

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 4 月 2 0 日

日本大学学長 殿

氏 名： 榎 原 正 靖

資格・所属： 文理学部・教授

実施研究所： 文理学部・自然科学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

ファイブリン・ゲルへの選択的オリゴヌクレオチド封入現象を利用した薬物送達システムの開発

## 2 研究期間

令和元年度～令和 2 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	榎 原 正 靖	文理学部・教授	研究の統括・マテリアルの作製と in vitro 評価
研 究 分 担 者	石 井 敬 基	医学部・教授	外科領域における SOEF の応用
	奥 村 恭 男	医学部・教授	循環器疾患治療における SOEF の応用
	北 野 大 輔	医学部・助教	動脈硬化モデルにおける動物実験
	永 嶋 孝 一	医学部・助教	不整脈モデルにおける動物実験
	深 町 大 介	医学部・助教	動脈硬化モデルにおける動物実験

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：③】・【達成度：70%】

#### 5 研究目的

研究代表者（乗原）が独自に見出した現象である“フィブリン・ポリマーへの選択的オリゴヌクレオチド封入現象：selective oligonucleotide entrapment in fibrin polymers (SOEF)”を利用した創薬基盤技術を開発する。

#### 6 研究概要

がん細胞は、細胞増殖を誘導する物質を盛んに分泌することで、無秩序に新生血管を増生し続け、腫瘍の増大に参与する一方で、がん細胞の転移を促している。それらの誘導物質は医薬品開発の標的であり、例えば、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に特異的に結合する抗体や核酸アプタマーなどが開発されている。近年、がん細胞の転移とフィブリン(フィブリノゲンの分解物)の関係性について、興味深い知見が報告された【Kołodziejczyk J. et al., *Contemp. Oncol.* 17, 113 (2013)】。それは、フィブリノゲン欠損マウスでは、がん細胞が発現しても転移は通常のマウスと比べると格段に少ないというものであり、がん細胞が他器官に接着したり浸潤したりする際に、フィブリンが重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

一方、循環器の病態では血栓が非常に重要な因子であり傷害を受けた血管(フィブリンが析出している血管)のみにピンポイントで高濃度の薬剤を送達できれば、副作用のリスクをかなり軽減した治療法が開発が期待される。例えば、心筋梗塞や脳梗塞では、血栓溶解は循環障害の治療で使われるが、一般に、これらの循環器疾患の患者は高齢であり、重大な出血性疾患(脳出血など)の合併症が常に臨床的に問題となっている。

従って、これらの重大な疾患に対して、SOEF現象を利用した新たなバイオ医薬品(核酸アプタマー治療薬)の開発が期待できると考えた。SOEF現象は、近年、研究代表者らが独自に見出した現象であり【Fujita H. et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 28, 35 (2018)】、『フィブリノゲンがトロンビンに部分的に分解されることによって、フィブリン・モノマーが生じ、それらが重合してフィブリン・ゲル(ポリマー)が形成される過程で、トロンビンがフィブリン・ゲルに取り込まれ、そして、さらに、この重合反応系に、トロンビン結合性核酸アプタマー(TBA: Thrombin Binding Aptamer)を共存させると、TBAもトロンビンにつられてゲルに取り込まれるという現象』である。そこで、本研究では、SOEF現象に基づく新しい薬物送達システム(DDS: Drug Delivery System)の基盤技術を開発し、副作用の少ない安全な治療法の提供が可能となるかについて検討することとした。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

前述のように、これまでに研究代表者らは、フィブリン・ゲルの生成過程で、トロンビンがフィブリン・ゲル中に高効率に取り込まれるというしくみに着眼し、トロンビンに特異的に結合する核酸アプタマー (TBA) もトロンビンに連れられてフィブリン・ゲル中に高効率に取り込まれることを実験的に証明していた (図 1B)。

さらに、これを発展させ、TBA にカンプトテシン結合性ゼノ核酸アプタマー (CMA) を連結した融合アプタマー (bApt) を用いることで、フィブリン・ゲルに抗がん剤であるカンプトテシン誘導体 (CPT1) を効率的に導入することができるのではないかと考えた (図 2)。CMA は申請者らが独自に開発したゼノ核酸アプタマーであり、鎖内に複数の修飾ヌクレオチドをもつことで、標的 CPT1 に高い親和性を示す (図 2A) 【Kuwahara M. and coworkers, *J Am Chem Soc.* 135, 9412 (2013)】。この CMA の CPT1 結合断片を切り取り、その 5'末端を TBA の 3'末端に連結させることで、bApt を調製した (図 2B)。さらに、bApt および CPT1 の共存下で、フィブリン・ゲル生成反応を行うと CPT1 がゲル中に濃縮されることが蛍光偏光法等によって確認された (図 2C)。

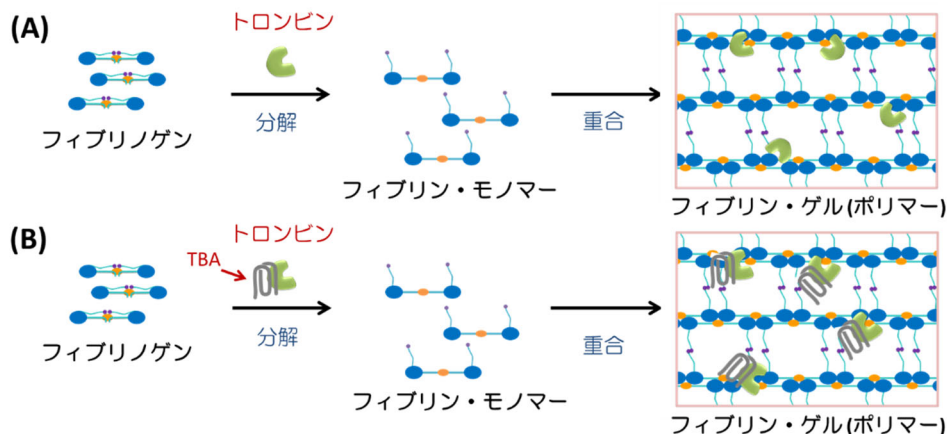


図 1 SOEF 現象によるフィブリン・ゲルへの (A) トロンビンの取り込みおよび (B) トロンビン/TBA 複合体の取り込み

図 2C のように調製したフィブリン・ゲル上でヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を 48 時間培養したところ、CPT1 濃度が 100 nM で完全に死滅していることが確認された (図 3A: 写真 1 番下)。一方、トロンビンや bApt が存在しない条件下では、CPT1 濃度が 100 nM であっても死滅することなく (図 3A: 写真上から 2 番目と 3 番目)、CPT1 を含まないフィブリン・ゲル上で培養したもの (図 3A: 写真 1 番上) とほぼ同等に生育することが確認された。また、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞でも同様の結果が得られた。

続いて、本実験系 (HeLa 細胞) において、細胞増殖抑制効果に対する抗がん剤 CPT1 の濃度依存性を検討したところ、1 当量の bApt 存在下では見かけの 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) が 7.6 nM であったのに対し、bApt の非存在下では 1300 nM であることが分かった (図 3B)。即ち、これらの結果は、SOEF 現象および薬物キャリア bApt によるドラッグデリバリーにより、細胞周辺

〔7 研究結果 (つづき)〕

のフィブリン・ゲルに、CPT1 が約 170 倍も濃縮され、非常に高い細胞増殖抑制効果が発揮されたことを実証した【Kuwahara M. et al., *Chem Comm.* 55, 11679 (2019)】。本報告には高い関心が寄せられ、当該研究のコンセプト図が *Chem Comm* 誌のインサイド・バックカバーに採用された (図 4)。

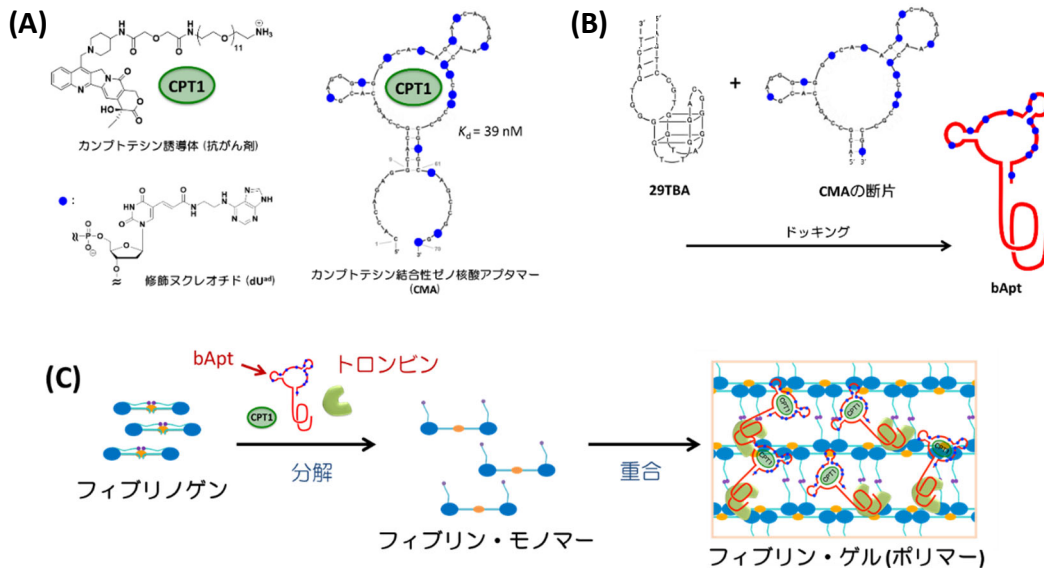


図 2 (A)ゼノ核酸に含まれる修飾ヌクレオチドおよび抗がん剤の化学構造, (B)TBA と CMA をドッキングさせた融合アプタマー (bApt) の構造 (カンプトテシン誘導体とトロンビンの両方に結合できる), (C)SOEF 現象による bApt を介したフィブリン・ゲルへの抗がん剤の取り込み

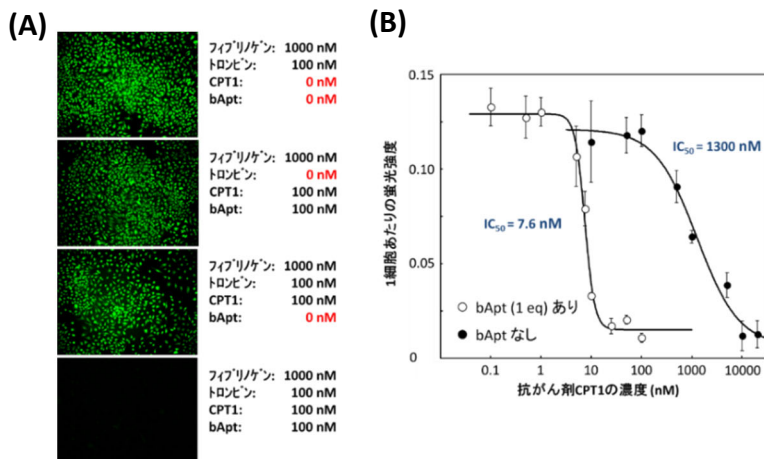


図 3 SOEF 現象と薬物キャリアのゼノ核酸アプタマー (bApt) を利用した細胞増殖抑制 (A)培養開始 48 時間後の蛍光顕微鏡写真:生細胞のみが染まる CellTracker™ 色素で蛍光染色したもの, (B)細胞抑制効果に対する CPT1 濃度依存性

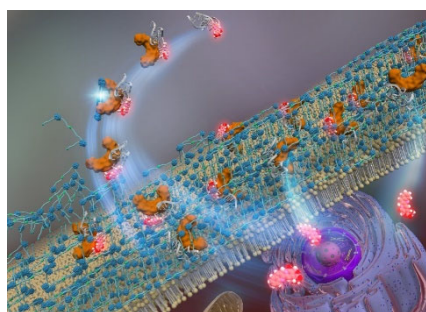


図 4 英国王立化学会 *Chemical Communications* 誌のインサイドバックカバーに採用された挿絵: 抗がん剤を担持した薬物キャリアが特異的にトロンビンに結合し、細胞周辺に生成するフィブリン・ゲルに効率的に取り込まれるようすを描いている。

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

次いで、我々は、種々のカンプトテシン誘導体に対する CMA-70 や bApt の結合特性を調べることで、bApt が薬物輸送担体すなわち薬物キャリアとして応用可能かどうかについて調べた。

カンプトテシン誘導体には、認可薬剤であるイリノテカンやトポテカンが挙げられる。それらは、キノリンアルカロイドの一種であるカンプトテシンの水溶性を高めた誘導体であり、肺がん・大腸がん・卵巣がん・悪性リンパ腫など、幅広い抗がんスペクトルを持つことが知られている。一般に、カンプトテシン誘導体は、I 型トポイソメラーゼと結合し DNA への再結合を阻害することで DNA 合成を阻害し、がん細胞のアポトーシスを引き起こし、非常に強力な抗がん活性を示すことが知られており、最も臨床で用いられている抗がん剤のひとつとなっている

実験に用いた化学修飾オリゴ核酸である bApt はポリメラーゼを用いて酵素的に合成した。TBA の配列を含むプライマー(TBA\_P1)にテンプレート(T1)をハイブリダイゼーションし、3種類の 2'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸(dATP, dGTP, dCTP)と 1 種類の修飾 2'-deoxyuridine-5'-phosphate (dU<sup>ad</sup>TP)を用い、*KOD Dash* DNA ポリメラーゼを触媒として反応を行い、生成した bApt はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した。カンプトテシン結合性ゼノ核酸アプタマーである CMA-70 も同様の方法で調製した。

まず、蛍光偏光法により、CMA-70 の結合特異性等について評価した。CMA-70 の濃度を変えて (最終濃度 0, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.50 および 1.0 $\mu$ M)、CPT1、イリノテカンおよび CPT の蛍光偏光度 ( $\Delta$ FP) を、LS-55 蛍光分光計を用いて、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS : 11.8 mM HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 140 mM Cl<sup>-</sup>, 157 mM Na<sup>+</sup>, 4.5 mM K<sup>+</sup>; pH 7.4) 中、25°C で測定し分子間相互作用を調べた。励起光 (372 nm) を照射し、モニタリング波長 (456nm) で 20~30 秒ごとに 20 分間記録した。図 5 に示したように、CMA-70 濃度の増大に応じて、CPT1 だけではなく、イリノテカンや CPT でも  $\Delta$ FP が増大することが明らかとなった。また、イリノテカンは CPT よりも  $\Delta$ FP 値が大きいことから、CPT1 と同様に CMA-70 に対する結合親和性が高いことが示唆された。

同じく蛍光偏光法により、イリノテカンを標的として bApt の段階的結合とフィブリン・ゲルへの取り込みを観察した。実験では、まず、トロンビンを蒸留水に溶解させた後、2000nM トロンビンを含む PBS 溶液を調製した。同様に、フィブリノゲン(20 $\mu$ M)およびイリノテカン(1 $\mu$ M)の PBS 溶液を母液として調製した。イリノテカン溶液 (63  $\mu$ L, 1.1  $\mu$ M) を光路長 1 cm のキューベットに入れ、蛍光偏光測定を開始した。20 分後、bApt 溶液 (7  $\mu$ L, 1  $\mu$ M) を同じキューベットに加え、続いて、トロンビン溶液 (3.5  $\mu$ L, 2  $\mu$ M) を添加して、40 分間測定を行いトロンビン、イリノテカンおよび bApt の 3 成分からなる複合体の形成を検証した。さらに、測定開始から 60 分後にフィブリノゲン溶液 (3.5  $\mu$ L, 20000 nM) を添加し、引き続き 20 分間測定を行った (図 6)。尚、反応液は、トロンビン/イリノテカン/bApt の最終濃度は 0.1  $\mu$ M であり、フィブリノゲンは 1  $\mu$ M となるように調製した。

図 6 は、(i) イリノテカンに bApt を添加した後、(ii) トロンビンを添加し、(iii) 最後にフィブリノゲンを添加しトロンビンの切断活性によってフィブリン・モノマーがゲル化するまでの  $\Delta$ FP の経時変化を示している。このように、イリノテカンは bApt の添加により、 $\Delta$ FP に約 4

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

mP の増大が見られたことから、bApt の CMA 部位に結合することが示された。さらに、トロンビンを添加すると、 $\Delta$ FP が約 18 mP 増加したことから bApt の TBA 部位にトロンビンが結合することが明らかとなった。最後に、フィブリノゲンを添加すると、 $\Delta$ FP が約 120 mP 増加したことから、イリノテカンが bApt とともにフィブリン・ゲルに取り込まれることが分光学的に確認された。

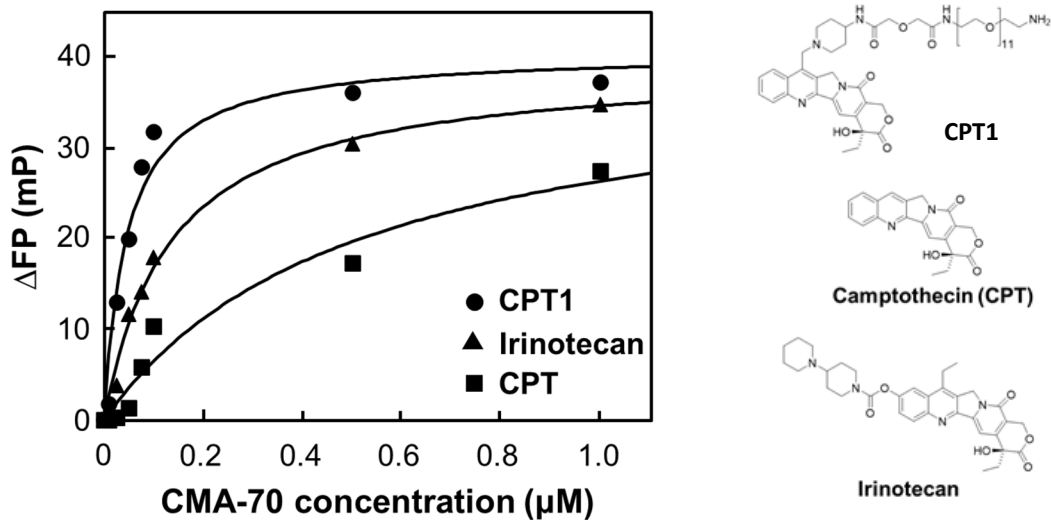


図5 CMA-70 の濃度に対する CPT1 (●), イリノテカン (▲) および CPT (■) の蛍光偏光度の滴定曲線

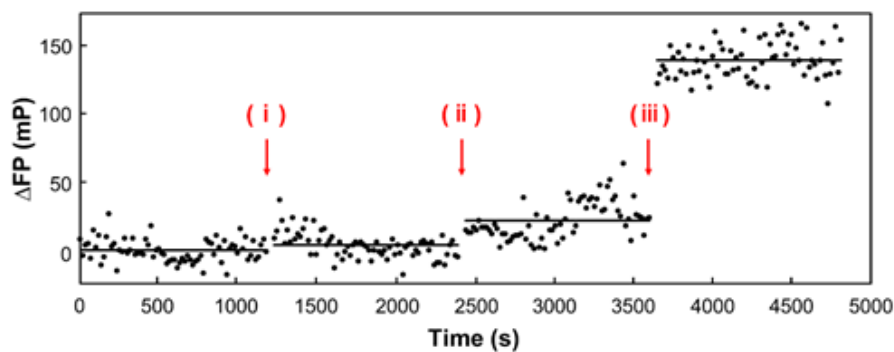


図6 薬物キャリア bApt (i), トロンビン (ii), フィブリノゲン (iii) の逐次添加によるイリノテカンの蛍光偏光度の変化

続いて、薬物キャリアである bApt への高い親和性が確認された認可薬剤であるイリノテカンを用いて細胞増殖抑制効果を調べた。まず、トリプシン処理した HeLa 細胞を、低グルコース DMEM、熱不活化した血清 (FBS)、および抗生物質溶液 (ペニシリン・ストレプトマイシン) を含む新鮮な培地で  $1.0 \times 10^4$  cell/mL の濃度に希釈した後、細胞を含む培地 (300  $\mu$ L) を 96 ウェル組織培養プレートに移し、次いで、95% の空気と 5% の  $\text{CO}_2$  を含む加湿インキュベーター

