

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5年 5月 2日

日本大学学長 殿

氏 名： 星 徹

所属・資格： 理工学部・准教授

実施研究所：

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

中空球状ナタデココによる陽イオン交換樹脂のカプセル化とカリウムイオン吸着能評価

英文表記

Encapsulation of cation exchange resins in hollow-type spherical Nata de coco and its evaluation of K⁺ adsorption

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 年度 ～ 令和 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

本研究では高カリウム血症を対象とした飲みこみやすく、消化管内壁に吸着しない新規経口吸着剤の開発を目指す。申請者が開発した『セルロースゲル膜によるカプセル化技術』により、血清カリウム抑制剤に用いられる陽イオン交換樹脂 (CER) をカプセル化した CER 内包中空球状ナタデココの調製を行う。さらに、CER 内包中空球状ナタデココの消化管環境における *in vitro* での安定性やカリウムイオンの吸着特性の評価を行う。

採択された科研費の研究課題では、尿毒症用の経口吸着剤を目標として、中空球状ナタデココに内包した吸着炭にインドキシル硫酸などの尿毒症毒素の吸着を評価している。尿毒症毒素は紫外可視分光計を用いた UV 吸収により定量が可能である。本研究では、イオンクロマトグラフィーを用いて、UV 吸収では定量が難しいイオン成分の吸着挙動を評価する。測定対象により最適な測定装置を選ぶことで、様々な症状に対応した経口吸着剤の評価が可能であり、本研究は新しい経口吸着剤の開発に大きく寄与するものと考えられる。

本研究と科研費課題を通して、様々な症状に対応する吸着剤内包中空球状ナタデココの調製と吸着特性の評価法を確立することで、新たな複合型経口吸着剤を提案することを目的とする。

4 研究概要

慢性腎臓病 (CKD) の患者は、腎機能の低下に伴い、体内の老廃物の十分な排泄が行われないため、高カリウム血症や尿毒症などの合併症が発現することで、心血管疾患、入院、死亡の危険性が高いことが知られている。高カリウム血症では、カリメート®、パチロマー®、ロケルマ®などのカリウム吸着剤が、尿毒症では AST120 (クレメジン®) に代表される球形吸着炭が経口吸着剤として、CKD 患者の腎機能低下を抑制するために広く用いられている。これらの経口吸着炭は消化管内で対象物質を吸着し便と共に体外に排出することで、合併症症状の改善による透析導入の遅延効果が認められている。CKD 患者は水分の摂取量が制限されることが多く、少量の水で経口吸着薬を嚥下するため、口内への残留感、飲みこみにくさが課題である。また、経口吸着薬の消化管内壁への吸着は、便秘症状などの軽度の副作用から腸閉塞、腸穿孔といった重度の副作用による死亡例が報告されている。

経口吸着剤を服薬補助ゼリーと一緒に飲みこむなど、口内、喉、食道での不快感を抑えて飲みこみやすい嚥下法が推奨されている。その一方で、副作用の原因となる経口吸着剤と消化管内壁との接触による吸着の抑制については、アガロースゲルやアルギン酸ゲルなどの含水ゲルに経口吸着薬を内包させる方法が検討されているが、報告例が非常に少ないのが現状である。水で膨潤した高分子ゲルに経口吸着剤を内包させることで、飲みこみやすさの向上と消化管内壁への吸着の抑制が期待される。

高分子ゲルに必要とされる機能は、第1に毒性がないことである。第2に、内包した活性炭が漏出しないように、消化管内環境で安定した素材で吸着炭を内包することである。消化管内は部位により pH が大きく変化するため、用いる高分子ゲルには広い pH 領域で安定であり、水に溶解しないことが必要である。また、様々な消化酵素に分解されないことも必要とされる。第3に、消化管のぜん動運動によって破損しない程度の強度を有することが求められる。これらの機能を持つ高分子ゲルとして、無毒かつ酸、塩基で分解しにくいナタデココに着目した。ナタデココは酢酸菌が産生するセルロースナノファイバーから成る無毒かつ消化管内環境では分解しない保水性に優れた高強度のヒドロゲルである。経口吸着剤を中空かつ球状のナタデココでカプセル化することで、飲みこみやすく、消化管内壁と経口吸着薬を接触させない複合型経口吸着剤の開発が期待される。

本研究では、高カリウム血症の改善のために、消化管内でのカリウムイオン (K^+) 吸着を目的とした陽イオン交換樹脂 (CER) 内包中空球状ナタデココを調製し、*in vitro* 環境中での安定性やカリウム吸着能の評価を行った。調製した CER 内包中空球状ナタデココは、消化管内の環境、具体的には模擬胃液および模擬腸液中で CER の漏出がなく、安定した CER のカプセル化を達成した。 K^+ の吸着はイオンクロマトグラフィーと Chlorophosphonazo-III を用いた 2 通りの定量法により評価を行ったところ、内包した CER は未内包の CER 粉末と同等の吸着能を示した。

以上より、CER の K^+ の吸着能を有したまま中空球状ナタデココへのカプセル化は、中空球状を形成しているセルロースゲル膜がバリア層として働き、CER と消化管内壁が接触しないため、CER の消化管内壁への吸着が原因とされる重篤な副作用が起こらないことが期待される。

5 研究結果

① CER 内包中空球状ナタデココの調製

CER 内包中空球状ナタデココは、以下の方法で調製した。CER 内包円柱状寒天ゲル(直径 2.2 mm, 高さ 2.5 mm)を、酢酸菌を植菌した培養液に浸漬後、96 ウェルプレートの各ウェルのシリコンオイル中に沈めて 30 °Cで所定日数培養を行い、寒天ゲル表面にナタデココを産生させた。ナタデココが産生した後、得られたゲルを熱水中での攪拌により、内部の寒天を溶解除去することで、CER 内包中空球状ナタデココを得た (Fig.1 (a))。CER の内包量は寒天水溶液に添加する CER 量で制御でき、30 wt%の CER を含む寒天水溶液で調製した寒天ゲルを用いると、中空球状ナタデココ 1 個あたり 4.19 mg の CER を内包させることが可能であった。

しかしながら、円柱状寒天ゲルを用いることで円柱の角部分に薄膜状ナタデココが産生するため、寒天溶解除去やイオン交換などの操作時に強度の低い薄膜部分が裂け、CER の漏出を多数確認した (Fig.1 (b))。そのため、調製方法の見直しを行い、CER 内包円柱状寒天ゲルを球状に成形し、CER 内包球状寒天ゲルを用いることで、薄膜部を生じさせずにナタデココによるカプセル化を試みた。直径 1.37 mm, 高さ 1.5 mm の CER 含有円柱状寒天ゲルを PTFE 製 96 ウェルプレートのシリコンオイルを満たした各ウェルに浸漬させた後、120 °Cで加熱することで、CER 内包球状寒天ゲル調製に成功した。

得られた CER 含有球状寒天ゲルを用いて、前述と同様の操作でナタデココによるカプセル化を行ったところ、小径かつ薄膜部がなく CER が漏出しにくい CER 内包中空球状ナタデココの調製に成功した (Fig.1 (c))。また、球状成型時に寒天ゲルに含まれる水が揮発することで、円柱状から球状になる過程での体積収縮により小径化が起こり、1 個あたりの CER 内包量が増加した。得られた小径かつ内包量が多い CER 内包中空球状ナタデココは、より飲みやすく、1 回あたりの投与量の低減が期待される。

② CER 内包中空球状ナタデココの *in vitro* 環境中での安定性

球状寒天ゲルを用いて調製した CER 内包中空球状ナタデココの消化管内 pH での安定性評価を次のように行った。経口投与し消化管を通過し排泄するまでにかかるおおよその時間を 48 時間とし、崩壊試験液第 1 液 (模擬胃液, pH 1.2) または崩壊試験液第 2 液 (模擬腸液, pH 6.8) に CER 内包中空球状ナタデココを浸漬し、内部の CER の漏出の有無を調査した。比較として、純水および強塩基条件 (pH 12.6) での安定性も評価した。どの条件においても内部 CER の漏出は確認されなかった。CER を内包した場合と同様に、漏出の有無がわかりやすい活性炭を内包した中空球状ナタデココにおいても漏出は認められなかった。ナタデココを形成しているバクテリアセルロースナノファイバーは、優れた酸および塩基耐性を有し、広い pH 領域で加水分解

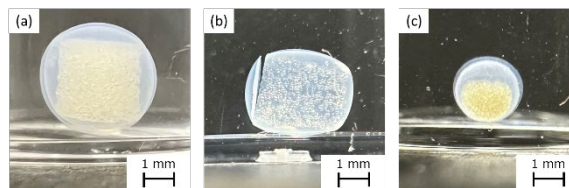


Fig.1 Photographs of CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco. (a) prepared using cylindrical agarose gel (ϕ 2.2 mm, height 2.5 mm), (b) Nata de coco gel membrane ruptured and CER leaked out, and (c) prepared using spherical agarose gel (diameter 1.85 mm)

Table 1. Comparison of the size and CER content of CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco prepared using agarose gels of different shapes.

