

### CONTENTS

●ごあいさつ

●プロジェクト研究(2015年～2017年)  
「質の高い健康長寿をめざす健康科学」の成果報告

おいしさと健康に留意した調理の理論と実践…………… 2

|       |              |       |
|-------|--------------|-------|
| 研究代表者 | 健康栄養学科・教授    | 山本 隆  |
| 研究分担者 | 健康栄養学科・教授    | 小西洋太郎 |
|       | 健康栄養学科・教授    | 上地加容子 |
|       | 健康栄養学科・特任助教  | 峰松 祐至 |
|       | 健康科学研究科・修士課程 | 水田 晴野 |

生体機能を改善する食品由来成分

およびその作用機序の解明…………… 5

|       |            |       |
|-------|------------|-------|
| 研究代表者 | 健康栄養学科・教授  | 栢野 新市 |
| 研究分担者 | 健康栄養学科・准教授 | 永澤 健  |
|       | 健康栄養学科・准教授 | 村木 悦子 |
|       | 健康栄養学科・助教  | 松村 羊子 |

疾患モデル動物を用いての効果的な運動介入法の探究…………… 7

|       |                |       |
|-------|----------------|-------|
| 研究代表者 | 理学療法学科・教授      | 今北 英高 |
| 研究分担者 | 理学療法学科・教授      | 峯松 亮  |
|       | 理学療法学科・助手      | 西井 康恵 |
|       | 健康科学研究科・博士後期課程 | 岡田 圭祐 |
|       | 広島大学大学院・講師     | 藤田 直人 |
|       | 日本大学大学院・助教     | 鷲木 新  |

アンチエイジング戦略の疫学的・実証的研究…………… 10

|       |                     |       |
|-------|---------------------|-------|
| 研究代表者 | 健康栄養学科・教授           | 金内 雅夫 |
| 研究分担者 | 看護医療学科・講師           | 鷲尾 弘枝 |
|       | 健康栄養学科・助教           | 柴田 満  |
|       | 健康科学研究科・博士後期課程      | 岩村 真樹 |
|       | 国立循環器病センター研究所・流動研究員 | 竹下 大輔 |
|       | 健康科学研究科・研究員         | 田中 愛佳 |

ヒト早老症の老化モデル細胞の作製と  
加齢に伴って増加するがん発症機構の解析…………… 11

|       |           |       |
|-------|-----------|-------|
| 研究代表者 | 健康栄養学科・教授 | 前原佳代子 |
|-------|-----------|-------|

※所属・職は平成29年度時点

### ごあいさつ

畿央大学健康科学研究所 所長 山本 隆

2018年度の健康科学研究所ニュースレター (vol.8) をお届けします。本号は昨年度終了した第2期の健康科学研究所プロジェクト研究「質の高い健康長寿をめざす健康科学」の3年間(2015～2017年)の成果をまとめた内容となっております。本ニュースレター発刊に先立つ2018年12月13日(木)には、本学P301講義室にて成果報告会を実施しました。冒頭の所長挨拶に引き続き、5つの研究領域からそれぞれの成果報告がなされました。最後には植田政嗣健康科学研究科長・健康科学部長より講評があり今後の更なる研究の発展について期待の言葉をいただきました。会には多くの教員や大学院生が最後まで熱心に参加していただきましたことを感謝申し上げます。

さて、健康科学研究所のメインの活

動ともいえるプロジェクト研究の取り組みは、2012～2014年の開学10周年記念プロジェクト研究に始まり、上記第2期プロジェクト研究に引き続き、さらなる研究の深化のため現在は第3期目のプロジェクト研究(2018～2020)が進行中であります。これらのプロジェクト研究に共通の一貫したテーマは「健康長寿の延伸を目指すための方策」であり、種々の観点から探求を進めております。

研究を大きく2つに分類すれば、先ず、本学の他の研究所、研究センターで進められているような人を対象としたアンケート調査、疫学的な研究、臨床的な研究、教育現場における実証的な研究等があります。一方で、基礎研究ともいえるものがあり、具体的には、解剖学、生理学、生化学、分子生物学、神経科学、遺伝学などのいわゆる基礎医学系に属するものであります。さらには、食物素材の分析的研究も含めることもできます。このような基礎研究

が重要なことは、昨年ノーベル賞を受賞した本庶 佑先生の言葉にもありましたように、基礎的な重要な発見は臨床に応用できる大きな発展に結びつく可能性があるものです。

まさに、本学におけるこのような基礎研究に携わる先生方が、健康長寿という共通の目標に向けて研究を進めるところにプロジェクト研究の醍醐味があります。畿央大学のインキュベーションラボを中心とした研究室に備わっている機器を活用しつつ基礎研究を行うことが畿央大学研究所の使命ではないかと考えております。優れた研究成果は必ずや注目を浴びるもので、産官学の連携もそのような業績があつてこそ成し遂げられるものであります。関連する企業からの共同研究も近年徐々に増加していることを思えば、研究所の活動は順調に進展しているものと思います。今後のさらなる発展のためにも皆様からのより一層のご支援とご協力をお願いしたく思います。

●プロジェクト研究の成果報告

# おいさと健康に留意した調理の理論と実践



**研究代表者**  
山本 隆 健康栄養学科・教授

**研究分担者**  
小西 洋太郎 健康栄養学科・教授 上地 加容子 健康栄養学科・教授 峰松 祐至 健康栄養学科・特任助教  
水田 晴野 健康科学研究科・修士課程

おいしく食べることでできる人は健康である。これは健康長寿を全うするための基本条件である。基礎研究の観点からは、おいしさとは何か、おいさを客観的に評価できるのかといった問いに答えることがまず挙げられる。また、幼少期からの食経験、食育がおいしく食べるためにいかに大切であるか、より現実的な課題として、健康に留意したおいしい食べ物を作るにはどのような食素材を用いるべきか、いかなる物質が重要な役割を演じるのかを明らかにすることも必要である。本研究領域ではこのような課題について研究を進めてきた。

## 1. 脳活動を指標としたおいしさの客観的な評価 (山本、峰松)

各種の飲み物、食べ物を摂取した時の脳活動を記録・分析し、その結果を摂取時に生じる感覚や「おいしい・まずい」の評価と対応させることにより、

脳活動を基にした客観的な評価法を確立することを目的とした。機能的近赤外分光分析法 (fNIRS) を用い、被験者(健康な男女大学生)の前頭部12チャンネル(前頭極、frontopolar cortex、ブロードマン10野相当する部位)から酸素化ヘモグロビン濃度(oxyHb)を計測した。

甘味・苦味溶液を摂取した場合、oxyHbの上昇・低下のパターンは被験者により大きく異なり、一定の傾向を見出すことはできなかった。これは同じ濃度の溶液でも人によって受け止め方が違うからだと考えられる。

好きな食べ物・嫌いな食べ物を摂取した場合、好きな食べ物(飲み物)に対してoxyHbは減少し、嫌いな食べ物(飲み物)に対してはoxyHbは増大する傾向にあった(図1)。

嗜好性の異なる4種のゼリー、すなわち、1)水をゼラチンで固めた味のないゼリー、2)これらに生クリームだけ、3)スクロースだけ、4)スクロースと生クリーム両方を入れたもの

を使用したところ、おいしいと評価したもののほどoxyHbは低下し、有意の負の相関を示した。

以上の実験結果から、被験者がおいしさに浸るとき、そのおいしさに比例してoxyHbは低下する傾向にあることが示された。好きな(おいしい)食べ物を摂取すると、リラックス状態になり、嫌いな(まずい)食べ物を摂取すると、ストレスによる興奮状態になるとも考えられる。fNIRSによる味覚刺激時の前頭極の脳活動の測定は味の客観的な評価法に利用できる可能性のあることが示された。

## 2. 適正な食育を目指すための基礎的研究—フレーバー学習を用いて—(上地)

我々は、幼若期の食経験が成長後の食行動にいかに影響を及ぼすかに関心を持ち研究を進めている。そのための基礎実験として、幼若期ラットがフレーバー学習を獲得できるかどうか、獲得した学習が成長後も保持しているかどうかを調べた。フレーバー学習とは、香り(フレーバー)を有する溶液を摂取させたとき快感を覚えればその香りが好きになり、不快感を覚えればその香りが嫌いになる学習をいう。嗜好学習になるか嫌悪学習になるかは、その溶液をおいしく思うかまずいと判断するのか(味覚)、摂取後の気分が快か不快か(摂取後効果)で決定される。3週齢ラットに、グレープあるいはチェリーの香りづけをした各種濃度のグルコース、フルクトース、ラクトースなどの糖溶液を摂取させた後、グレープとチェリーの香りの水を2ピン法として与え、その飲み量から学習獲

