

癌細胞内で開裂するリンカーの開発と核酸医薬への応用

神奈川大学 工学部 助教
實吉 尚郎

(研究目的)

本研究は、癌細胞内の低酸素環境で開裂するリンカーを開発し、癌細胞選択的に薬効を示す核酸医薬への応用を目指すものである。

(研究方法)

核酸医薬は、合成オリゴヌクレオチドを基本骨格とした医薬品の総称である。細胞内で遺伝子の発現を制御することを主な作用機構とする。核酸医薬は、従来の低分子医薬とは異なり、塩基配列を変えるだけで、理論的には様々な医薬品を設計できる強みがある。本研究では、癌細胞内で選択的に薬効を示す核酸医薬の創生にアプローチする。

<問題点・求められる性質>

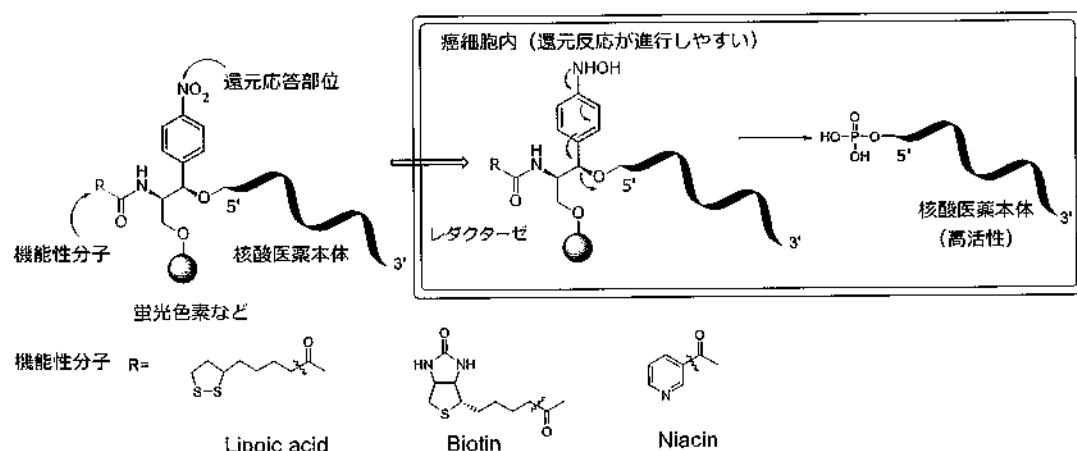


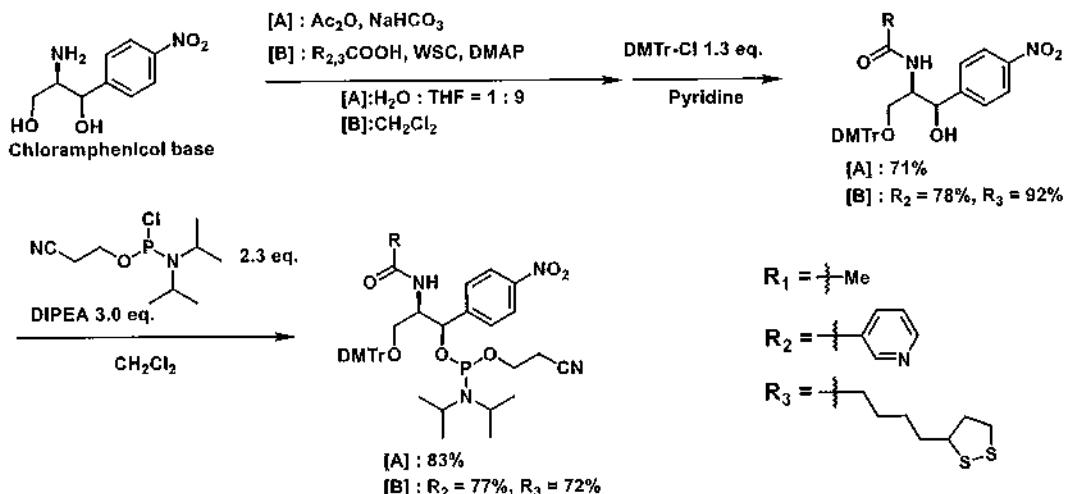
図1.癌細胞内で機能する抗癌性核酸医薬の設計

核酸医薬(合成オリゴヌクレオチド)は、分子構造中に多数の負電荷を有する高極性分子であるためそのままでは疎水性の細胞膜を透過しない。核酸医薬の作用する場所は、主に細胞内であるため、細胞膜を透過し細胞内に移行され、標的である癌細胞内で選択的に活性を示す必要がある。

<解決方法>

細胞内移行性を向上させる機能性基(リポ酸、ビオチンなど)を核酸医薬へ簡便に結合させる手法を開発する。さらに、癌細胞内で選択的に高活性核酸医薬へと変換される仕組みをつくる。

<基盤技術>核酸医薬の機能化と刺激応答性開裂反応を担うリンカーを創出する。この手法により、細胞膜透過性を著しく向上させるだけではなく望みの臓器あるいは細胞に核酸医薬をデリバリー



スキーム 1. 機能性分子を結合したリンカーアミダイトの合成

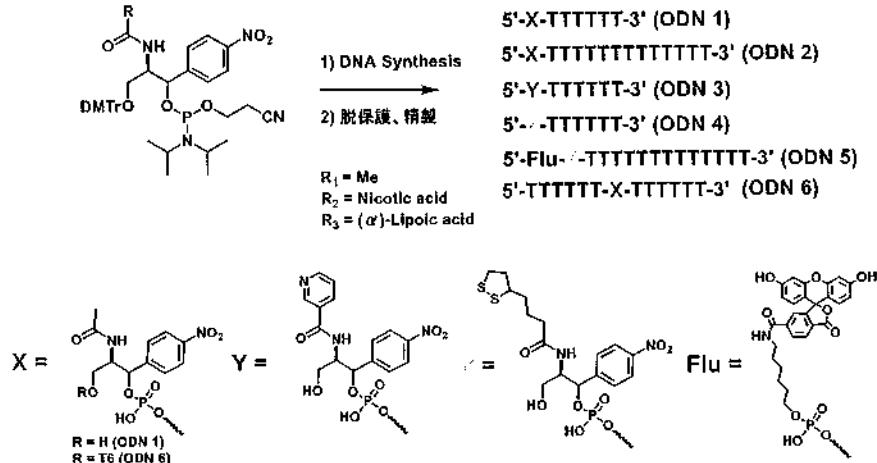
一させる機能を付与できる。固体癌の深部に存在する低酸素環境細胞内に到達後、レダクターゼによってニトロ基が還元され1,6-脱離機構によって、リンカーが開裂し遊離の活性型核酸分子を放出する仕組みである。

(結果)

市販のクロラムフェニコール塩基を出発原料にして、遊離のアミノ基を機能性分子と結合させた。引き続いで、1級水酸基をジメトキシトリチル化した。2級水酸基を亜リン化することでDNA合成用モノマーユニットを合成した（スキーム1）。

合成したモノマーユニットを行い、DNA自動合成を用いてオリゴヌクレオチドの合成を行った。一部のオリゴヌクレオチドは、さらに蛍光標識を行った。最後に、アンモニア水によって固相担体からの切り出しと保護基の脱保護を行った（スキーム2）。

合成したオリゴヌクレオチドは、HPLCによって精製し、構造は、質量分析によって同定した（図2）。



スキーム 2. リンカーカーの結合したオリゴヌクレオチドの合成

No.	Sequence	Formula	Calcd.[M-H] ⁻	Found
ODN 1	5'-X-TTTTTT-3'	C ₇₁ H ₉₁ N ₁₄ O ₄₇ P ₆ ⁻	2077.36	2077.23
ODN 2	5'-X-TTTTTTTTTTTT-3'	C ₁₄₁ H ₁₈₂ N ₂₃ O ₉₆ P ₁₃ ⁻	4205.68	4205.48
ODN 3	5'-Y-TTTTTT-3'	C ₇₅ H ₉₂ N ₁₅ O ₄₇ P ₆ ⁻	2140.37	2142.07
ODN 4	5'-Z-TTTTTT-3'	C ₇₇ H ₁₀₁ N ₁₄ O ₄₇ P ₆ S ₂ ⁻	2223.38	2223.30
ODN 5	5'-Flu-Z-TTTTTTTTTTT-3'	C ₁₆₄ H ₂₀₃ N ₂₇ O ₉₈ P ₁₃ S ₂ ⁻	4584.78	4584.50
ODN 6	5'-TTTTTT-X-TTTTTT-3'	C ₁₃₁ H ₁₆₈ N ₂₆ O ₈₉ P ₁₂ ⁻	3901.64	3886.72

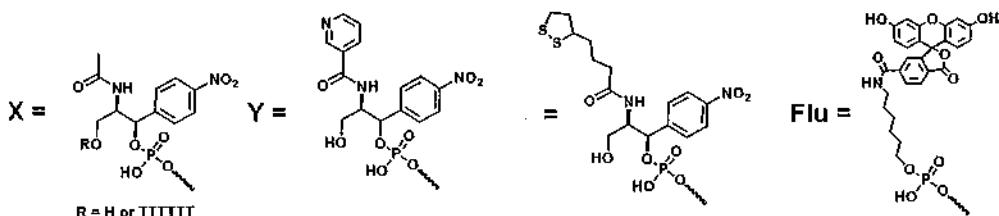


図2.合成したオリゴヌクレオチドの質量分析

次に、モデルオリゴヌクレオチドを用いて、還元反応によってリンカーが除去できるか検討した。癌細胞の還元反応のモデルとして、市販のニトロレダクターゼ（大腸菌由来）を用い、補酵素としてNADHを用いた。反応の追跡は、HPLCによっておこなった（図3）。

5'-X-TTTTTTTTTTTT-3' (ODN 2) の酵素実験

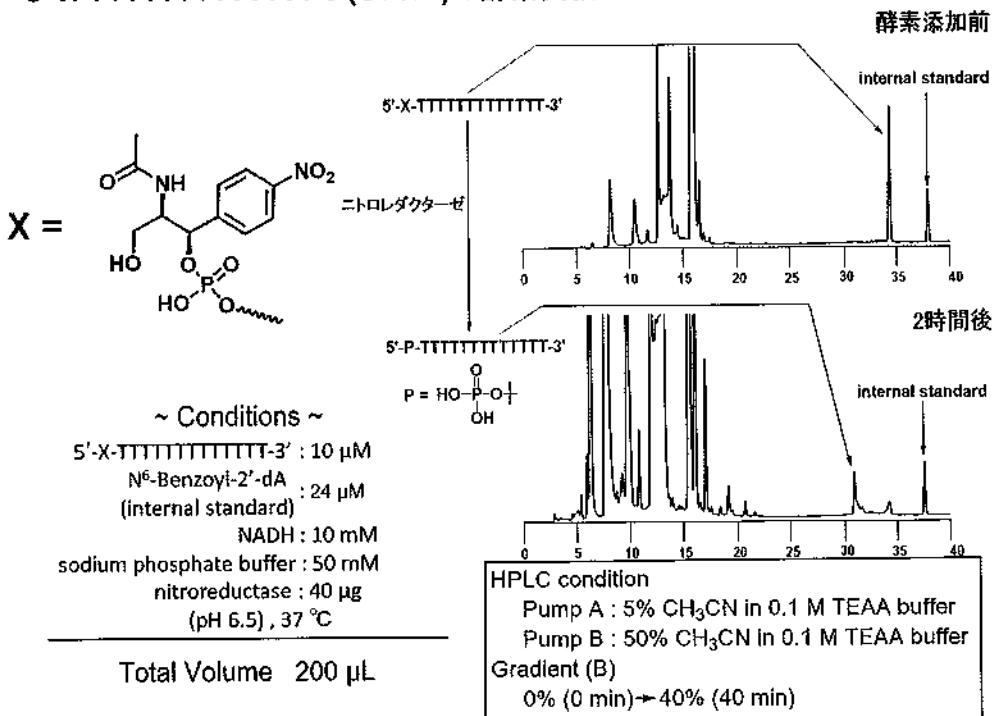


図3.ニトロレダクターゼによるリンカーの除去実験1

酵素添加前のHPLCプロファイルには、補酵素NADHサンプル由来のピーク（7-17分付近）、

リンカーの結合したオリゴヌクレオチド（34分付近）、内部標準物質（37分付近）のピークが現われている。酵素添加後2時間後、基質由来のピークは消失し、新たにリンカーが除去されたオリゴヌクレオチド（31分付近）が現われた。標品と重ね打ちをし、目的物であることを確かめた。

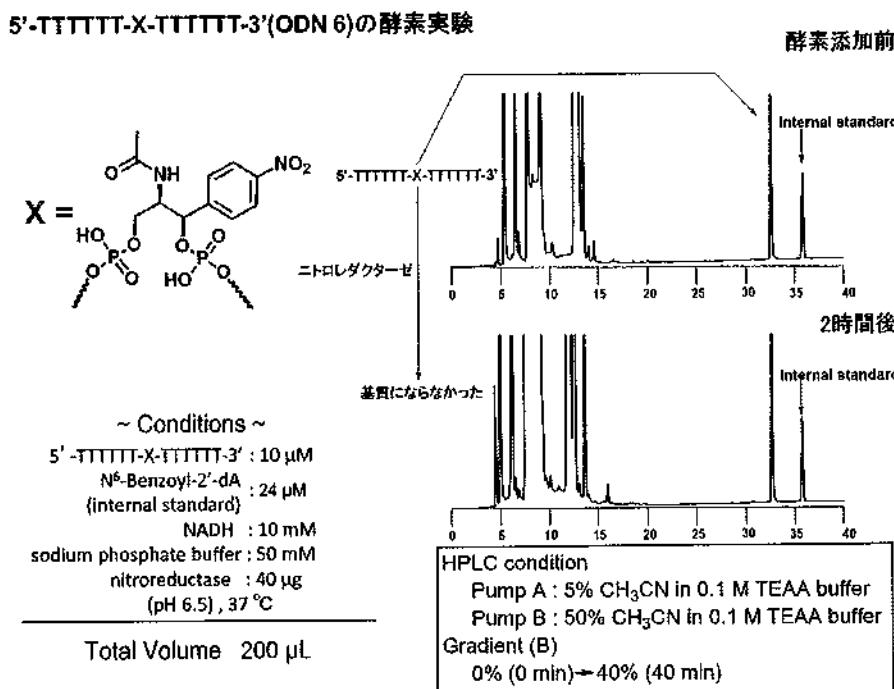


図4.ニトロレダクターゼによるリンカーの除去実験2

次にリンカーをオリゴヌクレオチドの中央部に導入したODN 6のリンカー除去実験を行った。先ほどと同様に、ニトロレダクターゼで処理してHPLCで反応を追跡した。しかしながら、ニトロ基の還元が起こらなかった。

(成果・考察) 等

本研究では、還元反応に応答して除去されるリンカーを開発した。リンカーの骨格は、天然物であるクロラムフェニコール塩基を採用した。この分子は、還元応答性部位であるニトロベンジル、機能性分子を取り付けられる遊離のアミノ基、ホスホロアミダイト法に適用可能な1級、2級水酸基を有する。常法に従って、リンカーをホスホロアミダイト試薬とことができ、オリゴヌクレオチド中に導入することができた。モデル実験から、リンカー中のニトロ基を還元することで、オリゴヌクレオチドからリンカーを除去することができた。導入する位置によって還元反応が進行しなかった。おそらく、中央部にリンカーを導入した結果、反応部位が混み合い、使用した酵素の基質にならなかつたと考えている。今後は、実際の癌細胞内で除去可能か検討する予定である。

定量的な細胞内力学操作技術の開発

横浜市立大学理学部 講師

谷本 博一

(研究目的)

■背景とこれまでの成果：生体力学は形態学の一分野として長い歴史を持ち、分子・細胞・組織の各スケールにおける物理的力の直接測定に基づいて、各々の階層における生命活動の力学的記述を構築してきた。一方で、分子と細胞の間の階層、長さにして100000倍にわたる階層における直接力学測定技術はいまだ確立していない。この準細胞スケールは、細胞骨格の高次構造形成、細胞内小器官の配置、染色体の分配をはじめとした細胞生物学における主要な研究対象である。準細胞スケールにおける力学測定技術を確立することで、分子からマクロスケールまでの生体運動を連続的に理解することが可能となると考える。

研究代表者はこれまでに、ウニ受精卵における微小管星状体をモデル系として、細胞内力学測定手法の開発に取り組んできた。微小管星状体は、中心体から放射状に伸びる多数の微小管高分子からなる細胞スケールの構造である。星状体は自ら機械的な力を生成して細胞内空間を動的に探索することで、核・染色体を含む生体構造の細胞内位置を決める役割を持つ。研究代表者は磁気ピンセットを応用した独自の細胞内力学測定技術を構築して、星状体の駆動力を直接測定することに成功した (Tanimoto et al., Nature Physics 2018)。その結果、星状体は運動のために非常に大きな力 (~500 pN) を生成していることが明らかになった。

■問い合わせ：星状体が大きな駆動力を生成する生物学的利点はあるのだろうか？多くの分子モーターが同時に働くことで、個々の分子の確率的な振る舞いが平均されて、ノイズの小さい運動を実現している可能性が考えられる。研究代表者は星状体を超解像度スケールで観察して、実際に速度揺らぎが非常に小さく、星状体は細胞の中心に誤差1%未満で到達できることを発見した (Tanimoto et al., J. Cell Biol. 2016)。星状体運動の正確性の力学的起源を検証するためには、星状体内におけるダイニン単一分子の力生成過程の定量的な評価が必要である。

■目的：本研究は、星状体運動の正確性を分子スケールの力学的性質に基づいて理解することを目標とする。星状体内部におけるダイニン単一分子の確率的な力生成過程を詳細に調べて、分子スケールの確率的な力生成からどのように細胞スケールの正確な星状体運動が生まれるのかを解明する。その成果は、細胞骨格が重要な役割を果たす多彩な細胞生物学的現象を力学的に理解するための一般的な枠組みとなりうるものである。

■期待される効果：生命科学における力学・物理学的アプローチの必要性は生物学者の間

で近年広く認知されつつあるが、生体内における直接力学測定は数例しか報告されておらず、測定技術・解析手法とともに全く確立されていない。本研究は研究代表者のこれまでの成果を発展させることで、定量的かつ汎用性の高い細胞内力学測定技術を構築して、実際の生命現象に応用することを目的とする。その成果は物理学の視点を細胞生物学にもたらすものであり、生命科学・物理学の両分野に大きなインパクトを与えることが期待される。

提案研究が構築する細胞内力学操作技術は、基礎・応用医学研究に広く適用可能である。この技術の特徴は、非侵襲的かつ磁性微粒子の表面修飾を変えることできまざまな対象に応用できる点にある。近年、機械的力が生体内において情報シグナル伝達因子として働き、細胞分化や組織形成、癌細胞の浸潤転移を始めとした医学的応用に直結する生命現象において重要な役割を果たしていることが解明されつつある(Fernandez-Sanchez et al., 2015 *Nature*)。生体内磁気ピンセットは、このようなメカノシグナル伝達系の生物学的解析において、直接の摂動を与える基盤技術として標準化しうるものである(Rotherham and Haj, *PLoS One* 2015)。さらに将来的には、力学過程とシグナル伝達系の双方を定量的に操作することで、細胞動態の*in vivo*制御や機能性組織の再構成研究などにも応用可能である。

本提案研究で得られる知見は工学分野においても重要である。生体高分子は外部の司令塔に頼ることなく、生体内において秩序的な高次構造を形成することができる。この自己組織化過程を利用して微小な電気デバイスを設計する試みが既に遂行されている(Galland et al., *Nat. Mat.* 2013)。提案研究は、タンパク質分子の高次構造が生体内で正確に運動する仕組みを明らかにするものであり、発展的研究として、得られた知見を応用して *biocompatible*な運動マシンを設計することを視野に入れている。再構成生物学分野で蓄積された骨格高次構造の設計手法(Vignaud et al., *Trends Cell Biol.* 2012)と、本提案研究で明らかにする骨格構造の生体内における運動原理を組み合わせることで、生体内に存在するタンパク分子とエネルギー源を利用して、生体内の標的部位に薬剤等を輸送する運動マシンの設計に挑戦することができる。

以上の理由から本提案研究は、基礎研究としての高い価値に加えて、医学・工学応用としての将来性を併せ持つものである。

(研究方法)

(a) 細胞内で標的をピコニュートン・サブミリ秒の精度で力学操作できる測定系の構築

研究代表者がこれまでに構築した細胞内磁気ピンセットを発展させて、pN精度かつサブ秒で時間変調する細胞内力学操作が可能な実験技術を構築する。そのために、数百ミクロンの長距離にわたる正確な磁場勾配とその実時間フィードバック制御を実装する。

(b) ダイニン単一分子の力生成過程の定量

研究代表者のこれまでの研究結果から、運動中の星状体内では多数のダイニン分子が同時に働いていることが示唆されている。そのような状況でダイニン単一分子の独立した力学測定を行うことは困難であり、何らかの統計的な手法を用いる必要がある。

Active Micro-rheologyは細胞骨格のマクロな実験に基づいて、内部の單一分子モーターの力の大きさやキネティクスを測定する手法である (Guo et al., 2014 Cell)。本項目は(a)で構築した測定系を用いて星状体の周波数依存的な粘弾性を測定して、ダイニン分子による星状体構造の自発揺らぎ（研究代表者、予備的結果）のデータを合わせて解析することで、星状体内におけるダイニン単一分子の力生成過程の詳細を明らかにする。

(c) 理論解析に基づく星状体の速度揺らぎの力学的起源の解明

星状体の正確性の分子機構の可能性として、例えば(1)多数のダイニン分子が同時に働くことで集合平均をとる、(2)個々のダイニン分子が長時間力を生成することによって時間平均を取る、などが考えられる。これらの仮説を検証するために、実験結果と細胞骨格の理論モデルとを比較する。分子モーターの非ガウス的キネティクスを考慮した理論を拡張して、実験結果を説明することを目指す。

(結 果)

生きている細胞の内部構造を力学的に操作するための技術の開発を目指して研究を遂行した。本年度は新しく立ち上げた研究室の実験環境を整備し、高出力磁気ピンセットを構築した。

■実験環境のセットアップ

細胞内磁気ピンセットのための倒立顕微鏡（2台）のセットアップを行った。細胞の蛍光経時観察とマイクロインジェクション用の微細針および磁気ピンセットのマイクロマニピュレーションが同時に行える測定系を構築した。

■高出力磁気ピンセットの構築

磁気ピンセットのプロトタイプとして永久磁石を用いた高出力な磁気ピンセットを構築した。微細磁気粒子の移動を測定することで磁気ピンセットが生成する引力場を校正した。

■細胞内への様々な大きさのプローブ粒子を導入するための条件検討

様々な細胞種に細胞内磁気ピンセットを用いるためにはプローブ粒子の大きさを細胞毎に最適化する必要がある。グラインダーとマイクロフォージを用いて、0.01~1umの幅広い粒子径のプローブ粒子を細胞にマイクロインジェクションできる微細針の自作に成功した。

