

福井大学 助成研究成果集 2015

—明日への挑戦—

創造力、実践力。

国立大学法人



福井大学

UNIVERSITY OF FUKUI

目 次

No. 部 局 講座・専攻・領域 職 研究代表者 研究 課 題 目次

■福井大学生命科学複合研究教育センター平成26年度研究費助成事業

【学内共同研究等】

1	工学研究科	生物応用化学	准教授	沖 昌也	異分野融合による多方面からのエビジェティクスの解明	4～ 5
2	医学部	人体解剖学・神経科学	助教	伊藤 哲史	聴覚神経回路機能構築のイメージングによる解析	6～ 7
3	医学部 工学研究科	統合生理学 繊維先端工学	教授 准教授	松岡 達 藤田 聡	ミトコンドリアによるリンパ球細胞走化制御に関するナノ ファイバー技術を用いた研究	8～ 9
4	子どものこころの 発達研究センター	こころの形成発達研 究部門	特命助教	岩田 圭子	統合失調症とミエリン化異常～RNA結合タンパク質の役割 解明～	10～ 11
5	医学部	ゲノム科学・微生物学	特命助教	山内 翔太	抗がん剤イマチニブはC型肝炎の治療薬となりうるか。	12～ 13
6	子どものこころの 発達研究センター	こころの形成発達研 究部門	特命助教	栃谷 史郎	妊娠期母体腸内細菌叢の胎児、乳児の中枢神経系の発生にお ける役割の解析	14～ 15
7	医学部	薬理学	教授	青木 耕史	大腸癌細胞の幹細胞性の維持におけるホモボックス蛋白質 CDX1/CDX2の役割の解明	16～ 17
8	医学部	内科学(1)	准教授	吉田 明	白血病幹細胞に対する分子標的治療の開発	18～ 19

■福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成26年度公募採択型研究費

【学内共同研究等】

1	医学部	分子生体情報学	准教授	水谷 哲也	子宮肉腫に対する新たなバイオマーカーの開発と転移メカニ ズムの解明	22～ 23
2	医学部	耳鼻咽喉科・頭頸部 外科学	准教授	齋藤 武久	生体用共焦点レーザー顕微鏡を利用した他覚的味覚検査の試 みーその2ー	24～ 25
3	医学部附属病院	産科婦人科学	助教	高橋 仁	凝固・線溶マーカーを用いた妊娠高血圧症候群患者に対する、 常位胎盤早期剥離の早期診断法の開発	26～ 27
4	医学部	腎臓病態内科学	准教授	糟野 健司	血清アルブミン・血清蛋白の側から見た蛋白尿の研究	28～ 29
5	医学部附属病院	小児科学	助教	村井 宏生	小児気管支喘息患者に対する病態解析バイオマーカーの開発	30～ 31
6	医学部	外科学(1)	准教授	五井 孝憲	Prokineticin1 (PROK1)によるリンパ管新生機能の検討	32～ 33
7	医学部附属病院 医学部	薬理学 内科学(2)	助教 准教授	中谷 真子 濱野 忠則	高ホモシステイン血症によるパーキンソン病αシヌクレイン 重合促進機構の解明	34～ 35
8	工学研究科	生物応用化学	教授	櫻井 明彦	新規生理活性物質の生産に向けたコルジセピンの高効率生産 に関する研究	36～ 37
9	工学研究科	繊維先端工学	教授	末 信一郎	オンサイト型有害微生物検出装置	38～ 39

■福井大学産学官連携本部平成26年度実用化研究助成(FUNTECフォーラム 福井大学研究シーズ紹介ポスター発表)

【知財創出研究】

1	工学研究科	材料開発工学	教授	橋本 保	ポリエチレンスルホン酸ナトリウムの合成と重合機構の解明	42
2	工学研究科	情報・メディア工学	准教授	森 幹男	インプラント型補聴器用超磁歪骨伝導振動子の試作	43
3	工学研究科	電気・電子工学	准教授	川戸 栄	高密度励起による固体レーザーの高効率化	44

【知財育成研究】

1	高エネルギー医学研究 センター	がん病態制御・治療 部門	准教授	松本 英樹	放射線障害に対する防護/治療作用を有する新規ニトロ製剤 の探索	45
2	工学研究科	機械工学	准教授	新谷 真功	搬送傷病者の身体的影響を軽減する3次元救急車用搬送ベッ トの開発	46

【復興支援研究】

1	工学研究科	建築建設工学	准教授	磯 雅人	高品質型PVA繊維補強吹付けモルタル増設耐震壁の開発	47
---	-------	--------	-----	------	----------------------------	----

※所属・職については平成26年度末時点の表記としています

福井大学
生命科学複合研究教育センター
平成26年度研究費助成事業

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

異分野融合による多方面からのエピジェネティクスの解明

研究代表者： 沖 昌也（工学研究科・准教授）
共同研究者： 稲谷 大（医学部・教授）、高村 佳弘（医学部・准教授）、
水谷 哲也（医学部・准教授）、吉田 俊之（工学研究科・教授）

概 要
<p>同じ DNA 配列から多様な遺伝子発現制御を生み出すエピジェネティックな制御機構は、ヒトなどの分化・発生や疾患のほか、多能性幹細胞“iPS 細胞形成”においても重要な役割を担う。本研究では、「酵母を用いた分子レベルでの解析（沖）」、「酵母で得られた知見をもとに、多細胞生物での分化誘導システムの実験系を用いた解析（水谷）」、「エピジェネティックな制御が予測される糖尿病合併症による白内障の発症メカニズム解明（稲谷・高村）」、「新たなスクリーニングを行う上で必須となるデータ解析をオートメーション化するシステムの開発（吉田）」など、異分野の研究者が融合し、様々な視点からの研究結果をもとに、エピジェネティクスの機能解明を目指した。</p>
<p>関連キーワード エピジェネティクス、白内障、糖尿病、1細胞追跡、発生・分化</p>

研究の背景および目的

生物にとって重要な機能は種を越えて保存されている。本プロジェクトでは、酵母を用いる研究グループ（沖）、ヒト細胞を用いた研究を行っている研究グループ（水谷）、患者さんから採取した細胞を用いて臨床の観点から解析を行う研究グループ（稲谷・高村）が共同し、種を越えた共通のエピジェネティクスメカニズム解明を目指す。また、現在は、手作業で膨大な時間を費やして解析しているが、独自の解析ソフトを開発（吉田）することにより、研究の飛躍的な発展が期待される。上記のように、異なる研究分野の研究者が協力し合って、独自の視点から「エピジェネティクス」の解析システムを開発し、メカニズム解明を目指すことが本プロジェクトの最大の特色である。

独自の解析ソフトを開発することにより、現状では膨大な時間を要するために出来ないエピジェネティクスコントロール遺伝子を同定するためのゲノムワイドなスクリーニングが可能となる。また、酵母や培養細胞で得られた知見をヒトの疾患の解明に役立てるため、推定 700 万人と言われている糖尿病患者の合併症の中でも頻度の高い「白内障」に注目する。将来的には白内障の発症とエピジェネティックな発現制御の関与を明らかにすることにより、その制御を阻害する薬剤等を用い発現状態をコントロールし、患者負担の少ない点眼を中心とした薬物治療を可能とする創薬を目指す。

研究の内容および成果

(1) 1細胞追跡システムを用いた解析（沖）：1細胞追跡システムを用い、環境の変化によりエピジェネティックな発現状態がどのように変化するか追跡した。今年度は、DNA 損傷を誘導した際のエピジェネティックな発現状態の変化及び、栄養飢餓状態の際のエピジェネティックな発現状態の

変化に注目した。最初に DNA 損傷誘発時、及び栄養飢餓状態でエピジェネティックに発現状態が制御される遺伝子を同定した。同定した遺伝子のプロモーターとターミナーを残し、タンパク質コード領域を、蛍光タンパク質をコードする遺伝子に置き換えた株を作製した。作製した酵母株を用

い、1細胞追跡システムにより、様々な環境状態でのエピジェネティックな発現状態変化を解析し、一定の規則性が存在することを見出した。

(2) ヒト及びマウス細胞を用いた解析(水谷・沖) : 酵母で同定したエピジェネティクス制御遺伝子を SiRNA により処理し、発現量の減少による表現型の変化を解析した。現在のところ顕著な表現型の変化は見られていない。

(3) 糖尿病と白内障合併症におけるエピジェネティックな変化に関する解析(稲谷・高村・沖) : 今年度は解析に使用するサンプルを患者さんから採取した。具体的には、糖尿病の合併症として白内障を起こしている患者さんに絞り、コントロールとしては糖尿病ではないが白内障を起こしている患者さんの細胞、組織を用いる。具体的には、白内障手術の際に摘出する水晶体上皮細胞を含んだ前囊片(直径5.5mmの円)を採取した。1人あたり、約4100細胞数/mm²で、現在のところ3名の患者さんからサンプルを採取させていただいた。患者さんの年齢、性別は以下の通りである。

皮質混濁+ 皮質混濁- それぞれの皮質

1. 69歳、女性 糖尿病なし
2. 79歳、女性 糖尿病なし
3. 72歳、男性 糖尿病あり

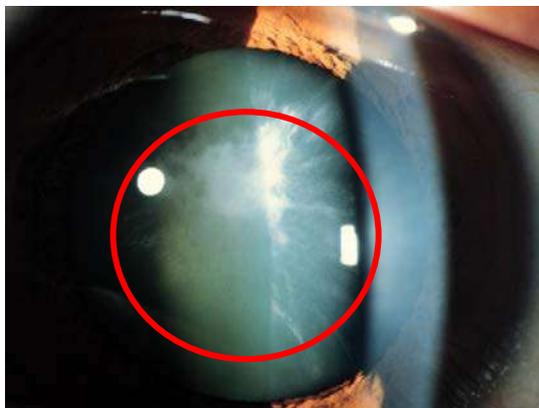


図1：前極白内障(写真のように中央の前囊直下に混濁を呈する症例から同様に前囊サンプルを集める。)

(4) 1細胞追跡システム自動追跡ソフトの開発(吉田・沖) : 今年度は、追跡の精度を更に取り上げ、また、蛍光輝度測定自動化及び系統図作製の自動化の機能を加えた。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. **Mizutani, T.***, Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)
2. Arimura S, **Takamura Y**, Takihara Y, Matsumura T, Tomomatsu T, **Inatani M.** (2015) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 253(2), 307-12.
3. Kamata K, Goswami G, Kashio S, Urano T, Nakagawa R, Uchida H and **Oki M***. (2014) *J. Biochem.*, 155 (3), 159-171.
4. **Takamura Y**, Tomomatsu T, Yokota S, Matsumura T, Takihara Y, **Inatani M.** (2014) *J Cataract Refract Surg.* 40(11), 1850-1856.
5. **Takamura Y**, Tomomatsu T, Matsumura T, Arimura S, Gozawa M, Takihara Y, **Inatani M.** (2014) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55(8), 4741-4746.
6. **Mizutani, T.***, Ju, Y., Imamichi, Y., Osaki, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Matsumura, T., Kanno, M., Kamiki, Y., Kimura, K., Minamino, N., Miyamoto, K. (2014) *Biochem. J.* 460, 458-471
7. Kanno, M., Yazawa, T., Kawabe, S., Imamichi, Y., Usami, Y., Ju, Y., Matsumura, T., **Mizutani, T.**

Fujieda, S., Miyamoto, K. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, 1839, 406-414.

8. Imamichi, Y., **Mizutani, T.***, Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. (2014) *Biochim. Biophys. Acta.* 1839, 33-42.

「特記事項」

(国際学会招待講演)

1. **Oki M.**, 8th International Symposium on Nanomedicine, December 4, 2014.
2. **Mizutani, T.**, Miyamoto, K. ADRENAL 2014 The XVIth Conference on the Adrenal Cortex. June 17-20, 2014.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 参天製薬研究助成金(採択)
代表：高村佳弘、分担：沖昌也
「糖尿病白内障のエピジェネティックな発現制御機構の解明と創薬」
2. ノバルティス科学振興財団
研究奨励金(採択) 代表：沖昌也
「DNA 損傷時にエピジェネティックに発現誘導される *DDI2/3* の発現機構の解明」

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

聴覚神経回路機能構築のイメージングによる解析

研究代表者：伊藤 哲史（医学部・助教）

共同研究者：故 池田 弘（工学研究科・教授）、村瀬 一之（工学研究科・教授）

概 要	
	音情報は多数の神経核によって特徴が抽出される。抽出された情報が収束する下丘で音情報が統合され、機能地図として空間的に符号化されると考えられるが、複雑な音に対する機能地図の存在は不明であった。下丘局所回路での機能構築を調べるため3つの実験を行った。第1に、下丘表層の神経回路をさまざまな機能イメージング技法によって解析した。下丘表層には同心円状の相互結合回路があり、局所回路の活動が遠方への神経活動伝播効率を高めることや、下丘表層には周波数についての機能構築が存在することが判明した。第2に近傍記録・染色法によって下丘の細胞形態と音刺激応答性との関連を見出した。これらのイメージング技術を組み合わせて下丘での情報処理、情報統合の仕組みを可視化することが可能であると考えられる。
関連キーワード	聴覚、電位イメージング、カルシウムイメージング、神経回路

研究の背景および目的

感覚神経回路において類似した刺激に応答する細胞が近くに配置する傾向がある。これを機能地図といい、その同定は神経回路の機能を知る上で本質的に重要である。時間変化を伴う複雑な音は自然環境中に満ちていて、それを検出する能力は生存上重要である。そのような音の特徴は脳内に機能地図のかたちで埋め込まれているのだろうか？

音の時間変化について検出する神経回路が聴覚系に存在することはわかっている。下丘は下位の聴覚神経核で並列処理された聴覚情報が初めて収束する場所であり、FM音などの複雑音に特異的に応答する細胞が出現する。下丘には応答周波数に

対する機能地図が存在することがわかっているが、それ以外の音の特徴（例えば FM音のような複雑音）に関する機能地図の存在についてはよくわかっていない。

下丘内部は複数のシナプスドメインに分かれていることが複数の研究によって示唆されている。各々のドメインは異なる神経核からの入力を受け、異なる神経核は異なる種類の音の特徴をコードすることから、シナプスドメインの配列が周波数以外の機能地図を作ると考えられる。また、下丘は細胞種によって音に対する応答性が異なると考えられるので、下丘の機能地図を細胞種も考慮しつつ検討するのが当研究の目的である。

研究の内容および成果

実験1：機能イメージングによる下丘表層神経回路機能構築の解明

実験1については、池田教授の研究費（科研費若手研究A）を元手に抑制性ニューロンにCHR2が特異的に発現するVGAT-CHR2マウスを導入し、更にこの実験系に習熟した小野宗範博士（コネチカット大学）を招聘する予定であった。しかし、2014年8月の池田教授の急逝に伴い、研究費は凍結、召し上げとなってしまい、マウスの導入や研

究者の招聘は白紙となった。このため、実験計画の見直しを行った。まず、VGAT-CHR2マウスに替え、当研究グループでの蓄積のあるCa²⁺イメージングに有用なThy1-GCaMP3マウスを輸入した。研究費切り替えに伴い導入時期が真冬にずれ込んでしまい、このためマウスの繁殖が抑制されてしまったが、現時点で20匹程度の組み換えマウスを得ることができたので、来年度はこのマウスを用いて実験を行うこととする。

電位感受性色素でマウス下丘表層スライスを負荷し、電気刺激に対する神経活動を計測した（申請書の実験 1-1）。表層部を刺激したところ、神経活動は周縁部を伝播し、更にこの伝播の効率は局所神経回路によって増幅されることが薬理的に明らかになった。この実験結果は下丘表層の神経回路は同心円状の相互結合を有することを示唆しており、これは次項で述べる生体マウスでの機能構築とも一部合致する。次年度はこの内容を更に検討する。

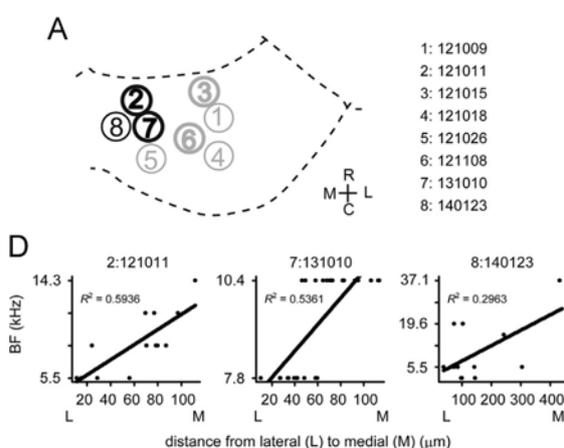


図1 下丘表層の機能構築。A:記録を行った部位。黒字の部位ではトノトピー構築が確認できた。D:トノトピー構築の確認された3領域では、細胞の内側-外側の座標と最適周波数の間に相関が見られた（論文[1]より引用）。

生体マウスの下丘表層に蛍光カルシウム指示薬 OGB-AM を負荷し、音刺激に対する下丘表層回路の応答性について検討を行った（申請書の実験 1-2）。前年度までに下丘表層に応答周波数に対する機能構築の存在が示唆されていたので、今年度は今までのデータを総合的に検討し、機能構築の有無について検討した。

音刺激に対する応答を得ることをできた 8 匹の

動物から、162 個の細胞の様々な音に対する活動を解析することができた。ほとんどの細胞が広帯域雑音と純音に対して応答性を示した。多くの細胞の最適周波数は 10kHz 程度であり、これはマウスの可聴域(1-100kHz)からみてかなり低い。個々の細胞の受容野を検討するとさまざまな応答性のものがあり、これは下丘皮質の他の層で報告されたものと類似する。ついで、これらの音刺激応答性と細胞の空間的配列との間の相関を解析した。音刺激に対する応答波形は近傍の細胞で類似する傾向が見られた。このことから、最適周波数と細胞の配置を解析したところ、下丘表層の内側部では、より内側の細胞が高い最適周波数、より外側の細胞が低い最適周波数を有する、トノトピー構築の存在が示唆された（図1、論文[1]）。

実験2：下丘単一ニューロンの機能形態学

下丘には大型抑制性ニューロン、小型抑制性ニューロン、興奮性ニューロンが存在し、それらの細胞が相互結合して作られる局所回路（論文[2]）が音刺激に対する応答性を新規に作り出すことが示唆される。これまでの研究から 3 種の神経細胞は異なる形態を有し、音刺激に対する応答性が異なり、下丘の機能構築に果たす役割が異なる可能性が示唆される。本年度も先年度に引き続き、近傍記録・染色法(Pinault, 1996)を用いて、単一ニューロンの音刺激に対する神経活動記録と、その樹状突起、軸索展開の関連について解析を行った。大型抑制性ニューロン 16 個、小型抑制性ニューロン 3 個、非抑制性ニューロン（興奮性であろうと思われる）70 個、計 89 個の音刺激応答性について検討した。まず、下丘の音刺激応答性は極めて多様性に富んでおり、このため多くの音刺激に対する特徴的な応答は細胞種との関連が見られなかった。有意に違いがみられた特徴として、大型抑制性ニューロンは音刺激に対する潜時が短く、より幅広い周波数受容野を有することが挙げられる。大型抑制性ニューロンは細胞体上に密な興奮性入力を受けており、樹状突起が下丘内の周波数地図を横切っていた。密な細胞体上の興奮性終末は短い潜時と、樹状突起の形態は幅広い周波数受容野と関係があると考えられる。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

[1] Ito T, Hirose J, Murase K, Ikeda H. Brain res 1590 45-55 2014 年 11 月

[2] Ito T, Oliver DL. J Comp Neurol 522 3539-3554 2014 年 10 月

「特記事項」

2014 年 8 月の池田教授逝去に伴い、残された学生（博士課程 1 名、修士課程 4 名、学部学生 5 名）の研究指導を行い、今年度は 5 名の卒業論文執筆の監督を行った。なお、伊藤は本研究の内容で 2014 年解剖学会奨励賞を受賞した。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費・基盤研究 C 2013-2015 年度 「かたちからさぐる聴覚情報統合のしくみ」代表・伊藤哲史 採択 70 万円（2014 年度分）

科学研究費・新学術領域（公募）代表・村瀬一之 2 件応募中

ノバルティス科学振興財団・研究助成金・2014 年度「かたちからさぐる聴覚情報統合のしくみ」代表・伊藤哲史 採択 100 万円

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

ミトコンドリアによるリンパ球細胞走化制御に関する ナノファイバー技術を用いた研究

研究代表者： 松岡 達（医学部・教授）、藤田 聡（工学研究科・准教授）

共同研究者： 竹内 綾子（医学部・特命助教）

概 要
<p>ミトコンドリア Ca^{2+}、Cl感受性蛍光タンパク（Case12-mito、Clomeleon-mito）を発現したマウス由来培養 B リンパ球細胞（A20）を、ナノファイバー上でライブセルイメージング可能なチャンバーの開発に成功した。これにより、リンパ球細胞走化時のミトコンドリア Ca^{2+}、Cl動態の定量的評価が可能となった。また、ミトコンドリア Ca^{2+}排出タンパクである NCLX を A20 B 細胞で siRNA ノックダウンまたは薬剤により抑制すると、トランスウェルチャンバーにおけるケモタクシスも抑制された。NCLX をノックダウンした細胞では F アクチンの重合が促進されたが、ケモカイン（CXCL12）による更なる重合は起こらなかった。NCLX は、B リンパ球ケモタクシスにおいて、ケモカインに対する F アクチンの重合過程に関連すると推測された。</p>
関連キーワード
リンパ球、細胞走化、ミトコンドリア、イオン、ナノファイバー