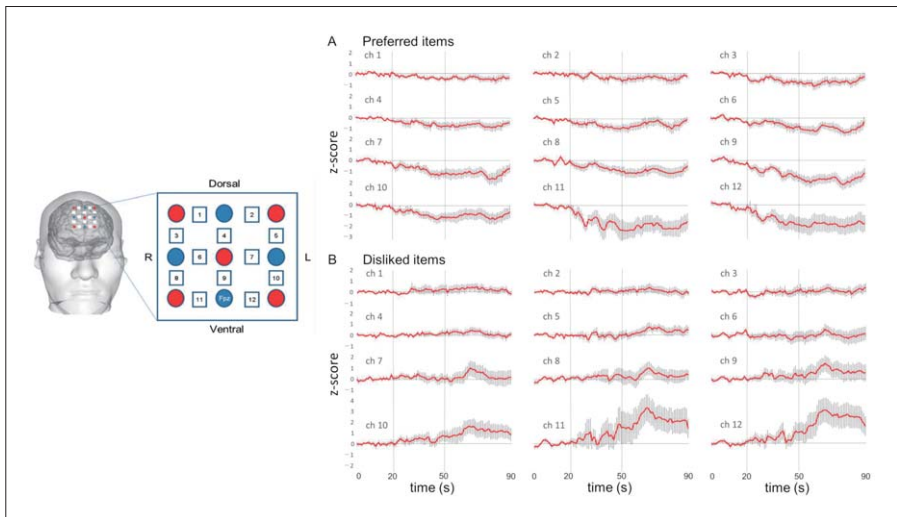


図1 記録部位(左)と好きな食べ物(A)、嫌いな食べ物(B)に対するoxyHb濃度の変化(右)

得能を評価した。糖濃度2%では、スクロース、グルコース溶液と連合した香りに嗜好学習を獲得し、ガラクトース、フルクトース、ラクトース溶液では学習が認められなかった。また、3週齢で学習を獲得したフレーバー嗜好学習は20週齢時にも保持されていた。糖濃度10%では、スクロース、グルコース溶液の場合には嗜好学習を獲得し、ガラクトース、フルクトース、ラクトース溶液の場合は連合した香りに嫌悪学習を獲得した。20週齢時にもその学習を保持していた。これらの結果から、糖の種類と濃度によりフレーバー嗜好学習は獲得されるが、濃度が濃くなると不快感を呈し、嫌悪学習に結び付くこと、その学習効果は成長後まで保持されることが分かった。幼若期特有の食嗜好性を考慮した食事を与えることが重要であることが実証された。

### 3. 減塩食をよりおいしく 増強するための工夫 (山本、水田)

我々は減塩食をおいしくするための工夫を考えているが、その中でしじみの味噌汁はコクがあっておいしいことをヒントに、しじみに多く含まれるオ

ルニチンに着目した。たんぱく質を構成しないこのアミノ酸は、体内ではアンモニアを尿素として解毒する際に重要な役割を演じることがよく知られている。マウスやラットを用いた嗜好実験で、グルタミン酸ナトリウムなどのうま味溶液にオルニチンを添加すると嗜好性が大きく増大し、ヒトの官能評価実験では、減塩味噌汁にオルニチンを添加するとコクが生じることが分かった。一方、オルニチンはGPRC6Aという受容体の強いアゴニストとして知られている。我々は、GPRC6AがII型味細胞に発現することを明らかにし、GPRC6Aのアンタゴニストの作用で動物が示した嗜好性が消失することなどからGPRC6Aはすでに報告されているCaSRとは別のコク味受容体であり、オルニチンの作用でコクを生じることが強く示唆された。現在、オルニチン以外のおいしさ増強物質の探索を進めている。

### 4. 機能性糖質 1,5-アンヒドロ グルシトールの多目的利用法 に関する研究 (小西)

1,5-アンヒドログルシトール (AG) は自然界に広く分布する希少糖である。生体内では $\alpha$ -グルカン (デンプンや

ある。(1)甘味度はスクロースの約60%であり、後味にやや苦味を呈する。(2)水分活性は他の単糖よりも低い。(3)動物実験においてAGは速やかに小腸から吸収されるが、数時間以内に投与量の約60%は尿中に排泄される。また、グルコースとAGの同時投与によって血糖値の上昇が抑制されることから、AGはインスリンを節約し肥満防止効果を有する甘味料として期待される。

本プロジェクト研究において筆者らは、AGの利用法として、多彩な機能性を有する1,5-アンヒドロフルクトース (AF) に着目した。AFはAGのC2位が酸化された還元糖で、抗酸化、抗褐変、抗がん、抗炎症、抗肥満など多岐の機能性を有することで知られている。これまでにAFは、酵母による発酵技術で原料のデンプンから製造されている [日本澱粉工業 (株) (現・サナス)] が、筆者らはAGにピラノースオキシダーゼ (PROD) を作用させAFを作る方法で行った。結果として、最大転換率88%を得る反応条件 (pH4、37°C、一夜) を得た。AFは、加熱処理 (120°C、100分) によってDPPHラジカル捕捉活性を獲得する。さらに興味あることに、PROD反応をpH7、72時間以上行くと、AGのC2位とC3位が酸化された、1,5-アンヒドロ-3-ケト-フルクトース (AKF) が生成される (ほぼ100%)。AKFはAFよりも還元力は弱い (約1/3) が、酵素的褐変阻害活性を有することがわかった。

以上、AGはそれ自体の機能性のみならず、機能性糖AFあるいはAKFの原料としても期待される。

### 論文・著書

1. Y. Minematsu, K. Ueji and T. Yamamoto. Activity of frontal pole cortex reflecting hedonic tone of food and drink: fNIRS study in humans. Scientific Reports (2018) 8 :16197 DOI:10.1038/s41598-018-34690-3
2. Y. Treesukosol, C. Inui-Yamamoto, H. Mizuta, T. Yamamoto and T.H. Moran. Short-term exposure to a calorically dense diet alters taste-evoked responses in

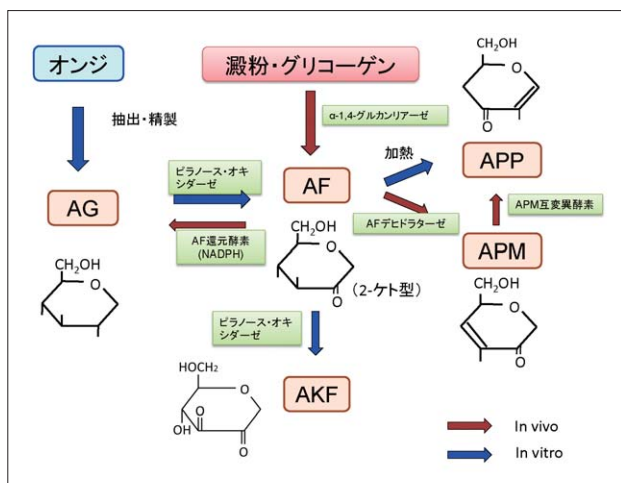


図2 1,5-アンヒドログルシトールの多目的利用法 (概略図) 赤い矢印は生体内での代謝経路。青い矢印はオンジからのAGの精製と利用法。AG, 1,5-anhydroglucitol; AF, 1,5-anhydrofructose; AKF, 1,5-anhydro-3-keto-fructose; APM, ascopyrone M; APP, ascopyrone P; GL,  $\alpha$ -1,4-glucan lyase; AFR, 1,5-anhydrofructose reductase; PROD, pyranose oxidase; AFDH, 1,5-anhydrofructose dehydratase; AUDH, aldo-2-ulose dehydratase; APMT, Ascopyrone M tautomerase. AFは水溶液中では、2-ケト型のほか、2-エノール型、2,3-エンジオール型、水和型の構造をとり得るが、希薄水溶液中ではほとんど水和型である。

the chorda tympani nerve, but not unconditioned lick responses to sucrose.

Chemical Senses 43: 433-441, 2018.