(成果・考察) 等

■学会発表（招待講演）

1. 定量生物学の会年会

「細胞の物理2019」

2019年1月（大阪大学）

2. 棘皮動物研究会

「ウニと考える細胞の物理」

2019年2月（遺伝学研究所）

3. 青い空の会

「生きている細胞の中ではたらく物理的な力」

2019年3月（金沢）

磁場発生装置を用いた定量的外乱下での羽ばたき飛行安定性の研究

関東大学理工学部 助教
野田 龍介

(研究目的)

昆虫の静止飛行や機動飛行といった高い飛翔能力は、従来の固定翼とは異なる空気力発生原理と共に、羽ばたき翼と胴体の優れた動力学的特性により実現されていると考えられる。本研究では、災害時において人が立ち入ることが困難な区域での情報収集・物資輸送などの活躍が期待されるドローンのような小型飛行体の安定飛行のために、昆虫羽ばたき飛翔を規範とした動力学的設計指針の導出と、それを用いた次世代型の小型飛翔体の創製を最終目的としている。これらの実現のため、本研究課題では、飛行機などの固定翼とは異なり、いまだ確固たる評価手法確立されていない羽ばたき翼を有する飛翔体の飛行安定性を定量的に評価し、その評価手法を確立させることを目的とする。現在までに、風洞を用いて乱れた流れを生じさせ、その影響下での羽ばたき飛行安定性の研究はあるものの、飛行体に対する負荷位置・方向・大きさが計測可能な定量的な外乱を、羽ばたき自由飛行時に付与した研究は極めて少ない。本研究課題では、これらを均一磁場発生装置と飛行体に付与した磁石を用いて生じさせ、この影響下での昆虫自由飛行時の応答性の撮影計測を行い、飛行安定性の定量的評価を行う。

(研究方法)

本研究課題では、外乱の負荷位置・方向大きさを把握した状態で、昆虫自由飛行時の翼・胴体の応答性を撮影計測し、羽ばたき飛行安定性を定量的に評価することを目的としている。このため、初めに図1(a)に示す1軸のヘルムホルツコイル(均一磁場範囲： $\phi 50 [mm] \times 50 [mm]$ 、磁場精度： $\pm 5 [\%]$)、2台の同期した高速度カメラ(1000 [fps]、shutter speed : 1/5000 [s])、光源を用いた昆虫飛翔用外乱発生装置の製作を行った。表1にヘルムホルツコイルの発生磁場と電流値を示す。本研究では、飛翔昆虫のモデル生物でもあるスズメガ科に属するセスジスズメを用いて実験を行った。図1

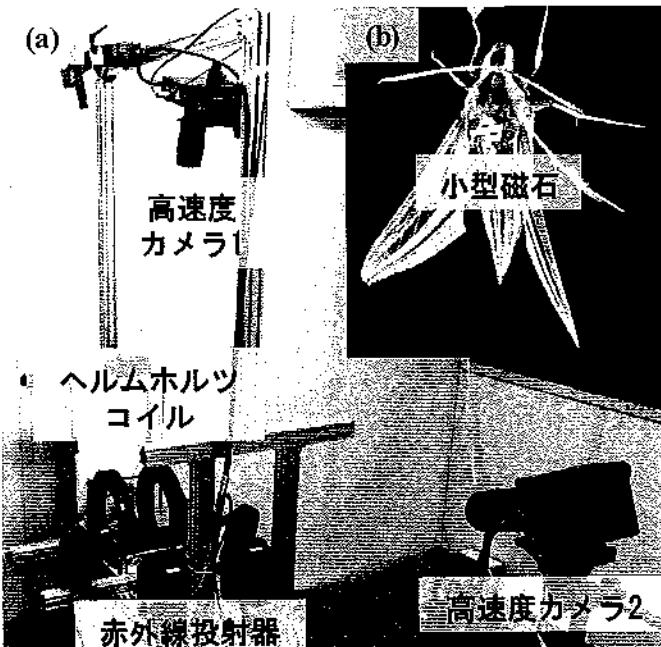


図1 (a) ヘルムホルツコイルを用いた外乱発生装置と
(b) 小型磁石を付与したセスジスズメ

(b) に小型磁石と姿勢解析マーカーを付与したモデルを示す。

上記の装置と飛翔昆虫を用いて自由飛行中の昆虫に定量的外乱を与える、高速度カメラによる撮影を行った。撮影後、それぞれのカメラで撮影された連続画像とDLT法による特徴点の3次元再構築手法を用いて、翅・胴体の特徴点の3次元座標を算出し、運動解析を行った。

表1 ヘルムホルツコイルの発生磁場と電流値

出力電流 [A]	出力電圧 [V]	発生磁場 [mT]
0.5	9.0	2.08
1.0	18.0	4.13
1.5	27.0	6.20
2.0	36.1	8.27
2.5	45.2	10.33

(結果)

図2に外乱下での飛翔昆虫の任意時刻における撮影画像を、図3に撮影された画像と両翼端・根本のトラッキングを行った軌跡を示す。この他、特徴点のトラッキングは、姿勢角度の算出のため頭部・腹部の頂点、姿勢解析用マーカー、また、翅の迎角(後述のfeathering angle)の算出のため両前翅の後縁側頂点の計11点を行った。今回の撮影では、遅い前進飛行中に磁力により姿勢を崩し、ヨー方向において右回りへ旋回する挙動が見られ、その後、右回りのトルクを打ち消すような翼運動により姿勢を回復させる挙動が観察できた。また、これらの運動はわずかに上昇飛行しながら行われていることも観察できた。なお、3次元の特徴点の再構築では、両カメラから必ず特徴点をトラッキングする必要があるため、本実験では右回りへの旋回部分の運動解析を行った。

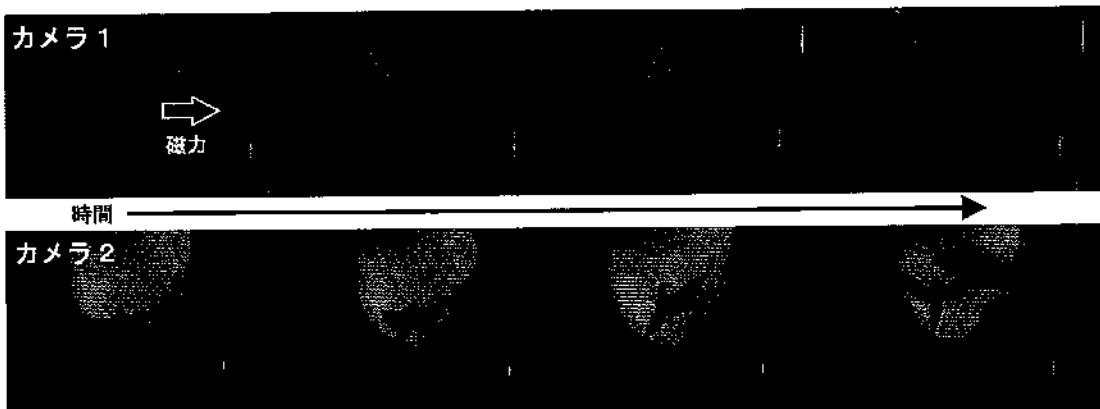


図2 外乱付与時におけるセスジズメの挙動

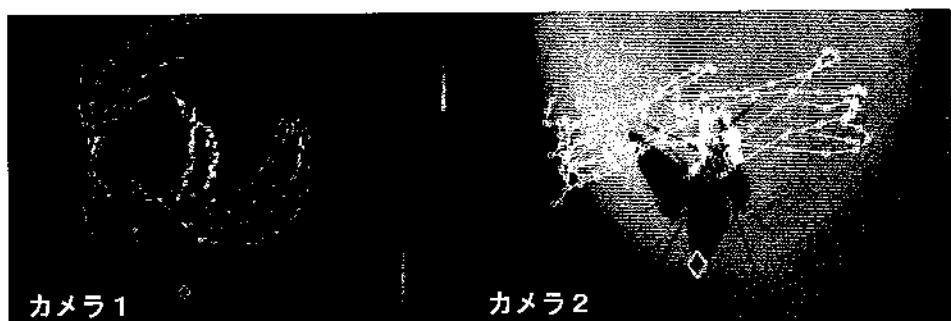


図3 外乱付与時における両翼端と翼根本の軌跡

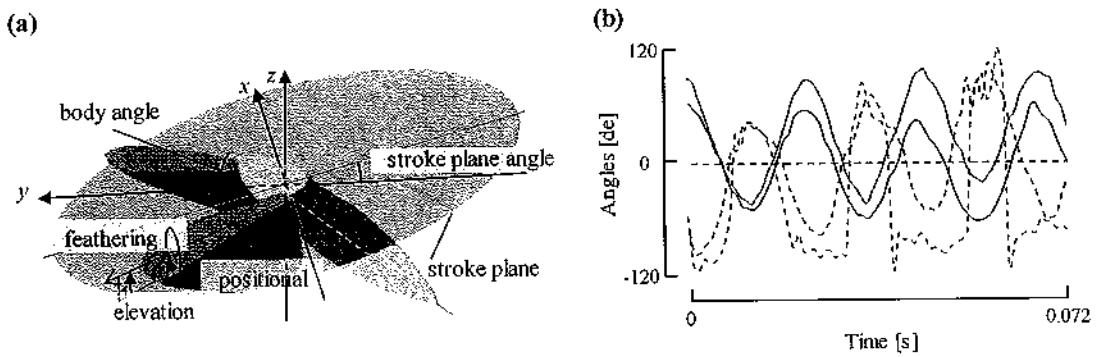


図4 (a) 翼固定座標系における羽ばたき角度の定義と (b) 右翅（赤色）と左翅（青色）の positional angle（実線）と feathering angle（破線）の時系列データ。

図4 (a) に翼固定座標系を用いた羽ばたき角度の定義、(b) に右翅・左翅それぞれの positional angle、feathering angle を示す。Positional angleにおいては、右翅で背面側の運動（正の値）、左翅で腹面側の運動（負の値）が時間の経過と共に増加していることが見て取れる。なお、それぞれの最大値・最小値を取るタイミングはほぼ一致しており、位相のずれは生じていない。Feathering angleにおいては、打ち上げ運動（positonal angle が最小値→最大値へ向かう区間）において、右翅の負の値が増加していることが分かる。また、打ち上げ運動開始後、左翅に対して右翅が負の値へと向かうタイミングが早まり、打ち下ろし運動（positonal angle が最大値→最小値へ向かう区間）開始後においても、正の値へと移行するタイミングに遅れが生じていることが分かる。この旋回運動における stroke plane angle の平均値は右翅・左翅でそれぞれ、11.4 [deg]、3.7 [deg]、羽ばたき周波数の平均値は 48.6 [Hz] であった。図5に胴体角度とヨー方向における時系列データを示す。この運動中にヨー方向右回りによよそ 35 [deg]、また 45 [deg] の機首上げが生じたことが分かる。また、ヨー方向における運動においては、半分の時刻を経過した後、運動が抑制されていることが確認できる。

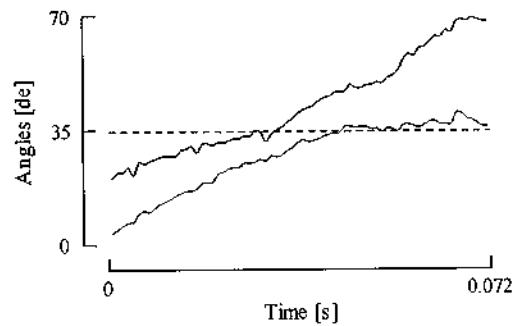


図5 胴体角度（黒色）とヨーイング角度（灰色）の時系列データ

（考察）

本実験では磁力によりヨー方向右回り・機首上げへと姿勢が崩れ、その回転運動を抑制すべく左右の翼運動に違いが生じたものと考えられる。Positional angle については左右の翅で位相のずれは見られなかったものの、右翅の背面側での左翅に比べた増加分が、左翅の腹面側での右翅に比べた減少分を上回っており、この非対称運動により機首下げへのトルクを増加させ、姿勢維持を図ろうとしていると考えられる。また、feathering angle の非対称運動については、背面側における運動の際に右翅での負の値が増加していることから、ヨー方向左回りへのトルクを生じさせ、磁力によるトルクを打ち消し、姿勢維持を図ろうとしたと考え

られる。また、結果で述べた位相差においても、右翅の背面側での負の値を取る区間が左翅に比べて増加していることから、左回りへのトルクの増加の要因となっていると考えられる。本実験でのヨー方向における回転運動は、およそ羽ばたき運動 2 周期における feathering angle の非対称運動により抑制されたことが見て取れたが、機首上げ方向の回転運動については一様に増加した。数値モデルを用いた微小外乱下での線形安定性解析を行った先行研究でも報告されている通り、羽ばたき飛翔には固有の長手方向の不安定性が存在している。本実験で確認された結果では、姿勢安定化を図るために能動的な非対称運動が行われたものと考えられるが、先行研究の結果と同様に、長手方向における姿勢安定性の動的不安定性が確認された。

(結言)

本研究課題では、ヘルムホルツコイルと昆虫に付与した小型磁石を用いた定量的外乱下での羽ばたき飛翔の飛行安定性に関する研究を行った。磁力によりヨー方向右回りに姿勢を崩した飛翔昆虫の撮影計測より、

- ・ヨー方向において、背面側での右翅の feathering angle の最小値と位相の能動的制御による磁力を打ち消す左回りのトルク
- ・ピッチ方向において、右翅の positional angle の振幅中心の背面側への移行による機首下げ方向へのトルク

を生じさせ得る翼運動が確認できた。この結果、ピッチ方向においては羽ばたき 3 周期程度では姿勢の回復は見られなかったものの、ヨー方向においては羽ばたき 2 周期程度での姿勢の回復が確認され、羽ばたき飛翔における飛行安定性向上のため、翼運動の能動的制御における重要なパラメータを明らかにした。

(今後の展望)

今後は、本研究で撮影計測された 3 次元形状・運動データを用いて、数値流体解析により空気力・空力トルクの定量的評価を行う。また、現在直流電源を用いて一様な方向への外乱を発生させているヘルムホルツコイルにおいても、交流電源を用いて左右への微小振動の外乱を生じさせ、この単振動の周波数と羽ばたき周波数の関係性から昆虫の有する特有の動的安定性を明らかにする。加えて、本実験では季節により採取できる昆虫に限りがあったため、様々な昆虫を用いて同様の実験を行い、昆虫のサイズ・翼運動・翅形状等の違いによる安定飛行性能を包括的に評価する。

(謝辞)

本研究を遂行するにあたり多大なご援助を賜りました横浜学術教育振興財團に厚く御礼申し上げます。

スペクトル可変近紫外サブ10-fsパルス光を用いる 光反応遷移状態の解析

神奈川大学 工学研究所 博士研究員
橋本 征奈

(研究目的)

分子振動周期よりも閃光時間が短い紫外サブ10-fsパルス光を用いた光反応機構解析

人の目では見ることが困難な高速現象を可視化する手法の一つに“ストロボ写真”の技術がある。分子内で原子が振動する周期よりも閃光時間が短い“高速ストロボ光”(閃光時間: 10 fs未満)を用いれば、化学反応に伴って化学結合が生成・解離する過程を可視化できる。例えば、紫外サブ10-fsパルス光(350–450 nm)を用いて化合物を励起すると、振電結合を通して分子が振動するタイミング(振動位相)を揃えた状態で振動が励起される。その結果、反応に伴い時々刻々と変化する分子振動の瞬時瞬時の周波数を計測できる。この分子振動周波数の変化と電子状態の変化から、経時に変化する分子構造、即ち遷移過程が可視化できる(遷移状態分光)。本研究では遷移状態分光法を用いてケージド化合物の脱保護過程の可視化を試みた。

ケージド化合物として2-ニトロベンジル化合物は幅広く用いられており、その光特性に関する様々な研究がなされてきた。しかし、250 nmに $\pi_{(\text{ring})}-\pi^*_{(\text{NO}_2)}$ 由来の吸収を有しており、光照射による脱保護反応と同時に、様々な化合物の光反応が進行してしまうため、より長波長光で脱保護可能なケージド化合物の開発が望まれている。例えばメトキシ基を導入すると $\pi_{(\text{ring})}-\pi^*_{(\text{NO}_2)}$ 吸収が350 nm付近まで長波長シフトすることが知られているが、脱保護効率が低くなるという欠点がある。その原因として $\pi_{(\text{NO}_2)}-\pi^*_{(\text{NO}_2)}$ 吸収帯の消滅が示唆されているが、詳細は不明である。そこで、本研究では二つのメトキシ基を導入した2-ニトロベンジルアセテート誘導体を用いて、脱保護過程の可視化を目指した。

(研究方法)

測定に用いた近紫外サブ10-fsパルスレーザー光を用いるポンプ・プローブ測定装置の概略を図1に示す。この装置では、まず光源(Legend-USP-HP, Coherent Inc.)からのパルス光(中心波長: 800 nm、パルス時間幅: 35 fs、パルスエネルギー: 2.5 mJ、繰り返し周波数: 1 kHz)を、非線形結晶(BBO)を通して波長変換し、高強度な400-nmパルス光を得た。この400-nmパルス光をアルゴンガスで満たした中空ガラス管(ホローファイバー)に集光し、自己位相変調によりスペクトル幅が広い(波長: 350~450 nm)紫外パルス光に変換した。発生させた広帯域近紫外パルス光には、波長毎の屈折率の差から正の群遅延が生じているため、群遅延補正鏡対(CM_{1,2})および、反射型回折格子・凹面鏡・可変形鏡(G, C, D)を用いて、分散を補償し、パルス幅を10 fs未満に圧縮した。パルス幅は自己回折光-周波数分解光ゲート法(SD-FROG法)により計測した。さらに、ビームスプリッター(BS)によりパルス光を励起光(ポンプ光)と検出光(プローブ光)に二分し、ポンプ光の光路内に遅延ステージを導入することでポンプ・プローブ測定を可能にした。

試料には、 α 位の置換基が、シクロヘキシル、フェニル、メチル、3種類の4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルアセテート(1)を用いた。分光分析用のアセトニトリル(cica-reagent)を溶媒とし、4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルアセテート溶液を調整した。各々、吸光度が1, 1.5, 2.5の3種類の濃度の溶液を調整し、調整した溶液0.4 mlを石英セルに封印し、ポンプ・プローブ測定に用いた。ポンプ光の集光面積は、 $81.5 \mu\text{m}^2$ である。プローブ光の透過光をファイバーへ集光し、分光器で分光した後に96チャンネルロックインアンプで波長成分毎のポンプ光の有無によるプローブ光透過光強度の差(ΔT)をロックイン検出した。励起光と検出光との遅延時間間隔は10 fsで測定した。

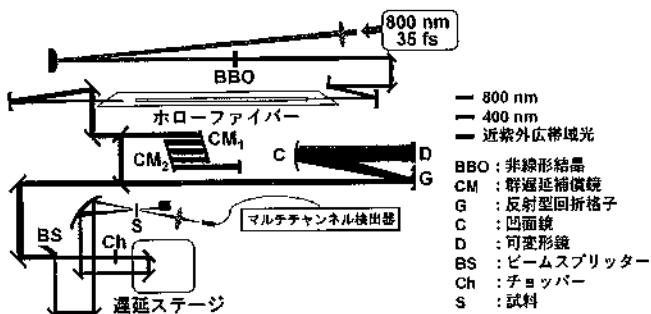


図1. 近紫外サブ10fs-パルス光を用いるポンプ・プローブ測定装置

(結果と考察)

3種類の4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルアセテート(1)の脱保護反応を反応式1に、定常吸収スペクトルを図2に示す。 α 位の置換基によらず、350 nm付近に $\pi_{(\text{ring})}-\pi^*_{(\text{NO}_2)}$ 由来の吸収が現れた。発生させた近紫外サブ10-fsパルスレーザー光は350~450 nmに広がっており、1光子励起により、 $\pi_{(\text{ring})}-\pi^*_{(\text{NO}_2)}$ 遷移を誘起し、1重項励起状態の動的過程をポンプ・プローブ法により計測可能である。化合物 1aの重アセトニトリル溶液(14 m mol/L)を別途調整し、発生させた近紫外サブ10-fsパルスレーザー光を照射し、光照射前後のプロトンNMRスペクトルを測定したところ、化合物 2aの生成が示され、近紫外サブ10-fsパルスレーザー光照射により、脱保護反応を誘起できることを確認した。また、近紫外サブ10-fsパルスレーザー光照射による量子収率は、0.007であった。

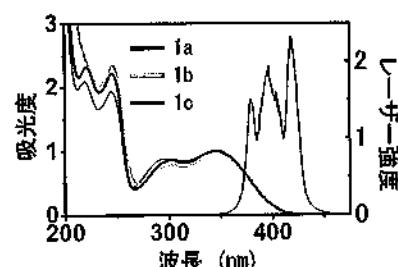
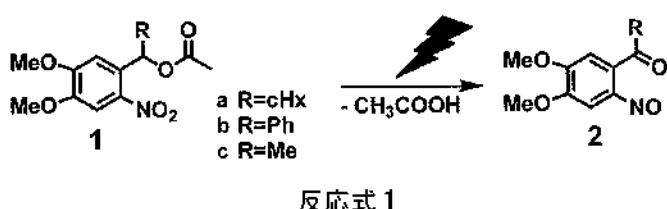


図2. 試料溶液の吸収および、レーザー光スペクトル

吸光度が1.5の溶液を用いたポンプ・プローブ測定の結果得られた差吸光度($\Delta A = \log(1+\Delta T/T)$)の2次元マップを図3に示す。横軸がプローブ光波長、縦軸がポンプ光とプローブ光との遅延時間、カラーマップは差吸光度(ΔA)を示す。いずれの場合にも、短波長側では ΔA が負の信号が、長波長側では ΔA が正の信号が現れた。アセトニトリル溶媒のみをポンプ・プローブ測定しても、 ΔA が正および負の信号は現れないことから、化合物由来の信号が現れていると考察できる。

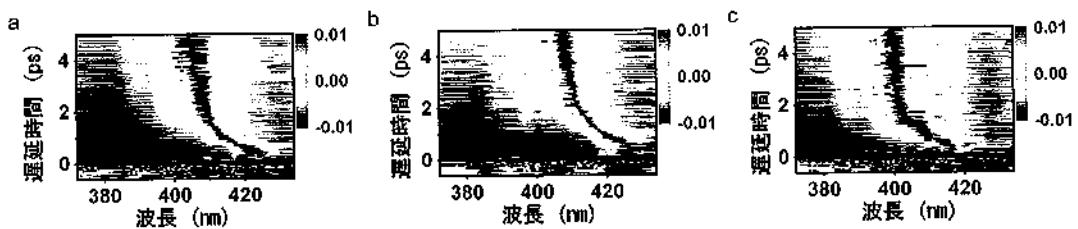


図3. ポンプ・プローブ測定の結果得られた2次元カラーマップ
(a:化合物1a, b:化合物1b, c:化合物1c)

