

# 共同研究 研究紀要

2020  
(2019年度共同研究)

神戸薬科大学



# 共同研究 研究紀要

2020  
(2019年度共同研究)

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。

### 2019 年度共同研究（研究期間 2019.4.1 ～ 2020.3.31）

承認番号	共同研究課題名（研究テーマ）	研究代表者
1	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
2	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
3	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	脂質過酸化を標的とする分子プローブ・治療薬の開発	薬品物理化学研究室 教授 向 高弘
5	代謝輸送工学による有用アルカロイド分泌生産系の開発	医薬細胞生物学研究室 教授 土反 伸和
6	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
7	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
8	メカノケミカル法によるシクロデキストリンと薬物との固相反応の検討	機能性分子化学研究室 教授 中山 尋量
9	高精度 LDL 受容体活性測定法の開発	薬品化学研究室 教授 上田 昌史
10	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
11	カロテノイド酸化代謝物の合成と生理作用に関する研究	生命有機化学研究室 准教授 山野由美子
12	妊娠に伴う神経系の可塑的变化	衛生化学研究室 教授 長谷川 潤
13	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
14	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
15	脳機能保護および修復に関する薬理学的研究	薬理学研究室 教授 小山 豊
16	老化疾患の病態形成機構の解明と制御	医療薬学研究室 教授 力武 良行
17	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



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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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
	古林 呂之	神戸薬科大学	薬学部	准教授	動物実験
	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	キャリアの合成
	山本 昌	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>前年度までの研究で、アスパラギン酸 (Asp) 及びポリエチレングリコール (PEG) 修飾を施したポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー誘導体 (PEG-Asp-PAMAM) が骨標的型薬物キャリアとして有用であることを明らかにした。本年度の研究では、PEG-Asp-PAMAM を用いた薬物の骨標的化による効率的な骨転移治療法の開発を目的として、PEG-Asp-PAMAM によるイットリウム 90 (90-Y, 治療用放射性核種) の骨標的化ならびにその骨転移治療効果について評価した。さらに、PEG-Asp-PAMAM を化学修飾し、界面活性剤様の化学構造を持たせることで、高分子ミセルを新たに開発した。高分子ミセルを用いて、90-Y とタモキシフェン (抗癌剤) の骨標的化を試みるとともに、その骨転移治療効果について検証した。</p> <p>アスパラギン酸 (Boc-Asp(OtBu)-OH) を PAMAM と縮合反応させ脱保護した後、PEG-NHS と反応させることで PEG-Asp-PAMAM を得た。さらにコレステロール修飾を施し、自己集合させることで、高分子ミセル (PEG-Asp-PAMAM micelle) を調製した。各種ナノキャリアの体内動態に関しては、インジウム 111 (111-In) による放射標識体を用いて評価した。薬理効果として、癌骨転移モデルマウスを作成し、PEG-Asp-PAMAM 及び [90-Y] PEG-Asp-PAMAM micelle、タモキシフェン封入 PEG-Asp-PAMAM micelle 投与後の下肢骨中癌増殖を評価した。</p> <p>マウス静脈内投与後の [111-In] 標識 PEG-Asp-PAMAM 及び [111-In] 標識 PEG-Asp-PAMAM micelle は骨へ効率よく移行し、特に癌骨転移の病巣部位である関節部に集積することが明らかとなった。さらに、癌骨転移モデルマウスにおいて、[90-Y] PEG-Asp-PAMAM 及び [90-Y] PEG-Asp-PAMAM micelle、タモキシフェン封入 PEG-Asp-PAMAM micelle の投与により、下肢骨における癌増殖が顕著に抑制されることが認められた。</p> <p>以上の結果より、PEG-Asp-PAMAM 及び PEG-Asp-PAMAM micelle は、癌骨転移をはじめとする骨疾患治療において、有望な骨標的化薬物キャリアであることが示された。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名	
吉岡 綾音、勝見 英正、 福井美奈子、高木 千聖、 山下 修吾、湯谷 玲子、 田中 晶子、古林 呂之、 木村 寛之、河嶋 秀和、 森下 将輝、坂根 稔康、 山本 昌	日本薬学会第 140 年会	
タイトル	開催日	開催場所
アスパラギン酸修飾ナノキャリアを利用した治療	2020年3月28日	京都市



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 薬剤学研究室  
研究代表者職・氏名 教授・大河原 賢一