3. C. Chizuko-Yamamoto, T. Yamamoto et al., Taste preference changes throughout different life stages in male rats. PLOS ONE July 25, 2017.
4. T. Saheki et al. Oral aversion to dietary sugar, ethanol and glycerol correlates with alterations in specific hepatic metabolites in a mouse model of human citrin deficiency. Mol.Genet.Metab.120: 306-316, 2017.
5. 山本 隆「楽しく学べる味覚生理学」建帛社 2017
6. K. Ueji, Y. Minematsu, D. Takeshita, T. Yamamoto, Saccharin taste conditions flavor preference in weanling rats. Chemical Senses 41: 135-141, 2016.
7. T. Tsuji, S. Tanaka, K. Kida et al., Disrupted normal ingestion during glucose intake modulates glucose kinetics in humans. SpringerPlus 4 : 621, 2015.
8. A. Ushimura, T. Tsuji, S. Tanaka et al., Neuropeptide-Y modulates eating patterns and masticatory muscle activity in rats. Behavioural Brain Research 278: 520-526, 2015.
9. Y. Konishi: 1,5-ANHYDROGLUCITOL AS A NEW FUNCTIONAL SWEETENER AND VERSATILE FOOD MATERIAL, in "Processing of Foods, Vegetables and Fruits: Recent Advances", ed. C. L.Hii, V. Jangam, S. P. Ong, S. P. Loke, A. S. Mujumdar, pp. 1-12, (2015), ISBN: 978-981-09-6284-5
10. 山本 隆 おいしく感じるしくみ. BIO INDUSTRY 32: 4-10, 2015.

## 招待講演、シンポジウム講演

1. 山本 隆 おいしさとコクの科学 第57回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 2018年12月 8 日 畿央大学 特別講演
2. T. Yamamoto, Interactions with umami substances and some key elements are important to induce koku in food. International Symposium 2018: "Koku Attribute: Food Science & Physiology" 2018年12月 6 日 女子栄養大学 シンポジウム講演
3. T. Yamamoto, Activity of frontal pole cortex reflecting hedonic tone of food and drink: fNIRS study in humans. The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception.2018 年12月 1 日 九州大学 招待講演
4. T. Yamamoto, Dual function of MSG. The 6th Xian Science and Quality Life. International Forum. 2018年10月18日 上海 China 招待講演
5. Y. Konishi, Characterization of 1,5-Anhydroglucitol and Its Enzymatic Conversion to Functional Rare Sugars, The 6th International Agricultural Science and Food Engineering Conference, 2018 年 8 月22日, Kunming, China 招待講演
6. 山本 隆 うま味物質とコク味物質の作用について 日本テンペ研究会平成30年度大会 2018年 8 月18日 畿央大学 特別講演
7. 山本 隆 ラット、マウスにおけるコクの研究:  $\gamma$ -Glu-Val-Glyのうま味増強効果について 2017年 8 月25 日 女子栄養大学駒込キャンパス シンポジウム講演
8. T. Yamamoto, Introduction of sugar in Japan and physiological background of joy of sweetness. Chulalongkorn Asian Heritage Forum. Bangkok, 2016年 8 月17

日 招待講演

9. T. Yamamoto, Flavor preferences acquired by umami substances are based on taste-flavor learning in weanling rats. International Symposium on Olfaction and Taste. 東京、2016年 6 月 4 日、シンポジウム講演
10. T. Yamamoto, Umami: The first taste of our life. International Symposium on Umami. 横浜、2016年 6 月 5 日、招待講演
11. T. Yamamoto, Umami-enhancing action of potential koku-inducing substances, glutathione and ornithine, in mice. International Symposium on Koku. 武蔵境、2016年 6 月10日、シンポジウム講演
12. T. Yamamoto Frontiers in eating behavior research. Special Seminars on Sensory Science for Better Nutrition, Institute of Nutrition, Mahidol University, Bangkok, 2015年 6 月 25日 招待講演

## 科研費

1. 山本 隆 基盤研究(C) 2013-2015 年度:食嗜好形成に重要な幼児期のフレーバー学習の特性とその脳機序に関する研究
2. 上地加容子 基盤研究(C) 2015-2018年度:食嗜好性の獲得と変化における化学感覚とくに味覚感受性の役割に関する解析的研究
3. 山本 隆 基盤研究(C) 2017-2019 年度:食嗜好性の獲得と変化における化学感覚とくに味覚感受性の役割に関する解析的研究

## 外部資金

1. 小西洋太郎 日本澱粉工業(株)(現・サナス)奨学寄付金(2015-2018年)
2. 山本 隆 味の素(株)研究助成金、共同研究費 味の素AGF(株)共同研究費 サントリー(株)共同研究費 不二製油(株)研究助成金

# 生体機能を改善する食品由来成分 およびその作用機序の解明



**研究代表者**  
栢野 新市 健康栄養学科・教授

**研究分担者**  
永澤 健 健康栄養学科・准教授 村木 悦子 健康栄養学科・准教授 松村 羊子 健康栄養学科・助教

## 研究内容

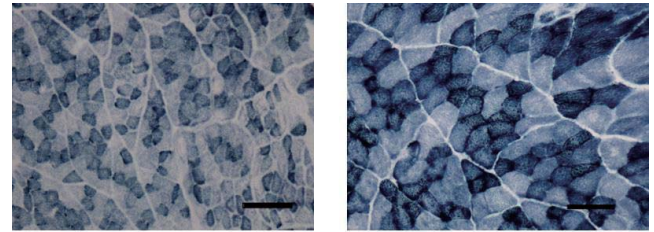
本領域においては、様々な食品素材が生体に与える機能性およびその作用機序に関する研究を行った。

多くの研究において、食品の有する機能性の一次スクリーニングでは主として抽出物を対象としている。しかしながら、本研究では干し柿の抽出残渣に着目し、不溶性成分が有する機能性を評価すべく検討を行った。奈良の特産物である柿、特に渋柿には渋み成分である可溶性タンニンが多量に含まれている。可溶性タンニンはカテキン類が重合した高分子化合物であるが、渋柿を乾燥して干し柿に加工する際に脱水縮合して不溶性タンニンに変化して渋味を呈さなくなる。このために干し柿は渋みがなく甘味を有する食品として利用されている。この干し柿を抽出

物と抽出残渣に分けて抗酸化性を評価したところ、干し柿の抗酸化性の約80%が抽出残渣に由来していた。これは、干し柿に含まれる不溶性タンニンが抽出残渣に残存して

いるためであると考えられた。抽出残渣の生体に対する抗酸化性を評価するため動物実験を行った結果、干し柿抽出残渣の投与によってラット血漿の抗酸化性は約1.5倍に上昇した(図1)。これは抽出残渣に含まれる不溶性タンニンの作用によるものと推察された。この結果の作用機序を解明するため、消化の各段階を人工的に再現した消化モデル実験により干し柿抽出残渣の処理を行ったところ、大腸段階において抗酸化性が著しく増加することが確認された(図2)。以上の結果より、抽出残渣に含まれる不溶性タンニンは大腸において腸内細菌の作用により低分子化し、生体に対して抗酸化性を発現すると考えられた。すなわち、これまであまり着目されてこなかった抽出残渣となるような不溶性成分が生体に対する抗酸化性を有することが明らかとなった。また干し柿抽出残渣を糖尿病モデルラットに投与した実験においては、コントロール食群と比較してラット下肢の長趾伸筋の横断面積が大きいというデータが得られた(図3)。

すなわち干し柿抽出残渣は糖尿病の症状緩和の可能性も有していると考えられる。また、柿の幼果より抽出した高純度の精製タンニンを慢性呼吸器疾患の肺MAC症マウスに投与したところ、病態を改



コントロール食群

干し柿抽出残渣食群

図3 ラット下肢の長趾伸筋横断面画像

善するというデータも得られている。このように、干し柿やタンニンは生体に対する種々の機能性を有することが明らかとなった。

他の素材の機能性を評価する動物実験においては、スパイスの一種で機能性食品であるFenugreek(フェヌグreek)投与による高齢期低栄養の改善効果を検討した。はじめに、食事誘発性低栄養モデル動物を作成するために、リタイアラットを用いて、①5%低たんぱく食で1か月飼育、②5%低たんぱく食で3か月飼育、③5%低たんぱく食、狭小ケージ内で3か月飼育の実験を行った。いずれの実験においても、体重、血清たんぱく、血清アルブミンは、コントロール食群に対して低たんぱく食群で有意に低下し、血清中性脂肪は3か月飼育の実験でのみ有意に低下したが、トレッドミルによる走行試験においては、いずれの実験においても有意な差はみられなかった。このことから、1か月の低たんぱく食で低栄養を誘発させることができたが、食事と狭小ケージだけではサルコペニアまで誘発させることは困難であった。次に、食事と狭小ケージによって低栄養を誘発したリタイアラットに、Fenugreekを混餌投与した。体重ではコントロール群に対してFenugreek投与群で高値を示したが、遅筋のヒラメ筋重量、速筋の長趾伸筋重量およびトレッドミルによる走行試験において