これらの信号を帰属するために、実時間差吸光度変化(図4)を、指数関数近似することで、時定数を解析した。図5に、96チャンネル各々のデーターを解析した結果を示す。その結果、 α 位の置換基によらず全測定波長領域において約75 fsの時定数(図5 オレンジ色の三角)が得られた。また、短波長側の ΔA が負の信号が現れている領域では1000 fsの時定数(図5 赤の四角)が、長波長側の ΔA が正の信号が現れている領域では約500 fsの時定数(図5 青の丸)が得られた。各検出波長から算出された時定数を平均化した結果を表1に示す。

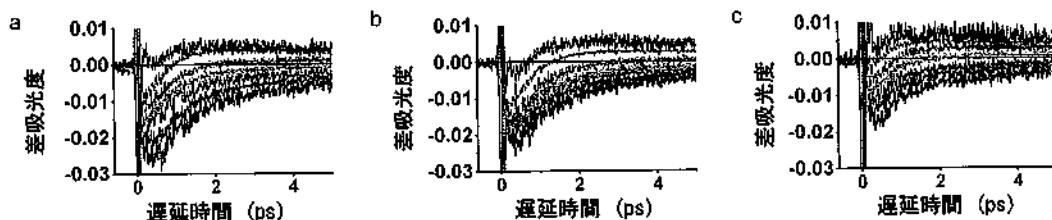


図4. 検出波長毎の実時間差吸光度変化 (a:化合物1a, b:化合物1b, c:化合物1c)
検出波長:379-385 nm (navy), 386-392 nm (blue), 393-399 nm (green),
400-405 nm (orange), 406-412 nm (pink), 413-419 nm (red), 420-426 nm (wine)

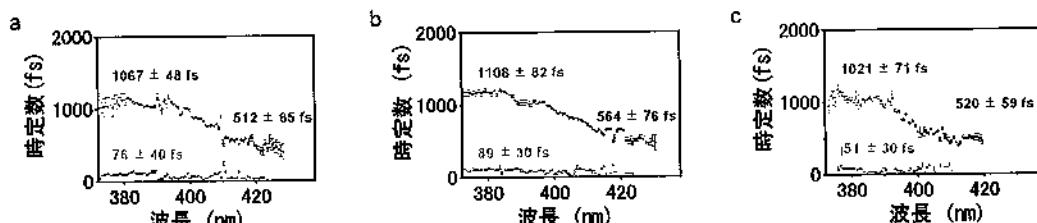


図5. 指数関数近似により得た検出波長毎の時定数の分布
(a:化合物1a, b:化合物1b, c:化合物1c)

表1. 測定試料毎の時定数の平均値

	時定数 τ (fs)								
	化合物1a			化合物1b			化合物1c		
	τ_1	τ_2	τ_3	τ_1	τ_2	τ_3	τ_1	τ_2	τ_3
吸光度 1.0	75 ± 20 , 535 ± 72 , 969 ± 81			62 ± 37 , 501 ± 33 , 1024 ± 115			53 ± 26 , 527 ± 80 , 1088 ± 100		
吸光度 1.5	76 ± 40 , 512 ± 65 , 1067 ± 48			51 ± 30 , 520 ± 59 , 1021 ± 71			89 ± 30 , 564 ± 76 , 1108 ± 82		
吸光度 2.0	69 ± 32 , 525 ± 45 , 1045 ± 29			68 ± 28 , 505 ± 23 , 1042 ± 65			45 ± 33 , 480 ± 60 , 954 ± 64		

次に、75、500、1000 fsの時定数が示されたため、時定数を75、500、1000 fsに固定し、成分スペクトルを解析した。得られた A_{75} 、 A_{500} 、 A_{1000} 、 A_∞ スペクトルを図6に示す。青で示す A_{500} スペクトルは4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルアセテートの定常発光スペクトルと良い一致を示したため、1重項励起状態($S_1(\pi_{\text{ring}}-\pi^*_{\text{NO}_2})$)からの誘導放出スペクトルに帰属できる。一方、赤で示す A_{1000} スペクトルの短波長側に現れる負の信号は化合物の定常吸収スペクトルと良い一致を示しているため、約1000 fsで基底状態に戻る成分があることが示された。また、緑で示す A_∞ スペクトルの長波長側に表れる正の信号は文献値と比較することで三重項励起状態およびキノイド中間体からの誘起吸収スペクトルの足し合わせに帰属できる。これらの結果は、 $\pi_{\text{(ring)}}-\pi^*_{\text{(NO}_2)}$ から $n_{\text{(NO}_2)}-\pi^*_{\text{(NO}_2)}$ 経由で基底状態に戻る過程と $n-\pi^*$ 経由で反応する過程の存在を示している。また、濃度に依存せず同様の結果が得られた(表1)。

以上、二つのメトキシ基を導入した2-ニトロベンジル化合物は光励起後 $\pi_{\text{(ring)}}-\pi^*_{\text{(NO}_2)}$ から $n_{\text{(NO}_2)}-\pi^*_{\text{(NO}_2)}$ 経由で反応していることが示された。そのため、 $n_{\text{(NO}_2)}-\pi^*_{\text{(NO}_2)}$ 吸収帯の消滅は、反応性に影響しないことがわかった。現在、より詳細な機構を解明するために実時間差吸光度変化に現れる分子振動の変化を解析している。

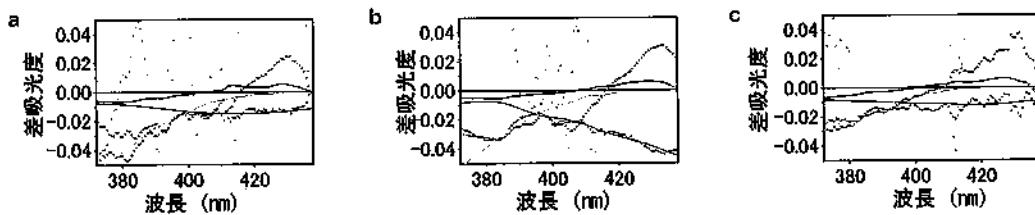


図6. 時定数毎の成分スペクトル(a:化合物1a, b:化合物1b, c:化合物1c)
(A_{75} =オレンジ, A_{500} =青, A_{1000} =赤, A_∞ =緑)と、測定試料の定常吸収(灰色)・定常発光スペクトル(黒)

(学会発表)

橋本征奈・浜田健太・藤田裕字・大野佑太・力石紀子・岩倉いずみ・山口和夫
“近紫外10 fsパルス光を用いる2-ニトロベンジルエステルの光反応機構解析”
日本化学会第99春季年会、神戸、2019年3月

(論文)

S. Hashimoto, K. Hamada, I. Iwakura, A. Yabushita, T. Kobayashi, H. Fujita, K. Takeda, Y. Ono, N. Chikaraishi Kasuga, K. Yamaguchi
“Photochemical reaction mechanisms of 4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl acetate analysed by a sub-10 fs near-ultraviolet pulse laser”
Chemical Physics, 524 2019 70–76. Front cover

卵管間質の運命決定における TGF β シグナルの役割

東京大学生産技術研究所 特任助教

横浜市立大学 生命ナノシステム研究科 客員研究員（平成30年度）

中島 忠章

（研究目的）

卵管・子宮・臍は同一の原基であるミュラー管から発生するが、卵管は受精の場となり、子宮は受精卵が着床し、臍は交尾の産道になるなど、それぞれ異なる形態と機能を持つ。これらの組織は上皮と間質から構成され、形態や機能の違いは主に異なる上皮を持つことに由来する。申請者を含め数々の研究により、上皮の運命は、発生期においてそれぞれの間質から分泌される因子によって決定されることがわかつてきたが [1-3]、そもそもミュラー管の間質がどのように領域化されるかは未解明であった。そこで私は、様々な組織の発生に関与しているレチノイン酸に着目し、胎生17.5日齢の臍予定領域のミュラー管にレチノイン酸を添加すると子宮へ分化し、逆にレチノイン酸受容体の拮抗薬を添加にすると子宮予定領域が臍へと分化することを見出し、レチノイン酸シグナルの有無によって子宮と臍の間質領域の境界が形成されることを明らかにした [4]。一方、卵管と子宮の間質領域の境界を形成する運命決定因子は同定されていない。これまでに、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析を行い、卵管間質領域において、TGF β ファミリー遺伝子の発現が子宮に比べて高いことを見いだした。そこで本研究では、卵管間質の運命決定におけるTGF β シグナルの役割を解析することを目的とする。

Reference

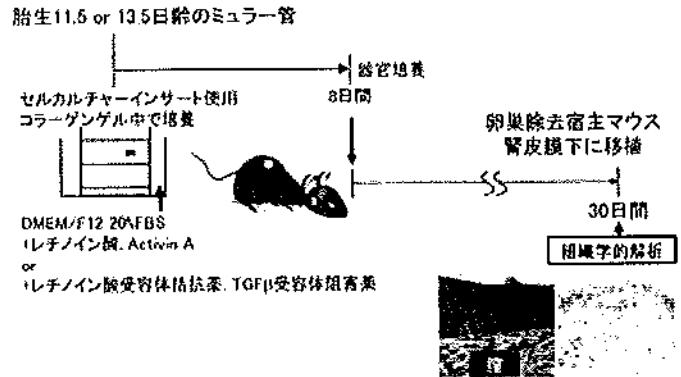
1. Nakajima T, Iguchi T, Sato T. Hedgehog signaling plays roles in epithelial cell proliferation in the neonatal mouse uterus and vagina. *Cell Tissue Res.* 348: 239–247, 2012.
2. Nakajima T, Hayashi S, Iguchi T, Sato T. The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. *Differentiation*. 82: 28–37, 2011.
3. Nakajima T, Iguchi T, Sato T. Involvement of activin signaling in abnormalities of the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Cell Tissue Res.* 344: 527–538, 2011.
4. Nakajima T, Iguchi T, Sato T. Retinoic acid signaling determines the fate of uterine stroma in the mouse Müllerian duct. *PNAS*. 113: 14354–14359, 2016.

（研究方法）

下図参照

- ・ ミュラー管が発生し始める胎生11.5日齢、またはミュラー管が完成する胎生13.5日齢のマウスからミュラー管を採取する。

- TGF β ファミリーの一つであり、卵管間質領域で遺伝子発現が高かったActivin A単独添加、またはレチノイン酸との共添加を行い、それぞれのシグナルを活性化させたもの、またはTGF β 受容体阻害薬、レチノイン酸受容体拮抗薬の単独または共添加を行い、それぞれのシグナルを阻害したものを器官培養する。
- 器官培養後、それぞれのシグナルが実際に活性化または阻害されたかを、免疫組織化学染色にて確認する。
- 器官培養後のサンプルを宿主マウスの腎被膜下に移植することで発生を進行させ、TGF β シグナルが卵管への分化に影響を及ぼすかどうかを、免疫組織化学染色にて解析する。



(結 果)

1. 器官培養におけるTGF β シグナルの制御

胎生11.5日齢のマウスよりミュラー管を採取し、器官培養を8日間行った。培養期間中、TGF β シグナルまたはレチノイン酸シグナルを制御するために、Activin Aまたはレチノイン酸、またはそれら受容体の阻害剤を添加した。TGF β シグナルが細胞内で活性化すると、転写因子であるSMAD2がリン酸化され、核内に移行することで細胞内の遺伝子発現を変化させる。そこで培養後、TGF β シグナルの活性化度合を解析するために、リン酸化SMAD2を標的とする抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。核内のリン酸化SMAD2に結合した抗体の蛍光強度を求め、相対値としてFig1に示した。対象群の卵管間質でもTGF β シグナルは活性化していることから、Activin Aやレチノイン酸を添加してもその活性化強度の上昇は培養8日目では確認できなかった。一方、TGF β 受容体阻害剤であるSB431542を添加すると、TGF β シグナルの活性は有意に減少した。予想外に、TGF β 受容体阻害剤とレチノイン酸受容体阻害剤を共添加することでTGF β シグナルの抑制は起こらなかった。これらの結果より、器官培養系においてTGF β シグナルを制御可能であることがわかり、レチノイン酸シグナルはTGF β シグナルを抑制する傾向にあることが示唆された。

2. TGF β シグナルを制御した器官培養系を用いた、卵管間質運命決定におけるTGF β シグナルの機能解析

胎生13.5日齢のミュラー管を、TGF β シグナルを活性化または抑制した器官培養後に、マウスの腎臓被膜下に移植して30日後に卵管纖毛上皮マーカーである β -tubulinと、卵管分泌

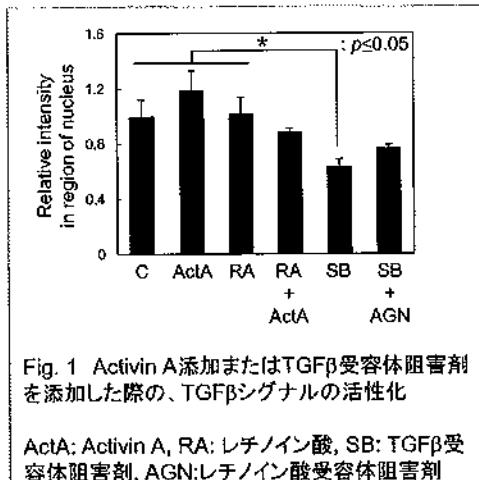


Fig. 1 Activin A添加またはTGF β 受容体阻害剤を添加した際の、TGF β シグナルの活性化

ActA: Activin A, RA: レチノイン酸, SB: TGF β 受容体阻害剤, AGN: レチノイン酸受容体阻害剤

上皮マーカーであるOVGP1に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。子宮、卵管間質へ分化したことがわかるマーカータンパク質は発見されておらず、上皮の運命は間質によって決定されること、上皮への運命決定は生後に行われること、さらに子宮上皮への分化マーカーも発見されていないことより、卵管上皮マーカーの発現が確認できれば、そのミュラー管の間質は卵管間質へと分化したことがわかり、発現がない場合は子宮間質へと分化したことが予想されるとして解析を行った。培養後移植した全ての条件において、卵管上皮マーカーが発現したサンプル、卵管上皮マーカーが発現しなかったサンプルの双方が確認できた(Fig. 2)。この結果より、胎生13.5日齢のミュラー管において、TGF β シグナルを制御しても卵管間質への運命には影響がないことがわかった。

(Fig. 2)。この結果より、胎生13.5日齢のミュラー管において、TGF β シグナルを制御しても卵管間質への運命には影響がないことがわかった。つまり、ミュラー管形成後において、TGF β シグナルは卵管間質の運命決定に関与していないことが示唆された。

発生を制御する因子群には、その因子が効き得る時期であるcritical windowが存在することがわかっている。TGF β シグナルはより早期のミュラー管形成期において働いていると予想し、胎生11.5日齢のミュラー管を用いて、同様の実験を行った。対照群のミュラー管においては、培養後移植しても卵管上皮マーカーの発現が全く確認出来なかったことから、この時期のミュラー管を器官培養してしまうと、卵管間質への運命決定が行われないことがわかった。しかしActivin Aを添加したサンプルにおいては、低い確率で卵管上皮マーカーの発現が検出された。驚くべきことに、TGF β シグナルとレチノイン酸シグナルを同時に阻害した場合でも、低い確率で卵管上皮マーカーは発現した。これらの結果より、TGF β シグナルはミュラー管形成期において、卵管間質への運命決定に関与しているが、トリガーというよりも補助的な作用である可能性が示唆された。

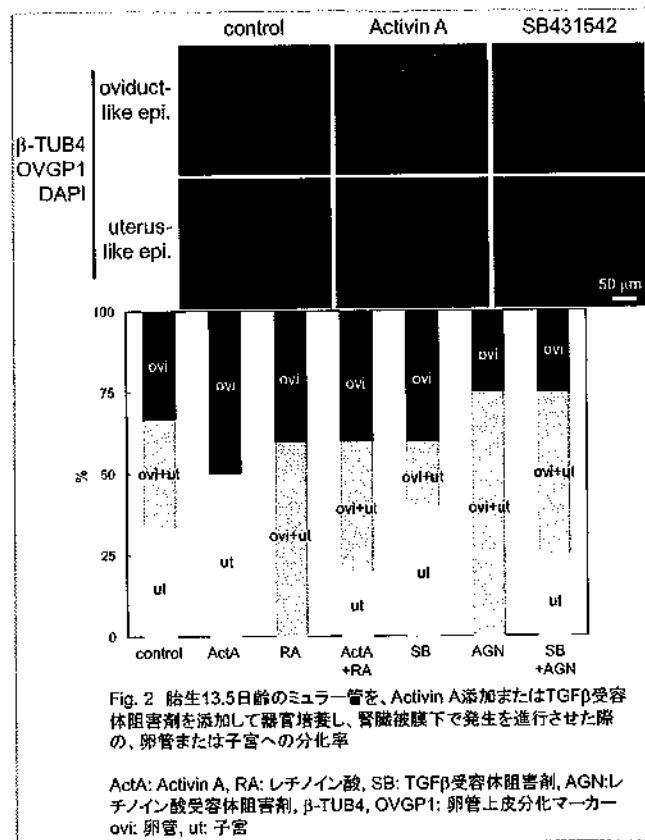


Fig. 2 胎生13.5日齢のミュラー管を、Activin A添加またはTGF β 受容体阻害剤を添加して器官培養し、腎臓被膜下で発生を進行させた際の、卵管または子宮への分化率

ActA: Activin A, RA: レチノイン酸, SB: TGF β 受容体阻害剤, AGN: レチノイン酸受容体阻害剤, β -TUB4, OVGP1: 卵管上皮分化マーカー
ovi: 卵管, ut: 子宮

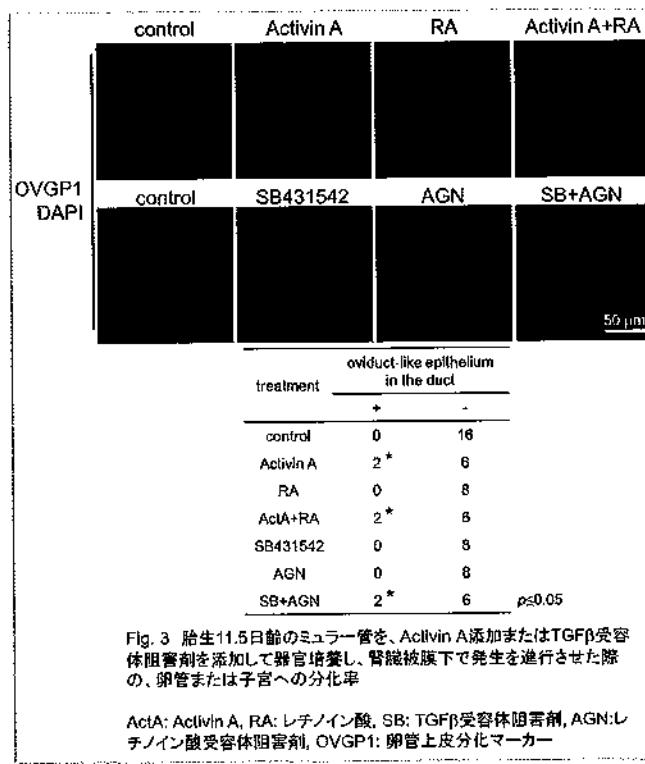


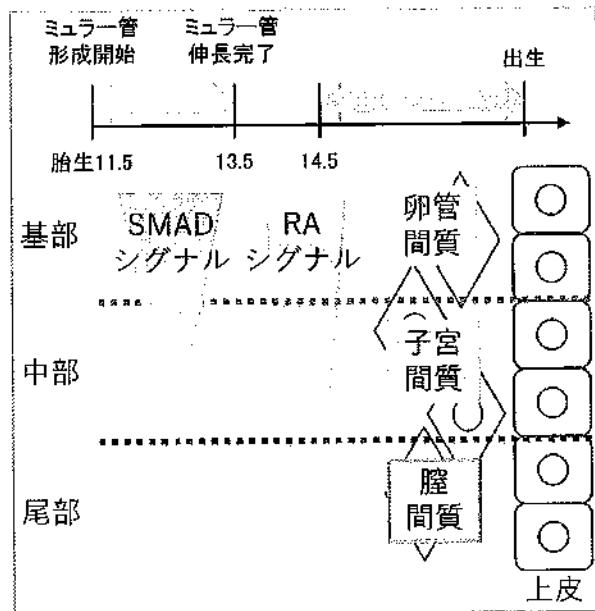
Fig. 3 胎生11.5日齢のミュラー管を、Activin A添加またはTGF β 受容体阻害剤を添加して器官培養し、腎臓被膜下で発生を進行させた際の、卵管または子宮への分化率

ActA: Activin A, RA: レチノイン酸, SB: TGF β 受容体阻害剤, AGN: レチノイン酸受容体阻害剤, OVGP1: 卵管上皮分化マーカー

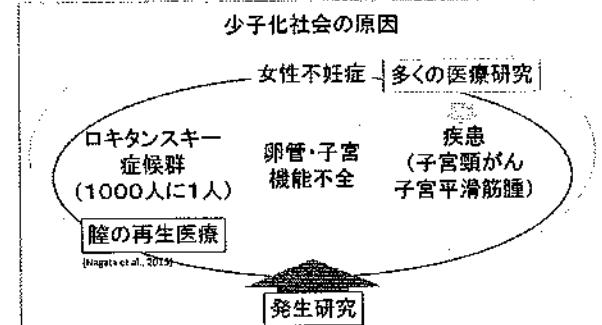
(成果・考察)

以上の結果より、卵管間質への運命決定はミュラー管形成期に起こることがわかった。胎生 13.5 日齢のミュラー管を器官培養すると、約半数は卵管になったのに対し、胎生 11.5 日齢のミュラー管を器官培養しても、全く卵管発生が進まなかつたことから、生殖腺などの近傍組織がミュラー管発生のオーガナイザーとして働いている可能性が考えられる。また、その際に TGF β シグナルを活性化することで、卵管間質への運命決定が誘導された。これらの結果より、卵管・子宮・臍の間質と上皮の運命決定時期はそれぞれ異なり、卵管から臍に向かって TGF β シグナルとレチノイン酸シグナルによって徐々に間質の運命が決定され、その後間質より上皮の運命が誘導されることが分かった(右図)。TGF β シグナルを活性化しても、卵管間質への誘導は低確率であったことから、TGF β シグナルによって制御される因子が、卵管間質への運命決定のキー ファクターであることが予想される。

