共同研究　研究紀要

2018

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。

2017（平成 29）年度共同研究　（研究期間　2017.4.1　～　2018.3.31）

承認番号	共同研究課題名（研究テーマ）	研究代表者
1	分子イメージングプローブの開発	薬品物理学化学研究室 教　授　　向　高弘
2	ヒドロキシプロリンのリン酸化とその保湿性の向上	機能性分子化学研究室 教　授　　中山　尋量
3	特異な縮環様式をもつ含窒素ヘテロ環化合物群の合成と抗癌活性評価	薬品化学研究室 教　授　　上田　昌史
4	新規エネルギー代謝ペプチドによる臓器間ネットワークに関する研究	病態生化学研究室 教　授　　加藤　郁夫
5	構造特異抗体によるアポ A-I 体内動態評価法の開発と疾患バイオマーカーとしての応用	生命分析化学研究室 教　授　　小林　典裕
6	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
7	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
8	婦人科悪性腫瘍の治療に有効な生薬・天然物の探索	医薬細胞生物学研究室 教　授　　士反　伸和
9	^{13}C- ラベル化したレチニルパルミテートを活用したビタミンＡ栄養評価法の開発	生命有機化学研究室 教　授　　和田　昭盛
10	神経管ユニットの機能制御機構の解明	医療薬学研究室 教　授　　力武　良行
11	生体内酸素還元反応に寄与する活性種のイメージングプローブならびにケージド化合物の開発研究	薬化学研究室 教　授　　奥田　健介
12	妊娠による脳内神経回路の変化	衛生化学研究室 教　授　　長谷川　潤
13	鼻腔内投与後の薬物の脳内移行：microdialysis 法を用いた評価	製剤学研究室 教　授　　坂根　稔康
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
15	抗アレルギー作用を有する化合物の探索	薬理学研究室 教　授　　小山　豊

第　1　号

平成30年7月1日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	分子イメージングプローブの開発

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
	向　高　弘	神　戸　薬　科　大　学	薬　学　部	教　授	研究総括
	萩　森　政　頼	長　崎　大　学　大　学　院	医歯薬学総合研究科	准教授	プローブの合成

共同研究の成果

我々は生体内遊離亜鉛イオンの動態および機能の解明を目的にピリジン - ピリドン型の亜鉛蛍光プローブの開発を行っており、本年度では蛍光 ON/OFF 制御型プローブの構造最適化および細胞での評価を行った。亜鉛錯体形成部位であるビピリジン環とフェニル基との距離を離すことによりバックグラウンド蛍光の減弱化が可能である。アルキル基の代わりに強い電子求引性のスルホニル基を導入した結果、プローブのバックグラウンド蛍光は大きく下がった。また、ピリジン環の代わりにピラジン環を導入したところ、蛍光波長は 50 ～ 60 nm 長波長側にシフトし、これまでに開発した誘導体の中で最も長波長側で蛍光を示した。そこで、アポトーシスを誘導した A549 細胞で検討を行った結果、ピラジン - ピリドン型誘導体は高感度に細胞内遊離亜鉛イオンを検出した。

テトラジンは 4 つの窒素原子を持つヘテロ環誘導体であり、水中で容易にアルケンと Diels-Alderh 反応することから生体での利用が期待されている。我々は生体イメージングや DDS への応用を指向し、還元型テトラジン誘導体(rTz-C18)を開発し、それと生体膜脂質との相互作用を評価してきた。本年度では、ジェミニ型の C18-rTz-C18 について、単分子膜物性を評価した。その結果、C18-rTz-C18 は典型的な液体凝縮膜を形成し、脂質成分と良好な混和挙動を示すことがわかった。また、C18-rTz-C18 は rTz-C18 と同様に細胞膜の内側に多く存在する DPPE と特異的に相互作用し崩壊圧低下作用を引き起こした。さらに、テトラジン誘導体をリポソーム膜へ導入し、テトラジン骨格に対して低分子ノルボルネンを化学的に反応させた結果、内包薬物が迅速に放出されたため、テトラジン修飾リポソームが内包薬物を自在に放出可能な新たな DDS 製剤となる可能性が示された。

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は、細胞外マトリックス分解酵素であり、マクロファージから分泌される MMP-12 は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の炎症過程において発現が亢進する。そこで、COPD の早期診断を目的に、放射性ヨウ素標識化合物の開発を行った。まず、ジベンゾフラン骨格を基盤にリンカー構造の異なる 3 つの化合物(1:カルバメート基、2:アミド基、3:スルホンアミド基)を合成し、MMP-12 発現タンパク質を用いてそれらの阻害活性を評価した。その結果、カルバメート基をリンカーとする化合物 1 は、2 および 3 に比べて強い阻害活性を示した。そこで、1 のブロモ置換体を標識前駆体として用い、ハロゲン交換反応を行ったところ、放射化学的純度 98% 以上で放射性ヨウ素標識体 [^{125}I]1 の合成に成功した。

全身性アミロイドーシスの早期診断を目的に、アミロイドに親和性を示すチオフラビン T をベースにした放射性ヨウ素標識化合物の開発を計画した。チオフラビン T の構造に大きな影響のないようにベンゾチアゾール環の窒素上のカチオンは残した。コールド体は、5- ブロモ -2- アミノベンゼンチオールより 4 ステップで合成に成功した。放射性ヨウ素標識は、容易であり、その後の分離精製が有利なスズ―ヨウ素交換反応で行うこととし、酸化剤としては N- クロロスクシンイミドを用いた条件において、放射化学的収率 41%、放射化学的純度 99% 以上、比放射能 2.2 GBq/μmol 以上で得ることができた。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Hagimori M., Temma T., Kudo S., Sano K., Kondo N., Mukai T.	Synthesis of radioiodinated probes targeted toward matrix metalloproteinase-12			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Bioorg. Med. Chem. Lett.		28	2018	193-195

〈総　説〉

著　者　名	論　文　標　題			
萩森　政頼、水山　奈央、小川　昂輝、川上　茂、向　高弘、佐治　英郎	亜鉛検出用蛍光プローブの開発とその応用			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
亜鉛栄養治療		8	2017	12-18

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
甘中　健登、佐野　紘平、萩森　政頼、山﨑　俊栄、向　高弘	第 15 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(PPF)2017		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
新規両親媒性テトラジン誘導体の開発とリポソームへの応用		2017/9/4	金沢

発　表　者	学　会　名		
萩森　政頼、狩峯　寧、加藤　直也、水山奈央子、渕上　由貴、佐治　英郎、向　高弘、川上　茂	第 34 回日本薬学会九州支部大会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
生体内遊離亜鉛の可視化を目的とした蛍光プローブの開発		2017/11/25	熊本

発　表　者	学　会　名		
中原　広道、萩森　政頼、向　高弘、柴田　攻	第 34 回日本薬学会九州支部大会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
新規還元型テトラジンと生体膜脂質の単分子膜物性評価		2017/11/26	熊本

発　表　者	学　会　名		
Hagimori M., Yamauchi T., Hirano Y., Sano K., Tanaka M., Mukai T.	The XVIth International Symposium on Amyloidosis		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Development of a radioiodinated Thioflavin-T derivative for nuclear imaging of systemic amyloidosis		2018/3/27	Kumamoto

発　表　者	学　会　名		
中原　広道、萩森　政頼、向　高弘、柴田　攻	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
還元型テトラジン(rTz-C18)と生体膜脂質の Langmuir 単分子膜挙動		2018/3/27	金沢

第　2　号

平成30年7月1日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	ヒドロキシプロリンのリン酸化とその保湿性の向上

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
	成相　裕之	神戸大学	工学研究科	教授	リン酸化剤の調製
	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

共同研究の成果

シクロ三リン酸塩(P_{3m})とヒドロキシプロリン(Hyp)との反応溶液の経時変化を HPLC により測定した。Hyp : P_{3m} = 1.0 mol/L : 0.5 mol/L, pH 11, 10℃で反応を行った反応溶液では、保持時間 73 分の P_{3m} によるピーク以外に保持時間 11 分および 25 分に生成物によるピークが認められ、保持時間 8 分(1 リン酸：P_1)、15 分(二リン酸：P_2)、19 分(三リン酸：P_3)に P_{3m} の分解物のピークが認められた。反応時間の経過とともに、P_{3m} のピークは減少し、分解物と生成物のピークが大きくなった。しかしながら保持時間 25 分の生成物は、反応 3 日後に最高収率 86 % を示した後、徐々に分解し、保持時間 11 分の生成物になることがわかった。

^{31}P- および ^{31}P-^{1}H HMBC NMR 解析により、保持時間 25 分のピーク はイミノ基に三リン酸が結合した生成物であることがわかり、保持時間 11 分は、一リン酸塩誘導体であることがわかった。Hyp には、ヒドロキシ基、カルボキシ基、イミノ基があるが、P_{3m} によるリン酸化反応では、イミノ基が選択的にリン酸化されることがわかった。

