

学 校 名	広 島 国 際 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	革新的乳癌転移阻害剤セマフォリンペプチドの 開発と応用 —乳癌転移阻害ペプチドの開発と応用—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①乳がん ②転移 ③軸索誘導因子 ④セマフォリン ⑤細胞内シグナル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 山 寛 尚	保 健 医 療 学 部	講 師	実験の立案と遂行

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
東 山 繁 樹	愛媛大学 プロテオ サイエンスセンター	教 授	ペプチド合成
中 原 正 子	保 健 医 療 学 部	講 師	細胞内シグナル解析

# 革新的乳癌転移阻害剤セマフォリンペプチドの開発と応用

## －乳癌転移阻害ペプチドの開発と応用－

### 1. 研究の目的

これまでに申請者は、神経軸索伸長を制御している軸索誘導因子に着目して研究を行ってきた。なかでも、分泌タンパク質である『セマフォリン 3F (SEMA3F)』はもともと、軸索伸長を負に制御する因子として同定されたが、その後の解析により様々な癌種において腫瘍血管新生、転移抑制因子として機能することが明らかになってきた (Bielenberg, JCI, 2004; Shimizu, JBC, 2008, 2013)。そこで私は脳腫瘍細胞を用いて SEMA3F による細胞内シグナル解析を行なったところ、SEMA3F は細胞増殖、遊走に重要な PI3K/Akt/mTOR 経路を抑制することを明らかにした (Sci Rep, 2015)。しかも、SEMA3F の効果は脳腫瘍細胞のみならず、癌抑制遺伝子である PTEN を欠損した脳腫瘍細胞、メラノーマ、血管内皮細胞、T 細胞を含む様々な細胞においても観察され、生理活性物質でありながら強力な Akt-mTOR シグナル阻害剤となりうるということが分かってきた。

以上の知見を基に、愛媛大学 (東山繁樹教授) と共同で、乳癌における分子標的薬剤ハーセプチン耐性化問題を解決すべく研究を開始している。乳癌治療においては PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化がハーセプチン薬剤耐性化機序に重要とされており、ハーセプチン処置に加えて PI3K/Akt/mTOR 経路の遮断が乳癌治療に効果的であることが報告されている。そこで私は、SEMA3F による PI3K/Akt/mTOR 抑制効果を利用して、乳癌治療におけるハーセプチン耐性化問題を克服し、新たな乳癌治療戦略の提示ができるのではないかと考えた。

これまでに私は、基礎実験としてマウス由来乳癌細胞株 4T1 にヒト SEMA3F を遺伝子導入して安定発現株を作成し、Balb/c マウス乳腺に同種移植して腫瘍増殖への影響を検討した。その結果、SEMA3F-4T1 細胞移植マウスでは腫瘍増殖と血管新生が有意に低下するとともに、肝臓および肺への遠隔転移が SEMA3F 群で強力に抑制されることが明らかとなった。腫瘍内部では Akt, mTOR, S6K (mTOR シグナル下流因子) のリン酸化が抑制されていることを確認しており、SEMA3F が乳癌増殖、転移を阻害する可能性が示唆された。よって、SEMA3F をハーセプチンと併用することによって、より強力かつ効果的に乳癌治療に望めるのではないかと考えている。その一方で、我々を含む、これまでの研究では SEMA3F の効果の判定には、遺伝子導入やウイルスが用いられており、生理活性物質を用いた臨床応用を目指すためには *in vivo* 環境下で、より安定なペプチドを作成することが求められる。

そこで本研究 (研究期間 3 年を想定) では、1) SEMA3F がどのようなメカニズムで乳癌の転移を抑制したのか、2) SEMA3F を利用して乳癌ハーセプチン薬剤耐性化を克服できるか否か、3) 全長 SEMA3F タンパク質に代わる安定構造を持つセマフォリンペプチド開発を行う。以上の検討から、PI3K/Akt/mTOR 阻害効果を持つ『セマフォリンペプチド』の開発が達成できれば、SEMA3F が持つ乳癌抑制効果の分子機構を解明するとともに、ハーセプチン耐性化を克服して、より効果的・安全な革新的乳癌治療法が提示できるものと考えている。

### 2. 研究の計画

#### (1) 乳癌モデル動物の作成と解析

乳癌モデル動物 (異種移植) は、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 をヌードマウス乳腺に移植することで作成した。まず、MDA-MB-231 細胞にヒト SEMA3F 遺伝子を導入し過剰発現細胞を作成した。さらに細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して *in vivo* imaging に使用できるようにした。作成した親株および SEMA3F 過剰発現細胞はヌードマウス (メス 6 週齢) 乳腺に  $1 \times 10^6$  個の細胞を移植した。移植後、*in vivo* imaging によってサイズ、転移の状況をモニターした。移植後、各マウスから腫瘍を摘出してパラフィン包埋したのちに、免疫組織染色によって評価を行った。

## (2) PTEN 欠損細胞の作成と解析

MDA-MB-231細胞に対して、遺伝子編集技術であるCRISPR/Cas9を用いてPTENノックアウトを行った。MDA-MB-231細胞に遺伝子導入試薬を用いて、PTEN遺伝子を標的とする2種類のCRISPRベクター（#1、#2）をそれぞれ導入した。その後、フローサイトメーターによってCRISPR遺伝子が導入された細胞（GFP陽性細胞）を確認し、それぞれ単離して培養を行った。各クローンは、ウェスタンブロット法により解析を行い、PTENが欠損していることを確認した。

## (3) セマフォリンペプチドの合成

セマフォリンペプチドの合成は、小麦胚芽を利用した無細胞タンパク質合成システムによって行った。合成したタンパク質はアクリルアミドゲル電気泳動にて、分子量や精製度を確認した。

# 3. 研究の成果

## (1) SEMA3F が乳癌細胞に与える影響を細胞レベルおよび移植モデルで評価する

まずSEMA3Fの乳癌細胞に対する効果を *in vitro* 系で評価を行った。乳癌細胞株MCF7とMDA-MB-231細胞にSEMA3F（640 ng/ml）を処理して15、30分後に細胞を回収した。その後、ウェスタンブロットによって細胞内シグナルを観察した。その結果、AktとmTOR下流分子であるS6Kのリン酸化が抑制されることが分かった。これは、これまで脳腫瘍細胞、血管内皮細胞で観察されたのと同様に乳癌細胞においてもSEMA3FがAkt-mTORシグナルを抑制することが明らかになった。

次に、SEMA3Fの効果をマウス乳癌細胞移植モデルによって検討した。まず、マウス乳癌細胞株4T1を用いる同種移植モデル（allograft model）によって検討を行った。4T1細胞にヒトSEMA3F遺伝子を導入して安定発現株を樹立した。親株4T1あるいは作成したSEMA3F-4T1細胞をそれぞれ、Balb/cマウスの乳腺に移植し経時的に腫瘍サイズを計測した。その結果、SEMA3F-4T1移植群で有意に腫瘍サイズが低下していることが明らかとなった。さらに、移植24日後に腫瘍および各種臓器を摘出して細胞内シグナル、転移の有無を検討した。乳癌の転移好発部位として肺と肝臓が知られているため、これらの臓器における結節（nodule）の数を評価した。その結果、SEMA3F-4T1移植群では肺、および肝臓ともに転移が抑制されていることが明らかとなった（図1）。また腫瘍における細胞内シグナルを見ると、*in vitro* 系で確認した結果と同様にAkt-mTORシグナルのリン酸化が抑制されていることを確認した。さらに私はヒト乳癌細胞MDA-MB-231をヌードマウスに移植し、SEMA3Fの腫瘍抑制効果を検討した（xenograft model）。MDA-MB-231細胞にヒトSEMA3F遺伝子を導入して安定発現株を作成した。親株あるいはSEMA3F発現細胞をヌードマウス乳腺に移植し経時的に腫瘍サイズを測定した。移植後10週まで計測したが、両群に有意な差は認められなかった（図2A）。さらにMDA-MB-231細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して *in vivo* imaging の手法を用いて腫瘍サイズを測定したが、上記と同様に両群に差は認められなかった（図2B）。一方で、MDA-MB-231細胞をヌードマウス尾静脈より投与して肺への生着を *in vivo* imaging で観察した。その結果、コントロールでは肺への生着が確認されたが、SEMA3F-MDA-MB-231細胞では肺への生着が抑制されることが明らかとなった（図2C）。

以上の検討から、SEMA3Fは乳癌細胞の転移を抑制する効果を有していることが明らかとなった。この時、腫瘍の細胞内シグナル解析結果からAkt-mTORシグナルのリン酸化が抑制されていることから、この現象はSEMA3FのAkt-mTORシグナル抑制効果が発現していることが示唆された。

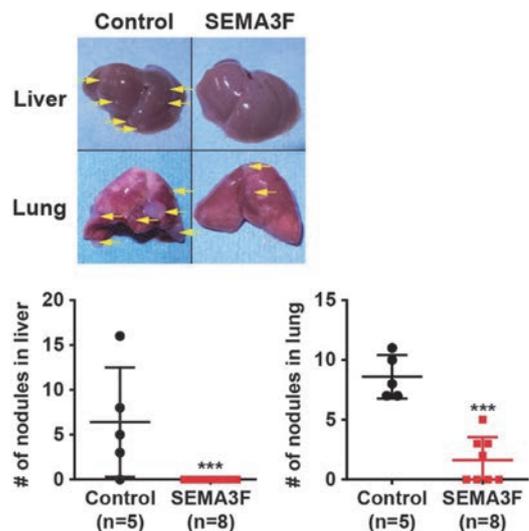


図1: 乳癌細胞同種移植モデルによる検討結果  
マウス乳癌細胞4T1にSEMA3Fを導入した細胞をBalb/cマウスに移植して腫瘍の転移を評価した。

(2) SEMA3F がハーセプチン耐性 HER2 陽性乳癌に対する効果を評価する

まずはハーセプチン耐性形成に重要である PI3K/Akt/mTORシグナルを活性化するため、CRISPR-Cas9技術を用いてPTENノックアウト細胞を作成した。その結果、AktとS6Kのリン酸化が親株に比べて上昇していることを確認した(図3A)。この細胞にSEMA3Fを処理したところ、AktおよびS6Kのリン酸化を抑制することが明らかとなった(図3A)。つまり、乳癌細胞においてSEMA3FがPTEN非依存的にAkt-mTORシグナルを阻害することを示唆している。さらに細胞浸潤能を評価するためにトランスウェルを用いてSEMA3Fの効果を検討した。その結果、SEMA3Fは親株とPTENノックアウト細胞の細胞浸潤を抑制していることが明らかとなった(図3B)。つまり、SEMA3FはPTEN欠損乳癌細胞においても効果を有していることが分かった。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) 考察

以上の検討結果から、SEMA3Fが乳癌細胞に対してAkt-mTORシグナルを抑制する効果を有することを確認した。さらにその効果は、in vivo系においても同様に確認され、SEMA3Fが乳癌の増殖、転移、血管新生を阻害する新たな治療標的となりうることが示唆された。一方で、本研究の目的であるハーセプチン耐性化に関する実験は現在進行中である。図3に示すようにSEMA3FはPTEN欠損細胞においてもAkt-mTORシグナルを抑制し、細胞浸潤能を阻害した。つまりハーセプチン耐性化を獲得した細胞においても効果を有している可能性が示唆される。今後は、HER2を過剰発現したSKBR3細胞を用いて同様な検証を行い、薬剤耐性乳癌に対するSEMA3Fの効果を詳細に検討したい。

(2) 今後の展開

上記の結果を基に、in vivo環境下で安定なSEMA3Fペプチドの作成を進めている。まずは全長SEMA3Fにビオチンタグをつけた遺伝子を作成し、共同研究先である愛媛大学 東山繁樹教授の協力の下、コムギ無細胞タンパク質合成技術によってSEMA3Fタンパク質合成を開始している。蛋白質の可溶化条件を再検討し、大量合成できる条件を決定する予定である。その後、全長SEMA3Fを断片化していき、NRP2(SEMA3Fレセプター)に結合する最小単位のペプチドを同定し生理活性を評価する。その結果、より安定的なセマフォリンペプチドが作成できるものと考えている。

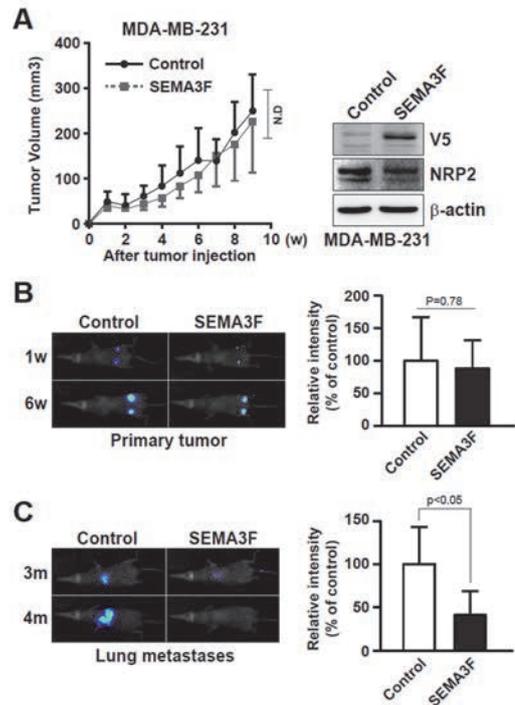


図2: 乳癌細胞異種移植モデルによる検討結果

- (A) ヒト乳癌細胞MDA-MB-231にSEMA3Fを導入した細胞をヌードマウス乳腺に移植して腫瘍のサイズおよび転移の様子を観察した。  
 (B) 腫瘍細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入してin vivoイメージングによって評価した。  
 (C) 腫瘍をマウス尾静脈に投与して肺へ生着したものを観察した。

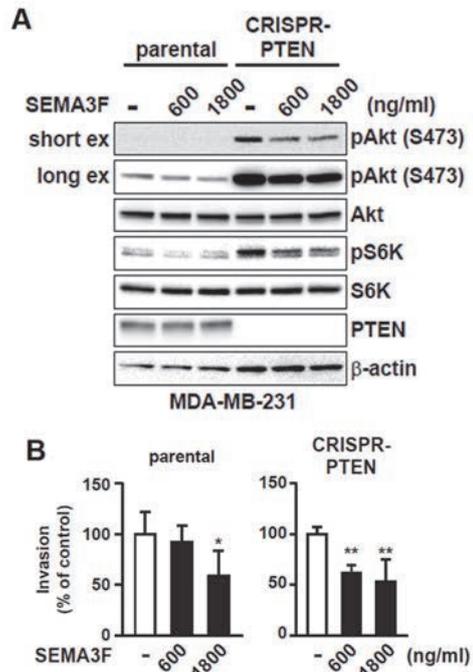


図3: PTENノックアウト細胞に対するSEMA3Fの効果

- (A) MDA-MB-231細胞にCRISPR-Cas9技術によってPTEN発現をノックアウトした。SEMA3Fを処理してAkt-mTORシグナルに対する影響を検討した。  
 (B) PTENノックアウト細胞を用いて、細胞浸潤能をトランスウェルアッセイによって評価した。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

①和田恵理子、松木依理奈、中原正子、楠本智章、藤原章、中山寛尚 遺伝子編集技術CRISPR-Cas9を用いた薬剤耐性乳癌株の作成とその評価 日本臨床検査自動化学会第51回大会 2019年10月4日 第1回JACLaS Award 2019 優秀演題賞（学部生部門）を受賞

②和田恵理子、松木依理奈、中原正子、楠本智章、藤原章、東山繁樹、中山寛尚 軸索誘導因子セマフォリン3FはNRP2レセプターを介して乳癌細胞の浸潤を阻害する 第14回日本臨床検査学教育学会 2019年8月21-23日

### (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	弾性線維の再生技術の開発		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①弾性線維 ②細胞外マトリックス ③老化 ④再生		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 邨 智 之	医 学 部	教 授	研究の統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 間 智 也	医 学 部	准 教 授	遺伝子改変マウスの作成と解析
平 井 希 俊	医 学 部	講 師	培養細胞の遺伝子改変と解析
三 木 貴 雄	医 学 部	講 師	リコンビナントタンパク質の作成と解析
楠 本 健 司	医 学 部	教 授	皮膚組織の採集
塩 島 一 朗	医 学 部	教 授	培養組織弾性線維の解析

# 弾性線維の再生技術の開発

## 1. 研究の目的

弾性線維は、伸び縮みする組織（皮膚・動脈・肺など）に多くあって、その伸縮性を担う細胞外マトリックスである。皮膚のたるみだけでなく、心疾患予後悪化因子である動脈中膜硬化、高齢者の重要疾患である肺気腫も弾性線維の劣化・分解が直接原因と考えられているため、弾性線維の劣化予防と再生は高齢化社会における極めて重要な課題である（図1）。しかし弾性線維のターンオーバーは極めて遅く、加齢組織では新たな弾性線維形成は起こらないため、弾性線維の再生は困難と考えられてきた。

弾性線維形成には、①マイクロフィブリル線維束形成 ②エラスチンの凝集 ③エラスチンのマイクロフィブリルへの沈着 ④エラスチンどうしの架橋 といったプロセスがあることがわかりつつある。研究代表者らは、②③のプロセスに必須の分泌タンパク質 **Fibulin-5** を同定した (*Nature* 2002, *J Cell Biol* 2007) のを皮切りに、**LTBP-2** (プロセス①)、**LTBP-4** (プロセス③)、**Fibulin-4** (プロセス④) といった弾性線維形成因子を同定・機能解明してきた (*EMBO J* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 2013, *Hum Mol Genet* 2014, *Sci Rep* 2017 など)。ここにきてこれらがつながり、弾性線維形成機構の全容が姿を現しつつある。