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	研究統括およびナノ粒子の腫瘍組織内動態の精緻な解析
	檜垣 和孝	岡山大学	薬 学 部	教 授	腫瘍組織内血管の構造・機能評価
共同研究の成果					
<p>腫瘍組織では異常な血管新生が引き起こされることが知られており、その新生血管は構造的また機能的に不全であり、且つその分布には偏りがあるため、腫瘍組織内の血流は不均一であることが知られている。このような状況下では、血流を介した腫瘍組織への薬物の移行が妨げられることに加え、抗腫瘍効果を発揮するために酸素を必要とする光線力学療法（PDT）には大きな障壁となる可能性が指摘されている。</p> <p>既に大河原らのグループでは血管新生阻害剤を血管のリモデリングが起こ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。したがって本結果は、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すものであった。</p> <p>そこで本結果の背後にあるメカニズムを明らかにするため種々検討を加えたところ、PE-SU5416 前投与により血管の構造ならびに機能が改善され、血管の壁細胞被覆と組織内の酸素分圧が改善することが明らかとなり、腫瘍組織内の血流を伴った血管の割合も増加していることが示された。これらの変化は、その後に投与した PN-Por の腫瘍組織へのデリバリー効率を増大させ、腫瘍組織深部への到達性も改善することが併せて示された。さらに PN-Por を用いた PDT 時に腫瘍組織で発生した活性酸素量を間接的に評価した結果、PE-SU5416 による前処置に PN-Por を投与することにより腫瘍組織で発生する活性酸素の量が顕著に増大することが示された。これらの知見は、血管新生阻害剤により予め腫瘍内微小環境を整えることで、PDT の治療効果を増強可能であることを示唆するものであると考えている。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
宮里 萌花、小林 紘子、 前田 寛聡、三宅 正晃、 大河原賢一、檜垣 和孝	第 34 回日本薬剤学会		
タイトル		開催日	開催場所
ポリアミン誘導体を用いた新規吸収改善固形製剤開発のための基礎的研究		2019年5月 16-18日	富山国際会議場

発表者	学会名		
住元 祐介、大川 慎也、 大河原賢一、檜垣 和孝	第 34 回日本薬剤学会		
タイトル		開催日	開催場所
難水溶性 - 難脂溶性薬物の Self-nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) 製剤化に関する基礎的研究		2019年5月 16-18日	富山国際会議場

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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	神戸大学大学院	医学研究科	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をきたす原因疾患の一つとしてシャント性の先天性心疾患が挙げられる。肺高血圧症を合併している先天性心疾患の外科的治療は難易度が高く、術後に右心不全をきたして血行動態が破綻することも稀ではない。私たちはそのような症例に対し、肺高血圧治療薬の初期併用療法を実施し、血行動態が安定したのちに根治的修復術に成功した症例について報告した (Internal Med. 2019)。また、肺動脈性肺高血圧をきたす薬物が複数知られているが、私たちは本態性血小板増加症の治療薬である Anagrelide が肺動脈性肺高血圧症をきたすことを世界に先駆けて見出し、これを報告した (Pulm. Circ. 2019)。さらに基礎研究的なアプローチとして、Fam13A という新規に同定された遺伝子が肺高血圧症の発症に重要な役割を果たし、その分子メカニズムとして内皮・間葉転換が関与していることを遺伝子改変マウスを用いて明らかにした (PLoS One 2020)。これら3つの論文により、肺高血圧症の発症メカニズムから臨床的診断・治療における新たな知見まで成果を得ることができた。</p> <p>同時に、慢性血栓性肺高血圧症に対するカテーテル治療の効果の臨床的比較・検討、デュアルエナジーCTを用いた慢性血栓性肺高血圧症の治療効果の評価法の確立、慢性血栓性肺高血圧症に対する外科的治療法である血栓内膜摘除術の効果について、日本肺高血圧・肺循環学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3報の論文発表及び3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			
Suto M, Matsumoto K, Kido S, Mori S, Nakayama K, Tanaka H, Inoue T, Emoto N, Okita Y, Hirata KI.	Advanced Pulmonary Hypertension Due to Congenital Double-shunt Successfully Treated With Surgical Repair and Up-front Combination Therapy			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Intern Med.	58	2019	1301-1305	