まず最初に三リン酸塩誘導体の単離を試みた。Hyp : P_{3m} = 1.0 mol/L : 0.5 mol/L, pH 11, 10℃で 3 日間反応を行った反応溶液を用いた。Wakosil®40C18 を充填した逆相カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーのどちらの場合でも、単離の過程で三リン酸塩誘導体が分解するため純度の高い生成物を得られなかった。これは、三リン酸塩誘導体は、分子内求核反応により、一リン酸塩誘導体に分解されやすいことが考えられた。さらに反応温度が 10℃の場合では、三リン酸塩誘導体は、比較的安定であるが単離の過程で温度が上昇すると、分解が促進されたと考えられた。

そこで 25℃で安定な Hyp の一リン酸塩誘導体が生成する最適反応条件を探した。

その結果、Hyp：P_{3m} = 1.5 mol/L : 0.5 mol/L, pH 13, 25°C で反応を行うのが良いことがわかり、このときの収率は、60%であった。

次に、一リン酸塩誘導体の単離を行ったが、三リン酸塩誘導体とは別な方法で行った。最適条件で作製した反応溶液に 2- プロパノールを加え、未反応の P_{3m} および Hyp と生成物とを分離し、純度 94% の Hyp の一リン酸塩誘導体を得た。Hyp が含まれるコラーゲンは、表皮細胞の増殖促進、角質層を保湿するという働きがある。これより Digital Moisture For Skin を使って実際に肌を塗布したときの保湿率を測定した。

まず、濃度 1.0 % の Hyp、リン酸化 Hyp 水溶液の 2 種類の液を生成しコットンに含ませ、被験者の腕の内側に 5 − 60 min 塗布した。

その結果、60 min 後の Hyp 水溶液の水分量は、50% であったのに対し、リン酸化 Hyp 水溶液では 90% と高い値を示すことがわかった。従って、Hyp にリン酸基を導入することで Hyp の保湿性が向上することが示された。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Hideko Maeda, Sakiko Tsuchida, Hiroyuki Nariai, Hirokazu Nakayama	Phsophorylation of Hydroxyproline with Trisodium cyclo-triphosphate and Evaluation of their Moisture Retaining			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Phosphorus Research Bulletin		34	2018	submitted

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
前田　秀子、土田　早紀、成相　裕之、中山　尋量	第 26 回無機リン化学討論会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ヒドロキシプロリンの保湿性向上を目指したシクロ三リン酸塩によるリン酸修飾		8/25	習志野市

第　3　号

平成30年7月17日

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・上田　昌史

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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ヘテロ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
	上田　昌史	神戸薬科大学	薬学部・薬学科	教　授	候補化合物の合成
	武田　紀彦	神戸薬科大学	薬学部・薬学科	講　師	候補化合物の合成
	松野　研司	工学院大学	先進工学部・生命化学科	教　授	候補化合物の抗癌活性評価

共同研究の成果

3- ヒドロキシイソキサゾール誘導体は、様々な生物活性化合物に含まれている。例えば、AMPA は中枢神経系に作用し、記憶や学習に大きく関与することが知られている。また、THIP は睡眠薬の標的である GABA 受容体の部分アゴニスト活性を示すと報告されている。そのため、これらの効率的な新規合成法の開発は重要な課題のひとつである。そこで、3- ヒドロキシイソキサゾール誘導体の抗癌活性などの新たな生物活性の探索を目的として、窒素原子上にアルコキシ基をもつプロピオルアミドを基質とした遷移金属による連続的な閉環反応と置換基導入反応を検討した。 すなわち、基質のアルコキシ酸素のアルキンへの求核付加によって生成する中間体の酸素原子上の置換基が 4 位へ転位すれば、4 位に置換基をもつ 3- ヒドロキシイソキサゾールが得られると考えた。まず、アリルオキシ基をもつ 3- フェニルプロピオルアミドを 1,2- ジクロロエタン還流条件下、AuCl を触媒として用いて反応を検討したところ、期待通り閉環と転位反応が進行したと考えられる 4- アリル -3- ヒドロキシイソキサゾールが得られた。次に、収率の向上のため様々な遷移金属触媒を用いて検討したところ、$AuCl_3$ を用いた場合に収率が向上したことから、3 価の金触媒が本反応の触媒として優れていることが明らかとなった。また、窒素原子上にアリル基が転位したと考えられる 2- アリル -3- イソキサゾロンも少量ながら得られることが分かった。次に、様々な配位子をもつ 3 価の金触媒を検討したところ、$PicAuCl_2$ を触媒として用いた場合に 86% と最も高収率で目的の 4- アリル -3- ヒドロキシイソキサゾールが得られることが明らかとなった。次に、アルキン末端の置換基効果を検討した。まず、アルキン末端上のフェニル基の置換基について検討したところ、電子供与基や電子求引基をもつ場合でも効率よく反応が進行した。次に、アルキン末端にアルキル基をもつ基質で検討した。その結果、興味深いことに、*t*-Bu 基をもつ基質の反応では、窒素原子上にアリル基が転位した 3- イソキサゾロンの収率が増加することが明らかとなった。本反応の反応経路は以下のように考えている。まず、金触媒により活性化されたアルキンに *N*- アルコキシプロピオルアミドの酸素原子が分子内求核付加することで、オキソニウム中間体が生成する。続いて、イソキサゾール環の 4 位へアリル基の転位が進行し、最後に金触媒の再生に伴う芳香化が進行することで、3- ヒドロキシイソキサゾールが生成したと考えている。さらに、本研究の有用性を確認する目的で、本反応を鍵反応とした生物活性イソキサゾール誘導体の全合成研究へと展開した。その結果、超長鎖脂肪酸伸長酵素（VLCFAE）阻害活性を有する除草剤、MAO 阻害活性化合物、および AMPA を合成することに成功した。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Shoichi Sugita, Norihiko Takeda, Norimitsu Tohnai, Mikiji Miyata, Okiko Miyata and Masafumi Ueda	Gold-Catalyzed [3+2]/Retro-[3+2]/[3+2] Cycloaddition Cascade Reaction of *N*-Alkoxyazomethine Ylides			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Angew. Chem. Int. Ed.		56	2017	2469–2472

著　者　名	論　文　標　題			
Nobuyoshi Doi, Norihiko Takeda, Okiko Miyata and Masafumi Ueda	Regiodivergent Chlorine Atom-transfer Ring-opening Reaction of Trichloromethylcyclopropanes			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Eur. J. Org. Chem.			2017	3652-3657

著　者　名	論　文　標　題			
Norihiko Takeda, Erika Futaki, Yukiko Kobori, Masafumi Ueda and Okiko Miyata	Nucleophilic Arylation of *N,O*-Ketene Acetals with Triaryl Aluminum Reagents: Access to α -Aryl Amides through an Umpolung Process			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Angew. Chem. Int. Ed.		56	2017	16342-16346

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
武田　紀彦、古石　瑞希、松野　研司、宮田　興子、上田　昌史	第 37 回有機合成若手セミナー		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
メチルケトン類の立体選択的α－フェニル化反応の開発		2017.8.9	京都

発　表　者	学　会　名		
東川　　泉、杉田　翔一、武田　紀彦、松野　研司、宮田　興子、上田　昌史	第 67 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
金触媒による閉環－転位反応を鍵反応とした生物活性を有するイソキサゾール誘導体の合成		2017.10.14	神戸

発　表　者	学　会　名		
上田　昌史、伊藤　勇太、野久保名菜恵、八幡　茉由、武田　紀彦、宮田　興子	第 47 回複素環化学討論会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
共役ヒドラゾンの求核性を利用したインドール類およびピラゾール類の合成		2017.10.26	高知

第　4　号

平成30年7月20日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	新規エネルギー代謝ペプチドによる臓器間ネットワークに関する研究

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
	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

共同研究の成果

本研究室では、新規エネルギー代謝ペプチドである adropin、nesfatin-1、musclin 及び外因性ホルモン様ペプチドである rubiscolin-6 を中心に、これらペプチドの臓器間エネルギー代謝ネットワークにおける役割を解明することを目指している。現在、その研究の一環として、合成ペプチドを用いて各ペプチドの膵機能及び摂食に対する影響を検討している。また、本研究の基盤となる各ペプチドの ELISA の確立に必須な高純度免疫抗原を合目的に化学合成して、これらを免疫原として作製した特異抗血清を用いて高感度 ELISA を確立し、生理的意義やエネルギー代謝異常などの病態解析への応用を目指している。H29 年度に行った研究概要・成果は以下の通りである。