Shape of agarose gel used for encapsulation	Diameter (mm)	Volume (mm ³)	Encapsulated CER (mg)	Amount of CER per volume ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
Cylindrical: ϕ 2.2 mm, height 2.5 mm	3.75	27.61	4.19	151
Spherical: diameter 1.85 mm	1.70	2.57	0.61	237

などされないため、様々な吸着剤を漏出させずにカプセル化することに成功した。

③ CER 内包中空球状ナタデココの K⁺吸着能の評価

市販のカリウム吸着剤であるカリメート®を参考に、内包 CER を Ca²⁺型に置換した試料を用いて K⁺の吸着実験を行った。Ca²⁺型 CER は K⁺が存在すると、CER のスルホン酸に配位している Ca²⁺と K⁺がイオン交換することで、K⁺を吸着し Ca²⁺を放出する。放出された Ca²⁺は Chlorophosphonazo-III とのキレート錯体を形成後、690 nm の吸光度を用いて定量を行った。Ca²⁺の放出量は K⁺濃度に依存するため、濃度依存性が消失する最小の濃度 100 mg/mL KCl 水溶液を用いた。100 mg/mL KCl 水溶液 (K⁺濃度 52.4 mg/mL) 中での Ca²⁺の放出は、CER の内包量に依存せず、約 50 分程度で平衡に達した。CER 粉末では、KCl 水溶液に添加後 1 分ほどで Ca²⁺濃度は平衡に達した。これは CER をカプセル化したことで、中空球状ナタデココの内部への K⁺の拡散がイオン交換の律速となるためと考えられる。CER 内包量 1.40 mg × 5 個 (Fig.3 (c)) の平衡に達した時の Ca²⁺濃度は 1.35 μmol/mL、同量の CER 粉末は 1.32 μmol/mL と同程度になったことから、カプセル化による吸着能の低下は確認されなかった。

KCl 濃度 100 mg/mL は、生体内環境中の濃度と比較して非常に濃く、現実的ではない。また、Ca²⁺の定量のため、K⁺の濃度変化を追跡することが出来ていないため、イオンクロマトグラフィーを用いて、K⁺濃度 5.0 mg/mL (5000 ppm)、溶剂量 2.0 mL 中での CER 内包中空球状ナタデココ (CER 内包量 4.19 mg × 5 個) の吸着能の評価を行った。この吸着条件の K⁺の総量は、高カリウム血症改善剤 (ロケルマ®) の評価で使用されている量とほぼ等しい値である。室温下 24 時間吸着後の水溶液のクロマトグラムでは、良好に Ca²⁺と K⁺のピークが分離されており、検量線の R² 値はどちらも 0.9997 以上であり、精度よく定量することが可能であった。また、Chlorophosphonazo-III を用いて定量した Ca²⁺放出量とイオンクロマトグラフィーで定量した値は、ほぼ同等の値であった。

CER 粉末との比較において、CER 1.0 g あたりの K⁺の吸着量はほぼ等しい値であり、低濃度の K⁺の吸着においても、カプセル化工程による吸着能の低下は確認されなかった。また、1 個の Ca²⁺は 2 個の K⁺とイオン交換するため、吸着した K⁺と放出した Ca²⁺の mol 比 (K⁺/Ca²⁺) の理論値は 2.0 であり、実測値も理論値に近い値であった。このことは、K⁺とのイオン交換によって、Ca²⁺は放出されていることを支持している。

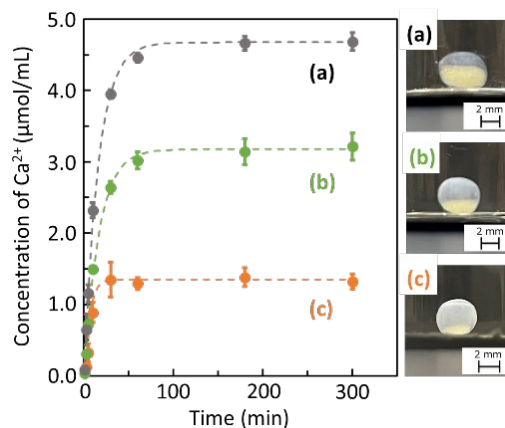


Fig.2 Calcium release behavior of CER-encapsulated HSBC gels (5 pieces) upon potassium adsorption (n=3). Encapsulated amount of CER : (a) 4.19 mg, (b) 2.79 mg, (c) 1.40 mg

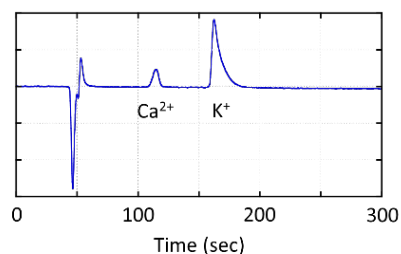


Fig.3 Chromatogram of aqueous solution after potassium adsorption.

Table 2. Comparison K⁺ adsorption ability of CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco and CER powder.

Sample	Amount of adsorbed K ⁺ (mmol/g-CER)	K ⁺ /Ca ²⁺ ratio
CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco	1.93	2.25
CER powder	1.88	2.18

- 6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
 文部科学省 科学研究費助成事業 基盤研究 (A), 基盤研究 (B),
 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金 腎疾患政策研究事業など

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否
なし				

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
平井あや 丸山高史 阿部雅紀 青柳隆夫 星 徹	第 65 回 日本腎臓学会 学術総会	尿毒症改善を目的としたセルロースナノファイバーシームレスカプセルによる活性炭の封入と吸着能評価	2022 年 6 月 10 日
高野弦貴 星 徹 青柳隆夫	第 71 回 高分子討論会	陽イオン交換樹脂内包中空球状バクテリアセルロースゲルの調製とカリウム吸着能評価	2022 年 9 月 7 日
佐藤海斗 星 徹 青柳隆夫	第 71 回 高分子討論会	尿毒症の症状改善を目的とした小径の中空球状バクテリアセルロースゲルによる活性炭粒子のカプセル化	2022 年 9 月 7 日
高野弦貴 星 徹 青柳隆夫	第 66 回 日本大学理工学部 学術講演会	陽イオン交換樹脂内包中空球状バクテリアセルロースゲルの調製とカリウム吸着能評価	2022 年 12 月 1 日
佐藤海斗 星 徹 青柳隆夫	第 66 回 日本大学理工学部 学術講演会	尿毒症の症状改善を目的とした小径の中空球状バクテリアセルロースゲルによる活性炭粒子のカプセル化	2022 年 12 月 1 日
星 徹	新技術説明会	シームレスな薄膜状セルロースナノファイバーゲルによる物質内包技術	2022 年 12 月 20 日

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
なし				

10 本研究課題に関するその他の発表 (新聞, 一般雑誌掲載等)

なし

1 1 他の研究への発展

本研究で確立した小径かつ薄膜部がない CER 内包中空球状ナタデココの調製法は、CER 以外の吸着剤（活性炭、ゼオライトなど）にも適用することが可能であり、活性炭、ゼオライトのカプセル化に成功している。活性炭は尿毒症原因物質の除去、ゼオライトは高カリウム血症、高血糖、高脂血症の原因物質の除去に用いられており、本研究成果と合わせることで、様々な症例に適した経口吸着剤への応用を検討中である。

また、本手法は寒天ゲルの表面にナタデココを産生させることでカプセル化を行っている。寒天ゲルの代わりに機能性高分子ゲルをカプセル化することに成功している。機能性高分子ゲルには、温度応答性や pH 応答性ゲルを用いることで、任意の刺激に対して薬剤の放出制御が可能なドラッグリザーバーとしての応用も検討を進めている。

1 2 その他の成果

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
な し						

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

いずれかを選択してください

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5年 4月 11日

日本大学学長 殿

氏 名：加藤修平

所属・資格：生産工学部・准教授

実施研究所：生産工学部・生産工学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

太陽光発電量増加のためのパネル接続切り替え用直流スイッチとその応用

英文表記

DC switch for switching panel connection to increase solar power generation and its application

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 4 年度 ～ 令和 5 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

太陽光発電はカーボンニュートラルに向けた必須の発電技術とされている。しかし、狭い住宅街では晴天でも電柱等のわずかな影による発電量の低下が運用上の大きな課題の一つになっている(図 1)。これに対し本研究課題は影のない太陽電池の発電能力を最大限に発揮すべく、影の太陽電池を電氣的に分離する直流スイッチの実現を目指している。現在、影対策として光子エネルギーを有効に活用できるペロブスカイト太陽電池などが試みられているが、実用化に十年単位の期間が必要と予想されている。そこで本研究課題は電気スイッチとして機械接点とパワー半導体を併用し長寿命かつ小型の直流スイッチによる影対策を目指している。具体的には機械接点は抵抗成分が小さく発熱しない反面アークが発生する。一方、パワー半導体はアークが発生しない反面、抵抗成分が大きく巨大な放熱器を必要とする。つまり両方の欠点を補い機械寿命の 20 万回まで可能な直流スイッチの実現が本研究の目的である。



図 1 影での太陽光発電電力低下
(左)影なし(右)約 5%影で 70%低下

4 研究概要

直流電流は交流電流と異なり電流ゼロ点が存在しないため、機械接点で強制的に遮断すると図2のようにアーク放電現象により接点電極が摩耗し、寿命は数100回程度である。それだけでなく、条件によってはアークが途切れず継続し火災に至る場合もある。これに対しこれまで提案されている直流スイッチ技術の先行研究を図3(a)(b)に示す。図3(a)は機械接点内部に永久磁石等で磁場を生成し、アーク放電の電子と磁場によるローレンツ力によりアーク経路を引き伸ばして確実に遮断する方法である。図3(b)は事前に充電した電荷を用いて遮断時に通電方向と逆向きのカウンター電流を強制的に生成する方法である。図3(a)は確実な電流遮断を実現できるものの接点電極が摩耗するため効果は限定的である。図3(b)は接点電極の摩耗は抑制されるものの、遮断電流の大小に応じて充電回路の調整が必要であり回路が複雑になっている。