現在これらの結果は論文として投稿準備中であり、さらに今後は、卵管・子宮・臍への運命決定機構をより詳細に解明すること目的として実験を続けていく予定である。



日本のみならず、現在は世界の先進各国において少子化が問題となっており、その原因の一つとして不妊症の増加が挙げられる。女性の不妊症のうち、生殖腺附属器官による原因是大きく次の 3 つに分けられる(右下図参照)。①ロキタンスキー症候群患者のように、そもそも卵管、子宮、臍が存在しない、②卵管に詰まりが生じる、受精卵が子宮に着床出来ないなど、卵管や子宮の機能が正常でない、③子宮頸がんなどの疾患が進行し、その機能を失うか子宮摘出手術を受けている。このうち、子宮の疾患に対しては多くの研究が存在するが、そもそも卵管、子宮の欠損や機能異常に対しては、医療研究のアプローチだけでは治療することが出来ず、発生学的視点からの基礎研究が必須となる。実際に今回の研究からでも、卵管発生障害の原因の一つとして、TGF β シグナルの異常が可能性として考えられる。今後のより詳細な研究により、実際の医療に繋がるように貢献していきたい。



木造住宅を対象とした外装材の層間変位追従性能の評価法の開発

横浜国立大学大学院都市イハーション研究院 特別研究教員
中尾 方人

(研究目的)

木造建築物で用いられる外装材の構造躯体への留め付け方法は多種多様であり、強風時や地震時にこれらの外装材が脱落しないことを設計で検証するには、未だ知見が不足している。特に近年では、木造建築物の防耐火性能を向上させるために、構造躯体に石こうボードを張った上から外装材を施工する場合もあり、外装材が脱落しないことの検証が一層困難になっている。高い防耐火性能を必要とする建築物は、概して、大規模であるか、重要度が高いものであるため、外装材についても、脱落しないことをより慎重に検証することが求められる。本研究では、木造の耐火建築物の外壁を対象に、ラスモルタル（湿式構法の外装材）が強風時および地震時に脱落しないことを、実験をもとに、検証する手法を検討する。また、カーテンウォールのように、スウェイやロッキングが可能な、湿式外装材用の支持金物も考案し、実験によりその性能を検証する。

(研究方法)

木造の耐火建築物の外壁には、図1のように、室外側および室内側に21mm厚の強化石こうボードを二重に張ることが建築基準法において求められている。外装材は、室外側の石こうボードの上に留め付ける必要があるが、石こうボートおよび外装材の留め付け方法は、規定されていない。そこでまず、下張り石こうボードを柱に留め付けるビス、上張り石こうボードを下張り石こうボートに留め付けるビス、および、通気胴縁を上張り石こうボードに留め付けるビスを選定し、引抜きおよび一面せん断試験を実施した。

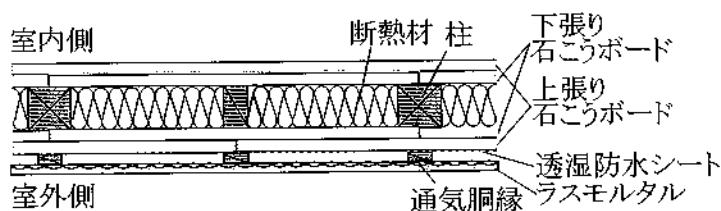


図1 木造の耐火構造の外壁

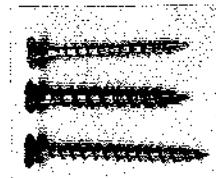


図2 使用したビス
(下から、下張り用、上張り用、脇縁用)

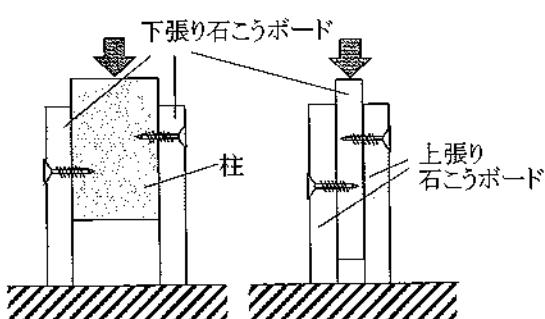
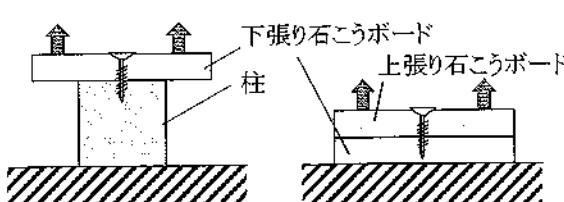


図3 ビスの引抜きおよびせん断試験方法

下張り石こうボードを柱に留め付けるビスは、図2に示す41mmの石こうボード用ビスとした。上張り石こうボードを下張り石こうボードに留め付けるビスは、刃の外径が5.5mm、長さが38mmの専用ビスとした。通気胴縁を上張り石こうボードに留め付けるビスは、長さ38mmの木材用コーススレッドとした。図3に示すビスの引抜きおよび一面せん断試験の結果から、外装材に作用する風圧力および地震による慣性力に対する余裕度を求めた。

次に、ビスの引抜きおよび一面せん断試験結果を考慮して、石こうボードおよび通気胴縁の留め付け方法を検討し、図4のように実物大の外壁試験体を製作して、せん断加力実験を実施した。試験体は、壁長1820mmで高さ2730mmとし、上張り石こうボードまで留め付けたものと、上張り石こうボードの上に通気胴縁およびラスモルタルを施工したもの2体とした。

また、この結果を参考に、カーテンウォールのような、スウェイやロッキングが可能な湿式外装材用の支持金物を考案し、壁長が910mmで高さが2730mmの実物大試験体のせん断加力実験により、その性能を検証した。なお、この実験では、メタルラスはこの支持金物を用いて直接柱および間柱に留め付けた。

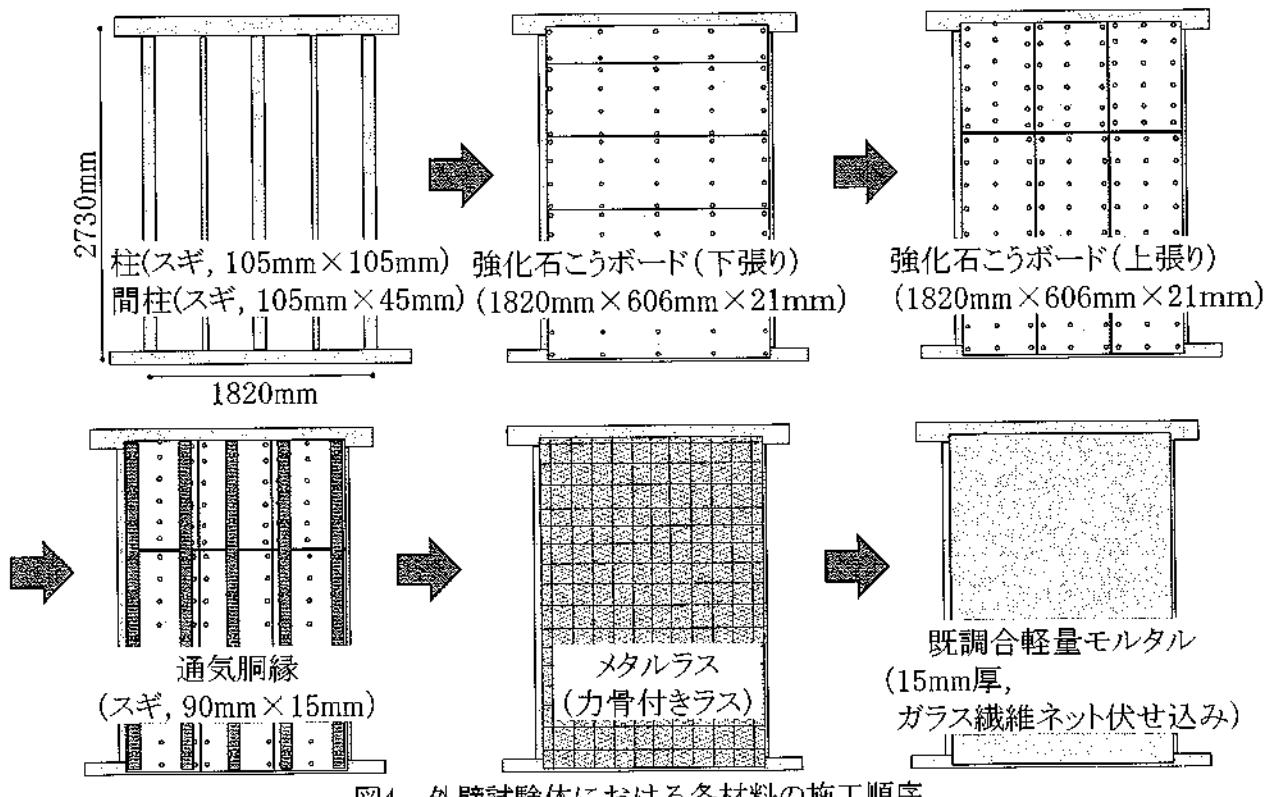


図4 外壁試験体における各材料の施工順序

(結 果)

図5と図6にビスの引抜きおよび一面せん断試験の結果を示す。下張り石こうボードを柱に留め付けるビスの引抜き試験では、ビスの頭が石こうボードにめり込み、最大引抜き力は0.94kNであった。上張り石こうボードを下張り石こうボードに留め付けるビスと、通気胴縁を上張り石こうボードに留め付けるビスの引抜き試験では、ビスは石こうボードから引抜け、最大引抜き力はそれぞれ0.30kNと0.40kNであった。

下張り石こうボードを留め付けるビスの一面せん断試験では、ビスが曲がりながら、ビスの頭が石こうボードにめり込む様子がみられ、最大せん断力は1.26kNであった。これとは逆方向の力が作用した場合を想定し、端距離を15mmとした場合の一面せん断試験を行うと、最大せん断力は0.47kNであった。これは、石こうボードの端が割れ、せん断力を負担できなくなつたためである。上張り石こうボードを留め付けるビスの一面せん断試験では、ビスは曲がることなく加力方向に傾き、最大せん断力は0.60kNであった。

風荷重（高さ13m、粗度区分III、基準風速46m/sec、出隅）と地震による慣性力（2G相当）がそれぞれのビス1本に作用する力を求め、試験による最大引抜き力および最大せん断力と比較すると、3倍以上の余裕度を有することを確認した。

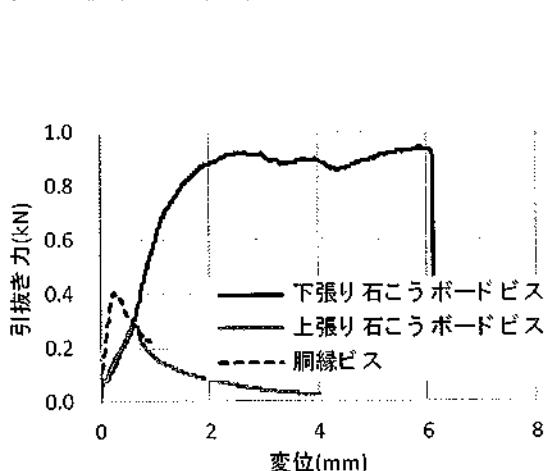


図5 ビスの引抜き試験結果

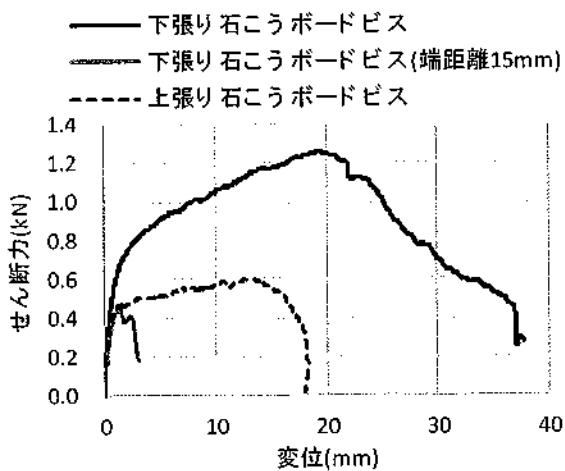


図6 ビスの一面せん断試験結果

上張り石こうボードまで施工した外壁試験体のせん断加力実験の結果を図7に示す。1/100radで石こうボード間のずれや、石こうボード隅角部での欠けがみられた。1/30radを超えると、石こうボードは隅角部以外でも割れがみられ、下張り石こうボードの軸組からの浮きがみられた。最大荷重は1/30radで9.8kNであり、その後、荷重はゆるやかに低下した。1/15radまで石こうボードの脱落はなかったが、最終的に、上張り石こうボードを留め付けるビスは、下張り石こうボードから簡単に引抜ける状態であった。終局変位（最大荷重後、80%に低下した時点の変位）は164mm（1/16.7rad）、壁倍率は1.50であった。下張り石こうボードの回転角は変形角の15～30%程度、上張り石こうボードは下段（1820mm×606mm）で30～60%程度、上段（910mm×606mm）で30～40%程度であり、下張り石こうボードと上張り石こうボードは、それぞれが独立した挙動であるといえる。

上張り石こうボードの上に通気胴縁とラスマルタルを施工した試験体の結果を図8に示す。1/50radで上張り石こうボードが下張り石こうボードから浮き上がる様子がみられた。1/30radでは、下張り石こうボードの軸組からの浮き上がりがみられた。最大荷重は1/50radで9.8kNであり、終局変位は111mm（1/24.6rad）、壁倍率は1.56であった。下張り石こうボードの回転角は変形角の30～50%程度、上張り石こうボードやラスマルタルは50～70%程度であり、ラスマルタルと上張り石こうボードは一体として挙動しており、下張り石こうボードの回転角もラスマルタルがない場合より大きくなっていることが分かる。

以上の実験結果より、ラスマルタルは面内剛性が高く、水平力が作用すると、剛体として回転挙動が生じることが分かる。そこで、ラスマルタルの水平方向のスウェーを許容す

る支持金物を考案し、壁長が910mmの軸組にその金物を取り付け、ラスマルタルを施工した試験体を製作し、せん断加力実験を行った。図9に結果を示す。間柱上の金物は意図したようにスウェーが生じていたが、柱上の金物は、上下方向に曲げ変形が生じ、ラスマルタルには回転運動がみられた。しかし、変形角に対するラスマルタルの回転角は80%前後であり、通常の工法では概ね100%（回転角は変形角とほぼ同じ）であることを考慮すると、一定の効果は得られたものと考えられる。

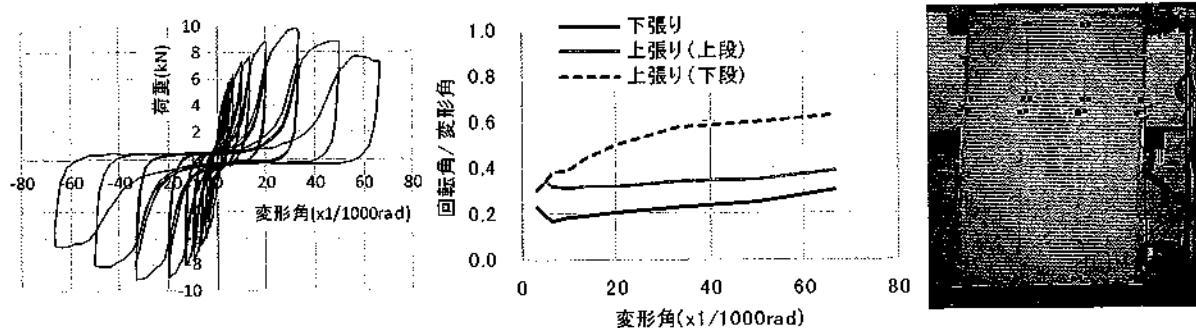


図7 上張り石こうボードまで施工した試験体の結果

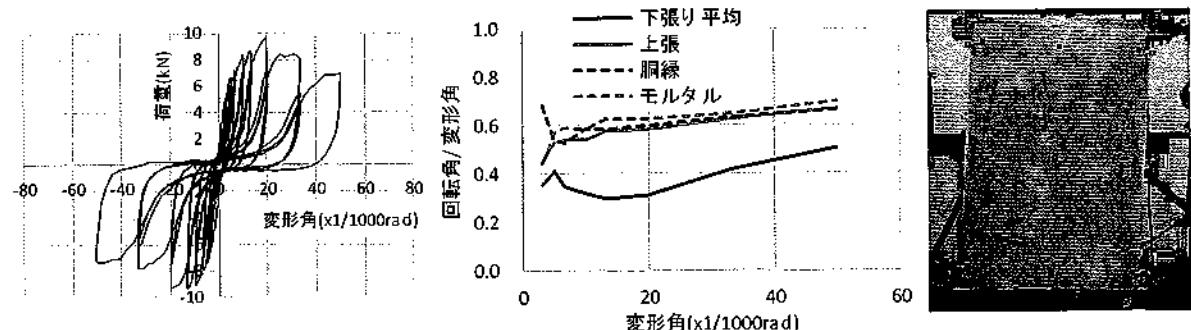


図8 ラスマルタルまで施工した試験体の結果

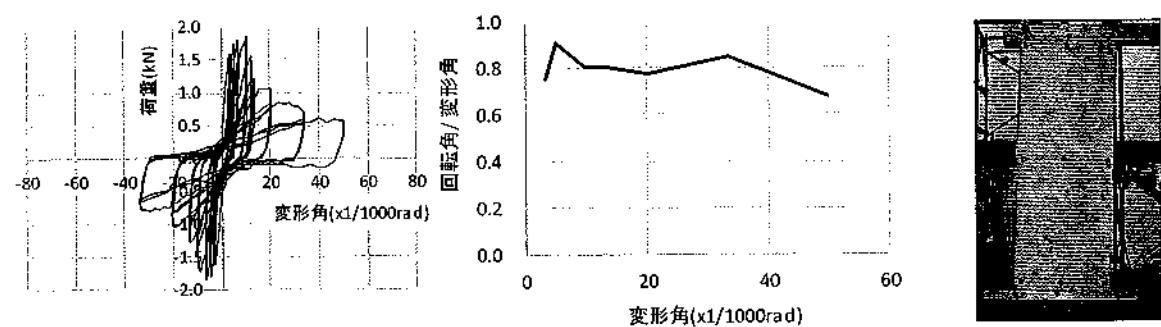


図9 ラスマルタルのスウェーを許容する支持金物を用いた試験体の結果

(成果・考察)

石こうボードを二重に張った木造建築物の外壁のせん断加力実験の結果、石こうボードの上にラスマルタルを施工することで、ラスマルタルと上張り石こうボードは一体として挙動し、ラスマルタルがない場合より最大荷重時の変形角や終局変形角が小さくなることが分かった。ラスマルタルがある場合、5枚の下張り石こうボードが一体であるとした簡単な解析によって、荷重-変形角関係を概ね推定できることが確認された。また、ラスマルタルの面内剛性の高さが石こうボードの挙動に影響を及ぼすことのない、スウェーを許容する支持金物の開発の目途も立ち、実用化に向けた検討を進めていく。

人工気象機内における穀物類イネの生長解析

横浜市立大学 木原生物学研究所 特別研究員 PD
大西 由之佑

(研究目的)

「植物工場」と呼ばれる室内環境での農作物生産の市場は、近年急速に拡大している。完全に気象条件(気温・湿度・光量)のコントロールが可能なその人工気象機/室では、無農薬栽培や、効率の良い安定した作物生産が可能(悪天候による収量への影響が皆無)であり、また、栽培場所を選ばず、たとえそこが宇宙空間であっても農業の実現が可能となっている。しかしながら、現在、植物工場で生産される作物は、レタスなどの副食を中心であり、人類の主食となる穀物の生産は主流でなく、またその育成法の知見も乏しい。これは現代において、穀物類の人工気象機での栽培が低需要・高コストとなるためであるが、近代頻繁に報告される異常気象による収量減少への懸念からも、その人工気象機内での穀物類の基礎的な育成情報の蓄積は重要な研究課題であると言える。そこで本研究は、人工気象内での穀物類(イネ)の育成状態を評価・解析し、一定環境条件下での栽培が穀物類にもたらす影響を体系化することを研究目的とする。

(研究方法)

栽培は人工気象機(ハイカルチャ RTC-2000、セラ不動:図1a)にて開花登熟に適した一定環境下(25度、湿度50%、明期11時間、暗期13時間:図1b)で行った。イネは播種後、一穂ごとにポット(TO深鉢φ6 cm/150 cc、土:JAくみあい宇部培土2号)栽培し(図1c)、育成過程では、イネの脇芽は常に除去し、一穂の状態で育成し、開花ののち止葉と、止葉から2枚目までの葉(-1葉、-2葉)以外は全て除去している(図2)。生長の計測では、7日毎の草丈の伸長、出穂日、開花日、花数、種子数、栽培開始98日後の地上部・地下部の乾燥重量を計測した。さらに、7日毎の草丈の伸長から最大草丈(式1)を算出し、最大草丈の-3 cmまで近づいた日を伸長停止日とした。また、伸長速度(式2)、花数と種子数から稔実率を算出した。加え、人工気象機内でのイネの老化進行を定量化するため、葉緑素計SPAD-502Plusを用いて、止葉と-1、-2葉の葉緑素量を育成56日目から7日おきに計測し、計測された値の近似曲線の最大傾きから老化速度、最大傾きの直線が最大SPAD値と接する点を老化開始日として算出した。

$$\text{式1} \quad \text{最大草丈(cm)} = \frac{x_{84} + x_{91} + x_{98}}{3}$$

$$\text{式2} \quad \text{伸長速度(cm/day)} = \frac{\text{最大草丈(cm)}}{\text{伸長停止日(days)}}$$

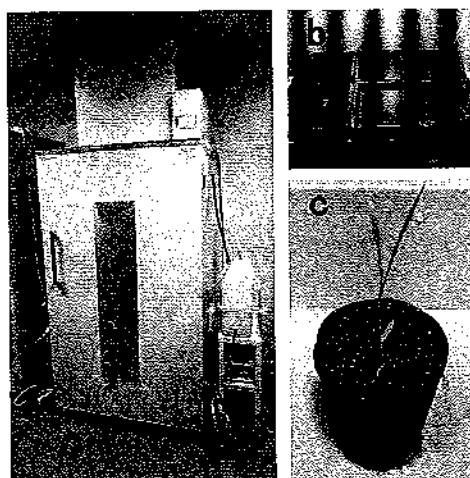


図 1、a: 人工気象機(ハイカルチャ RTC-2000、セラ不動)の外観、b: 人工気象機の内観、c: ポット栽培した14日目のイネ

(結果)

上記の計測項目の値を98日間、計4回、93個体から取得した(2018年7月2日から10月8日、2018年9月10日から12月17日、2018年12月3日から2019年3月11日、2019年1月14日から4月22日)。各計測項目の平均値および標準誤差は表で示されるとともに、各項目における計測値は図3で示された。

