

学 校 名	大 阪 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① iPS細胞 ②間葉系前駆細胞 ③広域顎口腔組織再生 ④再生医療 ⑤幹細胞 ⑥3次元組織担体 ⑦歯学			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
馬 場 俊 輔	歯 学 部	教 授	研究代表者・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 伊 記	歯 学 部	准 教 授	動物実験・論文作成
橋 本 典 也	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
本 田 義 知	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
上 村 直 也	歯 学 部	平成28年3月 31 日 退 職	動物実験・データ整理

iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究

1. 研究の目的

口腔癌や顎骨骨折等によって生じた広域顎口腔組織欠損は、患者に大きな手術的および、精神的負担を生じさせる。これまでこの治療に対しては、欠損補綴や顎補綴治療が広く用いられてきたものの、利用される補填物は恒久的な発音障害・審美障害・咀嚼障害を生じさせ、患者の生活の質を大きく損ねている。特に、咀嚼障害は寿命と直結する事が知られている (Takada et al. *Ann Jpn Prosthodont Soc*, 2012)。天然歯と同様に利用可能なインプラントは、潜在的に本課題を改善しうる力を持つものの、土台となる顎骨の広域欠如が本治療の遂行を妨げてきた。これらの背景から、再生医療を用いた顎骨再生法に期待が向けられ、自家骨移植や、骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療等が広く試みられている。しかし、広域を満たす程の試料の調達は困難を極め、未だ大きな発展が見られていない。もし、これらの課題を克服する優れたオーダーメイド顎骨組織再生治療が実現すれば、次世代に残された課題と言われる広域顎骨組織欠損治療を著しく前進させ、患者の生活の質を大きく向上させる可能性を持つ。

本研究は、独自開発を進めてきた①癌化し難いiPS細胞と、②生体高分子を任意な形状に織り込む担体合成技術を用い、オーダーメイド広域骨再生治療の具現化を図っている点に最大の特色を持つ。顔貌に応じた形状再建を可能とするオーダーメイド再生治療としては、東京大学が3Dプリンターを用いた人工骨を報告している (Chung et al., *Int J Automation Technology*, 2009)。しかしながら、人工骨は靱性に乏しく、骨置換に数年の年月を要し、大型人工骨では破折が危惧される。一方、吸収性生体高分子は高い靱性をもつものの、低い骨伝導能ゆえに自家骨や骨髄間葉系幹細胞と複合化し研究が進められてきた (Kinoshita et al., *Tissue Eng*, 2007)。しかし、自家骨は採取量に、骨髄由来間葉系幹細胞は細胞数の確保に課題を残し、広域骨再建は大きく進展してこなかった。

申請者らが着目したiPS細胞は、①無限に増殖し細胞数の問題を克服し得る、②ドナーの年齢に依存しない調製が可能、③血管前駆細胞への分化誘導も報告されており、血管網を含んだ骨組織の迅速再生を実現しうる、等の利点を有す。更に申請者らは、独自にプラスミドベクターを用いた癌化し難いiPS細胞の樹立に成功しており、安全性の高いiPS細胞の調達が可能である。また、生体高分子を紡糸し、織ることで任意の3次元形状へと整形する特殊技術を保持しており、迅速に本研究への着手が可能な状態にある。

以上の点から、本申請内容は既存の広域骨欠損治療と一線を画す革新的な治療法と成り得る事が期待出来る。本研究の着想は自ら蓄積した知見に基づき、“癌化しにくいiPS細胞と3次元組織担体を用いたオーダーメイド広域顎骨再生”に着目して研究を進めているグループは国内外無く、極めて新規性が高い研究であると言える。

本申請は、申請者らが独自に樹立した、癌化を起こしにくい口腔軟組織由来iPS細胞と、任意な3次元構造に生体高分子を織り込む特殊技術で作成した顎骨形状担体を最適に複合化し、次世代のオーダーメイド広域顎口腔組織欠損再生治療を可能とする新規技術創生の基盤を築く事を目的とする。

2. 研究の計画

(1) 樹立したiPS細胞からのiPS細胞由来間葉系幹細胞様細胞 (MSLCの誘導)

HGF-iPSCsをフィーダーフリーの状態で成長因子を除いたマトリゲル上にて3日間mTeSR1で培養した。培地をDMEM low glucoseに10%FBSと10 ng/mL bFGFを含んだものに置換し、2日ごとに交換した。2週間培養後、細胞は0.025%トリプシンを用いて継代し、ゼラチンコートしたdish状で同様の培地に播種した。4回の継代後、細胞の形態は線維芽細胞様の形態に変化した。継代は、3~5日ごとに、3倍で0.025%トリプシンを使用して行った。

(2) MSLCの表面抗原解析

0.025%トリプシン処理後、細胞 (5×10^5) を得た。細胞表面抗原染色は、2%ヒト血清アルブミンを含んだPBSで行った。細胞懸濁液は特異抗体を標識し、30分間4℃にてインキュベートした。マウスアナンチト抗体は適正濃度で使用した。染色した細胞は、FACS Aria IIで解析し、データは、FlowJo softwareで解析した。

(3) MSLCのin vitroでの分化

三系統への分化は、過去の報告をもとに行った。骨分化誘導は、DMEM high glucoseに10% FBS、290 nMアスコルビン酸-2フォスフェート、5 mM β グリセロフォスフェート、100nMデキサメタゾンを添加したもので行った。脂肪分化誘導は、DMEM high glucoseに15%馬血清、100nMデキサメタゾンを添加したもので行った。軟骨分化誘導は、遠心分離にて細胞を1.5mLチューブに集め、DMEM high glucoseに50 mg/mLアスコルビン酸、100 nMデキサメタゾン、1:100 ITS premix、40 μ g/mL L-プロリン、10 ng/mL ヒト組み換えTGF β を添加したもので行った。すべての分化誘導において、培地は3日ごとに交換し、21日後分化の評価は、アリザリンレッド染色、オイルレッド染色、トルイジンブルー染色で行った。

3. 研究の成果

(1) MSLCの誘導

HGF-iPSCsがMSLCに分化するかどうか検討した。まず、初めに、HGF-iPSCs1-1(継代33、37、45)と1-2(継代23)をフィーダーフリーの状態にて3日間培養し、2週間直接分化誘導を行った。分化したiPSCは4継代後に完全に線維芽細胞様形態に変化した。我々は、iPSCから分化した線維芽細胞様細胞がMSLCかどうか検討した。これらの細胞と骨髄由来のMSCをCD44、CD73、CD90、CD105のようなヒト間葉系マーカー、CD34、CD45のような血管内皮、造血細胞マーカー、SSEA-3、TRA-1-60のような多能性マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。HGF-iPSC由来の細胞とMSCはすべての継代における検査でCD44、CD73、CD90、CD105を発現し、CD34、CD45は発現していなかった。CD34は血管内皮マーカーで、CD45は造血細胞マーカーであり、両方ともMSCでは発現しない。したがって、MSLCを血管内皮もしくは造血細胞と区別するために使用した。加えて、HGF-iPSC由来の細胞とMSCはSSEA-3、TRA-1-60といったHGF-iPSCsで発現していた多能性マーカーは発現していない。我々は、15継代まで増殖することを確認した。さらに、細胞はBMSCよりも相対的に高い増殖能を示した。

(2) MSLCのin vitroでの分化

MSLCの分化能を試験した。骨分化においては、細胞は骨分化誘導培地にて培養し、カルシウム沈着は、アリザリンレッドにて検出した。対照的に、基質の石灰化はコントロール培地(DMEMに10%FBS)で骨芽細胞に分化していないMSLCでは起こらなかった。脂肪分化においては、細胞は脂肪分化誘導培地で培養し、細胞質内の小さな脂肪滴はオイルレッド染色で観察した。軟骨分化においては、軟骨分化誘導培地でペレットを培養し、高プロテオグリカン細胞外基質はトルイジンブルー染色で赤紫色に染色された。これらのデータは、MSLCが形態、表面マーカー、3系統への分化を含んだいくつかの側面でMSCに類似していることを示唆した。

4. 研究の反省・考察

以前より、ESやiPS細胞からのMSLCへの分化誘導の研究は行われてきた。我々はiPS細胞をいったんフィーダーフリーの状況でマトリゲルをコート材として培養を行い、その後、トリプシン処理を行い、一般的なDMEMに10%血清とFGFを含む培養液で培養することで、MSLCに誘導することを可能にした。マトリゲルでなくVitronectin-Nでも可能であったが、MSLCへの誘導は遅かった。

細胞播種密度、培養液組成(血清、成長因子)、細胞外マトリックス等をアレンジすることでiPS細胞からiPSMSLCの樹立効率が高くなる。また、現在、理化学研究所等で提供されるプラ

スミドベクターを用いて樹立された歯髄や皮膚由来のiPS細胞株からもiPSMSLCの作製が可能となることが予想される。平成27年9月より再生医療用iPS細胞ストックプロジェクトが立ち上がり、血液から作製されたHLAホモのiPS細胞が提供されることとなり、これら細胞のiPSMSLCのストックを作製することで臨床応用への展開も可能である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ito T, Hashimoto Y, Baba S, Iseki T, Morita S. Bone regeneration with a collagen model polypeptides/ α -tricalcium phosphate sponge in a canine tibia defect model. *Implant Dent* 2015; 24: 197-203.
- ② Umezaki Y, Hashimoto Y, Nishishita N, Kawamata S, Baba S. Human Gingival Integration-Free iPSCs; a Source for MSC-Like Cells. *Int J Mol Sci* 2015;16:13633-13648.
- ③ Honda Y, Tanaka T, Tokuda T, Kashiwagi T, Kaida K, Hieda A, Umezaki Y, Hashimoto Y, Imai K, Matsumoto N, Baba S, Shimizutani K. Local controlled release of polyphenol conjugated with gelatin facilitates bone formation. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 14143-14157.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 ーヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ヒト化マウス ②ヒト免疫 ③疾患モデルマウス ④胸腺内分化			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
木 梨 達 雄	医 学 部	教 授	研究の統括と推進

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 崎 和 一	医 学 部	教 授	疾患モデルの確立と解析
藤 澤 順 一	医 学 部	教 授	臍帯血移植によるヒト化マウスの作製
李 成 一	医 学 部	准 教 授	ヒト化マウスの解析と改良

ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 ーヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立ー

1. 研究の目的

- (1) 免疫学はマウスを中心とした動物実験や培養細胞による実験系より知見を集積してきたが、医学研究に応用される際には種差に基づく差異が問題となってきた。ヒトを対象とした研究手法は倫理的側面から制限がありヒト特有の免疫現象を解明する手法の確立が待望されてきた。ヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞を超免疫不全マウスに移植し生着させる「ヒト化マウス」は、*in vivo* 環境でヒト由来免疫系細胞の分化や動態が観察でき、ヒトの免疫を解明する有力なツールである。我々は、ヒト免疫細胞の抗原応答や免疫寛容の成立と維持およびその破綻における動態調節に着目し、ヒト化マウスの免疫学的解析および2光子顕微鏡を用いた組織イメージング解析系樹立を目標とした。
- (2) 研究計画の前半においてなされた免疫学的解析を通し、以下の項目を主な検討課題とするにいたった。
 - ① 造血幹細胞から成熟免疫細胞への分化や組織間のおよび組織内への移動、胸腺の選択過程や炎症部位へ集積を調べ、動態制御分子の重要性を明らかにする。
 - ② よりヒトの疾患に近い免疫関連疾患モデルマウスとして、病態形成や新規治療手法の確立について検討する。

2. 研究の計画

- (1) 系としてのヒト化マウスは確立しているが、より効率のよい作成方法を樹立した。計画の前半では、免疫学的解析を主にすすめた。
 - ① 文書による同意により無記名で提供されたヒト臍帯血よりCD133陽性細胞を単離し、超免疫不全マウス（NOGもしくはNSGマウス）の骨髄内に注入する。ヒト由来細胞の生着を確認し、各種免疫細胞の出現状況をフローサイトメトリー法や蛍光免疫組織法にて解析する。免疫グロブリンをELISA法にて測定し抗原抗体反応に基づく抗体産生が行われているかを確認する。
 - ② アジュバンドを添加したタンパク抗原を投与し免疫反応を惹起させる。共同研究者が行ってきたウイルス感染実験と比較し、免疫反応成立に必要な因子の同定につなげる。
- (2) イメージング解析系樹立や遺伝子導入、shRNAによる遺伝子の発現抑制を目的とし、高効率の遺伝子導入手法を確立する。
 - ① レンチウイルスベクターを用いて蛍光タンパクを導入する系を確立する。移植されるヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞に蛍光タンパクを導入した上で、マウスに生着させ2光子励起顕微鏡にて各組織を観察する。
 - ② 免疫系細胞の分化や免疫反応の際の動態を生体内もしくは組織の薄片を*ex vivo*で直接観察することにより、生体内での免疫系細胞通しの相互作用について画像情報を得る。

3. 研究の成果

- (1) ① ヒト臍帯血からCD133陽性細胞を単離し移植するのは、他の研究グループで広く行われているCD34陽性細胞を用いた方法よりより幹細胞に近い前駆細胞を導入できる。また移植場所も経静脈的におこなう方法や肝臓内に移植する方法もあるが、骨髄内骨髄移植による直接注入する方法はすみやかに移植細胞が生着部位に達することができる利点がある。これらの手法を組み合わせ、最高で90%のヒト由来細胞生着率を認めた。生着率の向上は、作成個体数の限られるヒト化マウスの解析をすすめる上で非常な利点となった。末梢血、胸腺、脾臓、リンパ節をフローサイトメトリー法にて解析すると分化したリン