先行研究に対し提案法は電流を遮断する代表的な2つのオン・オフ機構（機械接点とパワー半導体）を併用する仕組みである。具体的にはパワー半導体は元来、電流遮断時にアーク放電現象が発生しないメリットがあるものの、抵抗成分が大きく常時使用において巨大な放熱器が必要となるデメリットがある。そこで、提案法は図4に示すように機械接点を常時使用し、電流遮断時の過渡的な瞬間のみパワー半導体を活用する。本研究では以下の内容を明らかにする。

- ① 提案回路の有無における機械接点のアーク放電減少の定量評価
- ② パワー半導体での直流電流遮断速度と発熱限界の関係性

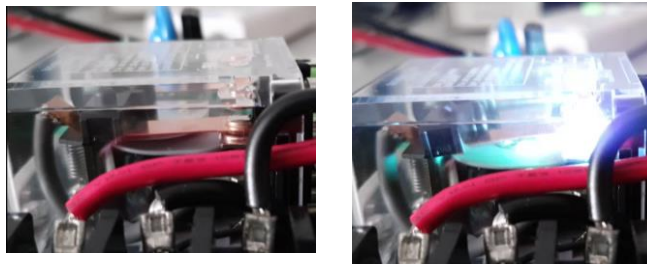


図2 機械接点による直流遮断(150 V/30 A 遮断時)のアーク放電(左)遮断前の通電時(右)電流遮断時

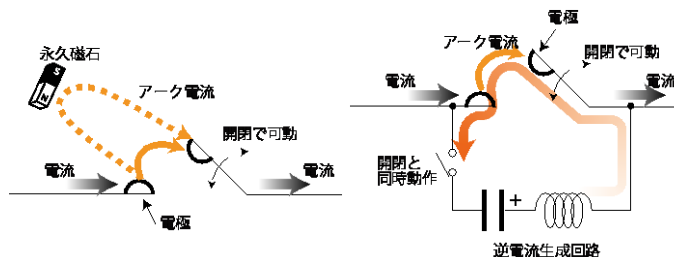


図3 直流スイッチの先行研究
(左 a) ローレンツ力利用(右 b)逆電流生成法

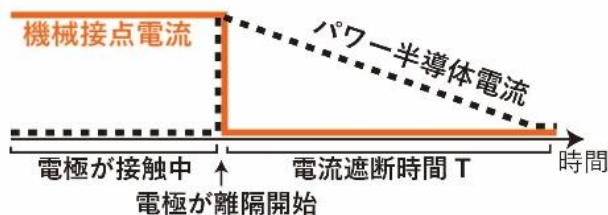
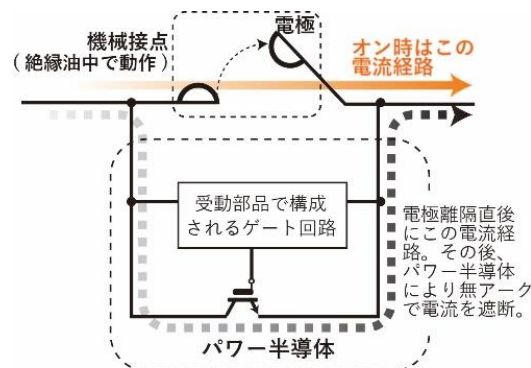


図4 金属接点とパワー半導体を併用した提案回路による直流スイッチ

5 研究結果

本研究で明らかにする前述の①の実験結果について述べる。提案回路を用いることでアーク放電現象は発生しないが、これらを定量的に確認する実験を行った。図5に試験回路を示す。電源電圧は直流30Vとしてハーフブリッジ回路の機械接点で約20Aのインダクタンス負荷の直流電流を遮断し、発光強度信号をオシロスコープにて観測した。フォトディテクタ（波長域：320~1100 nm、THORLAB 社製、型番：PDA100A2）を用いて提案回路の有無で発光強度を比較した。の発光強度をオシロスコープにて観測した。

発光強度比較の実験結果を図7、図8に示す。同図より提案回路の有無でどちらも約20Aの直流電流を遮断していることがわかる。提案回路が無く機械接点のみの場合（図7）、直流電流の遮断の約50 μ s前から発光強度が徐々に増加し始めている。これは約20Aの直流電流を遮断する際、電極間距離が離隔し始めると同時にアーク放電現象が起きているためである。そして、次第に電極間距離が離れていき、アーク放電距離が長くなるにつれて発光強度も強くなっている。そしてアーク放電が継続できない距離に達した時点で発光強度信号が垂直にゼロまで降下していることがわかる。これにより提案回路が無く機械接点のみではアーク放電により電極材料が消耗していることがわかる。

一方、提案回路を接続することで前述と同じ条件の直流電流20Aを遮断した際の発光強度は図8に示すように検出できないほど低レベルの信号であった。これは提案回路を接続することで直流電流を機械接点にて遮断した瞬間に、その電流が行き場を失わず全てパワー半導体へ流れ込んでいるためである。これにより直流電流は機械接点の電極間でアーク放電を形成する電流経路を作る必要性がなくなり、アーク放電現象が発生することは無い。そして、パワー半導体へ流れ込んだ直流電流はゲート電圧を絞ることにより無アークで徐々に減少し、最終的に直流電流を遮断できている。

今後は放電現象を分光計測することにより、提案回路が無い場合、電極材料のどのような成分がどれだけ消耗しているかについて、光学フィルタ等を利用して定量化する。これらにより提案回路付加における機械接点の寿命評価を行う予定である。

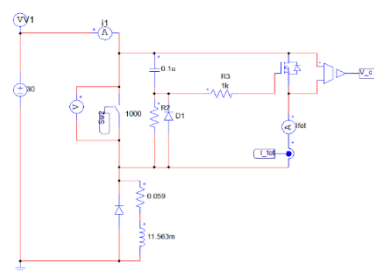


図5 アーク放電現象の定量評価実験回路



図6 アーク放電発光強度の定量評価実験装置の外観

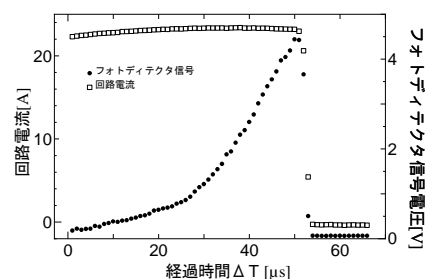


図7 提案回路が無い場合の直流電流遮断と発光強度

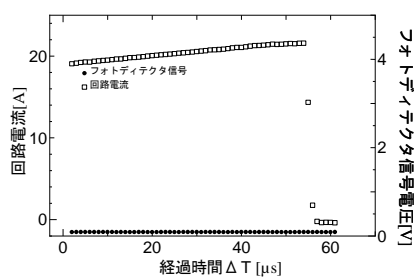


図8 提案回路の付加による直流電流遮断と発光強度

〔5 研究結果 (つづき)〕

本研究で明らかにする前述の②のパワー半導体での直流電流遮断速度と半導体発熱限界について、新たな回路を提案しシミュレーションにより効果を確認した。

具体的には提案回路はパワー半導体を瞬間とはいえ能動領域で使用するため、発熱がメガソーラー等への大容量化に向けた大きな課題の1つとなっていた。というのは、パワー半導体での電流遮断速度が速すぎる場合、能動領域での動作時間は短く発熱や温度上昇は問題とならないが、電極間距離が十分離隔していないため、電極間にアーク放電経路が発生してしまう恐れがある。一方、電流遮断速度が遅すぎると電極間距離が十分離隔しているものの、パワー半導体が能動領域で動作する時間が長くなるため、パワー半導体が過度な温度上昇で破壊されてしまう。これらはミリ秒以下の現象のため、熱時定数の関係で放熱器などでは解決できない。

そこで、図9に示す回路により電極間距離が十分離隔するまでは半導体が殆ど発熱しない飽和領域で動作させるべくゲート部に追加のトランジスタを用いる。そして電極間距離が十分離隔した後に高速な電流遮断速度で直流電流を遮断する。ここで追加のトランジスタはゲート電圧の制御に用いるため電圧電流ともに数V、数mA程度の極めて定格の低い論理素子でよい。図10に電源電圧300Vで直流電流80Aを遮断した際の新回路の有無によるパワー半導体のPN接合部温度上昇の推定シミュレーション結果を示す。同図より提案回路の従来はパワー半導体が熱破壊されるPN接合部温度が150°Cを大幅に超過する250°C近くまで上昇している。一方、新回路ではそれが80°C程度まで抑制されており劇的な改善が確認できる。この回路を応用すれば電極間離隔速度の遅い大容量機械接点に対しても発熱の殆どない飽和領域の時間を長く設定することで過度な温度上昇を引き起こさず直流電流の遮断が可能となる。

