

共同研究 研究紀要

2019

神戸薬科大学

共同研究 研究紀要

2019

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。

2018(平成 30)年度共同研究 (研究期間 2018.4.1 ~ 2019.3.31)

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	浸透性向上のための美白成分のリン酸化の検討	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	消化管化学物質受容機構を介した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	植物におけるフェニルプロパノイド生産機構の解明	医薬細胞生物学研究室 教授 土反 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	小胞体ストレス応答を標的とする創薬化学研究	薬化学研究室 教授 奥田 健介
12	妊娠による神経可塑性の分子基盤	衛生化学研究室 教授 長谷川 潤
13	薬物動態解析に基づく新規薬物送達キャリアの開発	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とアレルギー誘導機序の解析	薬理学研究室 教授 小山 豊
16	機器を用いた生理活性物質の分析・解析と臨床への応用	中央分析室 准教授 竹内 敦子
17	革新的 DDS 技術による難治性がんの克服を目指した基礎的検討	薬剤学研究室 教授 大河原賢一

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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 萩 森 政 頼	神 戸 薬 科 大 学 長 崎 大 学 大 学 院	薬 学 部 薬 学 研 究 科	教 授 准教授	研究総括 プローブの合成
共同研究の成果					
<p>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-Alder 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。本年度は、昨年度に評価したジェミニ型 C18-rTz-C18 の単分子膜物性についての結果を論文報告した。また、両親媒性テトラジン誘導体をリボソーム膜へ導入し、テトラジン骨格に対して低分子 2-ノルボルネンを化学的に反応させた結果、内包薬物 (In-111-DTPA およびインドシアニングリーン) が迅速に放出された。薬物放出は、リボソームに導入されたテトラジン誘導体の割合および添加する 2-ノルボルネン濃度に応じて増加した。さらに、これらの薬物の放出促進は、リボソーム膜上での化学反応による膜流動性の一時的な上昇が一因になることを明らかとした。以上の結果より、テトラジン修飾リボソームが、2-ノルボルネンとの化学反応に基づき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。</p> <p>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 を基盤とした放射性ヨウ素標識化合物の開発を実施した。昨年度合成した放射性ヨウ素標識チオフラビン T 誘導体について、全身性アミロイドーシスモデルマウスを用いた体内放射能分布を評価した結果、健常マウスと比較して、肝臓、脾臓、腎臓に高い放射能集積を認めた。次に、脾臓組織内における放射能分布 とアミロイドの局在を比較検討したところ、両者の局在は良く一致したことから、放射性ヨウ素標識チオフラビン T 誘導体が、全身性アミロイドーシス診断薬として有効である可能性を示した。</p> <p>がんを高発現する葉酸受容体を標的とする核医学/蛍光デュアルイメージングプローブの開発を目的に、放射性ガリウム (Ga)-DOTA 錯体を基本骨格とするプローブの設計および合成を行った。Ga-DOTA 錯体が6座配位であることに着目し、DOTA の一つのカルボキシ基に蛍光団である FITC 誘導体を導入し、さらに、DOTA 骨格の向かい合うもう一つのカルボキシ基に生体分子認識部位 (葉酸誘導体) を導入した。まず、FITC とヘキサメチレンジアミン誘導体を反応させたのち、DOTA di(tBu)ester に導入した。葉酸受容体認識部位には、結合親和性の保持を目的として、葉酸の γ 位のカルボキシ基へ選択的に DOTA を導入することを目指し、葉酸の2位と10位のアミノ基および α 位のカルボキシ基を保護した葉酸誘導体を合成した。最後に、葉酸受容体認識部位を DOTA-FITC 骨格に導入した後、脱保護反応を行い、標識前駆体を得た。</p> <p>細胞内情報伝達に関わる遊離亜鉛イオンの動態および機能解明を可能にする蛍光プローブの開発が期待されている。我々は、これまでにピリジン-ピリドン型およびピラジン-ピリドン型蛍光プローブを合成し、その機能評価を行ってきた。本年度は、これまでに開発した亜鉛蛍光プローブについて総説としてまとめ、報告した。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Hikomichi Nakahara, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai, Osamu Shibata	Monolayers of a tetrazine-containing gemini amphiphile: Interplays with biomembrane lipids			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i>	164	2018	1-10	

〈総説〉

著者名	論文標題			
萩森 政頼、川上 茂、 向 高弘	生体内遊離亜鉛イオンを可視化する蛍光プローブの開発			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
ファルマシア	54	2018	688-692	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Hikomichi Nakahara, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai, Osamu Shibata	European Colloid and Interfaces Society (ECIS2018)		
タイトル	開催日	開催場所	
Monolayers of a tetrazine-containing gemini amphiphile: Interaction with biomembrane lipids	2018/9/3	Ljubljana, Slovenia	

発表者	学会名		
甘中 健登、佐野 紘平、 萩森 政頼、山崎 俊栄、 宗兼 将之、向 高弘	第 34 回日本 DDS 学会学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
化学反応による薬物放出制御を可能とする新規リポソーム型 DDS 剤の開発	2018/6/21	長崎	

発表者	学会名		
萩森 政頼、山内 健夫、 平野 優里、土屋 美希、 山崎 俊栄、佐野 紘平、 田中 将史、向 高弘	第 58 回日本核医学会学術総会		
タイトル	開催日	開催場所	
全身性アミロイドーシスを標的とする放射性ヨウ素標識チオフラビン T 誘導体の開発	2018/11/15	沖縄	

発表者	学会名		
甘中 健登、佐野 紘平、 萩森 政頼、山崎 俊栄、 宗兼 将之、向 高弘	日本薬学会第 139 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
[4+2] 環化付加 Diels-Alder 反応を用いたリポソームの薬物放出制御法の開発	2019/3/21	千葉	

発 表 者	学 会 名	
原 史子、佐野 紘平、 三浦 拓、野沢 治加、 宗兼 将之、山崎 俊栄、 萩森 政頼、向 高弘	日本薬学会第 139 年会	
タ イ ト ル	開催日	開催場所
葉酸受容体を標的とした核医学／蛍光デュアルイメージングプローブの 開発	2019/3/23	千葉

