会に外部の実務家などを招き、8名の研究者だけではカバーしきれない問題について、知識を深め、研究を深化させることも行っていく。当然のことであるが、そこでは限られた研究資金を有効に使用することに十分、留意することはいうまでもない。

本研究は、その目的で明らかにしている通り、これまであまり顧みられることがなかった、憲法などの法制度の問題と経済発展との関係を学部を超えた学際的な研究体制にもとづき、比較研究の中で明らかにするだけでなく、経済発展という観点からわが国の憲法のあり方について、提言していこうというように、憲法改正論議にも一石を投じる野心的な研究である。かかる体系的な研究を2年間という限られた時間を自ら設定したのは、激変する時代的、社会的背景を考慮し、時代に即した成果を上げようと企図されたからである。それを実施していくためには、とりわけ最終年次である平成22年度にいかにか精力的に研究活動を行っていくかが鍵になるが、幸いにして、本部のご好意により、研究資金を配分されたため、その期待に十分に答えるべく、平成22年度は研究の体系化と最終成果の執筆に向けた研究活動を活発化させる所存である。


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21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 29 日

日本大学 総長 殿

氏 名 高橋 淑郎  印

所属・資格 商学部 ・ 教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <u>総合研究</u>	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	医療バランスト・スコアカード (balanced scorecard) の導入意図と利用方法と成果評価に関する国際比較	
3 研究目的	<p>世界の多くの国々で医療領域での BSC が導入され利用されてきているが、その利用の方法や導入意図も広がりを見せている。それに応じて成果もその評価も広がりや深さを見せている。例えば、本来、経営のトップマネジメントの経営のツールとして発展してきた BSC であるが、カナダやイタリアでは、単一の組織での利用から医療政策での BSC の利用へと広がりを見せている。そこで、医療領域でのバランスト・スコアカードの利用方法や導入意図を洗い出し、その背景を探り、利用方法ごとにその意図を踏まえて、その成果を測定し、評価する研究を行う。国際比較検討することで、医療での BSC の戦略的経営実践の枠組みとしての機能を多角的に明確にすることを目的とした。</p>	
4 研究概要	<p>昨年文献の確認、文献の洗い出しと評価、アンケート表作成、予備テストおよび国際会議といった基礎的研究を終えて、本年度は、実際にアンケート調査とインタビューをカナダのオンタリオ州と日本でおこなった。</p> <p>医療政策の策定浸透のために BSC を政策的に利用しているカナダのオンタリオ州、オンタリオ州での政策的意図を知った上で、病院の経営に BSC を利用しているオンタリオ州の代表的病院、我が国で BSC を利用し、成果を上げている病院、成果は明確でないが、BSC の利用で明らかに変わってきた病院、アンケート調査およびインタビュー、台湾で BSC を利用してきた病院での予備調査をもとに共同研究してきた。</p> <p>また、2010年3月には国際シンポジウムという形式で、カナダのオンタリオ州での政策担当者から、オンタリオ州で最大規模の急性期の病院での BSC 利用に関して医師である院長から、台湾大学の医療 BSC 研究者から、台湾の代表的な BSC 利用病院の医師である院長から、事例報告と分析が行われた。我が国からは、BSC を利用している病院の院長や経営者および筆者が参加して、東京と京都で成果発表会を開催し、東京(永田町、町村会館)で75名、京都で50名(メルパルク京都)の参加者を得て活発な議論が行われた。</p>	

5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）

・研究代表者

高橋淑郎／商学部・教授（BSC理論、病院経営からのアプローチおよび統括）

・研究分担者（役割分担）

- ・大道 久／医学部・教授（臨床医療からのアプローチ）
- ・白神 誠／薬学部・教授（医療経済からのアプローチ）
- ・劉 慕和／商学部・准教授（管理会計からのアプローチ）
- ・青木武展／商学部・准教授（統計学およびオペレーションリサーチからのアプローチ）
- ・渡辺明良／聖路加国際病院財務経理課・マネジャー（医療の現場でのミドル層の事務方からのアプローチ）
- ・中野種樹／財団法人長岡記念財団長岡病院・理事長（病院の経営者からのアプローチ）
- ・Adalsteinn D. Brown／Assistant Deputy Minister Ontario Ministry of Health and Assistant Professor University of Toronto（政策およびBSC担当者からのアプローチ）
- ・George H. Pink／University of North Carolina-Chapel hill Department of Health Policy and Management Professor（病院のファイナンスおよび病院経営からのアプローチ）

部科校名：商学部

氏名：高橋淑郎

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

研究成果については、報告書に詳細に記述するので、研究結果の発表会を中心に記述する。

3月に東京と京都で行った研究成果発表会では、まず、研究代表者の高橋が日本での3本の調査の結果概要を示した。

第1の調査では、平成16年から行っている、日本能率協会総合研究所と日本大学商学部高橋淑郎研究室との合同調査結果の分析である。日本の病院でのBSC導入の現状については、アンケートに回答いただいた病院のうち、BSCを導入していたのは、平成16年では5.0%にも満たなかったのが、現在では23.9%にまで増加した。導入を検討している病院も、14.8%から23.2%に伸びている。また、導入している病院の90%以上は、BSCが経営管理手法として有効だと回答している。BSCは年々、日本の病院経営者に評価され、広がりを見せていることを示した。増加する導入状況を詳細に分析して、経営の危機感あるいはベクトルの一致を求めることが日本では多いことを示した。

同調査で、BSCの有効性が高い病院の特徴を見ると、BSCはどのような規模・形態にも適用できることがわかってきた。また、導入することで経営活力が高まり、それが業績改善につながる可能性が大きいことも明らかになってきた。つまりBSCは病院では、直接、財務状況に反映するものではないが、組織の経営活力を生み出し、結果として財務状況にも影響を及ぼしているとした。これは、コスト、コスト、コストとしてコスト削減を前面に打ち出したBSCは、あまり成果が出ない傾向にあり、一方で、組織を活性化させて、生産性向上、収益増大を目指すBSCは、機能することが分析から分かった。また、目先の課題を解決するためのBSC導入では、すぐに運用が止まってしまう。スタッフにも“やらされ感”が生まれ、結局、組織力は低下してしまう。経営者の継続的な支援を前提に、中長期的な視点から経営力を高めるためにBSCを導入することで、利用価値は最大限に高まると、効果が高まる導入目的を示した。

第2の調査は、今回の日本大学の研究助成によるものである。カナダのオンタリオ州の病院のトップマネジメントとミドルマネジメントのBSCに対する意識の相違を分析した。まだ、すべてのデータを分析したのでない状態であったので、サンプル数の少ないもので、このような結果が出たというものであったが、同じアンケート調査を同じ病院のトップとミドルが回答した国際比較はこれまでなく、今後のフルデータでの解析が待たれる。

第3は、今回の日本大学の総合研究助成と科研費の研究成果を組み合わせたインタビュー分析である。オンタリオ州の保健省、サニープロックヘルスサイエンスセンター、日本のBSCで成果が上がった地方中核病院でのBSC導入意図、成果、成果評価方法を比較し、病院での導入意図、成果は、国際比較においても大きな相違はないが、成果評価方法と成果をどのように納得するかについては国ごとに相違があることが分かった。

ただし、今回の調査対象は、キャプランらのBSCを正しく認識して、活用している調査対象であったことを理解しておくことが重要であろう。キャプランらの思考を、自分の組織の都合の良いように改定して使用している施設は、BSCもどきとなり、うまく機能しないことが多いので経営者のリーダーシップ、真摯な経営態度がBSC導入にかかせない要因となることもわかった。

次に、オンタリオ州保健省の次官補で、医療戦略室の室長であるAdalsteinn Brown氏によって、医療政策にBSCを導入するカナダ・オンタリオ州の取り組みや、その成果について発表された。増大する医療費を抑えつつ、医療の質を担保するためのツールとして、1999年から州の医療政策策定と浸透にBSCを導入した。現在ではそれぞれの病院で、患者の再入院率の減少や、患者満足度の向上などの改善が見られる。それにより政府の医療政策でのジレンマが若干解決に向かっている。その要因として、経営者にBSCの評価指標などを提供し続け、一緒に考えることを行ったこと、と同時に医療機関から提供を求める各数値の項目をシンプルにすることをやってきた。さらに数値目標

部科校名：商学部

氏名：高橋淑郎

研究結果（つづき）

の達成度を一般に公表（インターネットで）したことなどで成果がでていることを示した。今後の課題は、医療行政とBSCの連動といえる。特に予算づくりと結びつけていきたいということを示した。

続いて、病院側からの報告としてSunnybrook Health Sciences CentreのBarry A. McLellan病院長（医師）が、BSCの活用状況を説明した。BSCの導入は、サービスの質の向上、研究・教育面での充実で特に役立っている。同時に、戦略づくりには、経営者や部門のリーダーだけでなく、すべての医師に参加してもらっている。これにより、何としても戦略目標を達成するという責任感が組織全体に芽生えた。現場においては成果の計測項目をなるべくシンプルにすることがとても重要であることも分かった。また、BSCをスムーズに運用するためには、理事会にその取り組み状況を詳細に報告することは欠かせない。そして経営者側はBSCを継続的に、積極的にサポートしていくことが現場の活動を助けることになる。これまでBSCで一定の成果を上げてきたが、戦略は社会の流れ、ニーズに合わせてなければならない。BSCも同様に進化させ、機敏に変化させていくことが、今後のステップだと考えていると経験を科学的に分析して示した。

その後、楊銘欽氏（国立台湾大学公共衛生学院副教授）と、陳進堂氏（為恭記念病院院長）が、それぞれ、BSCの導入が始まったばかりの台湾の現状と、その成果、課題などについて講演した。

総合討議では、東京では高橋と白神誠氏（日本大学薬学部教授）を座長に、先に講演した4者に、大道久氏（日本大学医学部教授）、高野靖悟氏（JA相模原共同病院院長）、渡辺明良氏（聖路加国際病院マネジャー）の3人が加わり、京都では、仲田清剛（沖縄敬愛会理事・ちばなクリニック院長）、前田純典（医真会 八尾総合病院専務理事）、高橋昌里（駿河台日本大学病院副院長）が、BSC運用のあり方や課題の解決策などについて意見を交換した。

BSCをいかに運用していくかという課題については、「経営者が積極的に関わり、強いリーダーシップを発揮することが重要」「すべての職種が戦略づくりなどに積極的に参加してもらうことが不可欠」「運営するための専門の組織を設置することも効果的」などの議論がなされた。

また、行政が政策として病院にBSCを導入する際に起こり得る問題とその解決策については、「それぞれの組織は独自の役割を持っている。それをしっかり把握した上で、共通の戦略、指標を策定することが重要」「指標の項目が多すぎず、合理的に設定することも大切。指標を増やすときでも、それぞれの病院の合意を得ることが必要」などの意見が出された。

医療サービスの質をBSCでどのように評価していくかについては、「手術数や再入院率、などはもちろん、資格取得、スキルアップなどスタッフ教育の面から質を評価することができる」「患者からのクレームやトラブルの件数を評価指標として設定している病院もある」などの意見が出された。

大病院で導入する場合の留意点について、「はじめは、あまり多くの指標を設定しないことが大きなポイント」「トップダウンの力とボトムアップの力の両方のバランスをうまくとっていくことが重要」などの意見が交わされた。

最後に高橋は、「これまでの日本大学の総合大学としての強みを活かした研究シフトを組むように努力した。これらの研究成果を少しでも多くの医療関係者や病院経営者の方々に知っていただき、各国の先進事例を共有するために研究報告会を開催した。これからも、こうした活動などを通じ、少しでも医療BSCの普及につなげていきたい」と今後の抱負を述べ締めくくった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：商学部

氏名：高橋淑郎

研究結果（つづき）

最後になったが、一連の医療BSC研究の変化を知るために2003年と2009年に文献を広くサーベイした。その概略を示すと、2003年以後、発表される論文の性格が変わりつつあり、2003当時は、BSCの原理や理論を中心とする論文が多かった。BSCの開発プロセス、Kaplanらがパラダイムをいかに作り上げたか、BSCの早期の導入者の事例分析、戦略面および運用面での使用法、4つの視点の相互作用や関係性などを主題とする論文が多かった。その理由は、BSCのコンセプトが新しいものだったためと考えられる。ところが2003年以降の論文では、具体的な問題の議論に重点が置かれるようになってきた。その理由は、BSCの概念や理論が広く知られるようになり、BSCが北米では、成熟したためと考えられるのである。Kaplanも近年、BSCが業績評価システムから変化し、戦略的マネジメントのためのツール、さらに最近では、組織全体のマネジメントのためのツールになりつつあることを指摘していることからわかる。

以上

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 4月 15日

日本大学 総長 殿

氏 名 中川 活二



所属・資格 理工学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	次世代超高密度磁気光複合記録システムと材料に関する研究 Ultra high density hybrid recording system and materials	
3 研究目的	情報量の急速な増加に対応可能な超大容量情報記録システムの構築が緊急課題であり、その基盤をなす磁気および磁気・光複合超高密度記録に関する総合的研究を行う。現状の磁気記録方式を打破する磁気および磁気・光複合記録方式実現のための、(1)記録媒体、(2)光ヘッド、(3)磁化制御についての基盤技術を実験と詳細なシミュレーションの両面から明らかにし、超高密度記録技術基盤の実現を目的とする。	
4 研究概要	記録媒体に関して、自己配列型基板上へ高い磁気異方性を有する媒体を作製し、高密度化を行う。光ヘッドに関して、レーザー光を理論限界以上に収束させる表面プラズモン技術を磁気記録と融合した磁気・光複合記録方式を確立する。磁化制御に関して、記録速度の限界を打ち破るため、フェムト秒レーザーによる外部磁場を必要としない光誘起超高速磁化制御を実施する。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 中川 活二； 研究総括、磁気・光ハイブリッド記録ヘッド、システムの研究 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 伊藤 彰義； ハイブリッド記録用ナノ構造と材料、シミュレーション 塚本 新； 光による磁化反転の高速直接制御 芦澤 好人； 磁気・光ハイブリッド記録プラズモンアンテナの試作とシミュレーション 上坂 保太郎； 超高密度磁気記録のシミュレーション 遠藤 拓； 超高密度磁気記録のシミュレーション 移川 欣男； 超高密度磁気記録用材料 新妻 清純； 超高密度磁気記録用材料 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 中川 活二

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

情報社会の根幹を支える情報記録の主流である磁気記録において記録密度のさらなる増加が要求されており、これには高い磁気異方性を持つ高安定磁性材料 FePt、PdCo 等の記録媒体が必要不可欠となる。さらにその機能を発揮するためには材料の微粒子結晶制御とその配列、それらの複合材料が必要となる。微粒子および複合材料の磁化状態シミュレーション解析は超高密度記録材の実現に欠かせないものであり実験と並行した研究により理想的な記録材料実現を目指す必要がある。さらに、記録状態の安定性を有する高密度記録では、その安定性故に従来の磁気記録ヘッドでは記録できないという矛盾を生じるため、記録材料だけでは高密度記録達成が難しい。そこで、レーザー光を記録部分だけに照射する、すなわち記録時に熱でアシストする新しい概念の熱アシスト記録の研究が必要である。レーザー光照射は、数十 nm 領域に光を絞る必要があるが、従来の方法では波長オーダー(数百 nm)までしか集光できないため、表面プラズモンアンテナを利用した近接場光で数十 nm に集光する。プラズモンアンテナの設計には、近接場光解析のシミュレーションが不可欠であり、これと、ナノサイズ加工プロセスを駆使して試作する。さらに、従来の記録方法における記録スピードの限界を打ち破る光誘起超高速磁化制御をフェムト秒レーザーにより実施する。従来の方法では、磁性体内の磁化の共鳴周波数(数 GHz)が記録速度の限界で大きな問題であった。この研究により、将来の超高速「全光磁気記録: All Optical Magnetic Recording」という新分野の開拓発展を目指す。以上のような 2 Tb/in² を越える記録実証を本研究で世界に先駆けてシミュレーションと実験とで達成するため、複合記録媒体と磁気・光複合記録のための光ヘッドの実現と光誘起超高速磁化制御を、シミュレーションと実験との緊密な連係の下に行った。

以下に、(1)記録媒体に関する、マイクロマグネティクスシミュレーションによる磁壁抗磁力の安定性およびナノ構造下地上に作製した FePt 微粒子の粒制御、(2)光ヘッドに関する、電磁界および熱計算における媒体表面の加熱冷却過程、ナノサイズプラズモンアンテナの作製手法 (3)磁化制御に関する角運動量補償点近傍における超高速磁化反転現象を中心に結果の詳細を報告する。

(1)記録媒体 (伊藤彰義、上坂保太郎、遠藤拓、移川欣男、新妻清純)

(a)CGC 薄膜における記録軸の安定性

超高密度磁気記録媒体として、連続膜の微粒子上への積層 (Coupled Granular & Continuous, CGC 膜)による記録磁区の安定化(ピンニングサイト増加)と、ハード層とソフト層からなる ECC(Exchange Coupled Composite Media)膜による安定化(実効的異方性増加)と記録磁界低減を目指した手法がある。また、BPM(ビットパターンド媒体:Bit Patterned Media)と呼ばれる 1 ビットの情報を磁性一粒子に記録する方式も検討されている。これらについてマイクロマグネティック(LLG)シミュレーションにより高密度化に適した媒体構造のシミュレーションを進めた。特に、磁気・光複合記録では温度分布が有る場合の磁化過程や冷却時の磁化過程が重要であり、世界的にも端緒についたばかりのこの分野のシミュレーションを詳細に行った。

稠密に配列した FePt 孤立微粒子および TeFeCo 連続膜からなる交換結合複合膜に対し、微小磁区形成条件の指標として磁壁抗磁力に注目し、LLG 方程式を用いた 3 次元マイクロマグネティクスシミュレーションにより検討を行った。シミュレーション結果より FePt 粒径 5 nm、粒間 3 nm、TbFeCo 膜厚 5 nm の TbFeCo/FePt 複合膜において、ピンニングとして作用する FePt 孤立微粒子数が 3 個のモデルにおいても磁区形成が可能であることを確認し、このとき記録密度は 1.8 Tbit/inch² に相当することを示した。また、磁壁抗磁力 H_w はこの条件においても $H_w \geq 12$ kOe であることを示した。さらに、ピンニング点を利用した交換結合膜での磁区形成において、同一の薄膜構造を用いた場合には、磁壁抗磁力は、磁壁の形状を示す曲率半径とピンニング点間の平均磁壁長さにより見積もることが可能であることを示した。

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 中川 活二

研究結果 (つづき)

(b) BPM 孤立微粒子媒体用テンプレート下地と微粒子媒体の作製

記録媒体作製には、1) 自己配列微小空孔凹凸を持つ SiO₂ 下地の薄膜化とナノテンプレートへの応用、2) ナノテンプレートを利用した高い磁気異方性を持つ高安定記録磁性粒子配列、3) 高安定磁性粒子 FePt の結晶性、粒子密度の制御を行い、現状の「微粒子充填密度の低さを克服する方法」を進めた。また、磁気・光複合記録で用いる材料として FePt 等の高安定磁性材料のキュリー温度を制御する必要がある。添加元素により 200°C 前後にキュリー温度(Tc)を低下するとともに、粒子密度、結晶制御を行った。また、高飽和磁束密度材料である Fe-N 系薄膜を製膜し、記録材料、記録補助層(軟磁性下地層)、記録ヘッド材料としての評価を並行して進めた。

自己配列微小空孔凹凸を有する SiO₂ テンプレート下地として、ナノスケールの凹部配列およびシリカ球配列を作製することに成功した。シリカ球においては、平均粒径 18 nm の単層配列の作製に成功した。高安定磁性微粒子の結晶性、粒子密度の制御として、急速昇温熱処理法により作製した FePt および FeCuPt 結晶では、結晶粒の下地に対する面積占有率が下地および微粒子結晶組成に依存せず 0.2 程度で一定であることを示した。結晶粒径の制御では、急速昇温熱処理後の結晶粒径が、熱処理前の薄膜の膜厚に比例することを予測し、確認した。結晶粒子数密度は、シリカ球自己配列基板 (SASP: Self Assembled Sillica Particles)、凹部配列 NDA (Nano Dent Array)、平坦 SiO₂ の順に大きいことを示した。これは、同順に結晶の核生成頻度が増加するためという考えに矛盾しない。シリカ球配列上の FePt および FeCuPt は垂直磁化膜に必要な (001) 配向を示し、その配向指数は FeCuPt が FePt よりも大きかった。シリカ球配列上の FeCuPt 微粒子薄膜の保磁力は、薄膜表面に垂直方向において 20 kOe であり、薄膜表面平行方向の保磁力の倍の大きさを示した。

(c) BPM 媒体における粒子形状の記録特性への影響

また、BPM (Bit Patterned Media) は次世代磁気記録媒体の有力な候補の一つである。この BPM を作製する方法の一つとして、連続膜をエッチング等の方法により、磁性粒子のアレイを作製する方法がある。この方法で作製した粒子は端が欠けていたり、辺がギザギザになっていたりすると、そこが反転の核となるため、反転磁界が小さくなり、雑音やエラーを生じやすいということがいわれてきた。そこで、端の欠けや辺のギザギザが磁性粒子の反転磁界に及ぼす影響をコンピュータシミュレーションにより検討した結果、粒子サイズが交換長よりも十分に小さく、磁化反転機構が一斉反転である場合には、端の欠けや辺のギザギザは反転磁界にはほとんど影響しないことを明らかにした。

(d) 記録補助軟磁性下地層材料の検討

記録補助層として軟磁性下地層材料として有望な高飽和磁束密度材料である Fe-N 箔状試料の作製についても、窒化鉄箔生成時における他元素添加が及ぼす影響を窒素プラズマ照射法により得られた窒化鉄を用いて結晶構造および磁気特性について検討した。炭素および水素の影響を N₂ ガスに対する CH₄ ガスの混合比により検討した結果、3%CH₄ 付近で飽和磁化の増大と保磁力の現象が観測された。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 中川 活二

研究結果 (つづき)

(2) 光ヘッド (中川活二、芦澤好人)

磁気・光複合記録実験のための実験装置を活用して顕微鏡下で近接場光アンテナ利用の基礎的実験を進めるにあたり、近接場光を利用するナノメートルサイズの表面プラズモンアンテナの形状設定、ナノサイズ加工、記録膜との接触によるアンテナ摩耗など以下に示す解決すべき事項がある。1) FDTD 法等による近接場光解析シミュレーションを用い、アンテナ材料、アンテナ形状、記録媒体構造との相互作用による近接場光への寄与を解明すること。2) 収束イオンビーム加工装置 (FIB) を用いたプラズモンアンテナ作製のための微細加工の最適加工条件を明確にすること。3) 潤滑剤の利用および摩耗しにくい構造設計によりアンテナの摩耗対策を推進すること。4) 極微小領域に記録可能な超高密度記録技術として、熱アシスト磁気記録技術に注目して研究を進めており、超高速記録技術として、円偏光を用いた光誘起磁化反転現象に着目している。熱アシスト磁気記録方式では、近接場光による加熱によって熱安定性の高い媒体に記録を行うことが可能である。記録ビットサイズが近接場光に強く依存するため、アンテナの形状や記録媒体構造を適切に設計する必要があり、また媒体温度の空間分布と加熱・冷却過程を把握することが極めて重要である。一方、光誘起磁化反転現象では円偏光を用いる必要があるため、近接場光アンテナを用いた超高密度かつ超高速記録技術へと発展させるためには、表面プラズモンの円偏光モードを形成することが重要となる。そこで、直線偏光入射の近接場光による加熱方式における媒体の温度分布及び加熱・冷却過程の解析を行った。

媒体の加熱過程が記録媒体の構造により大きく異なること、さらに、媒体の局所領域のみを加熱する手法をシミュレーションにより示した。熱分布及び媒体温度の時間変化を明らかにしたことは、媒体の材料及び粒子の配列構造、アンテナの構造、さらに加熱と記録のタイミングを踏まえた磁気ヘッド構造の設計に大きく寄与し、研究の発展を促進する。詳細を以下に示す。

孤立した磁性ドット微粒子が規則的に配列した構造の媒体 (BPM: Bit patterned medium) を用いることにより、数十ナノメートル程度の粒子のみを効率良く加熱可能であることを示した。従来の薄膜状の媒体構造 (CM: Continuous medium) では局所的に加熱することが困難であった。近接場光発生アンテナを用いて 1 ns 加熱した各媒体 (CM と BPM) の温度分布を計算した結果、CM では最大 10°C 程度しか昇温せず空間的な分布もブロードであるが、BPM においてはアンテナ先端部直下において、最高 140°C 程度まで加熱されることが示された。また温度分布は、粒子構造を反映したステップ形状を示し、粒子径に対応して急峻な変化が得られた。

媒体平面内における温度分布の解析結果から、近接場発生アンテナの先端部直下の粒子のみが効率よく加熱されることを明らかにした。このとき、アンテナのエッジ部分と粒子との重畳部分においても加熱が促進される傾向があり、単一粒子のみを加熱する場合には問題となりうることを示した。さらに、BPM において適切な粒子の配列構造を選択することにより、単一粒子を十分に加熱し、かつ、周辺粒子の温度を記録粒子の温度の 65% にまで低減可能であることを示した。粒子を直形状に配列させた BPM におけるアンテナ先端部周辺粒子の昇降温変化では、記録粒子が 140°C 程度まで加熱されているのに対し、隣接する粒子の温度はその 65% 程度の 100°C 以下に抑制されており、六方配置時から 20% 程度も低減させることに成功した。加えて、単一粒子のみを加熱する技術として、記録時における近接場光発生アンテナと記録粒子との位置関係、アンテナの形状の影響を明らかにした。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名： 理 工 学 部

氏名： 中川 活二

研究結果 (つづき)

(3)磁化制御 (塚本新)

先行研究において高速磁化反転現象を GdFeCo 薄膜において光誘起高速磁化現象を確認している。これを実際の高速情報記録のプロセスを確認するため、(a)本合金系材料の磁気ダイナミクスに関する詳細な検討、(b)実際に本現象を用いた情報記録(磁区の形成)プロセスの検討、が不可欠である。

(a) フェリ磁性 GdFeCo 薄膜の磁気ダイナミクス

フェリ磁性 GdFeCo 希土類遷移金属垂直磁化膜について、正味の角運動量が消失する角運動量補償点近傍において、磁化の歳差運動周波数およびダンピング特性の増大現象が観測され、高速に磁化応答する条件を見出せた。さらに、フェムト秒パルス・レーザを用いた超短パルスによる超高速加熱を利用し、サブ ps での超高速磁化反転現象を示した。GdFeCo 希土類遷移金属薄膜の各 Gd 組成比における磁化歳差運動の様子から、磁化補償組成付近において歳差運動の位相の反転が観察された。各種 Gd 組成比 x at.% における磁化歳差運動の様子から、磁化補償組成 C_M 付近 ($x \sim 24$) において歳差運動の位相の反転が観測された。 $x < C_M$ では、Gd の磁化 M^{RE} に比べ FeCo の磁化 M^{TM} が優勢なため、 M^{TM} は外部磁界と同方向に向き、 $x > C_M$ では逆に M^{RE} が同方向を向く。波長 800nm では、 M^{TM} に対応したファラデー回転を示すことから上記位相反転を生じた。その結果から求めた α_{eff} 、 f の組成依存性を示す。図中実線は理論的に予測される定性的組成依存性を基に目安として挿入した。共に、 $x = 23.6$ 付近において著しい増大が見られ、角運動量補償組成 C_A が存在する事を示している。以上の事より、 g 係数の異なる副格子からなるフェリ磁性体において、正味の磁化および正味の角運動量が組成により調整可能であり、それに伴い α_{eff} 、 f に強い依存性が現われる事を示した。実効的ダンピング定数および歳差運動周波数の組成依存性を調査した結果、いずれも、Gd 組成が 23.6 at.% 付近において著しい増大を示し、角運動量補償組成が存在することを示唆した。 g 係数の異なる副格子からなるフェリ磁性体において、正味の磁化および正味の角運動量が組成により調整可能であり、それに伴い実効的ダンピング定数および歳差運動周波数に強い依存性が現われる事を示した。理論的に予測される定性的組成依存性を基に目安として挿入した。

(b) 情報記録 (磁区の形成) プロセスの検討

磁性体表面の偏光顕微鏡観察と超短パルスレーザ照射が同時に行える磁気イメージング装置を構築した。本システムはハロゲンランプを光源とした磁気ファラデー効果を用いており、CCD カメラにて垂直磁化膜試料の磁化状態を観察する。レーザ光源として中心波長 800 nm、パルス幅 90 fs (半値全幅) の再生増幅器付き Ti:Sapphire レーザを用い、高強度パルス光を照射し、磁化状態の変化を観察可能とした。

超短パルス光を利用した熱寄与による磁気記録の可否について検討した。これは、光照射により加熱された領域のみ H_c が減少し、周辺の磁化が作る静磁界により反転磁区が形成されるものである。パルス光を試料面で走査した結果、単一パルスレーザ光照射により、円形状の磁区形成が可能であることを確認した。形成された磁区はレーザパルス照射前の磁化状態と常に逆向きに磁化している。本結果は、90 fs という極短時間の光照射のみで熱磁気記録が可能であることを示すものである。

同試料に対し、高強度円偏光パルス光の照射を行った。結果、レーザパルスを照射した領域において、極めて偏光に依存した磁化状態の変化を確認した。この磁化状態の変化が非熱的光誘起磁化現象によるものであることを確認するため、前述の熱的寄与による磁化反転現象と比較する。右回り円偏光 ($\sigma+$)、左回り円偏光 ($\sigma-$)、直線偏光 (Linear) のレーザパルス照射領域における、磁化状態を比較・検討した。結果、左右円偏光の照射領域ではレーザパルス照射前の磁化状態によらず一方に磁化しており、磁化の向きは $\sigma+$ と $\sigma-$ では互いに逆方向となった。直線偏光の照射領域ではこのような現象は観測されず、磁化方向が多磁区構造となることを確認した。上記磁化反転現象は熱的寄与で誘起されたとすると、反転磁化は偏光状態によらず常にパルス光照射により反転磁区が形成されるはずであり、説明できない。円偏光の進行方向に平行かつカイラリティに一意に対応した向きに磁場を加えたのと同様の効果が得られた。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

課題番号	総09-004
------	---------

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 4月 27日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 邊 吾 一



