

イネ胚乳の初期発生に関する分子機構の解明

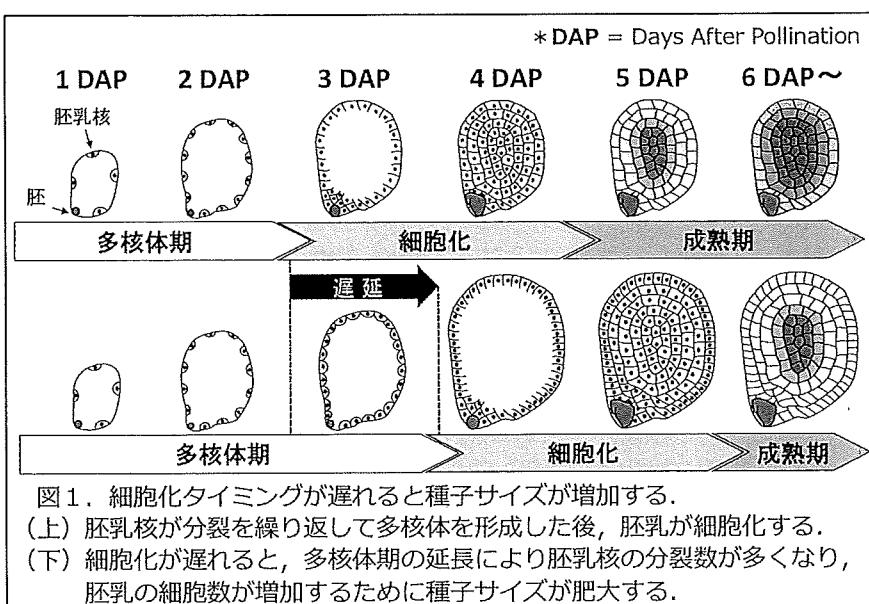
横浜市立大学 木原生物学研究所 植物エピゲノム科学部門 特任助教
大西 孝幸

(研究目的)

植物の種子は、様々な用途で利用され、現時点で最も主要な作物の利用形態である。今後、種子を改変し、種子利用の更なる高度化・効率化を達成するためには、種子形成の分子メカニズムの解明は必須である。モデル植物シロイヌナズナは、種子成熟過程において胚乳が衰退し無胚乳種子を形成するため、有胚乳種子のモデル作物であるイネを用いて、胚乳を含む種子発生の分子機構を理解することは非常に意義深い。特に申請者はモデル作物であるイネについて、栽培時や実験時に発生する諸問題（栽培時期の制限、世代時間の長さ、栽培環境の揺らぎ、栽培面積など）を解消する、人工気象器を用いたイネ屋内栽培系を確立した（Ohnishi et al. 2011）。これによって、屋内環境下における、イネの高密度栽培・安定した高稔実率・交配の簡便化を達成した。この技術によって、イネ品種日本晴の世代時間を1世代当たり2ヶ月に短縮し、従来よりも格段に早いペースでイネ研究を進めることができてきている。本研究によって、種子形成メカニズムに対する知見を深め、種子サイズを制御する分子育種の方法論を確立したい。

(研究方法)

イネ胚乳核は、受精直後から活発に複製と分配を繰り返すが、細胞質分裂を伴わないとめシシチウム（多核体）が形成される（図1）。この時、胚乳核の増殖とともに胚乳サイズの増大が起こる。受精後3日目に、シシチウムを形成している胚乳核の間に一齊に細胞壁が形成され、胚乳は多数の細胞の集合体となる。この現象は細胞化と呼ばれている。種子の最終的なサイズは胚乳細胞の数に大きな影響を受け、シシチウムを形成している時期が長ければそれだけ胚乳（種子）サイズが増大する。従って、細胞化を人為的に操作できれば、種子サイズを増大させた作物を作り出すことも可能であると考えられる。しかしながら、イネ胚乳の細胞化に関する分子機構はわかつ



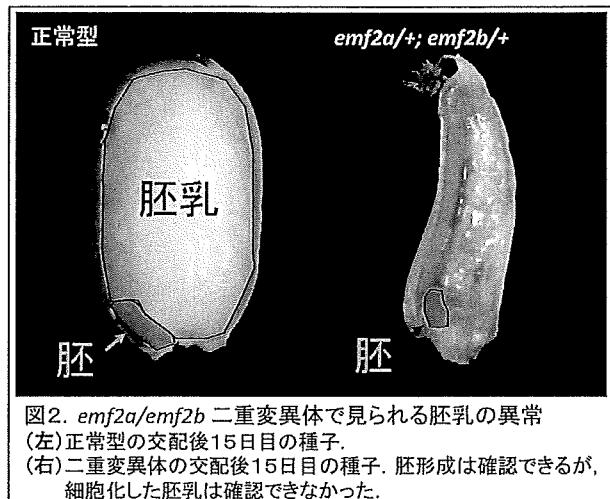
ていなかった。

これまでの私達の研究から、転写抑制に働くヒストンH3のリジン27トリメチル化(H3K27me3)活性がイネ胚乳の初期発生における細胞化(cellularization)の制御に重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。本申請では、イネ胚乳の初期発生におけるH3K27me3活性の役割を明らかにするため、①CRISPR-Cas9 systemを用いたゲノム編集技術によって、H3K27me3レベルを制御するPolycomb複合体構成因子の遺伝子破壊株を作出し、解析すること、②ChIP assayによって、標的遺伝子のH3K27me3レベルを検出すること、を研究内容とする。

(結果と考察)

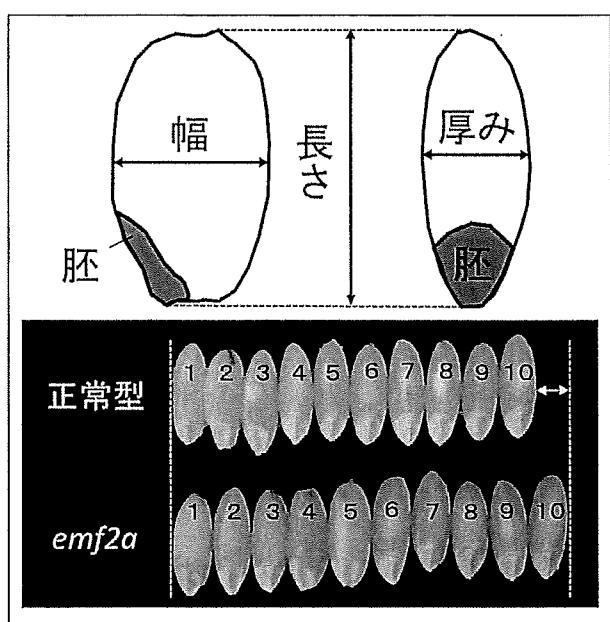
1. イネの PRC2 は胚乳発生を制御する。

PRC2複合体は4つのタンパク質から構成され、ヒストン修飾によって標的遺伝子の発現を抑制する機能をもつ。イネの PRC2構成タンパク質の1つは、相同性の高いOsEMF2a と OsEMF2b にコードされ、重複した機能を担っている。申請者は、CRISPR/Cas9 システムを用いてOsEMF2a/OsEMF2b の二重変異体系統を作出した。その結果、二重変異体系統の種子では、胚は形成されるものの胚乳が形成されず(図2)、イネの PRC2 の機能が胚乳発生に不可欠であることが明らかになった。



2. PRC2 変異体(emf2a)は種子の厚みが増加する。

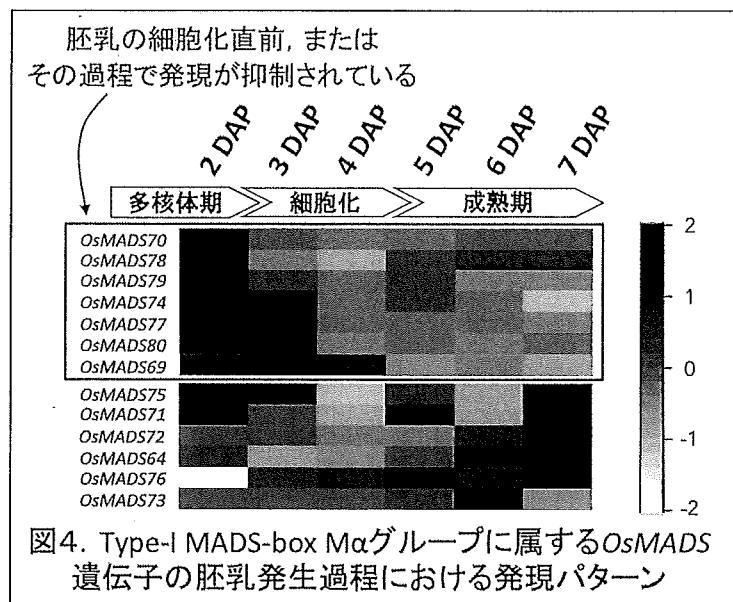
申請者は *OsEMF2a* の変異体(emf2a)の表現型についても観察を行った。emf2a の種子形は、種子の長さや幅は変化しないにも関わらず、種子の厚みだけが10%ほど増加していた(図3)。これまでにイネで同定されてきた種子サイズを制御する遺伝子は、種子サイズのうち、種子の長さや幅を制御するもののみであり、emf2a のように厚みのみを制御する表現型は初めての発見である。この表現型は、PRC2構成タンパク質をコードする機能的に相同な2つの遺伝子の一方が欠失することによって引き起こされた、PRC2の機能低下が原因であると考えられた。



3. PRC2 標的遺伝子を探索する。

PRC2 は複数の標的遺伝子の発現を、H3K27me3 のヒストン修飾によって抑制することで様々な発生過程を制御している。シロイヌナズナにおいては、PRC2 の標的遺伝子である Type-I MADS-box 転写因子の AGL62 が、胚乳の細胞化抑制因子として細胞化のタイミングを制御していることが知られている(Hehenberger et al., Development 2012)。イネでは PRC2 によって制御される標的遺伝子についての知見はほとんどなく、PRC2 がどのような遺伝子を標的にして胚乳発生を制御しているかについて明らかになっていない。

申請者は PRC2 の標的遺伝子、特に AGL62 のように細胞化に関わる遺伝子を探索する目的で、マイクロアレイによる胚乳での遺伝子発現解析を行い、胚乳発生過程における遺伝子の発現様式を網羅的に明らかにした。その結果、シロイヌナズナの AGL62 と相同性の高い7つの OsMADS 遺伝子が、胚乳の細胞化の直前またはその過程で発現抑制されていることが分かった(図4)。従って、これらの遺伝子がシロイヌナズナの AGL62 と同様に胚乳の細胞化の抑制に関わっている可能性が高いものと考えるに至った。



(今後の展開)

今後は PRC2 の機能低下によって種子が肥大するメカニズムを明らかにすると共に、PRC2 に制御される胚乳発生過程の分子機構を理解し、種子サイズの人為的な制御に繋げることを目的として、更なる研究を継続する。具体的には以下の研究課題に取り組む。

1) 胚乳発生過程における PRC2 標的遺伝子の探索

PRC2 変異体の胚乳におけるマイクロアレイ解析および H3K27me3 の ChIP-seq を行い、胚乳での PRC2 の標的遺伝子を同定する。

2) 種子サイズを制御する PRC2 標的遺伝子の機能解析

種子サイズを制御する PRC2 標的遺伝子を明らかにするため、(1)で明らかにした種子の肥大メカニズムと関連が想定される PRC2 標的遺伝子を対象に同様の解析を行う。

タンパク質分解系であるプロテアソームによる 植物高温ストレス耐性機構の解明

理化学研究所環境資源科学研究センター 特別研究員
佐古 香織

(研究目的)

動くことのできない植物は様々な環境ストレスにさらされている。中でも、高温ストレスは植物の生育阻害や収量低下を引き起こす有害なストレスである。さらに近年では地球温暖化によって平均気温が上昇し、農作物への悪影響が懸念されている。従って植物の高温ストレス応答機構を解明し、高温耐性を獲得した作物の作出が急務となっている。

ユビキチン・プロテアソーム系は、ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームが分解することによって、細胞周期をはじめとした様々な生命現象の制御に寄与する機構である。申請者は、シロイヌナズナのプロテアソーム変異体*rpt2a*が高温ストレス耐性を示すことを見出した(図1)。プロテアソーム変異体ではタンパク質の分解が異常となったことによって、高温耐性を獲得したことが推察される。従って、本研究では、プロテオミクスによって、ユビキチン化タンパク質の網羅的探索を実施し、プロテアソームによって分解制御を受ける高温耐性原因因子の同定を目指した。

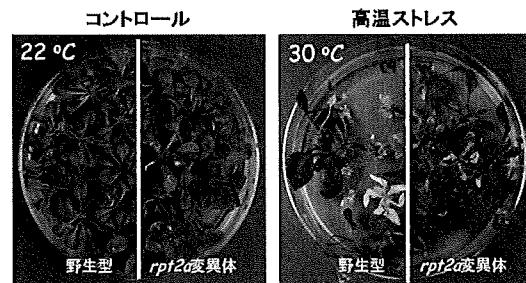


図1 *rpt2a*変異体は高温ストレスに耐性を示す。
左図:22°Cで生育させた4週齢の植物体、右図:30°Cで3週間高温ストレスを与え、
22°Cで2週間生育させた植物体。

(研究方法)

プロテアソームは60以上のサブユニットからなる複合体である。これらサブユニットの一つRPT2a欠損変異体は30°Cを長時間与えるマイルドな高温ストレスに対して耐性を示した。

この高温耐性原因因子を明らかにするために、22°Cで2週間生育させた野生型および*rpt2a*変異体の植物体地上部6gよりタンパク質を抽出した。本タンパク質抽出液に、ビオチンタグを付加したポリユビキチン結合タンパク質TUBEを添加し、ユビキチン化タンパク質の免疫沈降を行った。得られたタンパク質をトリプシン消化し、基質とユビキチン鎖との間に形成されるグリシン-グリシン結合を認識する抗体であるK-ε-GG抗体(Cell signaling)を用いて2度目の免疫沈降を行った。得られたペプチドを精製し、LC-MS/MSによって解析した。本研究は東京都医学総合研究所との共同研究として実施した。

(結果)

1. ユビキチン化タンパク質の比較

野生型および*rpt2a*変異体を22°Cまたは30°Cで2週間生育させた時のユビキチン化タンパク質をウエスタン blotによって検出・比較した。

図2に示すように、野生型と*rpt2a*変異体でユビキチン化タンパク質の蓄積に大きな差は見られなかった。一方で、22°Cと30°Cでは、高温ストレス時の方がユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。

2. ユビキチン化タンパク質の網羅的探索

22°Cで生育させた時の野生型および*rpt2a*変異体よりタンパク質を抽出し、免疫沈降およびMS解析によって、ユビキチン化タンパク質を同定した。同定されたタンパク質の一覧は表1にまとめた。野生型では67個のタンパク質が同定された。一方、*rpt2a*変異体では36個のタンパク質が同定された。