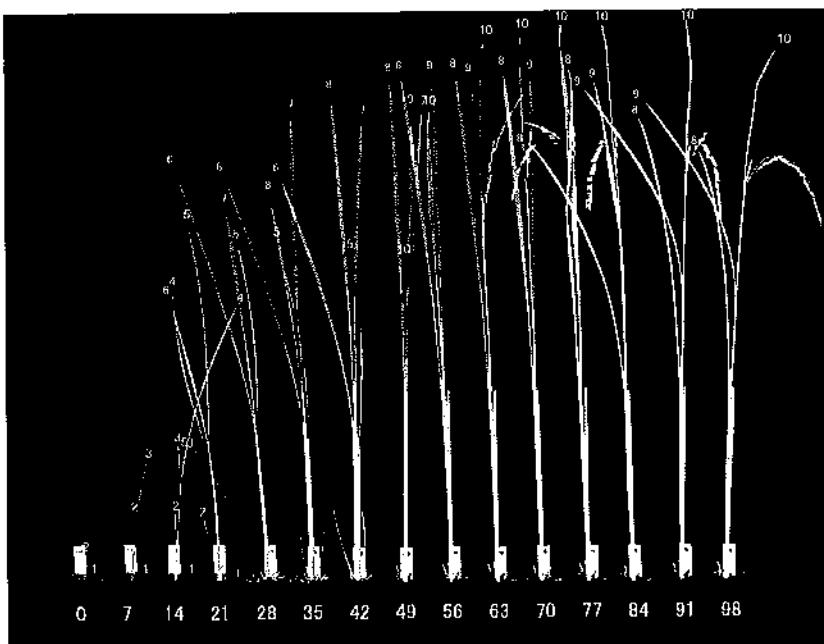


図2、人工気象機内で育成したイネ。葉上部の数字は展葉数、下の数字は育成日数を表す。

表

	測定項目	平均値	標準偏差
	0 day	4.84	1.69
	7 days	17.36	4.78
	14 days	33.51	6.16
	21 days	44.88	6.90
	28 days	56.44	7.68
	35 days	65.78	7.49
	42 days	71.92	8.04
草丈(cm)	49 days	75.51	5.62
	56 days	78.73	7.06
	63 days	82.14	7.10
	70 days	83.79	6.59
	77 days	83.60	6.59
	84 days	83.76	6.64
	91 days	83.63	6.48
	98 days	83.67	6.54
	最大草丈(cm)	85.40	6.54
	伸張停止日(days)	64.09	9.27
	伸張速度(cm/day)	1.345	0.282
	出穂日(days)	61.25	3.71
	開花日(days)	62.84	5.00
	花数(n)	74.46	11.56
	種子数(n)	44.75	22.05
	稔率(%)	60.21	27.93
	1種(g)	0.0236	0.0015
	全身乾燥重量(g)	1.883	0.448
	地下部乾燥重量(g)	0.498	0.113
	地上部乾燥重量(g)	1.388	0.392
	-2葉	63.98	2.31
老化開始日(days)	-1葉	69.28	3.28
	止葉	80.01	5.50
	-2葉	2.724	0.485
老化速度(SPAD/day)	-1葉	2.036	0.802
	止葉	1.642	1.013

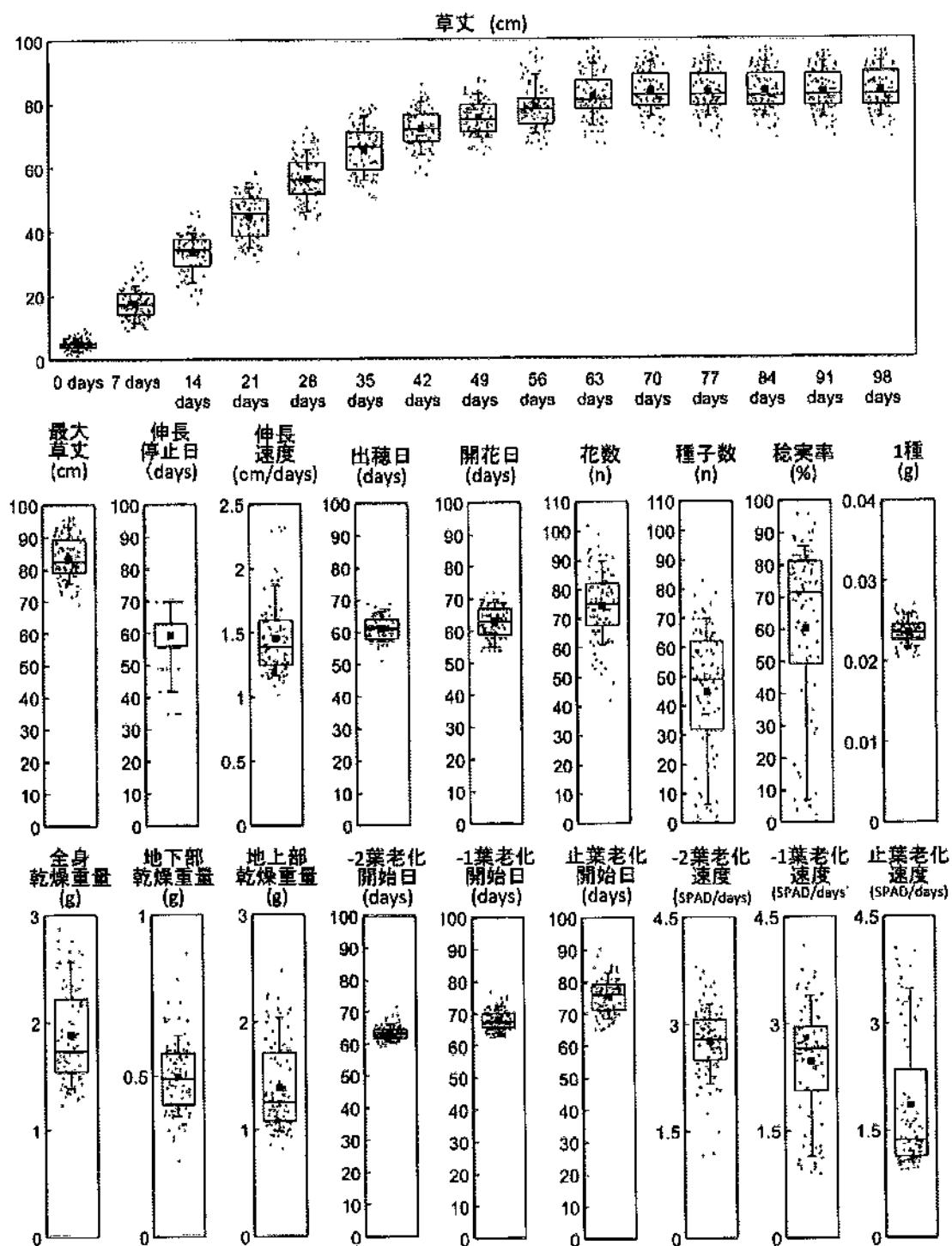


図3、各計測項目の実測値。それぞれの計測された値は赤点で表示されている。箱ひげ図は上部線が10位、上部はこれが25位、下部はこれが75位、下部線が90位を表し、中央の線が中央値、中央の黒点が平均値を表している。

(成果・考察) 等

これら包括的な測定とそのデータの蓄積は、人工気象機内での共通基礎的なイネ生長の情報を明らかにし、次世代の学術ならびに農業に対し貢献するものである。

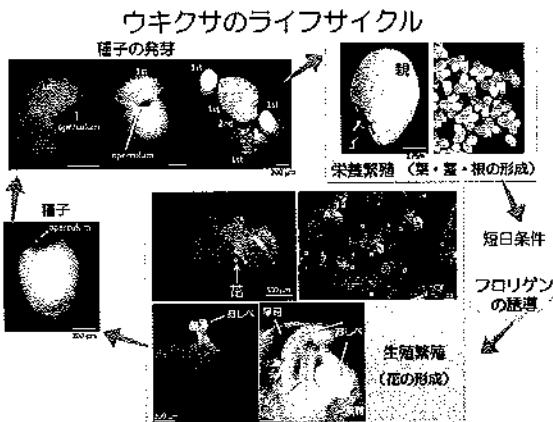
栄養繁殖性の雑草防除に向けた分子基盤の確立

横浜市立大学 木原生物学研究所 助教
吉田 明希子

(研究目的)

農業生産を向上させるには収量増加や病害虫駆除だけでなく、農地内や農地周囲の雑草防除による栽培技術の向上も重要な課題である。特に、花・種子を介する生殖繁殖性の雑草とは異なり、環境に適応したクローンにより増殖する栄養繁殖性の雑草は、増殖速度が速くその防除が非常に難しい。申請者は、これまでに雑草の一種である野生イネ地下茎を用いて栄養繁殖と生殖繁殖のスイッチング機構を形態学的・分子遺伝学的に解析してきた。本研究では、栄養繁殖性を有する水田雑草の防除につながる分子基盤確立にむけ、水生の代表的な雑草であるウキクサの繁殖・成長様式について明らかにする。ウキクサの繁殖機構のしくみを解明することにより、環境に応じて栄養繁殖または生殖繁殖と、繁殖方法を切り替えて旺盛に繁殖し続ける雑草の防除に向けた研究基盤の整備につながることが期待される。

本研究には、栄養繁殖性雑草のモデルとしてウキクサ (*Lemna aquinoctialis*) を用いた(右図)。ウキクサは単子葉植物で、水田雑草の一つであり、増殖すると瞬く間に水面を覆う。100日間で400万倍に増えるという報告もあり、増殖すると水中の温度低下や、水中植物プランクトンの光合成抑制による酸素量減少などを通じてイネの生育阻害を引き起こし、稻作に大きな被害をもたらす。本研究では、栄養繁殖性を有する水田雑草の分子遺伝学的解析にむけ、まずはウキクサの栄養繁殖・生殖繁殖の成長様式の解明について、次に、花成ホルモンであるフロリゲン誘導による栄養繁殖と生殖繁殖のスイッチング機構の2点を明らかにした。



(研究方法)

ウキクサを栄養繁殖性雑草のモデル植物としての実験系整備を行った上で、(I) ウキクサの繁殖・成長様式の解明と (II) 環境に応答した栄養繁殖と生殖繁殖のスイッチング機構の解明を行った。(I)では、ウキクサが増殖していく繁殖様式を観察し、分子遺伝学的・形態学的な解析を行った。(II)では、生殖繁殖である花器官を誘導するフロリゲンの同定とそのフロリゲン作用機序について明らかにした。

栄養繁殖性雑草の様々な解析への基礎知見として、まずは I-①ウキクサの繁殖・成長様式を発生形態学的手法により詳細に観察し記述した。I-①の解析により、I-②栄養繁殖と生殖繁殖をおこなうそれぞれの器官を生み出すメリistem領域(葉や花器官を生み出す未分化細胞の分裂組織)を特定し、I-③RNAシーケンスによるトランスクriptオーム解析を行った。

トランスクリプトーム解析と合わせて、モデル植物などで報告されているホルモン応答性遺伝子や器官マーカー遺伝子の遺伝子情報を応用し、それらのホモログ遺伝子をクローニングして、I-④ウキクサに導入する形質転換系の確立を目指した。さらに、ウキクサの栄養繁殖・生殖繁殖スイッチング機構を明らかにするために、まずはII-①光周期依存的に花成誘導するフロリゲンの単離同定とフロリゲンの作用機序の特定を行った。

(結果)

(I) ウキクサ (*L. aequinoctialis*) の繁殖・成長様式の解明

- ① ウキクサの繁殖・成長様式
- ② 栄養繁殖器官と生殖繁殖器官を生み出すメリステム領域（葉や花器官を生み出す未分化細胞の分裂組織）の特定

ウキクサは水面上で次々に増殖して漂うために、1個体の追跡観察がしづらい。そこで、まずはウキクサを固体培地で生育・増殖させる系を確立した。確立した系を用いて、ウキクサの栄養繁殖と生殖繁殖の成長様式の詳細な組織学的観察を行った。ウキクサは葉と茎が一緒になった一つの親フロンド（葉状体）から次々に娘フロンドが形成され、娘フロンドが分離・独立することにより増殖していく。フロ

図1a. ウキクサの栄養繁殖様式

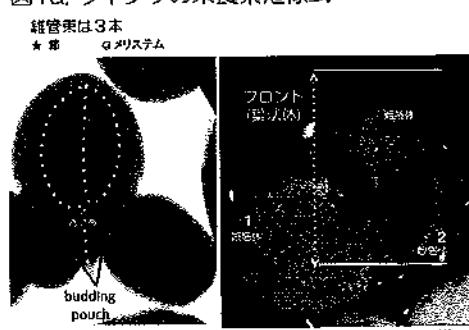
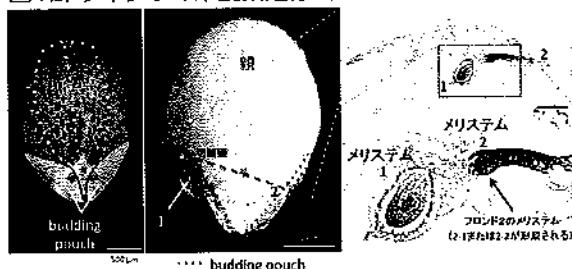


図1b. ウキクサの栄養繁殖様式



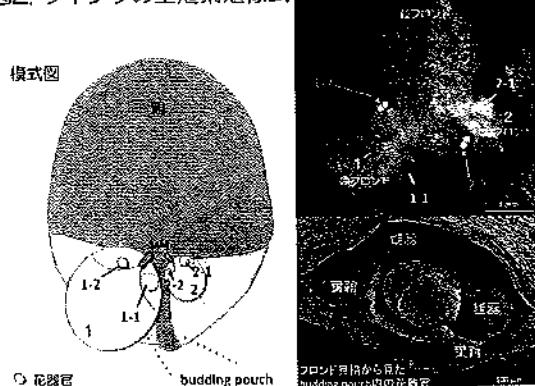
ンドには2つのbudding pouchと呼ばれるポケットが左右にあり、その中にあるメリステム（分裂組織）から娘フロンドが形成される（図1a, 1b）。固体培地では、短日処理12日後にはメリステムにおいて誘導された花芽がbudding pouchから現れた（図2）。そこで、短日処理0日から12日目までのbudding pouch内にあるメリステム

での花芽形成過程を組織切片により詳細に観察した。その結果、誘導してから3日目にはbudding pouch内にあるメリステムが花芽に誘導されていることが明らかになった。

③ RNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析

①と②の形態学的解析結果より、短日処理をしてから12日目までは、花芽が誘導・形成されることが明らかになったので、短日処理前（栄養繁殖期）・短日処理後5日・10日・13日のウキクサをサンプルとしてRNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。ウキクサはフロンド全体（シート・根を含む）をサンプルとした。本研究に用いたウキクサ (*L.*

図2. ウキクサの生殖繁殖様式



aequinoctialis) は、ゲノム配列情報がないので、*de novo* によるトランスクリプトーム解析を行った。発現変動解析により、4975の発現変動している遺伝子 ($FC > 1.5$ かつFDR<0.05) を同定した。これらの発現変動遺伝子群をクラスタリング解析した結果、6つのクラスタが得られた。これにより、ウキクサが栄養繁殖から生殖繁殖へときりかわっていく過程に特徴的な遺伝子群が得られた。GO解析をした結果、生殖繁殖が誘導される過程において特徴的な発現パターンをもつ6つのクラスタのうち、とくに短日処理後の遺伝子発現が上昇していくクラスタ1においてのみ、花器官形成遺伝子群が多く含まれていた。

④ウキクサの形質転換系の確立

ウキクサはゲノム情報がないので、モデル植物シロイヌナズナ・イネで報告されているホルモン応答性遺伝子や器官マーカー遺伝子の遺伝子情報を応用し、それらのホモログ遺伝子をクローニングした。それらを用いてウキクサの形質転換系の確立を目指した。ウキクサ遺伝子をアグロバクテリウムに導入し、直接ウキクサに感染させた後、アグロバクテリウムが感染したウキクサを選抜する手法を試みた。現在、抗生素入り培地を用いて目的の遺伝子が導入された形質転換体ウキクサをスクリーニングしている段階である。

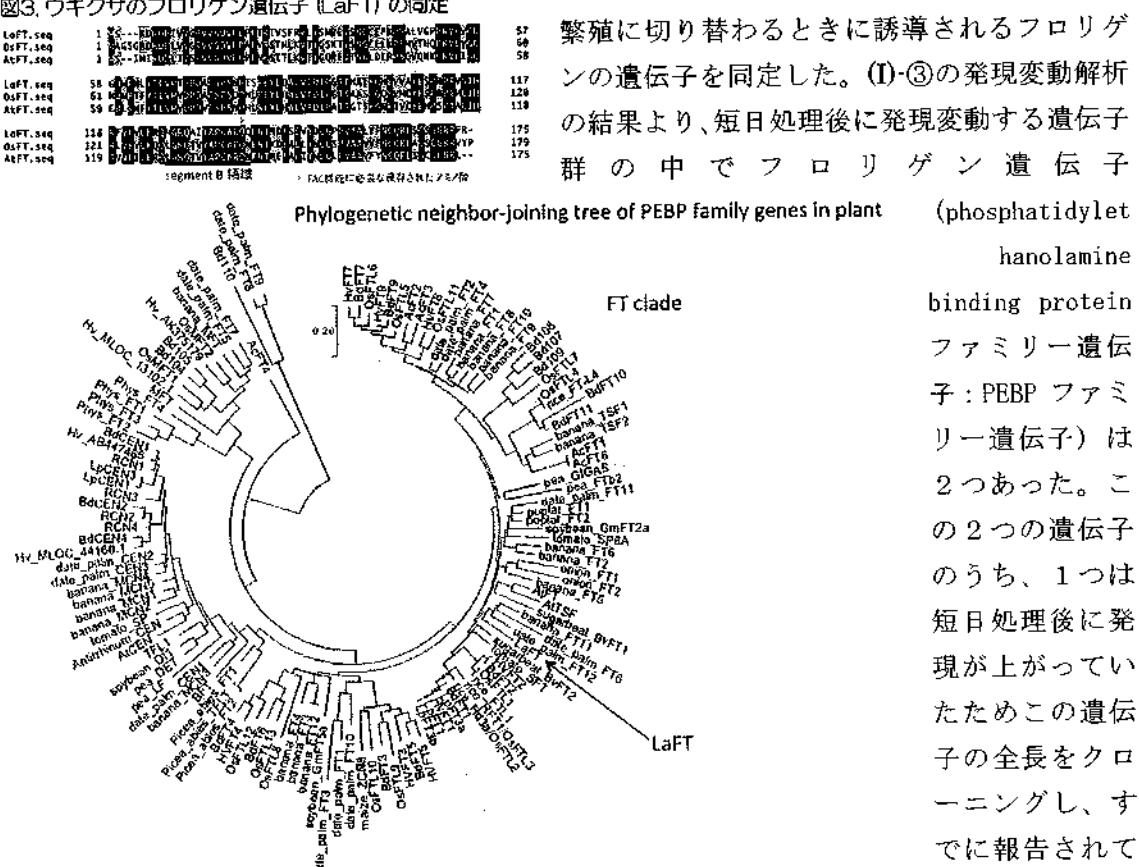
(II) 環境に応答した栄養繁殖と生殖繁殖のスイッチング機構の解明

① 光周期依存的に花成誘導するフロリゲンの単離同定とフロリゲンの作用機序の特定

栄養繁殖しているウキクサが、花・種子を形成して生殖繁殖に切り替わる環境条件には、光や栄養など様々な要因がある。その中でも今回は、(I)・③の解析結果を利用して、短日処

理による光周期に応答して栄養繁殖から生殖繁殖に切り替わるときに誘導されるフロリゲンの遺伝子を同定した。(I)・③の発現変動解析の結果より、短日処理後に発現変動する遺伝子群の中でフロリゲン遺伝子

Phylogenetic neighbor-joining tree of PEBP family genes in plant (phosphatidylethanolamine binding protein ファミリー遺伝子: PEBP ファミリー遺伝子)



リードしたためこの遺伝子の全長をクローニングし、すでに報告されて

いる他の植物の開花促進に関与するフロリゲン遺伝子（シロイヌナズナ AtFT・イネ Hd3a・トマト SP6Aなど）を用いて系統解析を行った。その結果、短日誘導処理後に発現が上がったこのフロリゲン遺伝子は、FT cladeに属しており、栄養繁殖から生殖繁殖に切り替わるのに関与しているフロリゲン遺伝子（LaFT）であることが明らかになった（図3）。

植物において、開花を促すフロリゲン（FT）は、転写因子（FD）と相互作用して、フロリゲン活性化複合体（florigen activation complex : FAC）を形成して機能することが知られている。そこで、次に①-③のトランスクリプトーム解析により、FACの構成因子であるFD遺伝子が発現しているかどうか調べた。その結果、栄養繁殖期と生殖繁殖期の両方で発現しているLaFD遺伝子を見出した。

（考察）

ウキクサの栄養繁殖・生殖繁殖の成長様式を詳細に解析した結果、短日処理後ごく初期にbudding pouch内にあるメリシステムで花芽分化が誘導されていることが明らかになった。しかしながら、ウキクサは必ず左右対称に2つのbudding pouchを持つものの、決まった片方のbudding pouch内のメリシステムでは花芽分化が必ず誘導されない（図4）。今後は、この現象を引き起こす原因について、メリシステムの形態を中心に詳細に解析していく予定である。

栄養繁殖期と生殖繁殖期のウキクササンプルを用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、生殖繁殖が誘導される過程において特徴的な発現パターンは6つのクラスタに分類された。とくに短日処理後の遺伝子発現が上昇していくクラスタ1においては、花器官形成遺伝子群が多数含まれることから、これら遺伝子が短日誘導処理による光周期に応答した栄養繁殖と生殖繁殖のスイッチング機構に関与していることが示唆された。

フロリゲンはFACを形成して花芽分化誘導する。本研究では、ウキクサの光周期依存的に花成誘導するフロリゲンを単離同定し、ウキクサにおいても他の植物同様FACの構成因子FTとFDが存在することが明らかになった。これによって、短日処理に応答したフロリゲンがbudding pouch内のメリシステムに作用して、メリシステムを花芽に誘導することで、栄養繁殖しているウキクサが生殖繁殖へと切り替わることが示唆された。今後は、本研究により単離したLaFTとLaFDがbudding pouch内のメリシステムでどのように機能するかについて、詳細に解析していく予定である。

栄養繁殖しない多くの植物体のFACの構成因子FDは、花芽誘導される前でも栄養成長期のメリシステム内で発現・機能している。そして、FTと拮抗して花芽誘導を抑制する因子と相互作用していることが知られている。栄養繁殖するウキクサでも、FTと拮抗して生殖繁殖への移行を阻止している因子が存在する可能性が考えられる。今後は本研究成果をふまえて、FTと拮抗して栄養繁殖を維持し生殖繁殖への移行を阻止している可能性が考えられる因子の探索をする予定である。

コーヒー残渣の非可食性バイオマスとしての利用を目指した 燃料成分の構造解析

横浜国立大学大学院工学研究院 准教授
川村 出

(研究目的)