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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		浸透性向上のための美白成分のリン酸化の検討			
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					
<p>美白成分として <i>a</i>-Arbutin および Rhododenol についてリン酸化反応を行った。まず初めに、<i>a</i>-Arbutin (<i>a</i>-Arb) の三リン酸塩誘導体の生成条件について検討した。シクロ三リン酸塩 (P_{3m}) と <i>a</i>-Arb との反応溶液の経時変化を HPLC により測定した。a-Arb : P_{3m} = 0.1 mol/L : 0.5 mol/L, pH 11, 25°C で反応を行った反応溶液では、保持時間 11 分の <i>a</i>-Arb によるピーク以外に保持時間 9 分に生成物によるピークが認められた。反応時間の経過とともに、<i>a</i>-Arb のピークは減少し、生成物のピークが大きくなり、30 日後に収率 86% を示した。</p> <p>^{31}P-および ^{31}P-1H HMBC NMR 解析により、保持時間 9 分のピークはヒドロキシベンゼンのヒドロキシ基に三リン酸が結合した生成物 (triphosphoryl-<i>a</i>-Arb) であることがわかった。<i>a</i>-Arb には、<i>a</i>-D-グルコピラノシド部分に 4 つのヒドロキシ基およびヒドロキシベンゼンに 1 つヒドロキシ基があるが、P_{3m} によるリン酸化反応は、ベンゼンに結合しているヒドロキシ基で選択的に起こることがわかった。</p> <p>先行研究で、P_{3m} と β-Arb との反応について検討しており、その最適反応条件は、β-Arb : P_{3m} = 0.1 mol/L : 0.5 mol/L, pH 11, 40°C で、生成物の構造は、β-Arb のヒドロキシベンゼンのヒドロキシ基に三リン酸が結合した構造であった。従って、<i>a</i>-Arb と P_{3m} との反応性は、β-Arb とほぼ同様の反応性を示すことがわかった。</p> <p>次に、Rhododenol (Rd) と P_{3m} との反応を検討したが、生成物の収率が 20% 程度と低かった。そこで、ジホスホン酸塩 (DP) との反応を検討した。最適反応条件は、Rd : DP = 0.1 mol/L : 0.5 mol/L, pH 10, 40 °C であることがわかった。この条件での最高収率は、反応 15 日後で 73% であった。各種 NMR 測定の結果より、生成物の構造は、ロドデノールのヒドロキシベンゼンの OH 基にホスホン酸が結合した構造であることがわかった。ロドデノールには、OH 基が 2 カ所あるが、DP によるリン酸化では、ヒドロキシベンゼン環の OH 基が選択的にリン酸化されることがわかった。以上の結果より、無機リン酸化剤によるリン酸化反応では、ヒドロキシベンゼン環の OH 基にリン酸基が導入されやすいことがわかった。</p> <p><i>a</i>-Arb と P_{3m} との生成物の単離は、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで行い、純度 94% で目的の生成物を得た。一方、ロドデノールと DP との生成物の単離は逆相カラムクロマトグラフィーおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで行ったが純度の高いものを得られなかった。</p> <p>単離した <i>a</i>-Arb の三リン酸塩誘導体のチロシナーゼ阻害活性を評価した。</p> <p>その結果、<i>a</i>-Arb の三リン酸塩誘導体は、<i>a</i>-Arb とほぼ同等のチロシナーゼ阻害活性を有することがわかったため、本研究で合成した <i>a</i>-Arb の三リン酸塩誘導体は、肌への浸透性が高い美白成分としての応用が期待される。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
前田 秀子、室川 綾華、 守田 香織、成相 裕之、 中山 尋量	第27回無機リン化学討論会		
タイトル	開催日	開催場所	
浸透性向上のための美白成分のリン酸化の検討	8/31	春日井	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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					
<p>ピラゾール環は、抗炎症作用、抗菌作用や抗がん作用など様々な生物活性化合物に含まれる重要な骨格のひとつである。そのため、ピラゾール類の効率的な新規合成法の開発は有機合成化学上重要な研究課題のひとつである。そこで我々は、ピラゾール類の新規合成法の開発研究を行い、これまでに報告例のないピラゾール誘導体の合成を検討した。本研究を遂行するにあたって、着目した官能基はヒドラゾンである。ヒドラゾンは連続する窒素原子をもつため、そのイミノ炭素は強い求核性を有していることが知られおり、ハロゲン化やアシル化などの様々な反応が報告されている。しかし、炭素-炭素二重結合に共役したヒドラゾン類の反応性に関してはほとんど報告例がなく、その反応性の開拓に興味もたれた。</p> <p>そこで共役ヒドラゾンの求核性を利用したピラゾール骨格の新規合成法の開発を検討した。すなわち、酸性条件下で共役ヒドラゾンのβ位がプロトン化されることによって生成するアザジエンを求電子剤として利用し、もう一分子のヒドラゾンを求核剤として反応することで、ピラゾール環が構築できると考えた。</p> <p>初めに、β位にエステルをもち、窒素原子上にパラメトキシフェニル基をもつ共役ヒドラゾンを基質として、同一分子の擬二量化によるピラゾール合成の最適条件を見出すべく検討した。アセトニトリル還流中、3当量のトリフルオロ酢酸で処理すると、期待通り反応が進行しピラゾールが23%の収率で得られた。次に、収率の向上を目指し、様々なBronsted酸を用いて検討したところ、メタンスルホン酸を用いた場合に62%まで収率が向上することが明らかとなった。</p> <p>さらに、反応条件を温和にするために3当量のメタンスルホン酸および様々な溶媒を用いて室温における溶媒効果について検討した。その結果、ジクロロメタンを用いた場合に74%まで収率が向上した。さらに、メタンスルホン酸の必要量を検討したところ、1当量とした場合に最も収率良くピラゾールが得られることが明らかとなった。最適条件を見出すことができたので、次に、ベンゼン環上に様々な置換基を有する<i>N</i>-アリールヒドラゾンをを用いて本反応の置換基効果について検討した。パラ位に電子供与基やハロゲンを有する場合には効率よく反応が進行したのに対し、パラ位に電子求引基やオルト位に置換基を有する場合には収率が低下したが、いずれの場合も新規ピラゾール誘導体が得られた。</p> <p>また、本反応は、ワンポット化にも適応可能であることが分かった。すなわち、共役アルデヒドを基質として、2,4,6-collidine存在下、パラメトキシフェニルヒドラジンをを用いてヒドラゾンを調製し、続いてメタンスルホン酸を加えることでピラゾールが高収率で得られ、使用する溶媒の削減にも成功した。</p> <p>最後に、2種類の異なるヒドラゾンをを用いたピラゾール合成を検討した。その結果、共役ヒドラゾンと多様な置換基を有するヒドラゾンとの反応によって様々な置換様式のピラゾール誘導体を合成することに成功した。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Yuika Nishida, Norihiko Takeda, Kenji Matsuno, Okiko Miyata, Masafumi Ueda	Acylative Coupling of Amine and Indole Using Chloroform as a Carbonyl Group			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Eur. J. Org. Chem.</i>		2018	3928-3935	

著者名	論文標題			
Norihiko Takeda, Mizuki Furuishi, Yuri Nishijima, Erika Futaki, Masafumi Ueda Tetsuro Shinada, Okiko Miyata	Chiral isoxazolidine-mediated stereoselective umpolung α -phenylation of methyl ketones			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Org. Biomol. Chem.</i>	16	2018	8940-8943	

〈総説〉

著者名	論文標題			
上田 昌史、武田 紀彦、宮田 興子	アルコキシ基をもつイミンおよびアミドの特性を利用したヘテロ環合成			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
有機合成化学協会誌	76	2018	584-595	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
小西 恵地、森 祐介、武田 紀彦、上田 昌史	第 38 回有機合成若手セミナー		
タイトル	開催日	開催場所	
<i>N</i> -アルコキシイミンを有するシクロプロペンの環化異性化反応による多置換ピロール類の合成	2018.8.7	西宮	

発表者	学会名		
武田 紀彦、岡村 光平、折原 琴美、松本 由貴、上田 昌史	第 48 回複素環化学討論会		
タイトル	開催日	開催場所	
ラクタム類の求核付加-環縮小反応によるピロリジン合成	2018.9.4	長崎	

発表者	学会名		
松崎 大力、伊藤 勇太、野久保名菜恵、八幡 菜由、武田 紀彦、上田 昌史	第 68 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	
共役ヒドラゾンの反応性を駆使したピラゾール合成法の開発	2018.10.13	姫路	

発 表 者	学 会 名		
武田 紀彦、折原 琴美、 松本 由貴、岡村 光平、 上田 昌史	第 44 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
N-イミノラクタムの求核付加-環縮小反応の開発		2018.11.5	熊本