パ球はB細胞、T細胞ともに確認でき幹細胞より分化が起こっていることは確認できたが、とくにT細胞の成熟度は健常人コントロールと比べ悪かった。抗体産生は、健常人末梢血と比較しIgMは 約1/4の濃度で認められたものの、IgGは 1/60、IgAは 1/500程度と低く、免疫グロブリンのクラススイッチの効率が悪いことが示唆された。胸腺は認められるものの低形成であり、リンパ節は頸部、腋窩には認められるものの鼠径や膝下には欠損していた。このリンパ節形成の分布の異常はリンパ節形成に重要なケモカインBLCおよびその受容体CXCR5欠損マウスに似ていることからBLCシグナルの欠乏が示唆された。

- ② Bリンパ球のクラススイッチが行われる胚中心の形成を確認するため、完全フロイドアジュバンドを添加した卵白アルブミン（OVA/CFA）を皮下投与し免疫反応を惹起させた。免疫組織法で組織構築を検討したところ、リンパ節には胚中心様の組織像は認められなかったが、活性化Tリンパ球が瀰漫性に増殖していた。もともとリンパ節が欠損している部位に新たにリンパ節の出現を認めることはなかった。意外なことに低形成であった胸腺は免疫刺激により増大した。機能的に髄質に相当するCD4またはCD8陽性胸腺細胞の集積が島状に分布していたが、免疫刺激後、髄質相当部位がとくに増大していることが確認できた。これらよりT細胞の胸腺内分化はほぼ正常に行われていると結論した。次にT細胞の胸腺内分化に必要な胸腺上皮細胞、胸腺内の樹状細胞について検討した。フローサイトメトリ法、免疫組織法ともに皮質胸腺上皮細胞（cTEC）は検出したが、髄質胸腺上皮細胞（mTEC）はほとんど検出できなかった。樹状細胞はおもな3亜群のうち、CD11c陽性の従来型樹状細胞（cDC）とCD303陽性の形質細胞様樹状細胞（pDC）を未免疫状態で認めた。免疫されるとSIRP α 陽性の移住性樹状細胞（migratory DC）出現を認めた。髄質胸腺上皮細胞が未発達な状態でT細胞の分化が行われていることから、樹状細胞が抗原提示などの役割を代替していることが示唆された。
- (2) ① レンチウイルスによる血球系幹細胞への外来遺伝子導入の系を確立した。骨髓移植では移植後の遺伝子発現の低下がよく起こるが、種々のプロモーターを調べた結果、ユビキチンCプロモーターを用いた場合、安定発現することがわかり、第3世代レンチウイルスベクターに組み込み導入遺伝子を発現させる系とした。ヒト臍帯血由来血球系幹細胞／前駆細胞にレンチウイルスベクターにて蛍光タンパクVenus遺伝子を導入し蛍光観察できることを蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで確認できた。この蛍光タンパク導入幹細胞を超免疫不全マウス骨髓に移植し、イメージング可能なヒト化マウスを樹立する予定である。
- ② 免疫反応を惹起させる方法として、アジュバンド加卵白アルブミン皮下投与以外に、TNF α 単独もしくはインターロイキン1 β との投与やデキストランサルフェイト（DSS）経口投与を検討した。いずれもタンパク抗原を皮下投与したときと異なる反応であった。サイトカインの動態やイメージングにより免疫反応に動員される細胞群を特定し現象の解析へとつなげていく。

4. 研究の反省・考察

- (1) 今年度の研究成果で重要な点は、骨髓移植のみではヒト免疫系の発達は充分ではなく、免疫刺激をすることにより胸腺が発達することがわかった点である。特に免疫刺激によってヒト樹状細胞の末梢からの胸腺移動がおこっているため、同じヒト由来のMHCにより胸腺細胞が分化・成熟し、胸腺の肥大に至った推察される。これまでHLA遺伝子導入などMHCの不一致を克服する方法が報告されていたが、この系を用いるとことによりHLAを選ばず容易に胸腺発達が誘導できることが考えられ、さらに改良をしていく予定である。ヒト胸腺細胞の成熟過程を可視化する方法としてレンチウイルスによる蛍光蛋白質導入により、ヒト胸腺細胞の胸腺内移動や樹状細胞との相互作用を2光子イメージング等を用いて詳細に調べることができる見通しとなった。また、マウスでは胸腺スライス培養を用いた胸腺細胞の動態・分化・選択過程のイメージング系を確立しており、その応用が可能になった。この方法の利点はサイ

トカインや抗体などを直接胸腺内に導入でき、その効果を2光子イメージング、FACSなどを用いて調べることが可能な点である。この系を用いてマウス制御性T細胞の分化誘導にすでに成功している。制御性T細胞の不全は自己免疫疾患、慢性アレルギー等の難治性免疫疾患発症に重要であり、今後、骨髄移植後免疫刺激によって発達した胸腺とこの系を用いてヒト制御性T細胞の効率的誘導に展開していく予定である。これが実現できれば、制御性T細胞の分化促進による新たな免疫治療に展開できることが期待される。

- (2) ヒト疾患モデルとして、DSS誘発性腸炎を検討している。この系は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患と類似した腸炎を起こすことが知られている。腸炎にヒト由来免疫細胞が参加しているのなら、その動員を阻害することにより炎症を改善できる。 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する抗体は治験中であり、近い将来に臨床応用される見込みである。イメージングでヒトリンパ球の動態を解析し制御分子の阻害方法を確立することは、新たな治療法開発のシードとなりうる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Ueda Y., Kondo N., Ozawa M., Tomiyama T., Yasuda K., Kinashi T., Sema3e/plexin D1 modulates immunological synapse and migration of thymocytes by Rap1 inhibition *J Immunol*. 2016 Apr 1;196(7):3019-31. doi: 10.4049/jimmunol.1502121. Epub 2016 Feb 26.
- ② Yasuda K., Ueda Y., Ozawa M., Matsuda T., Kinashi T., Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. *FEBS Letter* 590(1):68-75. (2016) doi: 10.1002/1873-3468.12045.
- ③ Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, Nomura S, Uchida K, Okazaki K, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):968-74. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.043. Epub 2015 Jun 6.
- ④ Ishibashi M, Miyanaga Y, Matsuoka S, Kozuka J, Togashi Y, Kinashi T, Ueda M. Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 21;464(2):459-66. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.155. Epub 2015 Jul 2.

(2) 口頭発表

- ① Kinashi T. Roles of Rap1 signaling in immune synapse formation and self-tolerance. The 6th Xiamen Winter Symposium, Xiamen China 2015 Dec.5-7,
- ② Ueda Y., Establishment of thymic organ culture system for regulatory T cell development, The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hokkaido, Nov. 20 2015
- ③ Kondo N., Regulation of high-affinity LFA-1/ICAM-1 binding and immunological synapse formation, The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hokkaido Nov. 20 2015

(3) 出版物

なし

学 校 名	岡 山 理 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ロイコトリエンB ₄ 受容体の細胞内輸送制御機構の解明 －新規抗炎症薬開発のための基盤研究－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ロイコトリエンB ₄ ②新規抗炎症薬 ③BLT1 ④細胞内輸送制御 ⑤表在量調節 ⑥GPCR			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 村 元 直	理 学 部	教 授	研究代表 総括および 分子生物学、生化学、細胞生物学的な実験全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 極 秀 次	理 学 部	教 授	特定遺伝子のノックダウン・ゲノム編集実験、定量PCRによる遺伝子発現解析
橋 川 成 美	理 学 部	准 教 授	酵母2-ハイブリッド法によるBLT1結合蛋白質の探索、及び、蛍光標識受容体の培養細胞内での挙動解析(顕微鏡解析)

ロイコトリエンB₄受容体の細胞内輸送制御機構の解明 —新規抗炎症薬開発のための基盤研究—

1. 研究の目的

本研究の目的は、ロイコトリエンB₄の第一受容体であるBLT1の表在量調節をコンセプトとした阻害剤開発を進めるため、リサイクル／分解の制御機構を含む、受容体の細胞内輸送調節を解明することにある。こうした受容体の細胞内輸送には活性化に伴う受容体の修飾や結合タンパク質の存在が不可欠である。本課題では、細胞表面に局在するBLT1の活性化前後における修飾変化(特にリン酸化とユビキチン修飾)や結合タンパク質に注目し、これらがBLT1のシグナリングや細胞内輸送(細胞内取込み、リサイクル／分解制御)にどう関わるかを解明することで、BLT1の細胞内輸送調節(表在量抑制)という新しいBLT1標的創薬を確立する。

2. 研究の計画

BLT1が受けるリン酸化修飾やユビキチン修飾とその責任酵素、また、細胞内輸送に関わる結合タンパク質を同定する。活性化後の受容体の細胞内取込み、リサイクル／分解過程におけるこれらの意義を明らかにし、細胞表面に局在するBLT1の量的制御に役立てる。本課題では、アスパラギン残基の点変異でN型糖鎖修飾を欠失させた変異BLT1を利用する。この変異体はヘテロな糖鎖修飾がないためにSDS-PAGE解析でシャープなバンドを示し、リン酸化やユビキチン修飾で起こるバンドシフトが明確に判断出来る。なお、BLT1は例外的にN型糖鎖修飾を欠損させても小胞体に貯留せずに細胞膜に発現することを我々は確認している。

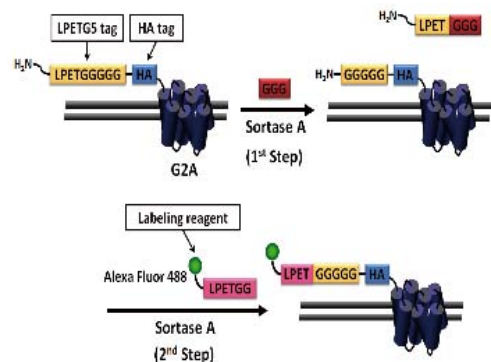
3. 研究の成果

(1) LTB₄の刺激濃度が低濃度から高濃度に徐々に変化することでBLT1を介するシグナル伝達に変換すること(リガンド濃度依存的なシグナル変換機構)を見出しつつある。

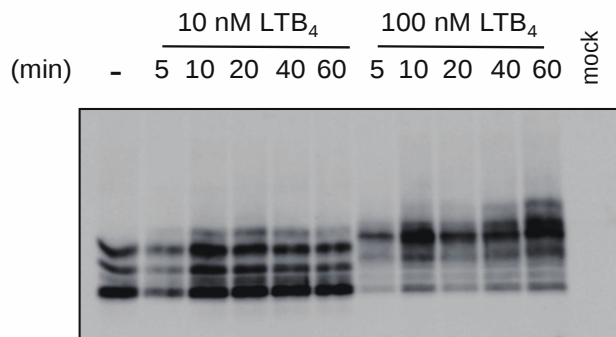
① 仮説が正しいならばBLT1は低濃度LTB₄で活性化後も細胞表面に留まることになる(細胞内取込みがない)。活性化BLT1が細胞内移行しないことを示す論文は既にあるが(Aratake et al. *FASEB J.* 2012)、これを独自の新技术で検証中である。本課題の協同研究者である東京大学大学院工学研究科の長棟輝行教授が開発した表在蛋白質の蛍光標識法(下図)を活用し、解析に必要な受容体発現コンストラクトを作製し、現在共焦点蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス解析を実施中である。

右図説明: Sortase-Aを利用したGPCRの蛍光標識法(Lan et al. *FASEB J.* 2014)。

2ステップ(1st & 2nd steps)からなる方法で、Sortase-Aは細胞外のみで作用するため、この技術では、Sortase-Aが認識する特定配列(図中の黄色タグ)をN末端(細胞外側)に有し、且つ、細胞表面に局在するGPCRだけが蛍光標識される。



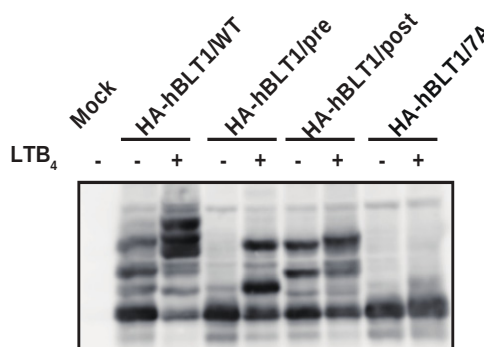
- ② BLT1のカルボキシ末端領域のリン酸化修飾がリガンド濃度依存的に亢進することを見出した（下図）。Phos-tag SDS-PAGE法を活用し、低濃度と高濃度刺激時の比較解析に加え、細胞周辺の環境を低濃度から高濃度へ連続的にシフトさせるなど、生体内環境を意識したLTB₄濃度変化でのBLT1リン酸化変化を観察中である。



上図説明： 仮説を立証する予備的データ（Phos-tag SDS-PAGE解析）。

N 型糖鎖修飾を欠失させたBLT1（バンドがシャープ故に移動度変化が分かりやすい）をHeLa細胞に発現させ、低濃度（10nM、遊走可能濃度）と高濃度（100nM）のLTB₄で刺激すると、高濃度刺激ではリン酸化が亢進した。なお、BLT1は無刺激状態でもリン酸化されていることがこのデータから分かった（最左レーン）。

- ③ BLT1のリン酸化の度合いが濃度依存的なシグナル変換に重要であることを証明する。まず、BLT1の全リン酸化部位を決定し、その欠損体を作製する。BLT1のリン酸化には恒常的なものが5カ所（preリン酸化と命名）とリガンド刺激依存的なものが2カ所（postリン酸化と命名）あることを明らかにし、恒常的、誘導的部位のそれぞれの欠損体と全リン酸化部位の欠損体（7A変異体）を作製した（Phos-tag SDS-PAGEにてpre、post部位のリン酸化欠損も確認済み。下図参照）。これらリン酸化部位欠損BLT1を用いてシグナル伝達の変化（cAMP産生、細胞内カルシウムイオン応答、ERK活性化、Aktキナーゼ活性化、脱顆粒、活性酸素産生など）を正常型と比較解析中である。