研究の背景および目的

松岡、竹内らは、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体（NCLX）が B リンパ球の抗原受容体刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 応答に重要であることを見いだした。さらに、NCLX 抑制は B リンパ球（A20B リンパ球及びマウス脾臓 B リンパ球）のランダムな細胞走化を増大し、ケモカインに向かうケモタクシスを抑制した。また、ミトコンドリア Cl 放出を促進する薬物は、B リンパ球のケモタクシスを抑制することを見いだした。これら一連の研究から、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体、Cl 輸送体がリンパ球細胞走化を制御するという仮説を得た。一方、藤田

は、ナノファイバーに添って遊走する細胞の挙動をタイムラプス顕微鏡で観察することで、1 細胞の遊走挙動を定量的に評価する技術を確認している。

本研究では、ミトコンドリア Ca^{2+} 感受性タンパク（Case12-mito）ならびに松岡・竹内が新規に開発したミトコンドリア Cl 感受性蛍光タンパク（Clomeleon-mito）と、藤田による独自のナノファイバー技術を用いた実験を中心に、この仮説を確認することを目指す。

研究の内容および成果

1. マウス由来 B リンパ球細胞 A20 を用いたミトコンドリア内 Ca^{2+} 、Cl イオンイメージング

マウス由来培養 B リンパ球細胞 A20 を用いて、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 、Cl のライブセルイメージングを行った。ミトコンドリア Ca^{2+} イメージングは、 Ca^{2+} 感受性タ

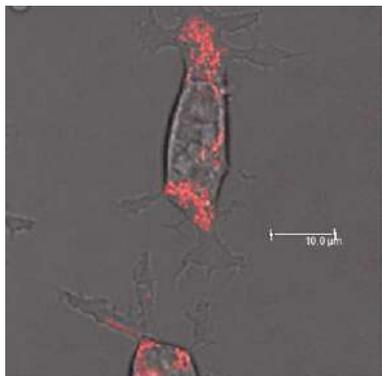


図1 Clomeleon-mitoを発現するA20B細胞

ンパク Case12-mito (Evrogen) をミトコンドリアに発現することで行った。ミトコンドリア Cl イメージングは、細胞内 Cl 感受性タンパク Clomeleon (Kuner and Augustine, *Neuron*, 2000) にミトコンドリア標的シグナルを付加することで新たに開発した Clomeleon-mito を用いた（図 1）。Case12-mito、Clomeleon-mito とともに A20 B 細胞のミトコンドリア特異的に発現した。

2. A20 B リンパ球のケモタクシスを評価するためのナノファイバーの開発

ナノファイバーを、ガラスボトムディッシュの底面より数 $10 \mu m$ の上方に位置するように張ったチャンバーを設計・作成し、散布した A20 B リンパ球細胞がナノファイバー上を走化する条件を検討した。当初用いたポリウレタンは、自家蛍光を

有したので、ポリ-ε-カプロラクトン(PCL)を用いたナノファイバーに素材を変更した。また、顕微鏡の自動フォーカス機能に対応できるように、チャンバーの高さを低くした。さらに、チャンバーに投与する細胞数、細胞投与からナノファイバー上の細胞走化を観察できるまでの時間等の条件を検討した。

3. ナノファイバーを用いた A20 B リンパ球細胞のケモタクシス測定

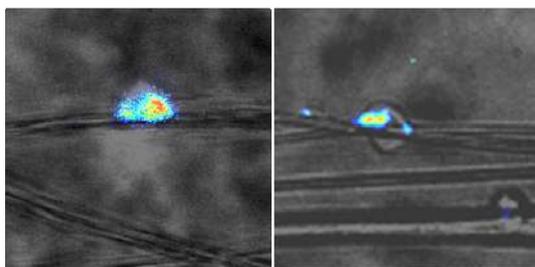


図2 Case12-mito(左)、Clomeleon-mito(右)発現するカーボンナノファイバー上のA20 B細胞

Case12-mito、Clomeleon-mito を発現した A20 B 細胞をナノファイバー上で観察することに成功した。二つの蛍光タンパクとも細胞内での輝度に

不均一性があり、ミトコンドリア毎の Ca^{2+} 、 Cl^{-} 濃度不均一性が示唆された。共焦点レーザー顕微鏡による、より高解像度観察の準備を進めている。現状では、蛍光細胞がナノファイバー上に接着する確率が低いので、確率を向上させるよう実験条件の再検討を行っている。

4. ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体 NCLX と B リンパ球ケモタクシス

ミトコンドリア Ca^{2+} 排出タンパクである NCLX を B リンパ球で siRNA ノックダウンまたは薬剤により抑制すると、トランスウェルチャンバーを用いたケモタクシスも抑制された。また、siRNA ノックダウンによりケモカイン (CXCL12) 非存在下でも F アクチンの重合が促進されたが、ケモカインによる更なる重合は起こらなかった。NCLX 抑制による B リンパ球のランダムな細胞走化の増大と、ケモカインに向かうケモタクシスの抑制は、F アクチンの重合促進が一因であると考えられた。

本研究から、リンパ球細胞走化時のミトコンドリアイオン (Ca^{2+} 、 Cl^{-}) 動態を定量的に評価可能な、ナノファイバー技術と蛍光タンパクを応用した新しい実験系を確立することができた。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S: The destiny of Ca^{2+} released by mitochondria. *J Physiol Sci* 65(1), 11-24, 2015.
2. Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, Miyawaki A, Kabashima K, Watanabe T, Kanagawa O: Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep* 2014, 4:6030.
3. Batnyam O, Uematsu H, Chou CW, Suye S, Fujita S: Taiwanin A Incorporated Polyurethane Fiber Sheets for Prevention of Postoperative Cancer Recurrence, *J Biomater Sci Polym Ed.* (submitted, under review)
4. 竹内綾子, 松岡達「リンパ球細胞走化・遊走におけるイオン・水動態」第2回「水シグナリングの分子動態から病態へ」研究会(福井、2015年3月)
5. 竹内綾子, 松岡達「ミトコンドリアモデル」e-Heart シンポジウム(南草津、2015年2月)
6. 金森 啓一郎, 荻原 裕佑, 末 信一郎, 藤田 聡: シングルナノファイバーを用いたガン細胞浸潤現象の解析, 平成26年度高分子学会北陸地区若手研究会, 2014.11(富山)【優秀ポスター賞受賞】
7. Batnyam O, Fujita S, Chou CW, Suye S: Capacity of Polyurethane Elastomers Fibers as a Drug Delivery System. The International Symposium on Fiber Science and Technology 2014, 2014.9 (Tokyo)
8. Fujita S: Electrospun nanofibers for prevention of cancer recurrence: The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, 2014.8 (Taoyuan,

Taiwan, invited)

9. 藤田 聡, バトニヤム オノン, 周 志謂, 末 信一郎: 癌細胞の増殖抑制を目指した抗癌剤含有ナノファイバーシートの創製, 平成26年度繊維学会年次大会, 2014.6(東京)

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 科研費・挑戦的萌芽研究, 2014~2015年度, ミトコンドリア代謝によるリンパ球ケモタクシス制御(代表・松岡), 採択, 377万円
2. 公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団 平成26年度助成研究「ミトコンドリア Na 動態に関する細胞生理・システム生物学的研究」(代表・松岡), 採択, 100万円
3. 科研費・若手研究(B), 2014年度, 分子配向を利用したバイオミメティック・ファイバーの創成と組織構築への応用(代表・藤田), 採択, 208万円
4. 科研費・基盤研究(A), 2014年度, 次世代器官再生医療のための基盤技術の開発(分担・藤田), 採択, 156万円

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

統合失調症とミエリン化異常～RNA結合タンパク質の役割解明～

研究代表者： 岩田 圭子（子どものこころの発達研究センター・特命助教）

概 要	
	<p>統合失調症の病態に、グリアの一種であるオリゴデンドロサイトやそのミエリン化の異常が指摘されている。一方、Martins-de-Souza らによる死後脳プロテオーム解析で、統合失調症患者の脳内では RNA 結合タンパク質の一種である hnRNP C1/C2 タンパク質が顕著に減少していることが明らかとなった。その後、申請者らは、ヒト神経芽腫細胞を用いて hnRNP C1/C2 がミエリン関連因子の発現を変動させることを報告した。本研究では、ヒトオリゴデンドロサイト細胞株を用い、hnRNP C1/C2 のオリゴデンドロサイトのミエリン化（分化）過程における役割を追究し、hnRNP C1/C2 の異常から派生するオリゴデンドロサイトやミエリン形成の異常が統合失調症の病態基盤形成に関与しているという仮説を検証する。</p>
関連キーワード	オリゴデンドロサイト、ミエリン関連遺伝子、統合失調症、hnRNP C1/C2

研究の背景および目的

統合失調症は、その多くが思春期以降に幻覚や妄想を主症状として顕在化し、社会機能が著しく障害される精神疾患である。現在、統合失調症の原因および病態発現のメカニズムはいまだ不明であり、根本的な治療法は確立されていない。

そのような中、統合失調症の病態に、グリアの一種であるオリゴデンドロサイトやそのミエリン化の異常が指摘されている。一方、Martins-de-Souza らによる死後脳プロテオーム解析で、統合失調症患者の脳内では RNA 結合タンパク質の一種である hnRNP C1/C2 タンパク質が顕著に減少していることが明らかとなった。RNA 結合タンパク質は pre-mRNA のスプライシング、mRNA の安定化や分解、および翻訳の促進や抑制に関与し、遺伝子発現過程において重要な役割を担っている。これまでに、RNA 結合タンパク質の破綻が、がん

どをはじめとする様々な疾患を引き起こすことが多数報告されている。しかし、統合失調症をはじめとする精神疾患における RNA 結合タンパク質の動態は未解明である。そこで、申請者らは、ヒト神経芽腫細胞を用いて hnRNP C1/C2 がミエリン関連因子発現に関与しているかについて解析し、これら遺伝子の発現を変動させることを報告した (Iwata et al., 2011)。

本研究では、ヒトオリゴデンドロサイト細胞株を用い、hnRNP C1/C2 のオリゴデンドロサイトのミエリン化（分化）過程における役割を解明し、hnRNP C1/C2 の異常から派生するオリゴデンドロサイトやミエリン形成の異常が統合失調症の病態基盤形成に関与しているという仮説を検証することを目的とする。

研究の内容および成果

精神疾患の病因・病態を探るには死後脳は非常に有用なサンプルである。しかし一方で、ほとんどの解析が神経とグリアが混ざった状態で解析されている。そのため、死後脳解析の結果からグリア特異的な異常を検出することは困難である。そこで本研究では、特定の細胞に絞り解析することにした。また、申請者は死後脳解析を行った Martins-de-Souza らと提携しており、本研究の結果と統合失調症死後脳プロテオーム解析の結果とを照らし合わせた考察を行う予定である。このことにより、臨床サンプルと *in vitro* のサンプルが

最大限に有効利でき、導き出される結果は統合失調症の病態解明や治療へと直接結びつくものである。

本研究にはホルボールエステル (PMA) 刺激により成熟オリゴデンドロサイトに分化可能な未分化ヒトオリゴデンドロサイト細胞株 M03.13 を使用する。我々は既に本細胞のプロテオミクス解析を行っており、hnRNP C1/C2 をはじめとする多くの RNA 結合タンパク質が豊富に発現していることを突き止めている (Iwata et al., 2013)。

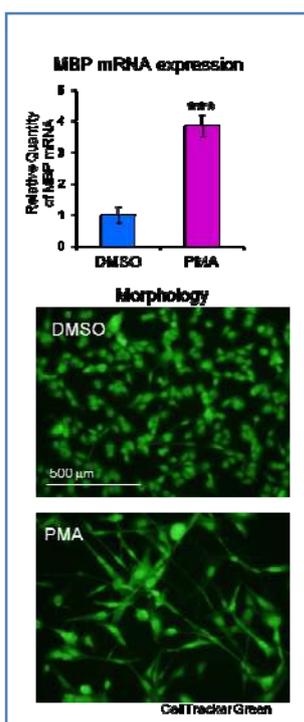


図 1. M03.13 の PMA による分化誘導

申請者は、まず M03.13 の分化過程において hnRNP1 および C2 を発現変化自体が変動するかについて解析を行った。図 1 に示すように、PMA 刺激により分化マーカーである MBP 遺伝子の発現の増加と形態変化をおさえることにより、M03.13 が成熟オリゴデンドロサイトに分化していることを確認した。続いて、分化によって hnRNP1 および C2 の発現が変化するかを調べたところ、どちらも減少することが明らかとなった(図 2-A)。

そこで hnRNP1 および C2 を過剰発現させた上で PMA 処理した際に分化に異常が認められるかを解析した。図 2-B に示したように、どちらの過剰発現においても分化状態を変化させることはなかった。しかし、興味深いことに、hnRNP2 を過剰発現させた細胞は PMA 刺激なしでも MBP 発現の増加が認められた。続いて、同様の処理をした細胞をそれぞれのミエリン関連因子発現の発現が変化して

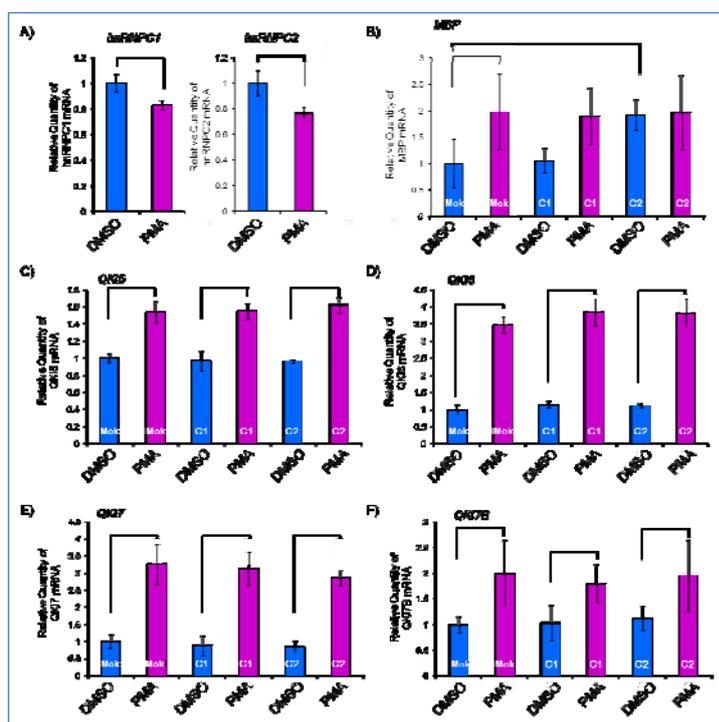


図 2. M03.13 の分化過程への hnRNP1/2 の影響

いるかについて検討した。その結果、図 2-C~F に示すように、これら遺伝子発現への影響は認められなかった。

以上のことから、hnRNP1 および C2 の過剰発現は PMA による分化には影響を与えないが、hnRNP2 のみ、未分化細胞の分化マーカー遺伝子の発現増加を誘導することが明らかとなった。この結果は、以前申請者が報告したヒト神経芽腫細胞 SK-N-SH を用いた際の結果に似ている。つまり、hnRNP C2 のみ MBP 遺伝子の発現を変化させたのである (Iwata et al., 2011)。統合失調症患者の死後脳で hnRNP C1/2 発現異常が確認されていることから (Martins-de-Souza et al., 2009)、本疾患の脳内では hnRNP C1/2 発現異常による MBP 発現に変化が起こり、オリゴデンドロサイトの異常な分化状態が起こっている可能性がある。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Alteration of the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination- and schizophrenia-related genes in the human oligodendrocytic cell line. *under preparation*
2. MK-801 treatment affects glycolysis in oligodendrocytes more than in neuronal cells: insights for schizophrenia. *under preparation*

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

現在受け入れ中

日本学術振興会・基盤研究 C (一般)・平成 25-27・

統合失調症とオリゴデンドロサイト異常—hnRNP1/2 の役割解明・代表・採択・390 万円

申請予定

日本学術振興会・基盤研究 C (一般)・平成 28-30・自閉症におけるエピジェネティック異常の解明・代表

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

抗がん剤イマチニブはC型肝炎の治療薬となりうるか。

研究代表者： 山内 翔太（医学部・特命助教）
共同研究者： 定 清直（医学部・教授）、千原 一泰（医学部・准教授）、
竹内 健司（医学部・学内講師）

概 要	C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV) は肝細胞への侵入後、ウイルス RNA の複製とウイルスタンパク質の合成を繰り返し、これらを部品としてウイルス粒子を形成する。ウイルス粒子は肝細胞の分泌機構を介して放出され、別の肝細胞に感染する。ウイルス RNA の複製とウイルス粒子の形成には、ウイルスタンパク質 NS5A のリン酸化が重要であるとされているが、このリン酸化に関与するキナーゼはほとんどわかっていない。本研究では、HCV の粒子産生におけるチロシンキナーゼ c-Abl の役割を調べた。HCV の粒子産生は c-Abl のノックダウンにより抑制された。また、c-Abl は <i>in vitro</i> で NS5A の 330 番目のチロシン残基をリン酸化し、このチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型ウイルスでは、ウイルス粒子の形成が顕著に減弱していた。これらの結果は HCV の粒子形成には c-Abl による NS5A のリン酸化が必要であることを示唆する。
関連キーワード	ウイルス粒子形成、宿主ウイルス相互作用、チロシンリン酸化

研究の背景および目的

HCV は 3 種類の構造タンパク質と 7 種類の非構造タンパク質を有する RNA ウイルスである。構造タンパク質がウイルス RNA とともにウイルス粒子の一部をなすのに対し、非構造タンパク質は宿主の肝細胞タンパク質を利用することで、ウイルス RNA の複製やウイルス粒子の形成を担う。

非構造タンパク質 NS5A は、ウイルス RNA の複製とウイルス粒子の形成の両方に必要なリン酸化タンパク質である。低リン酸化型(p56)の NS5A はウイルス RNA の複製を、高リン酸化型(p58)の NS5A はウイルス粒子の形成をそれぞれ促進するとされる。NS5A をリン酸化するキナーゼの一つとして、セリン/スレオニンキナーゼであるカゼインキナーゼが同定されている。これに加え、我々は、NS5A が未同定のチロシンキナーゼにリン酸化されることを報告している(Nakashima, K. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012)。また、NS5A は Src, Fyn,

Syk, c-Abl といったチロシンキナーゼと会合することが報告されている(Macdonald, A. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2004; Inubushi, S. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2008; Nakashima, K. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012)。しかしながら、HCV のライフサイクルにおけるチロシンキナーゼの役割はほとんど解明されておらず、上皮増殖因子受容体(EGFR)のキナーゼ活性が、HCV の細胞内への侵入に必要なことが、最近報告された程度である(Lupberger, J. *et al.*, *Nat. Med.*, 2011; Zona, L. *et al.*, *Cell Host Microbe*, 2013)。

Abl ファミリーキナーゼは、コクサッキーB ウイルス、ワクチニアウイルス、エボラウイルスなどの細胞内への侵入や細胞外への放出に関わることが知られている。本研究では、HCV のライフサイクルにおける Abl ファミリーキナーゼの役割を明らかにすることを目的とした。

研究の内容および成果

Abl 阻害剤イマチニブが HCV の感染拡大を阻害することが、培養細胞を用いたスクリーニングによって既に示されている。イマチニブが HCV のライフサイクルのどの過程を抑制するのかを調べるために、Huh-7.5 細胞を HCV(J6/JFH1 株)に感染させ、イマチニブ存在下で培養した。細胞内外のウイルス粒子を回収し、フォーカス形成アッセイにより定量した。イマチニブ処理により細胞内外ともにウイルスタイターが約 80%低下していた。一方、ウイルス RNA の複製や細胞の生存率には顕

著な影響が見られなかった。これらの結果はイマチニブ処理がウイルス粒子の形成を抑制することを示唆している。

イマチニブは、Abl ファミリーに属する c-Abl と Arg に加えて、いくつかのチロシンキナーゼの活性を阻害することが知られている。c-Abl または Arg が HCV の粒子形成に必要なかを検討するために、c-Abl と Arg が常時ノックダウンされた Huh-7.5 細胞を作成し、HCV に感染させた。イマチニブ処理と同様、c-Abl のノックダウンにより細

胞内外のウイルスタイターが低下したが（図 1）、ウイルス RNA の量に変化は見られなかった。一方、Arg のノックダウンはウイルスタイターに顕著な影響を与えなかった。これらの結果は c-Abl がウイルス粒子の形成に関わることを示唆している。

我々は過去に c-Abl の SH3 ドメインが *in vitro* で NS5A と結合すること、過剰発現させた NS5A が pervanadate（チロシンホスファターゼ阻害剤）処理によりチロシンリン酸化されることを報告している。そこで、c-Abl がウイルス粒子形成を促進するために、NS5A をリン酸化する可能性を検討した。HCV に感染させた Huh-7.5 細胞において、NS5A はチロシンリン酸化され、c-Abl のノックダウンによりこのリン酸化が抑制された。また、Con1 株の NS5A を COS7 細胞において c-Abl と共発現させると、チロシンリン酸化された。c-Abl によるリン酸化部位を特定するために、Con1 株と JFH1 株が共通して持つチロシン残基を Con1 株 NS5A においてフェニルアラニンに置換した。8 個の変異の内 Y334F 変異が COS7 細胞における NS5A のチロシンリン酸化を抑制した。また、c-Abl は *in vitro* で JFH1 株 NS5A の Y330（Con1 株の Y334 に相当）をリン酸化した。これらの結果は NS5A が c-Abl の基質であることを示唆している。

