

共同研究 研究紀要

2016

神戸薬科大学

共同研究 研究成果報告書

本学では、産業界、国内外の大学等の教員・研究者と行う共同研究について、神戸薬科大学共同研究規程に基づき、共同研究委員会で審査を行っています。また、その研究成果を広く公表するため、次に「共同研究 研究成果報告」を掲載します。

2015（平成 27）年度共同研究（研究期間 2015.4.1 ～ 2016.3.31）

承認番号	共同研究課題名（研究テーマ）	研究代表者
1	合成糖鎖を用いた硫酸化グリコサミノグリカンの生合成と機能の研究	生化学研究室 教授 北川 裕之
2	特異抗体を活用したアポリポ蛋白 A - I 体内動態評価法の開発	生命分析化学研究室 教授 小林 典裕
3	未根治心房中隔欠損症における肺高血圧発症メカニズムの解明と治療法最適化への応用	臨床薬学研究室 教授 江本 憲昭
4	リン酸化反応を利用したサリシンの可溶化および新規化合物の合成	機能性分子化学研究室 教授 中山 尋量
5	特異な縮環様式をもつ含窒素複素環化合物群の合成と抗癌活性評価	薬品化学研究室 教授 宮田 興子
6	分子イメージング薬剤の開発研究	薬品物理化学研究室 教授 向 高弘
7	天然物から婦人科悪性腫瘍に対する活性成分の探索	生薬化学研究室 准教授 土反 伸和
8	レチノールアナログを利用した optogenetics ツールの開発	生命有機化学研究室 教授 和田 昭盛
9	新規摂食調節ペプチド adropin の食行動および情動に関する研究	病態生化学研究室 教授 加藤 郁夫
10	ビタミン K 合成酵素 UBIAD1 の機能解析	衛生化学研究室 准教授 中川 公恵
11	難治性アレルギー疾患の病態解明と制御	薬理学研究室 教授 吉野 伸
12	高等植物ならびに地衣類を起源とする DNA 代謝酵素阻害剤の探索	薬化学研究室 教授 棚橋 孝雄
13	Cocrystal 形成による医薬品の物性および安定性の改善	製剤学研究室 教授 北河 修治
14	糖鎖による生体機能の新規調節機構の解明	微生物化学研究室 教授 小西 守周

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属 生化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・北川裕之

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	合成糖鎖を用いた硫酸化グリコサミノグリカンの生合成と機能の研究				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	北川裕之 田村純一	神戸薬科大学 鳥取大学	薬学部 地域学部	教授 教授	生合成および機能の解析と全体の総括 糖鎖合成
共同研究の成果					
<p>コンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸を含む硫酸化グリコサミノグリカン鎖は、多様な硫酸化修飾構造をもつ多糖鎖の一つであり、細胞接着、分化、神経回路網の形成などを調節する役割を果たしているが、その硫酸化構造の生合成と機能との相関は十分に解明されていない。本研究では、糖鎖有機合成の専門家の協力により、有機化学的に合成された糖鎖を用いて、硫酸化グリコサミノグリカン鎖の精密な生合成機構と機能を明らかにすることを目標としている。</p> <p>特に、コンドロイチン硫酸は、中枢神経系のマトリックスに豊富に存在することが知られ、軸索再生や神経可塑性の制御などに重要な役割を果たしていると考えられている。コンドロイチン硫酸は、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンが交互に繰り返した構造を基本糖鎖骨格にもち、その様々な部位が硫酸化修飾を受けて構造多様性を獲得する。我々は、コンドロイチン硫酸の多様な硫酸化パターンによって軸索再生や神経可塑性が制御されていると考え、有機化学的に合成された様々なコンドロイチン硫酸鎖を用いてその作用メカニズムを明らかにしようとした。</p> <p>本年度は、鳥取大学の田村純一教授との共同研究に加え、理化学研究所・脳科学総合研究センターの戸島拓郎研究員らとも共同研究を行い、コンドロイチン硫酸鎖内に存在する糖鎖機能ドメインとその受容体候補を絞り込むことを試みたところ、複数の糖鎖機能ドメインとその受容体の同定に成功し、さらに受容体下流で作動する、軸索伸長活性や軸索成長円錐の運動性を調節する細胞内シグナル伝達クロストークについても多くの知見を得た。例えば、高硫酸化コンドロイチン硫酸サブタイプの一つであるコンドロイチン硫酸-Eによる軸索伸長活性や軸索ガイダンスを媒介する受容体としてCNTN-1、PTPRσ、LARを同定し、受容体下流の細胞内シグナル分子としてFynや、Ca²⁺とcAMPの関与を示した。興味深いことに軸索ガイダンスに関しては、軸索の誘引時と反発時では、必要な最短コンドロイチン硫酸-Eの鎖長、活性化される受容体の組み合わせ、さらには開口するCa²⁺チャネルの種類が全く異なることが明らかとなった。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Masao Nakamura, Jun-ichi Tamura, Hiroshi Kitagawa, Takuro Tojima, Hiroyuki Kamiguchi	International Symposium on Glyco-Neuroscience		
タイトル	開催日	開催場所	
Identification of receptors for chondroitin sulfate-E-mediated bidirectional axon guidance	2016年1月 14日-16日	淡路	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属 生命分析化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・小林 典裕

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題		特異抗体を活用したアポリポ蛋白 A-I 体内動態評価法の開発			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	小林 典裕 斎藤 博幸	神戸薬科大学 京都薬科大学	薬学部 薬品物理化学分野	教授 教授	抗 apoA-I 抗体の作製と応用 apoA-I 体内動態の解析
共同研究の成果					
<p>ApoA-I は HDL を構成するアポリポタンパク質で、体内余剰コレステロールの肝臓への運搬を補助するため、動脈硬化抑制作用が示唆されている。しかしアミノ酸配列に変異を生じた ApoA-I は加水分解されやすく、生じた N 末端フラグメント (fr) が重合し、線維状のアミロイドタンパク質 (fibril) が形成される。この fibril が組織へ沈着し、アミロイドーシスを発症すると考えられているが、その機構の全貌は未だ明らかにされていない。そこで、前年度に引き続き、抗 ApoA-I モノクローナル抗体の作製と、その ApoA-I 体内動態解明への応用を検討した。</p> <p>G26R 変異 ApoA-I の N 末端フラグメント (ApoA-I-frg; 1-83 番アミノ酸からなる)、変異を含まない ApoA-I 全長タンパク質 (ApoA-I-wt)、そして fr の重合体 (ApoA-I-fib) の 3 種を抗原とするモノクローナル抗体の調製を試み、これまでに ApoA-I-frg に特異的な抗体産生株が 5 種、ApoA-I-wt に特異的な抗体産生株が 10 種、frg および wt のいずれにも反応する抗体産生株が 6 種得られている。しかし、ApoA-I-fib については、未だモノクローナル抗体産生株は得られず、次年度以降も調製を続ける予定である。</p> <p>得られた抗体のうち、wt に特異的な抗体に絞って、認識している ApoA-I 分子上の抗原決定基の特定を試みた。その結果、抗体 #20-7 は 44 ~ 65 番目の、#19-17 は 84 ~ 126 番目の、そして #11-5、#124-2、#176-1、#129-9 は 122-143 番目のアミノ酸残基からなる部分構造を認識することが示された。これら抗体のうち、#19-17 と #20-7 の 2 種については、lipid-free (LF)、disc 状高密度リポタンパク質 (d-HDL)、ヒト血清由来の高密度リポタンパク質 (HDL) 粒子内の 3 つの状態における ApoA-I に対する反応性をバイレイヤー干渉法により調べた。その結果、いずれの抗体も HDL に対して最も強く反応するが、#19-7 は LF、d-HDL とともに有意な交差反応が見られた。他方、#20-7 は LF には交差反応するものの d-HDL にはほとんど反応せず、ApoA-I の存在様式に基づく立体構造の微小差にある程度の特異性を示すことが判明した。今後、他の 4 種抗体についても立体構造に関する特異性を検討し、LF、d-HDL、HDL を分別定量できるイムノアッセイ系の開発を試みる予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
K. Kuwabara, K. Nishitsuji, K. Uchimura, S.-C. Hung, M. Mizuguchi, H. Nakajima, S. Mikawa, N. Kobayashi, H. Saito, N. Sakashita	Cellular interaction and cytotoxicity of the Iowa mutation of Apolipoprotein A-I (ApoA-IIowa) amyloid mediated by sulfate moieties of heparan sulfate			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>J. Biol. Chem.</i>	290(40)	2015	24210-24221	

