

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高性能次世代有機系二次電池の開発 —有機 π 電子系物質を基盤とする正極材料創製—		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①二次電池 ②金属有機構造体 ③X線吸収微細構造分析 ④ナノグラフェン ⑤キノン ⑥正極			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 川 浩 史	理 工 学 部	准 教 授	研究の統括と電気化学測定

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
羽 村 季 之	理 工 学 部	教 授	酸化還元活性な有機分子の合成
畠 山 琢 次	理 工 学 部	教 授	ホウ素含有有機分子の合成
田 中 大 輔	理 工 学 部	准 教 授	有機金属構造体の合成

高性能次世代有機系二次電池の開発

—有機 π 電子系物質を基盤とする正極材料創製—

1. 研究の目的

- (1) 近年、資源問題やエネルギー問題などから、環境にやさしい高性能なエネルギーデバイスの開発が求められている。とりわけ、携帯型電子機器、電気自動車、大容量スマートグリッドなどへの需要から、クリーンなエネルギーデバイスとしての二次電池の高性能化は重要な研究課題の一つである。現在汎用的な二次電池であるLiイオン電池は、その正極材料にリチウムコバルト酸などの遷移金属酸化物が用いられているが、希少元素の利用や構造が分解するために理論容量の半分程度しか容量を得ることができないといった問題を有しており、代替の正極材料の探索・創製および新しい原理・現象の開拓が必要不可欠である。
- (2) このような状況の下、2000年代以降、環境や資源問題、低コスト、ファブリケーションのし易さといった観点から、有機ラジカル電池や分子スピン電池といった酸化還元活性な有機分子・高分子を正極活物質とした有機系二次電池が数多く報告されるとともに注目を集めてきた。しかしながら、これらは容量およびサイクル特性といった面で必ずしも現状のLiイオン電池に対して優位性を持つものではなかった。
- (3) これまでに我々のグループでは、高容量と急速充電の両方を可能にする新しい正極材料として、多電子レドックス特性を示す多核金属錯体分子（分子クラスター）を手始めに、クラスターと酸化還元活性な π 電子系有機配位子（キノンなど）から成る多電子レドックスアクティブ金属有機構造体（Metal-Organic Framework: MOF）を創製し、これを正極材料とすることで、有機配位子と金属イオン両方の酸化還元による高容量とMOFの強固な空孔構造に由来した安定なサイクル特性が実現可能なことを提示した。
- (4) また、このような酸化還元活性な π 電子系分子が集積したMOF電池の研究を行うだけでなく、上述の有機ラジカル電池や分子スピン電池とは異なる観点で、特異な構造や多電子の酸化還元能を有する π 電子系有機分子の蓄電特性開拓を進め、例えば、ホウ素ドーピングナノグラフェン分子や反芳香族性ノルコロール分子について検討したところ、高容量や全有機電極電池といった各分子に特徴的な興味深い電池特性を見出した。このことは、高性能な有機電池を実現するうえで様々な π 電子系有機物質の検討が今なお重要なことを意味する。
- (5) 以上より、酸化還元活性な π 電子系分子は、次世代蓄電材料として非常に魅力的な物質群であり、本研究では、これまでの研究を基に、様々な酸化還元活性な π 電子系有機分子及び集積体を基盤とした実用化に向けた高性能な蓄電特性の開拓を目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 酸化還元活性 π 電子系有機分子に特異な電池特性の開拓を計画する。
 - ① 初年度は、多電子の酸化還元活性な有機分子として、特徴的な構造を有するポリキノン分子を創製し、その電池特性を検討する。
 - ア 一つのユニットで2電子のレドックス反応を示すキノン部位を複数有する分子の開発・合成を行う。例えば、3つのテトラセンキノン部位を有する分子1の合成とこれを正極活物質とするリチウム電池の作製及び蓄電特性の計測を行う。
 - イ 予備実験の結果ではあるが、テトラセンキノン分子2よりも大きな電池容量を示すことを見出しつつあり、キノン部位のみに由来する分子1および2の理論容量がそれぞれ146 Ah/kg（6電子の酸化還元）と208 Ah/kg（2電子の酸化還元）であることを考えると、分子1の放電容量は非常に大きく、キノン部位以外の π 電子系が酸化還元に関与していることが示唆される。本研究では、これらの電池特性について、電流密度や電圧範囲を変えるなどして、より詳細に検討する。
 - ウ 上述の研究について、より重量当たりの電池容量を大きくするために、周縁部のアルキル鎖長が短い分子を合成し、その電池特性を検討する。
 - エ 最後に、DFT計算などによりHOMO-LUMOレベルなどを解析し、その本質を解明して分子設計へのフィードバックを行う。
 - ② 多孔隙性を有する酸化還元活性 π 電子系有機分子集合体の電池特性開拓を計画する。
 - ① 初年度は、応募者のこれまでの研究に基づき、酸化還元活性な π 電子系有機分子が集積し

た多電子レドックス MOF の作製と電池特性の開拓に取り組む。

ア これまでに 2 電子の還元を示すアントラキノンジカルボン酸配位子 2,7-H₂AQDC と Cu や Mn イオンからなる MOF が、配位子単体よりも容量およびサイクル特性において圧倒的に優れていることを見出し、これが酸化還元活性な有機分子が集積した MOF における構造安定性と多孔性のためであることを明らかにした。本研究では、これに基づき、金属イオンを Cu や Mn から Fe などに置換した MOF を作製し、より大きな容量とサイクル安定性を実現する。

イ 上述の配位子に加え、重量当たりの容量が増大するように、分子量が小さくかつ 2 電子以上の酸化還元反応を示す他の様々な配位子についても合成し、各種金属塩（元素戦略的観点から Cu, Fe, Mn など）と反応させることで、多電子レドックス MOF を作製する。

ウ 得られた MOF について、これを正極とするリチウム電池の充放電特性を計測するとともに、その基礎物性（構造、表面積、空孔、伝導性）と電池特性の相関を明らかにする。その結果、 π 電子系有機分子の集積化に基づいたより良い電池特性を実現する。

3. 研究の成果

(1) 酸化還元活性 π 電子系有機分子に特異な電池特性を開拓した。

① 多電子の酸化還元活性な有機分子として、特徴的な構造を有するポリキノ分子やホウ素含有ナノグラフェン類似分子を創製し、その電池特性を検討した。

ア まず、一つのユニットで 2 電子のレドックス反応を示すキノン部位を複数有する分子として、3 つのテトラセンキノン部位を有する分子 1 を合成し、これを正極活物質とするリチウム電池の蓄電特性を計測したところ、テトラセンキノン分子 2 よりも大きな電池容量を示すことを見出し、分子 1 では、キノン部位以外の π 電子系が酸化還元に関与しているためである可能性を明らかにした。

イ 次に、ホウ素含有ナノグラフェン類似分子として、非平面四配位ホウ素化合物を新規に合成し、その二次電池正極特性を初めて明らかにし、論文として報告した (Org. Lett. 2019)。

(2) 多孔性を有する酸化還元活性 π 電子系有機分子集合体の電池特性開拓

① 酸化還元活性なジスルフィド部位を含有する有機配位子が集積した多電子レドックス MOF の作製と電池特性の開拓に取り組んだ。

ア ジスルフィド含有配位子を有する、様々な次元と空孔サイズを持つ MOF (DS-MOF) を複数作製し、その基礎物性の探索とこれらを正極材料とするリチウム電池を作製し、その充放電特性を計測した。

イ その結果、三次元構造を持つ DS-MOF がもっとも安定なサイクル特性を示すことを明らかにするとともに、空孔を有する DS-MOF のみが電池特性を示すことを明らかにした。

ウ 通常、ジスルフィドは、充電放電（酸化還元）に伴い、S-S 結合の再結合と開裂を示すため、サイクル特性の不安定性や低い電池容量につながっているが、DS-MOF 骨格内へのジスルフィドの集積化により、充放電で可逆な S-S 結合の開裂と再結合（電気化学的動的共有結合）を引き起こすことに成功し、ジスルフィドの電池特性改善につながったことを S K-edge X 線吸収微細構造 (XAFS) 測定などより明らかにした。

4. 研究の反省・考察

(1) 上述したように、2 つのテーマにおいて、様々な有機分子及び集積体の電池特性を明らかにするとともに、その反応機構や、次年度に計画していたホウ素含有分子の電池特性も調べることができており、論文発表までを達成した。よって、「当初の計画以上に進展している」といえる。

(2) 一方で、真に実用化するうえでは、さらなる改善が必要である。

① 現状、正極中の活物質濃度は、30wt%程度であるが、これを80wt%程度まで上げる。

② 負極をLiとしているが、これを炭素材料などの安全なものに取り換える必要がある。

(3) 上述のような反省点を生かして、次年度以降に、実用化につながるような有機二次電池の開発を実現したい。

(4) また、どのような有機分子や有機分子集合体が良いかを包括的に明らかにする研究へと展開したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Zhenxin Zhang*, Heng Wang, Hirofumi Yoshikawa*, Daiju Matsumura, Syuya Hatao, Satoshi Ishikawa, Wataru Ueda*, Zeolitic vanadomolybdates as high performance cathode-active materials for sodium ion battery, *ACS Applied Materials & Interfaces* (2020) 12(5), 6056–6063 (DOI: 10.1021/acsami.9b19808)
- ② Kensuke Nakashima, Takeshi Shimizu, Yoshinobu Kamakura, Akira Hinokimoto, Yasutaka Kitagawa, Hirofumi Yoshikawa* and Daisuke Tanaka*, A new design strategy for redox-active molecular assemblies with crystalline porous structures for lithium-ion batteries, *Chemical Science* (2020) 11(1), 37–43 (DOI: 10.1039/C9SC04175C)
- ③ S. Oda, T. Shimizu, T. Katayama, H. Yoshikawa*, T. Hatakeyama*, Tetracoordinate Boron-Fused Double [5]Helicenes as Cathode Active Materials for Lithium Batteries, *Org. Lett.* (2019), 21(6), 1770–1773 (DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00337)
- ④ Yoshinobu Kamakura, Pondchanok Chinapang, Shigeyuki Masaoka, Akinori Saeki, Kazuyoshi Ogasawara, Shigeto R. Nishitani, Hirofumi Yoshikawa, Tetsuro Katayama, Naoto Tamai, Kunihiisa Sugimoto and Daisuke Tanaka*, Semiconductive Nature of Lead-Based Metal-Organic Frameworks with Three-Dimensionally Extended Sulfur Secondary Building Units, *J. Am. Chem. Soc.* (2020) 142(1), 27–32 (DOI: 10.1021/jacs.9b10436)

(2) 口頭発表

- ① Hirofumi Yoshikawa, Rechargeable Batteries Using Redox-Active MOFs as Cathode Active Materials, 7th Asian Conference on Coordination Chemistry (ACCC7), Putra World Trade Center, Kuala Lumpur, Malaysia Oct 15–18, 2019, Invited Talk
- ② 吉川 浩史、分子および分子集積体の蓄電機能開拓、エネルギーデバイスの新潮流をつくるサステイナブル・機能レドックス化学（日本化学会第100春季年会）、東京理科大学野田キャンパス、2020年3月22日、招待講演

(3) 出版物

- ① 吉川浩史、清水剛志、他102名、『PCP/MOFおよび各種多孔質材料の作り方、使い方、評価解析』（技術情報協会）、総ページ数639ページ、2019年10月30日刊

学 校 名	神 戸 女 子 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規バイオメタル錯体の糖尿病治療効果に関する 作用機構解明 — 生物無機化学的アプローチを基盤として —		研究分野	理 学
キ ー ワ ー ド	①錯化合物 ②抗糖尿病作用 ③インスリンシグナル ④セレン含有タンパク質			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
吉 川 豊	健 康 福 祉 学 部	教 授	研究総括・動物実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
加 来 田 博 貴	岡 山 大 学 大 学 院 医 歯 薬 学 総 合 研 究 科	准 教 授	合成実験アドバイザー
糸 井 亜 弥	健 康 福 祉 学 部	准 教 授	動物実験・動物実験データ解析
内 藤 行 喜	京 都 薬 科 大 学 部 薬 学	助 教	分子生物学データ解析

新規バイオメタル錯体の糖尿病治療効果に関する作用機構解明 —生物無機化学的アプローチを基盤として—

1. 研究の目的

生命科学において、生体内に存在する微量元素、すなわち、バイオメタルが持つ役割は幅広く、かつ、必要不可欠なものであるため、生体内でどのような機能を発揮し、また、そのバイオメタルを我々人類がどのように有効利用できるのかを明らかにしていくことに注目が集まっている。

平成28年の5690万人の死亡者のうち、半数以上は死亡原因のトップ10の疾患によるものである。トップ10の死亡疾患には、糖尿病などの生活習慣病が多く含まれており、先進国はもとより発展途上国においても多くの人々が生活習慣に関わる疾患と戦っている。そのため、生活習慣病の助けとなるサプリメントや医薬品の開発が望まれている。現在使用可能な無機医薬品としては、Pt含有のもの、As含有のもの、Se含有のもの、Au含有のもの、Zn含有のもの、およびCo含有のものなどが存在する。その数は約18,000種の薬価基準収載医薬品数からみるとわずかな数であるが、有機化合物とは異なる作用メカニズムで疾患を治療できるため、無機医薬品への注目は高まっている。特に近年、酢酸亜鉛（ノベルジン）が低亜鉛血症治療への適応追加になった事は記憶に新しい。

申請者らは、生体とZnとの相互作用についての研究を続けてきており、副作用の少ない糖尿病治療薬の開発を目指し、配位子となりうる多数の有機化合物やメタル錯体を合成し、それらのインスリン様作用の探索を行ってきた。そして、実験動物を対象とした研究から、経口投与したZn錯体が血糖値降下作用を示す事実を世界で初めて明らかにした。つまり、Zn錯体というバイオメタルを用いた2型糖尿病治療という、新たな可能性を提供できる内容の研究を遂行してきたが、「なぜ疾患に対して効果を示すのか？」という観点から、特に動物レベルでの作用機構は、未だ解明できていない。そこで本研究では、生活習慣病の中でも患者数やその疾患の予備軍が未だ増加する傾向にある糖尿病に焦点を絞り、

- ①従来の合成薬剤に代わり得る新しいバイオメタル錯体を合成すること
- ②その糖尿病治療に及ぼす分子機構を細胞・動物レベルで解明すること
- ③①②の成果にもとづいて、治療や予防で使用可能となる新規バイオメタル錯体を提案することを目的とした。

人への適用を視野に入れた無機医薬品の合理的な評価のためには、詳しい作用機構の解明、および、バイオメタルの生体内挙動の解析が必須である。糖尿病の治療ができ、安全に長期的に経口摂取可能な化合物の開発は、早急な実現が待ち望まれている。本研究によって効率的な錯体合成経路の開発と、高活性な化合物の選択ができれば、疾患治療可能なバイオメタル錯体の使いみちがひろがることが期待される。

2. 研究の計画

「バイオメタル（特に亜鉛）」と「糖尿病治療に影響する生体との相互作用」に着目することを最も重要な研究計画とし、

- ①新規錯体の探索を行う。さらに亜鉛は硫黄（S）との親和性が高いため、Sが配位元素となる錯体の合成に着手し、大量合成可能なルートの提案を行う。
- ②肝臓をターゲットとした新規糖尿病治療効果の評価系を立ち上げ、既存の錯体と併せて糖尿病治療効果の評価を行う。
- ③選抜された錯体を2型糖尿病モデル動物に投与し、解剖後の組織を用いての糖尿病に関連するタンパク質の変動を評価する。

3. 研究の成果

(1) 新規亜鉛錯体の合成ならびに硫黄含有亜鉛錯体の大量合成への着手

- ①新規バイオメタル錯体の合成

配位子に糖鎖が入ることで生体内の糖輸送体に認識される可能性が高くなり、生体へのメタルの輸送が高まることが期待される。そのため、アミノ糖を用いて新規糖含有亜鉛錯体の合成に着手した。具体的には、D(+)-グルコサミン塩酸塩をメタノール中に溶解し、メタノール中に溶解させたカリウム α -ブトキシドと8-ヒドロキシ-2-キノリンカルボアルデ

ヒドを加え、室温で24時間攪拌した。反応混合物は、減圧条件下において蒸発させ、残渣物はメタノール中で再結晶化させ、淡黄色の化合物1（収率40%）を得た。得られた化合物は、(E)6-(ヒドロキシメチル)-3-(((8-ヒドロキノリン-2-イル)メチレン)アミノ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2,4,5-トリオールのカリウム塩であり、NMR・MS・元素分析から同定した。この化合物のメタノール溶液に塩化亜鉛を加え、カリウムと亜鉛の置換反応を起こさせ、目的の化合物((E)6-(ヒドロキシメチル)-3-(((8-ヒドロキノリン-2-イル)メチレン)アミノ)テトラヒドロ-2H-ピラン-2,4,5-トリオールの亜鉛錯体)を得た。得られた化合物は、元素分析により確認した。