これらの新回路を実証すべく図11に示す基板を設計・製作中である。同図の3Dビューアでもわかるように、追加のトランジスタの物理的サイズは極めて小さいことがわかる。今後これらの実証実験やさらなる高電圧・大電流化に向けて実験を行う予定である。

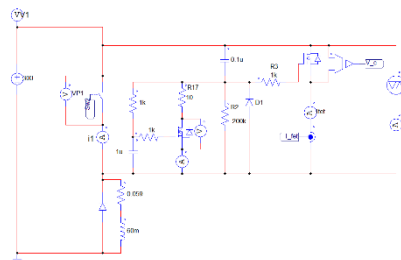


図9 パワー半導体の発熱限界改善回路

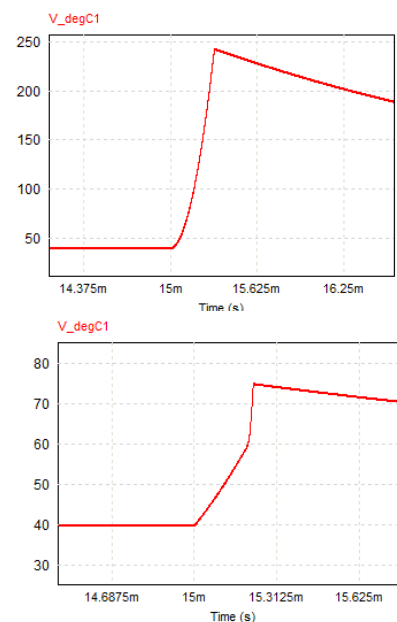


図10 新回路によるパワー半導体の温度上昇の劇的な改善 (上段)従来回路(下段)新回路

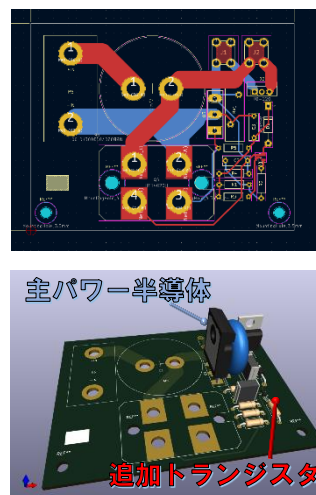


図11 新回路の設計・製作

- 6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
科学研究費助成事業 基盤研究(B)

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否
川口 卓志、加藤 修平	令和4年度	NEDO 新エネルギー技術研究開発事業フェーズ B	災害時に安全で高効率な太陽光安全スイッチの開発	否

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
成川、加藤	令和4年度電気学会産業応用部門	金属接点とパワー半導体による直流電流スイッチの双方向化	2022.8
石本、加藤	令和4年度電気学会産業応用部門	太陽光発電の最大電力点探索のためのキャパシタ短絡・開放回路に関する研究	2022.8
成川、加藤	令和4年度生産工学部学術講演会	金属接点とパワー半導体の併用による直流遮断器の寿命評価	2022.12
石本、加藤	令和4年度生産工学部学術講演会	太陽光発電システムの最大電力点追従運転の高速化に関する研究	2022.12

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名/論文名	巻・号	年月	出版社・発行所

10 本研究課題に関するその他の発表 (新聞、一般雑誌掲載等)

1 1 他の研究への発展

本研究の成果は太陽光発電の影対策のみならず広く直流回路の開閉に関わる技術として応用可能なため

- ・水素製造の電気分解大電流直流回路の開閉
- ・東日本と西日本の長距離直流送電の高電圧開閉器
- ・洋上風力発電における本土への直流送電開閉器

などへ非常に大きな波及効果が期待できる。

1 2 その他の成果

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

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

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5 年 5 月 22 日

日本大学学長 殿

氏 名： 青木 亮二
所属・資格： 医学部・助教
実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

低出生体重-非肥満 2 型糖尿病モデルマウスに対するホエイプロテインの発症予防効果

英文表記

Preventive effects of type 2 diabetes by whey protein in a low birth weight-non-obese type 2 diabetes mouse model

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 4 年度 ～ 令和 5 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

低出生体重-非肥満 2 型糖尿病動物モデルを用いて、幼仔期からホエイプロテインによる栄養学的介入により PPAR ファミリー遺伝子を介した 2 型糖尿病の発症を予防する効果があるかを明らかにすることである。

4 研究概要

日本では総出生数は減少しているが低出生体重児は増加している。低出生体重児は、成人期の内臓脂肪増加による非肥満型糖尿病の発症リスクが高い。それゆえ、その予防法と治療法の開発が喫緊の課題である。我々は、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルの作成に世界で初めて成功した（特願 2020-116354）。本研究では、本低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルに用いて、胚発生から成体までホエイプロテインを摂取させたマウスとカゼインプロテインを摂取させたマウスとを比較し、身体的および生化学的变化を測定することにより、ホエイプロテインがグルコースおよび脂質代謝に及ぼす影響を調べ、体脂肪減少に關与する潜在的メカニズムを特定することを目的とした。

5 研究結果

【体重の経過】

出生時の体重は、両群間に有意差はなかった。その後1週間ごとに、ホエイ群ではカゼイン群より体重が減少した。12週目では、体重はカゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった (48.3g vs 61.0g, $p < 0.01$)。

【血糖値、インスリン、インスリン抵抗性 (HOMA-IR)】

空腹時血糖値は、2群間で有意差はなかった (177.5 mg/dL vs. 184.7 mg/dL, $p = 0.75$)。IRI は、カゼイン群よりもホエイ群でわずかに低かった (22.0 μ IU/mL vs. 47.0 μ IU/mL, $p = 0.07$)。HOMA-IR は、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった (7.9 vs. 19.2, $p = 0.02$)。

【脂肪重量と体組成】

脂肪重量は、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった (2.4g vs. 3.8g, $p < 0.01$)。体組成は、除脂肪 (67.9% vs. 64.7%, $p = 0.63$) および脂肪 (32.0% vs. 35.3 %, $p = 0.63$) において両群で類似していた。

【血清および尿中クレアチニン】

クレアチニン値は、血清ではホエイ群がカゼイン群よりわずかに高く (0.11 mg/dL vs. 0.14 mg/dL, $p = 0.06$)、尿では有意に高かった (35.8 mg/dL vs. 54.6 mg/dL, $p = 0.02$)。

【血清リポ蛋白質分画】

コレステロール値については、総量、個数ともに両群間に有意差は認められなかった (総量 : 173.51 mg/dL vs. 153.46 mg/dL, $p = 0.63$; CM: 1.06 mg/dL vs. 2.99 mg/dL, $p = 0.11$; VLDL: 10.85 mg/dL vs. 10.94 mg/dL, $p = 0.94$; LDL: 25.16 mg/dL vs. 23.38 mg/dL, $p = 0.52$; HDL: 136.44 mg/dL vs. 116.16 mg/dL, $p = 0.26$) (Figure 3a-e)。一方、トリグリセリド値は、測定したすべての結果について、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった (総計 : 51.47 mg/dL vs. 119.2 mg/dL, $p = 0.01$; CM: 4.34 mg/dL vs. 17.92 mg/dL, $p = 0.01$; VLDL: 34.66 mg/dL vs. 73.48 mg/dL, $p = 0.04$; LDL: 9.42 mg/dL vs. 22.09 mg/dL, $p = 0.01$; HDL: 2.06 mg/dL vs. 7.14 mg/dL, $p = 0.01$)。

【肝遺伝子発現】

RT-qPCR 解析の結果、PPAR α の肝発現は、カゼイン群よりもホエイ群でわずかに高かった ($p = 0.08$) ; しかし、評価した他の脂質代謝関連遺伝子 (PPAR γ 、 $p = 0.27$; SREBP1c、 $p = 0.73$; HSL、 $p = 0.58$; LPL: $p = 0.25$) では他に差異は認められなかった。

〔5 研究結果（つづき）〕

【脂肪代謝】

主成分分析または階層的クラスタリングヒートマップの結果は、グループ間で有意な差はなかった。グルタチオン、1-メチルニコチンアミド、ミオイノシトールリン酸 (1-リン酸+3-リン酸) のレベルは、カゼイン群よりもホエイ群で有意に高かった ($p < 0.01$, $p = 0.04$, $p = 0.01$)。

結語

胎児期に開始したホエイプロテイン介入は、抗炎症作用や抗酸化作用を持ついくつかの代謝物のレベルを上昇させ、脂肪体重の減少やインスリン抵抗性の改善につながると思われた。

6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
 日本小児内分泌学会未来開拓研究助成、公益財団法人母子健康協会小児医学研究助成、一般財団法人近藤記念医学財団学術奨励賞、公益財団法人小児医学研究振興財団アサヒグループ食品(和光堂)研究助成金

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
中崎公隆	第58回日本周産期・新生児医学会学術集会	高脂肪食肥満に対するホエイプロテインの脂質代謝改善効果：モデルマウスにおける検討	2022.7.11
青木亮二	第58回日本周産期・新生児医学会学術集会	出生時の門脈血流に影響を及ぼす出生時因子に関する検討	2022.7.10

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
中崎公隆、青木亮二	Nutrient/Body Fat Reducing Effects of Whey Protein Diet	15・10	2023.5.10	