このうち、野生型と変異体とで共通して同定されたタンパク質は33個あった。PSMをタンパク質量の指標（PSMが5以上差があるものをタンパク質量に差があると定義した）として野生型と変異体を比較した。野生型の方が多い検出されたタンパク質が49個、*rpt2a*変異体の方が多く検出されたタンパク質が6個、野生型と変異体とで差がなかったタンパク質が17個であった。

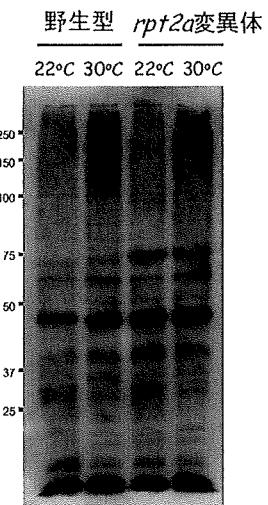


図2 ユビキチン化タンパク質の比較

(成果・考察)

ウエスタンプロットの結果から、野生型と変異体とでユビキチン化タンパク質の蓄積に大きな差はないことが示された。すなわち、*rpt2a*変異体では全てのユビキチン化タンパク質が蓄積しているわけではなく、特定のタンパク質の分解が異常になったことによって、高温耐性を示したことが示唆された。

高温応答に関するタンパク質はDREB2Aのように、通常条件ではプロテアソームによる分解制御を受けており、ストレス時に安定化することによって機能するものが多く存在する。そこで、本研究では通常時の野生型と*rpt2a*変異体のユビキチン化タンパク質を比較した。その結果、HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70-1やPYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.2など高温ストレス誘導性のタンパク質が野生型の方が多い検出された。すなわち、野生型ではこれら高温誘導性タンパク質が分解されているが、*rpt2a*変異体では分解されにくくなっていると考えられる。また、ヒストンH2A.Zは温度変化のセンサーとして機能している（Cell (2010)140:136）。本研究によってH2A.Zをコードするタンパク質HTA9とHTA11が*rpt2a*変異体では分解されにくくなっていることが示された。H2A.Zは温度が上昇するとクロマチンから解離することが知られている。*rpt2a*変異体ではH2A.Zがクロマチン内に残っている、すなわち温度変化に対して非感受性になっている可能性が示唆された。以上の結果から、*rpt2a*変異体の高温耐性の要因は、①高温応答性タンパク質が蓄積しているため、高温ストレスに対して素早く応答できる可能性。②温度変化に対して応答性が低く、見かけの耐性を示しているという2つの可能性が示された。今後は得られたタンパク質について、温度変化時の安定性をウエスタンプロット等によって詳細に解析し、高温耐性機構の解明を目指したい。

表1 野生型および*rpt2a*変異体のユビキチン化タンパク質の比較

Accession	Description	野生型			<i>rpt2a</i> 変異体		
		Score ^a	Coverage ^b	PSM ^c	Score	Coverage	PSM
P59271	UBQ5/6-like	21394.22	51.92	771	22294.77	51.92	880
P59233	UBQ5	21270.38	51.59	769	22136.94	51.59	877
P22953	HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70·1	850.64	8.45	59	549.03	6.76	33
O50008	COBALAMIN-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE	515.24	8.76	64	61.34	4.84	17
O80448	ARABIDOPSIS THALIANA PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.1	2734.25	14.89	174	2157.2	8.41	175
Q9M339	Ribosomal protein S3 family protein	840.3	10.04	55	657.63	10.04	45
P54609	CELL DIVISION CYCLE 48	27.83	0.99	1	86.65	2.72	4
P13114	CHALCONE SYNTHASE	89.12	4.05	6	91.04	4.05	8
P0DH99	GTP binding Elongation factor Tu family protein	211.68	9.13	20	99.89	6.24	5
Q9C944	HISTONE H2A PROTEIN 9	398.06	6.72	22	316.73	6.72	16
Q9LUT2	METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 4	368.33	11.45	32	44.21	7.63	6
Q8L940	PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.3	1203.89	16.18	76	520.6	8.41	49
Q9SIP7	Ribosomal protein S3 family protein	507.09	10	34	453.65	4.4	27
P0CJ46	ACTIN 1	41.35	3.18	3	26.46	3.18	1
P42737	BETA CARBONIC ANHYDRASE 2	392.05	11.97	19	24.45	6.95	7
P0DH95	CALMODULIN 1	72.55	8.72	4	51.58	8.72	3
Q8LAR7	CIS-PRENYLTRANSFERASE 9	30.19	4.78	14	19.14	4.78	11
P59169	Histone H3.3	52.99	8.09	3	0	8.09	1
O03986	Heat shock protein 90·4	90.61	1.29	9	59.82	1.29	13
Q93VP3	Eukaryotic translation initiation factor 5A·2	19.06	16.35	10	0	16.35	1
P45724	Phenylalanine ammonia-lyase 2	106.18	1.53	9	136.89	1.53	10
O24616	PROTEASOME ALPHA SUBUNIT D2				27.32	3.6	2
Q9LJX4	PUMILIO 5	62.63	0.94	4	0	0.94	1
P42798	40S ribosomal protein S15a·1	169.77	10.77	11	153.69	10.77	11
P41916	RAS-RELATED NUCLEAR PROTEIN-1	64.5	2.71	3	65.62	2.71	4
Q9SRX2	60S ribosomal protein L19·1	23.01	18.22	2	20.1	4.67	1
Q682S0	ROOT PHOTOTROPISM 2	308.5	2.02	13	199.79	2.02	19
Q9SW09	40S ribosomal protein S10·1	49.24	9.6	29	25.6	9.04	4
P49200	40S ribosomal protein S20·1	94.06	29.84	25	18.97	8.87	1
Q9LXG1	40S ribosomal protein S9·1	63.1	5.56	2	82.59	5.56	4
O23255	Adenosylhomocysteinase 1	63.62	2.27	4	0	2.27	1
Q8L9Y0	SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 25	74.18	1.9	5	51.51	1.9	5
Q9FKA5	Uncharacterized protein	39.63	12.6	2	47.68	12.6	3
Q0V7U7	La protein 2				40.41	1.5	1
Q9FI78	Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase	104.44	6.47	12	37.79	2.08	4
Q8LC83	40S ribosomal protein S24·2				29.11	6.02	2
Q56YU0	ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1A	84.75	1.8	5			
P36397	BFA-VISUALIZED EXOCYTIC TRAFFICKING DEFECTIVE 1	209.18	23.2	45			

Q9M2Z1	BARELY ANY MERISTEM 2	55.86	0.8	2
Q9LE06	BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4	37.64	3.11	3
O49499	CAFFEOYL COENZYME A O-METHYLTRANSFERASE 1	24.29	5.79	2
Q5GM68	PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 2	61.68	3.01	6
O22527	CHLOROPHYLLASE 1	33.65	3.7	4
Q42406	ARABIDOPSIS THALIANA CYCLOPHILIN 1	68.76	6.4	3
P25858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC1	43.2	5.62	9
P26568	Histone H1.1	52.31	2.92	3
O23628	HISTONE H2A 11	84.09	6.62	3
P42801	D-MYO-INOSITOL 3-PHOSPHATE SYNTHASE 1	141.61	13.11	16
P23686	S-adenosylmethionine synthase 1	265.5	8.91	26
Q9S JL8	S-adenosylmethionine synthase 3	135.37	5.38	7
O23676	HAPLESS 1	26.42	9.33	1
P32961	Nitrilase 1	111.96	14.16	10
P54887	DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1	30.19	1.67	2
Q56Z59	Patellin-3	36.43	2.24	1
Q9ZNR6	PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.2	40.72	8.28	6
Q9SD76	Alpha-glucan phosphorylase 2	45.87	0.95	1
P61837	Aquaporin PIP1·1	22.71	3.15	2
Q39033	Phosphoinositide phospholipase C 2	43.03	2.07	4
P59230	60S ribosomal protein L10a·2	33.4	4.17	1
Q56XG6	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15	21.74	5.85	1
P42794	60S ribosomal protein L11·2	62.65	16.48	8
P49227	60S ribosomal protein L5·2	44.74	2.33	1
Q8LPN7	E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like	93.97	5.49	10
Q9FFS8	40S ribosomal protein S10·2	74.5	11.11	4
Q9STY6	40S ribosomal protein S20·2	75.02	28.69	6
Q8L8Y0	40S ribosomal protein S2·1	142.12	14.08	15
P49688	40S ribosomal protein S2·3	25.4	9.47	3
Q42262	40S ribosomal protein S3a·2	23.42	3.44	1
Q700C2	Squamosa promoter-binding-like protein 16	28.92	0.71	1
P35133	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 10	27.47	10.14	3
Q9SVM9	Protein ECERIFERUM 26	89.59	10.28	7
Q9SRM4	PHD finger protein ALFIN-LIKE 2	20.97	4.88	2

^ascore: タンパク質同定システムMASCOTソフトウェアによって同定されたスコア,

^bcoverage: 全アミノ酸配列のうち同定されたペプチドが占める割合, ^dPSM(peptide spectrum matches): 同定されたペプチド配列の数

グラフ上の空間非一様な離散時間量子ウォークの スペクトル解析

神奈川大学工学部情報システム創成学科 特別助教
井手 勇介

(研究目的)

通常のランダムウォークが情報科学において基礎的な過程となっていることに対応して、その量子版と見なされる離散時間量子ウォークも量子情報理論において同様の役割を果たすことが期待されている。現在では、膨大なデータが大規模ネットワーク上に存在し、それらのデータを利活用する必要性が高まっており、今回の研究対象である（有限）グラフ上の離散時間量子ウォークは、現在のコンピュータを凌駕する性能をもつと考えられる量子コンピュータが実現した際に、その上で動作する各種探索アルゴリズムの基礎に位置づけられる可能性があるモデルである。そのため、その基本的な性質である確率分布を解析するための手法の開発が必要である。

一般に、グラフ上の離散時間量子ウォークを定義するためには、頂点毎に、頂点の次数（頂点からのびる辺の本数）の次元を持つヒルベルト空間を用意し、隣接する頂点対に付随するそれぞれのヒルベルト空間を定義域・値域とするユニタリ作用素（ユニタリ行列）を定める必要がある。このようなユニタリ作用素の決め方は複数存在しうるが、どのようなグラフ上でも適用可能な方法として、各頂点に付随するヒルベルト空間からそれ自身へのユニタリ作用素（コイン作用素と呼ぶ）と、各辺に付随する、辺の始点に属する状態ベクトルを辺の終点に属する状態ベクトルへ推移させるユニタリ作用素（フリップフロップ型推移作用素）の積によって定義されるユニタリ作用素を用いる方法がある。このようなタイプの離散時間量子ウォークに対して、ゼゲディの方法ではコイン作用素を適切に選ぶことによって、通常のランダムウォークの遷移行列のスペクトル解析により量子ウォークの遷移確率を解析可能である。本研究では、従来研究では未達成である、コイン作用素の固有値が $\{1, -1\}$ に限る場合以外の、一般的のコイン作用素を用いる離散時間量子ウォークについて、スペクトル解析手法を明らかにすることを目標とする。

(研究方法)

ゼゲディの方法では、対象とするグラフ上の通常のランダムウォークを一つ固定して考えるとき、各頂点におけるコイン作用素を、各成分が隣接頂点への推移確率の平方根となる単位ベクトルから作られる、ハウスホルダー型のユニタリ行列とする離散時間量子ウォークを考える。このとき、 (i, j) 成分が頂点*i*と頂点*j*を結ぶ辺上に定義されている古典ランダムウォークの推移確率の積の平方根となるような行列（ヤコビ行列）を用意すると、その固有値・固有ベクトルを用いて、対応する離散時間量子ウォークの時間発展を定めるユニタリ作用素

の固有値・固有ベクトルを求めることができる。ここで、この場合のヤコビ行列とランダムウォークの遷移行列の固有値は一致することに注意が必要である。これまでの研究では、この情報をもとに、種々のグラフ上の離散時間量子ウォークの推移確率を評価している。このゼゲディの方法は、コイン作用素の固有値が $\{1, -1\}$ のみであることを本質的に用いているため、それ以外のコイン作用素を用いる場合についてのスペクトル解析手法が必要である。

本研究では、円環グラフ（周期境界条件付き有限一次元格子）上の離散時間量子ウォークのうち、各頂点のコイン作用素が異なる場合（空間非一様な場合）について検討を進めた。コイン作用素の固有値・固有ベクトルによる分解を考える際に、固有値が $\{1, -1\}$ のみの場合には適切な基底を具体的に構成可能であり、離散時間量子ウォークの時間発展作用素はその基底によって張られる空間上の線形作用素と見なせるため、うまく解析できた。今回は、一般の固有値が $\{1, -1\}$ とは限らないコイン作用素の場合に、ゼゲディの方法に沿った基底の構成法の拡張手法を明らかにした。

（結果）

頂点集合 $V_n = \{0, 1, \dots, n\}$ と辺集合 $E_n = \{(i, i+1) : i \in V_n \pmod{n}\}$ からなる円環グラフ $C_n = (V_n, E_n)$ を考える。離散時間量子ウォークを定義するために、ヒルベルト空間 $\mathcal{H}_n = \text{span}\{|i, L\rangle, |i, R\rangle : i \in V_n\}$ を用意する。ここで、 $|i, J\rangle = |i\rangle \otimes |J\rangle$ ($i \in V_n, J \in \{L, R\}$)である。但し、 $\{|i\rangle : i \in V_n\}$ は量子ウォーカーの位置を表す正規直交基底であり、 $\{|L\rangle = [1, 0]^T, |R\rangle = [0, 1]^T\}$ (A^T は行列 A の転置を表す) は量子ウォーカーの移動の向きを表すカイラリティーと言われる正規直交基底である。

準備したヒルベルト空間 \mathcal{H}_n 上に、 $U_n = S_n C_n$ で定義される離散時間量子ウォークの時間発展作用素を定義する。ここで、 C_n はコイン作用素、 S_n はフリップフロップ型推移作用素とそれぞれ呼ばれる作用素で、以下のように定義される。

$$C_n = \sum_{i=1}^{n-1} |i\rangle\langle i| \otimes C_i,$$

$$S_n |i, J\rangle = \begin{cases} |i+1, L\rangle \pmod{n} & \text{if } J = R, \\ |i-1, R\rangle \pmod{n} & \text{if } J = L, \end{cases}$$

但し、 C_i ($i = 0, \dots, n-1$)は 2×2 のユニタリ行列である。

$X_t^{(n)}$ を時間発展作用素 U_n で駆動される量子ウォーカーの位置を表す確率変数とする。この時、初期状態（単位ベクトル） $|\psi\rangle \in \mathcal{H}_n$ から時間発展する量子ウォーカーが、時刻 t において位置 x で観測される確率は以下で定義される。

$$\mathbb{P}_{|\psi\rangle} (X_t^{(n)} = x) = \|(\langle x| \otimes I_2) U_n^t |\psi\rangle\|^2.$$