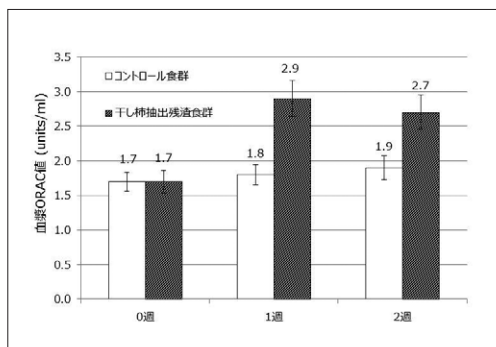


図1 ラット血漿抗酸化性の変化

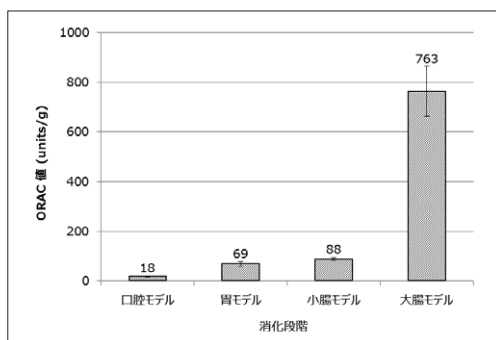


図2 消化モデル実験による干し柿抽出残渣の抗酸化性の変化

は、有意な差はみられなかった。このことから、Fenugreek投与による筋肉増強効果は期待できないが、体重を増加させることは期待できると思われる。今後はFenugreekの体重増加に関わる栄養素の検討を行う予定である。

ヒトを対象とした研究においては、抗酸化性を有し生体内酸化ストレス軽減作用が期待できるルイボスとカルノシンに着目して、これら抗酸化物質を運動前に摂取することで運動が誘発する生体内酸化ストレスを軽減させるという仮説を立て、その検証に取り組んだ。また、抗酸化性を有するだけでなく血流促進作用が期待できる当帰にも着目した。当帰には体温保持作用がある為、冷え性改善作用を有するかどうかについて検討した。その結果、ルイボスの運動前の摂取による運動時の酸化力上昇効果を認めるとともに、カルノシンの運動前摂取が激運動時の酸化ストレスの低減(尿中の8-OHdG量生成速度の低下) および筋疲労の自覚症状の抑制効果を認めた。また、当帰の葉から抽出した当帰茶を飲用したところ、当帰茶の血流促進および体温保持の作用を認めるとともに冷え性改善の効果についても確認できた。以上の結果より、ルイボスとカルノシンの運動前の摂取によって運動が誘発する酸化ストレスが軽減し、また、当帰には体温保持および冷え性改善の作用を有することが明らかとなった。

以上のように、本領域においては食品素材が有する機能性について様々な検討を行い、多くの成果を得ることができた。いずれの研究も継続中であり、今後も新たなデータが見いだされることが期待される。

## 論文

1. Kayano S., Isoflavone C-glycosides isolated from the root of Kudzu (*Pueraria lobata*) and their estrogenic and antimutagenic activities., *J. Food Nutr. Disord.*, 7, 20 (2018)
2. Kayano S., Antioxidant potential in non-extractable fractions of dried persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), *J. Microb. Biochem. Tech.*, 9 (4) Suppl., 77 (2017)
3. Matsumura Y., Kitabatake M., Ouji-Sageshima N., Yasui S., Mochida N., Nakano R., Kasahara K., Tomoda K., Yano H., Kayano S., Ito T., Persimmon-derived tannin has bacteriostatic and anti-inflammatory activity in a murine model of *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease., *PLOS ONE*, 12(8) e0183489 (2017)
4. 永澤健、村上海、グリーンルイボス摂取による激運動時の酸化力上昇作用、微量栄養素研究、34、74-77、2017
5. 北野文理、永澤健、大和当帰茶のフラクトイド類およびフロクマリン類の含有量、微量栄養素研究、34、43-46、2017
6. Kayano S., Glucosyl terpenates from the dried fruits of *Prunus domestica* L., *J. Pharmacog. Nat. Prod.* 2 (3) Suppl., 51 (2016)
7. 北野文理、永澤健、大和当帰茶の継続的な飲用による若年女性の冷え性改善作用、微量栄養素研究、33、1-8、2016
8. Matsumura Y., Ito T., Yano H., Kita E., Mikasa K., Okada M., Furutani A., Murono Y., Shibata M., Nishii Y., Kayano S., Data in support of antioxidant activities of the non-extractable fraction of dried persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), *Data in Brief*, 8, 1247-1254 (2016)
9. Matsumura Y., Ito T., Yano H., Kita E., Mikasa K., Okada M., Furutani A., Murono Y., Shibata M., Nishii Y., Kayano S., Antioxidant potential in non-extractable fractions of dried persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), *Food Chem.*, 202, 99-103 (2016)
10. 村上海、永澤健、松林弘明、発酵および非発酵ルイボスティー飲用による夏季の屋外歩行時の酸化ストレスへの影響、ウォーキング研究、19、

31-36 (2015)

## 招待講演

1. Kayano S., Antioxidant properties of prunes (*Prunus domestica* L.) and their constituents, *Global Biothechnology Congress* (Boston, USA), 2015
2. 永澤健、運動と栄養(教育講演)、第14回日本栄養改善学会近畿支部学術総会、奈良、2015
3. Kayano S., Glucosyl terpenates from the dried fruits of *Prunus domestica* L., *International Conference and Exhibition on Marine Drugs & Natural Products* (Melbourne, Australia) 2016

## その他

1. 村上海、永澤健、発酵および非発酵ルイボスの生理機能と健康長寿への寄与、*アグリバイオ* 3 (1)、73-80、2019
2. Matsumura Y., Ito T., Yano H., Kita E., Mikasa K., Okada M., Furutani A., Murono Y., Shibata M., Nishii Y., Kayano S., Antioxidant potential in non-extractable fractions of dried persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), *World Biomedical Frontiers*, Mar 3, 2017
3. Kayano S., Matsumura Y., Ito T., Extraction residue of dried persimmon fruits shows antioxidant potential in vivo., *Atlas of Science*, Jun 20, 2016
4. 永澤健、子どもたちに運動と食事の科学の魅力を伝える、*奈良県教育振興会、やまと*、468号、12-14、2015

## 科研費

永澤 健 ストレッチングがもたらす糖尿病と動脈硬化症予防効果の解明  
2015-2017年度

## 外部資金

栢野新市 山本勝之助商店より委託研究費 2015-2017年度

# 疾患モデル動物を用いての 効果的な運動介入法の探究



**研究代表者**  
今北 英高 理学療法学科・教授

**研究分担者**  
峯松 亮 理学療法学科・教授 西井 康恵 理学療法学科・助手 岡田 圭祐 健康科学研究科・博士後期課程  
藤田 直人 広島大学大学院・講師 蔦木 新 日本大学大学院・助教

理学療法士が対象とする疾患は運動器疾患が大部分を占め、続いて脳血管疾患、呼吸器疾患と続く。運動器、脳血管、呼吸器を合わせると約85%、それに心大血管疾患を加えると約90%となる。本プロジェクト研究はこのような疾患に関連する疾患モデル動物を用いての効果的な介入方法の探求について進めていった。そのいくつかを紹介する。

## 局所的磁場が骨微細構造に与える影響

雌性SDラットを用いて、両側の卵巣を摘出することで、骨粗鬆症モデル(OVXモデル)を作成した。右のグラフがそのモデルの海綿骨量の経時変化を示すが、90-100日くらいまで急激に減少していく。そのOVXモデルに対して磁石による静磁場に曝露させ、どのような影響を与えるかを調べたものである。磁束密度は、343mTのものを使用した。実験期間は20週間、解析部位は右脛骨近位部であった。