所属・資格 生産工学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	奨励研究/一般研究(個人)/一般研究(共同)/総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ナノ粒子添加による環境低負荷型グリーンコンポジット創製法の開発と評価に関する研究	
3 研究の目的	<p>既存のガラス繊維強化プラスチックの代替としてグリーンコンポジット（GC）を用いる場合に、強度と剛性不足が否めないし、特に高温状態での特性の低下が懸念される。そこで、今世紀に発見された最も重要な新材料一つであるナノ粒子（チューブ、フレーク、クレイ）をGCに添加・分散させることでGCの力学特性だけでなく、他の物理特性の向上を図り、環境負荷低減型の新しい構造材料を創製し、循環型社会に貢献することを目的とする。</p>	
4 研究の概要	<p>平成21年度に代表者と分担者が実施した研究の概要を以下に示す。</p> <p>① ナノファイバーの生成方法の検討および強化繊維にケナフ織物を使用し、その表面にナノファイバーを塗布したグリーンコンポジットの開発を行った。さらに、そのナノファイバーを塗布したGCの引張特性を実験で評価した。ナノファイバーの材料にはポリ乳酸(PLA)とポリアミド6(PA6)、ポリエーテルサルホン(PES)を用いた。</p> <p>② 熔融混練法によりポリブチレンサクシネート(PBS)とナノクレイを混練してナノクレイコンポジットを作製し、混練条件およびナノクレイの種類がナノコンポジットの機械的特性に与える影響を検討した。</p> <p>③ 昨年度はグリーンコンポジットの強化材としてケナフ繊維束を用いたが、今年度は幅広いGCを成形するために、ケナフ織物を用いた新たな引抜き成形機構を考案し、熱可塑性のグリーンコンポジットの成形法を開発し、その問題点を明らかにし、その解決策を示した。</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<p>・研究代表者</p> <p>邊 吾一(生産工学部・教授) 研究の総括, ナノ粒子添加・分散法の開発</p> <p>・研究分担者（役割分担）</p> <p>青木 義男(理工学部・教授) 引き抜き成形法の確立</p> <p>上田 政人(理工学部・専任講師) 加熱・加圧成形法の確立</p> <p>高橋 進(生産工学部・教授) 射出成形法の確立</p> <p>依田 満夫(工学部・教授) 高温時の力学特性の解明</p> <p>今村 仙治(工学部・教授) 常温時の力学特性の解明</p> <p>青木 隆平(東京大学・教授) 物理特性の解明</p>	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：生産工学部

氏名： 邊 吾一

6 研究の結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

6.1 ナノファイバーの創製とナノファイバーのグリーンコンポジットへの応用

(1) ナノファイバー創製法開発 エレクトロスピンング法を用いてポリ乳酸とポリアミド6, ポリエーテルサルフォンのナノファイバー化に成功したが、この方法は基本的に溶液紡糸法である。原理はポリマー溶液にプラスの高電圧を印加させ、アースやマイナスに帯電したターゲット上に塗布する過程で繊維化を起こさせる。そのとき、ノズル先端から引き出されたポリマー溶液は溶媒が揮発し、電気的な延伸を経てナノファイバー化される。Fig.1に一例として、PLA ナノファイバーを示すが、ファイバーの直径はおよそ 380nm~900nm である。

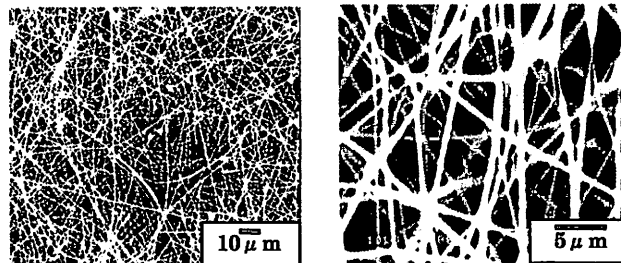


Fig.1 PLA nanofibers

(2) コンポジットの作成 FRP の構成材料は、強化繊維に撚り糸状ケナフ繊維束を平織りにしたケナフ織物、母材に不飽和ポリエステルを用いた。寸法 300×300×2mm の金型内でナノファイバーを塗布した2枚のケナフ繊維織物に母材となる不飽和ポリエステルを含浸させた。また硬化剤にはメチルエチルケトンパーオキサイドを用い、不飽和ポリエステルに対して1%混ぜた。そして、金型全体をフィルムで包んだ。フィルムを密閉し、真空ポンプでフィルム内を真空状態にしなが、常温で1.5MPaの圧力をかけた。成形品は「ナノファイバー塗布なし」、「PLA ナノファイバー塗布」、「PA6 ナノファイバー塗布」、「PES ナノファイバー塗布」の4種類作製し、成形品の繊維体積含有率は4種とも約20%であった。また、成形品の重量に対して塗布したナノファイバーの重量比は0.78から0.5%である。

Table 1 Reasult of Tensile test

	Average	Standard deviation
	Tensile Strength(MPa)	
No nanofiber	32.6	1.63
PLA nanofiber	40.8	1.46
PA6 nanofiber	46.4	1.32
PES nanofiber	47.2	0.91
Young's modulus(GPa)		
No nanofiber	4.22	0.270
PLA nanofiber	4.44	0.097
PA6 nanofiber	4.20	0.298
PES nanofiber	4.02	0.078
Breaking strain(%)		
No nanofiber	1.13	0.080
PLA nanofiber	1.36	0.190
PA6 nanofiber	1.71	0.140
PES nanofiber	2.00	0.129

(3) 引張り試験結果 静的引張試験結果をTable1に示し、PA6 ナノファイバーを塗布した試験片断面内にナノファイバーの層を観察した結果をFig.2に示す。また、Fig.2の丸で囲んだ部分がナノファイバーである。Table 1よりナノファイバーを塗布していない試験片に比べナノファイバーを塗布した試験片は強度が高いことが示されている。「PLA ナノファイバーを塗布した試験片」は「ナノファイバーを塗布していない試験片」に比べ強度25.2%向上、「PA6 ナノファイバーを塗布した試験片」は「ナノファイバーを塗布していない試験片」に比べ強度42.3%向上、「PES ナノファイバーを塗布した試験片」は「ナノファイバーを塗布していない試験片」に比べ強度44.8%向上した。ヤング率は「ナノファイバーを塗布していない試験片」・「PLA ナノファイバーを塗布した試験片」・「PA6 ナノファイバーを



Fig.2 Layer of nanofibers in test piece

部科校名：生産工学部

氏名：邊 吾一

塗布した試験片」・「PES ナノファイバーを塗布した試験片」の 4 種共に非常に近い値を示した。破断ひずみについては「ナノファイバーを塗布していない試験片」・「PLA ナノファイバーを塗布した試験片」・「PA6 ナノファイバーを塗布した試験片」・「PES ナノファイバーを塗布した試験片」の順に値が大きくなっており、特に「PES ナノファイバーを塗布した試験片」は「ナノファイバーを塗布していない試験片」に比べ、77.0% 向上した。

(4)まとめ ①PLA ナノファイバーを生成するためのポリマー溶液の最適濃度は 10wt% であり、生成された PLA ナノファイバーのファイバー径はおよそ 380nm~900nm であった。② PA6 ナノファイバーを生成するためのポリマー溶液の最適濃度は 20wt% であり、生成された PA6 ナノファイバーのファイバー径はおよそ 170nm~700nm であった。③PES ナノファイバーを生成するためのポリマー溶液の最適濃度は 22wt% であり、生成された PES ナノファイバーのファイバー径はおよそ 100nm~700nm であった。④ 「ナノファイバーを塗布していない試験片」と比較して、「PLA ナノファイバーを塗布した試験片」は強度 25% 向上、破断ひずみ 21% 向上、「PA6 ナノファイバーを塗布した試験片」は強度 42% 向上、破断ひずみ 51% 向上、「PES ナノファイバーを塗布した試験片」は強度 45% 向上、破断ひずみ 77% 向上した。

6.2 ナノクレイ添加による生分解性樹脂 PBS の熱特性改善

(1) 構成材料 母材には PBS ペレット (昭和高分子, ビオノーレ #1020, 融点 115°C, 密度 1.26g/cm³, 粒径約 3mm) を用いた。ナノクレイには有機処理の異なる 3 種類の有機変性モンモリロナイト (Southern Clay Products, Cloisite 10A, Cloisite 15A, Cloisite 30B) を用いた。

(2) 試験方法 オートグラフ (島津製作所, AG-1) を用いて引張試験を行い, PBS/ナノクレイコンポジットの引張強さ及び弾性率を測定した。試験条件は JIS K7161 に準拠して室温のもと行った。試験速度 2mm/min とし, ひずみの測定には伸び計を用いた。試験片はダンベル型試験片を用い, 引張強さ及び弾性率の測定用にそれぞれ 5 本ずつ用意した。ヒートデステーションテスター (安田精機製作所, HDPC-3) を用いて PBS/ナノクレイコンポジットの荷重たわみ温度を測定した。試験条件は JIS7191-1 に準拠して, 曲げ応力 0.45MPa, 昇温速度 2°C/min とした。試験片はダンベル型試験片を精密切断機で長さ 80mm, 幅 10mm, 厚さ 4mm に切り出して用いた。また, 測定は, 開始温度 40°C で 5min の予備加熱後に開始した

(3) 試験結果 試験結果を Fig. 3 と Fig. 4 に示す。弾性率はナノクレイ含有率の増加につれて向上した。これはナノクレイが鉱物を原料とする事によるものと考えられる。一方, 引張強さはナノクレイの添加量 3% までは増加し, その後低下したが, PBS/ナノクレイの界面相互作用が弱いためと考えられる。Fig. 5 の荷重たわみ温度はナノクレイの種類によって異なり PBS/30B がやや低く, 耐熱性の向上は見られなかった。他の場合の耐熱性は向上した。また添加量が増えると緩やかに荷重たわみ温度が低下する傾向にあることが分かった

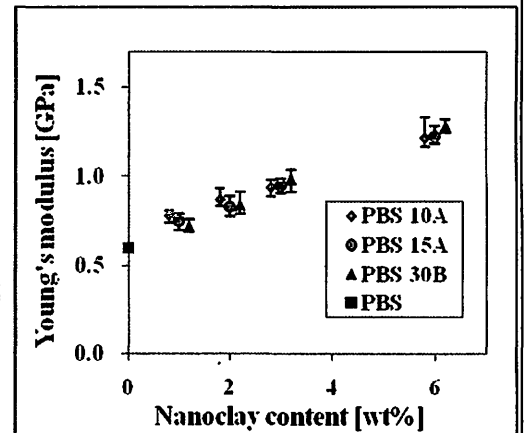


Fig. 3 Relation of Youngs' modulus to different nanoclay contents

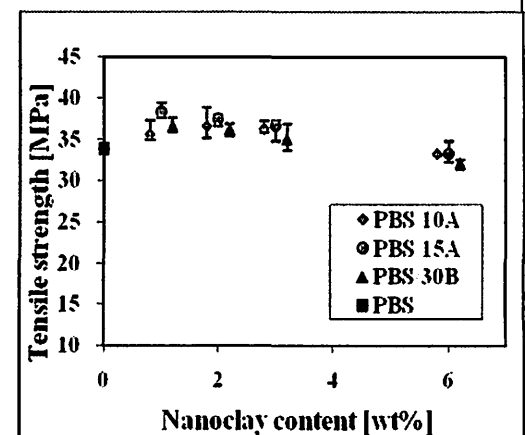


Fig. 4 Relation of tensile strength to different nanoclay content

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：生産工学部

氏名：邊 吾一

(4)まとめ ①層間挿入型ナノコンポジット得られた。②高せん断力で混練するほど引張強さ・耐熱性が向上した。③ナノクレイの疎水性によって層間距離拡大に差が表れた。④ナノクレイを 1wt%添加することで機械的特性ならびに耐熱性が向上した。

6.3 グリーンコンポジットの中間材の成形方法の確立

(1)成形法の開発 昨年度のグリーンコンポジットの幅 15 mm であり、幅方向に積層して溶融した場合、引抜き材間で樹脂リッチを生じやすい。また種々の積層構成を有する積層板を圧縮成形することは難しく、この引抜き材には限界があった。そこで、幅方向に拡張した幅 150 mm の引抜き材の成形法を本年度は開発した。この成形法で作成したグリーンコンポジットは大きな形状、積層構成の異なる成形品の作製が可能となり、作業性の向上が期待できる。Fig. 6 に今年度に開発した引抜き成形機の概略図を示す。

(2)成形上の課題 幅の広いケナフ織物に PBS を含浸させて作製する引抜き材の成形の問題点は、引取り機により引き取られる繊維と直角方向の横糸が燃れる (Fig. 7)。この現象は金型壁面近くの横糸が燃れ始め、次第に大きな燃れとなる。樹脂を流さずに成形を行った場合にはこの現象は確認されない。金型壁面近くで生じる抵抗によって金型内で速度布が生じ、燃れたものと考えられる。

(4)樹脂粘度の検討 一般に熱可塑性樹脂の熔融粘度は高いため、天然繊維への樹脂の被覆が困難となるなど、成形不良の原因として樹脂粘度が問題視される。樹脂粘度の低下に着目して前述の問題の解決を図った。PBS の粘度を下げる手法の一つとしては、加水分解を逆に利用して分子量を低下させ、粘度を下げる事が考えられる。そのためには PBS を高温・高湿の環境下に長期間浸漬させる方法や、アルカリ環境下に長期間浸漬させる必要があるが、両者ともに時間を要すること、また取り扱いにも注意が必要であり実用的ではない。ここではより簡易に短時間で粘度下げる手法を試みた。具体的にはあらかじめ水分を吸水させた PBS を用いて二軸押し出し成形により高負荷でペレットを作製した。通常の押し出し成形に加え、水分をあらかじめ吸水させた樹脂を用いることで加水分解を促進させ、より短時間で樹脂粘度を下げることを目標とした。今後、この粘土を下げたペレットを用いて、幅の広いグリーンコンポジットの作製を試みる。

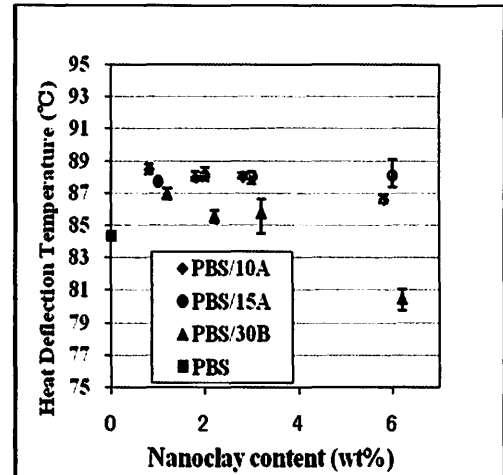


Fig.5 Relation of heat distortion temperature to different nanoclay

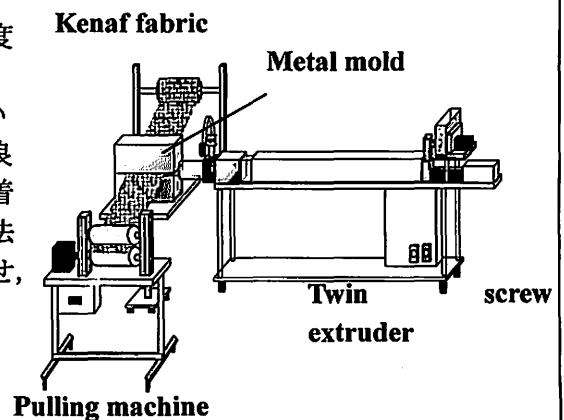


Fig.6 Schematic diagram of pultrusion machine

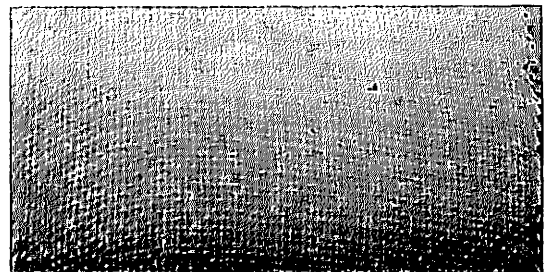


Fig. 7 Technical issues at pultrusion molding

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 4月 9日

日本大学 総長 殿

氏 名 野呂 知加子



所属・資格 生産工学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	高次生命機能を指標とした新規有用化合物スクリーニング系の開発	
3 研究目的	本研究は、新規有用化合物の発見と薬剤開発をめざし、細胞分化・細胞接着・形態形成・再生・発生・神経作用など、高次生命機能を指標とした低分子化合物スクリーニング系の開発を具体的な目的とする。	
4 研究概要	<p>本研究は研究期間の2年間で、下記の3種類の化合物スクリーニング系を開発・実用化する。</p> <p>1) ヒト幹細胞およびがん細胞を用いた分化誘導・細胞接着抑制・転移性浸潤効果スクリーニング</p> <p>2) マウス ES 細胞および iPS 細胞等の万能性細胞を用いた分化誘導・増殖抑制効果スクリーニング</p> <p>3) ヤマトヒメミミズ再生・生殖系を用いた個体再生・形態形成・有性生殖誘導効果スクリーニング系</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<p>・研究代表者</p> <p>野呂 知加子 生産工学部・准教授（全体総括、細胞と個体を用いた高次生命機能スクリーニング系の開発）</p> <p>・研究分担者（役割分担）</p> <p>神野 英毅 生産工学部・教授（新規有用化合物の探索と精製、遺伝子発現解析）</p> <p>柏田 歩 生産工学部・准教授（ペプチド合成と精製 タンパク発現解析）</p> <p>小森谷 友絵 生産工学部・助手（多能性幹細胞を用いたスクリーニング系開発）</p> <p>松本 太郎 医学部・教授（ヒト間葉系幹細胞を用いたスクリーニング系開発）</p> <p>加野 浩一郎 生物資源科学部・准教授（脱分化脂肪細胞を用いた分化スクリーニング系開発）</p> <p>杉山 弘 京都大学大学院理学研究科・教授（PI ポリアミドの合成と精製）</p> <p>渡辺 信元 理化学研究所・前任研究員（理研ケミカルライブラリーの提供）</p>	

※ホームページ等での公開の(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。

部科校名：生産工学部

氏名：野呂 知加子

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本研究の全体的なスケジュールと課題は以下のとおりである。

平成 21 年度

- ・ロボットによる自動化に適用可能なように、96well plate を用いた細胞培養系、個体再生系を整備する。
- ・既存の化合物および理研でリストされた機能のすでにわかった化合物についてまずテストを行う。
- ・細胞内へ薬剤を浸透させるためのベクター試薬等の補助剤を検討する（なるべく使わない方向）。
- ・効果判定の客観的方法 バロメーターの決定、メカニズムを検討し、分子アッセイ方法の開発を行う。

平成 22 年度

- ・上記の結果を踏まえて細胞・個体など系毎のスクリーニング系を確立し、特許申請・実用化を行う。
- ・これらの系を用いて、理研の化合物ライブラリについて大規模スクリーニングを行う。
- ・効果のあった化合物について、より詳細なメカニズム研究を展開する。

試験する化合物の種類は、ピロールイミダゾールポリアミド（PIポリアミド）、低分子有機化合物、ペプチドおよび理化学研究所化合物ライブラリ等の中から目的に応じて選択する。（神野・柏田・杉山・渡辺）

化合物の効果判定は、細胞分化・細胞接着・細胞移動・形態形成・再生・発生・神経作用など、生物の複合的高次機能を指標とし、形態変化、細胞遊走性試験、細胞接着試験、免疫組織染色、遺伝子発現解析、タンパク発現解析、ELISA（固相酵素抗体反応）等、客観的な評価ができるように数値化を目指す。

スクリーニング系毎の研究内容は、

1) ヒト幹細胞およびがん細胞を用いた分化誘導・細胞接着抑制・転移性浸潤効果スクリーニング系

A. ヒトがん細胞を用いた細胞接着・細胞移動（転移性浸潤）指標スクリーニング系（野呂）

細胞接着分子カドヘリンプロモーターに対して設計したPIポリアミドは、ヒトがん細胞に添加するとカドヘリン遺伝子の発現を抑制し、上皮-間充織転換（転移）を誘導する効果があることが判明し、このポリアミド配列について昨年特許申請を行った。この現象の逆反応を誘発する薬剤のスクリーニング系を検討し、がん転移防止薬の開発に繋げる。また、がん転移の分子メカニズム解明にも役立てる。

B. ヒト間葉系幹細胞および脱分化脂肪細胞を用いた細胞分化指標スクリーニング系（松本・加野）

ヒト間葉系幹細胞および脱分化脂肪細胞は体性幹細胞として近年注目されている。特に後者DFATは日大発のアイデアであり、今後の展開が期待されている。現状はこれらの細胞を移植医療へ応用する臨床応用研究が行われているが、この系を用いて細胞分化を指標としたスクリーニング系を作ることによって、特定方向のみへの分化誘導、完全分化による残存幹細胞の除去効果のある分子の発見が期待される。

これまでの研究から、軟骨・血管・平滑筋・骨・神経等多様な組織へ分化誘導できることがわかっており、これらの組織の分化マーカー遺伝子等も確認済みであるので、反応の指標として活用できる。

2) マウス ES 細胞および iPS 細胞等の万能性細胞を用いた分化誘導・増殖抑制効果スクリーニング系（野呂・小森谷・松本）

多能性幹細胞は再生医療のホープとして期待され、特に昨年来話題の iPS 細胞は自己皮膚細胞に 3 種類の遺伝子を導入するだけで万能化することから注目されている。しかしこれらの細胞の問題点は、移植したときに幹細胞が残存しており、それががん化することで生命をおびやかす点である。また現状では、特定の方向のみへの分化誘導が完成されておらず、効率よく安全な移植医療のためには、これらの問題解決が必須である。マウス万能性細胞を用い、完全で特異的な細胞分化を誘導する（未分化幹細胞を残さない）薬剤のスクリーニング系を作り、ヒト移植医療への応用に発展させる。

3) ヤマトヒメミズ再生・生殖系を用いた個体再生・形態形成・有性生殖誘導効果スクリーニング系（野呂）

ヤマトヒメミズ (*Enchytraeus japonensis*) は東北農業試験場で見つかった純国産の生物で、碎片分離と再生による無性生殖を行う環形動物である。体長は 1 cm ほどで透明な体をもつ。実験室のシャーレ中の寒天上で、通常は摂氏 18-25 度で、オートミールを餌として飼育する。自身で体を引きちぎり数片の断片となり（碎片分離）、3 日ほどで頭（脳）と肛門が前後に再生し、2 週間で元の大きさまで成長して数倍の個体数に増殖することを繰り返す。このミミズの無性生殖子孫は皆同じゲノムを持ったクローンである。

部科校名：生産工学部

氏名：野呂 知加子

研究結果 (つづき)

これまで約 10 年間の北大との共同研究により、この再生のメカニズムおよび幹細胞について分子レベルで詳細に解析し、平成 20 年度論文 2 報が掲載された。一方、条件によってはこのミミズに有性生殖を誘導できる(成熟から産卵・発生まで 16 日程度)ので、その発生機構についても研究が進んでいる。

碎片分離は電気刺激で誘導でき、1-2mm ほどの断片に同調的な再生を誘導できる。水中でも再生は起こるので 96well plate の中で反応させることができ、化合物の再生への影響は 3 日以内という短期間に判定可能である。また、再生における神経の関与についてすでに論文発表しており、化合物の神経作用を試験する系としても優れている。一方有性生殖により得られる卵の発生についても、同様に化合物の影響を試験できる。これらについてのスクリーニング系を開発し、個体という複雑反応に影響を与える化合物を探索する。すでに線虫で知られているように、下等動物であっても分子メカニズムに共通な部分が多いことから、この結果を高等動物へ応用発展させることは十分可能と考えられる。

H21 年度生産工学部の学科再編により、野呂と柏田は応用分子化学科、神野と小森谷は環境安全工学科所属となった。学部内の学科横断的なプロジェクトとして、協力して研究を進めて来た。また、医学部松本および生物資源加野とは、新たに設立された日本大学幹細胞研究会のメンバーとして、メールや講演会で情報交換を行い、共にこの研究課題の推進に努めてきた。

本研究の実施には、細胞および個体に対する薬物反応の客観的効果判定法および定量的解析法の開発が必須である。そこで平成 21 年度は、結果の数値化および定量化に重点をおき、モデル系の開発につとめた。

まず、カドヘリン発現を抑制する PI ポリアミドを、細胞に与えた際の濃度依存的細胞形態変化を指標として、がん転移誘発(上皮-間充織転換)を定量化した。生産工学部生命工学リサーチセンターにある Cellomics Array Scan (Forma) は、96well plate 上に播種した細胞を、細胞の生死・増殖・形態を検出する抗体等の蛍光試薬で染色することにより、各 well 中の個々の細胞についての蛍光強度を計測し、統計処理する装置である。本研究にこのシステムを活用するために、細胞培養法や検出法などの技術の最適化について検討を行い、細胞死誘発および上皮-間充織転換における細胞形態変化について、定量化するシステムを開発した(図 1)。

次に、上皮-間充織転換を遺伝子発現から評価するために、関連遺伝子群(E-cadherin, slug, snail, twist 等)について、RT-PCR 法にて解析した(図 2)。本助成金で購入したリアルタイム PCR 装置および分光光度計は、細胞の遺伝子発現解析の定量化に非常に有効であった。

一方ヤマトヒメミミズの再生・生殖系については、再生始動のマーカとなる新規遺伝子 *grimp* を発見し、論文発表した(図 3)。この遺伝子は再生開始後 3-6 時間に発現し、12 時間後には発現が消失する。構造解析から細胞接着に関わることが予測されるので、さらなる分子メカニズム解析および薬剤スクリーニングマーカーとしての利用など、今後の研究開発に期待が持てる。

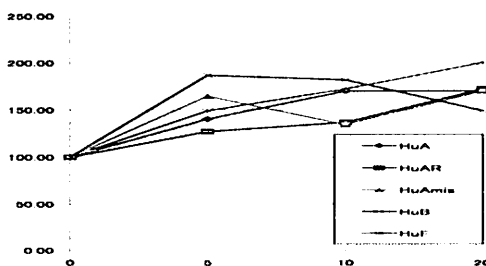


図 1 細胞骨格染色による上皮-間充織転換細胞形態変化の定量化

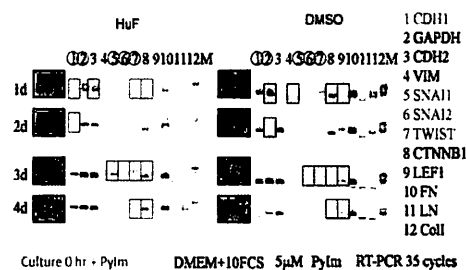


図 2 上皮-間充織転換に伴って発現変化する遺伝子群

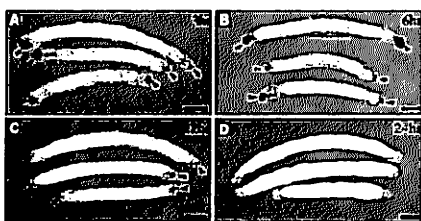


図 3 再生始動マーカー遺伝子 *grimp* の発現解析

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21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22年 5月 14日

日本大学 総長 殿

氏 名 武内 惇



所属・資格 工学部情報工学科・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	総合大学としてスケールメリットを活かす安心安全ユビキタスプラットフォームの研究	
3 研究目的	キャンパスライフをサポートするための基盤となる個人認証やユビキタスプラットフォームとしてのあり方及び、安心安全をサポートするための既存サービスや新たなサービスの提供方法について明らかにする。特に、学部ごとに異なる複数のITシステムによる既存サービスを統合・連携し、安心安全に結びつく新たなサービスを効率的に提供するためのユビキタスプラットフォームを確立して各種サービスの統合・連携を実現する方法を確立する。	
4 研究概要	<p>前年度の研究に基づいて、各学部で既に提供中のサービスについてはSOAに基づく「サービスバス」による手法でサービスの継続的な提供法を研究するとともに、新たな安心安全サービスの提供については、SOAに基づいて、総合学術情報センター（以下、総情センター）をハブとするネットワークを介して、全学共通のサービスを効率的で柔軟かつ拡張性のあるサービス提供する仕組みの構成法について研究する。課題を以下に示す。</p> <p>I. 既存サービスの統合・連携法 II. 新たな安心安全サービスの提供法 III. データベースの整備・管理法</p>	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 武内 惇 ・研究分担者（役割分担） 関根 好文（仕様設計・評価） 泉 隆（仕様設計・評価） 荒関 仁志（システム設計・開発・評価） 金子 正人（システム設計・開発・評価） 藪田 孝造（システム設計・開発・評価） 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

I. 既存サービスの統合・連携法の研究

運用・保守要件の確認と具体化，信頼性要件の確認と対策，セキュリティ要件の確認と対策について研究を行い，学生サービスシステムを開発し実現性を確認した。

1. 運用・保守要件の確認と具体化

(1) 運用・保守のためのサービス連携の見える化の方式

SOAに基づきサービス連携を行う上で，複数のシステム間でどのようなデータのやり取りがなされているか，正しい方法でユーザが利用しているかを明らかにし，また，業務変更が行われたときサービスに起こる問題を解決するため，サービスにおける問題を運用管理者が把握できるようにする仕組みが重要となる。本研究では，EBS上にサービス連携の「見える化」の仕組みを組み込みサービスにおける問題を運用管理者が把握できるようにする方法を開発する。

「見える化」に用いる情報を運用管理者が得るためには，サービス連携を行うESB上でどのようなデータのやり取りがなされているかログをとり，運用管理者に分かりやすい形式に変換して情報提供を行わなければならない。しかし，業務ごとに「見える化」に用いる情報を異なる方法や形式で取得する場合，ESBの見える化の仕組みが複雑になり，部署全体，また，会社全体の業務の「見える化」が難しくなるという問題がある。そのため，サービス間のデータ転送を行うだけでなく，「見える化」の情報取得を考えたESBコンポーネントの構成法を開発することが必要となる。

本研究では，SOAに基づくシステムはオフィスにおいて業務担当者の作業の一部をESBという作業場を介してサービスに代行させる仕組みであると考え，オフィスワークにおける作業を機能に注目してモデル化するOSCARモデルに基づいてESBでの作業をESBコンポーネントとして分類し，ESBへの「見える化」の仕組みの組込を容易にする。

表1. OSCARモデル分類とESBコンポーネント

OSCAR分類	役割	ESBコンポーネントの役割
Order	外部システムへの情報入手，提供に関する指示	・データの認証
Stream	サービスと外部システム間のデータ送受	・ロギング
Coordinate	サービスと作業者間の情報の送受	・サービスの呼び出し
Action	データベースに格納されているデータの加工	・XMLDBからのデータの取得 ・SOAPメッセージの作成 ・SOAPメッセージの解析
Report	サービスから作業者への情報の提示	・管理者への報告

(2) 見える化の仕組みの実装法

本研究では，ESBとしてInterstage（富士通のSOAプラットフォーム）を使用し，基本的で，かつ，重要な「見える化」の仕組みである障害の発見の仕組みを取り上げ，その実装法の研究を進めている。ここでは学生サービス（詳細は後述）を例に実装法を説明する。

学生サービスシステムからの要求により，ESB上に登録したシーケンスを実行し，登録した機能コンポーネントを順番に実行し，出席システムのサービスの連携を実現する。

このシーケンスの役割は，まず送信するユーザとデータの認証を行い，送信するメッセージを編集して対象のサービスに送信し，返ったメッセージから実行結果を解析することであ