NS5A の Y330 が HCV の粒子形成に必要であるかを調べるために、HCV のゲノム RNA に NS5A Y330F 変異を導入した。この変異型ウイルスでは細胞内外のウイルスタイターが 90%以上低下していた。一方、NS5A Y330F 変異を持つサブジェノミックレプリコンは野生型と同様の複製能を示した。これらの結果は NS5A Y330 がウイルス粒子形成に関わることを示唆している。

NS5A は Core タンパク質依存的にリピッドドロプレットに局在し、HCV の粒子形成を促進する。

そこで、c-Abl による NS5A のリン酸化が NS5A の細胞内局在に影響を与える可能性を検討した。c-Abl ノックダウン細胞において、NS5A はコントロール細胞内と同様にリピッドドロプレットに局在していた。また、NS5A Y330F 変異を導入したウイルスにおいても、NS5A のリピッドドロプレットへの局在に目立った変化は見られなかった。したがって、c-Abl は NS5A のリピッドドロプレットへの局在には不要と考えられる。

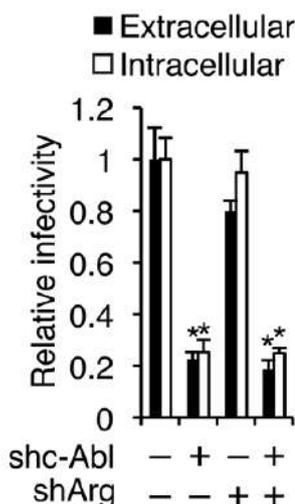


図 1. c-Abl ノックダウンによるウイルス粒子形成の抑制。Huh-7.5 細胞において c-Abl と Arg をショートヘアピン (sh) RNA を用いて、ノックダウンし、HCV 感染 48 時間後、細胞内外のウイルスタイターを定量した。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

The c-Abl Tyrosine Kinase Promotes Hepatitis C Virus Particle Assembly by Phosphorylating NS5A
Shota Yamauchi, Kenji Takeuchi, Kazuyasu Chihara, Xuedong Sun, Chisato Honjoh, Hatsumi Yoshiki, Hak Hotta, Kiyonao Sada
投稿予定

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費補助金・若手 (B)・H27~28・「ウイルスタンパク質のチロシンリン酸化に着目した C 型肝炎ウイルス増殖機構の解析」・代表・申請中

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

妊娠期母体腸内細菌叢の胎児、 乳児の中枢神経系の発生における役割の解析

研究代表者： 栢谷 史郎 (子どものこころの発達研究センター・特命助教)

概 要	<p>非吸収性の抗生剤を妊娠9日目～16日目の期間、妊娠マウスに飲水投与したのち、仔マウスを出産させ、離乳まで養育させた。その後、生後4週の子マウスに対して行動実験を行った。その結果、活動低下、不安様行動などが観察された。マウスは生後6週で性的に成熟するため、生後4週の時期は未就学児童や小学校の低学年に相当する。この時期には本来、活動的で、好奇心旺盛であるべきで、低活動で不安傾向が強いことはさらなる学習、発達の機会を奪う可能性がある。本研究の結果は妊娠期におけるマウス母体腸内細菌叢が胎児の中枢神経系の発生、発達に寄与しており、妊娠期の腸内細菌叢の攪乱が仔の中枢神経系の機能的な発達に深刻な影響を与えることを示唆する。</p>
関連キーワード	腸内細菌、精神発達障害、マウスモデル、不安様行動、プロバイオティクス

研究の背景および目的

1970年代以降の精神神経分野の発達障害の増加は健全な脳の発育における環境要因の重要性を示唆する。健全な腸内細菌の構成は妊娠期母体の重要な環境の一つである。腸内細菌叢の構成の変化が動脈硬化、肝臓障害、アレルギー疾患などの原因となる可能性が様々な研究により示唆されている(光岡, 2014)。精神神経分野においても腸内細菌叢の変化が社会的行動や不安傾向等に影響を与えることがヒトおよびマウスで示唆されている(Collins, 2013; Tillisch, 2013; Hsiao, 2013)。

ただし妊娠期母体腸内細菌叢が胎児、新生児の脳の発生、発達において果たす役割は明らかではない。研究代表者は妊娠マウスに対する非吸収性抗生剤の飲水投与により母体腸内細菌の構成を攪乱する方法を確立している。本研究は、この方法を用いて胎児神経発生期を通じて母体腸内細菌叢の攪乱を引き起こし、そのことが胎児、新生児の中枢神経系の発生にどのような影響を与えるかを仔マウスに対する行動実験により明らかにする。

研究の内容および成果

胎児神経発生期に母体腸内細菌叢の攪乱が生じると、胎児、新生児の中枢神経系の発生にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、非吸収性抗生剤を妊娠9日目～16日目の期間、妊娠マウス(C57BL/6J系統)に飲水投与したのち、仔マウスを出産させ、離乳まで養育させた。その後、生後4週の子マウスに対して行動実験を行った(図1)。その結果、24時間の活動量を測定するホームケージ活動試験においてマウスにとって本来の活動期である暗期の低活動が観察された(図2)。また、広く目印などが何もない空間にマウスを置き、行動様式を観察するオープンフィールド試験の結果は、新奇環境における活動量が低下すること(図3)、マウスが空間の中心部を避け、壁沿いを移動することを好み、不安傾向があることを示唆した(図4)。マウスは生後6週で性的に成熟するため、生後4週の時期は未就学児童や小学校の低学年に相当する。この時期には本来、活動的で、好奇心



図1 非吸収性抗生剤投与による妊娠期母体の腸内細菌攪乱と仔マウスへの行動実験のスキーム

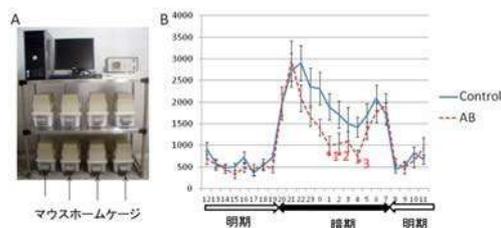


図2 (A) ホームケージ活動試験測定装置 (B) 対照群(Control)及び抗生剤投与群(AB)の24時間周期の活動

旺盛であるべきで、低活動で不安傾向が強いこと(表1)はさらなる学習、発達の機会を奪う可能性がある。これらの結果は妊娠期におけるマウス母体腸内細菌叢が胎児の中枢神経系の発生、発達に寄与しており、妊娠期の腸内細菌叢の攪乱が仔の中枢神経系の機能的な発達に深刻な影響を与えることを示唆する。

日本は発酵食品が豊かであり、腸内細菌を整えるプロバイオティクス製剤、プレバイオティクス製剤の研究開発が盛んである。この実験系は抗生剤により腸内細菌が攪乱された母体及びその仔マウスに対し、プロバイオティクス製剤、プレバイオティクス製剤を投与し、仔の行動の改善の度合いを定量的に観察することができ、仔の脳の発生、発達に寄与するプロバイオティクス製剤、プレバイオティクス製剤等の評価、スクリーニングに有効である。そのため、この実験系をもとに「妊娠期母体腸内細菌攪乱による行動異常モデル動物の作製方法とその用途」として特許を出願済みである(特願 2015-017613)。また、本実験系に興味を持った企業と共同研究を開始する予定である。

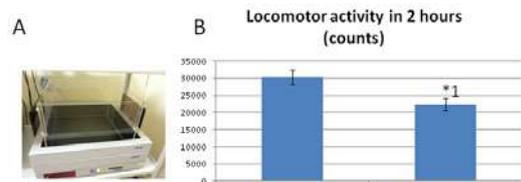


図3 (A) オープンフィールド試験測定装置 (B) 対照群(Control)及び抗生剤投与群(AB)の新奇環境における行動量(2時間)

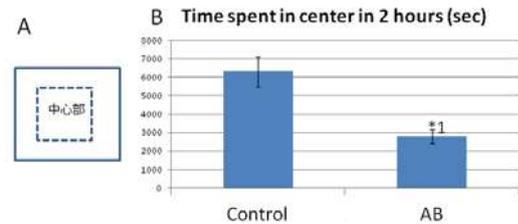


図4 対照群(Control)及び抗生剤投与群(AB)がオープンフィールド試験において空間の中心部(A)で過ごした時間(B)

	妊娠期に腸内細菌が攪乱された母体から生まれたマウス仔の行動の特徴
社会的行動異常	なし
常同性	なし
睡眠障害(概日リズム障害)	あり(暗期活動低下)
新奇環境下低活動	あり
不安傾向	あり

表1 妊娠期に腸内細菌が攪乱された母体から生まれたマウス仔の行動の特徴

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Tochitani *et al.*, Perturbation of maternal gut microbiota during pregnancy results in abnormal behaviours in offspring. *Sci. Rep.*, *submitted*.

栃谷史郎、松崎秀夫「マウス妊娠期腸内細菌叢の攪乱は仔の中枢神経系の発生発達に影響を与える」第19回腸内細菌学会、東京都、2015年6月(予定)

Tochitani S. and Matsuzaki H. Perturbation on the mouse maternal gut microbiota during pregnancy leads to the abnormal behavior of their offspring. 第38回日本神経科学大会、神戸市、2015年7月(予定)

「特記事項」

特許(出願済)

発明の名称: 妊娠期母体腸内細菌攪乱による行動異常モデル動物の作製方法とその用途

出願日: 2015年1月30日

整理番号: A12307

出願番号: 特願 2015-017613

出願人: 福井大学

発明者: 栃谷史郎、松崎秀夫

栃谷史郎「妊娠期母体腸内細菌攪乱による行動異常マウスの作成方法とその用途」

ふくい知財フォーラム、福井市、2015年3月10日

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

公益財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団・研究助成・一般課題研究・平成26年度・「母体腸内細菌の胎児、乳児中枢神経系の発生、発達における役割とそのメカニズムの解析」・代表・採択・100万円

公益財団法人武田科学振興財団・研究助成・医学系研究奨励・平成26年度・「母子関係に基づく新生児脳発達における腸内細菌叢の役割(仮題)」・代表・申請予定・200万円

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

大腸癌細胞の幹細胞性の維持におけるホメオボックス蛋白質 CDX1/CDX2 の役割の解明

研究代表者： 青木 耕史（医学部・教授）

概 要	<p>最近の我々の解析から、腸管上皮細胞の恒常性や分化の維持に不可欠のホメオボックス蛋白質 CDX1/CDX2 が大腸癌悪性を抑制することが分かった。その機序を解明するために、ヒト大腸癌細胞株を用いた Tet 誘導システムを用いて、CDX1/CDX2 により変動する遺伝子発現を解析した。その結果、CDX1/CDX2 が大腸癌幹細胞性の遺伝子発現プログラムを負に制御していることが分かった。そこで、腸腫瘍の幹細胞性の維持における CDX1/CDX2 の役割を明らかにするために、大腸癌幹細胞の <i>in vitro</i> 培養系の確立を進めた。L-Wnt 細胞に、R-spondin と Noggin を安定的に発現させて調製した培養上清を用いることにより、腸管の正常と腫瘍の粘膜上皮細胞の培養が可能になった。そこで今後、本実験により確立したスフェロイド培養系を用いて、CDX1/CDX2 による大腸癌幹細胞性の制御機構の解明を進める。</p>
関連キーワード	CDX1、CDX2、大腸癌幹細胞性、大腸癌悪性化

研究の背景および目的

研究の背景) 癌は、日本人の死因の第1位となっている。また、近年大腸癌への罹患率が増加しており、大腸癌を標的にした新たな治療薬の開発が重要な課題となっている。そのためには、大腸癌の発症および悪性化進展の機序解明が不可欠である。

これまでの解析から我々は、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子である CDX2 が大腸腫瘍形成の初期段階を抑制することなどを見出した (Aoki K. *et al.*, *Nat. Genet.* 2003; *Cancer Res.* 2011)。さらに最近の解析から良性の腸腺腫モデルである *Apc* 変異マウスに *Cdx1* または *Cdx1/Cdx2* 両遺伝子変異を導入したところ、強い浸潤を示す悪性腫瘍に変化することを見出した。これらの実験結果から、CDX1/CDX2 は腸腫瘍の初期段階を抑制するだけでなく、腸腫瘍の悪性化進

展を抑制することが分かった。

そこで、我々は、CDX1/CDX2 の機能解明を進めることにより、大腸癌細胞悪性化の機序解明を進める。

研究の目的) CDX1/CDX2 による大腸癌悪性化の抑制機構を解明する。とくに、CDX1/CDX2 による大腸癌の幹細胞性の制御機構を解明するために、次の実験を進める。
1) ヒト大腸癌細胞株を用いて CDX1 または CDX2 の発現を制御できるテット誘導性細胞を樹立して、CDX1 または、CDX2 による遺伝子発現プログラムへの影響を解析する。
2) スフェロイド培養系を確立することにより、*Apc/Cdx1/Cdx2* 伝子変異マウスの腸管に形成された腫瘍から腸腫瘍の幹細胞を培養し、CDX1/CDX2 の幹細胞性の制御における役割とその機構を解明する。

研究の内容および成果

研究結果 1) CDX1/CDX2 による大腸癌の幹細胞性の抑制機構を解明するために、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 と LS174T 細胞を用いて、

テット誘導システムにより、CDX1 または CDX2 の発現を制御できる誘導性細胞を樹立した。CDX1 または、CDX2 の発現を誘導して

から12時間と24時間後にRNAを抽出して、遺伝子発現プロファイルをcDNAマイクロアレイ法を用いて解析した。その結果、ID遺伝子ファミリーに属すID1とID3の発現が顕著に減少することが分かった(図1 and data not shown)。近年の研究から、ID1とID3が大腸癌の幹細胞性の維持に主要な役割を担うことが報告されている(Cancer Cell 2012)。これらの結果から、CDX1/CDX2が大腸癌細胞の幹細胞性を抑制していると想定した。この仮説を検証するために、さらに大腸癌の幹細胞性のマーカー遺伝子として確立しているLGR5遺伝子やASCL2遺伝子の発現量をqPCRにより解析した。その結果、これらの大腸癌幹細胞のマーカー遺伝子を含む、複数の癌幹細胞のマーカー遺伝子の発現をCDX1/CDX2が顕著に抑制していることが分かった(図2 and data not shown)。これらの実験結果ら、CDX1/CDX2は、大腸癌細胞の幹細胞性を遺伝子発現制御を介して、負に制御していることが示唆された。現在、CDX1/CDX2の直接の標的遺伝子をChIP-seqにより解析を進めている。今後、これらの実験結果を解析することにより、CDX1/CDX2による大腸癌幹細胞性の遺伝子発現プログラムの制御機序を解明する。

みた。その結果、これまで培養が困難であった腸上皮細胞のスフェロイド培養系が確立できた。今後、確立したスフェロイド培養系を用いて腸腫瘍細胞の幹細胞性の制御におけるCDX1とCDX2の役割の解明を進める。

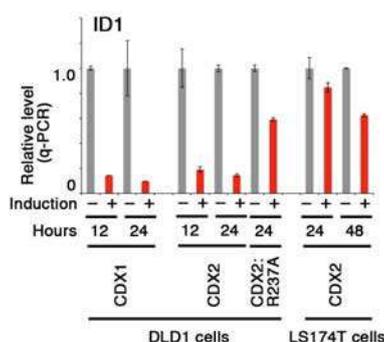


図1. CDX1/CDX2によるID1遺伝子発現の抑制

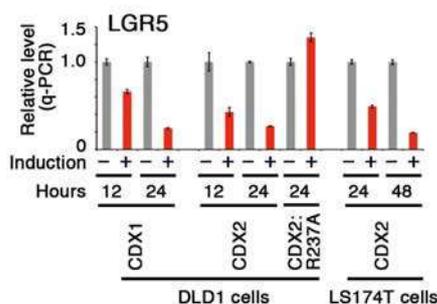


図2. CDX1/CDX2によるLGR5遺伝子発現の抑制

研究結果 2) 腸管上皮細胞のスフェロイド培養系の確立。
Apc 変異マウスや *Apc/Cdx1/Cdx2* 複合変異マウスの腫瘍細胞の幹細胞性を比較するために、スフェロイド培養系の確立を進めた。L-Wnt細胞に、R-spondinとNogginを安定的に発現させた。その培養上清を用いて、conditioned培養液を作成した。また、腸管から単離した細胞(腫瘍細胞)を酵素処理により単独の細胞まで分離して培養を試

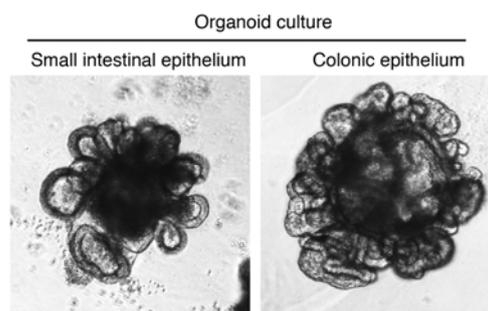


図3. 腸管細胞のSpheroid培養

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Hori K and Aoki K (corresponding au.), et al.,
Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2
(投稿準備中)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

高松宮妃癌研究基金・研究助成金・2014年・代表・大腸癌細胞の幹細胞性の負の制御機構の解明・200万円

生命科学複合研究教育センター
「平成26年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

白血病幹細胞に対する分子標的治療の開発

研究代表者：吉田 明（医学部・准教授）
共同研究者：大蔵美幸（医学部・大学院生）

概 要	
	<p>がんは遺伝子変異の結果として引き起こされるが、変異した遺伝子産物の活性および安定性は熱ショックタンパク質のひとつ Heat shock protein90 (HSP90)のはたらきに大きく依存している。一方、Myeloid Cell Leukemia-1 (MCL-1)は抗アポトーシス作用を有する蛋白であり、多くの癌細胞において重要な役割を果たしてしていることが既に報告されており、癌治療を考察するための標的分子と考えられる。今回、我々は、MCL-1はHsp90のclient proteinであることを明らかにした。臨床的にもHSP90阻害剤の作用機序を考察する上でも興味深い発見である。</p>
関連キーワード	Heat shock protein90 (HSP90)、Myeloid Cell Leukemia-1 (MCL-1)、抗アポトーシス分子

研究の背景および目的

『研究の背景』

近年、成人の急性骨髄性白血病の治療成績は進歩がみられているが、その完全治癒率は35%前後にとどまっており、十分に満足できるものではない。治療の観点からは、特に白血病性幹細胞をいかに効率よく根絶するかが重要であると考えられる。我々は、特に難治性の骨髄異形成症候群から移行してきた白血病症例においては、CD34陽性の白血病性幹細胞において、抗アポトーシス分子であるSurvivinが非常に強く発現していることを見いだした(Yoshida, A et al. Haematologica, 2012, IF 5.9)。また、FLT-3遺伝子の変異を有する予後不良な症例でもSurvivinが高発現していることが認められている(Yoshida, et al. Biochem Pharmacol, 2014, IF 4.56)。こういった予後不良な症例に対する治療法を考案するため、Survivin阻害剤である低分子化合物YM155に関して我々は研究をおこなってきたが、YM155はSurvivinのみならず、もう一つの抗アポトーシス分子であるMCL-1をより強く抑制することを見いだした(Feng, W., Yoshida A et al. BBRC 2013)。さらに、興味深いことにYM155は直接的にHeat Shock Protein 90 (HSP90)に結合して、その機能を阻害すること発見した(投稿準備中)。YM155がMCL-1蛋白の分解を強力に誘導することより、MCL-1がHSP90のclient proteinではないか?という仮説を我々は考えた。これらの我々の知見をベースにして、さらに以下の点を明らかにすることを今回の目的とする。

『目的』

1. MCL-1がHSP90のClient Proteinであることを証明するため培養白血病細胞を用いて以下の検討をおこなう。まず抗MCL-1抗体を用いて、免疫沈降を実施、その後、抗HSP90抗体を用いてウエスタンブロットを実施してMCL-1とHSP90の結合があるかどうか検討する。また、逆に抗HSP90抗体を用いて免疫沈降をおこない、その後抗MCL1抗体を用いてウエスタンブロットを実施する。さらにHSP90に対するsiRNAを培養白血病細胞に作用させることによりMCL-1蛋白の分解が誘導されるかどうかについて検討する。
2. HSP90阻害剤は癌治療の分野で大きな注目を集めている。しかし、がん幹細胞に対する効果については未だ報告がない。がん幹細胞の生物学的特性として、細胞がG0/G1期(静止期)にあることが知られており、静止期にある細胞は、多くの抗がん薬に対して耐性をしめし治療が困難となる。そこで、培養細胞をG0/G1期に誘導して、その状態でYM155を添加して、抗腫瘍効果を発揮するかを検討する。

研究の内容および成果

結果

1. MCL-1 が HSP90 の Client Protein であることを証明するため以下の検討をおこなった。培養白血病細胞株 KBM-5 を使用した。RIPA Buffer に Triton X-100 を加えて細胞を溶解後に、抗 MCL-1 抗体 (Santa Cruz 社) を加えて、Spin Trap Protein-G カラムを用いて、免疫沈降を実施した。免疫沈降物を回収後、ポリアクリルアミド電気泳動を実施して、その後に、抗 HSP90 抗体を用いてウエスタンブロットを実施し MCL-1 と HSP90 の結合があるかどうか検討した。その結果、図に示すように、MCL-1 との免疫沈降物には、確かに HSP90 が存在することが判明した。また、逆に抗 HSP90 抗体を用いて免疫沈降をおこない、その後に抗 MCL-1 抗体を用いてウエスタンブロットを実施したが、やはり、MCL-1 と HSP90 の結合が示唆された。さらに HSP90 に対する siRNA を培養白血病細胞に作用させ、HSP の発現を抑制したところ、MCL-1 蛋白の分解が誘導されることか観察された。

2. 細胞を G0/G1 期に誘導するため細胞を PBS で洗浄後、2%BSA を含む RPMI 培地に浮遊させ培養を継続した (血清非存在下で培養した)。その後、1 μ M YM155 を添加し細胞死の誘導について検討した。対象実験として、S 期特異的な薬剤 ara-C を添加して細胞死の誘導について検討した。その結果、ara-C は、まったく効果を示さなかったが、YM155 は強い細胞死誘導活性をしめした。以上より、YM155 は、静止期の細胞にも効果を示す薬剤であることがわかった。

考察

HSP90は細胞にもっとも豊富に存在する分子シャペロンであり、タンパク質が細胞において正常な立体構造を維持するうえで重要な役割をはたしている。HSP90は、変異型p53, ErbB2 (Her2/neu, Bcr-Ab1など、特にがん細胞の増殖や生存にかかわるさまざまな変異タンパク質、過剰発現タンパク

質、キメラタンパク質の安定性および活性化に必要不可欠である。一方、正常なタンパク質のHSP90への依存性は低い。そのため、HSP90は抗がん薬の有望な分子標的と考えられている。実際に、Hsp90阻害薬はさまざまな種類のがんに対して抗がん活性を示し、現在、第1世代および第2世代のHsp90阻害薬は骨髄腫、乳がん、肺がん、前立腺がん、腎がんなどを対象に臨床試験 (第1相試験～第3相試験) が行われている。

MCL-1 は多くの癌細胞において高発現していることが既に報告されており、癌治療を考察するための重要な標的分子と考えられる。具体的には、慢性骨髄生白血病の幹細胞において MCL-1 が高発現しており、その生存に重要な機能を果たしていることが報告されている。MCL-1 は BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death) と結合しており、BIM の機能を阻害することにより、抗アポトーシス作用を発揮していると考えられる。近年になり、MCL-1 に選択的に結合して特異的に阻害する化合物として、A-1210477, UMI-77 などが見いだされており、前臨床の段階であるが、抗腫瘍活性を有していることが報告されている。今回の我々の知見は HSP90 阻害薬により効率的に MCL-1 を抑制できる可能性が高いことを示唆するものである。



図. 抗 HSP90 抗体および抗 MCL-1 抗体を用いて免疫沈降を行い Western Blotting を実施した。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. **Yoshida A**, Ookura M, Zokumasu K, Ueda T. G66976, a FLT3 kinase inhibitor, exerts potent cytotoxic activity against acute leukemia via inhibition of survivin and MCL-1. *Biochem Pharmacol.* 90(1): 16-24. 2014

2. Feng W, **Yoshida A**, Ueda T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 435(1):52-7, 2013.

3. **Yoshida A**, Zokumasu K, Wano Y, Yamauchi T, Imamura S, Takagi K, Kishi S, Urasaki Y, Tohyama K, Ueda T. Marked upregulation of Survivin and Aurora-B kinase are associated with disease progression in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 97(9):1372-9, 2012.