②硫黄を配位原子に持つバイオメタル錯体の大量合成への着手

硫黄を配位元素にもつ配位子として、今までにマルトール、トロポロン、ヒノキチオールなどの酸素原子を硫黄原子に置き換える方法で合成をしていたが、合成経路が複雑で、誰もが簡単に合成できる状況ではなかった。そのため、硫黄含有の上記化合物を大量合成することができる新たな合成ルートの開拓を行った。

ア) 亜鉛チオマルトール錯体の合成；マルトールの溶液にローソン試薬を加えて窒素下、80°Cで加熱還流を行った。得られた黄色の油状物質を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離を行った。チオマルトールの溶出部分を濃縮し、得られた油状物質を減圧下で乾燥させチオマルトールを得た。チオマルトールと水酸化リチウムメタノール下で混合し、硫酸亜鉛を加え反応させた。得られた析出物を洗浄し、減圧下で乾燥させ、得られた黄色粉末を亜鉛チオマルトール錯体とした。得られた錯体は、質量分析と元素分析から合成できたことを確認した。

イ) 亜鉛チオトロポロン錯体の合成；トロポロンのキシレン溶液に五硫化二リンを加え、反応促進剤を加えたのち、加熱還流した。濃縮後、カラムクロマトグラフィーを用いて分離し、減圧下で乾燥させチオトロポロンを得た。チオトロポロンと水酸化リチウムメタノール中で反応させた後、硫酸亜鉛を加え、得られた析出物を洗浄し、減圧下で乾燥させ、亜鉛チオマルトール錯体とした。得られた錯体は、質量分析と元素分析から合成できたことを確認した。

ウ) 亜鉛チオヒノキチオール錯体の合成；ヒノキチオールのトルエン溶液にローソン試薬を加え加熱攪拌後、減圧下で濃縮し、クロロホルムに溶解させた。水酸化ナトリウム水溶液を加え分液後下層を除去した。水酸化ナトリウム層にクロロホルムを加え、中和のため塩酸を加え、分液後下層を減圧下で濃縮した。濃縮残渣をメタノールで溶かし、酢酸亜鉛を加え、1時間攪拌した。沈澱物をグラスフィルターで回収し、シリカゲルカラムで分離し、濃い茶色の部分を濃縮し、亜鉛チオヒノキチオール錯体とした。得られた錯体は、質量分析と元素分析から合成できたことを確認した。

(2) 肝臓をターゲットにした新規糖尿病治療効果の評価系の構築と亜鉛錯体の効果

糖尿病に関する研究の中で、2型糖尿病患者の血中セレノプロテインP (SeP) 濃度が上昇することが近年報告され、過剰なSePの分泌がグルコース代謝を悪化させ、2型糖尿病を進行させることが明らかとなっている。SePは肝臓に蓄えられたセレン輸送タンパク質として機能しており、インスリン抵抗性を誘導し高血糖を発症させる機能も発見され、近年SePへの注目が高まっている。そこで、本研究では合成した亜鉛錯体の抗糖尿病効果の指標として、ヒト肝腫瘍細胞由来のHePG2細胞によるSePの発現量をリアルタイムPCR法を用いてmRNA量の変動から評価する新たな系を構築し、亜鉛錯体の評価を実施した。

方法は、細胞密度が $1.0\sim 2.0\times 10^5$ 個/mlになるように培地を加え、細胞懸濁液を作成した。12 wellのディッシュに培地と細胞懸濁液を播種し培養し、24時間後、培地を取り除き、PBSを加えて細胞を1回洗浄し、無血清培地を加えさらに培養した。20時間後、ディッシュに無血清培地で調整した錯体を4時間作用させた。4時間後、total RNAを抽出し、TaKaRa One step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)を用い、シグマアルドリッチジャパン合同会社より購入したプライマーから、リアルタイムPCR法によりSePのmRNA量の評価を行った。

その結果、ポジティブコントロールとして使用したインスリンは濃度依存的にSePの発現量を抑制し、50%抑制する濃度のIC50値は $15.1\mu\text{M}$ であった。また、評価した錯体は、マルトール

ルを配位子に持つ亜鉛錯体 ($\text{Zn}(\text{mal})_2$)、マルトールの酸素原子一つを硫黄化した $\text{Zn}(\text{S-mal})_2$ 錯体、トロポロンを配位子に持つ亜鉛錯体 ($\text{Zn}(\text{trp})_2$)、トロポロンの酸素原子一つを硫黄化した $\text{Zn}(\text{S-trp})_2$ 錯体であり、硫酸亜鉛も同時に評価した、これらの錯体の中で、SePの発現量を低下させたものは、 $\text{Zn}(\text{S-mal})_2$ 錯体と $\text{Zn}(\text{S-trp})_2$ 錯体のみであり、SePのmRNA発現量を50%抑制する濃度は、それぞれ17.1 μM 、17.5 μM であり、それ以外の亜鉛化合物ではSePの発現に影響を及ぼさなかった。一方、他のバイオメタルの中では、硫酸銅が21.4 μM となり、バイオメタルの中でもSePの発現量は異なることが明らかとなった。

(3) 動物モデルを用いた糖尿病治療に関わるタンパク質の変動評価

亜鉛はインスリン合成、インスリン分泌に関与することが知られている。以前より、亜鉛と糖尿病の関係を示す研究が報告されており、糖尿病治療に亜鉛を用いる可能性が示されていた。In vitro系3T3-L1脂肪細胞を用いた検討から、亜鉛化合物がインスリン標的組織のうち脂肪細胞においてインスリンとは独立したメカニズムによってインスリンシグナル経路に作用し、末梢におけるインスリン抵抗性を改善する可能性があることを明らかにしており、今回の検討では、in vivo系において、亜鉛錯体がインスリン標的組織に対してどのような作用メカニズムを示すのかを解明することを目的とした実験を実施した。

その結果、雄性ICRマウスをコントロール群、インスリン投与群、 $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群に分け、化合物を腹腔内投与した。各薬剤投与40分後及び90分後に解剖を行い、肝臓、骨格筋および脂肪を摘出した。同様に、2型糖尿病モデルKK-A^yマウスに対しても、ICRマウスと同様、各薬剤を腹腔内投与し、臓器摘出を行った。摘出した肝臓、脂肪、骨格筋はウエスタンブロッティング法によりAktのリン酸化の程度を評価した。ICRマウスを用いた検討では、インスリン投与群および $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群においてのみ有意なリン酸化促進作用が認められた。特に、脂肪組織において、投与後40分ではコントロール群に対して有意なAktリン酸化促進作用が認められた。投与後90分では、インスリン投与群、 $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群共にAktリン酸化促進傾向を示すことが認められたが、インスリンによる効果は40分時よりも弱い一方で、 $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群はコントロール群に対して有意な促進作用が認められた。肝臓と骨格筋においては、インスリン投与群においてのみAktリン酸化促進作用が認められた。一方、2型糖尿病モデルKK-A^yマウスに対する $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与群の肝臓、骨格筋、脂肪組織に対するインスリンシグナル経路への影響を検討すると、ICRマウスとは異なり、KK-A^yマウスでは、いずれの臓器においても $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与によるAktリン酸化促進作用は認められなかった。以上のことから、2型糖尿病モデルでは $\text{Zn}(\text{mal})_2$ 投与に対する感受性・応答性がICRマウスに比べて低下しているという結論が得られた。

4. 研究の反省・考察

(1) 今回新規の亜鉛錯体と高活性が期待できる亜鉛錯体の特別な装置を有さず、簡単な合成ルート確立を目指した実験を実施した。

- ①糖鎖含有の亜鉛錯体は現在までほとんど報告がなく、今回合成できた錯体は新規性のあるものである。本来であれば、この錯体を用いても各種生理活性、メカニズム解明を実施したかったが、その検討までは到達できなかった。予想以上に配位子の精製に時間がかかったことがその一因であると考えている。現在、糖鎖含有の亜鉛錯体の大量合成を実施中であり、今年度には生理活性のデータを取得する予定である。
- ②酸素原子を硫黄原子に簡易な方法で置換する方法を、文献情報をもとに検討し、いくつかの錯体でその手法を確立することができた。小スケールであれば簡単に合成できても、大スケールになると合成できないという事象も出てきたため、大量合成できるような合成経路を考えるのに時間を有してしまった。今回の研究で、動物に投与して各種作用を評価できる量は、普通の化学実験室があれば合成可能となったため、今後動物に投与する実験を実施し、バイオメタル錯体の抗糖尿病作用の解明につなげたい。

(2) 抗糖尿病効果の評価として、当初はラット脂肪細胞へのグルコース取り込み活性での方法を検討していたが、動物倫理の縛りが厳しい昨今、細胞を用いた評価に切り替えることになった。そのため、今回購入したリアルタイムPCRを用いての評価方法の検討を行い、SePのmRNAの発現レベルから比較することに成功した。その結果S化した亜鉛錯体は、イン

スリンと類似の作用を有していることが明らかとなり、SeP の発現量から亜鉛錯体の抗糖尿病作用の機構を解明したのは、本研究が初めてである。また、今までに申請者らが報告してきた糖尿病治療効果の指標として用いていた脂肪細胞に対する亜鉛錯体の効果と比較すると、いずれの場合も S 化された配位子を持つ亜鉛錯体の方が高活性であり、これらのデータには相関性が認められた。この SeP 発現量からの評価系が確立できたことより、今回合成が成功した、糖鎖を有する亜鉛錯体においても、SeP の発現量を測定すべく、現在鋭意検討中である。

- (3) 抗糖尿病作用を評価する上で、メタル関連化合物の評価は多くのものが *in vitro* 実験や細胞実験であり、動物を用いたメカニズム解明はほとんど行われていない。今回の研究で、Zn(mal)₂ 錯体を用いて、健常動物と糖尿病モデル動物の両方を用い、生きた動物での作用メカニズムの違いが評価できたことはとても有益なことである。一方、研究環境を選ばず最低限の設備で合成できる方法を確立した硫黄を配位子にもつ亜鉛錯体の *vivo* における評価にまでは、2019 年度では到達できなかった。現在、KK-A^y マウスに Zn(S-mal)₂ 化合物を投与する実験計画をたて、学内で動物倫理審査を申請中であり、2020 年度には糖尿病モデル動物における、硫黄化した亜鉛錯体の SeP 発現量の結果が出る予定であり、学会などで発表していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Crystal Structure of Zinc(II) Complexes with 2-Ethyl-3-hydroxy-4H-pyran-4-thione and 2-Ethyl-3-hydroxy-4H-pyran-4-selenone, Takayuki Nishiguchi, Masayuki Yamashita, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui, *Crystallography Reports*, 64, 1099–1102 (2019)
- ② In Vivo Effect of Bis(Maltolato)Zinc(II) Complex on Akt Phosphorylation in Adipose Tissues of Mice, Yuki Naito, Hiroaki Yamamoto, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui, *Biol Trace Elem Res*, 192, 206-213 (2019).

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 北 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	睡眠覚醒リズムを持つヒトiPS細胞由来神経ネットワークの創生 —生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築—		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①ヒトiPS細胞由来ニューロン ②睡眠薬 ③電気活動 ④薬効評価			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 郁 郎	工 学 部	准 教 授	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辛 島 彰 洋	工 学 部	准 教 授	データ解析

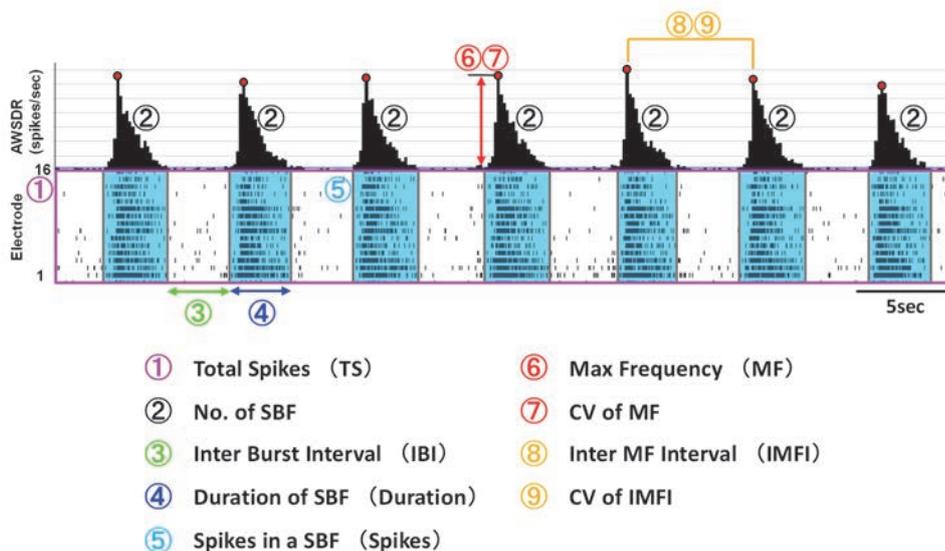
睡眠覚醒リズムを持つヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの創生 — 生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築 —

1. 研究の目的

我々はヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を長期間モニタリングできる機能評価技術を開発し、薬剤応答性を見出すと共に、開発技術を用いた創薬開発および安全性・毒性評価法への展開を目指している。令和元年度は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした既存睡眠薬の応答を明らかにし、主な作用機序が同様の薬剤においても神経ネットワーク活動の違いにより、神経機能の実態に基づいた精度の高い睡眠薬スクリーニング法の開発を目的とした。

2. 研究の計画

平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来ニューロン (Mixed Neurons; Elixirgen Scientific) を 7.0×10^5 cells/cm² の密度で培養し、培養 5 週目に、睡眠薬 6 種類、痙攣陽性化合物 2 種類と DMSO を用いた用量依存的な神経活動を取得した。睡眠薬は、非ベンゾジアゼピン系であるゾルピデム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ベンゾジアゼピン型であるトリアゾラム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、エチゾラム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ロルメタゼパム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、フルニトラゼパム (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M)、ニトラゼパム (1, 3, 10, 30, 100 μ M)、メラトニン MT1/2 受容体アゴニストであるラメルテオン (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M) を使用し、陰性化合物として DMSO (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6%)、比較対照として痙攣陽性化合物である 4-アミノピリジン (0.3, 1, 3, 10, 30 μ M)、クロルプロマジン (0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M) を使用した。各濃度 10 分間の自発活動計測を行い、下図に示す 9 個のパラメータを導出し、得られたパラメータを用いたクラスタリング解析により、各薬剤が神経ネットワーク活動に及ぼす影響、および主な作用機序が同様の薬剤における神経活動の差異を調べた。