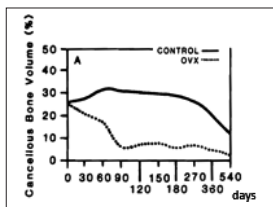


図1 OVXモデルの海綿骨量の経時変化

静磁場による脛骨海綿骨微細構造への影響として、マイクロCTから得たデータよりOVXモデルによって骨粗鬆症が生じ、そのモデルに対して磁場に曝露すると骨粗鬆症を抑制していた。これらの結果から、磁場曝露によって骨組織標本で破骨細胞面が減少していることから、骨破壊を抑制し、海綿骨量を維持していると考えられた。

図2は、AのマイクロCT画像ではOVXの海綿骨が粗な状態であるが、磁

場曝露で改善が認められた。Bの骨組織標本ではOVXで破骨細胞面の増加(赤矢印)と類骨面の増加(青矢印)が認められ、骨代謝回転が高い状態であった。以上より、骨粗鬆症モデルラットにおける海綿骨量の減少は、磁場曝露によって骨代謝回転が低下することにより、抑制されるのではないかと示唆された。尚、この研究は平成25-27年に科研費の基盤C(研究代表者 西井康恵)で採択された。

## 成長期のラット脛骨に及ぼす Green Tea Polyphenol 長期間投与の影響

Green Tea Polyphenol(いわゆるカテキン)摂取によって、肥満モデルラット、性腺摘出ラット、炎症モデルラットなどの骨密度の減少抑制や骨微細構造の劣化予防の効果が報告されている。本研究の目的は、正常の成長期ラットに緑茶抽出物(GTE)含有飼料を短期間(85日間)および長期間投与(170日間)することにより、海綿骨や皮質骨の骨微細構造に対するGTE摂取の影響を調査することであった。

対象は、4週齢のWistarラットで、標準飼料またはGTE含有飼料を短期間与えたCS、GS群、その倍の180日

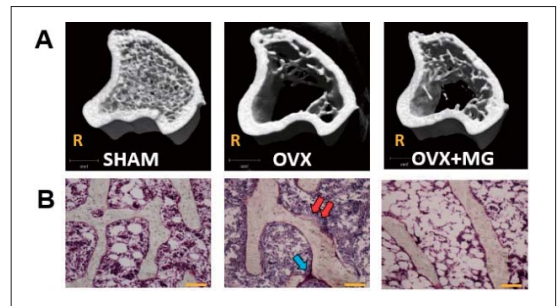


図2 Micro CT 3D images. Proximal tibia (A)抗酸性の変化 and representative histological sections (B, scale bar 100µm)

間(4-28週齢まで)および長期間与えたCL、GL群に分け、骨微細構造および骨代謝マーカーへの影響を調査した。

表1は最終体重および大腿骨における骨量パラメータを示す。最終体重やBone lengthに有意な差は認められなかったが、赤字に示しているGTE長期間投与群(GL)においてBMC(Bone mineral content)やvBMD(Volume Bone mineral density)が低下していた。

ELISAにて測定した骨形成マーカーであるオステオカルシンおよび骨吸収マーカーであるTRACP-5bを図3に示す。CS群、GS群では高く、CL群、GL群では低くなっており、成長期においては骨代謝が高く、それを過ぎると低下することが示された。しかし、標準飼料摂取とGTE摂取群とは、有意な差は認められなかった。

骨端成長板下端からの距離1.0mmと0.5mmにおける脛骨海綿骨の

|                           | CS            | GS            | CL            | GL                    |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| Final body weight (g)     | 427.1 ± 27.7  | 430.9 ± 26.0  | 497.7 ± 18.9  | 509.0 ± 27.9          |
| Bone length (mm)          | 37.4 ± 0.5    | 37.6 ± 0.5    | 39.3 ± 0.5    | 39.0 ± 0.9            |
| <b>海綿骨</b>                |               |               |               |                       |
| TMD (mg/cm <sup>3</sup> ) | 378.1 ± 6.2   | 375.7 ± 14.9  | 387.4 ± 11.6  | 384.4 ± 8.1           |
| BMC (mg)                  | 0.695 ± 0.249 | 0.631 ± 0.406 | 0.681 ± 0.148 | <b>0.302 ± 0.184*</b> |
| vBMD (mm)                 | 58.5 ± 15.6   | 52.6 ± 25.8   | 55.0 ± 13.3   | <b>25.7 ± 12.4*</b>   |
| <b>皮質骨</b>                |               |               |               |                       |
| TMD (mg/cm <sup>3</sup> ) | 927.5 ± 9.5   | 936.1 ± 19.9  | 1061.3 ± 23.2 | 1071.7 ± 26.5         |
| BMC (mg)                  | 9.1 ± 0.5     | 9.2 ± 0.8     | 10.9 ± 0.3    | 10.8 ± 0.9            |

\*: Significantly difference from the control group in the same experimental period (p<0.05). Means ± S.D.

表1 最終体重および大腿骨における海綿骨、皮質骨の骨量パラメータ

Micro CT像を図4に示す。いずれのCT像でもGL群で海綿骨構造に粗の状態が認められた。

本研究結果から成長期における長期間GTE摂取は、海綿骨の骨量、骨微細構造にはポジティブな効果をもたらさない可能性が示唆され、GTE摂取の骨に対する影響（作用）は、成人期以降のそれとは異なるかもしれない。従ってGTE摂取量、摂取形体、摂取期間に加え、摂取時期の影響を考慮する必要があると考えられた。尚、本研究は、花王健康科学助成（研究代表者 峯松亮）を受けて、実施した。

### 右心不全モデルに対する酸素療法の効果

4週齢のWistarラットにモノクロタリン(MCT: 30 mg/kg)を投与し、右心不全モデルを作成した。投与後14日目より30% repetition maximumの負荷を設定して、1日15回金網のぼり運動を実施した(図5)。その結果、運動介入により、体重が減少し、心重量は増加し、腓腹筋重量は低下する結果となり、右心不全を助長させてしまっ

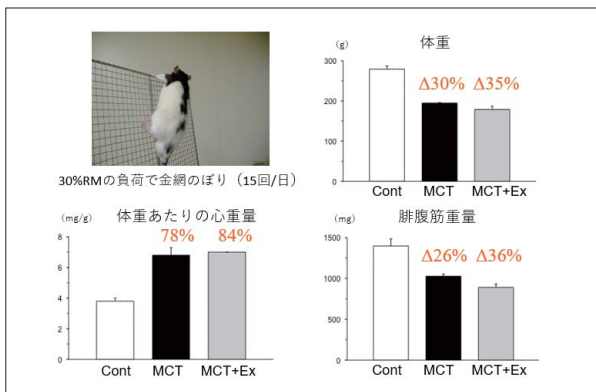


図5 右心不全モデルに対する運動療法の効果  
4週齢のWistarにMCT投与→14日目から運動開始→21日時点のデータ

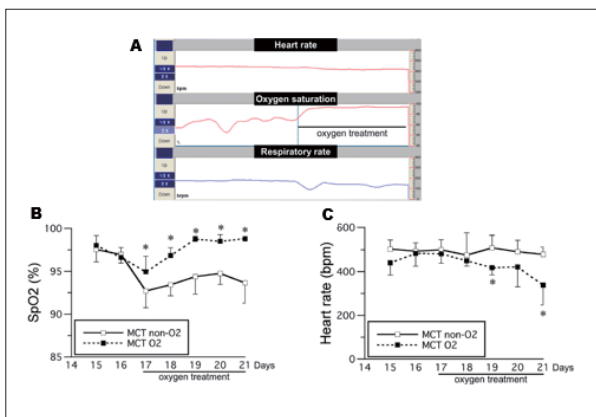


図6 右心不全モデルに対する酸素療法の影響  
4週齢のWistar RatにMCT投与→投与後17日目より酸素療法

た可能性が示唆された。

次の介入研究として、同モデルに対して酸素療法を実施した。図6は右心不全モデルに対する酸素療法の影響を示すが、Aは、酸素療法を実施した際のSpO2の状態を示し、介入直後から即時的に上昇した。また、BはMCT腹腔内投与後、17日目から酸素療法を実施したが、SpO2は酸素療法を実施すること