1. Adropin の摂食抑制作用機序について：自由摂食下の正常マウスに合成 adropin を腹腔内投与し、摂食調節因子である ghrelin − des-acyl ghrelin 分泌を促進させる結果を得た。Adropin の摂食抑制作用機序は、これまでに明らかにされていないが、上記結果より、adropin は、ghrelin − des-acyl ghrelin 分泌系を調節し摂食抑制する作用を有することが示唆された。

2. Rubiscolin-6 の摂食促進作用機序における活性発現配列について：Rubiscolin-6 及びその誘導体 6 種類を合成し、自由摂食下の正常マウスに経口投与し、30 分後の摂食量を検討した結果、rubiscolin-6 の摂食促進作用における活性発現の最小単位に相当すると考えられる配列が推察された。

3. Nesfatin-1 の insulin 分泌促進について：一晩絶食下の正常マウスに合成 nesfatin-1 を腹腔内投与し、血中 insulin 及び GLP-1 濃度は増加した。これらの増加は抗 nesfatin-1 抗血清及び抗 GLP-1 抗血清投与により阻害された。さらに、膵 Ins 及び回腸 Gcg mRNA 発現量はこれらの変動にほぼ一致していた。以上の結果は、nesfatin-1 の insulin 分泌促進作用機序の一つを示唆するものと考えられ、この成果を報告する。

4. Nesfatin-1 の摂食抑制作用について：自由摂食下の正常マウスに合成 nesfatin-1 を腹腔内投与し、摂食調節ホルモンの分泌及び視床下部での摂食調節因子の発現について変化を認めた。これらの結果は、nesfatin-1 の摂食抑制作用機序の一因であると考える。

5. 免疫測定法の開発：マウス nesfatin-1、adropin、及び musclin のサンドイッチ法及び競合法 ELISA 系を用いて、肥満・糖尿病、エネルギー代謝に関し集めたデータを報告する。

6. 自家製 rubiscolin-6 ELISA 系確立の基礎的検討を行った。

7. げっ歯類での adropin 及び Enho mRNA の発現動態：　マウスの肝臓及び視床下部において adropin をコードする遺伝子 Enho の発現は、肥満・糖尿病発症機序により異なる結果を得た。この成果は、第 90 回日本内分泌学会学術総会（2017.4.21 京都）で報告した。

8. マウス脂肪組織を用いて、nesfatin-1 は脂肪組織より glucose の刺激により分泌されることを認めたので、日本薬学会第 138 年会（2018.3.26 金沢）で報告した。以上

〈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	第 90 回日本内分泌学会学術総会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
肥満モデルマウス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		2017.4.21	京都

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 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
マウス脂肪組織における nesfatin-1 分泌への glucose の影響について		2018.3.26	金沢

第　5　号

平成30年7月19日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	構造特異抗体によるアポ A-I 体内動態評価法の開発と疾患バイオマーカーとしての応用

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
	小林　典裕	神戸薬科大学	薬学部	教授	apoA-I 抗体の設計・作製
	大山　浩之	神戸薬科大学	薬学部	助教	apoA-I 抗体の評価
	森田　いずみ	神戸薬科大学	薬学部	助手	apoA-I 抗体の応用
	斎藤　博幸	京都薬科大学	薬品物理化学分野	教授	apoA-I 体内動態および病態発現の解析
	扇田　隆司	京都薬科大学	薬品物理化学分野	助教	apoA-I 抗体の物性評価
	水口　智晴	京都薬科大学	薬品物理化学分野	特別研究学生	apoA-I 抗体を用いた測定系の構築
	灘井　亮	京都薬科大学	薬品物理化学分野	大学院生	apoA-I 抗体の動態評価

共同研究の成果

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。その解明を目的として、これまでに、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)および変異を含まない ApoA-I 全長タンパク質(ApoA-I-wt)に対するモノクローナル抗体、さらに、ApoA-I-frg の重合体(ApoA-I-fib)に特異的なモノクローナル抗体を調製した。今年度は、重合体に対する抗体の性質に検討を加え、さらに可変部遺伝子のクローニングを行った。

計 4 種の抗 ApoA-I-fib 抗体(#7-5、#A4-18、#B37-9、#B40-5)を樹立したが、まず、各抗体のアイソタイプを市販のアイソタイピングキットを用いて調べたところ、H 鎖サブクラスは 4 種いずれも μ、L 鎖タイプは、#A4-18 と #7-5 が κ、#B40-5 と #B37-9 が λ であった。これら抗体は、いずれもビオチン化 ApoA-I-fib に対して用量依存的に反応した。なかでも #4-18 は ApoA-I-fib に対して良好な特異的を示し、同質量の未重合モノマー(すなわちビオチン化した ApoA-I-frg)に比べて 5 倍以上も高い反応性を示した。

次いで、抗体 #A4-18、#B40-5 の可変部遺伝子をクローニングした。これらを産生するハイブリドーマ細胞から総 RNA を抽出し、オリゴ dT プライマーを用いる逆転写反応により cDNA を調製した。次に、両抗体について、5'-RACE 法またはリーダー配列に特異的なユニバーサルプライマーセットを用いた RT-PCR により V_H および V_L 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物をクローニング用プラスミドに組み込んで大腸菌に導入し、挿入遺伝子陽性のクローンを培養してプラスミドを抽出し、その塩基配列をサンガー法により調べた。推定されるアミノ酸配列から可変部を同定し、Kabat の分類する可変部サブグループを調べたところ、V_H は #A4-18 が IB、#B40-5 がⅢ C であり、#A4-18 の V_L(κ 鎖)はⅤであった。

今後、V_H、V_L 遺伝子をリンカーで連結して一本鎖 Fv フラグメント(scFv)の遺伝子を構築し、蛍光あるいは発光タンパク質との融合体として大腸菌内で発現させて、その産物のアミロイド線維への反応性を評価する予定である。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
H. Kimura, S. Mikawa, C. Mizuguchi, Y. Horie, I. Morita, H. Oyama, T. Ohgita, K. Nishitsuji, A. Takeuchi, S. Lund-Katz, K. Akaji, N. Kobayashi, H. Saito	Immunochemical Approach for Monitoring of Structural Transition of ApoA-I upon HDL Formation Using Novel Monoclonal Antibodies			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Sci. Rep.		7	2017	2988

著　者　名	論　文　標　題			
H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, T. Morishita, S. Fukushima, Y. Nishimori, T. Niwa, N. Kobayashi	A A Single-Step "Breeding" Generated a Diagnostic Anti-cortisol Antibody Fragment with Over 30-Fold Enhanced Affinity			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Biol. Pharm. Bull.		40(12)	2017	2191

著　者　名	論　文　標　題			
I. Morita, H. Oyama, M. Yasuo, K. Matsuda, K. Katagi, A. Ito, H. Tatsuda, H. Tanaka, S. Morimoto, N. Kobayashi	Antibody Fragments for On-site Testing of Cannabinoids Generated via in Vitro Affinity Maturation			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Biol. Pharm. Bull.		40(2)	2017	174

著　者　名	論　文　標　題			
H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, E. Banzono, K. Ishii, S. Kubo, Y. Watanabe, A. Hirai, C. Kaede, M. Ohta, N. Kobayashi	One-Shot in Vitro Evolution Generated an Antibody Fragment for Testing Urinary Cotinine with More Than 40-Fold Enhanced Affinity			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Anal. Chem.		89(1)	2017	988

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
古谷　優樹、服部　恵美、扇田　隆司、森田いずみ、大山　浩之、小林　典裕、斎藤　博幸	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
新規 apoA-I 構造特異抗体によるアミロイド線維反応性の評価		2018.03.27	金沢

発　表　者	学　会　名		
大山　浩之、肥越ひかる、森田いずみ、小林　典裕	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
V_H-CDR3 内チロシン残基を変異標的とする抗Δ^9- テトラヒドロカンナビノール scFv の親和性成熟		2018.03.27	金沢

発　表　者	学　会　名		
森田いずみ、大山　浩之、田中　理恵、花尻(木倉)瑠理、小林　典裕	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
オンサイト分析を目的とするモノクローナル抗シロシン抗体作製の試み		2018.03.27	金沢

発　表　者	学　会　名		
木口　裕貴、大山　浩之、森川　真衣、中野明日香、森田いずみ、小林　典裕	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
実用診断薬の創製を目指す抗コルチゾール scFv の試験管内親和性成熟		2018.03.27	金沢

発　表　者	学　会　名		
Hiroyuki Oyama, Izumi Morita, Toshifumi Niwa, and Norihiro Kobayashi	European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Utility of *Gaussia* luciferase as a fusion partner with scFvs for bioluminescent immunoassays testing clinical biomarkers		2017.06.12	Athens

発　表　者	学　会　名		
Izumi Morita, Hiroyuki Oyama, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, and Norihiro Kobayashi:	European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
In vitro affinity maturation of a single-chain Fv fragment for on-site testing of cannabinoids		2017.06.12	Athens