福井大学
トランスレーショナルリサーチ
推進センター
平成26年度公募採択型研究費

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター
**子宮肉腫に対する新たなバイオマーカーの開発と転移メカニズムの
 説明**

研究代表者： 水谷 哲也（医学部・准教授）
 共同研究者： 吉田 好雄（医学部・教授）
 清野 泰 （高エネルギー医学研究センター・教授）

概 要	子宮肉腫は稀な疾患であるが、血行性転移による他臓器への再発率が高く予後不良な難治性疾患である。一方、良性の子宮筋腫は30代女性の約1/3に認められる疾患である。これらは、画像診断では区別できないケースがあり、正確に判断する為には外科病理検査が必要となる。そこで本研究では、血液を測定することで子宮肉腫を鑑別できるバイオマーカーの開発に取り組んだ。その結果、3種類のペプチドが子宮肉腫を鑑別できる新たなバイオマーカーの候補になることが示された。また、近年抗転移作用が示されているナトリウム利尿ペプチドについて検討したところ、ナトリウム利尿ペプチドファミリーであるCNPで転移抑制作用が認められ、新たな抗転移薬としての可能性が示された。
関連キーワード	子宮肉腫、子宮筋腫、バイオマーカー、ペプチド

トランスレーショナルリサーチ推進センター公募採択型研究費

研究の背景および目的

子宮がんの中で子宮肉腫は子宮体部悪性腫瘍の3-8%を占めるまれな疾患であるが、有効な化学療法は確立されておらず、主な治療法は外科療法となる。しかし、子宮摘出後に血行性転移による他臓器への再発率が高く、5年生存率は30%と非常に予後不良な腫瘍である。一方、良性の子宮平滑筋腫（子宮筋腫）は30代女性の約1/3に認められるが、悪性の子宮肉腫と鑑別する診断マーカーは確立されておらず、正確に判断する為には外科病理検査を必要とするのが実状である。その為、良性の子宮筋腫として子宮摘出をした後に悪性の子宮筋肉腫と判明することもあり、病理診断が非常に困難な疾患として知られている。私どもはヒト子宮肉腫由来MES-SA細胞を用いた同所移植実験モデルを確立しており、

この移植モデルの原発巣を用いた遺伝子プロファイリング解析の結果、分泌性のタンパク質（ペプチド）が腫瘍の悪性度や肉腫を検出する新たなバイオマーカーの開発に有用であることが示唆された。また、肉腫特異的な遺伝子・蛋白質をターゲットとした新たな分子イメージングトレーサーの開発の可能性も示された。本研究では、(1)これらの分泌性タンパク質（ペプチド）を用いて、子宮肉腫と子宮筋腫を早期に鑑別する新たなバイオマーカーを製作すること、(2)これらのアゴニスト・アンタゴニストおよび近年抗転移作用が示されているナトリウム利尿ペプチドを用いた治療法を開発し、新たな治療戦略モデルを示すことを目指している。

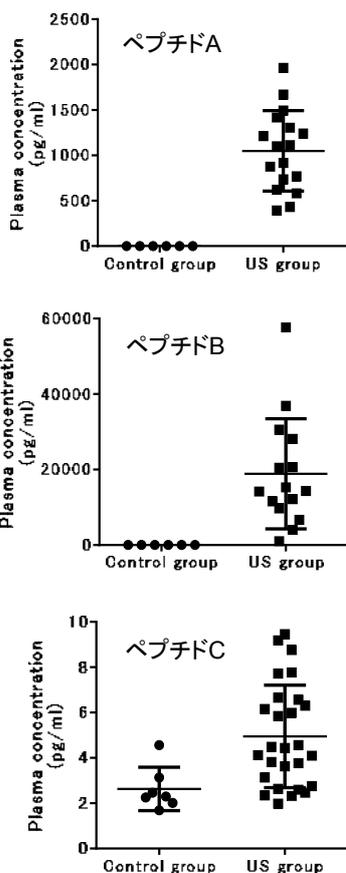
研究の内容および成果

(1) 子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別するバイオマーカーの開発

私どもはGFP遺伝子を導入したヒト子宮肉腫由来MES-SA細胞を樹立し、この細胞を免疫不全マウスに同所移植する実験モデルを確立している。この実験モデルより、子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別するバイオマーカーの候補を以下の方法により得た。同所移植マウスの原発巣を用いたDNAマイクロアレイの結果を基に①肺への血行性転移が認められる細胞株（高転移株）が転移の認められない細胞株（低転移株）より有意に発現量が高い遺伝子および②肉腫由来以外の細胞株より有意に発現量が高い遺伝子を候補とした。

分泌性タンパク質は、転写・翻訳後、細胞内にプールされたり、分泌されてもすぐに分解されて

しまうケースもあるため、転写量が必ずしも血中濃度を反映するとは限らない。そのため、実際に血中濃度を測定し、明らかにすることが重要である。そこで6種類の分泌性タンパク質（ペプチド）を候補とし、ヒト子宮肉腫由来MES-SA細胞を用いた同所移植マウスおよびコントロールマウスの血中濃度をELISAまたはIRMAにより測定した。その結果、3種類の分泌性タンパク質（ペプチド）の血中濃度が、コントロールより有意に高値だった(図)。今後これらの分泌性タンパク質（ペプチド）についてヒト患者血液を測定し、新たな肉腫マーカーの開発につなげる。



図の説明

コントロールマウスと担ガンマウス (US group)における、それぞれの血中ペプチド濃度

(2) ヒト子宮肉腫の新たな治療戦略の確立

上述のように、子宮肉腫は血行性転移による他臓器への再発率が高く、非常に予後不良な腫瘍である。しかし現在までに、転移を抑制する薬は開発されていない。近年、心臓から分泌される心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)に転移の抑制作用が示されていることから、新たな抗転移薬の可能性が示唆された。本研究では、ANPをはじめとするナトリウム利尿ペプチドファミリーおよび肉腫に高発現する分泌性タンパク質(ペプチド)について、転移に対する作用を検討している。

血行性転移モデルとして代表的なB16F10メラノーマ細胞肺転移モデルを用いて、ANPおよびそのファミリーであるCタイプナトリウム利尿ペプチド(CNP)の肺転移に対する作用を検討したところ、CNPの持続的投与は、コントロールおよびANP投与群よりも有意に転移を抑制した。この結果から、CNPが新たな抗転移薬として有用であることが示唆された。現在、子宮肉腫の転移に対する抑制作用についても検討している。また、子宮肉腫に高発現する分泌性タンパク質(ペプチド)のアゴニストおよびアンタゴニストの持続投与による転移への影響についても解析中である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1) **Mizutani, T.***, Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press)
- 2) **Mizutani, T.***, Ju, Y., Imamichi, Y., Osaki, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Matsumura, T., Kanno, M., Kamiki, Y., Kimura, K., Minamino, N., Miyamoto, K.: CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) mediates progesterone production through transcriptional regulation in cooperation with steroidogenic factor 1 (SF-1). *Biochem. J.* 460, 458-471 (2014).
- 3) Kanno, M., Yazawa, T., Kawabe, S., Imamichi, Y., Usami, Y., Ju, Y., Matsumura, T., **Mizutani, T.**, Fujieda, S., Miyamoto, K.: Sex-determining region Y-box 2 and GA-binding proteins regulate the transcription of liver receptor homolog-1 in early embryonic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 406-414 (2014).
- 4) Imamichi, Y., **Mizutani, T.***, Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T.,

Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 33-42 (2014).

「特記事項」

招待講演

- 1) **水谷哲也**, 宮本 薫: SF-1による新たな転写調節メカニズム. 第19回日本生殖内分泌学会学術総会. 2015, 1, 10, 豊中.
- 2) **Mizutani, T.**, Miyamoto, K.: SF-1 dependent regulation of GSTA family genes and their implication for adrenocortical function. ADRENAL 2014 The XVIth Conference on the Adrenal Cortex. June 17-20, 2014, Chicago.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

基盤研究 (C)・新たなステロイド合成酵素の同定と高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明・代表・採択
 基盤研究 (C)・クロマチン構造変化を制御するSF-1複合体の同定とStAR発現調節機構の解明・代表・申請中

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター
生体用共焦点レーザー顕微鏡を利用した他覚的味覚検査の試み
-その2-

研究代表者：齋藤 武久（医学部・准教授）
 共同研究者：伊藤 哲史（医学部・助教）

概 要
<p>臨床上の味覚検査としては電気味覚検査と味質検査が行われているが、いずれも自覚的検査であり、味覚障害に対する検査として信頼性が期待できない場合がある。すなわち、患者が虚偽の結果を出すことが可能であるため、事故などによって味覚が障害されたと訴える患者には他覚的味覚検査が求められる。しかし、臨床応用できる他覚的味覚検査はないのが現状である。生体用共焦点レーザー顕微鏡は、舌の茸状乳頭表面に対物レンズを接触させるだけで短時間に乳頭内の味蕾を観察することができるため臨床応用が可能であり、味蕾数と自覚的味覚検査の結果が相関すれば、他覚的味覚検査として利用できる可能性がある。今回、味覚障害患者と正常ボランティア 211 人を対象に測定を行い、電気味覚検査域値と乳頭一個当たりの平均味蕾数が逆相関することを明らかにした。</p>
<p>関連キーワード 他覚的味覚検査、共焦点レーザー顕微鏡、茸状乳頭、味蕾、鼓索神経</p>

トランスレーショナルリサーチ推進センター公募採択型研究費

研究の背景および目的

臨床的な味覚検査としては、電流刺激による電気味覚検査、甘味、塩味、酸味、苦味の4種類の味質液を用いた味質検査が存在するが、いずれも自覚的な検査であるため、味覚障害を訴える患者の検査として100%の信頼が得られている訳ではない。すなわち、検査時に患者が虚偽の結果を出すことが可能である点が問題である。聴覚検査では聴性脳幹反応（ABR: auditory brainstem response）が他覚的聴力検査として確立されているが、現時点で他覚的味覚検査は存在していないのが現状である。味覚の受容器は舌や軟口蓋などに存在する各種乳頭内の味蕾であるが、味蕾の存在を証明するためには乳頭を生検し、その連続切

片を光学顕微鏡で観察するしか方法がなかった。Justらは2005年に角膜表面の観察に利用されている共焦点レーザー顕微鏡を用いて茸状乳頭味蕾の形態を観察できると報告した。光学顕微鏡で観察する味蕾は垂直断面であるのに対して、共焦点レーザー顕微鏡は水平断面を観察するため、一つの乳頭内に存在する味蕾数を短時間で測定できる利点がある。しかも非侵襲的に検査できる。われわれはこの顕微鏡を使用して茸状乳頭味蕾数をカウントし、平均味蕾数と自覚的味覚検査結果との間に相関が認められれば、他覚的味覚検査として利用できるのではないかと考えた。

研究の内容および成果

1. 研究方法

(1) 対象

中耳炎患者の術前、術後、中耳手術中に鼓索神経が切断された症例、味覚障害のないボランティアを含めた211人に対して、電気味覚検査を行った後に共焦点レーザー顕微鏡による舌茸状乳頭味蕾の観察を行った。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡による茸状乳頭味蕾の観察

ヒト茸状乳頭味蕾の形態を観察するために使用した機器は、Heidelberg Engineering社製の共焦点レーザー顕微鏡(Heidelberg Retina Tomograph HRT II)にRostock Cornea Moduleを組み合わせたHRT2Rである。まず、中耳手術用顕微鏡下に舌尖から2cm後方、中央から2cm外側にある領域の茸状乳頭10個にメチレンブルー液でマーキングを

行い、各乳頭に共焦点レーザー顕微鏡の対物レンズ(x63)を接触させ、乳頭表面に焦点を合わせて味蕾を水平断面でとらえる。手動操作によって乳頭内部へとz軸方向にスキャンし、味孔から味蕾内部を連続的に観察して静止画および動画をデジタル画像として保存した。

2. 結果

(1) 年代間で電気味覚検査域値と茸状乳頭味蕾数に差がないことの確認

年齢によって電気味覚検査域値や味蕾数に差があると、味覚検査域値と平均味蕾数の間に相関があるか検討できなくなる。そこで、20代から80代までの対象者を10歳毎の7群に分け、電気味覚検査(EGM)の域値を測定した後に、共焦点レーザー顕微鏡で茸状乳頭10個の味蕾数をカウントし、乳

頭一個当たりの平均味蕾数を算出した。その結果、各年代間において電気味覚検査域値、平均味蕾数ともに有意差は認められなかった(図1, 2)。

(2) 自覚的味覚検査結果と茸状乳頭味蕾数の比較

211例の電気味覚検査域値を横軸に、平均味蕾数を縦軸にとって211例の数値をプロットすると、両者は逆相関することが明らかとなった(図3)。すなわち、電気味覚検査域値が上昇した症例では味蕾はほとんど存在せず、電気味覚検査域値が正常範囲(8dB以下)である場合は平均味蕾数が多く存在するという結果が得られた。なお、図3において、日本人のEGM正常値は8dB以下、鼓索神経刺激による反応は14dB以下とされている。これに対して、16dB以上の電気刺激には三叉神経が反応するとされている。

以上の結果から、共焦点レーザー顕微鏡による茸状乳頭味蕾数のカウントは他覚的味覚検査として応用できるのではないかと考えられた。

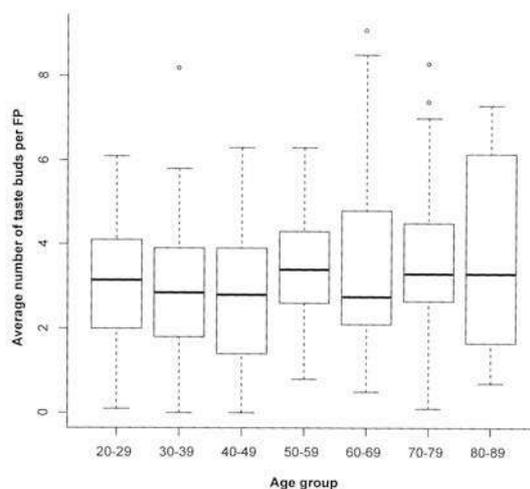


図2

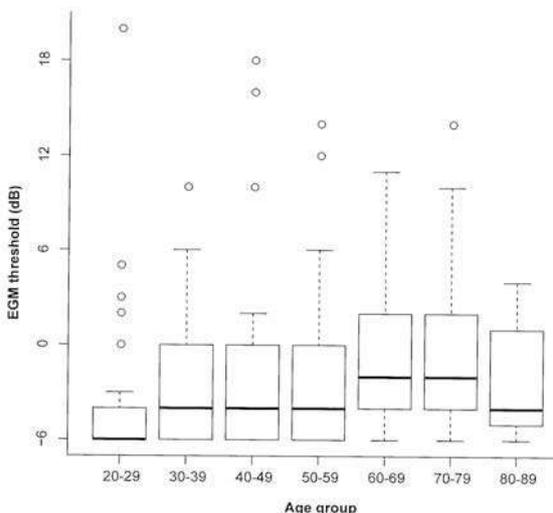


図1

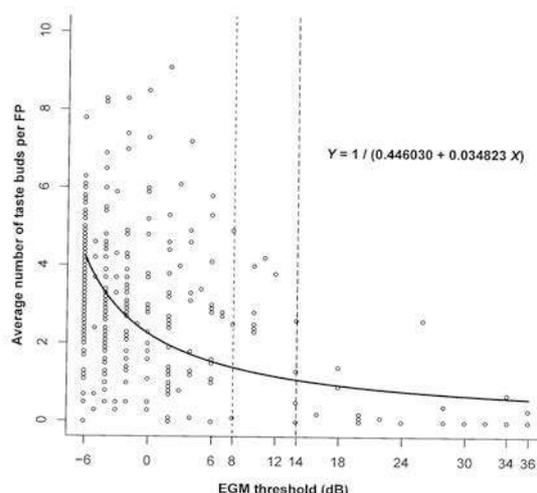


図3

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文」

Saito T, Ito T, Ito Y, Kato Y, Manabe Y, Narita N. Degeneration process of fungiform taste buds after severing the human chorda tympani nerve - observation by confocal laser scanning microscopy. *Otol Neurotol* 36 (3): 539-544, 2015. 3

による比較検討- 第24回日本耳科学会総会, 2014年10月.