で有意に上昇した。Cの心拍数は有意に低下した。図7に体重変化と生存率を示す。Aは、体重の経時的変化を示すが、MCT投与の14日から上昇が緩やかになり、酸素療法開始以降は、介入群でのみ有意な体重減少が確認された。また、Bの生存率を見ても酸素療法を行った群が有意に低下した。

右心不全ラットに対して酸素療法を実施した結果、体重も減少し、生存率も低下した。なぜこのような結果が生じたかを調べるため、酸化ストレス応答に関するいくつかのアウトカム

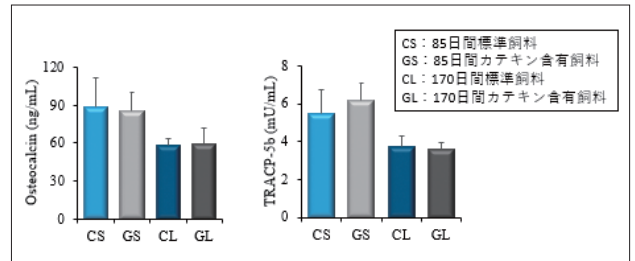


図3 血清レベルでのオステオカルシンおよびTRACPの変化

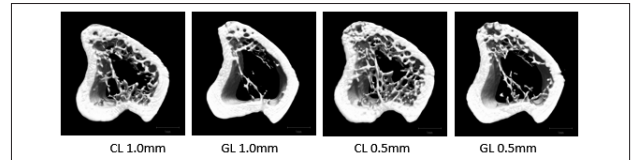


図4 長期投与群 (CL群、GL群) におけるMicro CT像

を調査した(図8)。A, Bに示すNox1,2は、Nox (NADPH oxidase) ファミリーで、主に生体の酸化ストレス応答を担う活性酸素の生成源として機能するが、活性酸素の生成がMCT投与および酸素療法の実施により高値を示した。これに対して、通常は活性酸素を除去するためにSuperoxide dismutase (SOD) 活性が上昇し、酸化ストレスを打ち消そうとするが、Cで調べたSOD活性を見ると、モノクロタリン投与によって既にSOD活性が上昇してしまい、酸素療法を実施した群では十分にSOD活性を上げることができなくなっていた。さらに、Dでは、酸化

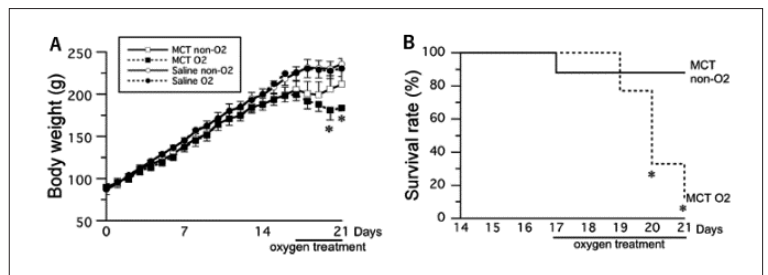


図7 体重変化と生存率

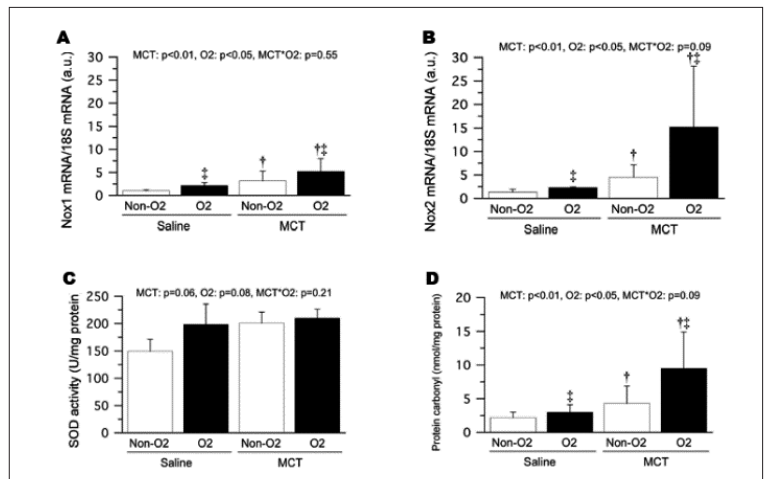


図8 酸素療法による酸化ストレス応答



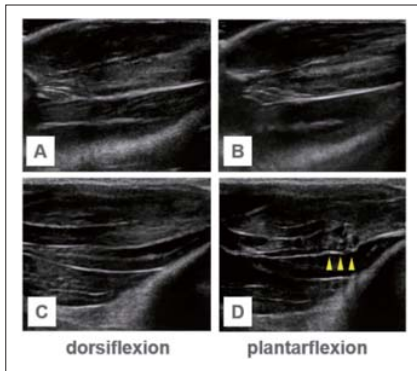


図9 足関節底背屈による皮下組織の動き

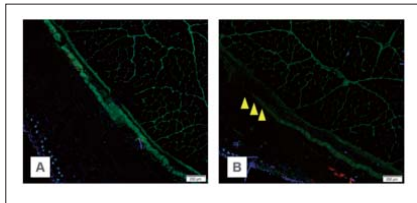


図10 下腿前面における蛍光免疫組織化学染色  
A:Control group B:Adhesion group

ストレスを受けたことによって、生じた代謝産物（タンパク質酸化）であるタンパク質カルボニルを調べたところMCT+O<sub>2</sub>において、大きく上昇していました。MCT+O<sub>2</sub>では、酸素療法によって、右心不全の状態、いわゆる抗酸化力が低い状態で酸素毒性を浴びたことで、より早期にカヘキシアの状態になり生存率が下がったのではないかと考えられた。

### 癒着によるFasciaの滑走制限が皮膚および関節の動きに影響を与えるか

Fasciaは身体の組織を包み込んでいる結合組織で、内臓や骨格筋の相対的な位置を保持し、身体内部の枠組みを構成している。皮下には、浅層の脂肪組織、Superficial fascia、深層の脂肪組織、Deep fasciaが存在し、この構造が、外部からの機械的な力を吸収する役割を果たし、骨格筋は外力に影響されることなく収縮することが可能となる。本研究の目的は、癒着によってFasciaの構造を破壊させることで、皮膚や皮下組織の動きにどのように影響を与えるかを調査することである。

9週齢のWistar ratを10匹使用し、control group (n= 4) およびadhesion group (n= 6) に分類した。adhesion groupには、下腿前面にて皮膚から前脛骨筋中間層の深さまで長軸方向に切開し、その後縫合した。4

週間後、麻酔下にて皮膚の動きをビデオ撮影し、その後超音波エコーを用いて、足関節底背屈時の皮下の各組織の動きを観察した。その後下腿前面部を摘出し、anti-CD68およびanti-Collagen Type I免疫染色を施し、検鏡した。4週間後の皮膚の動きは低下しており、エコー下での深層筋膜の動きは大きくなっていた（図9）。また、切開部位でのanti-CD68陽性細胞は残存しており、anti-Collagen Type I免疫染色は陰性であった（図10）。

本研究は、皮下から前脛骨筋までを切開し、縫合することで癒着モデルを作成した。4週間においても癒着は存在し、その結果皮膚の動きは制限され、他動的関節運動により癒着部位の下層で滑走が増大していた。このようなfasciaの滑走のアンバランスが発痛物質の出現を助長し、痛みから不動、関節拘縮へと進む過程になるのではないかと考えられた。