発　表　者	学　会　名		
大山　浩之、森田いずみ、松田　和久、片木　謙吾、小林　典裕、田中　宏幸、森元　　聡	日本法中毒学会第 36 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
抗Δ^9- テトラヒドロカンナビノール一本鎖 Fv フラグメントの作製と試験管内親和性成熟		2017.07.06	品川

発　表　者	学　会　名		
森田いずみ、大山　浩之、神田　結、安尾まゆみ、伊藤　綾、小林　典裕	日本法中毒学会第 36 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
新規モノクローナル抗ケタミン抗体の作製とその諸性質		2017.07.06	品川

発　表　者	学　会　名		
小林　典裕、大山　浩之、森田いずみ、木口　裕貴	日本法中毒学会第 36 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
アッセイ感度の向上を目指す「抗体育種」：抗コチニン抗体を例として		2017.07.07	品川

発　表　者	学　会　名		
大山　浩之、木口　裕貴、井上由香莉、高嶺百合子、藤原　若菜、森田いずみ、小林　典裕	日本分析化学会 66 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
高親和力を保持した抗エストラジオール scFv 最少変異体調製の試み		2017.09.11	葛飾

発　表　者	学　会　名		
森田いずみ、神田　結、安尾まゆみ、伊藤　綾、大山　浩之、小林　典裕	日本分析化学会 66 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
オンサイト免疫測定法を目的としたモノクローナル抗ケタミン抗体の新規調製		2017.09.11	葛飾

第　6　号

平成30年6月12日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	神戸薬科大学	薬学部	教授	生合成および機能の解析と全体の総括
	灘中　里美	神戸薬科大学	薬学部	准教授	糖鎖の機能解析
	田村　純一	鳥取大学	農学部・生命環境農学科	教授	糖鎖合成

共同研究の成果

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。

特に、コンドロイチン硫酸は、がん細胞などのマトリックスに豊富に存在することが知られ、がん細胞の浸潤や転移の制御などに関わ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(GlcA)と *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)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。我々はこれまでに、ビオチンリンカーを共有結合させた数種類のコンドロイチン硫酸四糖を化学合成し、ミッドカインとの相互作用を解析した。本年度は、位置選択的硫酸化を経てビオチン化コンドロイチン硫酸四糖；β GalNAc6S(1-4) β GlcA ± 2S(1-3) β GalNAc6S (1-4) β GlcA ± 2S(CS-CC, CS-DD)を化学合成し、これまでに合成した CS-AA 四糖とともに、２種類の抗コンドロイチン硫酸 A 抗体(LY111 と 2H6)との結合を四糖レベルで検証した。その結果、LY111 は CS-AA と CS-DD 四糖を認識したが、CS-CC 四糖は認識しなかった。一方、2H6 は CS-AA 四糖を強く認識し、CS-CC と CS-DD 四糖も弱いながらも認識することが明らかになった。

また、我々はコンドロイチン硫酸によって高転移性の basal-like 型乳がん細胞株 BT-549 細胞の浸潤が促進することも見出した。BT-549 細胞の表面には N- カドヘリンが存在し、この分子にコンドロイチン硫酸が結合すると、カベオラ依存的に N- カドヘリンが細胞内に取り込まれた。取り込まれた N- カドヘリンはプロテアーゼにより膜近傍で切断され細胞質ドメインが遊離した。この遊離した細胞質ドメインにはβ - カテニンが結合しているため、これらが核へ移行するとβ - カテニンによる転写が活性化すると考えられた。実際、β - カテニンの下流でマトリクスメタロプロテアーゼ 9 遺伝子の発現が上昇し、BT-549 細胞の浸潤が促進した。このようなエンドサイトーシスを介する N- カドヘリン / β - カテニン経路の活性化による浸潤能の上昇は、外来性コンドロイチン硫酸の添加により促進された。これらの結果から、がん細胞が組織に浸潤しようとする際、がん細胞は宿主側のコンドロイチン硫酸及びがん細胞自身がつくるコンドロイチン硫酸を利用して浸潤能を高めている可能性が示唆された。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Matsushita, K., Nakata, T., Takeda-Okuda, N., Nadanaka, S., Kitagawa, H., and Tamura, J.	Synthesis of chondroitin sulfate CC and DD tetrasaccharides and interactions with 2H6 and LY111			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Bioorganic & Medicinal Chemistry		26	2018	1016-1025

第　7　号

平成30年7月18日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	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

本研究の目的は肺高血圧症発症の新たな分子機序を解明し、最適な治療法を選択するためのエビデンスの集積に資する臨床的および基礎的データを蓄積することである。

肺高血圧症は原因不明の進行性・難治性疾患であり、適切な治療がなされなければ右心不全を来たし死に至る予後不良の疾患である。そのため、病態の解明、新規診断マーカーの開発、治療や患者マネージメントの最適化が重要であり、その確立が急務とされている。このような背景のもと、肺高血圧症患者における臨床データあるいは臨床検体などを用い解析することで先に述べた臨床課題を解決する必要がある。そこで、本共同研究では、肺高血圧症症例について、血液・生理検査データや血行動態データの蓄積、統計解析を行うことで新規の診断あるいは治療指標の同定を試みた。

肺動脈性肺高血圧症と慢性血栓塞栓性肺高血圧症症例において血行動態指標と運動耐容能との相関を治療前後で解析し、心不全や死亡などの心血管イベントを予測する因子を解析し、論文として発表した（J Cardiopulm Rehabil Prev.2017）。また、慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対するカテーテル治療のゴール設定について新たな指標を見出し、5 年ごとに開催される肺高血圧症のワールドシンポジウムで発表するとともに、論文として発表した（EuroIntervention.2017）。さらに、慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する開胸手術とカテーテル治療のハイブリッド治療の有用性、デュアルエナジーCT を用いた慢性血栓塞栓性肺高血圧症の治療効果の評価法の確立、重症肺疾患合併肺高血圧症の予後規定因子探索後向き研究、肺高血圧症の生活の質に影響を及ぼす指標の探索などについて、肺高血圧症のワールドシンポジウム、日本循環器学会、日本肺高血圧・肺循環学会など国内外の学術集会で発表を重ねてきた。これらの学会発表については論文として発表するべく、現在論文作成中である。

以上、本共同研究の結果、肺高血圧症に関する臨床的課題に関して2 報の論文発表及び9 件の学会発表を行い、同症の発症メカニズムの解明と治療法最適化において着実に成果をあげることができた。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Tsuboi Y, Tanaka H, Nishio R, Sawa T, Terashita D, Nakayama K, Satomi-Kobayashi S, Sakai Y, Emoto N, Hirata KI.	Associations of Exercise Tolerance With Hemodynamic Parameters for Pulmonary Arterial Hypertension and for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
J Cardiopulm Rehabil Prev.		37	2017	341-346

著　者　名	論　文　標　題			
Shinkura Y, Nakayama K, Yanaka K, Kinutani H, Tamada N, Tsuboi Y, Satomi-Kobayashi S, Otake H, Shinke T, Emoto N, Hirata KI.	Extensive revascularization by balloon pulmonary angioplasty for chronic thromboembolic pulmonary hypertension beyond hemodynamic normalization.			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
EuroIntervention.		13	2017	2060-2068

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
中山　和彦、江本　憲昭、玉田　直己、新倉　悠人、谷仲　謙一、新家　敏郎、平田　健一	第２回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
重症肺疾患合併肺高血圧症の予後規定因子探索後向き研究		2017/6/1-3	札幌

発　表　者	学　会　名		
谷仲　謙一、中山　和彦、玉田　直己、大西　裕之、新倉　悠人、坪井　康典、田中　秀和、小林　成美、新家　俊郎、江本　憲昭、平田　健一	第２回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
CTEPHに対するハイブリッド治療の有効性･安全性について		2017/6/1-3	札幌

発　表　者	学　会　名		
Yorifuji K, Uemura Y, Horibata S, Tsuji G, Suzuki Y, Miyagawa K, Nakayama K, Hirata KI, Kumagai S, Emoto N	The Fifteenth International Conference on Endothelin		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Polymorphisms of CHST3 and CHST13 in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension for Predicting Bosentan-Induced Liver Toxicity		2017/10/5-7	チェコ・プラハ

発　表　者	学　会　名		
Nakayama K, Emoto N, Tamada N, Shinkura Y, Yanaka K, Onishi H, Matsuoka Y, Shinke T, Hirata KI	6th World Symposium on Pulmonary Hypertension		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Prognostic factors of pulmonary hypertension with severe lung disease in retrospective study		2018/2/27-3/1	フランス・ニース