本研究では、これら弾性線維形成因子の中で加齢組織において不足するものを見出し、弾性線維の再生に必要な条件を明らかにすることを目指す。本年度は、ヒト加齢皮膚、および露光部加齢皮膚にみられる無秩序なエラスチン凝集体である日光弾性線維症のサンプルを収集し、弾性線維形成因子の増減を検討した。

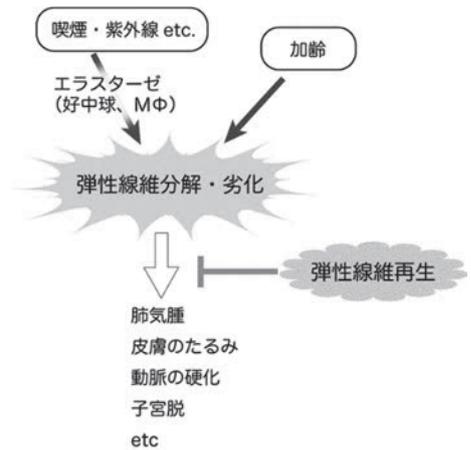


図1. 弾性線維の分解と劣化が多くの老化関連疾患の直接原因となる。

## 2. 研究の計画

### (1) 加齢皮膚で弾性線維再生がおこらない原因の特定

富山大学および関西医科大学における医学倫理審査委員会より承認を受けた後、富山大学附属病院および関西医科大学附属病院にて採取された加齢皮膚18例（平均73歳、露光部7例、非露光部11例）およびコントロールとして若年皮膚5例（平均22歳）の凍結切片を作成し、抗エラスチン抗体 (Millipore)、抗Fibrillin-1抗体 (Elastin Products Company)、抗Fibulin-4抗体 (自作)、抗Fibrillin-5抗体 (自作)、抗LTBP-2抗体 (自作)、抗LTBP-4抗体 (自作) を用いて蛍光免疫染色を行った。

### (2) 日光弾性線維症でエラスチンが無秩序な沈着をおこす原因の特定

日光弾性線維症の皮膚サンプル8例（平均76歳）の凍結切片を作成し、上記の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、上記サンプルと比較した。

## 3. 研究の成果

### (1) 加齢皮膚で弾性線維再生がおこらない原因の特定

①加齢皮膚においては抗エラスチン抗体で染色される弾性線維のフラグメンテーションが多く観察された。弾性線維形成の鋳型となるマイクロフィブリル（抗Fibrillin-1で染色される）も減少していたが、マイクロフィブリルがあってもエラスチンが沈着していない線維が多く認められた。真皮直下より垂直に走るマイクロフィブリルであるオキシタラン線維も

抗エラスチン抗体で染色されることがわかったが、減少しているサンプルと正常なサンプルがあり、真皮の弾性線維の減少とは独立していた。

- ②今回調べた弾性線維形成因子（Fibulin-4, 5, LTBP-2, 4）は総じて若年皮膚よりも減少していたが、特にLTBP-4の減少程度が強く、一貫していた。

#### (2) 日光弾性線維症でエラスチンが無秩序な沈着をおこす原因の特定

- ①日光弾性線維症の皮膚サンプルでは、真皮浅層に抗エラスチン抗体で強く染色される厚い構造物（弾性線維の塊）を認めた。弾性線維形成の鋳型となるマイクロフィブリルは増えているもの、正常なもの、フラグメンテーションをおこしているもの、と様々であった。
- ②弾性線維形成因子のうち、LTBP-2とFibulin-4はエラスチンと共局在して増えていた。Fibulin-5は5例で増えていたが3例で減少していた。LTBP-4の発現は全例で消失していた。

## 4. 研究の反省・考察

#### (1) 加齢皮膚で弾性線維再生がおこらない原因の特定

弾性線維のターンオーバーは極めて遅いことが知られており、特に加齢組織では弾性線維が再生されることはない。今回、その原因を探るためにエラスチン、マイクロフィブリルの本体であるFibrillin-1、我々がこれまで同定してきた弾性線維形成因子Fibulin-4, 5, LTBP-2, 4の染色パターンをヒト加齢皮膚18例と若年皮膚5例で比較した。これだけの弾性線維形成因子をこれほどの数のヒト皮膚サンプルで調べた研究はこれが最初である。

まず、エラスチンの分布は加齢とともに線上の連続性を失い、フラグメンテーションを来しているように見えるが、エラスチン沈着の鋳型となるマイクロフィブリルはフラグメンテーションを来していないものが多く、「弾性線維が分解された」だけでなく「新たに形成されたマイクロフィブリルにエラスチンが正しく沈着できていない」ことを示している可能性がある。エラスチンをマイクロフィブリルに沈着させるための因子として我々はFibulin-5とLTBP-4を同定しているが、これらは加齢皮膚で減少しており、特にLTBP-4は一貫して加齢とともに大きく減少していた。すなわち、これがエラスチンのマイクロフィブリル上への沈着を妨げている原因であると考えられる。

また、Fibrillin-1の染色そのものも減少している加齢皮膚が多く、マイクロフィブリルの形成が加齢によって減っていると考えられた。

#### (2) 日光弾性線維症でエラスチンが無秩序な沈着をおこす原因の特定

日光弾性線維症では、露光部の加齢皮膚（真皮）に多量の弾性線維様の塊が生じる。加齢皮膚で弾性線維再生能が失われることと一見矛盾する現象であるため、その発生機序に興味を持たれているが、未だ定説はない。紫外線がエラスチン遺伝子のプロモーターを活性化するという報告はあるが、機能的な弾性線維ではなくてエラスチンの無秩序な沈着物が形成される理由はわかっていない。

今回解析した8例の日光弾性線維症の皮膚サンプルでは、真皮浅層に多量のエラスチン沈着を認め、同時に多量のFibulin-4の沈着を認めた。LTBP-2は8例中7例、Fibulin-5は8例中5例でエラスチンと同部位に多量の沈着を認めた。しかし、興味深いことに全例でLTBP-4の染色が消失しており、エラスチンとは全く別の発現調節がされていることがわかった。これらのことから、紫外線によりエラスチンの発現が増加するものの、エラスチンの正しい沈着に必須のLTBP-4が加齢皮膚では発現しないため、エラスチンの無秩序な沈着がおこることが日光弾性線維症の発症機序であると推察した。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①Mori H, Yamada H, Toyama K, Takahashi K, Akama T, Inoue T, Nakamura T: Developmental and age-related changes to the elastic lamina of Bruch's membrane in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 257(2):289-301, 2019. doi: 10.1007/s00417-018-4184-5.

### (2) 口頭発表

- ①Nakamura, T.: Essential function of Fibulin-4 in lysyl oxidase activation. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 21 - July 25, 2019, Manchester, NH, U.S.A.).
- ②中邨智之: 「弾性線維形成のしくみ ～弾性線維形成タンパク質と日光弾性線維症の発症メカニズム」 第41回日本光医学・光生物学会 招待講演 (ホテルグランテラス富山、富山、2019年7月19日)

### (3) 出版物

なし

学 校 名	兵 庫 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 —抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①炎症性腸疾患 ②腸内細菌叢 ③腸管免疫 ④ノバイオート			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 戸 聡	医学部 病原微生物学講座	主 任 教 授	研究統括、細菌叢解析、細菌数解析、動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 椋 英 樹	医学部 病原微生物学講座	助 教 授	細菌叢解析、細菌数解析、動物実験
池 内 浩 基	医学部 炎症性腸疾患学講座 外 科 部 門	主 任 教 授	臨床サンプル収集のマネージメント・統括
内 野 基	医学部 炎症性腸疾患学講座 外 科 部 門	准 教 授	臨床データの収集・解析
大 野 博 司	理化学研究所生命医科学研究センター 粘膜システム 研 究 チ ー ム	チ ー ム リ ー ダ ー	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析の指導
加 藤 完	理化学研究所生命医科学研究センター 粘膜システム 研 究 チ ー ム	研 究 員	臨床と細菌叢のデータの統計学的解析
中 西 裕 美 子	理化学研究所生命医科学研究センター 粘膜システム 研 究 チ ー ム	研 究 員	臨床サンプルの代謝産物解析

# 細菌叢変化による潰瘍性大腸炎発症機構の解明 —抗菌剤による潰瘍性大腸炎の治療戦略への道—

## 1. 研究の目的

- (1) 現在、潰瘍性大腸炎 (UC) の患者は増加の一途であり、若年者層に広がっていることから、国家レベルにて対策が行われている。平成 25 年度末の統計では、人口 10 万人あたり 100 人程度の患者数とされており、男性では 15 から 25 歳に、女性でも 20 から 30 歳に患者が集中している。UC 発症における腸内細菌叢の関与について多くの研究がなされており、様々な細菌叢変化の関与が推察されている。しかしながら、細菌叢の量的、質的变化がどのように UC 発症に関連するのかは現在においても明らかになっていない。共同研究者である兵庫医科大学 炎症性腸疾患学講座外科部門の池内浩基らは、UC による回腸嚢造設後の回腸嚢炎発症率と、家族性ポリポーシスによる回腸嚢造設後の回腸嚢炎発症率を検討し、UC による回腸嚢造設後において顕著に回腸嚢炎が起こることを報告した (Dig Surg 2004, Ikeuchi et al.)。このことから、UC による回腸嚢造設後の回腸嚢炎は、UC の病態を反映しており、その解析は UC 発症の原因解明に繋がるものと考えられ、池内らによる提案は、全世界にて認められている。したがって、我々は、池内グループと、細菌叢研究を世界的にリードしている理化学研究所の大野グループと有機的に連携し、UC の病態を反映しているとされている UC 術後回腸嚢炎患者の糞便サンプルを解析することにより、UC 発症に関する腸管細菌叢の関与を明らかにすることを目的として 2017 年度から研究を開始している。その中で、ある種の腸内細菌数の増加が UC 増悪の原因となっている可能性を示す preliminary な結果を得、新たな仮説を得るに至った。したがって、細菌叢解析、代謝産物解析から得られる結果を総合することによって、新たな UC の治療戦略を提唱することを目的とした。具体的には、
- ①患者糞便サンプル中の細菌数測定方法の確立と、解析を行う。
  - ②次世代シーケンサーによる細菌叢解析、質量分析による代謝産物解析を行うことにより、回腸嚢炎発症時の細菌叢変化、代謝の変化を明らかにする。
  - ③患者糞便サンプルを抗生剤投与により無菌化したマウスに投与し、腸内環境変化 (主に炎症について) の解析を行う。これからの解析を総合することにより、仮説の検証を行うことを目的とした。

## 2. 研究の計画

- (1) 炎症性腸疾患外科における回腸嚢炎患者は、治療経過観察を受けているものを含めて週に 1-4 人来院する。それら全ての患者の情報から臨床スコアを算出し記録する。
- (2) 細菌数解析方法を確立させる。具体的には、便サンプルを Nycodenz の密度勾配にかけ、細菌層を回収しフローサイトメトリー (FACS) にて解析する。FACS への前処置として核酸染色を行う (すでに、ThermoFisher から Bacteria Counting kit for flow cytometry として入手することができる)。あるいは、全ての細菌にて one copy しか存在しない遺伝子数を qPCR にて測定することによって細菌数を測定する。この方法は富山大学 臨床分子病態検査学講座の仁井見 英樹 先生が開発者であり、その方法を導入する。
- (3) それぞれの便サンプルを内視鏡にて収集し、(2) にて確立させた方法にて細菌数解析、すでに確立された方法を用いて細菌叢解析、代謝産物解析を行う。患者の便サンプルを抗生剤にて腸内を無菌化したマウスに投与し、腸における炎症状態をマウス便中の Lipocalin-2 を指標に検討する。また、便投与を受けたマウスの糞便細菌叢を調べる。炎症が疑われた場合、腸管粘膜固有層の炎症細胞、CD4<sup>+</sup> T 細胞を FACS にて解析する。前述の方法にて炎症の兆候が認められない場合は、腸炎を起こし易いと考えられるマウス (IL-10 欠損マウスなど) をレシピエントとして用いて検証する。すでに、これらの方法にて炎症性腸疾患患者の便サンプルがレシピエントマウスに腸炎を起こすことが報告されている (Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2016;2:468-481)。
- (4) (1) から (3) を総合し、どのような細菌叢の異常 (どのような属の細菌群の量的な異常) が回腸嚢炎の原因となっているのかを明らかにする。

### 3. 研究の成果

(1) 潰瘍性大腸炎(UC)にて回腸囊が増設された患者 82 サンプルにおける細菌叢解析を行った。

#### ①治療前後における検討

現在まで治療経過を追うことが出来ている患者12人をシプロキササン(CPFX) 著効(Very good)、効果あり(Good)、効果なし(Poor)に分け検討した。患者IDは#にて標記、サンプル採取時期(開始時、2週間後、4週間後、再燃時)はIDの下に標記した。著効、効果ありでは、Bifidobacteriaceaeが治療後に増加しているものが4例、Bacteroidaceaeが治療後に顕著に増加(2倍以上しているもの)が4例あった。著効の2例にてFusobacteriaceaeが顕著に減少、再燃時にErysipelotrichaceaeが出現していた。さらに、著効、効果ありの中で、Prevotellaceaeが優位なものが、3例あった(図1)。

#### ②mPDAIスコアにおける検討

抗菌剤にて未治療であった患者の細菌叢を、初診時でのmPDAIスコア(5以上が回腸囊炎と診断される)別にて検討した。mPDAI $\leq$ 4とmPDAI $\geq$ 5にて比較すると、Bifidobacteriaceae、LachnospiraceaeがそれぞれP=0.0269、0.0484と優位にmPDAI $\geq$ 5にて減少していた。さらに、mPDAI $\geq$ 5で、Fusobacteriaceae、Pasteurellaceae、Enterobacteriaceaeを多く持つ患者があり、mPDAI $\leq$ 4で、Bacteroidaceae、Clostridiaceaeが優位である患者が多かった(図2上参照)。さらに、Lachnospiraceae、Bifidobacteriaceae、Bacteroidaceae、Clostridiaceaeの割合を個々の患者にて検討したところ、mPDAI $\leq$ 4では、前記の4種類のうち3種類を10%以上持つもの(図2下の”□”にて示されている)が多かった(図2下図参照)。

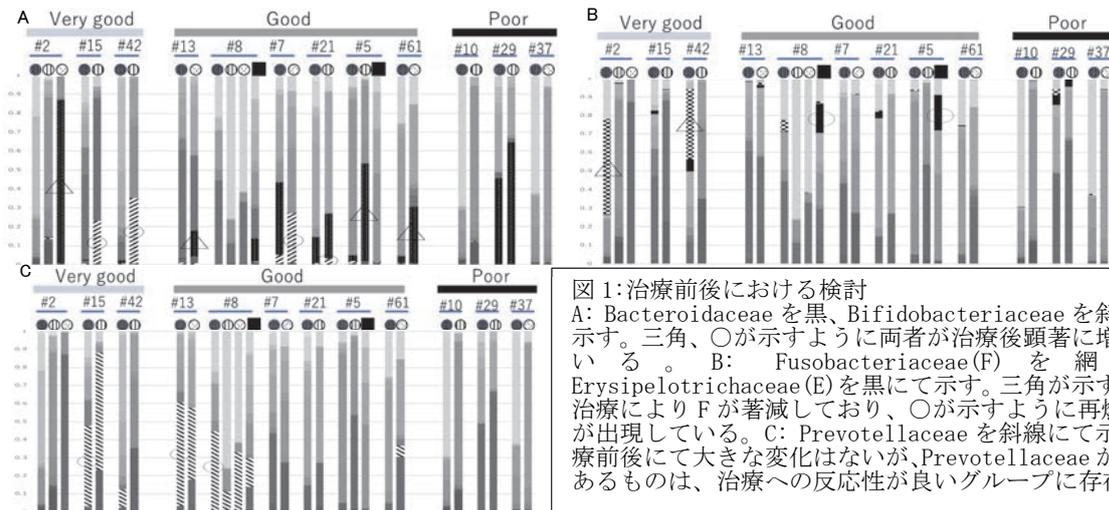


図1: 治療前後における検討  
 A: Bacteroidaceaeを黒、Bifidobacteriaceaeを斜線にて示す。三角、○が示すように両者が治療後顕著に増加している。 B: Fusobacteriaceae(F)を網目、Erysipelotrichaceae(E)を黒にて示す。三角が示すように治療によりFが著減しており、○が示すように再燃時にEが出現している。 C: Prevotellaceaeを斜線にて示す。治療前後にて大きな変化はないが、Prevotellaceaeが優位であるものは、治療への反応性が良いグループに存在する。