上図説明： 作製したリン酸化欠損BLT1の確認。Phos-tag SDS-PAGE法はリン酸化の有無をゲル上移動度の違いで判断する。正常型及び変異型BLT1をこの方法で解析した結果、LTB₄刺激前のリン酸化（バンドシフト）はpre部位欠損型（HA-hBLT1/pre）で、LTB₄刺激後のリン酸化はpost部位欠損型（HA-hBLT1/post）で消失し、全部位欠損型（HA-hBLT1/7A）では刺激の有無に関わらずバンドシフトが認められなかった。以上の結果から、目的とおりにBLT1のリン酸化部位を全て決定できたと判断した。

- (2) BLT1に対し高濃度LTB₄刺激と同じシグナルを惹起する脂質メディエーターの探索に着手した。BLT1に作用させた際に高濃度LTB₄で刺激した場合と同様のリン酸化パターンを起こす脂

質を脂質ライブラリーから探索中である。この実験に関しては期待するものが簡単には見つからない場合も想定されるが、脂質研究者の協力を得ながら議論を重ねて脂質ライブラリーの質を色々変えて進めると同時に、炎症部位から抽出、分離した新規脂質類も探索候補として評価する。ライブラリーからの探索の際の評価は、高濃度LTB₄でBLT1を刺激した場合のリン酸化パターンやシグナル伝達との比較で行う。ここで見出した新規脂質リガンドをBLT1創薬のためのツールとして活用する。

4. 研究の反省・考察

本課題研究でBLT1がLTB₄の刺激濃度の上昇に伴いリン酸化修飾を亢進させる現象を発見した。これは、1つのメディエーターが量的に変化することでシグナルを変換させることを予測させ、新しい概念の提唱に繋がるかもしれない。例えば、周辺のリガンド濃度が低濃度から高濃度に変わることでBLT1がシグナル変換を起こすことを確証して詳細なメカニズムを解析し、さらに、高濃度下での応答（低親和性状態）を代替できる新規脂質メディエーターを見出すことができればこの物質を新たなBLT1拮抗剤の開発ツールとして創薬現場に提供することができる。1つのGPCRが低濃度リガンドの感受から徐々に構造状態を変え、親和性が低下する構造へと変化し、高濃度下で別のシグナル伝達を起こすという作業仮説は全く新しく独創的である（情報伝達研究の新展開）。このように、BLT1のリン酸化修飾テーマは予想外の興味深い展開に進展し、創薬的に有用な情報でもあったことから、この1年はリン酸化修飾研究に多くの労力を注いだ。結果的にユビキチン修飾研究が計画通りに進まなかったことが反省点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Daisuke Yasuda, Yuki Imura, Satoshi Ishii, Takao Shimizu, Motonao Nakamura, "Atypical N-glycosylation motif of human GPR109A required for surface expression and intracellular signaling" *The FASEB J.*, Vol. 29(2015)2412-2422.
- ② Tetsuya Hori, Motonao Nakamura, Takehiko Yokomizo, Takao Shimizu, Masashi Miyano, "The leukotriene B4 receptor BLT1 is stabilized by transmembrane helical capping mutations" *Biochemistry and Biophysics Reports*, Vol. 4(2015)243-249.
- ③ Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu, Yoshitsugu Yamada "The absence of the leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinalnociceptive processing following intraplantar formalin injury" *The Molecular Pain*, Dec;11(1) (2015)doi:10.1186/s12990-015-0010-9.

(2) 口頭発表

- ① 談莫東、山口哲志、山平真也、中村元直、長棟輝行；一細胞アレイを用いたpH応答性GPCRの細胞内動態解析、第67回（2015年度）日本生物工学会大会、2015年10月26～28日（発表10/26）、城山観光ホテル、鹿児島県 鹿児島市
- ② Modong Tan, Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune；Development of the image cytometry method to analyze g-protein coupled receptor kinetics in the cell. The international chemical congress of Pacific Basin Societies 2015, Dec.15～20, Honolulu, Hawaii, USA

(3) 出版物

- ① 安田大恭, 中村元直, “薬理学的シャペロン - 小胞体蓄積GPCRを形質膜へ発現させる特異的リガンド” 特集「GPCR研究の最前線2016」, 医学のあゆみ, 第256巻(2016)385-392. 2016年1月30日出版
- ② 栗原裕基, 中村元直, “Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)” 生体の科学, 第66 (5) 巻 (2015) 2-3. 2015年10月15日出版

学 校 名	川 崎 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	慢性腎臓病と脳・心血管病との関連機序としての血管内皮機能障害 一分子機序の解明と新規治療法開発一		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①慢性腎臓病 ②内皮機能障害 ③バイオイメーjingグ ④酸化ストレス ⑤心血管病 ⑥脳卒中 ⑦認知機能障害			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
柏 原 直 樹	医 学 部	教 授	研究統括および論文の作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐 藤 稔	医 学 部	准 教 授	分子生物実験、細胞培養実験、結果解析
桑 原 篤 憲	医 学 部	講 師	バイオイメーjingグ実験
八 木 田 佳 樹	医 学 部	教 授	脳組織を用いた遺伝子発現解析、組織学的解析
山 内 明	医 学 部	准 教 授	生化学・分子生物学的解析
長 洲 一	医 学 部	講 師	バイオイメーjingグ実験

慢性腎臓病と脳・心血管病との連関機序としての血管内皮機能障害 —分子機序の解明と新規治療法開発—

1. 研究の目的

- (1) CKDにおける腎内微小血管のECDの分子機序を解明する
 - ① 病態腎微小血管における活性酸素種 (ROS), 一酸化窒素 (NO) 産生変化の解析
 - ② 糸球体内皮障害のアルブミン尿出現における役割の解明と分子機序の解析
 - ③ 内皮 (機能) 機能障害と微小炎症との連関機序の解析
- (2) CKDにおける脳内小血管の血行動態異常、血管機能異常の解析

2. 研究の計画

- (1) CKDにおける腎内微小血管のECDの分子機序を解明する
 - ① 病態腎微小血管におけるROS, NO産生変化の解析

ROS と NO は両義的存在であり、また緊密な相互関係を有するため、役割同定のためには両者を同時に検討する必要がある。ROS、NO の実体を蛍光指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用いて組織において直接可視化し検出する方法「in situ 可視化法」を確立している。糖尿病、高血圧では腎内微小血管系に eNOS uncoupling と ROS 産生亢進、鏡像的 NO 低下認めた (ROS/NO 不均衡)。また eNOS の補酵素である BH4 の組織濃度の低下を認めた。BH4 産生の律速酵素が GTP-cyclohydrolase I (GTPCH-1) である。本酵素を内皮特異的に高発現するトランスジェニックマウス (Tie2-GTPCH-1 Tg) に糖尿病モデルを作成し、ROS/NO 発現変化を検討する。
 - ② 糸球体内皮障害のアルブミン尿出現における役割の解明と分子機序の解析

アルブミン尿出現メカニズムにおける内皮障害の病因的役割を端的に証明するために、2 つの遺伝子改変動物を利用する。①NOX2 (NAD(P)H oxidase主要要素)を内皮特異的に高発現するtie2-NOX2 transgenic mouse(Tg)、及び②BH4 (eNOS機能維持に必須補酵素)の産生律速酵素であるGTPCH-1を内皮特異的に高発現するtie2-GTPCH-1Tgである。①は内皮特異的酸化ストレス負荷モデルであり、②はeNOS uncoupling抑制によるROS/NO不均衡を改善する内皮障害抑制モデルと位置づけることが可能である。①、②に腎障害モデルを作成しアルブミン尿出現の増悪あるいは抑制効果を検証する。腎障害モデルとして糖尿病自然発症マウスAkitaマウスとの交配、及びSTZ糖尿病モデルを作成する。
 - ③ 内皮 (機能) 機能障害と微小炎症との連関機序の解析

尿病性腎症などの多くの障害腎では、糸球体における (微小) 炎症を付随することが示されている。CKDではROS/NO不均衡状態であることを前述した。炎症形成に中心的役割を果たす転写因子NF- κ Bは酸化ストレスによって活性化される。その上流で制御するI κ B kinase (IKK) の活性化とROS/NO不均衡との関連を解明する。上述したCKDモデルにおいてROS/NO不均衡とNF- κ B依存性に発現制御されるICAM-1, VCAM-1炎症サイトカイン (MCP-1, IL-1等) 発現との関連を検討する。
- (2) CKDにおける脳内小血管の血行動態異常、血管機能異常の解析
 - 2 光子レーザー顕微鏡と蛍光色素を用いることでマウス脳皮質部微小血流を可視化できることを確認している。蛍光標識小分子プローブを用いて脳内血管透過性変化、blood brain barrier (BBB)機能変化を解析する方法を確立する。
 - GFR 低下及びアルブミン尿が血管性認知障害及びアルツハイマー型の発症リスクであることが示されている。CKD モデルを用い脳内微小血行動態変化、透過性変化、BBB 機能変化と認知機能変化を解析する。さらに CKD モデルマウスに脳梗塞/局所脳虚血モデルを作成する。梗塞部及び周辺のペナンプラ部の血行動態変化、透過性変化、認知機能変化を評価する。

3. 研究の成果

(1) CKDにおける腎内微小血管のECDの分子機序を解明する

① 病態腎微小血管における活性酸素種 (ROS) , 一酸化窒素 (NO) 産生変化の解析

Diaminorhodamine (DAR-4M : NO 指示薬) 、 Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA : ROS 指示薬) と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、生成 NO (bioavailable NO) を ROS と同時に組織上で可視化検出する in situ 可視化法を確立した。

本法を活用して病態モデル腎糸球体における NO (赤色蛍光で検出可能) , ROS (緑色蛍光で検出可能) 変化を検討し、病態腎における糸球体内皮細胞の形態的かつ、機能的変化の解析が可能となった。糖尿病、高血圧性腎障害、加齢腎では共通して酸化ストレスが亢進し、NO が減少 (ROS/NO 不均衡) が生じていることが判明した。

② 糸球体内皮障害のアルブミン尿出現における役割の解明と分子機序の解析

GTPCH-1 は proteasome 依存性経路により分解調節されており、糖尿病腎組織において減少することが判明した。AMPK は proteasome 抑制活性を有しており、AMPK 活性化は GTPCH-1 の分解抑制を介して GTPCH-1 発現を維持しうるということが判明した。Metformin は LKB1 依存性に AMPK をリン酸化・活性化する。糖尿病モデル (Akita, STZ) に metformin を投与し、AMPK 活性化を介した GTPCH-1 発現亢進によってアルブミン尿の抑制効果を認めた。

GTPCH-1 は eNOS 機能発現に必須であり、内皮機能調節において中心的役割を果たしている。糖尿病 (Akita DM) 糸球体内皮では (Fenestrae の消失、Glycocalyx 層の減少) 、機能的 (NO 産生能低下、eNOS uncoupling) が生じている (図 3-1, 2) 。一連の変化は GTP-CH1Tg マウスを Akita マウスとの交配により抑制された。

糖尿病腎では eNOS 機能発現に必須の補酵素 BH4 が低下する。BH4 不足を起因として eNOS uncoupling が生じる。BH4 産生の律速酵素が GTPCH1 であり、糖尿病では AMPK 活性低下によりプロテアソーム系亢進により分解が亢進している (図 3-4) 。GTPCH1 は腎症の治療標的となりうるということが判明した。

③ 内皮 (機能) 機能障害と微小炎症との関連機序の解析

CKD モデルにおいて ROS/NO 不均衡と NF- κ B 依存性に発現制御される ICAM-1, VCAM-1 炎症サイトカイン (MCP-1, IL-1 等) 発現との間に関連があることを明らかにした。

(2) CKDにおける脳内小血管の血行動態異常、血管機能異常の解析

2 光子励起方式レーザー走査型顕微鏡 (2-photon 顕微鏡) を利用する。生体臓器の深部まで、蛍光標識小分子の生体内挙動を 3 次元的に検出でき、長時間観察、動画で記録可能である。すでに各種分子量の蛍光標識 probe を用いてラット、マウスの糸球体血流の可視化、アルブミン等の macromolecule の糸球体係蹄壁からの漏出状態を直接個々の糸球体で可視化する方法を確立している。この技術を応用し、大脳皮質の微小循環動態や透過性変化を可視化、解析し、病態における変化を検討した。CKD モデルにおける脳内小血管内皮障害、透過性変化を解析する。同時に脳内小動脈における NO, ROS 産生変化を解析した。

血管内皮を可視化するために、Tie2-GFP マウスを用いる。同マウス頭蓋骨に観察窓の形成手術 (骨を薄削する thin skull 法、または頭蓋骨一部を削除する cranial window 法) を施行し、同部より観察した。FITC 標識大分子量デキストランをプローブとして用いて、脳皮質部の微小血行動態を可視化できることを既に確認している。Tie2-GFP マウスに一側頸動脈結紮と解除による虚血・再灌流モデル、あるいは糖尿病自然発症マウスである Akita マウスと交配することで糖尿病モデルを作成した。これらの病態モデルにおける脳内微小血管の血行動態変化、血管透過性変化を解析する。分子量 3000~10000 の Texas Red 標識デキストランを尾静脈より投与し、透過性変化を検討している。

4. 研究の反省・考察

糖尿病、高血圧等の生活習慣病を基盤とする CKD は①腎内血行動態異常（糸球体高血圧）、②諸種の代謝異常を 2 大基盤病態として発症、進展する。糸球体高血圧と内皮（機能）障害が重複すると、アルブミン尿が出現する。さらに蛋白尿へ移行し腎不全へと至る。

内皮機能障害はアルブミン尿出現に関与し、糖尿病、高血圧、加齢腎に共通した基盤病態であり、CKD と CVD の連関機序である。内皮機能障害は線維化にも関与しており、CKD/CVD の有望な治療標的病態であることが判明した。