エネルギー・環境問題の改善による低炭素社会への意識や要求が高まっている中、バイオマス資源が占める役割は依然として注目されており、その中でコーヒー残渣は魅力的なターゲットの一つである。コーヒーは世界中で広く親しまれている飲料の一つであり、2017年には世界中で年間約950万㌧ものコーヒー豆が消費されている^{1,2)}。日本は世界でも卓越した缶コーヒーやコーヒー製造技術が発展し、横浜市においても多くのコーヒーショップがあるなど日本のコーヒー豆使用量(46万5千トン)は先進国の中でも高い水準である(EU、アメリカに続いて第3位)。コーヒー豆の乾燥重量の約10~20%は脂質成分、約50%は不溶性の分厚い細胞壁が占め³⁾、これらの成分はドリップ後のコーヒー残渣中にもおよそ保たれる。一方、世界中で年間約800万トンものコーヒー残渣が生じているが²⁾、その大半はゴミとして捨てられてしまっている。コーヒー残渣中に含まれる脂質や細胞壁成分の分子構造を理解し、それらを巧みに取り扱うことができれば、非可食性バイオマスとして効率的で網羅的なコーヒー残渣の再利用法を検討することが出来る。特にトリアシルグリセロール(TAG)は公共のバスのディーゼル燃料の原料ともなる物質であり、この構造情報の調査は重要である。

本研究ではコーヒー豆中に含まれるTAGの固体核磁気共鳴(NMR)法による直接検出技術の構築とTAGの抽出方法の最適化をはかり(図1)、バイオマス資源としてのポテンシャルを化学的な情報から示すことが目的である。

図1 本研究の主な流れ⁴⁾

(研究方法) 固体NMR分光法は測定試料状態に依存することが少ない特徴を有する。そのため、コーヒー豆に含まれる状態で脂質成分のTAGの構造的特徴を明らかにする。用意したサンプルはインドネシア産のロブスタ種のコーヒー生豆、焙煎豆、また焙煎豆からコーヒーを淹れた後に残るコーヒー残渣である(図2)。

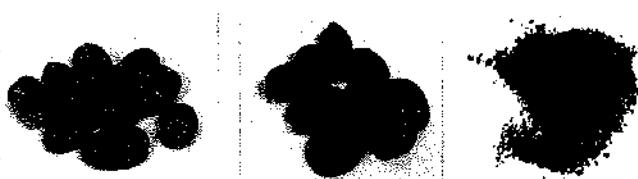
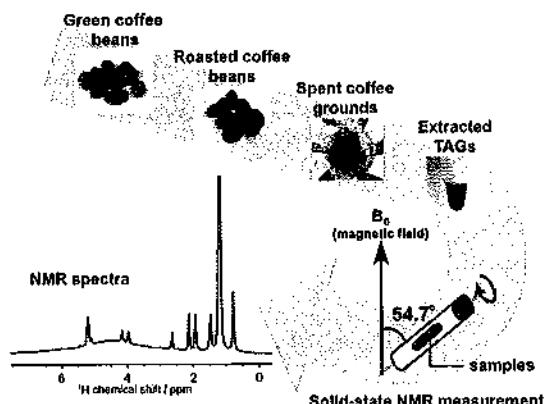


図2 (左) コーヒー生豆
(中央)焙煎豆
(右)脂質抽出後の
コーヒー残渣

1. コーヒー豆中のTAGの高分解能NMRモニタリング

TAGはグリセロール骨格と飽和または不飽和炭素-炭素結合部位を有する3つのアルキル鎖で構成される。固体NMRの高分解能化技術の一つで、化学シフト異方性を消去できるマジック角回転法(MAS)を用いることで¹Hおよび¹³C固体NMRスペクトルを観測した。固体NMRは横浜国立大学に設置されているBruker Avance III 600MHzの分光計を利用した。

2. TAG抽出とそのNMR信号の観測

油脂であるTAGを植物中から抽出するには、様々な方法がある。*n*-ヘキサン中でコーヒー残渣を長時間攪拌後、エバポレータによってコーヒー残渣に含まれるTAGを抽出した。

(結果) コーヒー豆中のTAGの高分解能NMRモニタリング

ミルで碎いた生豆および焙煎豆、コーヒー残渣の¹Hおよび¹³C固体NMRスペクトルを記録した(図3)。一般に、固体サンプルの¹H MAS NMRシグナルは同核双極子相互作用¹H-¹Hのためにブロードになることが知られている。しかし、生豆、焙煎豆、コーヒー残渣のいずれにおいても¹H MAS NMRスペクトルは溶液の信号のように鋭く観測された(生豆で観測された約4.5 ppmの広いシグナルを除いて)(図3(a)-(c))。スペクトルパターンより、TAG分子中の3つの脂肪酸がオレイン酸とリノール酸の混合物であることを明らかにした。3つすべてのスペクトル中の¹H NMRピークは図3下のTAGのA-Jの位置に対応した。3つすべてのスペクトルにおけるFのシグナルはリノール酸中で-CH=CH-CH₂-CH=CH-の2つの-C=C-結合の間に挟まれた炭素と直接結合しているプロトンに帰属できる。

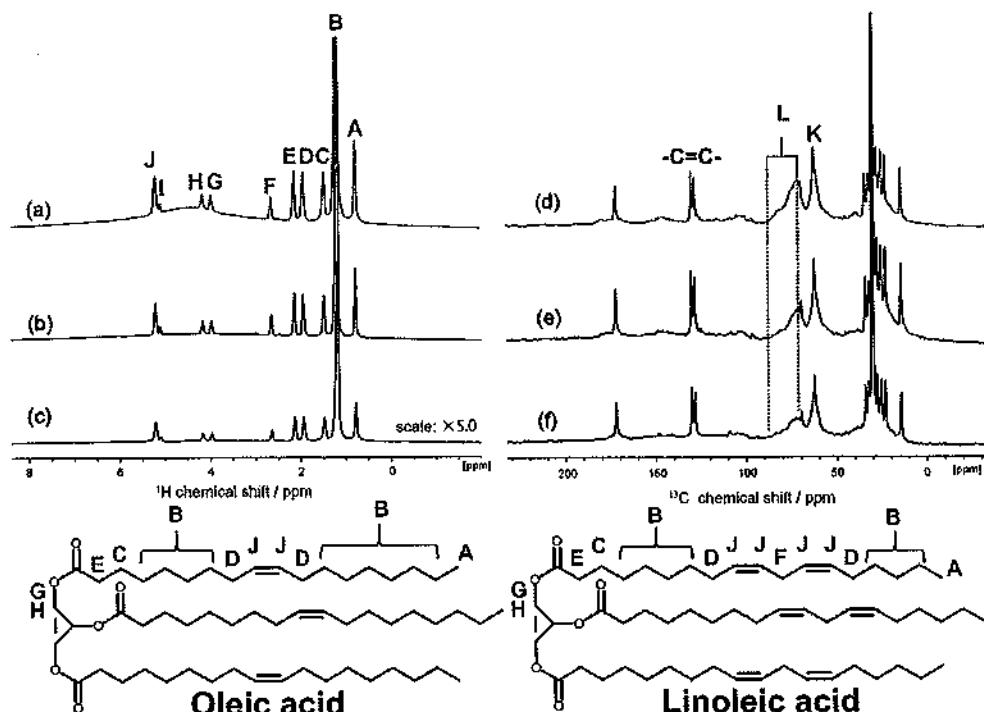


図3(d)~(f)に示す生豆、焙煎豆、コーヒー残渣の¹³C DD-MAS NMRスペクトルは、同様のパターンの化学シフトを示した。K (60~63 ppm) とL (70~77 ppm) のブロードなピークを除くすべての鋭いピークはTAGに帰属することができ、特に、およそ130 ppmに現れた信号はリノール酸の-C=C-二重結合であった。

TAG抽出方法とそのNMR信号の観測

コーヒー残渣から脂質を抽出した後、液体脂質および固体残渣を¹H MAS NMRおよび¹³C DD-MAS NMRによって分析した（図4）。図4の(a)、(c)のピークの鋭さは、コーヒー残渣から抽出されたTAGの高純度と均一性を示唆している。(c)において172.3 ppmに現れるピークより、遊離脂肪酸が存在しないことを示しており、これはバイオディーゼル生産のエステル交換プロセスにとって大きな利点と考えられる。図4(b)の4 ppm付近のブロードなピークは、コーヒーに添加された水、または乾燥工程中に吸着された水によるものと考えられる。110 ppmにおけるピーク（図4(c)）は、NMRローター中の液体脂質のこぼれを回避するために使用したテフロンコーティングスペーサーである。図4(d)でアスタリスク (*) が付いているシグナルは、コーヒー豆の細胞壁を構成する多糖類であり、これは細胞壁が脱脂処理中に完全には破壊されなかったことを示す。一方、乾燥残渣中のTAGの¹³C NMRシグナル強度（図4(d)）は焙煎豆とコーヒー残渣と比較して明らかに低く（図3）、ほとんどのTAGは脱脂処理によって抽出されたことを示唆している。

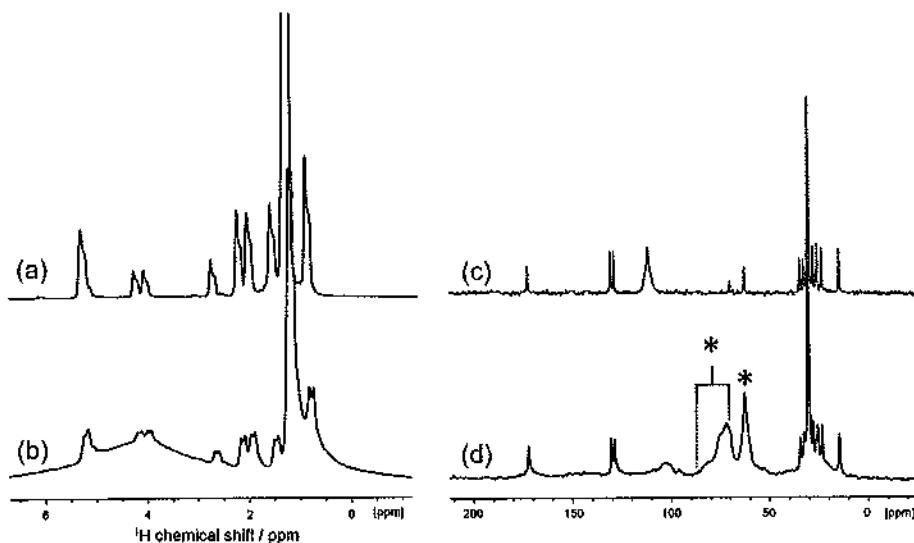


図4. (左) 脱脂処理後の(a)抽出された液体TAGおよび(b)固体コーヒー残渣の¹H MAS NMRスペクトル。(右) (c) 抽出された液体TAGおよび(d)ヘキサン処理後の固体コーヒー残渣の¹³C DD-MAS NMRスペクトル⁴⁾

(成果・考察) 生豆/焙煎豆/コーヒー残渣に含まれる、もしくはヘキサンにより抽出したTAGは不飽和脂肪酸が多く、常温で液体であることが予想される。実際に冷蔵庫内では凍結しない。このような凍りにくい性質は寒い地域への運搬にも優れ、利用しやすいと考えられる。¹H MAS NMRおよび¹³C DD-MAS NMRスペクトルの現れた信号から判断すると、コーヒー残

渣から抽出された脂質は不純物が少なく、本方法によってコーヒー粕から抽出した TAG は高純度であることが示唆された。バイオディーゼル燃料を生成する典型的な原料の植物油である大豆油、パーム油とは異なり、コーヒー残渣は新たに耕作された土地を必要とせず、食料と完全に競合することがない。我々の NMR 結果は、コーヒー残渣がバイオディーゼル燃料を生成する有望な原料であることを示唆している。ただし、脱脂処理後の残渣には TAG がまだ残存しているようであり、今後の課題としては TAG の抽出率の向上が挙げられる。また、他の種類のコーヒー豆をいくつか試したが、上記に報告したスペクトルとほぼ同じ固体 NMR スペクトルが得られ、NMR スペクトルだけでは産地特有の信号は今の所見つけられていない。

世界で年間数百万トンが流通・消費されるコーヒーの抽出後の残渣は、飲料として人類が楽しむ限り、安定的な供給可能な非可食性バイオマスである。コーヒー豆中のTAGやセルロースなどの高度な利用を妨げている理由は、コーヒー豆中のそれらの構造情報が不十分なことが一つの原因であったと考えられ、本研究成果によりコーヒー残渣を利用する術に一つの道筋をつけた。また、横浜市や飲料企業などでこれまでにも固形燃料や肥料としての利用報告はあるものの、特にTAGは液体の燃料として利用可能なため、固形燃料よりも用途が格段に広がることが期待できる。一方で、大量のコーヒー残渣からTAGを抽出する必要があるため、大きな問題点としてコーヒー残渣の回収が難しい課題である。しかし、コーヒーは普段から我々の生活に深く入り込んでいることからも、コーヒー残渣を回収することに関して実は市民も社会も参加しやすいと考える。本研究成果を報告することによって、単にコーヒーからTAGの抽出方法の確立だけでなく、社会に対して「廃棄から循環へ」とエネルギー問題への意識をさらに高める相乗的な効果が期待できる。本研究の一部は日本農芸化学会の英文誌Bioscience, Biotechnology and Biochemistry誌に掲載されました。次の目標としてコーヒー残渣からセルロースナノファイバーを生成するべく現在研究を進行中である。

文献)

- 1) AGF® ホームページ
- 2) R. W. Jenkins, N. E. Stageman, C. M. Fortune, C. J. Chuck, Effect of the Type of Bean, Processing, and Geographical Location on the Biodiesel Produced from Waste Coffee Grounds. *Energy and Fuels* 2014, 28 (2), 1166–1174.
- 3) 広瀬幸雄, もっと知りたいコーヒー学 -工学屋が探求する焙煎・抽出・粉碎・鑑定etc.- 旭屋出版, (2007), p.19.
- 4) N. Kanai, N. Yoshihara, I. Kawamura Solid-state NMR characterization of triacylglycerol and polysaccharides in coffee beans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2019, 83 (5), 803-809.

謝辞) 本研究は横浜学術教育振興財団のH30年度研究助成によって支援されております。ここに深く感謝申し上げます。また、本研究には横浜国立大学 理工学部化学・生命系学科 化学教育プログラムの金井典子さんも共に研究を遂行し、多大な協力を頂きました。ここに感謝申し上げます。

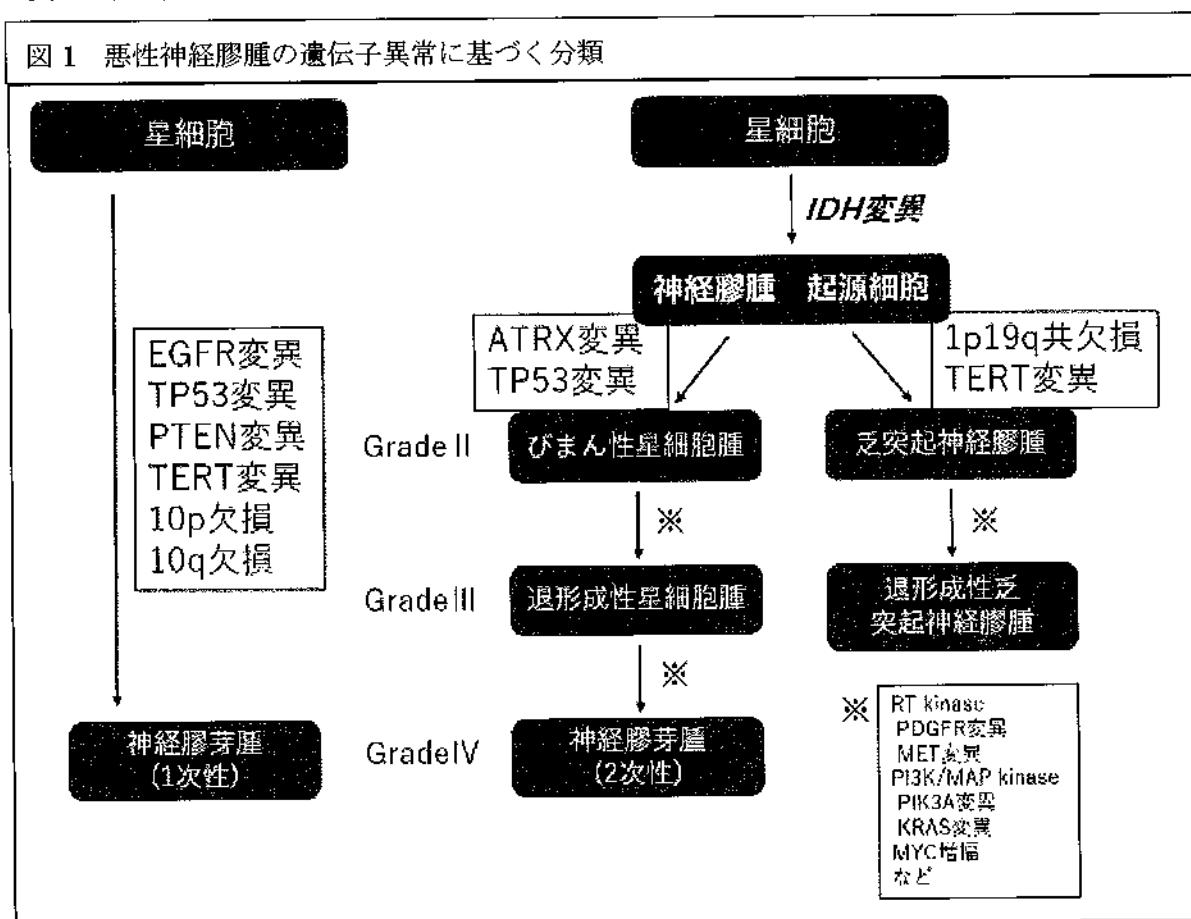
IDH1 変異が及ぼすアポトーシス制御機構の解明とアポトーシス誘導による独創的治療法の開発

横浜市立大学医学研究科 大学院博士課程 脳神経外科
三宅 茂太

【研究目的】

神経膠腫は原発性頭蓋内腫瘍の約20%を占め、その治療予後は手術の精度や放射線化学療法が発達したものの革新的な向上は得られておらず、特に神經膠芽腫は全悪性腫瘍の中で最悪の予後である。分子遺伝学の進歩により神經膠腫の予後を規定する遺伝子異常が近年明らかになりつつある。中でも*IDH1/2*変異は低悪性度神經膠腫の約9割に存在し、この変異を有する神經膠腫は比較的予後が良いことが判明している。*IDH1/2*変異は星細胞腫や乏突起神經膠腫の腫瘍発生初期における遺伝子変異であり、再発進展時にも遺伝子変異が維持される点で重要な遺伝子変異である。

図1 悪性神經膠腫の遺伝子異常に基づく分類



*IDH*変異により細胞内では代謝・酸化ストレス・DNA修復・エピゲノムなど様々な変化をもたらすことが明らかとなっている。このように腫瘍発生に大きく影響を及ぼし、かつ終始一貫して細胞内に認められることからも*IDH*変異は神經膠腫の治療標的として極めて重要である。最近の研究では変異型*IDH*の代謝産物である2-HGがアポトーシス関連タンパクを阻

害することでアポトーシスを誘導する可能性が示唆されていることからも、IDH1変異がアポトーシス制御機構に影響を及ぼしている可能性があると考えられる。今回我々は、IDH1変異のアポトーシス制御機構を明らかにすることで遺伝子変異特異的な治療を開発し、分子生物学的背景に基づくいわゆる”Precision Medicine”に寄与する事を目標とした。

【研究方法】

1. 変異型 IDH1阻害薬(IDH1i)による細胞活性の検討

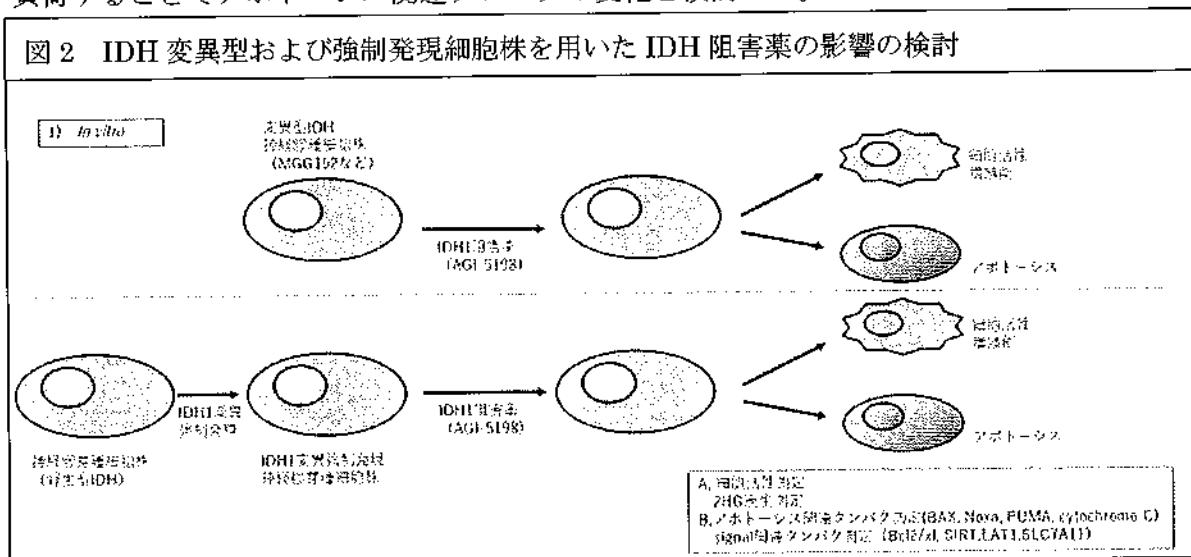
IDH1iによる細胞活性・増殖能の増加はこれまでの研究を通じて見いだされており、この背景にIDH1iによりアポトーシスが抑制される可能性が示唆されている。また、先行研究では2-HGがアポトーシス関連タンパクであるMcl-1活性を阻害することでBcl-2/x1を介したアポトーシスを制御する可能性が示唆されている。IDH1i投与によるアポトーシス調整がBcl-2/x1を介するのか、どのような経路で細胞活性が増加するかは不明である。

これらの疑問を解明するため、IDH1変異型神經膠腫細胞株であるMGG152を中心にIDH1i(AGI-5198)を投与し、細胞活性をCell Titer-Gloにより測定した。

2. IDH1iによるアポトーシス制御機構の検討

IDH変異型細胞株および変異型IDH強制発現細胞株に対し、IDH1iを投与し、western blot法を用いてアポトーシス関連タンパク質の変化やBcl12/x1発現を検討した。さらに、2-HGを負荷することでアポトーシス関連タンパクの変化を検討した。