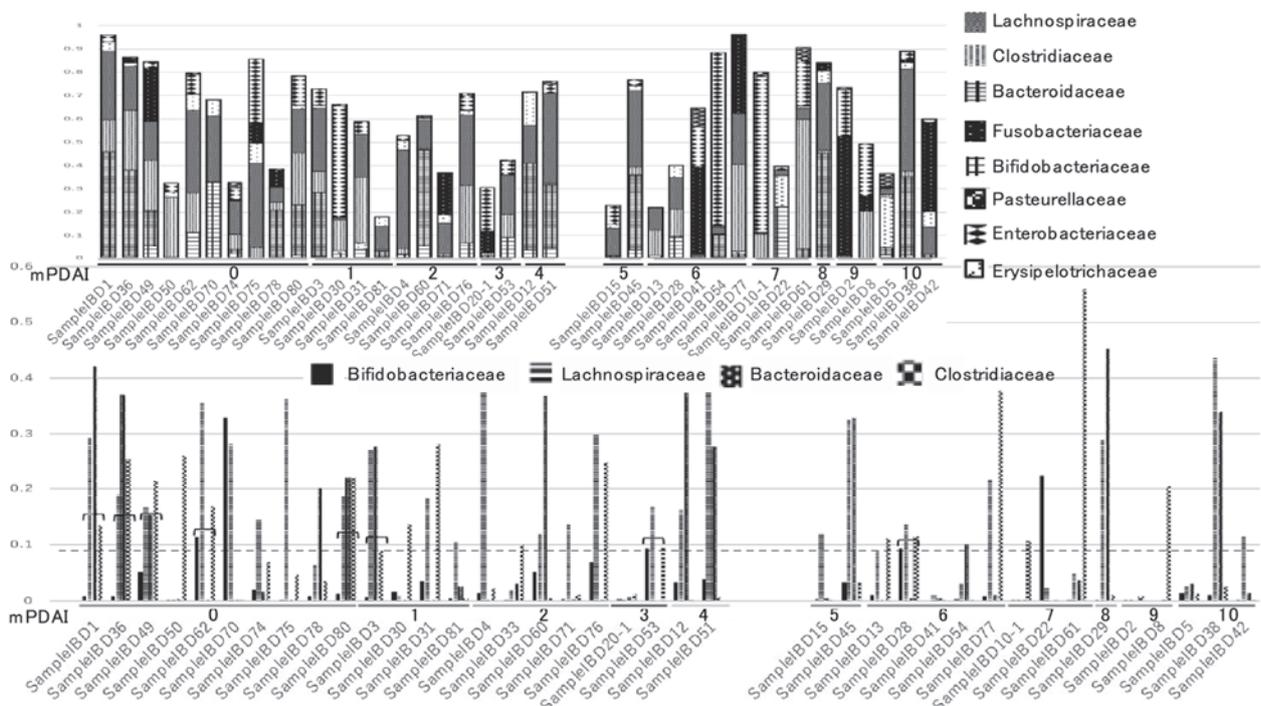


図 2:mPDAI スコアにおける検討

上：それぞれの患者（グラフの下に ID を標記）サンプル中における凡例に示された細菌の割合を mPDAI 別にグラフ化している。mPDAI $\geq$ 5（回腸囊炎患者）にて Fusobacteriaceae を多く持つ患者が存在する。下：上に示した患者個々のサンプルにおける、Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Clostridiaceae の割合を示す。点線は 10%のラインを示し、“┌” は前述の 4 種類のうち 3 種類が 10%を超えている患者を示す。“┐”にて示された患者は mPDAI $\leq$ 4にて明らかに多い。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) UC 術後回腸囊炎患者の便サンプルの形状は個々においてかなり差があり、腸内細菌数をサンプル間にて正確にカウントすることが困難であることが明らかとなった。したがって、細菌叢構成の詳細を検討することを主眼にして解析を行った。UC 術後回腸囊炎患者 82 サンプルについて 16SrRNA アンプリコンによる解析を行い、腸管環境の恒常性維持に関与していると考えられる”Balanced microbiota”の候補、さらに、病原性常在細菌の候補を見出した仮説図、「研究成果」の図 2 の下図参照)。また、UC 術後回腸囊炎の通常治療である抗菌剤（シプロキササン(CPFX)）治療に対する反応性が治療開始時における Prevotellaceae の優位性によって規定されるとの仮説を得るに至った（仮説図、「研究成果」の図 1C 参照)。したがって、①さらに、解析サンプル数を増やすことにより、前述の傾向を統計学的に明らかにすること、そして、②マウスを用いて仮説の証明する必要があると考えられる。さらに、③前述の結果をもとに潰瘍性大腸炎患者へ検討を拡大し、同様の傾向が認められるかも検討する必要があると考えられる。

現段階における仮説



仮説図

UC 術後回腸囊では Lachnospiraceae, Bifidobacteriaceae, Bacteroidaceae, Clostridiaceae のうち 3 種類が少なくとも 10%存在することで、炎症あるいは病原性常在細菌(Pathobiont) (Fusobacteriaceae, Pasteurellaceae, Enterobacteriaceae, Erysipelotrichaceae 等) の増殖が抑制され恒常性が保たれている。これらの恒常性維持に関わる細菌群を”Balanced microbe”と名付けた。さらに、Prevotellaceae が優位であるとシプロキササン(CPFX)の代謝の抑制、あるいは、回腸囊細菌叢への CPFX の浸透が促進され抗菌剤の効果が向上するのではないかと考えた。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①石戸聡、加藤完、大野博司、小椋英樹、内野基、池内浩基、潰瘍性大腸炎術後の回腸囊炎と腸内細菌叢の関連性に関する検討、第38回 近畿腸管微生物研究会、平成30年6月9日

(3) 出版物

なし

学 校 名	福 岡 大 学	研究所名等	てんかん分子病態研究所	
研 究 課 題	iPS細胞由来オータプス培養標本による シナプス機能評価法開発 —シナプス対象の神経疾患治療薬創製法開発—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①オータプス ②シナプス ③微小電極アレイ ④iPS細胞			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
廣 瀬 伸 一	医 学 部 てんかん分子病態研究所	教 授 所 長	研究代表者 総括 iPS細胞樹立・維持 ドラッグスクリーニング

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
桂 林 秀 太 郎	薬 学 部	准 教 授	オータプス標本作成 ドラッグスクリーニング
安 田 隆	九州工業大学大学院生命体工学 研究科 生体機能応用工学専攻 生 体 メ カ ニ ク ス 講 座	教 授	シリコン窒化膜を用いたマイクロデバイス開発

# iPS 細胞由来オータプス培養標本によるシナプス機能評価法開発 ーシナプス対象の神経疾患治療薬創製法開発ー

## 1. 研究の目的

### (1) 目的

本研究の目的はシナプス機能の詳細な解析に適した培養標本であるオータプス培養標本をヒト iPS 細胞より調製し、ハイスループットでニューロンの電氣的活動を評価できる次世代微小電極アレイシステムを用いてシナプス機能のスクリーニング法を開発することにある。具体的には微小孔アレイデバイスを用いてオータプス培養標本を作製する技術を構築するとともに、デバイス上の微小電極アレイを用いてオータプス培養標本の電気活動を計測する技術を構築する。

### (2) 背景

アストロサイトがシナプス機能を制御することは既に分かっている。しかし、アストロサイトの密度が変化した場合のシナプス動態は、未知な部分が多い。例えば、1) ニューロンがシナプスを投射する場所(位置)は影響を受けるのか、2) 個々のシナプスにおける開口放出メカニズムの変化はどうなっているのか、3) その生理的意義は何か、などである。本研究で用いた培養標本は、従来の神経生理学研究で用いられる脳スライス標本や分散培養標本とも異なる、全く新しいコンセプトに基づいた再構築型単一ニューロン培養モデルである。この特徴を活かした解析的研究の成果を基に、共存するアストロサイトの密度環境とシナプス動態の相関関係を理論的にモデル化することによって、アストロサイトの密度依存的な環境変化を基軸として高次脳機能の獲得原理を理解することが必要であった。

## 2. 研究の計画

### (1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

半導体加工技術を利用して、窒化シリコン製の自立膜に微小孔をアレイ状に形成した培養膜を製作する。この培養膜の裏面にアストロサイトを、膜のオモテ面にニューロンを培養することで、微小孔アレイを通じたアストロサイトとニューロンの細胞間コミュニケーションを実現し、オータプス培養標本を作製し得る培養環境を構築する。次に、微小孔アレイを有する窒化シリコン製培養膜のオモテ面に微小電極アレイを形成する。培養膜の裏面にアストロサイトを、オモテ面の微小電極アレイ上にニューロンを播種して共培養を行いながら、微小電極アレイによりニューロンの細胞外電位を計測する技術を構築する。

### (2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

まず初めに自己にシナプスを投射する海馬オータプス初代培養標本の作製を行う。続いてこの海馬オータプス初代培養標本を用いてパッチクランプ法を用いたシナプス伝達の解析を行う。さらに、蛍光イメージング法によるシナプス数の解析を行うことで、シナプス数の解析を実施する。

## 3. 研究の成果

### (1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

膜厚約  $1\mu\text{m}$  の窒化シリコン膜に、直径約  $3\mu\text{m}$  の微小孔をピッチ  $7.5\mu\text{m}$  でアレイ状に形成した。この膜を挟むようにしてアストロサイトとニューロンの共培養を行った。アストロサイトの播種数が異なるサンプルを用意し、ニューロンのシナプスマーカーを蛍光染色することでシナプス数をカウントし、ニューロンの活性を評価した。その結果、アストロサイトの播種数が多いほど、ニューロンの活性が高いことが分かった。これにより、微小孔アレイを通じて細胞間コミュニケーションを構築し得ることを実証した。次に、膜厚約  $1\mu\text{m}$  の窒化シリコン膜に、直径約  $6\mu\text{m}$  の微小孔をアレイ状に形成するとともに、一辺約  $54\mu\text{m}$  の微小電極を  $8\times 8$  個のアレイ状に形成した。この膜の裏面にアストロサイトを、オモテ面にニューロンを培養し、微小電極アレイによりニューロンの自発活動に伴うスパイク状の電位変化を計測した。その結果、培養 7 日目には  $20\mu\text{V}$  程度のスパイクが観察され始め、14 日目にはスパイクの大きさが  $100\mu\text{V}$  程度に増加した。以上の実験により、構築した計測システムの有用性を実証した。

## (2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

アストロサイトが高密度になるほど、単一ニューロンにおける興奮性シナプス後電流は大きかった。単一ニューロンあたりの即時開口放出可能シナプス小胞のサイズと自発的シナプス伝達の頻度も、アストロサイト高密度群のほうが大きかった。形態学的に同定されたグルタミン酸作動性シナプスの数は両者で有意な差は認めなかったが、伝達物質を放出できる興奮性シナプス(アクティブシナプス)の比率はアストロサイト高密度群では増加しており、逆にシナプス前サイレントシナプスの比率は低い結果であった。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

すでに本研究の窒化シリコン多孔膜を用いることでオータプス培養標本を構築できることは確認済みであるが、歩留まりが極めて低いいためその改善を行うとともに、微小孔のピッチなどの最適化を行う必要がある。また、微小電極によるオータプス培養標本の電位計測を実現するために、微小電極上でのオータプス培養標本の作製を目指す。

### (2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

ニューロン1個あたりに必要なアストロサイトの最適数が分かったので、次年度はその結果に基づいてアストロサイトを播種し、iPS細胞由来オータプス培養標本の構築を目指す。ただし、マウス海馬ニューロンと、iPS細胞由来ニューロンが同じ挙動を示すかは全く不明なので、慎重に解析を行う必要がある。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①Yoshitomi S, Takahashi Y, Yamaguchi T, Oboshi T, Horino A, Ikeda H, Imai K, Okanishi T, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Yoshimoto J, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Quinidine therapy and therapeutic drug monitoring in four patients with KCNT1 mutations. *Epileptic Disord.* 2019;21(1):48-54.
- ②Yoshitomi S, Takahashi Y, Yamaguchi T, Imai K, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Efficacy and tolerability of peramppanel in pediatric patients with Dravet syndrome. *Epilepsy Res.* 2019;154:34-8.
- ③Yoshitomi S, Takahashi Y, Imai K, Koshimizu E, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Kato M, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Different types of suppression-burst patterns in patients with epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS). *Seizure.* 2019;65:118-23.
- ④Okumura A, Shimojima K, Kurahashi H, Numoto S, Shimada S, Ishii A, Ohmori I, Takahashi S, Awaya T, Kubota T, Sakakibara T, Ishihara N, Hattori A, Torisu H, Tohyama J, Inoue T, Haibara A, Nishida T, Yuhara Y, Miya K, Tanaka R, Hirose S, Yamamoto T. PRRT2 mutations in Japanese patients with benign infantile epilepsy and paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Seizure.* 2019;71:1-5.
- ⑤Hirabayashi K, Uehara DT, Abe H, Ishii A, Moriyama K, Hirose S, Inazawa J. Copy number variation analysis in 83 children with early-onset developmental and epileptic encephalopathy after targeted resequencing of a 109-epilepsy gene panel. *J Hum Genet.* 2019;64(11):1097-106.
- ⑥Goto A, Ishii A, Shibata M, Ihara Y, Cooper EC, Hirose S. Characteristics of KCNQ2 variants causing either benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 2019;60(9):1870-80.
- ⑦日暮憲道, 廣瀬伸一, PCDH19 関連症候群, 日本医師会雑誌 指定難病ペディア 2019, 2019;148(特別号(1)):128.

(2) 口頭発表

- ① てんかんと遺伝子／廣瀬伸一，／第 14 回日本てんかん学会九州地方会（2019. 7. 13 沖縄）
- ② 安田隆，細胞解析デバイスで創薬・医療に貢献する，第42回日本バイオテクノロジー学会年会・第37回バイオテクノロジー・リサーチ・フォーラム，北九州市，2019.
- ③ 桂林 秀太郎，構成論的に神経ネットワークを作る～人工脳を作るための細胞レシピ～、第20回ブレインサイエンス研究会、2019年（熊本）
- ④ Shutaro Katsurabayashi, Kohei Oyabu, Kotomi Takeda, Kaori Kubota, Takuya Watanabe, Katsunori Iwasaki, Glial assembly for regenerative medicine and brain transplant, 2nd Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research, 2020年（福岡）

(3) 出版物

なし

学 校 名	獨 協 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	がんにおける自然免疫型T細胞の機能解明 —新規免疫療法を目指して—		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①がん ②免疫療法 ③自然免疫型T細胞 ④MAIT細胞 ⑤iPS細胞 ⑥細胞治療 ⑦Proof-of-concept ⑧マウス		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
若 尾 宏	医 学 部	教 授	研究代表者・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
杉 本 智 恵	医 学 部	准 教 授	実験・論文作成

# がんにおける自然免疫型 T 細胞の機能解明

## —新規免疫療法を目指して—

### 1. 研究の目的

本研究ではがんにおける MAIT 細胞の機能を新規マウスモデル創生によって解明する。

生まれながらに持っている自然免疫と生後さまざまな異物と接触することで獲得される獲得免疫は生体防御の要であり、がんの発生と進展においても重要である。現在のがん免疫研究は免疫チェックポイント阻害剤とキメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T 細胞) などを使用した細胞傷害性 T 細胞が中心であるが、がん免疫療法をさらに普遍的・効果的な治療法に発展させるためには、獲得免疫系の T 細胞のみに焦点をあてるのではなく、自然免疫系を含めたさまざまな免疫細胞の機能を総合的に理解する必要がある。申請者は自然免疫と獲得免疫の両方の性質を持つ自然免疫型 T 細胞である NKT 細胞に着目し、NKT 細胞核移植によるクローン胚の樹立、ここから分化誘導した NKT 細胞移植によるがん細胞の増殖抑制を報告した (Wakao et al Current Biol 2005, FASEB J 2008)。これら一連の研究により自然免疫型 T 細胞移植によるがんの細胞治療の可能性を示した。

MAIT 細胞は近年注目されている新規の自然免疫型 T 細胞であり、ヒトにおける最大の T 細胞亜集団で、微生物・ウイルス感染、自己免疫疾患、生活習慣病、がん等の疾患に関与する。特に種々のがんにおいて MAIT 細胞は患者の末梢血から消失し、がん浸潤リンパ球 (TIL) 中に多く存在する。しかし、がんにおける MAIT 細胞機能の詳細については殆ど未解明である。MAIT 細胞は細胞傷害性 T 細胞と異なりペプチドではなく、ビタミン B2 代謝中間物等の化合物を抗原として認識する。MAIT 細胞は様々ながんの TIL 中に存在することから、固形がんにおいても抗がん活性を発揮すると期待でき、その作用機能解明は新規治療法開発を可能とする。

MAIT 細胞の機能解析上の問題点は、①生体から分離した MAIT 細胞は増殖能が弱く、細胞死を起こしやすいこと、②現行マウスには MAIT 細胞が微量すぎて解析が難しいことである。申請者はヒト iPS 細胞から MAIT 細胞を選択的に分化誘導・増幅することで、この課題を克服した (Wakao et al Cell Stem Cell 2013)。

本研究では上記研究成果を応用して「MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウス」と「マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞」を構築・誘導し、これを用いてがんにおける MAIT 細胞機能を解明する。

### 2. 研究の計画

本提案では MAIT 細胞がいかなる作用機序で抗がん活性を発揮するのかを解明することを目指し、以下の研究を行う。

#### (1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立

移入細胞をレシピエント (C57BL/6 CD45.2) マウス由来細胞と免疫学的に区別するためコンジェニックマウス (C57BL/6 CD45.1) 由来 MAIT 細胞から iPS 細胞を樹立する。iPS 細胞から m-reMAIT 細胞を分化誘導し、C57BL/6 CD45.2 マウスに移植し、その性状・機能を明らかにして、がん移入時の m-reMAIT 細胞の機能解析に供する。

#### (2) m-reMAIT 細胞による抗がん活性とその作用機序解明

移入 m-reMAIT 細胞が試験管内・生体内でがん増殖抑制能や細胞傷害活性などの抗がん活性を発揮するのか明らかにし、抗がん活性を担う分子を特定し、その作用機序を解明する。

#### (3) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスの作製

C57BL/6 CD45.2 由来 MAIT 細胞をゲノム修飾せずに iPS 細胞化し、これら iPS 細胞を用いてキメラマウスを経由し、MAIT 細胞特異的にその T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子の再構成が終了したゲノム配置を持つ対立遺伝子を有するマウスを作製する。