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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		消化管化学物質受容機構を介した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	研究総括、化学的実験
	桑原 厚和	立命館大学	総合科学技術研究機構	客員教授	立命館大学での研究管理及び研究主体
	丸中 良典	立命館大学	総合科学技術研究機構	客員教授	生理的研究
	中張 隆司	立命館大学	総合科学技術研究機構	客員教授	生理的研究
	浅野 真司	立命館大学	薬学部	教授	生理的研究
多河 典子	神戸薬科大学	薬学部	講師	免疫化学的実験	
共同研究の成果					
<p>本研究の基盤となる高感度かつ特異的な xenin の ELISA 法の開発を行った。高純度の免疫抗原、標準抗原及び標識抗原を化学合成し、免疫抗原を keyhole limpet hemocyanin と縮合させ、複合体を調製した。この複合体を Freund' s complete adjuvant と共に乳化させ、2週間毎に家兎3羽の皮内に注射免疫し、高力価の抗血清を作製した。得られた抗血清は IgG 分画に精製後、さらにアフィニティ精製により高純度化した。本 xenin 抗体、合成標準抗原及び合成標識抗原を用い、種々測定至適条件を検討し ELISA の確立を行った。本 ELISA 法の測定範囲は、約 9.17 pg/mL ~ 6.76 ng/mL であり、添加回収試験、検体希釈試験及び再現性は良好であった。また、構造類似の neurotensin との交差反応性は 0.1% 未満であった。合成 xenin フラグメントを用いて本抗体の抗原認識部位を検討したところ、xenin (14-18) 配列中に存在することが明らかになった。本 ELISA 法を用いてマウス腸組織での xenin 発現を検討したところ、上部小腸で発現が多いことが認められた。本 ELISA 法は高感度であり、定量性及び特異性が良好であり、小腸組織など生体試料中の xenin を定量できるものであった。以上の結果は、日本薬学会第 139 年会 (千葉 2019.3.23) で発表した。今後、腸管での xenin の分泌促進機構を明らかにするための研究の一環として、糖、脂肪酸、アミノ酸など栄養素認識による分泌機序について検討する予定である。</p>					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
多河 典子、中張 隆司、 浅野 真司、桑原 厚和、 丸中 良典、加藤 郁夫	日本薬学会第 139 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
消化管ホルモン xenin の ELISA 法の開発		2019.3.23	千葉

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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 30 年 6 月 29 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 31 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	講 師	apoA-I 抗体の評価
	森田 いずみ	神戸薬科大学	薬 学 部	助 教	抗 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	
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 末端フラグメントが重合し、線維状のアミロイドタンパク質 (ApoA-I-fib) が形成される。この繊維が組織へ沈着し、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、先に ApoA-I-fib に特異的な IgM 型モノクローナル抗体 4 種 (#7-5、#A4-18、#B37-9、#B40-5) を調製し、そのうち抗体 #7-5、#A4-18、#B40-5 の可変部遺伝子のクローニングを行った。今年度は、これら抗体のうち、#7-5 に対応する一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) を遺伝子操作により構築し、さらにグリーン蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) との融合体を創製して、その有用性に検討を加えた。</p> <p>抗体 #7-5 の V_H および V_L 遺伝子を RT-PCR によりそれぞれ増幅し、overlap extension PCR により連結して scFv 遺伝子を作製した。本遺伝子を大腸菌に導入し、得られた形質転換菌を培養して scFv タンパク質を調製した。さらに、scFv 遺伝子と市販のオワンクラゲ由来 GFP (acGFP) の遺伝子を連結して scFv-GFP 融合遺伝子を構築し、同様に発現させて、scFv-GFP 融合タンパク質を得た。これらを ApoA-I-fib を固定化したプレートに反応させ、C 末端に付加した FLAG タグを比色検出する ELISA を行ったところ、どちらも強いシグナルを示し、scFv 単独、GFP 融合型ともに ApoA-I-fib に対して十分な結合能を持つことが判明した。また、scFv-GFP の溶液は、励起波長 485 nm において 528 nm の強い蛍光を発することが確認された。さらに、そのアフィニティー精製産物を ApoA-I-fib 固定化プレートに反応させたのち共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、ApoA-I-fib の局在部位を反映するものと期待される蛍光像が得られた。この結果から、今回作製した scFv-GFP 融合タンパク質は、共焦点レーザー顕微鏡による組織切片上の ApoA-I の繊維化部位の検索に応用が可能と期待された。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Y. Kiguchi, H. Oyama, I. Morita, E. Katayama, M. Fujita, M. Narasaki, A. Yokoyama, N. Kobayashi	Antibodies and Engineered Antibody Fragments against M13 Filamentous Phage to Facilitate Phage-Display-Based Molecular Breeding.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	41(7)	2018	1062-1070	

著者名	論文標題			
I. Morita, H. Oyama, Y. Kanda, M. Yasuo, A. Ito, M. Toyota, Y. Hayashi, T. Yokoyama, N. Kobayashi	Enantioselective Monoclonal Antibodies for Detecting Ketamine to Crack Down on Illicit Use.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	41(1)	2018	123-131	

〈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	第8回4大学連携研究フォーラム		
タイトル	開催日	開催場所	
アミロイド構造を識別可能な新規モノクローナル抗体の開発	2018.11.20	京都	

発表者	学会名		
扇田 隆司、服部 恵美、古谷 優樹、森田いずみ、大山 浩之、小林 典裕、斎藤 博幸	フィジカルファーマフォーラム (PPF2018)		
タイトル	開催日	開催場所	
新規モノクローナル抗体を用いた Apo-AI 高次構造変化の検出	2018.09.04	三浦	

発表者	学会名		
服部 恵美、中川 美穂、原田 航吉、古谷 優樹、扇田 隆司、森田いずみ、大山 浩之、小林 典裕、斎藤 博幸	第68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	
抗 ApoA-I 線維モノクローナル抗体の反応特異性の評価	2018.10.13	姫路	

発表者	学会名		
大山 浩之、肥越ひかる、 小林奈津子、田口 歩維、 比嘉ひかり、森田いずみ、 小林 典裕	日本法中毒学会第 37 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 scFv の部位特異的変異導入による試験管内親和性成熟の試み		2018.07.06~07	品川

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	日本法中毒学会第 37 年会		
タイトル		開催日	開催場所
幻覚性キノコ成分シロシンのオンサイト分析を目的とする新規モノクローナル抗体の作製		2018.07.06~07	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	日本分析化学会第 67 年会		
タイトル		開催日	開催場所
新世代の高性能イムノアッセイを目指す「抗体育種」		2018.09.12	仙台

発表者	学会名		
大山 浩之、木口 裕貴、 森田いずみ、小林 典裕	日本分析化学会第 67 年会		
タイトル		開催日	開催場所
新規な酵素融合型 scFv を活用する繊維状ファージのサンドイッチ ELISA		2018.09.12	仙台

発表者	学会名		
崎尾 奈美、森田いずみ、 柏原 圭佑、横田 朝香、 大山 浩之、吉田 武美、 上田 宏、小林 典裕	日本薬学会第 139 年会		
タイトル		開催日	開催場所
メタンフェタミン第Ⅱ相代謝物に対する特異モノクローナル抗体産生の試み		2019.03.23	千葉

発表者	学会名		
森川 真衣、中野明日香、 木口 裕貴、大山 浩之、 森田いずみ、小林 典裕	日本薬学会第 139 年会		
タイトル		開催日	開催場所
高親和力変異 scFv の創製におけるアレイ型選択法の有用性		2019.03.23	千葉

発 表 者	学 会 名		
中野明日香、森川 真衣、 木口 裕貴、大山 浩之、 森田いずみ、小林 典裕	日本薬学会第 139 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
低 off-rate 指向アレイ型選択法による高親和力変異抗体の効率的単離		2019.03.23	千葉