発　表　者	学　会　名		
Shinkura Y, Nakayama K, Onishi H, Yanaka K, Tamada N, Tsuboi Y, Satomi-Kobayashi S, Otake H, Shinke T, Emoto N, Hirata KI	6th World Symposium on Pulmonary Hypertension		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Predictors for worsening hemodynamics during follow-up period after balloon pulmonary angioplasty		2018/2/27-3/1	フランス・ニース

発　表　者	学　会　名		
Onishi H, Nakayama K, Yanaka KI, Tamada N, Izawa Y, Shinkura Y, Tuboi Y, Shimoyama S, Nishii T, Kono A, Negi N, Mori S, Otake H, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Emoto N, Hirata KI	6th World Symposium on Pulmonary Hypertension		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Pulmonary Blood Volume by Dual-energy CT is a new management index for chronic thromboembolic pulmonary hypertension		2018/2/27-3/1	フランス・ニース

発　表　者	学　会　名		
Tamada N, Nakayama K, Yanaka K, Onishi H, Shinkura Y, Shinke T, Emoto N, Hirata KI	6th World Symposium on Pulmonary Hypertension		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Pulmonary endarterectomy and balloon pulmonary angioplasty similarly improve health related quality of life in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension		2018/2/27-3/1	フランス・ニース

発　表　者	学　会　名		
Yanaka K, Nakayama K, Shinke T, Otake H, Kawamori H, Shinkura Y, Tamada N, Onishi H, Tsuboi Y, Satomi-Kobayashi S, Tanaka H, Okita Y, Emoto N, Hirata KI	6th World Symposium on Pulmonary Hypertension		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Sequential hybrid therapy with pulmonary endarterectomy and additional balloon pulmonary angioplasty for chronic thromboembolic pulmonary hypertension.		2018/2/27-3/1	フランス・ニース

発　表　者	学　会　名		
Yanaka K, Nakayama K, Shinke T, Otake H, Kawamori H, Shinkura Y, Tamada N, Onishi H, Tsuboi Y, Satomi-Kobayashi S, Tanaka H, Okita Y, Emoto N, Hirata KI	第 82 回　日本循環器学会学術集会総会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Sequential Hybrid Therapy with Pulmonary Endarterectomy and Additional Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension		2018/3/23-25	大阪

第　8　号

平成29年7月19日

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

研究代表者職・氏名　　教授・士反　伸和

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	婦人科悪性腫瘍の治療に有効な生薬・天然物の探索

	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
構成員	士反　伸和	神戸薬科大学	薬学部	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

現在、２人に一人はがんになり、３人に一人ががんで亡くなると言われている。がん治療の１つに化学療法があり大きな効果をあげているが、有効な抗腫瘍薬がほとんどないがんもある。また、強い副作用や耐性の獲得などにより治療続行が困難となる場合も多く、新たな抗腫瘍薬の開発が期待されている。

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、抗がん剤治療が選択されることが多い。また、初期の治療では有効であった抗がん剤に耐性が生じてしまうことも度々観察されている。そこで我々はまず、数種の卵巣がん細胞株を用いて、生薬などの天然物から新たな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用い、数種の生薬を対象に試験を行った。

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、抗がん剤との併用効果の検討を行った。

スクリーニングの結果、卵巣がん細胞株に対して幾つかの生薬に細胞増殖抑制効果が認められた。その中で、ビャクシ、タクシャ、アカネ根について、活性成分の探索及び作用機序の検討を行った。①ビャクシからは、活性を有する数種のフラノクマリン類を確認しその構造を決定した。②タクシャからは、２種のトリテルペノイドを単離した。これらは細胞周期に対して G_0/G_1 期から S 期への移行を阻害することがわかり、PCR を用いて関連する因子の mRNA 発現量などを検討した結果、いくつかの遺伝子について発現上昇／低下を観察した。③アカネ根からは、前年度に引き続きさらに活性の強いアリザリン型アントラキノンを単離した。また、その中にトポイソメラーゼ阻害作用を有するものを見出した。

一方、漢方薬と抗がん剤（シスプラチン）の併用効果については、前年度に引き続き、計 90 の漢方処方について試験を行った。その結果、シスプラチンの効果を強め相乗効果が期待出来る漢方薬として 28 の処方を確認した。また、シスプラチン耐性株に対してもシスプラチンと漢方薬の併用効果を検討した結果、10 処方のうち１処方にシスプラチンの効果を強め耐性改善作用が期待できた。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Yumi Nishiyama, Yuki Noda, Noriyoshi Nakatani , Nobukazu Shitan, Tamotsu Sudo, Atsushi Kato, Patrick B. Chalo Mutiso	New aromatic compounds including two flavan dimers from the bark of *Cassipourea malosana* and their cytotoxicity against a human ovarian cell line			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
投稿中				

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
美濃　明佳、西山　由美、士反　伸和、須藤　　保	日本生薬学会第 64 回年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ヒト卵巣がん細胞 KOC7C 株に対するタクシャの抗腫瘍活性成分の探索		2017/9/9-10	千葉

発　表　者	学　会　名		
石飛　遥奈、中川　朋美、田中　　萌、西山　由美、士反　伸和、須藤　　保	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ヒト卵巣がん細胞KOC7C株に対する漢方薬とシスプラチンの併用効果		2018/3/26-28	金沢

発　表　者	学　会　名		
池水奈々子、西山　由美、士反　伸和、須藤　　保	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
アカネ根のヒト卵巣がん細胞株に対する抗腫瘍活性成分の探索　2		2018/3/26-28	金沢

発　表　者	学　会　名		
滝川　侑衣、西山　由美、士反　伸和、須藤　　保	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ビャクシ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		2018/3/26-28	金沢

第　9　号
平成30年7月5日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	13C- ラベル化したレチニルパルミテートを活用したビタミン A 栄養評価法の開発

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
	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	ラベル化レチニルパルミテートの合成
	松浦　知和	東京慈恵会医科大学	医学部	教授	ビタミン A 栄養評価法の開発

共同研究の成果

レチナールからレチニルパルミテートへは、還元によりアルコールへ還元後、エステル化することにより容易に変換できその方法は確立されている。13 位を 13C でラベルしたレチナールの合成法は既に報告されているので、まず、その問題点を考察し改良法を検討した。

報告されている合成法では、13C でラベル化した C18- ケトンが鍵中間体となっており、この大量合成が課題となる。これまでは β-ionylideneacetaldehyde に 13C レベル化された CH3CN を反応させた後、アセチル化、脱酢酸、続く幾つかの官能基変換を経て、6 工程総収率 43％となっている。β-ionylideneacetaldehyde とラベル化していないアセトンとのアルドール反応では、1 工程で収率よく C18- ケトンが合成できることが知られているが、アセトンを溶媒兼用としているため大過剰使用しており、ラベル化体の合成では経済性が問題となる。そこでアセトン量を削減したアルドール反応を検討した。その結果、6 当量のアセトンと塩基として NaOMe を用いトルエン中加熱する方法が最も良いことが判明した。実際のラベル化したアセトンを用いて反応したところ 69％の収率で目的とする C18- ケトンが得られた。C18- ケトン体は、シアノホスホネートとの反応で側鎖を延長後、還元しレチナールへと誘導した。レチナールは、更に NaBH4 で還元しアルコールとした後、アシル化してパルミテートへと変換した。またアルコールはアセテートへも変換することができた。

合成したラベル体は、現在、動物（ラット）を用いる呼気試験法を検討している。その結果により、ラベル化する位置が 1 か所だけでは呼気試験での検出が困難な場合には、他の位置にラベル化を実施し、2 個あるいは 3 個レベル化したレチニルエステルの合成を行い、呼気試験に用いるレベル化する位置としてどの位置がより効果的かを検討する予定である。

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名	
平岡　敬子、柏原　里香、和田　昭盛	日本ビタミン学会第69回大会	
タ　イ　ト　ル	開催日	開催場所
13位を ^{13}C でラベルしたレチナールの別途合成法の開発	6月10日	横浜

発　表　者	学　会　名	
和田　昭盛、平岡　敬子、柏原　里香、山野由美子、松浦　知和	第61会香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会	
タ　イ　ト　ル	開催日	開催場所
13位 ^{13}C- レチニルパルミテートの効率的な合成法の開発	9月10日	金沢

第　10　号

平成30年6月28日

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　　医療薬学研究室

研究代表者職・氏名　　教授・力武　良行

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	神経血管ユニットの機能制御機構の解明

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
	力　武　　良　行	神　戸　薬　科　大　学	薬　　学　　部	教　授	研究の統括
	佐　々　木　　直　人	神　戸　薬　科　大　学	薬　　学　　部	准教授	動物実験と解析
	堀　部　　紗　世	神　戸　薬　科　大　学	薬　　学　　部	助　教	細胞・組織培養と解析
	平　田　　健　一	神　戸　大　学　大　学　院	医　学　研　究　科	教　授	データの解析