脳内微小血管の血行動態を可視化する方法の確立に成功した。病態モデルにおける検討は現在も進行中である。鋭意、研究を続け成果をあげたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Deficiency of endothelial nitric oxide signaling pathway exacerbates peritoneal fibrosis in mice.
Kadoya H, Satoh M, Nagasu H, Sasaki T, Kashihara N. Clin Exp Nephrol. 19(4): 567-75, 2015
- ② Relationship between vascular function indexes, renal arteriolosclerosis, and renal clinical outcomes in chronic kidney disease. Namikoshi T, Fujimoto S, Yorimitsu D, Ihoriya C, Fujimoto Y, Komai N, Sasaki T, Kashihara N. Nephrology (Carlton). 20(9): 585-90, 2015
- ③ Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Taniguchi S, Takahashi M, Kashihara N. FASEB J. 29(9):3899-910, 2015
- ④ Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice. Nagasu H, Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N. Lab Invest. 96(1):25-36, 2016
- ⑤ Combination Irbesartan/Amlodipine versus Irbesartan/Cilnidipine for attenuation of albuminuria in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Satoh M, Nishi Y, Kadoya H, Itano S, Komai N, Sasaki T, Kashihara N. Pharmaceutica Analytica Acta. 6:5, 2015
- ⑥ Increased total homocysteine levels predict the risk of incident dementia independent of cerebral small-vessel diseases and vascular risk factors. Miwa K, Tanaka M, Okazaki S, Yagita Y, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K. J Alzheimers Dis. 49(2):503-13, 2015
- ⑦ Comparison of arteriosclerotic indicators in patients with ischemic stroke: ankle-brachial index, brachial-ankle pulse wave velocity and cardio-ankle vascular index. Saji N, Kimura K, Yagita Y, Kawai T, Shimizu H, Kita Y. Hypertens Res. 38(5):323-8, 2015
- ⑧ Chronic elevation of tumor necrosis factor- α mediates the impairment of leptomeningeal arteriogenesis in db/db mice. Yukami T, Yagita Y, Sugiyama Y, Oyama N, Watanabe A, Sasaki T, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K. Stroke. 46(6):1657-63, 2015
- ⑨ Deep cerebral microbleeds and renal dysfunction in patients with acute lacunar infarcts. Saji N, Kimura K, Yagita Y, Uemura J, Aoki J, Sato T, Sakurai T. J Stroke Cerebrovasc Dis. 24(11):2572-9, 2015

- ⑩ Increase in activated Treg in TIL in lung cancer and in vitro depletion of Treg by ADCC using an antihuman CCR4 mAb (KM2760). Kurose K, Ohue Y, Sato E, Yamauchi A, Eikawa S, Isobe M, Nishio Y, Uenaka A, Oka M, Nakayama E. J Thorac Oncol. 10(1):74-83, 2015

(2) 口頭発表

- ① 5-Aminolevulinic Acid Attenuates Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury in Mice. Atsushi Uchida, Minoru Satoh, Tamaki Sasaki, Naoki Kashiara. ASN KIDNEY WEEK 2015. Nov. 7, 2015. San Diego USA
- ② Effects of Lanthanum Carbonate on Intestinal Bacterial Flora in Chronic Renal Failure Mice. Minoru Satoh, Hiroyuki Kadoya, Seiji Itano, Atsushi Uchida, Yuji Sogawa, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashiara. ASN KIDNEY WEEK 2015 Nov. 6, 2015. San Diego USA
- ③ Possible Implication of Xanthine Oxidase Activation on the Pathogenesis Diabetic Nephropathy. Seiji Itano, Minoru Satoh, Atsushi Uchida, Hiroyuki Kadoya, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashiara. ASN KIDNEY WEEK 2015 Nov. 5, 2015. San Diego USA
- ④ Visualization of in vivo renin activity and its application to study the pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. Minoru Satoh, Kengo Kidokoro, Seiji Itano, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashiara. 10th World Congress for Microcirculation Sep. 25, 2015 Kyoto
- ⑤ Possible implication of xanthine oxidase activation on the pathogenesis diabetic nephropathy. Seiji Itano, Minoru Satoh, Yuji Sogawa, Atsushi Uchida, Hiroyuki Kadoya, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashiara. 10th World Congress for Microcirculation Sep. 25, 2015 Kyoto

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ディーゼル排ガス曝露により次世代の神経幹細胞に 生じる機能障害 ーマイクロRNAの変化と増殖・分化制御異常ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①胎児期 ②ディーゼル排ガス ③粒子状物質 ④神経幹細胞 ⑤マイクロRNA			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
立 花 研	薬 学 部	講 師	研究総括、実験、データ解析、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
武 田 健	東 京 理 科 大 学 研究推進機構 総合研究院	教 授	データ解析、論文作成
樋 口 敏 幸	薬 学 部	教 授	データ解析、論文作成

ディーゼル排ガス曝露により次世代の神経幹細胞に生じる機能障害 —マイクロRNAの変化と増殖・分化制御異常—

1. 研究の目的

(1) 背景

近年、転写産物の網羅的な解析が行われた結果、膨大な転写産物の多くがタンパク質をコードしないRNA（ノンコーディングRNA）であることが明らかになり、なかでも、マイクロRNAは生命の陰のプログラムではないかと注目を浴びている。マイクロRNAは対応する遺伝子（mRNA）に作用することでタンパク質の合成を抑制する。アポトーシス、細胞増殖、血球・神経・筋など組織の分化といった基本的な生体機能を制御していることが知られ、生物が生命を維持する上で重要な役割を果たす。特に、マイクロRNAの中には臓器特異的に発現するものが知られており、個体の発生・分化に不可欠な要素と考えられている。また、種々のがんや糖尿病などの病態に応じて特異的なマイクロRNA発現パターンを示すことが明らかとなっている。以上より、マイクロRNAは生体の正常な発達や健康状態と密接な関係があると考えられる。

我々はこれまでにディーゼル排ガス（DE）の生体影響について、マウスを用いて胎仔期曝露の影響を検討した。その過程で、脳血管周囲細胞の変性、血管内皮やアストロサイトなどへの影響などを世界に先駆けて明らかにした。加えて、脳内モノアミン濃度の変動、記憶学習能力の低下などの機能的変化が認められたことから、脳神経疾患との関連に注目した。これらの影響はDE中の粒子状成分の除去によって軽減されることから、粒子状成分が特に重要であると考えられる。

器官形成段階である胎児期に受けた影響が不可逆的な変化として表れる場合、一度受けた影響が出生後も残り、疾病の発症につながる恐れがある。これまでに我々が行った研究では、DEの曝露を胎仔期に限定して行っている。したがって、これまでに認められた障害は器官形成段階における発生や分化に生じた異常に起因する可能性が高い。また、近年、マウスにおいて胎仔期における親の食餌が産仔のマイクロRNA発現に影響を及ぼすことが報告されている。これらの報告から、胎仔期のDE曝露によって次世代に生じる脳神経系の健康影響にマイクロRNAの発現変動が関与する可能性が考えられる。

胎仔期は個体の形成に向けて細胞の分化や淘汰、機能獲得といった発達が盛んに生じる期間であることから、脳神経系の正常な発達の要となる神経幹細胞の遺伝的・機能的変化に注目した。これらの神経幹細胞に生じるマイクロRNA発現異常は各種神経細胞の正常な増殖・分化や機能獲得を攪乱し、脳神経系の組織やネットワークの形成に影響を及ぼす可能性が高い。

(2) 目的

本研究では、以下の項目について明らかにすることを目的として実験を行った。

- ① 妊娠マウスにDEを曝露し、胎仔あるいは新生仔の脳から神経幹細胞を得る。得られた神経幹細胞のマイクロRNA発現量を網羅的に解析し、DE胎仔期曝露により発現変動するマイクロRNAを明らかにする。
- ② ①で得られた神経幹細胞の増殖能を調べるとともに、人工的にニューロン、グリア細胞等の各種神経系細胞への分化を誘導し、分化のされやすさに変化が生じているか検討する。また、分化した細胞について遺伝的・機能的解析を行い、その性状の変化を明らかにする。
- ③ ①、②から、DEによる脳機能障害に関与するマイクロRNAを見出す。特にDE曝露により脳組織に生じる病変部位とマイクロRNA発現部位の相関から脳機能障害への関与を検討する。

2. 研究の計画

(1) 概要

妊娠マウスにDEを曝露し、胎仔・新生仔から神経幹細胞を得た。得られた神経幹細胞のマイクロRNA発現レベルを網羅的に解析した。変動が見出されたマイクロRNAについては、バイオイ

ンフォマティクスを用いた*in silico*での検討により、その標的となる遺伝子（mRNA）を抽出した。さらに、見いだされた標的候補遺伝子を機能的に分類した。また、神経幹細胞の増殖能に及ぼす影響について検討を行った。本研究では、環境基準値に近い都市部重汚染地区の大気汚染粒子濃度、すなわち、実際に起こりうる汚染状況の条件で実験を行った。

(2) 実験動物及びDE曝露

実験動物として妊娠マウス（C57BL/6J）を用いた。曝露時期は、妊娠期に実施し、胎仔・新生仔から試料を採取した。曝露装置は共同研究を行う東京理科大学 研究推進機構 総合研究院 環境次世代健康科学研究センター内に設置された設備を用いて行った。曝露装置の運転、管理および実験動物の飼育・管理は当該センターの武田健教授の協力を得て行った。なお、動物実験に関しては学内の倫理委員会における審査・承認を得た後に開始し、動物実験倫理に関する規定を遵守して行った。

(3) 神経幹細胞の培養および増殖能についての検討

DEの曝露後、胎仔あるいは新生仔から脳を採取し、専用の培地を用いて神経幹細胞を特異的に培養し、神経幹細胞を得た。得られた神経幹細胞を3日間培養し、DE曝露群、非曝露群における増殖能の変化の有無について検討を行った。

(4) マイクロRNA発現の網羅的解析および標的遺伝子の同定

得られた神経幹細胞からtotal RNAを抽出・精製した後、マイクロアレイを用いて網羅的に発現量の解析を行い、DE曝露により発現変動するマイクロRNAを同定した。

マイクロRNAの遺伝子を実験的に同定する優れた手法は現在のところ十分には確立されていない。その一方で、バイオインフォマティクスを用いたマイクロRNAの標的遺伝子候補の推定手法が開発され、多くのツールが無償で利用可能となっている。このことから、解析原理が異なる複数のツール（主に、塩基配列、結合エネルギー、立体構造の安定性に基づく解析を行う）を用いて標的候補遺伝子の探索を行った。特に、複数の解析ツールにおいて共通して抽出された遺伝子はマイクロRNAの標的となる可能性が非常に高いため、GO termを用いて機能的に分類することで、どのような機能に影響が及ぶか検討を行った。

3. 研究の成果

(1) 実験動物及びDE曝露

C57BL/6Jマウスを用い、妊娠期（仔の器官が急速に発達する妊娠10日目から18日目）にDEの曝露を実施し、新生仔から試料を採取した。DEは、粒子濃度として100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ となるように調整して1日8時間曝露した。この条件を用いることで、環境基準で定められた基準値（1日平均値）と同等の粒子濃度での曝露となる。

(2) マイクロRNA発現の網羅的解析および標的遺伝子の同定

① DEの曝露後、新生仔（1日齢）から脳を採取し、専用の培地を用いて神経幹細胞を特異的に培養し、神経幹細胞を得た。

② 得られた神経幹細胞からtotal RNAを抽出・精製した後、マイクロアレイを用いて網羅的に発現量の解析を行い、DE曝露により発現変動するマイクロRNAを同定した。その結果、雄性産仔の神経幹細胞では18分子、雌性産仔の神経幹細胞では15分子のマイクロRNAに発現変動が認められた。中でも1分子のマイクロRNAは雌雄で共通して発現が変動しており、DE曝露による神経幹細胞の性質の変化に大きく関与することが示唆された。

③ バイオインフォマティクスを用いてマイクロRNAの標的遺伝子候補の推定を行った。解析原理が異なる複数の解析ツールを用いて、発現変動が認められたマイクロRNAの標的候補遺伝子の探索を行った。その結果、400の標的候補遺伝子を見出した。これらの標的候補遺伝子についてGO termを用いてそれぞれの遺伝子が司る機能を分類した結果、“nervous system development” “apoptotic process” “cell cycle”といった機能が抽出された。この結果は、妊娠期のディーゼル排ガス曝露が産仔の神経幹細胞の増殖や分化に影響を及ぼすという本研究の仮説を支持している。実際に、予備的な実験を行ったところ、DE曝露群の神経幹細胞

胞では非曝露群に比べて増殖能が低下する傾向が認められた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究では、胎仔期が個体の形成に向けて細胞の分化や淘汰、機能獲得といった発達が盛んに生じる期間であることから、脳神経系の正常な発達の要となる神経幹細胞の遺伝的・機能的変化に注目した。神経幹細胞に生じるマイクロRNA発現異常は各種神経細胞の正常な増殖・分化や機能獲得を攪乱し、脳神経系の組織やネットワークの形成に影響を及ぼすと仮説を立て、検証を行った。発現変動が認められたマイクロRNAの標的遺伝子を推定し、その機能をGO termを用いて*in silico*で解析したところ、増殖や分化に関与することが報告されている遺伝子が多く抽出された。この結果は、DE胎仔期曝露がマイクロRNAの発現変動をひき起こし、神経幹細胞の増殖や分化に影響を及ぼすことを示唆しており、重要な結果である。引き続き、神経幹細胞の機能的な変化について詳細な分子メカニズムを明らかにすることが、DE胎仔期曝露による脳神経系への影響を理解し、またその回避に向けた対策を検討する上で重要であると考ええる。
- (2) 研究の経過については、当初の予定よりやや遅れたものの計画に沿って進行することができた。引き続き、詳細な分子メカニズムの解明に向け検討を継続する予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
 - ① Ken Tachibana、Kohei Takayanagi、Ayame Akimoto、Kouji Ueda、Shotaro Kawazoe、Yusuke Shinkai、Masakazu Umezawa、Ken Takeda : Disruption of epigenetic regulation and the health effect caused by prenatal nano-sized particle exposure、4th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2016 (iPoPS2016)、Chiba、Japan (2016年2月)
 - ② 梅澤雅和、小野田淳人、川副翔太郎、立花研、武田健 : ナノ粒子曝露が脳の発達に及ぼす影響—鋭敏なマーカーと毒性学的意義、第42回日本毒性学会学術年会、金沢 (2015年6月)
- (3) 出版物
なし