著者名	著書名			
H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, S. Miyake, A. Moriuchi, T. Akisada, T. Niwa, N. Kobayashi	Gaussia luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Anal. Chem.</i>	87(24)	2015	12387-12395	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
木村 仁、三河 志穂、 小林 典裕、斎藤 博幸	膜シンポジウム 2015		
タイトル	開催日	開催場所	
HDL-apoA- I の結合構造を特異的に認識する抗 apoA- I 抗体の開発と相互作用評価	2015.11.25	神戸	

発表者	学会名		
桑原 香織、西辻 和親、 山下 太郎、小林 典裕、 内村 健治、安東由喜雄、 斎藤 博幸、坂下 直実	第3回日本アミロイドーシス研究会学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
ApoA I アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響	2015.08.21	東京	

発表者	学会名		
Kobayashi Norihiro	The 2015 Annual convention of the Korean Society of Applied Pharmacology Seoul		
タイトル	開催日	開催場所	
Generation, molecular breeding, and biomedical application of antibodies specific to low molecular weight drugs	2015.10.08	Seoul	

発表者	学会名		
黒田 裕美、森田いずみ、 伊藤 綾、小山 千尋、 池田 夏美、大山 浩之、 小林 典裕	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
オンライン分析を目的とする Teoc 化覚せいアミンに対するモノクローナル抗体の作製		2016.03.28	横浜

発表者	学会名		
山本 知佳、大山 浩之、 木口 裕貴、森田いずみ、 小林 典裕	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
抗エストラジオール scFv 試験管内親和性成熟機構の解析 (2)		2016.03.28	横浜

発表者	学会名		
木口 裕貴、藤田 真聡、 片山恵美子、大山 浩之、 森田いずみ、小林 典裕	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
高性能変異抗体の効率的単離を目的とする抗ファージ scFv-GLuc 融合体の調製		2016.03.28	横浜

発表者	学会名		
大山 浩之、徳重 仁美、 知念絵美理、森下 知美、 森田いずみ、小林 典裕	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
抗コルチゾール scFv の親和性成熟における部位特異的変異の効果		2016.03.28	横浜

発表者	学会名		
大山 浩之、江浪 友理、 田川 達矢、山本 知佳、 森田いずみ、小林 典裕	日本分析化学会第 64 年会		
タイトル		開催日	開催場所
改良型抗エストラジオール scFv の親和性成熟機構の解析		2015.09.11	福岡

発表者	学会名		
大山 浩之、宮下 貴之、 森田いずみ、小林 典裕	日本分析化学会第 64 年会		
タイトル		開催日	開催場所
scFv ー ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いるチロキシン生物発光 ELISA の試み		2015.09.11	福岡

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属	臨床薬学研究室
研究代表者職・氏名	教授・江本 憲昭

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	未根治心房中隔欠損症における肺高血圧発症メカニズムの解明と治療法最適化への応用				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	江本 憲昭	神戸薬科大学	薬学部	教授	臨床検体解析
	中山 和彦	神戸大学	医学部附属病院	特命助教	臨床データ解析
	平田 健一	神戸大学大学院	医学研究科	教授	臨床検体収集
共同研究の成果					
<p>本研究の目的は肺高血圧症の治療対象となる新規病態を探索し、将来の臨床試験の計画・遂行に有益な知見を集積し、新たな治療概念を構築することである。</p> <p>未根治心房中隔欠損症は本邦における肺高血圧症の原因として大きな割合を占め、肺血管拡張薬による治療がある一定の成果をあげつつあるが、重症化例の治療法は未だ確立していない。</p> <p>そこで、本研究では未根治心房中隔欠損症の症例登録を神戸大学で行いつつ、患者より得られた採血検体を用いて本症の新規病態解明と新たな創薬標的探索を分子遺伝学的手法を用いて解析する。基礎および臨床の両面からのアプローチにより、新規治療法開発に関する成果を目指す。</p> <p>今年度は、神戸大学における心房中隔欠損症患者の症例登録を行い、心臓カテーテルおよび心エコー図検査による血行動態評価、6分間歩行や心肺機能検査による運動耐容能、治療内容などを含んだデータベースを構築した。同時に対照群として共同研究を行っているインドネシア・ガジャマダ大学でのデータと比較検討した臨床疫学データを平成27年10月に日本肺高血圧／日本肺循環学会、また平成28年1月に日本成人先天性心疾患学会等で発表した。また、肺高血圧症の非侵襲的検査手法として心エコー図検査における各種指標の解析を行い、論文として発表した。</p> <p>また、個別化医療の開発に向けた心房中隔欠損症に伴う肺高血圧症の分子遺伝学的背景の探索目的で、患者血液検体を用いて血中マイクロパーティクル内RNAを次世代シーケンサーで網羅的に解析し、新規バイオマーカーの探索に取り組んできた。13,462遺伝子中、肺高血圧患者で対照患者に比べ4倍以上の発現上昇がみられている遺伝子が70個同定されており、これらの遺伝子を蛋白レベルで検証し、真の新規バイオマーカー同定への確認作業中である。この技術を用いてASD患者が①正常肺血圧、②肺高血圧症、③Eisenmenger症候群の3群間で比較検討して先天性心疾患に合併する肺高血圧症特有のバイオマーカー探索を行う予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Teguh Ryanto GR, Nakayama K, Takaya T, Fujimoto D, Kinutani H, Shinkura Y, Mori S, Okada T, Nishii T, Kono A, Shinke T, Emoto N, Hirata K.	Use of Coils and a Pulmonary Vasodilator to Reduce Pulmonary Hypertension in a Patient with Interstitial Pneumonia and Scleroderma.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Intern Med.	54	2015	2721-2726	

著者名	論文標題			
Sano H, Tanaka H, Motoji Y, Fukuda Y, Sawa T, Mochizuki Y, Ryo K, Matsumoto K, Emoto N, Hirata K.	Right ventricular function and right-heart echocardiographic response to therapy predict long-term outcome in patients with pulmonary hypertension.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Can J Cardiol.	465	2015	352-362	