発 表 者	学 会 名		
池田 穂高、片木 謙吾、 宮脇 翔大、大山 浩之、 森田いずみ、小林 典裕	日本薬学会第 139 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
共焦点レーザー顕微鏡による scFv 提示ファージの可視化		2019.03.23	千葉

発 表 者	学 会 名		
木口 裕貴、大山 浩之、 森田いずみ、小林 典裕	日本薬学会第 139 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
抗体の試験管内親和性成熟を迅速化する酵素融合型抗ファージ scFv の作製		2019.03.23	千葉

発 表 者	学 会 名		
大山 浩之、市村 彰祥、 木口 裕貴、森田いずみ、 小林 典裕	日本薬学会第 139 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
抗チロキシン scFv -ルシフェラーゼ融合タンパク質の創製と生物発光 ELISA への応用		2019.03.23	千葉

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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					
<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鎖は、脳神経系の主要な細胞外マトリックス成分であり、多様な硫酸化パターンを持つ直鎖状の硫酸化糖鎖である。コンドロイチン硫酸鎖は、障害を受けた成体脳において軸索再生を阻害する分子として振る舞う一方、神経突起の伸長を促進する分子としての一面も併せもつ。これまでに我々は、海馬神経細胞において、高硫酸化コンドロイチン硫酸サブタイプの1つであるコンドロイチン硫酸-Eが、神経細胞特異的な細胞接着分子である Contactin-1 (CNTN-1) のリガンドとして機能することにより、軸索様の神経突起形成を促進することを明らかにしていた。一方で興味深いことに、コンドロイチン硫酸-Eとは異なる硫酸化パターンをもつ高硫酸化コンドロイチン硫酸-Dは、コンドロイチン硫酸-Eとは異なり、樹状突起様の神経突起形成を促進する作用を示す。これらのことから、コンドロイチン硫酸-E受容体である CNTN-1とは異なる細胞接着分子がコンドロイチン硫酸-D受容体として機能することが示唆されるが、その同定には至っていなかった。本研究では、コンドロイチン硫酸-D受容体の候補分子として細胞外マトリックス受容体の代表格であるインテグリン (ITG) ファミリーに着目し、コンドロイチン硫酸-Dによる神経突起形成メカニズムの解析を試みた。</p> <p>コンドロイチン硫酸-Dにより促進される海馬神経細胞の神経突起伸長は、ITGシグナルの主要な細胞内シグナル伝達経路である FAK-Src/Fynカスケードの活性化を介することが判明した。さらに、コンドロイチン硫酸-D依存的な神経突起伸長に関与する ITG分子を探索した結果、特定の ITG分子がコンドロイチン硫酸-Dと結合親和性を示すこと、その分子の機能阻害によってコンドロイチン硫酸-Dによる神経突起形成が有意に抑制されることを見出した。これらのことから、特定の ITG分子がコンドロイチン硫酸-D受容体として機能することにより、コンドロイチン硫酸-Dによる樹状突起様の神経突起形成が制御されている可能性が示唆された。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Sakamoto, K., Ozaki, T., Ko, Y.-C., Tsai, C.-F., Gong, Y., Morozumi, M., Ishikawa, Y., Uchimura, K., <u>Nadanaka, S.</u> , <u>Kitagawa, H.</u> , Zuluta, M. M. L., Bandaru, A., <u>Tamura, J.</u> , Hung, S.-C., and Kadomatsu, K.	Glycan sulfation patterns define autophagy flux at axon tip via PTPR σ -cortactin axis			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Nature Chem. Biol.	15	2019	699-709	

著者名	論文標題			
Shida, M., Mikami, T., <u>Tamura, J.</u> , and <u>Kitagawa, H.</u>	Chondroitin sulfate-D promotes neurite outgrowth by acting as an extracellular ligand for neuronal integrin $\alpha V \beta 3$			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biochim. Biophys. Acta	1863	2019	1319-1331	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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
	谷口 悠	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。</p> <p>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。</p> <p>肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療法としてイロプロストの吸入療法が2016年に日本で承認された。しかしながら、酸素吸入下での薬剤の効率的な吸入が困難であり、期待した治療効果が得られないことが臨床上的の問題であった。私たちは吸入デバイスに直接酸素チューブを結合することにより短時間で効率的な吸入法を開発し、その成果を論文として発表した(Pulm Circ. 2018)。また、慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する手術並びにカテーテル治療の有用性をQOL(生活の質)を指標として評価し、論文として発表した(JACC Cardiovasc Interv.2018)。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を明らかにし、論文として発表した(J Am Heart Assoc.2018)。その他に、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臨床的比較・検討、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などについて、ヨーロッパ心臓学会、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。</p> <p>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4報の論文発表及び5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。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Nakayama K, Emoto N, Tamada N, Okano M, Shinkura Y, Yanaka K, Onishi H, Hiraishi M, Yamada S, Tanaka H, Shinke T, Hirata KI.	The optimization of iloprost inhalation under moderate flow of oxygen therapy in severe pulmonary arterial hypertension.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Pulm Circ.	8	2018	1-8	

著者名	論文標題			
Tamada N, Nakayama K, Yanaka K, Onishi H, Shinkura Y, Tsuboi Y, Izawa KP, Satomi-Kobayashi S, Otake H, Tanaka H, Shinke T, Okita Y, Emoto N, Hirata KI.	Early Introduction of Pulmonary Endarterectomy or Balloon Pulmonary Angioplasty Contributes to Better Health-Related Quality of Life in Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
JACC Cardiovasc Interv.	11	2018	1114-1116.	

著者名	論文標題			
Yanaka K, Nakayama K, Shinke T, Shinkura Y, Taniguchi Y, Kinutani H, Tamada N, Onishi H, Tsuboi Y, Satomi-Kobayashi S, Otake H, Tanaka H, Okita Y, Emoto N, Hirata KI.	Sequential Hybrid Therapy With Pulmonary Endarterectomy and Additional Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
J Am Heart Assoc.	7	2018	pii: e008838.	

著者名	論文標題			
Sano H, Tanaka H, Motoji Y, Mukai J, Suto M, Takada H, Soga F, Hatani Y, Matsuzoe H, Hatazawa K, Shimoura H, Ooka J, Nakayama K, Matsumoto K, Yamada H, Emoto N, Hirata KI.	Echocardiography during preload stress for evaluation of right ventricular contractile reserve and exercise capacity in pulmonary hypertension.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Echocardiography.	35	2018	1997-2004	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
谷仲 謙一、中山 和彦、 谷口 悠、大竹 寛雅、 川森 裕之、新倉 悠人、 玉田 直己、大西 裕之、 松岡庸一郎、田中 裕史、 大北 裕、新家 俊郎、 江本 憲昭、平田 健一	第3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 に対する治療効果の比較及び RC time の臨床的意義について		2018/6/22-23	大阪

発表者	学会名		
Yanaka K, Nakayama K, Shinke T, Otake H, Kawamori H, Toba T, Shinkura Y, Tamada N, Onishi H, Matsuoka Y, Tanaka H, Okita Y, Emoto E, Hirata KI	ESC Congress 2018		
タイトル		開催日	開催場所
Comparison between pulmonary endarterectomy and balloon pulmonary angioplasty focusing on RC time constant and pulmonary artery compliance in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.		2018/8/25-29	ドイツ・ミュンヘン

発表者	学会名		
Onishi H, Nakayama K, Yanaka K, Tamada N, Izawa Y, Shinkura Y, Shimoyama S, Nishii T, Kono A, Mori S, Otake H, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Emoto N, Hirata KI	ESC Congress 2018		
タイトル		開催日	開催場所
Lung perfusion recovery evaluated by dual-energy CT correlated with the improvement of exercise capacity in chronic thromboembolic pulmonary hypertension		2018/8/25-29	ドイツ・ミュンヘン