「競争的資金・研究助成への申請状況」

平成27~29年度文部科学省 科学研究費補助金(代表者として申請→採択). 生体用共焦点レーザー顕微鏡を用いた鼓索神経交叉支配説の検証と他覚的味覚検査の試み

「学会発表」

1. ヒト茸状乳頭味蕾における生体用共焦点レーザー顕微鏡の有用性. 第27回日本口腔・咽頭科学会, 2014年9月.
2. 慢性中耳炎・真珠腫性中耳炎患者における茸状乳頭味蕾数 -生体用共焦点レーザー顕微鏡

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

凝固・線溶マーカーを用いた妊娠高血圧症候群患者に対する、 常位胎盤早期剥離の早期診断法の開発

研究代表者： 高橋 仁（医学部産科婦人科学・助教）

共同研究者： 西島 浩二（医学部産科婦人科学・助教）

概 要	<p>妊娠高血圧症候群（PIH）は常位胎盤早期剥離のリスク因子である。早剥は臨床症状で外出血型や突発的な下腹部の激痛が出現する場合には診断されやすい。しかしPIH症例では、血管透過性の亢進が進んでいるケースもあり、急速に進行し、重症化しやすい。DIC 準備状態では、我々が推奨する可溶性フィブリンモノマー複合体（SFMC）や FDP・D-dimer を用いても診断に苦慮する症例も経験する。この問題の解決のために、37 週以降では、カットオフ値を変更することで、これらの凝血学的検査が、早期診断および除外診断に有用となりえる可能性が示唆された。</p>
関連キーワード	常位胎盤早期剥離、可溶性フィブリンモノマー複合体、FDP、Dダイマー

研究の背景および目的

常位胎盤早期剥離（以下、早剥）は全分娩の 0.5～1.3%に認められ、その発症の予知や予防は困難である。先行研究では切迫早産と 37 週未満の早産型の早剥との鑑別に凝固・線溶マーカーが有用であることを報告した。妊娠高血圧症候群（PIH）は早剥を合併することが多く、PIH 関連疾患と見なされている。PIH 患者では脱落膜のらせん動脈の攣縮により血流が障害されて、血栓形成が起こり、脱落膜の間質が壊死する病態が病理所見として確認されている。PIH 型の早剥では、基底脱落膜にある母体血管から出血がおこりやすく、その出血が胎盤後血腫を形成し、胎盤剥離を引き起こすという仮説が有力ある。その際、外出血が多めでも下腹部の症状が軽症の場合で剥離の程度が進行しないケースや、急速に分娩が進行し、胎児娩出後ほぼ同時に胎盤が娩出される症例も経験する。

PIH は胎児機能不全、胎盤機能不全、子宮内胎児

発育遅延、子宮内胎児死亡、HELLP 症候群、子癇など母児の生命を危うくする合併症を併発しやすい。さらに、早剥では脱落膜血腫部位での凝固因子の消費と組織因子の母体血管内流入により、播種性血管内血液凝固症候群（DIC）を発症しやすい特徴がある。早剥の診断がつき次第、急速遂娩により児の予後を改善できるという報告が散見されるため、早期診断を求められる。しかし PIH でも可能な限り経膈分娩を試みるべきであり、その際に早剥を発症したか否かを診断することは容易ではなく、急速遂娩の介入の決断に迷う場面もしばしばある。

今回、妊娠 37 週以降の早剥の症例で凝固・線溶分子マーカー（SFMC・FDP・D-dimer）が術前から高値を示す点に着目し、PIH で入院管理中の症例にこれらのマーカーが早期診断および除外診断に有用であるか検討した。

研究の内容および成果

【対象および方法】

対象は、当院で経験した、37 週以降の症例のうち、当研究にインフォームドコンセントを得られた、常位胎盤早期剥離 7 例（早剥群）と、PIH 管理中に分娩に至った 24 例（PIH 群）である。それぞれについて、入院時または発症時の SFMC・FDP・D-dimer 値を比較検討した。なお、測定法はラテックス免疫比濁法で、試薬はオートLIA FMC（ロッシュ・ダイアグノスティクス）；基準値<6.1 μg/ml、ナノピア P-FDP（積水メディカル）；基準値<5.0 μg/ml、ナノピア D ダイマー（積水メディカル）；

基準値<1.0 μg/ml を用い、終日、30 分以内に結果が報告される環境である。

【成績】

検討した PIH 群（24 例）の病型を妊娠高血圧（gestational hypertension: GH）と妊娠高血圧腎症（preeclampsia: PE）とし、軽症（収縮期圧 160mmHg、拡張期圧 110mmHg 未満）と重症（収縮期圧 160mmHg、拡張期圧 110mmHg 以上）で分類すると、軽症 GH（3 例）、重症 GH（5 例）、軽症 PE（5 例）、重症 PE（11 例）となった。（1）SFMC の平均値は早剥群 114.3 μg/ml vs.

PIH群 8.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、早剥群で有意に高値であった ($p < 0.01$)。 (2) FDP の平均値は早剥群 66.9 $\mu\text{g/ml}$ vs. PIH群 6.0 $\mu\text{g/ml}$ であり、早剥群で有意に高値であった ($p < 0.01$)。 (3) D-dimer の平均値は早剥群 27.0 $\mu\text{g/ml}$ vs. PIH群 2.9 $\mu\text{g/ml}$ であり、早剥群で有意に高値であった ($p < 0.01$)。早剥群では、PIH群と比較して、SFMC, FDP, D-dimer が全て有意に高値であった (図1)。カットオフ値をROC解析で求められた、SFMCの50.0 $\mu\text{g/ml}$ 、FDP 12.0 $\mu\text{g/ml}$ 、D-dimer 6.0 $\mu\text{g/ml}$ に設定すると、妊娠37週以降では、カットオフ値以上で、常位胎盤早期剥離を感度SFMC 85.7%、FDP、D-dimer 100%で確定診断ができた。またPIH症例ではカットオフ値未満で、SFMC, FDP, D-dimer はともに特異度96.0%で早剥を除外診断できた。

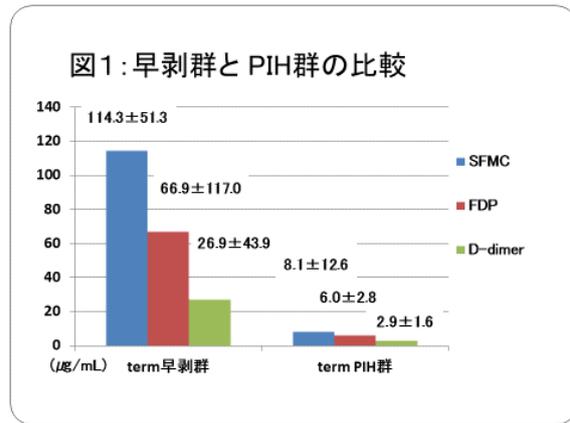


図1. 常位胎盤早期剥離群7例とPIH群24例の検討

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1) 里見裕之, 他: 常位胎盤早期剥離の病態と管理早剥の診断—凝血的診断—. 周産期医学 2013; 43: 471-474
- 2) 高多佑佳, 他: 妊娠後期における凝固・線溶マーカーは常位胎盤早期剥離の診断に有用となるか. 産婦人科の実際 2014; 63: 713-717
- 3) 里見裕之, 他: 常位胎盤早期剥離—発症予知と対策—DICの診断と凝固線溶系マーカー. 産婦人科の実際 2014; 63: 1965-1972

「特記事項」

共同研究者 里見裕之 (福井済生会病院産婦人科)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

血清アルブミン・血清蛋白の側から見た蛋白尿の研究

研究代表者： 糟野 健司（医学部・准教授）

共同研究者： 岩野 正之（医学部・教授）、木村 秀樹（医学部附属病院・臨床教授）、高橋 直生（医学部附属病院・診療講師）

概 要	<p>尿蛋白は腎機能低下の主要原因と考えられている。現在、蛋白尿は腎糸球体の異常で生じると考えられているが、腎臓側からでなく、血清蛋白の異常から蛋白尿を捉えるべく蛋白質の高次構造に影響を及ぼすチオレドキシン（TRX）の酸化型/還元型の変化に注目して研究を行った</p> <p>今回、血液中の蛋白質の高次構造を制御するチオール基の酸化還元反応に関わる TRX に関してマウス腎虚血再灌流モデルマウスで血中 TRX が酸化型か還元型かを Native Western Blot で観察した。腎障害による血清 TRX の酸化/還元状態の変化は有意な影響を観察できなかった。腎障害による血清蛋白のチオール基修飾への影響は少ないと考えられるため、今後は酸塩基平衡異常や高尿素窒素、各種尿毒物質の影響について調べる必要がある。</p>
関連キーワード	慢性腎臓病、血清アルブミン、血清蛋白、尿蛋白

研究の背景および目的

<研究の背景> 現在、日本人の8人に1人が慢性腎臓病と言われており対策が求められている。蛋白尿は慢性腎臓病の主要な進行因子である。本研究は血清蛋白質の側からのアプローチで蛋白尿の病態に関する研究を行う。

<特色> 腎障害進行の主因は、血清蛋白が尿へ漏出し、この尿蛋白が尿細管を障害する事で、尿細管間質障害が進行し腎機能低下に至ると考えられている。

現在の腎臓病研究は糸球体上皮細胞や間質線維芽細胞など腎臓という臓器を中心に進められているが、血清蛋白の異常を主眼にした研究は行われていない。本研究では腎臓側からでなく、血清蛋白の異常という全く新たな着眼点から腎臓病を捉

えて研究を進めることが特色である。

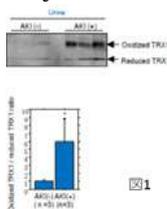
<目的> 血清アルブミンや血清蛋白の働きには血管内に水分を保持する役割と血中内物質と結合し、これらを目的臓器に運ぶ運搬作用がある。腎臓病患者の血清蛋白は細胞間 tight junction を通過しやすく、血管内にとどまらず蛋白尿として排泄されてしまい、結果として血管内に水を保持する能力を失ってしまうことが予想される。腎臓病患者の血液は酸塩基平衡異常、高尿素窒素、各種尿毒物質の蓄積を呈しており血清アルブミンや血清蛋白質が、翻訳後修飾や他分子と結合することで、高次構造などに影響を受けていると考えられ、腎臓病の浮腫・肺鬱血・尿毒症・病態進行に関わっている可能性がある。

研究の内容および成果

蛋白質の高次構造はアミノ酸配列中の2組のシステイン残基間でチオール基が酸化されて分子内に disulfide 結合が形成されることでコンフォメーション制御がなされている。この酸化還元反応を触媒する補酵素の一つにチオレドキシン (TRX) がある。TRX は 105 個のアミノ酸からなるタンパクで、TRX タンパクの活性中心には2つのシステイン残基があり、そのシステイン残基間の dithiol/disulfide 交換反応により基質タンパクのコンフォメーションを制御する。dithiol/disulfide 交換反応で酸化された TRX は TRX 還元酵素により再び還元型となる。TRX は酸化ストレスによって誘導され、細胞外に分泌され、細胞保護作用・細胞遊走阻害作用などサイトカイン・ケモカイン様活性を示すことなどが明らかにされている。研究代表

者はこれまでの研究で急性腎障害 (AKI) 患者の尿では酸化型 TRX が増加することを観察している (図1; Kasuno et al, Am J Physiol Renal Physiol. 2014)。

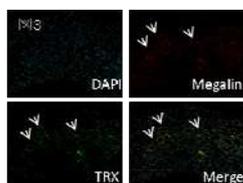
今回の研究では腎障害の際に見られる尿中 TRX の還元型から酸化型への変化が血中でも起こっているかどうかを調べるためにマウスの両側腎動脈を30分クリッピングした後、再灌流し24時間後に腎障害を来す虚血再灌流モデルマウスで血中 TRX



が酸化型か還元型かを Native Western Blot で観察した。マウス虚血再灌流モデルマウスの尿中 TRX はヒト腎障害と同様に還元型から酸化型への変化が認められたが、



血中 TRX は酸化型への変化を認めなかった。この実験結果から TRX の還元型から酸化型への変化は尿中 TRX に特異的な現象であり、血清 TRX では見られないことが分かった (図2)。以前、免疫組織学的な研究法で急性腎障害 (AKI) 患者の尿中に増加する TRX が糸球体からの単なるろ過による漏出ではないと考えられたが (Kasuno et al, Am J Physiol Renal Physiol. 2014)、今回の実験結果はこれを裏付ける結果となった。また血清中の TRX が尿細管で再吸収される可能性について実験を行った。アルブミンの一部は尿細管の megalin により再吸収されることが知られている。血中の TRX は 12kDa であることから糸球体でろ過され、megalin により再吸収される可能性が高い。この仮説を検証するため megalin と TRX の蛍光二重染色を行った。その結果、megalin と TRX は同一の尿細管に染色を認め、両者が同一局在を示すことが観察された (図3)。



さらにマウスに

ヒトリコンビナント TRX を静脈内注射し、マウス TRX と交差認識を示さない抗ヒトモノクローナル抗体で腎の免疫組織染色を行った(図4 A)。Vehicle 投与マウスの腎を同じ抗体で染色した標本 (図4 B) と比較して、静脈投与したヒト TRX がマウス腎尿細管に沿って観察された (図4)。

以上の結果から血中の TRX は糸球体でろ過され、megalin により尿細管に再吸収されること

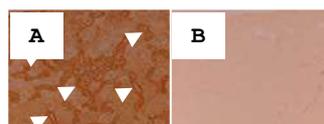


図4 示唆された。

今回の研究から TRX の還元型から酸化型への変化は尿中に特異的な現象であることが分かった。血液中の蛋白質の高次構造を制御するチオール基の酸化還元反応に関わる TRX に関しては腎障害による有意な影響を観察できなかった。

2014に Am J Physiol Renal Physiol. で報告した結果と統合すると血中 TRX は健康正常状態で糸球体でろ過され、megalin により尿細管に再吸収され細胞内に蓄えられており、腎障害時には酸化ストレスにより酸化型 TRX として細胞外 (尿中) に分泌され尿中に増加すると考えられる。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Kasuno K, Shirakawa K, Yoshida H, Mori K, Kimura H, Takahashi N, Nobukawa Y, Shigemi K, Tanabe S, Yamada N, Koshiji T, Nogaki F, Kusano H, Ono T, Uno K, Kakamura H, Yodoi J, Muso E, Iwano M. Renal redox dysregulation in AKI: application for oxidative stress marker of AKI. Am J Physiol Renal Physiol. 307:F1342-1351, 2014

糟野健司 レドックス UPDATE (医学のあゆみ別冊) 医歯薬出版 2015.6 発行

Tobino K, Muso E, Iwasaki Y, Yonemoto S, Kasuno K, Tsukamoto T, Nakamura H, Tomino Y. Gende-

and disease-specific urinary thioredoxin in chronic kidney disease patients with or without type 2 diabetic nephropathy. Nephrology (Carlton) 20:368-374, 2015

「招聘講演」

糟野健司 新規尿中バイオマーカー 第58回 (平成27年) 日本腎臓学会学術総会 (招待講演) 2015.6.5

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

小児気管支喘息患者に対する病態解析バイオマーカーの開発

研究代表者：村井 宏生（医学部附属病院小児科・助教）
 共同研究者：大嶋 勇成（医学部病態制御医学講座小児科学・教授）
 安富 素子（医学部・助教）、（大学院生）岡崎 新太郎
 河北 亜希子（医学部附属病院小児科・病院助教）
 浜田 敏彦（医学部附属病院検査部・副技師長）、橋本 儀一（主任技師）

概 要	小児気管支喘息は気道の狭窄部位や気道炎症の種類が異なる様々なフェノタイプからなる症候群と考えられている。近年、気道炎症の成立には、Th2 細胞を中心とした獲得免疫のみならず、自然免疫も重要な役割を持つことが明らかにされつつある。本研究では、自然免疫による炎症成立に関与するサーファクタントプロテイン D (SP-D) と Chitinase-3 like protein (YKL-40) に着目し、小児で非侵襲的に採取可能な唾液中の SP-D や YKL-40 が病態解析バイオマーカーとして有用か否かを検討した。その結果、唾液中 SP-D 濃度は喘鳴の重症度とともに増加しており、末梢気道抵抗を反映する%R5-R20 と相関を認めた。一方、唾液中 YKL-40 濃度は気道抵抗とは有意の相関を示さなかったものの、気道の好酸球性炎症を反映する FeNO と正の相関を認めた。唾液中 SP-D と YKL-40 はそれぞれ、気道の炎症部位とその性状を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。
関連キーワード	気管支喘息、小児、バイオマーカー サーファクタントプロテイン、YKL-40

研究の背景および目的

小児気管支喘息は、幾つかの異なるフェノタイプからなる症候群と考えられている。強制オシレーション法（モストグラフ）を用いた呼吸機能検査により、気道狭窄の好発部位が異なるフェノタイプが存在することが指摘されている。また、発作時と非発作時の喀痰中の炎症細胞の解析から、気道炎症にもいくつかの異なるパターンが存在することが示唆されている。現在、呼気中一酸化窒素を用いた (FeNO) の簡易測定法は気道の好酸球性炎症を反映するものとして臨床応用されているが、FeNO 以外に、気道炎症の性状や部位を測定する有用なバイオマーカーが存在しない。

また、小児では成人と異なり気管支肺胞洗浄液や誘発喀痰を集めることは容易でなく、より非侵襲的な検査法が求められる。

我々は喘息の増悪に関与する自然免疫を担うサーファクタントプロテイン D (以下 SP-D) と気道リモデリングへの関与が推測されているに Chitinase-3 like protein (以下 YKL-40) 着目し、唾液中 SP-D と YKL-40 濃度とモストグラフや、FeNO などの各種パラメーターとの関連性を解析し、小児気管支喘息のバイオマーカーとしての有用性を検証するとともに、その病型解析を試みることを目的とした。

研究の内容および成果

本研究への参加同意をが得られた 39 症例を対象とした。患者家族歴、既往歴、発作頻度、発作重症度に加え、スパイロメーターとモストグラフにより呼吸機能を測定し、中枢気道と末梢気道の狭窄性変化の有無を検討した。好酸球性気道炎症の指標となる呼気中 NO は Ninox Mino を用いて測定した。また、唾液サンプルキット (Salimetrics Childrens Swab, Funaoshi, Japan) を用いて唾液を収集し、採取した唾液中と血清中の SP-D、YKL-40 を ELISA (R&D systems) を利用して測定し、各種

呼吸機能、臨床パラメーターとの相関を解析した。

1) 唾液中 SP-D と喘鳴の重症度との関係

喘鳴の程度別の唾液中 SP-D 濃度を比較すると異なる喘鳴の重症度群間には有意な差を認めなかった (図 1)。しかし、同一症例において、喘鳴の重症度の変化と SP-D の変化を対比すると、喘鳴の重症度が高い方が SP-D が高値を示していた。この結果から、唾液中 SP-D 濃度は症例によって異なるため、患者間での喘鳴の重症度を比較する目的には使用できな

いが、同一症例における喘鳴の重症度の推移をみるためには有用と考えられた。

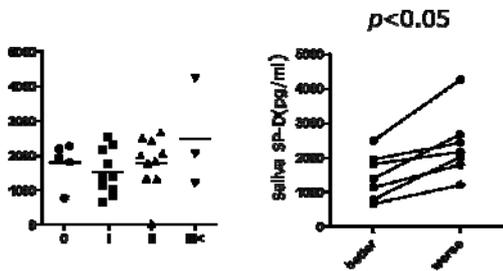


図1 唾液中 SP-D と喘鳴重症度との関係

2) 唾液中 SP-D 濃度と気道抵抗の相関

我々のこれまでの検討から、モストグラフによる呼吸機能測定値である R5, R20, R5-R20 は年齢と相関するため、非喘息児の値より各パラメーターの回帰式を作成し、年齢による予測との比を求めることで標準化し (%R5, %R20, %R5-R20)、検討を行った。

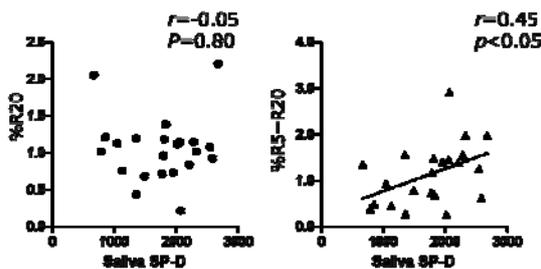


図2 唾液中 SP-D 濃度と中枢気道抵抗、末梢気道抵抗との関係

その結果、唾液中 SP-D 濃度は、中枢気道抵抗や全気道抵抗を反映するとされる %R5, %R20 とは相関しなかったが、末梢気道抵抗や気道不均等を反映する %R5-R20 と

は有意な相関を示した。SP-D は唾液腺とともに肺胞上皮細胞やクララ細胞など末梢気道を構成する細胞から分泌されることから、唾液中 SP-D 濃度は、末梢気道炎症を反映したマーカーとなる可能性が示唆された。

3) 唾液中 YKL-40 濃度と呼気中 NO 濃度との関係

気道リモデリングが進行した成人の気管支喘息患者では血清中 YKL-40 が高値を示すことが報告されている。しかし、唾液中 YKL-40 濃度は、モストグラフで測定した中枢および末梢気道抵抗の値とは有意の相関を示さなかった。一方、好酸球性気道炎症のマーカーである呼気中 NO 濃度 (FeNO) とは有意の正の相関を認めた。

今回対象とした小児喘息患者では、成人と異なり罹患期間が短いことから YKL-40 濃度は気道リモデリングの原因となる好酸球性気道炎症の程度を反映するにとどまった可能性が考えられた。

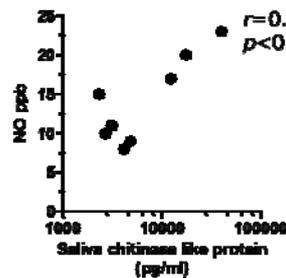


図3. 唾液中 YKL-40 と FeNO の相関

唾液中 SP-D, YKL-40 はそれぞれ、気道の炎症部位とその性状を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。今度両者の唾液中への分泌調節機序を明らかにすることが小児喘息の病態の理解に有用と考えらえる。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表等」

国際学会での発表

Saliva-SP-D Is a Practical Marker to Identify the Peripheral Airway Inflammation. (AAAAI meeting 2015, Houston, Oral presentation)

Standardized resistance is a practical indicator in asthmatic patients, those who cannot perform spirometry. (AAAAI meeting 2014, Houston, poster presentation)

唾液中サーファクタントプロテイン D は局所性炎症マーカーとなりうるか。日本小児呼吸器学会

(口演, 2014 10 月)

唾液中サーファクタントプロテイン D は局所的気道炎症の指標となりうるか?