〈総説〉

著者名	論文標題			
中山 和彦、江本 憲昭	肺高血圧症 エンドセリン受容体拮抗薬			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
最新医学 別冊 診断と治療のABC	104	2015	113-126	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
中山 和彦、Lucia Kris Dinarti, Anggrahini Dyah Wulan, Anggoro Budi Hartopo, 鈴木 陽子、 松本 賢亮、田中 秀和、 新家 俊郎、平田 健一、 江本 憲昭	第4回日本肺循環学会（JPCS）第3回日本肺高血圧学会（JPHS）合同学術総会		
タイトル	開催日	開催場所	
インドネシアと日本における心房中隔欠損症患者の疫学比較調査	2015/10/3-10/4	東京	

発表者	学会名		
中山 和彦、鈴木 陽子、 新倉 悠人、玉田 直己、 谷仲 謙一、松本 賢亮、 田中 秀和、大竹 寛雅、 新家 俊郎、平田 健一、 江本 憲昭	第18回日本成人先天性心疾患学会学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
先天性心疾患由来肺高血圧症における術後肺高血圧症の特徴	2016/1/16-1/17	大阪	

発 表 者	学 会 名		
Dyah Wulan Anggrahini, Lucia Kris Dinarti, Anggoro Budi Hartopo, Kazuhiko Nakayama, Noriaki Emoto, Budi Yuli Setianto	第 18 回日本成人先天性心疾患学会学術集会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Incidence of Pulmonary Hypertension complicating Atrial Septal Defect in Indonesia Patients:Lessons from non-treated adult patient		2016/1/16-1/17	大阪

発 表 者	学 会 名		
Lucia Kris Dinarti, Dyah Wulan Anggrahini Anggoro Budi Hartopo, Kazuhiko Nakayama, Noriaki Emoto, Budi Yuli Setianto	第 18 回日本成人先天性心疾患学会学術集会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Mortality in Pregnant Patients with Pulmonary Hypertension related Atrial Septal Defect		2016/1/16-1/17	大阪

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属 機能性分子化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・中山 尋量

平成 27 年 7 月 2 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 28 年 3 月 31 日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	リン酸化反応を利用したサリシンの可溶性および新規化合物の合成				
構 成 員	氏 名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職 名	研究の役割分担
	中山 尋量	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	総括
	前田 秀子	神戸薬科大学	薬 学 部	講 師	リン酸化反応および単離
	成相 裕之	神 戸 大 学	工 学 研 究 科	教 授	リン酸化剤の調製
共同研究の成果					
<p>β-D-グルコース配糖体であるサリシンのジホスホン酸塩 (DP) によるリン酸化反応を行った。DP とサリシンとの反応溶液の経時変化を HPLC により測定した。保持時間 15 分のサリシンのピーク以外に 8、13、14 分に生成物のピークが見られたため、それぞれの生成物の構造を同定するため単離を行った。</p> <p>単離は、Wakosil®40C18 を充填した逆相カラムクロマトグラフィーで行った。まず初めに、HPLC での保持時間 8 分の生成物を多く含むフラクションを真空乾燥後凍結乾燥し、構造を ^{31}P および ^1H-^{31}P HMBC NMR で解析したところ、サリシンのグルコース部分にホスホン酸が結合していることが明らかとなった。さらに、^1H-^1H COSY および ^1H-^1H TOCSY NMR、ESI-MS スペクトルの測定により、サリシン 1 分子に対し、2 分子のホスホン酸が結合していることが明らかとなった。従って生成物の構造は、サリシンのグルコース部分の 2' 位と 4' 位のヒドロキシル基の両方にホスホン酸が結合したジホスホン酸エステルであることがわかった。</p> <p>一方、HPLC での保持時間 13 および 14 分のピークについても同様に単離の操作を行ったところ、2' 位または 4' 位のヒドロキシル基に 1 つホスホン酸が結合した生成物であることがわかった。サリシンには、5 カ所ヒドロキシル基があるが、DP と反応するのは、グルコース部分の 2' 位と 4' 位のヒドロキシル基であることがわかった。</p> <p>そこで、サリシンと DP との反応機構について考察した。サリシンのグルコース部分の 2' 位または 4' 位のヒドロキシル基が DP のリン原子を求核攻撃すると、2'-monophosphonylsalicin または 4'-monophosphonylsalicin が生成する。2'-monophosphonylsalicin または 4'-monophosphonylsalicin が、さらに DP と反応することにより、2', 4'-diphosphonylsalicin が生成すると考えた。当研究室では、これまで無機リン酸化剤を用いるリン酸化反応を検討しているが、1 分子内に同時に 2 カ所リン酸基が導入された反応は、経験したことが無く、非常に興味深い結果が得られた。</p> <p>次に、2 カ所にリン酸基が導入された生成物が生成する反応条件について検討した。リン酸化反応の最適反応条件は、サリシン : DP = 0.1 mol/L : 1.0 mol/L, pH 12, 25°C であり、この場合の収率は 50% であった。</p> <p>反応溶液の pH は高アルカリ側の方が、反応速度が速かったが、生成物の分解も起こった。そこで、生成物の安定性について検討した。その結果、生成物がある程度生成したところで反応溶液の pH を 7 にすることにより、生成物の分解が防げることがわかった。</p> <p>以上のような結果から、DP によるサリシンのリン酸化反応では、サリシン 1 分子に対し 2 カ所のヒドロキシル基がリン酸化された新規生成物が得られることがわかった。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Hideko Maeda, Aya Moriwaki, Hiroyuki Nariai, Hirokazu Nakayama	Two sites phosphorylation of salicin with disodium diphosphonate in aqueous solution.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Phosphorus Research Bulletin	32	2016	submitted for publication	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
前田 秀子、森脇 彩、成相 裕之、中山 尋量	第25回 無機リン化学討論会		
タイトル	開催日	開催場所	
ジホスホン酸塩によるサリシンのリン酸化反応および生成物単離法の検討	2015/9/29	米沢	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属 薬品化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・宮田 興子