本研究では、時間発展作用素 U_n の固有値・固有ベクトルによる分解を考える。そのため、コイン作用素 $C_n = \sum_{i=1}^{n-1} |i\rangle\langle i| \otimes C_i$ を構成する C_i ($i = 0, \dots, n-1$)の固有値・固有ベクトルによる分解を考える。 $v_{1,i}, v_{2,i}$ と $|w_{1,i}\rangle, |w_{2,i}\rangle$ をそれぞれ C_i の固有値・固有ベクトル（正規直交）とする。このとき、 C_i は以下のように分解できる。

$$C_i = v_{1,i} |w_{1,i}\rangle\langle w_{1,i}| + v_{2,i} |w_{2,i}\rangle\langle w_{2,i}| = v_{1,i} |w_{1,i}\rangle\langle w_{1,i}| + v_{2,i} (I_2 - |w_{1,i}\rangle\langle w_{1,i}|)$$

$$= (v_{1,i} - v_{2,i}) |w_{1,i}\rangle\langle w_{1,i}| + v_{2,i} I_2.$$

ここで、正規直交性から $I_2 = |w_{1,i}\rangle\langle w_{1,i}| + |w_{2,i}\rangle\langle w_{2,i}|$ が成り立つことを用いた。

時間発展作用素 U_n の分解を考えるために、以下で定義されるヤコビ行列 J_n を考える。

$$(J_n)_{i,j} = \overline{(J_n)_{j,i}} = \begin{cases} \overline{w_i(R)}w_j(L) & \text{if } j = i+1 \pmod{n}, \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases}$$

但し、 $|w_{1,i}\rangle = [w_i(L), w_i(R)]^T$ である。ここで、 \bar{z} は $z \in \mathbb{C}$ の複素共役を表す。直接計算することによって、次の事実がわかる。

補題 1

$$K_{i,j}(\lambda) = \begin{bmatrix} \lambda & -\overline{w_i(R)}w_{i+1}(L) & & & 0 \\ -\overline{w_{i+1}(L)}w_i(R) & \lambda & & & \\ & \ddots & \ddots & & \\ & & \ddots & \lambda & -\overline{w_j(R)}w_{j+1}(L) \\ 0 & & & -\overline{w_{j+1}(L)}w_j(R) & \lambda \end{bmatrix}$$

とおくと、以下が成り立つ。

$$\begin{aligned} \det(\lambda I_n - J_n) &= \lambda \det(K_{2,n-1}(\lambda)) \\ &\quad - |w_0(R)|^2 |w_1(L)|^2 \det(K_{3,n-1}(\lambda)) - |w_{n-1}(R)|^2 |w_0(L)|^2 \det(K_{2,n-2}(\lambda)) \\ &\quad + (-1)^n 2\Re\left(\prod_{i=1}^{n-1} \overline{w_i(R)} w_i(L)\right). \end{aligned}$$

但し、 $\Re(z)$ は $z \in \mathbb{C}$ の実部を表す。

さらに、直接計算により、

$$\begin{aligned} \det(K_{i,j}(\lambda)) &= \lambda \det(K_{i,j-1}(\lambda)) - |w_j(R)|^2 |w_{j+1}(L)|^2 \det(K_{i,j-2}(\lambda)), (j \geq i+1), \\ \det(K_{i,i}(\lambda)) &= \lambda^2 - |w_j(R)|^2 |w_{j+1}(L)|^2, \end{aligned}$$

がわかるため、次の事実が従う。

補題 2

$p_i = |w_i(R)|^2, q_i = |w_i(L)|^2$ とおくと、 $\det(K_{i,j}(\lambda))$ は $p_i, \dots, p_j, q_i, \dots, q_{j+1}$ のみから係数が定まる実係数多項式である。

以下、ヤコビ行列 J_n を用いた時間発展作用素 U_n の分解を実行するために以下の仮定する。

仮定 1

コイン作用素 $C_n = \sum_{i=1}^{n-1} |i\rangle\langle i| \otimes C_i$ を構成する C_i ($i = 0, \dots, n-1$) の固有値は全て等しい。即ち、

$$C_n = \sum_{i=1}^{n-1} |i\rangle\langle i| \otimes \{(v_1 - v_2)|w_i\rangle\langle w_i| + v_2 I_2\},$$

とする。

$\lambda_m, |v_m\rangle$ ($m = 0, \dots, n-1$) をヤコビ行列 J_n の固有値・固有ベクトル（正規直交）とする。

各 $\lambda_m, |v_m\rangle$ に対して、次の 2 つのベクトルを定義する。

$$\begin{aligned} \mathbf{a}_m &= \sum_{i=1}^{n-1} v_m(i) |i\rangle \otimes |w_i\rangle, \\ \mathbf{b}_m &= S_n \mathbf{a}_m, \end{aligned}$$

但し, $|v_m\rangle = [v_m(0), \dots, v_m(n-1)]^T$ とする. $S_n^2 = I_n \otimes I_2$ であることに注意すると, 直接計算から以下がわかる.

$$U_n \begin{bmatrix} \mathbb{a}_m \\ \mathbb{b}_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & v_1 \\ v_2 & (\nu_1 - \nu_2)\lambda_m \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbb{a}_m \\ \mathbb{b}_m \end{bmatrix}.$$

同様に, $|\mathbb{a}_m| = |\mathbb{b}_m| = \lambda_m$ であることも確かめられることから, 以下が得られる.

定理 1

時間発展作用素 U_n の固有値を $\mu_{\pm m}$, 対応する固有ベクトルを $\mathbb{w}_{\pm m}$ とおくと, 以下が成り立つ.

1. $\lambda_m = \pm 1$ ならば, $\mu_m = \pm \nu_1$, $\mathbb{w}_m = \mathbb{a}_m$.
2. $\lambda_m \neq \pm 1$ ならば, $\mu_{\pm m}$ は次の 2 次方程式の解である.

$$\mu^2 - (\nu_1 - \nu_2)\lambda_m\mu - \nu_1\nu_2 = 0.$$

対応する固有ベクトルは, $\mathbb{w}_{\pm m} = \nu_2 \mathbb{a}_m + \mu_{\pm m} \mathbb{b}_m$ である.

補題 1, 2 より, $p_i = |w_i(R)|^2$, $q_i = |w_i(L)|^2$, かつ, $\Re\left(\prod_{i=1}^{n-1} \overline{w_i(R)} w_j(L)\right)$ が等しいコイン作用素については, 定理 1 より時間発展作用素 U_n の固有値が等しいことがわかる. この事実を用いて, 従来のゼグディの方法の適用範囲外だったコイン作用素の固有値が $\{1, -1\}$ 以外のコイン作用素 (但し, 固有値は全て等しい) を用いたフリップフロップ型の離散時間量子ウォークの時間発展を定めるユニタリ作用素の固有値・固有ベクトルを求める手法が得られた.

(成果・考察) 等

1. 円環グラフ上の離散時間量子ウォークの確率分布の性質を明らかにする内容の下記論文が投稿準備中である.
X.-P. Xu, Y. Ide, Exact solutions and symmetry analysis for the limiting probability distribution of quantum walks.
2. 円環グラフ上の離散時間量子ウォークの時間発展作用素の周期性を明らかにする内容の下記論文が投稿準備中である.
T. Arai, C.-L. Ho, Y. Ide, N. Konno, Periodicity for space-inhomogeneous quantum walks on the cycle.

アムラ果実が含む細胞機能調節物質の単離・精製とその応用

横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究所 特任助教

三木 健輔

(研究目的)

皮膚は表面から順に表皮、真皮、皮下組織の3つの組織からなり、最上部にある表皮は主に体内の水分保持や免疫系の一員として重要な役割を果たしている。表皮を構成する角化細胞は表皮の最下層で分裂し、成熟するに伴い上方の層へ移行していく。最上層まで移行すると、角化細胞は脱核して膜状になり重層化し、表層から順に垢となって剥がれ落ちる。このように角化細胞が分裂して表皮表面から剥がれ落ちるまでの期間はおよそ4週間である。しかし、加齢などに伴ってこのサイクルが長くなると、自然治癒力の低下や乾燥肌などの皮膚障害が起こることが知られている。そのため、健康で正常な皮膚機能を維持するためには、ケラチノサイトの増殖を活性化し、新陳代謝を促進させることが重要である。

当研究室ではインド亜大陸で5000年の歴史を持つ伝統医学「アーユルヴェーダ」に着目し、126種類のアーユルヴェーダハーブの中から角化細胞の増殖促進作用を持つものを探索した。その結果、インド地方に自生する樹木アムラ (*Embllica officinalis*) の果実に含まれる成分が、皮膚細胞の増殖を促進し、活性酸素やDNA障害に防御効果を示すを見出した。そこで本研究では、これらの有効成分を精製し、その構造を決定する。これらの成分には皮膚再生効果や活性酸素等に起因する生活習慣病の抑制効果が期待できる。

(研究方法)

1. アムラ抽出液の作製

バングラデシュより輸入したアムラの乾燥果実をミキサーで粉末状にした。粉末1g当たり10mlの50%エタノールを加え、1週間暗所に置き、フィルター濾過を2回繰り返して得られた溶液を各アムラ抽出液とした。

2. 有効成分の精製と同定

抽出液をHPLC（高速液体クロマトグラフ装置 L-7000 シリーズ、日立製作所）により分画した。カラムはオクタデシルシリル基を導入した全多孔性球状シリカゲルカラム（COSMOSIL PACKED COLUMN FOR HPLC 4.6×150mm、ナカライトスク）を使用した。移動相には水とメタノールのグラジエントを使用し、分画条件は次の2つを用いた。

条件①：水100%から開始、60分でメタノール100%

条件②：水100%から開始、15分でメタノール25%、105分でメタノール100%

流速(0.5 mL/min)の値で溶媒を流し、また吸光度210 nmで各フラクションを測定・採取した。質量分析による有効成分の解析は液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS/MS）を用いた。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法を用いた。細胞増殖試験で角化細胞増殖促進効果が確認されたピークについてMS/MS解析を行った。

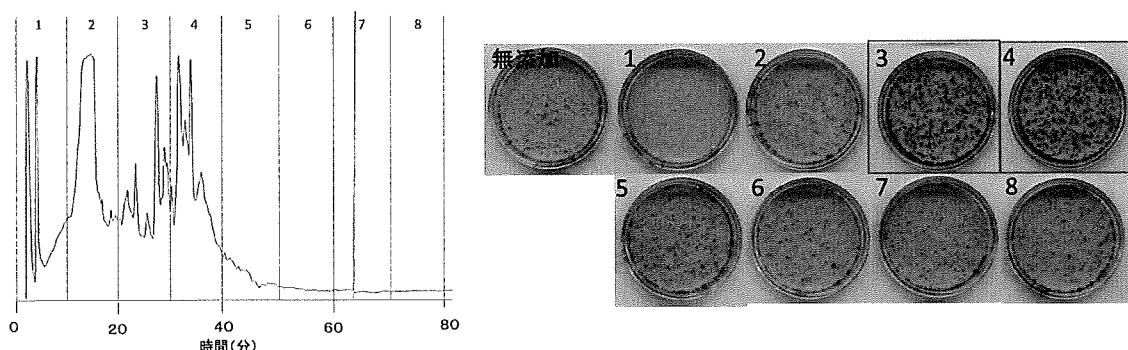
3. 細胞試験

ヒト子宮頸部由来およびヒト胸部由来ケラチノサイトをシャーレに播種し、適宜希釀した各アムラ抽出液を添加した。コントロールには50%エタノールを添加した。培地は両細胞とも増殖因子を希釀した専用培地を用いた。3, 4日毎に培地を交換した後、50%エタノールまたは各アムラ抽出液を添加して約1週間以上培養した。培養後、細胞数の測定やコロニー染色を行った。

(結 果)

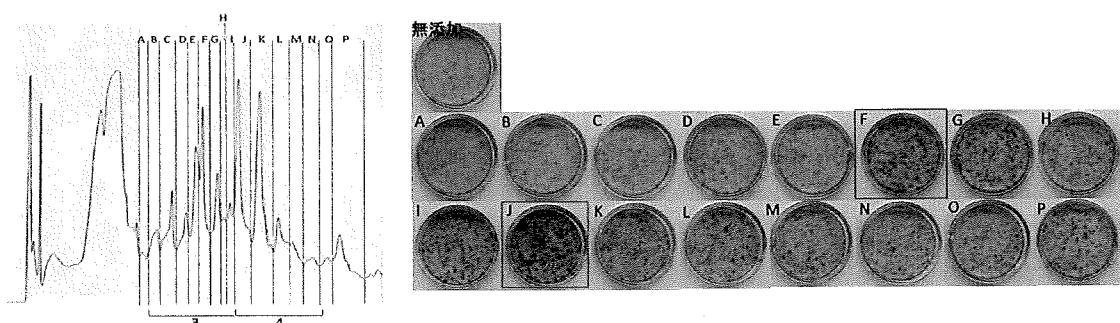
1. HPLC によるアムラ抽出液の成分分画

アムラ抽出液の有効成分を精製するためにHPLCで抽出液を分画した。HPLCの分画条件①を用いて抽出液を8つの分画液に分け、各分画液の効果を調べた。その結果、分画液3あるいは4の添加により角化細胞の増殖が促進され、有効成分は分画液3と4にあると考えられた。



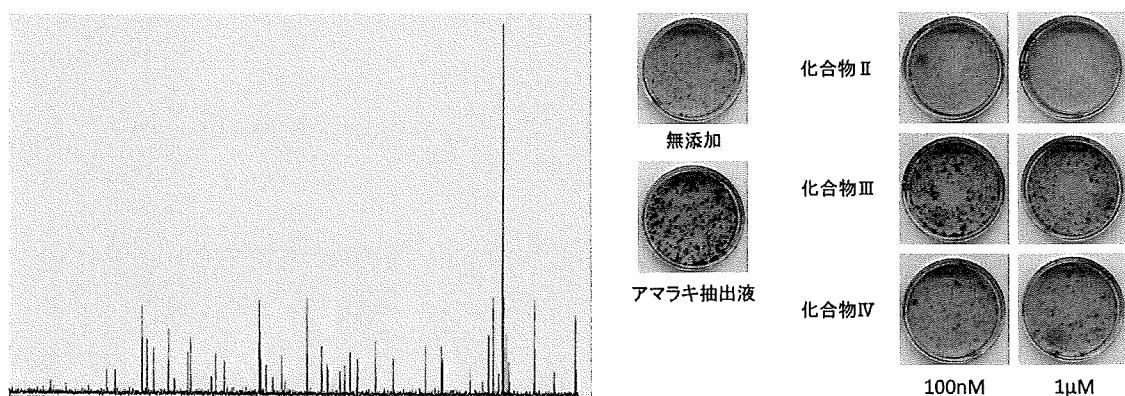
2. HPLC による画分3, 4の分画

有効成分がどのピークに含まれるのかを調べるために、画分3と4をさらに細かく採取した。この部分は複数のピークが密集しているため、HPLCの分画条件②を用いて移動相中のメタノール濃度の上昇をゆるやかにし、分画しやすくした。ピークごとに分画液を分け、各分画液の効果を調べた。その結果、分画液FあるいはJの添加により角化細胞の増殖が促進された。このように単一ピークに分離しても増殖促進効果は失われなかった。分画液3は分画液Fの成分、分画液4は分画液Jの成分が含まれていたことにより増殖が促進されたと考えられた。