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

内で、細胞を 37°C で 24 時間培養した。尚、培地、血清、抗生物質の混合比率は 90/9/1 (v/v/v%) とした。培地を 240  $\mu$ L の新しい培地に交換した後、30  $\mu$ L のフィブリノゲン溶液 (10000 nM) を加え、穏やかにピペッティングして混合した。続いて、トロンビン/イリノテカン/bApt 複合体 (30  $\mu$ L, 1000 nM) の溶液を加え、同様に穏やかにピペッティングして混合した。陰性対照実験には、三成分混合液の代わりに、トロンビン/TBA 複合体または遊離イリノテカン (30  $\mu$ L, 各 1000 nM) の溶液を使用した。さらに、フィブリノゲン溶液を PBS に置き換えた陰性対照実験も行った。一方、陽性対照実験としてはイリノテカンを CPT1 に置き換えたもので行った。細胞は 95% の空気と 5% の CO<sub>2</sub> を含む加湿インキュベーター内で、37°C で 48 時間培養した。培養後、CellTracker™ Green CMFDA 色素を含む 100  $\mu$ L の低グルコース培地 (D-MEM) に交換し、引き続き、95% の空気と 5% の CO<sub>2</sub> を含む加湿インキュベーター内で細胞を 37°C で 30 分間インキュベートした。300  $\mu$ L の培地を 300  $\mu$ L の PBS に交換した後、染色した細胞層を BZ-X710 倒立型蛍光位相差顕微鏡で観察し、励起光 (480 nm) とカットオフ・フィルター (< 520 nm) を使用して蛍光画像 (40 $\times$ ) を取得した (図 7)。

蛍光染色に用いた CellTracker™ は生きた細胞のみを選択的に染色することができる。図 7D と 7H のとおり、トロンビン/イリノテカン (もしくは CPT1) / bApt の 3 成分存在下でのみ無発光の画像が得られた。すなわち、これは、同条件下において非常に顕著な細胞増殖の阻害が起きていることを示している。これらの結果から、bApt を輸送担体として CPT1 と同様にイリノテカンも SOEF により細胞増殖抑制効果をもたらすことが実証された【Kuwahara M. and coworkers, *Appl Sci.* 10, 8755 (2020)】。

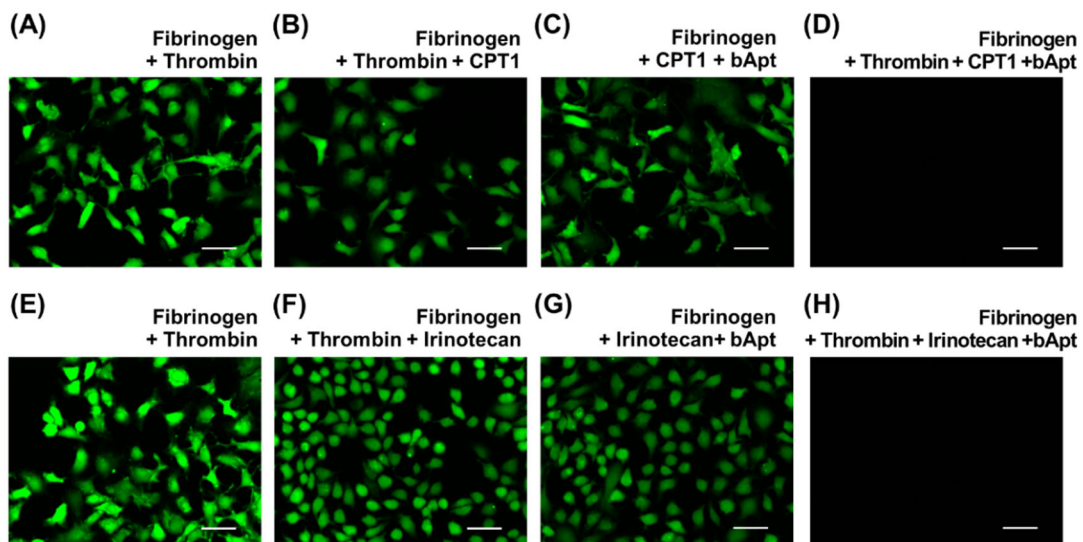


図 7 フィブリンとトロンビンを添加 (A, E)、フィブリンとトロンビンおよび CPT1 もしくはイリノテカンを添加 (B, F)、フィブリンとトロンビンと bApt を添加 (C, G)、フィブリンとトロンビンと bApt および CPT1 もしくはイリノテカンを添加 (D, H) し、37°C で 48 時間培養後の蛍光顕微画像：スケールバーは 50  $\mu$ m

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

近年、肝臓がんの主な治療法のひとつとして、ラジオ波の熱でがんを焼くラジオ波焼灼術 (RFA; radiofrequency ablation) が保険収載で実施されている。経皮的にプローブ (電極針) を刺入するだけで腫瘍組織の完全な死滅を狙える治療であり、腫瘍の摘出を行う外科的治療に比べて患者への身体的負担が少ないというメリットがある。RFA 術は、肝臓がんだけでなく肺がんや乳がん等、他の固形がんの治療にも有効性が実証されつつある。侵襲が少ないため、超高齢化が進む本邦の医療においても今後重要性を増すことが予測されている。

これまでにマウスを用いた実験で、結晶シリコン系ナノ粒子を注射により直接患部に導入し、ラジオ波 (27 MHz, 60 W) を 2 分間照射したところ、1 週間後に腫瘍組織 (肺がん由来) が 40% 消失したと報告されている【Tamarov KP. et al., *Sci Rep.* 4, 7034 (2014)】。このように、腫瘍組織に対して、ラジオ波照射で誘電加熱したナノ粒子が高い殺傷効果を示すことが分かっている。金ナノ粒子の場合、ラジオ波照射 (27 MHz, 5W/cm<sup>2</sup>) で 1 分間あたり 1.4°C の水温上昇をもたらすと見積もられている。

そこで、蛍光標識化した TBA 修飾金ナノ粒子 (TBA-GNP) の存在下で、フィブリン形成反応を行ったところ、フィブリン・ゲル中に当該金ナノ粒子が効率的に取り込まれることが蛍光顕微鏡測定により確認された (図 8)。RFA は身体的負担が少ない低侵襲な治療法であり、超高齢化社会を迎える本邦において、このような患者にやさしい治療法に関連する技術の開発ニーズはますます高まると予想される。

粒子放射線や電磁放射線と異なり、ラジオ波に曝されることによる人体への悪影響は、ほとんどないといって良い。一般に、ナノ粒子が体内に残留し長期的に健康に悪影響を及ぼす可能性がしばしば懸念されている。しかし、例えば金ナノ粒子の場合、極微小サイズ (< 直径 5.5 nm) のものは、体内に蓄積されず、最終的に尿中に排泄されるため、TBA 修飾ナノ粒子の剤形や材料等を工夫することで毒性を回避できると期待される【Choi HS. et al., *Nat Biotechnol.* 25, 1165 (2007)】。

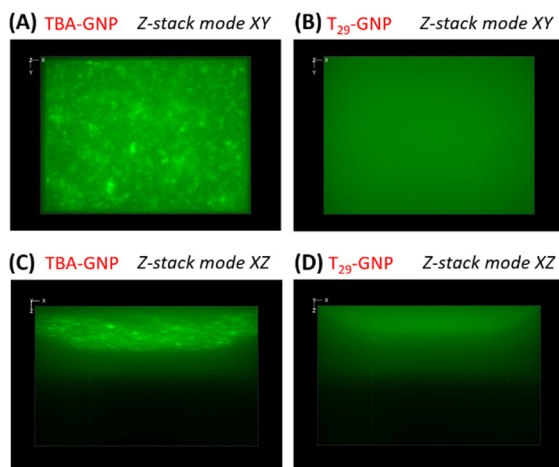


図 8 SOEF 下における TBA-GNP のフィブリン・ゲルへの取り込み (A, C); 29mer のオリゴチミジン (DNA) を修飾した GNP (T<sub>29</sub>-GNP) を用いた陰性対照実験 (B, D)。尚、A および B は Z-スタックモード XY で、C および D は Z-スタックモード XZ で撮影した。

以 上



## 令和2年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 5 月 6 日

日本大学学長 殿

氏 名： 羽尾 裕之

資格・所属： 医学部・教授

実施研究所： 医学部 総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

術中迅速病理診断における遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究

## 2 研究期間

令和 1 年度～令和 2 年度 / 令和 3 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	羽尾 裕之	医学部・教授	研究の統括・論文執筆
研 究 分 担 者	橋本 伸哉	文理学部・教授	SATIC 法における検出法開発
	吉野 篤緒	医学部・教授	脳腫瘍症例の検体提供
	角 光一郎	医学部・助教	脳腫瘍症例の検体提供・解析
	浅野 正岳	歯学部・教授	口腔腫瘍症例の検体提供
	久山 佳代	松戸歯学部・教授	口腔腫瘍症例の検体提供
	末光 正昌	松戸歯学部・専任講師	口腔腫瘍症例の解析
	相澤 信	医学部・教授 (令和3年3月31日退職)	血液腫瘍症例の検体提供・解析
	吉田 研一	医学部・助教 (令和3年3月31日退職)	骨軟部腫瘍の解析

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ③】・【達成度： 50 %】

#### 5 研究目的

Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC)法により、迅速かつ簡便に病理組織切片上で遺伝子変異の同定やマーカー分子の発現を検出する。

- 1) これまで日本大学医学部附属板橋病院・日本大学病院・日本大学歯学部附属歯科病院・日本大学松戸歯学部附属病院にて手術により採取・保管されている悪性リンパ腫や口腔内悪性腫瘍の病理組織検体を用いて、SATIC 法による既知の遺伝子変異やマーカー分子の発現の検出を試みる。
- 2) 多様な悪性度を示す脳腫瘍（神経膠腫）においては 1p19q 共欠失, isocitrate dehydrogenase 1/2 gene (*IDH1/2*), *TP53*, *ATRX*, *TERT*などの遺伝子変異が知られている。これらの遺伝子変異がすでに同定されている日本大学板橋病院・日本大学病院における過去の脳腫瘍の手術標本を用いて、SATIC 法での遺伝子変異の検出感度を検証する。
- 3) 以上の検証を踏まえて、悪性リンパ腫・口腔内悪性腫瘍・脳腫瘍の術中迅速病理診断において、術中に提出された検体を用いて SATIC 法にて遺伝子変異やマーカー分子の検出を行う。

#### 6 研究概要

手術中に行われる術中迅速病理診断（医学部・羽尾 本間, 歯学部・浅野, 松戸歯学部・久山 末光）は、手術によって採取された検体から 10～20 分程度の時間内で凍結組織切片を作製し、形態学的な所見から診断を行うものである。脳腫瘍など手術前に生検が困難な症例においては、迅速病理診断によって悪性度の評価が行われ、術式決定の重要な情報となる（医学部・吉野）。しかし神経膠腫など一部の脳腫瘍は腫瘍の発生起源細胞や悪性度の判断が形態学のみでは困難であることが知られている。また悪性リンパ腫などの血液腫瘍や口腔内悪性腫瘍も術中迅速診断での形態学的評価に限界がある（医学部・相澤, 歯学部・浅野, 松戸歯学部・久山、末光）。さらに迅速診断で作製される凍結組織切片は通常ホルマリン固定パラフィン包埋切片と比較し、標本の品質の低下が不可避である。そのため、時として診断に苦慮する症例も経験される。病理診断の精度の向上には従来の形態学的検索とともに、バイオマーカーの発現や遺伝子変異が重要な情報となる。しかし、これらの分子生物学的解析にはシーケンサーなどの高額で大型の機器が必要で、解析にも一定の時間がかかり、現在の技術では術中迅速診断という限られた時

間内で結果を得ることは不可能である。

我々は、本学で研究・開発が進められている Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC)法（文理学部・栞原、橋本、藤田）を術中迅速病理診断に応用することを考えた。SATIC 法は分析対象物と検出試薬を混ぜ等温下で放置するだけで標的となる分析対象物を蛍光発色によって検出が可能な測定系である。

この SATIC 法による標的分子の検出を病理診断に提出された検体に対して行い、検体中の遺伝子変異やマーカー分子の存在を同定する。SATIC 法の検出には大掛かりな機器や高額な試薬は不要であるため、本技術の開発によって装置化と術中迅速診断における普及が大いに期待できる。

## 7 研究結果（4,000字以上記入してください。）

1. 本研究の推進にあたり、日本大学医学部「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」審査申請を行った。本申請では対象疾患として以下の疾患と遺伝子を挙げた。審査により許可番号 275-0 として令和元年 7 月 24 日に許可された。承認された研究期間は当初、令和元年 7 月 24 日から令和 3 年 3 月 31 日までであったが、コロナ禍の特例措置申請により、研究期間の延長が認められ、令和 4 年 3 月 31 日までとなった。

脳腫瘍：diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, diffuse midline glioma, pilocytic astrocytoma

骨軟部腫瘍：giant cell tumor, nodular fasciitis, solitary fibrous tumor, low-grade fibromyxoid sarcoma, myxofibrosarcoma, liposarcoma

口腔内腫瘍：squamous cell carcinoma, leukoplakia,

唾液腺腫瘍：adenoid cystic carcinoma, mucoepidermoid carcinoma, acinar cell carcinoma

*H3F3A, IDH1 R132H, BRAFV600E, H3 K27M, telomeric associations, MYH9-USP6 fusion gene, NAB2-STAT6 fusion gene, FUS-CRE-B3L2 fusion gene, NF1, MDM2, CDK4, FUS-DDIT3 fusion gene, tp53, tp16, CDKN2A, PIK3CA, NOTHC1, FAT1, KRAS, EGFR*

また本申請に当たっては研究協力依頼書により文理学部 化学科 バイオ分析化学 栞原研究室、歯学部 口腔科学系 病理学分野研究室、松戸歯学部 病理学 研究室を共同研究施設として申請し承認された。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

2. 研究目的（1）悪性リンパ腫や口腔内悪性腫瘍の病理組織検体を用いて、SATIC 法による既知の遺伝子変異やマーカー分子の発現の検出を試みる。

口腔内悪性腫瘍において約半数で認められる p53 遺伝子変異について、SATIC 法での伝子変異の検出が可能かどうか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS, Ca9-22, HSC4 を用いて変異の検出感度について検討している。これらの細胞株での結果を受けて、今後は動物モデルや共同研究施設である歯学部および松戸歯学部保存されている検体を用いて、SATIC 法での病理組織切片上での変異の検出の可能性を検討する。これらの検討結果により術中迅速診断の際に形態学的に反応性変化か腫瘍性変化か判定が困難な症例について、より精度の高い診断が可能となる。

3. 研究目的（2）日本大学板橋病院・日本大学病院における過去の脳腫瘍の手術標本を用いて、SATIC 法での遺伝子変異の検出感度を検証する。

脳腫瘍において生じる遺伝子変異の検出の可能性について検討するため、ヒト由来脳腫瘍細胞株 T98G (p53 変異型), A172 (p53 野生型) を用いて、遺伝子シーケンスによる変異の確認を検討している。これらの細胞株を用いて、脳腫瘍細胞株においても SATIC 法で遺伝子変異の検出が可能かを今後文理学部と共同で研究を推進する。さらに、これらの細胞株での結果を受けて、今後は過去に採取され保存されている脳腫瘍検体 30 症例の腫瘍検体の一部から組織切片を作製し、免疫染色にて検出可能なものの遺伝子変異の有無について検討する。これらの染色結果を検証するため、保存検体から DNA を抽出して遺伝子シーケンスにて変異の確認を行う。これらのヒト検体から、組織切片上での SATIC 法による遺伝子変異の検出感度を検証する。

4. 骨軟部腫瘍における遺伝子変異の検出の可能性について

さらに今回、骨軟部腫瘍の遺伝子変異の検出として、骨巨細胞腫で高率に認められる遺伝子変異 H3F3A の SATIC 法による変異検出の可能性を検討する目的で、手術症例の選別とこれらの腫瘍の変異の有無について免疫染色でスクリーニングした。今後、さらに遺伝子シーケンスにて変異の確認を行ってから、SATIC 法での病理組織切片上での変異の検出の可能性について検討する。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

## 5. 口腔細胞診検体における SATIC 法応用の可能性について

通常の SATIC 法では、抽出した核酸におけるターゲット遺伝子の検出をチューブ内にて行う。一方、細胞診検体において SATIC 法が応用可能かは報告されていない。そこで、口腔細胞診検体にて SATIC 法が応用可能か否か検討することを目的とした。松戸歯学部における研究の進捗状況として、本学倫理委員会に個別申請し研究の倫理承認を得た（EC20-027 号）。確実な陽性コントロールでの検証が必要と考え、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH をターゲット遺伝子とし SATIC 法に用いる専用の環状テンプレート及びそれらと会合可能な primer の設計及び作製を行った。現在、文理学部化学科バイオ分析化学薬原研究室にて、環状テンプレートの精製が完了したところである。今後、細胞診検体から核酸の抽出を行い、チューブ内で SATIC 法による GAPDH の検出を確認後、スライドガラス上での GAPDH 検出の可能性について検討する。

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 4 月 15 日

日本大学学長 殿

氏 名： 鈴木 豊 史

資格・所属： 薬 学部・ 教 授

実施研究所： 薬 学部・ 薬 学 研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

鼻から脳への薬物移行経路を介した経鼻投与製剤の基盤技術の開発と中枢疾患治療戦略

## 2 研究期間

令和 元 年度～令和 2 年度 / 令和 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	鈴木 豊史	薬学部・教授	研究総括／鼻から脳薬物移行機構解明
研 究 分 担 者	柏田 歩	生産工学部・教授	経鼻送達ナノキャリアーの創製
	石毛 久美子	薬学部・教授	中枢疾患に対する経鼻的治療効果の解析
	小林 俊亮	薬学部・教授	樹状突起タウとアルツハイマー病発症との関連の解析
	橋崎 要	薬学部・准教授	ナノファイバーゲルの経鼻用基剤への最適化
	田中 融	薬学部・助教	高リン酸化タウ出現機構の解析
	鈴木 直人	薬学部・助教	経鼻用基剤の物性評価と製剤設計

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 90 %】

#### 5 研究目的

本研究は、血液脳関門 (BBB) を迂回する効率的な Nose-to-Brain (N2B) 薬物標的化のための基盤技術の確立を目指すものである。すなわち、(1) 経鼻投与による N2B 経路を定量的に明らかにすること、(2) 小動物での経鼻投与による治療効果の実証、および (3) ヒト鼻腔の付着滞留性を付与した機能性 N2B ドラッグデリバリー製剤の基盤技術を開発することである。

これまで、生体に適用する薬物の投与経路のうち、経鼻投与は経皮および経肺などの経路と比較して、それほど注目されてはいなかった。経鼻投与は、自己による投与の容易さ、注射針による侵襲性が少なく、静脈内注射と同等程度の作用発現、透過性に優れた鼻粘膜吸収表面、小腸粘膜を通過しないことから酵素による代謝の影響がなく、肝臓での初回通過代謝を回避できることから、高齢者にとっては、全身性副作用の低減も含め数多くの利点を有している。したがって、本研究は、鼻から脳への経路に着目し、超高齢化時代において高齢者にとって望ましい薬物の投与形態である有用性と経鼻投与製剤技術の優位性を明らかにすることを目的としている。