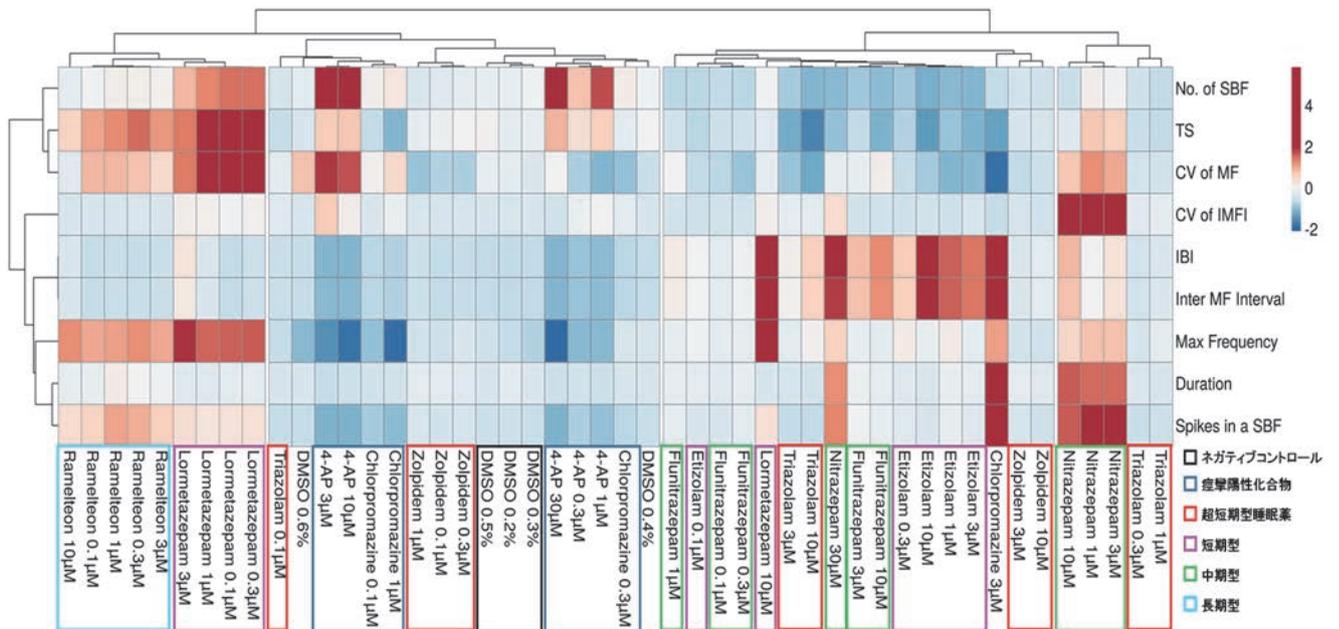


9個の解析パラメータを用意

3. 研究の成果

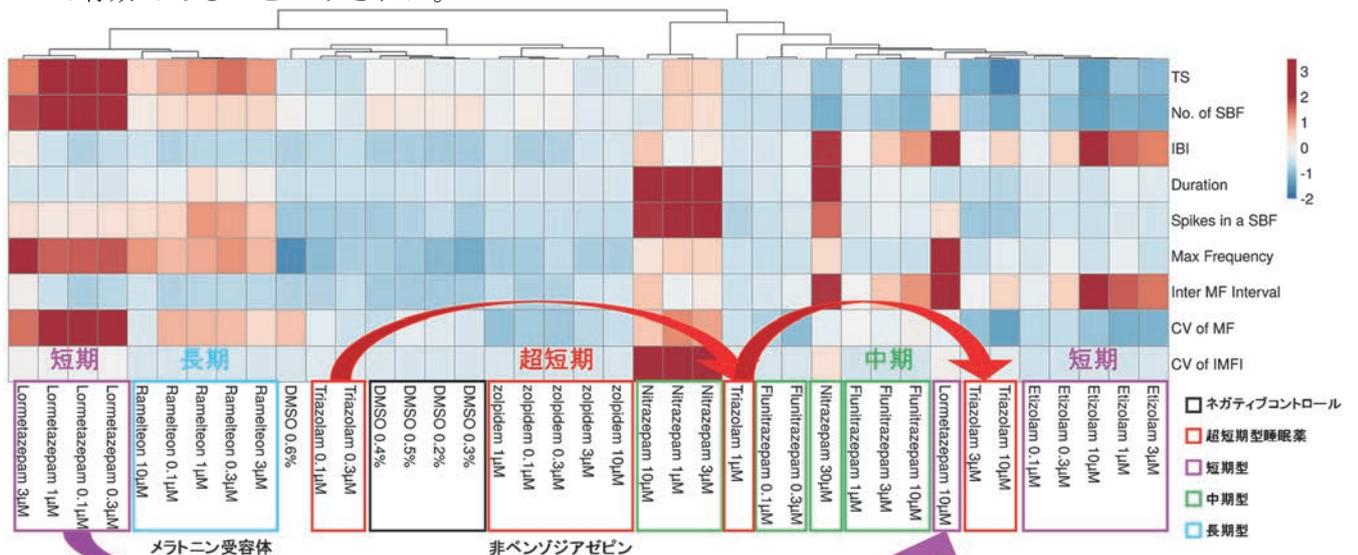
(1) 睡眠薬の応答は、比較対照とした痙攣陽性化合物の応答とは全く異なる

9個のパラメータを用いた全薬剤全濃度のクラスタリング解析の結果を次頁に示す。比較対照として用いた痙攣陽性化合物4-アミノピリジンとクロルプロマジンは、睡眠薬の応答とは異なり、睡眠薬と比較するとDMSOに近い結果となった。クロルプロマジン3、10 μ Mは、同期活動が消失した為、解析パラメータが揃わないことからクラスタリング解析から除外している。睡眠薬の応答は、痙攣陽性化合物の応答とは全く異なる神経活動を示すことがヒト iPS 細胞由来ニューロンのMEA計測で確かめられた。



(2) 睡眠薬毎の神経応答を検出した

睡眠薬7種類とDMSOのクラスタリング解析結果を以下に示す。ゾルピデムは、 $10\mu\text{M}$ においても顕著な変化を示さなかったが、その他の睡眠薬は大きく2群に分かれた。ベンゾジアゼピン型のロルメタゼパム ($0.1, 0.3, 1, 3\mu\text{M}$)、メラトニン受容体アゴニストのラメルテオンは、TS・NoB・PS・CV-MSが顕著に増加（発火を増大する変化）を示した。また、クラスタリング解析の結果、ロルメタゼパムとラメルテオンは別クラスターに分類されたことから、作用の違いも検出された。一方、フルニトラゼパム、エチゾラム、トリアゾラムは、対称的にTS・NoBが減少（発火数を減少させる変化）を示した。フルニトラゼパム、エチゾラムは別クラスターに分類されたことから、神経活動の差異が検出された。ニトラゼパムは、最高濃度 $30\mu\text{M}$ でTS・NoBの減少が顕著になったが、Duration・Spikes・IMFI・CV of IMFIのパラメータが顕著に増大する特徴的な変化を示した。トリアゾラムは、低用量はDMSOに近い応答を示し、濃度が高くなるにつれて、右側にシフトした。高用量 $3, 10\mu\text{M}$ は同クラスターであり、他の睡眠薬との差異も見られた。以上の結果により、睡眠薬毎に特徴的な神経活動を示すことがわかった。特に、主の作用機序が同様であるベンゾジアゼピン系睡眠薬6種類の差別化が得られた点は興味深く、神経活動に基づいた本評価系は、睡眠薬のプロファイリング法として有効であることが示された。



4. 研究の反省・考察

本研究により、主作用が同じ睡眠薬においても神経ネットワーク活動の応答は異なることがわかった。同じ主作用を持つ睡眠薬を神経活動を指標に分類できたことから、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法と本解析法は、未知の睡眠薬化合物がどの既知化合物の応答に近いのか、異なる神経活動を誘発するものなのかを評価でき、新たな睡眠薬のフェノタイプスクリーニング法として有効であると考えられる。睡眠薬は、その作用期間から超短期、短期、中期、長期に分類されている。作用期間での明確な分離は見られなかったが、長期計測を行えば、作用期間の分類も可能であると考えられる。ゾルピデムは 10 μ M 投与においても顕著な差が見られなかった。同じく超短期に分類されるトリアゾラムとバインディングアフィニティを比較した報告からは、ゾルピデムはトリアゾラムと比較して、GABA-A 受容体のサブタイプである $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ について数十倍以上、結合親和性が低いことが報告されている (Psychopharmacology 164.2 (2002): 151-159)。また、ゾルピデムは、 $\alpha 1$ への作用が最も強く、10mg の経口投与時の血中最高濃度は約 0.5 μ M である。今回使用したヒト iPS 細胞由来ニューロンの $\alpha 1$ の発現を調べる必要があると共に、ゾルピデムの脳室内濃度が高い可能性も考慮する必要がある。ゾルピデムで反応性が低い理由を今後調べてゆく予定である。ただ、ゾルピデムは、他の睡眠薬と異なり、睡眠の構造を乱すことなく睡眠を誘発する特徴を持っている為、その特徴が現れている可能性もある。ロルメタゼパムとラメルテオン投与で発火数が増大した現象は、睡眠リズムを整える作用として他の睡眠薬とは神経作用が異なることを示している。そのメカニズムについても今後調べて行きたい。

現在、計測したサンプルの各種受容体発現を RNA sequence により、調査中である。各種受容体の発現と電気活動との相関を引き続き調べる。睡眠薬を電気活動を指標としてプロファイリングできた成果は、睡眠薬スクリーニング法を目指した今後の研究を加速する成果であるが、前年度までに開発した電気刺激法などを睡眠薬のプロファイリングに取り込むところまで進まなかった点が反省点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- [1] Shirakawa T, Suzuki I* “Approach to Neurotoxicity using Human iPSC Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells”, Current Pharmaceutical Biotechnology, 20, 2019, 1-7, doi: 10.2174/1389201020666191129103730.
- [2] Yokoi R, Okabe N, Matsuda N, Odawara A, Karashima A, Suzuki I*. “Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons.”, Frontiers in Neuroscience, 2019 May, 13:554,1-15, DOI: 10.3389/fnins.2019.00554.
- [3] Sasaki T*, Suzuki I*, Yokoi R, Sato K, Ikegaya Y, “Synchronous spike patterns in differently mixed cultures of human iPSC-derived glutamatergic and GABAergic neurons” Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019 May, Volume 513, 300-305, DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.161.

(2) 口頭発表

1. 鈴木郁郎, 基調講演:ヒト iPS 神経の機能を指標とした医薬品アッセイの有用性 細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」, 2020/1/20、国内、招待
2. 鈴木郁郎, 浜松フォトニクス企業セミナー: in vitro 神経ネットワークの電気活動から薬効を予測する, 第 10 回スクリーニング学研究会, 2019/11/20-22, 東京、国内、招待
3. 鈴木郁郎, ヒト iPS 由来ニューロンを用いた薬効予測, 日本バイオマテリアル学会東北ブロック 講演会, 2019/10/2 仙台 招待

4. 鈴木郁郎, iPS 細胞を用いた痙攣・てんかん研究への挑戦, さいたま神経生理 てんかん研究会, 2019/6/7 さいたま 招待
5. 鈴木郁郎, iPS 細胞を用いた抗てんかん薬の評価と今後の展望, 第3回 Kinki epilepsy summit, 2019/5/11 京都 招待
6. I. Suzuki. Investigators Workshop: Recent Advances in Microelectrode Array Technology and Its Applications, American Epilepsy Society 2019, Dec.6-10, Baltimore, USA 口頭招待
7. I. Suzuki. AI Utilization in MEA data of hiPSC Neurons. Symposium “Recent Trends in High Performance Computing for Safety Pharmacology”, Safety Pharmacology Society 2019, Sep.23-26, Balcelona, Spain 口頭 招待

(3) 出版物

- [1]鈴木郁郎, 医薬品開発における創薬スクリーニング関連技術開発, 第5章第3節 MEA 計測機器を利用した安全性評価・創薬スクリーニング p153-163, 情報機構 2019年12月

学 校 名	成 蹊 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む —対破壊電流密度にどれだけ近づけられるか?—		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①超伝導 ②臨界電流密度 ③対破壊電流密度 ④ナノ組織制御			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 浦 正 志	理 工 学 部	教 授	研究総括および超伝導薄膜の創製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
作 間 啓 太	理 工 学 部	助 教	超伝導薄膜の創製
神 原 陽 一	慶應義塾大学理工学部	教 授	キャリア制御技術の開発
Harold Hwang	米国スタンフォード大学	教 授	新超伝導材料開発
Boris Maiorov	米国ロスアラモス国立研究所	研 究 員	超高磁場中特性評価
Serena Eley	米国コロラド鉱山大学	助 教	磁化測定による熱擾乱の評価

ナノ組織制御超伝導薄膜創製により対破壊電流密度に挑む —対破壊電流密度にどれだけ近づけられるか？—

1. 研究の目的

安価かつ無尽蔵である液体窒素温度下 $\text{REBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ (RE123) 超伝導線材は、発電機、MRI(磁気共鳴画像)、NMR(核磁気共鳴)装置など次世代エネルギー及び医療機器応用に期待されている。これらの応用上最も重要となるのが臨界電流密度(J_c)である。現状の J_c 値は、 J_c の限界値である対破壊電流密度(J_d)の 10%程度であり応用に適さない状況となっている。これは、RE123 超伝導内に侵入したナノサイズの量子化磁束が①ローレンツ力($F_L=J_c \times B$)及び②熱擾乱($S \propto k_B T$ (k_B 及び T は、ボルツマン定数及び温度))により運動し、 J_c が低下するためである。我々は、これまで J_c の低下の原因である量子化磁束運動を抑制するために、非超伝導相をナノサイズ・ナノ間隔に導入することにより量子化磁束の運動を抑制し J_d の 10%程度の世界最高 J_c を得ることに成功してきた。また、我々は、すべての超伝導材料において、ギンツブルグ数(G_i)が小さいほど量子化磁束の熱擾乱(S)を抑制でき、 J_c が向上することを明らかにした。

独自のインコヒーレント非超伝導相導入技術に加えて、本研究で開発する高キャリア注入による熱的臨界磁場(B_c)向上技術を融合することで J_c を最大限に活かす超伝導材料設計の指針を確立し、未だ誰も実現していない 100 MA/cm^2 以上の J_c を目指す。

近年、申請者らが構築した独自 J_c 理論モデルをもとに J_c 向上には『キャリア密度向上による B_c 向上が鍵』であると考えた。そこで革新的 J_c には 4 つの課題を解決する必要がある。本研究では、特に高キャリア注入技術を開発し、以下の課題を解決し、目標達成を目指す。

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加

2. 研究の計画

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
 - ① 金属有機酸塗布(MOD)法を用いインコヒーレントナノ粒子導入RE123薄膜創製
 - ② パルスレーザ蒸着(PLD)法を用いたインコヒーレントナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜創製
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制
 - ① 密度・サイズの異なるナノ粒子がRE123薄膜の熱擾乱に及ぼす影響の解明
 - ② 密度・サイズの異なるナノ粒子が鉄系超伝導薄膜の熱擾乱に及ぼす影響の解明
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
 - ① 化学圧力・キャリア制御技術によるナノ粒子導入RE123薄膜の高 T_c 維持
 - ② 化学圧力・キャリア制御技術によるナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の高 T_c 維持
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加
 - ① 高キャリアがナノ粒子導入RE123薄膜の熱的臨界磁場に及ぼす影響の解明
 - ② 高キャリアがナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の熱的臨界磁場に及ぼす影響の解明
- (5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価
 - ① 高キャリア注入がナノ粒子導入RE123薄膜の J_c 特性に及ぼす影響の解明
 - ② 高キャリア注入がナノ粒子導入鉄系超伝導薄膜の J_c 特性に及ぼす影響の解明

3. 研究の成果

- (1) 母相 T_c や結晶性を低下させずに高密度非超伝導相を導入
 - ① MOD法を用い独自のナノ粒子導入技術(特許第5270176号)を活かし、RE123薄膜の T_c や結晶性を低下させずに、5-10nmの直径を有する BaHfO_3 ナノ粒子を $100 \times 10^{21} [\text{nm}^{-3}]$ 導入することに成功した。
 - ② PLD法を用い独自のナノ粒子導入技術(特許第5757587号)を活かし、鉄系超伝導薄膜の T_c や結晶性を低下させずに、5-10nmの直径を有する BaZrO_3 ナノ粒子を $65 \times 10^{21} [\text{nm}^{-3}]$ 導入することに成功した。
- (2) 高密度非超伝導相導入により磁束の熱擾乱抑制

- ① 高密度なBaHfO₃ナノ粒子を導入するほどRE123薄膜の磁束の熱擾乱が抑制された。
- ② 高密度なBaZrO₃ナノ粒子を導入するほど鉄系超伝導薄膜の磁束の熱擾乱が抑制された。
- (3) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域でも高い T_c を維持
 - ① (Y,Gd)Ba₂Cu₃O_y ((Y,Gd)123)薄膜に変え、酸素熱処理条件(圧力、温度)を制御することで、高キャリア密度と高 T_c を維持することに成功した。
 - ② BaFe₂(As_{0.66}P_{0.33})₂(Ba122:P)のAs/P組成を制御することで、高キャリア密度と高 T_c を維持することに成功した。
- (4) 高キャリア注入技術によりオーバードープ領域で熱的臨界磁場(B_c)増加
 - ① キャリア注入したナノ粒子導入(Y,Gd)123薄膜の B_c を評価した結果、高キャリア密度であるほど B_c が高いことが明らかになった。
- (5) 高キャリア注入したナノ粒子導入超伝導薄膜の J_c 特性評価
 - ① キャリア注入したナノ粒子導入(Y,Gd)123薄膜の J_d の約25%まで J_c を向上させることに成功した。この特性は、本研究の目的である未だ誰も実現していない100 MA/cm²以上の J_c を実現したことになる。
 - ② キャリア制御したナノ粒子導入Ba122:P薄膜は、 J_d の約15%まで J_c を向上させることに成功した。この特性は、従来の薄膜特性の約2倍の特性である。

4. 研究の反省・考察

2019年度に得られた成果は、2019年度内に行われた国際学会10報、国内学会3報で成果報告した。また、新聞発表1報および受賞が1件あった。研究成果としては、3.研究の成果に記した通り計画以上の成果が得られている。

その一方で、2019年度に得られた研究成果をまとめて投稿した学術論文は、いくつかの論文に投稿中や再投稿準備中の状態にあり2019年度内に掲載された論文がないことは反省すべき点である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