3. 有効成分の解析

分画液 F の成分を HPLC カラムにて再度精製し、LC-MS/MS を用いて成分を解析した（都合により分子量の情報は省略）。分画液 F を 20 μl 注入し、LC 部分で現れたピークの成分を MS/MS 解析した。得られたマススペクトルから、有効成分の候補としてある物質を推測した（物質を化合物 I とする）。しかし化合物 I は市販されていないため、化合物 I に類似した構造を持っている化合物（化合物 II～IV とする）を購入し細胞増殖試験を行った。化合物 II と III は 100% エタノール、IV は 50% エタノールに溶解し、化合物 II, III, IV をそれぞれ終濃度 100 nM と 1 μM となるように添加した。その結果、化合物 III を添加したシャーレでアムラ抽出液ほどではなかったが増殖が促進された。終濃度 100 nM のほうがより強く効果が表れた。化合物 II と IV を添加したシャーレでは効果が見られなかった。



(成果・考察)

本研究ではアムラ抽出液に含まれる有効成分を特定するため、HPLC によってアムラ抽出液を分画した。有効成分が存在する範囲を絞り込むために、まずは 10 分ごとに粗分画した分画液を用いて細胞増殖試験を行った。その結果、分画液 3 あるいは 4 の添加により増殖が促進され、有効成分は分画液 3 と 4 に含まれると考えられた。次いで画分 3 と 4 をピークごとに A～P の 16 個に細かく分画し、細胞増殖試験を行った。分画液 F あるいは J の添加により増殖が促進され、増殖促進活性を示す成分は少なくとも 2 つ存在することが示唆された。分画液 F を LC-MS/MS で解析し、ある物質（化合物 I）が有効成分の候補として推測された。化合物 I は市販されていないため、類似した物質（化合物 II～IV）を用いて細胞増殖試験を行ったところ、化合物 III の添加により増殖が多少促進した。化合物 III 自体にも増殖促進効果がある可能性が考えられる。また、今後、化合物 I を化学合成することで結論を得たい。分画液 F に加えて分画液 J も促進効果を示したため解析を試みたが、分画液 J の HPLC による再精製は困難であった。現在のところ理由は不明であるが、その成分は抽出液から単一に分離されると不安定になるのかもしれない。分画後の精製や保存の方法などを検討する必要がある。分画液 F と J に含まれるこれらの成分は、全く異なる構造をもつのか、それとも類似した構造をもつのか興味がもたれる。

アムラはアーユルヴェーダの中でも最も有名な果実の一つであり、その多彩な生理作用の一端を科学的に示したことは意義深い。また、アムラは日常的に食され、人々の健康維持に

大きな役割を果たしていることから、健康食品／機能性食品としての利用は容易であると推測される。同様な植物として、同じくインド地方を原産とするウコン（ターメリック）が挙げられる。ウコンも様々な薬効を示し、現在幅広い商品に展開されている。ウコンの薬効成分としてはクルクミンが有名であり、多くの基礎科学的な知見が蓄積しつつある。本研究では表皮角化細胞を増殖するアムラの有効成分を精製・同定することに成功し、その意義はクルクミンと同様に大きいと思われ、アムラに機能性食材としての価値をもたらせることができる。今後、皮膚細胞への効果を考えれば化粧品への応用が可能であり、有効成分のメカニズムが証明できれば、機能性食品や医薬品への展開も可能になる。

女性薬物依存症者が回復資源につながり 利用していく心理過程

横浜市立大学精神看護学領域
助教 一柳（岩崎）理絵

I. 緒言

近年のわが国の対策は、薬物依存症者の治療、社会復帰支援を充実させていくことに向けられてきた。地域の回復資源としては、民間の回復支援施設であるダルク、自助グループである NA(Narcotics Anonymous; 以下、NA とする)等がある。ダルクは薬物依存症者の援助を専門に行う任意団体である。男性を対象としたダルクは全国に存在するが、女性を専門にしたダルクは少ないため、治療が追いついていないという問題に直面している。

援助機関の早期介入・早期援助は、女性薬物依存症者への深刻なダメージを減らすが、女性薬物依存症者の回復資源につながりにくいことが、治療や回復に結びつかない現状がある。その背景には、幼児期の被虐待頻度の高い女性ほど薬物依存症が深刻であったこと(藤野ら, 2007)や、女性の薬物依存症者の対人関係の特徴ともいえる「人を信じられなくなった病=信頼障害」(小林, 2012)の側面がある。

女性薬物依存症者が回復資源につながりそれを利用していく心理過程を明らかにして、それを加味したアプローチを考案することは、女性薬物依存症者への質の高い医療、看護、回復支援の充実につながる。そこで本研究の目的は、女性薬物依存症者が回復資源につながり、それを利用していく心理過程を明らかにすることとした。

II. 用語の定義

1. 薬物依存症とは、覚せい剤や麻薬などの違法薬物、有機溶剤、向精神薬、危険ドラッグへの依存を指し、アルコールやタバコへの依存は含まないこととする。依存症以外の精神疾患を重複している者も含むこととする。
2. 回復とは、薬物を使用しない状態に向けて、またその状態の維持のために、薬物依存症者が自らの生きづらさに気づき、その生き方の方向を変えていく成長のプロセス(江藤, 2003)とする。
3. 回復資源とは、医療機関等を含めて薬物依存症者を回復へ促す社会資源のことである。具体的には、精神保健福祉センター、保健所、デイケアに加え、主に当事者の相互作用を活用した組織体制を持つ、回復支援施設であるダルク、自助グループである NA を示す。

III. 研究方法

1. 対象者

対象者は、断薬期間が 3 年以上の女性薬物依存症回復者で、かつダルク及び、NA のメンバーとした。

2. データ収集法

調査期間は、2015 年 6 月から 8 月であった。研究協力に同意を得られた対象者に、個別の半構造化面接によるデータ収集を行った。面接内容は、対象者の同意のもと IC レコーダーに録音し、逐語録を作成した。

3. 分析方法

本研究では、木下(2003)が開発した修正版グラウンデッド・セオリー・アプローチ(Modified Grounded Theory Approach; 以下、M-GTA とする)を用いて分析を行った。分

析過程においては、M-GTA に精通し関連の研究経験のあるスーパーバイザーから指導を受けることで、データ解釈の妥当性を確認した。

4. 倫理的配慮

本研究は、横浜市立大学医学研究倫理審査委員会に承認【A150528004】を得て行った。

IV. 結果

1. 対象者の背景

研究協力の同意が得られた女性薬物依存症回復者 6 名に、半構造化面接を実施した。対象者の年齢は 30 代から 40 代であった。主な使用薬物は覚せい剤、処方薬、シンナーで、最初の薬物使用の年齢は 10 代半ばから 20 代前半、平均断薬年数は 11.7 年であった。

2. 分析結果

分析では分析ワークシートを用いて、1 事例ごとに類似例と対極例を検討しながら概念生成を行ったことで、個々の概念は理論的飽和化に至った(木下, 2014)と考える。一方で分析結果全体に対する理論的飽和化は、理論的サンプリングを用いていないため理論的飽和化に至らなかった。以上を吟味した結果、8 のカテゴリが見出され、32 の概念が抽出された。さらに女性薬物依存症者が回復資源につながりそれを利用していく心理過程の結果図を見出すことができた。抽出されたカテゴリとカテゴリ間の関係を図 1 に示す。

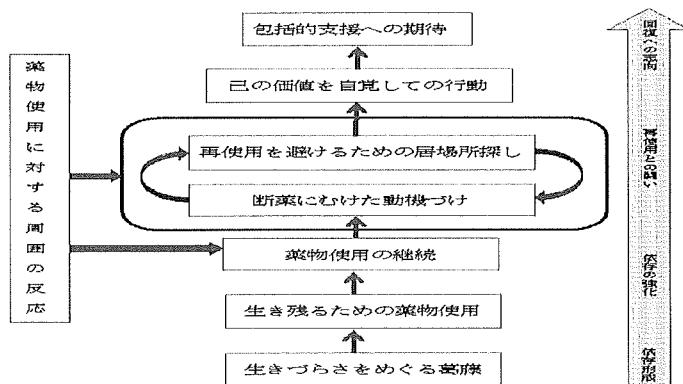


図 1 女性薬物依存症者が回復資源につながりそれを利用していく心理過程

以下に、ストーリーラインを示し、文中のカテゴリは【 】、概念は〈 〉で示した。対象者は幼少期から親の依存症問題、暴力、過度な期待もしくはそぐわない愛情などを受け続け(〈親から受ける負の影響〉)、親からの愛情に対する愛情に対する渴求と裏切られることへの不安、すなわち〈親からの愛情に対する両価的感情〉を抱いていた。【生きづらさをめぐる葛藤】を感じて、クリニックに受診するものと関係性を築くことが難しいために〈専門家に本音を言えない状態〉で、一部の者は〈主治医との処方をめぐる共依存〉に陥った。また対象者は〈薬物使用者との遭遇〉から薬物を使用し始め、仲間意識を高めていった。薬物の作用は対象者の疲弊感を癒し、自己否定感を緩和して〈苦悩からの回避〉を強化した。【生き残るために薬物使用】に至った対象者は今までにない〈生活の破綻〉を来し、〈薬物のない生活を想像できない苦悩〉に直面するが、それでも薬物をやめられなかつた。徐々に心が不安定になり〈自傷行為による救急搬送を通じて得た危機感〉から医療機関につながつた。対象者は医療機関や刑務所に入つて薬物を使用する日常から離れることができ、そこで〈隔離(入院・刑務所)がもたらす安心感〉を得ることもあったが、結果的には依存症の

診断を受け入れられず＜依存症と要支援の否認＞に至った。

【薬物使用に対する周囲の反応】は、対象者の薬物依存症からの回復を左右した。＜対象者の薬物依存に気づいた親＞は医療機関や行政機関、知人から情報を得たが、＜家族療法に結びつく困難＞ゆえに対象者は治療の機会を失う（【薬物使用の継続】）。一方、＜治療に参加して依存症理解を深める親＞の行動や、＜変わらないスタンスで待つ支援者＞のかかわりは、対象者に安心感を与え、治療参加への意欲をかもし出した。＜施設職員のかかわりから得る安心感＞や、＜ミーティングや治療プログラムへの参加＞を通して得るわくち合いは、【断薬にむけた動機づけ】になった。しかし、回復資源に馴染めない対象者は、自分に合った＜安心できる居場所探し＞をせざるを得ず、ともすると＜断薬するための断薬男性の存在＞を求めて共依存に陥った。また対象者はしばらく断薬しても、＜しらふで直面した現実への焦り＞から再使用するが、薬物による癒しではなく、後悔や不安にさいなまれる（＜再使用しても得られない快感＞）。それでも対象者の心底には回復への希求があるため、【再使用を避けるための居場所探し】をくり返した。＜断薬を続けるために必要な仲間＞や＜専門家との信頼関係＞は、対象者に＜安全であるという感覚の獲得＞をもたらし、それにより徐々に＜健康的なつきあい＞ができるようになり、＜様々な立場の相談相手＞に恵まれるようになる。さらに自己肯定感が高められ、＜自己実現への志向＞を得る。

最後に対象者は、＜子どもを抱えて断薬し続けるための支援不足＞や、＜女性の回復の難しさ＞もあって、自助グループでの支援の限界を感じていた。社会や専門家の＜女性薬物依存症者に関する知識の欠如＞と、多職種の専門家を主体とした＜セルフヘルプ等に偏らない包括的支援への希求＞を課題として捉えるようになった。回復した対象者であっても＜経済的な安定のための生活保護＞や包括的支援を【己の価値を自覚しての行動】を維持するために必要としていた（【包括的支援への期待】）。

V. 考察

1. 女性薬物依存症者が薬物使用に至る背景

今回、対象となった女性薬物依存症者の＜親からの愛情に対する両価的感情＞の背景には、幼少期からの暴力、アルコール依存症、不仲、対象者への無関心という＜親から受けた負の影響＞の結果ともいえる重要他者との基本的信頼の揺らぎがあった。また、本対象者は薬物使用に至るまでに精神障害を併存するケースが少なくなかった。＜親から受けた負の影響＞に浸食された成育歴が紡ぎだした＜女性の回復の難しさ＞があった。薬物使用は対象者の自己価値を高め、彼女らの実生活で直面する＜苦悩からの回避＞になっていたことから、対象者は薬物依存症に陥りやすい心理状態であったと考える。

2. 薬物使用を継続する心理過程

対象者にとって薬物使用は、否認や回避せざるを得ない甚大な苦悩に打ち克つ対処行動であったと推察される。また薬物使用や自傷行為自体が、生命の危機を冒しても重要他者とのつながりを求める行為と考えると、＜隔離（入院・刑務所）がもたらす安心感＞は薬物依存症者の心理を象徴しているともいえる。一方、「信頼障害」（小林, 2012）を抱えた対象者は、心底からの援助希求によってかろうじてつながった回復資源からも、＜専門家に本音を言えない状態＞のまま離れる可能性をもつ。周囲の人が対象者の否認や薬物使用の継続に動じない姿勢を保つこと、対象者の断薬への動機づけを働きかけることが重要であると示唆する。

3. 断薬にむかう心理過程

対象者は断薬するための仲間が回復支援施設や NA にいたため、たとえ再使用や断薬中

の男性との共依存に陥ることがあっても、究極的な断薬へと再度立ち上がり、ミーティングで＜断薬を続けるために必要な仲間＞とのわかつち合いを通じて安堵を得ていた。【再使用を避けるための居場所探し】の結果、回復支援施設や NA といった所属集団の中に自己の定位を築き、アイデンティティを形成していたと考える。信頼障害の特徴をもつ対象者が他者を信頼できるようになった心理過程は、稻垣(2013)の主張から考えると、対象者は自分にマッチした安心できる居場所を探す中で、相手を信頼できる人か否かを「見極め能力」、つまり「安心」を獲得する能力を醸成すると考える。

4. 回復資源につながり回復を志向していく心理過程と回復に向けての包括的支援への期待

対象者は回復するにつれて、専門家、施設職員、断薬するための仲間との関係性の中で、自尊感情を高め、他者に左右されない主体性を得、対人関係においても、共依存とはほど遠い＜健康的なつきあい＞ができるようになったといえよう。また、アイデンティティの確立で自我が強化されたため、対象者は現実の親を受け入れられるようになり、親との関係も変化したと考える。一方、対象者には自助グループが果たせる役割の見極めと、当事者スタッフを巻き込んだ多職種の専門家主導の支援、すなわち、＜セルフヘルプ等に偏らない包括的支援への希求＞があった。

5. 看護への示唆

社会で活躍する回復者であっても、断薬生活を維持するには、継続した包括的支援が必要であることが示唆された。本結果より、対象者の薬物使用前からの援助希求や、再使用を避けるための居場所探しが示すように、対象者は回復する可能性を有している。支援を求めている対象者や家族をいかに迅速に掌握し、彼女らのニーズを見極めて支援するかが問われる。精神看護 CNS が当事者回復者と協働し、多職種・多機関と連携を図ることは、地域で生活する女性薬物依存症者への QOL 向上につながると考える。

VII. 結論

女性薬物依存症者が回復資源につながりそれを利用していく心理過程を明らかにすることを目的に、女性薬物依存症回復者 6 名に半構造化面接を行い、M-GTA の手法を用いて分析した。本研究の結果から対象者が他者を信頼できるようになった心理過程は、対象者は自分にマッチした安心できる居場所を探す中で、相手を信頼できる人か否かを見極め、安心を獲得する能力を醸成したと考えられた。また、安全であるという感覚は＜安心できる居場所探し＞の経験を積み重ねる中で培うことができたと推察された。さらに、精神看護 CNS が当事者回復者と協働し、多職種・多機関と連携を図ることは、地域で生活する女性薬物依存症者への QOL 向上と包括的支援システムの構築の発展に寄与できると示唆された。

引用文献リスト

- 江藤節代 (2003): 薬物依存リハビリテーション施設利用者の回復過程, 日本精神保健看護学会誌, 12(1), 1-10.
- 藤野京子, 高橋哲 (2007): 覚せい剤事犯受刑者の現状(2)児童虐待被害経験からの分析, アディクションと家族, 24(2), 160-168.
- 稻垣佑典 (2013): 信頼生成過程の検討による「信頼の解き放ち理論」再考—個人と地域コミュニティとの関係性に着目して—, <http://ir.library.tohoku.ac.jp/re/bitstream/10097/58741/1/140326-Inagaki-458-1.pdf>.
(2016.01.05 確認)
- 木下康仁 (2003): グラウンデッド・セオリー・アプローチの実践(初版), 弘文堂、東京.
- 小林桜児 (2012): いわゆる「パーソナリティ障害」症例におけるアルコール・薬物問題をどのように認識し, 対応するか Khantzian の「自己治療仮説」と「信頼障害」という観点から, 精神医学, 54(11), 1097-1102.