## 論文

1. Naoto Fujita, Hidetaka Imagita et al.: Oxygen therapy may worsen the survival rate in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. PLOS ONE. In press
2. A.Minematsu, Y.Nisii, H. Imagita et al.: Long-term intake of green tea extract causes mal-conformation of trabecular bone microarchitecture in growing rats. Calcif Tissue Int 102: 358-367, 2018.
3. Koda H, Fukumoto T, Imagita H et al.: Relationship between muscle strength asymmetry and body sway in older adults. J Aging Phys Act.Oct 16: 1 -17. doi: 10.1123/japa.2017-0096. 2017
4. A.Minematsu , H. Imagita et al.: Long-term wheel-running can prevent deterioration of bone properties in diabetes mellitus model rats. J Musculoskelet Neuronal Interact 17(1): 433-443, 2017.
5. A.Minematsu, Y.Nisii, H. Imagita et al.: Whole-body vibration can attenuate the deterioration of bone mass and trabecular bone microstructure in rats with spinal cord injury. Spinal Cord 54(8): 597-603, 2016.
6. Minematsu A, et al.: Femoral bone structure in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. Osteoporosis and Sarcopenia 2 : 25-29,2016.
7. Nishii Y, Imagita H et al.: Moderate exercise attenuated airway resistance and inflammation induced by cigarette smoke solution and endotoxin in rats. Sport Sciences for Health, 1291-97. 2016
8. Minematsu A, Nishii Y, Imagita H et al.: Whole-body vibration can attenuate the deterioration of bone mass and trabecular bone microstructure in rats with spinal cord injury. Spinal cord, 2015, doi: 10.1038/sc.2015.220.
9. Hayashibe M, Imagita H, Morioka S et al.: Locomotor improvement of spinal cord-injured rats treadmill training by forced plantar placement of hind paws. Spinal cord, 2015, doi: 10.1038/sc.2015.186.
10. Kitakaze T, Imagita H et al.:  $\beta$ -Carotene increases muscle mass and hypertrophy in the soleus muscle in mice. J Nutr. Sci. Vitaminol, 61, 481-487. 2015
11. Sakata S, Imagita H, Minematsu A et al. Poor Wheel-Running Exercise Can Decrease Blood Pressure through Hormonal Control and Increase Endurance Exercise Capacity in Middle-Aged Normal Rats. J Biosci Med. 3 (8), 10-24. 2015

## 科研費

1. 今北英高 基盤研究(C) 2017～2019年度 呼吸器疾患に対する複合

- 的介入によるリハビリテーション戦略の構築
- 2. 峯松 亮 基盤研究(C) 2015～2018年度 骨特性(骨量・骨構造・骨強度)対する全身振動刺激の有効性の検討
- 3. 西井康恵 基盤研究(C) 2012～2015年度 運動器に対する局所的磁場の影響

- 4. 今北英高 基盤研究(C) 2011～2015年度 肺気腫症における運動介入が呼吸機能および横隔膜機能、呼吸中枢に与える影響

### 外部資金

峯松 亮 花王健康科学研究助成  
2015年度

### 受賞

Hidetaka Imagita ; Best Basic Science Abstract Award  
5th International Fascia research congress 2018.11  
(ドイツ ベルリン)

# アンチエイジング戦略の疫学的・実証的研究

#### 研究代表者

金内 雅夫 健康栄養学科・教授

#### 研究分担者

鷺尾 弘枝 看護医療学科・講師 柴田 満 健康栄養学科・助教 岩村 真樹 健康科学研究科・博士後期課程  
竹下 大輔 国立循環器病センター研究所・流動研究員 田中 愛佳 健康科学研究科・研究員



最近、食習慣と併せて腸内細菌叢の異常が肥満や糖尿病など代謝性疾患の病態に関連するのではないかと注目されている。また、加齢に伴う慢性炎症が生活習慣病の形成や動脈硬化の促進、あるいは認知症の発症・進展に関与していることも推測されている。そこで地域在住の元気な高齢者を対象として、食習慣および腸内細菌叢の分析を行い、健康長寿に対する促進因子あるいは阻害因子の解明を行うことを目的として本研究を実施した。

地域で元気に社会活動を続けている65歳以上の高齢者を対象として、生活習慣についての調査(喫煙、飲酒、睡眠時間、朝食日数、間食の有無、歩行・運動、疲労感、日常の活動様態、既往疾患)、身体計測、血圧測定、身体機能測定(握力および歩行速度を含む)、食事調査による食品摂取量および主要栄養素の摂取量の分析、認知機能、低栄養状態の評価、腸内細菌叢の分析を行った。現地調査は研究代表者・分



写真1 現地調査の風景

担者と学生スタッフにより1回当たり約20名の測定を行い、これまでに約160名のデータを集積してきた(写真1)。

これまでの主な結果は以下のとおりである。

### 1. 地域在住高齢者の低栄養リスクと身体活動能力

低栄養は高齢者のサルコペニア(筋肉減少)やフレイル(虚弱)の要因のひとつとされている。われわれの検討では、地域在住高齢者の4分の1に低栄養リスクがみられ、低栄養リスクは低活動性、身体疾病の数、喫煙と関連していた。また、とくに男性において身体活動量と骨格筋指標に関連がみられた(日本成人病学会、日本老年医学会で発表)。

### 2. 地域在住高齢者における食習慣と腸内細菌叢

被験者から便を採取し、16S-rRNA遺伝子配列分析法に基づいて腸内細菌叢解析を行った(図1)。食習慣との関連では、飽和脂肪酸の摂取が多い群は少ない群に比べてファーミキュテス門とバクテロイデス門の比率(F/B比)が高い傾向にあった。乳酸菌とビフィズス菌の占有率には水溶性食物繊維の量が影響することが示唆された

(日本肥満学会、日本糖尿病学会、日本臨床生理学会で発表)。

### 3. 高齢者での肥満・糖尿病と腸内細菌叢

肥満例ではプレボテラ比率の高い症例が多い傾向にあった。F/B比は糖尿病の有無で差がなかったが、糖尿病群では酪酸産生菌を含むクラスターが少ない傾向にあった。プレボテラ菌種はでんぷんを多く食べる食習慣と関連するといわれており、肥満例とも関連したのかもしれない。また、特定の腸内細菌によって産生される酪酸は腸上皮の栄養・活性化と関係しているため、腸内細菌叢の変化が糖尿病の病態に影響を与えている可能性がある(日本肥満学会、日本糖尿病学会、日本臨床生理学会で発表)。

### 4. 高齢者における地中海食型食習慣と健康長寿

地中海食型食習慣は心血管病、代謝疾患、がん、認知症などのリスク低減と関連するといわれている。一般的に日本人は地中海食に馴染まないと思われており、地中海食型食習慣と健康リスクの関連も明らかでない。われわれの検討では、地中海食型食習慣を有する高齢者では身体活動量が多く、適正

飲酒者および適正体格指数の比率が有意に高かった。また、高齢者のフレイルあるいはフレイル予備軍が地中海食型食習慣例で少ないことも明らかになった。さらに腸内細菌叢の分析から、地中海食型食習慣例ではF/B比が低く、腸内細菌種の多様性指標も良好であった。従って、地域在住の元気高齢者において、地中海食の食習慣は健康長寿の一要因になっている可能性がある（日本成人病学会、日本体質医学会で発表）。

## 5. バランスよく食べることは健康長寿に寄与するか

バランスよく食べることの重要性がしばしば強調されるが、実際には意味するところが抽象的で、指導するうえでも難しい概念ではなからうか。日本食は総じて健康食と考えられており、わが国での健康長寿に寄与してきた。そこで簡便な日本食型食習慣の評価法を開発し、地域在住高齢者を対象として検討したところ、日本食型食習慣がないグループでは低体重例が高頻度であり、握力低下の頻度も高く、よりフ

レイル傾向にあった。そのほかに、食事に由来する炎症惹起性と炎症抑制性のバランス指標や、摂取食品によって齎される酸・アルカリ負荷のバランスなど、新しい切り口から健康長寿の諸要素との関連について検討中である（日本体質医学学会、日本糖尿病学会、日本臨床生理学会で発表）。

最後に、このプロジェクト研究2015～2017は基本的に症例登録期間といつてよいものである。これまでのところ、腸内細菌叢の分析においても腸内老化と関連する新たな知見が得られつつある。しかし、フレイルへの進展や認知症予防など、健康長寿に関わる要因を明らかにするためには、当然のことながら追跡データの集積が不可欠である。2018年度から漸次その解析を進めているところであるが、今後さらなる経年的な追跡データの結果を以て英文誌に投稿する予定である。

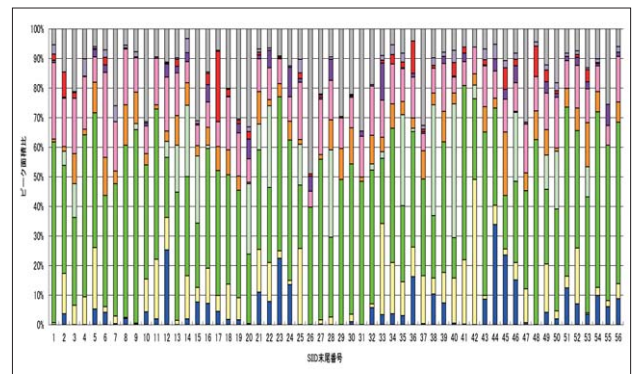


図1 腸内細菌叢分析(16S-rRNA 遺伝子配列分析法)