10 本研究課題に関するその他の発表(新聞、一般雑誌掲載等)特になし。

1 1 他の研究への発展

本研究ではマウスをホエイプロテインまたはカゼインプロテインのみで飼育したため、今後はホエイプロテインとカゼインプロテインを異なる比率で一緒に投与する混合介入を検討していく。臨床に応用するためには、このような混合製剤を検討する必要がある。

また、科研費で採択された成長ホルモンとの組み合わせにより、治療と予防による効果を検証していく。

1 2 その他の成果

特になし。

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

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

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5 年 5 月 5 日

日本大学学長 殿

氏 名： 清水 翔一
所属・資格： 医学部・助教
実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

低出生体重-肥満・非肥満 2 型糖尿病の病態解明：新規モデルマウスによる腎機能解析

英文表記 Analysis of renal function in a low birth weight-type 2 diabetes mouse model

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 4 年度 ～ 令和 5 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

本邦では少子化が進む一方、低出生体重児の割合は増加している。低出生体重児は将来、慢性腎臓病や糖尿病を発症しやすい。そのメカニズムの解明と予防法の開発が喫緊の課題である。我々は、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満 2 型糖尿病マウスモデルの作成に世界で初めて成功した (特願 2020-116354)。本研究の目的は、我々の開発したマウスモデルの①腎組織形態、尿・血液検査を用いた腎機能評価で慢性腎臓病の存在を明らかにすること、②腎臓組織のメタボローム解析を用いて、腎障害の発症機序を解明することである。その結果、低出生体重児の成人期の慢性腎臓病や糖尿病性腎症に関与する新しいメカニズムを明らかにする。本研究の成果は、低出生体重児の慢性腎臓病や糖尿病性腎症の早期発見のバイオマーカーの発見に繋がり、その予防法の開発に寄与できる。

4 研究概要

慢性腎臓病の病態メカニズムの仮説として、酸化還元反応の破綻を介したミトコンドリア内膜での代謝異常によってミトコンドリア障害に陥っていること (Kidney Int, 2017) や腎臓の AMP/ATP 比の上昇が、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の細胞内エネルギー不良を起こすことが推測されている (Kidney Int, 2019)。しかし、低出生体重児に発症する慢性腎臓病においてもそれらの病態メカニズムが関連しているかが不明である。本研究課題の核心は、「低出生体重-肥満・非肥満 2 型糖尿病動物モデルは慢性腎臓病や糖尿病性腎症を来すのか、その病態は何か？」である。そこで、成獣期の腎臓を用いたメタボローム解析や腎病理学的解析を行うことで病態解明ができると確信している。将来、バイオマーカーを明らかにし、早期に腎障害を発見して治療介入を行うことで、腎障害の進行およびそれに伴う透析導入の減少に寄与できることが大きく期待される。

本研究の目的は、低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルが慢性腎臓病、糖尿病性腎症を発症するかを明らかにし、メタボローム解析と腎病理学的解析でその病態を明らかにすることである。そのために、特許申請を行った通り独自性が極めて高い、我々のオリジナルのモデルである子宮内虚血による低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデル (特願2020-116354) を使用し、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症モデルを作成した。腎臓組織のメタボローム解析、腎病理学的解析にて低出生体重-慢性腎臓病の病態メカニズム解析を行った。

具体的な方法を示す。ICR 系統の妊娠マウスを妊娠 16.5 日にイソフルラン麻酔下で下腹部を切開した。両側子宮動脈の血流をクリップで遮断し、胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群を虚血群 (I) とした。15 分後クリップを外し、胎仔を腹腔内に還納、腹部を縫合した。同様の麻酔下で下腹部の切開のみを行った群をコントロール群 (C) とした。出生した I 群と C 群の雌の新生仔を 4 週齢で離乳し、8 週齢まで普通食で飼育した (各群: n=7)。体重測定は出生時と 8 週齢まで週 2 回行った。7~8 週齢に蓄尿を行い、尿検査にて尿蛋白・糖や尿細管マーカーの測定を行った。8 週齢に体組成測定した。その後、採血、腎臓摘出を行う。腎機能や糖代謝に関する生化学的検査、腎臓を用いてメタボローム解析を行った。慢性腎臓病、糖尿病、ミトコンドリア異常に関連する蛋白質・RNA 解析そして病理組織学的解析を行った。

本若手研究者助成の目的は、すでに採択された科研費に関連した事項について、さらに発展させることにある。採択された科研費の研究課題 (課題番号: 22K15908) は、低出生体重児の胎生期の環境が成体の慢性腎臓病や高血圧発症に関与する新しいメカニズムを明らかにする研究である。その病態解明の主眼は組織幹細胞や前駆細胞のエピジェネティクス異常といった胎生期の素因にある。一方、本研究は出生後の変化に主眼を実験を行った。

全てのプロトコールと手順は、日本大学医学部動物実験委員会の承認を受け実施した。

5 研究結果

(1) 出生体重、体重推移

出生体重の平均値はI群 1.5g、C群 1.8g と子宮内虚血によって低出生体重仔が産まれた ($p < 0.05$) (図 1a)。その後も I 群は低体重で推移し、8 週齢でも平均体重 I 群 35.5g、C 群 40.2g と I 群は低体重のまま推移した ($p < 0.05$) (図 1b)。

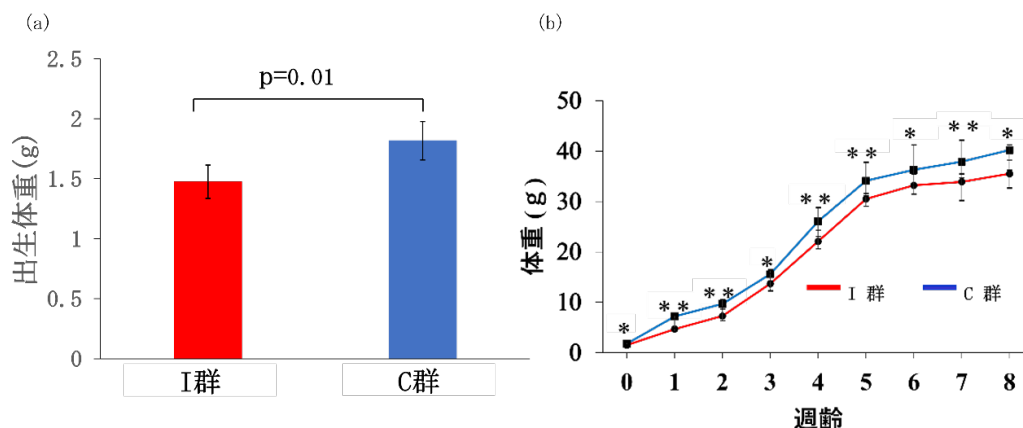


図 1 (a) 出生体重(b)出生から 8 週齢までの体重推移 (平均±標準誤差(各群 n=7)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)

(2) 8 週齢での体組成

両群の平均脂肪重量(I群 16.6 vs C群 17.7g)の間に有意差はなかった($p = 0.95$)。一方、平均除脂肪量は、C群よりも I 群で有意に低かった(I群 19.1 vs C群 22.6g、 $p < 0.05$) (表 1)。

	コントロール群(n=7)	虚血群(n=7)	p-Value
脂肪量 (g)	17.7±0.9	16.6±1.9	0.95
除脂肪量 (g)	22.6±0.8	19.1±1.6	< 0.05

表 1 8 週齢での体組成

(3) 7 週齢での蓄尿尿中 $\beta 2$ マイクログロブリンおよびアルブミン

両群の 7 週齢の尿中 $\beta 2$ マイクログロブリンおよびアルブミンの平均値は、C 群($26 \mu\text{g/L}$ 、 2.7mg/dL)と比較して、I 群($116 \mu\text{g/L}$ 、 6.5mg/dL)で有意に高かった(いずれも $p < 0.01$)(図 2)。

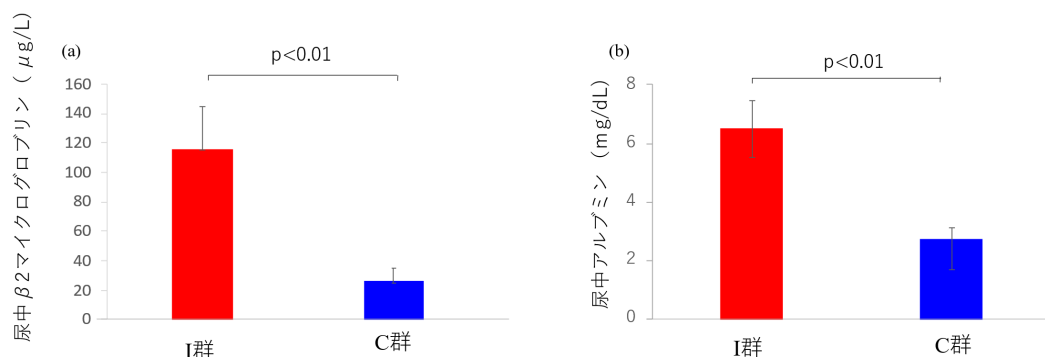


図 2 7 週齢での蓄尿検査結果

〔5 研究結果 (つづき)〕

(4) 8 週齢での腎臓病理検査

両群の 8 週齢における腎臓病理所見を比較した。各群の腎臓病理標本を用いて、糸球体径、メサンギウムの拡大の有無、硬化病変の割合において、両群間に有意差は認めなかった。