投稿中および再投稿準備中

(2) 口頭発表

- ① M. Miura, “Recent results on flux pinning in nanoparticle-doped TFA-MOD REBa₂Cu₃O_y Coated Conductors” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ② G. Tsuchiya, J. Kawanami, **M. Miura**, M. Kiuchi and T. Matsushita “Film thickness dependence of in-field J_c in (Y,Gd)BaCuO+BaMO₃ (M=Zr, Hf) nanoparticle CCs” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ③ K. Miyata, J. Nishimura, S. Anno, **M. Miura**, A. Ibi and T. Izumi “The in-field J_c in RTR-PLD EuBa₂Cu₃O_y+BaHfO₃ coated conductors” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ④ J. Ohta, K. Shimizu, **M. Miura**, A. Ibi, K. Nakaoka and T. Izumi “The influence of carrier density on the in-field J_c of (Y,Gd)BCO+BZO CCs” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ④ T. Furuya, Y. Kamada, K. Sakuma and **M. Miura** “Enhanced critical current density in TFA-MOD (Y_{0.77}Gd_{0.23})Ba₂Cu₃O_y films on CeO₂ buffered R-Al₂O₃ substrates” 32th International Symposium on Superconductivity 2019, December 3-5, 2019, Kyoto, Japan
- ⑤ G. Tsuchiya, J. Kawanami, **M. Miura**, M. Kiuchi and T. Matsushita “Film thickness dependence of in-field J_c in (Y,Gd)BaCuO+BaZrO₃ nanoparticle CCs” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑥ K. Miyata, S. Anno, J. Nishimura, **M. Miura**, A. Ibi and T. Izumi “The influence of BaHfO₃ nanorods on the in-field J_c for RTR-PLD EuBa₂Cu₃O_y CCs” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑦ J. Ohta, K. Shimizu, **M. Miura**, A. Ibi, K. Nakaoka and T. Izumi “The influence of O₂ annealing condition on the in-field J_c of (Y,Gd)BCO+BZO CCs” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland

- ⑧ T. Furuya, Y. Kamada, K. Sakuma and **M. Miura** “The enhanced J_c in TFA-MOD (Y,Gd)BCO+BZO films on $CeO_2 / R-Al_2O_3$ substrates” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑨ T. Harada, G. Tsuchiya, **M. Miura**, K. Tanabe, M. Kiuchi and T. Matsushita “Enhanced J_c in $BaZrO_3$ nanoparticles doped $BaFe_2(As_{0.66}P_{0.33})_2$ films” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑩ K. Sakuma, Y. Kamada, and **M. Miura** “High J_c TFA-MOD-($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ films on CeO_2 buffered $R-Al_2O_3$ substrates” 14th European Conference on Applied Superconductivity, Sep. 1-Sep.5, 2019, Glasgow, Scotland
- ⑪ 土屋豪, 原田工夢, 川浪隼也, **三浦正志**, 木内勝, 松下照男 “ $BaMO_3$ ナノ粒子(M = Hf, Zr) 導入($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ 線材における磁場中臨界電流密度の膜厚依存性” 2019年第67回応用物理学会 春季学術講演会, 2020年3月12日～15日, 上智大学, 東京
- ⑫ 太田順也, 清水一輝, **三浦正志**, 中岡晃一, 和泉輝郎 “酸素アニール温度がTFA-MOD法($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ + $BaMO_3$ 線材のキャリア濃度及び超伝導特性に及ぼす影響” 2020年第67回応用物理学会 春季学術講演会, 2020年3月12日～15日, 上智大学, 東京
- ⑬ 古谷大起, 鎌田哲徳, 作間啓太, **三浦正志** “TFA-MOD法($Y_{0.77}Gd_{0.23}$) $Ba_2Cu_3O_y$ + $BaMO_3/CeO_2 / R-Al_2O_3$ 薄膜の臨界電流密度” 2020年第67回応用物理学会 春季学術講演会, 2020年3月12日～15日, 上智大学, 東京

(3) 出版物
なし

学 校 名	東 京 理 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①再生医療 ②軟骨 ③間葉系幹細胞 ④細胞足場			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 澤 重 仁	理 学 部 第 一 部	嘱 託 助 教	高分子設計、細胞機能評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 塚 英 典	理 学 部 第 一 部	教 授	高分子設計、細胞機能の評価
橋 詰 峰 雄	工 学 部	教 授	細胞機能の評価、材料物性評価
飯 島 一 智	横 浜 国 立 大 学 工 学 部	准 教 授	遺伝子発現解析、免疫染色

新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生

1. 研究の目的

(1) 背景

加齢に伴う軟骨の磨耗により膝関節の炎症・変形が引き起こされる変形性膝関節症の治療は超高齢社会を迎えた我が国における最重要課題の一つである。現在は人工関節への置換が広く行われ、本邦の市場規模は1000億円にも上るが、約9割を海外に依存しているのが現状である。また人工関節は、置換手術後のQOLの低下や、10年～20年で再置換の手術が必要となるなどの問題がある。本研究の目標は、人工関節に替わる自律再生軟骨の開発であり、これにより海外品シェアを国産再生組織製品に移行でき、大きな社会・経済効果が期待される。

組織再生を目指した細胞移植において、近年、再生医療における細胞ソースとして体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞(MSC)が注目を集めている。MSCは患者本人の骨髓液や脂肪組織などから低侵襲に採取し、生体外で増幅することが可能であり、軟骨や骨、脂肪、心筋など間葉系に属する種々の細胞に分化することができるため、間葉系幹細胞を用いた組織再生は広く検討されている。しかし、こと膝関節軟骨組織の再生に関しては、硝子軟骨への選択的分化手法が未だ確立されておらず、大きな障壁となっている。

細胞は細胞足場材料とともに患部へ移植することで組織形成能を制御できると知られている。細胞足場材料に求められる機能は対象とする組織により異なり、関節軟骨においては、線維軟骨化を抑制し、耐摩耗性に優れた本来の硝子軟骨を修復・形成させることが重要で、細胞の分化状態の制御・維持機能が求められる。さらに、膝関節軟骨では移植部位に対して常に大きな負荷がかかるため、十分な力学的強度も必要とされる。申請者らはこれまでに、天然由来多糖のキトサン(CHI)と生体適合性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)からなる化学架橋ネットワークと自己会合性ペプチドRADA16(Ac-RADARADARADA-CONH₂)からなる物理架橋ネットワークにより構造化した、相互侵入高分子網目(IPN)型ゲルを関節軟骨組織再生足場材として開発してきた。これは、化学架橋ネットワークが十分な力学的強度を、物理架橋ネットワークが細胞外マトリックスの構造を模倣することで播種された細胞が高機能化する設計である。CHI/PEG/RADA16 IPNゲル内に軟骨細胞を播種し培養すると、CHI/PEGゲルや軟骨移植用足場材料として臨床応用されているアテロコラーゲンゲルと比べて高いグリコサミノグリカン(GAG)産生と細胞増殖性を示した。ヒト軟骨細胞をIPNゲルとともにマウスへ移植すると、炎症反応はほとんどみられず、アテロコラーゲンゲルと比較して良好なGAGなどの軟骨基質の蓄積がみられ、本IPNゲルの軟骨再生用足場材料としての有効性を示した。さらに、IPNゲル内にてMSCを培養し、軟骨分化挙動を解析したところ、MSCは効率的に硝子軟骨組織に分化していることがわかった。また、ポリ乳酸(PLA)部を組み込んだPEG-PLA-PEGをPEGの代わりに用いることで、組織再生足場材として安全面の観点からも必要な機能である生分解性の付与も達成している。

(2) 目的

本IPNゲルは軟骨組織再生足場材として、臨床応用がなされているアテロコラーゲンゲルと比較しても優れた結果を示している。これが実際の現場で使われる技術となるためには、簡便且つ再現よく本IPNゲルが作成可能であることなど、使い勝手の良さも備える必要がある。よって本年度は、本IPNゲルの社会実装への展望を広げるため、IPNゲルの調製条件、形成過程についての基礎知見や、分解過程のゲルが細胞に与える影響について精査した。

2. 研究の計画

(1) IPNゲルの調製条件、形成過程の評価

IPNゲルの成分であるCHI、PEG、RADA16、CHI溶液について、様々な濃度で調製し、これらを混合した時のゲル化挙動及びCDスペクトルをそれぞれ確認した。また、この実験で決まったゲル前駆体溶液において、CHI、RADA16溶液の濃度はそのまま、PEG溶液の濃度を変化させたものを混合し、ゲル化挙動を比較することで、ゲルの形成過程についても考察した。

(2) 生分解性ゲル中でのウシ膝軟骨細胞の挙動解析

これまでの軟骨マーカー遺伝子発現解析より、生分解性IPNゲル中においてMSCは硝子

軟骨へと分化誘導されていることが示唆されてきた。本年度ではこの分解性 IPN ゲルの効果について、ゲル分解性が MSC の分化を促進するためか、それとも軟骨細胞に分化したのちの組織形成に有利に働くためなのか、掘り下げて考察する。具体的には PLA リンカーにより、生分解性が付与されたゲルとそうでないゲル中でウシ膝軟骨細胞を培養し、細胞の細胞外基質産生量、及び硝子軟骨マーカーの遺伝子発現量を経時的に評価した。

3. 研究の成果

(1) IPN ゲルの調製条件、形成過程の評価

IPN ゲルの調製条件であるが、4 wt%の CHI の 300 mM PBS 溶液と、4 wt%の PEG、1 wt%の RADA16 水溶液を 2:1:1 の体積比で混合して CHI/PEG/RADA16=2.0/1.0/0.25 wt% の前駆体溶液とすることが、ゲル前駆体の粘度、細胞の内包効率、またゲル化までの所要時間の観点から総合的に好ましいことを見出した。この時のゲル前駆体溶液をレオメーターで評価すると、IPN ゲル化に必要な時間は、貯蔵弾性率 G' の変化から 220 秒であり、これは同濃度条件の CH/PEG ゲルの形成時間と関連した (図 1 上)。これは RADA16 の有無によらず CH/PEG が独立にネットワークを形成していることを示唆している。このことは、PEG の含有量を増やして CH/PEG のネットワーク形成を早めると、 G' の変化点も対応して早まることから支持される (図 1 中段、下段)。また完成後のゲルについて CD スペクトルを評価すると、RADA16 ペプチドの β シート由来のシグナル強度が、RADA16 単独ゲルのそれと同じであったことから、CH/PEG の有無によらず RADA16 物理架橋ゲルが形成されていることが確認された。またゲル前駆体混合溶液においては、RADA16 ペプチド単独より G' の初期の値が高く、CHI と PEG のゲルが構築されてゲルが完成することが回転式レオメーターを用いた。この条件においては、ただ溶液を混合するだけ、すなわち one-pot で IPN ゲルが作製可能で、実際に硝子軟骨を形成する足場として有用であることも確認した [S. Ishikawa et al., *Chem. Mater.*, 2020, 32(6), 2353-2365]。

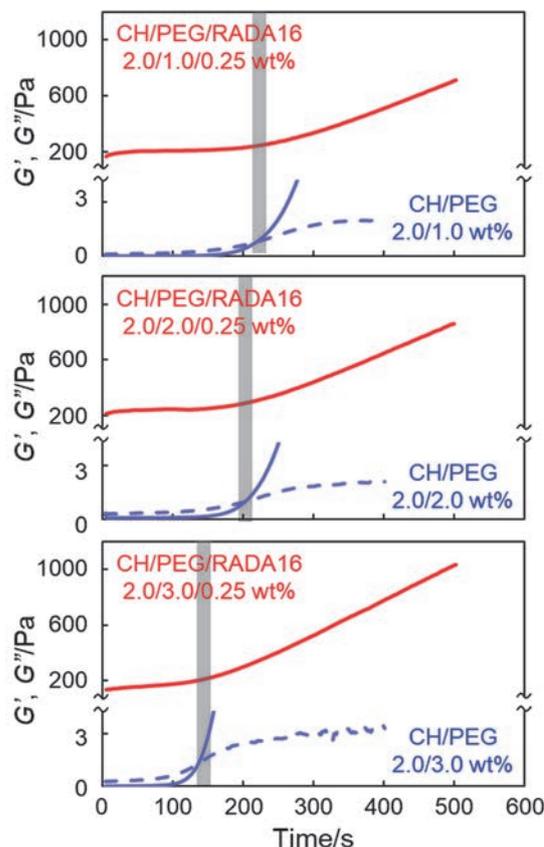


図 1. 回転式レオメーターによるゲル前駆体溶液の動的粘弾性の時間変化の評価。

(2) ゲルへの分解性の付与と軟骨細胞

IPN ゲルは軟骨再生に伴って分解・吸収あるいは代謝され、最終的には間葉系幹細胞より分化した軟骨細胞によって産生された軟骨基質と完全に置換されることが安全性の観点から望ましい。また分解性を持つ足場は、分解により内部空隙が広がることで足場に内包された細胞が産生する ECM 蓄積量を増加させるという点より、組織形成能を高める効果も報告されている [Nicodemus, G. D. et al., *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008, 14, 149-165]。本年は、両末端を官能基化した PEG と加水分解性ポリ乳酸 (PLA) を含む ABA 型ブロック共重合体 (NHS-PEG-*b*-PLA-*b*-PEG-NHS) をゲルの分解性架橋剤として合成し、これを介して CHI を基盤としたゲル CHI/PEG-PLA-PEG を作製し、CHI/PEG と比較評価した。CHI/PEG-PLA-PEG は、CHI/PEG と比較して、大きな重量減少が見られ [S. Ishikawa et al., *Biomater. Sci. and Eng.*, 2019, 5(11), 5759-5769]、またさらに、内包した軟骨細胞のグリコサミノグリカン、コラーゲンといった細胞外基質の生成能が向上することが見出された (図 2)。また、遺伝子発現の評価から、分解性ゲル内で細胞が生産したコラーゲンは硝子軟骨の基質である II 型のコラーゲンであることが見出された。ゲルへの分解性の付与は、安全性のみならず、細胞外基質の産生及び蓄積

を促進し、軟骨細胞からの関節軟骨主要成分である硝子軟骨の形成の促進にも重要であることが見出された。

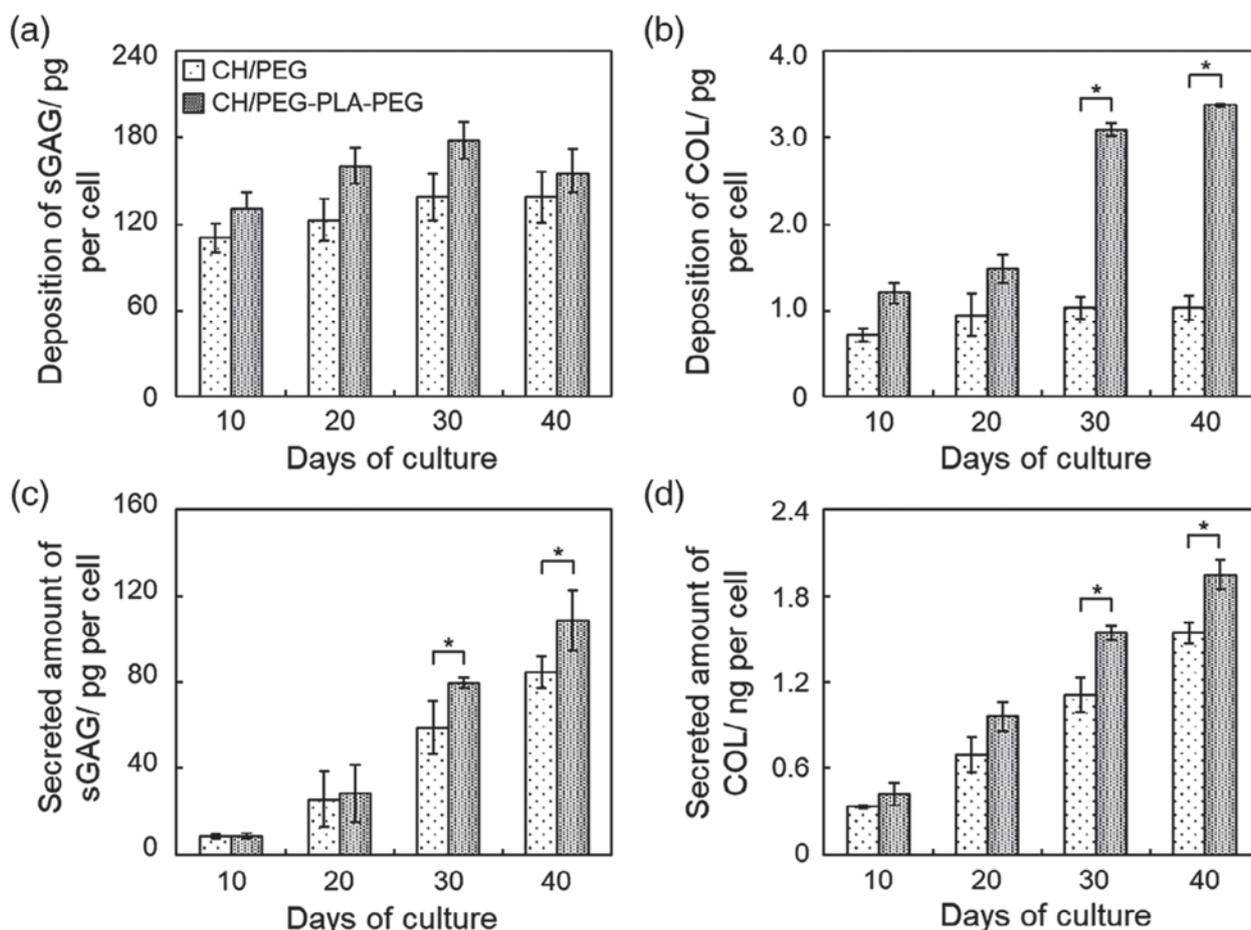


図 2. ウシ膝軟骨細胞の分解性ゲル (CH/PEG-PLA-PEG)、及び非分解性ゲル (CH/PEG) 内の培養にて産生された細胞外基質量。ゲル内に蓄積された(a)グリコサミノグリカン(b)コラーゲン。ゲル外に分泌された(c)グリコサミノグリカン(d)コラーゲン。