発表者	学会名		
Taniguchi Y, Matsuoka Y, Onishi H, Yanaka K, Nakayama K, Emoto N, Hirata KI	第83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
Balloon Pulmonary Angioplasty for Patients with Symptomatic Chronic Thromboembolic Disease without Pulmonary Hypertension		2019/3/29-31	横浜

発 表 者	学 会 名		
Onishi H, Taniguchi Y, Matsuoka Y, Yanaka K, Tamada N, Izawa Y, Tsuboi Y, Mori S, Nakayama K, Ohtake H, Kobayashi S, Emoto N, Hirata KI	第 83 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	
Evaluation of Microvasculopathy Using Dual-energy CT in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension	2019/3/29-31	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 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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		植物におけるフェニルプロパノイド生産機構の解明			
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
	士反 伸和 肥塚 崇男	神戸薬科大学 山口大学大学院	薬 学 部 創成科学研究科	教 授 助 教	統括、遺伝子解析 形質転換体の作出と解析
共同研究の成果					
<p>植物が生産する二次代謝産物は20万種を超えるといわれ、その中には強い生物活性などから医薬品原料として用いられるものも多い。しかし、希少植物を原料とする、または植物中の含量が少ないなどから、有用な生物活性を示しながらも安定供給できない代謝産物も存在する。これら代謝産物の多くは、植物中の特異的な器官や細胞においてのみ生産されており、その生産には植物細胞の形態的分化および代謝的分化に関わることが明らかとなってきた。しかし、その過程でどのような遺伝子群が発現するか、また代謝的分化における細胞間や細胞内オルガネラ間の代謝物の輸送動態に関する知見は極めて限られている。</p> <p>本研究では、植物フェニルプロパノイドに分類されるイソオイゲノールなど芳香族香気成分の生産機構解明を最終目的とし、香気成分を含めた二次代謝物の輸送動態に関わる輸送体の解析を行った。その結果、ペチュニアの各組織から得られたRNA-seq解析データを基に、花卉において発現の高い輸送体遺伝子を5つ見いだすことに成功した。さらに、それらについて、組織特異的および時期特異的な遺伝子発現解析を行い、糖代謝や植物ホルモン代謝に関わることが推定される輸送体の発現特性および機能推定をすることに成功した。本研究で得られたデータは、第13回トランスポーター研究会年会で発表するとともに、国際誌PloS Oneに報告した(Amano, Koeduka, Shitan et al. 2018)。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Amano I, Kitajima S, Suzuki H, Koeduka T, Shitan N.	Transcriptome analysis of <i>Petunia axillaris</i> flowers reveals genes involved in morphological differentiation and metabolite transport.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
PLoS One	13 (6)	e0198936	2018	

〈図書〉

著者名	著書名			
水谷 正治、土反 伸和、 杉山 暁史／編	基礎から学ぶ植物代謝生化学			
出版社	発行年	ページ		
羊土社	2018	328		

〈学会発表〉

発表者	学会名		
土反 伸和、天野 郁子、 北島佐紀人、鈴木 秀幸、 肥塚 崇男	第13回トランスポーター研究会		
タイトル	開催日	開催場所	
ペチュニアのトランスクリプトーム解析および輸送体の時期組織特異的な発現解析	2018年7月21日	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 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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		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			
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					
<p>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でラベル化したレチナールの合成法は既に報告されているので、その問題点を考察し改良法を検討した。</p> <p>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であった。昨年度は、β-ionylideneacetaldehydeとラベル化したアセトンを用いたアルドール反応を検討したところ、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く、69%の収率でC18-ケトンが合成できた。しかし、本方法でも高価なラベル化したアセトンを6等量も使用していることが問題となっている。そこで、ラベル化したC2-ホスホナートが市販されていることから、ラベル化していないホスホナートを用いて、アルデヒドからC18-ケトン体への変換を種々検討したが、いずれの場合も生成したエステルからケトンへの変換が必要であり、工程数が多くなること、また収率も中程度であることから、前回の方法をうわまわることはできなかった。続いて、C18-ケトンからレチニルエステルへの別途合成法を検討したが、これまでのシアノホスホネートを用いた反応よりも、効率のよい改良法を見出すことはできなかった。レチノイン酸のエステルとしては、パルミテートだけでなくアセテートも合成した。</p> <p>合成したラベル体の内、人肝癌細胞FLC-4を用いて¹³C-レチニルアセテートを添加し培養しながら、還流培養液のガス交換をおこなうリザーバーから採取した呼気中のガス成分の¹³CO₂/¹²CO₂比を検討した。その結果、¹³C-レチニルアセテート呼気試験でビタミンA代謝、特に不足か充足かを判定できる可能性が示唆された。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
和田 昭盛、竹永 駿輝、 大野 恵美、山野由美子、 松浦 知和	第 62 回香料・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- レチニルエステルの効率的な合成法の開発		2018/10/13	長崎

発表者	学会名		
和田 昭盛、松浦 知和、 古庄 律、山内 淳	第 361 回脂溶性ビタミン総合研究委員会		
タイトル		開催日	開催場所
13 位 ¹³ C- レチニルエステルの効率的な合成法		2019/3/15	東京

発表者	学会名		
松浦 知和、中村まり子、 和田 昭盛、古庄 律、 山内 淳、目崎 喜弘、 政木 隆弘、堀部 晃啓、 末岡 邦昭、相原 達、 菅原 純一	第 361 回脂溶性ビタミン総合研究委員会		
タイトル		開催日	開催場所
¹³ C-retinyl acetate 呼気試験によるビタミンA 欠乏・不足状態判定の試み		2019/3/15	東京

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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					
<p>(1) アストロサイトの形態形成機構：培養アストロサイトを用いて突起形成の分子機構を解析し、水チャネルであるアクアポリン-4 (AQP4) がβ1インテグリンを介して細胞骨格再構築を制御する focal adhesion kinase (FAK) の Tyr397 残基のリン酸化・活性化を制御することによって突起形成を促進していること、さらに、β1インテグリンの活性化への関与が報告されている Rap1 GTPase が突起形成を促進していることを明らかにした。</p> <p>(2) アルツハイマー病の病態形成機構：アルツハイマー型認知症の危険因子である加齢、糖尿病は、血管の老化を促進するが、アルツハイマー型認知症の病態形成において血管の老化が果たす役割は依然として不明である。そこで、血管内皮細胞において特異的に TRF2-dominant negative 体が過剰発現している TIE2-TRF2DN-Tg マウスを、アルツハイマー病モデルマウスである PSAPP マウスと交叉交配して TIE2-TRF2DN-Tg/PSAPP マウスを作出し、血管内皮細胞老化がシナプスの形成と、アミロイドβが蓄積したプラークの形成に及ぼす影響について検討し、以下の知見を得た。野生型マウスの海馬 CA3 領域においては、加齢に伴ってシナプスの数が増加する傾向を示した。一方、TIE2-TRF2DN-Tg マウスの海馬 CA3 領域においては、3ヶ月齢の時点で野生型マウスに比べてシナプスの数が増加していた。また、TIE2-TRF2DN-Tg/PSAPP マウスでは、6ヶ月齢からプラークが形成され始め、15ヶ月齢にかけてプラークの数は増加したが、対照となる PSAPP マウスに比べてプラークの大きさは小さかった。Y字迷路試験の交替行動率およびモリス水迷路試験を用いて認知機能を評価したところ、6ヶ月齢の時点においては、まだ、野生型マウス、TIE2-TRF2DN-Tg マウス、PSAPP マウス、TIE2-TRF2DN-Tg/PSAPP マウスの間で有意な認知機能の違いは認められなかった。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Sato J, Horibe S, Kawauchi S, Sasaki N, Hirata K, Rikitake Y.	Involvement of aquaporin-4 in laminin-enhanced process formation of mouse astrocytes in 2D culture: Roles of dystroglycan and α -syntrophin in the expression of aquaporin-4.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
J Neurochem.	147	2018	495-513	