(5) メタボローム解析

腎臓のメタボローム解析を行った。主成分分析および階層型クラスター分析のヒートマップ表示において、I 群と C 群との間に明確な差が見られた (図 3)。コハク酸、スペルミジンは C 群よりも I 群で有意に高く (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)、S-アデノシルメチオニン、5'-シチジル酸は、C 群よりも I 群において有意に低かった (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。Human Metabolome Database を用いた物性分類では、腎機能障害の指標となる、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide が C 群よりも I 群で有意に高かった ($p < 0.05$)。

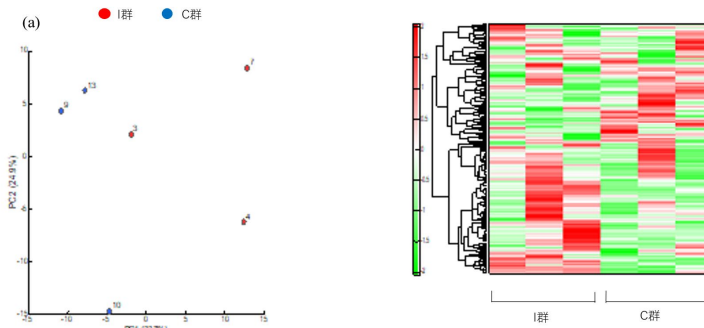


図 3. メタボローム解析(a) 主成分(PC)分析(b)階層型クラスター分析のヒートマップ表示(各群 n=3)。

(6) 酸化ストレスマーカー

代表的な酸化ストレスマーカーである 3-インドキシル硫酸、システイン、および S アデノシルメチオニンは I 群で C 群よりも有意に高かった (それぞれ $p < 0.001$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$) (表 2)。

		コントロール群 vs. 虚血群	
		比*	p-Value
酸化ストレス	インドキシル硫酸	2.0	<0.001
	システイン	3.0	<0.05
	S-アデノシルメチオニン	1.7	<0.01
	エルゴチオネイン	0.7	0.061
	N,N-ジメチルグリシン	0.9	0.683

表 2 酸化ストレスマーカー *2 群間の平均値の比

これらの結果から、低出生体重-肥満・非肥満 2 型糖尿病マウスモデルにおいて、8 週齢という比較的若い時期では、腎臓病理組織的な変化は来していなかった。しかしすでに微量アルブミン尿を認め、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症の予兆をきたしていた。メタボローム解析では腎障害に関連する N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide の関与を、また酸化ストレスマーカーの関与も示唆され、これらが同モデルの慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症に関連する可能性があると思われた。

6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
 日本小児内分泌学会未来開拓研究助成、公益財団法人母子健康協会小児医学研究助成、一般財団法人近藤記念医学財団学術奨励賞、公益財団法人小児医学研究振興財団アサヒグループ食品(和光堂)研究助成金

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否
清水翔一	令和5年度	公益財団法人川野小児医学奨学財団研究助成金	低出生体重仔の成獣期の糖尿病性腎症発症機序の解明とタウリンによる予防効果	採

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
Shimizu.S, Morioka.I, et al.	第58回高血圧関連疾患モデル学会	Epigenetic memory of stem and progenitor cells by the fetal malnutrition induce renal injury and hypertension with activation of renal renin-angiotensin system.	2022年 10月
清水翔一、長野伸彦、森岡一朗 他	第6回臨床DOHaDセミナー	早産児の在胎週数と臍帯血アミノ酸分画の関係	2023年 1月
Nakazaki.K, Nagano.N, Shimizu.S, Morioka.I, et al.	Pediatric Academic Societies Meeting 2023	Body fat reducing effects of a whey protein diet	2023年 4月

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Nakazaki.K, Nagano.N, Shimizu.S, Morioka.I, et al.	Nutrients / Body Fat Reducing Effects of Whey Protein Diet in Male Mice	15巻10号	2023年 5月	Multidisciplinary Digital Publishing Institute · Basel, Switzerland

10 本研究課題に関するその他の発表(新聞、一般雑誌掲載等)

特になし

1 1 他の研究への発展

「低出生体重ー高血糖発症マウスモデルにおける成長ホルモン治療の効果に関する研究」を開始し、同マウスモデルにおいて、成長ホルモンを投与することで、糖尿病や慢性腎臓病発症を抑制しうるか検討を開始している。

1 2 その他の成果

第 58 回高血圧関連疾患モデル学会 荻原賞を受賞（清水）

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

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

いずれかを選択してください

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5年 4月 6日

日本大学学長 殿

氏 名： 岡崎 章悟

所属・資格： 歯学部・助教

実施研究所： 歯学部・総合歯学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

癌ゲノム医療の基盤となる革新的癌モデルの開発

英文表記

Development of an innovative cancer model for cancer genome medicine

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 4 年度 ～ 令和 5 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

ゲノム解析技術の発展により、個々の腫瘍の遺伝子変異に基づき適した治療法を選択する「癌ゲノム医療」が現実となりつつある。しかし、既存の治療法の適応となる遺伝子変異は限られており、治療法が未確立の遺伝子変異に対する新規治療法が求められている。そのために、多様な遺伝子変異パターンを横断的に比較解析し、遺伝子異常に基づき癌の性状を理解することが重要となる。しかし、現状のマウス癌モデルにおいては、多様な遺伝子変異パターンを比較することは現実的ではない。本研究では、癌ゲノム医療時代における癌研究の基盤構築のため、PiggyBac システムによる遺伝子発現、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウト、ピンセット型電極による in vivo エレクトロポレーション法などの最新の手法を組み合わせることにより、膵癌、乳癌、大腸癌、膀胱癌、口腔扁平上皮癌などの多くの癌に応用可能かつ、多様な遺伝子変異パターンを比較解析可能な革新的癌モデルの作製を目指す。

4 研究概要

(背景) 近年のゲノム解析技術の発展により、個々の腫瘍における遺伝子変異を安価かつ迅速に解析可能になり、悪性腫瘍の遺伝子変異パターンに基づき治療を行う、「癌ゲノム医療」が現実のものとなりつつある。しかし、治療標的となる遺伝子変異は限られており、治療法の確立されていない遺伝子変異に有効な新規癌治療法開発のため、遺伝子変異に基づく癌の性状理解の重要性が高まっている。一方、遺伝子変異パターンと癌の性状の関連性を解明するためには、多様な遺伝子変異パターンを横断的に比較・解析する必要がある。しかし、現在用いられている遺伝子改変マウスによる発癌モデルにおいてこのような解析を行う場合、複数の遺伝子改変マウスの維持・交配が必要となるが、現実的ではなく、解析が進んでいないのが現状である。そこで、本研究では、遺伝子変異パターンが癌の性状に及ぼす影響の解明に向けた、革新的な新規癌モデルの開発を試みる。

(方法) 従来、癌研究に主に用いられてきた、遺伝子改変マウスを用いた発癌モデルと、発癌物質の投与による化学発癌モデルでは遺伝子変異パターンに基づく癌の性状解析は困難であった。例えば、遺伝子改変マウスモデルにおいて多様な変異を比較・解析するためには、多数の系統のマウスを維持・交配する必要があり、非現実的である。また、化学発癌モデルは遺伝子変異が不明確であり、特定の遺伝子変異と癌の特性を比較解析することは難しい。本研究では、上記課題を克服するため、高効率に遺伝子ノックアウト (KO) 可能な CRISPR/Cas9 システム、レトロトランスポゾンを用いることで高効率かつ永続的な遺伝子発現が可能な PiggyBac システム、ピンセット型電極による *in vivo* エレクトロポレーション法を組み合わせることにより、野生型マウス局所に遺伝子変異を導入し、発癌を誘導する新規癌モデル作製することで、従来のモデルでは困難であった、遺伝子変異パターンの違いが癌の性状に及ぼす影響の解明に向けた基盤構築を試みる。

以下はその詳細である。

1. 遺伝子導入条件の検討：蛍光タンパク質発現 PiggyBac ベクターを用い、エレクトロポレーション法による遺伝子導入後の蛍光タンパク質発現効率を検討し、各組織における遺伝子導入の至適条件を検討する。また、長期に蛍光タンパク質発現が維持されることも確認する。
2. 発癌誘導因子の同定：癌モデルの作製においては腫瘍形成に必要な遺伝子変異の選定が課題となる。本研究においては、腫瘍形成に必要な遺伝子変異を同定するため、癌遺伝子を発現する PiggyBac ベクターに加え、複数の癌抑制遺伝子に対する gRNA 発現ベクターをミックスし、遺伝子導入を行う。導入直後は各細胞において多様な遺伝子変異が生じるが、腫瘍形成能を獲得した細胞のみがクローン増殖し、腫瘍を形成する。その後、腫瘍の遺伝子変異を解析することで、腫瘍形成に必要な遺伝子変異を同定する。導入する遺伝子変異は癌ゲノム解析の大規模臨床データベースである The Cancer Genome Atlas の変異解析データをもとに選択し、その遺伝子変異パターンを反映した複数種類の癌モデル作製を試みる。

5 研究結果

本研究では、*In vivo* エレクトロポレーション法による PiggyBac ベクターの導入による様々な組織に由来する癌モデルの作製を試みるが、まず初めに、遺伝子導入が比較的容易である、皮膚および舌に癌を生じるモデルの樹立を試み、下記の実験を行った。