#### 6 研究概要

研究計画書に記載したとおり、研究組織は 7 名の研究者から構成されることから、下記にある 3 つの研究ユニットを形成し、研究代表者と各研究ユニット間で連携をとりながら、相互に研究技術的なサポート支援を行った。

##### 1: 鼻から脳への移行経路の有用性と分子標的の探索

中分子モデル物質の鼻から脳への移行経路を解析し、N2B 送達の有用性を定量的に明らかにした。アルツハイマー病 (AD) 治療の分子標的を設定するために、シナプス毒性を引き起こす高リン酸化タウの樹状突起内出現機構を部分的に明らかにした。

##### 2: 鼻から脳への薬物送達ナノキャリアーの創製と有効性の実証

鼻から脳への薬物送達に有効と考えられるリポソームナノキャリアーからの薬物の放出制御系の構築し、内封されたモデル物質の放出がリポソーム非破壊的に進行していること、薬物送達システムに不可欠な「徐放性」を明らかにした。生体内で産生される PGD<sub>2</sub> は受容体非依存的に NSC-34 の運動ニューロンへの分化を促進することを明らかにした。

##### 3: 経鼻投与製剤に適した基剤の最適化と製剤設計

3次元ヒト鼻腔透明モデル (3D モデル) に汎用経鼻投与デバイスを用いて、ヒト鼻腔表面に付着し鼻腔温度を検知することでゲル化する温度感受性ゲルの Pluronic®F-127 を添加することで、最適な粘膜付着剤の選定ができることを明らかにした。粘性付与により鼻腔上部に位置する嗅覚領域に製剤を付着および滞留させることが可能となる逆紐状ミセルの組成を見いだした。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

## 1: 鼻から脳への移行経路の有用性と分子標的の探索

N2B 送達に及ぼす経鼻的な投与速度や投与液量の影響を明らかにするために、中分子モデル放射性標識物質を用いてマウスにおける食道逆挿管鼻腔内投与後の脳および脳脊髄液 (CSF) への分布量を測定した。緩やかな投与速度 (5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) と鼻腔内体積に相当する薬液量 (25  $\mu\text{L}$ ) を投与 60 分後、脳で 0.27%ID/g brain, CSF で 0.24%ID/mL CSF の分布が認められた。食道逆挿管鼻腔内投与されたモデル分子の鼻-脳直接輸送効率は、93%以上と見積もられた。経鼻投与後、脳領域の中でどのような分布を示すかを特徴づけるために、蛍光標識中分子モデル物質を用いて脳内の分布局在を ex vivo イメージング観察したところ、嗅球や大脳前方領域の範囲にわたって最も強い蛍光が観察された。以上のことから、鼻から投与された中分子モデル物質は約 95%が嗅粘膜を介して嗅神経に沿って、残りは三叉神経あるいは CSF に沿って脳に直接移行することを明らかにした。これらの結果は、学術論文に投稿、公表した (**Quantitative analysis of inulin distribution in the brain focused on nose-to-brain route via olfactory epithelium by reverse esophageal cannulation, J. Contr. Res., 332, 493-501, 2021**)。アルツハイマー病 (AD) 治療の分子標的を設定するために、シナプス毒性を引き起こす高リン酸化タウの樹状突起内出現機構を明らかにすることを試みた。前年度までに、1) タウ mRNA が樹状突起へ輸送され、NMDA 受容体を介する刺激に応じて局所で翻訳活性化が起こること、2) タウリン酸化の主要酵素である GSK3 $\beta$  mRNA も樹状突起で翻訳されること、3) GSK3 $\beta$  が不活性化型として樹状突起に存在し、刺激による Ser9 の脱リン酸化で再活性化することを示した。今年度は、刺激による GSK3 $\beta$  活性化の分子メカニズムを調べ、以下のことを証明した。樹状突起には、脱リン酸化酵素 PP1 が阻害因子 I-2 との複合体として不活性化状態で分布しており、刺激によって mRNA から生じた活性型の GSK3 $\beta$  が I-2 をリン酸化し、PP1 を脱抑制する。この活性化された PP1 は、不活性化型 GSK3 $\beta$  を脱リン酸化して再活性化する。再活性化された GSK3 $\beta$  は、mRNA から合成された GSK3 $\beta$  と共にタウのリン酸化を行うが、I-2 もリン酸化して PP1 の脱抑制を促進するので、再活性化型 GSK3 $\beta$  が増加し、樹状突起で盛んに翻訳されるタウが過剰にリン酸化される。これらの結果は、学術論文に投稿、公表した (**Glutamate-responsive translation of dendritic GSK3 $\beta$  mRNA triggers a cycle for amplification of reactivated preexisting GSK3 $\beta$  that is indispensable for tau hyperphosphorylation, Neurochem. Int., 139, 104808, 2020**)。さらに、タウ mRNA の樹状突起輸送について解析し、輸送関連因子が結合するといわれる 4 つのグアニン分子からなる特殊な構造が、タウ mRNA 上にも形成されることを見出した。今後、30 塩基長のランダムな RNA 配列 (RNA アプタマー) を調製し、輸送、翻訳、リン酸化および凝集のそれぞれに関わる因子の働きを調節し得る特異的 RNA の探索を行い、鼻から脳へ送達可能な核酸医薬の開発に繋げて行きたいと考えている。

## 2: 鼻から脳への薬物送達ナノキャリアーの創製と有効性の実証

N2B 薬物送達に有効と考えられるリポソームナノキャリアーからの薬物の放出制御系の構築



を行った。すなわち、前年度から継続して、細胞内エンドソーム環境に匹敵する弱酸性 pH において精度のよい膜透過活性とリポソーム内封物放出活性を示すペプチドの設計を継続して行った。良好な膜透過活性を有するペプチドをリポソーム表層に担持し、系の pH 低下に伴う自発的な薬物放出を可能にする担体を調製した。得られたキャリアーは血中あるいはサイトゾルに相当する中性付近では内封薬物モデルとしてのフルオレセイン放出または漏出挙動を示さなかった。一方、系の pH を 5.0 程度まで低下させるとフルオレセインの放出を示す蛍光強度の増大が観測された。なお、本系で認められた内封物質の放出はリポソーム非破壊的に進行しており、薬物送達システムに不可欠な「徐放性」を明らかにした。本来は細胞レベルでの評価を経て、*in vivo* での検討に移行するべきであるものの、現時点での成果として緩衝液中での評価結果は、学術論文に投稿、公表した (**Design and Construction of pH-Selective Self-Lytic Liposome System, Processes, 8(12), 1526, 2020**)。緩衝液中で得られた本成果は今後、*in vitro* レベルでの評価後、*in vivo* での検討に移行するべきのものであり、脳疾患部への N2B 薬物送達ナノキャリアーにより新たなアプローチとなりうるものと考えている。前年度、脳梗塞モデルマウスにおいて、梗塞領域周囲で IgG の発現が上昇することを示した。このことは、梗塞領域において炎症反応が誘発される可能性を示している。近年、脳梗塞においても神経炎症がその病態に重要な役割を演ずることが明らかにされつつあるが、我々の結果もこれらの報告に一致するものと考えられた。脳梗塞に伴う神経炎症は、脳浮腫の原因となるばかりでなく梗塞巣の周囲組織を傷害して、患者の予後に悪影響を及ぼすことが示されている。これに対し、ステロイド薬の投与が脳梗塞の病態を改善しないことから、神経炎症は、損傷領域の修復過程においても重要な役割を担うと考えられている。したがって、神経炎症は、脳梗塞病態において複雑な調節作用を持つと考えられるが、不明な部分も多く、今後の検討が必要である。生体内で産生される PGD<sub>2</sub> は、脳内のミクログリアやアストロサイトの活性化を介して神経炎症を増悪させることや、末梢組織での血管透過性や炎症細胞の浸潤を抑制することが知られているが、ニューロンにおける役割は不明な点が多い。PGD<sub>2</sub> が運動ニューロンモデルとして汎用されている NSC-34 の神経突起伸長に及ぼす影響を検討した。NSC-34 において、PGD<sub>2</sub> の処置は、濃度依存的に神経突起伸長を伸長させた。NSC-34 では PGD<sub>2</sub> 受容体の発現は認められたが、その作動薬には神経突起伸長作用が認められなかった。PGD<sub>2</sub> は非酵素的に代謝され、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) リガンド作用を有する 15d-PGJ<sub>2</sub> へと変換されることが報告されている。そこで、PPAR $\gamma$  拮抗薬である GW9662 を PGD<sub>2</sub> と共処置したところ、細胞障害性を示すことなく、PGD<sub>2</sub> による神経突起誘導を顕著に抑制した。以上、PGD<sub>2</sub> は受容体非依存的に NSC-34 の運動ニューロンへの分化を促進することが明らかとなった。この機構には少なくとも一部は PGD<sub>2</sub> から 15d-PGJ<sub>2</sub> へと代謝されることによる PPAR $\gamma$  の活性化が関与することが示唆された。これらの結果は、学術論文に投稿、公表した (**The Molecular Mechanisms Underlying Prostaglandin D<sub>2</sub>-Induced Neuritogenesis in Motor Neuron-Like NSC-34 Cells, Cells, 9(4), 934, 2020**)。今後、これらの結果をもとに、IgG の発現上昇が確認されている脳梗塞モデルマウスにおいて、神経炎症に関する検討に加え、N2B 薬物送達による有効性を明らかにしていく予定である。

### 3：経鼻投与製剤に適した基剤の最適化と製剤設計

N2B薬物送達を目的とした経鼻投与製剤の開発では、粘性付与により鼻腔上部に位置する嗅覚領域に製剤を付着および滞留させることが極めて重要である。これまでに、鼻腔内滞留性の向上を目的としてセルロース誘導体や熱感受性ゲル化剤などの粘膜付着剤の添加により経鼻投与した薬物の脳移行性が向上した研究例が多数報告されているのに対して、粘膜付着剤含有経鼻投与製剤のヒト鼻腔における滞留性を評価した報告はほとんどない。昨年度に引き続き、3次元ヒト鼻腔透明モデル（3Dモデル）に汎用経鼻投与デバイスにより製剤を噴霧した後、レオロジー特性の違いが経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性に及ぼす影響について評価した。鼻腔面積に対する製剤の付着率は時間-付着率曲線下面積（AUCadh）を鼻腔内滞留性の指標とした。本評価方法により、レオロジー特性の違いが経鼻投与製剤の鼻腔内滞留性に及ぼす影響について検討した。粘膜付着剤として高分子増粘剤ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）を添加したところ、その添加量に伴いAUCadhの増加が認められた。しかしながら、HPC添加量が1.0%を超えると粘度の増加により、汎用経鼻投与デバイスによる良好な射出が妨げられAUCadhが顕著に低下することがわかった。次に、射出時には粘度が低く、鼻腔表面に付着し鼻腔温度を検知することでゲル化する温度感受性ゲルのPluronic®F-127を添加した経鼻投与製剤を評価したところ、HPCと比較して顕著に高いAUCadhを示した。本評価法は、N2B薬物送達を目的とした経鼻投与製剤に添加するための最適な粘膜付着剤の選定に有用であることを見いだした。これらの結果は、学術論文に投稿、公表した（Nose-to-Brainデリバリーを指向した経鼻投与製剤の設計, *Pham Tech Japan*, 36(7), 128-133, 2020）。

今回用いた汎用経鼻投与デバイスでは高粘性の製剤を噴霧することは極めて困難であった。一方、界面活性剤が溶媒中で形成する紐状のミセルは、ゲル状態でも噴霧が可能であることが知られている。これは、高剪断を印加した際紐状ミセルが切断され、粘度が急激に低下するためと考えられている。そこで、モデル製剤として各種紐状ミセルを用い、製剤のレオロジーパラメータと3Dモデルにおける噴霧時の広がり具合の関連性を調べた。その結果、製剤の付着面積は“プラトー弾性率”との間に強い負の相関があることを突き止めた。また、新たな創薬モダリティとして開発が進んでいる水溶性中分子を紐状ミセルに搭載するため、ミセル内部に水溶性中分子を含む水相、分散相に油である流動パラフィンおよび両親媒性物質のレシチンを用いて、逆紐状ミセルを設計した。汎用される経鼻投与デバイスで噴霧可能な逆紐状ミセルとなる比率をスクリーニングしたところ、レシチンおよび水相比率を最適化することで水と同等の噴霧特性を有する逆紐状ミセルの組成を見出した。最適化した逆紐状ミセルの鼻腔各部位の滞留性を評価したところ、水よりも逆紐状ミセルは薬物のN2B移行に大きく関与すると考えられる嗅覚領域に滞留することを明らかにした。経鼻投与製剤の新規基剤としてリポソームと水溶性高分子ゲルの特性を併せ持ったリポソーム架橋ゲルを開発した。これらの結果は、学術論文に投稿、公表した。

（疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたリポソームの架橋とレオロジー特性, *YAUKGAKU ZASSHI*, 140(3), 435-441, 2020）。このゲルは、DDS製剤の興味深い材料特性を有することから、新たなN2B型経鼻投与製剤の基剤としての利用が期待される。（4,824文字）

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 4 月 12 日

日本大学学長 殿

氏 名： 和田 平  
資格・所属： 准教授・薬学部  
実施研究所： 薬学部・薬学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

アディポネクチンによる体内時計制御機構の解明

## 2 研究期間

令和 元年度～令和 2 年度 / 令和 3 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	和田 平	日本大学薬学部/准教授	統括、培養細胞実験 マウスの管理及び解析
研 究 分 担 者	内山武人	日本大学薬学部/教授	アディポロン及びその誘導体の合成・精製
	鈴木正泰	日本大学医学部/教授	ヒト血液の採取及び解析

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 80 %】

#### 5 研究目的

我が国ではシフトワーカー及び長時間労働者の数が急増しており、これらの労働者の健康問題がクローズアップされている。シフトワークによる肥満、糖尿病などの代謝性疾患の発症メカニズムについては不明な点が多いが、体内時計の変調の関与が示唆されている。体内時計の変調が代謝性疾患の発症に関連していることが明らかにされているが、体内時計の変調による代謝性疾患の発症メカニズムの詳細は不明な点が多い。近年、臓器連関を媒介する液性因子として、脂肪細胞から分泌される”アディポネクチン”が注目を集めている。アディポネクチンはその受容体を介して、糖・脂質代謝促進作用のみならず、抗がん作用などの様々な機能を示す生理活性物質である。申請者は、初代肝細胞を用いた検討より、アディポネクチン受容体作動薬が時計遺伝子の発現量及び振幅を低下させることを見出した。このことは、アディポネクチンシグナルの活性化は肝細胞の体内時計を直接的に制御することを示している。そこで本研究は、体内時計の変調に起因した生活習慣病の発症メカニズムを、代謝調節因子であるアディポネクチンによる体内時計システム制御の観点から明らかにする。

#### 6 研究概要

本研究ではアディポネクチンを体内時計とエネルギー代謝とを結ぶ因子として捉え、アディポネクチンによる体内時計制御機構を明らかにするとともに、体内時計システムの変調に関連した疾患の予防及び治療法の開発のための科学的エビデンスを提供することを目指す。そのため、本研究期間内に以下のことを明らかにする。(1)アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御機構を明らかにする。概日時計を同調させた初代肝細胞を用いて、アディポネクチンシグナルによる体内時計メカニズム機構の解析を行う。また、アディポネクチン受容体作動薬(アディポロン)に体内時計調節作用が認められたことから、種々のアディポロン誘導体ライブラリーを化学合成法により構築し、より高いアディポネクチンシグナル活性を示す誘導体を探索する。(2)アディポネクチンによる体内時計システムを介したエネルギー代謝制御機構を明らかにする。アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御及び時間依存的なエネルギー代謝制御について Adn(-/-)マウスを用いて検討する。(3)シフトワークマウスにおける体内時計システムの異常へのアディポネクチンの関与を明らかにする。シフトワークマウスの肝臓における時計遺伝子の概日リズムの位相のずれならびに振幅の増大と血中アディポネクチン量の減少との関連性について検討する。(4)シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度の変動について検証する。日本大学医学部附属板橋病院の看護職員及び受診患者を被験者として、シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度を測定する。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

アディポネクチンによる肝臓の体内時計制御機構

総合研究初年度において、アディポネクチンシグナルによる体内時計システムの制御は、アディポネクチン受容体の下流に存在する AMP キナーゼ(AMPK)及び核内受容体 PPAR $\alpha$ を介して時計遺伝子(*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*)の発現制御していることを見出した。そこで2年度は、Adn(-/-)マウスの解析より肝臓の糖・脂質代謝制御の時間依存性への関与が示唆された遺伝子の発現リズムについて、デキサメタゾン処理により概日リズムを同調させたマウス初代肝細胞を用いて検討した。脂質代謝関連遺伝子において、Adn(-/-)マウスの肝臓で発現増加が見られた脂肪酸代謝関連遺伝子 *Srebp1*, *Fas*, *Insig2a* 発現量を測定したところ、アディポネクチン受容体作動薬(アディポロン)を処理したマウス初代肝細胞において、*Srebp1*, *Fas* 遺伝子発現量の低下が見られた。一方、*Srebp1c* のプロセッシングに関与する *Insig2a* 遺伝子の発現量は、アディポロンを処理したマウス初代肝細胞において発現変化は見られなかった。コレステロール代謝関連遺伝子において、Adn(-/-)マウスの肝臓で発現増加が見られた *Hmg-coa reductase*, *Acta2*, *Ldlr* 遺伝子発現量を測定したところ、アディポロンを処理したマウス初代肝細胞に発現低下が認められた。さらに、アディポロンによるこれら脂質代謝関連遺伝子の発現低下メカニズムを明らかにするため、アディポネクチンシグナルの阻害剤を用いて検討した。その結果、アディポロン処理によって遺伝子発現およびそのリズム性が低下したこれらの脂質代謝関連遺伝子は、AMPK の阻害剤である Compound C を同時処理により発現低下が回復した。一方、PPAR $\alpha$ アンタゴニストである GW6471 を同時処理したマウス初代肝細胞において、アディポロンによるこれらの脂質代謝関連遺伝子の発現低下の改善は見られなかった。したがって、アディポネクチンシグナルによる脂質代謝関連遺伝子の発現量およびそのリズム性の調節は AMPK を介して行われていることが示唆された。次に、アディポネクチンシグナルによる時計遺伝子発現調節作用の種特異性についてヒト肝がん細胞である HepG2 細胞を用いて検討した。その結果、概日リズムを同調させた HepG2 細胞にアディポロンを処理したところ、時計遺伝子(BMAL1, REV-ERB $\alpha$ , PER1, PER2, CRY2)発現量ならびにその振幅が低下し、アディポネクチンシグナルによる体内時計の制御がヒト株化肝細胞でも見られることを明らかにした。またマウス初代肝細胞においてアディポネクチンシグナルによる制御が見られた CLOCK, CRY1 などの時計遺伝子に影響は観察されなかった。また、ヒト肝がん細胞におけるアディポネクチンシグナルを介した時計遺伝子の発現抑制作用は、マウス初代肝細胞より弱いものであった。その要因として、アディポネクチン受容体, AMPK 及び PPAR $\alpha$ 発現量の違い、あるいは正常肝細胞と肝がん細胞の増殖能などの違いなどが影響している可能性が考えられるため、さらに現在解析を進めている。