4. 研究の反省・考察

これまで、IPN ゲルを用いることによって、間葉系幹細胞から誘導された軟骨が組織構造的にも硝子軟骨であることが確認され、さらに架橋剤への分解性ユニットの導入によるゲルへの分解性付与の検討など IPN ゲルの高機能化についての実証を進めており、本研究は当初の研究計画通り進捗していた。一方、IPN ゲルを汎用性の高いものとするためには、例えば医学部などの外部研究機関で作製しても再現性高くかつ高機能を出すためには、より調製条件、形成過程、ゲル分解に対する細胞応答について深く考察し、いかにノウハウの部分を科学的に説明するかが重要であった。本年度はこの点を特に重視した検討を行い (特筆すべきこととして、これらの成果は国際誌 *Chemistry of Materials* の supplementary cover、*Journal of Applied Polymer Science* の front cover に選出)、IPN ゲルの社会実装への展望を広げることに注力した。今後は、医学部との共同研究により移植前臨床、臨床実験に着手していき (長崎大学医学部、東京大学医学部)、IPN ゲルを用いた軟骨再生の実用化に向けた研究体制を整えていく。本研究の継続により、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, Daisuke Matsukuma, Yukiyo Asawa, Kazuto Hoshi, Shigehito Osawa*, Hidenori Otsuka*. Interpenetrating Polymer Network Hydrogels via a One-pot and in Situ Gelation System Based on Peptide Self-Assembly and Orthogonal Cross-Linking for Tissue Regeneration. *Chemistry of Materials*, 2020, 32, 2353-2364. **Supplementary Cover.**
- ② Shohei Ishikawa, Kazutoshi Iijima, Daisuke Matsukuma, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa*,

Hidenori Otsuka*. Enhanced function of chondrocytes in a chitosan - based hydrogel to regenerate cartilage tissues by accelerating degradability of the hydrogel via a hydrolysable crosslinker. *Journal of Applied Polymer Science*, **2020**, 137(19), 48893. *Front cover*

- ③ Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Kazutoshi Iijima, Michihiro Iijima, Shigehito Osawa*, Hidenori Otsuka*. *N*-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. **2019**, 5(11), 5759-5769.
- ④ Kazutoshi Iijima, Seiko Ichikawa, Shohei Ishikawa, Daisuke Matsukuma, Yusuke Yataka, Hidenori Otsuka, and Mineo Hashizume, Preparation of Cell-Paved and -Incorporated Polysaccharide Hollow Fibers Using a Microfluidic Device, *Biomaterials Science and Engineering*. **2019**, 5(11), 5688-5697.

(2) 口頭発表

- ① 山口紘、石川昇平、大澤重仁、飯島道弘、大塚英典 インシュリン様成長因子を化学固定した IPN ゲルの作製と固定化剤の長さ制御による軟骨細胞機能向上 第 68 回高分子討論会 2019 年 9 月 27 日
- ② 大澤重仁、石川昇平、飯島一智、飯島道弘、大塚英典 加水分解性リンカーを用いたハイドロゲル構築とその分解性が誘起する軟骨細胞足場材としての機能向上 第68回高分子討論会 2019年9月26日
- ③ 石川昇平、山口紘、飯島一智、大澤重仁、飯島道弘、大塚英典 成長因子固定型分解性インジェクタブルIPN ゲル中における軟骨組織再生機能 第68回高分子年次大会 2019年5月31日
- ④ Shigehito Osawa, Yukino Fukuda, and Hidenori Otsuka. Design of cationic glycopolymers and surface coating of nanoparticles for effective cellular uptake through glycoprotein receptor. 第68回高分子年次大会 2019年5月29日

(3) 出版物

- ① Mineo Hashizume, Kazutoshi Iijima, and Yusuke Yataka, “Surface Modification of Polymer Substrates for Hydroxyapatite Coating Using Biomimetic Processes, Chapter 2: Nanostructured Materials -Synthesis, Properties, and Applications” Nova Scientific Publishers, 2019.

学 校 名	同 志 社 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す 統合的研究		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①抗重力筋活動 ②メタボリックネットワーク ③リハビリテーションデバイス ④健康寿命 ⑤脳活動 ⑥活性酸素 ⑦宇宙放射線			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 内 伸 好	理 工 学 部	教 授	抗重力筋活動促進装置の開発

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 平 充 宣	研 究 開 発 推 進 機 構	客 員 教 授	神経・筋の適応機構・抑制策の追究
井 澤 鉄 也	ス ポ ー ツ 健 康 科 学 部	教 授	骨格筋—脂肪組織間のメタボリックネットワークの 解明
櫻 井 芳 雄	脳 科 学 研 究 科	教 授	抗重力活動と脳・神経系関連の追及
加 藤 久 詞	研 究 開 発 推 進 機 構	特 別 研 究 員	骨格筋—脂肪組織間のメタボリックネットワークの 解明
河 野 史 倫	松本大学 健康科学研究科	准 教 授	神経・筋の適応機構・抑制策の追究
大 平 宇 志	研 究 開 発 推 進 機 構	特 定 任 用 研 究 員 学 術 研 究 員	神経・筋の適応機構・抑制策の追究

宇宙生体医工学を利用した健康寿命の延伸を目指す統合的研究

1. 研究の目的

(1) 超高齢社会を迎えた我が国においては、加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）や骨粗鬆症など運動器障害によるロコモティブシンドローム（運動器障害）の増加が見られ、また身体の不活動やエネルギー消費のアンバランスにより糖尿病や高血圧を発症するメタボリックシンドローム（代謝障害）も増加している。それらの予防と改善のためにはこれらの身体諸機能の低下が起こる原因の解明と対処策の構築が必須である。ロコモティブシンドロームの最大の原因は抗重力筋活動の低下・抑制にある。抗重力筋活動抑制は筋萎縮のみならず、脳における遺伝子やタンパク質発現の変化等も誘発するとされている。さらに、抗重力筋などの骨格筋は脂肪組織の代謝と相互作用していることから、骨格筋の萎縮はメタボリックシンドロームやサルコペニア肥満に繋がっている。一方、身体諸機能の低下は宇宙環境滞在などの微小重力環境下で助長されることが分かっており、微小重力環境暴露によってロコモティブ・メタボリック両シンドロームの進展過程が増幅されることも分かっている。すなわち、微小重力環境を利用した研究は、両シンドロームの原因と対応策を追究するうえで格段に優れており、地球上での微小重力の模倣環境下や宇宙空間での身体諸機能を追究する「宇宙生体医工学」を応用することで、地球上における健康長寿の獲得を目指した研究が可能となることから、次の各分野において研究に取り組む。

- ① 生理学：ラットやマウスにおける重力レベルに応じた発育や老化、日常生活における抗重力筋の張力発揮、運動神経活動や代謝活性レベルが、抗重力筋、脳・運動神経の可塑性に及ぼす機構を追究する。老化や身体活動抑制は、生体に悪影響を及ぼす活性酸素産生を助長し、宇宙環境では、長期間飛行中の宇宙放射線被曝も憂慮される問題である。そこで、マンガン・スーパーオキシド・ディスムターゼ (MnSOD) 等を使ったこれらの抑制処方の解明も目指す。
- ② 生化学：骨格筋-脂肪組織間のクロストークを仲介する生理活性物質の発現・分泌に及ぼす抗重力筋活動や不活動、老化が及ぼす影響を追究し、その調節機構の詳細と新規調節物質の同定、ならびに脂肪組織の脱分化・形質転換や体脂肪量・分布を決定する因子を明らかにするための、脂肪由来幹細胞の分化調節に及ぼす影響を解明する。こうした知見から、肥満症の予防や治療（新規運動療法の提案や創薬）に貢献する基盤的知見を提供し、メタボリックシンドロームを防止・抑制する処方策の開発に繋げる。
- ③ 神経科学：抗重力筋活動抑制や運動が脳や神経系に及ぼす影響を解明する。動物の筋活動や運動機能の計測と神経回路の活動を測定する電気生理学および免疫組織化学を組み合わせることで、身体機能と脳機能の相互作用を明らかにし、身体運動の負荷により生じる神経細胞の活動や新生を解析することで、衰えた脳機能を活性化するための身体トレーニング法や新たな運動療法、リハビリテーション方策を提案する。
- ④ 生体医工学：アメリカ航空宇宙局ジョンソンスペースセンター（NASA JSC）保有の重力免荷能動制御システム（ARGOS）や反重力トレッドミル、弾道飛行実験による微小・低重力模擬環境下で、歩行やランニングの実験を行い、ウェアラブルな歩行解析システムを使って、下肢抗重力筋の活動状態と機能発揮状況をより詳細に解明する。下肢抗重力筋に有効な刺激や負荷を与え、足首を積極的に動かすことで、自分の意思で歩行面を蹴ることが可能な自走式トレッドミルを開発し、有人探査時の宇宙飛行士の運動処方や飛行前歩行訓練に役立つ新規トレーニング方法の提案、リハビリテーション処方や装置の開発に繋げる。

2. 研究の計画

- (1) ①②③で行う動物実験による基礎研究での検証と④での歩行解析などによるヒトの活動状況の研究により新規の運動療法や装置の開発を目指す。
 - ① ジェノヴァ大学（イタリア）との共同実験によりヨーロッパ宇宙技術研究センター（オランダ）にて動物用遠心機を用いた実験を行い、過重力負荷に対する生理的特性の適応を追求する。2009-2010年実施の宇宙飛行実験等と同種のマウスを30日間、3-G環境で飼育した場合の各種臓器特性を、1-G環境飼育群と比較する。また、老化促進マウスを用いて、老化、活性酸素産生、X線照射に対する生体反応をMnSOD投与が抑制するか否か追求する。
 - ② ①と共同で作製した3-G負荷マウスの骨格筋組織ならびにADSCに発現するmRNA発現変化をDNAマイクロアレイ法によって網羅的に解析し、3-G負荷に応答する標的候補遺伝子（群）を探索する。さらに、脂肪組織-骨格筋のメタボリックネットワークを仲介する脂肪細胞の新規アディポカインを探索するため、ADSCを脂肪細胞に分化させた後に培地を回収し、2次元電気泳動法によって脂肪細胞から分泌されるタンパク質全体の発現状況に及ぼす3-G負荷の影響を検討する。
 - ③ ①、②と共同で作製する運動負荷装置を用いてマウスとラットに自発的運動を一定時間行わせる。そして運動中と運動前後の抗重力筋の変化をリアルタイムで測定すると同時に運動野と大脳基底核の神経細胞の活動も測定する実験システムを開発する。
 - ④ NASA JSC保有の重力免荷能動制御システム「ARGOS」と申請者らの開発した「ウェアラブルな歩行解析システム」を用いて床反力など周囲環境との相互作用情報の計測を行う。空間的な制約を受けることなく負荷状態や関節角度、表面筋電位に基づく下腿骨格筋群の筋活動量を計測し、生体力学的データ解析を行うことで定量的な運動評価指標となる特徴量を抽出する。

3. 研究の成果

- (1) ①生理学、②生化学、③神経科学、④生体医工学の4つの研究テーマ毎に、個々の成果を導出した。
 - ① ヨーロッパ宇宙技術研究センター（オランダ）での動物実験の予定がジェノヴァ大学の都合で延期となった。ジェノヴァ大学での研究計画や実験マウスの変更について打ち合わせを実施した。その結果、2019年7月に本実験のpre-testとして、15日間連続の3-G負荷を行い、アムステルダム大学（オランダ）で解剖・サンプリングを実施した。足底筋におけるタンパク質発現の分析を進行中である。

老化促進マウスにおける老化に伴う活性酸素産生およびX線照射による生体への悪影響がMnSOD投与で抑制できるか追求する実験も行った。ヒラメ筋における遺伝子発現の網羅的解析から着手した結果、コントロールとしてrMnSODに変えてphosphate-buffered saline (PBS)を投与した群では、実験前に比べて3か月間の実験後には2倍以上発現が増えたり、半分以下に減った遺伝子発現が認められたが、rMnSOD投与により顕著にその数が減少した。老化現象がrMnSOD投与により、抑制されたことが示唆された。しかし、X線照射の影響のみに対する効果については大きな変化がみられなかった。

骨格筋は抗重力活動の抑制で萎縮し、その促進で肥大するが、そのメカニズムを解明する目的で学外の共同研究者たちと長年骨格筋の萎縮・肥大における筋温の影響を追求してきた。2019年には、ブピバカインの注入による筋損傷の回復が温熱刺激で促進する機構に72-kDa heat shock protein (HSP72)が関与するという成果を論文にこぎつけることができた。筋損傷の誘発に伴い顕著にup-またはdown-regulationした遺伝子発現が、温熱刺激で顕著に抑制された。この現象には、損傷筋の毛細管内に発現が増えるHSP72がkey factorとなっているという示唆を得た。

- ② ヨーロッパ宇宙技術研究センターにて作製予定だった3G負荷マウスは、上記によりに実施に至らなかった。しかし、微小重力・過重力環境細胞培養装置 (Zeromo) を使用した研究は概ね順調に進み、ラット皮下脂肪組織から単離したADSCの脂肪細胞への分化能に及ぼす重力の影響を検討した。加えて、9週間の運動トレーニング (TR) を実施したラットから同様のADSCを単離し、重力の影響に対する運動効果も検証した。その結果、微小重力により脂肪細胞への分化が促進するものの、TRを課した個体から得たADSCでは、模擬微小重力による分化能促進効果が消失することを発見した。また、過重力 (3G) はADSCの脂肪細胞分化能に大きな影響を及ぼさない可能性も示唆された。現在、RNA-seq解析を委託しており、ADSCに及ぼす模擬微小重力の影響を網羅的に解析し、標的候補遺伝子を探索中である。こうした成果の一部は、国際学会で発表し、さらに追試を行なった後、論文公表の予定である。

脂肪組織-骨格筋のメタボリックネットワークを仲介する脂肪細胞の新規アディポカイン探索については、運動トレーニングを実施したラット皮下脂肪組織から単離したADSCとマウス由来筋芽細胞株C2C12を共培養した結果、インスリン刺激によるインスリンシグナルの増強がみられた。しかし、2次元電気泳動を実施するまでは至らず、次年度に持ち越すこととなった。この2次元電気泳動法はRNA-seq解析による方法に変更する予定である。

- ③ ラットに自発的運動を一定時間行わせるコンピュータ制御の実験システムを開発した。また、3D深度カメラによりラットの全身運動をリアルタイムで観察し記録すること、および頭部に取り付けた加速度センサーとジャイロセンサーにより頭部の動きを方向と速度も含め詳細に検出することも可能となった。さらに運動野や大脳基底核の神経細胞の活動と抗重力筋の活動を同時計測できる記録システムも開発した。運動負荷装置については、これら実験システムおよび記録システムと組み合わせ可能な装置の設計を進めている。

- ④ NASA JSCとの共同研究をすすめるためにNASA eIRBの承認を受けたが、共同研究契約の途中で契約の見直しが行われ、またJSCの共同研究者の担当部署異動などの要因が重なり、それ以降契約が進んでいない。低重力環境を模擬可能な「反重力トレッドミル Alter-G」を使用した低重力環境下の歩行状態をウェアラブル計測装置によって計測し、歩容の変化と下肢抗重力筋の活性化度を実験運動解析とシミュレーションによって明らかにした。

低重力環境下で下肢三頭筋の筋活性度が低下することが確認されたので、計画通り自走式トレッドミルを試作し運動計測と表面筋電位計測を実施して、抗重力筋に及ぼす影響を検証した。負荷を制御することにより、下肢三頭筋の活性度が向上することが明らかとなった。検証結果に基づき、スプレッド型のトレッドミルをシングルベルト型に改良し適切な負荷制御法を検討する。

NASA-JSCの「ARGOS」の使用に係わる契約が進まないため、上下方向と進行方向に自由度を有する重力免荷能動制御システムの開発に着手した。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究プロジェクトは学内において運営委員会をおき、自己評価、外部評価をふまえ研究の進捗を点検、次年度の計画に反映させる体制をとっており、研究計画の変更などにも応じた研究のマネジメントを実施している。

今年度は、生理学チームとジェノヴァ大学 (イタリア) の共同研究の予定が大きく変更となった。これはジェノヴァ大学と共同でヨーロッパ宇宙技術研究センター (オランダ) にて実施予定であったマウスの実験の実施時期をイタリア側が延期することになったことが要因である。しかしながら、ジェノヴァ大学への出張を経て、計画の見直しを行い、共同実験のメンバーであるアムステルダム大学 (オランダ) での解剖とサンプリングを実施することができた。当初予定のヨーロッパ宇宙技術研究センターの施設を利用した共同実験については、新型コロナウイルス感染症の影響等で実施の目途がたたない状況であるが、海外連携機関とは情報交換を引き続き実施し、国内でオス Wistar Hanover ラットにおける老化および身体活動現象に伴う活性酸素産生増大による生体諸機能への悪影響の抑制が、骨格筋等の特性に及ぼす影響を追求する。

また、NASA-JSC との共同研究の実施についても、上述の状況で計画変更が必要になっている。当初の計画から研究の遅れが懸念されるが、NASA-JSC での実験に替えて、国内での負荷制御の実験に対応する重力免荷能動制御システムの開発に着手するなど、多方面から研究の方法を検討する機会となった。

新型コロナウイルス感染症拡大の影響により、海外研究機関に出向いて実験する方法は、次年度においても厳しい状況が続くことが懸念されるため、国内での研究に重点を置き、プロジェクト内の成果の導出につなげる予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①

Ohno, Y., T. Egawa, S. Yokoyama, H. Fujiya, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, and K. Goto. MENS-associated increase of muscular protein content via modulation of caveolin-3 and TRIM72. *Physiol. Res.* 68: 265-273, 2019.