学 校 名	福 岡 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 ーHB-EGF発現に関与する分子群の解析ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①がん治療 ②標的分子 ③創薬開発 ④HB-EGF ⑤コンパニオン診断薬			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 本 新 吾	医 学 部	教 授	研究代表者 統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
四 元 房 典	医 学 部	講 師	実験・論文作成
宮 田 康 平	医 学 部	助 教	実験・データ整理
深 川 怜 史	医 学 部	大 学 院 生	実験・データ整理

ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 ーHB-EGF発現に関与する分子群の解析ー

1. 研究の目的

本研究の目的は、造腫瘍能のない卵巣癌、乳癌、胃癌のがん前駆細胞を用いて、種々の遺伝子発現ライブラリーを導入し、HB-EGFの発現亢進にともない造腫瘍能の獲得に寄与する分子群を探索・同定する。HB-EGFは上皮系増殖因子ファミリーに属する細胞増殖因子であり、近年、申請者らはHB-EGFが卵巣癌・乳癌・胃癌などの悪性腫瘍の治療の標的分子であること明らかにしている。これまでの研究成果より、血中HB-EGF値や組織中HB-EGF発現量が高い症例が予後が不良であり、HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)投与により血中や組織中のHB-EGF発現が抑制されることは、申請者らにより明らかにされている。本研究の成果による治療診断検査法の開発とBK-UM創薬開発を併行して成果をあげることで、臨床的予後の改善と医療費の削減を同時に目指した医療イノベーションを達成でき、さらなる創薬開発が進むことが期待できる。

- ① 代表的な癌抑制遺伝子p53およびBRCAを欠失させた細胞株を用いて、遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーによる癌・増殖に関わる遺伝子を同定する。また、HB-EGFの発現に寄与する遺伝子の同定のため、HB-EGFの3'UTR側にIRES配列に続くGFP遺伝子配列を挿入し、HB-EGFとGFPの発現が相関する細胞に遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーを感染させ、HB-EGFの発現を制御する遺伝子を同定する。
- ② HB-EGF特異的阻害剤であるBK-UMの医師主導型臨床試験において、HB-EGF値を臨床試験参加の基準のひとつとして参加症例の選別していた。その場合、患者血清をELISA法によりHB-EGF値を測定し、高値症例にはBK-UMの効果が期待できると期待していた。しかし、ELISA法による測定では遊離したHB-EGFを測定していない可能性があり、測定方法を見直す必要があった。また、BK-UM投与症例のなかに、HB-EGFが低いにも関わらずBK-UMが効果があるなどの問題点があった。以上より、HB-EGF以外または併用でのコンパニオン診断薬の開発が必要であった。

一方でnon-coding RNAといわれるmicroRNAは近年の研究により、癌の増殖、転移に関与することが多数報告されている。さらに、RNAのため血液中では容易に壊れてしまうと考えられていたが、エクソソームに内包されることで、血液中においても安定し存在することが報告された。そこで、我々はmicroRNAに着目しコンパニオン診断薬の開発を開始した。BK-UMの臨床試験参加症例や卵巣癌患者、正常卵巣患者、良性卵巣腫瘍患者の血液を対象にマイクロアレイ解析を実施し、HB-EGFの発現に関わるmicroRNAを検索するとともに、BK-UMのコンパニオン診断薬を開発する。

2. 研究の計画

- ① HEK293細胞を用いて、HB-EGF 3' UTR側にIRESに続くGFP遺伝子配列を挿入させた細胞を樹立する。樹立したレポーター細胞を用いて、HB-EGFの発現に寄与する遺伝子をshRNAライブラリーおよびcDNAライブラリーを併用することで、スクリーニングする。同様の検討をがん細胞株、正常乳腺および正常卵巣上皮より樹立した細胞株を用いて試みる。さらに、3種類の乳がん細胞株を用いて、二次元培養サンプルとマウスの皮下に移植したxenograft modelを作製し、CGHアレイを行う。
- ② 臨床試験の参加症例や卵巣癌、良性卵巣腫瘍患者の血清をマイクロアレイ解析する。検出されたmicroRNAを検討し、BK-UMの効果が期待できる症例を診断するmicroRNAを同定している。さらに、HB-EGFとともに変動するmicroRNAを同定し、卵巣癌患者血清を用いてreal-time PCR法で臨床的意義を検証していく。

3. 研究の成果

- ① CGHアレイによるスクリーニングやウィルスベクターライブラリーを用いたHB-EGFの制御に関わる遺伝子の探索を行った結果、Y-14 protein(RNA binding motif 8A)を含む3つの遺伝子を同定した。さらに、リポフェクション法によるsiRNAの導入でそれらの遺伝子を抑制すると、HB-EGFを含むEGFR ligandの発現が抑制された。なかでもY-14が最も抑制される結果となった。また、RBM8aを安定し過剰発現または抑制した細胞株をマウスに皮下移植したxenograft modelによる腫瘍増殖能の検討では、Y-14の抑制では腫瘍増殖が抑制され、Y-14の過剰発現では腫瘍増殖が亢進した。
- ② マイクロアレイ解析の結果、予後不良な卵巢癌患者で優位に発現が上昇するmicroRNA、低下するmicroRNAを同定した。さらに、それらのmicroRNAを用いてRT-PCR法で臨床的意義を確認したところ、卵巢癌患者の予後不良群で優位に発現が上昇しバイオマーカーとなりうる3つのmicroRNAを同定した。さらに3つのmicroRNAを用いて、正常卵巢や良性卵巢腫瘍患者および卵巢癌患者の血液を対象にRT-PCR法で発現解析を行った結果、卵巢癌患者で優位に高く、さらに治療後6ヶ月以内に再発した予後不良症例で優位に発現が上昇するmicroRNAを同定した。

4. 研究の反省・考察

- ① Y-14はヒトでは、RNA binding motif 8Aとよばれ、mRNAのスプライシングや輸送、翻訳や調節に関わるエクソンジャンクソン複合体の一つである。MAGOH、PYMなどの分子との相互作用により翻訳調節を行うことがわかっている。今回の研究では、Y-14はHB-EGFの発現を調節することを証明した。さらに、HB-EGF発現の低下において、転写後発現調節機構が関与しているかを検討するため、RBM8Aをノックダウンした細胞により得られたRNAで、HB-EGFの全長を増幅させるようなRT-PCRを行った。その結果、RBM8Aをノックダウンした細胞で、全長のPCR産物は減少し、短いフラグメントが増幅され、スプライシング異常が起こっていることが判明した。
- ② microRNAの機能の特性として、ひとつの遺伝子を制御するために複数のmicroRNAが関連すると考えられている。反対に複数の標的遺伝子は複数のmicroRNAに制御されている。今回の解析で同定されたmicroRNAは1種類であり、さらに解析を進めることでコンパニオン診断薬の候補として数種類のmicroRNAを同定する必要がある。そのためには、マイクロアレイ解析の結果を再検討し、候補microRNAを検出し、RT-PCR法での臨床的意義の確認を行う必要がある。さらには、同定されたmicroRNAを用いて、卵巢癌細胞株へ遺伝子導入し細胞増殖試験や薬物感受性試験などを行っていく予定である。さらにそれらのmicroRNAを安定的に過剰発現した細胞株をウィルスベクターを用いて作成する。その細胞をマウスの皮下に移植し、xenograft modelでの腫瘍増殖能の検討などを行う必要がある。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
「翻訳調節分子によるHB-EGFとがん増殖能の制御」 宮田 康平
第14回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 平成27年7月17日 松本
- (3) 出版物
なし

学 校 名	福 岡 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの 解明 ー真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①口腔細菌学 ②微生物学 ③歯学 ④免疫 ⑤感染 ⑥炎症 ⑦細胞分化 ⑧シグナル伝達			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 芳 彦	口 腔 歯 学 部	教 授	総括、主な研究の遂行

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 環	口 腔 歯 学 部	准 教 授	真菌を用いた実験

口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの解明 －真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発－

1. 研究の目的

口腔真菌感染症は、カンジダ菌などの口腔内常在菌が原因で発症する難治性の口腔感染症である。その病態には免疫応答が関与しているが、その制御機構については未だに解明されていない。高齢化が進む中で、義歯の使用と相まって患者数が増加傾向にある。再発を繰り返す抗真菌薬療法には限界があるために新しい予防法と治療法の開発が待たれているが、真菌に特異的な免疫応答を誘導する治療法の開発は進んでいない。

Candida albicans (*C. albicans*)は、口腔真菌感染症の病原菌として最も頻度が高く、その病原因子や生体防御との関係が特に研究されており、獲得免疫系が疾患と深く関与していることが知られている。なかでもインターロイキン-17 (IL-17) 産生を特徴とするヘルパーT細胞Th17が口腔真菌感染症において重要な役割をはたしており、Th17細胞欠損マウスでは口腔真菌感染症が重篤化する。真菌そのものがヘルパーT細胞を分化させる抗原と示唆されているが、T細胞受容体を介した真菌の抗原性に着目してTh17細胞の分化や遊走への影響を包括的に解析した報告は認められない。また、これらのTh17細胞の生体内における主たる分化の「場」が、小腸であることが明らかにされてきたことにより、口腔真菌感染症の研究は口腔から全身を対象とした解析へ移行するパラダイムの転換の必要性が生じてきたと考えられる。

本研究は、病原微生物と宿主免疫応答の両側面からのアプローチによって、研究代表者がこれまで明らかにしてきた免疫系細胞の分化と遊走に焦点をあて、口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークを解明するとともに、抗原特異的なT細胞エピトープを同定することで、口腔真菌感染症を選択的にターゲットとする新しい予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) ヘルパーT細胞の分化と遊走を司る真菌のT細胞エピトープの同定

- ① ヘルパーT細胞の分化・遊走を司る真菌コンポーネントの同定：ヘルパーT細胞の分化能について、IL-17産生を指標として評価する。具体的には、野生型マウスの骨髄を採取し、骨髄細胞をGM-CSFと7日間共培養することで骨髄細胞由来樹状細胞(BM-mDC)を誘導する。BM-mDCを抗原提示細胞とし、抗原として全ゲノムシーケンスが判明している真菌*C. albicans* SC5314株を用いて、野生型マウスから単離したナイーブT細胞を*in vitro*で分化誘導させて検証する。分化誘導されたヘルパーT細胞を再刺激してサイトカインを産生させた後に、細胞内サイトカイン染色をしたサンプルをFlowcytometryで解析してIL-17産生を評価する。その際に、酵母形、菌糸形、バイオフィルムといった各種形態で培養した真菌について、全菌体抽出液、可溶性画分、不溶性画分や細胞壁画分といった各種分画成分に分離したものを抗原として用いる。これらを順次、評価することで主要な抗原部位を絞り込む。
- ② 網羅的解析によるカンジダ菌のT細胞エピトープの同定：さらに、候補となった分画成分を、逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相HPLC）、二次元SDS-PAGE、プロテオミクス的手法により順次解析を進めることで、T細胞エピトープを同定する。プロテオミクス解析は共同研究拠点である九州大学生体防御医学研究所 プロテオミクスセンターの支援を受ける。

(2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析

- ① 腸管粘膜内への真菌の取り込み：真菌の全身における免疫応答の影響を解析するために、蛍光標識された真菌の実験系を構築する。FITCで蛍光標識した真菌を野生型マウスへ胃ゾンデにて投与し、腸管粘膜内への取込みを組織学的あるいはFlowcytometryを用いて観察する。

- ② 生体における口腔内樹状細胞の細胞遊走の解析：FITCで蛍光標識した真菌を作製の上、このFITCで蛍光標識された真菌をBM-mDCと共培養することで、真菌を取り込んだ抗原提示細胞を可視化できるか蛍光顕微鏡で検証する。さらに、BM-mDC をPE-CD11cで染色することで、樹状細胞がFITCで蛍光標識された真菌を取り込んでいることをFlowcytometryによって確認する。T細胞エпитープ抗原をパルスした樹状細胞を蛍光標識し、野生型マウスの口腔粘膜下に移入した後、蛍光顕微鏡ならびにFACSを用いて所属リンパ節および全身への遊走を解析する。

3. 研究の成果

(1) ヘルパーT細胞の分化と遊走を司る真菌のT細胞エпитープの同定

- ① ヘルパーT細胞の分化・遊走を司る真菌コンポーネントの同定：ヘルパーT細胞の分化能についてIL-17産生を指標として評価した。具体的には、骨髓細胞由来樹状細胞(BM-mDC)を抗原提示細胞とし、抗原として全ゲノムシーケンズが判明している真菌*C. albicans* SC5314株を用いて、IL-17-GFPレポーターマウスから単離したナイーブT細胞をin vitroで分化誘導させて検証した。その際に、酵母形、菌糸形、バイオフィルムといった各種形態で培養した真菌について、全菌体抽出液、可溶性画分、不溶性画分や細胞壁画分といった各種分画成分に分離したものを評価した。可溶性画分ならびに細胞壁画分を主要な抗原部位の候補として絞り込むことに成功した。
- ② 網羅的解析によるカンジダ菌のT細胞エпитープの同定：候補となったこれらの分画成分に対して、逆相HPLCの手法を用いて抗原を複数のフラクションとして分離した。この逆相HPLC解析によりいくつかのピークが検出されており、画分成分が分離されていることが確認された。これらフラクションを用いて、同様のIL-17産生を指標とした評価方法によって解析したところ、IL-17の産生を高く誘導する主要なフラクションが存在していることを見出した。以上の成果は、平成27年9月歯科基礎医学会（新潟）にて共同研究者とともに2演題「*C. albicans*の新規T細胞分化誘導抗原の探索」「口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明」として発表した。その後、IL-17の産生を高く誘導する主要なフラクションと周辺のフラクションをSDS-PAGEにて電気泳動分離を行い、銀染色法にてタンパク質を可視化したところ、幅広い分子量において多数のバンドが存在していることが確認された。主要なフラクションには周辺のフラクションには存在しないバンドが複数存在していることが確認されたものの、候補となるバンドを絞り込むことは困難であることが予想された。そこで、二次元SDS-PAGEを用いて、主要なフラクションサンプルを二次元に展開して周辺のフラクションと比較検討した。その結果、複数の特異的なスポットがあることが確認され、これらのスポットに対してプロテオミクス解析を進めている。