アディポネクチンによる体内時計システムを介したエネルギー代謝制御機構

総合研究初年度に Adn(-/-)マウスを用いてアディポネクチンによる糖脂質代謝制御の時間依存性について検討し、(I)アディポネクチンは時間依存的なインスリン分泌制御を介して耐糖能を調節していること、(II)アディポネクチンによる糖新生を介した血糖制御には時間依存性は存在しないこと、(III)アディポネクチンは時間依存的な PPAR $\alpha$ 遺伝子の発現制御を介して VLDL

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

分泌を調節していることを明らかにした。また、野生型マウスの血中総コレステロール濃度は1日を通して一定であるが、Adn(-/-)マウスにおいて日内変動が認められた。血中では脂肪酸とエステル結合しているコレステロールエステルとして約70%、残り30%は遊離コレステロールとして存在している。そこで2年目において、アディポネクチンによるコレステロール代謝制御の時間依存性について明らかにするために、コレステロールエステル、遊離コレステロール濃度を測定した。Adn(-/-)マウスにおけるコレステロールエステル濃度は、LDLコレステロールと同様に Circadian Time (CT)2, 6において野生型マウスに比較して低下を示した。一方、Adn(-/-)マウスにおける遊離コレステロール濃度は、総コレステロール、HDLコレステロール濃度と同様に野生型マウスでは1日の変動は認められないが、Adn(-/-)マウスにおいて日内変動が認められた。さらに血中遊離脂肪酸濃度を測定したところ、野生型マウスにおいて日内変動が見られたが、アディポネクチンの欠損に伴い日内変動が消失した。さらにアディポネクチンによるこれらの血中脂質パラメーターの制御機構の解明を行っている。

アディポネクチンは視床下部に存在する AdipoR1 受容体を介して AMPK を活性化し、摂食調節及びエネルギー代謝制御を担っていることから、アディポネクチンによる視床下部の時計遺伝子発現制御を検討した。その結果、Adn(-/-)マウスの視床下部において時計遺伝子(*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*)の発現増加が見られた。次に、1日摂食量を測定したところ、Adn(-/-)マウスで摂食量の増加傾向、そしてCT14~CT16における摂食量の増加が見られた。しかしながら、摂食調節関連遺伝子 *Agouti-related protein(Agrp)*, *Proopio-melanocortin (Pomc)*の発現量に変化は見られなかった。さらに、Adn(-/-)マウスにおける視床下部の遺伝子発現制御を検討したところ、CT22においてコルチコトロピン放出ホルモン(*Crh*)遺伝子発現量の著しい増加が見られた。CRHは下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌を介して副腎からの糖質コルチコイドの産生を促すことから、Adn(-/-)マウスにおける血中コルチコステロン、コルチゾール濃度の増加は視床下部における *Crh* 遺伝子の発現増加と関連していることが考えられる。さらにアディポネクチンによる行動の概日リズムへの影響を検討したところ、恒暗条件下ならびに明暗条件下のいずれにおいてもアディポネクチン欠損による影響は見られなかった。また現在、肝臓におけるアディポネクチン受容体の発現量との関連について検討を行っている。

**シフトワーカー及び長時間労働者における血中アディポネクチン濃度の変動**

メタボリック症候群に対するより有効な予防法・治療法を確立するためには、体内時計の変調を来しやすい生活習慣や勤務形態、個人の特性とアディポネクチン濃度との関係を明らかにすることが、24時間社会と呼ばれる現代においては重要である。そこで本研究は、シフトワーカーが多く含まれる医療関係者の中で健常成人を対象に、勤務体系を含めた生活習慣や体内時計に関する個人の時間特性(時計遺伝子多型など)と上記疾患関連マーカーとの関係を明らかにすることが目的である。(対象)今回は特定の職場、病院に勤務する健常成人の医療関係者(シフトワーカーを含む)を対象とし、以下を募集基準とした。主に20-65歳の特定の都内の病院に勤務する医療関係者の方(医師、看護師、薬剤師、事務職など)、重度の精神疾患や身体疾患

## 〔7 研究結果（つづき）〕

に罹患していない方、脂質異常症や糖尿病に罹患していない方、睡眠薬/抗不安薬など向精神薬を服用していない方、妊娠していない方、採血が可能な人を対象とした。[方法]2020年は新型コロナウイルス感染症が流行していたため、検体を集める日程は、2020年11月に募集し、検体収集を同年12月に行った。合計97名（夜勤（当直）あり：52名、夜勤（当直）なし：45名）が募集し、本研究の参加に同意した。参加同意した後、午前中に病院の指定場所で採血（10mL）及び質問紙による生活習慣を含めた社会心理学的要因(シフトワーカーの有無、勤務体系、抑うつ症状、ピッツバーグ睡眠質問票、朝型夜型質問紙)について評価を行った。[解析]現在集められた採血の検体からDNAのSNP多型（CLOCK、BMAL1）及び血清におけるアディポネクチン濃度、IL-6、TNF $\alpha$ などのサイトカイン濃度については解析中である。また質問紙で得られた社会心理学的要因についての情報についてもまとめている。得られたデータを元に、今後解析を行い、ヒトにおける血中アディポネクチン濃度と生活習慣、個人の睡眠特性との関連について多変量解析を行う予定である。

総合研究2年目は、新型コロナウイルス感染症が流行により、予定していた臨床研究のボランティアの募集の遅延、海外出張による国際学会を通じた情報交換の中止により当初の計画よりも遅れてしまったため、特例処置の許可を得て1年間の研究期間を延長して行う。

## [競争的資金申請への準備状況及び外部研究費の獲得]

本研究より得られた結果を基盤として、外部研究費に積極的に申請を行い、これまでに日本私立学校振興・共済事業団 2020年度 学術振興資金を獲得した。また、本年度の研究の一部は、“アディポネクチンによるエネルギー代謝の概日リズム制御”という題目で日本薬学会第141年会（広島）（2021）において口頭発表を行った。さらに現在、投稿論文作製中である。これらの研究の発展を踏まえ、今後、厚生労働科学研究費補助金“糖尿病など生活習慣病対策の地域格差の把握、その改善のための研究”、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）、武田報彰医学研究助成、科学研究費助成事業・基盤研究（B）などの”外部研究費の申請を行う予定である。

## 令和2年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和3年 5月14日

日本大学学長 殿

氏 名： 古賀 徹

資格・所属： 教授・通信教育部

実施研究所： 通信教育部・通信教育研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

戦後教育改革期における政官民アクターの三者関係に関する研究

## 2 研究期間

平成31年度～令和2年度 / 令和 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	古賀 徹	通信教育部・教授	研究の総括、史料デジタル化、速記史料復元担当
研 究 分 担 者	末富 芳	文理学部・教授	史料の閲覧と複写、史料整理の作業管理
	古川 隆久	文理学部・教授	教育―社会関係の理論的整理、政治思想面の考察
	中澤 瞳	通信教育部・准教授	人物研究・政治思想面の考察
	富士原 雅弘	国際関係学部・准教授	史料の閲覧・複写、史料整理
	香川 七海	法学部・助教	史料の閲覧・複写、史料整理

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。



#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ③】・【達成度： 70%】

#### 5 研究目的

本研究では、1945年から50年代にかけての戦後教育改革期における政官民（政党・文部省・諸教員団体）の三者（間）関係に注目して分析を進めることで、戦後日本の教育発展の歴史を捉え直すことを試みる。具体的には、(A) 政治家・政党関係史料、(B) 官僚・文部省関係史料、及び (C) 教職員組織関係史料の3種類の史料を突き合わせていくことで、教育改革をめぐる諸事件に関する政治過程を描き出していく。

戦後教育改革期に関する先行研究としては既に通史的刊行物や個別のテーマ毎の著作・論文等が数多く編まれている。しかし通史著作の多くは「教育政策史」中心であり、本研究で注目する政官民の関係については考察の対象とされてなかった。

政官民アクターの3つの関係性に注目した研究を進めることは、従来にない研究視点・方法論上の提起ともなり、その結果として戦後教育の発展の歴史を新たな像で描き直すことにもなるという大きな意義がある。

#### 6 研究概要

本研究では、1945年から50年代にかけての戦後教育改革期における政官民（政党・文部省・諸教員団体）の三者（間）関係に注目して分析を進める。従来の戦後教育史研究において、この政官民アクター三者関係を含めた「よりリアルな歴史像」を描くに至らなかった理由は三つある。(1)「現在」との連続性の問題があり「過去の出来事」として客観的に整理されるに至っていなかったという難しさと、(2)史料の公開・活用が未だ十分に進んでいないという史料的な制約、(3)教育学研究者の教育的な関心のせいで、当時の政治（政治的事件や政治構造）や社会（社会意識やイデオロギー）との関連があまり考慮されてこなかったこと、である。

本研究では、(2)史料的な問題を（質・量ともに）解決することを通して説得力ある分析を進めていく。

なお、本研究では三者（間）関係を「政府対運動」や「正義対悪」というふうな単純な図式にはあてはまらない、多様なグラデーションで存在する諸アクターの相互作用と、その意図せざる帰結としての制度改革、という構造を明らかにしていくことになる。3種類のアクターの一次史料群を突き合わせていくことで、多種多様なアクターが相互にどう協議や対話、交渉や妥協を行ったのか、そしてその結果、どういう選択肢が消え、どういう選択肢が残ることになったのかを明らかにすることが、本プロジェクトの中心的な「問い」になる。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

令和 2 年度の研究実績報告書であるので、研究計画 2 年目 (最終年度) の研究成果を以下に報告する。なお、2 年間の当初の研究計画に比して 70% と評価した理由についても述べておく。

本研究の核となるのは「三者」関連の資料の袖手と整理、相互の史料の対照の作業である。この史料のうち「教職員組織関係史料」(主に日本教育会館教育図書館所蔵史料)の未整理史料を書庫で整理し、デジタル化の可否を判断する作業に時間をかけつつも、多くのデジタル化と大学(文理学部・教育学研究室内)への収蔵を行うことができた。膨大な量の貴重な史料を収集できた点は本プロジェクトチームとして喜ばしい、最大の成果であると考えている。

また、研究分担者、通信教育研究所に雇用したプロジェクト専従の研究員(松嶋哲哉氏)の協力のもとに、そのデジタル化した史料の目録作成、データベース化を進めてきた。さらには近畿・中部地方の関連史料の調査及び史料収集についてもほぼ計画どおりに進めることができた。さらには研究協力者(メンバー)による協力のもと報告書に掲載する形で論文・史料紹介・一部目録と解題を寄稿していただくこともできた。その成果報告書は 2 冊に分けて現在印刷中である。掲載される(予定の)論文は、①富士原雅弘「第 1 回全国教研の開催をめぐる日教組内部の議論と決定過程」、②松嶋哲哉「教員労働組合としての労働協約」、③香川七海「【教育史としての判例研究】福岡県教職員組合・学力テスト反対闘争事件」、④古賀徹「日本教職員組合所蔵資料「公文書綴」について」の 4 本である。さらには⑤〔史料復刻〕「日本教職員組合所蔵資料「公文書綴」及びその⑥「目録」及び解題を記している。論文編と資料編の 2 冊となる。

以上の論文①～④はすべて、本研究のアクターのうちの一つ「日本教職員組合」及び「地方教組」を対象とするものである。従来の研究では、もっとも資料的に不足していて、そしてもっともその評価に偏りがみられた部分である。研究目的・概要にも記したように、この偏った見方を再考するのが本研究の中心的課題となっている。例えば①富士原論文は、本研究のアクターのうちの一つ「日本教職員組合」の同時期の特徴として語られる「平和運動」「教育研究運動」のうち後者に関する史料を分析している。従前には用いられなかった組合内部での議論が記録された史料を活用することによって戦後直後の教員側による研究活動や自主性に関する意識(の一面)を明らかにすることができている。②松嶋論文、③香川論文、④古賀論文では日教組・地方教組内部の問題のみではなく交渉相手となるアクターとの関係性に注目して問いが展開されていく。また⑤⑥の史料復刻等の紹介により、「史料の公開」を行うとともに、⑥の解題によって当時の時代状況を概説・概括しておいた。

⑤⑥の史料は、タイトルこそ「公文書綴」であるが、性格は日教組という組織の機関文書・私文書ということになる。しかし 1950 年前後の文書整理状況やその作成(文書形態)の変化をみていくと、交渉相手(官側)の影響を受けてか「公文書化」といえるような状態となっていく。組織化が進む度合いとあわせてみていくと興味深い変化の一つと考えられる。

本研究は、この「教員組織」というアクターのみではなく「三者」間の関係性に注目するものである。他のアクターとして(A)政治家・政党関係史料については憲政資料室所蔵資料の中から文教行政関連資料を抽出・整理を行い、(B)官僚・文部省関係史料については国立教育政策研究所教育図書館所蔵資料を中心に考察を進めていく。教職員組織関連史料は(C)ということになる。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

以上の三者の中で従来未公開であったのが、(C)「教職員組織関連史料」のうちの日本教育会館教育図書館所蔵史料であり、その意味で最も貴重な史料といえる。そのためデジタル化を進めることが本研究の中心作業となっていた。戦後期に政府・行政機関と対峙した「組織資料・文書」類の発掘・整理という基礎作業から研究を推進してきたが、もちろん日本教職員組合のみならず、日本教育会、日本教育者連盟、信濃教育会など、多様な教職員団体の動きを把握すべく、全国各地の関連史料収集にもつとめてきている。

以上のように史料集めとデジタル化を計画に沿って進めてきた。また目録化も進めその史料をいかした論文も成果として記している。しかし、冒頭にも記したように全体で「70%」という進行状況に止まっている。このことは別途延長願い出時にも記しているが、いささか簡略な記載に止めていたので、ここでは研究計画と合わせる形で記させていただく。

新型コロナウイルス感染拡大の関係で、地方教育会関連史料の調査を中止とした。信濃教育会、広島大学所蔵資料の調査を中止し、さらに同史料群に関する研究者から情報提供をいただく機会ももつことができなかった。日本教育会・大日本教育会に関する研究者との交流や教示いただく機会も実行することができなかった。このことは「戦後初期」を対象とする本研究にとって前史となる戦前の教員組織・教育運動と官側アクターとの関係を理解しておくことが必須となるのだが、その連続性や関係性に関する考察を深めていくことが未だできていないということである。さらには学会開催時の同時期にその関係者聞き取りやコロキウム・小研究会を行うことや、時期を合わせて合宿型で研究会と史料館・文書館取材を行う予定であったが、これらも中止せざるを得なくなった。

さらには、史料館等の閲覧の制限も発生し、国立国会図書館、国立教育政策研究所付属図書館、国立公文書館等の基本的な図書館でのアクター (A) (B) に関する照合についても、自由に行えない状態となった。昨年緊急事態宣言が解除された間に (C) については集中的に撮影を進めることはできた。しかし本来ならば (C) 資料こそ、さらなる選定作業の時間が必要であったものが制限されたというのも事実である。

以上のように「コロナ禍で」というのはすべての面で停滞の理由として語られるが、地道な史料調査を中心とする研究にとっては現実に大きな障害となったということになる。この進められなかった作業に加えて、もちろん研究グループメンバーが各学部でオンライン形式授業への対応など、新しい手間が増えることにより十分に時間をかけられなかったということも実感としてある。しかし、その中で遠隔（オンライン）形式で会合を行い、各担当部分に関する作業進捗状況の共有や、論文執筆を進めていくこともできた。メンバーの協力・尽力により 70%まで進めることができたということを研究代表者としてここに記させていただきたい。

延長期間についても、2年間で前述の理由により出来なかった作業を進めていく。しかし施設の活用や取材のための移動については引き続き制限される可能性がある。本研究の延長を決意したのは、このようなプロジェクト型研究は、大学の審査機関により審査を受けて「この課題、この研究ならば十分に成果が出せるだろう」という期待を受けて、はじめて進めることができるという思いからである。中途半端に終わらせるのではなく、期待された成果に結びつけていく努力を行うのが「研究の機会を支援していただく側」としての義務だと考えている。そのために無理に期間内に終了させずに、できる方法に振りかえ、当初の目的の中で中心となるデジタル化を進めてきたのであり、そこで得た新資料をもとに本研究の問いを見直しながら論文執筆等につなげてきた。残された期間についても同

様に進めて行きたい。

また延長を許可いただいた期間の中で、残された研究計画を達成することは最低限の義務と考えているが、研究を進めてきたことで見えてきたことがある。これも研究の成果といえると考えている。例えば未公開史料であった（C）資料について「選定作業の時間が必要であったものが制限された」ということも、その未公開史料の膨大さや全体の分量がみえてきたということである。今後、どのぐらいの作業が必要で、どのぐらいの分野に関する資料が存在するのかという全体像がみえてきた。今後の作業の継続によって、この期間支援していただいた研究の成果がさらに意義深いものとなる。令和 2 年度の研究の達成度合いを記すとともに、その位置づけについて整理させていただいて本研究の報告書とさせていただく。

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 5 月 2 1 日

日本大学学長 殿

氏 名： ソコロワ山下 聖美

資格・所属： 芸術学部・ 教授

実施研究所： 芸術学部・ 芸術研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

日本人の「南方」経験の再検討ーグローバル化時代の新しい歴史像の構築にむけてー

## 2 研究期間

令和 2 年度～令和 3 年度 / 令和 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	ソコロワ山下 聖美	日本大学芸術学部／教授	「南方」派遣作家の言説分析。全体の統括。
研 究 分 担 者	石川徳幸	日本大学法学部／准教授	「南方」地域で発行された邦字新聞と、その発行を担った新聞人の分析。
	伊藤雅俊	日本大学国際関係学部／助教	日系インドネシア人の史料分析。
	鳥海早喜	日本大学芸術学部／准教授	「南方」に関する政策の国策宣伝に利活用された写真撮影者の特定。
	町田祐一	日本大学生産工学部／専任講師	「南方」への移動の推進を、民間言論人及び職業指導所における実態から分析。

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ③】・【達成度：50%】

#### 5 研究目的

本研究の目的は、外地（「南方」）と内地（日本）をめぐる「還流」を視座に据え、グローバル化社会に寄与する歴史像を構築することにある。今日地球規模で進むグローバル化の中において、複雑な地政学的影響による社会変動を知的に把握し、国際的な枠組みの中で様々な課題に向き合う相互理解に基づく実践力を構築していくためには、相互理解を深めるコミュニケーションツールとネットワークの形成が重要である。中でも、インドネシアのように過去様々な歴史的かかわりを持つ国々や地域との関係については、歴史的理解を前提とする人文・社会科学の学術的知見の蓄積が、その素材として欠かせない。現在、インドネシアは日本への留学生や外国人労働者の受け入れといった側面で活発化してきている。学術的知見を隣接する他の学問領域へ波及させるだけでなく、教育を含めた幅広い社会的還元によって活用することが、本研究の大きな目的である。

#### 6 研究概要

本研究のテーマは、1920年代から1950年代における「南方」と内地（日本）の人びとの「還流」がもたらした歴史的意義を検討することである。

対象は、いわゆる戦前期におこなわれた南進政策にともなう国策移民だけではなく、自由移民や一時的な出稼ぎ労働者とその推奨者、文学者、ジャーナリスト、2世・3世の人々、写真家などの人々である。これらの人々が、外地における多様性のある日本人社会の形成と、それらが内地（日本）との関係において果たした役割を、戦前・戦時・戦後の様々な立場における人びとの経験から明らかにしていく。

対象時期については、「南方」への移動が本格化した大正時代（1920年代）から、戦後に残留兵を中心とした日系インドネシア人のコミュニティが形成された1950年代を設定した。対象地域は戦前期日本において「南方」と呼称された地域、とくに戦前の早い時期から日本人社会の形成がみられ、戦後においても日系人社会が発達したインドネシアを中心に扱う。