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題		特異な縮環様式をもつ含窒素複素環化合物群の合成と抗癌活性評価			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	宮田 興子	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究計画の立案・総括
	上田 昌史	神戸薬科大学	薬学部	准教授	候補化合物の合成
	松野 研司	工学院大学	先進工学部	教授	候補化合物の抗癌活性評価
共同研究の成果					
<p>これまでの共同研究で、ラジカル開始剤であるジメチル亜鉛とクロロホルムから、トリクロロメチルラジカルが発生することを見出している。この知見を基に、今回はトリクロロメチルラジカルをさらに酸素分子と反応させることで、ホスゲンが発生できると考えた。このようなクロロホルムのホスゲン等価体としての性質を利用し、ホモアリルアミン類のクロロラクタム化反応を検討した。なお、本反応で得られるラクタム類は生物活性物質に含まれる重要な基本骨格の1つであり、汎用性の高い合成素子である。はじめに、ホモアリルアミン誘導体として、シクロペンテン環をもつテトラヒドロキノリンを基質に用いて、クロロホルム中ジメチル亜鉛で処理したところ、β位に塩素原子をもつ架橋型ラクタムが86%の収率で得られた。次に本反応条件を最適条件として、ベンゼン環上の置換基効果について検討した。その結果、その電子的性質に影響されず反応は効率的に進行することが明らかとなった。さらに、環の大きさの異なるインドリンやテトラヒドロベンゾアゼピンなどを有する基質に関しても本ラクタム化反応は問題なく進行することが明らかとなった。</p> <p>本反応の反応経路は次のように考えている。まずジメチル亜鉛および酸素によってクロロホルムからトリクロロメチルラジカルの生成を経由してホスゲンが生成する。続いて、ホスゲンによってアミノ基がアシル化されカルバモイルクロリドが反応中間体として生成する。その後、オレフィン部分との分子内 Prins 型環化反応によりラクタムが得られたと推定している。</p> <p>次に、本反応の基質一般性を検討した。スピロ構造を有さないシクロペンチルアミン類を用いた場合にも本ラクタム化反応は進行し、目的のラクタムが得られた。さらに、鎖状構造のホモアリルアミン類とジメチル亜鉛との反応を検討したところ、塩素原子をもつラクタムが生成するものの脱ハロゲン化水素が進行した α, β-不飽和ラクタムの生成が一部確認されたため、DBU を用いて完全に脱離反応を進行させ、不飽和ラクタムを2工程68%の収率で得た。</p> <p>次に、求核部位としてオレフィンの代わりに芳香環を検討した。すなわち、フェニルエチルアニリンを基質として、クロロホルム中ジメチル亜鉛との反応を検討した。その結果、期待通り分子内 Friedel-Crafts 型カルバモイル化反応が進行し、目的のラクタムが76%の収率で得られた。さらに、本反応の分子間反応への展開を目的として、インドール類のカルバモイル化反応を検討した。テトラヒドロキノリンと1-メチルインドールを上述の反応と同様にクロロホルム中ジメチル亜鉛で処理したところ、分子間反応においても期待通りの反応が進行し、アミドが収率よく得られた。さらに、種々のアミン類およびインドール類の反応についても検討し、本反応が基質一般性に優れていることを確認した。今後は、これら化合物群の抗癌活性を評価する予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Yuta Ito, Masafumi Ueda*, Norihiro Takeda, and Okiko Miyata*.	<i>tert</i> -Butyl Iodide-Mediated Reductive Fischer Indolization of Conjugated Hydrazones			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Chem. Eur. J.</i>	22	2016	2616 - 2619	

著者名	論文標題			
Yuika Nishida, Masafumi Ueda*, Masataka Hayashi, Norihiro Takeda, and Okiko Miyata*.	Dimethylzinc-mediated Chlorolactamization of Homoallylic Amines with Chloroform			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Eur. J. Org. Chem.</i>	-	2016	22-25	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
上田 昌史、杉田 翔一、 武田 紀彦、宮田 興子	第 13 回次世代を担う有機化学シンポジウム		
タイトル	開催日	開催場所	
<i>N</i> -アルコキシアゾメチンイリドを経由する新規連続的環化付加反応の開発	平成27年5月22日	草津	

発表者	学会名		
上田 昌史、河野友紀子、 西田 唯香、武田 紀彦、 松野 研司、宮田 興子	第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会		
タイトル	開催日	開催場所	
クロロホルムを炭酸等価体として用いる Friedel-Crafts 型カルバモイル化反応の開発	平成27年10月17日	富田林	

発表者	学会名		
伊藤 勇太、上田 昌史、 武田 紀彦、宮田 興子	第 41 回反応と合成の進歩シンポジウム		
タイトル	開催日	開催場所	
ヨウ化水素の特性を利用した共役ヒドラゾンの還元反応の開発とインドール合成への応用	平成27年10月27日	東大阪	

発表者	学会名		
Masafumi Ueda, Shoichi Sugita, Norihiro Takeda, Okiko Miyata	The 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13)		
タイトル	開催日	開催場所	
Gold-Catalyzed Generation of <i>N</i> -Alkoxyazometine Ylide and Cycloaddition Cascade	平成27年11月12日	京都	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属 薬品物理化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・向高弘

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	分子イメージング薬剤の開発研究				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	向高弘 佐治英郎	神戸薬科大学 京都大学大学院	薬学部 薬学研究科	教授 教授	研究総括 イメージング評価
共同研究の成果					
<p>亜鉛は生体内において酵素等の構造保持や活性中心として機能することが報告されており、また近年では神経伝達や免疫システムにおけるシグナル物質として機能していることが示唆されている。そのため、生体内における亜鉛の動態や作用の解明を目的に、亜鉛蛍光プローブの開発が行われている。我々はこれまでに蛍光団と亜鉛錯体部位を同一にする分子設計によりプローブの低分子量化を可能にしており、それによって溶解性および細胞膜透過性が向上することを見出している。また、分子内互変異性を化学構造の修飾によって制御することにより、亜鉛イオンに対する親和性の向上が可能であることも見いだしている。本年度では、昨年度報告した蛍光団として2-アミノピリジン環をピリドン環の代わりに導入したピピリジン誘導体の詳細な評価を行うこととした。本ピピリジン誘導体は、ジョブズプロット解析により亜鉛イオンは1:1で配位し、亜鉛イオンに対しnMレベルの高い結合親和性を示す。そこで、亜鉛イオンとの結合の詳細なメカニズムについて¹H NMRを用いて検討を行ったところ、亜鉛イオン濃度変化時におけるスペクトルの変化において、亜鉛イオンと錯体を形成しないイミノ型は見られず、亜鉛イオンとの結合に有利なアミノ型のままであることがわかった。つまり、互変異性を制御することによって亜鉛イオンに対する大きな親和性が得られたと考えられる。さらに、亜鉛イオンと他の金属イオンとの共存下における蛍光変化については、生体内に多く存在するアルカリ金属イオンやアルカリ土類金属イオンによって影響を受けないことがわかった。一方、蛍光プローブのバックグラウンド蛍光が強いことにより、蛍光イメージングにおいて十分な感度が得られないことも問題となっている。そこで、蛍光プローブのバックグラウンド蛍光の減弱化を目的に、蛍光団と電子供与部との間にスペーサーを導入し距離を離す分子を設計したところ、スペーサーとしてメチレン基を導入した分子においてバックグラウンドの蛍光の減弱が見られた。本誘導体も亜鉛イオン濃度依存的な蛍光の増大を示し、また、pH変化による影響を受けないことやアルカリ金属イオンやアルカリ土類金属イオン等の共存下においても利用できることが示された。今後、細胞膜透過性の評価やその応用性について検討していく予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Masayori Hagimori, Naoko Mizuyama, Yoshinori Tominaga, Takahiro Mukai, Hideo Saji	A low-molecular-weight fluorescent sensor with Zn ²⁺ dependent bathochromic shift of emission wavelength and its imaging in living cells			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Dyes and Pigment	113	2015	205-209	

著者名	論文標題			
Masayori Hagimori, Takashi Temma, Naoko Mizuyama, Takuhiro Uto, Yasuchika Yamaguchi, Yoshinori Tominaga, Takahiro Mukai, Hideo Saji	A high-affinity fluorescent Zn ²⁺ sensor improved by the suppression of pyridine-pyridone tautomerism and its application in living cells			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Sensors & Actuators: B. Chemical	213	2015	45-52	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Masayori Hagimori, Naoko Mizuyama, Hideo Saji, Takahiro Mukai	2015 World Molecular Imaging Congress		
タイトル	開催日	開催場所	
Wavelength shifting Zn ²⁺ probe based on pyridine-pyridone core structure	2015/9/2-5	Honolulu	