① *In vivo* エレクトロポレーション法の条件検討

In vivo エレクトロポレーションによる発がん誘導においては、高い遺伝子導入効率が必要となることから、まず、皮膚において、GFP 発現ベクターによる遺伝子

導入法の検討を行った。また、ヒアルロニダーゼがエレクトロポレーションの効率を向上させるとの報告があったため、ヒアルロニダーゼ投与の有無による遺伝子導入効率の比較を行った。

C57BL/6 マウス皮下にヒアルロニダーゼを投与し、その1時間後、ヒアルロニダーゼ投与部位および非投与部位に GFP 発現ベクターを投与した。その後、ピンセット型電極で皮膚を挟み、エレクトロポレーター NEPA21 によるエレクトロポレーションを行った。その5日後に皮膚組織の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡による GFP 発現の検討を行った。

その結果、ヒアルロニダーゼ非投与部位においては明らかな GFP 発現は認められなかったが、ヒアルロニダーゼ投与部分においては、GFP の発現が認められた (図1)。以上の結果より、ヒアルロニダーゼ投与と *In vivo* エレクトロポレーションを組み合わせることにより、皮膚へのベクター導入が可能であることが示された。

② 遺伝子発現誘導およびノックアウトベクターの作製

皮膚および舌へのベクター導入による発がん誘導実験をおこなうため、TCGA データベースを用いた、癌において高頻度に認められる遺伝子異常の検索を行った。TCGA データベースには、皮膚がんのデータはなく、口腔扁平上皮癌のデータが登録されているため、主に口腔扁平上皮癌において高頻度に変異・過剰発現などの遺伝子異常が認められる遺伝子を検討した。

PIK3CA の遺伝子増幅もしくは活性化変異は半数近くの腫瘍に認められ、また、CCND1 または EGFR の過剰発現は 20-30% 程度の腫瘍において認められた。機能欠損を生じる遺伝子異常としては、TP53 において約 70%、CDKN2A において約 50%、FAT1、NOTCH1、KMT2D において約 20% で認められた。そのため、PiggyBac システムにより過剰発現を誘導する遺伝子として変異型 *Pik3ca*、*Ccnd1*、EGFR を、CRISPR/Cas9 システムにてノックアウトする遺伝子として、*Trp53*、*Cdkn2a*、*Fat1*、*Notch1*、*Kmt2d* を選択した。次に、PiggyBac システムによる変異型 *Pik3ca*、*Ccnd1*、EGFR およびポジティブコントロールに用いる蛍光タンパク質 EGFP とピューロマイシン耐性遺伝子の発現を誘導するベクター、さらには CRISPR/Cas9 による *Trp53*、*Cdkn2a*、*Fat1*、*Notch1*、*Kmt2d* の欠損を誘導するベクターの設計及び作製を行った (図2)。

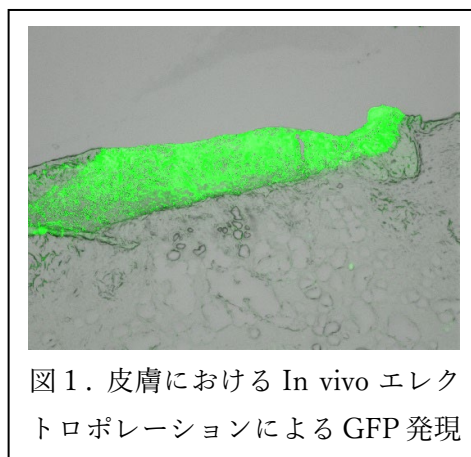
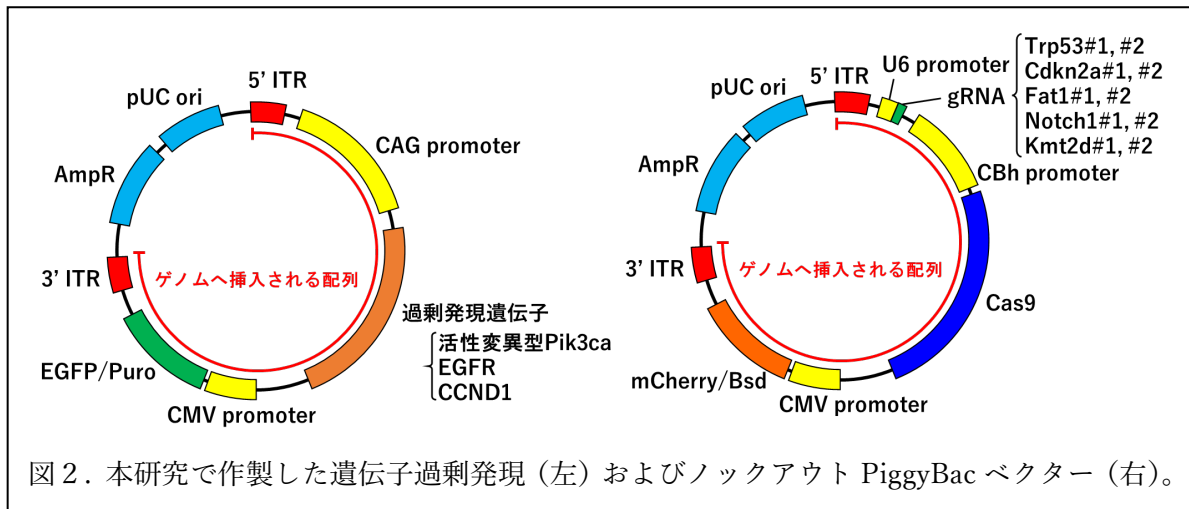


図1. 皮膚における *In vivo* エレクトロポレーションによる GFP 発現

〔5 研究結果 (つづき)〕



③ HEK293T 細胞を用いた PiggyBac システムの検討

作製した EGFP・ピューロマイシン耐性遺伝子発現 PiggyBac ベクターを用い、HEK293T 細胞にトランスポザラーゼ発現ベクターとのコトランスフェクションを行うことで、長期的な EGFP およびピューロマイシン耐性遺伝子発現が維持されるか検討を行った。EGFP・ピューロマイシン耐性遺伝子発現 PiggyBac ベクターを、単独、もしくは PiggyBac トランスポザラーゼベクターとのコトランスフェクションによる HEK293T 細胞への遺伝子導入を行い、トランスフェクション 3 日後より薬剤セクションを行った。その結果、EGFP 発現ベクター単独でのトランスフェクションにおいてはほとんどの細胞が薬剤選択により細胞死が誘導された一方、PiggyBac トランスポザラーゼとのコトランスフェクションにおいては多くの細胞が残存し、また、長期的な EGFP 発現も認められた (図3)。この結果より、PiggyBac システムを用いたゲノムへの外来遺伝子挿入による効率的かつ長期的な遺伝子発現が可能であることが確認された。



以上、本年度は、マウスに対して *in vivo* エレクトロポレーションを行うためのベクターの作製と、その条件検討等が完了したため、今後は作製したベクターをマウス皮膚および舌へ導入し、発がんを誘導可能か検討を行う。

6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
 科学研究費基盤研究 (B)・挑戦的研究 (萌芽)、JST、AMED の若手向け研究費、上原記念生命科学財団や武田科学振興財団等などの民間の研究費

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否
なし				

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
岡崎章悟、吉川桃子、相馬智也、蒔生田整治、今井健一、後飯塚、佐谷秀行、永野修	第 81 回日本癌学会学術総会	FOXA1 suppresses oral cancer progression through inhibiting p38 activation induced by lipid-derived aldehydes	2022 年 10 月
岡崎章悟、中島由梨佳、吉川桃子、相馬智也、蒔生田整治、今井健一、後飯塚、佐谷秀行、永野修	第 45 回日本分子生物学会年会	口腔扁平上皮癌における FOXA1 の発現低下は腫瘍成長と xCT 依存性を促進する	2022 年 12 月
岡崎章悟、今井健一	第 64 回歯科基礎医学会学術大会	シスチントランスポーター-xCT に対する阻害剤は FOXA1 低発現口腔扁平上皮癌に対して抗腫瘍効果を示す	2022 年 9 月

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名/論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Yamasaki A, Miyake R, Hara Y, Okuno H, Imaida T, Okita K, Okazaki S, Akiyama Y, Hirotsu K, Endo Y, Masuko K, Masuko T, Tomioka Y.	Cancer Med. / Dual-targeting therapy against HER3/MET in human colorectal cancers	In press	2023 年	Wiley
Yamasaki A, Maruyama-Takahashi K, Nishida K, Okazaki S, Okita K, Akiyama Y, Suzuki H, Endo Y, Masuko K, Masuko T, Tomioka Y.	Genes to Cells / CD98 regulates the phosphorylation of HER2 and a bispecific anti-HER2/CD98 antibody inhibits the growth signal of human breast cancer cells	In press	2023 年	Wiley

10 本研究課題に関するその他の発表 (新聞、一般雑誌掲載等)

なし

1 1 他の研究への発展

近年、腫瘍と細菌の相互作用が腫瘍の発生・進展に涵養することが明らかとなりつつある。本研究により任意の局所に腫瘍を発生させることが可能になれば、本実験系は腫瘍-細菌相互作用の解析においても有用なツールとなると考えられる。現在、癌細胞株を用いた偏性嫌気性菌と癌細胞の共培養系の構築など、腫瘍-細菌相互作用の実験系についても樹立を進めており、本研究の癌モデルと組み合わせることにより、細菌が腫瘍の発生・進展に及ぼす影響の解析にも発展が期待できる。