図2 IDH変異型および強制発現細胞株を用いたIDH阻害薬の影響の検討



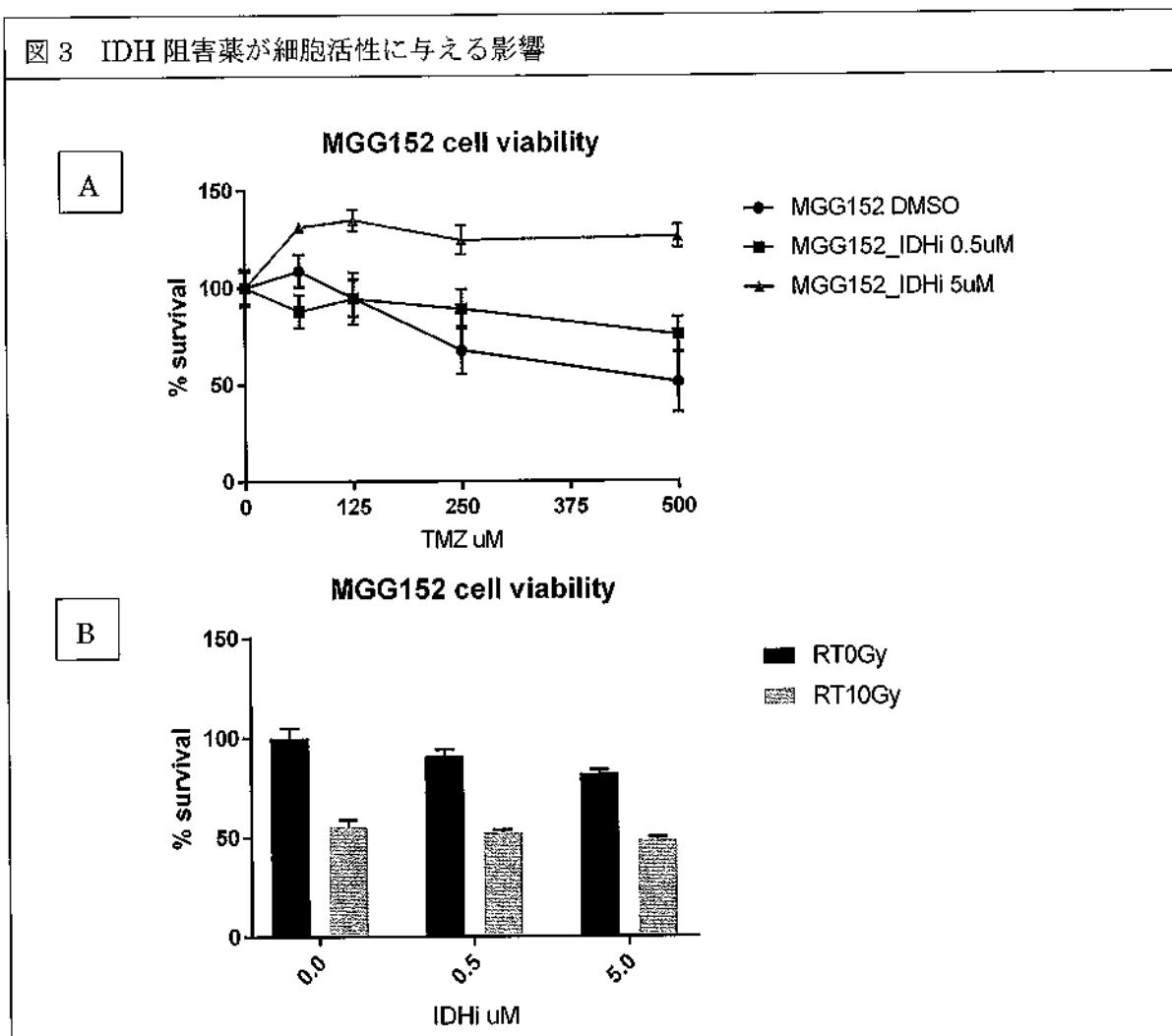
【結果】

-IDH阻害薬が細胞活性に与える影響

MGG152細胞株に対しAGI5198(IDH1)を0.5μM、5μM投与した細胞を用い、TMZ(抗がん剤：アルキル化剤)に対する細胞活性の変化を評価した。(図3.A) IDH1 5μM投与した群では有意にMGG152の細胞活性が維持され、TMZによる細胞毒性が相殺されていた。

一方、MGG152に対し放射線10Gyを照射する細胞実験においては、IDH1投与による細胞活性の維持は認められず、IDH1投与にもかかわらず放射線による細胞毒性を認めた。(図3.B)

図3 IDH 阻害薬が細胞活性に与える影響



-IDH阻害薬によるアポトーシスの制御機構

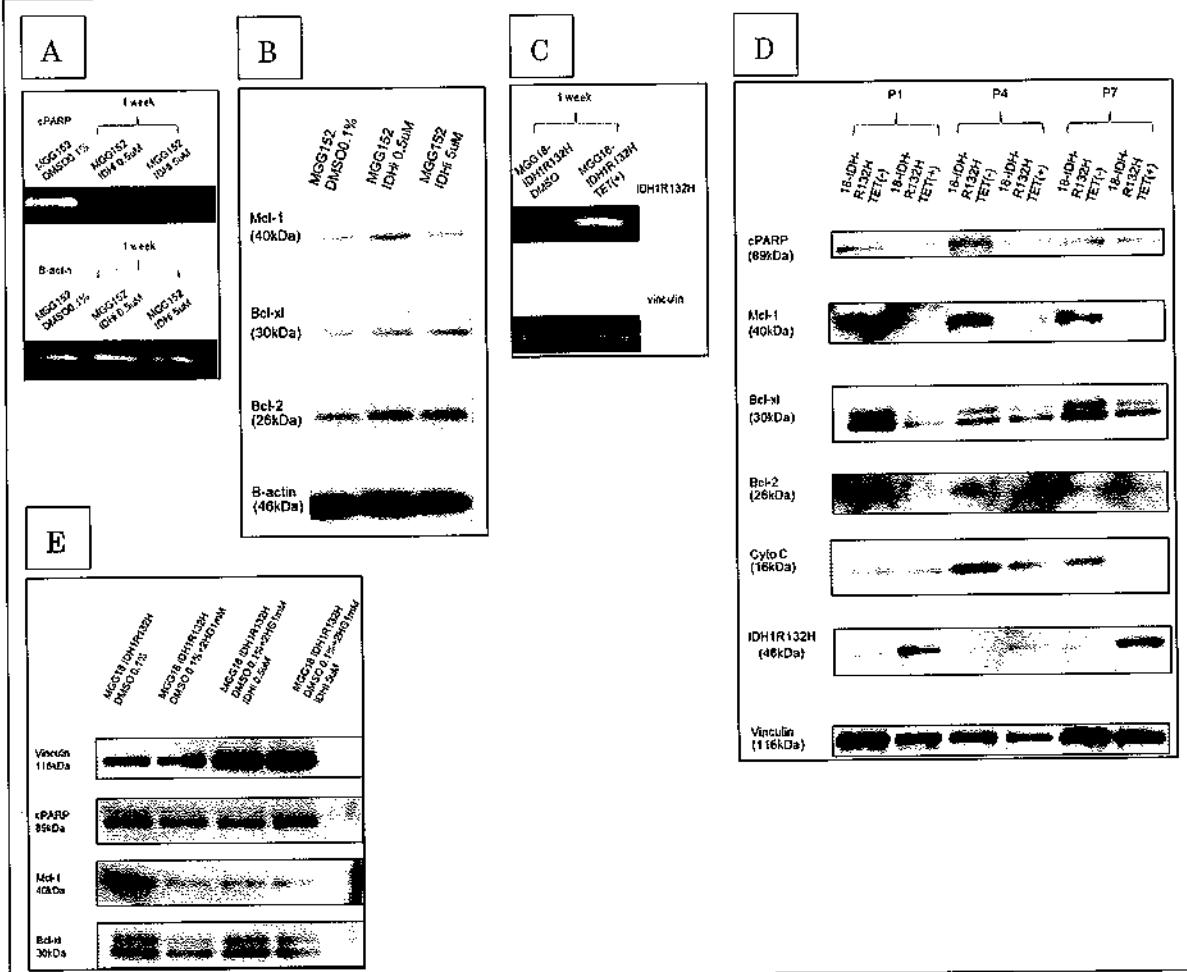
IDH変異型細胞株であるMGG152に対しAGI5198(IDH1i)を0.5 μM /5 μM で割り振り、1週間暴露した。DMSO投与を対照群とし、western blotでcPARPの発現が低下することを確認した。(図4. A)

続いて、MGG152に対するAGI5198の抗アポトーシス効果の背景を解析するため、ミトコンドリア膜上の抗アポトーシスタンパク質であるMcl-1, Bcl-2, Bcl-xlを検討した。Western blotによるタンパク質発現解析では、AGI-5198投与によりMcl-1およびBcl-2の発現が増加することを見いだした。(図4. B)

次に、MGG18(IDH野生型細胞株)に遺伝子導入した変異型IDH強制発現細胞を用いた検討を行なった。(図4. C)まず、テトラサイクリンを用いてIDH1R132Hが強制発現されることを確認した。続いて、MGG152と同様にMGG18で変異型IDH1強制発現により抗アポトーシスタンパク質の変化を解析した。(図4. D)

MGG18では変異型IDHの発現によるBcl-2の変化は一定しなかったが、変異型IDH1強制発現によりMcl-1の発現抑制を来すことが示された。同様に、MGG18に2HGを投与することでMcl-1の発現低下が誘導されることを確認した。一方、2HG投与によるMcl-1発現低下はAGI-5198(IDH1i)投与によってはreverseされなかった。(図4. E)

図4 IDH阻害薬によるアポトーシスの制御機構



【成果・考察】

本研究により、患者由来の細胞株を用いた実験を確立し、変異型IDH強制発現細胞株が細胞実験に有用であることを示した。その上で、IDH阻害薬が抗アポトーシス効果を示す可能性が示唆された。一方、IDH阻害薬の抗アポトーシス効果はTMZには認めるものの放射線に対する認められなかつた。それぞれの治療によりアポトーシスのメカニズムが関連している可能性があると考えられた。

すなわち、抗アポトーシスタンパク質の解析で示されたように、変異型IDHまたは代謝産物である2HGはMcl-1発現を抑制する。これに対し、IDH阻害薬はMGG152においてMcl-1およびBcl-2の発現増加をもたらした。TMZによるアポトーシスはこれらの抗アポトーシスタンパク質を介して阻害されるが、放射線によるアポトーシスはこれらのミトコンドリア膜上抗アポトーシスタンパク質を介さない可能性がある。

今後、IDH変異型神経膠腫に対する放射線治療の効果やその生物学的メカニズムを解明することで、この差異を説明することが可能になる可能性がある。今後も、IDH変異型神経膠腫に対する特異的治療の開発やそのメカニズムの解明のため研究を継続する。

腎がんから家族を守る

：AYA 世代から始めるポストゲノム診療

横浜市立大学医学研究科分子病理 准教授
古屋 充子

(研究目的)

がん遺伝子検査は近年急速に医療に浸透し、一部が保険収載され一般市民の手に届くものになってきました。未発症段階に保因者診断が可能かつ浸透率の高い家族性腫瘍では、発症前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、個人遺伝子情報は慎重に管理されねばならず、AYA世代と呼ばれる若い成人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、各疾患に精通した専門の医療チーム対応が求められます。

私どもは21世紀に診断概念が普及したバート・ホッグ・デュベ (Birt-Hogg-Dubé [BHD]) 症候群と呼ばれる家族性がんの診療拠点を横浜市立大学附属病院に、また診療ウェブサイト “BHDネット” (<http://www.bhd-net.jp/>) をそれぞれ開設し、希少家族性がんの包括診療・研究組織として全国の医療機関からの診断・診療依頼に対応してきました。この活動は次第に発展し、Xp11転座腎癌や遺伝性平滑筋腫症-腎細胞癌症候群 (HLRCC) などのAYA世代発症型腎がん情報が集約されるようになりました。AYA世代の腎癌死は未発症段階から適切な診療を受けていれば早期発見可能です。本研究目的は、国際的にもトップクラスの希少腎がん診断とそれらの集積情報に基づく病態解明・予防・治療戦略の確立です。

(研究方法)

- I) BHD 症候群を背景とする腎がんは AYA 世代から発症し、罹患者の半数以上が多発性で生涯フォローを必要とし、また浸透率が高く、近親者ケアや教育が欠かせません。私どもは世界トップクラスの診療・疫学・研究データを蓄積し、国際誌にも論文発表してきましたが、引き続き診療・研究体制を強化し、次世代の患者家族が安心して暮らすことを目指に保険収載を目指して先進医療を横浜市大附属病院で行います。鑑別診断に有用な疫学情報や遺伝子診断・診療ガイドライン確立、医療関係者や患者家族のニーズに応えるため、執筆や講演活動などを進める予定です。また年1回開催する患者交流会も並行して継続します。
- II) Xp11 転座腎がんは AYA 世代の腎がんの中で最も多く、予後不良例が含まれます。X染色体上の TFE3 がいくつかの分子とキメラ蛋白を形成しうることが知られていますが、融合分子が 10 以上あり確定診断が難しく、一般病院では診断できません。白血病や肺がんではキメラ蛋白を標的とした治療薬が開発されてきましたが、転座腎がんは希少で診断困難なため、まず疑い例の診断依頼に対応する診療拠点体制を創設します。正確な診断治療情報に基づいて治療標的につながるシグナル制御分子の研究を加速させます。

III) 遺伝性平滑筋腫症-腎細胞癌症候群(HLRCC)はまだ日本で殆ど報告のない AYA 世代の高悪性度腎がんですが、医療関係者の多くが本疾患が知られていないこともあり、正しく診断されていないと考えられ実態が不明です。私どもは先ず神奈川県内の医療機関と協力して疑い例を検討し、病態解析を進めています。今後正確な疫学情報を作成し、迅速に公開する予定です。

(成 果)

I) BHD 症候群

- (ア) 2019 年 3 月から全国に先駆けて先進医療「BHD 症候群の遺伝子検査」を横浜市大附属病院で開始しました。今後新規 200 家系の診療情報を蓄積する予定です。
- (イ) 2019 年 5 月 9 日の日本病理学会総会においてコンパニオンミーティング「臓器横断的病理診断から読み解くがん関連症候群」を主催しました。基調講演として「がんゲノム医療時代の遺伝性腫瘍診療」を中島健先生(がん研究会有明病院)、各疾患として「SDH 遺伝子関連腫瘍を」辻隆裕生先生(市立札幌病院)、「BHD 症候群の生検」を都地友紘先生(岡山大学病院)、「家族性甲状腺癌」を近藤哲夫先生(山梨大学)にご講演いただきました。
- (ウ) 2018 年 7 月 20 日、崎陽軒本店会議室にて第 4 回 BHD 交流会を開催しました。順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座の樋野興夫先生に「遺伝病も単なる個性である社会構築に向けて」というタイトルでご講演いただきました。また全国からお集まりいただきいた 30 家系の患者さんご家族と BHD ネットスタッフらが交流しました。
- (エ) 病理組織診断に役立つ総説を国内外誌に発表しました(業績参照)。

II) Xp11 転座腎がん

- (ア) 2019 年 5 月 10 日の日本病理学会総会において日本泌尿器病理研究会主催のコンパニオンミーティング「希少組織型を含む腎癌新規組織型診断のために」において「転座型腎細胞癌」を発表しました。
- (イ) 2018 年 9 月 28 日の日本癌学会総会において全国医療機関と協力して本邦の Xp11 転座腎がん 20 症例の臨床病理学的検討結果を発表しました。
- (ウ) TFE3 の新規融合分子として EWSR1-TFE3 転座腎がんを国際誌に報告しました。EWSR1 は Ewing 肉腫において FLI-1 と融合することが知られていましたが、腎がんにおいて TFE3 と融合することは報告がなく、腎がんの治療戦略にも影響を与える成果です。
- (エ) X 染色体上で腕内逆位によって TFE3 と融合する RBM10-TFE3 腎がん 10 例の臨床病理学的検討成果を国際誌に発表しました。RBM10-TFE3 腎がんはそれまで世界中で 9 例しか報告がなく、病態については殆ど不明でした。今回 10 例中 6 例が慢性腎不全を背景に発症したことは今後透析関連腎癌の分野にも影響を及ぼす可能性が予想されます。
- (オ) 熊本大学の馬場理也先生らが作成した転座腎がんモデル動物研究において病理学的検討を担当し、成果を国際誌に発表しました(業績参照)。

III) 遺伝性平滑筋腫症-腎細胞癌症候群(HLRCC)

- (ア) 2019年5月10日の日本病理学会総会において本邦における10家系のHLRCCに関する最新情報を報告しました。全て異なる胚細胞変異を呈し、これまでの報告と合わせても、本邦には少なくとも15以上の創始者がいることが明らかになりました。更に家族性発症が少なく、問診情報からは遺伝性が分かりにくいと示唆されます。
- (イ) 関西医科大学と共同で皮膚腫瘍の病態を国際誌に報告しました(業績参照)。欧米人患者では80%以上に皮膚症状がでる一方、これまで集積した日本人25名中皮膚症状があったのは5名にとどまり、症状も軽い傾向がみられました。頻度が低い原因を今後更に検討する必要があります。
- (ウ) 本邦10家系の臨床病理学的検討成果を国際誌へ発表準備中です。

(考察)

腎がん研究に携わる国内外の研究者や全国医療機関との協力が進むにつれ、社会的にはあまり知られていない希少腎がんによってAYA世代で死亡あるいは透析導入になる患者数は把握できただけでも100名以上で、保険診療外の高度診断技術が必要なため殆どの場合は治療を受けている医療機関では正確に診断できない実態が把握できました。HLRCCでは数例ながら免疫チェックポイント阻害薬や集学的外科治療が奏功する患者さんがいるという手掛かりが得られ、未発症段階から適切な検診を受けられる診療への導線を作ることを視野に今後も研究を続けていきます。

貴財団に支援いただき、横浜市大附属病院で診療を受ける希少腎がんの患者さん家族の数は今後更に増加することが予想され、医療福祉面でも多くの課題があります。研究と診療体制を充実させ、より多くの成果を一日も早く患者さん家族に還元していきたいと思います。

(関連業績)

1. Kato I, Furuya M, Baba M, Kameda Y, Yasuda M, Nishimoto K, Oyama M, Yamasaki T, Ogawa O, Niino H, Nakaigawa N, Yano Y, Sakamoto K, Urata Y, Mikami K, Yamasaki S, Tanaka R, Takagi T, Kondo T, Nagashima Y. RBM10-TFE3 Renal Cell Carcinoma Characterized by Paracentric Inversion with Consistent Closely Split Signals in Break-apart Fluorescence *in situ* Hybridization: Study of Ten Cases and a Literature Review. *Histopathology* 2019, in press.
2. Baba M, Furuya M, Motoshima T, Lang M, Funasaki S, Ma W, Sun HW, Hasumi H, Huang Y, Kato I, Kadomatsu T, Satou T, Morris N, Karim B, Ileva L, Kalen J, Hasumi Y, Nakamura E, Sugiyama A, Kurahashi R, Nishimoto K, Oyama M, Nagashima Y, Kuroda N, Araki K, Eto M, Yao M, Kamba T, Suda T, Oike Y, SchmidtL, Linehan WM. TFE3 Xp11.2 translocation renal cell carcinoma mouse model reveals novel therapeutic targets and identifies GPNMB as a diagnostic marker for human disease. *Mol Cancer Res* 2019, in press.
3. Hasumi H, Furuya M, Tatsuno K, Yamamoto S, Baba M, Hasumi Y, Isono Y, Suzuki K, Jikuya R, Otake S, Muraoka K, Osaka K, Hayashi N, Makiyama K, Miyoshi Y, Kondo K, Nakaigawa N, Kawahara T, Izumi K, Teranishi J, Yumura Y, Uemura H, Nagashima Y, Metwalli AR,

Schmidt LS, Aburatani H, Linehan WM, Yao M. BHD-associated kidney cancer exhibits unique molecular characteristics and a wide variety of variants in chromatin remodeling genes. *Hum Mol Genet* 27:2712-2724, 2018

4. Matsuda T, Kambe N, Nhung TMY, Hatakeyama UI, Yamazaki S, Ohe C, Yoshida K, Kinoshita H, Furuya M, Okamoto H. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome in which skin biopsy enabled diagnosis. *J Dermatol* 2019, in press.
5. Fukuda H, Kato I, Furuya M, Tanaka R, Takagi T, Kondo T, Nagashima Y. Novel Partner of TFE3 in the Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma: Clinicopathological Analyses and Detection of EWSR1-TFE3 Fusion. *Virchows Archiv* 474:389-393, 2019
6. Noguchi G, Furuya M, Okubo Y, Nagashima Y, Kato I, Matsumoto K, Tanaka R, Hisasue S, Yao M, Kishida T. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer without cutaneous manifestations in two Japanese siblings. *Int J Urol* 25:832-835, 2018
7. Furuya M, Nakatani Y. Pathology of Birt-Hogg-Dubé Syndrome; A Special Reference of Pulmonary Manifestations in a Japanese Population with a Comprehensive Analysis and Review. *Pathol Int* 69:1-12, 2019
8. Furuya M, Kobayashi H, Baba M, Ito T, Tanaka R, Nakatani Y. Splice-site Mutation Causing Partial Retention of Intron in the FLCN Gene in Birt-Hogg-Dubé Syndrome: A Case Report. *BMC Med Genomics* 11:42, 2018
9. 古屋充子, 遺伝性腫瘍診療への病理医の関わり：パート・ホッグ・デュベ症候群診療情報ネット、「病理と臨床」 2019. in press
10. 古屋充子, パート・ホッグ・デュベ症候群診療情報ネット、「家族性腫瘍」 2019, in press

フェンタニル貼付剤皮膚移行のカギを握る分子は何か 皮膚組織における膜輸送体 P-glycoprotein (P-gp) の BMI にともなう発現変動の解析

横浜市立大学大学院医学研究科・講師
横原 弘子

(研究目的)

本研究は、経皮吸収型製剤であるフェンタニル貼付剤のBMIによる皮膚移行の変動に関して、フェンタニルを基質とする膜輸送体P-glycoprotein (P-gp) に着目し、ヒト皮膚組織を使用して解析することを目的とした。

フェンタニル貼付剤の皮膚移行に関しては、がん性の悪液質による低体重患者で血中移行が低下すること(Heiskanen *et al.*, 2009)、体脂肪量と皮膚への移行率が相關することなどが報告されているものの(Chiba *et al.*, 2010)、そのメカニズムは不明である。一方で、皮膚組織中にはフェンタニルを基質とする代謝酵素cytochrome P450 (CYP) 3A4および膜輸送体P-gpが発現しており、薬物の経皮吸収に寄与することも明らかになりつつある(Gonzalez *et al.*, 2001, Baron *et al.*, 2001, Ito *et al.*, 2008)。これらの分子は環境や病態などの要因で発現が変動することが知られており、なかでも炎症性サイトカインはこれらの発現をともに抑制する(Pascussi *et al.*, 2000)。つまり、慢性的な炎症状態にある肥満者の皮膚においても、フェンタニル貼付剤の血中移行を左右している可能性が高い。本研究では、P-gpの発現変動に着目し、ヒト皮膚組織を使用して解析することによって、フェンタニル貼付剤のより効果的な使用に向けた知見を得る。