著者名	論文標題			
Sumimoto K, Taniguchi Y, Matsuoka Y, Onishi H, Emoto N, Hirata KI.	"Anagrelide-induced Pulmonary Arterial Hypertension": A Rare Case of Drug-Induced Pulmonary Arterial Hypertension			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Pulm Circ.	9	2019	2045894019896682	

著者名	論文標題			
Rinastiti P, Ikeda K, Rahardini EP, Miyagawa K, Tamada N, Kuribayashi Y, Hirata KI, Emoto N.	Loss of Family With Sequence Similarity 13, Member A Exacerbates Pulmonary Hypertension Through Accelerating Endothelial-To-Mesenchymal Transition			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
PLoS One.	15	2020	e0226049	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
松岡庸一郎、谷口 悠、住本 恵子、大西 裕之、向井 淳、玉田 直己、谷仲 謙一、坪井 康典、大竹 寛雅、江本 憲昭、平田 健一	第4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 患者に対する BPA 治療後の低酸素血症、肺機能に関する検討	2019/6/22	浜松	

発表者	学会名		
大西 裕之、谷口 悠、松岡庸一郎、谷仲 謙一、玉田 直己、坪井 康典、森 俊平、小林 成美、江本 憲昭、平田 健一	第4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	
Assessment of microvasculopathy by dual-energy CT in CTEPH	2019/6/22	浜松	

発 表 者	学 会 名		
坪井 康典、小林 成美、 小川 真人、小槇 公大、 後竹 康子、谷口 悠、 酒井 良忠、江本 憲昭、 岡田 健次、平田 健一	第 4 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
PEA 周術期における CTEPH 患者の身体機能および骨格筋力の変化		2019/6/21	浜松



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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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		脂質過酸化を標的とする分子プローブ・治療薬の開発			
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、プローブ評価
	佐野 紘平	神戸薬科大学	薬学 部	准教授	プローブ評価
	山崎 俊栄	神戸薬科大学	薬学 部	助教	プローブ・治療薬合成
	山田 健一	九州大学	薬学 研究院	教授	治療薬評価
共同研究の成果					
<p>脂質過酸化は脂質炭素ラジカル（以下、脂質ラジカル）の生成を起点とする酸化反応であり、連鎖的反応によって周囲へと伝播し、脂質過酸化物の蓄積が生じる。結果、細胞死が起こり、がんや神経変性疾患、老化などの病態が発現することから、脂質過酸化の検出はこれらの病態の診断および発症・進展機構の解明に有益な情報をもたらすと考えられる。脂質過酸化は、酸化の関与する疾患と密接に関連していると考えられており、その分析手法の構築や脂質過酸化を抑制する薬剤の開発が期待されている。そこで本研究では、「脂質過酸化を標的とする分子プローブ・治療薬の開発」を目的とし、2019年度は脂質過酸化の起点となる脂質ラジカルを標的分子とし、これに高い反応選択性を示す分子プローブを設計・合成した。具体的には、脂質ラジカルに対して高い反応性・選択性を示すニトロキシド化合物の放射性ヨウ素標識体を良好な放射化学的収率および純度で合成することに成功した。また、培養細胞実験において、脂質ラジカル産生刺激を与えた場合に、産生刺激のない場合に比べて高い細胞滞留性が見られた。これらの結果より、開発化合物が細胞レベルで脂質ラジカルを検出し得る成果を得ており、ACS Med Chem Lett 誌に報告した。一方、本化合物は生体内還元物質であるアスコルビン酸によって迅速に還元される結果が得られており、生体適用時にラジカル捕捉能の消失が示唆される。今後、ラジカル捕捉能の消失を抑えた化合物の開発を進める。また、脂質過酸化過程で生じるラジカル種の検出プローブの開発として、昨年度は、過酸化水素およびスーパーオキシドアニオンラジカルと反応するプローブの合成を進めた。目的とする化合物の合成は完了しており、現在生体応用に向けた放射性ヨウ素標識の検討を進めているところである。今後、ヒドロキシルラジカルを対象としたプローブ合成も進め、いずれのプローブも、各種ラジカルとの反応性を <i>in vitro</i> 試験により評価し、それぞれの用途に応じた評価系により、分子プローブとしての有用性を精査する予定である。さらに、LC/MS による脂質ラジカル解析のための基準物質（標品）を合成した。具体的には、脂質過酸化過程では種々の脂質由来の炭素ラジカルが生成するが、これらの種類や量を LC/MS により決定するためには、安定同位体標識した基準物質が必要となる。そこで、炭素ラジカルを捕捉した化合物の重水素標識体を合成し、評価を進めている。</p> <p>また、脂質過酸化を抑制し得る治療候補化合物の探索も進めており、特に、脂質過酸化初期に生成する脂質ラジカルを標的として、これを捕捉し得る化合物の合成を進めた。目的化合物の合成を終え、現在、細胞生存試験によりその有用性を評価している。効果の見られたものについては今後動物モデルを用いて効果を検証していきたいと考えている。</p>					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Toshihide Yamasaki, Risa Azuma, Kohei Sano, Masayuki Munekane, Yuta Matsuoka, Ken-ichi Yamada, Takahiro Mukai	Radioiodinated Nitroxide Derivative for the Detection of Lipid Radicals			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
ACS Medicinal Chemistry Letters	11	2020	45-48	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
山崎 俊栄、東 里沙、 佐野 紘平、宗兼 将之、 松岡 悠太、山田 健一、 向 高弘	第3回日本核医学会分科会放射性薬品科学研究会／第19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	
生体内の脂質アルキルラジカルを検出する放射性ヨウ素標識ニトロキシドプローブの開発	2019/11/30	岡山	