研究成果の共有と定着化については、各自の個別研究を継続したうえで、インターネットに研究状況の進捗を公開することを予定している。研究成果を定期的に研究会において検討し、インドネシアにおける気鋭の日本研究者の全面的な協力をえたうえで検討を繰り返し、学術知見の国際性を担保して研究成果として国内外に広く公表していく。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

令和2年度はコロナウイルスの世界的流行により調査研究のための渡航が不可能となったため、当初予定していたインドネシア国立図書館にての資料収集と、インドネシア大学とランブンマンクラ大学で予定されていた国際ワークショップを行うことができなかった。ゆえに、国内で遂行できることに集中して取り組んだ。具体的には以下ようになる。

### 1) インターネットでの進捗状況の公開

ホームページを解説し、幅広く情報提供を募るとともに、各研究者の略歴、研究課題と進捗状況を公開した。[\(https://rjse.upstory.biz/\)](https://rjse.upstory.biz/)

### 2) 研究会の開催

Zoom において3回の研究会を実施した。第1回は4月3日に行われ、各自の研究状況の確認と予定、購入図書の選定などを行った。第2回は7月27日に行われ、各自の中間研究報告と共に、インドネシア大学専任講師・スーシー・オング氏より現地に残る史料についての情報提供や史料批判についての報告を聞いた。また、ブラビジャヤ大学専任講師のフィトリアナ・プスピタ・デヴィ氏からは、戦時中の文学者たちにおけるインドネシア体験についての報告を聞いた。第3回は2月27日に行われ、各自の中間研究報告と共に、ミネソタ大学医学部講師の中島基弘より、世界にアウトプットする研究成果の作成方法についての報告を聞いた。

### 3) 報告・論文集の作成

国際ワークショップを開催することができなかったため、『復刻版 ジャワ新聞/カナジャワシンブン 全8巻総9冊』、『復刻版 新ジャワ 全2巻 (南方軍政関係史料シリーズ)』、『復刻版 南洋年鑑 全4巻』、三平将晴『パラグアイ移民案内』、三平将晴『パラグアイ移民案内』、美平晴道『心の灯』(財団法人 皇居外苑保存協会事業部)、美平晴道『皇室御写真集』、美平晴道『全国孤児綴方選集 夢のお母さん』などを購入し、研究史料とした上で、「日本人の「南方」経験の再検討ーグローバル化時代の新しい歴史像の構築にむけてー 報告・論文集」を作成し、各自の研究成果や史料批評を掲載し、相互に読解した。

「報告・論文集」における研究者各自の役割と研究成果は次のようになる。

山下聖美：「はじめに」と史料紹介「林芙美子の南方視察と「南の田園」」を執筆した。1942年、林芙美子は陸軍から派遣され、「南方」の視察に訪れる。とくにインドネシアにおいて、様々な土地に滞在した芙美子は、自らの体験と当時の南方の様子を作品に書き記した。それらは大変貴重な記録であるが、敗戦後に抹殺されてきた歴史をもつ。本研究では、史料を見出し、「南方」の当時の様子を伝える持続可能な史料として保存すべく再録を試みた。また、インドネシアにおいて今後の聞き取り調査の資料とするべく、インドネシア語に訳し、現地の方々にも読解可能とした。

石川徳幸：「研究の概要 日本人の「南方」経験の再検討ーグローバル化時代の新しい歴史像の構築にむけてー」と史料紹介「『日蘭協会会報』(日蘭協会、1939～1941年)」を執筆した。戦前日本のいわゆる「南方関与」に関しては、南洋協会の活動については多くの研究がなされているものの、「日蘭協会」や「日蘭領印度協会」といった団体に関する研究は十分にされていないとは言い難い。両会が合併して新たに設立された日蘭協会に関しては、その歴史的

背景から鑑みても注目すべきものがある。ゆえに『日蘭協会会報』を取り上げ、史料の読み込みを行うことで今後のさらなる分析の糸口を見出した。

伊藤雅俊：論文「1950年代のスマトラ島における日系インドネシア人一世の諸相－居留地と職種を中心に－」と史料紹介「日本・インドネシア友好親善永遠の金橋 Japanese Emas Persahabatan Indonesia Jepang yang Abadi」を執筆した。第二次世界大戦時にインドネシア各地に派兵され、終戦後も帰国せず、インドネシア独立戦争に参加し、さらに独立後も帰国の途を選択しなかった残留元日本兵とその子孫である「日系インドネシア人」について、1951年から1958年にかけて作成された「附 スマトラ地区残留邦人連名簿」を基本資料として考察した。とくにスマトラ島の日系一世は北スマトラ州、なかでも州都メダンに集中していたこと、ドクトル・ジュパンとして成功した者を除くと、概して日系一世の経済生活は芳しくなかったことが明らかになった。また、Ridjojo Uchida氏（第二次世界大戦時に日本軍に従軍し、インドネシア独立戦争いはインドネシア国軍の一員として身を投じた。独立後はメダンで新聞記者となり、日本に関する記事を中心に執筆した。）に関連する新聞記事の日本語訳を史料として掲載した。貴重な新聞記事からは、戦争という悲惨な出来事の最中でも「南方」と内地（日本）の人々との人間的な交流を垣間見ることができ、今後さらなる考察への可能性をもった史料であると位置づけた。

金山泰志（研究協力者）：論文「昭和戦中期における日本の南方教育」を執筆した。昭和戦中期の小学校（国民学校初等科）において、南方地域がどのように教えられていたのか明らかにしている。小学校教育もまた当時を代表するメディアの一つであり、小学校教育の影響力は特に大きく、南方地域に関しても、小学校で教わった内容（南方地域に関する情報）が、多くの日本人の唯一の南方体験（間接経験）であったと考えられる。論文中では、『初等科地理』（国定6期、1944年）、『初等科国史』（国定6期、1943年）、『初等科国語』（国定5期、1941～43年）、『初等科修身』（国定5期、1941年）を使用し、「地理化における南方教育」、「歴史科における南方教育」、「修身科における南方教育」、「国語科における南方教育」の実態を探った。結果として、当時の小学校教育においては、「南方」に関する地誌や民族、物産（資源）に関する基礎知識が相当程度教授されていたことがわかった。

スーシー・オング（連携協力者）：論文「インドネシアにおける日本「神話」の誕生と展開 1930年代と1960年代」を執筆した。1930年代と1960年代における日本とインドネシアの文化人の交流とインドネシア文化人の対日認識、具体的には1930年代と1960年代にインドネシアで発行された雑誌・新聞に掲載の記事を手掛かりに、それらの記事に描かれた日本像、及びそのような日本像が形作られ、定着した時代的背景を取り上げている。資料の制限のため、1930年代の蘭領インドの首都バタビア（現在のジャカルタ）でオランダ教育を受けた文化人が発行した月刊誌『新詩人』（『ブジャンガ・バル』）と、同じく1930年代に東京で発行された欧文（英・独・仏文）雑誌『Cultural Nippon』のみを分析の対象としているが、さらなる考察のステップとなる見解を見出すことができた。

鳥海早喜：論文「『アサヒグラフ』を中心としたインドネシアにおける日本写真に対する一考察」を執筆した。日本とインドネシアの関係性について「写真」を通して探るこの論文では



『アサヒグラフ』に掲載されたインドネシア関連記事の撮影者調査を中心に、インドネシアと日本の写真を通じた関係性を明らかにした。インドネシアと日本の写真に関する先行研究は少ない。写真絵葉書研究や、戦時下における国策宣伝の中で「日本を対外に向けて、どのように写真を使って見せていたか」という視点からのメディア研究に限られているが、論文では、戦前から続く日本とインドネシアの写真を通じた交流を明らかにした。また、「日本が占領地をどのように日本国内に対して見せようとしていたか」「その写真を撮影したのは誰なのか」という視点から『アサヒグラフ』を分析し、そこから戦時下における写真分析調査の問題点を見出した。調査は初期段階であり、今後さらに調査を深めていく必要を痛感する結果となったが、さらなる研究への展望をひらくことができた。

町田祐一：論文「1940年初頭における日本人の「南方熱」の諸相」を執筆した。この論文はアジア太平洋戦争下（1941－1945年）の1940年代初頭に日本内地で盛り上がった日本人の「南方熱」の実態とメディアの状況、そして「南方」進出希望者の背景を検討するものである。第一に、戦時下における南方への移動についての諸研究をまとめて、日本人がどの程度渡航していたかをまずはふまえた。第二に、日本内地で刊行されていた大新聞であった『朝日新聞』『読売新聞』データベースから析出される南方関係記事を検討することで、「南方熱」に対するメディアの機能を明らかにした。最後に、南方開拓の教育機関であった、興南錬成院の卒業生の回想を手がかりに、「南方」指導者への進路がいかにより選ばれたかを分析した。結果として、「南方熱」は、1940年代初頭に日本の軍事作戦の展開を受けて隆盛したが、現実的には会社企業あるいは職業指導所経由により「軍属」による渡航が多くの希望者にとっては現実的であり、指導者を目指すものは拓南塾など官制の各種錬成機構を通じた「進路」を選択したものとどまっていたことが明らかになった。

以上のように、「報告・論文集の作成」を通して、各研究者が各分野からのアプローチで開拓した「南方」についての知見と情報を共有することができた。総合すると、

- ① 戦前期の日本において「南方」地域への出稼ぎや移民は、いかにして拡大したのか。「南方」における日本人コミュニティの形成過程や、日本内地における斡旋事業を明らかにする。
- ② 戦時期の日本は「南方」地域において、いかなる「文化工作」を実践したのか。いわゆる「文化工作」の実態を明らかにし、現地にもたらした影響とともに、「文化工作」に携わった日本人の戦後の活動への影響を詳らかにする。
- ③ 戦後の日本と「南方」地域の関係において、日系人コミュニティが果たした役割はいかなるものであったのか。戦前からの移民や残留兵によって形成された「南方」におけるコミュニティの実態を明らかにし、現地における当該コミュニティの位置づけと日本との関係をどのように維持したのか（ないしは維持し得なかったのか）を詳らかにする。という3つの目標を達成する道筋のスタートは切れたと確信している。今年度の国内調査で得られた成果をもとに、来年度はさらに知見を開拓し、研究成果を確実なものとし、グローバルに発信していきたいと考えている。

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 4 月 14 日

日本大学学長 殿

氏 名： 齊藤 健

資格・所属： 理工学部・教授

実施研究所： 理工学部・ 理工学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

次世代型エッジ処理が可能な NU ブレインチップの開発とロボットへの実装

## 2 研究期間

令和 2 年度～令和 3 年度 / 令和 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	齊藤 健	理工学部・教授	研究統括, ブレインチップ(脊髄神経系および深層学習型)の設計開発およびロボットの開発
研 究 分 担 者	内木場 文男	理工学部・教授	昆虫型マイクロロボットおよび脊髄神経系ブレインチップの開発
	佐伯 勝敏	理工学部・教授	中枢神経系ブレインチップの設計開発
	金子 美泉	理工学部・助教	深層学習型ブレインチップの開発
	武藤 伸洋	工学部・教授	ネットワークロボットシステムの開発
	見坐地 一人	生産工学部・教授	ロボットの解析

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は, 理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：②概ね順調に進展している。】・【達成度： 50%】

#### 5 研究目的

本研究は、3つの学術的「問い」に対し答えるべく、世界初の技術を開発する事が目的である。3つの学術的「問い」は、「ロボット技術、AI技術で世界に注目される競争力を得るにはどのような研究を展開するべきか」、「ノイマン型から脳型のAI技術への転換として、アナログ高集積化回路による、Nihon University (NU)ブレインチップがキーデバイスとして提案できるか」、「社会ニーズに答えうるレベルのシーズを日本大学で育てられるか」である。研究代表者、研究分担者による3種のNUブレインチップを独自のロボットに実装することは、他の研究機関では実現が難しく、高い学術的独自性と創造性を兼ね備える。また、日本大学の持つロボットおよびAIに関するシーズを育て、日本学術振興会などの学外の大規模資金獲得の際の研究の柱とする。また、本研究を礎とし、将来的には日本大学の持つシーズを、ニーズを抱える企業との協働にて、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)や科学技術振興機構(JST)による大規模プロジェクトの立ち上げを目指すものである。

#### 6 研究概要

本研究では次世代型AIとして、エッジ処理が可能なNUブレインチップを開発し、ロボットに実装する。NUブレインチップをオリジナルのロボットに実装することで、日本大学発の新たな産業革命が実現し、世界的なインパクトを与える可能性がある。本研究では、NUブレインチップの開発とプラットフォームとなるオリジナルのロボットの開発を同時におこなう。

##### (1) NUブレインチップの開発

研究代表者および研究分担者(内木場、佐伯、金子)は、生物の脳を構成する神経細胞の電気的な活動を、アナログ回路で模倣したモデルを用いて、生物の脳の情報処理を集積回路化し、脳型の情報処理が可能なNUブレインチップを実現する。NUブレインチップ以下の3種類に分け、開発を同時に進める。

(1)-a.脊髄神経系ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：内木場)

(1)-b.中枢神経系ブレインチップ(研究分担者：佐伯)

(1)-c.深層型ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：金子)

##### (2) ロボットの開発

NUブレインチップを搭載するロボットについても開発を進める。また、開発においてはロボットのモデル解析を適時行い(研究分担者：見坐地)、設計開発にフィードバックをかける。

(2)-a.昆虫型ロボット(研究代表者および研究分担者：内木場)

(2)-b.4足動物型ロボット(研究代表者)

(2)-c.ネットワークロボット(研究分担者：武藤)

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

「4 現在までの達成度」に記載した通り、当初の研究目的に対しては概ね順調に進展しているが、COVID-19 の状況により学部連携研究の実施が困難な状況であった。学部個別の研究は進んでいる状況であり、研究終了年度である令和 3 年度において研究の学部間連携を進める必要がある。研究開始年度である令和 2 年度の研究結果を「6 研究概要」に記載した項目ごとにまとめる。

### (1) NU ブレインチップの開発

#### (1)-a. 脊髄神経系ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：内木場)

研究代表者および研究分担者の内木場が進めている、動物の脊髄神経系に学んだブレインチップを実現する。既に世界最小であるミリメートルサイズの昆虫型ロボットに搭載し、コンピュータプログラムの不要な歩容の生成を実現しているが、引き続き高機能化を実施する。また、回路基板に実装したニューロ回路をセンチメートルサイズの動物型ロボットに搭載し、歩容の発現に成功したので、ニューロ回路の集積回路化を行う。脊髄神経系ブレインチップは、中枢神経系に負荷をかけることなく基本的な歩行動作を生成可能であり、まさにエッジ処理である。

本年度の研究結果として研究代表者および研究分担者内木場は、昆虫型ロボット用および動物型ロボットの脊髄神経系ブレインチップを計 6 種類試作し納品された。測定の結果、設計通りの動作をおこなったのでロボットに実装を進めている状況である。令和 3 年 6 月には更に 6 種類を試作する予定である。

本研究の結果を基に、研究代表者は 11 件の口頭発表をおこなった。また、論文誌に研究の結果の一部を記載した<sup>[1-3]</sup>。

[1] Yuki Takei, Katsuyuki Morishita, Riku Tazawa, Koichi Katsuya, and Ken Saito, “Non-programmed gait generation of quadruped robot using pulse-type hardware neuron models” *Artificial Life and Robotics*, Volume 26, Issue 1, pp. 109-115, (2021 年 2 月)

[2] Takuro Sasaki, Mika Kurosawa, Yu Usami, Shinya Kato, Arisa Sakaki, Yuki Takei, Minami Kaneko, Fumio Uchikoba, and Ken Saito, “Development of neural networks chip generating driving waveform for electrostatic motor” *Artificial Life and Robotics*, online, online, (2021 年 1 月 3 日)

[3] Mika Kurosawa, Takuro Sasaki, Yu Usami, Shinya Kato, Arisa Sakaki, Yuki Takei, Minami Kaneko, Fumio Uchikoba, and Ken Saito, “Neural networks integrated circuit with switchable gait pattern for insect-type microrobot” *Artificial Life and Robotics*, online, online, (2021 年 2 月 9 日)

本研究の結果を基に、研究分担者の内木場は 2 件の査読付き国際会議にて発表し<sup>[4-5]</sup>、その内容を現在論文誌に投稿中である。

[4] Mikihiro Hayakawa, Kenji Takeda, Motokuni Ishibashi, Kaito Tanami, Megumi Aibara, Minami Kaneko, and Fumio Uchikoba, “Hardware neural networks that change the gait of quadrupedal walking according to sensor input” *Proc. of The Twenty-Sixth International Symposium on Artificial Life and Robotics 2021 (AROB 26th 2021)* (2021 年 1 月 22 日)

## 〔7 研究結果（つづき）〕

[5] Kenji Takeda, Mikihiro Hayakawa, Motokuni Ishibashi, Kaito Tanami, Megumi Aibara, Minami Kaneko, and Fumio Uchikoba, “The control of bipedal gait transitions by pulse-type hardware neural networks that mimic the CPG model based on muscle synergy” Proc. of The Twenty-Sixth International Symposium on Artificial Life and Robotics 2021 (AROB 26th 2021) (2021 年 1 月 22 日)

## (1)-b.中枢神経系ブレインチップ(研究分担者：佐伯)

研究分担者の佐伯は、上記の脊髄神経系ブレインチップと比較してより高度な情報処理である、記憶・学習が可能な中枢神経系ブレインチップの開発をおこなう。特に、ニューロン間の結びつきの強さの変化、すなわち、シナプス可塑性をブレインチップに導入する。本研究期間では、シナプス可塑性を利用したネットワーク構造の基本構成をアナログ高集積回路で実現する。

本年度の研究結果として研究分担者の佐伯は、中枢神経系ブレインチップについて研究を進め、成果を学会発表や論文誌にまとめている状況である。また、以下の論文誌に研究の結果の一部を記載した<sup>[6]</sup>。

[6] 佐々木芳樹, 佐伯勝敏, “自動補正機構を有するパルス形カオスニューロンモデル”, 電子情報通信学会論文誌 C, 採録決定, (2021 年)

## (1)-c.深層型ブレインチップ(研究代表者および研究分担者：金子)

研究代表者は、現在主流であるコンピュータ上で計算を行う深層学習を、アナログ高集積回路で実現する。本研究期間では、層間のニューロン間の結びつきの強さが自由に設定可能であることをアナログデジタル混合回路で実現する。但し、学習による結びつきの強さはコンピュータの計算結果をそのまま用い、深層型ブレインチップ単体での学習は行わない。研究分担者の金子は、現在主流であるコンピュータ上で計算を行う深層学習の研究を進め、深層型ブレインチップと比較検討する。

本年度の研究結果として研究分担者の金子は、コンピュータ上で計算を行う深層学習の研究を進め、小型のデバイスに実装を進めている。また、歯学部や生物資源科学部との研究連携を進めている状況であり、1 件のポスター発表をおこなった。

## (2) ロボットの開発

## (2)-a.昆虫型ロボット(研究代表者および研究分担者：内木場)

現在までに世界最小の昆虫型ロボットのプロトタイプが完成している。しかし、熱収縮を用いた電力消費量が多いモータを使用しているため、静電気力を用いた低消費電力のモータに変更するなど、より一層の小型化、高機能化に向けて引き続き研究が必要である。

本年度の研究結果として研究代表者および研究分担者の内木場は、新しい昆虫型ロボットの設計および作製を実施している状況である。本研究の結果を基に、研究代表者は 10 件の口頭発表をおこなった。現在、査読付きの国際会議や論文誌への投稿を検討している。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