(2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析

- ① 腸管粘膜内への真菌の取り込み：真菌の全身における免疫応答の影響を解析するために、蛍光標識された真菌の実験系を構築した。FITCで蛍光標識した真菌を野生型マウスへ胃ゾンデにて投与し、腸管粘膜内への取込みを組織学的あるいはFlowcytometryを用いて観察した。全身において真菌への生体防御を獲得する可能性が示唆された。
- ② 生体における口腔内樹状細胞の細胞遊走の解析：FITCで蛍光標識した真菌を作製の上、このFITCで蛍光標識された真菌をBM-mDCとin vitroで共培養したところ、多数のBM-mDCが真菌を取り込んでいる様子が蛍光顕微鏡的に観察された。さらに、BM-mDC をPE-CD11cで蛍光染色してFlowcytometryにて解析したところ、ほとんど全てのカンジダ菌がBM-mDCに取り込まれていることが確認された。

4. 研究の反省・考察

抗原特異的なT細胞の解析、特にT細胞受容体を介して認識する真菌特異的な抗原部位につい

での解析は国内外を問わず進んでおらず、Th17細胞を誘導するT細胞エピトープは未だに明らかになっていない。また、Th17細胞そのものは歯周病などでは増悪因子となるため、口腔真菌感染症に対するワクチンの開発において、抗原と無関係に単にTh17細胞の免疫応答を誘導するだけでは不十分であり、T細胞受容体を介した真菌特異的な抗原部位の同定は不可欠であると言える。本研究では、我々が取り組んできた「宿主免疫応答」と「病原微生物*C. albicans*」の両側面からのアプローチにより、Th17細胞を誘導する真菌特異的な抗原部位の同定を進めており、候補となる抗原の絞り込みを経てプロテオミクス解析を進めている。本研究によって得られた研究成果により病原微生物を選択的にターゲットとする口腔真菌感染症の予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目指していく。

さらに、従来の研究は、*in vitro*あるいは口腔内局所に限局された解析によって進められてきたが、歯科口腔領域の疾患を全身の健康と密接に関連した疾患としてとらえる「口腔医学」という新しい概念でとらえる必要があると考えられる。今後、「口腔医学」という新しい領域の発展を念頭に研究を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 長 環、田崎園子、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、田中芳彦。*Candida albicans*の新規T細胞分化誘導抗原の探索。第57回歯科基礎医学会学術大会・総会。新潟、9月12-13日（13日）、2015。
- ② 田崎園子、長 環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、小島 寛、田中芳彦。口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明。第57回歯科基礎医学会学術大会・総会。新潟、9月12-13日（12日）、2015。

(3) 出版物

なし

学 校 名	広島国際学院大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	超高放射能汚染土壌の簡便な除染と食用基準値内の野菜栽培 ー光合成細菌による実用的除染及び農業復興ー		研 究 分 野	環 境 科 学
キ ー ワ ー ド	①放射能汚染土壌 ②土壌浄化 ③光合成細菌 ④農業復興			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐々木 健	工 学 部	教 授	研究統括、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
新 川 英 典	工 学 部	教 授	光合成細菌の培養、放射能分析
竹 野 健 次	工 学 部	教 授	光合成細菌による土壌除染、データ整理、論文作成
佐々木 慧	工 学 部	講 師	光合成細菌による土壌除染、データ整理、野菜栽培

超高放射能汚染土壌の簡便な除染と食用基準値内の野菜栽培 －光合成細菌による実用的除染及び農業復興－

1. 研究の目的

(1) 光合成細菌による放射能汚染土壌除染技術の実地における試験

- ① 福島第一原発事故により放射能汚染された土壌のうち、超高汚染土壌（約10-50万Bq/kg）の土の除染を、光合成細菌法を用いて行い、除染後、各種野菜栽培を行って、食用基準値内の野菜栽培が可能かを試験する。光合成細菌の量や培養方法（栄養塩添加、通気量調製等）を変化させ、除染効果を高めるとともに、野菜への放射性セシウムの移行を抑え、どの程度の超高汚染土壌なら農業復興が可能かどうかを明らかにする。
- ② 福島では、黒ボク土、褐色森林土、褐色低地土等多種類の土壌が存在しているが、どのタイプの土壌で、どの程度の汚染ならば、本技術で農業復興が可能かを明らかにする
- ③ 土壌放射能の、光合成細菌や野菜への移行を定量的に把握し、光合成細菌の保有する強力なカリウムポンプによる現象である仮説（佐々木仮説）を証明する。

2. 研究の計画

(1) 福島県浪江町での除染実験

- ① 前年度に引き続き、福島県浪江町の福島第一原発から約20km地点から採取した高濃度に汚染された土壌（20-50万Bq/Kg）で除染試験を行う
- ② 従来の光合成細菌ビーズを用いる方式だけでなく光合成細菌の培養液を直接用いて回収する方法を試みる。
- ③ 除染した土壌で、食用基準範囲を満たす（100Bq/Kg以下）野菜の栽培を実現する。

3. 研究の成果

(1) 高濃度汚染土壌の除染

実験地域は前年度20万Bq/Kg以上を確認したエリアだが、実験開始前に土壌の放射線濃度を計測した際は最大で12万Bq/Kgほどの土壌しか見いだせなかった。放射能の自然減衰や雨水による放射性物質の地下への浸透が原因と考えられた。当初は20～50万Bq/Kg程の黒ボク土、褐色森林土、褐色低地土のような様々な土壌で試験をする予定であったが、目的の放射能濃度の土壌試料が得られなかったため、計測したエリア内で最も高かった森林内の腐葉土のみで試験を行った。

60L容量のコンテナボックスに汚染土壌30kgと井戸水20Lを入れ、乳酸菌を10L添加し37℃で3日間嫌気条件で乳酸菌処理を行った。その後、ネットに入れた光合成細菌ビーズを2000個投入し、栄養源を添加した後10日間好気処理を行った。好気処理中は温度を30℃とし、毎日pHを7前後に調節した。好気処理が終わると土壌を水で洗浄して菌体などを洗い流し、除染処理後の土壌とした。

結果除染処理前は123,064 Bq/kgdwであった土壌は、除染後は35,191 Bq/kgdwとなり、除去率は75.2%となった。これはこれまでに土壌で行ってきた除染では最高の除去率である。

(2) 水による洗浄との比較

この除染処理技術では、土壌に入り込んだ光合成細菌を洗い流すため、光合成細菌処理後に土壌を水で洗浄している。この土壌の洗浄が除染に与えている影響を確かめるため、乳酸菌処理と光合成細菌処理を行わない水洗浄と光合成細菌による除染処理との比較を行った。その結果、水洗浄の洗浄後の土壌は89,453 Bq/kgdw（除去率27.3%）となり、光合成細菌による除染の35,191 Bq/kgdw（除去率は75.2%）となった（図1）。

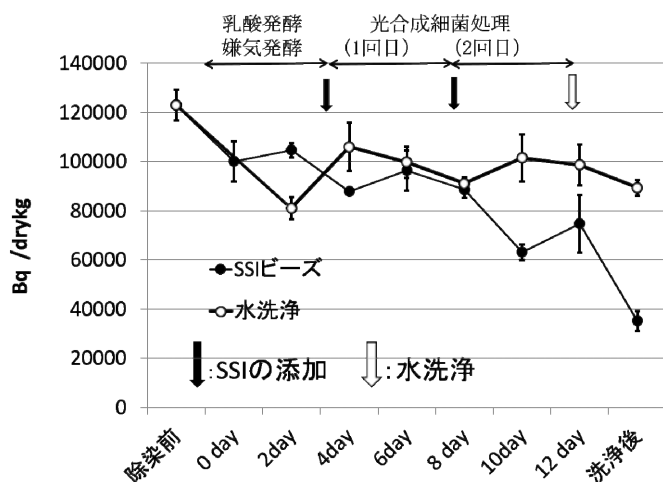


図1 光合成細菌処理 (●) と水洗浄 (○) の土壌の放射線量の挙動

(3) 除染土壌を用いた野菜栽培

除染を行う前の土をコントロールとし、光合成細菌ビーズによる除染後の土と水洗浄後の土を用いて小松菜とチンゲン菜の栽培を行った。それぞれの土をプランターに詰め、市販の小松菜とチンゲン菜の種を植え、約40日間栽培した。肥料は、種まき時に石灰、配合肥料（ハイポネックス）を添加し、一日1回水やりを行った。収穫後の野菜は（株）福島同位体研究所（郡山市、横浜市）に依頼して放射線量を測定した。測定装置は、半導体ゲルマニウム計測器CANBERRA GC2020/SEIKO-EG&G SEG-EMS (GEM 20-70)で行なった。

測定の結果、処理前の土で栽培した野菜は小松菜が609.6Bq/kgfw、チンゲン菜が835.6Bq/kgfwであったが、光合成細菌ビーズで除染した土で栽培した野菜は小松菜が328.8Bq/kgfw、チンゲン菜が242.1Bq/kgfwとなった。また水洗浄後の土壌で栽培した野菜は小松菜が249.5Bq/kgfw、チンゲン菜が187.3Bq/kgfwとなった（表1）。このように土壌の除染では過去最高の放射線量の除去率を達成できたものの、野菜の栽培では食用基準値である100Bq/kg以下の値を達成することができなかった。また、水洗浄では土壌の放射線量は89,453 Bq/kgdwと光合成細菌ビーズにより除染した土の35,191 Bq/kgdwに比べ2.5倍以上高いにも関わらず、栽培した野菜の放射線濃度では大きく変わらなかった（表1）。

表1 除染後土壌での野菜の放射線量

土壌	除染方式	野菜放射線量 (Bq/kgfw)							
		コマツナ				チンゲン菜			
		I ₁₃₁	CS ₁₃₄	CS ₁₃₇	合計	I ₁₃₁	CS ₁₃₄	CS ₁₃₇	合計
腐葉土	対照	ND	104.7	504.9	609.6	ND	163.4	672.2	835.6
腐葉土	水洗浄	ND	56.0	193.5	249.5	ND	28.0	159.3	187.3
腐葉土	光合成細菌	ND	42.0	286.8	328.8	ND	53.8	188.3	242.1

(4) 光合成細菌のカリウムポンプがセシウム吸着に及ぼす影響

光合成細菌を培養する際にカリウム濃度を調整した培養液で培養した菌体を用いてセシウムの吸着量を測定した。実験には7L規模のエアリフト式のバイオリアクターを用い、非放射性の塩化セシウムを添加して試料液中のセシウム濃度を原子吸光計で測定した。その結果、通常のGM培地で培養した菌体より、培地のカリウム成分（リン酸水素2カリウム、リン酸2水素カリウムなど）の濃度を半分にした培地で培養した菌体の方がセシウム吸着能が顕著に高いこと確認した。これらの結果から、今回の除染実験では光合成細菌はカリウム濃度を調整した培地で培養したものを用いた。

4. 研究の反省・考察

(1) 目的

前年度の実験の際に測定した時点では牧場敷地内の森林、牧草地、畑土壌など様々なエリアで20万Bq/kg以上の放射線量を確認していた。しかしながら今年度の実験では、同じ牧場の敷地内では当初予定していた20万Bq/kg以上の高放射線濃度の土壌を得られなかった。これは放射性セシウムの雨水による漏出や放射線量の自然減衰が想定を超えていたためである。また同じ理由から、黒ボク土、褐色森林土、褐色低地土等様々な種類の土壌を用いた試験を行うこともできなかった。これらの実験を行うには、より放射線濃度が高く多様な土壌が採取できる新たな実験場を見出す必要があった。しかしながら、今回実験した地域より福島第一原子力発電所に近いエリアは立ち入りが制限されており、新たな土壌採取は困難であった。以上の理由から目的のサンプルが得られないと分かった時点では実験場所を柔軟に変更することができなかった。

(2) 高濃度汚染土壌の除染

除去率が過去の実験より高くなった理由として、用いた土壌が腐葉土であったことが考えられた。腐葉土は有機質を多く含み、この有機質は乳酸菌処理によってよく分解されるため、土壌からの放射性セシウムの遊離が効率よく進んだためと考えられた。

(3) 水による洗浄との比較

光合成細菌による除染は放射線量の除去率が75.2%と水洗浄の27.3%と比べ顕著な差が見られた。このことは水による洗浄に対して本技術の有用性を示した。一方で水による洗浄でも放射線量は低下したことから、雨水による放射性セシウムの漏出が少なからずあることが考えられた。これは水による洗浄の際に放射性セシウムを比較的多く含む細かい土壌粒子が泥として流されているためと考えられた。光合成細菌の除去率が高くなったのは乳酸菌処理の際に今回の試験土壌に多く含まれる腐葉土が分解され、そこから放射性セシウムがよく水中に溶出したためと考えられた。

(4) 除染土壌を用いた野菜栽培

光合成細菌ビーズで除染した土で栽培した野菜は処理前の土で栽培した野菜に比べて放射線量は46.1~72.1%減少したが、それでも食用基準値である100Bq/kg以下の値を達成することができなかった。これは野菜の種を植えてから収穫するまでの時間が40日間と長すぎたため、土壌の放射性セシウムを野菜が多く吸収、蓄積したためと考えられた。再度栽培実験を行い、より短い日数で収穫する必要がある。

(5) 光合成細菌のカリウムポンプがセシウム吸着に及ぼす影響

実験室内の実験で、カリウム濃度を半分にした培地で育てた菌体の方がセシウム吸着能が強いことを見出すことができた。しかしながら、現象面での確認はできたが、具体的なカリウムポンプの機能の証明まではできなかった。今後はカリウム濃度の異なる様々な種類の土壌を用いた除染試験や実験室内でカリウムポンプの細胞内局在を確かめるなどの実験を行う予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