#### (4) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスを用いた抗がん活性とその作用機序解析

上記 (3) で作製したマウスにがんを移植し、野生型マウスと比較して生存期間の有意な延

長がみられるのかを評価し、その作用機序を明らかにする。

### 3. 研究の成果

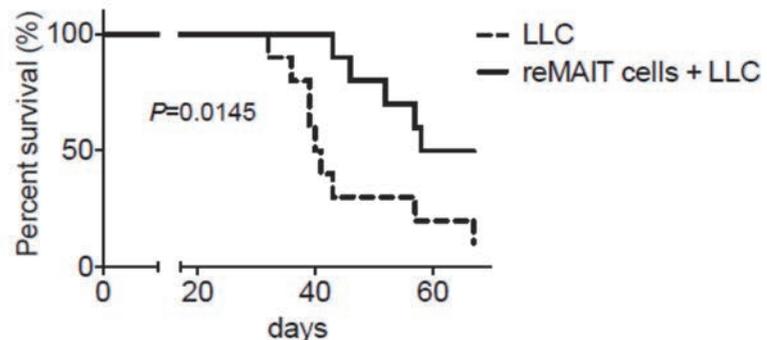
#### (1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立

① マウスMAIT細胞のiPS細胞化とMAIT細胞の分化誘導・大量産生：iPS細胞をOP9とOP9に Notchリガンドであるdelta-like 1を強制発現させたOP9/DLというフィーダー細胞上で培養することでMAIT細胞(m-reMAIT細胞)を分化誘導・大量産生する技術を確認した。

② m-reMAIT細胞養子移入後の動態解析：Ly5.1由来m-reMAIT細胞をLy5.2マウスに移入して肺、脾臓、肝臓、腸管上皮、腸管粘膜固有層、腸管膜リンパ節に存在するLy5.1+細胞をフローサイトメーターで測定・解析した。その結果、肺、脾臓、肝臓、腸管粘膜固有層でLy5.1+細胞の存在を確認した。現在、各組織から精製したMAIT細胞をRNA-seqにて解析中である。この解析によりin vitroで作製したm-reMAIT細胞のトランスクリプトームがマウスへの養子移入によってどれだけ生体内に存在するMAIT細胞のトランスクリプトームに近づくのかが明らかになる。

#### (2) m-reMAIT細胞による抗がん活性とその作用機序解明

① 肺原発性がんに対する生存期間の評価：野生型マウスと m-reMAIT 細胞を養子移入したマウスに肺原発性がん Lewis Lung Carcinoma (LLC) を移植し、マウス生存期間を測定した。その結果、m-reMAIT 細胞を移入したマウスでは野生型マウスに比して有意な生存期間延長が認められた (右図、m-reMAIT 細胞は reMAIT cells と表記。有意差検定は Log-rank 試験による)。



② MAIT細胞による抗がん効果の作用機序解明：m-reMAIT細胞移入による生存延長がNK細胞もしくは細胞傷害性T細胞である

CD8細胞を介しているのかを明らかにするため、NK細胞を選択的にマウスから除去する anti-asialo-GM1抗体、ならびにCD8細胞を選択的に除去するanti-CD8抗体をマウスに投与し、その抗がん効果への影響を(1)肺へのがん転移、(2)生存期間の延長という視点から検討し始めた。なお、m-reMAIT細胞はLLCやメラノーマであるB16F10に対して直接的な細胞傷害活性を発揮しないことを予備実験にて確認済である。

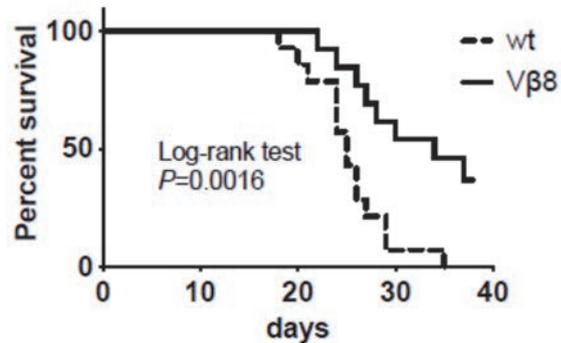
#### (3) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスの作製

① MAIT 細胞由来 iPS 細胞からのキメラマウス作製：MAIT 細胞由来 iPS 細胞(C57BL/6 CD45.2)を ICR マウスの胚盤胞にマイクロインジェクションしてキメラ率の異なるキメラマウスを複数匹得た。キメラ率が最も高いマウス(キメラ率 90%)を C57BL/6 メスマウスと交配させ、MAIT 細胞特異的に TCR 遺伝子再構成が終了したゲノム配置を有する産仔を PCR 法にて同定した。これら産仔を再び C57BL/6 と交配させ、片方の対立遺伝子中に遺伝子再構成済み MAIT 細胞特異的 TCR  $\alpha$  鎖 (以下  $V\alpha 19$  マウス) もしくは  $\beta$  鎖 (以下  $V\beta 8$  マウス) を有する産仔を選択し、以下の実験を行なった。

② 新規モデルにおける MAIT 細胞の存在割合:MAIT 細胞を特徴つける TCR は  $\alpha$  鎖 (TRAV1-TAJ33) と  $\beta$  鎖 (TRBV8) の組み合わせから成り立っているが、これらをヘテロで対立遺伝子に有する  $V\beta 8$  マウス血中での MAIT 細胞の存在割合は全  $\alpha\beta$  型 T 細胞の 0.5%、 $V\alpha 19$  マウスでは 30%以上であった。なお、野生型マウス血液中では MAIT 細胞量は検出限界以下であった。

#### (4) MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウスを用いた抗がん活性とその作用機序解析

① V $\beta$ 8 マウスにおける抗がん能の亢進：V $\beta$ 8 マウスを用いて LLC を移植してその生存期間に及ぼす影響を評価した。野生型マウスと比較して V $\beta$ 8 マウスでは有意な生存期間延伸が観察された（右図、野生型マウスは wt、V $\beta$ 8 マウスは V $\beta$ 8 と表記）。



② V $\beta$ 8 マウスにおける抗がん効果の作用機序解明：V $\beta$ 8 マウスにおける生存延長が NK 細胞もしくは細胞傷害性 T 細胞である CD8 細胞を介しているのかを明らかにするため、NK 細胞を選択的にマウスから除去する anti-asialo-GM1 抗体、ならびに CD8 細胞を選択的に除去する anti-CD8 抗体をマウスに投与し、その抗がん効果への影響を(1)肺へのがん転移、(2)生存期間の延伸という視点から検討し始めた。

(5) その他：m-reMAIT 細胞の養子移入がいかなる作用機序によって抗がん効果の発揮につながるのかを明らかにするため、m-reMAIT 細胞をマウスに養子移入後、LLC を移植して経時的に m-reMAIT 細胞を取り出してセルソータにより精製し、RNA-seq 解析を行なった。この解析からがんという異物の侵入に対して m-reMAIT 細胞がトランスクリプトームをどの様に変化させるのか、NK 細胞や CD8 細胞との相互作用を担う m-reMAIT 細胞由来のメディエーターは何かを同定する。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1) m-reMAIT 細胞や新規モデルマウスを用いた抗がん効果の作用機序解明：学術研究振興資金により、CD45.1 マウス由来の m-reMAIT 細胞ならびにトランスジェニックでもノックアウトマウスでもない、新たなカテゴリーの新規マウスが樹立できたことは今後の MAIT 細胞の機能解析のためのツールの確立として特筆できる。しかし、抗がんの作用機序解明という点では MAIT 細胞が CD8 T 細胞の様に直接的にがんを認識・攻撃する様式でないため、その解明に時間を要しており、3 年目の資金補助が得られなかったのは誠に遺憾である。本研究結果は iPS 細胞由来 MAIT 細胞を用いた、「がんの再発防止」に臨床応用可能である。
- (2) 新規モデルマウスの有用性：今回、樹立した MAIT 細胞豊富なマウスは従来の遺伝子改変動物とは全く異なる概念で作製されたものである。MAIT 細胞がヒトで最大の T 細胞亜集団であり、微生物・ウイルス感染、自己免疫疾患、生活習慣病、喘息、アレルギー、がん等の疾患に関与することを鑑みれば、これらマウスにて様々なヒト疾患モデルを樹立し、新たな知見や治療法開発に有益であると考えられる。特に MAIT 細胞は従来研究で使用されているマウスには極微量にしか存在しないことから、この新規モデルマウスは今後の生命科学の進展に寄与するものと期待できる。

#### 5. 研究発表

- (1) 学会誌等  
なし
- (2) 口頭発表  
①先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2020年2月4-5日琵琶湖ホテル
- (3) 出版物  
なし
- (4) その他  
①特許願2019-199603(2019) マウスMAIT様細胞及びMAIT細胞豊富なマウス  
発明者 若尾 宏、 杉本 智恵

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	理 工 学 研 究 所
研 究 課 題	光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①メタノール ②光脱水素 ③金属錯体 ④光触媒		

## ○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
張 浩 徹	理 工 学 部	教 授	研究代表者 総括

## ○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
芳 賀 正 明	理 工 学 部	教 授	光誘起電子・プロトン移動の設計
片 山 建 二	理 工 学 部	教 授	無輻射過程等の光誘起ダイナミクス解析
中 田 明 伸	理 工 学 部	助 教	光応答性有機配位子及び錯体の合成
孫 雲 龍	理 工 学 部	助 教	水素種の励起状態ダイナミクスの測定と解析

# 光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築

## 1. 研究の目的

従来のエネルギーキャリア(EC)からの水素の吸蔵と放出は高温を必要とすることから、新しい技術が必要とされている。本研究では、申請者らが見出したアミノフェレート(apH)3d金属錯体が示す有機骨格上での光誘起電子・プロトン移動の高次設計と反応ダイナミクスの解明による、高活性光駆動型ECシステムの構築を目指す。本研究では、錯体化学、有機化学、光材料化学、光化学を専門とする新たなグループを立ち上げ、室温下での「光」エネルギーの入力により、効果的に水素を利用できる材料を得るための基礎学理を構築する。

## 2. 研究の計画

光による EC の活性化のためには副反応、プロセスを抑制しつつ活性種を発生する励起状態へ如何に高効率に励起するかが鍵となる。平成 30 年には、平成 29 年に得られた種々の重要知見を基に、EC (特に MeOH) からの脱水素を引き起こす活性水素種の発生効率を向上すべく、金属種及び配位子骨格の置換基の最適化を進め水素発生量(TON, TOF)や失活に通ずる輻射(発光)効率を測定し明らかにする。また現在の反応系は液相の均一系で行われている一方、光応答型触媒を担体へと担持することで不均一系光駆動型 EC システムの構築も併せて遂行する。均一系により分子レベルの詳細な触媒設計と反応機構解明を行い、これを不均一系触媒の設計へと有機的にリンクすることで、耐久性や触媒活性の飛躍的向上を図る。均一及び不均一系においてこれらの活性種が示す反応ダイナミクスを各種時間分解分光法により定量的に明らかにし高活性触媒の設計にフィードバックする。

検討項目

### (1) 分子性(PRC)触媒の設計

我々が *Nature Commun.*(2016)に発表した PRC 触媒の肝は、電子及びプロトンをプーリング可能な有機骨格(Proton/Electron Pooling Ligand, PEPL)と、Fe(II)等の非貴金属イオンとの融合にある。これらは UV 光照射により水素ラジカルを発生(実証済)し、続く MeOH からの水素引抜きにより H<sub>2</sub> と HCHO を触媒的に与える。本研究では初報の Fe(II)系に加え、Mn(II)錯体も活性を示し、且つ量子収率が 4.8% (Fe(II))から 6.8% (Mn(II))へと上昇することを確認している。この知見を基に、s ブロック及び 3d 金属を中心に、dd 及び無輻射失活を抑制しつつ高活性を示す金属イオンを選定する。また、これらの基本骨格を利用した PEPL の最適化を図る。置換基の導入やヘテロ環への変換は、HOMO-LUMO ギャップや S<sub>1</sub> 状態及び N-H を活性化する励起状態への円錐公差確率を変調し、均一系・室温における MTF 反応活性を最適化する化学因子を見いだす。

### (2) PRC の無機担体への固定化

HCHO は 130°C 以上では MeOH との付加体を生成せず分離側に反応が進行する。そのため、本研究では本 PRC を中低温での MTF 反応に応用すべく、シリカや MCM 表面のターミナル酸素、または担体への異種金属のドーピングにより固定化 (*Chem. Rev.*, 2016, 116, 323 他) する。担体としては、(i)光透過性、(ii)熱的・機械的安定性、(iii)高い表面積、(iv)化学的安定性、(v)経済性に加え(vi)PRC の固定に必要な十分な量の固定化サイトが求められるため、メソポーラス担体を中心にその新規合成法の開発も含め検討する。

## 3. 研究の成果

### (1) 実験方法

窒素雰囲気下、[M<sup>II</sup>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (M = Mg, Fe, Co, Zn) と二当量の apH<sub>2</sub> および水酸化テトラブチルアンモニウム (TBAOH) を MeOH 中、混合することで各金属の apH 錯体 MapH を得た。また、MapH と補助配位子(ホスフィン (-PR<sub>3</sub>), アミン (-NR<sub>3</sub>), イソシアニド (-RNC), カルボニル (-CO), シアノ (-CN<sup>-</sup>)) の MeOH 溶液を種々の濃度 (0.66-6.6 mM) で混合し、UV-vis および <sup>1</sup>H NMR スペクトルにより分析した。これら MeOH 溶液に光照射 (λ<sub>ex</sub> = 289 ± 10 nm) を行い、気相成分を GC により分析した。

続いて分子性触媒を担持する多孔性担体の合成においては、ゼオライト骨格中に見出される Al と六つの Si からなるスピロ環状型骨格から構築される [pyH] [Al {OSiPh<sub>2</sub> (OSiPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O} ]<sub>2</sub> (pyH = pyridinium, **AlSi<sub>6</sub>**) 及び double 4-Ring (D4R) 型骨格を有し、かつ加水分解を起こし得る末端 OH 基を持つ (NMe<sub>4</sub>)<sub>4</sub> [Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>(OH)<sub>8</sub>O<sub>12</sub>] · 24H<sub>2</sub>O (**TMA-Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>**), を KOH 共存下にて水熱反応させた。生成物の同定は PXRD, ICP, IR, TG-DTA 等により行った。

## (2) 研究成果

### ① PRC 触媒の設計

MeOH-*d*<sub>4</sub> 中での <sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて、**MapH** (M = Fe, Co) はフリーの apH<sub>2</sub> とは異なる、常磁性錯体種の形成を示すブロードニングしたシグナルを与えた。一方、**MapH** (M = Mg, Zn) は apH<sub>2</sub> より低磁場側にシグナルを示し、錯形成による apH の電子密度の低下を示唆した。また、結晶構造解析により **CoapH** は **FeapH** と同様の分子構造を示した。

**MapH** (M = Fe, Co) と <sup>t</sup>BuNC を *x* : 1-*x* (0 < *x* < 1) の濃度比で混合した際の UV-vis 吸収スペクトルにおいて、350-600 nm に複雑な変化が現れたことから、<sup>t</sup>BuNC と Fe, Co の相互作用による複数の錯体種の形成を示唆した。一方 M = Co の場合、315 nm の吸光度における Job プロットが *x* = 0.5 で一つの頂点を示した事から、Co : <sup>t</sup>BuNC = 1 : 1 での新たな錯体の形成が示唆された。一方 M = Fe の場合の Job プロットから、単純な置換反応に加え apH の脱離などの複数の反応が競合していることが明らかとなった。その他の M と L の組み合わせでは、**FeapH** + <sup>t</sup>BuNC と同様に複数の競合反応の進行が示された。

**CoapH** と <sup>t</sup>BuNC の MeOH-*d*<sub>4</sub> 混合溶液は芳香族領域にブロードな <sup>1</sup>H NMR スペクトルを与え、**CoapH** 単独とは異なることから新たな錯体種は常磁性であることを示唆する。一方 **FeapH** は <sup>t</sup>BuNC と混合するとフリーの apH<sub>2</sub> 配位子のシグナルに加え、**FeapH** とは異なるシャープなシグナルを芳香族領域に示した。apH 配位子と <sup>t</sup>BuNC 配位子由来のシグナルの積分比から、apH と <sup>t</sup>BuNC 配位子が 1 : 1 で配位した反磁性錯体種を形成する事が明らかになった。一方 PEt<sub>3</sub> および NBu<sub>3</sub> を用いた場合はブロードなスペクトルが得られた事から、<sup>t</sup>BuNC が Fe(II) の配位子場分裂を拡大し、低スピン電子状態を安定化するのに適当であることを示す。また、**MapH** (M = Mg, Zn) においては <sup>t</sup>BuNC との反応後、apH の脱離に由来するスペクトルを示した。apH の脱離は <sup>t</sup>BuNC > NBu<sub>3</sub> > PEt<sub>3</sub> の順で促進される傾向にあったが、M の d 電子数には単純に依存せず、Zn (*d*<sup>0</sup>) > Mg (*d*<sup>0</sup>) ~ Fe (*d*<sup>7</sup>) > Co (*d*<sup>7</sup>) の順で起こりやすいことが明らかになった。

各 MeOH 溶液に六時間の紫外光照射を行うと、apH<sub>2</sub> は 0.4 mol、**MapH** (M = Mg, Fe, Co, Zn) はそれぞれ 2.7, 1.2, 0.7, 1.1 mol の水素を生成した。apH<sub>2</sub> は光反応後に全て 2, 3-ジヒドロベンゾオキサゾールへと分解していたのに対し、**MapH** を形成することで分解が一部抑制されたことが水素生成の高活性化の要因と考えられる。特に遷移金属錯体ではない **MgapH** の場合に水素生成量が大きく向上した。同様の光反応を **MapH** (M = Mg, Zn) と <sup>t</sup>BuNC の混合溶液で行うと、混合時点における apH の脱離により **MapH** のみの場合に比べ水素生成量が低下した。一方、**CoapH** に <sup>t</sup>BuNC を添加してもほとんど水素生成活性は向上しなかったのに対し、**FeapH** では水素発生量が 3.9 倍増大した。光反応後も反磁性錯体の残存が <sup>1</sup>H NMR により確認されたこと、および反磁性化しない PEt<sub>3</sub> や NBu<sub>3</sub> の添加では <sup>t</sup>BuNC の場合より水素発生量の向上が小さかったことから、反磁性種形成による光安定性の向上が水素生成の高活性化に重要であることが示唆された。