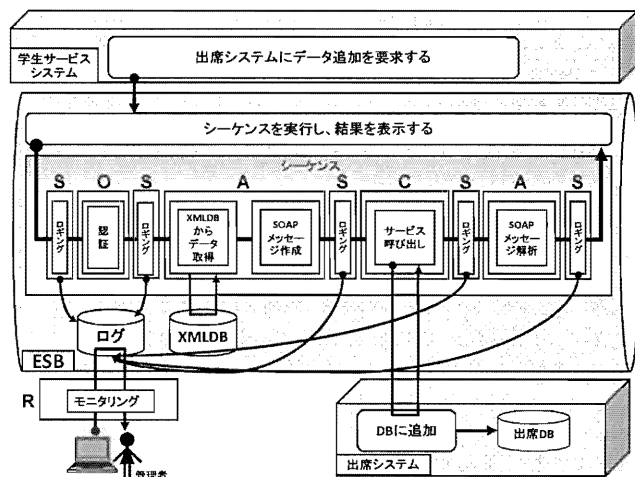


図1. OSCARモデルを用いたサービス連携の仕組み

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

研究結果（つづき）

る。シーケンスで実行する機能コンポーネントの順番は、Order, Action, Coordinate, Action の順となる。そして、それらの機能コンポーネントの実行後に、Stream を実行することにより、直前の機能コンポーネントの実行結果をログに蓄積して、どの機能コンポーネントでどんな異常が発生したのか明確にする。すなわち、シーケンスで実行する機能コンポーネントの順番は、①Stream, ②Order, ③Stream, ④Action, ⑤Stream, ⑥Coordinate, ⑦Stream, ⑧Action, ⑨Stream である。Stream で蓄積したログにより、管理者は、Report を実行し、どの機能コンポーネントにどんな異常があるのか検出する。

ESB の機能コンポーネントが、サービス連携での異常の検出が可能であるか検討する。事例として、表 2 の⑥Coordinate での「異常の見える化」について検討する。予想される各異常を検討するために、(1) サービスのアドレスの変更と(2) サービスの入力値の追加という業務変化が発生した場合について(図 2)、「異常の見える化」とそれをを用いた解決法について述べる。

OSCAR モデルの Stream で蓄積するログにより、(1)「⑥Coordinate」において「対象サービスが存在しない」という異常が見えるようにする。これにより、サービスの選定で設定したアドレスが適切ではないと判断でき、対象のサービスの URL を取得し、Coordinate で登録する URL を `http://~/webapps/attendservices/~` に修正することで異常を解決する。

(2)Stream で蓄積したログには、「対象のサービスに適さない入力値」という異常も見えるようにする。

そして、対象のサービスの入力値の情報を取得することにより、送信する入力値に IC カード番号が必要であると判断できる。入力値の修正は、Action で修正する。この場合「XMLDB からのデータの取得」の機能に、学生基本番号、学生番号、氏名以外に IC カード番号を取得することを追加すれば、適切な入力値とすることができる。

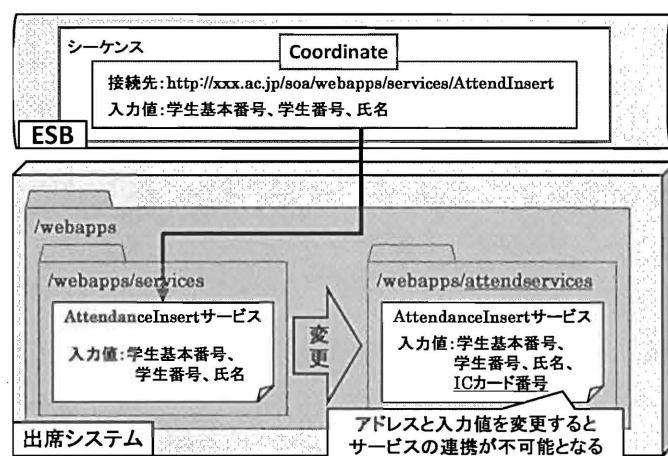


図 2 対象のサービスの変化

2. 信頼性要件の確認と対策の策定

データの不正アクセス、サービス間でのデータの利用を容易にするため、サービス間で参照するデータは ESB 上に実装した「台帳」と呼ぶ XML データベースで一括管理する。

3. セキュリティ要件の確認と対策の策定

見える化の一つとして、利用者の認証、台帳参照の認証の機能を実現する。

以上の方式の実現性を確認するため、以下に述べる学生サービスシステムを構築した。

4. 学生サービスシステムの実装

学生サービスとは、親元から離れている学生が授業に出ているか、健康状態は良いかを、学生の父母が知るために使用することを目的としたサービスである。学生サービスは学生の出席情報閲覧のために既存の出席システム、履修システム、学生の安否情報の確認を行う安否システムをそれぞれサービスとして利用し、ESB を用いて連携させた構成である(図 3)。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

研究結果（つづき）

学生サービスの機能である出席表示では、出席システムと履修システムを連携させたデータを使用している。この出席システムと履修システムの連携の機能を例に OSCAR モデルによる ESB の機能コンポーネント分割の方法を考案することが本研究の目的である。

a. 出席システム概要

出席システムは学生の授業における出席情報を蓄積するシステムである。学生は IC カードリーダーを用い、FeliCa カードをかざして出席登録を行う。学生は履修システムから取得される時間割表に表示される出欠情報を見て、授業への出欠が正しく記録されているか確認する。また、教師は出席情報の削除、変更を行う。

b. 履修システム概要

履修システムは学生の時間割情報を蓄積するシステムである。学生は履修登録、履修削除を行うことができ、また、登録内容を確認することができる。

c. 安否システム概要

安否システムは学生の現在の状況（風邪引いた、経済状況が悪いなど）を蓄積するシステムである。災害時に管理者が学生に状況を登録するように知らせるメールを送信する。学生は受信したメールから安否システムにアクセスし現在の自分の状況を入力する。学生の家族は入力された情報を閲覧でき、学生の状況を知ることができる。また、送信権限を持ったユーザであれば情報登録のメールを送信できるので、家族が学生の状況を知りたいときにメールを送信し学生の状況を得ることができる。

5. まとめ

以上の学生サービスシステムの実現により、OSCAR モデルに基づいて構成する ESB コンポーネントを用いて見える化の仕組みを組み込み、「既存サービスの統合・連携」を行うことができることを確認した[1,2]。

II. 新たな安心安全サービスの提供法の研究

総情センターをハブとして、各学部ネットワークを介して安心安全サービスを提供するための SOA に基づくサービスの提供法について研究し、全学共通のサービスをタイムリーに提供する手法を確立する。このため、(1) 新たな全学共通の安心安全サービスとして、安否情報の提供サービスや全学に関わる重要事項などの一斉同報サービスなどの提供法、(2) 総情センターをハブとした SOA に基づくシステム構成法として、本年度は学部から学生の出席情報をリアルタイムに総情センターに設置したデータベースに登録し、また、いつでも登録された情報を参照可能にするオンライン出席管理システムを開発した。

1. 一斉同報サービスの実現

多くの学生や父母に対して一斉に情報送信を行うに当たって、運用費用の低減を図るため、Google Apps を活用する方法を検討した。本研究では、GoogleApps, ならびに、GoogleAppEngine を使用し、安否システムの構築を進めている。

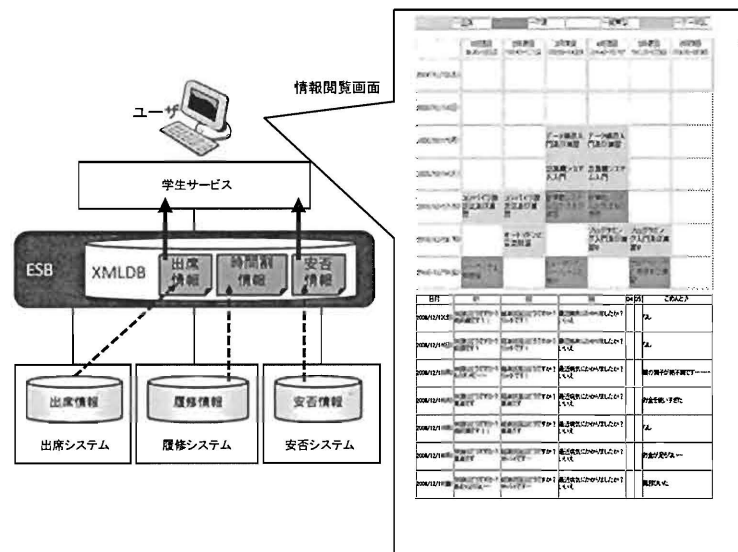


図3 学生サービスシステム

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

<安否システムの構成法>

安否システムは既設の安否システムと同様の機能を有し、Java のサーブレットを用いて作成したアプリケーションを Google App Engine に置き Google Apps のサービスと連携させたことによりクラウド環境で稼働するシステムである (図 4)。

- ①Google App Engine 上に置く作成したアプリケーションの機能構成は安否情報を Google Spreadsheets から取得し、Google Calendar に反映する。
- ②Google Spreadsheets のアンケート機能を使うことによって、安否情報の登録要請、登録を行う。また、Spreadsheets は安否情報の処理に関するデータベースとしても使用する。
- ③Google Calendar は携帯電話からも閲覧可能であり、共有が可能なため、安否情報の閲覧に使用する。
- ④Gmail は安否情報が反映したことを通達するために使用する。

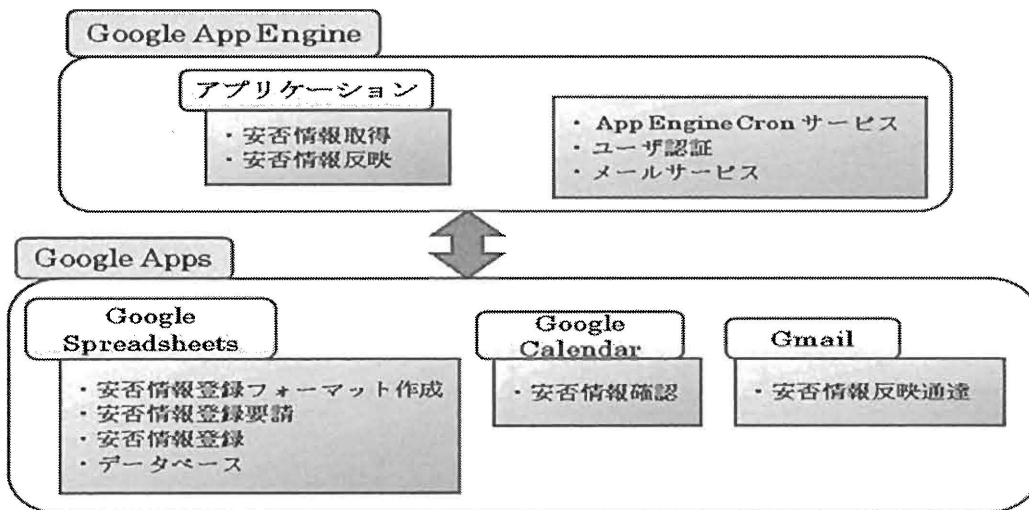
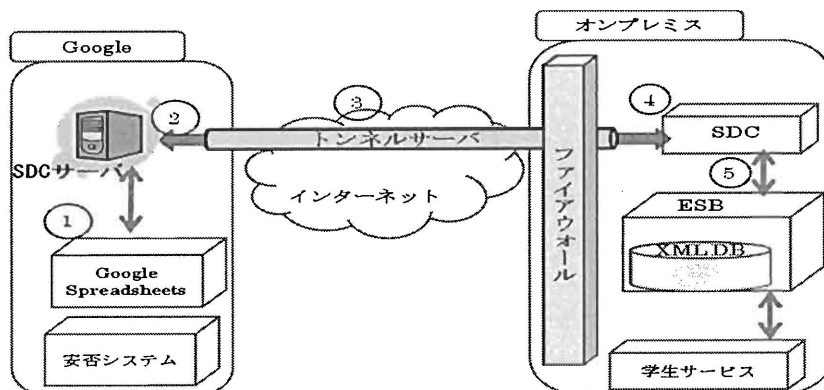


図 4 安否システムの構成

また、Google サーバと SOA との連結は、相互に安全な運用を可能とするため、SDC (Secure Data Connector) を SOA 側 (オンプレミス) に組み込み使用する。主要な動作を以下に示す (図 5)。

- ①安否データを要求されると、Google Apps から安否データ転送をするために Google 上にある SDC サーバーをアクティブ化する。
- ②SDC サーバーは指定された安否データの転送を行うための検証を行い、暗号化するトンネルにより、SDC (オンプレミス) に接続する。SDC はオンプレミスのネットワークの中で稼働する。
- ③トンネルサーバーに接続することにより、安否データを暗号化しインターネット上を通過する。
- ④SDC は取得したデータが要求した安否データと一致するかを検証し、解読する。
- ⑤取得したデータを ESB に送り、ESB は学生サービスと連携する。



現在、Google 側のシステムの開発まで終了している。今後、総情センターから SDC 使用の許可を得てシステムの完成を図る。

図 5 Google とのサービスの連携

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：工学部

氏名：武内 惇

2. オンライン出席管理システム[3]

本システムは、学生の出席情報をリアルタイムに総情センターに設置したデータベースに登録したり、登録された出席情報をどこからでも参照できるようにするシステムである。図6に示すように、出席端末がネットワーク上に接続されるクライアントサーバシステムであり、ネットワーク接続により他の出席管理システムに連動することも可能としている。また、ICカードリーダー、バーコードリーダーのほか、PCや携帯端末などいずれの出席端末にも対応可能としている。中でも、将来のICカード学生証の利用を想定して、Felicaチップを搭載したICカードや携帯端末は、ほとんどの学生が所有しているもので、これを利用することを考える。

ただし、この場合、利用するのはFelica固有のIDのみである。出席端末には非接触型ICカードリーダー(SonyのRC-S320)を用い、出席端末のアプリケーション開発にはSDK for Felicaを使用した。また、読み込んだ情報は、IPネットワークを介して、総情センターに設置されているデータベースに格納される。出席管理システムは、データベースサーバをMySQL、HTTPサーバをApacheで構成した。

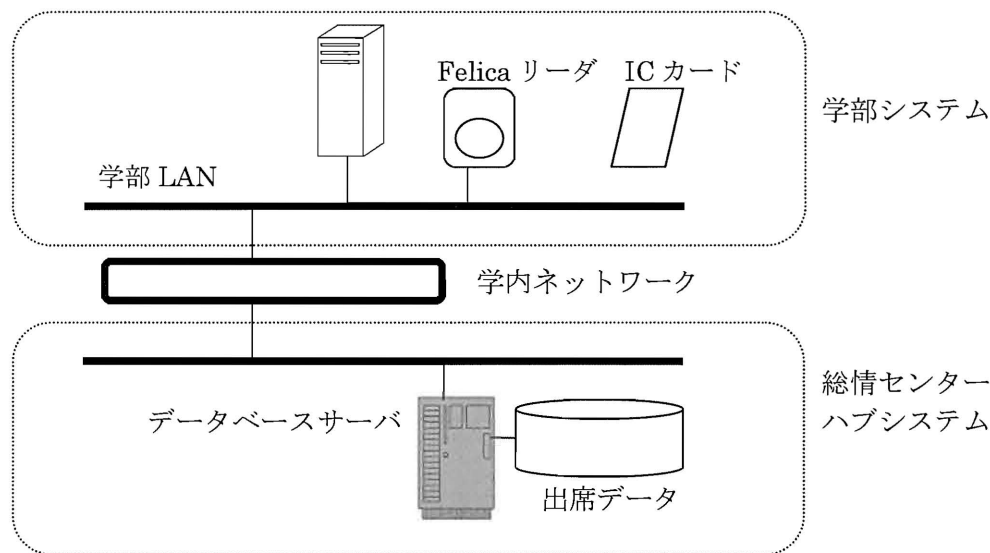


図6 出席管理システム

3. まとめ

本研究により、

- (1) 一斉同報システムについてはGoogleを使用することを実現する方法を明らかにした。
- (2) 学部のシステムで収集したデータを、学内ネットワークを介して総情センターに設置したデータベースにリアルタイムに登録したり、学部システムから参照する方法を明らかにした。

III. データベースの整備・管理法

総情センターを核とする、セキュリティや事故などに対応できるデータ管理法を明らかにした。すなわち、各学部の学生情報データベースのスレーブコピーを保持することで、各学部での障害に対して、迅速な復旧が可能と考える。この場合のデータの整合性の確保、並びに、各学部の学生情報データベースを、外部から疑似的に1つのデータベースに見せるためのパーティショニング技術の研究を進めた。また、これによって災害時に発生する特定のデータベースへのアクセス集中を軽減することも期待できる。

本年度は実現法の研究を終了してシステムの実装を進めた。現在、工学部の学生サービスシステム、ならびに、理工学部の出席管理システムとの連結の準備作業を進めている。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

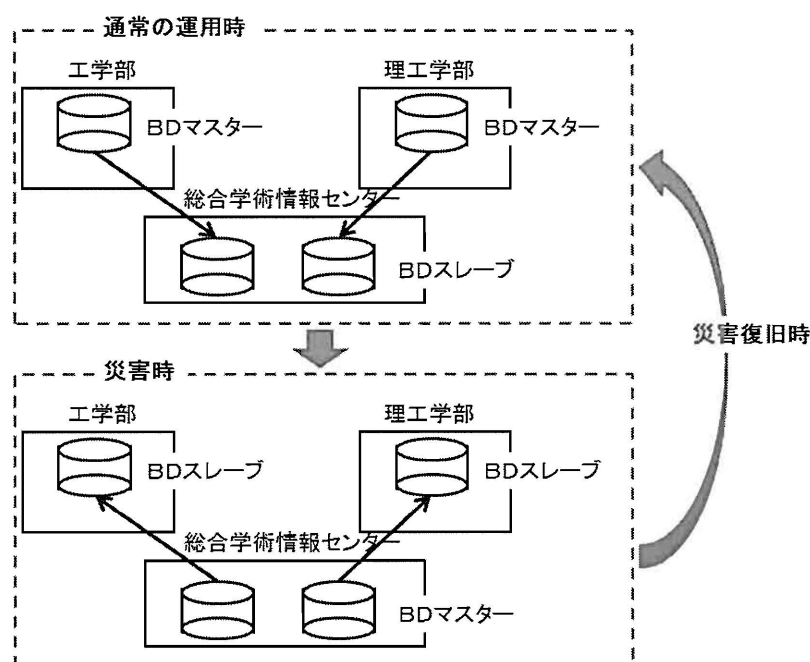
部科校名：工学部

氏名：武内 惇

1. 分散データベースの実証実験

災害時におけるデータベースの保護、およびデータベースの早期復旧に関する実証的研究を進めてきた。日本大学では、広域に分散するキャンパスを有するため、この立地条件を利用した災害対策用データベースの構築を提案した。具体的には、MySQL データベースのマスタ・スレーブ管理方法を、広域キャンパスネットワークに利用することを提案した。このようなキャンパス内の広域ネットワークをデータベース管理に利用した試みは他にはない。

この実験では、主にネットワークのレスポンスと情報量の関係を調査し、学生の安否情報程度の情報量（数百バイト程度）を扱う上では、特別にネットワークが遅延しない限り問題がないことがわかった。ただし、キャンパスをつなぐ広域ネットワークでデータベースを管理するためには、ネットワーク管理専用のセキュリティを強化した専用ネットワークが必要であることが分かった。したがって、広域分散型データベース管理には、全学的なネットワークの管理や運用が不可欠であることが分かった。



2. まとめ

- (1) MySQL データベースを基本とする広域分散型データベース管理が有効であることを確かめた。
- (2) 広域分散型データベースを実際に運用・管理するためには、セキュリティの高い、データベース専用ネットワーク (VLAN など) の利用が不可欠であることがわかった。今後は、総合学術情報センターを中心とした「広域分散データベース管理」のための取り組みが必要と思われる。

IV. 学会発表

- [1] 泉奈津子, 金子正人, 武内 惇, 泉 隆, 菌田孝造, OSCAR モデルに基づく ESB の機能構成法に関する一考察～サービス連携をコンポーネントに分割する方式～, 情報処理学会第 7 2 回全国大会, 3P-6, pp.1-485~1-486(2010)
- [2] 泉 貴志, 金子正人, 武内 惇, 泉 隆, 菌田孝造, OSCAR モデルに基づく ESB の機能構成法に関する一考察～学生サービスシステムへの適用～, 情報処理学会第 7 2 回全国大会, 3P-5, pp.1-483~1-484(2010)
- [3] 田中晃平, 泉 隆, 武内 惇, 荒関仁志, オンライン出席管理システムの開発に関する検討, 情報処理学会第 7 2 回全国大会, 6ZK-3, pp.4-707~4-708(2010)

以上

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 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 31 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 松本 紘一



所属・資格 医学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注: 該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	進行性腎障害に対する PI ポリアミドによる遺伝子治療の開発	
3 研究目的	進行性腎障害に対して現在有効な治療薬が無く、我々は工学部、薬学部との共同で進行性腎障害へ DNA 認識新規遺伝子制御薬として TGF-β1 に対する PI ポリアミドの GLP 創薬開発と、ループス腎炎を含めた自己免疫性腎炎に対し免疫グロブリン FcRγ鎖 PI ポリアミドの効果を SLE マウスを用いて検討する。	
4 研究概要	<p>TGF-β1 に対する PI ポリアミドの創薬開発の為、薬用量を Dahl 食塩感受性ラットに 1 ヶ月長期投与したが、摂餌量や体重は変化せず副作用は認められなかった。また TGF-β1 蛋白発現を著明に抑制し、腎糸球体、腎髄質の間質線維化を抑制した。さらにマイクロアレイにて TGF-β1 の特異的抑制を確認した。マウスを用いた毒性試験で、TGF-β1 に対する PI ポリアミドの致死量は 40 mg/kg であった。現在、GMP での創薬開発の為、PI ポリアミドの Fmoc 自動合成法での高効率大量合成法を開発している。</p> <p>FcRγ鎖に対する PI ポリアミドの分子設計は、マウス FcRγ鎖プロモーターの構造解析から、基本転写を抑制する用設計、合成した。マクロファージ細胞株 J774A-1 での PI ポリアミドの FcRγ鎖 mRNA 発現、蛋白発現の抑制を確認した。FcRγ鎖に対する PI ポリアミドは FACS 解析にて CD16/32 陽性細胞数を有意に抑制した。In vivo ではループス腎炎モデルマウス CD16 陽性の単球の浸潤を検証している。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 松本紘一 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 羅 智靖：(IgG 受容体に対する PI ポリアミドの研究) 齋藤 烈：(ポリアミドの化学修飾、分子設計) 松本宜明：(遺伝子治療薬の物性、薬物動態) 福田 昇：(PI ポリアミドの開発実験) 上野高浩：(PI ポリアミドの開発実験) 杉山 弘：(PI ポリアミドの合成) 	

※ホームページ等での公開の 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。

部科校名： 医学部

氏名： 松本 紘一

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

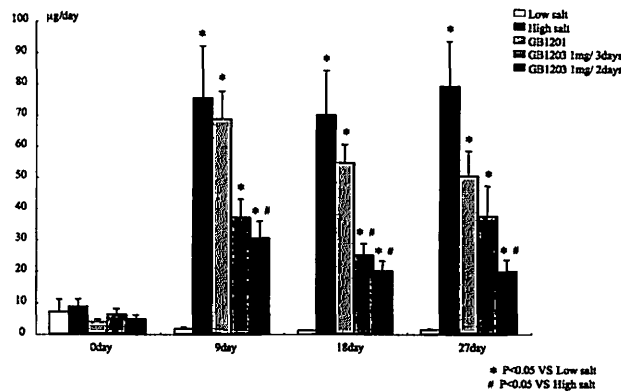
I. TGF-β1 に対する PI ポリアミドの創薬開発

1. TGF-β1 に対する PI ポリアミドの前臨床試験

TGF-β1 に対する PI ポリアミド (GB1203) の新規遺伝子制御薬としての創薬開発研究として、薬容量での副作用を検討する目的で、GB1203 を 8 週齢 Dahl 食塩感受性ラットに 1 mg/kg 体重で尾静脈から 2 日または 3 日に 1 回で、28 日間長期投与した。GB1203 は尿中 TGF-β1 蛋白の排泄量を経時的に著明に抑制したが、ミスマッチポリアミドは影響しなかった (図 1)。

図 1

Changes in urinary excretion of TGF-β1 in Dahl-S rats treated with PI polyamide



GB1203 は Dahl 食塩感受性ラット尿蛋白、尿アルブミンを有意に抑制した。28 日目では腎臓糸球体、尿細管での TGF-β1 免疫染色を有意に抑制し、組織学的には糸球体硬化、腎間質線維化を著明に改善した (図 2, 3)。さらに GB1203 は腎髄質の TGF-β1、fibronectin、collagen、CTGF mRNA 発現を有意に抑制した。Dahl 食塩感受性ラットでの長期投与でも体重や摂餌量には影響せず、薬容量での副作用は認めなかった (図 4)。

図 2

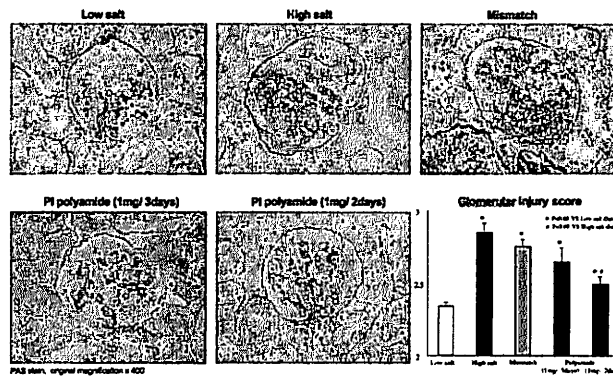
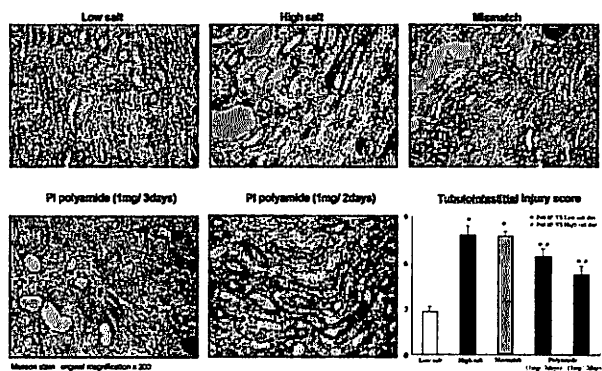


図 3

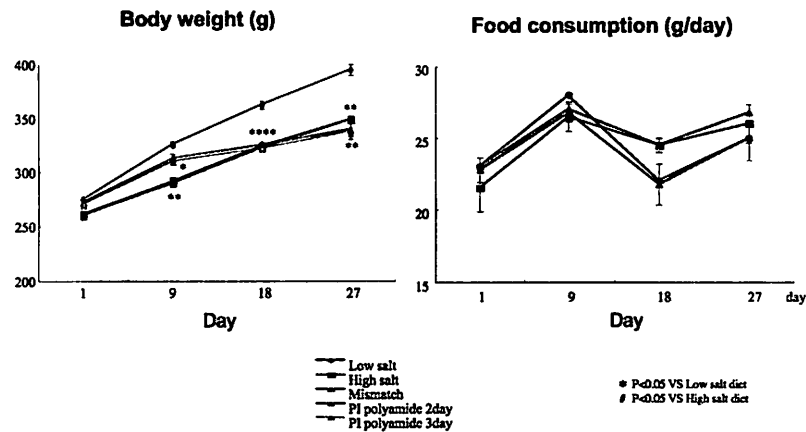


部科校名：医学部

氏名：松本紘一

研究結果 (つづき)

図 4



2. TGF-β1 に対する PI ポリアミドのターゲット遺伝子への特異性

TGF-β1プロモーターのAP-1サイトの8塩基認識をするGB1203の特異性を検証するため、Dahl食塩感受性ラットにGB1203を28日間投与後摘出した腎皮質からmRNAを抽出し、Affimetrix社のマイクロアレイ(Rat genome 230 2.0 array, GeneChip)を用いて、網羅的に30,000のmRNA発現を半定量的に評価した。mRNAのサブクラスでは増殖因子681の内9のmRNA発現を抑制、サイトカイン685の内11のmRNA発現を抑制、細胞外マトリックス397の内8のmRNA発現を抑制し、抑制されたmRNAの殆どがTGF-β1関連であり、PIポリアミドの特異性が確認された。

更に GB1203 が特異的に TGF-β1 を抑制する事より、Dahl 食塩感受性ラットへの高食塩負荷で増加し、GB1203 で抑制された mRNA が TGF-β1 に関連した腎障害因子である。結果として enolase-2γ、補体 C3、免疫グロブリン Fc 受容体γ鎖、Synaptotagmin 13、plectin-1 が抑制され、これら分子は TGF-β1 による腎障害に関わっていると考えられた。

3. PI ポリアミドの染色体への結合の検討

FITC ラベル PI ポリアミド(GB1203)と DMSO に溶解し、培養 HeLa 細胞と 24 時間インキュベートし、DAPI による FISH 染色と、染色体結合パターンを検討したところ、PI ポリアミドの染色体結合パターンは DAPI とは異なっており、PI ポリアミドが染色体上の遺伝子 DNA に対し、塩基配列特異的に結合している事が確認された。

4. PI ポリアミドの薬物動態の検討

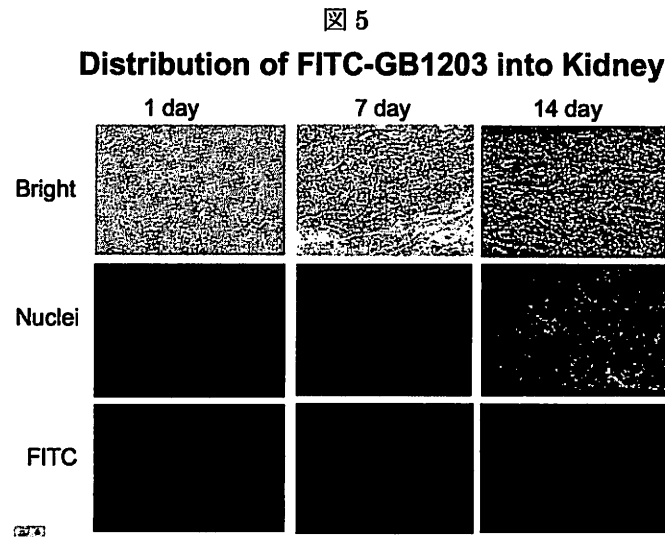
PI ポリアミドは核酸医薬と異なり生体内で安定で、ベクター無く組織や細胞に取り込まれ、殆どの細胞の核に結合する。そこで、薬学部松本宜明研究グループにて、UV-HPLC システムを用いて TGF-β1 に対する PI ポリアミド(GB1203, MW1700)の ADEM を検討した。GB1203 は腎排泄型で、胆汁排泄は殆ど認められなかった。