共同研究の成果

（1）アストロサイトの形態形成機構：浮遊神経幹細胞集塊であるニューロスフェアから分化誘導して得た培養アストロサイトを用いて、細胞外マトリックスであるラミニンによる突起形成の分子機構を解析した。①水チャネルであるアクアポリン -4（AQP4）の裏打ちタンパク質であるα - シントロフィンが AQP4 の mRNA 発現を制御して突起形成を促進していること、② AQP4 が focal adhesion kinase（FAK）のリン酸化・活性化を制御していること、③ FAK が突起形成を促進していることを明らかにした。

（2）培養アストロサイトと単離マウス脳血管との共培養系の構築：胎児マウスより単離した脳血管と培養アストロサイトとの in vitro 共培養系を構築した。本共培養系を用いて、①免疫染色後の輝度解析から、脳血管とアストロサイトとの接触部での AQP4 の局在には、シントロフィンおよびジストログリカンが重要であること、② live imaging と撮像後の免疫染色から、脳血管に周皮細胞が存在している部位で、脳血管とアストロサイトとが接触しやすい傾向があることを明らかにした。

（3）アストロサイトと血管内皮細胞における細胞内シグナル伝達：血管内皮増殖因子（VEGF）により誘導される血管内皮細胞の管腔形成・運動における細胞内シグナル伝達機構について解析した。RhoA を不活化する RhoGAP である ArhGAP29 がアクチン結合タンパク質である afadin と結合しており、afadin と協調して RhoA と Rho-associated kinase の活性化を抑制して血管内皮細胞の管腔形成・運動を制御していることを明らかにした。さらに、マウスに T 細胞特異的に CTLA-4 を過剰発現させると、高脂肪食とアンジオテンシンⅡにより惹起される腹部大動脈瘤の形成が抑制されることを明らかにした。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
Tagashira T, Fukuda T, Miyata M, Nakamura K, Fujita H, Takai Y, Hirata K, Rikitake Y.	Afadin facilitates VEGF-induced network formation and migration of vascular endothelial cells by inactivating ROCK through ArhGAP29.			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Arterioscler Thromb Vasc Biol.		38	2018	1159-1169

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
中江　友軌、堀部　紗世、井上　咲那、宇野　槙優、後藤　麻友、西岡　詩織、佐藤　淳哉、河内　正二、佐々木直人、小林　成美、平田　健一、力武　良行	生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ラミニンによるアストロサイトの突起形成促進にはジストログリカンとα－シントロフィンを介したAQP4の発現が関与する		2017.12.6	神戸

発　表　者	学　会　名		
濱口　康介、堀部　紗世、黒井　美希、坂口　恵亮、中江　友軌、橋本　紗季、山本　麻耶、河内　正二、佐々木直人、平田　健一、力武　良行	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ラミニンによるアストロサイト突起形成の分子制御機構		2018.3.26	金沢

発　表　者	学　会　名		
山本　麻耶、河内　正二、黒井　美希、中江　友軌、坂口　恵亮、橋本　紗季、濱口　康介、堀部　紗世、佐々木直人、平田　健一、力武　良行	日本薬学会第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
マウス脳血管とアストロサイトとの接着部での AQP4 局在に果たすシントロフィンおよびジストログリカンの役割		2018.3.26	金沢

発　表　者	学　会　名		
Naoto Sasaki	第 46 回日本免疫学会学術集会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Ultraviolet B exposure prevents atherosclerotic cardiovascular disease by regulating immunoinflammatory responses.		2017.12.14	仙台

第　11　号
平成30年7月20日

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・奥田　健介

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	生体内酸化還元反応に寄与する活性種のイメージングプローブならびにケージド化合物の開発研究

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
	奥田　健介	神戸薬科大学	薬学部	教授	分子設計・合成
	永澤　秀子	岐阜薬科大学	薬学部	教授	活性評価

共同研究の成果

近年、H_2S をはじめ H_2S_2 等の persulfide, polysulfide などの活性硫黄種によるレドックス・シグナリングが注目を集めている。このシグナル伝達系は，がんや発生分化をはじめ、きわめて多岐にわたる生命現象に関与していることが明らかにされつつあり、その恒常性の破綻が様々な疾病を引き起こすことも報告されている。さらに、活性硫黄種は酸化還元反応を通して相互に容易に変換するため、活性硫黄種としての真の活性種に関しては混とんとしている。そこで、これら活性硫黄種個々に対応する高感度かつ迅速な検出法を確立することにより、レドックス反応に基づく新たな細胞内シグナル研究の基盤技術を提供することができれば、発がんや老化、生活習慣病など酸化ストレスに起因する様々な疾病治療に波及効果をもたらすことが期待される。さらに、これら活性硫黄種の過渡的なふるまいを明らかにすることを目的として、顕微鏡下での光照射により活性硫黄種発生の時空間制御を可能にするような、これら活性硫黄種のケージド化合物の創製をも目指している。

平成 29 年度においては、細胞内で発生した H_2S をトリガーとして自ら H_2S 等価体を放出すると同時に蛍光分子を放出し、プローブとの反応により消費された H_2S を再生して連鎖的に蛍光を増幅して高感度に検出できる H_2S センサー分子の開発を行うべく、数種の蛍光団(クマリン、フルオレセイン、ロドール、Si- ローダミン、SO_2- ローダミン)に対してそれぞれ分子設計・合成を行った。その結果、青色蛍光を有するクマリンを基盤とした標的化合物を得ることに成功した。今後、選択性・特異性・検出感度などの一次評価を行い、結果をプローブデザインにフィードバックし、望ましい性質を有する誘導体を選抜する。次いで、*in vitro* 培養細胞系での H_2S 検出実験に適応し、プローブの妥当性を評価する。細胞透過性・毒性などに問題が認められた場合には、適宜物理化学的なパラメータを考慮した誘導体化を行うことによりプローブの性能向上を図る。

ケージド活性硫黄化合物に関しては、申請者らが以前に開発したケージド H_2S_2 化合物の構造単純化に平成 28 年度に成功してはいたが、その合成収率は非常に低いものであった。平成 29 年度においては合成を再検討して収率を改善し、光アンケージングの効率を高めることができるようにアンケージング波長の長波長化を可能とする分子設計を行ったケージド H_2S_2 化合物の合成も達成した。予備的な実験ではあるが、光照射を行ってアンケージング反応を検討したところ、ケージド化合物の分解ならびに活性硫黄種の放出が認められた。今後、さらに反応の詳細を検討するとともに、生細胞に対する光ダメージを可能な限り低減できるようにアンケージングの効率化ならびにアンケージング波長の最適化をおこなって、培養細胞を用いた実験系への適用を目指す。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題			
T. Hirayama, H. Tsuboi, M. Niwa, S. Kadota, A. Miki, K. Okuda, and H. Nagasawa	A universal fluorogenic switch for Fe(II)ion based on N-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Chem. Sci.		8	2017	4858–4866

著　者　名	論　文　標　題			
T. Hirayama, A. Mukaimine, K. Nishigaki, H. Tsuboi, S. Hirosawa, K. Okuda, M. Ebihara, and H. Nagasawa	Bismuth-rhodamine: a new red light-excitable photosensitizer			
雑　誌　名		巻	発行年	ページ
Dalton Trans.		46	2017	15991–15995

第　12　号
平成30年6月11日

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　　教授・長谷川　潤

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	妊娠による脳内神経回路の変化

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
	長谷川　潤	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究総括・脳の機能変化
	瀬木(西田)　恵里	東京理科大学	基礎工学部	准教授	神経細胞新生
	中川　公恵	神戸薬科大学	薬学部	准教授	脳の形態変化

共同研究の成果

本研究では、妊娠中の母体における神経系の変化とそれを司る分子機構を明らかにする目的で研究を行ってきた。

我々はこれまでの研究で、妊娠中の母親雌マウスの脳内で、特定の神経細胞が活性化されていることを示唆する予備実験の結果を得ていた。しかし、神経細胞が新しく生まれているのか、もしくは既存の神経細胞が長期にわたって活性化されているのかは不明なままであった。

この問題を解決するため、各妊娠ステージの雌マウス海馬における神経新生を Ki67 の免疫抗体染色により検討した。その結果、妊娠中期および後期の特定の時期に Ki67 陽性の細胞が増えていることを確認した。これらの Ki67 陽性細胞が神経細胞に分化しているかを検討するため、未熟神経細胞のマーカーである doublecortin(DCX)の発現を検討した。DCX 陽性細胞は、海馬歯状回の脳室帯上部に観察されるが、それらの数は未妊娠マウスに比べて妊娠中マウスにおいては減少していた。このことから、妊娠中では神経新生はむしろ減少しており、Ki67 陽性細胞はグリア細胞に分化していることが示唆された。この可能性を確定させるため、BrdU を用いたトレーシングの実験を行ったが、実験条件の確立まで至っていない。現在も実験条件の検討中である。