精巣組織培養下での精子形成メカニズムの可視化システムの開発

横浜市立大学大学院医学研究科泌尿器科学
古目谷 暢

(研究目的)

男性不妊はいまだ病態が解明されておらず、治療法が確立していない疾患群である。診断・治療の進歩には、*in vitro* 精子形成研究が重要であり、究極的にはヒトの*in vitro*精子形成系が必要であると考える。そこで実験動物を用いた*in vivo*実験がこれまで行われてきた。我々の研究室は2009年にアガロースゲルを用いた気相液相境界部培養により世界で初めてマウスでの*in vitro*精子形成を実現した。しかし、精子形成の効率が低く持続期間も短く、眞の意味で*in vivo* 精子形成を再現することはできていない。そこで2012年からマイクロ流体システムを用いた精巣組織培養の開発に取り組んできた。マイクロ流体システムは半導体作成技術から派生しており、 μm 単位の培養回路が作製でき、生体内微小循環を模倣することができる。近年細胞培養の分野で生体内機能を再現した*in vitro*肺胞が作製され注目を集めている。我々は、マイクロ流体システムを用いて生体内微小循環系を再現した多孔膜型マイクロ流体デバイスを開発し、培養精巣全体での精子形成を長期にわたって維持し、6ヶ月培養した精巣から産仔を得ることができた。これによって*in vivo*精子形成を疑似的に*in vitro*で再現することに成功した。本研究では、詳細かつ経時的な観察という*in vitro*のメリットを十分に活かして*in vitro*精子形成研究を大きく進展させるため、精子形成メカニズムの*in vitro*可視化システムの開発を行った。

(研究方法)

多孔膜型マイクロ流体デバイスにより、最低でも6ヶ月間にわたってマウスの精子形成を維持し、精巣でつくられた精子を用いて産仔も獲得できており、*in vitro*で生体内における精子形成環境を疑似的に再現することに成功した。この検討では、減数分裂特異的にGFPを発現するアクロシントランスジェニックマウスの精巣を用いたが、GFPを発現した生殖細胞を培養しながら一つずつ識別することができ、GFP陽性細胞の形態変化によって精子形成の進行を確認することができた(図1)。これまでの先行研究は長期培養に主眼を置いていたため断続的な観察に限定されていたが、今回は精子形成メカニズムの*in vitro*可視化システムを開発するために、精細管の同一部位での精子形成について詳細な検討を持続的に行うこととする。

(1)多孔膜型マイクロ流体デバイスでの検討

アクロシントランスジェニックマウスの精巣を先行研究で用いた多孔膜型デバイスで培養し、精子形成の可視化に最適な条件を検討していく。まずは全ての精細管において生殖細胞を識別できるか観察し、識別が困難な部位の状況を確認する。高倍率観察の障害となるのは、レンズから組織までの距離、組織の厚みなどであるため、状況によってこれらの因子の調整を行っていく。並行して、同一の精細管内で生殖細胞が減数分裂を開始し、半数体へと分化

し、精子細胞へと成熟する過程を連続して観察することで精子形成の全過程を可視化する。観察期間はマウスで1回の精子形成が完了する6週間を目途とする。全ての生殖細胞の鮮明な像が得られる条件を調整し、タイムラプスでの観察も行っていく。

(2) 視認性を向上させたスリット型マイクロ流体デバイスでの検討

顕微鏡を用いた高倍率観察は通常ガラス素材に対応しているため、マイクロ流体デバイスの素材をシリコンからガラスに切り替え、高倍率での観察能力を強化したスリット型デバイスを開発した。このデバイスも用いて(1)と同様の検討を行っていく。

(結果)

(1) 多孔膜型マイクロ流体デバイスでの検討

多孔膜型デバイスで培養精巣の同一部位を経時に撮影し、精細管内における精子形成の推移を観察した。培養33日目に精子形成が進展し、47日目に1回目の精子形成が終了し、54日目に2回目の減数分裂が開始し、62日目に精子形成が進展した(図2A)。別の培養組織で培養64日目に減数分裂を開始した生殖細胞を精細管に多数認め、74日目には生殖細胞の多くが円形精子細胞まで分化していた(図2B)。以上より多孔膜型デバイスにより精子形成の推移の観察が可能であることが確認できた。しかし、生殖細胞1つ1つを明瞭に識別する高倍率観察が十分に実現したとは言えない。より高倍率の観察を行うには生殖細胞毎に焦点を合わせる必要があり、精細管内における各生殖細胞の位置関係を把握しながら観察するのは困難である。現状では精細管の全体像を撮影した画像と生殖細胞毎に焦点を合わせて撮影した画像を比較検討するしかなく、これらの作業を全て手動で行う必要がある。そこでタイムラプス撮影によって高倍率画像を連続撮影し合成することでこの問題の解決を試みたが、ガラス素材に最適化された顕微鏡のオートフォーカス機能がシリコン素材には対応せず、多孔膜型デバイスでは自動撮影が全くできなかった。

以上より多孔膜型デバイスでも手動撮影をおこなえば精子形成過程の可視化が最低限可能であることが判明したが、マウスでの精子形成は6週間ほどかかり、精子形成の進展状況を表すStageもそれぞれ11~27時間の短時間で次のStageへと移行することから、手動撮影で高頻度かつ長期間のデータ収集と解析を行い、精子形成メカニズムの解明をすすめるのは現実的なアプローチとは言い難い。さらに、シリコン素材は一般的なガラス素材での高倍率観察とくらべて、像が不鮮明になり易く、シリコン自体の厚みのため観察可能距離も浅くなり組織の深いところしか評価できないという欠点がある。

(2) 視認性を向上させたスリット型マイクロ流体デバイスでの検討

そこでガラス素材を用いて視認性を向上させたスリット型マイクロ流体デバイスを開発した。このデバイスは生殖細胞1つ1つのより鮮明な画像を得ることができ、顕微鏡のオートフォーカス機能も正常に作動しタイムラプス観察が可能であった。実際に4時間毎に精細管の同一部位を撮影したところ、減数分裂を開始した生殖細胞が円形精子細胞へと分化していく過程が確認できた(図3A)。さらに円形精子細胞が出現する時期、伸長精子細胞が出現する時期は、生体内での精子形成と同様のタイミングであることも確認できた(図3B)。

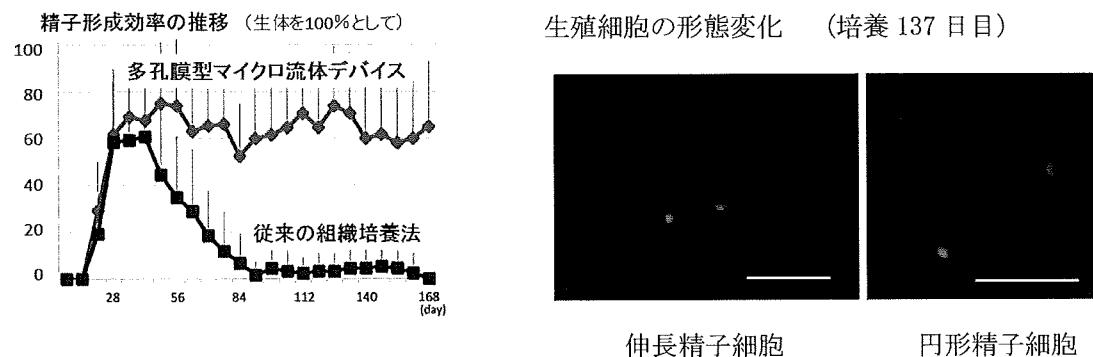
(成果・考察)

In vitroのメリットを活かしタイムラプス観察をはじめとする詳細かつ経時的な観察により生命現象の解明をすすめる試みは、これまでも多数行われている。しかし、その多くは培養細胞を用いており、得られた知見が必ずしも生体内現象を反映していない。また、従来の組織培養では経時に機能が障害され消失するため、摘出後数時間以内の観察ですらどこまで生体内現象を反映できているのかが懸念される。我々が開発した多孔膜型マイクロ流体デバイスは精巢組織をin vitroで安定して維持できるので、生体内における精子形成をin vitroで詳細に観察するために必須な培養環境の最適化に成功した。そこで、今回我々はマイクロ流体システムの利点である視認性の高さを活かし、精子形成過程をin vitroで可視化するシステムを開発した。当初使用した多孔膜型デバイスは顕微鏡による観察面がシリコン素材であり高倍率観察には向きなため、対物レンズと接するシリコン厚を調整することにより高倍率観察の実現を目指した。手動での観察ならば組織培養下で生殖細胞の観察が可能になったが、顕微鏡のオートフォーカス機能が反応せずタイムラプス観察は不可能であった。そこで観察面をガラスにしたスリット型デバイスを開発したところ視認性が格段に向上し、タイムラプス撮影が可能となり、生殖細胞の分化・成熟を精細管内における位置関係も含めて詳細に観察することが可能になった。これによってin vitroで精子形成を可視化するシステムの開発が実現した。今後は可視化したデータの効率的な解析など実運用に向けた最終調整を行うことで、精子形成メカニズムの解明の進展が期待される。また様々な因子が精子形成のどの過程に影響を与えるかも観察することができ、精子形成障害の評価も可能である。さらに従来の組織切片での評価といった一定点観察よりも遙かに多くの情報が得られるため、精子形成研究のハイスループット化が可能である。将来的には、多サンプルを並列化して同時に培養しながら観察したり、観察を自動化したりすることで、さらに高速化することが可能である。こうして得られた情報は、マウス以外の動物種の精子形成研究への応用が期待される。靈長類、ひいてはヒトでの精子形成が実現できれば、男性不妊の病態解明のみならず治療装置の実用化へ向けた道が拓かれることとなる。

(学会発表)

- ①古目谷 暢、マイクロ流体システムを用いて生体内循環系を疑似的に再現した精巢培養法の開発、第15回日本再生医療学会総会、2016.3.19、大阪国際会議場（大阪府）
- ②古目谷 暢、精子形成を長期間維持できるin vivo精巢組織培養システムの開発、第20回日本生殖内分泌学会学術集会、2016.1.9、神戸国際会議場（兵庫県）

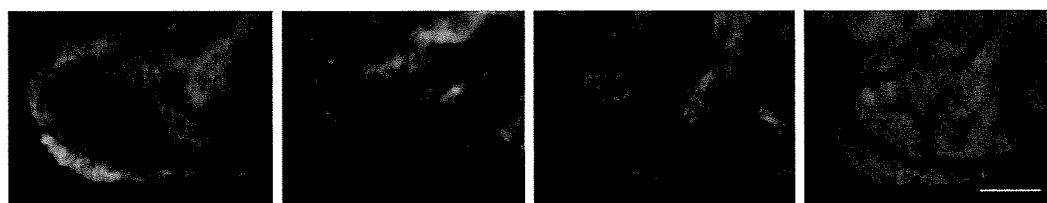
図1 多孔膜型デバイス



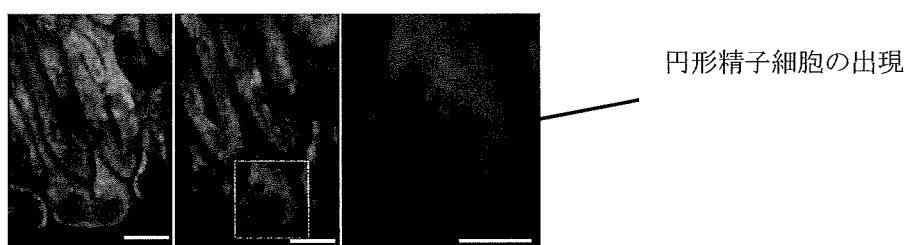
Scale bars: 10 μm .

図2 多孔膜型デバイスでの精子形成進展の確認

A) 培養33日目 47日目 54日目 62日目



B) 培養 67 日目 74 日目

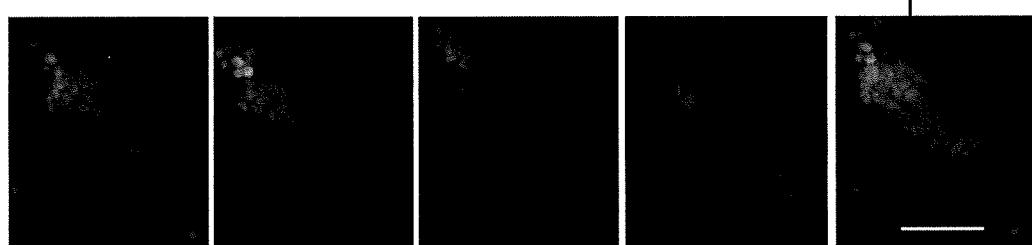


Scale bars: 200 μm (A, B left and center), 100 μm (B right).