Kami, K.*, T. Ohira*, Y. Oishi*, T. Nakajima, K. Goto, and Y. Ohira. Role of 72-kDa heat shock protein in heat-stimulated regeneration of injured muscle in rat. *J. Histochem. Cytochem.* 67: 791-799, 2019.

②なし

③

Takamiya, S., Yuki, S., Hirokawa, J., Manabe, H. and Sakurai Y. (2019) Dynamics of memory engrams. *Neuroscience Research*, In press.

Song, K., Takahashi, S. and Sakurai, Y. (2019) Reinforcement schedules differentially affect learning in neuronal operant conditioning in rats. *Neuroscience Research*, In press.

Yuki, S., Sakurai, Y. and Okanoya, K. (2019) The utility of internal cognitive states as discriminative cues affecting behavioral adaptation in humans and animals. *Animal Behavior and Cognition*, 6(4), 262-272.

Nakazono, T., Takahashi, S. and Sakurai, Y. (2019) Enhanced theta and high-gamma coupling during late stage of rule switching task in rat hippocampus. *Neuroscience*, 412, 216-232.

Murata, K., Kinoshita, T., Fukazawa, Y., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Miyamichi, K., Okuno, H., Bito, H., Sakurai, Y., Yamaguchi, M., Mori, K and Manabe, H. (2019) GABAergic neurons in the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice. *Scientific Reports*, 9(article7132), 1-14.

Ohnuki, T., Osako, Y., Shiotani, K., Sakurai, Y. and Hirokawa, J. (2019) Single-neuron and population codings in a higher-order cortical area. *The Proceedings of the 29th Annual Conference of the Japanese Neural Network Society*, pp.89-90.

④

北野敬祐、伊藤彰人、辻内伸好「慣性センサを用いた前腕および手指運動計測システムの開発」
[設計工学, Vol.54, No.4 [DOI:10.14953/jjsde.2018.2815], (2019年4月) 231~244頁]

H.Oshima, S.Aoi, T.Funato, N.Tsujiiuchi and K.Tsuchiya “Variant and Invariant Spatiotemporal Structures in Kinematic Coordination to Regulate Speed During Walking and Running” *Frontiers in Computational Neuroscience*, Vol.13 [DOI:10.3389/fncom.2019.00063], (2019.9), pp.1~11

(2) 口頭発表

①

Ohira, Y. Neuromuscular responses to gravitational load levels. Doshisha Week, Tubingen University, Germany, November 25, 2019. (招待講演)

大平充宣、同志社宇宙 DREAMプロジェクト、第 65 回日本宇宙航空環境医学会大会、特別セッション SS-1、2019年11月30日、松本大学、2019 (招待講演)

②

加藤久詞、前田優希、大澤晴太、大平充宣、井澤鉄也、脂肪由来間葉系細胞の脂肪細胞への分化能に及ぼす微小重力および運動の影響、第 65 回日本宇宙航空環境医学会大会、特別セッション SS-3、2019年11月30日、松本大学、2019 (招待講演)

Kato H., Osawa S., Imai K., Takakura H., Ohira Y. and Izawa T. Effect of exercise training on neurogenesis of adipose-derived stem cells isolated from fat-depot in high-fat diet-fed rats. *Cell Symposia: Exercise Metabolism Conference 2019*, Stiges, Spain, May 5-7, 2019.

井澤鉄也、脂肪組織の質と量を転換させる運動療法の分子基盤、第 74 回日本体力医学会大会、つくば国際会議場 (茨城)、2019年9月19-21日 (招待講演)

加藤久詞、大澤晴太、只野愛美、前田優希、高倉久志、井澤鉄也、運動トレーニングに伴う体重・体脂肪量調節に及ぼすメラトニンの影響、第 74 回日本体力医学会大会、つくば国際

会議場（茨城）、2019年9月19-21日

Ohira, Y., Y. Ozaki, H. Kato, and T. Izawa. Effects of inhibition of reactive oxygen species on the properties of rat soleus muscle during hindlimb suspension. Doshisha Session in the 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology, May 27, 2019, Nagoya University, Japan, 2019. (招待講演)

③

櫻井芳雄・宋基燦 (2019) ラットの身体運動と脳神経活動それぞれを増強する条件づけ訓練、第65回日本宇宙航空環境医学会大会、松本大学（長野県・松本市）、2019年11月30日

櫻井芳雄 (2019) 心を知るために神経細胞の活動を記録する－文魂理才の脳研究、滋賀大学データサイエンス学部文理融合探求ワークショップ/データサイエンスセミナー、彦根 (2019年11月15日)

櫻井芳雄 (2019) セル・アセンブリの実験的検出－なぜ、どのようにして、玉川大学先端セミナー、町田 (2019年10月28日)。

Sakurai, Y. (2019) Brain freedom from body: Enhancement of neuronal activity by brain-machine interface (BMI) in the rat. 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology (ISGP). 名古屋大学野依記念ホール（愛知県・名古屋市）、2019年5月27日

(3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	光 — 化学エネルギー変換デバイスの材料設計 — 半導体工学と電気化学の協奏 —		研 究 分 野 工 学
キ ー ワ ー ド	①エネルギー変換 ②半導体工学 ③電気化学 ④太陽電池 ⑤化学電池 ⑥バンド構造		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
荒 木 努	理 工 学 部	教 授	研究代表者総括 半導体材料設計

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
稲 田 康 宏	生 命 科 学 部	教 授	実験 放射光測定
今 田 真	理 工 学 部	教 授	データ整理 界面反応機構の解析
滝 沢 優	理 工 学 部	教 授	データ整理・論文作成 界面電子状態の理論的解析
折 笠 有 基	生 命 科 学 部	准 教 授	実験・論文作成 電気化学測定
片 山 真 祥	総合科学技術研究機構	准 教 授	実験 材料合成

光－化学エネルギー変換デバイスの材料設計

－半導体工学と電気化学の協奏－

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

再生可能エネルギーは発電量が一定でなく、発電比率の劇的な向上が難しい。そのため、蓄電池を利用し、発電した電力を貯蔵することや、水素エネルギーに変換する技術開発が進んでいる。太陽光発電の場合は、光→電気→化学エネルギーへとエネルギーを変換する。一般に、エネルギー変換効率は100%ではなく、ロスが生じるため、変換の回数は少ないことが望ましい。そこで本研究では、光エネルギーから化学エネルギーに直接変換可能なデバイスを実現し、再生可能エネルギーの劇的な普及の端緒となることを目的とした基礎研究を行う。

光－化学エネルギー変換の現象自体については1983年にTributschが報告しており、光エネルギーを駆動力として、イオンの挿入脱離反応が発現することが知られている[1]。しかし、この分野の研究は、光－電気エネルギー変換（太陽電池）、電気－化学エネルギー変換（電池）と比較すると、顕著な研究の発展に至ってはいない。近年では、電池材料の研究成果を利用した、光エネルギーによる電池の直接充電が報告されるようになったが、その変換効率は1%に満たず、充電時間が十数時間必要とされる[2]。従って、変換効率と入力特性を劇的に向上させる新たなアプローチが必要である。

(2) 本研究の特徴

光エネルギーの工学的利用には、太陽電池の研究を代表とする「半導体工学」の基礎学理が必須であり、化学エネルギー利用では、電池関連を取り扱う「電気化学」の研究が求められる。そこで本研究では、それぞれの分野で専門知識を有する研究者が共同して光－化学エネルギー変換のブレークスルーを目指す。ブレークスルーを引き起こすために、電池を構成する正極・負極をどちらも光エネルギーによって応答する材料を見だし、「ダブルアシスト」型の光充電機構を実現させる。従来型の光－化学エネルギー変換デバイスでは、正極・負極どちらか一方の電極を光エネルギーにより、イオンを挿入脱離させることで、充電反応を発現させていた。電池反応では、正極・負極どちらも、イオンの挿入脱離反応が進行して初めて充電反応が実現する。そのため、光エネルギーによる駆動力を片方の電極のみに与えても、別の電極での反応に駆動力が無ければこれが律速反応となる。この仮説を検証して、作動原理を明らかにした上で、光エネルギーによる充電反応の高効率化と高入力特性を実現させる。

(3) 本研究の概要

本研究では次の3項目から構成される。1) 既存材料を用いて光－化学エネルギー変換の発現機構を、半導体工学の考え方に基づいて検証する。特に、電極材料のバンドギャップに着目して整理する。これはデバイス設計のために必要不可欠な基盤情報となる。2) 光エネルギーを駆動力とするイオンの挿入・脱離反応の変換効率と入力特性を、単極の場合と、二電極による場合で比較する。「ダブルアシスト」型の原理検証を行う。3) 光－化学エネルギー変換の反応場である電極・電解質界面における電子構造を解明した上で、更なる反応速度の向上を目指す。上記で得られた研究成果により、実用面では、光－化学エネルギー変換による新規デバイスの実現、学術面では、半導体・イオン伝導体界面の新しい科学の創出につながることを期待できる。光エネルギーによる充電反応が実用化されると、資源の乏しい我が国の社会・産業面に有益な、環境負荷の小さい低コストなエネルギー貯蔵が実現できる。

[1] H. Tributsch, *Solid State Ionics*, **9-10**, 41-58 (1983).

[2] A. Paolella *et al.*, *Nature Comm.*, **8**, 14643 (2017).

2. 研究の計画

(1) 本研究の基盤となる、モデル試料の作製とキャラクター化、電気化学測定データを取得するとともに、リチウム対極を用いて、単一電極の光充電に関する情報を取得し、光－化学エネルギー変換の発現機構を、半導体工学の考え方に基づいて検証する。

①モデル試料の作製

キャリアイオンとしてリチウムイオンを用い、挿入・脱離が可能なホスト構造を電極材料として用いる。充電反応では正極にリチウムイオンが挿入し、負極から脱離する。n型半導体の場合、光エネルギーによりリチウムイオンが挿入し、p型半導体の場合、脱離する。したがって、n型半導体を正極、p型半導体を負極に用いる。既存のリチウムイオン電池材料系を参考にし、酸素欠損型の LiMn_2O_4 をモデル正極、ボロン置換のシリコンをモデル負極として電極を作製する。反応場は電極・電解質界面であり、反応を正確に規定するために、薄膜モデル電極を作製する。

②試料のキャラクタリゼーション

作製した薄膜試料は、X線回折測定による結晶構造解析、X線光電子分光およびX線吸収分光測定による電子構造解析、透過型および走査型電子線顕微鏡による形態観察、ホール測定とゼーベック測定によるn型-p型半導体の判別と移動度の計測、光吸収測定によるバンドギャップの算出を行い、それぞれの基礎物性を測定する。

③薄膜試料の電気化学測定

薄膜試料の電気化学測定を行う。3極式のセルをアルゴン雰囲気下のグローブボックスで作製する。対極、参照極はリチウム金属、電解質に LiPF_6 をカーボネート系の有機溶媒に溶解した液体を用いる。サイクリックボルタモグラム、定電流充放電測定により、リチウムイオン電池としての特性を計測するとともに、間欠充放電測定や交流インピーダンス測定により、リチウムイオン拡散係数や熱力学パラメーターの情報を得る。

④光充電の特性試験

光透過型の3極式セルを新たに設計する。電位と電流をモニターしながら、キセノンランプによりモデル電極の光応答性を計測する。光-化学エネルギー変換における入力特性と変換効率の解析方法について、一連の測定・解析手法を確立する。

3. 研究の成果

(1) モデル試料の作製

計画を大幅に上回る種類のモデル試料を作製して、その効果を検証した。より具体的には酸素欠損型 LiMn_2O_4 やp型シリコン単結晶以外にも、色素混入型 LiFePO_4 、n型半導体の MoS_2 を作製した。

(2) 試料のキャラクタリゼーション

作製したモデル試料について、X線回折測定等により、基本的なキャラクタリゼーションを行った。

(3) 試料の電気化学測定

電気化学測定により、リチウムイオンの挿入脱離挙動について検証した。

(4) 光充電の特性試験

①測定系の確立

光透過型の3極式セルを新たに設計した。また、キセノンランプを用いた実験系を新たに組み上げて、光充電反応が検証できるシステムを確立した。

②各種試料の測定

電位と電流をモニターしながら、キセノンランプによりモデル電極の光応答性を計測した。電解質にリチウムイオンを含むセルを用いて、正極・負極に挿入脱離しない金属板上では、光応答が観測されないことを確認した後に、各モデル電極の光応答性を検証した。その結果、p型シリコンでは、光照射時に明確な応答を示す電流が観測された。一方で、 LiMn_2O_4 では、観測された電流値は一桁程度小さい値であった。

③光充電試料のキャラクタリゼーション

光応答電流の反応機構解析を立命館大学SRセンターでのX線吸収分光測定により実施した。より大きな電流が観測されたp型シリコンにおいては、光照射のみでリチウムがシリコンとの合金化反応を進行させていることを明確に示した。一方で、より光電流が小さかった試料については、リチウムイオンの明確な寄与が確認できなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) 光充電のメカニズム

本研究では、光照射により、電極・電解質界面における電荷移動反応が進行して、光充電反応が可能であることを実証した研究として、非常に有用である。そのメカニズムを図1に示す。p型半導体のシリコンと電解質の界面においては、異なるフェルミ準位の差を埋めるようにバンドの屈曲が起こる。この状態で光が照射されると、励起された伝導帯中の電子と電解質中のカチオンによる電荷移動反応が進行して、半導体中にリチウムイオンが挿入される。今回、リチウムイオンの反応を検出した X 線吸収分光では、測定する深さ領域はサブマイクロメートル以上あり、これはキャパシターの反応ではない。したがって、本研究では、シリコン電極の光充電を初めて実証したケースであり、その研究手法は今後のデバイス創製へ向けて極めて有用である。

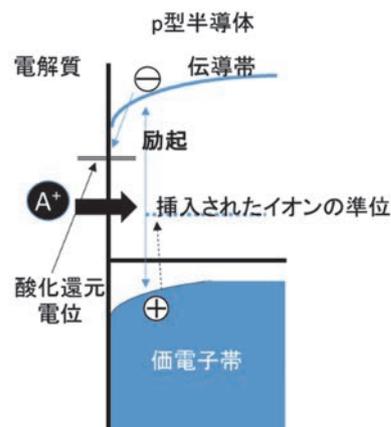


図1 p型半導体と電解質の界面における描像

(2) 今後の課題

本研究では、革新的なデバイスの構築をターゲットにして、光エネルギーから化学エネルギーへの直接変換反応の実証を行った。本研究結果から、リチウムイオン電池シリコン負極における明確なリチウム合金化反応が検出された点は、極めて有用な成果であると言える。しかしながら、この反応は、一般的な認知度が低く、研究を継続する審査過程においては残念ながらその有用性が認められなかった。今後は、本研究の先駆性と、理論面の強固なサポートをよりわかりやすく説明して、この現象の認知度を広めることが重要であると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ①Nur Chamidah, Yuki Orikasa, “Electrochemical Response in Photo-charging for Lithium-ion Battery” The 8th International Conference of The Indonesian Chemical Society, 2019年8月
- ②S. Mouri, Y. Komichi, K. Shinokita, K. Matsuda, and T. Araki, “Photoluminescence Properties of MoS₂/GaN Hetero Structure”, Recent Progress in Graphene & 2D Materials Research (RPGR 2019), 2019年10月
- ③Nur Chamidah, Yuki Orikasa, “Electrochemical Response in Photo-charging for Lithium-ion Battery using LiFePO₄ and Si Semiconductor” The 10th Asian Conference on Electrochemical Power Sources, 2019年11月
- ④Nur Chamidah, 折笠有基, “Electrochemical Response in Photo-assisted Lithium-ion Battery”, 2019年度 第3回 関西電気化学研究会 2019年12月