発表者	学会名		
萩森 政頼、佐治 英郎、向 高弘	第15回放射性医薬品・画像診断薬研究会		
タイトル	開催日	開催場所	
生命現象・病態イメージングを目指した蛍光プローブの開発	2015/9/12	京都	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属

医薬細胞生物学研究室
(平成28年7月1日より研究室名変更)

研究代表者職・氏名

教授・土反 伸和
(平成28年7月1日より職名変更)

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題		天然物から婦人科悪性腫瘍に対する活性成分の探索			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	土反 伸和	神戸薬科大学	薬学部	准教授	統括
	西山 由美	神戸薬科大学	薬学部	講師	成分の構造解析と活性試験
	須藤 保	兵庫県立がんセンター	研究部・婦人科	部長	活性試験と評価・考察
共同研究の成果					
<p>1981年より、がんは脳卒中を抜いて日本人死亡原因の第1位であり、生涯でがん罹患する確率は2人に1人、死亡率は3人に1人とも言われている。現在、治療効果の高い抗腫瘍薬もあるが、有効な抗腫瘍薬がほとんどないがんもあり、新たな抗腫瘍薬の開発が期待されている。</p> <p>婦人科悪性腫瘍の1つである卵巣がんは初期症状が乏しく発見された時にはすでに手術不能の進行がんとして発見されることが多く、抗がん剤治療が選択されることが多い。そこで我々は最初に、数種の卵巣がん細胞株を用いて、生薬などの天然物から抗腫瘍薬またはそのソースとなる化合物の探索を目指し、細胞増殖抑制試験を用いてスクリーニングを行った。細胞は兵庫県立がんセンターが保有する卵巣がん細胞株を数種用いて検討した。そして、古くから婦人薬として利用され、特に子宮など女性のみが有する器官の不調を緩和する目的で利用されている生薬、また、フラボノイドやアルカロイドなど生理活性を期待出来る化合物を多く含む生薬を対象に試験を行った。</p> <p>一方、漢方薬もがん治療において、副作用の軽減や免疫力の増強などを目的に多く使われるようになってきている。また、そのエビデンスも徐々に増えてきている。我々はがん治療において、もっと漢方薬が利用できるのではないかと考え、抗腫瘍薬との併用効果の検討を行った。</p> <p>スクリーニングの結果、卵巣がん細胞株に対して、数種の生薬に細胞増殖抑制効果が認められた。中でも、婦人薬として用いられる生薬から、今回は、コウブシ（香附子）、コウコウ（降香）について、活性成分の探索及び作用機序の検討を行った。①コウブシからは、強くはないが活性を有するセスキテルペン類を確認しその構造を決定した。これら化合物はアポトーシスを誘導するが、濃度が高くなるとアポトーシス以外による細胞死が観察された。細胞周期に対しては、いずれの化合物もG0/G1期からS期への移行を阻害することがわかった。しかし、コウブシはエキスをを用いた場合が最も活性が強く、これは複数の成分の相乗効果と考えられた。②コウコウからは、活性の強いイソフラボノイド数種を単離しその構造を決定した。これら化合物もアポトーシスを誘導することがわかった。細胞周期に対しては、G0/G1期からS期への移行を阻害する化合物とG2/M期からの移行を阻害する化合物があった。婦人薬以外の生薬においては、チンピ（陳皮）、アザミコン（薊根）、タクシャ（沢瀉）などに活性が認められたので、今後、活性成分を探索してその作用機序を検討すると共に、それをソースとしてより有効な化合物の探索を進めていく予定である。</p> <p>漢方薬と抗腫瘍薬の併用効果については、抗腫瘍薬として卵巣がん用いられるシスプラチンと併用した効果を、細胞増殖抑制試験で検討した。今回用いた漢方薬では、シスプラチンの効果を増強するといった期待した効果は得られなかったが、負の影響も与えなかったことから、がん治療中でも漢方薬を安全に使える1つのエビデンスになりうると考えている。今後は、耐性株を用いて、併用効果を検討する予定である。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
正田 恵理、西山 由美、 土反 伸和、須藤 保	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
降香のヒト卵巣がん細胞 KOC7C 株に対する抗腫瘍活性成分の探索		2016/03/26-29	横浜

発表者	学会名		
中村 直美、西山 由美、 土反 伸和、須藤 保	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
香附子のヒト卵巣がん細胞 KOC7C 株に対する抗腫瘍活性成分の探索		2016/03/26-29	横浜

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属 生命有機化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・和田 昭盛

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	レチナールアナログを利用した optogenetics ツールの開発				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	和田 昭盛	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究の統括・計画
	山野 由美子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	レチナールアナログの合成
	沖津 貴志	神戸薬科大学	薬学部	講師	レチナールアナログの合成
	七田 芳則	京都大学大学院	理学研究科	教授	人口チャネルロドプシンの特性解析
	今元 泰	京都大学大学院	理学研究科	准教授	人口チャネルロドプシンの特性解析
山下 高廣	京都大学大学院	理学研究科	助教	人口チャネルロドプシンの特性解析	
共同研究の成果					
<p>サフラナルを出発原料として C5 ホスホネートと C3 ホスホネートによる Horner-Emmons 反応の組み合わせ順序を変更することにより合成したビタミン A2 アルデヒドの側鎖部分に二重結合を一つ導入した化合物 3 種類についてタンパク質と結合実験をしたところ、いずれの発色団もタンパク質中に取り込まれ新たなチャネルロドプシンアナログ (ChR) が生成した。これら 3 種の ChR の吸収極大は、天然の ChR の吸収極大 (λ_{max}) に比べてわずか 10 ~ 20 nm 長波長シフトしているだけであったが、$1/2 \lambda_{max}$ の吸収波長をみると 70 ~ 80 nm と大きく長波長シフトしていることが判明した。コンピューターを用いて発色団の安定コンホメーションについて考察したところ、安定な発色団ほど $1/2 \lambda_{max}$ の吸収波長のシフト値が大きくなっており、二重結合を導入する位置としては 12 位の後に入れるのが最も効果的であることが明らかになった。</p> <p>他の発色団としては、α-ヨノンから 4 位に二重結合を 2 個伸長した β-ヨノン体へと誘導後、エチルトリメチルシリルアセテートとの Peterson 反応後、エステルをアルデヒドへと変換、続いて C5 ホスホネートとの Horner-Emmons 反応で側鎖を延長した。最後にエステルをアルデヒドへと変換し、A1 アルデヒドの 4 位へ二重結合を 2 個導入したアナログ化合物を合成することができた。この化合物の UV 吸収スペクトルでは、A1 アルデヒドより二重結合が 2 個伸びたものであるが吸収極大波長はほとんど変わらず、長波長シフトしないことが判明した。また、アクチノールより 3,4 位に二重結合と 3 位にビニル基を導入した β-シクロシト랄ールへと返還後、C5 シアノホスホネートで側鎖を延長し、シアノ基をアルデヒドへと変換した。続いて C5 シアノホスホネートで更に側鎖を延長し、最後にシアノ基をアルデヒドへと変換し、A2 アルデヒドの 3 位から二重結合を 1 個伸ばしたアナログ化合物を合成することができた。この化合物の UV 吸収スペクトルでは、A2 アルデヒドより二重結合が 1 個伸びたものであり吸収極大波長は、A2 アルデヒドより 30 nm 長波長シフトしていることが判明した。</p> <p>今後、これら新規に合成したアナログとタンパク質との結合実験を検討する予定である。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Wada, A.; Okitsu, T.; Yamano, Y.; Kobayashi, Y.; Ishizuka, T.; Yawo, H.; Matsuyama, T.; Yamashiya, T.; Imamoto, Y.; Shichida, Y.	The 3rd International Conference on Retinoids		
	タイトル	開催日	開催場所
	Preparation of New ChR with One Double Bond-elongated 3,4-Dehydroretinals	10.21	Gifu/Japan