第 51 回日本小児アレルギー学会 (口演, 2014 11 月)

唾液中サーファクタントプロテイン D は気道炎症の指標となりうるか。(第 41 回北陸アレルギー研究会 口演, 2014 12 月)

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

Prokineticin1(PROK1)によるリンパ管新生機能の検討

研究代表者：五井孝憲（医学部・第一外科学 准教授）、中谷真子（医学部・薬理学 助教）
共同研究者：山口明夫（医学部・第一外科学 教授）、青木耕史（医学部・薬理学 教授）

概 要
<p>本邦において生涯に2人中1人が悪性腫瘍に罹患する状況となりつつある。その中で大腸癌は本邦、欧米などで罹患率、死亡者数が上位にあり、世界中で研究が成されている。生命を脅かす転移は血行性転移、リンパ節転移、腹膜転移があるが、これらの機構の解明は新規療法の開発から予後改善に繋がっていくことが考えられる。</p> <p>今回検討を行った PROK1 因子は、Prokineticin family の1つとして最近になり生体の恒常性を担う重要な働きを行うことが報告された。本研究において私どもはリンパ管内皮細胞に PROK1 因子のレセプターを発現していること、また PROK1 蛋白質の刺激によってリンパ管細胞の新生・増殖に働くこと、更に大腸癌において抗 PROK1 抗体によってリンパ管新生を抑制する新しい知見を見出したので報告する。</p>
関連キーワード
Prokineticin1、リンパ管、大腸癌、リンパ管侵襲、リンパ節転移

研究の背景および目的

WHO の附属機関国際がん研究機関(IARC)の世界がんレポート 2014(World Cancer Report 2014)によるとがんの発症数は毎年、約 11%増加しており、2012 年には 1,410 万例と推定されている。本邦において 2012 年の大腸癌の死亡者数は悪性腫瘍別統計において女性 1 位、男性第 3 位となっている。最近では手術技術の進歩や抗癌剤、分子標的治療薬など様々な薬剤により生存率の延長は認められるものの、未だに撲滅には至っておらず、この目的が達成されるにはさらなる転移機構の解明が瘳撲滅への近道と考えられる。

転移形式としてはリンパ行性転移、血行性転移、腹膜転移があり、その中で特にリンパ行性転移と血行性転移は高率に発生し易く、近年では血管新生をターゲットとした分子標的治療薬が開発され、実際の臨床に汎用されている。一方リンパ行性転移に関しては、詳細な研究はほとんど無く、新規機序の解明を含めた検討は不

可欠であると考えられる。

今回検討を行う Prokineticin1(PROK1) (別名 Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)) 因子はこれまでに当科を始めとして他施設からも悪性腫瘍の血行性転移に関わる報告が行なわれています(当科論文:Goi T, Yamaguchi A. et. al. Cancer Research 2004. Anticancer Research 2014. Oncotarget 2015.)

さらに私どもはリンパ管内皮細胞には PROK1 因子のレセプターである PK-R1, PK-R2 を発現すること、PROK1 蛋白質を加えると PROK1 因子の新機能としてリンパ管内皮細胞の増殖に関わることを見出した。

すなわち PROK1 因子によるリンパ管新生は悪性腫瘍におけるリンパ節転移、良性疾患としてのリンパ浮腫など多くの疾患に対する新しいメカニズムである可能性が高く、新規治療法へ発展する可能性が考えられる。

研究の内容および成果

-研究計画-

I. PROK1 因子によるリンパ管新生メカニズムの分子生物学的研究

(1) 正常リンパ管内皮細胞における PROK1 因子のレセプター:PK-R1, PK-R2 の発現

リンパ管内皮細胞に対して免疫組織化学染色法にて検討を行った。

(2) PROK1 蛋白質におけるリンパ管細胞増殖能の検討

正常リンパ管内皮細胞を PROK1 蛋白質の存在下と非存在下で培養して、10 日後における内皮細胞数の検討を行った。

II. 大腸癌におけるリンパ管新生とリンパ節転移機構分子生物学的研究

(3) PROK1 蛋白質におけるマウス皮下のリンパ管新生の検討(Dorsal air sac method)

PROK1 蛋白質を含んだ PBS 液をメンブレンチャンパー内に入れた後、マウスの皮下に挿入する。留置 3 週間後に接するマウス皮下を摘出して凍結切片を作製、リンパ管細胞染色抗体:抗 LYVE-1 抗体によって染色細胞数検の検討を行った。

(4) 抗 PROK1 抗体によるマウスの移植腫瘍におけるリンパ管増殖抑制の検討

高 PROK1 蛋白質発現型大腸癌細胞株と抗 PROK1 抗

体(当科作製)を matrix gel (BD Biosciences, USA) と後マウスの皮下に移植する。2週間後に腫瘍が形成された時点で腫瘍を摘出して凍結切片を作製、リンパ管細胞染色抗体: 抗 LYVE-1 抗体によって染色細胞数検の検討を行った。

-研究結果-

(1) リンパ管内皮細胞における PK-R1, PK-R2 の発現について

正常リンパ管内皮細胞において PK-R1, PK-R2 の発現が確認された。

(2) PROK1 蛋白質によるリンパ管内皮細胞増殖について

正常リンパ管細胞を PROK1 蛋白質にて刺激を加えると刺激後 10 日目では 678/HPF と刺激しない場合 (181 個/HPF) と比較して有意に増加することが認められた(図 1)。

(3) PROK1 蛋白質におけるマウス皮下のリンパ管新生の検討(Dorsal air sac method)

PROK1 蛋白質を含んだ PBS 液におけるリンパ管数は 22.6/HPF と PROK1 蛋白質を含まない場合 (15.4 個/HPF) と比較して有意に増加することが認められた(図 2)。

(4) マウスの皮下腫瘍に対する抗 PROK1 抗体によるリンパ管新生抑制効果について

マウスの皮下に大腸癌細胞株を移植し、腫瘍を形成した場合のリンパ管内皮の陽性細胞数は約 20 個/HPF であったのに対して、抗 PROK1 抗体を加えた場合には約 13 個/HPF と有意にリンパ管新生が抑制されることが認められた(図 3)。

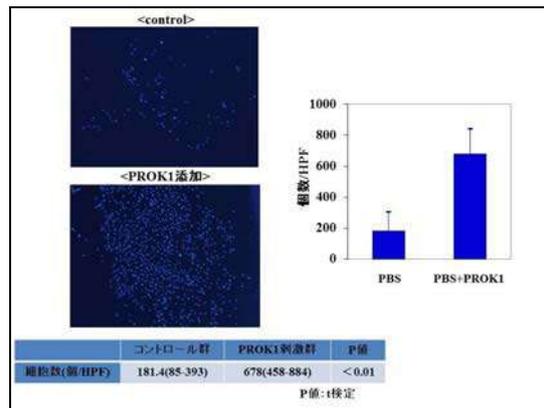


図 1. PROK1 によるリンパ管内皮細胞の増殖の変化

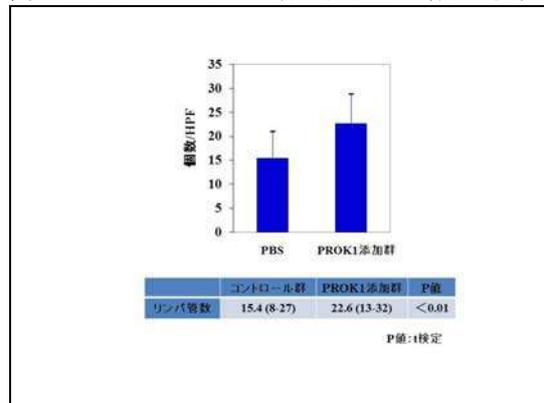


図 2. PROK1 蛋白質におけるマウス皮下のリンパ管新生の検討(Dorsal air sac method)

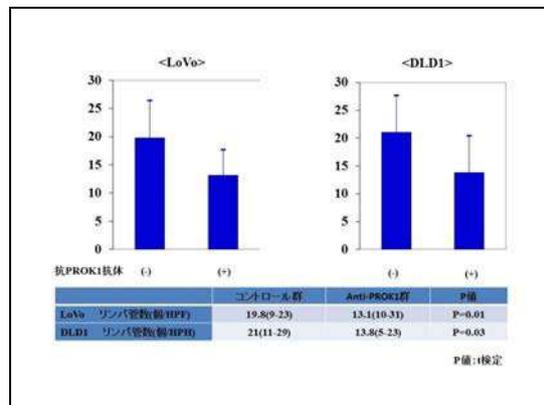


図 3. 大腸癌細胞株に対する抗 PROK1 抗体によるリンパ管新生の抑制

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

発表予定 学会発表

- 第 115 回日本外科学会定期学術集会: 発表
2015 年 4 月 16-18 日
- 第 74 回日本癌学会学術総会: 発表予定
2015 年 10 月 8-10 日

発表予定 論文発表

Prokineticin 1(PROK1) is an important factor for lymphogenesis in colorectal cancer. Goi T, Nakatani M, Aoki K, Yamaguchi A et al. 投稿準備中。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター
高ホモシステイン血症によるパーキンソン病αシヌクレイン重合促進機構の解明

研究代表者：濱野忠則（医学部・准教授）

共同研究者：医学部・第二内科・大学院生・白藤法道、同研究協力員・藤田祐之
 医学部・放射線医学講座・准教授・土田龍郎

概 要	<p>パーキンソン病(PD)は緩徐進行性に振戦、無動、固縮、歩行障害、姿勢反射障害などの運動障害を呈する代表的神経変性疾患であり、その頻度は10万人当たり100～150人に達する。これら運動障害のみならず、非運動症状として、うつ、認知症、突発性睡眠、そして高度の便秘や起立性低血圧をはじめとする多彩な自律神経症状を呈する。PDの治療薬としてL-Dopaが有効であるが、長期経過例では有効時間の短縮(wearing off)や、不随意運動(ジスキネジア)が出現し、L-Dopaの効果自体も徐々に乏しくなる。また抗PD薬は極めて高価であり、医療経済に与える影響も大きい。PDの特徴的病理所見は黒質ドーパミンニューロンを中心に形成されるレビー小体(LB)である。LBの構成要素はαシヌクレイン(αSyn)である。αSynはリン酸化やC末端の切断により重合が促進し、アルツハイマー病(AD)のタウ蛋白と極めて類似した性質を有する。PD患者ではHcyが概して高値であること、PD患者の脳萎縮、脳室の拡大の程度はHcy値と関連すること、さらにL-Dopaの投与によりHcy値がさらに上昇することが知られている。またマウスの腹腔内へHcyを投与することにより、PD類似の病理所見が形成されることが示された。これらの事実から、HcyがαSynの重合に何等かの影響を及ぼしている可能性が推察される。我々は、神経系細胞でのHcyがα-Synに及ぼす影響を検討した。Hcy投与後リン酸化αSynが増加していた。Hcyはカスパーゼ活性化を介しαSynのリン酸化、および重合を促進するものと推察している。さらに、臨床的には、PD患者でのHcyの定量を行ったところ、PD、およびレビー小体型認知症患者ではHcyが高値を示すことが明らかになった。</p>
関連キーワード	パーキンソン病、αシヌクレイン、ホモシステイン

研究の背景および目的

パーキンソン病(PD)は緩徐進行性に振戦、無動、固縮、歩行障害、姿勢反射障害などの運動障害を呈する代表的神経変性疾患であり、その頻度は10万人当たり100～150人に達する。これら運動障害のみならず、非運動症状として、うつ、認知症、突発性睡眠、そして高度の便秘や起立性低血圧をはじめとする多彩な自律神経症状を呈する。PDの治療薬としてL-Dopaが有効であるが、長期経過例では有効時間の短縮(wearing off)や、不随意運動(ジスキネジア)が出現し、L-Dopaの効果自体も徐々に乏しくなる。また抗PD薬はおしなべて高価であり、1日の薬価が1万円を超える患者も少なくなく、医療経済に与える影響も大きい。PDの特徴的病理所見は黒質ドーパミンニューロンを中心に形成されるレビー小体(LB)である。LBの構成要素はαシヌクレイン(αSyn)である。αSynはリン酸化やC末端の切断により重合が促進し、アルツハイマー病(AD)におけるタウ蛋白と極めて類似した性質を有する。葉酸、ビタミンB6、B12はホモシステイン(Hcy)をメチオニンに変換する際

の補酵素として働くため、これらの欠乏は高Hcy血症の原因となりうる。高Hcy血症は虚血性心疾患、脳梗塞のみならず、ADの危険因子となることが注目されている。PD患者ではHcyが概して高値であること、PD患者の脳萎縮、脳室の拡大の程度はHcy値と関連すること(Movement Disord 29, 368, 2014)、さらにL-Dopaの投与によりHcy値がさらに上昇することが知られている。またマウスの腹腔内へHcyを投与することにより、PD類似の病理所見が形成されることが示された(Neurotoxicology 26, 361, 2005)。これらの事実から、HcyがαSynの重合に何等かの影響を及ぼしている可能性が推察される。我々は、神経系細胞を用いHcy投与後のαSynのオリゴマー形成、リン酸化の促進につき検討した。さらに、神経内科外来、物忘れ外来患者の軽度認知障害(MCI)患者、およびパーキンソン病、あるいはレビー小体型認知症患者のHcy値につき検討した。

研究の内容および成果

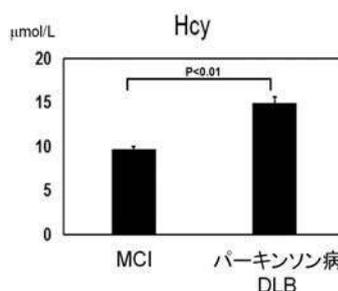
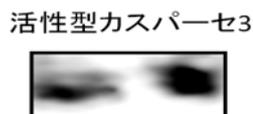
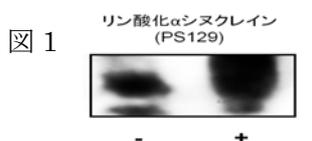
基礎研究として、以下の研究を行った。

ヒト神経芽細胞腫細胞 (M17-D cell) に対しホモシステイン(100 μ M)を投与したところ、リン酸化 α -Synの著しい増加が確認された(図1)。さらに、活性型カパーゼ3の増加が確認された(図2)。以上より、Hcyはカパーゼの活性化を介して α -Synのリン酸化を促進し、重合促進を行っている可能性が示唆された。

また、臨床的検討として以下の検討を行った。神経内科外来受診中の患者中軽度認知障害(MCI)患者とパーキンソン病、およびレビー小体型認知

症(DLB)患者での血中Hcyの測定を行い、比較した。MCI患者121例、パーキンソン病、およびDLB患者79例の比較では、パーキンソン病群でHcyの高値が認められた($p < 0.01$, Mann-Whitney U test)(図3)。

以上の結果から、高Hcy血症は α -Synの重合促進を介して、パーキンソン病の病態の形成促進を来すという機序が存在する可能性が示唆された。今後のこの分野における研究のさらなる進展が期待される。



本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「論文」

- 1) **濱野忠則**、白藤法道、栗山勝、中本安成:アルツハイマー病とホモシステイン. **ビタミン** 88(2), 92-96, 2014 (査読有)
- 2) Muramatsu T, Ikawa M, Yoneda M, Sugimoto K, Matsunaga A, Yamamura O, **Hamano T**, et al., Pathophysiological decrease in the regional cerebral blood flow in Hashimoto's encephalopathy: a multiple-case SPECT study. **Eur Neurol** 2014;72:13-9.(査読有)
- 3) Saito Y, Matsunaga A, Yamamura O, Ikawa M, **Hamano T**, et al., [A case of left hemi-facial metamorphopsia induced by infarction of the right side of the splenium of the corpus callosum]. **Rinsho Shinkeigaku**. 2014 54(8):637-42 (査読有)
- 4) **Hamano T**, **Shirafuji N**, et al. Prevention of Tau Aggregation by Pioglitazone Through GSK3 β and Caspase3 Inactivation. in submission.
- 5) **Shirafuji N**, **Hamano T**, et al., Homocysteine induces tau aggregation via caspase activation, in submission.

「学会発表」

- 1) **Shirafuji N**, **Hamano T**, et al., ROCK inhibitor decreases phosphorylation levels of tau protein. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2014 July 11-17 in Copenhagen) **Alzheimer's Dementia** 2014: 10(4), Supple, P145-P146.
- 2) **Fujita Y**, **Hamano T**, et al., Chronic hypoperfusion induces tau hyperphosphorylation accompanied by axonal in adult mice. AAIC 2014 July 11-17, in Copenhagen) **Alzheimer's Dementia** 2014: 10(4), Supple, 2014, P789

競争的資金・研究助成への獲得状況

- 1) **科学研究費補助金代表** 基盤C 2013年から2015年 **濱野忠則** 分担研究者 **白藤法道**、内木宏延 タウ蛋白オリゴマーが誘導するアルツハイマー病の分子機序の解明 臨床への応用 採択
- 2) **科学研究費補助金** 基盤C 2015年から2017年 **研究代表** **白藤法道** 分担研究者 **濱野忠則** ホモシステインが促進するアルツハイマー病・タウ蛋白オリゴマー形成機序の解明(15K08904) 採択

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター
**新規生理活性物質の生産に向けたコルジセピンの
 高効率生産に関する研究**

研究代表者： 櫻井 明彦（工学研究科・教授）

概 要	冬虫夏草の一種であるサナギタケ (<i>Cordyceps militaris</i>) に固有な生理活性物質であるコルジセピンの生産について、回転円板型培養器を用いて検討した。その結果、菌体の増殖に関しては培養器内部の円板素材として、レーヨンやポリオレフィンを主成分とする不織布を用いた場合に高い増殖量が得られた。一方、コルジセピンの生産に関してはナイロンを主成分とする織物を用いると不織布に比べて増殖量は低下するが、コルジセピン生産量は増加することが明らかとなった。円板の回転速度に関しては、酸素の供給と剪断力のバランスの面から、5rpm がコルジセピンの生産に適していることが明らかとなった。さらに反復回分培養によるコルジセピン生産が可能であった。
関連キーワード	冬虫夏草、 <i>Cordyceps militaris</i> 、抗腫瘍物質、コルジセピン、回転円板型培養器

研究の背景および目的

冬虫夏草サナギタケが生産する固有成分であるコルジセピン (3'-デオキシアデノシン、図1) は、生体内でアデノシンのアナログとして働き、核酸の伸長を阻害することにより抗腫瘍作用を発揮する。*in vitro* 実験では多くのガン細胞に対して抗腫瘍性を示すことが報告されているが、天然のサナギタケの資源量が少ないこと、さらに子実体中のコルジセピン含有量が非常に低いことから工業的な生産には至っていない。また、コルジセピンは *in vivo* 実験では生体内でアデノシンデアミナーゼにより分解されるため、その効果が *in vitro* に比べて低下することが知られている。このため、コルジセピンの大量生産技術および生体内での有効性の高いコルジセピン誘導体の開発が期待されている。

コルジセピンの生産技術については、冬虫夏草の菌糸体培養による生産が中国や韓国を中心に精力的に検討されているが、通常の振盪培養法や深部培養法ではコルジセピンの生産性は極めて低く、その生産性は実用レベルには達していない。これらの培養法によるコルジセピン生産性が低い原因としては、冬虫夏草の機械的ストレスに対する弱さがある。このため、当研究室では、静置培養である液体表面培養法により、コルジセピンの生産条件を検討してきたが、その生産速度は低く、またスケールアップが難しい。そこで、本研究では液体表面培養と深部培養の両方の特徴を備え、比較的スケールアップが容易な回転円板型培養器(図2)を用いて、コルジセピンの高効率生産条件を検討した。回転円板型培養器では菌体を円板上に固定し、円板を低速で回転させることにより、菌体を培養器下部の液相(培地)と上部の気相に移動させ、菌体に栄養分と酸素を供給することが可能である。このため通常の通気攪拌培養と

異なり、培養液の攪拌が不要となり菌糸体にかかる機械的ストレスを大幅に低減することが可能となる。また、菌体が固定化されているため培養液の入れ替えが容易であり、反復回分培養法により生産性を大幅に向上できる可能性がある。

本研究の最終目的は、新規な生理活性物質としてコルジセピンの誘導体を合成し、その生理活性性質を評価することである。本年度は、新規生理活性物質の原料となるコルジセピンの高効率生産条件を確立することを目標として、回転円板型培養器によるコルジセピン生産条件の検討を行った。

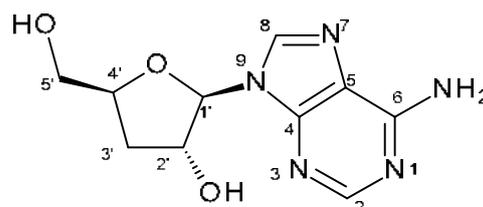


図1 コルジセピンの構造



図2 回転円板型培養器

研究の内容および成果

【実験方法】

コルジセピン生産菌として、冬虫夏草（サナギタケ）をイオンビームにより変異させた *Cordyceps militaris* G81-3 株を用いた。回転円板型培養器は、内径 15cm 長さ 20cm の横置き円筒型で、容積は約 3.5L である。内部中心シャフトには菌体固定化用の円板を等間隔に 9 枚設置し、これをマグネチックカップリングにより無菌的に駆動した。円板回転速度は、2~10rpm の範囲に設定した。菌体を回転円板型培養器内に固定化するための円板素材としては、不織布として EW4980、ED8350、OA12529、T3、T3P、T100P（日本バイリーン製）、メッシュ織物として HA5960W（八田経編製）を用いた。培養液には、グルコース 86.2g/L、Bacto yeast extract 93.8g/L を主成分とするものを用いた。円板素材への菌糸体の付着性（固定化性）については、振盪培養法を用いて評価した。

【円板素材の影響】

ナイロンを主成分とする HA5960W やレーヨン主成分とする EW4980、ED8350 に比べてポリオレフィン主成分とする T100-P や T3P、T3-nP への菌体付着性が高いことが分かった（図 3）。最も高い菌体付着量は T3-nP で得られたが、加圧蒸気滅菌時（121℃、15 分間）の寸法安定性が悪いことから、T100-P を回転円板型培養器用の最適な円板素材として選択した。また、不織布とは構造が異なるメッシュ織物 HA5960W についても、円板素材としての可能性を評価した。コルジセピンの生産性について比較したところ、培養初期の生産性は同等だが、菌糸体付着量の多い T100-P では培養の後半からコルジセピン生産性が低下するため、メッシュ織物の H5960W の方がコルジセピン生産に適していることが明らかとなった（図 4）。