著者名	論文標題			
Kawauchi S, Horibe S, Sasaki N, Hirata K, Rikitake Y.	A novel in vitro co-culture model to assess contact formation between astrocytic processes and cerebral vessels.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Exp Cell Res.	374	2019	333-341	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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	小胞体ストレス応答を標的とする創薬化学研究				
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、 <i>in vitro</i> および培養細胞を用いた活性評価
	大橋 憲太郎	岐阜大学	工学部	准教授	分子細胞生物学的手法による培養細胞を用いた活性評価
共同研究の成果					
<p>ビグアニド系抗糖尿病薬が小胞体ストレス応答 (UPR) 阻害作用を有し、さらにグルコース欠乏培地特異的な細胞毒性も有するという報告に着目し、なかでも最も強力な作用を有していたフェンホルミンをリード化合物として、塩基性基であるビグアニド部位及び疎水性基であるフェニル基に関する構造展開ならびに活性評価をこれまでに行ってきた結果、がん微小環境におけるストレス応答系に関してフェンホルミンを大きく上回る活性を有する化合物である 2-(2-chlorophenyl) ethylbiguanide (2-Cl-Phen) をすでに見出している。また、この化合物が ER ストレスシグナル伝達系の中でも ATF6 経路を強く抑制することを見出し、c-Myc 経路にも干渉していることもすでに明らかにしている。平成30年度においては、2-Cl-Phen が UPR の典型的な下流標的である ATF4 と GRP78 を転写および転写後調節様式にて速やかに弱めることを見出して、論文発表を行った。</p> <p>その一方で平成30年度においては、そのナトリウム塩が尿素サイクル異常症の治療薬として臨床で使用されており、化学シャペロン活性を有する 4-フェニル酪酸 (4-PBA) の UPR シグナル系に与える影響に関して興味を持ち、その構造活性相関研究を新たに立ち上げた。網羅的な構造活性相関研究を本共同研究にて行うことにより、普遍的な固形がんに関する新規な創薬標的ならびにリード化合物を得ることが期待される。北村等により 4-PBA analogue として UPR 阻害活性が見いだされた (4-methoxyphenoxy) acetic acid (M. Kitamura, <i>et al.</i>, <i>Br. J. Pharmacol.</i> 2013, 170, 822–834.) をリード化合物として、構造類縁化合物をまず9種類合成した。次いで、これらの化合物を U-87 MG 細胞を用いて、通常培地・血清欠乏培地・血清およびグルコース欠乏培地での培養を行いそれぞれの形態を観察したところ、血清およびグルコース欠乏培地で培養した小胞体ストレス負荷条件下で2種の化合物に細胞保護効果が期待できる結果が得られた。そこで Neuro2a 細胞を用い、小胞体ストレス応答増強効果を検討するべくツニカマイシン処理による細胞毒性に与える影響を評価したが、顕著な細胞保護作用は見られなかった。</p> <p>そこで、HT-29 および PANC-1 細胞を用いて通常培地・血清欠乏培地・血清およびグルコース欠乏培地・栄養欠乏培地を用いて再び細胞毒性に関するスクリーニング試験を行ったところ、いくつかのチアゾリジンジオン誘導体に強い低栄養選択的な毒性が認められた。さらに、HEK293 細胞を用いた低酸素応答ルシフェラーゼアッセイおよび UPR 応答ルシフェラーゼアッセイスクリーニング試験を行ったところ、強く HIF-1 および GRP78 活性化を阻害するログニン誘導体を1種類見出すことができた。本化合物は通常培地での毒性も認められるものの良好な低栄養選択毒性をも有しており、今後はこの化合物をもとにして新たに構造相関研究を行っていくと同時に、HIF-1 α や GRP78 の転写レベルならびに翻訳レベルに与える本化合物の実際の影響をも検討していく。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
K. Oh-hash, S. Matsumoto, T. Sakai, Y. Nomura, K. Okuda, H. Nagasawa, and Y. Hirata	Elucidating the rapid action of 2- (2-Chlorophenyl) ethylbiguanide on HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Cell Biol. Toxicol.</i>	34	2018	279-290	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
大橋憲太郎、松本 詩織、境 崇行、平田 洋子、奥田 健介、永澤 秀子	第24回 癌治療増感研究会 in 雲仙		
タイトル	開催日	開催場所	
血清およびグルコース欠乏状態での小胞体関連分解因子におけるフェンホルミン誘導体の効果に関する研究	2018.5.26.	雲仙	

発表者	学会名		
T. Sakai, K. Oh-hash, Y. Matuo, K. Hirota, K. Okuda, T. Hirayama, and H. Nagasawa	11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research Biology to Precision Medicine		
タイトル	開催日	開催場所	
Structure-activity relationship study of biguanide derivatives for tumor microenvironment modulator	2019.2.8.-11.	カナバリ (ハワイ)	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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	妊娠による神経可塑性の分子基盤				
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
	北條 寛典	神戸薬科大学	薬学部	助手	脳内遺伝子発現解析
共同研究の成果					
<p>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。昨年度までの研究では、主に中枢(脳)を研究対象とした扱ってきたが、本年度は主に末梢の方に目を向け、解析を行ってきた。</p> <p>マウスを交配し、妊娠マウスを準備した。出産直前の妊娠17日目、18日目および分娩当日、分娩後1, 2, 7日目の母体より臍を摘出し、Matrix metalloproteinases (MMPs) およびその制御因子である Tissue inhibitor of metalloproteinase (Timp) の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。その結果、Timp-1 が分娩直後に発現上昇を起こすことが分かった。これに関しては、分娩時に臍に加わる圧力が Timp-1 の発現誘導をしているのではないかと考え、現在さらに検討中である。MMPs に関しては、出産前に発現が上昇するもの、分娩直後に発現が上昇するもの、分娩の1~2日後に発現が上昇するもの、分娩7日目に発現が上昇するものの4グループに分類できた。それぞれのグループがどのような刺激により発現制御されているのかを現在検討しているところである。</p> <p>分娩後の臍では組織の損傷と修復が行われることから、血管系のリモデリングが起きていると考え、血管リモデリング因子の発現を検討したところ、Angiopoietin-4 (Ang-4) の発現が特異的に変動していることを見出した。Ang-4 はこれまで生理機能がほとんど分かっていない因子なので、今後解析を行っていきたいと考えている。</p> <p>一方、妊娠中には胸腺が退縮するが、これには血中エストロゲンの高値が関与していると考えられている。そこで、雄マウスにエストロゲンを投与することで胸腺退縮を誘導するモデルを作製し、飢餓ストレスによる胸腺退縮とのメカニズムの違いを検討した。その結果、飢餓ストレスモデルで見られるプロスタグランジン合成酵素の発現上昇が、エストロゲン投与による胸腺退縮では非常に弱いということが分かった。また飢餓ストレスモデルでは顕著にみられる血管系のリモデリングも、エストロゲン投与モデルではそれほど激しくは起きていないことが分かった。これらのことから、妊娠中における胸腺退縮は、加齢や飢餓による胸腺退縮とは全く異なる分子機構で起きている可能性が考えられた。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
吉野 寿美、北裏 卓也、 泰井麻由奈、横田 衣利、 中川 公恵、長谷川 潤	日本ビタミン学会 第70回大会		
タイトル		開催日	開催場所
脳特異的 UBIAD1 欠損による小脳プルキンエ細胞消失の原因解析		2018/6/22	大阪