### ② PRC の無機担体への固定化

分子性前駆体として **AlSi<sub>6</sub>** を用い塩基および酸条件下での水熱反応を行なった。塩基として KOH を添加し 160-200°C で反応させるとアルミノケイ酸塩ゼオライトである K 型 Zeolite L と Zeolite W、およびアルミノケイ酸カリウム的一种である Megakalsilite がそれぞれ選択的に生成することを明らかにした。KOH を共存させると **AlSi<sub>6</sub>** が AlO<sub>4</sub><sup>5-</sup> あるいは SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> 単位まで完全に分解される機構か、Si-Ph 結合のみが選択的に開裂しシラノールを経て縮合する二つの機構が推定された。また酸として HCl を共存させ水熱反応を行なったところ、ゼオライトなどの結晶性無機酸化物は得られず Ph 基が残存したポリシロキサン系の重合体が生成したことが示唆された。酸共存下では **AlSi<sub>6</sub>** 中の Al-O 結合が優先的に開裂し、生成したシラノールを経て重合体が形成される機構と、一部の Si-Ph 結語のみが選択的に開裂して **AlSi<sub>6</sub>** 骨格を保持した Ph 基残存重合体が形成される機構の二つが推定された。本研究で得られたゼオ

ライトは従来法に比べ、前処理を必要としないばかりでなく、ゼオライト L, W の選択的形成という観点でも優位点を有す。また得られたゼオライトは従来法と同等の比表面積を持つことも確かめられたこと、またその表面に分子性錯体と反応しうる活性サイトを持つことが知られているため、メタノールの脱水素触媒を担持しうることも期待された。

一方、**MA-Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>**とそのカチオン交換体 **K-Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>** 及び **Na-Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>** を合成し、**Na-Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>** は 800°C の加熱により *carnegieite* を、一方 **TMA-Al<sub>4</sub>Si<sub>4</sub>** は NaOH 及び KOH 共存下での水熱反応により LTA, SOD 及び EDI 型ゼオライトを与えることを明らかにした。以上の結果及び LTL 及び MER 型ゼオライトを与える先行研究から、MP 種により生成するアルミノシリケートを制御可能であることが示される。

最後に、本研究課題を三カ年に渡り遂行して得られた研究成果を広く公開するために「*Symposium on Materials Chemistry for Sustainable Energy in Chuo University*」と題したシンポジウムを 2020 年 3 月 6 日に中央大学にて開催した。当初は外国からの招聘を計画したもののコロナウィルスにより国内招聘者に限定し開催をした。研究実施者である芳賀、片山、張の発表に加え、速水先生（熊本大）、宮坂先生（東北大）、藤井先生（北大）、酒井先生（九大）による招待講演を実施し、50 名を超える参加者と共に本申請課題である光駆動型ハイドライドに関する研究成果に加え関連する光化学やエネルギー変換化学、錯体材料に関する研究について議論を行った。これにより本申請課題の成果の一部を公開できた。

#### 4. 研究の反省・考察

本研究ではまず、MeOH 中におけるアミノフェノラート錯体骨格への補助配位子 L の効果に加え、MeOH の光脱水素化に与える影響を明らかにした。**MapH** と L を混合すると、M と L の組み合わせに依存して L の配位による新たな錯体種の形成と apH 配位子の脱離平衡が存在することが明らかとなった。また、常磁性 **FeapH** と補助配位子 <sup>t</sup>BuNC の組み合わせが新たな反磁性錯体種を与えるとともに、この反磁性錯体種の形成は光安定化に寄与し、**FeapH** 単体よりも水素生成活性を 3.9 倍向上することを見出した。以上の結果は、apH 配位子を脱離させず、反磁性化する錯体設計が MeOH の光脱水素化に有効であることを示す。3 年間の研究を通じて、金属、ap 配位子上の置換基及び補助配位子が光脱水素活性に与える影響を定量的に明らかにできたことは今後の触媒設計の糧になる。一方、触媒の不安定性については今後十分な検討が必要である。特に溶液中における暗条件及び明条件下における十分な安定性の獲得は実用性を高めるためにも避けて通れない課題である。これを克服すべく、本研究遂行期間に分子性触媒を担持しうる多孔性担体の新規合成法の開発に取り組んだ。その過程に分子前駆体を用いた直接的かつ簡便で選択的なゼオライト合成に世界で初めて成功した。以上の成果は、今後多孔性担体及び分子性触媒との複合化によるシングルサイト触媒とそれを用いた反応開発を展開できる礎になると期待できる。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① Molecular Insights into the Ligand-Based Six-Proton and -Electron Transfer Processes Between Tris-ortho-Phenylenediamines and Tris-ortho-Benzoquinodiimines  
Takeshi Matsumoto, Risa Yamamoto, Masanori Wakizaka, Akinobu Nakada, Ho-Chol Chang  
*Chem. -Eur. J.*, 2020, in press (10.1002/chem.202001873).
- ② Impact of Group 10 Metals on the Solvent-induced Disproportionation of o-Semiquinonato Complexes  
Shota Yamada, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang  
*Chem. -Eur. J.*, 2019, **25**, 8268-8278.
- ③ Photo-controllable rotational motion of cholesteric liquid crystalline droplets in a dispersion system  
Y. Sakai, W. Y. Sohn and K. Katayama  
*RSC Adv.*, 2020, **10**, 21191-21197.
- ④ Cooperative effects of surface and interface treatments in a hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) photo-anode on its photo-electrochemical performance

M. Inaba, K. Katayama and W. Y. Sohn

*Sustain. Energy Fuels*, 2020, **4**, 2174-2183.

- ⑤Molecular Orientation Change Nearby Topological Defects Observed by Photo-Induced Polarization/Phase Microscopy  
H. Sakanoue, W. Y. Sohn and K. Katayama  
*ACS Omega*, 2019, **4**, 13936-13942.
- ⑥Optical motion control of liquid crystalline droplets by host-guest molecular interaction  
Y. Sakai, W. Y. Sohn and K. Katayama  
*Soft Matter*, 2019, **15**, 7159-7165.
- ⑦An initial estimation method using cosine similarity for multivariate curve resolution: application to NMR spectra of chemical mixtures  
Y. Nagai, W. Y. Sohn and K. Katayama  
*Analyst*, 2019, **144**, 5986-5995.
- ⑧Lifetime mapping of photo-excited charge carriers by the transient grating imaging technique for nano-particulate semiconductor films  
M. Ebihara, W. Y. Sohn and K. Katayama  
*Rev. Sci. Instrum.*, 2019, **90**, 073905.
- ⑨Uncovering Photo-Excited Charge Carrier Dynamics in Hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Hidden in the Nanosecond Range by the Heterodyne Transient Grating Technique Combined with the Randomly Interleaved Pulse-Train Method  
W. Y. Sohn, M. Inaba, T. Tokubuchi, J. E. Thorne, D. Wang and K. Katayama  
*J. Phys. Chem. C*, 2019, **123**, 6693-6700.
- ⑩Origin of optical nonlinearity of photo-responsive liquid crystals revealed by transient grating imaging  
K. Katayama, D. Kato, K.-I. Nagasaka, M. Miyagawa, W. Y. Sohn and K.-W. Lee  
*Sci. Rep.*, 2019, **9**, 5754.
- ⑪Electrochemical interfacing of Prussian blue nanocrystals with an ITO electrode modified with a thin film containing a Ru complex  
H. Sato, M. Ide, R. Saito, T. Togashi, K. Kanaizuka, M. Kurihara, H. Nishihara, H. Ozawa and M. Haga  
*J. Mater. Chem. C*, 2019, **7**, 12491-12501 (Inside Cover)
- ⑫Mie Resonance-Enhanced Light Absorption of FeS<sub>2</sub> Nanocubes in a Near-Infrared Region: Intraparticulate Synergy between Electronic Absorption and Mie Resonances  
K. Sugawa, M. Matsubara, H. Tahara, D. Kanai, J. Honda, J. Yokoyama, K. Kanakubo, H. Ozawa, Y. Watanuki, Y. Kojima, N. Nishimiya, T. Sagara, K. Takase, M. Haga, and J. Otsuki  
*ACS Appl. Energy Mater.*, 2019, **2**(9), 6472-6483
- ⑬A Peanut - Shaped Polyaromatic Capsule: Solvent - Dependent Transformation and Electronic Properties of a Non - Contacted Fullerene Dimer  
K. Matsumoto, S. Kusaba, Y. Tanaka, Y. Sei, M. Akita, K. Aritani, M. Haga, M. Yoshizawa  
*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, **58**, 8463-8467
- ⑭Synthesis, X-ray structure, photophysical properties, and theoretical studies of six-membered cyclometalated iridium (III) complexes: revisiting Ir(pnbi)<sub>2</sub>(acac)  
K. Yamada, H. Mori, T. Sugaya, M. Tadokoro, J. Maeba, K. Nozaki, M. Haga  
*Dalton Trans.*, 2019, **48**(40), 15212-15219
- (2) 口頭発表
- ①H.-C. Chang, New Challenges in the Molecular Functional Chemistry of Redox-active Ligands, 12th China-Japan Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, 2019.10.25-28. China (Invited talk).

- ②H.-C. Chang, New Challenges in the Molecular Functional Chemistry of Redox-active Ligands, China-Japan Symposium of Functional Coordination Chemistry, 2019.4.11-14. China (Invited talk).
- ③H.-C. Chang, Molecular lattice engineering for valence tautomerism, 錯体化学会第69回討論会, 2019.9.18-20. 名古屋 (Invited talk).
- ④A. Nakada, Photochemical H<sub>2</sub> Evolution and CO<sub>2</sub> Fixation Using an ortho-Phenylenediamine Fe(II) Complex, 7th Asian Conference on Coordination Chemistry, 2019.10.15-18. Malaysia (Invited talk).
- ⑤小池 翔太、松本 剛、中田 明伸、張 浩徹、2-アミノフェノラート錯体によるメタノールの光脱水素化に対する軸配位子効果、第69回錯体化学討論会 名古屋・2019/9/21-23
- ⑥Kenji Katayama, A New Microscopy for Charge Carrier Mapping of Photocatalytic Materials, International Symposium on Materials Chemistry for Sustainable Energy Mar, 2020, Tokyo, Japan
- ⑦Kenji Katayama, Phase Transition Dynamics of Liquid Crystals Observed by Pattern-Illumination Phase Imaging, Optics of Liquid Crystals 2019, Sep, 2019, Quebec city, Canada
- ⑧Kenji Katayama, Photo-induced charge dynamics in photo-devices -sphotocatalysis, water splitting, solar cells, Chemistry Lecture at McMaster University, Sep, 2019, Hamilton, Canada
- ⑨Kenji Katayama, Direct imaging of phase transition of liquid crystals by nanosecond time-resolved transient grating phase imaging, SPIE Liquid Crystals XXIII, Aug, 2019, San Diego, USA
- ⑩Kenji Katayama, Photo-induced charge dynamics in photo-devices -solar cell, photocatalysis, water splitting, Chemistry Seminar at San Diego State University, Aug, 2019, San Diego, USA
- ⑪Kenji Katayama, Photo-controllable active liquid crystalline droplet, The 23th International Symposium on Advanced Display Material and Devices (ADMD), Jul, 2019, Guangzhou, China
- ⑫Kenji Katayama, Photo-induced charge dynamics in photo-devices -solar cell, photocatalysis, water splitting, Physics Seminar at Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Science, Jul, 2019, Shenzhen, China
- ⑬Kenji Katayama, Photo-controllable active liquid crystalline droplet, The 40th PIERS Jun, 2019, Roma, Italy
- ⑭Masa-aki Haga, Electrochemical Functions of Surface Coordination Network Films on ITO Electrode, 24th International Society of Electrochemistry Topical Meeting 2019 "Electrochemical Assembling at the Meso, Nano and Molecular Scale", 10 April, 2019 Merida, Mexico
- ⑮Masa-aki Haga, Coordination Chemical Approach to Molecular Functional Devices on Surface, Lecture Series at Beijing Normal University, June, 2019, Beijing, China, June 11, 2019
- ⑯Masa-aki Haga, Luminescent Cyclometalated Ir Complexes, Lecture Series at Beijing Normal University, June, 2019, Beijing, China, June 18, 2019
- ⑰Masa-aki Haga, Luminescent Cyclometalated Ir Complexes, Lecture Series at Beijing Normal University, Development of Scalable Coordination Network Films Based on Ruthenium Complexes Toward Energy Storage Devices, June 22, 2019
- ⑱Masa-aki Haga, Development of Coordination Network Films on an ITO Electrode: Heterojunction and Electrochemical Interfacing, Chemistry Lecture at Institute of Chemistry Chinese Academy of Sciences, Beijing China, June 18, 2019
- ⑲Masa-aki Haga, Molecular Functions of Surface Network Films based on Ru Complexes on ITO Electrode, Chemistry Lecture at Xiamen University, Xiamen, China, June 20, 2019
- ⑳Masa-aki Haga, Electrochemical interfacing with Prussian blue nanocrystals through

redox-active Ru complex on an ITO electrode, The 17th International Symposium on Electroanalytical Chemistry & the 3rd International Meeting on Electrogenerated Chemiluminescence, 25 August 2019. Changchun, China

②芳賀正明、表面錯体ナノ化学の機能創成、Surface coordination nanochemistry based on functional metal complexes、錯体化学会第69回討論会学会賞受賞講演, 9月22日, 2019 名古屋大

(3) 出版物

①Kenji Katayama and Woon Yong Sohn, Unconventional Liquid Crystals and their Applications, edited by Wei Lee and Sandeep Kumar, Chapter 6, Time-resolved dynamics of dye-doped liquid crystals and the origin of their optical nonlinearity

学 校 名	帝 京 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と 先天性代謝異常症への応用		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①ゲノム編集 ②メタボローム ③スフィンゴ脂質 ④高速液体クロマトグラフィー質量分析系(LC-MS) ⑤極長鎖脂肪酸 ⑥副腎白質ジストロフィー(X-ALD) ⑦新生児マススクリーニング		

## ○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
濱 弘 太 郎	薬 学 部	准 教 授	実験・データ整理・論文作製

## ○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 原 優 子	薬 学 部	助 教	実験・データ整理・論文作製
林 康 広	薬 学 部	助 教	実験・データ整理・論文作製
横 山 和 明	薬 学 部	教 授	データ整理・論文作製
山 下 純	薬 学 部	教 授	データ整理・論文作製

# スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と 先天性代謝異常症への応用

## 1. 研究の目的

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド長鎖塩基と脂肪酸からなるセラミドに、ホスホリルコリンや糖鎖等の極性頭部が結合した構造をとり、脂肪酸と極性頭部が多様であることから、様々な分子種が存在する。しかし個体が多様なスフィンゴ脂質を有する意義は不明な点が多い。各スフィンゴ脂質分子種の機能を明らかにする為には、各分子種の産生・代謝経路を正確に理解する必要がある。本研究では、ゲノム編集技術を用いてスフィンゴ脂質代謝を担う酵素類の細胞内における基質特異性を解析し、また、高速液体クロマトグラフィー質量分析系（LC-MS）によるメタローム解析を用いた各スフィンゴ脂質分子種の網羅的分析方法を確立することにより、スフィンゴ脂質の新しい生物学的機能を解明する。

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：スフィンゴ脂質は、リン脂質等の他の複合脂質と比較して、炭素数が24以上の極長鎖脂肪酸を含む割合が高い。申請者は、極長鎖脂肪酸の一定量がスフィンゴ脂質の一部として組み込まれる過程に注目し、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の過剰な蓄積によって生じる生体の恒常性維持機構への影響を解析する。具体的には、ゲノム編集技術を用いて極長鎖脂肪酸をスフィンゴ脂質等に組み込む酵素群をノックアウトした培養細胞を樹立し、そこに極長鎖脂肪酸を添加して細胞内極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質を変動させることにより、その細胞生物学的意義を解明する。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：副腎白質ジストロフィーは、極長鎖脂肪酸の蓄積を生化学的な主徴とする先天性代謝異常疾患で、約2万人に1人の頻度である。現時点で唯一の治療法は造血幹細胞移植であり、脱髄症状等を抑制する為には早期の移植が必須となる。しかし、診断基準である血中の極長鎖脂肪酸値の測定方法は煩雑であり、新生児マススクリーニングに適用することが困難である。多くの臓器においてスフィンゴミエリン(SM)は最も含有量の多いスフィンゴ脂質であり、かつイオン化が容易なホスホリルコリンを有していることから、LC-MSによる高感度分析が期待できる。そこで申請者は、新生児マススクリーニングに適用可能な極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリン分子種の簡便な測定系を開発する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ糖脂質の主要な産生・代謝酵素は同定されているが、各スフィンゴ糖脂質量の制御機構についての解析はほとんどされていない。申請者はLC-MSを用いて、スフィンゴ糖脂質のクラスごと、分子種ごとの定量系の確立をし、生体サンプル中のスフィンゴ糖脂質の網羅的解析を行う。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：SMとスフィンゴ糖脂質は、共通の基質であるセラミドにホスホリルコリンかグルコースのいずれかが結合することで産生される。一方、SMとスフィンゴ糖脂質は機能的に大きく異なることから、両脂質をどの程度のバランスで産生するかは、各々の細胞および臓器の恒常性維持において重要と思われる。申請者はSMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分けを担う二つの酵素（SM合成酵素とセラミドグルコシルトランスフェラーゼ）に注目し、詳細な産生制御機構を解明する。