【円板回転速度の影響】

次に円板回転速度とコルジセピン生産性の関係について反復回分培養法により検討した（図 5）。2rpm から 5rpm に回転速度を高めると、空気中から培養液中への酸素の供給速度が高くなったためコルジセピン生産性が高くなったと考えられる。さらに回転数を高めた 10rpm では酸素の供給速度は高くなるが、剪断力による菌体の損傷によりコルジセピン生産性が低下したと考えられる。

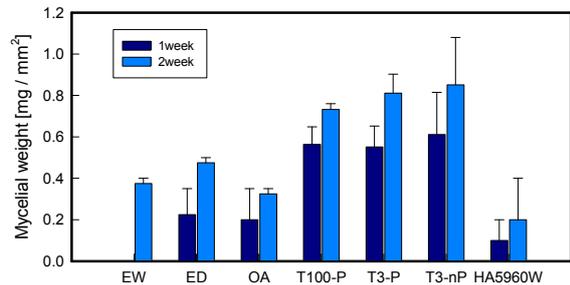


図 3 円板素材と増殖量との関係

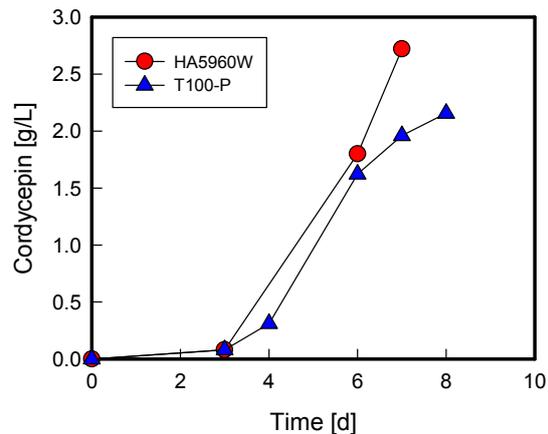


図 4 回転円板型培養器によるコルジセピンの反復回分生産

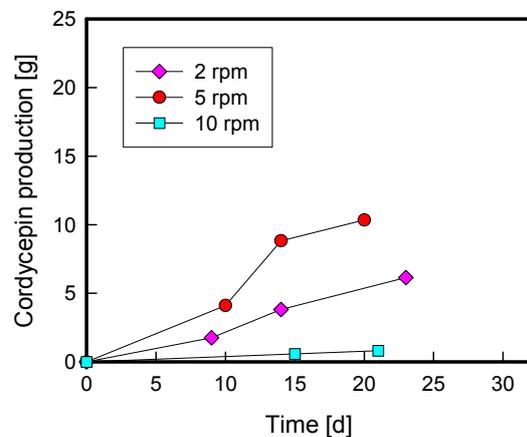


図 5 円板回転速度とコルジセピン生産性の関係

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Mina Masuda, Masanori Hatashita, Shinya Fujihara, Yu Suzuki, Akihiko Sakurai: Simple and efficient isolation of cordycepin from culture broth of a *Cordyceps militaris* mutant, Journal of Bioscience and Bioengineering (submitted)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

JST・A-STEP・FS ステージ・探索タイプ・2014

年 12 月～2015 年 11 月・冬虫夏草変異株を用いた生理活性物質コルジセピンの大量生産法の開発・分担・採択・170 万円

JSPS・科研費・基盤(C)・2015 年 4 月～2018 年 3 月・冬虫夏草変異株による天然コルジセピン誘導体の生産及び新規コルジセピン誘導体の合成・代表・申請中・498 万円

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター オンサイト型有害微生物検出装置

研究代表者：末 信一郎（工学研究科・教授）

共同研究者：里村武範（工学研究科・准教授）、坂元博昭（テニユアトラック推進本部・講師）

概 要	MRSA の DNA をターゲットとし、磁気ナノ粒子(MNP)と金ナノ粒子(AuNP) の 2 種類のナノ粒子を用いたセンシングシステムの構築を行った。MRSA 固有の塩基配列である <i>mecA</i> 領域と相補的な塩基配列を持つ 2 種類のプローブを設計し修飾ナノ粒子を調製した。MRSA より抽出したゲノム DNA とプローブをハイブリダイゼーションさせ得られた複合体を磁気分離によって回収、洗浄を行い測定用試料とした。PQQ 依存性グルコース脱水素酵素を用いた酵素電気化学反応を行い試料中のフェロセン誘導体に基づく酸化電流を測定した結果、フェロセン誘導体に基づく酸化電流値がターゲット DNA 量に依存して得られた。また、測定操作の簡便化のためハイブリダイゼーション、磁気分離等のプロセスを流路内に組み込んだマイクロ流路チップを設計、作製した。チップ内で反応を行い、回収した複合体の電気化学的応答を測定した結果、100 pM のターゲット DNA の検出が可能であった。
関連キーワード	バイオセンサ、DNA センサ、 μ TAS、MRSA

研究の背景および目的

食品や環境への有害微生物による汚染は深刻な問題である。その中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は院内感染の原因菌であるが、 β -ラクタム系抗生物質への耐性を獲得しているために感染に対する防疫処置は困難である。そのため適切な処置を施すために MRSA をはじめとする有害微生物に対する迅速かつ簡便な検出手段が求められている。従来、有害微生物の検出に用いられてきた培養法やリアルタイム PCR 法はともに高い感度を有している。しかし、培養法では検出結果が得られるまでに数日を要すること、リアルタイム PCR 法では装置自体が高価かつ大型であり、研究室外の現場での測定では実用性に欠けること等が欠点として挙げられる。そこで近年、on-site 分析を目的とし、装置が小型かつ操作が容易といった利点を有する電気化学的手法を用いた DNA センシングシステムの開発が進められている。しかし、

これまでに報告されている検出法の多くは合成 DNA をターゲットとして検出を行っており、実際の臨床サンプルを用いた有害微生物の検出のためには試料から抽出した DNA の増幅が必要である。

そこで、本研究では MRSA より抽出した DNA をターゲットとし、磁気ナノ粒子 (Magnetic nanoparticle: MNP) と金ナノ粒子 (Gold nanoparticle: AuNP) の 2 種類のナノ粒子を用いた DNA センシングシステムの構築を試みた。また、PCR 等によるターゲット DNA 増幅なしでの測定を可能にするために、L-プロリン脱水素酵素 (LPDH) と L-プロリンを電流増幅の目的で使用した。さらに臨床現場等での on-site 分析を目的とし、マイクロ流路チップを用いた Micro Total Analysis System (μ TAS) の構築についても検討した。

研究の内容および成果

[実験]

1. プローブ及びプローブ/フェロセン誘導体修飾ナノ粒子とターゲット DNA のハイブリダイゼーション

MRSA 固有の塩基配列である *mecA* 領域と相補的な塩基配列を持つ 2 種類のプローブを設計し、MNP にはプローブ、AuNP にはプローブ/フェロセン誘導体を標識することで修飾ナノ粒子を調製した。MRSA よりゲノム DNA を抽出し、熱処理により 1 本鎖 DNA を得た後に、修飾 MNP、AuNP を混合し、45°C で反応させることによりプローブとターゲット DNA をハイブリダイゼーションさ

せた。得られた複合体を磁気分離によって回収、洗浄を行い、測定用試料とした(図 1)。

2. 測定サンプルの電気化学測定

電気化学測定は対極、参照極、作用極をもつ 3 電極型スクリーンプリント電極(SPE)を用いて行った。+250 mV の電位を印加することでクロノアンペロメトリ法により測定サンプル中のフェロセン誘導体に基づく酸化電流を測定した。また、この酸化電流を増幅するために LPDH と L-プロリンを用いた。

[結果及び考察]

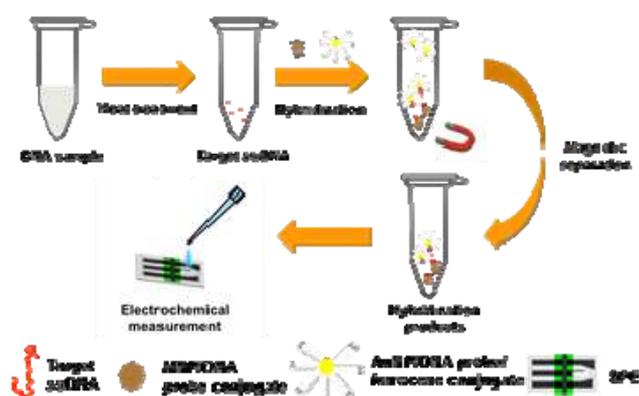


図1. DNA抽出からハイブリダイゼーション、磁気分離、電気化学測定までの工程

測定サンプルの電流応答を測定した結果、測定サンプル中に含まれるフェロセン誘導体に基づく酸化電流値がターゲット DNA 量に依存して得られた。その結果、検出限界は 20.0 pM であり、20.0-166 pM の間で良好な直線性を有していた(図2)。一方、黄色ブドウ球菌、大腸菌由来ゲノム DNA を用いた測定では電気化学的応答は得られず、本システムが MRSA に対する高い選択性を有していることが確認された。

しかし、on-site 分析への応用を考慮すると、測定に要する時間の短縮、検出感度の向上を検討する必要がある。まず測定時間を検討したところ、反応時間の増加とともに電流応答も増加する傾向が確認された。また、10 分間のハイブリダイゼーション時間でも従来の 2 時間と比較して 70% の応答が得られたため、迅速な操作性を考慮して以降はハイブリダイゼーション時間を 10 分間とした。

次に検出感度を向上する目的で LPDH と比較して比活性が約 240 倍高い PQQ 依存性グルコース脱水素酵素(PQQ-GDH)についても増幅反応酵素としての可能性を検討した。その結果、150 pM のフェロセンカルボン酸において酸化電流値が LPDH と比較し PQQ-GDH では約 12 倍向上した。これより、システムに用いる酵素は PQQ-GDH とした。この 2 点の検討を踏まえ再度測定を行ったところ、従来の測定時間を 110 分短縮し、検出限界は 20 倍向上させることに成功した。

また、測定操作の簡便性のためにハイブリダイゼーション、磁気分離等のプロセスを流路内に組み込んだマイクロ流路チップを設計、作製した。チップ内で反応を行い、回収した複合体の電気化学的応答を測定した結果、100 pM のターゲット DNA を検出することが可能であった。

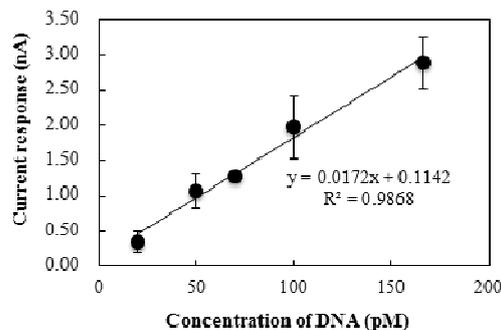


図2. DNA に対する検量線
各濃度の試料につき 3 回測定

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- (1) K. He, X. Wang, X. Meng, H. Zheng, S. Suye, Amperometric determination of hydroquinone and catechol on gold electrode modified by direct electrodeposition of poly (3,4-ethylenedioxythiophene) *Sensors and Actuators B*, 193 (2014) 212– 219.
- (2) H. Sakamoto, H. Asakawa, T. Fukuma, S. Fujita, S. Suye, Atomic force microscopy visualization of hard segment alignment in stretched polyurethane nanofiber prepared by electrospinning. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 15 (2014) 015008-015014
- (3) A. Koto, S. Taniya, H. Sakamoto, T. Satomura, H. Sakuraba, T. Ohshima, S. Suye Efficient Direct Electron Transfer for a Highly Oriented PQQ-GDH Immobilized Electrode for Bioanode. *J. Biosens. Bioelectron.*, 5, (2014)
- (4) K. Watanabe, N. Kuwata, H. Sakamoto, Y. Amano, T. Satomura and S. Suye, A smart DNA sensing system for detecting

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using modified nanoparticle probes, *Biosens. Bioelectron.*, 67, 419-423 (2014)

- (5) X. Zhou, Y. Song, K. He, H. Zheng, S. Suye Electrochemical Behavior of Glucose Oxidase on Gold Electrode modified by poly (3, 4-ethylenedioxy-thiophene) *Ad. Mat. Res.*, 1044-1045 (2014) pp 39-42

「主な学会発表」

- (1) 渡邊 和也, 桑田 典明, 里村 武範, 坂元 博昭, 末 信一郎、プローブ修飾ナノ粒子を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の電気化学的 DNA バイオセンシング 第 66 回生物工学会大会 P-251 2014.9.11 (札幌) などその他 1 件 (国際会議) 発表予定 1 件 (国内)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

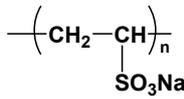
- (1) 共同研究 TOWA 株式会社 2016 年 4 月 1 日 ~2017 年 3 月 31 日 高感度バイオセンシングシステムのチップ化を目的とした技術開発 分担 1,000,500 円

福井大学
産学官連携本部
平成26年度実用化研究助成
(FUNTECフォーラム
福井大学研究シーズ
紹介ポスター発表)

ポリエチレンスルホン酸ナトリウムの合成と重合機構の解明

福井大学 工学部 材料開発工学科 小川 幸大・橋本 保

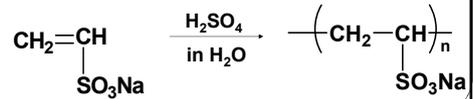
Introduction



- ・医薬品として使用されている血行促進剤である
- ・医薬品としての効能には適切な分子量がある
- ・合成方法は一般に開始剤を用いたラジカル重合である



水溶液重合であるにもかかわらず、カチオン開始剤である硫酸を用いて重合する製造法が存在する。しかしこの製造法では安定して望みの分子量のポリマーが得られない。

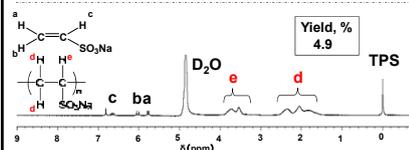
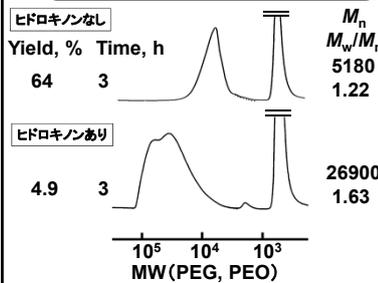
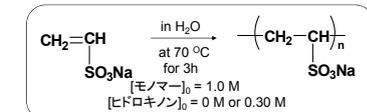
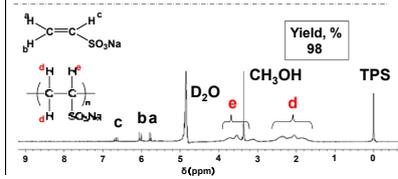
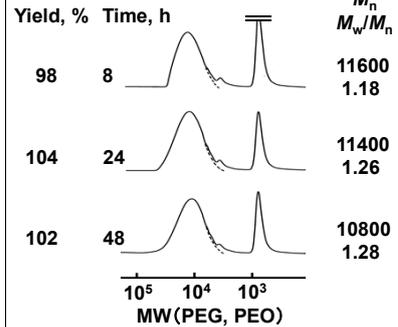
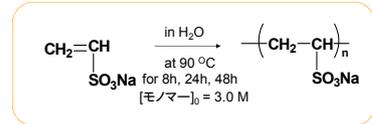
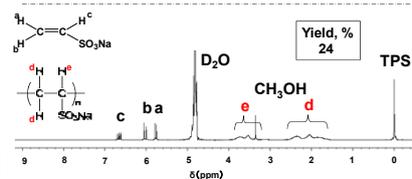
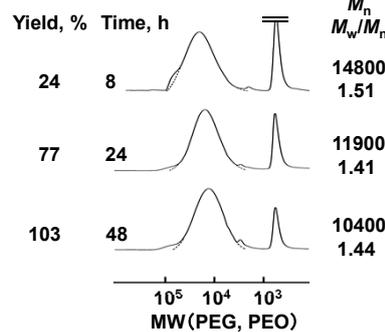
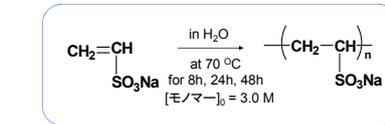
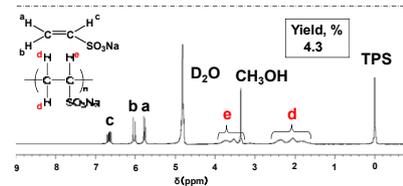
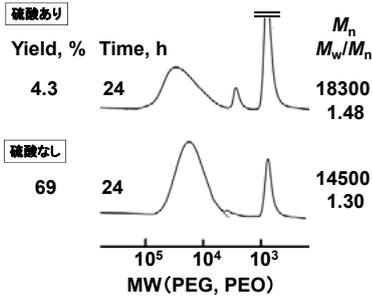
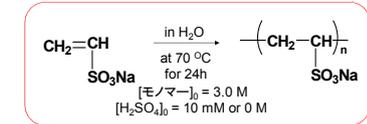


ポリエチレンスルホン酸ナトリウム

This Study

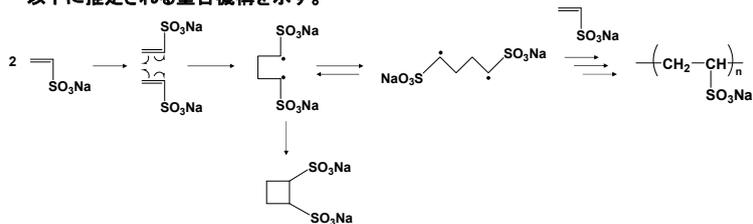
- ・硫酸あり、硫酸なしの条件でそれぞれ重合し、硫酸が重合に関係しているかを検討した。
- ・様々な重合条件下で重合を行い、高収率かつ分子量が規制されたポリエチレンスルホン酸ナトリウムの合成方法を検討した。
- ・ラジカル重合禁止剤(ヒドロキノ)の存在下、重合が進行するかどうかを調べた。

エチレンスルホン酸ナトリウムの重合



Conclusion

- ・エチレンスルホン酸ナトリウムは硫酸なしで重合し、ポリエチレンスルホン酸ナトリウムを生成することがわかった。
- ・重合時間の増加とともに、収率が增大することがわかった。
- ・重合温度の上昇とともに、重合速度が増加することがわかった。
- ・ラジカル重合禁止剤(ヒドロキノ)の存在下重合すると、収率が著しく低くなることがわかった。よって、この重合の機構は、無触媒ラジカル重合であると考えられる。以下に推定される重合機構を示す。¹⁾



¹⁾ 蒲池 幹治, 遠藤 剛, ラジカル重合ハンドブッケー基礎から新展開まで. エヌ・ティ・エス, p.336 (1999).