発表者	学会名		
藤原 聖美、西 亮宏、 一ノ瀬千尋、河本桂生花、 中川 公恵、長谷川 潤	日本ビタミン学会 第70回大会		
タイトル		開催日	開催場所
ビタミン K 変換酵素 (UBIAD1) は出生成熟後のマウスの生存維持に必須の役割を担う		2018/6/22	大阪

発表者	学会名		
北條 寛典、外園 さや、 廣野 順介、瀬木-西田恵里、 中川 公恵、長谷川 潤	フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー		
タイトル		開催日	開催場所
妊娠時末梢組織における神経軸索伸長		2018/9/10	長崎

発表者	学会名		
長田 理沙、北條 寛典、 岡本 大志、吉田 千秋、 廣野 順介、中川 公恵、 長谷川 潤	第68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
妊娠マウスの生殖器官に対する内分泌かく乱物質 DEHP の毒性評価 - 妊娠初期の DEHP 曝露が胎の免疫能に与える影響の解析 -		2018/10/13	姫路

発表者	学会名		
廣野 順介、堀川 伊和、 只佐 友貴、北條 寛典、 瀬木-西田恵里、中川 公恵、 長谷川 潤	第68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
光血栓性脳梗塞モデルを用いた梗塞巣拡大メカニズムの探索 - Ccr2 による Matrix Metalloproteinase 群の発現制御 -		2018/10/13	姫路

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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 30 年 6 月 29 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成 31 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		薬物動態解析に基づく新規薬物送達キャリアの開発			
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
	坂 根 稔 康	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	教 授	研究の総括・データ解析
	湯 谷 玲 子	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	助 教	動物実験
	田 中 晶 子	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	特任助教	動物実験
	山 下 修 吾	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	博士研究員	キャリアの合成
	山 本 昌 正	京 都 薬 科 大 学	薬 学 部	教 授	キャリアの最適化
	勝 見 英 正	京 都 薬 科 大 学	薬 学 部	准教授	キャリアの物性評価
共同研究の成果					
<p>骨は種々の生体組織と相互に作用することで造血、ミネラル代謝などの生体恒常性に寄与しており、骨機能の異常を起因としたこれら代謝異常が死亡リスクの増大に関与している。本研究は薬物移行性が乏しい骨への薬物送達効率の向上および骨転移治療を目的に、骨標的化素子としてアスパラギン酸 (D) を導入したリジンデンドロン (DpK) および D とフェニルアラニン (F) の重合体 (poly (D' /F')) のブロックコポリマー (DpK-poly (D' /F'))、ポリエチレングリコール (PEG) と poly (D' /F') のブロックコポリマー (PEG-poly (D' /F')) を組み合わせた混合ミセル (PEG-DpK-poly (D' /F')) の創製を試みた。初めに DpK の骨指向能を FT-IR を用いて評価した。IR スペクトルの二次微分演算曲線には DpK と Ca²⁺ が配位結合したことによる 1528 cm⁻¹ の吸収バンドが観察され、DpK が骨吸着能を有することが示された。DpK-poly (D' /F') および PEG-poly (D' /F') を混合した際に形成されるマイクロ相の熱的性質を DSC を用いて評価した。混合した際の熱的性質パラメーターは DpK-poly (D' /F') 単独や PEG-poly (D' /F') 単独と異なる値を示したことから PEG-DpK-poly (D' /F') が形成可能であることが示された。骨指向性の高い PEG-DpK-poly (D' /F') の処方最適化を目的に、D/F 比および混合比率の異なる合計 27 種の PEG-DpK-poly (D' /F') に [111In]InCl₃ 標識を施した [111In]PEG-DpK-poly (D' /F') のマウス尾静脈内投与後の骨移行性を評価したところ、5 種の PEG-DpK- (D' /F') が 20% 以上の骨移行率を示した。これら PEG-DpK-poly (D' /F') に [3H]Paclitaxel (PTX) を封入し [3H]PTX の骨移行性を評価したところ D/F 比が 4 (mol/mol) および 1 (mol/mol) の PEG-poly (D' /F') および DpK-poly (D' /F') を 90/10 (mol/mol) の処方で混合した PEG-DpK-poly (D' /F') が 21.3% の [3H]PTX 移行率を示した。これは 4.3% の骨移行率を示した [3H]PTX 封入 PEG-poly (D' /F') の 5 倍高い骨移行性であった。以上、本研究で骨移行性の高いデンドロン型高分子ミセル製剤の創製に成功し、疎水性薬物の骨移行性の改善に成功したことから、本研究は骨代謝異常疾患の治療を目的とした医薬品開発における薬物送達技術の発展に貢献し得る研究と位置付けられる。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
山下 修吾、勝見 英正、 田中 晶子、湯谷 玲子、 古林 呂之、森下 将輝、 山本 昌、坂根 稔康	日本薬学会第 139 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
薬物の骨ターゲットイングを目的としたデンドロン型高分子ミセル製剤の開発	2019年3月21日	千葉市	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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
	中 山 喜 明	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	講 師	遺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					
<p>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とする。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。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Naosuke Nakamura, Yuki Tsujimoto, Yoshiaki Nakayama, Morichika Konishi, and Akira Kurosaka	第 41 回日本分子生物学会年会		
タイトル	開催日	開催場所	
Phenotypic analysis of double mutants that lack vertebrate-specific polypeptide α -N-acetylgalactosaminyl-transferase genes	2018/11/28	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 宮田 興子 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30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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とアレルギー誘導機序の解析				
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
	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
	江藤 忠洋	いわき明星大学	薬学部	准教授	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
泉 安彦	神戸薬科大学	薬学部	講師	動物・細胞実験	
共同研究の成果					
<p>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。</p> <p>いわき明星大学では、昨年度から本年度にかけて、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。</p> <p>神戸薬科大学では、譲渡された単離物質の抗アレルギー活性について解析する目的で、肥満細胞のモデル細胞である好塩基性白血球細胞株 RBL2H3 を、抗卵白アルブミン (OVA) モノクローナル IgE (OE-1) で感作し、抗原である OVA で刺激することにより誘導される脱顆粒反応に対して前述の単離物質がどのように作用するかについて、細胞毒性作用 (MTT 法) とともに解析した。その結果、本年度においては毒性を示すことなく、強く脱顆粒反応を抑制する単離物質を見出すことはできなかった。一方、本共同研究では、既知有機化合物の中から、抗アレルギー作用を有するものの探索も同時に行っている。その中で、抗ガン薬としての臨床応用が期待されているチロシンキナーゼ阻害薬の一つである saracatinib について、その抗アレルギー作用を詳細に解析した。In vitro では、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。また、細胞内シグナル伝達についても、細胞内カルシウム濃度の上昇、Akt、ERK、JNK、p38 の活性化を示すリン酸化レベルの上昇いずれもに対して、saracatinib が抑制作用を示すことを明らかにした。このことから、saracatinib はこれらの細胞内情報伝達系を抑制することにより、脱顆粒反応やサイトカイン産生を抑制することが示唆された。さらに in vivo でも saracatinib の抗アレルギー作用について解析した。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 依存のおよび IgG 依存 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 saracatinib が抗アレルギー作用を示すことを明らかにした。これらの解析により、今後の抗アレルギー化合物探索に向けて、in vitro および in vivo での解析系がほぼ確立され、新規化合物などのスクリーニングが効率的に進められるようになった。In vitro では、他のアレルギー因子の解析法を加えたり、in vivo では、ASDIS モデルへの薬物の塗布により薬効を評価する系を確立するなどして、このスクリーニング系を発展させることも重要であると考えられた。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
八巻 耕也、井上 聖太、 寺師 匡人、小椋 詩織、 稲垣 佑亮、中 成利、 中垣 友子、江藤 忠洋、 金 容必、泉 安彦、 小山 豊	日本薬学会 第139年会		
タイトル		開催日	開催場所
Src family kinase 阻害薬 saracatinib の抗アレルギー作用		2019.3.23	千葉