## 2. 研究の計画

本研究では以下4つの計画に従って行われた。

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：細胞内の極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質量を減少させる細胞を作出する。特に、極長鎖脂肪酸を様々な複合脂質に導入する酵素群に着目する。申請者はゲノム編集技術を用いてこれらの酵素群に関する単独もしくは複数同時欠損体を作成する。加えて本年度は、X-ALD病態発症における極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の病理的意義を解析する為の実験系を構築する。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：濾紙血を用いて、夾雑物から目的の極長鎖脂肪酸含有SM分子種を分離検出する

条件を検討する。超微量噴霧法の専用機器を用いた検討過程において、試料中の大量のホスファチジルコリンが原因と考えられるイオン化抑制効果が見られた。そこで、試料をアルカリ処理することでホスファチジルコリンを加水分解し、脱塩処理することでイオン化抑制効果を克服することができるか検証する。

- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ糖脂質は多様な構成脂肪酸、およびスフィンゴイド長鎖塩基のため、脂質部分も考慮した糖脂質の構造や機能解析は、高速液体クロマトグラフィー-質量分析系で通常用いられる疎水性カラムによる分離は困難である。申請者は、糖鎖構造の立体構造の差異に注目し、キラルカラムを用いて各分子種を分離、測定する系を確立する。さらに、確立した測定系を用いて、生体サンプルから抽出した総脂質画分中の中性および酸性スフィンゴ糖脂質の網羅的な分子種解析を行う。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：本研究に係る昨年度までの研究によって、SM合成酵素は様々なタンパク質と相互作用することで、その機能を調節している可能性が示された。そこで、近位依存性ビオチン標識法を用いて、SM合成酵素の近接タンパク質を網羅的に同定する。

### 3. 研究の成果

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：ゲノム編集技術を用いて副腎白質ジストロフィー（X-ALD）の原因遺伝子である ABCD1 遺伝子のノックアウト（KO）細胞株を確立し、極長鎖脂肪酸を含有する脂質分子種が増加することを確認した。このKO細胞株に対して、幾つかの脂肪酸転移酵素の機能を、ゲノム編集技術を用いて更に欠損させることで、極長鎖脂肪酸含有脂質代謝への寄与を検証した結果、極長鎖脂肪酸含有リン脂質量の変動に関与する候補遺伝子を見出した。また、極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質量を変動する化合物を探索した結果、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor（PPAR）作動薬が極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質を有意に増加させることを見出した。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：メタノールを用いて濾紙血から極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリンを効率良く回収可能であることを確認した。しかし、試料中の大量のホスファチジルコリン等の夾雑物が原因と考えられるイオン化抑制効果の為、当初予定したインフュージョン法では十分な検出感度が得られず、試料のアルカリ処理などによって改善を試みたが、安定的な抽出効率が得られなかった。そこで新たに、ポリエーテルエーテルケトン樹脂でカラム内壁を処理した HPLC カラムを用いることで、夾雑物を排除し、かつHPLC カラムとSMの非特異的な吸着を抑制する高感度な分析系を構築した。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：マウス脳から抽出した総脂質画分を用いて網羅的解析を行った結果、多量のリン脂質存在下で中性、および酸性のスフィンゴ糖脂質の検出が可能であることがわかった。また各種スフィンゴ糖脂質の脂肪酸プロファイルを解析したところ、糖脂質系列によりセラミド部分の比率が異なっていることが示唆された。さらに、構成スフィンゴイド長鎖塩基を解析したところ、動物組織で広く存在するC18長鎖脂肪酸を持つスフィンゴイド長鎖塩基(d18:1)以外に、C20長鎖脂肪酸を持つスフィンゴイド長鎖塩基(d20:1)も検出された。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：大腸菌由来ビオチンリガーゼTurboと融合するSM合成酵素のキメラタンパク質を安定発現するヒト由来のHEK293T細胞を樹立した。共焦点顕微鏡で細胞内局在を調べたところ、全てのキメラタンパク質が野生型と同様の局在を示した。細胞をビオチン含有培地で培養し、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで回収し、溶出タンパク質をOrbitrap LC-MS/MSを用いて解析し、SM合成酵素と近接する約800個のタンパク質を同定した。

#### 4. 研究の反省・考察

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明: 極長鎖脂肪酸代謝に関与する候補分子について、*in vitro* の酵素学的解析を行うことで、基質特異性を詳細に検証する。その為に、様々な基質を用いる必要があるが、商業的に得られる基質は限られていることから、必要に応じて有機化学的に基質を合成する。一方、極長鎖脂肪酸を含有するスフィンゴ脂質の産生・代謝の異常が、X-ALDの病態の進展においてどのように寄与するかを検証するためには、X-ALDの病態を反映する評価系が必要である。X-ALDの原因遺伝子である ABCD1 のノックアウトマウスは脱髄等が見られず、X-ALD の病態モデルとして不十分な要素がある。そこで申請者は、ヒトオリゴデンドロサイト、ヒトミクログリア、ヒト副腎皮質細胞等の培養細胞株を用いた *in vitro* の X-ALD 評価系の構築を目指す。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発: ポリエーテルエーテルケトン樹脂でカラム内壁を処理した HPLC カラムを用いた方法は、インフュージョン法に比べて一検体あたりの測定時間が長い。このため、安定的な測定結果を得る為に必要な、最小の測定時間を検証する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立: キラルカラム使用時の各スフィンゴ糖脂質分子種の溶出時間の決定が今後の課題である。その為に、グルコシルトランスフェラーゼをノックアウトすることでスフィンゴ糖脂質が減少した細胞を用いて、これと親細胞株とを比較することで、スフィンゴ糖脂質特異的なシグナルを効率良く検出し、スフィンゴ糖脂質の溶出時間決定に用いる。また、スフィンゴ糖脂質に含まれる脂肪酸には、水酸基が結合したものも存在することが分かっている。これらの分子種についても溶出時間を決定し、生体サンプル中における網羅的解析を行う必要がある。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明: 本年度の研究によって、SM 合成酵素に近接する約800個のタンパク質を同定した。今後は、同定した近接タンパク質の中からSM合成酵素の酵素活性、および細胞内局在に影響するタンパク質を探索し、SM合成酵素の制御機構の全貌を明らかにする必要がある。さらに、SM合成酵素のみならず、スフィンゴ糖脂質の合成酵素であるセラミドグルコシルトランスフェラーゼの近接タンパク質も同定し、詳細なSMとスフィンゴ糖脂質の産生制御機構の解明を目指す。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① Hama K\*, Fujiwara Y, Takashima S, Hayashi Y, Yamashita A, Shimozawa N, Yokoyama K. Hexacosenoyl-CoA is the most abundant very long-chain acyl-CoA in ATP-binding cassette transporter D1-deficient cells. *J Lipid Res*, 61(4):523-536, 2020 (\*corresponding author)
- ② Fujiwara Y\*, Hama K, Yokoyama K. Mass spectrometry in combination with a chiral column and multichannel-MRM allows comprehensive analysis of glycosphingolipid molecular species from mouse brain. *Carbohydr Res*, 490:107959, 2020 (\*corresponding author)
- ③ Murakami C, Hoshino F, Sakai H, Hayashi Y, Yamashita A, Sakane F. Diacylglycerol kinase  $\delta$  and sphingomyelin synthase-related protein functionally interact via their sterile  $\alpha$  motif domains. *J Biol Chem*, 295(10):2932-2947, 2020
- ④ Karasawa K, Tanigawa K, Harada A, Yamashita A. Transcriptional Regulation of Acyl-CoA:Glycerol-*sn*-3-Phosphate Acyltransferases. *Int J Mol Sci*:20(4):964, 2019
- ⑤ 林 康広, スフィンゴミエリン合成酵素のホモおよびヘテロ複合体の解析. 生化学会誌ミニレビュー 91(4) 523-528, 2019

(2) 口頭発表

- ① 林 康広 「スフィンゴミエリン合成酵素のホモ・ヘテロ複合体の機能解析」  
第63回日本薬学会 関東支部大会 若手シンポジウム「最先端の若手脂質研究」  
(招待講演)、東京、2019年9月14日
- ② 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明 「BezafibrateはABCD1欠損条件下において極長鎖脂肪酸CoAを上昇させる」第61回日本脂質生化学会、札幌、2019年7月
- ③ 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明 「キラルカラムを用いたLC-MS法によるスフィンゴ糖脂質一斉分析系の構築」第38回日本糖質学会、名古屋、2019年8月
- ④ 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明 「キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質一斉分析系によるヒドロキシ脂肪酸分子種の解析」第38回日本糖質学会、名古屋、2019年8月
- ⑤ 濱弘太郎、藤原優子、高島茂雄、下澤伸行、横山和明 「Lorenzo's oilとBezafibrateの極長鎖脂肪酸脂肪酸CoAに対する影響」第61回日本先天代謝異常学会、秋田、2019年10月
- ⑥ 藤原 優子、濱 弘太郎、横山 和明 「キラルカラムを用いたスフィンゴ糖脂質のLC-MS一斉分析系によるマウス脳解析」第61回日本先天代謝異常学会、秋田、2019年10月

(3) 出版物

- ① Hama K\*, Fujiwara Y, Yokoyama K., 'Lipidomics of peroxisomal disorders' *In* Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease, Eds Imanaka T. Shimozawa N. Springer, 2019  
(\*corresponding author)
- ② 林 康広, セラミド研究の新展開-基礎から応用へ  
(担当:分担執筆, 範囲:ヒト免疫不全ウイルスとスフィンゴミエリン合成酵素)  
セラミド研究会編, 食品化学新聞社 2019

学 校 名	光産業創成大学院大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動いている生体分子1分子の高時間分解能蛍光検出 一定常蛍光検出と蛍光寿命測定一		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①1分子計測 ②高時間分解能蛍光検出 ③ナノバイオサイエンス ④生体分子の動態			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
横 田 浩 章	光産業創成研究科	准 教 授	研究代表者 総括・実験・データ処理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 野 美 奈 子	光産業創成研究科	講 師	実験・データ処理・論文作成
井 出 徹	岡山大学大学院・ ヘルスシステム統合科学研究科	教 授	実験・論文作成
瀧 口 義 浩	光産業創成研究科	教 授	実験・論文作成

# 動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出 — 一定常蛍光検出と蛍光寿命測定 —

## 1. 研究の目的

### (1) 本研究の背景

生命科学の研究現場において生体分子を生きたままイメージングできる蛍光顕微鏡はなくてはならないツールとなっている。とりわけ、蛍光標識した生体分子 1 分子を実時間で直視できる蛍光 1 分子検出技術は、個々の生体分子の運動・相互作用・構造変化などのダイナミクスを集団平均することなく実時間で観察できる強力な蛍光顕微鏡法である。生体内で通常動き回って機能している生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出が、そのダイナミクスや関連する生命現象の生体分子間相互作用の機序を理解する上で重要であるにもかかわらず、光検出器の性能上の制約から、同一の動いている生体分子 1 分子の継続した高時間分解能蛍光検出の報告はない。蛍光 1 分子検出によく使われる電子増倍型 CCD (EMCCD) は広視野観察ができるが時間分解能は数 ms に制限される。一方、それ以上の高時間分解能検出が可能であるアバランシェホトダイオード (APD) は受光面が小さいため広視野観察はできない。

そこで我々は広視野高時間分解能蛍光 1 分子検出が可能な HPD を用いて研究を行っている。HPD は APD と同等の高い時間分解能の特長をもちながら、CCD なみの広い受光面をもつ。HPD は光電子増倍管にまさる光検出器として高エネルギー物理学の研究用に開発されたため、生命科学の分野ではほとんど知られていない。

### (2) 本研究の目的

本研究では、ハイブリッドホトディテクタ (HPD) と呼ばれる微弱光検出器を用いて生命機能で重要な役割を果たしている動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出を達成することを目的とした。この蛍光検出から対象とする生体分子の運動様式や構造変化を解き明かしたい。

#### ① 本研究で対象とする蛍光検出技術

蛍光検出技術はその励起光の性質によって連続した励起光を用いる定常蛍光検出とパルス状の励起光を用いる時間分解蛍光検出に大別される。従来の蛍光 1 分子検出のほとんどは定常蛍光検出である。本研究では、時間分解蛍光測定光学系を構築し、蛍光寿命測定にも取り組む。研究期間である3年間で以下の系を構築する。

ア 偏光2成分同時時間分解蛍光検出系

イ 蛍光2色同時時間分解蛍光検出系

#### ② 本研究で対象とする動く生体分子

ア 2次元自由拡散する脂質

イ ミオシン上で滑走するアクチンフィラメント

ウ DNA上で運動するDNA修復タンパク質

#### ③ 本研究で用いる蛍光プローブ

ア 蛍光色素

イ 半導体超微粒子 (Qdot)

ウ 蛍光ダイヤモンドナノ粒子

### (3) 本研究から期待できる波及効果

本研究で行う動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出は、さまざまな生体分子への適用が想定できる。本研究は、蛍光 1 分子検出系の高度化と生体分子のダイナミクスの解明に貢献し、様々な病態の発現機構などの分子レベルでの理解に通じる。

## 2. 研究の計画

2019年度は動いている蛍光標識した生体分子1分子の定常・時間分解蛍光検出を、より高精度な蛍光2色同時検出・蛍光偏光2成分同時検出系も用いて行う。

(1) 蛍光2色同時検出・蛍光偏光2成分同時検出系を用いた定常・時間分解蛍光検出

① 蛍光2色同時検出による動く生体分子1分子の構造変化の検出

ミオシン上で滑走する、ドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチンフィラメントに対して蛍光2色同時検出を行う。そして、蛍光色素の蛍光強度や蛍光寿命から1分子FRET効率を見積もり構造変化の検出を試みる。

② 蛍光偏光2成分同時検出による動く生体分子1分子の配向の検出

蛍光標識した動いている脂質とタンパク質1分子に対して、蛍光偏光2成分同時検出を行い分子の配向変化の検出を試みる。

## 3. 研究の成果

(1) 周囲環境の定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出

① pH感受性蛍光色素標識Qdotの蛍光寿命変化測定

pH感受性蛍光色素を標識したQdotの蛍光寿命測定を継続した。そして、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用して、pH変化をドナーであるQdot1分子の蛍光寿命変化として検出した。個々のQdotの蛍光寿命変化のばらつきの定量を試みた。また蛍光分光光度計によってpH変化をQdotの蛍光強度変化としてもとらえた。

② 温度変化系による蛍光プローブの定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出

平成30年度に導入した顕微鏡ステージの温度変化系を用いて、定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出によって、Qdot、蛍光ダイヤモンドナノ粒子に対して蛍光強度、蛍光寿命の温度変化をとらえることを試みた。

(2) 蛍光2色同時検出・蛍光偏光2成分同時検出系を用いた定常・時間分解蛍光検出

① 蛍光2色同時検出による動く生体分子1分子の構造変化の検出

ミオシン上で滑走する、ドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチンフィラメントに対して蛍光2色同時検出を行った。

(3) 蛍光偏光2成分同時検出系を用いた動いている生体分子1分子の定常蛍光検出・時間分解蛍光検出

① 2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光強度測定.