医学部腎臓高血圧内分泌内科で FITC ラベル PI ポリアミドを DMSO に溶解して、Wistar ラットの尾静脈から iv し、1, 7, 14 日目にラットを貫流し、各臓器を取り出し、核染色をした後、蛍光顕微鏡を用いて FITC ラベル PI ポリアミドの取り込みを評価した。1, 7 日目において腎臓皮質、髄質全体へのデリバリーが認められ、特に尿細管細胞上皮細胞や腎糸球体メサンジウム細胞への取り込みが認められた。PI ポリアミドは 14 日後までは核内に留まっていた (図 5)。

部科校名：医学部

氏名：松本紘一

研究結果（つづき）



5. PI ポリアミドの合成法の検討

京都大学理学部杉山研と日本大学では、合成機を用いたポリアミド合成の自動化を試み、Fmoc 自動固相合成法を開発し、知財化した。更に PI ポリアミドの GMP レベルでの創薬開発に向け、PMMS-8 での Fmoc 自動固相合成法での縮合剤として、HATU、HBTU、HCTU の合成効率を検討したところ、HCTU が最も効率が良い事が分かった。この結果を基に縮合剤として HCTU を使い、PMMS-8 での Fmoc 自動固相合成法をスケールアップして、PI ポリアミドの大量合成法を開発している。

II. FcR γ 鎖に対する PI ポリアミドの開発

1. マウス FcR γ 鎖プロモーターに対する PI ポリアミドの分子設計と合成

平成 20 年度に京都大学杉山、工学部齋藤と医学部羅研究グループで FcR γ 鎖プロモーターに対する PI ポリアミドの分子設計を行い、マウス FcR γ 鎖遺伝子発現に重要な役割を担う転写因子の結合ターゲット配列に対して、まずマウス FcR γ 鎖遺伝子発現のノックダウンを目的に、PI ポリアミドによりマウス FcR γ 鎖プロモーター活性を完全に抑制するため、FcR γ 鎖プロモーターの基本転写領域に近く、基本転写ユニットに含まれる転写因子の結合に関わる領域に対して PI ポリアミドを設計した。さらに、マウス FcR γ 鎖遺伝子発現の病的状態（血管内皮障害時やループス腎炎発症時）での抑制は NRF-2 領域、AP-1 領域など、その転写調節と疾病との関連がすでに示唆されている転写因子のプロモーター上の結合配列に競合して結合する PI ポリアミドを設計した。PI ポリアミドの構造はループ型とし、3 塩基と 2 塩基の間に β リンカーを入れた 3- β -2 の構造を基本とし、DNA の 8 塩基対を認識するよう設計した。これら複数の PI ポリアミドを我々が開発した Fmoc 自動合成法で合成した。

部科校名：医学部

氏名：松本紘一

研究結果 (つづき)

A

```

-200 ATCGTCCAGC TCCCCAAAT GGCCCTTCCG GGAGCTGCCT
-160 GGTCTGTAGT ACAGGAGGG GAAGGGGCCA AAGTGTGGGC
          FCERG-3
-120 GAAGGCGTGG CAGGAAGGAG GAAACTGTGG TCAAGGAACT
          FCERG-2
-80  GTTCGTGGGC ACAGCTGCGC AGTTCTGTCA GCGCAGCGCG
-40  ATCACCAGCT CCCAGCGCCG CAGCCCCCAG CGCACCCAGG

1  ATGATCTCAG CCGTGATCTT GTTCTTGCTC
   Translation initiation codon

GGAA:Ets family binding site
    
```

B

```

FCERG-2 [ lmlmPy-β-lmlm-β-Dp
          PyPylm-β-PyPy-Ac
FCERG-3 Ac-PyPy-β-lmlmPy
          Dp-β-Pylm-β-PyPyPy ]
    
```

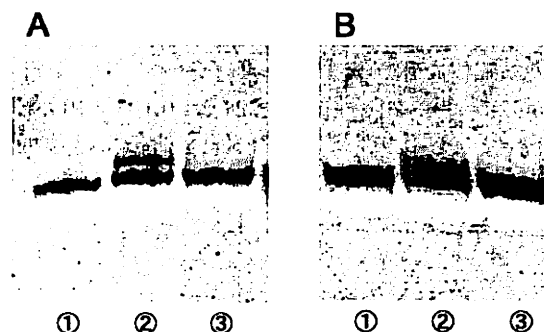
2. FcRγ 鎖に対する PI ポリアミドのリード化合物の決定

分子設計した複数の FcRγ 鎖に対する PI ポリアミドを島津製 PMMS-8 ペプチド合成機にて、Fmoc 固相自働合成で合成した。合成した PI ポリアミドの効果を評価するため、マウス由来単球/マクロファージ cell line である J774 細胞で FcRγ 鎖 mRNA 発現にて確認した。J774 細胞に FcRγ 鎖に対する PI ポリアミドを 1、0.1、0.01 μM にて添加し、48 時間後に mRNA を抽出、逆転写後にリアルタイム PCR にて FcRγ 鎖 mRNA 発現を比較した。さらに Fcγ RIII 蛋白発現は、やはり J774 細胞に FcRγ 鎖に対する PI ポリアミドを 1、0.1、0.01 μM にて添加し、48 時間後に抗 CD16、3 2 抗体を用いた免疫染色、FACS 解析で FcRγ 鎖に対する PI ポリアミドが確実に in vitro で FcRγ 鎖発現を抑制する事を確認し、最も効果の高い PI ポリアミドをリード化合物として決定した。

3. PI ポリアミドのターゲット配列への結合の確認

PI ポリアミドのターゲット配列への結合を確認するため、ゲルシフトアッセイを行った。PI ポリアミドは 2 本鎖 DNA のマイナーグループにはまりこむように結合することが知られている。このため、ターゲット配列の sense 鎖に FITC ラベルしたものを作成し、antisense 鎖とアニーリングさせ、FITC ラベル 2 本鎖 DNA を作成してゲルシフトアッセイを行った。FCERG-2 を 2 本鎖のターゲット配列に加えると、バンドのシフトが認められ、このシフトしたバンドは過剰量の FITC 非標識 2 本鎖 DNA の添加により消失することより、FCERG-2 がターゲット配列に結合していることが確認された。FCERG-3 についても同様に添加によりバンドのシフトを認め、過剰量の非標識 2 本鎖 DNA によりシフトしたバンドが消失することより、ターゲット DNA に結合すると確認された (図 6)。

図 6



部科校名：医学部

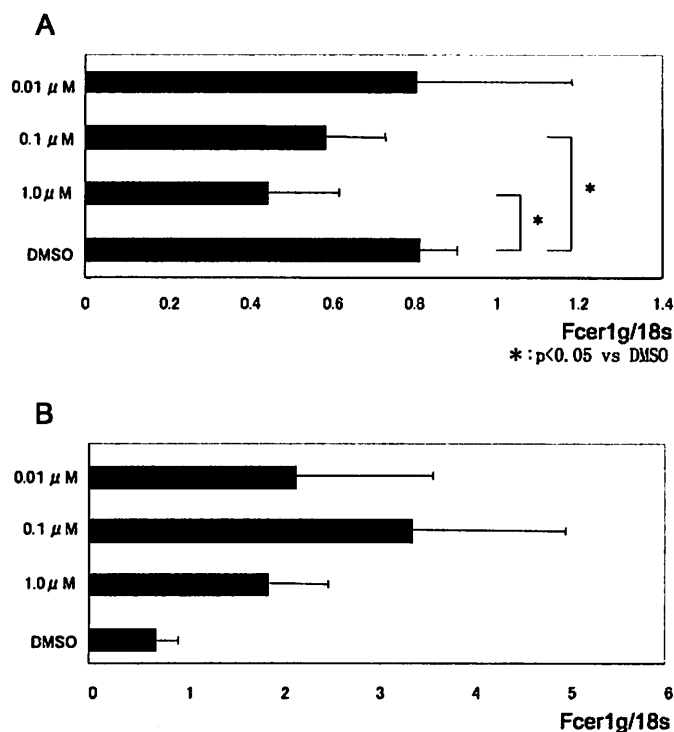
氏名：松本絃一

研究結果 (つづき)

4. PI ポリアミドによる Fcεr1g mRNA 発現抑制効果の確認

合成した PI ポリアミドの効果を検討するため、J774A.1 細胞培養液中に FCERG2 を 0.01、0.1、1.0 μM にて添加し、さらに 24 時間培養を行った後、細胞より total RNA を抽出、逆転写反応にて cDNA を作成後、real time PCR 法にて Fcεr1g mRNA 発現を検討した。FCERG-2 は濃度依存的に Fcεr1g 遺伝子発現を抑制したが (図 7A)、FCERG-3 はコントロールの DMSO と比べ、有意差は認めなかったが、むしろ mRNA 発現が増加していた (図 7B)。

図 7



5. 免疫染色による FcRg 鎖に対する PI ポリアミドの CD16/32 蛋白発現に対する効果の検討

Fcεr1g 発現を抑制すると、Fc 受容体の細胞表面抗原である CD16 の細胞表面での発現が低下すると予測される。その確認のため、J774A.1 細胞に FCERG-2 を 1.0 μM にて培養液に添加して 24 時間培養し、抗 CD16/32 抗体で染色して検討した。コントロールに比べ、PI ポリアミド添加群で CD16/32 蛋白発現の低下を確認した。

6. FcRg 鎖に対する PI ポリアミドのタンパクレベルでの確認

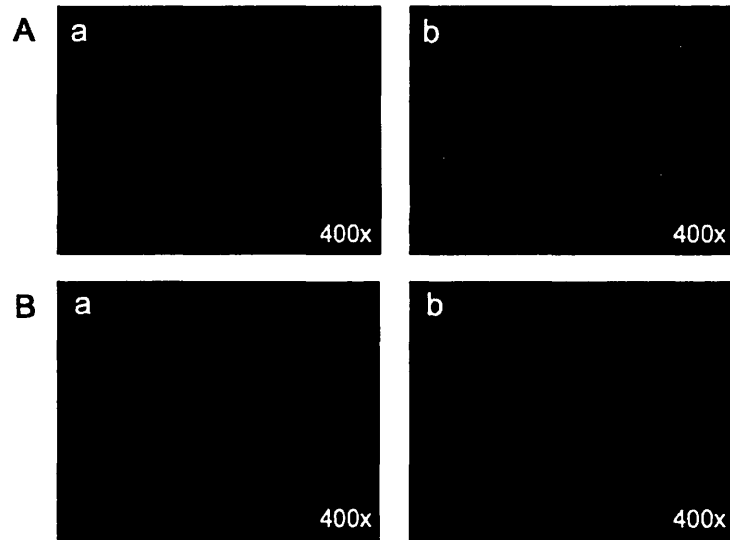
さらに、細胞表面での CD16 蛋白発現への PI ポリアミドの効果を実験的に検討するために、培養細胞 J774.A1 において、抗 CD16/32 抗体を用いたフローサイトメトリーを行った。PI ポリアミドと 48 時間インキュベートした細胞では CD16/32 タンパク陽性細胞は 21.2 ± 0.1% と PI ポリアミドで処理していない細胞の 75.1 ± 6.4% と比べ有意な減少を認め、PI ポリアミドが Fcεr1g 遺伝子発現抑制を介して CD16/32 蛋白の細胞表面での発現を抑制していることが確認された (図 8)。

部科校名：医学部

氏名：松本紘一

研究結果 (つづき)

図 8



A. DMSO 処理 J774A.1、B. PI ポリアミド処理 J774A.1 細胞。a : 抗 CD16/32 抗体による染色、b : 抗 CD16/32 抗体による染色+Hoechst33342 染色

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年4月26日

日本大学 総長 殿

氏 名 越永 従道



所属・資格 医学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	(和文表記) MYCN 遺伝子を標的とした神経芽細胞腫の新規治療法の開発 (英文表記) Development of novel neuroblastoma therapeutic agents targeting the MYCN gene	
3 研究目的	<p>神経芽細胞腫は、近年治療法の改善により予後が改善しているが、未だ多くの予後不良例（進行神経芽細胞腫）が存在し、その治療法は確立していない。</p> <p>MYCN 遺伝子は、予後の不良な小児固形腫瘍、神経芽細胞腫で高頻度に増幅が認められる遺伝子であり、その発現蛋白はアポトーシスの抑制や細胞増殖の亢進など広く癌化に関与し治療標的として注目されてきた遺伝子である。また MYCN は MYC 群 (MYCC、MYCL および MYCN) であり、MYC 群の機能は転写調整因子として E-box 配列 (cacgtg) を認識し、下流遺伝子群の発現を調整する。これらは多くの成人の悪性腫瘍、血液腫瘍においても鍵となる遺伝子であり、その下流の遺伝子群の機能解析と調節ができれば様々ながんの治療法が確立できる可能性がある。</p> <p>一方、我々はピロール基(Py)とイミダゾール基(Im)を組み合わせにより合成される PI ポリアミド化合物が DNA の塩基配列を認識することを見出し、その化合物を学内に確立している。この PI ポリアミド化合物は遺伝子の発現を調整する塩基配列に作成することで遺伝子の発現を調整できる。これに基づき、神経芽細胞腫特異的に増幅する MYCN 遺伝子自体の発現調整領域を認識し、発現を抑制する化合物の合成に成功した。さらに現在までに我々は MYC 群が共通に認識する転写調整領域 (E-box 配列) を標的とする PI ポリアミド化合物の合成にも成功している。</p> <p>本研究では、PI ポリアミド化合物を用いて MYCN 発現抑制による神経芽細胞腫の抗腫瘍効果を検討するとともに MYC 群の下流遺伝子を E-box 配列の前後の塩基配列の共通群ごとに機能を解析する。これは MYC 遺伝子の新たな機能解析方法となり、Off-target の少ない治療薬剤の開発に寄与できると考えられる。これらは PI ポリアミド化合物を臨床に応用するための基礎研究となり、日本大学発の独自の治療薬の開発を目差す基盤研究であると考えられるため本研究を企画した。</p>	
4 研究概要	<p>神経芽細胞腫の予後不良因子の一つである MYCN に対して DNA の塩基配列を認識し、発現を調整できる PI ポリアミド化合物を用いてその発現抑制と抗腫瘍効果を <i>In vivo</i>、<i>In vitro</i> で検討し、神経芽細胞腫の新規治療法の開発を試みる。</p> <p>さらに MYCN の属する MYC 群は共通の塩基配列を認識し、下流遺伝子の発現を調整する転写調整因子である。その共通に認識する転写調整領域を標的とする PI ポリアミド化合物を用いて下流遺伝子の塩基配列特異的な機能群に分け、機能解析を行うとともに新たな治療の標的として選択しうるかを検討する。</p> <p>これらは PI ポリアミド化合物の臨床応用への基盤研究となると考えられ、今回研究を企画した。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 越永 従道 ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 麦島 秀雄 (小児腫瘍薬物治療法開発) 松本 宜明 (薬物動態の解析) 永瀬 浩喜 (薬物の開発と機能解析) 斎藤 勉 (治療薬動態イメージング解析) 杉藤 公信 (小児腫瘍薬物治療法開発) 青山 隆彦 (薬物動態の解析) 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名： 医学部

氏名： 越永 従道

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

1. MYCN 転写調節因子の結合領域を標的としたポリアミド化合物の合成

予備実験において MYCN 転写調節因子のうち E2F および SP1 の、MYCN 遺伝子プロモーター領域への結合領域を標的とした PI ポリアミド化合物を 2 つ (E2F-1:ATGGAAAT, Sp1-1:AGGAGGC) 設計し、合成した。この 2 つのポリアミド化合物を MYCN 増幅神経芽細胞腫細胞株である CHP134 細胞、IMR32 細胞、NB9 細胞および、MYCN 非増幅神経芽細胞腫細胞株である SK-N-SH 細胞、NB69 細胞など複数の細胞株に投与し、WST-8 assay 法による生細胞活性および直接顕微鏡下に形態学的変化の有無と cell count での細胞増殖の抑制を確認した。E2F-1 において 1、5、10 μ M となるように投与し、72 時間培養したところ、非投与群と比べ 5 μ M 投与群において細胞増殖抑制効果を認めなかった。しかし SP1-1 で同様に CHP134 細胞に対し 1、5、10 μ M となるように投与し、72 時間培養したところ、非投与群と比べ 5 μ M 投与群において最も細胞増殖抑制を認めた。同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN の発現を real time RT-PCR 法にて検討したところ、E2F-1 5 μ M 投与群では MYCN の発現抑制を認めなかったも、SP1-1 投与群では非投与群と比べ MYCN の発現抑制を認めていた。また IMR32 細胞、NB9 細胞および、MYCN 非増幅神経芽細胞腫細胞株である SK-N-SH 細胞、NB69 細胞においては、CHP134 細胞に対する PI ポリアミド化合物の効果以上の細胞増殖抑制効果は認めなかった。

本年度は PI ポリアミド化合物の Dp 末端と β リンカー部分の設計の工夫により CG が多い配列への設計が可能となり、認識配列に対する設計の自由度が高くなり、またブロック合成の開発により認識配列が 12 塩基まで延長できるようになった。さらにそのいずれにおいてもビオコア法による分子間相互作用解析により、標的配列を持つ二本鎖 DNA に対する特異的結合能が低下しないことも確認された。これにより E2F、SP1 を標的としたポリアミド化合物の再設計を行い、PI ポリアミド化合物 (E2F-1:ATGGAAAT, E2F-2:TTGGCGCGA, Sp1-1:AGGAGGC, Sp1-2, -3:AGGGCGGGC -2 および -3 は β リンカー部分が異なった設計であり認識配列は同じ) を予備実験のものを含め 5 つ設計合成した。これらを用いて予備実験と同様の検討を CHP134 細胞で行った。その結果、E2F 群では E2F-2 投与群において、非投与群と比べ 5 μ M 投与群において最も細胞増殖抑制効果を認めた。さらに Sp1 群では SP1-2 ポリアミド化合物投与群では、非投与群と比べ 5 μ M 投与群において最も細胞増殖抑制を認めた。また同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN の発現を real time RT-PCR 法にて検討したところ、E2F-2 ポリアミド化合物 5 μ M 投与群では 65% の MYCN の発現抑制を認めた。しかし SP1-2 投与群では MYCN の発現の抑制は認めなかった。

並行して MYCN 遺伝子は E2F と Sp1 の二つの転写調整因子が協力して発現を調整していることが報告されており (J Biol Chem, 2003, 2004)、CHP134 細胞に対し上記で一番細胞増殖抑制効果を認めた SP1-2 と E2F-2 を各 2.5 μ M ずつ計 5 μ M となるように同時投与した。投与後 72 時間培養したところ、各ポリアミド化合物単独投与群よりも強い増殖抑制効果を認めた。同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN の発現を real time RT-PCR 法で検討したところ PI ポリアミド化合物の非投与群と比較し 40% の MYCN の発現抑制効果を認めた。これらより、一つの遺伝子の転写を調節する二つの異なる転写調節因子の結合を、2 種類のポリアミドによって同時に抑制することにより、それぞれの転写調節因子の結合を抑制するポリアミド単独で投与よりも相加的な効果が得られることが確認できた。

さらに既存の RNAi 干渉を用いた手法で MYCN の発現抑制では APOPTOSIS の誘導が確認されている (Int J Oncol, 2007)。実際に本研究においても E2F-2 および SP1-2 を同時に投与した CHP134 細胞において細胞増殖抑制効果とともに死細胞数の増加を顕微鏡から認めた。これは APOPTOSIS の誘導による考えられたため、Annexin V と 7-AAD を用いた FACS (fluorescence activated cell sorting) で APOPTOSIS の解析を行った。E2F-2 および SP1-2 を各 2.5 μ M ずつ計 5 μ M を CHP134 細胞に投与し、72 時間培養後 Annexin V と 7-AAD で蛍光染色し、FACS で解析した。ポリアミド化合物投与群では非投与群に比べ、初期 APOPTOSIS の細胞の割合が 20% 増加し、後期 APOPTOSIS の細胞の割合が 12% 増加した。necrosis 細胞の割合は変化なかった。このことから E2F-2 および SP1-2 の同時投与したことにより MYCN の発現が抑制され、それにより APOPTOSIS が誘導された可能性が示唆された。次に MYCN により発現調整され APOPTOSIS の誘導に関与することが MDM2 遺伝子で多く報告されており (Cancer Lett, 2005)、MDM2 遺伝子の発現量を確認した。方法は上記同様に CHP134 細胞に E2F-2 および SP1-2 を各 2.5 μ M 投与し 72 時間培養した後に RNA を抽出し real time RT-PCR 法で検討した。その結果、E2F-2 および SP1-2 同時投与群では非投与群に比べて、MDM2 遺伝子の発現が抑制されていた。これにより E2F-2 および SP1-2 の同時投与したことにより MYCN の発現が抑制されることにより MDM2 遺伝子の発現が抑制され、最終的に APOPTOSIS が誘導されたと考えられた。

次年度はこの *In vitro* の検討が細胞株特異的でないことの確認のために他の神経芽細胞腫細胞株 (MYCN 増幅神経芽細胞腫細胞株である IMR32 細胞、NB9 細胞および、MYCN 非増幅神経芽細胞腫細胞株である SK-N-SH 細胞、NB69 細胞) でも確認していく予定である。

部科校名：	医学部	氏名：	越永 従道
-------	-----	-----	-------

2. MYC の結合領域である E-box 配列を標的としたポリアミド化合物の合成

MYC 結合領域である E-box 配列(CACGTG)を標的とした PI ポリアミド化合物を 5 つ (MYC1: CACGTGC, MYC2: CACGTGG, MYC3: CCACGTG, MYC4: GCACGTG, MYC5: WCACGTGW) 設計合成した。これらを MYCN 増幅神経芽細胞腫細胞株である CHP134 細胞、IMR32 細胞、NB9 細胞および、MYCN 非増幅神経芽細胞腫細胞株である SK-N-SH 細胞、NB69 細胞の複数細胞株に投与し、WST-8 assay 法による生細胞活性および直接顕微鏡下に形態学的変化の有無と cell count での細胞増殖の抑制を確認した。また同時に得られた細胞から RNA を抽出し、その下流遺伝子の発現の抑制の有無、分化マーカーの発現を確認した。その結果、5 μ M の最終濃度で MYC2、3 および 5 を CHP134 細胞、SK-N-SH 細胞に投与すると非投与群と比べ 72 時間の培養後に細胞増殖抑制を認めた。また MYC2 投与群の CHP134 細胞から得られた RNA では、MYC2 の標的配列を promoter 領域に持ち MYCN により発現調整されている MDM2 遺伝子(細胞周期に関与、APOPTOSIS の誘導に関与)の発現抑制を認めた。

一方、MYC3 投与群の CHP134 細胞から抽出した RNA では、MYC2 と同様に MYC3 の標的配列を promoter 領域に持ち MYCN により発現調整されている ODC1 遺伝子(細胞周期に関与する)の発現を抑制することを確認した。MYC5 投与群の CHP134 細胞から得られた RNA では、MYC5 の標的配列を promoter 領域に持ち MYCN により発現調整されている EIF4G 遺伝子(翻訳調整因子)の発現抑制を認めるも CCND1 遺伝子の発現抑制は認めなかった。これらのことは MYC 下流ポリアミド化合物を用いることによって塩基配列ごとに発現調整下流遺伝子群が異なることを示しており、その機能ごとのグループ化ができると考えられた。

次年度はポリアミド化合物投与群の網羅的発現解析を行い MYCN の下流遺伝子のグループ化を進行中であり継続して確認を行っていく予定である。さらにグループの中より新たな抗腫瘍薬剤の標的となるグループの検討を行っていく予定である。

3. *In vivo*でのポリアミド化合物の抗腫瘍効果を確認

*In vivo*でのポリアミド化合物の抗腫瘍効果を確認するためにヌードマウスへ神経芽細胞腫細胞株 (CHP134 細胞) の移植を行い、Xenograft モデルの作成を企画した。すでに CHP134 細胞のヌードマウスへの移植モデルは報告されており (Cancer Res 1976)、これに準じて本年度までに予備実験として 1×10^7 個に CHP134 細胞を調節した 100 μ l の Hank's balanced salt solution (HBSS) を 6 週齢の雄ヌードマウスの後頸部に移植し、12 週間の飼育により皮下注射部位に一致して径 5mm 程度の腫瘍形成を肉眼的に確認できた。さらに得られた腫瘍組織から HE 切片を作成し検鏡的にも腫瘍の形成を確認した。

次年度は、形成した腫瘍から RNA、蛋白を抽出し real time RT-PCR、western blotting 法で MYCN 遺伝子の発現の確認を行う。さらに FITC ラベルした E2F-2、Sp1-2 をそれぞれ投与し、無処理および腫瘍形成したヌードマウスに 6mg/kg の FITC ラベルした E2F-2 および Sp1-2 を尾静脈から全身投与する。投与後 24 時間および 7 日後に解剖し、肝、脾、肺、腎、胃、小腸、皮膚、脳組織および腫瘍組織を蛍光顕微鏡で確認し、使用する PI ポリアミド化合物の腫瘍への移行性および各臓器への分布を確認する予定である。

これで確認された実験動物に対して *In vitro*の実験において最も効果のあった組み合わせの E2F-2 と Sp1-2 の同時投与による *In vivo*での抗腫瘍効果を検討する。

方法は腫瘍の大きさが 500mm³ になった移植マウスを以下の 3 群に分けて検討する。

① E2F-2 と Sp1-2 の同時投与群

② コントロール PI ポリアミド化合物投与群 (DNA の塩基配列に結合しない PI ポリアミド化合物)

③ PBS のみを投与群

①、②群では尾静脈もしくは局所に PI ポリアミド化合物(6mg/kg)を、③群では PBS を全身投与し、投与後 1 週間まで腫瘍径の確認と腫瘍形態の確認を行い解剖する。さらに腫瘍組織を摘出し、HE 切片での腫瘍の形態の確認と免疫組織化学染色による MYCN およびその下流遺伝子の発現を確認するとともに得られた腫瘍組織より RNA、蛋白を抽出し real time RT-PCR、western blotting 法で MYCN の発現およびその下流遺伝子の発現を確認する。これらで得られた結果は各群間で比較し、抗腫瘍効果を検討する予定である。

なおこれまでの研究経過については第 13 回神経芽腫研究会で発表した。今後、第 110 回日本外科学会、第 25 回日本小児がん学会 SIOP 2010、プレジデンシャルシンポジウムで報告予定である。さらに昨年までに検討を行ってきた MYC 下流遺伝子を標的とするポリアミド化合物については本年度、特願 2009-061321「Myc 下流遺伝子群を標的とした配列特異的 DNA 結合化合物による疾患治療薬候補探索と疾患治療化合物」として特許出願を行っており、国際特許申請を目指している。さらに本研究で合成される新たな化合物については随時新規性が得られた段階で化合物特許の申請を準備する予定である。

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21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 28 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 江角 真理子



所属・資格 医学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	マイクロダイセクション・プロテオミクス融合による新規病態分子の解明と診断への応用	
3 研究目的	本研究では、より正確な新規病態分子を解明するために、病理標本を対象に顕微鏡下で標的細胞を採取するレーザーマイクロダイセクションと疾患プロテオミクスとの融合を確立する。ここでは、特に肝細胞癌再発および発癌機構、および前癌病変白板症と扁平苔癬を例に、疾患メカニズムのより厳密な解明および新しい診断マーカーの発見に応用する。また組織切片上の特定分子の検出法として、免疫染色にかわる新たな tissue MS 診断法（組織薄切切片マススペクトル診断法）になりうるか、開発も試みる。	
4 研究概要	病理標本であるホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたマイクロダイセクション・プロテオミクスを確立する。肝細胞癌の再発マーカーや口腔内扁平上皮癌の腫瘍マーカー探索をテーマとして、その応用を検討する。tissue MS による特定タンパク質の検出法を確立するため、既知の量のウイルスやタンパク質の発現系を用いて検出限界の検討を行い、病理標本への応用を確立する。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 江角 真理子 ・研究分担者（役割分担） 高山 忠利 （肝細胞癌症例の収集と予後調査） 永瀬 浩喜 （プロテオミクス用マイクロダイセクションサンプリングの樹立） 小宮山 一雄 （白板症と扁平苔癬の組織マイクロダイセクションと解析） 杉谷 雅彦 （肝臓組織のマイクロダイセクション） 黒田 和道 （微量サンプル対応 nanoLC-MS/MS の樹立） 	

※ホームページ等での公開の 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。

部科校名： 医学部

氏名： 江角 真理子

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

1. ホルマリン固定パラフィン包埋切片/レーザーマイクロダイセクションサンプルのプロテオーム症例の発現比較は、ヘテロな細胞集団を材料とするので、その間質や細胞外基質成分の混入具合が結果を大きく左右する。またいつも凍結組織が採取できるとは限らないため、病理検査で使用される標本は貴重な材料となる。そこでルーチンに使われる病理標本でプロテオームを行う場合、どのような特徴と限界があるか調べた。生検材料と剖検材料の比較、さらに同一の剖検材料からの凍結組織とホルマリン固定パラフィン包埋/マイクロダイセクションサンプルとの比較を行った。(学会発表3: 病理組織、特に病理解剖症例のホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片のマイクロダイセクション (FFPE/LMD) から得られるプロテオームには、どのような特徴があるか?: 肝臓組織における3つの検体-生検、剖検、FFPE/LMD-の比較)

剖検症例は生検症例とほぼ遜色ない二次元ゲル電気泳動スポット数とパターンを示し、タンパク質の網羅的発現解析が可能であることがわかった。剖検症例でもタンパク質の分解の危険性は少なかった。またマイクロダイセクションでもそれほど情報量に制限はなく、またその剖検症例のFFPE/LMDでは、ほぼ8割のタンパク質を同定できることがわかった。ホルマリン固定による修飾ペプチドも解析対象としては意外に少なかった。

2. 口腔内病変の分子診断マーカー

口腔癌境界病変(上皮異形成・上皮内癌)の適切な診断は、早期治療を可能にし、患者のQOLを得るために肝要である。口腔癌境界病変の診断は生検標本の顕微鏡的診断により行われているが、時としてHE染色では、反応性・再生性上皮異型との鑑別が困難なことがある。そのため、境界病変に特有な診断マーカーの開発が期待されている。口腔粘膜癌境界病変の分子診断マーカーを探索すべく、薄切切片/マイクロダイセクションにて、扁平上皮癌および境界病変が共通にもち、非腫瘍性病変とは異なるタンパク質の同定-比較プロテオミクスを試みた。(学会発表5: プロテオーム解析を利用した口腔粘膜癌境界病変の分子診断マーカーの検討)

非腫瘍性病変、境界病変および扁平上皮癌のFFPE/LMDから、それぞれ約130種類のタンパク質が同定された。そのうちCytokeratin 17をはじめとする35個のタンパク質が境界病変および扁平上皮癌に共通して特異的に同定された。