近年の研究により、神経系の再編成にはミクログリアが重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、妊娠中の脳内における M1 type、M2 type のミクログリアの存在を定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、両タイプのミクログリアの存在比には大きな変化はないと思われたが、ミクログリアに発現するいくつかの遺伝子には変化が見られたことから、ミクログリアの活性が妊娠により変化している可能性が考えられた。いくつかの炎症性サイトカインの発現も併せて検討したが、これらの発現に変化は認められなかった。

〈研究論文〉

著　者　名	論　文　標　題		
Kamao M, Hirota Y, Suhara Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Okano T, Hasegawa H.	Determination of Menadione by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Using Pseudo Multiple Reaction Monitoring.		
雑　誌　名	巻	発行年	ページ
Analytical Sciences	33	2017	863-867

著　者　名	論　文　標　題		
Hirono J, Sanaki H, Kitada K, Sada H, Suzuki A, Lie LK, Segi-Nishida E, Nakagawa K, Hasegawa H.	Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and matrix metalloproteinases in the ischemic brain of photothrombosis model mice.		
雑　誌　名	巻	発行年	ページ
Neuroreport	29	2018	174-180

〈図　書〉

著　者　名	著　書　名		
高橋　典子、山崎　正博、坂　　晋、谷　佳津治、長谷川　潤、岡本　正志、髙橋　隆幸、里見　佳子、鈴木　健二、今井　正彦、原田　　均、坂崎　文俊、中川　公恵、高橋　勝彦、長谷川晋也、渡辺　　聡、河野　貴子、山口　孝子	My 衛生薬学		
出　版　社		発行年	ページ
株式会社　テコム		2017	

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
中川　公恵、泰井麻由奈、横田　衣利、原　　香織、三宅　智子、澤田　夏美、須原　義智、岡野登志夫、長谷川　潤	日本ビタミン学会第 69 回大会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
脳神経特異的ビタミン K2 合成酵素 UBIAD1 欠損マウスの脳機能解析		2017年6月17日	横浜

発　表　者	学　会　名		
立石奈恵美、鈴木　篤史、廣野　順介、正木　美有、Laurensius Kevin Lie、中川　公恵、長谷川　潤	第 44 回日本毒性学会学術年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
フタル酸エステルを投与した妊娠マウスにおける骨形成因子の発現		2017年7月10日	横浜

発　表　者	学　会　名		
佐名木遥佳、Laurensius Kevin Lie、廣野　順介、中川　公恵、長谷川　潤	フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
加齢に伴う胸腺の組織学的・分子生物学的変化		2017年 9月1日～2日	仙台

発　表　者	学　会　名		
藤原　聖美、西村　亮宏、中川　公恵、須原　義智、長谷川　潤	第 67 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
Tamoxifen 誘導型全身性ビタミン K 変換酵素（UBIAD1）遺伝子欠損マウスの表現型解析		2017年 10月14日	神戸

発　表　者	学　会　名		
Laurensius Kevin Lie、中川　公恵、須原　義智、長谷川　潤	第 67 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
ビタミン K による脂肪細胞分化の制御		2017年 10月14日	神戸

発　表　者	学　会　名		
廣野　順介、佐名木遥佳、北田　夏菜、佐田　晴佳、鈴木　篤史、瀬木−西田恵里、中川　公恵、長谷川　潤	2017 年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
光血栓性脳梗塞モデルにおける Timp/MMP ファミリーの発現解析		2017年 12月6日	神戸

発　表　者	学　会　名		
長谷川　潤	2017 年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
組織の老化に伴う血管新生とその制御		2017年 12月8日	神戸

第　13　号

平成30年7月18日

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・坂根　稔康

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	鼻腔内投与後の薬物の脳内移行：microdialysis 法を用いた評価

	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
構成員	坂　根　稔　康	神　戸　薬　科　大　学	薬　　学　　部	教　授	データ解析
	寺　岡　麗　子	神　戸　薬　科　大　学	薬　　学　　部	准教授	LC/MS による薬物の定量
	湯　谷　玲　子	神　戸　薬　科　大　学	薬　　学　　部	助　教	LC/MS による薬物の定量
	古　林　呂　之	就　　実　　大　　学	薬　　学　　部	准教授	MD プローブの埋設
	井　上　大　輔	就　　実　　大　　学	薬　　学　　部	助　教	MD 実験

共同研究の成果

鼻腔内投与された薬物の一部は、直接脳内に移行することから、鼻腔内投与は中枢系疾患治療薬の効率的な脳内送達を可能にする手法として注目されている。一方、脳細胞外液と脳脊髄液との循環システム（glymphatic system：GPS）の存在が、近年明らかとなった。GPS はアルツハイマー型認知症など中枢系疾患との関連が注目を集めており、睡眠時や麻酔時などの脳の神経活動が低下したときに活性化されることが知られている。鼻腔内投与された薬物は脳近傍の脳脊髄液に移行すると考えられており、脳表面の脳脊髄液中の薬物が GPS による体液循環に乗って、脳内深部にまで容易に到達する可能性を示している。そこで、本研究では、鼻腔内投与による薬物の脳内送達に対する GPS の影響を検討した。脳細胞外液中濃度の経時変化を測定することが可能な実験方法として、microdialysis 法を、また、モデル薬物として、生体膜透過性が良好な caffeine および血中タンパク結合率が高いために、血液から脳への移行性が乏しい sulpiride を用いた。

caffeine をラットに急速静脈内投与した結果、麻酔下、血液を介した caffeine の脳移行が低下する事が明らかとなった。一方、caffeine をラット鼻腔内に投与した結果、鼻腔から脳への直接移行率は増大することが明らかとなった。麻酔によって caffeine の直接的な脳移行が促進されることが示された。さらに、microdialysis 法で得られた脳細胞外液中の濃度推移は脳脊髄液および脳実質における caffeine の濃度推移と一致することが明らかとなった。これらの結果より、鼻腔から脳脊髄液に直接移行した caffeine は麻酔による GPS の活性化により、脳実質内部にまで、送達されることが示唆された。

sulpiride に関して同様の検討を行ったところ、caffeine と同様、麻酔群では血液を介した脳移行が低下する一方で、鼻腔から脳への直接移行量は増大した。鼻腔内投与後の脳への直接移行率も麻酔時に増大し、脳脊髄液、脳細胞外液、脳実質ともに同様の現象が観察された。caffeine と比較すると、sulpiride は血液を介した脳移行の寄与が小さいため、脳脊髄液、脳細胞外液、脳実質における濃度および直接移行率の増大の程度が大きく、GPS の影響がより明確に観察されることが明らかとなった。

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
Daisuke Inoue, Akiko Tanaka, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto, Reiko Yutani, Reiko Teraoka, Toshiyasu Sakane, Tomoyuki Furubayashi	第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Direct Nose to Brain Delivery of CNS Drugs: The Effect of Glymphatic System on Drug Distribution in Brain Parenchyma		2017/10/21	京都

発　表　者	学　会　名		
Daisuke Inoue, Akiko Tanaka, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto, Reiko Yutani, Reiko Teraoka, Toshiyasu Sakane, Tomoyuki Furubayashi	2017 AAPS Annual Meeting and Exposition		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Direct Nose to Brain Delivery of CNS Drugs: The effect of Glymphatic System on Pharmacokinetics and Brain Distribution of Sulpiride after Nasal Application		2017/11/14	San Diego, USA

発　表　者	学　会　名		
Daisuke Inoue, Akiko Tanaka, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto, Reiko Yutani, Reiko Teraoka, Toshiyasu Sakane, Tomoyuki Furubayashi	日本薬物動態学会第 32 回年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
Direct delivery of CNS drugs to the brain by nasal application III: Pharmacokinetic analysis of the effect of glymphatic system on drug delivery to brain parenchyma		2017/11/30	東京

第　14　号
平成30年7月1日

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 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	マウス血中ホルモンの測定遺
	中山　喜明	神戸薬科大学	薬学部	講師	伝子改変マウス神経機能解析
	黒坂　光	京都産業大学	総合生命科学部	教授	タンパク質活性の測定