平成30年度に構築した蛍光偏光2成分同時検出系を用いて、2次元自由拡散を行う脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光強度測定を行った(図1)。

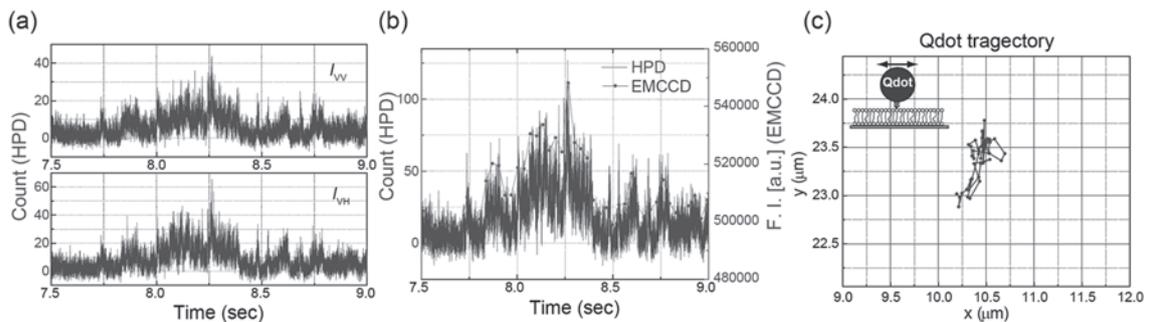


図1: 平面上を2次元自由拡散する脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光強度の同時測定。(a) HPDによるQdotの蛍光偏光2成分の蛍光強度の時間変化の同時測定。(b) Qdotの蛍光偏光2成分強度から得られた総蛍光強度(HPD)とEMCCDで蛍光像から得られた蛍光強度の時間変化同時測定。(c) Qdotの軌跡(EMCCD)。

## ②2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光寿命測定

また蛍光偏光2成分同時検出系を用いて、2次元自由拡散を行う脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光寿命測定（図2）を行った。

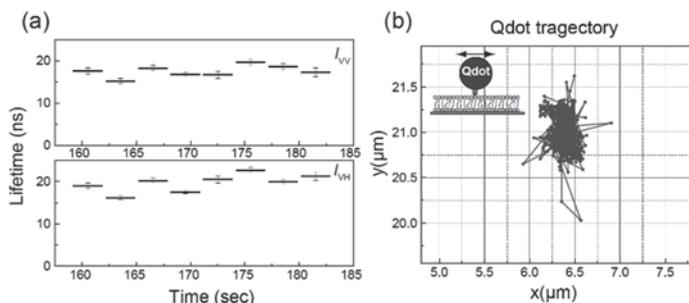


図2：平面上を2次元自由拡散する脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光寿命の同時測定。(a) HPDによるQdotの蛍光偏光2成分の蛍光寿命の時間変化の同時測定。(b)Qdotの軌跡(EMCCD)。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 周囲環境の定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出

#### ①pH感受性蛍光色素標識Qdotの蛍光寿命変化測定

pH感受性蛍光色素の標識、無標識にかかわらずQdot1分子の蛍光寿命がばらつきを見だし、そのばらつき具合を定量化した。またpH感受性蛍光色素の標識Qdot1分子については、pH変化による蛍光寿命変化量にもばらつきがあることを見いだしている。これらのばらつき具合を定量化し、pH変化を蛍光寿命によってより高精度に検知できるようにしていきたい。また蛍光分光光度計によって明らかとなったpH変化によるQdotの蛍光強度変化をQdot1分子の蛍光強度変化としてとらえられるようにしたい。

#### ②温度変化系による蛍光プローブの定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出

Qdot、蛍光ダイヤモンドナノ粒子に対して蛍光強度、蛍光寿命の温度変化をとらえることを試みた。これらに関するデータはほとんど報告されていないため、研究を継続し温度依存性を定量化したい。

### (2) 蛍光2色同時検出・蛍光偏光2成分同時検出系を用いた定常・時間分解蛍光検出

ミオシン上で滑走する、ドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチンフィラメントに対して蛍光2色同時検出を行った。視野中にドナー・アクセプター蛍光色素で蛍光標識したアクチン1分子のみが存在する状態を作るのが簡単ではなかった。今後はドナー・アクセプター蛍光色素の蛍光強度とドナーの蛍光寿命からアクチンの構造変化を検出したい。

### (3) 蛍光偏光2成分同時検出系を用いた動いている生体分子1分子の定常蛍光検出・時間分解蛍光検出

2次元自由拡散を行う脂質分子に標識したQdot1分子の蛍光偏光2成分の蛍光強度測定（定常蛍光検出）および蛍光寿命測定（時間分解蛍光検出）が行えることを実証した。今後は蛍光異方性が大きい蛍光プローブを用いて、生体分子の配向変化の高時間分解能検出を行う。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

①横田浩章：生体分子1分子の蛍光イメージング～DNA結合タンパク質の1分子直視～ 第16回バイオオプティクス研究会 山口大学（山口市）2019年12月（招待講演）

②Yokota, H.: 大腸菌非六量体型DNAヘリカーゼUvrD C末端欠損変異体の1分子イメージング 第57回日本生物物理学会年会 熊本大学（宮崎市）2019年9月

### (3) 出版物

①Yokota, H.: DNA unwinding dynamics of *Escherichia coli* UvrD lacking the C-terminal 40 amino acids *Biophysical Journal* 118(7) 1634-1648 (2020).

②Yokota, H.: Fluorescence microscopy for visualizing single-molecule protein dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1864(2) 129362 (2020).

学 校 名	名 城 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	革新的合成戦略による海洋創薬分子の合成研究 —ポリ環状エーテル海産毒ギムノシン-Bの合成—		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①オキシラニルアニオン ②ポリ環状エーテル ③ギムノシン-B ④合成 ⑤ギ渦鞭毛藻 ⑥赤潮		

## ○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 裕 二	総 合 学 術 研 究 科	教 授	総括

## ○研究分担者

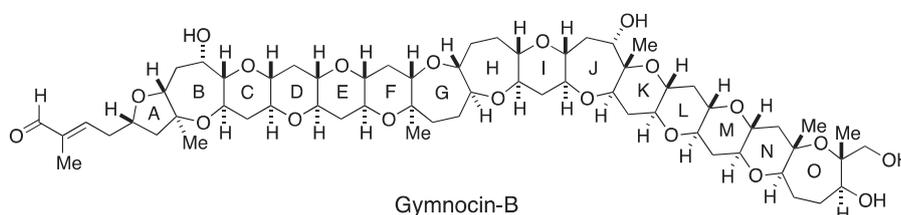
氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 井 健 男	薬 学 部	准 教 授	実験・論文作成

# 革新的合成戦略による海洋創薬分子の合成研究 —ポリ環状エーテル海産毒ギムノシン-Bの合成—

## 1. 研究の目的

(1) 海洋生物由来の天然物は特異な化合物の宝庫である。進化の過程で生存競争というふるいに掛けられて「最適化された構造と機能」を獲得し、人知を越えた新奇な化学構造と強力な生物活性を持つものが数多く存在し、これまでに多くの医薬素材や生化学用試薬となる有用物質が見出されてきた。ギムノシン-Bは、瀬戸内海を中心として西日本で赤潮を形成し、魚貝類の大量斃死を引き起こす代表的な有毒渦鞭毛藻*Karenia mikimotoi*から単離されたポリ環状エーテルである。14個のエーテル環が連続的に縮環した巨大構造を持つことから合成化学的に興味を持たれている。ギムノシン-Bはマウスリンパ腫細胞に対して細胞毒性(IC<sub>50</sub>=1.7 µg/mL)を示すことから、海産創薬シーズ分子として期待される。

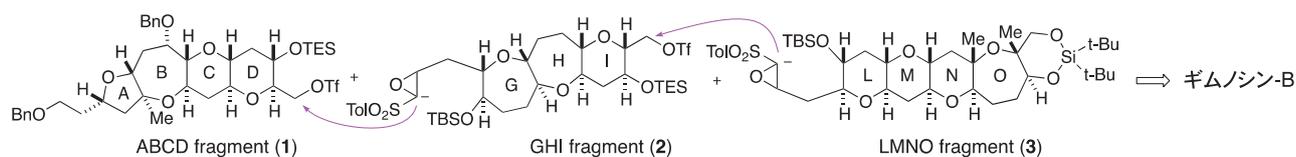
- ①本研究では、ギムノシン-Bを効率的に合成するために収束合成法を反復的に用いる合成戦略を確立する。
- ②上記合成戦略基盤としたギムノシン-Bの全合成研究を行う。



## 2. 研究の計画

(1) 研究代表者はこれまでにオキシラニルアニオン法を基盤とする[X+2+Y]型新規収束合成法を開発しており、この合成戦略を繰り返し用いることによって縮環システムを統一的手法によって構築し、ギムノシン-Bの効率的な全合成を目指す。

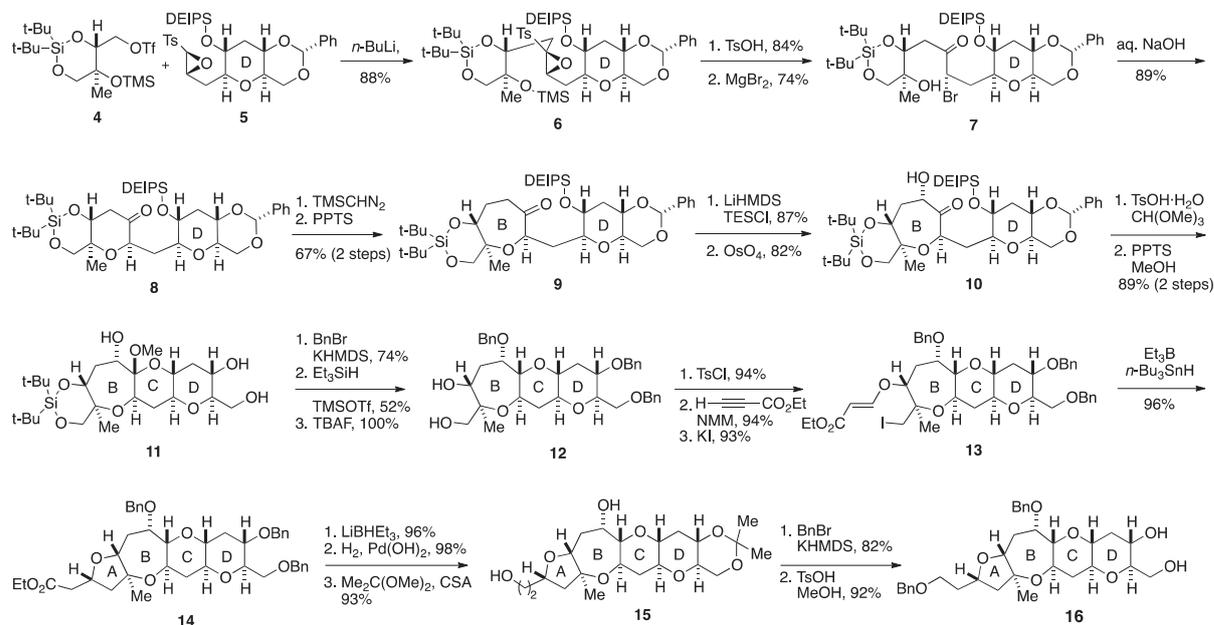
- ①ギムノシン-Bのフラグメント合成：全合成に必要な三種類のABCD環、GHI環、LMNO環フラグメントを合成する。
- ②ギムノシン-B全合成：はじめにGHI環フラグメント(2)とLMNO環フラグメント(3)からGHIJKLMNO環を構築後、ABDC環フラグメント(1)を結合してギムノシン-Bの全合成を行う。



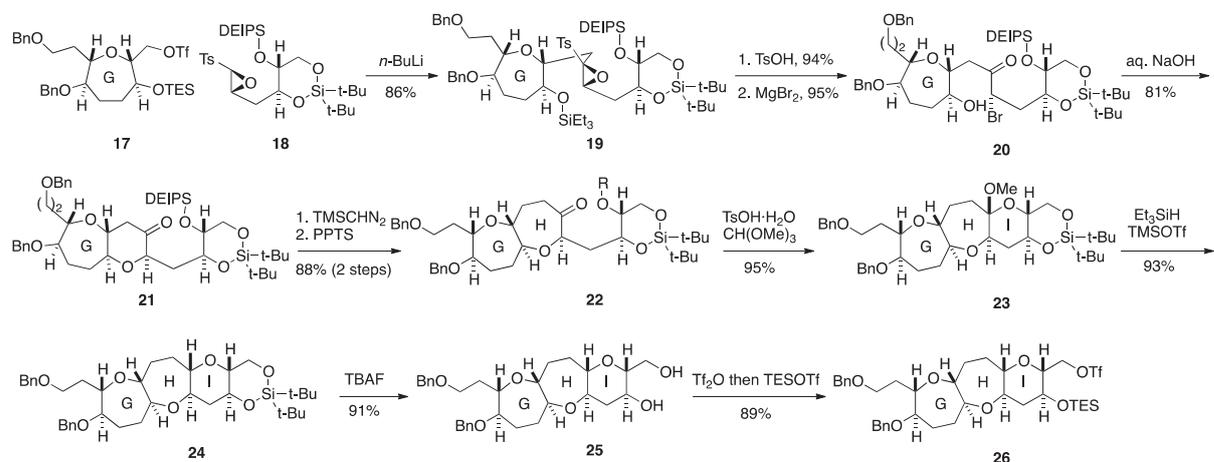
## 3. 研究の成果

(1) ギムノシン-Bのフラグメント合成

①ABCD環フラグメント(1)の合成：トリフレート4とD環エポキシスルホン5をカップリングして6を合成し、MgBr<sub>2</sub>との反応によって得られるプロモケトン7をNaOHで環化して6員環ケトン8を得た。これを環拡大して7員環ケトン9とし、シリルエノールエーテルに誘導後OsO<sub>4</sub>で酸化してヒドロキシケトン10を合成した。アセタール環化と保護基の着脱によりBCD環ジオール12を合成した。選択的トシル化したのち不飽和エステルを導入、ヨウ素化により13に変換し、ラジカル環化反応、エステルの還元、ベンジル化、脱アセトニド化反応を経てABCD環フラグメント(1)の前駆体であるジオール体16を合成することができた。



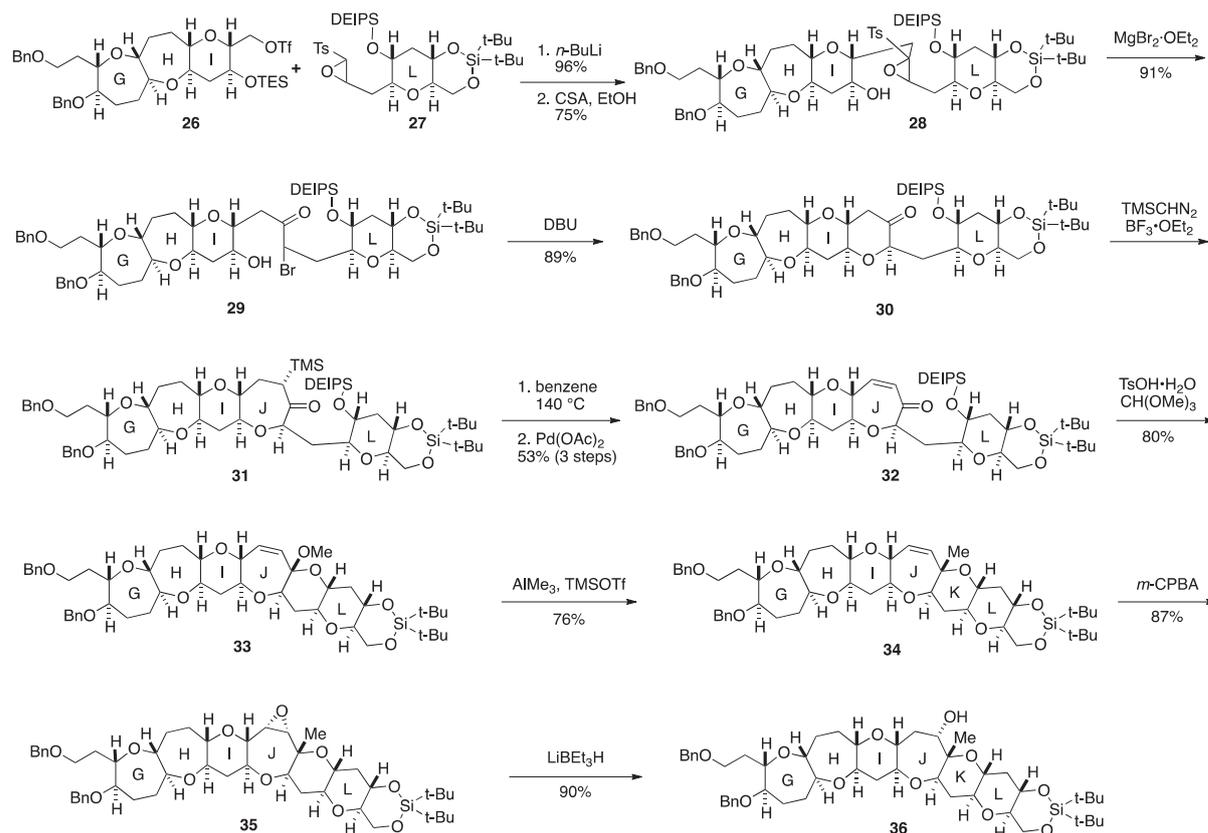
②GHI環フラグメント(2)の合成: G環トリフラート**17**とエポキシスルホン**18**をオキシラニルアニオン法でカップリングして**19**を合成した。酸処理後、 $\text{MgBr}_2$ を作用させてプロモケトン**20**とし、 $\text{NaOH}$ によるエーテル環化で6員環ケトン**21**を構築した。トリメチルシリルジアゾメタンで7員環に環拡大してGH環ケトン**22**に変換後、環状アセタール化と還元的エーテル化、脱シリレン化、トリフラート化反応によりGHI環フラグメント(2)の前駆体**26**を合成した。



## (2) 6環性GHIJKLフラグメント合成

①GHI環フラグメントとL環フラグメントの連結によるIJ環構築法の確立: GHI環フラグメント前駆体**26**とL環エポキシスルホン**27**をオキシラニルアニオン法で反応させ、カンファースルホン酸(CSA)で脱トリエチルシリル化すると、高収率でカップリング体**28**が得られた。 $\text{MgBr}_2$ を反応させてプロモケトン**29**に誘導後、塩基DBUで処理すると、分子内エーテル環化反応が進行し、6員環エーテル**30**が立体選択的に構築された。ついで、 $\text{BF}_3$ 存在下トリメチルシリルジアゾメタンを反応させると、環拡大反応が進行し7員環エーテル**31**が生成し、これを精製することなく、ベンゼン中で加熱するとBrook転位反応が起こり、シリルエノールエーテルが生成し、これを直ちに三枝酸化して不飽和ケトン**32**に誘導した。**32**を酸処理してアセタール**33**に変換後 $\text{AlMe}_3$ を反応させると、メトキシ基の脱離によるオキソニウムイオンの生成とメチル基の付加が立体選択的に起こり**34**が得られた。その二重結合を立体選択的にエポキシ化して**35**に変換後、 $\text{LiBET}_3\text{H}$ で還元するとエポキシドが位置選択的に開環して目的とするGHIJKL環フラグメント**36**を合成することができた。本法に

よりJK環の立体選択的な構築法を確立することができた。現在、全合成に向けて他のフラグメントを合成中である。



#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) ギムノシン-Bのフラグメント合成における問題点

① ABCD環フラグメントの合成について：今回の合成では、ラジカル環化反応によってA環を最後に構築するために、BCD環合成で保護基をベンジリデン基→ベンジル基→アセトニド基→ジオールへ変換する工程が含まれ、保護基の着脱に多くの工程数を要した。合成のさらなる効率化を考えると、より短ルートの第2世代合成法を考案する必要がある。

② GHI環フラグメントの合成：この合成ルートは問題がない。しかしFG縮環部のメチル基を導入する工程が全合成の中盤以降になるので、合成効率の低下が懸念される。初めからG環にメチル基が導入されたフラグメントを用いるルートも検討に値する。構造活性相関研究のための類縁体合成を考えると、合成の後半でメチル基を導入するルートも捨てがたい。