3. 肝細胞癌再発マーカー

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者は40人に1人である。日本人の肝細胞癌の8割はHCVが原因である。このウイルスは持続感染しやすく、慢性肝炎、肝硬変を経て、20~30年かけて肝細胞癌に進展する重篤な感染症である。たとえ癌を外科切除できてもその再発は2年で50%に及ぶ。未だに有効な治療法や予防法が模索されている感染症である。我々は、本来ヒトがもつウイルス制御や発癌再発制御因子をとらえ、診断、治療及び予防に役立てることを目指した。すなわち一癌の再発が早い肝臓と遅い肝臓-これらの違いを遺伝子発現レベルで明らかにすることで、これら生体内制御因子を探索した。

部科校名： 医学部

氏名： 江角 真理子

研究結果（つづき）

1) プロテオーム解析による再発難易を決める癌の素質について

HCV(+)の初発肝細胞癌で、径が6cm以下の単発症例を対象とした。切除術後再発までの月数を調査し、12ヶ月以内に再発した早期群11例と48ヶ月以内無再発の遅延群10例を選び、2次元電気泳動による網羅的タンパク質発現解析(2D DIGE)を行った。1623個のスポットを対象に解析したところ、2群間で有意差のあるスポットが51個見いだされた。そのうち19個は再発早期群で発現が亢進するものであった。再発早期群で悪性腫瘍マーカーが発現増加していた。再発遅延群で抗酸化ストレス、血管新生抑制タンパクが発現増加していた。さらに3つのタンパク質で再発難易を予測するセットが示唆された。(学会発表1)

2) プロテオーム解析による再発難易を決める非癌部の素質について

術後24ヶ月以内再発の15例と術後48ヶ月以内無再発12例を選び、非癌部組織から2D DIGEを行った。非癌部の線維化度により16例の慢性肝炎と11例の肝硬変に分けて再発難易による発現タンパク質の違いを解析した。1513個の検出スポットから慢性肝炎では60個が、肝硬変では32個が有意差のあるタンパク質として見つかった。しかしこれらの中で重複するものはなく、異なる機構で再発の起こることが示唆された。これら代表的なタンパク質について、ウェスタンブロットで検証を行ったところ、再発難易による差よりも病変による差のほうが顕著であることがわかった。早期再発群で発現低下を示したガレクチン1や胆汁酸塩硫酸基転移酵素は、正常肝で最も高く、癌部で顕著な発現低下を示した。これらは肝臓の正常機能に必須のタンパク質であり、癌化に伴う脱分化マーカーになり得ることが示唆された。一方早期再発群で発現亢進を示したサイトケラチン19は、肝硬変で最も高く、癌部や正常肝ではほとんど発現が見られなかった。サイトケラチン19については免疫染色像から、胆管上皮に特異的発現を示し、胆管増生そのものを定量していることが予想された。胆管増生と繊維化との関連が強く示唆された。このように肝実質細胞だけでなく、非実質細胞におけるプロテオーム解析も再発難易や発癌難易を決める微小環境因子として重要であることが示された。(学会発表2,4)

3) 同一症例からのトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析

貴重な組織材料からmRNAおよびタンパク質の発現解析が同時に行えることは、発現制御機構を解明する上で有用である。RNA抽出後残った分画からタンパク質を回収し、2D DIGEによる網羅的解析を試みた。この分画は抽出効率が約1/10と悪く、高分子量タンパク質の抽出が苦手である。が2Dパターンには遜色なく、解析データは半数強が他の抽出方法と同じ結果を示す。同一条件で抽出する限りは網羅的タンパク質発現解析も可能である。

部科校名： 医学部

氏名： 江角 真理子

研究結果 (つづき)

4. 椎間板プロテオーム解析の試み

喫煙は腰痛の危険因子の1つである。腰痛発生機序の1つに椎間板変性があげられる。本研究では椎間板変性機序あるいは再生機序を知る目的で、(1)受動喫煙ラット椎間板と(2)ヒト腰椎椎間板変性症について、椎間板タンパク質の発現を網羅的に解析し、比較プロテオミクスを試みた。特に椎間板細胞外基質を極力取り除き椎間板細胞由来のタンパク質について、トリプシン消化ペプチドのLC-MS/MS解析により比較プロテオミクスを行った。

1) 喫煙椎間板プロテオミクス

8週受動喫煙ラット(S8)と8週受動喫煙後4週喫煙停止した禁煙ラット(S8N4)とを用意し、非喫煙コントロールラット(N12)と比較した。3群間で2倍以上発現量の異なるタンパク質103個が見つかった。図のように、喫煙や禁煙により決まったタンパク質の発現変化が椎間板で起こっていることがわかる。受動喫煙により、細胞外基質タンパク質の恒常性の保持や、アポトーシス感受性亢進が示唆された。また喫煙による発現変化は禁煙により必ずしも解消されず、むしろ新たな発現変化を示すタンパク質があった。(学会発表 6, 7, 8, 9)

2) ヒト腰椎椎間板変性症プロテオミクス

代表的な腰椎椎間板変性症である腰椎椎間板ヘルニア7例と腰椎変性すべり症6例について、剖検時得た健常椎間板5例と比較し、プロテオーム解析を行った。3群間で2倍以上発現量の異なるタンパク質29個が見つかった。これらのタンパク質から変性症に共通して抗酸化ストレスと細胞再生機能の低下が示唆された。また腰椎変性すべり症では補体の活性化と自然免疫応答が示唆され、腰椎椎間板ヘルニアでは炎症亢進、細胞骨格の再生やコラーゲン発現抑制などが示された。

部科校名： 医学部

氏名： 江角 真理子

研究結果 (つづき)

【学会発表】

1. Esumi M, Yamaguchi H, Kuroda K, Munekata Y, Sugitani M, Hasegawa K, Mamiya T, Takayama T, Mitsumata M. Human liver proteomics between early and late recurrence of hepatocellular carcinoma. HUPPO VIII World Congress, Toronto, 2009, 9
2. Esumi M, Yamaguchi H, Munekata Y, Kuroda K, Sugitani M, Hasegawa K, Kokudo N, Mamiya T, Takayama T, Mitsumata M. Proteome analysis of human non-tumorous liver tissues to find signature for the recurrence of hepatocellular carcinoma. 第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009. 10
3. Takeya C, Yamaguchi H, Munekata Y, Kuroda K, Nagase H, Takayama T, Yamamoto T, Mitsumata M, Esumi M. Characterization of the proteome from laser microdissection samples of formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE/LMD) in autopsy case: comparison among autopsy, biopsy and FFPE/LMD of human liver. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009, 12
4. Esumi M, Yamaguchi H, Kuroda K, Munekata Y, Sugitani M, Fuchinoue F, Hasegawa K, Mamiya T, Takayama T, Kokudo N, Nagase H, Mitsumata M. Signatures for the recurrence of hepatocellular carcinoma determined by proteomics of non-tumorous liver tissues. 8th AACR/JCA Joint Conference - Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics. Waikoloa, 2010. 2
5. 松本直行¹、迎章太郎¹、天野雄介¹、尾曲大輔¹、荒井秀次²、大久保光朗³、齋藤康行³、大場育弘³、生木俊輔³、西村敏²、田中孝佳²、石井輝彦²、岩成進吉²、三宅正彦²、清水治³、米原啓之³、大木秀郎²、小宮山一雄：プロテオーム解析を利用した口腔粘膜癌境界病変の分子診断マーカーの検討。 口腔病理地方研究会
6. 山崎浩司、小川剛史、中橋昌弘、間世田優文、徳橋泰明、山口裕美、石橋真理子、宗像康明、黒田和道、江角真理子：受動喫煙ラットおよび喫煙後禁煙ラットにおける腰椎椎間板の分子病態解析。第82回日本生化学会大会、神戸、2009、10
7. 山崎浩司、山口裕美、黒田和道、宗像康明、徳橋泰明、江角真理子：ラット腰椎椎間板におけるタンパク質発現解析。第24回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、2009、11
8. 山崎浩司、山口裕美、宗像康明、黒田和道、徳橋泰明、江角真理子：受動喫煙ラットを用いた椎間板変性初期モデルにおけるプロテオミクス。第39回日本脊椎脊髄病学会、高知、2010.4
9. 中橋昌弘、山崎浩司、間世田優文、高橋理恵、石橋真理子、徳橋泰明、江角真理子：受動喫煙ラットにおける椎間板のアポトーシス経路の解明。第39回日本脊椎脊髄病学会、高知、2010. 4

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名： 医学部

氏名： 江角 真理子

研究結果 (つづき)

【論文発表】

1. 上井 浩、江角真理子：AP-1 と NFATc1. 脊椎脊髄ジャーナル 22(10): 1167-1169, 2009
2. 山崎浩司、江角真理子：細胞外基質とマトリックスメタロプロテアーゼ. 脊椎脊髄ジャーナル 22(11): 1249-1252, 2009
3. 中島伸哉、江角真理子：PCR と塩基配列解析. 脊椎脊髄ジャーナル 22(12): 1333-1335, 2009
4. 中島伸哉、江角真理子：遺伝子多型と疾患感受性遺伝子解析. 脊椎脊髄ジャーナル 23(1): 75-76, 2010
5. 小川剛史、江角真理子：RNA 解析-ノーザンブロット、RT-real time PCR/トランスクリプトーム解析. 脊椎脊髄ジャーナル 23(2): 143-145, 2010
6. 山口裕美、江角真理子：ウェスタンブロットと免疫組織染色. 脊椎脊髄ジャーナル 23(3): 213-216, 2010
7. 間世田優文、江角真理子：プロテオームとプロテオミクス. 脊椎脊髄ジャーナル 23(5): 553-555, 2010
8. 谷口 真、江角真理子：トランスジェニックマウスとノックアウトマウス. 脊椎脊髄ジャーナル 23(6): 印刷中, 2010

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 8 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 _____ 鈴木 直 人 _____



所属・資格 _____ 歯学部・准教授 _____

(受領時の資格)

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人) / 一般研究(共同) / 総合研究	注:該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	骨リモデリングに及ぼす短鎖脂肪酸の影響	
3 研究の目的	<p>短鎖脂肪酸を代表とする嫌気性菌の代謝産物は、口腔はもとより全身の健康と密接な関係がある。短鎖脂肪酸の一つである酪酸は、骨芽細胞の機能を亢進することで、局所における増骨に関与しているとの報告もある。しかし、重層扁平上皮からなる歯肉上皮をどのようにして短鎖脂肪酸が侵入するのか、侵入した短鎖脂肪酸が骨リモデリングにどのように影響するのかについてはほとんど解明されていない。さらに、局所の免疫担当細胞が種々のサイトカインを分泌し、骨リモデリングに密接に関与していることが示唆されているが、免疫担当細胞に対する短鎖脂肪酸の影響、とくに骨代謝との関連については全く解明されていない。これらの背景から、本研究では 1)上皮細胞における短鎖脂肪酸の侵入様式、2)骨芽細胞および破骨細胞に及ぼす短鎖脂肪酸の直接的作用および 3)免疫担当細胞を介する骨リモデリングに及ぼす短鎖脂肪酸の影響を明らかにすることを企図した。</p>	
4 研究の概要	<p>(1) 短鎖脂肪酸の侵入様式の検討 ヒト歯肉上皮由来株細胞あるいはそれに準じた細胞モデルを用い、酪酸が細胞間接着に及ぼす影響を検討する。</p> <p>(2) 短鎖脂肪酸が骨芽細胞に及ぼす影響の検討 株化ヒト骨芽細胞様細胞あるいは株化マウス骨芽細胞様細胞を用いて、種々の濃度の酪酸を作用させ、骨芽細胞の分化に関与する転写因子群、の遺伝子およびタンパク発現を調べる。また、破骨細胞の分化に関与する M-CSF や RANKL などの遺伝子およびタンパク発現に及ぼす酪酸の影響を検討する。</p> <p>(3) 短鎖脂肪酸が免疫担当細胞に及ぼす影響の検討 ヒト T 細胞を用いて、酪酸が IL-17 や IL-23 などのサイトカイン発現および RANKL 発現に及ぼす影響を遺伝子およびタンパクレベルで検討する</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<p>・研究代表者 鈴木 直人</p> <p>・研究分担者 (役割分担)</p> <p>大塚 吉兵衛 (細胞生物学的分野の総括・タンパク発現解析) 落合 邦康 (微生物学的分野の総括) 山本 正文 (免疫学的分野の総括) 落合 智子 (免疫担当細胞の培養・サイトカインの定量・分析) 津田 啓方 (細胞培養・共焦点顕微鏡による検討)</p>	

※ホームページ等での公開の (☑・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。

部科校名：歯学部

氏名：鈴木直人

6 研究の結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

平成20年度は、主に骨芽細胞の増殖・分化に及ぼす酪酸の影響について詳細に検討した。その結果、酪酸は骨芽細胞による細胞外マトリックス成分、とくに骨シロタンパクおよびオステオポンチン発現増加を介して石灰化 nodule 形成を促進し、osteoprotegerin 発現増加 M-CSF 発現低下によって破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

平成21年度は、まず、酪酸の侵入様式について検討を行った。歯周病原菌の産生する酪酸が骨芽細胞に作用するためには、酪酸が歯肉上皮のバリアーを通過して歯槽骨に到達する必要がある。このメカニズムを解明するため、歯肉上皮細胞のモデル細胞である株化ヒト歯肉上皮癌由来細胞(Ca9-22 細胞)を用いて検討を行った。

まず、酪酸が歯肉上皮細胞間の細胞接着に“ゆるみ”を与えることによって、酪酸自身が上皮細胞の間隙を通過するのではないかと考えた。ケモタキシスウェルの上底に Ca9-22 細胞をコンフルエントになるように播き、培養液に蛍光物質(PKH67 green fluorescent)を添加して、下底に浸出してくる蛍光物質を測定することで、酪酸の細胞間隙に及ぼす影響を調べた。その結果、 10^{-4} 、 10^{-6} および 10^{-8} M の酪酸を Ca9-22 細胞に作用させても、下底への蛍光物質の浸出には変化が認められなかった。この結果は、酪酸が細胞接着に“ゆるみ”を与えることによって上皮細胞間を通過するのではないかという予想とは大きく異なっていた。従来から酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸が細胞のアポトーシスを誘発するとの報告がある。そこで、酪酸刺激によって誘発された細胞のアポトーシスによって細胞形態が縮小し、そのことによって生じた細胞間隙を酪酸が通過するのではないかと考えた。Ca9-22 細胞に酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸を作用させ、蛍光物質(SYTOX Green)を用いた細胞死アッセイを行ったところ、酪酸、プロピオン酸、酢酸、イソ酪酸およびイソ吉草酸は、それぞれ1, 5, 40, 10, 5mM以上の濃度でコントロール分に比べて有意に細胞死を引き起こした。とくに、他の短鎖脂肪酸に比べて、酪酸は低濃度で歯肉上皮細胞の細胞死を誘発することが明らかになった。また、酪酸はアポトーシスマーカーである Annexin V の細胞表面への結合の増加とカスパーゼ3活性の上昇およびアポトーシスの回避に参与する *bcl-2* 遺伝子発現のへ減少を引き起こした。しかし、カスパーゼ阻害剤の一つである Z-VAD-FMK は、酪酸によるアポトーシスをわずかに抑制したのみであった。これらの所見から、酪酸は歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘発するが、酪酸によって起こる細胞死はアポトーシスのみではないことが考えられた。そこで、オートファジーを介する細胞死に及ぼす酪酸の影響について検討した。その結果、酪酸は LC3-I 分子の LC3-II 分子への移行、両分子の産生量増加、細胞質でのオートファゴゾームへの集積を促進した。さらに、オートファジー抑制剤の一つである 3-methyladenine は、酪酸誘導による歯肉上皮細胞の細胞死を抑制した。これらの所見から、酪酸は歯肉上皮細胞のアポトーシスとオートファジーの両方を介する細胞死を引き起こすことで、歯肉上皮に間隙を生じさせ、歯槽骨まで侵入する可能性が示唆された。

免疫担当細胞を介する骨リモデリングへの短鎖脂肪酸の影響を検討した報告は見当たらない。そこで、T 細胞などの免疫担当細胞が産生するサイトカイン、とくに骨代謝に関連することで着目されているインターロイキン(IL)-17 発現に及ぼす酪酸の影響を検討することを、研究計画の一つとして申請している。しかし、IL-17 の骨リモデリングへの影響、とくに骨吸収に及ぼす影響について詳細に検討した報告は見られない。そこで、平成21年度は、免疫担当細胞の IL-17 産生に及ぼす酪酸の影響を調べる前に、IL-17 の基礎データを蓄積する必要性から、破骨細胞の分化と機能発現に及ぼす IL-17 の影響について検討することにした。細胞には株化マウス単球細胞で、receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)存在下で破骨細胞への分化能を有する RAW264.7 細胞を用いた。まず、IL-17 の破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。RAW264.7 細胞を 24 穴プレートに 5×10^6 cells/cm² となるように播種し、50 ng/ml RANKL 存在化において、0, 0.1, 1.0, 10 および 50 ng/ml の IL-17 を添加して培養し、培養 3, 5, 7 および 10 日目に破骨細胞マーカーの一つである酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。その結果、培養 5 日目以降において、10 および 50 ng/ml IL-17 添加では TRAP 陽性細胞が顕著に減少することが認められた。次いで、RAW264.7 細胞の carbonic anhydrase II (CA II), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) およびカテプシン K 発現に及ぼす IL-17 の影響を調べた。CA II は破骨細胞の酸産生に参与する酵素、MMP-9 およびカテプシン K は骨タンパクの分解に参与する酵素で、破骨細胞の機能発現を示すマーカーとしてそれぞれ捉えられている。また、併せて RAW264.7 細胞の IL-17 受容体発現に及ぼす IL-17 の影響についても検討した。RAW264.7 細胞に前述と同条件で IL-17 を添加

部科校名：歯学部

氏名：鈴木直人

研究の結果（つづき）

して、培養3, 5, および7日目に細胞からRNAを抽出し、real-time PCR法によってmRNA発現を定量的に解析した。その結果、添加するIL-17の濃度依存的にMMP-9およびカテプシンK発現は減少した。MMP-9では培養5日目のみで、カテプシンKでは培養3, 5, および7日目のいずれにおいてもIL-17の影響が認められた。培養日数によってIL-17の影響に差が生じた理由については、今後の検討が必要である。一方、CA II発現は有意に増加することが認められた。これらの所見から、IL-17が破骨細胞による細胞外マトリックス成分の分解を抑制することが示唆された。しかし、骨溶解に関与するCA II発現を増加させた理由についても、今後更なる検討が必要であると思われた。IL-17受容体はサブタイプからA, B, C, D およびEに分類されている。RAW264.7細胞は、タイプAおよびCを発現しており、タイプB, D およびEの発現は検出できなかった。IL-17添加によってタイプA受容体発現は有意に増加した。破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞が、タイプAおよびC受容体を発現していること、また、タイプA受容体発現を増加させるという本研究結果は、今までに報告が無く、骨代謝の分野に新たな知見を提供するものである。また、IL-17がIL-17受容体発現の増加を介して、その作用を増強している可能性も示唆された。

IL-17がIL-17受容体を介してMMP-9およびカテプシンK発現を増加に関与していることを確認するため、RAW264.7細胞にあらかじめIL-17タイプA受容体の中和抗体を作用させ、それぞれの発現に及ぼすIL-17の影響をreal-time PCR法で調べた。その結果、IL-17単独添加によって減少したMMP-9およびカテプシンK発現は、IL-17受容体抗体の添加によって、いずれもコントロールレベルまで上昇した。これらの所見から、破骨細胞前駆細胞は、IL-17がタイプA受容体を介して、MMP-9およびカテプシンK発現を調節していることが明らかになった。

次いで、MMP-9およびカテプシンKのタンパク発現に及ぼすIL-17の影響をWestern blottingで調べた。その結果、いずれの発現もIL-17の添加によって顕著に減少することが認められた。カテプシンK発現は、培養5および7日目においていずれも減少したが、MMP-9発現は、培養5日目のみでIL-17の影響が認められた。これらの結果は、前述のmRNA発現の結果と一致しており、遺伝子のみならずタンパクレベルにおいても、IL-17がMMP-9およびカテプシンKのタンパク発現を減少させることが明らかになった。

骨吸収を担う破骨細胞の分化は、骨芽細胞が分泌するM-CSFが破骨細胞前駆細胞の受容体(c-fms)に結合し、骨芽細胞が細胞表面に提示あるいは分泌するRANKLの受容体であるRANKを破骨細胞前駆細胞が発現することによって始まると考えられている。そこで、IL-17がRAW264.7細胞のRANKおよびc-fms発現に及ぼす影響をreal-time PCR法で調べた。その結果、RANK発現には顕著な影響は認められなかったが、c-fms発現はIL-17添加によって培養初期(培養3および5日目)において有意に減少した。c-fms発現のみに影響が現れた理由の一つとして、培養系でのRANK発現の増加にはIL-1 α などの炎症性サイトカイン添加の必要性を示唆する報告がある。

これらの研究結果から、主に免疫担当細胞によって分泌されるIL-17は、破骨細胞の分化および機能発現を抑制することが示唆された。一方、現在検討中であるIL-23がRANK発現の増加を介して破骨細胞の分化を促進するとの報告がある。免疫担当細胞のIL-17発現がIL-23によって惹起されることから、IL-17とIL-23の相反する破骨細胞分化に及ぼす影響については、慎重に検討していく必要が考えられた。

当初予定した研究計画である(1)短鎖脂肪酸の侵入様式の検討、(2)短鎖脂肪酸が骨芽細胞に及ぼす影響の検討、(3)短鎖脂肪酸が破骨細胞分化に及ぼす影響、(4)短鎖脂肪酸が免疫担当細胞に及ぼす影響の検討のうち、(1)および(2)については計画を達成した。(3)および(4)については、本研究の独創性を重視して、免疫担当細胞が分泌するIL-17の破骨細胞に及ぼす影響について検討を行った。免疫担当細胞と破骨細胞前駆細胞との関連については現在検討中である。

課題番号	総 09 - 018
------	------------

注：課題番号を記入してください。

平成21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年3月31日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 小林 真之



所 属 ・ 資 格 歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1	種 目 <input type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2	研究課題 顎顔面口腔領域に生じる感覚の高次脳における制御機構	
3	研究目的 島皮質は、顎顔面口腔領域の感覚を情動系と結びつける重要な大脳皮質であり、島皮質における感覚がどのように処理されるかを明らかにするためには、階層縦断的アプローチが不可欠である。申請者は、ミクロ的視点の中でも特に in vitro の標本を用いて神経回路を明らかにしてきた。本研究では、現在までに行ってきた in vitro の研究成果を in vivo 研究に繋げるために、①全脳動物標本(in vivo 標本)に対して光学計測を適用することによって、島皮質における局所神経回路を明らかにする。さらに、動物実験による研究成果をヒトにおける知見に結びつけるために、② 脳磁図(Magnetic encephalogram: MEG)を用いて味覚および口腔領域に発現する痛覚の高次脳における情報処理機構を明らかにする。	
4	研究概要 本年度、動物を用いた光学計測による島皮質の局所回路を明らかにする研究、およびヒトを対象とした非侵襲的脳機能イメージング法(脳磁図)による研究を行った。その結果、味覚刺激によって島皮質の特に顆粒皮質および不全顆粒皮質領域が活性化された。これらの領域における興奮伝播はきわめて特徴的で、吻尾側方向へ扁平した形で興奮が伝わることが明らかとなった。また、味覚想起課題によって島皮質が活性化され、その多くは右側優位の活性パターンを示した。また、約半数例において、島皮質の活性化に先行して前頭前野の活性が認められた。	
5	研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します) <ul style="list-style-type: none"> ・ 研究代表者 小林 真之(研究の立案・遂行と統括) ・ 研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 越川 憲明(動物実験の立案と助言) 藤田 智史(動物実験の遂行) 坪井 美行(動物実験の遂行) 大井 良之(ヒトにおける実験の課題立案) 小川 節郎(ヒトにおける実験の課題立案) 伊藤 芳久(動物実験の立案と助言) 石毛 久美子(動物実験の遂行) 渡辺 恭良(ヒトにおける実験の課題立案と助言) 笹部 哲也(ヒトにおける実験の遂行) 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：歯学部

氏名：小林 真之

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

本年度は、①動物を用いた光学計測による島皮質の局所回路を明らかにする研究、および②ヒトを対象とした非侵襲的脳機能イメージング法(脳磁図)による研究を行った。以下、研究成果の概要と公表された業績(英文のみ)を記載する。

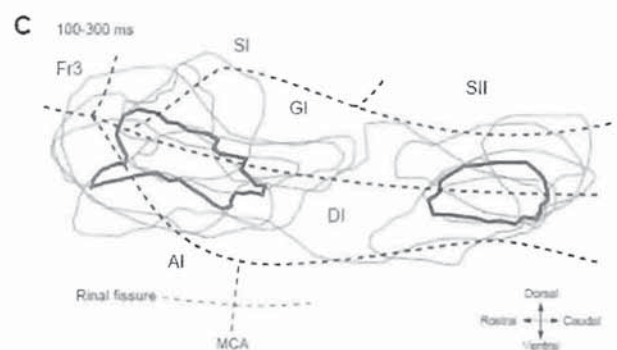
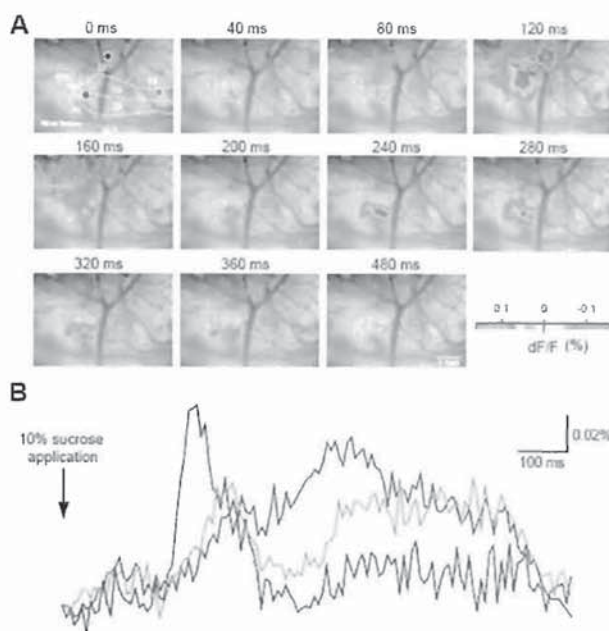
①ラット島皮質における *in vivo* 光学計測

全身麻酔下のラットに光学計測法を適用して、島皮質に投射する味覚が島皮質内での分布様式を明らかにするため。味刺激に対する島皮質ニューロンの膜電位応答を観察記録した。

まず、ウレタン麻酔下で生後 5-6週齢のラットを脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出後、中大脳動脈と側頭溝の交点を中心とした骨窓を開けた。開窓した大脳皮質(島皮質)に膜電位感受性色素(di-4-ANEPPS)を 30 分間負荷し、実体顕微鏡に CCD カメラを搭載した光学計測システム(MICAM 02-HS, ブレインビジョン社製)を用いて同領域の神経活動を光学的に記録した。また、光学計測による信号が神経細胞の活動性を反映していることを証明するため、必要に応じて細胞外記録を行った。

味覚刺激に用いる味溶液および蒸留水は、自作の電磁弁制御による溶液滴下装置を用いて、刺激装置から発生させるトリガー信号によって瞬間的に舌上に滴下した。味刺激に対する島皮質ニューロンの膜電位変化を上記の計測システムで光学的に計測し、50 回分の刺激による応答の平均加算を記録した。舌は味刺激ごとに蒸留水で洗浄し、味刺激はおおよそ 1 分間隔で行った。賦活領域の時空間的な定量解析については、MICAM を用いて行った。

下図に示すように、味覚刺激によって島皮質の特に顆粒皮質および不全顆粒皮質領域が活性化された。これらの領域における興奮伝播はきわめて特徴的で、吻尾側方向へ扁平した形で興奮が伝わるのが明らかとなった。また、てんかんモデル動物において、無顆粒皮質における興奮伝播が異常に拡大することが明らかとなった。すなわち、島皮質の興奮伝播様式は、てんかんをはじめとする病態と深く関わっていることが明らかとなった。



スクロース刺激により活性化された島皮質領域。 (A) 味覚刺激によって誘発される興奮伝播の様子を経時的に示す。赤に近づくに従って興奮度が高いことを示す。 (B) A の region of interest (ROI) における蛍光強度の時間的変化を示す。 (C) 5 例のラットにおいて味覚刺激によって活性化された領域の外形線を青線で重ねて示す。赤線は半数の例において共通して活性化された領域を示す。 AI: 無顆粒島皮質, DI: 不全顆粒島皮質 GI: 顆粒島皮質, MCA: 中大脳動脈。

部科校名：歯学部

氏名：小林 真之

研究結果（つづき）

②脳磁図による実験

大阪市立大学医学部附属病院にある、脳磁図検査室にて測定を行った。被験者は、水平に寝た姿勢で室外投影機から室内画面に投射される味覚想起課題を遂行し、全頭型の多チャンネル脳磁計（横河電機）および脳波計での測定を行った。被験者には、飲食物や非食物の写真または文字をコンピュータ制御により投影機により提示し、その食物の味を想起してもらう課題を遂行してもらった。

実験課題

実験1・2では、課題提示時間を4秒、連続して提示する課題数を70とし、実験3では課題提示時間を1秒、連続提示する写真数を105枚とした。味覚想起課題の配列はランダムにした。

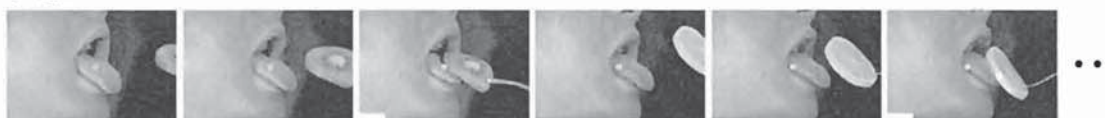
実験1



実験2



実験3



実験1：文字提示による味覚想起課題

奇数回に視覚想起課題を、偶数回に味覚想起課題にする。

実験2：写真提示による味覚想起課題

奇数回は食物と関連のない写真を見る課題に、偶数回を味覚想起課題にする。

実験3：連続写真提示による味覚想起課題

3枚1組の写真を提示し、舌に食物が触れた写真(3枚目)のみに検出用の白印を呈示。

MEG160(横河電機)およびsl160(Matlabによる自作ソフト)を用いてECD法、sLORETA法で双極子と極大点の解剖学的位置を推定し、MRIによる脳解剖イメージに重ね合わせた。

味覚想起課題によって、9例中8例の被験者で島皮質が活性化されることが明らかとなった。その多くは右側優位の活性パターンを示した。また、9例中5例では、島皮質の活性化に先行して前頭前野の活性が認められた。このことは、前頭前野が味覚想起課題において司令塔の役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：歯学部

氏名：小林 真之

研究結果（つづき）

公表された業績：

- 1) Kobayashi M, Kojima M, Koyanagi Y, Adachi K, Imamura K, Koshikawa N (2009) Pre- and postsynaptic modulation of glutamatergic synaptic transmission by activation of α_1 - and beta-adrenoceptors in layer V pyramidal neurons of rat cerebral cortex. *Synapse*, 63: 269-281.
- 2) Sugiyo S, Uehashi D, Satoh F, Abe T, Yonehara N, Kobayashi M, Takemura M (2009) Effects of systemic bicuculline or morphine on formalin-evoked pain-related behaviour and c-Fos expression in trigeminal nuclei after formalin injection into the lip or tongue in rats. *Exp Brain Res*, 196: 229-237.
- 3) Kobayashi M, Fujita S, Takei H, Song L, Chen S, Suzuki I, Yoshida A, Iwata K, Koshikawa N (2010) Functional mapping of gustatory neurons in the insular cortex revealed by pERK-immunohistochemistry and in vivo optical imaging. *Synapse*, 64: 323-334.
- 4) Fujita S, Adachi K, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Spatiotemporal dynamics of excitation in rat insular cortex: intrinsic cortico-cortical circuit regulates caudal-rostral excitatory propagation from the insular to frontal cortex. *Neuroscience*, 165:278-292.
- 5) Chen S, Fujita S, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Pilocarpine-induced status epilepticus causes acute interneuron loss and hyper-excitatory propagation in rat insular cortex. *Neuroscience*, 166: 341-353.
- 6) Fujita S, Kiguchi M, Kobayashi M, Kinsella A, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Assessment of jaw movements by magnetic sensor in relation to topographies of orofacial behaviour in freely moving rats: Studies with the dopamine D(1)-like receptor agonists SKF 83822 vs SKF 83959. *Eur J Pharmacol*, 632: 39-44.
- 7) Fujita S, Kiguchi M, Kobayashi M, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Involvement of NMDA receptors in the ventrolateral striatum of rats in apomorphine-induced jaw movements. *Brain Res*, 1322C: 30-37.
- 8) Tomiyama K, Song L, Kobayashi M, Kinsella A, Kanematsu T, Hirata M, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Orofacial movements in phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)-1/2 double knockout mice: effect of the GABAergic agent diazepam and the D1 dopamine receptor agonist SKF 83959. *Synapse* in press.
- 9) Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Presynaptic interneuron subtype- and age-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by β -adrenoceptors in rat insular cortex. *J Neurophysiol* in press.