## 著書

金内雅夫. フレイルと生活の質. サルコペニアとフレイル2015, pp54-62, 医薬ジャーナル社、大阪

## 科研費

基盤研究 (C) (一般)

研究代表者: 金内雅夫

課題名: 日本食型食習慣および地中海食アドヒアランスを応用したフレイル予防法の開発

期間: 平成29年度～平成31年度

# ヒト早老症の老化モデル細胞の作製と加齢に伴って増加するがん発症機構の解析

研究代表者

前原 佳代子 健康栄養学科・教授



老化とは、成熟期以後、加齢とともに体の機能が低下し、個体の恒常性を維持することができなくなり、やがて死に至る過程をさす。老化は誰にでも例外なく起こり、その進行を止めることができず、遺伝的な内因性の要因や食生活・ストレスなど外因性の環境要

因などが複雑に絡み合った高次の生命現象である。多くの機能不全が生じている老化は、がんをはじめとする加齢に関連する疾患と密接に関わっている。超高齢社会の日本では、悪性新生物は死因別死亡数の割合のトップであり、28.7%を占め(平成27年人口動態統計)、老化とがんの関連が示唆されている。また、ヒトの疾患には、一般的にすべての人に起きる老化に比べて、実年齢より早く老化の徴候があらわれる早老症がある。早老症は、主にDNAの修復に関係する遺伝子(図1)の異常が原因で発症し、高率に悪性腫瘍を合併する。本研究課題では、遺伝子の異常という原因がわかっていて、しかも

老化とがん化がともに進行している早老症をモデルに、早老症を模倣したヒトの培養細胞を開発し、加齢とがん化の関連の解析に供する。

ヒト早老症の疾患モデル細胞を作成するために、近年開発された遺伝子改変技術であるゲノム編集のクリスパーキャス(CRISPR-Cas: clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein)を利用した。Cas9というヌクレアーゼと、Cas9を標的遺伝子まで導くガイドRNA、これらを発現するベクターをヒト細胞に導入して、2本鎖DNA切断とそれに続いて起きる修復反応により、遺伝子を破壊する。標的遺伝子は、BLM(ブルー

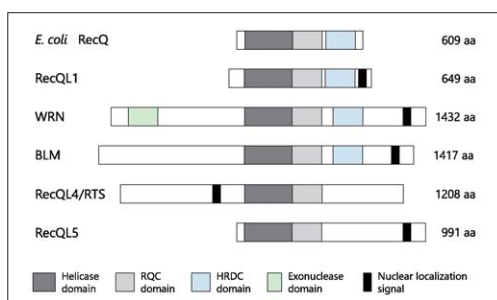


図1 RecQ type DNA helicases

| 早老症           | 原因遺伝子         | 老齢疾患・症候                                        |
|---------------|---------------|------------------------------------------------|
| ブルーム症候群       | <i>BLM</i>    | 低身長、日光過敏、免疫不全、毛細血管拡張、 <b>悪性腫瘍</b>              |
| ロスムンド・トムソン症候群 | <i>RECQL4</i> | 浮腫性紅斑、皮膚萎縮、水泡、白内障、低身長、骨格異常、性腺機能低下、 <b>悪性腫瘍</b> |

表1 早老症の原因遺伝子と症候

ム症候群の原因遺伝子)及び *RECQL4* (ロスムンド・トムソン症候群の原因遺伝子) である (表1)。CRISPR-Cas システムは Addgene より入手した。

2015年度から2016年度にかけて、学内で遺伝子組換え実験を行うために必要な研究環境を整えた。2017年度にベクター構築を開始した。ガイド役に RNA を利用する CRISPR-Cas9 では オフターゲット作用が生じやすいとされている。オフターゲット作用を抑えるために、Cas9 の変異体を利用したダブルニッキング法を用いた。ガイド RNA の標的配列は、国立成育医療研究センターの岡村浩司博士が開発した Find CRISPR Target (FCRISPR) を利用して選定した。*BLM* の標的配列として 2 組、*RECQL4* の標的配列として 3 組、配列特異性の高い、ユニークな配列を選んだ。標的配列を含むオリゴを使用して inverse PCR 法で *BLM* のガイド RNA クローニングベクターを 4 つ、*RECQL4* のガイド RNA クローニングベクターを 6 つ作成した。ベクターの塩基配列の収集は外注にて行い、ベクターの塩基配列を確認した。ヒト細胞へのベクターの導入には、Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific) を用いた。エレクトロポレーションの条件について GFP 発現ベクターを用いて検討した。最適化パルス条件は 1400 V, 20ms, 1 pulse であった。以上が 2015 年度から 2017 年度までの進捗である。本研究課題の遂行のために、学内の遺伝子組換え実験にかかわる研究環境を整えながら、疾患モデル細胞の作成に必要なベクターの作成やエレクトロポレーションの条件検討を行った。

本研究課題は、第 3 期プロジェクト

研究「高齢者 2 大疾患の成因に関する研究」のうち、老化による染色体不安定性 (chromosomal instability, CIN) とがん発症という研究計画で継続して遂行している。

染色体不安定性とは、有糸分裂時の染色体分配の異常により生じる、染色体の数が増えたり減ったりする染色体数の変動 (異数性) や、染色体の欠失、重複など構造異常のことである。ブルーム症候群とロスムンド・トムソン症候群の早老症疾患モデル細胞を利用して、がんの特徴である染色体不安定性に着目し、加齢とともに増加するがん発症機構の一端を明らかにしたいと考えている。

### 原著論文 (英文)

1. Usui H., Nakabayashi K., Kaku H., Maehara K., Hata K., Shozu M. Elucidation of the developmental mechanism of ovarian mature cystic teratomas using B allele-frequency plots of single nucleotide polymorphism array data. *Genes Chromosomes Cancer* 57, 409- 419, 2018
2. Sakaki M., Ebihara Y., Okamura K., Nakabayashi K., Igarashi A., Matsumoto K., Hata K., Kobayashi Y., Maehara K. Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses. *PLoS One* 12, (2), e0171431. doi: 10.1371/journal.pone.0171431. 2017
3. Ito Y., Maehara K., Kaneki E., Matsuoka K., Sugahara N., Miyata T., Kamura H.,

Yamaguchi Y., Kono A., Nakabayashi K., Migita O., Higashimoto K., Soejima H., Okamoto A., Nakamura H., Kimura T., Wake N., d Taniguchi T., and Hata K. Novel nonsense mutation in the NLRP7 gene associated with recurrent hydatidiform mole. *Gynecol. Obstet. Invest.* 81, 353- 358, 2016

4. Miyata T., Sonoda K., Tomikawa J., Tayama C., Okamura K., Maehara K., Kobayashi H., Wake N., Kato K., Hata K., and Nakabayashi K. Genomic, epigenomic, and transcriptomic profiling towards identifying omics features and specific biomarkers that distinguish uterine leiomyosarcoma and leiomyoma at molecular levels. *Sarcoma Article* ID 412068 doi:10.1155/2015/412068. 2015

### 招待講演、シンポジウム講演

前原佳代子 ヒト早老症モデル細胞の開発 第36回日本ヒト細胞学会学術集会 東京 2018年 8月 4日 シンポジウム講演

### 科研費

1. 前原佳代子 基盤研究(C) 2016~2018年度 「ヒト胎盤由来細胞を利用した NLRP7 の機能解析」
2. 前原佳代子 基盤研究(C) 2012~2015年度 「大規模塩基配列情報を利用した稀少産科疾患の病態解明と新規診断法の確立」

## 畿央大学健康科学研究所

Research Institute for Health Sciences, Kio University

〒635-0832 奈良県北葛城郡広陵町馬見中 4-2-2

Tel 0745-54-1601 Fax 0745-54-1600

4-2-2 Umami-naka, Koryo-cho, Kitakatsuragi-gun, Nara 635-0832 JAPAN

Tel +81-745-54-1601 Fax +81-745-54-1600

http://www.kio.ac.jp

### 寄付金の募集

健康科学研究所の研究活動についてのご寄付を受け付けています。

申込方法 畿央大学総務部までお問い合わせください。  
0745-54-1602 soumu@kio.ac.jp