発 表 者	学 会 名		
東 里沙、山崎 俊栄、 佐野 紘平、宗兼 将之、 松岡 悠太、山田 健一、 向 高弘	日本薬学会第140年会		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
脂質ラジカルの生体内検出に向けた放射性ヨウ素標識ニトロキシドの開発	2020/3/26	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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		代謝輸送工学による有用アルカロイド分泌生産系の開発			
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
	士反 伸和	神戸薬科大学	薬学部	教授	統括、遺伝子解析
	南 博道	石川県立大学 生物資源工学研究所	応用微生物学	准教授	アルカロイド生産菌の作出と提供
	山田 泰之	神戸薬科大学	薬学部	助教	輸送体発現菌の作出と解析
共同研究の成果					
<p>植物が生産する二次代謝産物は多彩な化学構造や生理活性を有し、医薬品原料などに用いられる。しかし近年、基原となる植物の減少や、植物中の含量の少なさなどから、植物由来の薬用資源の確保は急務の課題となっている。それら有用化合物の大量生産の一つの手法として、大腸菌など微生物に生合成酵素遺伝子を組み込み生産させる「代謝工学（合成生物学）」が発展してきた。共同研究者である石川県立大学 南准教授はアルカロイドの大腸菌生産において世界最先端の研究をしており、様々な有用化合物の生産に成功している。しかしながら、微生物において細胞内に代謝物が蓄積する可能性があることや、培地への放出促進により生産性の向上が期待されることもあり、代謝工学に輸送工学を組み合わせた研究領域の開拓を本研究では目指した。本研究では、レチクリンを生産する大腸菌に、アルカロイド輸送体である AtDTX1、NtJAT1 を導入し、その生産性変化だけでなく、細胞の増殖や生合成遺伝子の発現変化などを解析した。その結果、NtJAT1 導入により細胞の生育が顕著に抑制されることが観察された。一方、AtDTX1 でも若干の生育抑制が観察されたものの、その抑制は NtJAT1 よりは緩やかであったことからレチクリン生産性の変化を検討した。AtDTX1 発現株におけるレチクリン生産および培地への放出はコントロール株よりも有意に促進されていた。この際の生合成遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、いくつかの生合成遺伝子で発現量に変動が見られた。さらに、AtDTX1 株ではプラスミドの保持率が上昇傾向にあることも示唆された。以上から、輸送工学によるアルカロイド生産性の向上が示され、有用物質生産における新たな技術としてさらに発展されると期待された。</p>					

〈総 説〉

著 者 名	論 文 標 題		
Shitan N., Yazaki K.	Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants.		
雑 誌 名	巻	発行年	ページ
Biochim Biophys Acta Biomembr.	15	2019	183127

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
山田 泰之、潤井 みや、 松井 治幸、井上 開、 大木 秀浩、南 博道、 佐藤 文彦、土反 伸和	日本農芸化学会 2020 年度大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
輸送工学を利用した効率的なイソキノリンアルカロイド生産		2020 年 3 月 27 日	福岡