2016年農芸化学会大会発表（札幌）題目：放射能汚染土壌の光合成細菌による除染と食用基準内の野菜栽培 発表者：佐々木 慧

(3) 出版物

佐々木 健、佐々木 慧：「光合成細菌－採る・増やす・とことん使う－農業、医療、健康から除染まで」農文協 2015年12月20日発行 ISBN978-4-540-13150-9

学 校 名	上 智 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	有機無機複合型物質によるハイブリッド励起子の生成		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機無機ハイブリッド ②光学材料 ③量子閉じ込め材料			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
竹 岡 裕 子	理 工 学 部	准 教 授	試料作製、基本物性評価、太陽電池素子作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
樺 田 英 之	理 工 学 部	准 教 授	光学物性評価(レーザー物性等)、量子計算

有機無機複合型物質によるハイブリッド励起子の生成

1. 研究の目的

1990年代後半から、無機有機複合型物質の研究が盛んになり、無機半導体中の励起子と有機物質の励起子を相互作用の実現や、無機と有機の間の効率良いエネルギー移動や電荷移動を利用して、新規な光デバイスを実現させることに注目が集まっている。本研究では、ハロゲン化鉛と有機アンモニウムから構成される有機無機ペロブスカイト型化合物に着目し、 $[\text{PbX}_6]^{4-}$ から形成される無機半導体層内における励起子の解析と有機層中に機能性有機分子を導入することによる物性への効果を検討することを目的とした。一方で、近年ペロブスカイト型化合物を活性層に用いたハイブリッド型太陽電池が急速に発展し、注目を集めている。太陽電池における励起子物性を明らかにすることで、異種励起子間の相互作用を利用したデバイスの創製に結びつくと考え、機能性配位子を有機層に導入したペロブスカイト型化合物の太陽電池への応用を検討した。具体的な項目を下記に示す。

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の太陽電池評価

無機 - 有機層間の励起子相互作用を研究するため、有機・無機層状ペロブスカイト化合物 $(\text{RNH}_3)_2\text{PbX}_4$ に導入する種々のフラーレン化合物を有機無機ペロブスカイト型化合物に導入し、太陽電池をツールとして、導入効果を検討する。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

三次元有機無機複合型物質 $(\text{CH}_3\text{NH}_3)\text{PbX}_3$ は新規太陽電池材料として急速に研究が進んでおり、20パーセントを超える変換効率が達成されている。しかし、この物質が高い性能を示す理由については議論がなされており、特に光励起後のキャリアの状態については未だに理解されているとはいえない。例えば、少なくとも低温下ではキャリアは励起子を形成することが従来から分かっているが、いくつかの研究グループにより、励起子はそれほど安定ではないとの主張がなされている。そこで本研究では三次元ペロブスカイト物質を対象に精密な発光観測を行い、光励起後のキャリアの状態、およびその緩和過程の解明を行った。これにより、将来的に機能性有機配位子を導入したペロブスカイト化合物の物性評価に結び付くと考えられる。

2. 研究の計画

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の太陽電池評価

2014年度までにフラーレンを有機層に導入した有機無機ペロブスカイトにおいて、光伝導性が発現することが明らかとなっており、この化合物の特性をさらに明らかにするために、フラーレン系有機配位子の多様化と、これらを太陽電池の活性層に導入した際の特性評価を検討した。ここ数年、ペロブスカイト型化合物が太陽電池材料として急激に注目を集めており、高い効率が報告されているが、材料はメチルアミン (CH_3NH_2) とハロゲン化鉛 (PbX_2) から合成されるペロブスカイト化合物に限定されており、有機 - 無機ペロブスカイト化合物の多様性を活かしていない。本研究では、有機薄膜太陽電池のn型材料として注目されているフラーレン化合物を有機層に導入したペロブスカイト化合物を用いた際の特徴を見出し、今後の特性向上の施策を得ることを目的とした。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

不純物や欠陥による影響が少ない単結晶試料を用いて、発光スペクトルおよび時間分解発光を測定した。励起光強度依存性を調べることで、光励起キャリア間の多体効果に由来する信号を抽出し、それらがキャリアのどのような状態に対応するかを考察することによって、光励起後のキャリアの状態の解明を試みた。

3. 研究の成果

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の太陽電池評価

前年度までの研究により、フラーレン誘導体[ethyl-3-*tert*-butoxycarbonylaminopropyl (1, 2-methanofullereneC₆₀)]-61,61-dicboxylate iodide (EAF-I) を含む有機無機層状ペロブスカイト化合物(EAF)₂PbI₄が有機薄膜太陽電池の活性層として利用可能であることが明らかとなった(特願2014-190422)ている。その性能が低く、機能性有機配位子を導入した効果を判別することが難しいため、本年度は(EAF)₂PbI₄を導入した太陽電池の性能を向上させることを検討した。FTO / compact TiO₂ / mesoporous TiO₂ / (EAF)₂PbI₄ / HTM(ホール輸送層) / Auの構造からなる太陽電池を作製し、TiO₂層作製条件、(EAF)₂PbI₄のスピンコート条件、アニール温度を変化させ、太陽電池性能への影響を詳細に調べた。その結果、スピンコート回転数、アニール温度を変化させることにより、ペロブスカイト薄膜の結晶性と結晶サイズが変化し、性能に影響を及ぼすことが分かった。また、光電子分光測定等を利用することにより、本化合物のバンドエネルギーを算出し、最適なHTMを選択した。フラーレンに修飾された構造が異なる*N*-Methyl-2-(4-ammoniumphenyl)-fulleropyrrolidine iodide (AmPF-I)を有機層に導入したペロブスカイト化合物の薄膜も同様に作製し、太陽電池の活性層への導入が可能であることがわかった。また、層状ペロブスカイト化合物は湿度に対して安定であるため、従来のペロブスカイト太陽電池にある割合で添加することにより、耐湿性が向上することも分かった。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

臭素系三次元ペロブスカイトCH₃NH₃PbBr₃単結晶に対して低温・強励起のもとで発光観測を行った。その結果、これまで報告例のない新たな信号がみられた。さらに、励起光強度に対して非線形な立ち上がりが見られ、時間分解発光測定で極めて短い寿命であることが観測されたことから、この信号は励起子-励起子散乱に対応することが判明した。これらは、この物質における光発電過程には電子-正孔分離機構が働いていることを示唆しており、より励起子が安定とされる低次元系ペロブスカイト物質でも、適切な構造によって分離機構を組み込むことにより、高効率発電が期待できる。

4. 研究の反省・考察

(1) 機能性配位子を導入した有機無機ペロブスカイト薄膜の作製

フラーレンを導入したペロブスカイト化合物において、励起後の各層への電荷分離や光導電性等の発現が示唆され、太陽電池性能も徐々に上がってきつつあるが、異種励起子を利用したメリットが生かされる構造が未だ構築できていない。具体的には、現状では基盤に対する層状ペロブスカイト化合物の配向性が太陽電池の電荷分離に不利な方向に働いており、基盤に垂直な配向へと変化させることができれば、よりメリットを生かすことができると期待できる。

(2) 三次元ペロブスカイト物質における光励起キャリア特性の解明

本研究では単結晶試料を用いており、上記で述べた電荷分離過程の観測には至っていない。本研究の成果を生かし、実際のペロブスカイト太陽電池構造に対して同様な測定をするための光学系を構築する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

H. Kunugita, Y. Kiyota, Y. Udagawa, Y. Takeoka, Y. Nakamura, J. Sano, T. Matsushita, T. Kondo, K. Ema
“Exciton-exciton scattering in perovskite CH₃NH₃PbBr₃ single crystal”
Japanese Journal of Applied Physics 55 060304 (2016)

(2) 口頭発表

- ① 今田真央, 藤田正博, 竹岡裕子, 陸川政弘 「機能性配位子を用いたペロブスカイト太陽電池(I)-アルキルアミンユニットを導入したフラーレンの合成 -」 第64回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター, 2015年5月27日.
- ② 清田祐貴, 宇田川洋祐, 中村唯我, 佐野惇郎, 松下智紀, 樺田英之, 竹岡裕子, 近藤高志, 江馬一弘 「有機無機ペロブスカイト化合物の励起子物性」, 日本物理学会, 関西大学, 2015年9月18日.
- ③ 今田真央, 藤田正博, 竹岡裕子, 陸川政弘 「機能性配位子を用いたペロブスカイト太陽電池(III)-フラーレン誘導体を有するペロブスカイト薄膜の評価 -」 第64回高分子学会討論会, 東北大学, 2015年9月17日.
- ④ 今田真央, 藤田正博, 竹岡裕子, 陸川政弘 「機能性配位子を用いたペロブスカイト太陽電池(IV)-フラーレン誘導体を有する太陽電池作製の条件検討 -」 第5回CSJ化学フェスタ, タワーホール船堀, 2015年10月13日 - 15日.
- ⑤ Y. Kiyota, Y. Udagawa, H. Kunugita, Y. Takeoka, Y. Nakamura, T. Matsushita, T. Kondo, T. Miyasaka, and K. Ema “Excitonic Properties and Carrier Dynamics of $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ Single Crystals”, 1st International Conference on Perovskite Solar Cells and Optoelectronics, Lausanne, 27-29 September 2015.
- ⑥ Y. Takeoka, M. Imada, M. Yoshizawa-Fujita, and M. Rikukawa, “Control of Perovskite Structures using Various Organic Amines”, 1st International Conference on Perovskite Solar Cells and Optoelectronics, Lausanne, 27-29 September 2015.
- ⑦ M. Imada, M. Yoshizawa-Fujita, Y. Takeoka, and M. Rikukawa, “Hybrid perovskite solar cells using functional ligand (II)- Optical properties of perovskites containing fullerene derivatives-”, Pacificchem2015, Hawaii, 15-20, December 2015.

(3) 出版物

なし

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	理 工 学 研 究 所	
研 究 課 題	有機元素化学における含ホウ素新奇化合物群の創製と応用		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①ホウ素 ②求核種 ③小分子活性化 ④ルイス酸 ⑤有機合成化学 ⑥低酸化状態			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 下 誠	理 工 学 部	教 授	研究代表者:ホウ素求核種の化学全般・データ収集

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 克 規	理 工 学 部	助 教	含ホウ素高周期典型元素の化学・データ収集

有機元素化学における含ホウ素新奇化合物群の創製と応用

1. 研究の目的

【研究背景】有機化学において含ホウ素化合物は有機合成化学・材料化学・医薬品合成・触媒反応など、多岐にわたって使用されており、鈴木・宮浦クロスカップリングがノーベル賞を受賞したことは記憶に新しい。一般にこれらの有機ホウ素化学においては、ホウ素原子がルイス酸として働くことで sp^2 および sp^3 混成軌道を有する状態間で相互変換することが全ての反応の鍵となっている。このような背景の中、申請者は最近、ルイス塩基として振る舞う新規アニオン性 sp^2 ホウ素化合物、ボリルリチウムを発見し、この希少な化学種を中心にボリルアニオン類の性質の解明を行うことで元素化学基礎研究を推進してきた。

【研究目的】平成 27 年度には、平成 26 年度前半までに得られた実験結果に合わせて研究目的を組み直した上で、未発表の研究成果を論文として仕上げると共に、以下 4 課題を進めることとした。

(i) 非対称 diborane(4)化合物の構造多様化

既にその特異な反応性を明らかにした非対称 diborane(4)の誘導体ライブラリを構築し、その立体および電子効果が酸化還元特性へ与える影響を明らかにする。1 電子還元が可逆プロセスとなる場合には、電池への応用も視野に入れる。また、未知の炭素置換ボリルアニオン等価体としての応用も試みる。

(ii) 非対称 diborane(4)を用いた金属フリー三重結合切断反応の展開

非対称 diborane(4)の三重結合との反応性を活かして、ジアゾニウム塩の $N\equiv N$ 三重結合の切断への応用を試みる。ここでは(i)で構築する化合物ライブラリを最大限に活用する。また、反応性が非常に低い窒素分子の $N\equiv N$ 三重結合の直接切断、遷移金属窒素錯体を併用する間接切断を高難度の目標として設定する。

(iii) ボリルアニオン炭化水素溶液を用いたホウ素置換典型元素化合物の合成

平成 26 年度までにその調製条件を確立したボリルアニオン炭化水素溶液を用いて、典型元素ハロゲン化物に対して求核的にボリル置換基を導入し、ホウ素置換低配位典型元素化合物群を得る。従来のボリルアニオン THF 溶液では電子移動やハロゲンへの求核攻撃が優先していたため、この課題は達成不可能であった。得られる化合物群は光電子物性に注目して性質の解明を行う。

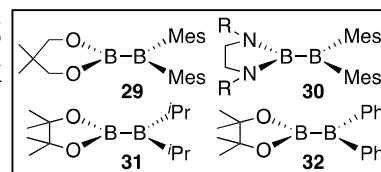
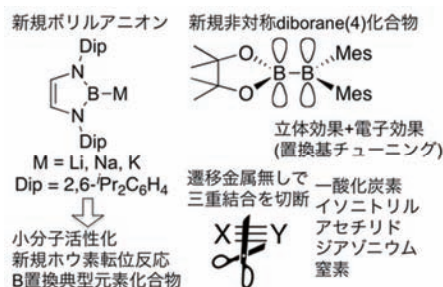
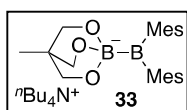
(iv) ボリルアニオン類による新形式有機反応探索

ここではボリルアニオンに特異な有機反応探索を行う。具体的には(a)ボリルアニオンによる炭化水素の直接脱プロトン化、(b)ボリルアニオンと各種小分子の反応、の 2 項目を目標とする。特に(a)はカルボアニオンでは達成できない反応であり、ボリルアニオンの塩基性の限界を見極めることで、最強の塩基としての位置づけを明確にする。