## (2)-b.4 足動物型ロボット(研究代表者)

一般的なサーボモータ、センサを搭載した 10cm 程度の小型ロボットの開発をおこなう。現在までに、馬をベースにしたプロトタイプロボットの開発に成功しているが、後述する通り、動物は体形に独自性があり、動物の種類を変化することにより、歩容も変化する可能性がある。猫型、犬型、ラクダ型など様々な 4 足歩行型ロボットを開発する。

本年度の研究結果として研究代表者は、既に開発していた馬をベースにしたプロトタイプロボットに加え、猫型の 4 足歩行ロボットを開発し、今後、研究成果を学会発表する状況である。

本研究の結果を基に、研究代表者は 6 件の口頭発表をおこなった。また、2 件の査読付き国際会議にて発表し<sup>[7-8]</sup>、その内容を現在論文誌に投稿中である。さらに、論文誌に研究の結果の一部を記載した<sup>[9]</sup>。

[7] Yuki Takei, Riku Tazawa, Takumi Kaimai, Katsuyuki Morishita, and Ken Saito, “Dynamic simulation of non-programmed gait generation of quadruped robot” Proc. of The Twenty-Sixth International Symposium on Artificial Life and Robotics 2021 (AROB 26th 2021), pp. 503-507 (2021 年 1 月 21 日)

[8] Katsuyuki Morishita, Shinya Kato, Takuro Sasaki, Yuki Takei, and Ken Saito, “Development of receptor cell model converting sensor inputs into pulse waveforms”, Proc. of The Twenty-Sixth International Symposium on Artificial Life and Robotics 2021 (AROB 26th 2021), pp. 508-512 (2021 年 1 月 21 日)

[9] Yuki Takei, Katsuyuki Morishita, Riku Tazawa, Koichi Katsuya, and Ken Saito, “Non-programmed gait generation of quadruped robot using pulse-type hardware neuron models” Artificial Life and Robotics, Volume 26, Issue 1, pp. 109-115, (2021 年 2 月)

また、4 足ロボットとは異なるが、ヤツメウナギ型のロボットに関する研究もおこなった<sup>[10]</sup>。

[10] Katsuyuki Morishita, Yuki Takei, and Ken Saito, “Design of Hardware-Based Biomimetic Neural Networks Exhibiting Oscillatory Burst Firing of Lamprey Nervous System”, Transactions of The Japan Institute of Electronics Packaging, Vol. 13, 2020, pp. E20-007-1-E20-007-4, (2020 年 8 月 26 日)

## (2)-c. ネットワークロボット(研究分担者：武藤)

ネットワークロボットは有線もしくは無線によるネットワーク化が必要であり、ロボットの台数の増加によりネットワークへの負担が大きくなる。正にエッジ処理が必要なプラットフォームであることから、ネットワークロボットへの NU ブレインチップ実装に向けた検討を進める。

本年度の研究結果として研究分担者の武藤は、ネットワークロボットに関する研究として、複数の遠隔作業支援ロボットの制御方法の開発、モーションキャプチャを利用した操作インタフェースの開発を行った。

## 〔7 研究結果（つづき）〕

## 科学研究費助成事業の申請・採択状況

「5 研究目的」に記載した大型プロジェクトの立ち上げについては、本助成金の令和2年度の研究成果を利用して2つのプロジェクトに挑戦した。

(1) 科学技術振興機構(JST)によるムーンショット型研究開発事業 研究開発プロジェクト  
ムーンショット目標3「2050年までに、AIとロボットの共進化により、自ら学習・行動し人と共生するロボットを実現」に研究代表者がプロジェクトマネージャーとして申請書を提出した。2020年度から2024年度までの研究期間で予算2,906百万円を計上し、企業および大学の研究者20名をパフォーマーとして申請し、「AIロボットシステム進化論 Darwin」を計画した。残念ながら採択には至らなかったが、企業および大学の研究者による研究チームの立ち上げができた。

(2) 日本学術振興会(JSPS)による令和3年度科学研究費助成事業 基盤研究 A  
ムーンショット型研究開発事業に提案したプロジェクトを縮小し、研究代表者として申請書を提出した。2021年度から2023年度までの研究期間で予算42,169千円を計上し、大学の研究者計3名で申請し、「iPS細胞とニューロ回路によるハイブリッド人工脳を実装したロボットの開発」を計画した。残念ながら採択には至らなかったが、次年度以降も継続して挑戦する計画である。

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 5 月 7 日

日本大学学長 殿

氏 名： 阿部雅紀

資格・所属：教授 医学部・腎臓高血圧内分泌内科学分野

実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

免疫性腎炎に対する DFAT 細胞療法の治療効果と安全性の検討

## 2 研究期間

令和 2 年度～令和 3 年度 / 令和 2 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	阿部 雅紀	医学部/教授	研究の総括
研 究 分 担 者	福田 昇	医学部/教授(研究所)	DFAT 細胞治療効果と作用機序、安全性の検討
	福家 吉伸	医学部/准教授	DFAT 細胞治療の治療効果としての組織学的な検討
	逸見 聖一郎	医学部/助教	DFAT 細胞治療の治療効果としての組織学的な検討
	丸山 高史	医学部/准教授	モデル動物への DFAT 細胞治療の施行と治療効果判定、治療効果の機序、安全性についての検討

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。



#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ③】・【達成度： 40 %】

#### 5 研究目的

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させ DFAT を得る技術を開発、特許化した（特願平 10-378013）。これまで DFAT を再生医療の移植細胞源として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた。間葉系幹細胞は多分化能を示し、再生医療分野において細胞移植源として期待されている。

DFAT は、局所麻酔下に 1 g の脂肪組織を採取できれば調製可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全や高齢患者からも採取・調製が可能である。進行性腎障害に罹患した場合、根治治療はなく透析療法を余儀なくされる事も少なくない。透析療法は週 3 回、1 日あたり 4 時間拘束され患者自身の QOL も格段に下がり、治療法の中でも患者満足度の最も低い部類の治療法である。またそれに費やされる医療費も年間 1 兆円以上と高額である。また透析に至らなくても腎機能障害が慢性的に存在する慢性腎臓病の患者数は 1330 万人で国民 8 人に 1 人は腎障害が存在すると言われており、根治治療を目指した慢性腎不全への再生医療が期待されている。

一方、免疫性腎炎である慢性腎炎の治療はステロイド療法が主体であるが、繰り返し再発し、経過途中重篤な感染症を併発したり、長期ステロイド内服による骨粗鬆症や糖尿病、胃潰瘍といった副作用が診られたり、腎予後的に最終的には末期腎不全に陥る予後不良疾患である場合が珍しくなく、透析導入の原因疾患の一つでもある。我々は DFAT 細胞移植の進行性腎障害に対する作用を検討し、DFAT は間葉系幹細胞と同様に免疫抑制作用を介して、免疫性腎炎である慢性腎炎モデルの病態を改善する事を見出した。(Maruyama, Fukuda et al. Stem Cell Res Ther 2015)。また平成 27 年～29 年度の科学研究費(15K09280)「進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞移植治療の開発」にて免疫抑制作用に TSG-6 が関与している事を見出した。しかし、DFAT 移植による詳細な免疫抑制作用機序は不明であった。免疫性腎炎に対する DFAT 移植の臨床応用の可能性が考えたく、治療効果のメカニズムを明らかにする共に DFAT 投与細胞数、投与期間、投与回数などの細胞治療として DFAT 移植の最適治療条件を確立する。今回は免疫性腎炎の中でも最も予後不良な ANCA 腎炎をターゲットに、そのモデル動物である SCG/ThpNkc マウスを使用して実験することとした。

ヒトに DFAT 細胞移植を行う場合、基本的には患者自身の細胞、血清を用いて DFAT を作成、培養、増殖させて移植に役立てる計画であるため拒絶反応などの免疫毒性の副作用は考えにくいと思われる。しかし多彩な細胞への分化能を有する幹細胞の一種と言える DFAT を移植した場合、何らかの部位に生着し、異所性組織形成を起こす可能性や形質転換による癌化の可能性も完全には否定出来ない。DFAT は他の再生医療の移植細胞源としてこれらの可能性が格段に低

いことが長所でもあるが、自家移植を想定した場合であってもこれらの安全性の検査も必要である。また臨床の現場で DFAT 移植を行うことを想定した場合、疾患によっては急を要するため自己の DFAT を作製する時間が足りず他人由来の細胞で凍結保存した DFAT を利用して移植する、つまり他家移植を行う可能性も皆無ではない。

よって移植による免疫毒性、異所性組織形成・癌化などの重篤な副作用の有無についても検証して臨床応用するにあたり安全性についても検討する。

## 6 研究概要

### 1) 実験に使用する SCG/ThpNkc マウスの繁殖

SCG/ThpNkc マウスは他のマウスと違い、生命力の弱いマウスである。発売元も大阪のメーカーであり輸送が必要であった。そのため同マウスを輸送後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸送後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約 8 週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症するため、雌親の授乳が困難であるため、ddy マウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5 週齢の SCG/ThpNkc マウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出する。繁殖では 1 回の繁殖で約 5 頭の出産が予想されることから、実験に使用する 41 頭を得るためにはメス 9 頭の交配が必要となった。

2) 7 週齢の SCG/ThpNkc マウスに ddy マウス由来 DFAT をそれぞれ  $1 \times 10^6$  個/頭、 $1 \times 10^5$  個/頭、 $1 \times 10^4$  個/頭の割合で各 4 頭ずつ静脈より細胞移植を行った。更に移植後の体内分布を検討する為、PKH26GL でラベルした DFAT を  $10^5$  個/頭の割合で移植した。

3) 細胞移植後 1 カ月飼育した。その間 1 週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1 日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。

4) 移植 1 カ月後、ddy マウス由来 DFAT を移植した群では生化学的検査として血液中の BUN、Cre、ANCA、ANA、WBC、CRP、IL-1、6、8、TNF- $\alpha$ 、TSG-6 濃度を ELISA 法で測定した。腎臓と肺について Real-time PCR 解析、Western blot 法を用いて免疫制御分子として TSG-6・IDO を、Th1-type cytokine として IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$  を、M1 マクロファージ関連サイトカインとして MCP-1・IL-6・IL-12 を M2 マクロファージ関連サイトカインとして CCL17・IL-4・IL-10・mannose receptor の発現の変化を観察した。これにより DFAT 細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを考察した。

さらに免疫毒性として代表的なのが移植片対宿主病(GVHD)である。この症状として代表的な皮膚病変(手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無)、消化器病変(食欲低下、嘔吐、下痢等)、肝臓病変(黄疸や意識障害)などが移植後の実験動物に診られないか注意深く観察した。以上の結果を踏まえて免疫性腎炎への DFAT 細胞移植療法について効果の有無や作用機序、免疫毒性を中心とした安全性について多角的に判断した。DFAT 投与細胞数、DFAT 投与期間などの細胞治療としてのデータを蓄積し、DFAT 移植の最適治療条件を確立した。

更に DFAT から分泌されるエクソソームについて実験計画について以下の通りとした。今回

はサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてエクソソームの回収を行った。継代培養した DFAT 細胞の培養上清 (DMEM) 15ml を 15ml tube で 4°C、1500 g、15~30 分遠心、15ml tube の上清 2ml を 2ml tube(1Sample 各 9 本)へ移し、4°C、10000 g、10 分遠心、Amicon 限外濾過フィルター(Cut off100kDa)を用いて、MilliQ Water 15ml をいれて 4000 g、10 分遠心し、フィルターの前処理を行い、100kDa Amicon Ultra-15 に c) の 15ml DFAT 培養上清を加えた。以上より絵得られた DFAT 培養上清濃縮液 0.5ml を qEV カラムの上から注入し抽出した。メイワフォーシス株式会社のナノ粒子マルチアナライザーを使用して培養上清、血清中、肺組織、腎組織中の miRNA について測定を行った。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

移植後の DFAT の体内分について、PKH26GL でラベルした DFAT は投与後 1 時間において DFAT の肺でのトラップが確認され、その他の臓器への分布は認めなかった。その後 1 週間、2 週間と徐々に肺にトラップされ DFAT 数は減少していったが、この間その他の臓器への移行は認めなかった。

移植細胞数については  $1 \times 10^5$ /個投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下データは DFAT を  $1 \times 10^5$ /個投与した結果について述べる。

生存率については DFAT を移植した群が治療 4 か月後 100%だったのに対して移植しなかった疾患群が 66%と低下しており、移植したことによる生存率の改善を認めた。

蛋白尿については腎炎群よりも DFAT 投与群の方が蛋白尿の改善を認めた。

腎臓組織の評価として、組織 GIS(糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT 投与群で有意な低下を認めた ( $P=0.018$ )。一方、尿細管の障害度を表す指数である TIS では腎炎群および DFAT 投与群において有意な差は認めなかった。

腎機能の評価として、血清 BUN 値と血清 Cr 値について腎炎群と DFAT 投与群で差を認めなかった。また ANCA 腎炎発症時に上昇する血清 MPO-ANCA 値は腎炎群と比較し、DFAT 投与群で低下傾向であったが、有意な差は認めなかった。

腎臓での TSG-6 の mRNA 発現は腎炎群と比較し、DFAT 投与群において有意な発現の亢進 ( $P=0.041$ ) を認めた。TSG-6 の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群と DFAT 投与群で糸球体において同等であった。一方、腎間質での TSG-6 の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両方において亢進を認めた。また CD44 の発現は、DFAT 投与群で低下傾向であった。免疫調整物質である IL-10 の発現は DFAT 投与群で増加傾向であり、PGE2 の発現は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群で増加傾向であった。IL-1 $\beta$  の発現は両群で差を認めず、TNF- $\alpha$  の発現は腎炎群と比較し DFAT 投与群で低下傾向であった。また M1 マクロファージのケモカインである MCP-1 の蛋白発現は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群において有意な発現低下 ( $P=0.04$ ) を認めた。M2 マクロファージに発現するケモサイトカインである CCL-17 の蛋白発現は、腎炎群と比較して DFAT 投与群で有意な発現亢進 ( $P=0.04$ ) を認めた。real-time PCR 法で ICAM、VCAM においては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞における Activated Treg の発現は両群に有意差を認めなかった。

ここまでの結果をまとめると移植された間葉系幹細胞と類似する DFAT が免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつ TSG-6 の発現亢進と、M1 マクロファージから M2 マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。

また DFAT についての催奇形性であるが、肺には DFAT がトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点での DFAT による催奇形性は認められなかった。移植による免疫毒性の一種である GVHD を考える手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無といった皮膚病変や、食欲低下、嘔吐、下痢等の消化器病変、黄疸や意識障害といった消化器病変などが移植後観察されることは無かった。

これらより、DFAT の細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果、副作用の両面から考えても臨床応用が可能であることが示唆されたと考えた。ここで障害組織である腎臓に到達せず肺に殆どがトラップされるにもかかわらず改善する機序について更なる検証をすることが望ましいと考えた。

一方興味深いデータとして、我々の研究室で以下のような結果を得ている。DFAT、ASC 培養上清からの抽出物(DFAT-Exo、ASC-Exo)を電子顕微鏡で観察した結果、両者共に直径 100～150 nm の細胞外小胞が確認され、ウエスタンブロット解析ではエクソソームマーカである CD63 の発現が確認できた。DFAT-Exo、ASC-Exo から RNA を抽出し、miRNA の発現解析を行った結果、T 細胞の増殖制御に係わる miRNA-20a-5p、miRNA-17-5p、ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞への分化制御に係わる miRNA-26a-5p、miRNA-100-5p、Th17 細胞への分化を制御に係わる miRNA-20b-5p の発現を確認した。Exosome のヒト T 細胞への取り込み能を検討した結果、DFAT-Exo、ASC-Exo は共にヒト CD4 陽性 T 細胞に効率良く取り込まれることが確認された。ヒト T リンパ球増殖に対する影響を検討した結果、DFAT 及び ASC また DFAT-Exo 及び ASC-Exo は、用量依存性に T 細胞の増殖を抑制した。ヒト T リンパ球のサブセット分化に対する影響を検討した結果、DFAT 及び ASC また DFAT-Exo 及び ASC-Exo は、用量依存性に制御性 T 細胞(CD25+ FoxP3+細胞)への分化を促進し、Th17 細胞(CD25+ IL17A+細胞)への分化を抑制した。一方、同一細胞濃度における DFAT と ASC、DFAT-Exo と ASC-Exo の比較では、両細胞間に明らかな差は認められなかった。

要約するとこの DFAT の培養上清中に、細胞間のインターアクションに関与するエクソソームが高純度に確認され、その内部に T リンパ球の増殖抑制や制御性 T 細胞分化抑制に関わるとされる miRNA が確認され、DFAT の分泌するエクソソームは種々の免疫調整作用を有すると考えられた。その内容として T 細胞の増殖を制御する作用が報告されている miRNA-20a-5p、miRNA-17-5p、ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞の分化誘導する miRNA-26a-5p、miRNA-100-5p、Th17 細胞への分化誘導を抑制する miRNA-20b-5p の発現をエクソソーム内に確認しているという内容である。

我々の結果では DFAT 細胞移植により TSG-6 の発現が更新してそれが免疫抑制作用を示すことが腎障害改善のメカニズムの概略であるが、この TSG-6 がどのような形で発現が更新して更に免疫抑制についてどのような役割を担っているかはいくつかの報告があるが、まだ完全には解明できていない<sup>1,2)</sup>。

この in vitro の結果より in vivo においても DFAT 移植がエクソソームを体内に増加させてそれが免疫調整を発揮する仮説を考えた。また近年、間葉系幹細胞がエクソソームの分泌により種々の効果が得られることが報告されている<sup>3,4)</sup>。この DFAT も間葉系幹細胞の一種であり、今回の治療効果のメカニズムがエクソソームによる免疫調整作用である可能性は十分あり得ると考えた。

そこで DFAT とエクソソームについて上記方法の通り追加実験を行った。DFAT の培養上清中や治療マウスの血清内にエクソソームについて検討した。一部結果を以下に記す(図 1 参照)。SEC 法による細胞外小胞抽出キット(qEV)で DFAT 培養上清中のエクソソームを回収した結果、 $6.38 \times 10^9$  個/ml の豊富なエクソソームが確認された。TSG6 に関係ある miRNA として過去の報告では、miR214-5p、miR-1247-3p、miR-326-5p、miR204-3p、miR-23b-3p などがある<sup>5,6)</sup>。今回の我々の検証でも miR-23b-3p は DFAT および培養上清投与で発現亢進を認めており腎と肺でも DFAT 投与で発現亢進を認めていた。今回の結果を受けて今後の方針として、TSG6 関連の miRNA についての定量的解析を real-time 法で施行して治療により有意に変化しているかを検討して、エクソソームによる免疫調整作用が治療効果のメカニズムであるかを検証して、肯定的な結果であれば更には今後細胞を直接投与する細胞治療ではなく DFAT の培養上清から抽出して得られたエクソソームを用いた治療を検討して、細胞治療より免疫原性や催奇形性といった副作用がより少ない創薬としてエクソソームの臨床応用を目指していく。

【図 1】(確認された遺伝子数)

Name	D01- No1plasma (raw) DFAT投与 群	D02- No3plasma (raw) DFAT培養 上清投与 群	D03- No4plasma (raw) 腎炎群	D04- No6plasma (raw) DFAT投与 群	D05- DFATmediu m(raw) DFAT培養 上清群	D06- SCG1Kidne y(raw) 腎DFAT+	D07- SCG1Lung (raw) 肺DFAT+	D08- SCG4Kidne y(raw) 腎DFAT-	D09- SCG4Lung (raw) 肺DFAT-
mmu-miR-214-5p	10.0	9.0	2.0	10.0	81.0	153.0	269.0	202.0	210.0
mmu-miR-1247-3p	63.0	75.0	27.0	97.0	10.0	17.0	12.0	20.0	18.0
mmu-miR-326-5p	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	10.0	7.0	5.0	10.0
mmu-miR-204-3p	10.0	10.0	5.0	5.0	14.0	41.0	13.0	44.0	14.0
mmu-miR-23b-3p	847.0	1001.0	643.0	1560.0	651.0	54550.0	98624.0	47281.0	79636.0

#### 【参考文献】

- 1). Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein ameliorates chronic liver damage by promoting autophagy formation in mice. Sihyung Wang, Chanbin Lee, Jieun Kim, Jeongeun Hyun, Minso Lim, Hyuk-Jin Cha, Seh-Hoon Oh, Yung Hyun Choi and Youngmi Jung. *Exp Mol Med*. 2017 Sep 22;49(9):e380. doi: 10.1038/emm.2017.140.
- 2). TSG-6 Downregulates IFN-Alpha and TNF-Alpha Expression by Suppressing IRF7 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. L. Kui, G. C. Chan, and P. P. W. Lee. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7462945. doi: 10.1155/2017/7462945. Epub 2017 Mar 6.