発表者	学会名		
和田 昭盛、沖津 貴志、 山野由美子、石塚 徹、 八尾 寛、山下 高廣、 今元 泰、七田 芳則	日本薬学会第 136 年会		
	タイトル	開催日	開催場所
	新規チャンネルロドプシンの開発	3月27日	横浜

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属 病態生化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・加藤 郁夫

平成 27 年 7 月 2 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 28 年 3 月 31 日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	新規摂食調節ペプチド adropin の食行動および情動に関する研究				
構 成 員	氏 名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職 名	研究の役割分担
	加藤 郁夫	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	神戸薬科大学での研究管理および研究主体
	多河 典子	神戸薬科大学	薬 学 部	講 師	神戸薬科大学での研究
	藤波 綾	神戸薬科大学	薬 学 部	講 師	神戸薬科大学での研究
	乾 明夫	鹿児島大学	大学院医歯学総合研究科	教 授	鹿児島大学での研究管理
	浅川 明弘	鹿児島大学	大学院医歯学総合研究科	准教授	鹿児島大学での研究管理
共同研究の成果					
<p>本研究は、新規摂食調節ペプチドである adropin の食行動や情動に関する研究の一環として、げっ歯類を用いた adropin の中枢における作用解析、および adropin 発現の変動と摂食障害や代謝異常などの病態との関連を検討することを目的とする。本年度は、以下の項目について検討を行った。</p> <p>1. Adropin ELISA 系の確立： H26 年度に引き続き、合成ペプチドを用いて高力価の抗体を作製し ELISA を確立した。H28 年度以降、更なる高感度 ELISA の確立のために、新たな免疫抗原を合成し、抗体作製を行った。得られた特異抗血清をアフィニティ IgG 分画に精製し、高感度 ELISA の開発に着手する予定である。なお、合成した免疫抗原は、各種機器分析により、高純度かつ目的物であることを同定・確認した。</p> <p>2. げっ歯類での adropin の睪ホルモン分泌への影響： 正常マウスへの adropin 腹腔内投与により、adropin は、インスリン分泌を調節して血糖値を正常化させる可能性を示す結果を得た。H28 年度は、引き続き、この作用について再現性、時間・用量依存性を検証するとともに、作用機序を解明していく予定である。</p> <p>3. げっ歯類での adropin 及び <i>Enho</i> mRNA の発現動態： 高脂肪食誘導肥満モデルマウス及び多因子変異型糖尿病・自然発症肥満モデルマウスを用いて、肝臓での adropin の発現について遺伝子及びペプチドレベルで検討し、adropin は抗肥満作用を有し、adropin 発現の減少は肥満を惹起する可能性を示す結果を得た。この結果は、日本薬学会第 136 年会（2016.3.29 横浜）で報告した。H28 年度は、引き続き、この作用について再現性を検証するとともに、他の肥満モデルマウスにおける普遍性を確認していく予定である。また、昨年度に引き続き、マウスの視床下部、脂肪組織において adropin をコードする遺伝子 <i>Enho</i> の発現は、肥満・糖尿病発症機序により異なることを第 36 回日本肥満学会（2015.10.3 名古屋）で報告した。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
多河 典子、浅川 明弘、 藤波 綾、乾 明夫、 加藤 郁夫	日本薬学会第 136 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
マウス肝臓におけるエネルギー代謝関連ペプチド adropin の発現について	2016.3.29	横浜	
発表者	学会名		
多河 典子、浅川 明弘、 藤波 綾、乾 明夫、 加藤 郁夫	第 36 回日本肥満学会		
タイトル	開催日	開催場所	
肥満モデルマウス脂肪組織での新規エネルギー代謝関連ペプチド遺伝子 <i>Enho</i> の発現について	2015.10.3	名古屋	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属 衛生化学研究室
研究代表者職・氏名 准教授・中川 公恵

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	ビタミン K 合成酵素 UBIAD1 の機能解析				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	中川 公恵 須原 義智	神戸薬科大学 芝浦工業大学	薬学部 システム理工学部	准教授 教授	研究の統括・分子生物学的解析 リガンド合成
共同研究の成果					
<p>我々が食事から摂取するビタミン K は主に植物由来のフィロキノン (PK) と発酵食品由来のメナキノン類 (MK-n) であるが、生体内では PK や MK-n がメナキノン-4 (MK-4) に変換され、生理作用を発揮している。この変換反応を担う鍵酵素は、Ubia prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1) である。本研究では、UBIAD1 を時期特異的かつ組織特異的に欠損したマウスを作出することにより、UBIAD1 の生理機能を明らかにするとともに、UBIAD1 に対する基質認識特性の高いリガンドおよび MK-4 よりも高活性を有するリガンドを開発し、ビタミン K の新たな生理作用の解明および疾患予防・治療薬創製を目指して研究を行った。中川は、時期特異的全身性 UBIAD1 欠損マウスおよび組織特異的 UBIAD1 欠損マウスを作出して表現型解析を行うことにより、UBIAD1 の生理機能を解析した。Conventional な Ubiad1 遺伝子欠損マウスは、胎生致死であるため、Tamoxifen 誘導型 CAG-cre マウスを用いて出生成熟後に全身的に Ubiad1 を欠損させたマウスを作成した。その結果、このマウスは Tamoxifen 投与後、10～50 日の間ですべて死亡した。死因は明らかではないが、UBIAD1 が成熟後のマウスの生体機能の維持にも必須であることがわかった。さらに、Nestin-cre マウスを用いて、脳神経系特異的に Ubiad1 を欠損させた結果、行動異常や成長不全、小脳萎縮などの異常が認められた。このことから、UBIAD1 は脳機能の維持に重要な役割を担うことが明らかとなった。また、須原は MK-4 が神経幹細胞をニューロンに分化誘導する活性があることに着目し、MK-4 を基盤とした新規ビタミン K 誘導体を開発した。この誘導体のニューロン分化誘導活性を評価した結果、MK-4 と同等の活性を有することを見いだした。両グループの解析結果より、UBIAD1 の生理機能の一端を明らかにできたのみならず、MK-4 以上に高い生理活性と作用特異性のある新規ビタミン K 誘導体を創製できることができた。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Suhara Y, Hirota Y, Hanada N, Nishina S, Eguchi S, Sakane R, Nakagawa K, Wada A, Takahashi K, Tokiwa H, Okano T	Synthetic small molecules derived from natural vitamin K homologues that induce selective neuronal differentiation of neuronal progenitor cells.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>J. Med. Chem.</i>	58	2015	7088-92	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
中川 公恵、澤田 夏美、 須原 義智、岡野登志夫	日本薬学会第136年会		
タイトル	開催日	開催場所	
脳神経系におけるビタミン K ₂ 合成酵素 UBIAD1 の機能解析	2016.3.29	横浜	