FUNTEC フォーラム 2015.2.5

インプラント型補聴器用超磁歪骨伝導振動子の試作

福井大学大学院 工学研究科 情報・メディア工学専攻 森 幹男

背景

補聴器利用者は、必要者の18%に満たない

補聴器の問題点(装着者の意見*)

- ・閉塞感があり不快
- ・ハウリングが生じ易い
- ・装着していると目立つ

*全国補聴器専門店認定協会補聴器供給システムの在り方研究会, “適正な補聴器普及のための供給システムに関する調査研究” 3年次報告書(2004)より

そこで, 「インプラント型補聴器」の提案

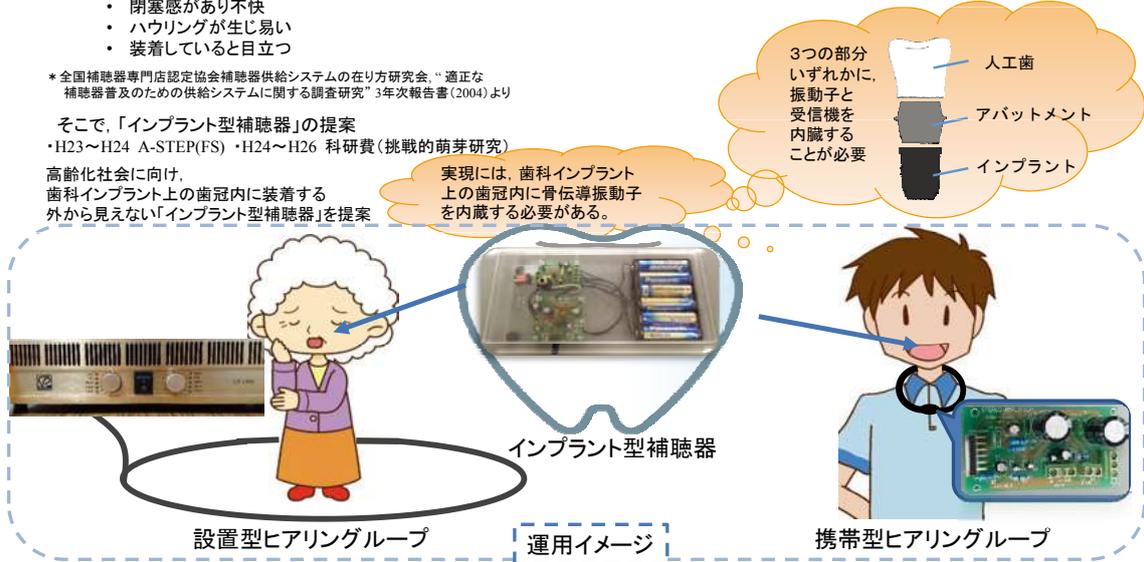
・H23~H24 A-STEP(FS) ・H24~H26 科研費(挑戦的萌芽研究)

高齢化社会に向け, 歯科インプラント上の歯冠内に装着する外から見えない「インプラント型補聴器」を提案

実現には, 歯科インプラント上の歯冠内に骨伝導振動子を内蔵する必要がある。

解決すべき課題

- ・骨伝導振動子の小型化 → 超磁歪骨伝導振動子の試作
- ・駆動するための電池の小型化 → 充電可能なボタン電池+ 充電
- ・外部マイクロホンとの通信 → 電磁誘導を用いた無線化



骨伝導振動子の方式

骨伝導振動子の方式と各方式の比較

方式	簡単な説明	厚み	周波数特性	駆動力
圧電式	結晶に, 電圧を加えることで変形する現象を利用	○ (薄い)	×	×
電磁式	コイルとマグネットとの相互作用による駆動力を利用	×	○	×
超磁歪式	磁場による素子の形状変化を利用	×	○	○

超磁歪骨伝導振動子を用いる。振動子の小型化が課題。

検討結果

先行研究: BAHA(スウェーデン)

骨に直接ネジで固定して直接骨に振動を伝える方式ではBAHA (Bone Anchored Hearing Aid, 埋め込み型骨導補聴器) が販売されているが, 外科手術により頭蓋骨にチタン製の台座を埋め込む必要がある。また, 外から見えないという問題点もある。

・骨伝導振動子の小型化 → 超磁歪骨伝導振動子の試作



・外部マイクロホンとの通信 → 電磁誘導を用いた無線化

磁気誘導を用いた無線化

- ・ループ状の電線に音を電気信号として流し, 受信用のコイルで受信。
 - ・磁界の人体への影響はICNIRPにより安全基準が決められている。
- 磁気誘導を用いた無線通信装置を試作し, 30Hz~100kHzの周波数でセラミック(人工歯の素材)が磁界に影響を与えないことを確認した。

無線化の方式と各方式の比較

方式	安全性	変調	制約
Bluetooth	○ (61V/m以下)	必要	ペアリングが必要
人体通信	○ (4mA以下)	必要	電極の装着が必要
磁気誘導	○ (27μT以下)	不要	向きによって感度が変化



謝辞

本研究は科学研究費補助金挑戦的萌芽研究(課題番号:24650081), 福井大学平成26年度実用化研究の助成を受けて行った。

連絡先

福井大学大学院工学研究科 情報・メディア工学専攻 森 幹男
E-mail : mikoi@u-fukui.ac.jp Tel : (0776) 27-8444

FUNTECフォーラム2015

高密度励起による固体レーザーの高効率化

京元 敬介†, 森岡 元希††, 西尾 正敏†, 丸小 淳幸†, 奥西 弘旭†, 加唐 賢人†, 吉田 武志†, 嶋林 恭輔†, 稲吉 真一††, 山形 沙由美††, 川戸 栄††††

† 福井大学工学研究科
†† 福井大学工学部

††† 福井大学生命科学複合領域教育研究センター

1. Introduction

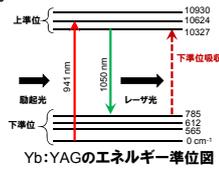
フェムト秒領域のパルス幅を持つ超短パルスレーザーはさまざまな産業や生体・医療応用が期待されている。これらの応用のために短パルス化、高効率化、小型化、安価、安定化が必要である。これらの特性を達成可能なものとして、イッテルビウムレーザーが注目されており、様々な研究開発が進んでいる。しかし、従来技術では、極低温下(10~100 K)でなければ高効率化を達成できず、室温という実用的な条件における高効率化が課題であった。

これに対して本グループは、高密度励起を用いたレーザー媒質の高利得化によって、室温で克服できる技術を開発し、世界最高かつ原理的効率の限界である量子効率(～90%)に近い効率(励起光-レーザー光変換効率85%)を室温において達成するなど、イッテルビウムレーザーの高効率化に成功した。本技術は、室温において高効率化を実現できるため、従来法に比べて実用性が高い。本技術を実用化するためには、励起光源として実用的な半導体レーザーを用いる必要がある。しかし、半導体レーザーの出力ビームには高密度励起には望ましくない特性があるため、この特性の補償・改善を行う必要がある。



Characteristics of Yb:YAG††

	Mt:YAG	Yb:YAG
Wave length [nm]	808	941
Cross section[10 ⁻²⁰ cm ²]	5.8	0.77
Band width [nm]	1.5	2.1
Wave length [nm]	1064	1030
Cross section[10 ⁻²⁰ cm ²]	2~6.5	0.33
Life time [ms]	~0.23	0.96
Band width [nm]	0.67	0.5
Quantum efficiency η _{sp}	~0.70	0.81



再吸収損失
→極低温(～100 K)への冷却
高密度励起(～100 kW/cm²)
により閾値の低下、結合効率の向上

解決すべき課題

- 半導体レーザーの集光技術
半導体レーザーの欠点:非点収差, 楕円ビーム, 低ビーム品質
→励起密度の低下, 結合効率の低下, 発振閾値の上昇
○高密度励起に最適な集光-集光強度の向上
- 収差の補償
励起光:楕円ビーム, レーザー:円形ビーム
→励起光とレーザービームのモードマッチング効率が低下する
○励起光の収差を補償するレーザー共振器:楕円レーザービーム
→モードマッチング効率の向上

実施内容

固体レーザーの高効率化を、半導体レーザーを励起光源として行う
実施事項:励起用集光光学系の開発, 非点収差補償共振器の開発
目標: 集光強度:100 kW/cm²以上, 発振閾値:300 mW以下
スロープ効率:70%以上, 励起光-レーザー光変換効率:60%以上,
平均出力:1 W以上

2. Laser efficiency

- Output power
- Mode-matching efficiency

$$P_{out} = \eta_s (P_p - P_{th})$$

$$\eta_s = \eta_a \eta_p \eta_q \eta_c \eta_m$$

- η_a: 吸収効率
- η_p: 励起量子効率
- η_q: 原子量子効率
- η_c: 結合効率
- η_m: モードマッチング効率

$$\eta_m = \frac{1 + B \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\Phi_0}{1 + S\Phi_0} dV}{F \int_{-\infty}^{\infty} \frac{(F_{rp} - B)\Phi_0^2}{(1 + S\Phi_0)^2} dV}$$

- Φ₀: レーザー光の空間分布関数
- B: 下単位吸収損失比
- F: 励起指数
- F_{rp}: 励起光の空間分布関数
- S: 利得媒質内光子指数

高効率化にはスロープ効率:η_sの向上,
閾値:P_{th}の低減が必要
スロープ効率:η_sの向上には、量子効率:η_pη_q
モードマッチング効率:η_mの向上が必要



3. Theory

共振器条件
アーム長 : L = 90 mm
ミラー曲率 : r = 100 mm
結晶長 : t = 1 mm
出力鏡反射率 : R = 98%

励起条件
集光径 : 31 μm × 65 μm
励起波長 : 941 nm
励起パワー : 1.77 W
ビーム品質M² : 1.7 × 6.1
最大集光強度 : 110 kW/cm²

使用したマイクロチップYb:YAG結晶

2θ = 13°のとき
最大モードマッチング効率η_m = 86%
スロープ効率η_s = 74%
→高効率動作が期待できる

4. Experiment

CW発振時の入出力特性

発振閾値:250 mW, 発振波長:1050 nm,
励起パワー:1.77 W (集光強度:110 kW/cm²)において,
最大出力:1.27 W, ビーム品質:1.6 × 1.6,
スロープ効率:η_s = 77%, 光-光変換効率:η_o = 72%

→LD励起Yb:YAGレーザーの高効率CW発振

5. Summary

集光強度:100 kW/cm²以上, 発振閾値:300 mW以下, スロープ効率:70%以上,
励起光-レーザー光変換効率:60%以上, 平均出力:1 W以上より, 半導体
レーザーのビーム特性に合わせた集光条件の最適化により, 高密度励起を実現で
きた。また, 励起光の収差に合わせたレーザー共振器の収差の最適化により, ス
ロープ&モードマッチング効率の向上を実現できた。

6. Reference

[1] L. D. DeLoach, "Evaluation of absorption and emission properties of Yb³⁺ doped crystals for laser applications," IEEE J. Quantum Electron. QE-29, 1179-1191 (1993).
[2] A. Gassen, H. Hugel, A. Voss, K. Witting, U. Brauch, and H. Opower, "Scalable concept for diode-pumped high-power solid-state lasers," Appl. Phys. B 58 (1994), pp. 355-372.
[3] Rigo Peters, Christian Kränkel, Klaus Petermann, and Günter Huber, "Broadly tunable high-power Yb:Lu₂O₃ thin disk laser with 80% slope efficiency," Opt. Express, Optical Society of America (2007), Vol. 15, No. 11, pp. 7079-7092.
[4] Y. Jeong, J. K. Sahu, D. N. Payne, and J. Nilsson, "Ytterbium-doped large-core fiber laser with 1.36 kW continuous-wave output power," Opt. Express, Optical Society of America (2004), Vol. 12, No. 25, pp. 6088-6092.
[5] S. Matsukawa, T. Ueda, T. Takamido, S. Kawato, and T. Kobayashi, Tech. Dig. Conf. Laser and Electro-Optics/Quantum Electronics and Laser Science, and Photonic Applications, Systems and Technologies 2005, p. CM33.
[6] Shirochi MATSUBARA, Tsutomu UEDA, Shiro KAWATO, and Takao KOBAYASHI, "Highly Efficient Continuous-Wave Laser Oscillation in Microchip Yb:YAG Laser at Room Temperature," JAP Express Lett. Vol. 46, No. 7(2007), pp. L132-L134

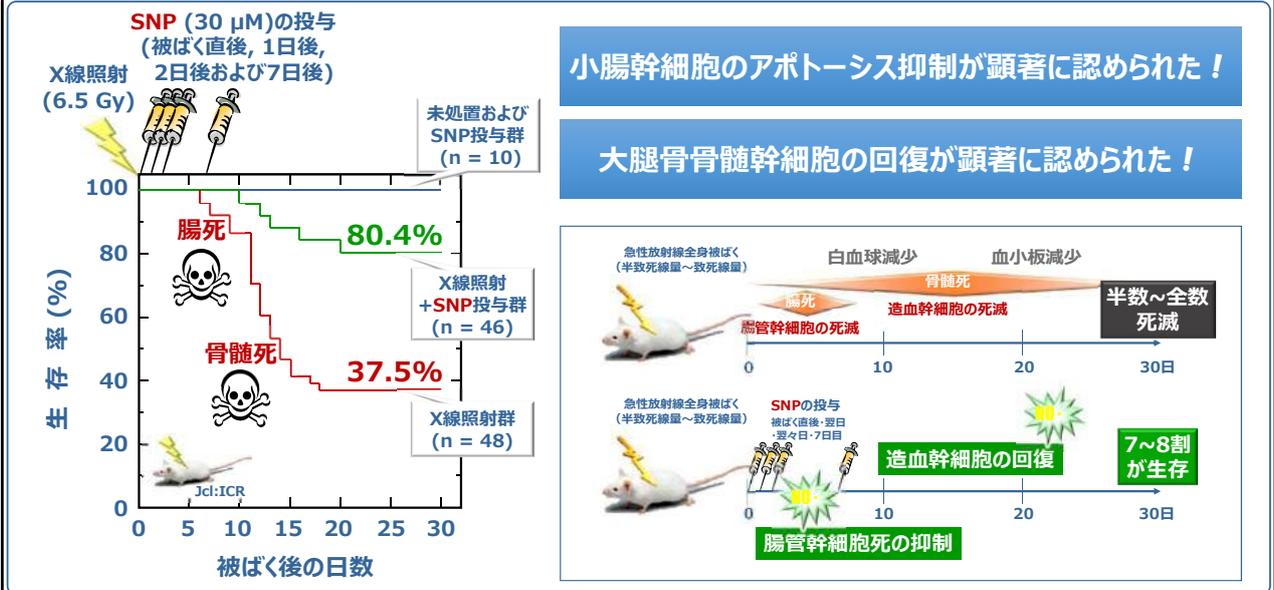
放射線障害に対する防護/治療作用を有する新規ニトロ製剤の探索

松本 英樹

福井大学 高エネルギー医学研究センター がん病態制御・治療部門
hidekim@u-fukui.ac.jp



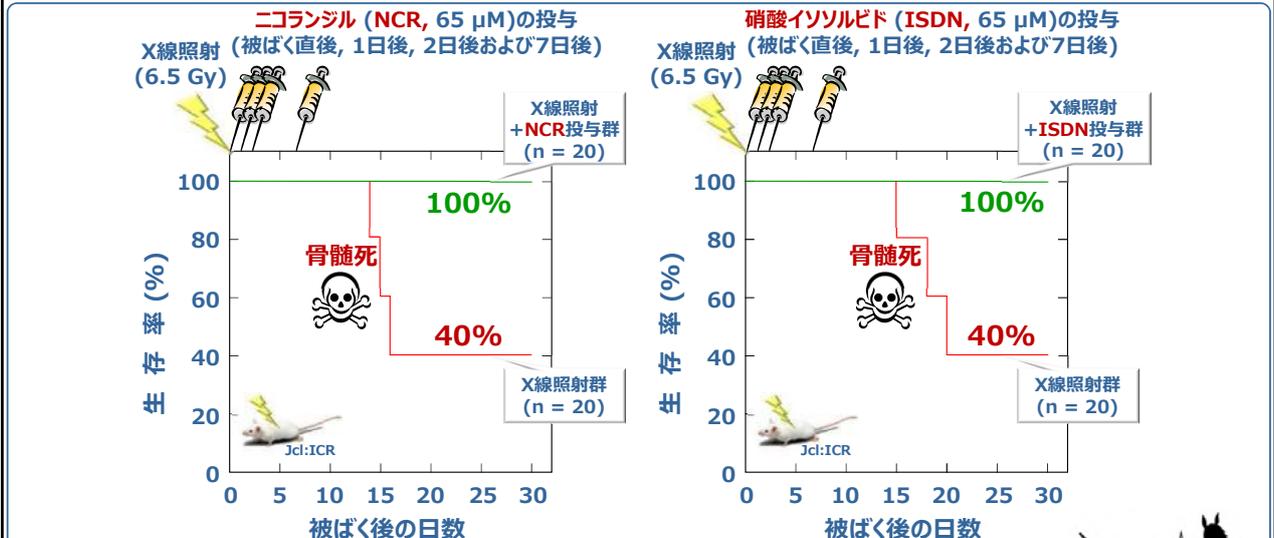
今までの研究成果 正常マウス(Jcl:ICR)を用いたニトロプルシドナトリウム(SNP)の放射線障害防護能試験



解決すべき課題 ニトロプルシドナトリウム(SNP)に含まれるシアン残基に起因する投与量制限および中毒回避

(独)医薬品医療機器総合機構から手術時の血圧降下剤として認可を受けているSNPにX線による放射線障害の防護/治療作用があることを明らかにした。しかし緊急被ばく救命処置薬としてSNPを実用化するには、SNPに含まれるシアン残基に起因する投与量制限および中毒回避という問題を解決しなければならない。

研究成果 新規ニトロ製剤による、より安全な緊急被ばく救命処置薬/放射線障害予防薬の探索結果



シアン残基を含まないニトロ製剤にも放射線障害防護効果が認められた!
さらに放射線防護効果の機構解明が今後の課題となる。



産学官連携本部
実用化研究助成

搬送傷病者の身体的影響を軽減する3次元救急車用搬送ベッドの開発

福井大学大学院 機械工学専攻 准教授 新谷真功

産学官連携本部
実用化研究助成

目的

救急車の加速度が搬送病者に与えるストレスを、**唾液アミラーゼモニター**により数値化を行う。

ストレス値の測定

唾液アミラーゼモニターを用いる。
・ ストレスを感じることで分泌されるアミラーゼを唾液から測定する



被験者(22~24歳の学生8名)の唾液アミラーゼ定常値: 4~12 KU/L

実験の内容

- ① 45km/hから急停車(3回)
停車直後と停車してから1分ごとに唾液アミラーゼを測定し、ピーク値が出るタイミングを調査
- ② 急発進(3回)
加速終了時から、唾液アミラーゼを2~5分ごとに測定(①の結果により測定タイミングは変動)
- ③ 40, 50km/hから急停車(各3回)
唾液アミラーゼ測定タイミングは②と同じ



実験風景



加速度のパターン

加速度の最大値より走行パターンを4つに分類する

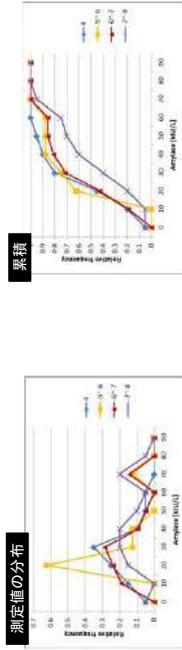


実験結果

1. 唾液アミラーゼの時間変化



2. 唾液アミラーゼ測定値の頻度分布



-7~-8m/s²を受けた時の唾液アミラーゼは高くなる

考察

- 1) 福井空港を利用して、救急車走行実験を行った。
- 2) 加速度、減速度によって、唾液アミラーゼのストレス値を計測した。
- 3) 加速度、減速度で、唾液アミラーゼのストレス値が上昇した。
- 4) -7~-8m/s²では唾液アミラーゼのストレス値が高くなった。

高品質型PVA繊維補強吹付けモルタル増設耐震壁の開発

福井大学建築建設工学専攻 構研究室 / 株式会社 クラレ

1 研究開発の背景

■背景■
 2011年3月11日 東日本大震災
 多くの構造物が地震により被災

↓

■課題■ アンカー筋、スパイラル筋、壁筋が密に配筋

■現在、東北地域が抱える問題■
 ・職人不足
 ・見積単価と実態単価との差異により、入札不調
 → 復興が進まない状況

■開発■
 PVA繊維補強モルタルを吹付けによる増設耐震壁の補強工法を開発

2010年(H22)6月4日
 日本建築防災協会の技術評価を取得

↓

・首都直下を震源とする地震
 ・東南海地域を震源とする地震 が想定

↓

■課題■ アンカー筋、スパイラル筋、壁筋が密に配筋

PVA繊維補強吹付けモルタルが十分に充填できない

↓

2 研究開発の目的
 本開発では、従来型の配筋を下記①、②のように改善

①アンカー筋: 短く
 基準で定められているアンカー筋長さ: 20 × da (da: アンカー筋の公称径)

②スパイラル筋: 無し

↓

PVA繊維補強吹付けモルタルの充填性向上 (品質向上, 充填作業の効率化, 補強工事の負担軽減)

繊維補強モルタル / 既存の独立柱

高品質型PVA繊維補強吹付けモルタル増設耐震壁の開発

福井大学建築建設工学専攻 構研究室 / 株式会社 クラレ

3 実験概要

本研究では、アンカー筋の引張試験により、その引張性状を明らかにすると同時に、「アンカー筋の定着長さ」および「スパイラル筋」の有無による影響を明らかにする。

■加力方法■
 引張力 ↑

■試験体■

■共通要因■
 ・アンカー筋: φ19mmの異形鉄筋
 ・試験体形状: 長さ1000mm × 高さ500mm × 厚さ250mm

■変動要因■
 変動要因は、
 ①スパイラル筋の有無
 ②ナットの有無
 ③偏心の有無
 ④定着長さ
 の4要因である。

試験体数は、PVA繊維補強吹付けモルタルの試験体6体、RCの試験体6体の計12体であり、マトリクスの影響を確認する。

■基準試験体■

4 実験結果

■最終破壊状況(上面)■

No.5 ネジ部の破断	No.15 ネジ部の破断
No.6 ネジ部の破断	No.16 ネジ部の破断
No.7 ネジ部の破断	No.17 ネジ部の破断
No.8 ネジ部の破断	No.18 ネジ部の破断
No.9 ネジ部の破断	No.19 ネジ部の破断
No.10 ネジ部の破断	No.20 ネジ部の破断

■荷重P-変位δ関係■

青: コンクリート
 赤: PVA繊維補強吹付けモルタル

※ 荷重増大後、変位増大が抑制される

5 まとめ

PVA繊維補強吹付けモルタル用いた先付けアンカー筋の引張性状は、コンクリート試験体とほぼ同様の性状を示した。また、本実験の範囲内では、アンカー筋の定着長さを12da以上確保すれば、脆性破壊(ネジ部)に至ることが確認できた。さらに、スパイラル筋の有無による影響は認められなかった。

福井大学助成研究成果集 2015

—明日への挑戦—

発行日 平成27年12月25日

編集 福井大学研究推進委員会

研究推進委員会（平成26年度）

委員長	理事（副学長）研究・国際	岩井 善郎
委員	附属図書館長	寺尾 健夫
〃	産学官連携本部長	米沢 晋
〃	附属国際原子力工学研究所長	安濃田良成
〃	高エネルギー医学研究センター長	岡沢 秀彦
〃	遠赤外領域開発研究センター長	谷 正彦
〃	子どものこころの発達研究センター長	佐藤 真
〃	総合情報基盤センター長	細田 陽介
〃	ライフサイエンス支援センター長	定 清直
〃	生命科学複合研究教育センター長	上田 孝典
〃	トランスレーショナルリサーチ推進センター長	宮本 薫
〃	UR Aオフィス所長	鷺田 弘
〃	教育地域科学部教授	伊藤 勇
〃	医学部教授	内木 宏延
〃	工学研究科教授	福井 一俊

発行 福井大学
〒910-8507 福井市文京3丁目9-1
（総合戦略部門研究推進課）
TEL 0776-27-8880
E-mail skkenkyo-k@ad.u-fukui.ac.jp

印刷 能登印刷株式会社