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 大木 秀浩、炭田 奈々、 南 博道、佐藤 文彦、 土反 伸和	第 61 回日本植物生理学会年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
スチロピン生産性ピキア酵母への輸送体導入と生産性変化の検討		2020 年 3 月 21 日	大阪

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 大木 秀浩、炭田 奈々、 南 博道、佐藤 文彦、 土反 伸和	日本薬学会第 140 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
スチロピン生産性ピキア酵母におけるアルカロイド輸送体 NtJAT1 発現と生産性の検討		2020 年 3 月 26 日	京都

発 表 者	学 会 名		
松井 治幸、山田 泰之、 大木 秀浩、井上 開、 潤井 みや、中川 明、 南 博道、佐藤 文彦、 土反 伸和	第 69 回日本薬学会関西支部総会・大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
アルカロイド生産性大腸菌への輸送体 AtDTX1 導入と生産性変化の検討		2019 年 10 月 21 日	神戸

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 大木 秀浩、炭田 奈々、 南 博道、佐藤 文彦、 士反 伸和	第 69 回日本薬学会関西支部総会・大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
アルカロイド生産性ピキア酵母への輸送体タンパク質の導入と生産性変化の検討		2019年10月21日	神戸

発 表 者	学 会 名		
松井 治幸、山田 泰之、 大木 秀浩、井上 開、 潤井 みや、中川 明、 南 博道、佐藤 文彦、 士反 伸和	第 14 回トランスポーター研究会年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Reticuline 生産性大腸菌への輸送体導入と生産効率変化の検討		2019年7月20日	札幌

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 大木 秀浩、炭田 奈々、 南 博道、佐藤 文彦、 士反 伸和	第 14 回トランスポーター研究会年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Stylopine 生産性ピキア酵母への耐性・輸送体タンパク質の導入と生産性変化の検討		2019年7月20日	札幌



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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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、および <i>in vitro</i> ならびに培養細胞を用いた活性評価
	高木 晃 大橋 憲太郎	神戸薬科大学 岐阜大学	薬学部 工学部	助教 准教授	分子設計および合成 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やってきた結果、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、さらに 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も前年度までに発表してきた。2019 年度においては、2-Cl-Phen が小胞体関連分解 (ERAD) に与える影響について検討を行う中で、ERAD の中でもホモシステイン誘導性小胞体タンパク質 (Herp) の誘導を 2-Cl-Phen が転写レベルで早期に抑制していることを見出して、論文発表を行った。</p> <p>その一方で 2019 年度においては、前年度にスクリーニングの結果見出した強い低栄養選択的な細胞毒性を有するチアゾリジンジオン誘導体の構造展開を行った。本誘導体は、1) カルボン酸の生物学的等価体とみなせるチアゾリジンジオン部位、2) チアゾリジンジオンと共役して結合している芳香環部位、ならびに 3) 両者の linker 部位であるアルケン部位、の 3 種の部分構造から成り立っている。そこで、1) チアゾリジンジオンの類縁体として、ロダニンならびに 2-(ピペリジン-1-イル)チアゾロ-4(5H)-オンを、2) 芳香環部位として各種 (無) 置換フェニル基およびナフチル基を、3) アルケン部位をアルキレン基に、それぞれ対応する部分構造を変換した各種誘導体の設計・合成を行った。続いて構造活性相関を検討するべく、前年度と同様に通常培地・血清欠乏培地・血清およびグルコース欠乏培地・栄養欠乏培地を利用して低栄養ストレスを順次負荷するように培地を用いて HT-29 細胞および PANC-1 細胞系での細胞毒性に関するスクリーニング試験、ならびに 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に供して、活性に関わる置換基などを明らかにしたリード化合物を得ることができた。今後はこのリード化合物をもとにして新たに構造関連研究を行っていくと同時に、HIF-1<math>\alpha</math> 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による実際の影響も検討していく。</p>					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題		
K. Oh-hash, S. Matsumoto, T. Sakai, Y. Hirata, K. Okuda, and H. Nagasawa	Effects of 2-(2-chlorophenyl)ethylbiguanide on ERAD component expression in HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition		
雑 誌 名	巻	発行年	ページ
<i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i>	188	2019	1009-1021

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
高木 晃、大橋憲太郎、 平田 洋子、奥田 健介	第 25 回癌治療増感研究会		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
小胞体ストレス応答を制御する化合物群の創製研究	2019.6.1.	高山市	