1 2 その他の成果

転写因子FOX A 1が口腔扁平上皮癌の進展を抑制すること、また、FOX A 1発現が歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* により抑制される可能性を見出しており、現在論文投稿準備中である。

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
なし						

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

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5年 3月 31日

日本大学学長 殿

氏 名：中西 祐輔

所属・資格：生物資源科学部・専任講師

実施研究所：生物資源科学部・生命科学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

好中球細胞外トラップによる上皮間葉形質転換の誘導

英文表記

Relationship between neutrophils extracellular traps and epithelial-mesenchymal transition

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 年度 ~ 令和 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

がん治療を取り巻く環境は大きく変化している。分子標的薬を含む化学療法の発達、免疫療法の進歩などの恩恵は多くの患者に還元され、がんは不治の病ではなくなりつつある。一方で、がんは我が国の死亡原因 1 位という事実がある。この要因は、がん細胞の「転移」、特に化学療法耐性を獲得した後の「再発・転移」であることは疑う余地はない。

上皮-間葉形質転換 (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) は、腺癌細胞が細胞接着の機能を失い、間葉系細胞へと変化することによって遊走・浸潤能を獲得するプロセスを指す。近年、術後化学療法を想定したマウスモデルを解析した論文において、EMT は乳がんおよび膵管腺癌の肺転移および全身性播種の必要条件ではないものの、EMT を経た細胞は化学療法に対してより強い耐性を示し、再発性転移を構成する中心的な細胞群であることが報告されている (Nature, 2015)。これらの報告は、術後の化学療法に効果が表れない患者は EMT を経た転移が関与している可能性を強く示唆しており、EMT を標的とした治療戦略が転移・再発抑制効果を高められる可能性を示している。

化学療法耐性のがん細胞を生体から排除するためには、どのような方法が良いのであろうか？がん細胞の持つ特異的な性質を分子レベルで捉え、それを標的とする分子標的薬は比較的副作用の少ない治療法として一定の成果を挙げている。一方で、細胞の性質を変化させてしまう EMT のような現象には効果は懐疑的である。このようなケースには、幅広い抗原に対応しうることが可能ながん免疫応答を賦活することが有効だと考えられる。

腫瘍関連好中球 (Tumor associated neutrophil: TAN) は、腫瘍組織に浸潤・集積している好中球である。これらの細胞は、細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: Nets) を放出することにより、原発巣においてキラーT細胞やNK細胞による抗腫瘍活性からの免疫逃避機構の確立に寄与していること、更には、肺への転移巣を構築するための微小環境を整える役割を果たしていることが知られている (*Immunity*,2020)。また、申請者の研究において、マウス転移性乳がん細胞株 4T1 で誘導した腫瘍内には多量の好中球が浸潤すること、およびその腫瘍内で Nets が引き起こされていることを明らかにしている (*BBRC*, 2022)。これらの事実から、TAN および Nets が EMT を介した転移・再発に深く関与しているのではないかと考えられた。よって、本申請課題では、EMT を介したがんの転移・再発メカニズムと TAN の関係性を明らかにし、TAN 側を標的とすることによる治療法の開発を目的とする。

4 研究概要

がんの「再発・転移」は今なお、がん治療における壁として立ちはだかっている。上皮-間葉形質転換 (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) はこの再発・転移に深く関わる生命現象と考えられているが、*in vivo* でのその細胞挙動を追跡することは難しく、また、臨床症状を模倣した再発・転移の実験は時間を有することからその詳細は明らかになっていない。本研究では、ゲノム編集技術を用いた EMT 標識細胞株と臨床症状を模倣したマウスモデルを用い、一部のがんにおいては、EMT の誘導に腫瘍微小環境に局在する好中球が関与しているという仮説の検証を目的とし、再発・転移の抑制に対する免疫治療の可能性を模索する。

5 研究結果

本研究では、臨床症状の転移・再発を反映させるため、ゲノム編集技術を用いた EMT 標識細胞株の樹立と乳がん細胞株の乳腺移植モデル (同所性移植モデル) を用いて、TAN と EMT の関連性を検討する。そのため、上皮系細胞の時は赤 (RFP+) に光り、EMT を起こし、間葉系細胞になると緑に光る (GFP+) カラースイッチ 4T1 細胞株を Crispr/Cas9 法を用いて樹立することを目指している。まず、Addgene より購入したプラスミドより loxp-DsRed-loxp の遺伝子配列を PCR で増幅した。この際、両末端に制限酵素サイトを付加しておいた。次に、PCR 産物を制限酵素サイトを用いて、GeneCopoeia 社の Mouse ROSA26 Safe Harbor Gene Knock-in Kits 中のクローニングベクターに挿入した。loxp-DsRed-loxp 配列を挿入されたベクターを大腸菌に形質転換することにより、ドナーDNA を取得する予定である。得られたドナーDNA と ROSA26 遺伝子に対する gRNA と CAS9 を発現するプラスミドを同時に 4T1 細胞にト

〔5 研究結果 (つづき)〕

ランスフェクションすることにより ROSA26 遺伝子配列に loxp 配列を持つ DsRed 蛍光 4T1 細胞株の樹立を目指していく。次に、Cre を挿入する EMT 関連遺伝子を決定するため、4T1 細胞株を EMT を誘導する代表的な誘導因子である TGF- β で刺激して、EMT 関連遺伝子の発現挙動を定量 PCR により測定した。その結果、カドヘリン遺伝子のリプレッサー因子である Snail の発現が最も強く誘導されていること、この発現はタンパクレベルでも誘導されていることが明らかとなった (図 1)。よって、Snail の下流に Cre の遺伝子を挿入することが、EMT カラースイッチ細胞を作るうえで有効であることが示唆された。

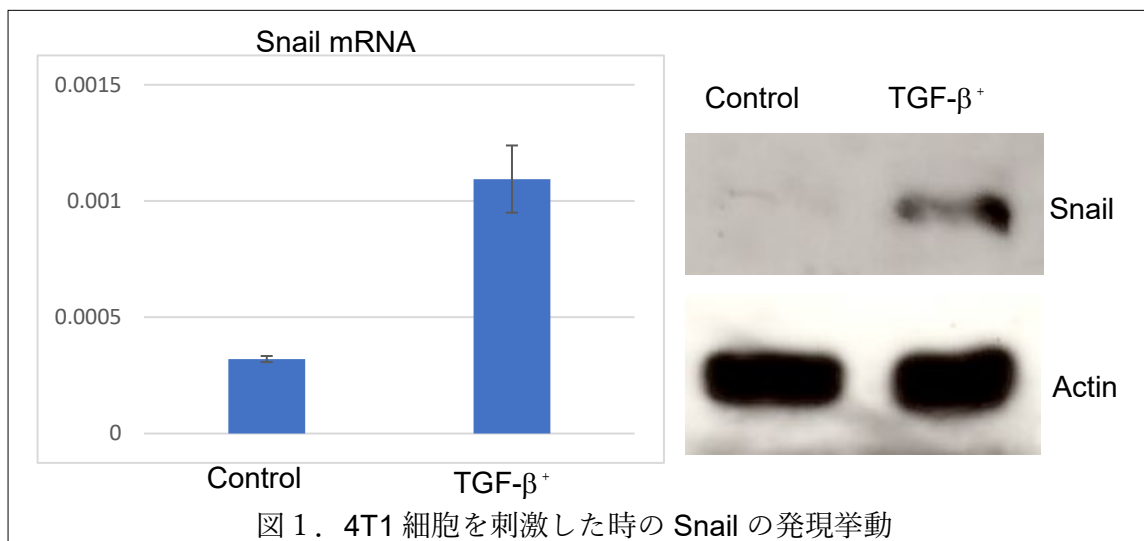


図 1. 4T1 細胞を刺激した時の Snail の発現挙動

最後に、臨床症状を反映させた転移モデルにおいて、Nets が関与しているかどうかを検討した。転移性乳がん細胞株 4T1 をマウスの乳房脂肪パッドに移植して原発巣を誘導した後、外科的手術により摘出した。その結果、乳がん細胞株を乳房脂肪パッドに移植する同所性移植モデルにおいても、腫瘍内への好中球の浸潤および Nets の産生が認められた。また、原発巣を除去した後、転移を起こした肺組織においても Nets の放出が認められた。よって、臨床症状を模倣した転移モデルにおいても Nets が関与している可能性が強く示唆された。今後、EMT カラースイッチ細胞および Nets を誘導するうえで必須の転写因子 PAD4 の遺伝子欠損マウス (Padi4 欠損マウス) を利用して転移・EMT・Nets の関係性を明らかにし、がんの再発・転移における新規の免疫療法の可能性について検証を進めていく予定である。

6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
 基盤研究 B、基盤研究 A、日本大学学術助成金

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Mukai H , et.al.	Pannexin1 channel-dependent secretome from apoptotic tumor cells shapes immune- escape microenviroment/BBRC	628・5	2022	エルゼビア

10 本研究課題に関するその他の発表（新聞、一般雑誌掲載等）

1 1 他の研究への発展

1 2 その他の成果

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

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