(研究方法)

A病院にて乳房再建術を受けた日本人女性患者を対象とし、手術により生じた腹部の余剰皮膚組織を解析に使用した。対象者には研究の目的および方法を紙面と口頭で説明し、書面で同意を得た。糖尿病、皮膚疾患、感染症に罹患しているものは除外とした。肥満の指標には、手術時のBMI (kg/m^2) を用いた。本研究は横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会の承認(A170928016)のもと実施した。

1. 免疫組織染色

ホルマリン固定し、パラフィン包埋ブロックで保存した皮膚組織を、 $5\mu\text{m}$ の厚さで薄切り、免疫組織染色に使用した。脱パラフィン処理後、クエン酸ナトリウム(0.1mol/L, pH6.0)に浸漬し、高圧蒸気滅菌器(TOMY LSX-500)を用いて121°C、20分で抗原の賦活化処理を実施した。その後、5% skim milk 含有TBST溶液を用いて室温で1時間ブロッキング後、フェンタニルの薬物トランスポーターP-gpを認識する1次抗体(Anti-P Glycoprotein, Mouse-Mono(C219) GTX23364, Gean Tex, USA, 1:50)および、血管内皮細胞のマーカーであるCD31を認識する1次抗体(Anti-CD31 antibody EPR3094 AB76533, Abcam, USA, 1:1000)を4°Cで一晩反応させた。その後、蛍光二次抗体(Alexa FluorTM488 goat

anti-rabbit IgG, 1:1000, Alexa FluorTM594 goat anti-mouse IgG, 1:1000, invitrogen, USA)を37°Cで2時間反応させ、蛍光発色させた。核染色には4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(1:1000, 同仁化学研究所, 日本)を用いた。

2. 画像解析

各検体1切片ずつ染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡(Olympus FV1000, 日本)を使用して観察を実施した。その後、真皮層においてCD31で染色された血管部位の蛍光イメージを1切片につき乳頭層3ヶ所、網状層3ヶ所の計6ヶ所取得した。取得したイメージはImageJ(NIH, Maryland, USA)を用いて各蛍光イメージにつき2点のCD31陽性部位におけるP-gpの蛍光輝度を定量し、乳頭層、網状層それぞれのP-gpのタンパク発現量として数値化した。

3. 統計学的解析

統計解析には統計ソフトIBM SPSS Statisticsを用いた。P-gp発現量とBMIの相関関係は、Shapiro-Wilkの等分散検定を行った後、正規分布のデータ群ではPearsonの相関係数、非正規分布のデータ群ではSpearmanの順位相関係数を用いて解析した。統計学的有意水準をp<0.05とした。

(結果)

1. 対象者の基本属性

本研究で解析を実施した対象者(16名)の基本属性を表1に示した。対象者の年齢は51.9±6.0歳であった。

表1 対象者の基本属性 N=16	
属性	平均±SD, n (%)
BMI (kg/m ²)	24.19±4.62
年齢(year)	51.86±6.02
乳房再建時期1期	2(12.5)
乳房再建時期2期	13(81.3)
乳房再建時期不明	1(6.25)
化学療法	11(68.8)
ホルモン療法	12(75)
放射線療法	5(31.3)

2. 免疫組織染色結果

図1に真皮の蛍光免疫組織画像を示した。真皮乳頭層において、表皮に対して垂直方向の血管走行が、また真皮網状層においては、表皮に対して平行方向の血管走行が確認された。今回の対象者16名の染色画像からは、BMIによる真皮血管の量的変動は観察されなかつた。また、P-gpの発現は真皮層における血管内皮細胞部位に観察された。

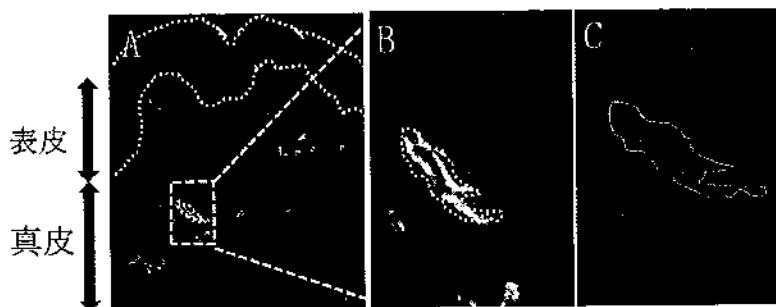


図1. 蛍光免疫組織像
 Green : 血管内皮細胞マーカー (CD31)
 Gray : P-gp
 Blue : DAPI (核)

3. P-gpタンパク発現量の定量解析

ImageJを用いて、CD31陽性部位におけるP-gpの蛍光輝度を定量し、乳頭層、網状層それぞれにおけるP-gpのタンパク発現量として数値化した。

乳頭層において、P-gpタンパク発現量とBMIとの間に有意な相関関係は認められなかつたが($r=-0.098, p=0.718$)、U字型の変動を示した。次に、日本人の体格の標準値であるBMI22をカットオフとして相関関係を解析した結果、 $BMI < 22$ で有意な強い負の相関関係が認められた($r=-0.886, p=0.045$)。網状層におけるP-gpタンパク発現量は乳頭層と同様にBMIとの間に有意な相関関係は認められなかつたが($\rho=-0.05, p=0.854$)、U字型の変動を示した。BMI22をカットオフとして解析した結果では、 $BMI \geq 22$ では中等度の正の相関関係が示唆されたが($r=0.581, p=0.061$)、統計的有意性は認められなかつた。

乳頭層、網状層ともにP-gpタンパク発現量と年齢に有意な相関関係は認められなかつた(乳頭層： $r=0.313, p=0.238$ 、網状層： $\rho=0.129, p=0.635$)。

(成果・考察)

皮膚には複数の薬物トランスポーターが発現しており(Li *et al.*, 2006)、その中でP-gpは薬物の経皮吸収への寄与が*in vivo*で示されている。P-gp遺伝子欠損マウスでは、貼付剤から皮膚組織への基質薬物の透過が促進することが報告されている(Ito *et al.*, 2008)。P-gpと薬物トランスポーターbreast cancer resistance protein (BCRP)の、両遺伝子欠損マウスでは、経皮投与したP-gp基質の血漿中濃度が、野生型と比較して有意に低下することが示されている(Hashimoto *et al.*, 2013)。これらのこととは、P-gpは皮膚では表皮から真皮および血中へと薬物の吸収方向に寄与することを示しており、P-gp発現量の増減が経皮吸収の重要な予測因子のひとつと考えることができる。

本研究では日本人女性の腹部皮膚組織を用いて、フェンタニルの輸送に関する膜輸送体として血管内皮細胞部位におけるP-gpの発現変動を解析した。その結果、真皮の乳頭層および網状層において、血管内皮細胞のP-gpタンパク発現量とBMIとの関係はともにU字型を示し、P-gpの発現量はBMIに伴い変動する可能性が示唆された。次に、日本人における疾患罹患率とBMIの関係を解析した報告で一番リスクが低いとされており(Matsuzawa *et al.*, 1990)、標準体重の算出にも用いられているBMI22をカットオフ値として解析した結

果では、乳頭層のBMI < 22 の範囲において有意な負の相関が認められた。真皮における薬物吸収は乳頭層を中心に行われていることを(鶴田, 1986)考慮すると、乳頭層におけるP-gpの発現量の増加は、基質薬物の経皮吸収促進に作用し、薬物有害作用の出現リスクの上昇にもつながり得る。

がん患者では病期の進行に伴い、栄養状態が悪化することから低体重となることが認められている(濱口ら, 2015)。がん患者を対象としたフェンタニル貼付剤に関する先行研究では、BMIとフェンタニルの皮膚移行速度割合との間には負の相関関係が報告されている(山本ら, 2008)。

本研究で真皮における血管数を観察した結果からは、BMIの変動による血管の量的变化は認められなかった。ゆえに、BMI < 22 の対象において乳頭層のP-gpの発現量がBMIと逆相関関係であった本研究の結果は、P-gpの発現増加がフェンタニルの皮膚移行に影響する一因と考えられる。一方で、Chibaらはがん患者を対象に体脂肪量とフェンタニルの輸送効率の関係を解析し、正の相関関係が認められたことを報告している(Chiba *et al.*, 2010)。身長と体重で算出されるBMIは、必ずしも体脂肪を反映しているわけではない。またフェンタニルなどの脂溶性薬物の体内動態に関しては、脂肪組織への薬物の蓄積についても考慮する必要がある。そのため、今後は肥満の指標についても検討していく必要がある。

本研究における研究の限界としては、乳房再建術の余剰皮膚を解析に使用したため、解析対象が女性の腹部に限定されていることである。肝臓におけるP-gp発現量は男性が女性に比べて約2倍であることが先行研究より明らかになっている(Schwartz *et al.*, 2004)。そのため、性差や皮膚部位の違いにも考慮して検証を実施する必要性がある。また本研究における対象者は16名と少数であり、BMIの範囲が 24.19 ± 4.62 で、軽度な肥満のみが含まれた解析であった。P-gpの発現変動が、乳頭層と網状層で類似していた点を考慮すると、乳頭層においてもBMI ≥ 22 でBMIの増加に伴いP-gpの発現が増加するのか、今後は対象者の人数や肥満の程度を広げて詳細に解析する必要がある。

(結論)

本研究の結果から、真皮におけるP-gpタンパク発現量とBMIとの間には乳頭層、網状層とともにU字型の関係性が示唆された。さらにBMI22でカットオフすることで、乳頭層のBMI < 22において強い負の相関関係が示され、網状層のBMI ≥ 22 において中等度の正の相関関係が示唆された。真皮におけるP-gpタンパク発現量のBMIに伴う変動は、薬剤の効果や薬物有害作用を予測するエビデンスの1つとなり得る。がん性疼痛や非がん性慢性疼痛に適用されるフェンタニル貼付剤の使用において、P-gpタンパク発現量の変動を起因とした血中移行の影響について、詳細な解析の必要性が示された。

肥満が皮膚の知覚にもたらす影響 —皮膚内神経線維に着目した疼痛閾値の解析—

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻看護生命科学分野
博士前期課程2年 堀井 麻里子

(研究目的)

疼痛管理は看護師の重要な役割の一つであり、疼痛閾値の変化に影響を与える因子の特定は重要な課題である。近年、疼痛閾値に影響を与える因子として肥満が報告されている。しかし、肥満と疼痛閾値の関連を報告した先行研究では低下と増加の両方が報告されており、現在一致した見解は得られていない。その理由として、先行研究では主観的疼痛閾値を解析しており、感情や経験による影響を受けていると考えた。そのため、本研究では疼痛を受容・伝達する機構に着目し、ヒトの皮膚で疼痛閾値に影響を与える因子である表皮内神経線維密度、侵害刺激受容体TRPチャネル、神経ペプチドの3つの測定を実施した。表皮内神経線維密度は、皮膚の刺激に対する感受性の増減と関連していることが報告されており、疼痛閾値の増減の評価の一つとして用いた。また、神経線維密度を制御する機構として、軸索ガイダンス因子である神経線維の伸長を促すNGFと神経線維の退縮を担うSEMA3Aを解析した。TRPチャネルは、皮膚で刺激を感じる神経線維の自由神経終末における侵害刺激受容体で、その発現量の変化が疼痛閾値の変化につながることが報告されている。神経ペプチドCGRP・SPは、刺激により神経線維から放出され炎症を惹起し疼痛閾値の低下を引き起こす分子である。本研究では、上記の3つを解析し疼痛閾値の変化の基礎的検討を実施することとした。本研究により肥満者の疼痛閾値の変化をメカニズムレベルで明らかにすることで、疼痛が生じる種類や原因に合わせた疼痛管理を可能にするための重要な知見につながると考えた。

(研究方法)

- ①対象者：A病院にて腹直筋皮弁法による乳房再建術を実施した女性患者74名を対象とした。手術時のBMI (kg/m^2) を算出し、日本肥満学会の定義に基づき、 $\text{BMI} < 25$ を非肥満群 (59名)、 $\text{BMI} \geq 25$ を肥満群 (15名) とした。
- ②分子生物学的解析：皮膚組織よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、RT-qPCR法によってNGFおよびSEMA3A、CGRPおよびSP、TRPチャネル (*TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3*, *TRPV4*) のmRNA発現量を定量した。内部標準として*ACTB*で補正した。
- ③組織学的解析：研究対象者の中から、非肥満群15名、肥満群7名を選定し組織学的解析を実施した。1検体あたり20 μm 以上の間隔をあけた非連続の3枚の切片を解析に用いた。抗PGP9.5抗体で可視化された表皮内の神経線維を定量し、計測した表皮範囲の長さで除することで、密度を算出した。3切片から得られた神経線維密度の平均値を算出し、検体ごとの神経線維密度とした。
- ④統計解析：統計ソフト SPSS version 24.0 (IBM, NY, USA) を用いた。非肥満群、肥満群の2群間の群間比較には、Studentのt検定もしくはMann-Whitney U検定および χ^2 検定を行った。神経線維密度と各遺伝子に対するBMIの相関関係には、Spearmanの順位相関係数を用いて解析した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

⑤倫理的配慮： 本研究は、ヘルシンキ宣言に基づき、横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会の承認（A170928016）を得て実施した。

（結 果）

1. 対象者の基本属性

研究対象者は74名（非肥満群59名、肥満群15名）であり、年齢は 50.9 ± 4.9 歳、BMIは 23.1 ± 2.9 (kg/m^2)（非肥満群： 22.0 ± 1.7 (kg/m^2)、肥満群： 27.5 ± 2.4 (kg/m^2)）であった。

2. 表皮内神経線維密度の解析

2-1. 軸索ガイダンス因子の分子生物学的解析

NGF の発現量は BMI との間に有意な弱い負の相関関係を示した（Spearman's $\rho = -0.28$, $p=0.02$ ）(図 1)。一方、神経の退縮を担う *SEMA3A* の発現量は BMI との間に相関関係は示さなかった（Spearman's $\rho = 0.03$, $p=0.83$ ）(図 2)。また、非肥満群と肥満群の 2 群間で比較した結果、それぞれ有意な差は認められなかった ($p=0.26$; $p=0.76$)。

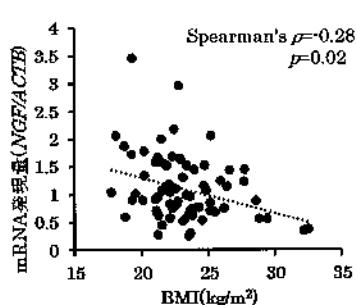


図 1. *NGF* と BMI との相関 (N=74)

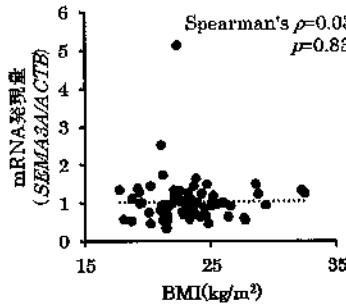


図 2. *SEMA3A* と BMI との相関 (N=74)

2-2. 表皮内神経線維密度の組織学的解析

表皮内神経線維密度は BMI との間に有意な相関関係は示さなかった（Spearman's $\rho = -0.23$, $p=0.30$ ）(図3)。非肥満群と肥満群による2群間比較では、非肥満群は 3.3 ± 4.9 (数/mm)、肥満群は 1.6 ± 1.2 (数/mm) であり有意な差は認められなかった ($p=0.38$) (図4)。

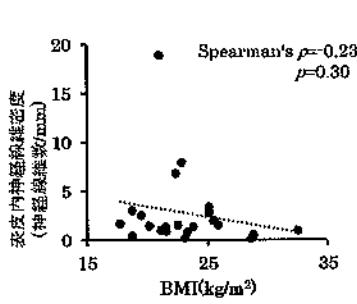


図 3. 表皮内神経線維密度と BMI の相関 (n=22)

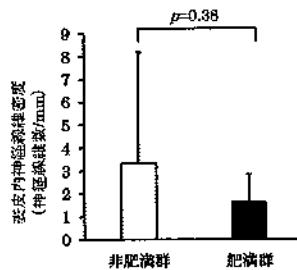


図 4. 表皮内神経線維密度の 2 群間比較
(非肥満群 n=15 肥満群 n=7)

3. 神経ペプチドの解析

CGRP、*SP*ともに BMI との間に有意な相関関係は示さなかった（Spearman's $\rho = -0.19$, $p=0.11$; Spearman's $\rho = -0.13$, $p=0.29$ ）、非肥満群と肥満群による2群間比較では、肥満群に

においてともに低下傾向を示した ($p=0.11$; $p=0.06$) (図5, 6)。

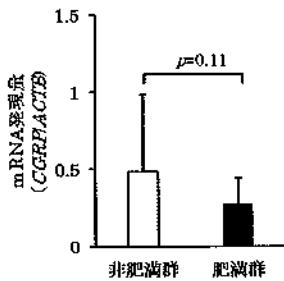


図5. *CGRP* の 2 群間比較
(非肥満群 n=59 肥満群 n=15)

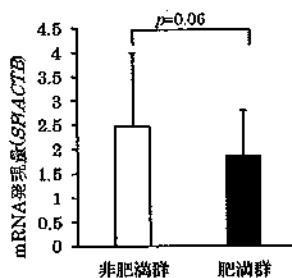


図6. *SP* の 2 群間比較
(非肥満群 n=59 肥満群 n=15)

4. 侵害刺激受容体の分子生物学的解析

*TRPV2*とBMIとの間には有意な弱い正の相関関係が示された (Spearman's $\rho = 0.29$, $p=0.01$) (図7)。非肥満群と肥満群による2群間比較では、2群間に有意な差は認められなかった ($p=0.10$) (図8)。

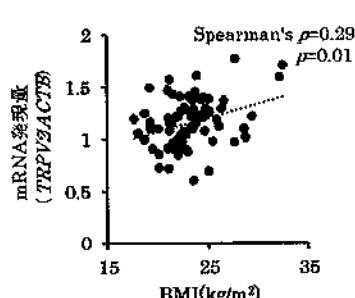


図7. *TRPV2* と BMI との相関 (N=74)

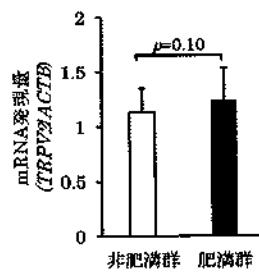


図8. *TRPV2* の 2 群間比較
(非肥満群 n=59 肥満群 n=15)

(成果・考察)

本研究は、ヒトの皮膚組織を使用し肥満が皮膚の疼痛閾値の変化にもたらす影響を、表皮内神経線維密度、神経ペプチド、侵害刺激受容体に着目して基礎的に検討を行った。

本研究ではまず、肥満による疼痛閾値の変化の要因として、皮膚の表皮内神経線維密度とそれを制御する軸索ガイダンス因子 *NGF* と *SEMA3A* の解析を実施した。本研究の結果、BMI と *NGF* には有意な弱い負の相関関係が認められ、2 群間による比較では有意な差は認められなかった。そのため、*NGF* は BMI の増加に伴い徐々に減少することが示唆された。また、*SEMA3A* の mRNA 発現量には BMI に伴う変動が起きていないことが示された。表皮内神経線維密度においては BMI に伴う変動は認められなかった。この結果から、表皮内神経線維密度の変動に伴う疼痛閾値の変化は生じていないことが示唆された。しかし、*NGF* は神経線維の伸長を促すとともに、疼痛を惹起する因子でもあり (Hefti *et al.*, 2006)、*NGF* の発現減少を介した疼痛閾値の増加も示唆された。

CGRP や *SP* といった神経ペプチドは、外部からの刺激を受けた神経線維から放出されることで (軸索反射)、末梢感作を引き起こし、疼痛閾値を低下させる。本研究の結果、*CGRP* と *SP* の mRNA 発現量には BMI に伴う変動はなく、2 群間による比較において肥満群で低下傾向であることが示された。そのため、BMI25 を境に軸索反射の働きが減弱し、疼痛の末

梢感作が減少する可能性が示唆された。

侵害刺激受容体の発現変化は疼痛閾値を変化させるという報告があることから（濱上ら, 2017）、本研究では TRP チャネルの発現量の解析を実施した。その結果、皮膚組織では BMI と侵害刺激受容体 *TRPV2* の発現量にのみ有意な弱い正の相関関係が認められ、BMI の増加に伴い機械刺激への疼痛閾値が特異的に低下している可能性が考えられた。先行研究では術後の創部痛と BMI には有意な正の相関があるという報告があり（Torres *et al.*, 2015）、本研究で示された *TRPV2* の発現量の増加が要因の一つとなっている可能性がある。

本研究の結果、日本人女性の腹部皮膚組織では BMI と侵害刺激受容体 *TRPV2* の発現量には有意な弱い正の相関関係が示され、機械刺激への疼痛閾値が低下していることが予測された。過剰な疼痛は、身体的・精神的な悪影響を与えることが報告されている（日本麻酔学会、2016）。また、乳がん患者における術後創部遷延痛が生じるリスクは、肥満者で高くなることが報告されており（Helmond *et al.*, 2017）、術中術後などの肥満者への疼痛管理において、疼痛閾値の変化を考慮する必要がある。本研究で得られた基礎的知見を基に今後さらなる研究を積み重ねることで、肥満者の個別性に合わせた疼痛アセスメントや、疼痛の種類や原因に応じた薬剤選択などの提案が可能になる。

今後の課題として、本研究は日本人女性（平均年齢 50.9 歳）を対象として解析を実施した結果である。今後は性別・年齢などの影響も考慮し、研究対象者の範囲を広げた解析も必要と考える。また、本研究で示した結果は、皮膚局所における疼痛閾値の変動を解析したものである。今後は疼痛の受容・伝達を担う他の機構として、脊髄や脳なども含めて解析し、疼痛感受性の変化のメカニズムを詳細に解明していくことが重要である。

（結論）

本研究により肥満の日本人女性（平均年齢 50.9 歳）の腹部の皮膚組織では BMI 上昇に伴う軸索ガイダンス因子 *NGF*mRNA 発現量の低下、*TPRV2*mRNA 発現量の増加が示された。そのため、機械刺激への疼痛閾値は低下していることが予測された。今後は、基礎的知見を基にさらに研究を積み重ねることでより個別性に応じた疼痛管理につなげていくことができると考えられる。

（学会発表）

・堀井麻里子, 横原弘子, 大山亜希子, 伊吹愛, 福田真佑, 赤瀬智子, 肥満者に対する疼痛看護ケア方法の確立に向けて・神経線維に着目した基礎的検討・、第 6 回看護理工学会学術集会、東京、2018 年 10 月