発 表 者	学 会 名		
Akira Takagi, Kentaro Oh-hash, and Kensuke Okuda	27 <sup>th</sup> International Society of Heterocyclic Chemistry Congress		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
Development of Drugs for Modulating Endoplasmic Reticulum Stress Response	2019.9.1.-6.	京都市	

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 生命分析化学研究室  
研究代表者職・氏名 教授・小林 典裕

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	講 師	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、アミロイド線維 (ApoA-I-fib) が形成される。この線維が組織へ沈着し、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、我々は 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) を調製した。さらに抗体 #7-5、#A4-18、#B40-5 について可変部遺伝子のクローニングを行い、アミノ酸配列を決定した。また、#7-5 を、遺伝子操作により一本鎖 Fv フラグメント (single-chain Fv fragment; scFv) に変換し、オワンクラゲ由来グリーン蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) との融合体を創製した。得られた融合体は、マイクロプレートに固定化した ApoA-I-fib に十分な結合能を持ち、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。一方、上記 4 種の抗体は、ApoA-I 分子の高凝集性領域を含む 3 ヶ所の領域 (14-22、32-40 及び 50-58 残基) を欠損したアミロイド線維にも反応性を示すことが判明した。また、ApoA-I と配列相同性がない <math>\alpha</math>-シヌクレインのアミロイド線維にも結合性を示したことから、アミロイド線維に共通の構造特性を認識することが示唆された。さらに、<math>\alpha</math>-シヌクレイン線維構造を用いたドッキングモデル解析の結果、開発した抗体は、<math>\alpha</math>-シヌクレインの凝集制御領域にある LYV 配列 (38-40 残基) が平行に折り重なった 4 次構造に結合することが示唆された。類似の配列領域は、ApoA-I の高凝集性領域 (VYV 配列: 17-19 残基) にも存在しており、ApoA-I-fib 構造中にも同様の 4 次構造が存在する可能性が高いと考えられる。</p> <p>以上の結果より、本研究で開発した抗 ApoA-I-fib 抗体は、アミロイド線維の共通構造を認識する可能性が高く、ApoA-I アミロイドーシスに限らず、様々なアミロイド関連疾患の診断ならびにアミロイド線維の微小構造解析への応用が可能と期待される。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Ohgita T., Furutani Y., Nakano M., Hattori M., Suzuki A., Nakagawa M., Naniwa S., Morita I., Oyama H., Nishitsuji K., Kobayashi N., Saito H.	Novel conformation-selective monoclonal antibodies against apoA-I amyloid fibrils			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
The FEBS Journal		2020	In press	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Oyama H., Morita I., Kiguchi Y., Kobayashi N.	European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine		
タイトル	開催日	開催場所	
In vitro affinity maturation of anti-cortisol antibodies to develop sensitive immunoassays	2019.05.20	Barcelona	

発表者	学会名		
Morita I., Oyama H., Tanaka R., Kikura-Hanajiri R., N. Kobayashi.	European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine		
タイトル	開催日	開催場所	
Generation of monoclonal antibodies for on-site analysis of psilocin and psilocybin in hallucinogenic mushrooms	2019.05.20	Barcelona	

発表者	学会名		
大山 浩之、森田いずみ、木口 裕貴、小林 典裕	日本分析化学会第 68 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
高感度免疫測定法の開発を目的とする抗コルチゾール抗体の試験管内親和性成熟	2019.09.13	千葉	

発表者	学会名		
大山 浩之、森田いずみ、砂川 偉皓、木口 裕貴、吉田 武美、上田 宏、小林 典裕	日本法中毒学会第 38 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
試験管内親和性成熟を目的とする抗メタンフェタミン硫酸抱合体一本鎖 Fv フラグメントの創製	2019.07.26~27	福岡	