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 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 5 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 杉 谷 博 士



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	唾液腺機能再生に向けての分子学的アプローチ	
3 研究目的	口腔は消化管の入り口としての機能を持つ重要な器官である。口腔機能の維持のために、唾液は重要な役割を担う体液である。唾液の分泌低下は、口腔機能維持や全身の健康維持に大きく影響し、QOLの低下を招く。唾液分泌低下には多くの原因が考えられており、高齢者のみならず、若年者層にも口腔乾燥症状を訴えるケースも増加している。本研究は唾液腺における唾液分泌機構に関わる分子を明らかにし、細胞レベルから個体レベルまでの統合的な研究を行い、唾液腺機能再生を目指すことを目的としたものである。	
4 研究概要	唾液腺からの唾液分泌は自律神経の二重支配により調節されている。自律神経系の神経伝達物質が細胞外からの情報として唾液腺細胞に作用すると、その情報を受容し、それに続く細胞内シグナルの活性化が惹起され、最終的にタンパク質分泌および水分分泌が引き起こされる。本研究では、神経伝達物質受容後の唾液腺細胞における水の分泌機構およびタンパク質分泌機構についての検討を行った。水分分泌調節に関しては、唾液分泌不全モデルとしての E2F-1 KO/NOD/SCID の唾液分泌機能を実験解析も含め検討した。また、水チャンネルアクアポリンの役割、特に AQP6 の発現、局在、機能について検討を行った。さらに、タイトジャンクションの役割を、灌流システムや培養細胞を用い、タイト機構調節、IGF-1 による機能維持を中心に検討を行った。タンパク質分泌調節に関しては、分泌顆粒形成・成熟と endocytosis の役割や開口分泌における PKC と MARCKS の役割を検討した。さらに、腺房細胞の分化・脱分化制御についての細胞内シグナルについて検討した。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 杉谷 博士 松戸歯学部・教授 ・研究分担者（役割分担） 吉垣 純子 松戸歯学部・准教授（初代培養系を用いた発現タンパク質の検索） 勝俣 治 松戸歯学部・専任講師（臓器レベルにおける分泌機能の検討） 成田 貴則 松戸歯学部・助教（唾液腺における発現遺伝子の検索） 中尾 寿美 松戸歯学部・助手（分泌顆粒形成機構の検索） 茂呂 周 大学院総合科学研究科・教授（分泌型抗体産生の分子機構の検索） 浅野 正岳 歯学部・専任講師（分泌型抗体産生の分泌機構の検索） 伊藤 芳久 薬学部・教授（ノックアウトマウスにおける唾液分泌能の検討） 小菅 康弘 薬学部・助教（初代培養系を用いた水チャンネル発現の検索） 	

※ホームページ等での公開の（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。

部科校名：松戸歯学部

氏名：杉谷 博士

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

口腔は消化管の入り口としての機能を持ち、食物を摂取し、咀嚼し、味わうための重要な器官である。また、舌を動かし、言葉を発することにも携わっている。こういった口腔機能の維持のために、唾液は重要な役割を担う体液である。また、唾液には多くの抗菌作用物質も含まれ、口腔機能環境液としての役割も担っている。そのため、唾液分泌の低下は、健全な口腔機能維持に大きく影響するばかりでなく、全身疾患発症にも深く関与することが報告されている。口腔乾燥症は唾液分泌低下を主症状とする疾患の総称であり、最近の調査により、高齢者の約25パーセントが口腔乾燥を訴えていることが明らかとなった。また、高齢者に限らず、若年者にも多く発症することも明らかとなり、顕在的な患者数は日本においては800万人、潜在的な患者数を含めると3000万人と推定されている。唾液分泌機能を低下する原因としては、他の疾患の治療に用いられる薬物の副作用や、癌治療のための放射線照射の副作用が知られている。こういった唾液分泌不全の解消のためには、唾液腺機能再生に向けての分子学的アプローチが極めて重要であると考えられる。

唾液腺からの唾液分泌は自律神経の二重支配により調節されている。自律神経系の神経伝達物質が細胞外からの情報として唾液腺細胞に作用すると、その情報を受容し、それに続く細胞内シグナルの活性化が惹起され、最終的にタンパク質分泌および水分分泌が引き起こされる。本研究では、神経伝達物質受容後の唾液腺細胞における水の分泌機構およびタンパク質分泌機構についての検討を行った。

1. 水分分泌調節

1) 唾液分泌不全モデルとしての E2F-1 KO/NOD/SCID

唾液腺機能研究においては唾液腺機能不全マウスが必要となる。われわれは、NOD/SCID マウスの E2F-1 をノックアウトすることにより、糖尿病を発症せず、唾液腺機能が低下するマウスを作成した (Exp Biol Med, 2009)。このマウスを用いて、ピロカルピン投与による唾液分泌機能を検討したところ、対照群と比べて有意に唾液分泌量は低下していた。さらに、行動生理学的な検討を行った。18時間の絶食の後に固形飼料を与えると、対照群のマウスに比べて、E2F-1 KO/NOD/SCID マウスでは給水ノズルへの接触回数および吸水時間ともに有意に増加した。一方、固形飼料に代えてペースト状の飼料においては、両マウス間では変化は認められなかった。これらの結果より、非薬物投与時でも唾液分泌低下が示唆され、E2F-1 KO/NOD/SCID マウスが唾液腺機能不全モデルとして有効であると考えられた。

2) アクアポリンの役割

水の分泌調節に関しては、水チャンネルであるアクアポリン (AQP) について検討した。現在までに AQP のファミリーとして13種類が認められている。われわれは AQP6 について検討をした。

(1) AQP6 の発現

唾液腺における AQP の研究を進める中で AQP6 に関して検討を進めたところ、ラットおよびマウスの耳下腺、顎下腺、涙腺、腭外分泌腺に抗 AQP6 抗体に反応するタンパク質の存在をウエスタンブロット法により認めた。さらに、mRNA の発現を RT-PCR で検討したところ、既に存在が認められている腎臓と同様の産物がラットおよびマウスの耳下腺、顎下腺、涙腺、腭外分泌腺に検出され、AQP6 の発現が示唆された。

唾液腺は腺房細胞と導管細胞とで構成されていることから、それぞれの細胞における AQP6 の発現を検討した。パーコールの密度勾配によりラット顎下腺の腺房細胞と導管細胞を分離した。それぞれの細胞における AQP6 タンパク質および mRNA 発現をウエスタンブロット法および RT-PCR により検討したところ、腺房細胞にのみ発現が認められ、導管細胞には発現しないことが明らかとなった。

(2) AQP6 の局在

AQP6 局在をラット耳下腺および顎下腺腺房細胞の粗膜画分を分離してウエスタンブロット法にて確認したところ、発現が認められた。そこでさらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた間接蛍光法にて局在を検討した。その結果、AQP6 が両唾液腺において腺腔側膜近傍に局在することを認めた。タイトジャンクションのマーカータンパク質である ZO-1 との共局在を検討したところ、ZO-1 の近傍に局在することが認められたことから、タイトジャンクション付近での局在が明らかとなった。次に、急速凍結切片を用いた免疫電顕で AQP6 の局在の検討を行った。その結果、AQP6 はタイトジャンクション近傍と分泌顆粒膜に局在することを認めた。

部科校名：松戸歯学部

氏名：杉谷 博士

研究結果（つづき）

(3) AQP6 の機能

AQP は水を選択的に透過するチャンネルとしての機能を持つことで発見されたタンパク質であるが、近年、AQP の中にはイオンチャンネルとしての機能を持つことも示唆されている。AQP6 は塩素イオンを含むハロゲン族のイオン透過性をもつことが電気生理学的な手法により明らかにされており、唾液腺における AQP6 も塩素イオンチャンネルとしての機能が推測される。塩素イオンの分泌は唾液の生成に重要な役割を担うことから、耳下腺においては腺腔側膜に局在することは唾液生成や分泌に関連すると考えられる。パッチクランプ法を用いて、マウス耳下腺腺房細胞のイオン透過性を検討したところ、塩素イオン、硝酸イオンを透過するチャンネルが認められた。さらに、このチャンネルは AQP6 の特徴である水銀により活性化されることから、AQP6 の可能性が考えられた。近年、外分泌腺で発見された塩素イオンチャンネル ANO-1 は非特異的塩素イオンチャンネル阻害剤 DIDS 感受性であるが、われわれの認めたチャンネル電流は DIDS に非感受性であり、AQP6 の可能性がさらに高められた。

3) タイトジャンクションの役割

(1) タイト機構

唾液分泌課程において、水の輸送には経細胞細胞輸送と傍細胞輸送系が存在するが、傍細胞輸送系の調節に関わるのがタイトジャンクションである。SMIE 細胞はタイトジャンクションをもつ細胞であるため、傍細胞間を經由する機能解析には極性を維持した培養系である。この系を用いることにより、傍細胞間経路の機能は抵抗値とデキストランの透過性で確認できた。また、タイトジャンクションを形成するタンパク質としては、ZO-1、クローディン 3、オクルーディンの発現をウエスタンブロット解析および共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学により確認した。しかし、一般的にタイトジャンクション機能を有する細胞での発現のみられる他のクローディンの発現は認められなかった。そこで、クローディンの 1 つであるクローディン 4 を過剰発現させ、傍細胞間機能の検討を行ったところ、抵抗値が上昇し、デキストランの透過は悪くなったことから、クローディン 4 が唾液腺傍細胞輸送系の機能調節に関与することが示唆された (Cell Tissue Res 2008)。

(2) IGF-1 による機能維持

唾液腺細胞には成長因子の一つである IGF-1 の発現が知られている。そこで、タイトジャンクション機能維持にかかわる IGF-1 の機能を検討した。有血清培地では、SMIE 細胞は増殖し、タイトジャンクションタンパク質と機能を維持していた。血清 (FCS) の代わりに HGF, EGF, TGF- β などを用いた場合は SMIE 細胞のタイトジャンクション維持は認められなかったが、IGF-1 存在下ではほぼ血清と同様な効果が認められた。IGF-1 受容体阻害剤を用いた場合は IGF-1 の効果も血清の効果も阻害されたことから、血清中に含まれる IGF-1 が SMIE 細胞におけるタイトジャンクション機能維持に関与することが認められた (投稿中)。

(3) 水分分泌とタイト結合機能

分離細胞や培養細胞系では直接に水分分泌を測定することは難しいことから、ラット顎下腺灌流標本をもちいた実験系を確立した。この灌流系では、神経伝達物質として知られているニューロキニン A や口腔乾燥症治療に用いられるピロカルピンやセビメリンにおいても唾液の分泌が認められた。時間に伴う分泌パターンについても検討を行ったところ、それぞれの薬物に依存した分泌パターンが認められた。タイト結合の役割を検討するために、灌流液中に細胞膜非透過性の蛍光物質であるルシファーイエローを加えたところ、唾液分泌に伴って唾液中にルシファーイエローの分泌が認められたことから、傍細胞輸送系の関与が認められた。

2. タンパク質分泌調節

1) 分泌顆粒形成・成熟と endocytosis の役割

タンパク質分泌に関わる因子の検討に関して、分泌顆粒形成機構の検討も行った。一連の分泌機構は分泌タンパク質の合成に始まり顆粒内への濃縮・分配、細胞内の輸送・成熟、そして開口放出という過程に分類することができる。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：松戸歯学部

氏名：杉谷 博士

研究結果（つづき）

一度刺激により細胞内の分泌顆粒を空にした状態からの分泌顆粒の合成を観察すると、腺腔側からの形成が認められたことから、腺腔側からの **endocytosis** が分泌顆粒形成に関与するという仮説をたてた。耳下腺を刺激し再合成される顆粒に関しては未成熟と思われるものが分離され、細胞内への非透過性蛍光物質であるデキストリンヤルシファーイエローで前処理をしておく、未成熟顆粒への取り込みも認められた。このことから、腺腔膜からの **endocytosis** による取り込みが示唆された。さらにこの細胞を刺激すると、取り込まれた細胞膜非透過性蛍光物質が分泌されることから、分泌顆粒形成に **endocytosis** が関わるということが強く示唆された。

2) 開口分泌における **MARCKS** の役割

唾液腺におけるタンパク質は開口放出により分泌される。モデル系として耳下腺腺房細胞におけるアミラーゼ分泌を使用して検討を進めたところ、**myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)** というタンパク質の発現を認めた。耳下腺腺房細胞における開口放出は **cyclic AMP** が細胞内シグナルとして必須である。しかし、**MARCKS** は C キナーゼの基質として知られているタンパク質であることから、**cyclic AMP** 系、C キナーゼ系、**MARCKS** のアミラーゼ分泌への関与を検討した。その結果、C キナーゼは約 10 種類のアイソフォームが知られているが、その中の C キナーゼ δ が関与することが認められた。さらに、**cyclic AMP** の下流に存在する A キナーゼの活性化により C キナーゼ δ が活性化されることを、リン酸化、細胞内局在、キナーゼ活性を検討することにより明らかにした。引き続き、C キナーゼ δ は **MARCKS** をリン酸化することも明らかとなり、さらに、**MARCKS** のペプチド阻害剤を用いた検討により、**cyclic AMP** 依存性のアミラーゼ分泌は抑制された。これらの結果より、**cyclic AMP**-C キナーゼ δ -**MARCKS** リン酸化系がアミラーゼの開口放出に関わることが明らかとなり、**cyclic AMP** から開口放出に至るシグナル経路の一部が明らかとなった (*Am J Physiol Gastrointest Physiol*, 2009)。

3. 腺房細胞の分化・脱分化制御

唾液腺においても分泌能を維持した培養細胞は確立されていなかったことから、我々は、分泌機能を維持した唾液腺腺房細胞の培養系の確立に着手した。その結果、ラット耳下腺腺房細胞を利用し、48 時間目までは自律神経からの神経伝達物質に対する分泌応答能を維持した初代培養系を確立することに成功した (*Cell Tissue Res*, 2005)。この培養系を用いて、腺腔側タンパク質やタイトジャンクションタンパク質の動態が培養に伴って大きく変化することを認めた。すなわち水分分泌に関与する **AQP5**、分泌タンパク質であるアミラーゼの合成、タイトジャンクションタンパク質の **クローディン 3** は低下し、一方 **クローディン 4** の合成と発現が促進された。このことは、腺房細胞が導管細胞に脱分化された現象と解釈された。そこで、これらのタンパク質をマーカーとして細胞内シグナルを検討したところ、**Src** および **p38 MAP** キナーゼを阻害することにより、その脱分化の阻害が認められた。これらのことから、腺房細胞の分化・脱分化調節が極めて重要であることを明らかにした (*Am J Physiol Cell Physiol* 2008)。

以上のいくつかの知見は、唾液腺機能の再生に向けた研究の大きな礎となり、更なる展開が期待できるものと考えられる。

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿

氏 名 西山典宏



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	ワンステップボンディング材による歯質接着システムの構築	
3 研究目的	<p>ワンステップボンディング材に多用されているメタクリル酸エステルモノマーのエステル基は、ボンディング材中に含まれる酸性メタクリル酸エステルモノマーの酸性基の解離によって生成されたH⁺イオン共存下で加水分解するため、ワンステップボンディング材は経時的に変質し、歯質に対するレジンの接着強さが低下することが報告されている。</p> <p>本研究では、N-メタクリロイル-2-アミノエチルホスホン酸 (NMEP)、N-メタクリロイル-ω-アミノ酸 (N-メタクリロイルグリシン：NMGLy；N-メタクリロイルアミノプテリックアシッド：NMBu) および架橋性モノマーとして多官能性メタクリル酸アミドモノマーを合成し、これら機能性メタクリル酸アミドモノマーを用い、従来のメタクリル酸エステルモノマーからなるボンディング材に比べ、加水分解安定性の高い新規ワンステップボンディング材を開発することを目的とする。</p>	
4 研究概要	<p>1. メタクリル酸エステルモノマーを用いて、ワンステップボンディング材を調製し、ボンディング材への水の添加量がハイドロキシアパタイトおよび象牙質アパタイトの脱灰量におよぼす影響を溶液の NMR 法を用いて明らかにする。</p> <p>2. 試作ワンステップボンディング材で処理したエナメル質および象牙質に対するレジンの接着強さを測定し、ボンディング材への水の添加量がエナメル質および象牙質に対するボンディングレジンの接着強さにおよぼす影響を明らかにする。</p> <p>3. 得られた結果を基に歯質に対する試作ワンステップボンディング材の接着機構を明らかにし、機能性メタクリル酸アミドモノマーを用いた新規ワンステップボンディング材の開発研究の糧とする。</p>	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<p>・研究代表者 西山 典宏 (アミドモノマーの合成・確認, モノマーと歯質との相互作用および総括)</p> <p>・研究分担者 (役割分担) 前田 隆秀 (接着強さの測定) 曾田 雅啓 (接着強さの測定およびモノマーと歯質との相互作用) 中島(藤田) 光 (アミドモノマーの合成・確認およびモノマーと歯質との相互作用) 平田 光男 (アミドモノマーの合成・確認)</p>	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：松戸歯学部

氏名：西山典宏

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

本研究では、N-メタクリロイル-2-アミノエチルホスホン酸 (NMEP, 酸性モノマー), N-メタクリロイル- ω -アミノ酸 (N-メタクリロイルグリシン:NMGLy; N-メタクリロイルアミノプチリックアシッド:NMBu, 親水性モノマー) および多官能性メタクリル酸アミドモノマーとしてN-ジメタクリロイルシスチン (NMCys) を合成し、これら機能性メタクリル酸アミドモノマーをベースモノマーとした新規ワンステップボンディング材をデザインし、従来のメタクリル酸エステルモノマーからなる市販ワンステップボンディング材に比べて、接着安定性および接着耐久性の高いワンステップボンディング材を開発することを目的としている。

まず始めに、ワンステップボンディング材に配合されている酸性モノマーの酸性基を効果的に電離させ、歯質アパタイトを脱灰させる能力を付与するため、ボンディング材への水の添加は不可欠である。そこで、ワンステップボンディング材に対する最適な水の添加量を検討するため、まず、メタクリル酸エステルモノマーを用いてワンステップボンディング材を調製し、水の添加量が歯質アパタイトの脱灰量および歯質接着性におよぼす影響について検討した。

1. ワンステップボンディング材の調製

ワンステップボンディング材の調製には、多官能性モノマーとしてウレタンジメタクリレート (UDMA) およびトリエチレングリコールジメタクリレート (TEGDMA), 親水性モノマーとして2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA), さらに酸性モノマーとして10-メタクリロイロキシデシルジヒドロゲンフォスフェイト (MDP) を用いた。すなわち、UDMA および TEGDMA をそれぞれ 10 g 計量して調製したモノマー混合物に HEMA を 4 g 添加し、さらに MDP を 10 g 加え、これに光重合触媒およびシリカフィラーを少量添加してボンディング材混合モノマーを調製した。つぎに、このボンディング材混合モノマーをアセトンで希釈した後、水を加え、水の添加量の異なる3種のワンステップボンディング材を調製した。なお、ボンディング材混合モノマー34 g に対するアセトンと水の添加量は、69.3 g (アセトン) と 11.2 g (水), 58.1 g (アセトン) と 22.4 g (水) および 47.0 g (アセトン) と 33.5 g (水) である。

2. 試作ワンステップボンディング材への水の添加量が MDP と歯質アパタイトとの反応性におよぼす影響

試作ワンステップボンディング材 2.000 g 中にヒドロキシアパタイト粉末 (エナメル質モデル化合物, HA200, 太平化学) または新鮮ウシ歯冠象牙質をエアタービンで切削して作製し歯冠象牙質粉末を 0.400 g 懸濁し、10分間振盪・攪拌した。つぎに、これらヒドロキシアパタイトあるいは象牙質懸濁液を遠心分離し、ワンステップボンディング材の上澄み液を得た。このワンステップボンディング材上澄み液を 0.300 g NMR 試料管に計量し、これに NMR 測定溶媒としてジメチルスルフォキシド-*d*6 を 0.200 g 加え、NMR 測定用の試料を調製し、溶液の ^{13}C NMR スペクトルを測定した。なお、NMR の測定には EX-270 スペクトロメーター (日本電子) を用い、 45° パルス、パルス間隔 9 秒、積算回数 3,000 回の条件で NMR スペクトルを測定した。得られた ^{13}C NMR スペクトルの NMR ピークの帰属を行い、MDP, UDMA, TEGDMA および HEMA のビニル基メチレンカーボンに帰属される NMR ピークの面積をそれぞれ求めた。つぎに、MDP のビニル基メチレンカーボンに帰属される NMR ピークの面積を UDMA, TEGDMA および HEMA のビニル基メチレンカーボン NMR ピークの総面積で除して強度比 (面積比) を求め、歯質成分添加前後における MDP ビニル基メチレンカーボン NMR ピークの強度比の変化からヒドロキシアパタイトまたは象牙質アパタイトの脱灰により生成された MDP のカルシウム塩の生成量を求めた。なお、UDMA, TEGDMA および HEMA は歯質アパタイトと酸-塩基反応を起こさないため、これらモノマーのビニル基メチレンカーボン NMR ピークの総面積は歯質成分と相互作用させる前・後において変化しないものと仮定し、MDP のカルシウム塩の生成量を算出した。

試作ワンステップボンディング材にヒドロキシアパタイトまたは象牙質粉末を添加して両者を相互作用させ、ワンステップボンディング材への水の添加量が MDP と歯質アパタイトの反応性におよぼす影響を検討した結果、試作ワンステップボンディング材にヒドロキシアパタイトまたは象牙質を相互作用させると、MDP のビニル基メチレンカーボンに帰属される NMR ピークの強度比は減少した。これは、酸性モノマーとして添加されている MDP のリン酸基が歯質アパタイトを脱灰し、ワンステップボンディング材に不溶性の MDP のカルシウム塩が生成され、MDP のカルシウム塩がワンステップボンディング材溶液から析出したためと考

部科校名：松戸歯学部

氏名：西山典宏

研究結果（つづき）

えられる。

また、ワンステップボンディング材中の水の割合が増加するにつれて MDP 分子内リン酸基の解離が促進され、MDP のカルシウム塩の生成が促進されるため、MPD の減少率は増大し、歯質アパタイトの脱灰量が増大することが明らかとなった。

さらに、ワンステップボンディング材中の MDP による歯質脱灰能は、象牙質アパタイトの方がエナメル質成分であるヒドロキシアパタイトより高いことが明らかとなった。これは、象牙質アパタイトはヒドロキシアパタイトに比べ結晶化度が低く、結晶の大きさが小さいためと考えられた。

2. 試作ワンステップボンディング材への水の添加量がエナメル質および象牙質に対するレジンの接着強さにおよぼす影響

新鮮ウシ抜去歯のエナメル質または象牙質面を被着体として試作ワンステップボンディング材の接着試験を行った。すなわち、エナメル質または象牙質研磨面（#1,000 シリコンカーバイトペーパー）にシリコンリングを仮着し、その内面に試作ワンステップボンディング材を塗布し、20 秒間作用させた後、ボンディング材中に含まれるエタノールおよび水を除去するため、強圧で 5 秒間エアブローを行った。つぎに、可視光線照射器を用い、光照射を 10 秒間行い、ワンステップボンディング材を重合させた後、リング内にコンポジットレジン（クリアフィル AP-X, クラレ）を充填して光重合・硬化し、コンポジットレジンを接着した試験体を作製した。この接着試験体を 37°C 水中に 24 時間浸漬した後、万能試験機（TG-5KN, ミネビア）を用い、クロスヘッドスピード 1 mm/min の条件下でエナメル質あるいは象牙質に対するボンディングレジンの圧縮せん断接着強さを測定した。

試作ワンステップボンディング材で処理したエナメル質および象牙質に対するボンディングレジンのせん断接着強さを検討した結果、ワンステップボンディング材への水の添加量が増加するにつれてエナメル質ヒドロキシアパタイトおよび象牙質アパタイトの脱灰量が増加するにも拘わらず、エナメル質および象牙質に対するワンステップボンディング材の接着強さはわずかに低下する傾向を示した。これは、エナメル質あるいは象牙質表面に作用させたワンステップボンディング材に強圧のエアブローを施しても、水がボンディング材層内部に残留するためと考えられた。すなわち、ワンステップボンディング材に強圧のエアブローを施すことによりエタノールは選択的に蒸発するが、ボンディング材層内部に大部分の水が残留し、残留した水がワンステップボンディング材に含まれる疎水性の UDMA および TEGDMA と相分離を起こし、エマルジョンを形成してワンステップボンディング材硬化物層内部に気泡として点在するため、水の添加量の増加に伴いボンディング材硬化物の強度が低下し、その結果エナメル質および象牙質に対するワンステップボンディングレジンの接着強さが低下したものと考えられた。

また、ワンステップボンディング材の接着強さは、ワンステップボンディング材中の MDP によるアパタイトの脱灰量の多い象牙質より脱灰量の少ないエナメル質の方が高い値を示すことが明らかとなった。これは、エナメル質および象牙質に対するワンステップボンディング材の接着機構が異なるためであり、象牙質の方がエナメル質に比べワンステップボンディング材硬化物層内部に残留する水の影響を受けやすいことが明らかとなった。

しかし、接着したレジンの破壊は、被着体であるエナメル質または象牙質表面からの界面剥離であり、レジンの接着強さをさらに向上させるためには水とモノマーとの相分離を起こさせないための工夫が必要であることが判明し、架橋性モノマーに用いるモノマーに親水性を付与することの必要性が示唆された。

以上の結果から、ワンステップボンディング材をデザインするにあたっては、1) ワンステップボンディング材混合モノマーに対する水の最適添加量が存在すること、2) ワンステップボンディング材の接着強さを向上させるためには多官能性メタクリル酸アミドモノマーが水と相分離を起こさないように、水に溶解性あるいは親和性を有するアミド系モノマーを分子設計することが重要であることが明らかとなった。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：松戸歯学部

氏名：西山典宏

研究結果（つづき）

現在、NMgly（親水性モノマー）またはNMBu（親水性モノマー）水溶液にNMEP（酸性モノマー）を添加し、さらに多官能性メタクリル酸アミドモノマーとして、親水性を付与するために分子内に2つのカルボキシル基を有するNMCysを添加したワンステップボンディング材を調製し、上記の手法に準じて試作ワンステップボンディング材中に含まれるNMEPと歯質アパタイトとの反応性および試作ワンステップボンディング材で処理したエナメル質および象牙質に対するレジンの接着強さを検討中である。今後、ワンステップボンディング材の加水分解安定性、接着安定性および接着耐久性について検討する予定である。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

課題番号	総 09-024
------	----------

注：課題番号を記入してください。

平成 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 20 日

日 本 大 学 総 長 殿



氏 名 寒河江 登志朗

所属・資格 松戸歯学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1	種 目	<input type="checkbox"/> 一般研究(個人研究) / <input type="checkbox"/> 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="checkbox"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2	研究課題	日本大学の新しい放射光 LEBRA-PXR の高度利用に関する基盤研究	
3	研究目的	日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設 (LEBRA) は学術フロンティア推進事業などの補助により、新しい X 線光源 (パラメトリック X 線、PXR) を応用実験に供給できる施設として、大学レベルで世界で唯一の施設となっている。この PXR は単色・波長可変・高コヒーレンスなど他の放射光施設でも容易に得られない高品質の X 線源である。これらの特性を有する LEBRA-PXR を高度に利用するために、超大型放射光施設で確立または実験されている計測法の導入と改変、および独自の計測法の基盤の開発研究を目指した。	
4	研究概要	LEBRA-PXR の特性の確証実験を行う中で、他施設では実際の実験には施設設備的・時間的・経費的に多大な困難が伴う種類の実験であるが LEBRA-PXR を利用することで比較的容易にしかも高精度の結果を得られるタイプの実験を探り出すことができた。それらは、位相コントラストイメージング、X 線吸収端分析、XAFS (X 線吸収微細構造) 解析であった。LEBRA-PXR の波長可変性を利用した硬組織/軟組織の観察では、従来の X 線法では観察が困難であった構造が明瞭に判別可能であった。PXR の将来像についても議論した。	
5	研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	・研究代表者 寒河江登志朗・松戸歯学部・准教授 (企画、総括、X 線実験) ・研究分担者 (役割分担) 佐藤 勇・総合研究大学院・教授 (加速器の応用開発) 新富 孝和・総合研究大学院・教授 (加速器の性能改良) 田中 俊成・量子科学研究所・教授 (加速器の安定化) 早川 建・量子科学研究所・教授 (加速器の恒常運転) 早川 恭史・量子科学研究所・准教授 (PXR 開発研究) 山本 寛・理工学部・教授 (電子材料研究) 鈴木 薫・理工学部・教授 (プラズマ現象研究) 岩田 展幸・理工学部・専任講師 (電子材料開発) 山本 浩嗣・松戸歯学部・教授 (病理組織研究) 金田 隆・松戸歯学部・教授 (放射線機器開発) 早川 徹・(現) 鶴見大学・歯学部・教授 (歯科材料開発) 鈴木 久仁博・松戸歯学部・准教授 (細胞組織研究) 岡田 裕之・松戸歯学部・専任講師 (病理的石灰化物研究) 山本 仁・松戸歯学部・専任講師 (細胞培養実験) 谷本 安浩・松戸歯学部・専任講師 (歯科材料研究) 中田 浩史・松戸歯学部・専任講師 (歯科インプラント材料開発) 森 啓・薬学部・助教 (加速器を利用した測定法)	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：松戸歯学部