2. 研究の計画

(i) 非対称 diborane(4)化合物の構造多様化

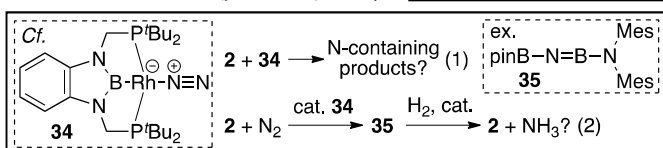
2 の反応性に対する置換基効果を見積もるため、ピナコール部位を換えた **29,30**、Mes 基を換えた **31,32** を合成し、電子受容性の違いについて **2** との比較を行う。また、分子内アルコキシ配位子を持つ **33** を合成し、初めての炭素置換ボリルアニオン Mes_2B^- 等価体としての利用を目指す。



(ii) 非対称 diborane(4)を用いた金属フリー三重結合切断反応の展開

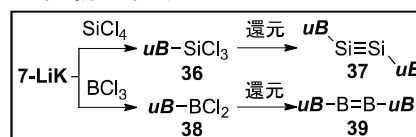
(i) で構築する誘導体群と CO・イソニトリル・アルキンとの反応を行い、

2 との比較を行う。**2, 29-32** とジアゾニウム塩との反応も検討し、N≡N 三重結合の切断の可否を判定する。また、申請者らが報告した Rh 錯体 **34** (ACIE 2012, 51, 6956.) における配位 N₂ の末端窒素を **2** と反応させる(式 1, **35** の生成を期待)。**37** の量を触媒量に減じ(式 2 の 1 段階目)、続く加水素分解により触媒的窒素固定反応へと展開する。併せて既知の他の N₂ 錯体も検討する。



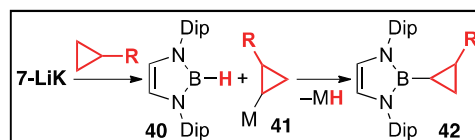
(iii) ポリルアニオン炭化水素溶液を用いたホウ素置換典型元素化合物の合成

7-LiK の溶液に SiCl₄ を作用させて **36** とし、続く還元によりホウ素置換ジシリル **37** を得る。**37** は **17** と構造の比較を行い、Si および P のπ軌道とホウ素の空の p 軌道との相互作用を、光化学および酸化還元特性にて比較する。同様に **7-LiK** に対して BCl₃ を作用させて **38** とし、続く還元により未知の化学種ジボレン **39** を得る。HB=BH は基底三重項で不安定だとされる(JACS 1975, 97, 3402.)が、ポリル置換基の導入で安定化が期待できる。



(iv) ポリルアニオン類による新形式有機反応探索

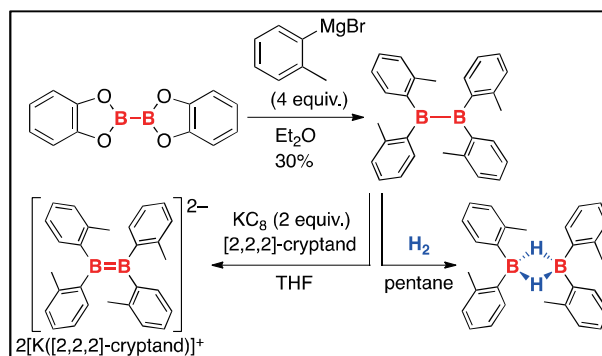
7-LiK とアルカンの反応による C(sp³)-H 結合の直接ホウ素化反応を検討する。シクロプロパンと反応することを予備的に見いだしており、**40** と **41** の反応で **42** が生成することを期待する(**22** の生成を参照)。また CO, N₂ などの気体小分子との反応を検討し、ボラケテン **29** やポリルヒドラジド **30** の生成を期待する(THF 溶媒を用いた際はいずれも反応しない)。



3. 研究の成果

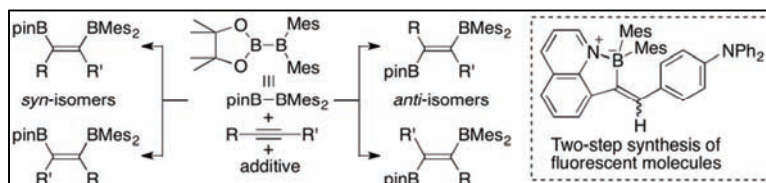
(a) 新規対称型 diborane(4) の合成と性質の解明

(i) の検討中に o-tol 基を 4 つ有する対称型 diborane(4) が得られ、これが 2 よりも容易に還元を受けること、**1** または 2 電子還元を受けてホウ素間に多重結合性を有するラジカルアニオンまたはジアニオンを与えること、B-B 結合の切断を伴いながら水素分子と直接反応して水素架橋型 diborane(6) を与えることを見出した。反応機構解明のための DFT 計算を行った後に論文投稿予定。



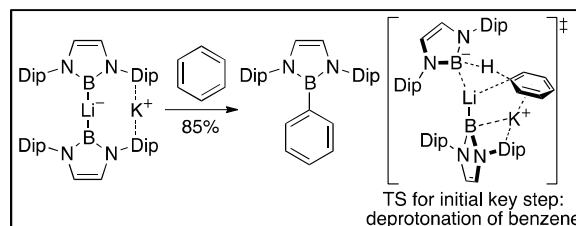
(b) 非対称 diborane(4) **2** とアルキンの反応によるジボリルアルケンの合成法開発

非対称 diborane(4), pinB-BMes₂ が遷移金属触媒の非存在下で末端および内部アルキンと直接反応して、ジボリルアルケンを与えることを明らかにした。反応条件により異性体を作り分けられることを明らかにすると共に、中間体として sp²-sp³ 型ジボランおよびボラタアレンの単離にも成功した。また、材料化学への応用として固体蛍光発光を示す分子の短工程合成経路の確立も行った。論文②発表済。



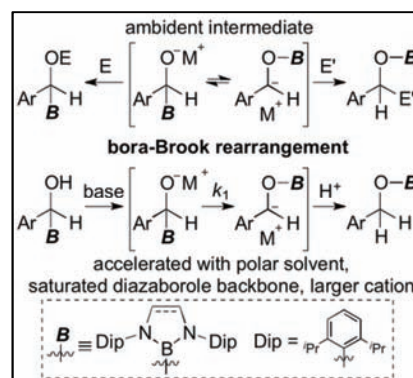
(c) ボリルアニオン7-LiKの塩基性の解明

溶媒和の無い混合ボリルアニオン塩がベンゼンを脱プロトン化できることを明らかにした。強塩基のⁿBuLi単独ではベンゼンの脱プロトン化はできないが、**7-LiK**はベンゼン溶液中で徐々にヒドロボラン**9**とフェニルボラン**22**を与えることがわかった。すなわち、炭素より電気陰性度の低いホウ素原子に負電荷を持つボリルアニオンが、カルボアニオンよりも高い塩基性を持つことを発見した。また、DFT計算により脱プロトン化段階の反応機構においてカリウムがルイス酸として働くことでベンゼンのC-H結合の酸性度を向上させていることも合わせて明らかとした。論文投稿中。



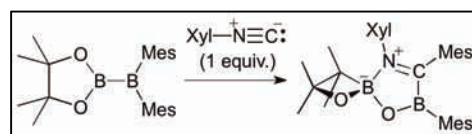
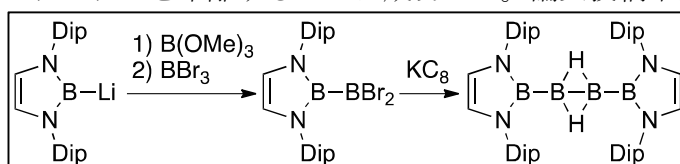
(d) bora-Brook転位の反応速度解析

ボリルベンジルアルコール誘導体**23**に触媒量の塩基を添加すると bora-Brook 転位が進行するため ¹⁹F NMR による反応速度解析を行った。極性溶媒・大きな対カチオンを持つ塩基・含 C-C 単結合の 5 員環を用いると反応が加速されること、負に大きなΔS[‡]を持つこと、を明らかにした。論文①発表済。



(e) 水素架橋型テトラボランの合成と性質の解明

ボリルリチウムとB(OMe)₃, BBr₃を順次反応させて得られたジアミノジブロボランを還元することで水素架橋型テトラボランを単離することに成功した。論文投稿準備中。



(f) 含ホウ素5員環の環縮小反応の発見

非対称diborane(4), pinB-BMes₂に2,6-dimethylphenylisocyanideを反応させると、通常は反応不活性なピナコラートボリル基の5員環が環縮小反応を起こし、4員環オキサボレタンを形成すると共にスピロ型の化合物に変換されることを明らかにした。論文投稿中。

4. 研究の反省・考察

反省は特にありません。考察は研究成果の項に含めてあります。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kisu, H.; Sakaino, H.; Ito, F.; Yamashita, M.; Nozaki, K., A Qualitative Analysis of a “Bora-Brook Rearrangement”: The Ambident Reactivity of Boryl-Substituted Alkoxide Including the Carbon-to-Oxygen Migration of a Boryl Group *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3548-3552.
- ② Kojima, C.; Lee, K.-H.; Lin, Z.; Yamashita, M., Direct and Base-Catalyzed Diboration of Alkynes Using the Unsymmetrical Diborane(4), pinB-BMes₂ *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6662-6669.

(2) 口頭発表

- ① Bora-Brook rearrangement reaction and the effects of solvent polarity, the backbone of boryl group, and counter cation of base. Haruki Kisu, Makoto Yamashita, Fumihiro Ito, Hirotohi Sakaino, Kyoko Nozaki 第10回有機元素化学セミナー 京都大学化学研究所 京都 2015年6月8日 P-02
- ② Regioselective diboration using unsymmetrical diborane(4) in the absence of transition metal catalyst. Chiemi Kojima, Makoto Yamashita 第10回有機元素化学セミナー 京都大学化学研究所 京都 2015年6月8日 P-03

- ③ Syntheses and Properties of diboryldiphosphene and diboryldiphosphene radical anion. Shun-suke Asami, Masafumi Okamoto, Katsunori Suzuki, Makoto Yamashita 第10回有機元素化学セミナー 京都大学化学研究所 京都 2015年6月8日 P-05
 - ④ Syntheses and Properties of diboryldiphosphene and diboryldiphosphene radical anion Shun-suke Asami, Masafumi Okamoto, Katsunori Suzuki, Makoto Yamashita ICHAC-11th Caen, FRANCE 2015年6月16日 Poster-28
 - ⑤ SYNTHESIS AND PROPERTIES OF REACTIVE DIBORANE(4) COMPOUNDS. Makoto YAMASHITA ICHAC-11th Caen, FRANCE 2015年6月18日 IL6 - 75
 - ⑥ 非対称ジボラン(4)を用いたピリジンのオルト位C-H 結合切断反応 勝間雄平・浅川博祈・山下誠 第26回基礎有機化学討論会 愛媛大学 愛媛県松山市 2015年9月24日 1P089
 - ⑦ 溶媒和の無いボリルアニオンの発生とその塩基性 大里拓人・奥野友里・石田真太郎・岩本武明・山下誠・野崎京子 第26回基礎有機化学討論会 愛媛大学 愛媛県松山市 2015年9月25日 2P024
 - ⑧ ボリルリチウムを用いた新規非対称ジボラン化合物の合成 木須遥規・山下誠 第42回有機典型元素化学討論会 名古屋大学 野依記念学術交流館 愛知県名古屋市 2015年12月4日 P-03
 - ⑨ ホウ素置換ジホスフェンとn-BuLiの反応 浅見 俊介・山下誠 第42回有機典型元素化学討論会 名古屋大学 野依記念学術交流館 愛知県名古屋市 2015年12月4日 P-11
 - ⑩ Basicity of non-solvated boryl anion: Deprotonation of benzene. Takuto Osato, Yuri Okuno, Shintaro Ishida, Takeaki Iwamoto, Makoto Yamashita, Kyoko Nozaki. The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.15and17 INOR 56 and INOR 460
 - ⑪ Base catalyzed bora-Brook rearrangement: the effects of solvent polarity, the backbone of boryl group, and counter cation of base toward reaction rate. Haruki Kisu, Makoto Yamashita, Fumihito Ito, Hiroto Sakano, Kyouko Nozaki The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.16 ORGN 812
 - ⑫ Regioselective diboration using unsymmetrical diborane(4) in the absence of transition metal catalyst. Chiemi Kojima, Makoto Yamashita The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.16 ORGN 814
 - ⑬ Synthesis, structure, photophysical property, and one-electron reduction of boryl-substituted diphosphene. Shunsuke ASAMI, Masafumi OKAMOTO, Katsunori SUZUKI, Makoto YAMASHITA The Pacificchem2015 Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii 2015.12.17 Inorganic 489
 - ⑭ ホウ素置換ホスフィノホスフィドの合成と性質 浅見俊介・岡本匡史・鈴木克規・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.25. 2F7-53
 - ⑮ 非対称ジボラン(4)とイソシアニドの反応による含窒素複素環化合物のオルト位官能基化反応 勝間雄平・浅川博祈・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.26. 3F7-11
 - ⑯ ボリルリチウムを用いた新規非対称ジボランの合成と性質 木須遥規・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.26. 3F7-51
 - ⑰ ボリルアニオンによる炭化水素の脱プロトン化 大里拓人・奥野友里・石田真太郎・岩本武明・山下誠・野崎京子 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.26. 3F7-52
 - ⑱ テトラアリアルジボラン(4)の簡便合成と還元反応 塚原菜那・浅川博祈・山下誠 日本化学会第96春季年会 同志社大学京田辺キャンパス 京都 2016.3.27.4F7-18
- (3) 出版物
Yamashita, M.; Nozaki, K., Boryl Anions. In *Synthesis and Application of Organoboron Compounds*, Fernández, E.; Whiting, A., Eds. Springer International Publishing: 2015; pp 1-37.