発表者	学会名		
中川 公恵、澤田 夏美、 木本 貴士、須原 義智、 岡野登志夫	日本ビタミン学会第68回大会		
タイトル	開催日	開催場所	
ビタミン K ₂ 合成酵素 UBIAD1 の脳神経系における機能解析	2016.6.17	富山	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属 薬理学研究室
研究代表者職・氏名 教授・吉野 伸

平成 27 年 7 月 2 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 28 年 3 月 31 日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題		難治性アレルギー疾患の病態解明と制御			
構 成 員	氏 名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職 名	研究の役割分担
	吉 野 伸	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	実験計画・研究総括
	水 谷 暢 明	神戸薬科大学	薬 学 部	准教授	動物実験
	奈 邊 健	摂 南 大 学	薬 学 部	教 授	実験データの評価
共同研究の成果					
<p>アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の罹患患者数は増加の一途をたどっており、国民病ともいわれている。本疾患は抗原特異的 IgE の上昇、Th2 反応を介したサイトカインの産生、ならびに病変部への好酸球浸潤が認められ、これらがアレルギー発症の根幹にあるメカニズムであると考えられてきた。しかしながら、本疾患にはステロイド抵抗性を示す難治性の病態が認められ、ステロイドが Th2 反応や好酸球浸潤を抑制しても症状の抑制につながらないことが知られている。また、ステロイド抵抗性を示すアレルギー疾患患者の quality of life は著しく低下していることから、本病態のメカニズムの解明ならびに新規治療薬の開発は急務である。本研究では、アレルギー疾患病態マウスモデル（アトピー性皮膚炎）を作製するとともに様々な薬物を用いることによる病態解析を行うことで、アレルギー疾患患者の新規治療薬開発ターゲットを提示することを目的とした。</p> <p>本研究では、抗原卵白アルブミン（OVA）に対する IgE モノクローナル抗体（神戸薬科大学で作製した IgE 産生ハイブリドーマ）を用いてマウスを受動感作し、OVA の皮膚への塗布を繰り返し行うことでアトピー性様皮膚炎症状を示す病態モデルを作製した。本皮膚炎モデルを用いた解析では、抗原を繰り返し皮膚に塗布することで、抗原惹起 6 回目でステロイド抵抗性を示す皮膚炎症状の発現が観察されることに着目して、本病態に関わるサイトカイン（thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、IL-17A など）や炎症細胞である好中球の関与を中和抗体などを用いて解析した。その結果、抗 TSLP 抗体、抗 IL-17A 抗体、抗 Gr-1 抗体（好中球枯渇）により皮膚炎症状が抑制されることを明らかにした。この結果に基づいてさらに詳細な検討を行った結果、表皮細胞より産生される TSLP により誘導される IL-17A（Th17 および $\gamma\delta$ T 細胞より産生）が好中球ならびに肥満細胞浸潤を誘導することで皮膚炎症状を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究で行った病態解析結果は、アトピー性皮膚炎の新規治療薬開発に役立つものと期待される。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Mizutani N, Sae-Wong C, Kangsanant S, Nabe T, Yoshino S.	Thymic stromal lymphopoietin-induced interleukin-17A is involved in the development of IgE-mediated atopic dermatitis-like skin lesions in mice.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Immunology.	146	2015	568-581	

著者名	論文標題			
Nabe T, Wakamori H, Yano C, Nishiguchi A, Yuasa R, Kido H, Tomiyama Y, Tomoda A, Kida H, Takiguchi A, Matsuda M, Ishihara K, Akiba S, Ohya S, Fukui H, Mizutani N, Yoshino S.	Production of interleukin (IL)-33 in the lungs during multiple antigen challenge-induced airway inflammation in mice, and its modulation by a glucocorticoid.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Eur J Pharmacol.	757	2015	34-41	

〈総説〉

著者名	論文標題			
水谷 暢明、奈邊 健、吉野 伸	セマフォリン7Aのアレルギー性気管支喘息における役割			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
アレルギーの臨床	35	2015	61-63	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属 薬化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・棚橋 孝雄

平成 27 年 7 月 2 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 27 年 9 月 30 日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	高等植物ならびに地衣類を起源とする DNA 代謝酵素阻害剤の探索				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	棚橋 孝雄	神戸薬科大学	薬学部	教授	総括
	竹仲 由希子	神戸薬科大学	薬学部	講師	成分の構造決定
	水品 善之	信州大学	農学研究科食品機能学	教授	活性の評価
共同研究の成果					
<p>三種のベトナム産オトギリソウ科 <i>Garcinia</i> 属植物を採集し、昨年度に引き続き、詳細な成分検索と活性試験を行った。</p> <p><i>Garcinia mangostana</i> の葉部から単離・同定した 8 種の既知キサントンについて、DNA polymerase と DNA topoisomerase の阻害活性を評価したところ、いずれの酵素に対しても、評価したキサントン類のうち β-mangostin が最も強い阻害活性を示した。また、β-mangostin は二重らせん DNA に直接結合するのではなく、酵素タンパクに結合することが示唆された。ヒト子宮がん細胞増殖抑制活性に関しても、DNA polymerase 阻害活性と同じ傾向を示し、β-mangostin が最強で、アポトーシスを誘導することを明らかにした。</p> <p><i>Garcinia schomburgkiana</i> の果実からは、4 種の既知ベンゾフロログルシノールとともに、8 種の新規ベンゾフロログルシノール shomburgkianone A - H を単離し、各種スペクトルおよび化学的手法により構造決定した。またその絶対構造と ECD スペクトルの関係について興味深い知見を得た。さらに、単離したベンゾフロログルシノールについて、DNA polymerase の阻害活性とヒト子宮がん細胞増殖抑制活性を評価し、比較的強い活性を見出した。</p> <p><i>Garcinia oblongifolia</i> の樹皮についても現在検討を行っており、新規のキサントン類の構造決定が進行中である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Takefumi Onodera, Yukiko Takenaka, Sachiko Kozaki, Takao Tanahashi, Yoshiyuki Mizushina	Screening of mammalian DNA polymerase and topoisomerase inhibitors from <i>Garcinia mangostana</i> L. and analysis of human cancer cell proliferation and apoptosis			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Int. J. Oncol.</i>	48	2016	1145-1154	

著者名	論文標題			
Duy Hoang Le, Katsumi Nishimura, Yukiko Takenaka, Yoshiyuki Mizushina, Takao Tanahashi	Polyprenylated benzoylphloroglucinols with DNA polymerase inhibitory activity from the fruits of <i>Garcinia schomburgkiana</i>			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>J. Nat. Prod.</i>	79	2016	1798-1807	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
平林 正大、小野寺威文、 竹仲由希子、神前 祥子、 棚橋 孝雄、片山 茂、 中村宗一郎、水品 善之	日本食品科学工学会第 62 回大会		
タイトル	開催日	開催場所	
マンゴスチン (<i>Garcinia mangostana</i>) から単離したキサントン類の DNA 代謝系酵素阻害活性とヒトがん細胞への影響	2015年8月28日	京都	