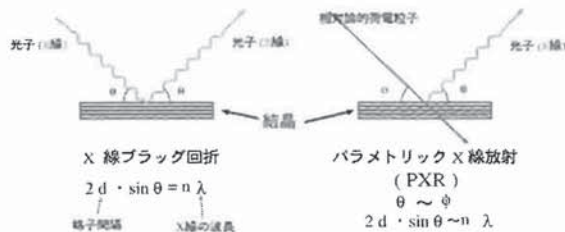
氏名：寒河江登志朗

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。)

I. パラメトリック X 線の実用化に向けた機器開発と性能試験、性能比較

パラメトリック X 線 (PXR) の発生原理と LEBRA-PXR の設計の独自性、特性

パラメトリック X 線 (PXR) は相対論的な速度の荷電粒子が結晶のような周期構造を持つ物質に入射したときに生じる電磁放射現象である。この原理は物理学分野では古くから知られていたが、実際に実験を行った例は少ない。PXR は結晶に入射する電子線の入射角によって発生する X 線の波長が一義的に定まるため、幅広い波長範囲で任意の X 線波長を選択することが可能である。



日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設(LEBRA)では学術フロンティア推進事業などの補助を受け、線形加速器によって100 MeVに加速した電子をSi単結晶に照射してPXRを発生し、これを光源とするビームラインの構築を行ってきた(LEBRAのホームページ <http://www.lebra.nihon-u.ac.jp/intro.html>を参照されたい)。特に、早川ら()によって開発された2結晶法と呼ぶ光路設計を採用したことにより、波長角度依存性のあるX線ビームを常に同一光路に導くことに成功した。現在LEBRA-PXRの可変波長範囲は5~36 KeV (2.48 ~ 0.344 Å)である。LINACで加速した電子線を使っているために、LEBRA-PXRはマイクロマクロパルス構造を有している(図3)。このことは、イメージングの撮像などにおいて実際にX線が照射されている実照射時間はシャッター開放時間の約1/10万であることを意味している(例、36 msec/60min)。X線の強度は実験に供用できる程度の実用性を確保している。X線強度の増強についてパルスおよび電流の増加などの解決策はあるが、施設管理および加速器稼働の人員などの問題点をクリアしなくてはならない。

LEBRA-PXRは波長可変、ほぼ平行なビーム、高いコヒーレンス性、水平方向にわずかな波長分散などの特性を有し、内外の放射光施設などと比較しても遜色のないX線光源である。

日本大学の放射光施設(LEBRA)と国内・海外の放射光施設の比較

	日本大学 LEBRA	つくば PF フォトンファクトリー KEK高エネルギー研究所	播磨 SPring8 放射光施設	米国 ブルックハイブン国立研究所 NSLS	米国 California DOE+スタンフォード大学 SLAC SSRL
加速器のタイプと 最大加速電圧	LINAC 128 MeV	PF-ring: 2.5 GeV PF-AR ring: 6.5 GeV	Ring: 8 GeV 世界最大の加速エネルギー	VUV-ring: 808 MeV X-ray ring: 2.8 GeV	Ring: 3 GeV
施設建設 予算規模	18億円 (日本大学学術フロンティア事業)	1000億円+ (国家的事業) 年間予算410億円	1000億円+ (国家的事業)	50 M\$ (国家的事業)	30 M\$ (国家的事業)
利用可能な 光の種類	1) FEL 自由電子レーザー (クラス世界最長波長) 0.3 ~ 6.0 μm 2) PXR パラメトリックX線 (世界唯一) 3 ~ 39 KeV (4.1 ~ 0.4 Å)	VUV ~ 硬X線	赤外 ~ 硬X線	VUV ~ 硬X線	赤外 ~ 硬X線
X線の特徴と 利用実績	PXR自体が単色化されている X線波長調整が容易 X線照射域が広視野である コヒーレントX線(世界唯一)	X線単色化装置高額 X線波長選択のための装置が必要 X線の指向性は高い(微小領域分析に適している。広視野のためには特別な装置が必要) 放射光はインコヒーレント			
X線回折	広角X線回折	広角X線回折・超微小部X線回折 X線結晶構造解析			
X線透過・吸収	X線吸収定量分析 元素固有X線吸収分析	X線吸収定量分析 元素固有X線吸収分析			
X線イメージング	超高精細・位相コントラスト	位相コントラスト (精密装置が必要)			
X線吸収微細構造 XAFS	広視野短時間測定	微小領域測定			

部科校名：松戸歯学部

氏名：寒河江登志朗

研究結果（つづき）

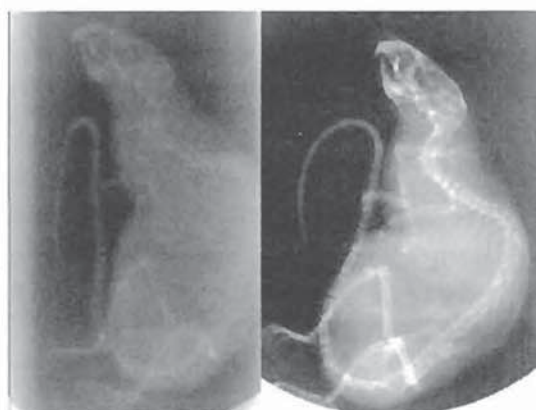
II. LEBRA-PXR の高度利用研究における基盤整備と確証実験

LEBRA-PXR の有する特性の中で、他の X 線装置・施設では得ることが困難であるものとして、1) 波長可変、2) 単色、3) 水平方向にわずかな波長分散、4) 高コヒーレンスな光源という性質が上げられる。これらの性質を単独あるいは組み合わせて利用することで従来は実現不可能と考えられていた各種の X 線実験が可能となることは以前より注目されていた。本研究では、実験に必要な装置設計・機器類配置 (X 線源となる Si 結晶) などの基盤を整備してこれらの実証実験を行った。

1) LEBRA-PXR の波長可変を利用した実験

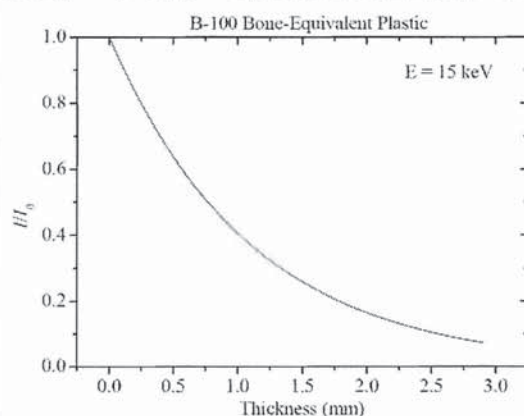
PXR の原理から、X 線源となる Si 結晶の周期構造 (格子間隔) と電子線の入射角の関係によって発生する X 線のエネルギー (波長) が自由に選択できる。実際には、結晶の角度調整範囲の限界と X 線エネルギーに適した結晶格子間隔の 2 つの要素から、LEBRA では (111) 結晶面の Si 結晶と (220) 結晶面の Si 結晶を用いて、それぞれ低エネルギー側 (5~26 KeV: 2.48~0.477 Å) と高エネルギー側 (8~36 KeV: 1.55~0.344 Å) の実験に用いた。

波長可変のもっとも端的な応用は動物の硬組織と軟組織構造撮影であろう。従来から X 線は硬組織の撮像には優れているが、軟組織は不得意であるとされてきた。しかし、低エネルギーの X 線は軽元素を主とする軟組織の撮影が原理的には可能である。下の写真は X 線エネルギー (波長) に関するマウス透過像の差を示した (右: 33KeV、左: 25.5KeV)。低エネルギーで撮影した像には内臓がより明瞭に観察された。



2) LEBRA-PXR の単色光源を利用した実験

X 線の物質による吸収は波長と元素によって決まることから、単色 X 線を用いることで定量的な評価が行える。これを用いて骨吸収を定量計測するためのスタンダードを作成した。

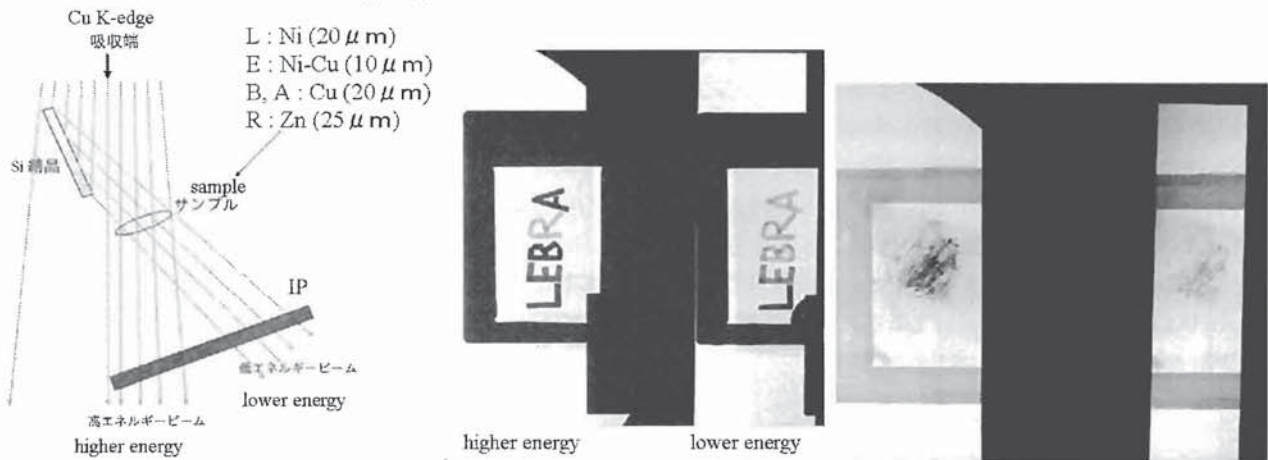


注：必要に応じて、このページをご使用ください。

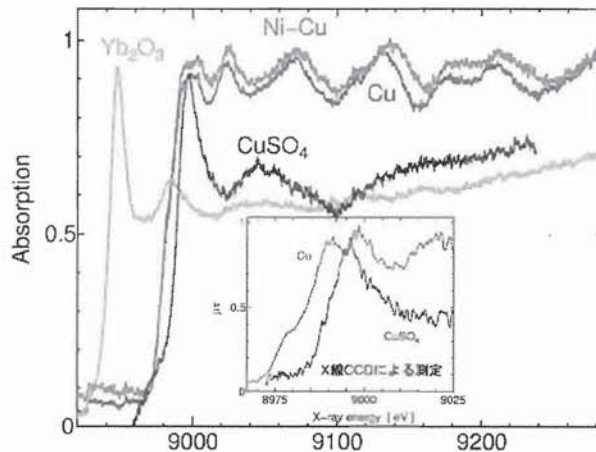
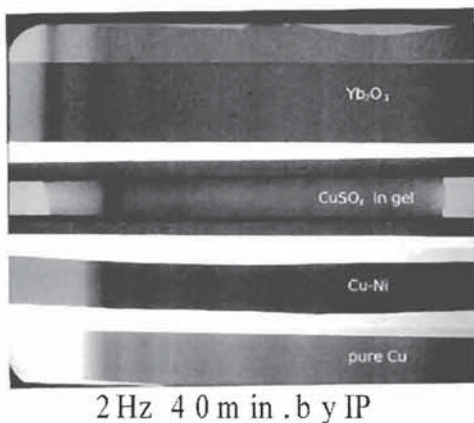
研究結果 (つづき)

3) LEBRA-PXR の波長分散を利用した実験

水平方向にわずかな波長分散を特徴とする LEBRA-PXR は、その大きな撮影視野 (約 10cm 径) とあいまって、一度に元素の吸収端分析が行える。下はその光路図と実際に Ni, Ni-Cu, CuZn 箔で描いた LEBRA 文字を撮影した像である。このようなタイプの分析は他所では行っていない。この方法の利点は、物質の X 線吸収端を挟んで高エネルギー側と低エネルギー側の撮影が一度で済むことから、特定したい元素の 2 次元的な分布を調べることが容易である点にある。下の右の写真は同様にヒ素の吸収端を挟んでヒ素含有鉱物を撮影したもので、ヒ素の存在が証明された。



LEBRA-PXR の広い視野と水平方向の波長分散は近年注目を集めている XAFS 解析に適っている。XAFS とは X-ray Absorption Fine Structure (X 線吸収微細構造) のことで、これはさらに XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) と EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) に分けられ、おもに前者は電子状態 (価数) の解析に後者は注目元素の局所構造 (配位数、結合距離) の解析に用いられている。XAFS の解析は放射光施設あるいは市販の高額な専用機器に頼るしかない現状であるが、LEBRA-PXR を用いることによって、容易に短時間で結果を得ることが出来る。下の図はそのような実験の例で、十分な解析精度をもっていることが証明された。ただ、より高分解能の検出つきを用いることで、さらに精度良く解析が可能である。



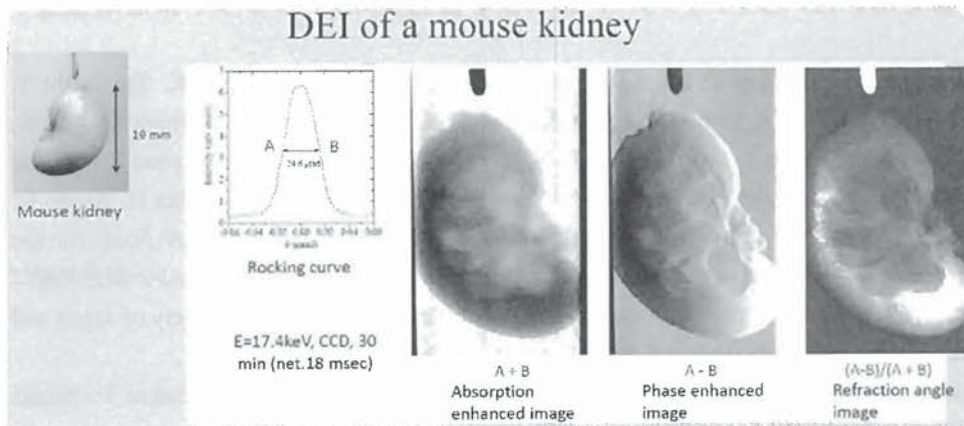
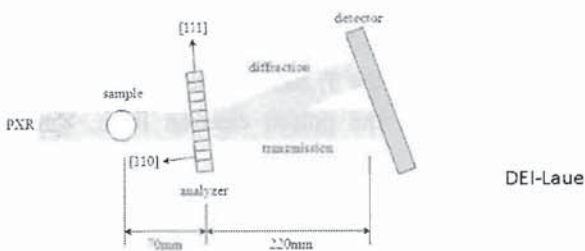
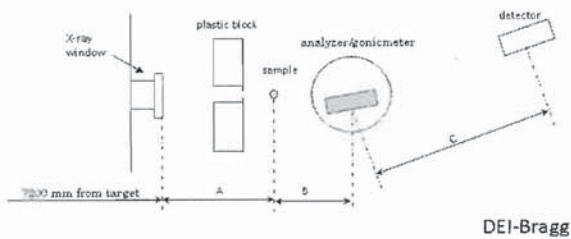
注：必要に応じて、このページをご使用ください。

研究結果 (つづき)

4) **LEBRA-PXR** の高コヒーレント性を利用した実験

X線が高コヒーレントであるということは、位相の揃った光であることを意味し、すなわち X線位相コントラストイメージングが可能であることになる。従来 X線で広く用いられてきた吸収コントラスト像は物質による吸収をみているため、相当程度の物質組成の違いあるいは量的な差異を捉えていた。このため、吸収コントラストでは軽元素からなる軟組織の構造を観察するには限界があった。しかし、位相コントラスト法では物質の屈折効果が大きくなり、軽元素から構成される物質での位相法のコントラストは吸収法に比べて 1 万倍になるという計算もある。そのため、軟組織観察・病理診断などに応用が期待されている。**LEBRA-PXR** を利用して、この位相コントラストイメージングに挑戦した結果、優れた性能を引き出すことに成功した。

位相コントラストイメージングの撮影には多様な方法が提唱され実験されているが、**LEBRA** では **Bragg** 法と **Laue** 法 (下図参照) ならびに伝搬法を実験した。これらの実験方法の詳細は別記論文に譲るが、**Bragg** 法では試料で屈折 (変調) した X線を捉えるアナライザー結晶が重要であり、その回転精度は 1 万分の一を要求する。また、**Laue** 法においては分光するアナライザー結晶の仕上げ精度が重要である。本研究において、これらの調整を精密に行ったうえで撮影したマウス腎臓の位相コントラスト像を下に示した。位相コントラスト像では吸収像では明瞭でなかった内部の構造をはっきりと捉えていた。



注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：松戸歯学部

氏名：寒河江登志朗

研究結果（つづき）

以上に述べた実験成果は本研究で行われた実験研究の一部であり、その他多数の研究成果は学会発表・論文発表を行ってきつつある。これらについては別途報告する予定である。

III. LEBRA-PXRの将来像

この1年間で行ってきた実験研究からPXRは新しいX線光源として極めて魅力的なものであることが実証できたと考える。LEBRA-PXRは世界で唯一の応用実験可能な施設として独自の位置を占めつつあることは、海外の学会等においても証明された。この貴重なX線光源をいかに利用していくかは、今後のユーザー側の光源の性能要求に大いに委ねられている。そのためには、LEBRA-PXRのX線特性をより明確にしてユーザーの目的を達成するための共同研究利用体制を確立することが望まれる。また、LEBRA-PXR光源開発側には、マイクロ・マクロパルス特性を利用した時分割・超短時間反応の計測実験研究あるいは直線偏光特性を利用したキラル分析研究などの提案を続けていく必要があるだろう。

IV. 本研究による成果ならびに本研究の基盤となる業績

1. 早川恭史: 日本大学電子線利用研究施設(LEBRA)におけるパラメトリックX線源開発. 加速器, 6(2) pp.166~177, 2009.
2. 高橋由美子, 早川恭史, 桑田隆生, 境武志, 中尾圭佐, 野上杏子, 田中俊成, 早川建, 佐藤勇: パラメトリックX線の位相コントラストイメージングへの応用, *Application of parametric x-rays to phase-contrast imaging*, X線分析の進歩 (Adv. X-ray Chem. Anal. Japan) 40, 269-278, 2009.
3. 稲垣 学, 野上杏子, 早川恭史, 早川 建, 田中俊成, 中尾圭佐, 佐藤 勇: Si 結晶面の違いによるパラメトリックX線放射の特性. 第6回日本加速器学会年会プロシーディングズ, 2009.
4. Suwa T, Sakae T, Nakada H, Numata Y, LeGeros RZ, Sato I: Quantitative micro-radiography of new bones formed around the implant using parametric X-ray. *Key Engineering Materials*, 361-363: 1249-1252, 2008.
5. Nakada H, Sakae T, Suwa T, LeGeros RZ, Gunji A, Kato T, Kobayashi K: Observation of newly formed bone around dental implants using parametric X-ray. *Key Engineering Materials*, 309-311: 31-34, 2008.
6. Hayakawa Y, Hayakawa K, Inagaki M, Kuwada T, Nakao K, Nogami K, Sakae T, Sakai T, Sato I, Takahashi Y, Tanaka T: Dependence of PXR beam performance on the operation of the pulsed electron linac. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 266, 3758-3769, 2008.
7. Inagaki M, Hayakawa Y, Nogami K: Wavelength dispersive X-ray absorption fine structure imaging by parametric X-ray radiation. *Japanese journal of applied physics*, 47(10), pp.8081~8086, 2008.
8. 境 武志: 中規模加速器を用いたパラメトリック X 線による位相差イメージング、非破壊検査、57(6), pp.282-285, 2008.
9. Sato I, Shintomi K, moro I, Kuwada T, sakai T, hayakawa K, Tanaka T, hayakawa Y, Nakao K, Takahashi Y, Nogami K, Ishikawa K, Takahashi M, Abe K, saito T, Nagase H, Shishikura F, Yoshikawa T, Kurihara K, mori R, yamamoto H, Suzuki K, Nakanishi T, Sakae T, Mori A, Fukuda S, Ohsawa S, Furukawa K, Michizono S, Suwada T, Kamitani T, Yokoyama K, Noguchi S, Kako E, Wakatsuki S. Yamamoto S, Tsuchiya K, Takenaka H, Asano K, Sato K, Nakayama K, Kuribayashi M, Miyazaki K, Sakurai K, Yamamoto N, Noda A, koizumi A: *Study for the Performance of Cancer Medical Treatments using of a Coherent Monochromatic X-ray*, コヒーレント単色X線によるガン治療医療を考える, Proceedings of the 5th Annual Meeting of Particle Accelerator Society of Japan and the 33rd Linear Accelerator Meeting in Japan (August 6-8, Higashihiroshima Japan) 64-68, 2008.
10. Hayakawa Y, Sato I, Hayakawa K, Tanaka T, Mori A, Kuwada T, Sakai T, Nogami K, Nakao K, Sakae T: "Status of the Parametric X-Ray Generator at LEBRA, Nihon University", 2007

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：松戸歯学部

氏名：寒河江登志朗

研究結果 (つづき)

11. Hayakawa Y, Hayakawa K, Inagaki M, Kuwada T, Mori A, Nakao K, Nogami K, Sakae T, Sakai T, Sato I, Takahashi Y, Tanaka T: Advanced applications of PXR at LEBRA, Nihon University. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, 663411:1-10, 2007.
12. Inagaki M: Correlation Between the Electron Beam Condition and the Energy Resolution of PXR Dispersion. Proc. 32nd Linear Accel. Meeting in Japan, 586-588, 2007.
13. Sato I, Kuwada T, Sakai T, Inagaki M, Hayakawa K, Tanaka T, Hayakawa Y, Nakao K, Nogami K, Takahashi Y, Okabe H, Sato N, Sakae T, Mori A, Fukuda S, Enomoto A, Ohsawa S, Furukawa K, Michizono S, Wakatsuki S, Yamamoto S, Tsuchiya K: *SPACE COHERENT X-RAY GENERATOR USING ELECTRON LINAC*, Proceedings of the 4th Annual Meeting of Particle Accelerator Society of Japan and the 32nd Linear Accelerator Meeting in Japan, 142-144, 2007.
14. Kuwada T, Hayakawa Y, Nogami K, Sakai T, Tanaka T, Hayakawa K, Sato I: Phase Contrast Imaging of Biological Materials using LEBRA-PXR. Am Inst Physics, Conf. Proc. CP879: 1968-1971, 2007.
15. Suwa T, Sakae T, Nakada H, Sato I: Quantitative Radiographic Study of New Bone Formed Around The Implant Using a Parametric X-ray Method. J Hard Tissue Biol., 16, 139-141, 2007.
16. 長瀬あゆみ、寒河江登志朗、笥 光夫: 恐竜(竜脚類タイタノサウルス類)の珪酸化した卵殻の鉱物組成と構造、化石研究会誌、39, 68-72, 2007.
17. Hayakawa Y: Tunable Monochromatic X-ray Source Based on Parametric X-ray Radiation at LEBRA, Nihon University. Synchrotron Radiation Instrumentation: Ninth International Conference, AIP CP879, 123-126 2006.
18. Sakae T, Hayakawa Y, Mori A, Kuwada T, Sakai T, Nogami K, Tanaka T, Hayakawa K, Sato I: *Application of LEBRA-PXR to the diffraction analysis of minerals*, Journal of Mineralogical and Petrological Sciences, 101, 10-13, 2006.
19. Hayakawa Y, Hayakawa K, Inagaki M, Kuwada T, Mori A, Nakao K, Nogami K, Sakae T, Sakai T, Sato I, Takahashi Y, Tanaka T: *Advanced applications of PXR at LEBRA, Nihon University*, Proceedings of SPIE Volume: 6634, International Conference on Charged and Neutral Particles Channeling Phenomena II. 663411, 2007. doi:10.1117/12.741898.
20. Mori A, Hayakawa Y, Kidokoro A, Sato I, Tanaka T, Hayakawa K, Kobayashi K, Ohshima H: Measurement of the energy distribution of parametric X-ray radiation from a double-crystal system. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 252: 118-123, 2006.
21. Mori A, Hayakawa Y, Sato I, Tanaka T, Hayakawa K, Kuwada T, Kobayashi K, Ohshima H: Dispersive XAFS Image Radiograph by Parametric X-ray Radiation. Synchrotron Radiation Instrumentation: Ninth International Conference, AIP, CP879, 1841-1844, 2006.
22. Nakada H, Sakae T, Suwa T, LeGeros RZ, Gunji A, Kato T, Kobayashi K: Observation of Newly Formed Bone Around Dental Implant Using Parametric X-ray. Key Engineering Materials, 309-311: 31-34, 2006.
23. Hayakawa Y, Sato I, Hayakawa K, Tanaka T, Mori A, Kuwada T, Sakai T, Nogami K, Nakao K, Sakae T: *Status of the parametric X-ray generator at LEBRA, Nihon University*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 252: 102-110, 2006.
24. Hayakawa Y, Hayakawa K, Inagaki M, Kuwada T, Mori A, Nogami K, Nakao K, Sakae T, Sakai T, Sato I, Takahashi Y, Tanaka T: *Phase-contrast Imaging Using the LEBRA-PXR System at Nihon University*. Proceedings of the 3rd Annual Meeting of Particle Accelerator Society of Japan and the 31st Linear Accelerator Meeting in Japan, 172-174, 2006.

注：必要に応じて、このページをご使用ください。

部科校名：松戸歯学部

氏名：寒河江登志朗

研究結果（つづき）

25. Sato I, Hayakawa K, Tanaka T, Hayakawa Y, Kuwada T, Sakai T, Nogami K, Takahashi Y, Suzuki K, Tanaka Y, Sakae T, Mori A, Nakao K, Oku Y, Inagaki M: *The Future View of Parametric X-ray*, パラメトリックX線の今後の展望, Proceedings of the 2nd Annual Meeting of Particle Accelerator Society of Japan and the 30th Linear Accelerator Meeting in Japan, 114-116, 2005.
26. Nakada H, Sakae T, Suwa T, LeGeros RZ, Gunji A, Kato T, Kozawa Y, Kobayashi K: Observation of Newly Formed Bone Around Implants Using Parametric X-ray. *Journal of Hard Tissue Biology* 14(1): 1-4, 2005.
27. 中田浩史, 寒河江登志朗, 諏訪武利, 町田健, Racquel Z. LeGeros, 郡司敦子, 加藤仁夫, 小林喜平: パラメトリックX線と歯科用X線を比較したインプラント周囲の新生骨の観察, 日大口腔科学 31: 110-115, 2005.
28. Hayakawa Y, Sato I, Hayakawa K, Tanaka T: Simulations to the project of a PXR based X-ray source composed of an electron linac and a double-crystal system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 227: 32-40, 2005.
29. Sato I: The science eye and scalpel in 21st century. Proc. 1st Ann Meeting Particle Accelerator Soc Japan and 29th Linear Accelerator Meeting in Japan, 137-141, 2004.
30. Hayakawa K, Hayakawa Y, Ishiwata K, Kanno K, Nakao K, Sakai T, Sato I, Tanaka T, Yokoyama K: *The LEBRA 125MeV Electron Linac for FEL And PXR Generation*, Proceedings of LINAC 2004, 90-92, 2004.
31. Hayakawa Y, Sato I, Hayakawa K, Tanaka T, Yokoyama K, Kuwada T, Mori A, Nogami K, Sakai T, Kanno K, Ishiwata K, Nakao K: *Present Status of the Parametric X-ray Generator at LEBRA*, 日大パラメトリックX線源の現状, Proceedings of the 1st Annual Meeting of Particle Accelerator Society of Japan and the 29th Linear Accelerator Meeting in Japan, 60-62, 2004.
32. Tanaka T, Sato I, hayakawa K, Hayakawa Y, Yokoyama K, Nogami K, Mori A, Kanno K, Sakai T, Ishiwata K, Nakano K, Fukuda S, Enomoto A, Ohsawa S, Suwada T, Furukawa K, Mochizono S.: Operational status of 125-MeV LINAC at Nihon University. Proc. 1st Ann Meeting Particle Accelerator Soc Japan and 29th Linear Accelerator Meeting in Japan, 22-24, 2004.
33. Hayakawa Y, Sato I, Sato K, Hayakawa K, Tanaka T, Matsubara Y, Nakazawa H, Yokoyama K, Kanno K, Sakai T, Ishiwata K, Inokawa H, Nakamura Y, Nakao K, Hashimoto E, Fujioka K Murakami T: 日大パラメトリックX線発生装置の概要, Proceedings of the 26th Linear Accelerator Meeting in Japan, 110-112, 2001.
34. 佐藤 勇, 川上 一郎, 佐藤 和男, 松原 洋一, 早川 建, 田中 俊成, 早川 恭史, 中澤 裕之, 横山 和枝, 菅野 浩一, 境 武志, 石渡 謙一郎, 猪川 弘康, 中村吉宏, 柳下 明, 山本 樹, 東 善郎, 加藤政博, 土屋 公央, 穴見 昌三, 福田 茂樹, 小林 仁, 榎本 収志, 大澤 哲, 設楽 哲夫, 山口 誠哉, 諏訪田 剛, 紙谷 琢哉, 道園真一郎, 山田家 和勝: 日本大学電子線利用研究施設の現状, 第25回リニアック技術研究会プロシーディングズ, 24-28, 2000.
35. Hayakawa, Y: Parametric X-ray radiation and possibility of monochromatic X-ray source using a linac. KURRI-KR-43, *Advanced Research of Quantum Beam Science (III)*, 43-49, 2000.
36. Hayakawa Y, Seto M, Maeda Y, Shirai T, Noda A: Analysis of the Angular Distribution and the Intensity of Parametric X-Ray Radiation in a Bragg Case. *Journal of the Physical Society of Japan* 67(3), 1044-1049, 1998.