共同研究の成果

生体においては、糖鎖は細胞同士のコミュニケーションツールである細胞外分泌因子や細胞膜上の接着分子・各種受容体の機能に重要な役割を果たす。従って、これらの役割やその分子メカニズムを明らかにすることは、生体のしくみの理解、またその破綻による病態の理解、さらには病態の治療法開発にも重要であると考えられる。Wbscr17 は、我々と共同研究先の京都産業大学黒坂研究室によって 2005 年に同定された新規糖転移酵素様遺伝子である。Wbscr17 は、これまで発現部位の同定や、腫瘍細胞における機能解析は行われてきたが、生理的な役割の解明は行われてこなかった。そこで本共同研究では、遺伝子改変動物を用い、Wbscr17 の生理的な役割を明らかにし、さらには Wbscr17 遺伝子と同一の遺伝子ファミリーに属する Galnt-Y サブファミリーの機能を明らかにすることを目的にする。本共同研究では、Wbscr17 の生理的役割を解明するために遺伝子改変動物の解析を行った。Wbscr17 遺伝子欠損マウスを作製したところ、この変異体マウスは、雄雌問わず軽度の成長不全を示し、さらに雌マウスでは分娩異常により繁殖能力を殆ど有していなかった。次に、これらの表現型に関するホルモンや血中パラメーターの測定を行い、Wbscr17 遺伝子欠損マウスでは下垂体前葉ホルモンである成長ホルモンの分泌低下とプロラクチンの分泌亢進が起きていることを現在までに見出している。さらには下垂体ホルモンの分泌を調節する中枢であることが知られている視床下部における機能解析を進めたところ、視床下部領域におけるカテコラミンの分泌量が遺伝子欠損マウスで増加していることが明らかになった。一方で、Wbscr17 の相同遺伝子である Galnt18 についてゲノム編集により遺伝子欠損ゼブラフィッシュを作成したところ、ゼブラフィッシュ Galnt18a 及び Galnt18b のそれぞれ単独の遺伝子欠損ゼブラフィッシュは正常に育成するのに対し、Galnt18a/b の両遺伝子欠損ゼブラフィッシュでは成魚まで育成できないことが明らかとなった。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 galnt 遺伝子は、ヒトでは 20 種のアイソザイムからなる大きな遺伝子ファミリーを形成するが、それぞれの生物学的な機能はよく分かっていない。　我々は、これまでに脊椎動物特異的な GalNAc-T である Y サブファミリー遺伝子群(galnt8, 9, 17, 18a, 18b)をゼブラフィッシュより単離し、galnt9 と galnt18a について TALEN を用いたゲノム編集により機能欠失体を作製したが、顕著な表現型の変化は観察されな

かった。既存のマウス Galnt 機能欠失体でも表現型に影響が見られないことから、galnt 機能欠失体で表現型の変化を見るためには、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。　Y サブファミリーのうち、galnt18 はゼブラフィッシュでは 2 種類のパラログ（galnt18a/b）が存在し、それらは初期胚において一部重複した発現分布を示し、互いに機能補完する可能性がある。そこで我々は、galnt18a/b 間で相同性の高い配列を標的として、CRISPR/Cas9 法を用いて単一の gRNA により、2 種類のパラログ遺伝子に同時に変異を導入することを試みた。その結果、それぞれのパラログに、ヘテロ変異を持つ F1 個体を得た。さらにこのヘテロ個体同士の掛け合わせにより、galnt18a/b のそれぞれ単独の変異体、及び galnt18a/b 二重変異体の作製に成功した。gant18a および galnt18b 変異体が成魚まで生育するのに対し、galnt18a/b 二重変異体は稚魚の段階で死滅した。この事より、galnt18a/b の両方の発現が成魚への生育に必須であることが分かった。また、この結果は、大きな遺伝子ファミリーを形成する GalNAc-T の機能解明には、複数アイソザイムの同時ノックアウトが必要であることを示すものである。現在は、この二重変異体のプロテオミクス解析より、これらアイソザイムの内在性基質の同定も試みている。タンパク質の翻訳後修飾の一つであるムチン型糖鎖の生合成開始反応は、ポリペプチド N- アセチルガラクトサミン転移酵素（GalNAc-T）によって触媒される。GalNAc-T はヒトでは 20 種のアイソザイムからなる大きな galnt 遺伝子ファミリーを形成するが、それぞれの生理学的な機能は十分に解明されていない。我々は、脊椎生物特異的に存在する Y- サブファミリーのアイソザイムに着目して機能を解析している。　我々は、ゼブラフィッシュより Y- サブファミリー遺伝子（galnt8, 9, 17, 18a, 18b）を単離し、これまでに以下の知見を得ている。1）それぞれのアイソザイムは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。 2）galnt9 と galnt17 は、哺乳類とゼブラフィッシュにおいて脳で強く発現する . 3）TALEN を用いたゲノム編集により、ゼブラフィッシュ galnt9 と galnt18a のそれぞれの機能欠失体を作製したが、顕著な表現型の変化が観察されない。この結果は、Galnt 遺伝子欠失マウスの結果と類似しており、同じ組織で発現する他のアイソザイムが欠失遺伝子の機能を補完している可能性が考えられた。よって、同一組織で発現する複数のアイソザイムの機能欠失が望ましい。　近年、ゼブラフィッシュに適合させたコドンからなる Cas9 mRNA を用いた CRISPR/Cas9 法により、F0 個体にて両遺伝子座への効率的なゲノム編集が起こり、F0 世代において機能欠失体様の表現型の変化が観察されることが報告された。我々はまず、本手法を用いて、galnt17 ゲノムを標的として、標的ゲノムの約 80％が編集を受けた F0 個体の作製に成功した。本研究では、galnt9 機能欠失体に対して、galnt9 と相同性が高く、脳特異的な galnt17 のゲノム編集を行い、F0 世代、さらに二重変異体を作製し、それらの表現型を解析することで、脳におけるムチン型糖鎖の機能を解明する予定である。

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
中村　直介、塚田かすみ、辻本　優季、中山　喜明、小西　守周、黒坂　　光	2017 年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
ゲノム編集技術を用いたムチン型糖鎖合成酵素をコードするパラログ遺伝子の二重変異体作製		2017年 12月6日～ 9日	神戸ポートアイランド

発　表　者	学　会　名		
中村　直介、辻本　優季、高橋　由衣、川合多美子、中山　喜明、小西　守周、黒坂　　光	2017 年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
脳特異的ポリペプチド N- アセチルガラクトサミン転移酵素を欠失したゼブラフィッシュ変異体の作製		2017年 12月6日～ 9日	神戸ポートアイランド

第　15　号
平成30年7月1日

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・小山　豊

平成 29 年 7 月 3 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 30 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	抗アレルギー作用を有する化合物の探索

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
	小　山　豊	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究総括
	金　容　必	いわき明星大学	薬学部	教授	被験化合物の単離
	八巻　耕也	神戸薬科大学	薬学部	准教授	動物・細胞実験

共同研究の成果

抗アレルギー作用を有し、抗アレルギー薬のシーズとなり得る新規化合物同定を目指し、いわき明星大学と共同研究を行った。

いわき明星大学では、微生物の培養上清から新規化合物を含む 12 種の低分子有機化合物の単離に成功し、それを神戸薬科大学薬理学研究室に譲渡した。

神戸薬科大学では、譲渡された薬物の抗アレルギー活性について解析する目的で、まず肥満細胞のモデル細胞である好塩基球性白血病細胞株 RBL2H3 を、抗卵白アルブミンモノクローナル IgE で感作し、抗原である卵白アルブミンで刺激することにより誘導される脱顆粒反応に対する単離化合物の作用について、細胞毒性作用と並行して解析した。その結果、いくつかの化合物については高濃度において毒性を示すことなく脱顆粒反応を抑制した。このことから、その化合物そのものが抗アレルギー薬として応用できる可能性は低いが、抗アレルギー薬創成のシーズ化合物となる得ることを明らかにした。また、抗アレルギー作用を有する既知有機化合物の探索も同時に行い、臨床応用されている数種類のチロシンキナーゼ阻害薬が、RBL2H3 の脱顆粒反応やサイトカイン（interleukin-4 および tumor necrosis factor-α）産生を毒性を示さない濃度で抑制することを明らかにした。そのうちの saracatinib については、本研究室で確立した迅速、簡便な新規アレルギーマウスモデルである IgE 依存的および IgG 依存的 ASDIS モデルにおいて、高濃度ではあるものの局所投与によって抗アレルギー作用を示すことを明らかにした。今後の抗アレルギー化合物探索に向けて、ASDIS モデルの誘導機序についても細胞枯渇抗体や受容体をブロックする抗体、および薬物を用いた解析を行い、IgE 依存的 ASDIS と IgG 依存的 ASDIS それぞれにおいて、その症状発現に重要な分子や細胞についての予備的な知見を得た。

〈学会発表〉

発　表　者	学　会　名		
神戸薬大 八巻　耕也、井上　聖太、 寺師　匡人、泉　安彦、 小山　豊 いわき明星大薬 江藤　忠洋、金　容必	日本薬学会　第 138 年会		
タ　イ　ト　ル		開催日	開催場所
皮膚への免疫複合体の斑点状の分布を指標とした IgG 依存的アレルギーモデル(G-ASDIS)の確立とそれを利用した抗アレルギー物質の探索		2018. 3. 26	金沢