発表者	学会名		
木口 裕貴、大山 浩之、森田いずみ、村山 佳穂、小林 典裕	日本薬学会第 140 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
V <sub>L</sub> 49 番システインの置換による抗コルチゾール scFv の抗原結合能の変化	2020.03.27	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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		メカノケミカル法によるシクロデキストリンと薬物との固相反応の検討			
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
	梶並 昭彦	神戸大学	工学部工学研究科	准教授	メカノケミカル法での固体の調製
	田中 将史	神戸薬科大学	薬学部	准教授	物性評価
	前田 秀子	神戸薬科大学	薬学部	講師	分光光学的な解析
共同研究の成果					
<p>トリアムテレン (TT) はカリウム保持性利尿薬で、高血圧や浮腫の治療の際にループ利尿薬やチアジド系利尿薬と併用して用いられる。しかしながら、TT は、水にほとんど溶けないため、被験者間のバイオアベイラビリティのバラツキが大きいことが知られている。</p> <p>そこで本研究では、シクロデキストリン (CD) と包接複合体を作ることで TT の水に対する溶解性を高めることを検討した。</p> <p>溶解度法の検討より <math>\beta</math>-CD および <math>\beta</math>-CD 誘導体を用いた場合、TT の溶解度が高くなることがわかった。特に SBE-<math>\beta</math>-CD を用いた場合、約 6 倍溶解度が上昇した。さらに SBE-<math>\beta</math>-CD について分光学的検討を行ったところ、TT は SBE-<math>\beta</math>-CD と安定な複合体を形成することがわかった。</p> <p>そこで、溶液中の TT/SBE-<math>\beta</math>-CD 複合体の構造を調べた。<math>^1\text{H}</math>-<math>^1\text{H}</math> ROESY NMR 測定の結果より、SBE-<math>\beta</math>-CD の 5 位のプロトンと TT のフェニル基のプロトンとの間にクロスピークが確認され、TT のフェニル基が SBE-<math>\beta</math>-CD の空洞内に包接されていることが示唆された。また、Job's plot から SBE-<math>\beta</math>-CD と TT は溶液中では 1:1 で複合体を形成していることがわかった。</p> <p>さらに物理的混合、混練、凍結乾燥、メカノケミカル法により、TT と SBE-<math>\beta</math>-CD との固体複合体が生成するかを調べた。XRD の結果より、<math>2\theta = 10, 21, 26^\circ</math> 付近に見られる TT に特徴的なピークが、メカノケミカル法を用いて作製した固体では、消失することがわかった。</p> <p>固体 <math>^{13}\text{C}</math> CP/MAS NMR 測定の結果より、メカノケミカル法を用いて作製した固体では、120-140 ppm 付近に見られるフェニル基のカーボンのピークがシャープになり、TT のフェニル基の部分が SBE-<math>\beta</math>-CD と相互作用していることがわかった。さらに SEM で固体複合体の表面を観察した。その結果、メカノケミカル法を用いて作製した固体は、微粒子化され、粒子径がそろっていることがわかった。</p> <p>最後に TT の原末とメカノケミカル法を用いて作製した固体複合体を用いて溶出試験を行った。TT 原末では、45 分後の溶出率が 20% 程度であったが、メカノケミカル法による固体複合体では、10 分程度ではほぼ 80% の溶出率を示すことがわかった。</p> <p>以上の結果より、メカノケミカル法により TT の溶解性を向上することが可能となった。このことから、TT の経口投与におけるバイオアベイラビリティも改善されることが期待される。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
前田 秀子, 塩原 綾麻, 田中 将史, 梶並 昭彦, 中山 尋量	日本薬学会第 140 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
シクロデキストリンによるトリアムテレンの溶解性の改善	2020/3/28	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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		高精度 LDL 受容体活性測定法の開発			
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
	上田 昌史	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	研究統括
	武田 紀彦	神戸薬科大学	薬 学 部	講 師	LDL 標識法の開発
	平田 健一	神戸大学大学院医学研究科	循環器内科学分野	教 授	LDL 検出法の開発
	杜 隆嗣	神戸大学大学院医学研究科	立証検査医学分野	特命准教授	LDL 単離法の開発
共同研究の成果					
<p>家族性高コレステロール血症 (Familial hypercholesterolemia : FH) は、LDL の取り込み能が低下することで、幼少期より LDL-C が高値を示し、高頻度で冠動脈疾患に罹患する生命予後が悪い疾患である。しかし、その確実な診断方法は未だ確立されておらず、FH を正しく診断することが難しいのが現状である。そこで本共同研究では、迅速・簡便かつ正確に LDL 受容体活性を評価できる測定系の開発を目指し、新規生体共役反応の基質となる化合物群の合成を行い、その機能性を評価することとした。</p> <p>生体共役反応として、LDL にシステインが多く含まれていること着目し、そのチオール部分の求核置換反応を利用することとした。脱離基としては、脱離能と安定性を考慮し臭素原子を選択した。一般に SN2 反応に対して高い反応性を示す第 1 級臭素化物を合成すれば迅速なチオールとの反応の進行を期待した。また、蛍光プローブ化への足掛かりとなる官能基として、カップリング反応に汎用される C(sp<sup>2</sup>)-Br を持たせた芳香族含窒素ヘテロ環化合物をデザインした。</p> <p>以上の考察を基に、合成ターゲットとなる新規生体共役反応の基質は、ピラゾール環を母骨格とし、4 位に臭素原子と、1 位に末端が臭素化されたアルキル基をもつ化合物とした。しかし、既存の合成法では、位置選択的な合成が困難であるため、新規合成法の開発を検討することとした。本骨格を選択的かつ効率的に合成できる手法として、アルキニルヒドラゾンの分子内求核付加反応と 2ヶ所の臭素化を同時に進行させる合成戦略を立て、まずは、最適条件を見出す検討から行った。イミン窒素上にピペリジンをもちアルキニルヒドラゾンを基質として、ニトロメタン還流中、臭化銅 (II) とリン酸三カリウムを用いて検討した。その結果、目的のジプロモピラゾールが生成したが低収率にとどまった。次に、クロロベンゼン還流中でリガンドの効果を検討することとした。様々なリガンドを検討した結果、バソクプロインが最適なリガンドであることが明らかとなり、収率も 55% まで向上した。続いて溶媒、添加剤を検討した。溶媒検討ではクロロベンゼンが最も良い結果を与えた。添加剤としてリン酸三カリウムを加えたところ、71% と収率の向上が見られた。</p> <p>本反応は、アルキニルヒドラゾンの三重結合に臭化銅 (II) が配位することでハロ環化が進行した後、臭化物イオンの求核攻撃によるピペリジン環の開環が進行することで、ジプロモピラゾールが生成したと考えている。</p> <p>次に基質適用範囲の検討を行なった。芳香環上に電子供与基、求引基いずれの置換基を持つ場合でも反応は進行した。また、モルホリン由来のヒドラゾンの場合は、水素結合受容体となるエーテル結合をもつジプロモピラゾールが収率良く得られた。</p> <p>本共同研究を開始して 1 年目であったため、予備的な検討に重点を置いて研究を進めてきたので、チオールとの反応など実用的な研究には至っていない。今後は、基質適用範囲の拡大、チオールとの求核置換反応、蛍光プローブ化を進めていく予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Keiji Konishi, Norihiko Takeda, Motohiro Yasui, Haruo Matsuzaki, Okiko Miyata, Masafumi Ueda	Copper-Catalyzed Cycloisomerization of Cyclopropenylimine for Synthesis of Pyrroles			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>J. Org. Chem.</i>	84	2019	14320-14329	