(3) 出版物

なし

学 校 名	大 阪 成 蹊 短 期 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①動物繊維 ②ケラチン ③ナノファイバー ④生体材料 ⑤再生繊維			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澤 田 和 也	生 活 デ ザ イン 学 科	教 授	研究全般の実施と総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 里 俊 哉	大 阪 工 業 大 学 工 学 部	教 授	ナノファイバー物性評価と組織親和性評価

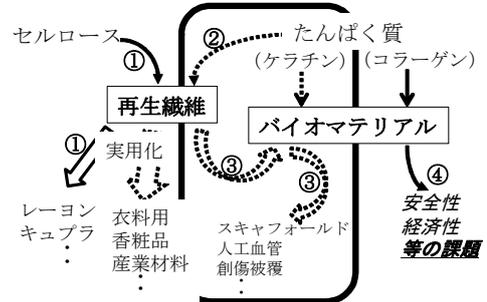
動物毛由来の再生繊維を利用した生体材料への応用

1. 研究の目的

(1) 研究背景

再生繊維は構成成分に由来する特性を活かしつつ、さらに種々の付加価値を付与することが可能となるため、天然繊維そのもの比べて応用価値は高い。下図に示す通り、現在のところ再生繊維としての実用化は植物由来のセルロースが主である（下図①参照）。

一方、動物由来タンパク質は、一部で研究例があるものの、実用的な応用には至っていない。特に、（紡績・製織時の）羊毛屑や毛髪は大量に廃棄されており、殆どリサイクルされていない。そこで、本申請者はそれらの有効活用を目指し、動物繊維である“羊毛”から構成タンパク質のケラチンを抽出し、エレクトロスピニング法によりナノファイバーとして再生繊維化する検討を実施した（右図②）。また、抽出ケラチンをフィルムや多孔質スポンジへと加工し、ナノファイバーと共に、バイオマテリアル応用化を検討した（図中③）。



本申請課題の研究対象領域（太枠部分）
（原料素材を羊毛からヒト毛へと変換させて挑戦）

一連の研究により得られた成果は、既に国内外の学術論文および学会にて報告を終えている。本申請者が、一連の当該研究テーマに着想した経緯には、廃棄される動物繊維タンパク質のリサイクルという意味合い以外に、バイオマテリアル応用した際の、汎用素材（コラーゲン）と比較した場合の生体に対する高い安全性が挙げられる。コラーゲンは生体を構成する構造タンパク質であり、優れた生体親和性を示す反面、BSE等による安全性の危惧、複雑な精製工程、高コスト等の課題を有する（図中④）。

一方、同じく構造タンパク質であるケラチンを成分とする動物毛は、非血管性由来でありBSEの危険性が無い。さらに、ケラチンは細胞接着性因子として知られるアミノ酸配列を分子内に複数セグメント含んでおり、細胞との高い親和性も有する。加えて、安価で大量に安定入手が可能ということも特筆すべき利点である。

(2) 先行研究と比較した本研究の特徴

これらの特性を活かし、本研究では本申請者の先行研究成果を発展させる。即ち、上図中の②及び③部分において、原素材を“羊毛”から“ヒト毛髪”へと応用すること、及び抽出手段を“酸化的”から“還元的”へと応用展開する（下表参照）。原素材にヒト毛髪を用いることで得られる利点（下表中⑤）は、異種（羊）由来から同種（ヒト）由来の材料となることで移植時の生体への安全性が飛躍的に高まることである。さらに、“酸化抽出ケラチン”が天然構造から変性しているのに対し、“還元抽出ケラチン”は天然構造に近い。その結果、生理学的特性の維持や、化学架橋を施すことなく力学的特性を再現できる利点も有する。一方、解決すべき課題も生じる。羊毛とヒト毛髪では含有アミノ酸組成差も大きく、色素含有の有無も異なる。また、年齢・性別・人種等による相違も想定され、それらは溶媒への溶解性や物性への影響とも深く関わっていると想定される。従って、上記利点を得るためには、それらの影響を幅広くスクリーニングすることが必要となる（表中⑥）。尚、本研究では応用対象がバイオマテリアルであることを勘案し、生体構造と同じくナノスケールで構造制御が可能な、ナノファイバー作成に焦点を絞った検討を実施する。

	ターゲットとする 応用分野	素材原料	抽出手段	利点	課題
現在までの研究	スキヤフォールド (バイオマテリアル)	羊毛	酸化的	⑤	⑥
本申請課題研究		ヒト毛髪	還元的		

2. 研究の計画

(1) 達成目標

当該年度の達成目標は、“ヒト毛髪”から“還元的”に精製抽出されたケラチンを利用し、エレクトロスピニングにより形成された成型物の物性評価と生体材料化の可能性を評価することである。その応用化ターゲットとして、癒着防止膜にターゲットを絞った。

(2) 研究項目

今年度実施した項目は以下の通りである。

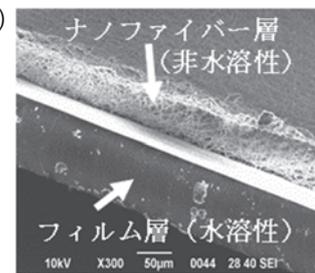
- ① 異種類ヒト毛髪ケラチンを用いたエレクトロスピニングにおける条件パラメータの設定
- ② 作成ナノファイバー（フィルムを含む積層膜）の物性評価とそれを受けた改善検討
- ③ ナノファイバーシート（積層膜）の生体親和性評価（in vivoおよびin vitro）

3. 研究の成果

上記研究項目について検討を実施した成果は以下の通りである。

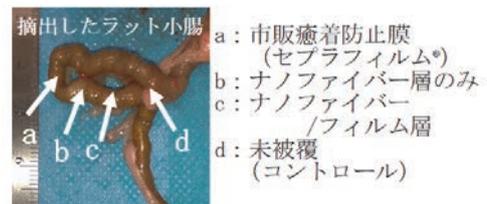
①について：研究開始当時の当初予定から実施内容を一部変更し当該項目を追加で実施した。その経緯は、研究の進捗に伴い応用化対象を具体的に絞り込んだことが挙げられる。本申請者の先行研究で得られた羊毛由来の酸化抽出ケラチンによる応用化(人工血管、創傷ドレッシング材等)に対し、本研究で得られたヒト毛髪由来還元抽出ケラチンの特性は、細胞接着性や増殖性において異なることが判明した。そして、その特性を活かしたバイオマテリアル応用例として、癒着防止膜への応用展開に着想した。その応用展開に向け、本年度に実施した当該項目では、細胞との接着性に差をつけるため、ナノファイバーに配向性を持たせ、異方性を持つナノファイバーの積層化を達成した。同様に、ナノファイバーとフィルムの積層化も達成した。

②について：当該項目では、力学特性を中心に積層膜の物性評価を行い、①にフィードバックしながら物性の向上を図った。具体的には、癒着防止膜としてハンドリングと強度を評価の対象とした。ナノファイバー、フィルム単独での特性と、それらの複合化の際の差異について力学試験を中心にデータを蓄積した。(データ詳細は、論文化のために省略) 右写真はそれの検討を行い制作した複合体の一例であり、膜厚の調整、組成の調整を行い、後述するように癒着防止膜として最も優れた効果が得られたナノファイバー/フィルム積層膜の例である。



③について：両表面の特性に変化を持たせることが、強度・分解・細胞親和性の観点から癒着防止膜に有効であった。この検討と並行して、(D)に相当するナノファイバーやフィルム上での繊維芽細胞を用いた細胞培養評価では、概ねフィルム層では細胞接着性が高い一方、ナノファイバー層ではそれが低く表面形体の変化で細胞増殖性を制御することも可能であった。これら in vitro での基礎データとの相関を検証するため、同じく(D)に相当する事項として、ウイスター(WI)系ラットを用いた in vivo 評価の一部を先行実施した。

右写真は、ラット小腸に対し癒着モデルを作成し、創傷部を種々の被覆材で覆い、所定期間後に摘出した例である。ナノファイバー層のみ(b)、及びコントロール群(d)で強い癒着が認められる。一方、ナノファイバー/フィルム積層膜(c)を被覆した創傷部は、市販癒着防止膜(a)に匹敵する癒着防止効果を示した。



このように、当該年度の成果として得られたことは、ヒト毛髪由来ケラチンから作成した積層膜が癒着防止膜として有効である可能性を示す基礎的知見である。今後、ナノファイバーやフィルムの分解性制御や物性コントロール等を実施すると共に、生体反応を詳細に評価する必要がある。

4. 研究の反省・考察

現時点までに得られたデータは、癒着防止膜に応用化可能か否かの基礎判定に用いるだけのデータに過ぎない。今後、更に詳細に評価するために必須なことは以下の事項である。

① 膜構造と癒着防止効果の関連性

現時点では、結果的に良好な成果が得られたまでの内容に過ぎず、その考察が不十分である。膜厚、膜の表面微細構造、膜の分解性、等、癒着防止に関連するパラメーターの影響を系統的に評価していく必要がある。

② 組織学的評価

現時点での癒着防止評価は、目視的な判定のみであり、不十分である。その正しい評価のためには、組織学的評価を行い、免疫組織染色により内膜の再生過程を追跡していく必要がある。

以上の反省点は、2020年度研究検討項目において取り入れ、改善を図る。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 再生医療用材料としての動物由来タンパク質、澤田和也、藤里俊哉、*繊維機械学会誌*、**72(7)**, 459-73, 2019

(2) 口頭発表

- ① Kazuya Sawada, Yuya Tanaka, Toshiya Fujisato, Biological Fiber Processing Utilizing Supercritical Fluid, ATC-14 (Shaoxing/Hangzhou, China), 2019.9.26-29
- ② Kazuya Sawada, Yuna Kume, , Toshiya Fujisato, Fabrication of an Antiadhesive Material Using Human Hair Kerati, TERMIS AM (Orlando), 2019.12.2-5
- ③ 岸田晶夫、藤里俊哉、澤田和也、生体組織の超臨界流体処理とその組織工学への応用、生体医工学共同研究拠点 成果報告会、新型コロナウイルスの影響にて要旨の発刊のみ。P. 14
- ④ 平井彩香、澤田和也、藤里俊哉、動物毛由来ケラチンタンパクを用いた癒着防止膜、ライフサポート学会、新型コロナウイルスの影響にて要旨の投稿のみ

(3) 出版物

なし

学 校 名	工 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	不活性化酵素、偽遺伝子からの活性化酵素の作成 —酸性キチナーゼの構造、活性と進化—		研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①酸性キチナーゼ ②不活性化酵素 ③偽遺伝子 ④活性化酵素の作成			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 山 文 隆	先進工学部生命科学科	教 授	研究代表者、統括、組換えタンパク質のベクターの構築、発現

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 口 政 吉	先進工学部生命化学科	准 教 授	組換えタンパク質の精製・酵素化学的解析

不活性化酵素、偽遺伝子からの活性化酵素の作成 —酸性キチナーゼの構造、活性と進化—

1. 研究の目的

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、カニなどの甲殻類、昆虫、真菌類などの多様な生物 (これらをキチン含有生物と呼ぶ) の主要な構成成分である。このため、キチンは、セルロースの次に豊富に存在するバイオマスである。

昆虫は、良質なタンパク質、脂質、糖質、そして様々なミネラルに富むので、高栄養価である。そのため、現在、世界的に「昆虫の飼料化」が注目されている。しかし、キチン含有生物を家畜飼料として利用する試みは進んでいない。これは、昆虫の主要な構成成分のキチンが、動物体内で、難消化性の食物繊維である、と長い間考えられてきたことによる。

ヒトとマウスは内在性のキチンを持たないが、キチンを加水分解する酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia; 別名称 acidic mammalian chitinase, AMCase) を発現している。最近、研究代表者らは、マウス、ブタ、ニワトリ (雑食性動物) の胃で、Chia タンパク質が多量に発現し、胃や腸の条件下で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し、キチンを、炭素、窒素そしてエネルギー源である (GlcNAc)₂ へと分解することを報告した [Ohno et al., (2016) *Sci Rep.* 6, 37756; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 6662; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 12963]。これに対し、イヌ、ウシなどの肉食性と草食性動物の Chia は、雑食性動物の Chia と比べ、キチンの分解活性がとて低かった (図1)[Tabata et al., (2018) *Sci Rep.* 8, 1461]。さらに、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマでは Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた (Tabata et al.,未発表データ)。

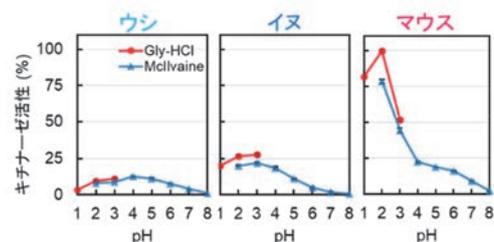


図1. ウシ、イヌ Chia のキチナーゼ活性測定。縦軸はマウス Chia の値を 100% とした相対活性。

これまでの研究で提示された問題点は以下の 2 点である。

- ① イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia のキチナーゼ活性は、なぜ低いのか？
- ② 肉食性動物のネコ科で見つかった Chia の偽遺伝子化の意義はなにか？

研究代表者らのこれまでの研究で提示された問題は、「肉食性と草食性動物における Chia の不活性化と偽遺伝子化」である。本研究は、「不活性化酵素、偽遺伝子からの活性化酵素を作成し、Chia の不活性化、偽遺伝子化のメカニズムを明らかにする」ことを目標とする。以下の 2 項目を研究した。

研究項目①：キチナーゼ活性の低いイヌ (肉食性動物) あるいはウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする。

研究項目②：活性化 Chia の遺伝情報を参考に、Chia の偽遺伝子から活性化キチナーゼを作成し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする。

2. 研究の計画

研究項目①：マウス、ウシ、イヌの Chia の一次構造は、同一性が 79-80% で、良く似ている。しかし、ウシ、イヌ Chia のキチナーゼ活性は、マウスのそれぞれ 1/10、1/4 であり、不活性化していた (図1)。そこで、活性の高いマウス Chia と活性の低いウシあるいはイヌ Chia 間で 6 種類のキメラ体を作製した (図2)。キメラ体の構造と酵素活性の関係から活性低下に関わる領域を絞り込み、アミノ酸置換体を導入することで原因アミノ酸を同定した。そして、肉食性動物全体で、Chia 遺伝子におけるそのアミノ酸の保存性を検討した。

研究項目②：活性が高いマウス Chia の遺伝情報を参考に、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマの Chia 偽遺伝子から活性化 Chia 酵素の作成を試みた。

3. 研究の成果

研究項目①：キチナーゼ活性の低いイヌ (肉食性動物) あるいはウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする

1. イヌ Chia の活性化

今年度はイヌ Chia について研究を進めた。

イヌ vs. マウスのキメラタンパク質 6 種 (図 2) を大腸菌で発現した。活性の高いマウス Chia の配列を、イヌ Chia に導入することで、イヌの Chia を活性化させ、活性低下の原因を同定することを試みた。

イヌ Chia およびその C 末からエクソン 8-12 をマウスに交換したキメラ体 (キメラ 4、5) では活性が上昇しなかったが、エクソン 6-7 がコードする領域を組換えさせたキメラ 6 ではキチナーゼ活性が上昇した (図 3)。

逆に、活性が高いマウス Chia にイヌのエクソン 6-7 がコードする領域を導入したキメラ体 (キメラ 3) では活性が低下した (図 3)。

以上のことから、イヌ Chia のエクソン 6-7 がコードする領域が不活性化の原因であることが分かった (図 3)。

2. イヌ Chia 不活性化アミノ酸の同定

原因領域をさらに絞り込むため、40 種類以上のキメラ体と変異体を作製し、解析を行った。イヌ Chia は、マウスのエクソン 6-7 コード領域上の 13 アミノ酸の導入により活性化した。数アミノ酸に絞り込むため、多数の変異体の作製、解析を行い、7 アミノ酸へと限定できた。さらなるアミノ酸の絞り込みの結果、イヌ Chia で特異的に保存される 4 アミノ酸が、不活性化の原因であることを明らかにした。