- 3). Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. DONALD G. PHINNEY<sup>a</sup> MARK F. PITTENGER<sup>b</sup>. *Stem Cells*. 2017 Apr;35(4):851-858. doi: 10.1002/stem.2575. Epub 2017 Mar 10.
- 4). Secretomes from Mesenchymal Stem Cells against Acute Kidney Injury: Possible Heterogeneity. Kenji Tsuji , Shinji Kitamura , and Jun Wada. *Stem Cells Int*. 2018 Dec 16;2018:8693137. doi: 10.1155/2018/8693137.
- 5). Upregulated TSG-6 Expression in ADSCs Inhibits the BV2 Microglia-Mediated Inflammatory Response. Yang Hu, Gaigai Li, Ye Zhang, Na Liu, Ping Zhang, Chao Pan, Hao Nie, Qi Li , and Zhouping Tang. *Biomed Res Int*. 2018 Nov 21;2018:7239181. doi: 10.1155/2018/7239181. eCollection 2018.
- 6). Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells. Takashi Miyaji, Taro Takami, Koichi Fujisawa, Toshihiko Matsumoto, Naoki Yamamoto and Isao Sakaida. *J Clin Biochem Nutr*. 2020 May;66(3):213-223. doi: 10.3164/jcbn.19-125. Epub 2020 Mar 6.

## 令和 2 年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 3 年 4 月 23 日

日本大学学長 殿

氏 名： 中山 洋平  
資格・所属： 松戸歯学部・准教授  
実施研究所： 松戸歯学部・口腔科学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

歯周疾患関連全身疾患を特定する唾液バイオマーカーによるヘルスケアシステムの開発
---

2 研究期間

令和 2 年度～令和 3 年度 / 令和 年度

3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 究 代 表 者	中山 洋平	松戸歯学部・准教授	研究統括, 歯周病検査, サンプル採取, RNA 抽出
研 究 分 担 者	小林 良喜	松戸歯学部・助教	ELISA 解析
	小方 頼昌	松戸歯学部・教授	データ解析
	北野 大輔	医学部・助教	サンプル採取
	大山 勝徳	工学部・准教授	統計解析
	荻原 淳	生物資源科学部・教授	プロテオーム解析

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ③】・【達成度：40%】

#### 5 研究目的

身体状況を把握するための唾液バイオマーカーを検索する。慢性歯周炎関連全身疾患の患者（主に循環器内科で定期検診を受けている、糖尿病、虚血性心疾患、メタボリックシンドロームの患者）を対象として、慢性歯周炎臨床パラメーター、血液検査データと網羅的に解析した唾液データの変動項目について、機械学習により検証する。同じ被験者で評価することで唾液による身体状況の変化を明らかにする基盤情報を構築する。

身体状況を把握するための生体試料として血液、尿、便などが用いられるが採取時に医療感染リスクや心理的抵抗感が患者と医療従事者に生じることから、非侵襲的に自己採取が可能である唾液は生体試料として有用である。他の生体試料と同様に唾液中には核酸やタンパク等が含まれており、これらの成分を測定することで身体状況を把握することは、個別化した疾患予測や健康管理、様々な疾患の早期診断への応用が期待でき、新規マーカーで補完したヘルスケアシステムの構築ができると考えている。

#### 6 研究概要

バイオマーカーは通常の生物学的過程・病理学的過程などの指標として、客観的に測定され評価される特性と定義され、生化学検査、血液検査、腫瘍マーカーなどの各種臨床検査値や画像診断データなどが含まれ、診断・予後・予測・モニタリングなどの様々な種類がある。生体情報を得る手段として、唾液は非侵襲的で簡便かつ反復して自己採取が可能であり、臨床応用が期待されている。

唾液バイオマーカーによる評価として、①ストレス評価（コルチゾール、 $\alpha$ -アミラーゼ、クロモグラニン A, IgA）、②心疾患発症の評価（C 反応性タンパク（CRP））、③癌の診断評価（サイトカインや核酸）があるがいずれも実用化には至っていない。2018 年にアメリカ歯周病学会（AAP）から発表された歯周炎の新分類では、現在の病態をステージ、現在に至るまでの進行度をグレードとして評価している。グレードの全身バイオマーカーの 1 つとして高感度 CRP が導入され、その変動と慢性歯周炎の病態変化の相関性が注目されている一方、局所のバイオマーカーについては記載がない。

唾液と血液成分の変動は日常生活において、食習慣（栄養状況）や運動習慣により変動することが報告されている。また、継続的な食品の摂取による唾液性状の変化も報告されているが、全身および口腔内状態と血液成分の長期変動と相関関係があるかは不明である。本研究では循環器内科に通院する慢性歯周炎患者を対象とし、慢性歯周炎重症度、唾液バイオマーカーと血液バイオマーカーの変動について相関性を検索するために、歯周組織検査、血液検査、質問票データを統合して統計解析を行い、相関のあるパラメーターを検索する。その代表的な患者群の唾液中バイオマーカーをプロテオーム解析にて検索する。その結果から、慢性歯周炎の病態変化やその他の生活習慣、全身疾患マーカーを反映する唾液成分を補完することができれば、慢性歯周炎の



重症化予防に繋がる唾液バイオマーカーのみならず、各疾患への新規マーカーとして臨床応用が期待できる。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

### ①患者サンプル採取

生命倫理については、日本大学医学部倫理委員会および松戸歯学部倫理委員会にて研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている (RK-191210-3)。

令和 3 年 3 月までに、日本大学付属板橋病院循環器内科に通院している患者を対象に、53 名 (男性 39 名、平均  $67.3 \pm 8.44$  歳、女性 14 名、平均  $66.3 \pm 18.6$  歳) のサンプル採取が終了している。血液生化学検査 (主に循環器疾患の項目)、歯周病検査 (動揺度、歯周ポケット深さ、プロービング時の出血 (BOP)、アタッチメントレベル、口腔清掃状態)、無刺激唾液の採取、Mini-Mental State Examination (MMSE、認知症テスト)、質問票 (別紙：食習慣、運動習慣、睡眠習慣) のデータを得た。また、血液生化学検査から異常値を抽出し、循環器疾患 (高血圧症、高脂血症、動脈硬化症) の紐付けを行った。投薬状況についても同様に紐付けした。

唾液は無刺激唾液を採取した。時間帯は午後 12:30~16:00 とし、最大 20 分間を目安に唾液採取を行った。平均唾液採取量は 3.867 mL、平均唾液採取時間は 568 秒、平均唾液流速は 0.410 mL/min であった。唾液流速安静時 0.1 mL/min 未満を唾液分泌低下症と定義し、唾液分泌低下症に該当する患者数は 5 名であった。

### ②歯周病データからの慢性歯周炎の診断および各種パラメーターの算出

口腔内審査および歯周病のデータから、歯周病の分類 (広汎性および限局性、重症度、ステージ、グレード)、残存歯数、平均歯周ポケット深さ (mm)、歯周ポケット値 (1~3 mm、4~5 mm、6 mm 以上) の各種割合、平均アタッチメントレベル (mm)、プロービング時の出血 (BOP) の割合 (%), 歯周ポケット面積 (Periodontal Epithelial Surface Area : PESA)、歯周ポケット炎症面積 (Periodontal Inflamed Surface Area : PISA)、動揺歯数の割合 (%), 白歯欠損歯数、アイヒナーの分類を算出した。

各患者の歯周ポケット最深部位と最浅部位から歯肉溝浸出液を採取した。簡易防湿後、歯周ポケット内に 30 秒間ペーパーポイントを挿入し、これを各部位 2 回行った。歯周炎バイオマーカーの候補タンパク質を決定後、ELISA 法にてタンパク質の検出に使用する予定である。

### ③RNA 抽出

600  $\mu$ l の唾液を使用して、全 RNA を Total RNA Purification Plus Kit (NORGEN) にて抽出した。プロテオーム解析の結果を参考に標的遺伝子を決定し、Real-time PCR を行う予定である。

### ④唾液タンパクの定量

被験者から採取した唾液を使用して、プロテオーム解析の結果を参考に標的タンパクを決定し、ELISA 法にて定量化を行う予定である。既知のタンパク成分については市販されている ELISA キットを用いるが、新規性の高い場合は検出用の抗体を最適化することで対応する。唾液成分はサーカディアンリズムにより変動することや性差、年齢によって流速が異なることで補正が必要となることから、BCA 法を用いて全唾液中のタンパク量を測定し各タンパク成分の産生量を補正する。もしくは単位時間あたりの分泌量から算出する。

## 〔7 研究結果 (つづき)〕

## ⑤プロテオーム解析

500  $\mu$ l の唾液から Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Kit (Thermo) を使用してタンパク質精製した。アセトン沈殿後、BCA 法により定量した。1 レーンあたり 10  $\mu$ g のサンプルを使用して、1 次元 SDS-PAGE によって分画し、ゲルを 12 断片程度に分画、網羅的に切り出して脱色した。システイン残基還元アルキル化、Trypsin ゲル内消化、ペプチド抽出の行程後、各画分のペプチド断片を Nano LC-ESI-MS/MS (Qexactive) によって分析した。Search Engine には SEQUEST HT with Percolator (FDR : False Discovery Rate, < 1%) を使用し、データベースには Human fasta from NCBI Protein fasta data base および Uniplot human protein fasta data base Proteome Discoverer 2.3 を用いた。発現タンパク質の LFQ (ラベルフリー半定量) 解析, volcano plot による二群間比較解析により各群のタンパク質成分の比較を行った。現在、代表的な歯周病群 (n = 4) と非歯周病群 (n = 4) の解析を行った。疾患別にも紐つけしているため、心疾患、腎疾患、脂質代謝異常などの区分けでも解析した。

歯周病患者と非歯周病患者の発現タンパク質成分を volcano plot にて解析した結果 (図 1)、歯周病患者で 2 倍以下の発現が低いものは 104 種で、それらのうち歯周病患者特異的なものは 48 種であった。非歯周病患者で 2 倍以上のものは 84 種で、これらのうち非歯周病患者特異的なものは 10 種であった。また、uniprot KB データのアノテーション情報から既知の情報として疾病との関連性が明らかになっているものを検索した結果、歯周病患者では 16 種、非歯周病患者では 7 種であった。虚血性心疾患の有無 (有 : AST, ALT, CK, NTproBNP いずれか上限超え)、腎疾患の有無 (有 : UN, Cr, UA, CK いずれか上限超え) および脂質代謝異常の有無 (有 : LDL および中性脂肪いずれか上限超え) についても同様の解析を行った。その結果、虚血性心疾患患者で特異的に増加したものは 45

種、非虚血性心疾患患者特異的なものは 14 種、腎疾患患者特異的に増加したものは 97 種、非腎疾患患者特異的なものは 5 種、脂質代謝異常患者で特異的に増加したものは 12 種、非脂質代謝異常患者で特異的なものは 51 種であった。患者リクルートを継続し、各疾患グループにデータ追加および解析をする。さらに歯周炎パラメータと相関性の高い問診表データを統計解析で抽出し、グループ化してプロテオーム解析を行う予定である。

## ⑥機械学習による検証

歯周疾患関連疾患と関連の高い生活習慣病を唾液タンパクにて検証を行うために、被験者より採取した臨床パラメータ (歯周組織検査・血液検査データ) から、クラスター形成解析 (次元削減, クラスタリング法, ポジションマップ作成および各疾患群のグループ化) および相関係数の算出により、各種パラメータの関連性を解析している。

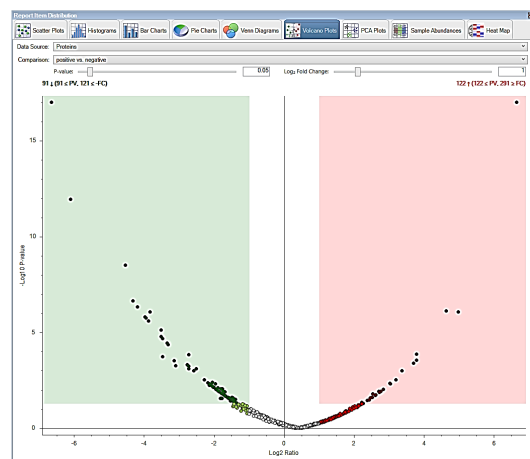


図 1 volcano plot 解析 (歯周病 VS 非歯周病)

## 〔7 研究結果（つづき）〕

歯周炎パラメーター（歯周ポケット深さ、アタッチメントレベル、アイヒナーの分類、残存歯数、PISA、PESA など 27 種）に関連が深い身体データ（性別、年齢、身長、体重、BMI、血液検査データ 22 種、喫煙関連 8 種、MMSE）を検索するため、歯周炎パラメーター含めて相関行列を作成した（予備解析時 n=42）。その結果、PISA と相関が高い血液検査データ項目が抽出された。

## ⑦血液検査データ

本研究に同意を得た被験者から採取した血液検査データから（1）一般検査、（2）肝機能検査、（3）腎機能検査、（4）糖質代謝機能検査、（5）脂質代謝機能検査、（6）心機能検査について解析を行った。男性被験者では肝機能検査項目（AST、ALT）、糖質代謝機能検査（HbA1c）、脂質代謝機能検査（HDL、TG）、腎機能検査（Cr）、心機能検査（hs-CRP、TropT、NTproBNP）について、基準値より高い値を示す傾向が認められている。

## ⑧生活習慣データ

被験者から質問票形式にて生活習慣（食事・運動・睡眠）についてデータを収集したところ、以下の通りの結果を得た。（1）食習慣：被験者の多くは主食として「ごはん」を摂取し、主菜では「肉類（鶏肉、豚肉、牛肉）、卵類やだいずや大豆製品」などを多く摂取していることが認められるが、「魚介類（いか・貝、いわし・さば）」等の摂取は少なかった。副菜では「野菜類・海藻類・きのこ類」は平均的に摂取していることが認められた。（2）運動習慣：被験者の多くは 3 時間以上 8 時間未満を座る時間にあて、「歩くもしくは立っている」時間は 1 時間以上 3 時間未満であった。労働時間も「1 時間未満」もしくは「していない」ものがほとんどであった。他方で、口腔内については「噛んで食べる」ことができ、「むせることはない」ものがほとんどであり、咀嚼・嚥下活動は問題ないことが考えられる。（3）休息習慣：約半数は 5 時間以上 8 時間未満の睡眠習慣があり、「充分」もしくは「まあまあとれている」と感じている。

## ⑨認知症テスト（Mini-Mental State Examination, MMSE）

歯周疾患関連疾患として認知症との関連性を検討するために被験者に MMSE テストを実施し採点結果を収集した。女性は健常（28 点以上）もしくは軽度認知障害（24～27 点）であったが、男性被験者のうち数名は軽度認知症（23 点以下）が認められた。

## 【現在までの考察】

慢性歯周炎と関連性がある全身疾患として多くの報告がある。相互的に悪化させる糖尿病をはじめ、慢性歯周炎によって悪化する虚血性心疾患（動脈硬化症）、誤嚥性肺炎、慢性腎炎（相互作用の可能性はある）、認知症および関節リウマチについては、エビデンスレベルに差があるものの、臨床研究および細胞・分子メカニズムからのエビデンスが示されている。しかし、これらの重症度やリスクの大きさを判断する指標は、歯科臨床の場では得られない。今回の唾液プロテオーム解析の結果、慢性歯周炎の重症度、心疾患、腎疾患および脂質代謝異常の有無で、検出レベルに有意差が生じたタンパク質が多く存在した。これらの結果は、疾患別に特異的な唾液バイオマーカーの存在を示唆するものである。患者のリクルートを継続し、各種疾患のサンプル数を増やし、プロテオーム解析の追加解析を行う予定である。

## 令和2年度 学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和3年4月1日

日本大学学長 殿

氏 名：辻 泰弘

資格・所属：薬学部・薬剤師教育センター

実施研究所：薬学部・薬学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

疾患の解明と個別化投与を成功に導く人工知能と薬物動態の異分野融合アプローチ

## 2 研究期間

 令和2年度～令和3年度 /  令和 年度

## 3 研究組織

	氏 名	部科校・資格	役割分担
研 代 表 者	辻 泰弘	薬学部・教授	<ul style="list-style-type: none"><li>研究計画の立案および実施などの研究総括</li><li>データ集</li><li>情報集約と総合的な解析・情報発信</li></ul>
研 究 分 担 者	細野 裕行	理工学部・教授	<ul style="list-style-type: none"><li>人工知能を利用した情報の解析</li><li>研究実施で生じた問題の解析</li></ul>
	松本 宜明	薬学部・教授	<ul style="list-style-type: none"><li>薬物動態解析</li><li>人工知能を組み込んだ投与設計モデルが患者治療に及ぼす影響の調査</li><li>研究結果の妥当性の評価</li></ul>
	関 弘翔	理工学部・助教	<ul style="list-style-type: none"><li>人工知能を利用した情報の解析</li><li>研究実施で生じた問題の解析</li></ul>

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 50 %】

#### 5 研究目的

薬物治療の最終ゴールは、患者における医薬品の有効性・安全性を担保することである。非臨床データからヒトへのブリッジング、患者集団という不均一な集団における薬剤応答性の個人間の変動を解明することは大きな課題である。このような状況下、情報科学と生命科学の分野に革命が起こっている。それが人工知能 (AI)、特に深層学習 (ディープラーニング) と呼ばれる技術の登場である。ディープラーニングは、人間の脳を作っている神経経路の基本部位であるニューロンとシナプスの働きにヒントを得て作り上げられたニューラルネットと呼ばれる数学モデルである。そのニューラルネットを多層に、そして複雑な経路として積み上げ、大量のデータを使い学習させることにより、これまで専門家による分析や匠の経験に頼っていた特徴抽出やパターン認識分析を自動的に行うことが可能になってきた。しかし、多くの AI は高精度な反面、予測モデルは複雑であり、出力の根拠 (生命科学としての根拠) を明確に提示することが困難である。そこで申請者らは、AI のブラックボックス性を改善できれば、疾患の特定や薬剤選択に科学的根拠に基づく理由付け・裏付けが可能になると仮説を立てた。

本研究の目的は、臨床試験データおよびリアルワールドデータ (RWD) を基盤に『薬物体内動態』と『深層学習手法』を新機軸とし、画期的な医療機器プログラムを開発することである。