##### (2) 6環性GHIJKLフラグメント合成について

① この合成はギムノシン-Bの中央部分のフラグメント合成、とくにJK環部位の構築法を確立するためのモデル合成である。水酸基とメチル基が置換したJK環部位を、不飽和オキソニウムへのメチル基の立体選択的1,2-付加、立体選択的エポキシ化、位置選択的エポキシドの還元開環という無駄のない合成ルートで達成できたことは、全合成を進める上で重要な成果であった。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

① Sakai, T.; Sakakibara, H.; Omoto, Y.; Tsunekawa, M.; Hadano, Y.; Kato, S.; Mori, Y.  
Synthesis of the GHIJKL Fragment of Gymnocin-B.  
*Org. Lett.* **2019**, *21*, 6864–6868. 令和元年8月

② Sakai, T.; Hata, K.; Kitamura, Y.; Ishibashi, R.; Mori, Y.  
Synthesis of the ABCD fragment of gymnocin-B.  
*Tetrahedron Lett.*, **2019**, *60*, 151261. 令和元年10月

(2) 口頭発表

- ① 曾根章貴、堀 泰子、坂井健男、森 裕二：  
Gymnocin-B の NO 環システムの合成研究  
第 65 回日本薬学会東海支部大会（名古屋）令和元年 7 月 6 日
  
- ② 坂井健男、常川真里菜、尾本弓実、榊原英晃、森 裕二：  
Gymnocin-B の合成研究 –GHIJKL フラグメントの合成–（ポスター発表）  
第45回反応と合成の進歩シンポジウム（倉敷）令和元年10月28日
  
- ③ 青木優奈、喜久山舞、江崎雄都、坂井健男、森 裕二：  
Gymnocin-B の ABC フラグメントの第二世代合成法に向けた研究（ポスター発表）  
日本薬学会第140年会（京都）令和2年3月27日
  
- ④ 水野佐映、曾根章貴、堀泰子、坂井健男、森裕二：  
7-endo環化による *syn*-2,7-dimethyloxepane 環形成における置換基効果（ポスター発表）  
日本薬学会第140年会（京都）令和2年3月27日

(3) 出版物

なし

学 校 名	近 畿 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	非フラーレンアクセプターを用いた 半透明有機薄膜太陽電池の開発		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①有機太陽電池 ②半透明太陽電池 ③非フラーレンアクセプター ④無機・有機複合ポリマー		

## ○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 久 保 貴 志	理 工 学 部	教 授	研究統括、複合材料の合成、薄膜太陽電池の作製

## ○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 仙 君	理 工 学 部	准 教 授	半透明薄膜太陽電池の作製と評価
須 藤 篤	理 工 学 部	教 授	ドナー性ポリマーの合成
松 本 浩 一	理 工 学 部	准 教 授	非フラーレンアクセプターの合成

# 非フラーレンアクセプターを用いた 半透明有機薄膜太陽電池の開発

## 1. 研究の目的

有機薄膜太陽電池は貴金属を使用しない環境に優しい軽くフレキシブルな太陽電池である。この有機薄膜太陽電池はプラスチック基板上にロール・ツー・ロールなどの低温印刷プロセスを利用することで安価に大量生産できるため、ユビキタスな電源装置としての幅広い用途への応用が期待されている。特に、半透明有機薄膜太陽電池は、その意匠性と軽量性を生かすことで、ビルの窓ガラスやブラインド、マンションのベランダの手摺、ビニールハウスなど従来のシリコン太陽電池では困難であった場所への応用が期待されている。しかしながら、現状での有機薄膜太陽電池の光電変換効率はシリコン太陽電池の半分以下であり、実用化に向けては更なる高効率化が必要不可欠である。この様な中、最近非フラーレンアクセプター (non-fullerene acceptor) を用いた有機薄膜太陽電池が注目されている。これまで有機薄膜太陽電池には、フラーレンと呼ばれるサッカーボール構造を有する炭素材料が用いられていたが、この誘導体は伝導性に優れているものの、可視領域の光を吸収せず、光電変換にはほとんど寄与していなかった。そこで、強い光吸収特性を持つ非フラーレンアクセプターの利用が提唱され、近年有機薄膜太陽電池の高効率化に貢献している。本研究ではこの非フラーレンアクセプターを用いた半透明有機薄膜太陽電池を開発し、有機薄膜太陽電池の更なる性能の向上を目指すことを目的とした。具体的な研究テーマを以下に記す。

- (1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化
- (2) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池
- (3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成
- (4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

## 2. 研究の計画

- (1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化  
本研究ではこれまでPTB7やPTB7-Thといったドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターITIC、およびフラーレン誘導体の三成分の有機半導体を組み合わせた高効率薄膜太陽電池の開発を行ってきた。その結果、PTB7-Th:ITIC:PC71BMの組み合わせにより8.6%の高い変換効率を示す有機薄膜太陽電池を実現した。そこで、2019年度は更なる高効率化を実現するためにPBDB-Tなど他のドナーを用いた三元系有機薄膜太陽電池の開発を目指すこととした。
- (2) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池  
研究代表者らは有機・無機複合ポリマーをバッファ層で利用することで有機薄膜太陽電池の高効率化が実現できることを見いだしている。2019年度はこの有機・無機複合ポリマーが汎用的なバッファ層として利用可能かどうかを検証することとした。
- (3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成  
実用可能な半透明有機薄膜太陽電池の実現に向けて可視領域の透過性の高い新規ドナー性ポリマーの開発は必要不可欠である。今回、ポリマー合成の専門家である須藤との共同開発により有機薄膜太陽電池に応用可能なドナー性ポリマーを新たに合成することとした。また、ITICに代わる強い光吸収特性と高いキャリア移動度を併せ持つ、新たな非フラーレンアクセプターの合成も行う。現在強い光吸収特性を有するジオキサジン誘導体を中心に合成を行っているが、それと平行して2019年度から研究分担者として加わった松本との共同研究を開始し、トリチオフェンを骨格に持つ新たな非フラーレンアクセプターの合成を行うこととした。以上の分子は第一原理計算を利用して有機薄膜太陽電池材料として有望であると判断したうえで実際の合成に取りかかっている。
- (4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価  
研究分担者の田中はこれまでの半透明太陽電池の実用化に向けた研究において、カーボンナノチューブシートを上部透明電極、共役高分子とフラーレン誘導体の混合膜を発電層として用いた半透明有機薄膜太陽電池の作製に成功している。2019年度は非フラーレンアクセプターを用いた太陽電池について、カーボンナノチューブシートと有機層との間のバッファ層に用いる

材料の更なる探索と作製条件の最適化を進める。

### 3. 研究の成果

#### (1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

本研究では上述の様に 2018 年度に PTB7-Th を用いた三元系有機薄膜太陽電池で 8.6%の光電変換効率を実現している。そこで、新たなドナー材料として PBDB-T と non-fullerene アクセプターである ITIC を組み合わせた有機薄膜太陽電池の作製を行った。その結果、素子構造を最適化することで 7.20%の有機薄膜太陽電池が作製でき、PTB7-Th と ITIC を用いた二元系薄膜太陽電池の効率を上回ることを確認した (図 1)。ただし、今回三元系太陽電池の作製まで行うことができず、2018 年度の結果を超える薄膜太陽電池を作製するに至らなかった。

#### (2) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池

PTB7-Th:PCBM を活性層とした有機薄膜太陽電池においてバッファ層として無機・有機複合ポリマー  $[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$  ( $m = 3$  or  $6$ )、酸化モリブデン  $\text{MoO}_3$ 、 $\text{HAT}(\text{CN})_6$ 、 $\text{CuBr}$  を用いた太陽電池を作製した。無機・有機複合ポリマーをバッファ層とした薄膜太陽電池において  $m = 6$  の  $d-\pi$  複合体の方が  $m = 3$  の無機・有機複合ポリマーを用いた場合より短絡電流密度  $J_{sc}$  が増大した。これは上述の通り  $m = 6$  の方が高い伝導性を持っていることに起因していると考えている。また、 $m = 6$  の素子は酸化モリブデン  $\text{MoO}_3$  をバッファ層にした素子よりも高い短絡電流密度とそれに伴う高い光電変換効率を示した。すなわち、本研究で開発した無機・有機複合ポリマー  $[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$  は有機薄膜太陽電池のバッファ層として利用可能であり、またその性能はハロゲン化銅 (I) と  $\pi$  共役配位子の混合比で制御可能であることが明らかとなった。

#### (3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成

今回、新規非フラーレンアクセプターとして図 3 に示すトリベンゾチオフェン誘導体を中心骨格に有する BTT-OT-ORD (1) と BTT-OT-OTZDM (2) を合成した。トリベンゾチオフェンは三回対象構造を有する平面性のドナー性ユニットであり、その末端にアクセプターユニット ORD と OTZDM を縮合させた。BTT-OT-ORD (1) および BTT-OT-OTZDM (2) はともに可視領域で強い光吸収を示し、また優れた発光特性を示した。これらの非フラーレンアクセプターとドナー性材料 P3HT を混合することで、有機薄膜太陽電池を作製し、その光電変換特性を評価した。その結果、いずれも光電変換特性は示したものの BTT-OT-ORD (1) を用いた素子の光電変換効率は 0.47%、BTT-OT-OTZDM (2)

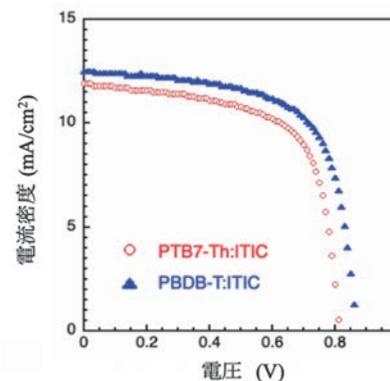


図 1, non-fullerene アクセプターを用いた有機薄膜太陽電池の J-V 特性

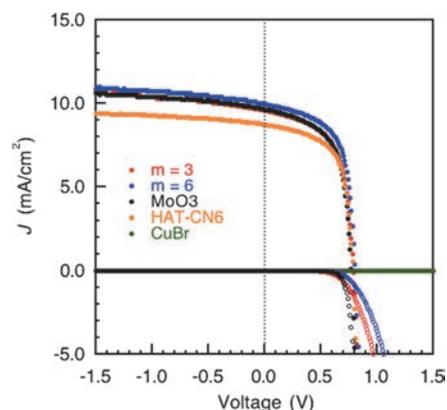


図 2, 異なるバッファ層を用いた有機薄膜太陽電池の J-V 特性

表 1, 異なるバッファ層を用いた有機薄膜太陽電池の光電変換特性

	$[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$ $m = 3$	$[\text{Cu}_m\text{Br}_m(\text{HAT-CN}_6)]_n$ $m = 6$	$\text{MoO}_3$	$\text{HAT}(\text{CN})_6$	$\text{CuBr}$
$J_{sc}$ (mA/cm <sup>2</sup> )	9.526	9.956	9.636	8.678	0.000
$V_{oc}$ (V)	0.802	0.796	0.771	0.780	-1.465
FF	0.603	0.611	0.612	0.634	-0.295
変換効率 (%)	4.610	5.021	4.542	4.345	0.0
変換効率 <sub>ave.</sub> (%)	4.555 ± 0.040	4.720 ± 0.131	4.256 ± 0.287	4.243 ± 0.104	—

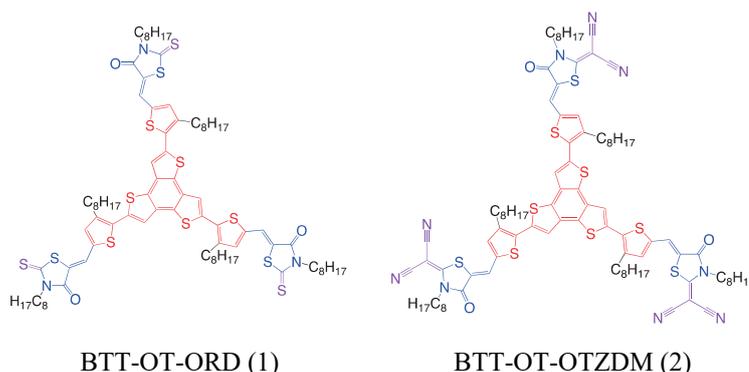


図 3, 新規非フラーレンアクセプターの分子構造

を用いた素子の光電変換効率は1.13%であった。

#### (4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

今回初めて非フラーレンアクセプターITICを用いた有機薄膜太陽電池にカーボンナノチューブシートを用いた透明電極を適用し、半透明太陽電池を作製した。ドナーとしてPTB7-ThおよびPBDB-Tを用いた活性層を成膜し、その上にカーボンナノチューブシートを貼り付け、銀ナノ粒子を含む溶液を滴下して乾燥させた。得られた半透明太陽電池の光電変換効率は0.50%、0.98%といずれも低かったものの、可視領域で60%を超える透過率の薄膜太陽電池が作製できることが明らかになった。

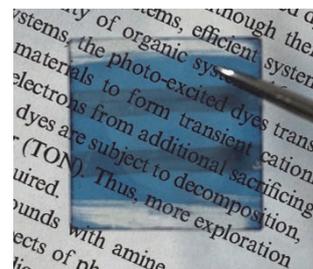


図4. 非フラーレンアクセプターを用いた半透明太陽電池

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

三元系有機薄膜太陽電池に関してはPBDB-Tを用いることでより高効率な三元系有機薄膜太陽電池を作製することを目指したものの、研究期間中はPBDB-TとITICを組み合わせた二元系太陽電池の条件検討までしか行うことができなかった。ただし、二元系太陽電池においてもPTB7-Th:ITICを上回る7.20%の太陽電池を実現できたことから今後三成分系に拡張することで更なる高効率化が可能であると考えている。

### (2) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池

本研究では、無機・有機複合ポリマーを有機薄膜太陽電池のバッファ層に用いることで光電変換効率が向上することを見いだした。この技術は様々な有機薄膜太陽電池に応用可能であり、膜厚の最適化や、金属イオンと有機配位子の組成比の最適化などを行うことで、有機薄膜太陽電池における汎用的な技術となり得ると考えている。実際に今回従来とは異なる有機半導体を用いた太陽電池を作製してその特性を評価したが、従来同様短絡電流密度の増大が確認されている。

### (3) 新規ドナー性ポリマーと非フラーレンアクセプターの合成

今回新たにトリベンゾチオフェンを中心骨格に含む非フラーレンアクセプターを合成し、太陽電池の作製と評価を行った。今回の材料に関しては光電変換効率は低かったものの、今後その誘導体を合成することで、高効率有機薄膜太陽電池の実現を目指す。

### (4) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

カーボンナノチューブシートを用いた透明電極形成技術についてはある程度確立したが、形成時に100°C程度の加熱処理を必要とするために、有機層の種類によっては熱負荷による劣化が生じてしまい、適用が困難な場合が見られている。実際、非フラーレンアクセプターを用いた有機薄膜太陽電池に適用したところ、光電変換効率の著しい低下が確認された。今後、より低負荷な電極形成技術の開発に取り組む必要があり、カーボンナノチューブ以外の透明電極材料についての探索も検討する必要があると考えている。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① “Intermolecular Carbon–Carbon Bond Formation Followed by Intramolecular Cyclization of Electrochemically Generated Magnesium Anthracenes and Esters in the Presence of Chlorotrimethylsilane”, K. Matsumoto, M. Matsumoto, T. Hayashi, M. Maekawa, K. Nishiwaki, S. Kashimura, *Electrochemistry*, **2020**, 88, 314-320.

### (2) 口頭発表

- ① “Crystal structures and carrier transport properties of coordination polymers including copper(I) halides”, Takashi Okubo, China-Japan Symposium of Functional Coordination Chemistry 2019, Guangzhou, China
- ② “ドナー・アクセプター型小分子を含む3元ブレンド有機薄膜太陽電池の作製” 玄野 航、中川 雄太、近藤 里奈、大久保 貴志、前川 雅彦、黒田 孝義、山口 仁宏、第80回応用物理学会秋期学術講演会、20a-PB2-52、2019年9月
- ③ “ベンゾトリチオフェン骨格を有する共役系化合物の合成と有機電子材料への応用” 山下和大、福田三四郎、佐古田祐綺、大久保貴志、田中仙君、柏村成史、松本浩一、1E01、

電気化学会第87回大会 2020年3月17日～19日

- ④ “アルデヒド類の可視光駆動型還元的カップリングにもとづく架橋反応系” 伊藤 大将、松本 教介、須藤 篤、第68回高分子討論会、3Pc001, 2019年9月27日
- ⑤ “可視光駆動型還元的カップリング系を基盤とするネットワークポリマーの合成” 須藤 篤、松本 教介、岡本 衆資、伊藤 大将、田中 秀弥、第68回高分子討論会、2V17, 2019年9月26日
- ⑥ “イミン類の可視光駆動型還元的カップリングにもとづく高分子合成” 田中 秀弥、岡本 衆資、須藤 篤、第68回高分子討論会、3Pd002、2019年9月27日
- ⑦ “半透明太陽電池の光電変換特性における光照射方向依存性の原因” 田中 仙君, 塚 昌樹, 義富 卓也, 第80回応用物理学会秋季学術講演会, 20p-E307-7, 2019年9月20日, 北海道大学
- ⑧ "Origin of Asymmetric Photovoltaic Properties on Semi-Transparent Organic Photovoltaics" Senku Tanaka, Takuya Yoshitomi, Masaki Tsuka, 2019 MRS (Materials Research Society) Spring Meeting, ES18.07.01, 2019年4月, Phoenix, USA

(3) 出版物

なし