発表者	学会名		
Duy Hoang Le, Katsumi Nishimura, Yoshiyuki Mizushina, Takao Tanahashi	Inaugural Sumposium of the Phytochemical Society of Asia (ISPSA) 2015 Tokushima		
タイトル	開催日	開催場所	
DNA polymerases inhibitory polyprenylated benzoylphloroglucinols from the fruits of <i>Garcinia schomburgkiana</i>	2015年8月30日	徳島	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属	製剤学研究室
研究代表者職・氏名	教授・北河修治

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	Cocrystal 形成による医薬品の物性および安定性の改善				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	北河修治	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究企画・統括
	寺岡麗子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	測定、データ解析
	湯谷玲子	神戸薬科大学	薬学部	助手	測定、データ解析
	都出千里	神戸薬科大学	薬学部	講師	測定、データ解析
長瀬弘昌	星薬科大学	薬学部	准教授	測定、データ解析	
共同研究の成果					
<p>【目的】レボフロキサシンには1/2水和物と1水和物の水和物結晶が報告されており、1水和物の方が1/2水和物よりも光に安定であることを明らかにしている。この2つの結晶の結晶構造を用いて、それぞれのスタッキングエネルギーを求め、光安定性との関係を比較した。一方、前年度にニューキノロン系抗菌薬であるレボフロキサシンのサッカリン cocrystal がレボフロキサシン原薬に比べて有意に光安定性が改善されることを明らかにした。レボフロキサシン以外のニューキノロン系抗菌薬も多数市販されており、いずれも光に不安定である。そこで、今年度はシプロフロキサシン（CIP）について Sac または有機酸との cocrystal を調製し、光安定性を評価した。</p> <p>【方法】①レボフロキサシンの水和物結晶の X 線回折強度を測定し、構造解析及びエネルギー計算を行った。 ②サッカリンまたは有機酸を coformer として用いて、Slurry 法により CIP の cocrystal を調製した。cocrystal の生成は粉末 X 線回折測定（PXRD）、示差走査熱量測定（DSC）、FT-IR 測定で行った。 ③調製した試料を錠剤に成形し、D65 ランプ下で光安定性試験を行い、経時的に着色過程を追跡した。また、cocrystal の UV スペクトルと光源の分光放射エネルギー分布の比較から、光安定性を予測した。</p> <p>【結果・考察】1/2水和物と1水和物は共に非対称単位に独立なレボフロキサシンを2分子持っており、1/2水和物と1水和物はスタッキング構造が異なっていた。求めたステリックエネルギーとスタッキングエネルギーは1/2水和物の2分子より1水和物の2分子の方が小さく、1水和物の構造の方が安定な構造であった。この結果は1水和物の方が1/2水和物よりも光に安定であるという結果と一致したので、結晶の光安定性は結晶構造と密接に関連していると考えられる。</p> <p>一方、メタノールを用いたスラリー法で調製した CIP のサッカリンまたはクエン酸の cocrystal の光照射下での外観変化は、CIP に比べて有意に抑制された。また FT-IR スペクトルより測定した光照射後の CIP 残存率においても CIP よりもいずれの cocrystal において有意に高い値を示し、サッカリンまたはクエン酸との cocrystal 化によって CIP の光安定性が向上することが明らかとなった。固体 UV-Vis スペクトル測定の結果、この2つの cocrystal の光吸収性は CIP よりも著しく低下していた。この結果から、cocrystal 化によって結晶構造が変化し、光安定性が改善されたと考えられた。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
笹子 翔大、斎藤菜穂子、 迫田 涼子、長瀬 弘昌、 寺岡 麗子、湯谷 玲子、 都出 千里、北河 修治、 古石 誉之、郡司美穂子、 遠藤 朋宏、米持 悦生	第 59 回日本薬学会関東支部大会		
タイトル		開催日	開催場所
レボフロキサシン結晶多形の構造解析と相転移現象の解明		2015/ 9/12	船橋

発表者	学会名		
牛島 智裕、長瀬 弘昌、 池上眞由美、笠井 博子、 寺岡 麗子、湯谷 玲子、 都出 千里、北河 修治	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
レボフロキサシン水和物の光安定性と結晶構造との関係		2016/3/28	横浜

発表者	学会名		
中島りり子、長瀬 弘昌、 池上眞由美、笠井 博子、 寺岡 麗子、湯谷 玲子、 都出 千里、北河 修治	日本薬学会第 136 年会		
タイトル		開催日	開催場所
レボフロキサシン / シュウ酸の共結晶の無水物の結晶構造		2016/3/28	横浜

発表者	学会名		
宮崎 智子、安藤 未裕、 寺岡 麗子、都出 千里、 長瀬 弘昌、湯谷 玲子、 北河 修治	日本薬剤学会第 31 年会		
タイトル		開催日	開催場所
シプロキサシンとそのサッカリン塩の光安定性比較		2016/5/21	岐阜

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属 微生物化学研究室
研究代表者職・氏名 教授・小西 守周

平成27年7月2日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成28年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題		糖鎖による生体機能の新規調節機構の解明			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	小西 守周	神戸薬科大学	薬学部	教授	血中ホルモンの測定
	中山 喜明	神戸薬科大学	薬学部	講師	神経組織学的解析
	黒坂 光	京都産業大学	総合生命科学部	教授	遺伝子欠損動物作成
共同研究の成果					
<p>ムチン型糖鎖生合成開始反応を触媒するポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-T) は、タンパク質の翻訳後修飾であるムチン型糖鎖の付加部位や数を決定する重要な酵素である。GalNAc-T をコードする遺伝子 galnt は、ヒトでは 20 種からなる大きな遺伝子ファミリーを形成するが、それぞれのアイソザイムの生物学的な機能はよく分かっていない。そこで本研究では、脊椎動物特異的に存在する GalNAc-T の Y-サブファミリーに焦点を当てて機能解析を行った。</p> <p>ゼブラフィッシュゲノムデータベースより Y-サブファミリー遺伝子 (galnt8, galnt9, galnt17, galnt18a, galnt18b) を単離し、in situ hybridization 法により、それぞれのアイソザイムがゼブラフィッシュの発生初期で一部重複するが特有の発現分布を示すことを見出した。さらに、ゲノム編集技術を用いてゼブラフィッシュの GalNAc-T9 と GalNAc-T18a のそれぞれの機能欠失体を確立したが、これらの機能欠失体で顕著な表現型の変化は観察されていない。これは、マウスの GalNAc-T 機能欠失体解析の結果と一致しており、多くのアイソザイムファミリーからなる GalNAc-T では、同一組織で発現する複数アイソザイムの同時機能欠失が不可欠であると考えられた。</p> <p>一方で、モデル動物としてマウスを用いた研究からは、galnt17 遺伝子を欠損したマウスでみられる下垂体ホルモンの分泌異常症の分子メカニズムを明らかにするため、下垂体ホルモン分泌の調節中枢である視床下部における galnt17 発現細胞を同定し、galnt17 が本能行動を司る視床下部腹内側核の神経細胞や弓状核の tanycyte に発現することを明らかにした。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
中山 喜明、加藤 啓子、 中村 直介、小西 守周、 黒坂 光	23rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GLYCOCONJUGATES		
タイトル	開催日	開催場所	
Galnt17/Wbscr17 knockout mice show decreased growth and hyperprolactinemia	2015/9/15-20	クロアチア・スプリト	