3. 食性に適応した Chia の分子進化の解明

イヌ Chia の活性低下に関わるアミノ酸置換の生物化学的、進化的意義を解明するため、イヌ以外の食肉目 (動物の分類群の 1 つであり、主に肉食性動物が属す) 42 種の Chia 遺伝子を塩基配列レベルで解析した。その 4 アミノ酸はイヌ科 (ディンゴ、キツネ) の Chia で特異的に保存されていた。さらに、他の大多数の肉食性動物の Chia 遺伝子では、数塩基の欠損や置換により、未成熟終止コドンが出現し、Chia が偽遺伝子化されていた (図 4)。

研究項目②：活性化 Chia の遺伝情報を参考に、Chia の偽遺伝子からキチナーゼを設計し、活性化酵素の作成を試みる

活性の強いマウス Chia の遺伝情報を参考に、ネコ、ピューマ、トラの Chia 偽遺伝子から活性を有するような Chia を設計し、大腸菌で発現した (これらを創製-ネコ、ピューマ、トラと名付けた)。キチナーゼ活性を測定したが、活性は認められなかった。現在、活性を有するキチナーゼの構造を参考に、各種アミノ酸置換を導入し、活性化を試みている。

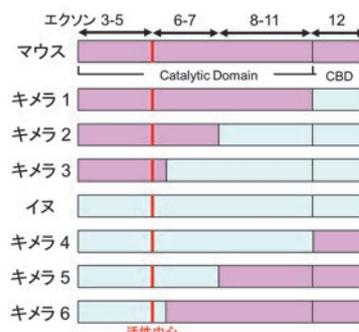


図 2. マウス Chia とのキメラ体の作製。

イヌ Chia の不活性化の要因となる領域を、大まかに特定するため、4 つの領域に分けた。

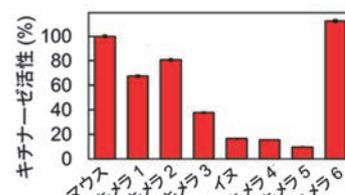


図 3. イヌ vs. マウス Chia キメラ体 1-6 のキチナーゼ活性。縦軸は、マウス Chia の活性を 100% とした相対活性。



図 4. Chia の偽遺伝子化。食肉目動物の Chia の多くで、数塩基の欠損(左)や置換(右)により、未成熟終止コドンが見られた。

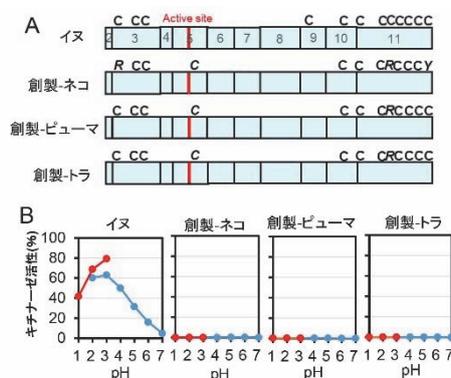


図 5. 偽遺伝子からの活性化キチナーゼ創製の試み。ネコ、ピューマ、トラの Chia 偽遺伝子から創製し、活性を測定した。

4. 研究の反省・考察

研究代表者らは、「昆虫のキチンが、動物体内で分解され得るか？」との観点から、Chia のアミノ酸配列とキチン分解活性を検討してきた。そして、キチンの分解性は、動物の食性と大きく関わることを示した (図1)。2019 年度の研究で、イヌ Chia の活性化を行い、不活性化の原因の解明を行った。イヌ Chia が、進化の過程でアミノ酸 (塩基) レベルで置換し、酵素活性が低下したことを明らかにした (図2)。現在、ネコ、ピューマ、トラの Chia 偽遺伝子から作製した分子について、Cys 残基数に着目して活性化を進めている。その結果がまとめ次第、原著論文として投稿する予定である。

ここまで、本研究を申請時に計画した研究目標①について、ほぼ順調に進んでいる。2020 年度は、ウシChia の活性化を試みたい。研究目標②について、偽遺伝子からの Chia の創製には成功したが、活性化酵素の作成には至っていない。さらに Chia の構造変化とその酵素活性への影響の可能性を考え、活性化酵素の作成をしたい。

最近、Chia 遺伝子が、ほ乳類の進化と密接に関わることが報告された (Emerling et al., *Sci Adv* 4, eaar6478, 2018)。研究代表者らのこれまでの結果と合わせると、「動物の食性が、進化の過程で、Chia の構造と機能に影響する」と結論できる。

持続的な食糧生産のため、国連食糧農業機関 (FAO) は昆虫の飼料化を推奨している。研究代表者らは、ほ乳類・鳥類の Chia の解析から、昆虫を飼料として積極的に与えるべき動物、控えるべき動物を提案した (Tabata et al., (2018) *Sci Rep.* 8, 1461)。以上の研究成果は、昆虫の飼料化促進にとっての重要な基礎的データとなる。

5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2019) Residues of acidic chitinase cause chitinolytic activity degrading chitosan in porcine pepsin preparations, *Sci Rep.* **9**, 15609.
- ② Kimura, M., Umeyama, T., Wakita, S., Okawa, K., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2019) Direct comparison of chitinolytic properties and determination of combinatory effects of mouse chitotriosidase and acidic mammalian chitinase, *Int J Biol Macromol.* **134**, 882-890.

(2)口頭発表

- ① **Oyama, F.**, Kashimura, A., and Tabata, E. The American Society of Human Genetics 2019 Annual Meeting (Houston, TX, USA), Gene loss and functional decline of chitinases and chitinase-like proteins in dog, 2019年10月18日
- ② Tabata, E., Kashimura, A., and **Oyama, F.** The American Society of Human Genetics 2019 Annual Meeting (Houston, TX, USA) Functional recovery of dog acidic chitinase, 2019年10月18日
- ③ **小山文隆**、榎村明德、脇田悟誌、菅原康里、田畑絵理、第 33 回日本キチン・キトサン学会大会 (神奈川) イヌとウシの酸性キチナーゼの遺伝子発現解析とその機能解析、2019年8月29日
- ④ 田畑絵理、榎村明德、上原麻衣子、脇田悟誌、菅原康里、塚本晃海、佐々木えりか、**小山文隆**、第 33 回日本キチン・キトサン学会大会 (神奈川) 食虫性非ヒト霊長類、コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) の胃における、酸性キチナーゼの高い発現とキチンの消化性、2019年8月29日
- ⑤ **小山文隆**、榎村明德、脇田悟誌、**坂口政吉**、菅原康里、田畑絵理、日本農芸化学会 2020 大会、イヌとウシの酸性キチナーゼの不活性化、2020年3月27日
- ⑥ 田畑絵理、榎村明德、上原麻衣子、脇田悟誌、菅原康里、塚本晃海、佐々木えりか、**小山文隆**、日本農芸化学会 2020 大会、食虫性非ヒト霊長類、コモンマーモセットの消化酵素としての機能解析、2020年3月27日

(3)出版物

なし

学 校 名	東 京 農 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	妊娠を支えるエキソソーム由来miRNAの解明とその制御 —加齢に伴う妊孕性低下とmiRNAの関係—		研究分野	農 学
キ ー ワ ー ド	①エキソソーム ②miRNA ③卵子 ④胚			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岩 田 尚 孝	農 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
亀 山 祐 一	生 物 産 業 学 部	教 授	マウス実験解析
下 井 岳	生 物 産 業 学 部	准 教 授	マウス実験解析
白 砂 孔 明	農 学 部	准 教 授	ウシ実験解析

妊娠を支えるエクソソーム由来 miRNA の解明とその制御 —加齢に伴う妊孕性低下と miRNA の関係—

1. 研究の目的

(1) 妊娠と加齢

近年の社会情勢やライフスタイルの変化に伴い、30代後半で挙児を希望する女性が増加している。しかし、母体の加齢によって卵子数が減少するだけでなく、卵子内の活性酸素種の蓄積・ミトコンドリアの機能異常・異常受精の増加など複合的な原因で卵子の質が低下し、妊孕性が急激に低下する。加齢に伴う妊孕性の低下は現代社会で少子化問題の一大要因とされており、いかにして妊孕性を維持するのか、加齢に伴い妊孕性を低下させている原因を明らかにするのは喫緊の課題である。

(2) 卵子・胚の周囲環境の重要性

これまでの加齢の研究では主に卵子や胚そのものの質的低下に焦点が当てられている。一方で卵子は長期間母体内で発育・受精し、受精卵・胚は卵管や子宮などの母体との相互作用を行い、胎児として娩出される。これらのプロセスは、卵子・受精卵の周囲の細胞や体液との高次な相互作用の下で実施される。我々はこれまで、加齢に伴い母体の体液（卵胞液）および卵子や初期胚の周囲の環境（顆粒層細胞や卵管細胞）が大きく劣化し、これが卵子や胚の質を低下させている要因であることを示す知見を得ている。

(3) 以上から、①卵子・胚および周辺細胞（顆粒層・卵管・子宮細胞）はエクソソームを介して miRNA を伝達することで互いの機能を制御する、②加齢に伴い適切な miRNA による制御機構が破綻し、周囲環境が悪化することで胚発生が低下する、という仮説を想定した。本研究では、卵巣・卵管・子宮内のエクソソームを介した卵や胚の発育制御機構とこれに加齢が及ぼす影響を検証し、加齢に伴う妊娠成立機構の破綻を改善する手法の開発を目指す。

2. 研究の計画

(1) 卵子の発育に影響を与える miRNA

- ①卵胞液と顆粒層細胞からの推測とその評価
- ②加齢がmiRNAの構成に及ぼす影響とその卵子発育に対する効果

(2) 胚の発育に影響を与える miRNA

- ①卵管液と胚からの推測とその評価

(3) エクソソーム分泌の分子背景

3. 研究の成果

(1) 卵巣から異なるステージの卵胞を回収し顆粒層細胞のRNAseqを行った。また発育能力が高かった卵子と低かった卵子の顆粒層細胞のRNAseqも行い両者から卵胞発育や質に重要な上流因子をバイオインフォマティクスにより推測した。さらに、これらの卵胞液中に含まれるmiRNAをsmall RNAseqによって推測した。上流因子としてのmiRNAと卵胞液に実在するmiRNAを比較し、候補miRNA(miR-17, -27, -92a, -145等)を推測した。これら候補miRNAのmimicを培地に添加すると、卵胞液が卵子発育に及ぼす効果として確認した卵子直径の増大、ヒストンのアセチル化の亢進、脂質の増加や発育能力の改善が観察された。また、若齢のウシと加齢のウシの卵胞液を調べ、加齢により変動するmiRNAを同定した。同定したmiRNAからmiR-19b(若齢個体で多い)を選択し添加すると卵子の増大やアセチル化の亢進など卵子の質改善が得られたため、卵子発育はmiRNAによって影響され、さらに加齢によってmiRNA構成が変化し、これが卵子の質低下に関与しているという結論を得た。

(2) 卵管液に含まれる miRNA を small RNAseq によって測定した。また卵管上皮の細胞を培養して培養液中から得たエクソソームに上記の miRNA が含まれていること、生殖周期により影響を受けることを確認した。さらに、体内で発育した胚と体外で発育した胚の RNAseq から発現変動遺伝子を見つけ、これらの上流因子を推測し、これと卵管中に存在している miRNA を比較することで胚発育に影響する miRNA を同定した。これらの miRNA を胚培養環

境に外挿すると胚の発育を有意に改善した。

- (3) 卵胞液や顆粒層細胞の培養液、胚の培養液に含まれる細胞外小胞中に miRNA のほか核酸が大量に含まれていることを見いだした。特に、ミトコンドリアゲノムに由来する DNA を内包した細胞外小胞の測定系を構築し、これをモデルに分泌に関わる因子を検討した。細胞を培養する条件（酸素濃度）や細胞中でのミトコンドリアの質によってこれらの細胞外核酸の量が大きく変動した。プロテアソームや細胞内小胞形成を抑制する細胞外核酸の量が減り、オートファジーを抑制すると細胞外核酸の量が増えることから、細胞質内での小胞管理が関与していることが明らかになった。特に加齢はこの分泌量を増やした。細胞外核酸を胎盤細胞や卵子、そして顆粒層細胞の培養条件に外挿する試験によって、これらが細胞に炎症用の反応を引き起こし、その生理機能を損なっていることが明らかになった。miRNA の構成に影響する飼養条件としてウシをモデルに牧草殖、穀物食区を設定し、血液中の miRNA 量を比較したところ飼養条件で変わることが明らかになった。

4. 研究の反省・考察

- (1) ブタで得られた候補 miRNA は予想どおり卵子の発育を大きく改善することが明らかになった。また、miR-92a は解糖系を亢進し、卵胞の発育を促進する結果を得たことは大きな発見であると考えている。ウシで行った解析ではブタと同様の miRNA が卵胞発育に関与していることが示唆された。また、加齢に伴い減少もしくは増加する miRNA があること、それらのうち若齢に多い miRNA は卵子の発育促進効果があることが明らかになった。
- (2) ウシの卵管液と卵管細胞の培養液、そして胚から推測したところ、miRNA が胚発育に関与する結果が示唆された。これらの miRNA は発情周期によって変動し、それらの一部(miR-17)を胚の培養条件に外挿すると胚発育を促した。また、ターゲットとしているタンパク質の発現を抑制している結果が得られており、胚は母胎との miRNA を介したコミュニケーションのもと発育していると考えられる。
- (3) 細胞外核酸には核やミトコンドリアゲノム由来のDNAが内包されているが、これらの量は加齢によって変化する結果となった。特に、ミトコンドリアのゲノム由来のDNAは細胞の生存に関係なくミトコンドリアの状態や合成や分解を反映していることが示された。オートファジーやDNase、そしてプロテアソームの活性が加齢によって変化することが知られているが、この変化は細胞外への核酸の放出量を左右することがわかった。また、この細胞外核酸量は細胞の恒常性に大きく影響することが明らかになった。さらに、繁殖に良いまたは悪い影響を及ぼす飼養環境では血液中のmiRNAが変化することから、母体の栄養状態などもこの構成に影響すると考えられた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Hara S, Aoki S, Nagata S, Shirasuna K, Noguchi T, Iwata H. Xanthan gum and locust bean gum substrate improves bovine embryo development. *Reprod Domest Anim* 2020; In press
- ② Ito J, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Resveratrol treatment increases mitochondrial biogenesis and improves viability of porcine germinal-vesicle stage vitrified-warmed oocytes. *Cytobiology* 2020; 93: 37-43
- ③ Sano M, Shimazaki S, Kaneko Y, Karasawa T, Takahashi M, Ohkuchi A, Kurosawa A, Torii Y, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Palmitic acid activates NLRP3 inflammasome and induces placental inflammation during pregnancy in mice. *J Reprod Dev* 2020; 66: 241-248
- ④ Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reprod Med Biol* 2019; 19: 95-103

- ⑤Munakata Y, Sugimoto A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Xanthan gum and locust bean gum gel supports in vitro development of porcine oocytes derived from early antral follicles. *J Reprod Dev* 2019; 65: 551-554
- ⑥Kansaku K, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells. *Zygote* 2019; 27: 272-278
- ⑦Shibahara H, Ishiguro A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Follicular factors determining the developmental competence of porcine oocyte. *Reprod Med Biol* 2019; 18: 256-262
- ⑧Nakamura Y, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. S100A8, which increases with age, induces cellular senescence-like changes in bovine oviduct epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2019; 82: e13163
- ⑨Ozeki A, Tani K, Takahashi H, Suzuki H, Nagayama S, Hirashima C, Iwata H, Kuwayama T, Ohkuchi A, Shirasuna K. Preeclamptic patient-derived circulating cell-free DNA activates the production of inflammatory cytokines via toll-like receptor 9 signalling in the human placenta. *J Hypertension* 2019; 37: 2452-2460

(2) 口頭発表

- ①伊藤洵、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. レスベラトロール処理がガラス化したブタ卵核胞期卵子の生存性に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ②宗像祥久、柴原秀典、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. MicroRNA-92aは顆粒層細胞の代謝を変化させブタ未発育卵子の体外発育を改善する 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ③立松薫、永田修大、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. microRNA-92aがウシ初期胞状卵胞由来卵子の体外発育に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ④市川佳奈、柴原秀典、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. ブタ卵胞液中のcell-free DNA量と卵子の能力の関係 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ⑤青木漱吾、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝. 加齢がウシ胚の発生培地中ミトコンドリア由来cfDNA量に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月
- ⑥中村悠稀、野口龍生、坂上信忠、岩田尚孝、桑山岳人、白砂孔明. 老化関連因子IL-1 α やIL-1 β がウシ卵管上皮細胞の炎症応答に及ぼす影響 第112回日本繁殖生物学会大会（北海道大学）、2019年9月

(3) 出版物

なし