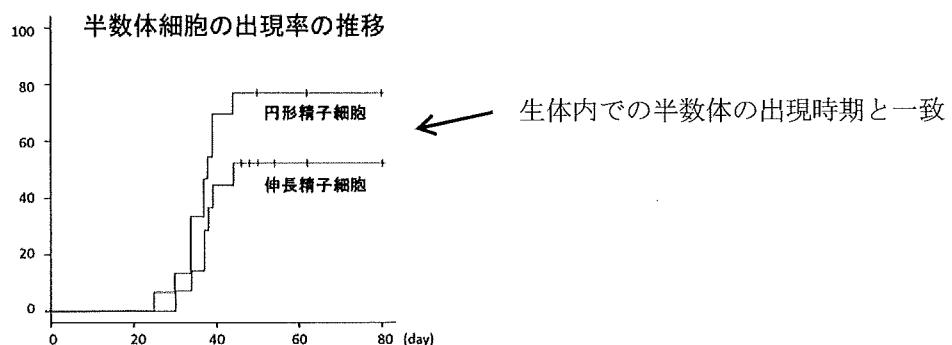
図3 スリット型デバイスでの検討

A) 同一精細管内における精子形成進展の確認（一部抜粋）

円形精子細胞の出現



B) 半数体細胞の出現時期の確認



Scale bars: 100 μm .

*FLCN*胚細胞変異がもたらす疾患の病態解明と 包括診療体制の確立

横浜市立大学医学研究科 准教授
古屋 充子

(研究目的)

遺伝子検査を手軽に健康管理活用する意識は日本人に広く浸透しつつあります。原因遺伝子が特定可能かつ浸透率の高い家族性腫瘍においては、発症前に遺伝子診断を行い早期治療につなげることで良好な生命予後を維持できます。一方で、遺伝子情報は慎重に管理されねばならず、若い世代や複数の罹患者がいる家族に対するきめ細かな支援が必要で、その疾患に精通した専門の医療チーム対応が求められます。

近年急速に報告が増加するバート・ホッグ・デュベ (Birt-Hogg-Dubé [BHD]) 症候群は新しい概念の遺伝性疾患で、*FLCN* と呼ばれる原因遺伝子変異を持ち、多発性腎癌を始め多臓器癌を高率に発症することが明らかになりました。申請者らは 2007 年より本疾患に着手し、包括的診療体制の確立が急務と考え、診療ウェブサイト“BHD ネット”(<http://www.bhd-net.jp/>)を開設し、横浜市立大学附属病院 BHD 専門外来を拠点に本邦唯一の包括診療・研究組織として全国の医療機関からの診療相談や遺伝子解析依頼に対応しています。この 2 年で年間、問い合わせ数は 100 件を超え、更に右肩上がりで増え続けています。本研究目的は、申請者らにより確定、集積された 270 名の保因者情報に基づく疫学・病態解明・治療戦略の確立です。

(研究方法)

- BHD 症候群全体における腎癌発症率は 20% 前後ですが、特定部位に変異を有する患者では 41.6% と高い発症率であることが疫学調査で分かってきました。また肺腺癌患者が 8 名、うち 2 名は多発癌で、現在腎以外の悪性腫瘍との関連は未報告ですが、これらの腫瘍から *FLCN* セカンドヒットを確認し(論文投稿中)、遺伝子解析に基づく新知見を次々と得て投稿を進めています。
- *FLCN* 変異腎癌から不死化細胞株を樹立しました(論文作成中)。*FLCN* 変異細胞株はこれまで、米国がん研究所に 1 種類あるのみで譲与不可でしたが、細胞レベルの研究に独自技術で臨む態勢が整い、シグナル経路の研究を加速させます。
- *FLCN* 変異腎癌で全染色体領域における CNV(copy number variation)解析を施行した結果、組織型とは無関係に特定染色体領域に UPD(uniparental disomy) が存在する知見

を得ました。UPD は新たな発癌機序と考えられ、共通 UPD 領域に存在する遺伝子の関与を多数例の組織で検討し、治療標的に繋がる分子群を絞り込む予定です。

- 全国医療機関から横浜市立大学附属病院 BHD 外来への患者受診および相談が年間合計で 100 件相当あります。特に家族で腫瘍を発生している場合や若年発症癌に対しては綿密な打ち合わせや資料のやりとりを通じて診療方針を決めていきます。

(結果・成果)

- 遺伝子診断で BHD 症候群と確定した家系は累計 128 家系となり、アジア最大の疫学情報を元に日本人データを作成しました。40 歳以上の保因者における腎がん罹患率が約 40% と高率であることが判明しました。
 - Furuya M*, Yao M, Tanaka R, Nagashima Y, Kuroda N, Hasumi H, Baba M, Matsushima J, Nomura F, Nakatani Y. Genetic, Epidemiologic and Clinicopathologic Studies of Japanese Asian Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Clin Genet.* in press.
 - 古屋充子、中谷行雄: Birt-Hogg-Dube 症候群. 特集 Tumor syndrome 第 5 章 遺伝性腎腫瘍 (編集: 山田正信, 対馬義人) 『臨床画像』 メジカルビュー, pp. 170-4, 2015.
- 計 7 名から 14 か所の肺がんあるいは前がん病変をマイクロダイセクションし、肺病変について新たな知見が得られました。浸潤がん症例のみ、*FLCN* のヘテロ接合性消失(LOH)以外に *KRAS*, *EGFR* の変異があることがわかり、*FLCN* セカンドヒットだけでは非浸潤性の上皮過形成に繋がることがあっても、生命予後に関わる重篤疾患にはならないと示唆されました。一方で、気胸診療後にフォローアップを終了すると、その後の腫瘍性変化を早期に診断するチャンスを逸してしまう危険性が危惧され、今後の肺検診のあり方に更なる情報が必要であると考えられます。
 - Furuya M*, Tanaka R, Okudela K, Nakamura S, Yoshioka H, Tsuzuki T, Shibuya R, Yatera K, Shirasaki H, Sudo Y, Kimura N, Yamada K, Uematsu S, Kunimura T, Kato I, Nakatani Y. Pulmonary Neoplasms in Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome: Histopathological Features and Genetic and Somatic Events. *PLOS ONE*, 2016 e0151476. doi: 10.1371/journal.pone.0151476.
- BHD 腎がんでは組織型に無関係に UPD が多数含まれていることが明らかになり、

散発腎がんとは生物学的に異なる特徴をもつとの我々の仮説を支持する結果が得られました。更にほとんどの染色体で gain/loss がないことから、散発性嫌色素性腎がんや散発性淡明細胞型腎がんとの鑑別に FISH によるセントロメア解析を施行しており、診断意義について精査したところ、診断への有用性が示されました。

- Kato I, Iribé Y, Nagashima Y, Kuroda N, Tanaka R, Nakatani Y, Hasumi H, Yao M, Furuya M*. Fluorescent and Chromogenic *in situ* Hybridization of CEN17q as a Potent Useful Diagnostic Marker for Birt-Hogg-Dubé Syndrome-associated Chromophobe Renal Cell Carcinomas. *Hum Pathol.* 2016;52:74-82. pii: S0046-8177(16)00036-8. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.004.
- 学会発表に加え、2016年春から夏にかけての患者会開催、市民医療講座開催、学会コンパニオンミーティング開催などの準備をすすめ、社会的な啓蒙活動も積極的に行いました。
 - 入部康弘、矢尾正祐、蓮見壽史、長嶋洋治、馬場理也、野村文夫、中谷行雄、古屋充子: Birt-Hogg-Dubé 症候群に発症する腎癌の臨床病理像、遺伝子変異および網羅的染色体解析. 第74回日本癌学会総会. (名古屋), 2015.10.8-10
 - 古屋充子、入部康弘、矢尾正祐、蓮見壽史、長嶋洋治、馬場理也、野村文夫、中谷行雄: Birt-Hogg-Dubé 症候群 100 家系における臨床病理像の特徴と腎癌およびその他の悪性腫瘍発症率の検討. 第74回日本癌学会総会. (名古屋), 2015.10.8-10
 - 中谷行雄、奥寺康司、入部康弘、矢尾正祐、蓮見壽史、長嶋洋治、馬場理也、野村文夫、古屋充子: Birt-Hogg-Dubé 症候群における肺腫瘍発生の病理学的検討. 第74回日本癌学会総会. (名古屋), 2015.10.8-10
 - 馬場理也、黄螢、蓮見壽史、矢尾正祐、長嶋洋治、古屋充子、尾池雄一、江藤正俊, Laura S Schmidt, W Marston Linehan: Xp11.2 転座腎細胞癌発癌機構の解明. 第74回日本癌学会総会. (名古屋), 2015.10.8-10
 - 早川佳奈、田村志宣、早川隆洋、中圖香陽子、那須英紀、中野好夫、古屋充子、木下貴裕、藤本特三: 胸部異常陰影から診断し得た Birt-Hogg-Dubé 症候群の 1 例。第210回日本内科学会 近畿地方会、神戸, 2015. 11.28.

(考察)

- 全国の医療関係者および患者家族からの相談は増加の一途で、稀少疾患診療拠点としての重要性がますます高まっています。
- 腎がんの病理診断にはこれまで有用なマーカーはないとされていましたが、我々の研究から FISH を用いた鑑別方法が提唱できる段階に進んでおり、将来的には WHO の診断クライテリアに含めてもらえる研究に発展させる予定です。
- 噫緊の課題として診療ガイドラインの確立、遺伝子検査適応基準の確立など、社会医学的な面での整備を加速させます。当施設で樹立した不死化細胞株による研究をすすめ、治療に有用な標的分子の発現解析などに尽力していきます。
- これまで欧米の疫学データだけが参考にされてきましたが、アジア人の特徴として皮膚症状が乏しく気胸が有意に多いこと、変異に 3 つのホットスポットがあることなどを明らかにしました。これらの集積データから日本人の特徴に基づく診療が重要であり、更なる啓蒙活動を行う予定です。

急性骨髓性白血病における多角的微小残存病変評価方法 の有用性に関する研究

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科学 助教
宮崎 拓也

(研究目的)

急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) に治療において、化学療法や造血幹細胞移植によって寛解に到達しても、その後に再発する症例を少なからず認めることが臨床で大きな問題である。体内に残存するごく僅かな白血病細胞（微小残存病変： minimal residual disease, MRD）を正確に評価することは、再発の早期発見や予後を予測する上で極めて重要である。疾患特異的融合遺伝子を有する一部のAMLではその融合遺伝子をPCR法で検出することによりMRDのモニタリングが可能であるが、大部分のAMLにおいて確立されたMRDの評価方法はない。

AMLの多くの症例で評価可能なMRD検出手法として、flow cytometryによる抗原発現異常 (aberrant expression) の検出やPCR法によるWT1mRNA発現、さらにはNPM1変異、FLT3/ITD変異の有無の検出等があげられる。特に、WT1mRNAは90%以上の初発AMLの骨髓や末梢血で過剰発現しており、MRDのモニタリングに有用なマーカーとして期待されている。さらに、NPM1変異は成人AMLの25%に、FLT3/ITD変異は30%にみられる遺伝子変異であり、疾患特異的な融合遺伝子に比較し出現頻度が高い。近年、NPM1変異はAMLの再発時にも検出され、優れた疾患マーカーであることが示されている (Ivey A, N Engl J Med, 2016)。

本研究では、AMLの多くの症例で発現しているWT1mRNA発現に着目し、PCR法を用いた末梢血WT1mRNAの検出によるMRDの評価を試みた。さらに、その他のMRD評価方法であるflow cytometryによる抗原発現異常の検出、PCR法によるNPM1変異、FLT3/ITD変異の有無を解析し、その解析結果を統合することで、より信頼性のあるMRD評価方法を確立することを目的とする。MRDをより正確に評価する方法が確立されれば、それぞれの症例に応じた治療戦略が可能となり、AMLの予後が改善されることが期待される。

(研究方法)

本研究は横浜市立大学附属病院および共同研究施設において、新規に成人のAMLと診断し、標準的な化学療法を行った患者を対象とした。AMLのうちFAB分類のM3は除外した。初めに、新規発症のAML患者における診断時の末梢血WT1mRNA発現レベルをPCR法によって測定し、これらのWT1mRNA発現の臨床的意義を後方視的に解析した。次に、それらの症例の中で、経時にWT1mRNAを始めとするMRDマーカーをモニタリングした症例を抽出し、それらのMRDレベルが再発や予後に与える影響を検討した。さらに、同種造血幹細胞移植を施行した症例におけるMRDモニタリングの有用性を検証した。

WT1mRNAはReal-time PCR法によって測定し、その解析はSRLにて実施した。統計解析にはEZRを使用した。生存期間解析では、Kaplan-Meier法を用いて生存曲線を作成し、log-rank testにより有意差を検定した。本研究は横浜市立大学附属病院の倫理委員会の承認を得た。

(結 果)

2008年から2015年の期間において102例のAMLが対象となった。年齢中央値は50歳（15 - 71歳）で59.8%が男性であった。AMLの診断時に97例（95.1%）で末梢血WT1mRNAを検出し、その発現レベルの中央値は13,000 copies/ μ gRNA (<50 - 1,000,000 copies/ μ gRNA) であった（表1）。WT1mRNA発現レベルをFAB分類のサブタイプ別に検討したところ、FAB-M0（中央値 1,700, n = 3）、M2（7,900, n = 44）、M5（18,000, n = 12）、M6（13,000, n = 3）と比較し、FAB-M1（中央値 44,500, n = 12）とM4（44,000, n = 23）で高発現を認めた（図1）。次に、WT1mRNA発現レベルを染色体別に検討したところ、inv(16)（中央値 97,000, n = 10）を有するAML症例では、t(8;21)（4,800, n = 21）や正常核型（19,000, n = 37）を有するAML症例よりも、有意にWT1mRNAの高発現を認めた（ $P < 0.005$ ）（図2）。WT1mRNAの発現レベルは、その他のAMLに関連したパラメータである末梢血白血病細胞数（ $r = -0.0946$, $P = 0.344$ ）、LDH値（ $r = -0.23$, $P = 0.0199$ ）、ferritin値（ $r = -0.124$, $P = 0.246$ ）、骨髄中の疾患特異的融合遺伝子の発現レベルのいずれとも正の相関を示さなかった。一方、WT1mRNAの発現レベルが予後に与える影響を検討した。WT1mRNAの発現レベルに応じて全生存率（Overall survival: OS）および無イベント生存率（Event-free survival: EFS）の群間比較を行ったが、いずれも有意差を認めなかつた（図3. WT1mRNA Cutoff 13,000, (A)OS, (B)EFS）。