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21年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 3 月 12 日

日本大学 総長 殿

氏 名 小方 頼昌



所属・資格 松戸歯学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	歯周組織再生における転写因子と骨シアロタンパク質の役割	
3 研究目的	石灰化、骨芽細胞および歯周組織再生のマーカーとして石灰化結合組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有する骨シアロタンパク質 (BSP) を使用し、BSP の発現と転写因子の関係に注目して歯周組織再生を制御する転写因子と BSP の発現調節機構との関係を明らかにすることを目的とする。	
4 研究概要	BSP の発現を促進する成長因子、ホルモンおよびサイトカインの検索を行い、歯周組織再生への臨床応用の足がかりとするために、骨髄由来未分化間葉系幹細胞に転写因子を強制発現または骨芽細胞内の転写因子をノックダウンし、骨芽細胞の分化への転写因子の関与を検討する。さらに将来、顎骨より採取した骨髄細胞中の未分化間葉細胞による歯周組織再生を目指す。転写因子と歯周組織再生に関してターゲットを当てた研究はほとんど無いことから、独創的な研究内容であると考えられる。	
5 研究組織 (共同研究・総合研究のみ該当します)	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 小方 頼昌 (研究総括・分子生物学的解析) ・研究分担者 (役割分担) <ul style="list-style-type: none"> 落合 邦康 (細胞内情報伝達系の解析) 大島 光宏 (タンパク質発現調節の解析) 加野浩一郎 (細胞分化機構の解析) 大場 茂夫 (再生医学への応用解析) 木場 秀夫 (病理組織学的解析) 増永 浩 (細胞生物学的解析) 中尾 寿美 (転写調節機構の解析) 中山 洋平 (転写因子の結合能の解析) 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：松戸歯学部

氏名：小方 頼昌

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1. Kaempferol 刺激後の BSP, Runx2 および Osterix mRNA 量の変化

UMR106 骨芽細胞様細胞をフラボノイドの一種である Kaempferol (0.05, 0.5, 5 および 50 μ M) で 12 時間刺激すると、BSP mRNA 量は 5 μ M の Kaempferol 刺激で最大に達した。5 μ M の Kaempferol で UMR106 細胞を経時的 (3, 6, 12, 24 時間) に刺激すると、BSP mRNA の発現は 12 時間後に増加した。Real-time PCR にて Runx2 および Osterix mRNA 発現量の変化を検索した結果、Runx2 と Osterix mRNA の発現は刺激 6 および 12 時間後に上昇した。

2. BSP 転写活性に対する Kaempferol の効果

ラット BSP 遺伝子プロモーターの長さを調節して挿入したルシフェラーゼプラスミド (pLUC1 ~ pLUC6) を UMR106 細胞に導入し、5 μ M の Kaempferol で 12 時間刺激すると、PLUC3 (-116~+60 塩基対) およびそれよりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトで、Kaempferol 刺激により転写活性が増加した。

3. Kaempferol 応答配列の同定

BSP プロモーターの -116~-43 塩基対上流の間には、逆方向の CCAAT 配列 (-50~-46 塩基対上流)、cAMP 応答配列 (CRE; -75~-68 塩基対上流)、Runx2 結合配列 (-84~-79 塩基対上流)、FGF2 応答配列 (FRE; -92~-85 塩基対上流) および下垂体特異的転写因子応答配列 (Pit-1; -111~-105 塩基対上流) が存在する。Kaempferol に応答すると考えられる -280 塩基対上流までのプロモーター配列をさらに短く調節して UMR106 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、-60 塩基対上流よりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトで、Kaempferol による転写活性の上昇が認められた。さらに、逆方向の CCAAT、CRE または FRE 配列の 1 か所に 2 塩基対の変異を挿入したシングルミュレーションプラスミド、2 か所に変異を挿入したダブルミュレーションプラスミドおよび 3 か所に変異を挿入したトリプルミュレーションプラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、CCAAT、CRE および FRE の 3 つの配列が Kaempferol に応答する配列であると考えられた。

4. Kaempferol 刺激後の核内タンパク質とプロモーター配列の結合の変化

ルシフェラーゼアッセイの結果から、ラット BSP プロモーター中の Kaempferol に応答すると考えられる CCAAT、CRE および FRE 配列の合成オリゴヌクレオチドを作製し、Kaempferol (5 μ M) 刺激した UMR106 細胞から核内タンパク質を抽出して、オリゴヌクレオチドとの結合をゲルシフトアッセイにて検索した。その結果、逆方向の CCAAT 配列に結合する核内タンパク質の結合量は、Kaempferol 刺激により変化しなかったが、CRE および FRE 配列に対する結合は、Kaempferol 刺激後 3 時間に増加した。抗体を使用したゲルシフトアッセイの結果、CCAAT 配列には NFYA が、CRE 配列にはリン酸化 CREB、c-Fos、c-Jun、JunD および Fra2 が、FRE 配列には Runx2、Dlx5 および Msx2 が結合することが明らかになった。

5. 組織学的検索の結果

投与 6 日目の Kaempferol およびコントロール部位の頭蓋冠を比較すると、コントロール部位では、未石灰化のおステオイドが観察されるのに対し、Kaempferol 投与部位では、石灰化した新生骨が認められ、免疫染色の結果、Kaempferol 投与部位で、BSP、Runx2 および Osterix のタンパク発現が増加していた。投与 12、15 および 19 日後においても、Kaempferol 投与部位で、石灰化の促進が観察された。

6. 考察

Kaempferol はフラボノールの一種であるが、骨代謝への影響はほとんど知られていない。Kaempferol や quercetin などのフラボノールは、エストロゲンレセプターを介して破骨細胞の分化、活性を阻害し、骨量の減少を抑制することが報告されている。また、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性を上昇させ、細胞内 ERK (Extracellular signal-regulated kinase) 活性を上昇させる。そこで、石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現する BSP に対する Kaempferol の効果を解析することを目的に本研究を行なった。Kaempferol (5 μ M) は、骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞における BSP mRNA 量の発現を 12 時間後に増加させ、さらに、骨芽細胞関連転写因子である Runx2 および Osterix mRNA の発現を増加させた。

部科校名：松戸歯学部

氏名：小方 頼昌

研究結果 (つづき)

Kaempferol (5 μ M, 12 h) 刺激により、ラット BSP プロモーター配列中の -116~ +60 塩基対を含む pLUC3 と、それよりも長いプロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクトの転写活性が上昇した。ラット BSP 遺伝子プロモーターの -280 ~ -43 塩基対上流までの配列を短く調節したコンストラクト (-43BSPLUC、-60BSPLUC、-84BSPLUC、-108BSPLUC、-116BSPLUC、-280BSPLUC) を kaempferol で刺激した結果、-60BSPLUC よりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトで BSP の転写活性が上昇し、CRE 配列を含む-84BSPLUC の転写活性が著しく増加した。ラット BSP プロモーターの-116~+43 塩基対上流の間には、逆方向の CCAAT 配列、cAMP 応答配列 (CRE、FGF2 応答配列 (FRE) および下垂体特異的転写因子応答配列 (Pit-1) が存在する。kaempferol 応答配列を検索する目的で、逆方向の CCAAT、CRE および FRE 配列に 2 塩基対ずつ変異を挿入してルシフェラーゼアッセイを行った結果、これらの 3 つの転写因子結合配列が kaempferol に応答する配列であると考えられた。逆方向の CCAAT 配列は、ラット、マウス、ヒトの BSP プロモーターで保存されており、オステオポンチン (OPN) プロモーターと類似した位置に存在する。BSP と OPN 遺伝子の転写は、転写因子である NF-Y が結合した逆方向の CCAAT 配列を介し、v-Src によって誘導される。また、サイクリン A, B1, B2, cdk1, cdc25C などのいくつかの細胞周期を司る遺伝子では、そのプロモーター中に CCAAT 配列を含むことから、NF-Y は細胞周期の調節因子として働いていることが報告されている。ゲルシフトアッセイの結果、CCAAT 配列と核内タンパク質との結合は kaempferol 刺激後変化が認められなかったことから、kaempferol 刺激による NF-Y の修飾は、BSP の転写に影響を与えるが、CCAAT 配列への結合能力には影響を与えないと考えられた。CRE および FRE 配列と核内タンパク質との結合は、kaempferol 刺激により増加した。CRE 結合タンパク質は、CRE 結合タンパク質 1 (CREB1) およびリン酸化 CREB1 であるが、抗体を用いた検索の結果、API ファミリー転写因子 (c-Fos, c-Jun, JunD, Fra2) も関与すると考えられた。FRE 配列と核内タンパク質との結合は、kaempferol 刺激 3 および 6 時間後に増加し、抗体による検索の結果、FRE 配列には、Runx2、Msx2 および Dlx5 が結合していると考えられた。FRE 配列と Runx2 配列は隣接して存在し、Real-time PCR の結果から、kaempferol 刺激 6 時間後に Runx2mRNA 量が最大になることから、骨芽細胞様細胞を kaempferol で刺激すると、FRE 配列には Msx2 と Dlx5 が、FRE 配列に隣接した Runx2 結合配列には Runx2 が結合して、BSP の転写を促進する可能性が示唆された。Osterix は Runx2 の下流で作用し、骨形成に必須の転写因子である。Osterix ノックアウトマウスでは軟骨に異常は認められないが、骨の完全な欠損を認める。Wang らは、ガン抑制遺伝子である p53 が Osterix の転写を抑制し、またそのノックアウトマウスは、骨量の増加、骨形成の促進、さらに Osterix の発現増加により骨芽細胞の分化が促進されることを報告した。Real-time PCR の結果から、Osterix 刺激 12 時間後に Osterix mRNA の発現が最大になるが、ラット BSP 遺伝子プロモーター中の Osterix 結合配列が未同定であることから、Osterix の BSP の転写に対する影響に関しては、今後の検討課題である。

kaempferol による BSP 遺伝子の転写の促進効果は、A キナーゼ阻害剤、チロシンリン酸化阻害剤、ERK 阻害剤および PI3 キナーゼ阻害剤により抑制を受けたことから、kaempferol の効果は、直接的なものと同接的なものの両者から成ると考えられた。

歯周病は、炎症性破壊により歯槽骨の吸収を引き起こし、最終的に歯を喪失する疾患である。歯周治療の目的は、歯周組織周囲の炎症を除去し、破壊された歯周組織を再生させるところにある。本研究の結果、kaempferol は BSP の転写活性を上昇させることから、kaempferol は骨形成、骨再生に関与すると考えられた。歯周組織の再生療法としては GTR 法、エムドゲインを用いた再生療法が行なわれており、現在、FGF2 を用いた歯周組織の再生療法の臨床応用が検討されている。今後、フラボノイド (kaempferol) による骨代謝のメカニズムをさらに解明することにより、将来の歯周病治療への応用の可能性が考えられた。

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 21 年度 学術研究助成金実績報告書

平成 22 年 4 月 20 日

日本大学 総長 殿

氏 名 加野 浩一郎



所属・資格 生物資源科学部・准教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	脱分化による体細胞の可塑性と多能性獲得機構に関する研究	
3 研究目的	本研究では、終末分化した細胞が脱分化することによって再プログラム化し、多分化能を獲得するメカニズムを解明する目的で、種々の体細胞が脱分化および多能性獲得する過程について生化学的、発生生物学および分子生物学的手法を用いて知見を集積し、理解を深めることによって、体細胞の多能性獲得機構を解明する。	
4 研究概要	本研究では、終末分化した細胞を脱分化誘導することによって再プログラム化を促し、多分化能を獲得するメカニズムを解明することを目的としている。卵母細胞やウィルスベクターによる山中ファクターなどを用いない独自の培養系を利用することによって、成熟脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞が脱分化および多能性獲得する過程をエピジェネテックスの側面から解析することによってデータを集積し、バイオインフォマティクス（生物情報学）の手法を用いて脱分化および多能性獲得機構に関わる重要な因子の同定を行なう。さらに、それら解析結果を基にして、脱分化および多能性獲得のパスウェイの描出を試みる。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 加野 浩一郎（成熟脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の網羅的解析） ・研究分担者（役割分担） 森友 忠昭（魚類および哺乳類における造血幹細胞の特性） 関 泰一郎（肝臓における幹細胞の特性） 松本 太郎（成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 DFAT の平滑筋および心筋細胞への分化転換） 小方 頼昌（歯髄組織における多能性細胞の遺伝子発現パターンと多能性維持の機構解明） 中尾 寿美（歯髄組織由来の多能性細胞のニッチ機構の解明） 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名：生物資源科学部

氏名：加野 浩一郎

6 研究結果（総合研究の研究代表者は、4,000字以上記入してください。）

1. 終末分化した成熟脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の網羅的解析

我々は、生体内において既に特異的な機能をもつ脂肪細胞および顆粒膜細胞を体外培養し、脱分化させることによって、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、神経系細胞など種々の細胞へと分化する細胞を作り出すことに成功している。しかし、これらの細胞がどのような機構で脱分化するかについては明らかにされていない。本研究では、成熟脂肪細胞および顆粒膜細胞の脱分化機構の一端を明らかにする目的で、組織から採取直後および脱分化後の2点をマイクロアレイ解析することによって、得られた遺伝子発現情報から脱分化に関与する遺伝子群を抽出し、脱分化過程における遺伝子発現状況を網羅的に調べた。

本研究で用いたブタマイクロアレイにデザインされた24,123個の塩基配列の中で、正確な遺伝子機能情報が付けられているものは20%程度であり、残りの約80%は遺伝子機能が不明なものや不十分な注釈付けとなっているのが現状である。このように、ヒトやマウスのマイクロアレイと比較するとブタマイクロアレイで利用できる遺伝子機能情報は非常に不足しているため、現状ではマイクロアレイデータの生物学的解釈を行うことは困難である。そこで、ブタの遺伝子の塩基配列情報をもとに、ヒトおよびマウスの全遺伝子に対する配列相同性検索を行い、対応付けたヒトおよびマウスの遺伝子機能情報をブタマイクロアレイのプローブに付与することを試みた。ブタマイクロアレイにデザインされた全塩基配列情報であるブタのプローブ配列は、アフィメトリクス社のWebページより取得した。また、ヒトおよびマウスの全cDNA配列とそれに付随した遺伝子機能情報は、真核生物のゲノムデータベースであるEnsemblよりそれぞれ取得した。生物種間で塩基配列よりもアミノ酸配列の方が保存されていることを考慮し、アミノ酸配列レベルの配列相同性を計算した。ブタのプローブ配列24,123個に対して16,975個のヒトの遺伝子機能情報が付与され、これはブタのプローブ配列全体の70.1%を占めた。また、マウスの遺伝子機能情報の場合は、ブタのプローブ配列全体の58%にあたる14,001個が付与された。このようにして、対応づけられた遺伝子機能情報をデータ解析に適用することで、本来では困難であったブタマイクロアレイデータの生物学的解釈が可能となった。

ブタの遺伝子機能予測によって、ヒトおよびマウスの遺伝子機能情報をブタマイクロアレイのデータ解析に適用することが可能となった。そこで、成熟脂肪細胞および卵胞顆粒膜細胞の脱分化前、脱分化後におけるそれぞれのサンプルについてマイクロアレイ解析を行ない、脱分化に関与する遺伝子群を抽出し、脱分化の機能的な特徴および全体像を見いだすことを試みた。ブタ皮下脂肪組織から採取した直後の成熟脂肪細胞と、同細胞を天井培養し得られたDFAT(前駆脂肪細胞株)の脱分化前および脱分化後の2点における総RNAを抽出した。同様に、ブタ卵巣から採取した直後の顆粒膜細胞と、体外培養した卵胞顆粒膜細胞の2点において総RNAを抽出し、それぞれマイクロアレイ実験に使用するサンプルとした。データ解析は、成熟脂肪細胞および卵胞顆粒膜細胞の脱分化前、後における発現比で2倍以上増減している遺伝子群を対象とした。成熟脂肪細胞および顆粒膜細胞の脱分化によって増減した遺伝子群、両細胞の脱分化に共通して増減した遺伝子群を抽出して解析を行なった。それぞれの遺伝子群に関連する生物学的機能の特徴を推測するために、遺伝子ネットワーク/パスウェイ解析データベースであるインジェニティパスウェイアナリシス(IPA)を使用した。成熟脂肪細胞の脱分化過程においては、脂肪酸修飾や脂質の酸化、脂肪蓄積、脂質合成などの脂質代謝全般と関わりのある遺伝子群が有意に減少することが明らかとなった。一方、卵胞顆粒膜細胞の脱分化過程においては、卵巣および卵胞の発育や卵子の成熟、性周期に関与する遺伝子群の発現低下がみられた。これらの結果から、成熟脂肪細胞および卵胞顆粒膜細胞が脱分化することによって、それぞれの細胞の特異的機能に関与する遺伝子群が顕著に発現減少することが示された。次に、両細胞の脱分化後に共通して発現が上昇した遺伝子群に特徴的な生物学的機能を探した結果、細胞骨格の構築、細胞接着、筋形成、骨形成、神経形成および血管新生に関連する機能を持つ遺伝子の割合が高いことが明らかとなった。また、これらの遺伝子群の中から細胞分化に関連するものに注目すると、種々の細胞型への分化を抑制する働きが知られているものが多く見受けられた。一方、両細胞の脱分化後に共通して発現が減少した遺伝子群については、遺伝子発現の活性化や転写に関連する機能を持つ遺伝子が高い割合で含まれていた。

2. ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化過程におけるクロマチン構造および遺伝子発現の変化

卵胞顆粒層細胞は、卵巣の卵胞内壁に存在し、エストロゲンやプロゲステロンなどのステロイドホルモンを分泌して、卵母細胞の発育および成熟を調節する支持細胞である。我々は、ブタ卵胞顆粒層細胞を単離し、体外培養することによって脱分化させると、骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞へと分化転換することを明らかにしてきた。しかし、卵胞顆粒層細胞の脱分化過程および多能性獲得の機構については明らかでない。

部科校名：生物資源科学部

氏名：加野 浩一郎

研究結果（つづき）

近年、細胞の機能はクロマチン構造の変化によって制御されることが明らかにされつつある。細胞の分化過程においてクロマチン構造は、DNA メチル化やヒストン修飾、その他クロマチン構成因子によるエピジェネティック制御によって変化し、それによって特異的遺伝子群の発現が起こる。その結果、分化細胞はそれぞれ特異的な機能を発現すると考えられている。これらのことから、卵胞から単離した卵胞顆粒層細胞が脱分化し、多能性を獲得するのは、体外培養によって卵胞顆粒層細胞のクロマチン構造が変化することに起因すると推察される。本研究では、ブタ卵胞顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の一端を明らかにする目的で、体外培養したブタ卵胞顆粒層細胞のクロマチン構造の変化とそれに伴う遺伝子発現の変化を調べた。

1) 体外培養した卵胞顆粒層細胞のヒストンアセチル化状況をウエスタンブロット法で解析した。その結果、採取直後から培養 7 日後においてアセチル化ヒストン H3 (Lys9,14) に有意な変化はみられなかった。一方、アセチル化ヒストン H3 (Lys14) は培養直後から急速に減少した。これらの結果は、卵胞顆粒層細胞を培養するとアセチル化ヒストン H3 (Lys14) は減少するが、アセチル化ヒストン H3 (Lys9) は変化しないことを示している。

2) ヒストン修飾はクロマチン構造の変化を促し、遺伝子発現を制御することが明らかにされている。そこで、脱分化過程における卵胞顆粒層細胞の遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析した。その結果、培養 7 日後の遺伝子発現が採取後と比較して 4 倍以上増加および減少した遺伝子の数は、それぞれ 865 および 565 個であり、培養時間の経過に伴って発現が増加する遺伝子が多いことが示された。

3) 初期分化マーカー遺伝子の発現状況をリアルタイム PCR 法で調べた結果、RUNX2 および nestin は培養 1～3 日後にかけて有意に増加した。その後、それらの発現は減少したが、培養 7 日後まで維持された。SOX9 の発現は採取直後には認められなかったが、培養 1～3 日後にかけて有意に増加した。その後、発現は低下したが、RUNX2 および nestin と同様に維持された。一方、卵胞顆粒層細胞特異的な遺伝子である CYP19、LHCG-R および PPAR γ の発現は培養 1 日後から急速に減少した。

4) SOX9 および CYP19 の上流領域におけるアセチル化ヒストン H4 および H3(Lys14)、さらに RNA ポリメラーゼ II の結合状況を ChIP 法で調べた。SOX9 の上流領域におけるアセチル化ヒストン H4 は培養 1 日後に著しく増加した。しかし、培養 7 日後では減少したが、採取直後に比べて高アセチル化状態であった。一方、CYP19 上流領域のアセチル化ヒストン H4 は、採取直後から培養日数の経過に伴って減少した。RNA ポリメラーゼ II の結合状況はアセチル化ヒストン H4 と同様の傾向を示した。アセチル化ヒストン H3(Lys14)においては培養 7 日後まで殆ど変化しなかった。これらの結果から、顆粒膜細胞を体外培養すると多種多様な遺伝子の発現が変化すること、またその遺伝子発現の変化は体外培養時におけるクロマチン構造の変化によって引き起こされることが明らかとなった。

以上の結果から、卵胞顆粒層細胞を体外培養すると、ヒストン修飾状況およびクロマチン構造が変化し、その結果として多種多様な遺伝子の発現変化が起こることが明らかとなった。

3. 魚類および哺乳類の造血幹細胞における遺伝子発現の比較解析

ゼブラフィッシュの造血幹細胞とマウスおよびヒト造血幹細胞の遺伝子発現状況を比較解析し、その特性を明らかにする目的で行なった。ゼブラフィッシュの造血幹細胞は腎臓から採取し、定法に従ってマイクロアレイ解析を行なった。マウスおよびヒト造血幹細胞の遺伝子プロファイリングについては、公共のデータベースである Gene Expression Omnibus (GEO) で公開されているデータを利用し、ゼブラフィッシュのそれと比較解析した。その結果、種にかかわらず 40 個の遺伝子が共通して発現上昇することが明らかとなった。それら共通して上昇した遺伝子を IPA で生物学的機能について解析した結果、いずれも造血幹細胞の機能にかかわる遺伝子群であることが明らかとなった。以上の結果から、種にかかわらず造血幹細胞の機能にかかわる遺伝子群は進化の過程においてよく保存されていることが示された。

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21年度 学術研究助成金実績報告書

平成22年4月16日

日本大学 総長 殿

氏 名 北 中 進



所属・資格 薬学部・教授

下記のとおり報告いたします。

1 種目	一般研究(個人研究) / 一般研究(共同研究) / <input checked="" type="radio"/> 総合研究	注：該当する種目を○で囲んでください。
2 研究課題	酸化還元活性天然薬物による保存的再生医療の確立	
3 研究目的	酸化ストレスは血管内皮前駆細胞（EPC）の自己修復細胞の機能を低下させることから、酸化還元機能が期待される生薬・漢方薬について EPC の機能低下を保護する保存的再生医療の確立を目指し、天然薬物について探索する。	
4 研究概要	食生活習慣による酸化ストレスは、老化、心血管傷害を引き起こすことが知られているが、その機序として酸化ストレスは、組織幹細胞や血管内皮前駆細胞(EPC)の自己修復細胞の機能を低下させることが原因の一つである。そこで酸化還元機能が期待される生薬・漢方薬などについて、酸化ストレスから血管内皮前駆細胞（EPC）を保護し自己修復細胞の機能を高め心血管臓器保護に働く天然薬物を検討し、新たな心血管病に起因する疾病の保存的再生医療の確立を目指した。	
5 研究組織（共同研究・総合研究のみ該当します）	<ul style="list-style-type: none"> ・研究代表者 北中 進 活性物質の単離・構造決定ならび研究総括 ・研究分担者（役割分担） 松本絃一 腎臓を用いた実験指導 飯島 洋 EPC アッセイと構造活性相関解析 福田 昇 LRC、心筋幹細胞アッセイ 矢久保 修嗣 漢方薬処方 of 幹細胞保護評価 	

※ホームページ等での公開の (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。

部科校名： 薬学部

氏名： 北中 進

6 研究結果 (総合研究の研究代表者は、4,000 字以上記入してください。)

我々は保存的再生医療の確立を目指すため、医療の場で使用されている漢方処方柴胡加竜骨牡蠣湯に注目し高血圧自然発症ラット (SHR) において EPC 保護作用を検討した。

実験方法

試験薬物に使用した柴胡加竜骨牡蠣湯

柴胡加竜骨牡蠣湯は比較的体力があり、心悸亢進、不眠、いらだち等の精神症状がある患者の高血圧症、動脈硬化症、慢性腎臓病、神経衰弱症、神経性心悸亢進、てんかん、ヒステリー、陰萎に使用され、その構成生薬は、サイコ、ハンゲ、ケイヒ、ブクリョウ、オウゴン、タイソウ、ニンジン、ボレイ、リュウコツ、ショウキョウからなる。今回、ツムラより分与された原末をオリエンタル酵母工業株式会社に委託し 0.5 w/w%配合、1.5 w/w%配合の2用量の MF (マウスフラット) を作成した。

ラット

4 週齢の SHR(♂)を 1 週間予備飼育後、3 群に分けた (第一回目実験は一群 8 匹、二回目は 6 匹)。基本飼料投与群 (C 群)、柴胡加竜骨牡蠣湯 0.5 w/w%投与群 (KL 群) 及び柴胡加竜骨牡蠣湯 1.5 w/w%投与群 (KH 群) とし、週 2 回体重、血圧を測定した。

EPC colony アッセイ

柴胡加竜骨牡蠣湯投与から 6 週間後(11 週齢)、麻酔下に下大静脈から採血し、リンパ球分離液 (Histopaque) を用いて単核球画分得た。この単核球画分を PBS で洗浄後、 10^6 cell/mL に調製し、6 穴プレートで 5 mL ずつ EBM 培地で一晚培養し浮遊性の細胞を回収した。この浮遊性細胞(10^6 cell/mL)をビトロネクリンでコートした 24 穴プレートに 1mL ずつ播種し、7 日間培養した。出現した EPC のコロニー数を計数した。

酸化ストレスアッセイ (TBARS アッセイ)

SHR は本態性高血圧のモデルであり、高血圧の形成期を通じて、内在的に酸化ストレスが発生していると考えられている。酸化ストレスの指標として投与 6 週目の単核球画分細胞抽出液に含まれるマロンジアルデヒド (MDA) 様物質をチオバルビツール酸と反応させ生じる色素を定量した。

サイトカインパネルアッセイ

6 週目の血清中のサイトカインの量を ELISA 法で一斉分析した。測定対象のサイトカインは次の 9 種類について検討した。IL1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α

結果

SHR の成長への柴胡加竜骨牡蠣湯の影響

C, KL, KH 群間で体重、エサの摂取量に差は認められなかった。また、血圧の増昇に差は認められなかった (Fig. 1)。

EPC コロニー数への柴胡加竜骨牡蠣湯の影響

表 1.1 に回収時細胞数、単核球画分細胞数、EPC コロニー数を示した。コントロール群においては、EPC コロニーの出現が認められなかったのに対し、KH 群の EPC コロニー数の平均は 21 個であり、最大は 45 個であった。

部科校名： 薬学部

氏名： 北中 進

研究結果 (つづき)

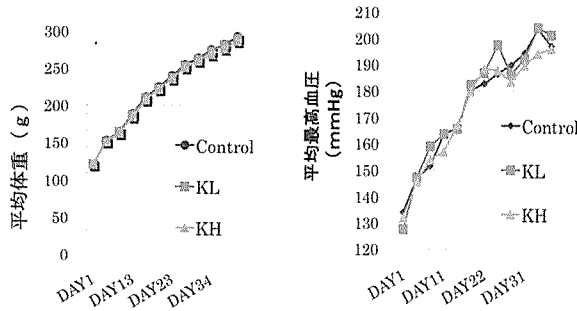


Fig1: SHRの体重変化(左)と血圧変化(右)
柴胡加竜骨牡蛎湯投与群:KL KH

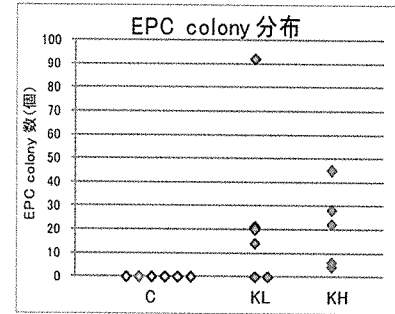


Fig-2: EPC コロニー数
柴胡加竜骨牡蛎湯投与群にのみ EPC コロニーが見られた。

柴胡加竜骨牡蛎湯には EPC 保護・増強作用があることが明らかになった (Fig. 2)。

酸化ストレス (TBARS アッセイ)

TBARS アッセイにおいて MDA の濃度は C>KL>KH の順になった (Fig. 3)。KH 群とコントロール群では MDA 相当濃度に明白な差が認められた。EPC の高い個体では、酸化ストレスは低かった。(Fig. 4)

サイトカインパネルアッセイ

試験した 9 種類のサイトカインのうち、 $INF-\gamma$ がコントロール群と比べ柴胡加竜骨牡蛎湯投与群で低い値を示した。柴胡加竜骨牡蛎湯投与により EPC 数の高い個体では $INF-\gamma$ は低い値を示した (Fig. 5)。

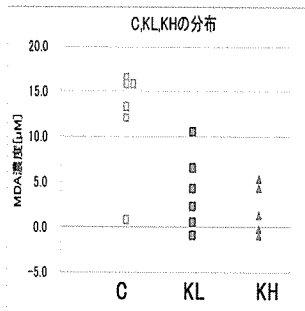


Fig3: 単核球画分の MDA 相当濃度
柴胡加竜骨牡蛎湯投与群は低い

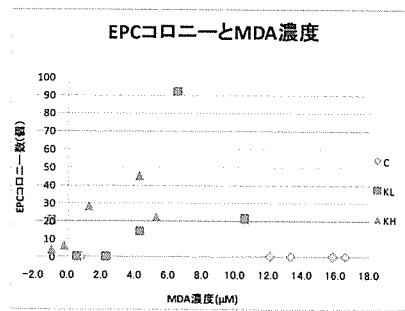


Fig4: MDA 相当濃度と EPC 数
MDA 相当濃度が高いと EPC は減少

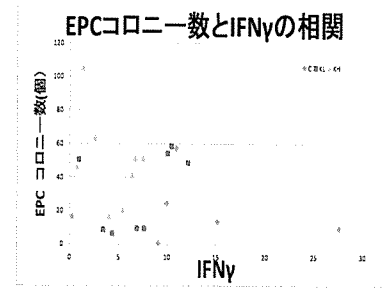


Fig5: $INF-\gamma$ と EPC 数

総括

柴胡加竜骨牡蛎湯を投与した自然発症高血圧ラット(SHR)の EPC の保護効果について検討した結果、柴胡加竜骨牡蛎湯投与群には明らかに EPC 保護作用が見られたが、血圧には影響を及ぼさなかった。そして TBARS アッセイの結果より、脂質の酸化の抑制が示されたことから酸化ストレスを軽減していると考えられる。また血中サイトカインのうち、 $INF-\gamma$ が特異的に抑制されていることから、慢性炎症に係るマクロファージの活性化が抑制されていると考えられる。本研究において、柴胡加竜骨牡蛎湯に EPC の機能改善効果が示唆されたことから、今後心血管病に起因する疾病についての臨床応用が期待される。

注：必要に応じて、このページをご使用ください。