#### 6 研究概要

##### 網羅的な医療情報と AI を融合する異分野横断型研究

本研究は、個別化医療に AI の技術を応用する足掛かりとなることが期待される。海外に先駆け 2 課題に取り組み、疾患の解明と次世代の薬物個別化投与設計手法を実現する。

①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索と至適投与薬剤の提案

②ディープラーニングによる薬物血中濃度・治療効果の個別化モデル

令和 2 年度は当初の計画通り、「①ランダムフォレストを用いた疾患の原因に関する共変量探索と至適投与薬剤の提案」に焦点をあて 2 つの研究課題を実施した。研究結果の詳細は「7. 研究結果」に記す。

##### ①-1 機械学習に基づく分類木を用いたリネゾリド誘発血小板減少症予測

リネゾリド誘発性血小板減少症を予測する投与早期の予測因子及びカットオフ値を機械学習の一つである分類木により同定した。

##### ①-2 ビッグデータを用いた 2 型糖尿病治療薬の併用効果の検証

2 型糖尿病治療薬の第一選択薬として繁用されているメトホルミンが他剤の有効性 (あるいは安全性) の反応に、どの程度影響しているのかを 355,400 人の医療情報データから包括的に数理モデル解析した。

## 7 研究結果 (4,000 字以上記入のこと)

### ①-1 機械学習に基づく分類木を用いたリネゾリド誘発性血小板減少症予測<sup>1)</sup> (研究終了)

#### 背景

機械学習は教師あり学習データまたは教師なし学習データを用いた予測分析に応用されている。ファーマコメト릭スにおいて機械学習は治療効果やプロテオミクスバイオマーカー、治療前のベースラインの背景情報などの予後予測因子の探索に用いられてきた。機械学習の中でもランダムフォレストやサポートベクターマシンは精度が高く、様々な分野の意思決定に使用されている一方で、解析過程がブラックボックスであるため臨床現場での実践は難しい。母集団薬物動態解析も機械学習のアルゴリズムで解析されている。機械学習の一つである分類木及び回帰木による分析は、解析結果の解釈が容易であり、診断や安全性の予測に直接使用できる点で他の機械学習の手法より有用である (図 1)。リネゾリドはオキサゾリジノン系の合成抗菌薬であり、院内肺炎、市中肺炎、骨髄炎を伴わない糖尿病性足感染症を含む複雑性皮膚及び皮膚組織感染症、非複雑性皮膚及び皮膚組織感染症並びにバンコマイシン耐性腸球菌に適応がある。リネゾリド投与は、12 歳以上に対しては 1 回 600 mg を 12 時間ごと経口又は静脈内投与で、年齢や体重、腎機能、肝機能による用量の調節は不要とされている。リネゾリドの重篤な副作用として、血小板減少、貧血、白血球減少などの汎血球減少が知られており、とくに血小板減少症の発現に、リネゾリドの曝露量が関連していることが報告されている。リネゾリド投与時において血小板減少症は一般的な副作用であり約 50% の患者で認められる。血小板減少は、患者の安全性にとって重要な事象であり、リネゾリド投与中止にもつながり、治療に難渋しているのが現状である。

決定木分析：木の様な構造を持つ分類方法。不純度が低下するように分類し木を成長させた後、誤り率と木の複雑さによって木を剪定する。

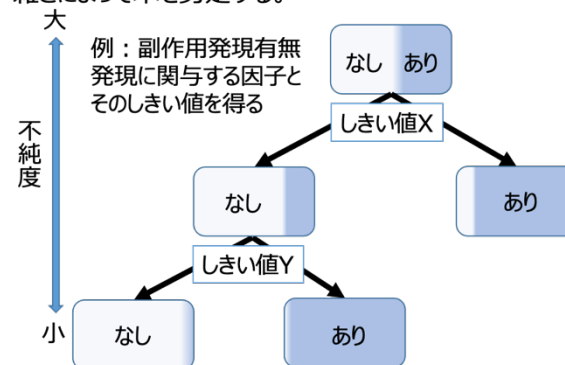


図 1 決定木分析

#### 目的

本研究では機械学習に基づいてリネゾリド誘発性血小板減少症を予測する投与早期の予測因子及びカットオフ値を分類木により同定することを目的とした。

#### 方法

リネゾリドの血清及び血漿中濃度を含む臨床データは、2 歳以上かつリネゾリドの投与期間が 7 日間以上であり、投与前の血小板数が 75,000 / $\mu$ L 以上の患者を対象とした。また、リネゾリド投与開始から 28 日以内に投与前の血小板からの変化が 100% を超えた患者は解析対象から除いた。開始用量は腎機能と体重により医師の判断で決定した。リネゾリド曝露と骨髄抑制の防止のため、継続した薬物濃度モニタリングを実施した。本研究は富山大学及び日本大学の倫理審査委員会の承認のもと (富山大学：承認番号 R2012133 revised、日本大学薬学部：承認番号 20-005)、ヘルシンキ宣言に則り実施した。

リネゾリド濃度は、高感度液体クロマトグラフィーHPL(島津製作所、京都、日本)を使用した。リネゾリド粉末(CAS番号; 16800033)はToronto Research Chemicals, Inc.,より購入し、そのほかの試薬は分析グレードで市販品を使用した。オクタデシルシランハイパーシルカラムを使用した。移動相は1%のオルトリン酸、30%メタノール及び2g/Lのヘプタンスルホン酸ナトリウムを用いた。流速は1.0 mL/min, 紫外検出波長は254 nmであった。リネゾリドの定量下限は0.1 mg/Lであった。

個別のベイズ推定値をもとにリネゾリドの薬物濃度と血小板数を予測した。シミュレーションには実際に投与された用法用量を使用した。投与時間及び採血時間は様々であったため、トラフのリネゾリド濃度及び血小板数は規定した時間(24, 48, 72, 96, 120時間)に採血されたと仮定した。

血小板減少の予測候補因子は、投与後24, 48, 72, 96及び120時間後のリネゾリド薬物濃度及び血小板数、投与前の血小板数、年齢、性別、体重並びにクレアチンクリアランスの推定値とした。血小板減少の定義は、投与開始から14日以内に発現した25%以上の血小板減少とした。分類木による分析はR version 3.5.1のパッケージ「rpart」を使用して実施した。分類木の分岐にはGini係数を用いた。分類木は木のコスト及び複雑性に基づき剪定した。最終的な木のモデルは、最も再代入誤り率が低いものを選択した。分類木の妥当性はLeave-one-out法により評価した。

## 結果

74例中51例(約68.9%)の患者で14日以内に25%以上の血小板減少が認められた。表1は検討した予測因子の組み合わせ、選択された予測因子及び誤分類率を示した。最も低い誤分類率を示したのは、No.10の分類木であり、誤分類率は0.122であった。最終的に選

表1 機械学習に基づく決定木分析

No.	検討を行った予測因子	選択された因子			終末ノ ドの数	誤り率
		1st	2nd	3rd		
1	体重, 年齢, 性別, 投与前の血小板数, $CL_{Cr}$ (以降、背景情報)	年齢	$CL_{Cr}$	年齢	4	0.203
2	投与1日後の $C_{min}$ ( $C_{min}$ 24h), 背景情報	$C_{min}$ 24h			2	0.203
3	投与2日後の $C_{min}$ ( $C_{min}$ 48h), 背景情報	$C_{min}$ 48h	体重		3	0.162
4	投与3日後の $C_{min}$ ( $C_{min}$ 72h), 背景情報	$C_{min}$ 72h			3	0.203
5	投与4日後の $C_{min}$ ( $C_{min}$ 96h), 背景情報	$C_{min}$ 96h	$C_{min}$ 96h	体重	3	0.162
6	投与5日後の $C_{min}$ ( $C_{min}$ 120h), 背景情報	$C_{min}$ 120h			2	0.162
7	投与1日後の血小板数変化率 (PLT 24h) $C_{min}$ 24h, 背景情報	$C_{min}$ 24h			2	0.202
8	投与2日後の血小板数変化率 (PLT 48h) $C_{min}$ 48h, 背景情報	$C_{min}$ 48h	PLT 48h		3	0.135
9	投与3日後の血小板数変化率 (PLT 72h) $C_{min}$ 72h, 背景情報	PLT 72h	$C_{min}$ 72h		3	0.135
10*	投与4日後の血小板数変化率 (PLT 96h) $C_{min}$ 96h, 背景情報	PLT 96h	$C_{min}$ 96h		3	0.122
11	投与5日後の血小板数変化率 (PLT 120h) $C_{min}$ 120h, 背景情報	PLT 120h	$C_{min}$ 120h		3	0.162

択された分類木を図2に示した。一つ目の分岐は投与96時間後の血小板数の投与前からの変化率であった。カットオフ値は-2.3%であった。この分類は投与96時間後の血小板数の変化率が-2.3%を下回る場合は血小板減少になるリスクが高いことを示している。43例の患者が該当しそのうち40例の患者で投与開始から14日以内に25%以上の血小板減少を示した。31例の患者は投与96時間後の血小板数の変化が-2.3%を下回らなかった。二つ目の分岐は、投与96時間後のリネゾリドの薬物濃度でありカットオフ値は13.5 mg/Lであった。投与96時間後のリネゾリドの薬物濃度が13.5 mg/L以上の場合、血小板減少のリスクが高いことを示している。31例中22例の患者で投与時間96後のリネゾリドの薬物濃度が13.5 mg/Lよりも低く、Node 3に分類さ

れた。そのうち 18 例の患者は分類通り血小板減少を示さなかった。31 例のうち 9 例の患者で投与 96 時間後のリネゾリドの薬物濃度は 13.5 mg/L 以上であり、Node 4 に分類された。そのうち 7 例の患者において血小板減少が認められた。分類木の特異度及び感度はそれぞれ 78.3% 及び 92.2% であった。最終的に選択された分類木において Leave one out 法による妥当性評

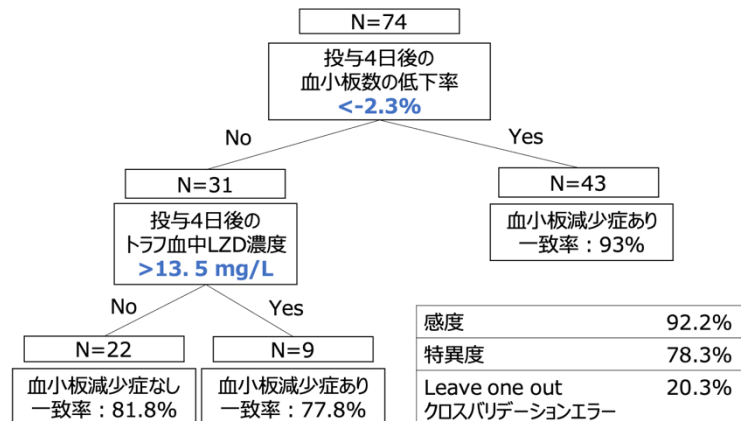


図 2 リネゾリドの血小板減少を予測する決定木

価を実施した。74 回の解析のうち 6 回のみで異なる予測因子が選択された。Leave one out によるクロスバリデーションエラーは 20.3% であった。

## 結 論

本研究は、機械学習の一つである分類木により、血小板減少の発現前にリネゾリド誘発性血小板減少症を予測可能する因子を調べた初めての研究である。今回の結果から、リネゾリド誘発性血小板減少症を予測する、治療介入が必要なターゲットは投与開始から 96 時間後の血小板のベースラインからの変化が -2.3% を下回った場合と、リネゾリドの薬物濃度が 13.5 mg/L 以上の場合であることがわかった。血小板減少が発症する前の血小板及びリネゾリド薬物濃度はモニターすべきである。また今回の結果から、薬物濃度及び血小板数に基づく治療介入は血小板減少症のリスクを低減することが期待される。

本研究は令和 2 年 12 月に投稿し、令和 3 年 2 月に査読付き英文誌にアクセプトされた。

Classification tree analysis based on machine learning for predicting linezolid-induced thrombocytopenia, J Pharm Sci, in press

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.02.014>

## ①-2 ビッグデータを用いた 2 型糖尿病治療薬の併用効果の検証（実施途中）

### 背 景

リアルワールドデータ (RWD)、いわゆるビッグデータとは、電子カルテなど電子的な患者情報、医療機関や調剤薬局から出される診療報酬明細書 (レセプト) データ、大規模コホート研究データなど、様々な情報源から収集される患者データのことである。近年、臨床試験だけでは分からなかった治療や医薬品の実効性・安全性や費用対効果などの顕在化を目的に、薬事規制において RWD の利活用に関する国際的な議論が重ねられている。



糖尿病は、インスリンが十分に働かないために、血液中を流れるブドウ糖（血糖）が増加する疾患である。血糖の濃度（血糖値）が高いままで放置されると、血管が侵襲をうけ、将来的に心臓病や、失明、腎不全、四肢切断など重篤化（糖尿病の慢性合併症）することが知られている。インスリンは膵臓から出るホルモンであり、血糖を一定の範囲におさめる働きを担っているが、糖尿病を発症するとインスリンが十分に機能せず、血糖を細胞に取り込めなくなるため、血糖異常を引き起こす。糖尿病は発症の原因によって、「1型」と「2型」、「その他」、「妊娠糖尿病」に分類される。特に「2型」糖尿病は、遺伝的な要因に運動不足や食べ過ぎなどの生活習慣が加わって発症すると考えられているが、明確な原因は明らかになっていない。糖尿病患者の95%以上が2型といわれており、中高年に多く発症する。2型糖尿病では、インスリンは分泌されているものの、働きが悪くて血糖値が下がらない（インスリン抵抗性）場合や、分泌そのものが減っている（インスリン分泌低下）場合がある。高血糖が是正できない場合は、運動療法や食事療法を基本しつつ薬物療法を展開する。2型糖尿病治療薬は6つの種類（ビッグアニド薬、チアゾリジン薬、SU薬、グリニド薬、DPP-4阻害薬、 $\alpha$ -GI、SGLT2阻害薬）に大別され、患者の症状や病態に合わせて選択されている。欧米の糖尿病治療ガイドラインには、有効性およびコスト優位性から2型糖尿病の第一選択薬としてメトホルミンが推奨されている。一方で、本邦の糖尿病診療ガイドラインにおいて第一選択薬は特定されておらず、病態に応じた薬剤選択が推奨されている。日本で最も普及している一次2型糖尿病治療はDPP-4阻害薬でありメトホルミンがそれに続く。メトホルミンは他の糖尿病治療薬との併用もガイドラインにて提案されており、DPP-4阻害薬とメトホルミンの併用療法による早期介入は、メトホルミン単剤療法と比較して長期的利益をもたらす報告がある。しかし、メトホルミンに他の血糖降下薬を併用した際の血糖降下作用の程度に関して、実臨床データを用いた各薬剤クラスの系統的なレビューの報告は限定的である。

## 目的

2型糖尿病治療薬の第一選択薬として繁用されているメトホルミンが他剤の有効性（あるいは安全性）の反応に、どの程度影響しているのかを医療情報データから包括的に数理モデル解析した。

## 方法

2型糖尿病の患者データおよび医療情報は、メディカル・データ・ビジョン株式会社より購入した。2型糖尿病（ICD10：E11-E14）かつ検査値を保有している患者数は約35万人、約5億レコードを一次抽出した。ここから、糖尿病治療薬が処方された患者数は17.5万人とHbA1cの検査値を保有している患者数は約16万人を二次抽出し、糖尿病治療薬の処方開始月にHbA1cの検査値をベースラインとして保有している約10万人の患者を本研究の対象とした。HbA1cはヘモグロビンにブドウ糖が結合した割合を示すものであり、採血時から遡って過去1~2ヶ月間の実測の血糖値の平均がHbA1c値と相関していることが知られている。すなわち直近の食事や運動の影響を受けずに、過去1、2か月間の平均的な血糖の状態を反映する値として診断に利用されている。本解析における糖尿病の治療効果の指標にはHbA1cを用いた。本研究では、各薬

剤クラスにおいて単剤治療が実施された単剤コホート、メトホルミン治療に各薬剤を併用追加したメトホルミン併用コホートの2つのコホートを設定した。

## 結果

メトホルミンが最初に処方された患者数 1.1 万人のうち、メトホルミン単剤療法からメトホルミン併用療法に移行した患者数は 4,685 人であり、そのうち HbA1c のデータを併用開始月に保有している患者数は 3,884 人であった。当該患者集団をメトホルミン併用コホートとした。併用された薬剤は DPP-4 阻害薬が最も多かった。図 3 にメトホルミンに他の薬剤を併用した際の併用開始時点からの HbA1c の変化量の推移を示す。HbA1c 減少効果は、GLP-1Ra が最も血糖降下作用が高く約-2%の減少、その他の薬剤は約-1%程度で、単剤療法よりも HbA1c 減少効果が高くなっている傾向にあった。

単剤療法での HbA1c 減少効果が小さかった原因のひとつとして、MDV データベースは転院患者を新たに登録された患者と認識される点が挙げられる。つまり、既に糖尿病治療を受けている患者が転院により MDV データベースに登録され、登録時点から糖尿病治療が開始されたとみなされ、単剤療法の HbA1c 減少効果を過小評価している可能性があった。本 MDV データベース内で糖尿病に罹患

し糖尿病治療薬が処方された患者を対象とするために、Look-back period (あらゆる薬剤が処方開始された日と糖尿病治療薬が処方開始された日の差分)を 60 日間と設定し、Look-back period を適用後に抽出した約 3.6 万人を単剤コホートと再定義した。

Look-back period を適用

した単剤療法での HbA1c の減少効果は、Look-back period を適用しなかった単剤療法に比べ、どの薬剤クラスにおいても高くなった。

次に、薬剤クラスごとに、単剤療法した際とメトホルミン併用した際の HbA1c のベースラインからの HbA1c の変化量の推移を比較すると、概ね同程度の変化量であった。このことは、メトホルミンに他剤を併用した場合、HbA1c の減少効果は相加効果の関係であることを示唆した。

## 課題

HbA1c の減少効果を予測する数理モデルを構築することに加え、AI に患者の背景情報、各薬剤や合併症の組み合わせを変数として組み合わせて糖尿病治療薬の効果を予測できる手法を開発したいと考えている。

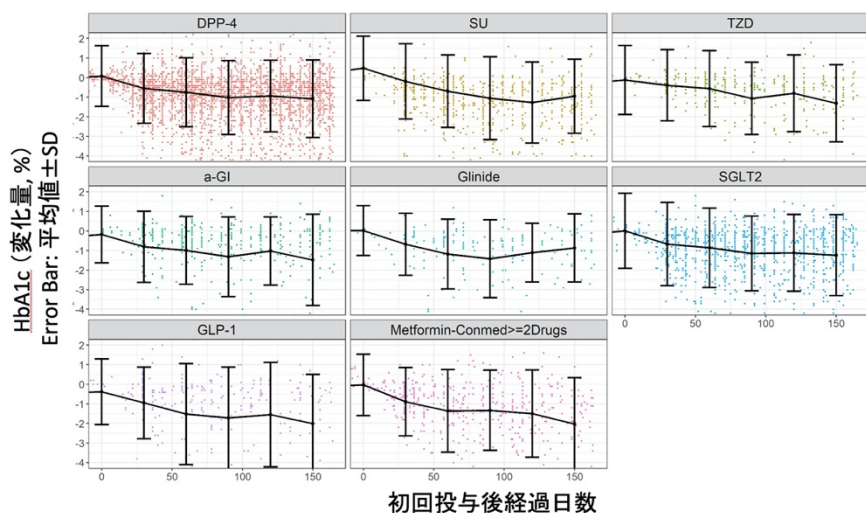


図 3 メトホルミンの他剤併用による HbA1c の変化量

6,800 文字