次に、経時的にWT1mRNAをモニタリングした症例を抽出し、それらのMRDレベルが再発や予後に与える影響を検討した。当院で診断されたAML30例のうち15例において経時的にWT1mRNAをモニタリングした。化学療法や造血幹細胞移植によって血液学的寛解に到達したAMLにおいて、WT1mRNAの発現レベルが再発の予兆となり得るかを検討した。そのうち4例において、WT1mRNAのモニタリングで検出感度以下（<50 copies/ μ gRNA）を維持していたがその後のWT1mRNA上昇を認め、最終的に血液学的再発を確認した。4例のWT1mRNA検出時の発現レベル中央値は106 copies/ μ gRNA（55 - 370 copies/ μ gRNA）であり、血液学的再発までの期間の中央値は138.5日（48 - 258日）であった。その他に再発の予兆を検出し得る検査方法を検討したところ、1例においては3か月後の骨髄検体のPCR法で疾患特異的融合遺伝子CBF β -MYH11の定性判定が陽性であり、別の1例においては5か月後の骨髄検体の移植後異性間FISHで1.2%レシピエント由来の性染色体を確認した。残りの2例では末梢血の白血病細胞の出現によって再発が示唆され、その他に有用なMRD検出方法はなかつた。一方、WT1mRNA上昇を複数回確認したにも関わらず、その後の経過観察中に血液学的再発に至らない症例を1例経験した（WT1mRNA 52 - 130、観察期間 322日）。

さらに、AMLの造血幹細胞移植におけるWT1mRNAの臨床的意義を検討した。造血幹細胞移植を施行した10例のうち、移植前にWT1mRNAが検出された症例を4例認め、その他の6例は検出感度以下であった。その4例の移植前WT1mRNAの発現レベルは中央値 580 copies/ μ gRNAであり、各症例の発現レベルは460、520、650、18000 copies/ μ gRNAであった。これら4例は移植後に全例が再発し、移植から再発までの期間は中央値186.5日（56 - 757日）であった。

表1. AML102例の臨床的特徴

	n = 102
Gender, male/female	61/41(59.8%)
Age, median (range), years	50 (15-71)

AML subtype	
M0/ M1/ M2/ M4/ M5/ M6	3/ 12/ 45/ 23/ 12/ 3
Mixed phenotype	2
Myelodysplasia-related change	1
Unknown	1
Core binding factor (CBF)	
AML1/MTG8	21
CBFB/MYH11	10
Peripheral blood-WT1, median (range), (copies/ μ gRNA)	13,000 (<50 - 1,000,000)
Peripheral blood -WT1 positive (%)	97 (95.1%)

図 1. FAB 分類別による WT1 発現レベル

図 2. 染色体別による WT1 発現レベル

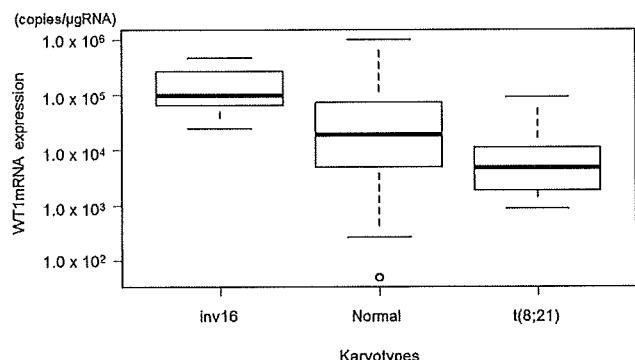
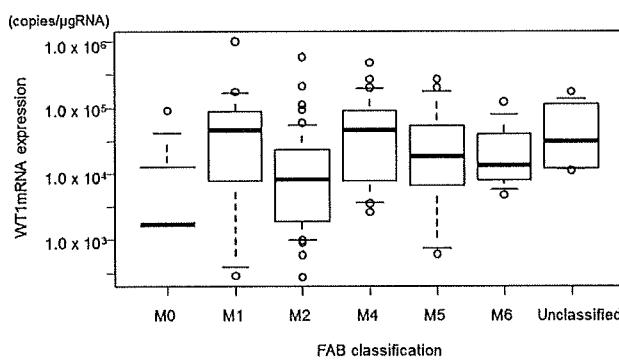
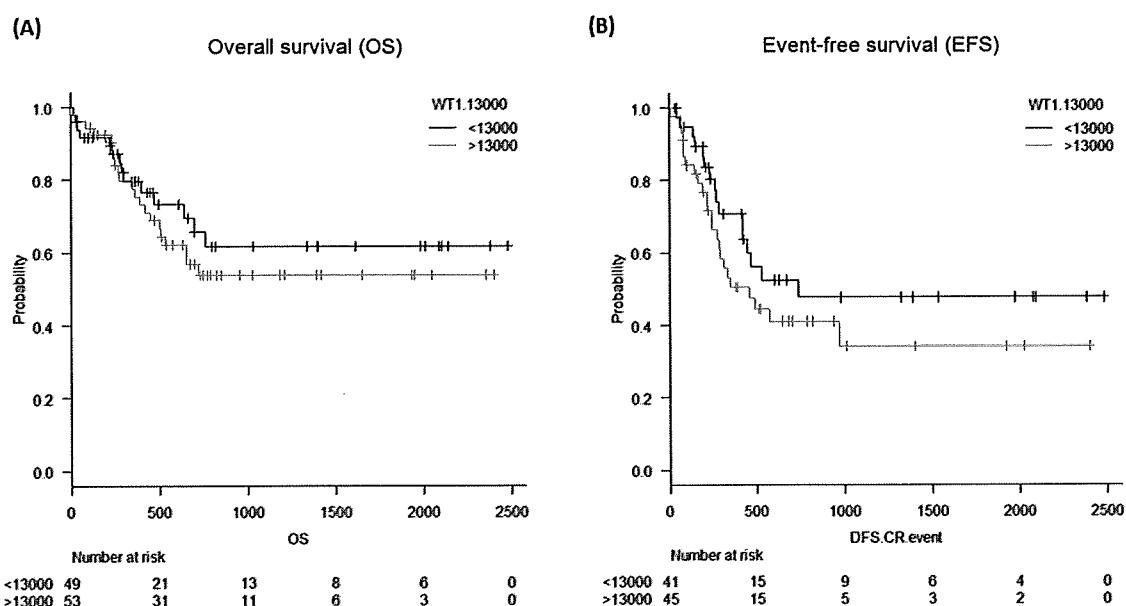


図 3. WT1 発現レベルと予後との関連 (A. 全生存率、B. 無イベント生存率)



(成果・考察)

AMLの化学療法後や造血幹細胞移植後において、MRDを正確に評価することはAMLの再発の早期発見や予後を予測する上で極めて重要である。しかし、日常臨床では定まったMRDの評価方法はなく、末梢血への白血病細胞の出現や正常血球の減少等、明らかに再発を疑う所見を認めてから、骨髄の評価によって再発の確定診断を行うことが多い。従って、早期再発を発見するためには、簡便かつ正確にMRDを評価する方法の確立が必要である。

本研究では、まず初めに末梢血のWT1mRNA発現に着目し、AMLのMRDマーカーとしての有用性を検証した。WT1mRNAは大部分の白血病細胞に発現することが知られているが、骨髄中の正常のCD34陽性の骨髄前駆細胞にも発現する。そのために、骨髄よりも末梢血によるWT1mRNAの評価がMRDの評価方法として有用であることが示唆される。日常臨床では、治療終了後のフォローアップとして骨髄検査を頻回に行なうことは侵襲や負担が大きく、末梢血液検体を用いたMRDの評価方法が確立されることが望ましい。

今回、AML102例の後方視的解析より、AMLの初発時には95%の症例で末梢血のWT1mRNAを検出することが可能であり、AMLの腫瘍マーカーとしての有用性を確認した。FAB分類のサブタイプごとの解析では、末梢血WT1mRNAはサブタイプごとにその発現レベルが異なっていることを示した。さらに、WT1mRNAの発現レベルは、白血病細胞数、LDH値、ferritin値とも相関しなかったため、その発現レベルは体内の白血病細胞の腫瘍量を反映しているとは結論づけられなかった。しかしながら、治療後のWT1mRNAのモニタリングで検出感度以下を維持していたにも関わらず、その後にWT1mRNA上昇を認め、最終的に血液学的再発を来たした症例を4例確認した。WT1mRNAの検出から血液学的再発までの期間は症例ごとに異なるが、中央値138.5日と比較的早期に再発を予測し得た。さらに、移植患者においても、移植前直前にWT1mRNAの上昇を認めた症例は、移植後に全例が再発しており、予後不良因子となる可能性も示唆された。

以上のように、末梢血WT1mRNAは感度の良いMRD評価方法であることが示唆されるが、WT1mRNA以外にも血液学的再発を早期に予兆するのに適した他のMRD評価方法を検討することは重要である。これまでに当研究者は、造血幹細胞移植後のMultidimensional flow cytometryによるMRDの評価方法が全てのAMLに対して測定可能であり、そのMRD検出が有意に予後に影響することを報告(Miyazaki T, Leuk Res, 2012)し、flow cytometry法を用いたMRD解析もPCR法と同等の検出感度が期待される。今後は、末梢血におけるflow cytometry法による抗原発現異常の解析とNPM1とFLT3/ITD変異の解析を組み合わせ、前方視的な臨床研究によって細胞学的および分子遺伝学的再発を立証する研究計画を検討中である。いずれも単独のMRDで評価するのではなく、各MRDの結果を統合し、より信頼性のあるMRD評価方法の確立を目指す。正確なMRD評価方法の確立によって、将来的には、MRDの検出によって症例に応じた治療戦略が可能となり、AMLの予後が改善されることが期待される。

学会発表：

第77回日本血液学会学術集会、金沢、2015、10. 一般口演、筆頭演者.

第38回日本造血細胞移植学会総会、名古屋、2016、3. 一般口演、共同演者.

第78回日本血液学会学術集会、横浜、2016、10. 筆頭演者. (予定)

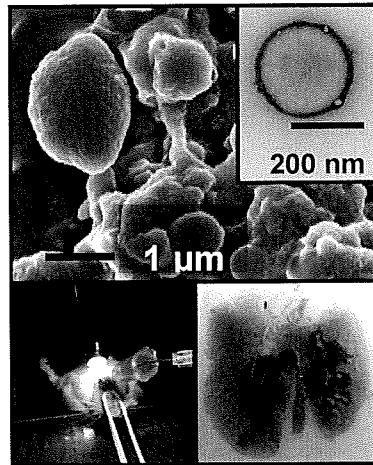
ナノ・マイクロ粒子化免疫調節剤の経気道投与による先駆的肺癌治療と安全性に関する研究

横浜市立大学大学院医学研究科呼吸器病学講師
佐藤 隆

(研究目的)

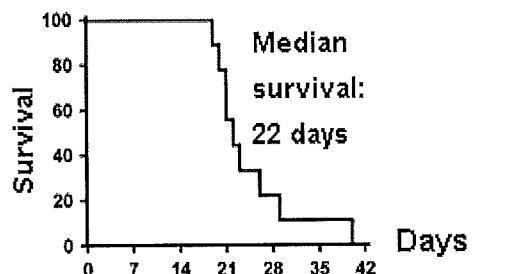
近年、我々は経気道投与が可能な免疫調節性合成オリゴ核酸包埋ポリケタルナノ・マイクロ粒子（右上図参照）を開発した（米国特許申請中・国際出願番号 PCT/US 2015/039574・国際公開2016年1月13日）。この粒子は、マウス呼吸器疾患モデルにおける経気道投与により気道粘膜免疫（特に傍気管支リンパ組織）での取り込みを介して、免疫応答を調節することが可能であることが分かった。我々はマウス原発性肺癌モデル（右下図参照）を利用して、Th1刺激性合成オリゴ核酸包埋ナノ・マイクロ粒子の経気道投与による腫瘍微小環境の改変と抗腫瘍効果、長期生存への寄与を報告した（Sato T *et al.* Mol Cancer Ther 14, 2198–2205, 2015）。

本研究は、この前臨床試験結果に基づいて、ヒト臨床試験への移行を計画するにあたり、治療後長期生存モデルとそのサンプルを用いた分子生物学的・組織学的な検証を主体とする長期安全性評価を行うことを目的とする。

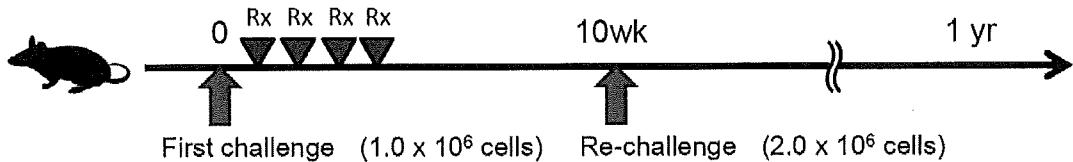


(研究方法)

今回使用するマウス原発性肺がんモデルは、近年ヒト肺がんの前臨床試験モデルとしての有用性が認識されている方法で、経気道的に肺がん細胞株を移植して作成する（Savai *et al.* Am J Pathol 2005;167:937–946）。我々はSavaiらの方法を一部改変して原発性肺癌モデルを作成した。具体的には、Lewis Lung Carcinoma (LLC1; ATCC CRL-1642細胞株)細胞100万個 (/50 μl saline) を、5週齢のC57BL/6マウスに全身麻酔下で経気道的に投与して作成する。このモデルは100%致死的で生存期間中央値が22日を示す、極めて高い再現性を示すモデルである（右図参照）。このモデルは、気道周囲への腫瘍浸潤様式だけでなく、形成された腫瘍結節の90%以上で腫瘍関連傍気管支リンパ組織（Tumor-induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue; T-BALT）を形成するなど、ヒト肺がん組織に特徴的な腫瘍微小環境を模倣することが示された。このモデルに対して、Day 7から1週毎にDay 28までTh1刺激性合成オリゴ核酸包埋ナノ・マイクロ粒子を投与することで、著明な生存率向上（Day 70における生存率82%）が示された（Sato T *et al.* Mol Cancer Ther 14, 2198–2205, 2015）。本研究では、このTh1刺激性合成オリゴ核酸包埋ナノ・マイクロ粒子投与による長期生存 (> Day 70) モデルに対して、再度LLC1細胞株の



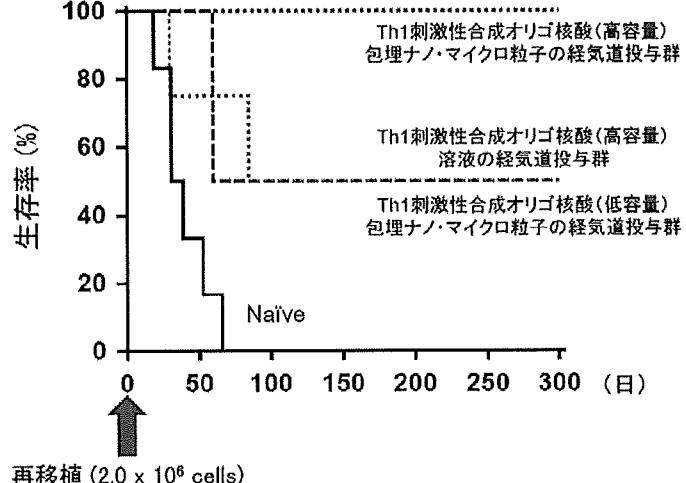
経気道的移植を行い（下図参照）、免疫記憶機能による長期抗腫瘍効果を有するか検討するとともに、生存の延長がみられた場合には病理組織学的検討を行った。