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 様

研究代表者所属 中央分析室
研究代表者職・氏名 准教授・竹内 敦子

平成30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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		機器を用いた生理活性物質の分析・解析と臨床への応用			
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
	竹内 敦子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	分析法の確立
	都出 千里	神戸薬科大学	薬学部	講師	分析及び結果の解析
	西尾 久英	神戸学院大学	総合リハビリテーション学部	教授	臨床応用
共同研究の成果					
<p>生体内のさまざまな生理活動を調節したり、活性化したりする生理活性物質は、生体に対して重要な役割を果たす。中には医薬品として開発されたものも多く、医薬品の資源としても注目される。これらの生理活性物質は生体内で微量であったり、化学構造が未知であったりするが、質量分析装置やNMR装置などを用いる機器分析法によりさまざまな問題が解決されてきた。</p> <p>(1) 質量分析装置の多様な発展に伴い、その手法は多岐にわたって利用されている。質量分析法を用いて、生理活性を有する種々の低分子化合物やペプチド・タンパク質の分析法を確立し、医療の分野、特に病気の診断や治療、医薬品の開発などに役立てることを目指して研究を行うことを目的とした。そこで、高分解能質量分析計 [LTQ Orbitrap Discovery LC/MS/MS system] およびタンデム型質量分析計 [API3000 LC/MS/MS system] を用いて、遺伝性疾患の診断と治療効果の判定への応用性を検討した。その結果、遺伝性筋疾患である Duchenne 型筋ジストロフィーや福山型筋ジストロフィーなどの遺伝性疾患などのバイオマーカーになると予想される生体成分の LC/MS/MS 定量法を確立し、それらの尿中含有量と疾患との関係について検討することができた。この結果から診断と治療効果の判定に適応可能であることを確認した。また、疾患の治療薬を開発することを目的として、遺伝子レベルで影響を及ぼす化合物の検索を行った。</p> <p>(2) 医薬品開発において結晶多形の分析は必須である。結晶多形の分析には粉末X線回折や赤外吸収スペクトルなどが用いられているが、固体 NMR でもその違いをみる事が出来る。固体 NMR シグナルを測定し、NMR による多形間の安定性評価へと発展させることを目指した。医薬品の場合、結晶多形間での溶解性の違いは、その薬物の吸収性に影響を及ぼす。急性前骨髄球性白血病の治療薬であるレチノイン酸には安定形と準安定形の結晶多形が存在する。両多形を固体 NMR で測定したところ、ケミカルシフトに差異が生じた。その差異が結晶の安定性にどのように影響を及ぼしているのかを検討するため重水素ラベル化体の合成を順次行った。レチノイン酸の7,8位のラベル化体の改良合成法の検討と準安定形の作成を行い、それらの固体 NMR を測定した。さらに、ロキソプロフェン Na 製剤中の主成分の結晶変化について検討した。</p> <p>(3) その他の分析法を用いて、先天性代謝異常症の治療法の確立のため、既存薬剤の応用や新規医薬の開発を目指し、種々の検討を行った。また、新生児スクリーニングやさまざまな迅速診断法を確立することを目的として検討を行った。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Sugawara K, Nomura K, Okada Y, Sugano A, Matsumoto M, Takarada T, Takeuchi A, Awano H, Hirota Y, Nishio H, Takaoka Y, Ogawa W.	<i>In silico</i> and <i>in vitro</i> analyses of the pathological relevance of the R258H mutation of hepatocyte nuclear factor 4 <i>a</i> identified in MODY1.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>J. Diabetes Investig.</i>	10	2019	680-684	

〈総説〉

著者名	論文標題			
竹内 敦子、西尾 久英、齊藤 利雄、篠原 正和	脊髄性筋萎縮症：SMN1 遺伝子非欠失患者の分子病態			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Bio Clinica</i>	33	2018	47-51	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
竹内 敦子、長瀬 明子、寶田 徹	日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会		
タイトル	開催日	開催場所	
Resveratrol の安定性評価と細胞内での代謝物解析	2018/5/15	大阪	

発表者	学会名		
Takeuchi A	22nd International Mass Spectrometry Conference		
タイトル	開催日	開催場所	
Evaluation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 activity towards bilirubin	2018/8/27	フローレンス	

発表者	学会名		
西野 真吉、都出 千里、竹内 敦子、西尾 久英	日本薬学会第 139 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
濾紙血 DNA を用いた新生児スクリーニングシステムの開発	2019/3/21	千葉	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 宮田 興子 様

研究代表者所属 薬剤学研究室
研究代表者職・氏名 教授・大河原 賢一

平成30年6月29日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成31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	革新的 DDS 技術による難治性がんの克服を目指した基礎的検討				
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
	大河原 賢一	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	研究全般およびサイトカインレベル・遺伝子発現変動の定量的な評価
	檜垣 和孝	岡山大学	薬 学 部	教 授	ナノ粒子の腫瘍組織内動態の精緻な解析
共同研究の成果					
<p>大河原らのグループでは先行研究にて、血管新生阻害剤を血管のリモデリングが起らない程度の低用量で前処理することで、腫瘍組織の微小環境をナノ粒子のデリバリーにより適した環境に改善可能であることを明らかにしている。そこで、マウス悪性黒色腫由来がん細胞（B16）をマウス皮下に移植することで作製した固形がんモデルマウスを用いて、血管新生阻害剤（PE-SU5416）を前処理し、その後に光増感剤内封ナノ粒子製剤（PN-Por）を用いた PDT を施すことにより本併用療法の有用性を評価した。その結果、PE-SU5416 単独あるいは PN-Por を用いた通常の PDT 単独処置では抗腫瘍効果が全く認められない一方で、これら両処置を逐次的に施すと、顕著な腫瘍増殖抑制効果の増強が認められた。また、前投与する PE-SU5416 とその後に投与する PN-Por の投与間隔について種々検討したところ、検討を加えた中では、PE-SU5416 投与 36 時間後が PN-Por を投与する最適なタイミングであることが示された。したがって今回の結果は、血管透過性が乏しく PDT 単独処置では効果が期待できないがん種に対して、PE-SU5416 による前処置を施すことで、PDT による抗腫瘍効果を増強可能であることを示唆するものであり、現時点では、PE-SU5416 の投与により、腫瘍内血管の構造が正常な血管構造に近づくことで、腫瘍内の血流が改善し、それに伴って酸素供給を含む物質の運搬能力が改善したことが関与しているものと推察している。そこで今後は、本結果の背後にあるメカニズムを明らかにするため、以下の観点から種々の解析を進める予定である。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・前処置がナノ粒子の腫瘍へのデリバリー効率に与える影響 ・前処置が腫瘍組織内部への酸素分圧に与える影響 ・前処置が腫瘍組織内血管の構造あるいは機能に与える影響 					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
中野 晶、檜垣 和孝、 大河原賢一	日本薬学会 第139年会		
タイトル	開催日	開催場所	
光増感剤内封ポリマーナノ粒子製剤を用いた光線力学療法の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤前投与の影響	2019年3月21-23日	幕張メッセ	