（結 果）

1. 治療後長期生存モデルでは免疫記憶機能による抗腫瘍効果が見込まれる。

治療後長期生存モデルにおける抗腫瘍記憶免疫を検証する目的で、治療後10週（15週齢）の時点で再度LLC1細胞株の経気道移植を行った。移植する細胞数は15週齢のNaïveマウスに $1.0 \sim 4.0 \times 10^6$ 個までのLLC1細胞株を移植し、再現性が得られる致死的モデルの作成に必要な細胞数を検証した結果、 2.0×10^6 個の細胞数に決定した。今回、治療後長期生存を達成し、再投与を行ったマウスは合計13匹であった（治療内訳；Th1刺激性合成オリゴ核酸（高容量）包埋ナノ・マイクロ粒子投与群7匹、Th1刺激性合成オリゴ核酸（低容量）包埋ナノ・マイクロ粒子投与群4匹、Th1刺激性合成オリゴ核酸（高容量）溶液投与群2匹。いずれも経気道投与による治療歴を有する）。再投与に供するマウス個体数は前治療による生存率を反映したため、群間で異なった結果となった。今回再投与を行った、治療後長期生存モデルの5週齢時（初回LLC1細胞移植時）の体重は 19.2 ± 2.1 gであり、15週齢の再移植時における体重は、 26.6 ± 3.6 gと良好な体重増加を示し、同じ15週齢のNaïveマウスの体重（ 26.7 ± 2.3 g）と比較して、有意な差を認めなかった($p = 0.787$)。全身麻酔下で、経気道的にLLC1細胞 2.0×10^6 個の移植を行ったあとは、無治療で経過観察を行った。Naïveマウス（N = 6）においては、生存期間中央値が31日で生存率 0% の致死的モデルであったが、前治療としてTh1刺激性合成オリゴ核酸（高容量）包埋ナノ・マイクロ粒子の経気道投与群（N = 7）においては、100% の長期生存が得られた（右図参照、 $p = 0.0002$ vs Naïve）。なお、Th1刺激性合成オリゴ核酸（高容量）溶液の経気道投与群（N = 2）や（低容量）包埋ナノ・マイクロ粒子の経気道投与群（N = 4）においては、いずれも50% の長期生存が得られた（右図参照、 $p = 0.0508$ vs Naïve）。



2. 抗腫瘍免疫記憶による長期生存モデルの個体外観・重要臓器評価。

治療後長期生存モデルに対して、LLC1再移植を行い、無治療経過観察にて1年生存が得られたモデル（N = 10; ♂ 5, ♀ 5）に対して安全性に関する評価を行った。個体外観では、体

表の50%以上に及ぶ高度脱毛と50%に及ばない中等度脱毛がそれぞれ1匹（10%）ずつにみられた。また、体表の一部に脱毛がみられる軽度の脱毛が3匹（30%）にみられたが、残りの5匹は外観に異常がみられなかった（右図参照）。体重平均は 35.0 ± 6.1 gで、中等度・高度脱毛がみられたのはいずれも雌で 29.9 ± 1.5 gであった（雌の平均体重 32.2 ± 3.8 g）。

重要臓器外観では、肺の外観で腫瘍結節は確認できなかった。心臓・肝臓・腎臓・脾臓に異常を認めなかった。

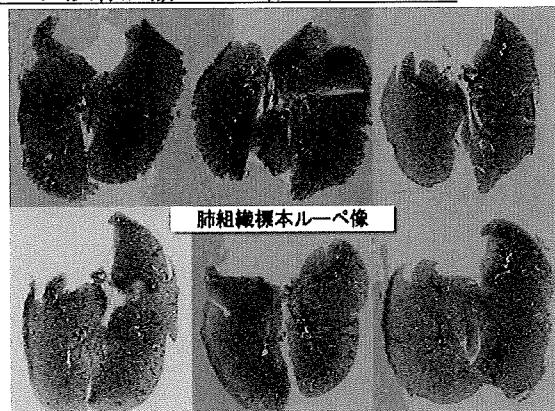
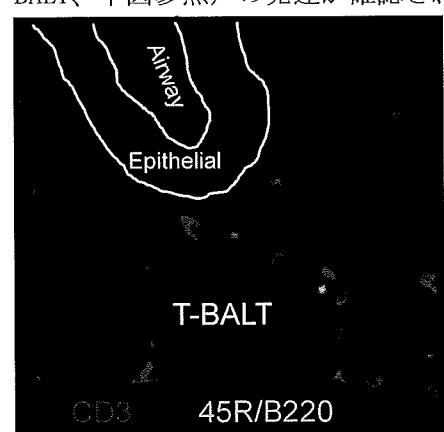
血液学的検査所見でも、10週齢のC57BL/6正常マウスの血液学的検査所見と比較して、肝機能（AST、ALT、ALP、T-Bil）、腎機能（BUN、CRE）に特記すべき異常を認めなかった。



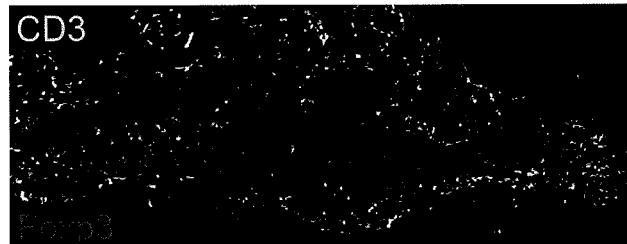
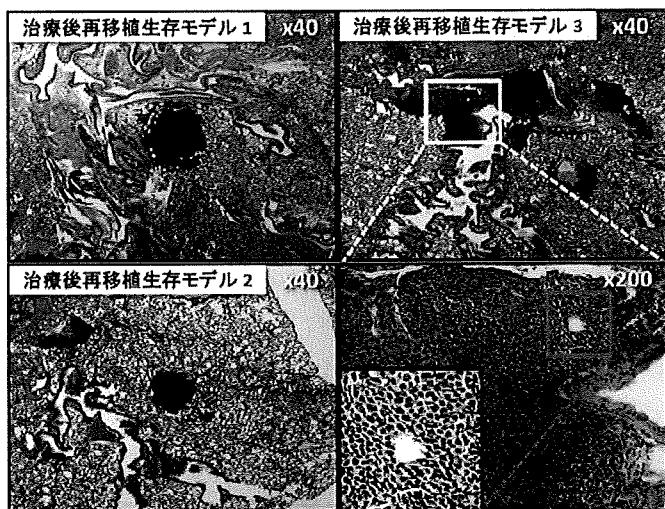
3. 抗腫瘍免疫記憶による長期生存モデルでは残存腫瘍との共存がみられる。

治療後長期生存モデルに対してLLC1再移植を行い、無治療経過観察にて1年生存が得られたモデル（N = 10; ♂ 5, ♀ 5）の肺組織の解析を行った。肺組織の正中冠状断標本では、すべてのモデルに平均8.2個の残存する腫瘍結節が確認された（右図参照）。

残存腫瘍結節の病理組織解析では、初回移植後の腫瘍結節周囲にみられた、腫瘍関連傍気管支リンパ組織（tumor-induced bronchus-associated lymphoid tissue; T-BALT、下図参照）の発達が確認された。初回移植後にみられる腫瘍結節では、周囲にTリンパ球・Bリンパ球、M1・M2マクロファージ、樹状細胞等からなるT-BALTの形成がみられるが、腫瘍結節を全周性に取り囲むほどの発達はみられない。また、初期形成段階のT-BALT周囲では、制御性T細胞密度が高く、相対的にアポトーシス腫瘍細胞の密度が低いことから、初期形成的T-BALTは抗腫瘍免疫応答において抑制性の腫瘍微小環境形成を促進することが示唆された。Th1刺激性合成オリゴ核酸包埋ナノ・マイクロ粒子は、このT-BALT領域のマクロファージやCD205陽性成熟樹状細胞に取り込まれ、T-BALT領域のM2マクロファージと制御性T細胞密度を低下させ、CD8陽性T細胞密度を増加させる（Sato T et al. Mol Cancer Ther 14, 2198–2205, 2015）。治療後再移植1年生存モデルにみられる残存腫瘍



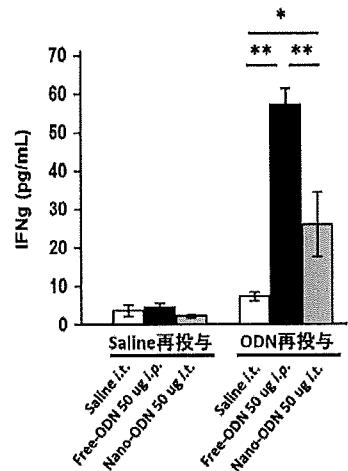
結節の強拡大（右図赤枠内）では、腫瘍細胞周囲に高密度の免疫細胞集塊が認められた。蛍光顕微鏡下では、残存腫瘍結節にはほぼ全周性にCD3陽性T細胞からなるリンパ組織の発達が確認された（下図参照）。残存腫瘍結節では、non-T cell由来のFoxp3陽性細胞が多数確認され、B細胞由来の可能性が示唆された。これらのnon-T-Foxp3 (+) 細胞の密度とTUNEL陽性アポトーシス細胞の密度に相関はみられなかった。



されるオリゴ核酸（ODN）の肺内定着性が向上し、間欠的投与が可能となった。他方、ナノ・マイクロ粒子に包埋化することにより免疫刺激能が局所に限定されるため、全身性免疫応答が惹起されない可能性も考慮された。そこで、ナノ・マイクロ粒子包埋ODNを経気道投与（i. t.）した場合と、同量の包埋化しないフリーのODNを腹腔内投与（i. p.）した場合で、脾細胞のODN再投与時の反応性の差異を検証した。右図はマウスにi. t.あるいはi. p.後、36時間経過した時点で脾細胞を採取し、ODN再投与を行った際のIFN γ 産生能を示した。この結果より、包埋化ODNの経気道投与でも短時間で全身性の免疫応答が惹起されることが確認された。このメカニズムにより、経気道投与においても包埋化ODNは抗腫瘍記憶免疫を惹起し、腫瘍細胞の再移植に対して効果的に抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。今回我々が作成したポリマー系ナノ・マイクロキャリアーは長期経過で重要臓器障害をきたさなかったが、10~20%の個体で中等度の脱毛を生じたことは、有機系溶媒を使用した製造過程でより完全な洗浄過程が必要と考えられた。ナノ・マイクロキャリアー包埋化Th1刺激性ODNによる治療生存群では、腫瘍細胞の再移植後も無治療で100%の長期生存を達成した。驚くべきことに、これら長期生存例においても肺内には残存腫瘍結節が認められ、それを取り囲むリンパ装置が高度に発達している点が着目された。抗腫瘍抑制性とされるFoxp3陽性細胞が多数確認されたものの、T細胞由来ではなく、B細胞由来が多数示唆された。長期生存例の残存腫瘍微小環境におけるFoxp3陽性細胞の機能解析をすすめることで、腫瘍との共存の手掛かりが得られると考えられた。

（成果・考察）

今回、我々が開発した生分解性のナノ・マイクロ粒子にTh1刺激性合成オリゴ核酸を包埋することにより、経気道投与で速やかに肺外にクリアランスさ



出 版 刊 行 助 成

「海洋ガバナンスの国際法－普遍的管轄権を手掛かりとして－」

横浜市立大学・国際総合科学部・准教授
瀬田 真

【出版物の概要】

(著者名)	瀬田 真
(出版社)	三省堂
(発行日)	2016年3月16日
(発行部数)	500 部
(価格)	3,900 円

【刊行の目的】

本研究は、国家という陸の視点から形成してきた国際海洋法が、その視点に根差しているが故に現実の問題、すなわち、海洋の自由から海洋の管理へと転換するという問題に対応できなくなっていることを示すものである。そして、海洋の管理への転換を可能にするには、海洋を一体のものとして統合的に管理する海洋ガバナンスの視点（海の視点）が必要不可欠であることを指摘する。本研究は、あくまでも海の視点の特徴が最も顕著に表れつつある海上犯罪に対する普遍的管轄権に焦点を当てたものであり、海洋の境界画定に関する規則や海洋環境についての規則、さらには船舶の航行規則をも含む国際海洋法全体についての海洋ガバナンスを包括的に考察するものではない。そのため、本研究を刊行することによって、海上犯罪について海の視点が現れているという事実を周知するだけでなく、この視点が他の海洋法の分野に広がり、さらなる海洋法の研究・形成を促進することが期待できる。申請者自身も、海上犯罪以外の分野において海の視点が海洋法に対しどの程度、またどのように作用していくのかを継続して検討していく予定である。しかしながら、その研究をより敷衍し、さらに現実の法として制定・施行していくためには、他の研究者及び政策決定者、あるいは他のステークホルダーと協働することが必要不可欠である。そのような協働を実現するために、本研究を書籍の形で出版することが必要となる。

【期待される効果】

本研究を行った背景としては、科学技術の発達に伴い、長く海洋法の原則とされてきた海洋の自由が妥当しなくなり、海洋の管理が必要とされるようになったことが挙げられる。しかしながら、過度な規律さえしなければよかつた海洋の自由と異なり、海洋の

管理を実現する上では、何のために管理するのかが問われることとなる。この点、現在の国際情勢に鑑みると、既に現れつつある「人間のために海洋を管理するという理念」を明確化することが肝要である。そして、そのような管理を効率的に行うためには、海洋を一体のものとして統合的に管理する海洋ガバナンスの視点が必要になるのである。

以上の背景のもとに行った本研究からは、次の二つの効果が期待される。第一に、海上犯罪についての管轄権について検討を行ったことから、国際法学において常に議論がなされてきた国家管轄権の理論的な整理につながる研究となることである。特に、何をもって、域内で発生した事件とするのか、あるいは域外で発生した事件とするのかを決定する域内外判断基準については、これまでの国家管轄権の研究においては正面から扱われたことがなかった問題である。そのため本研究は、国際海洋法や国際刑事法といった特定の分野だけでなく、国際法学一般において重要性を持つことが期待される。第二に、人のために海を管理するという視点が、海上犯罪に対する普遍的管轄権の文脈においては現れつつあり、さらに海洋法の他の分野においても定着していくべきとの本研究の結論は、今後の海洋法・政策の研究・実施においても広く示唆を与えることが期待される。最先端の科学技術を用いても管理が著しく困難な海洋という空間を少しでも実効的に管理するためには、あらゆる国家が協力し、人類の英知を結集してこれにあたる必要がある。このように、政策決定者や研究者が海洋を管理していく上の指針となることが、本研究に期待されるもう一つの効果である。

販路としては、大手出版社たる三省堂の出版物として、生協を含む一般書店で販売されるほか、Amazonのようにオンラインで購入することも可能な状況となっている。

【その他の考察】

ちょうど昨年、「海洋」に関する産官学が連携を深めて海洋に関する取組を展開できるよう「海洋都市横浜うみ協議会」が設立されたように、海は、横浜にとって大きな財産であり、可能性である。その横浜市の大学たる横浜市立大学に籍を置く研究者の著作として、本書が海洋法の発展に少しでも貢献するのであれば望外の喜びである。