著者名	論文標題			
Norihiko Takeda, Narumi Arisawa, Misaki Miyamoto, Yukiko Kobori, Tetsuro Shinada, Okiko Miyata, Masafumi Ueda	Reagent-controlled Regiodivergence in the [3.3]-Sigmatropic Rearrangement of <i>N</i> -(Acyloxy)enamides			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Org. Chem. Front.</i>	6	2019	3721-3724	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
武田 紀彦、二木恵里佳、宮田 興子、上田 昌史	第17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	
アミドの極性転換反応： $\alpha$ 位および $\gamma$ 位への求核剤導入法の開発	2019.6.1	東京	

発表者	学会名		
武田 紀彦	第5回関西薬学シンポジウム：化学系の若い力		
タイトル	開催日	開催場所	
<i>N</i> -アルコキシアミドを用いた新分子変換法	2019.7.6	京都	

発表者	学会名		
松崎 大力、武田 紀彦、安井 基博、上田 昌史	第39回有機合成若手セミナー		
タイトル	開催日	開催場所	
ヒドラゾンの極性転換を利用した含窒素ヘテロ環の新規合成法の開発	2019.8.8	堺	

発表者	学会名		
Keiji Konishi, Motohiro Yasui, Norihiko Takeda, Masafumi Ueda	27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress		
タイトル	開催日	開催場所	
Copper-Catalyzed Synthesis of Multisubstituted Pyrroles by Cycloisomerization of Cyclopropenyl Oxime Ethers	2019.9.2	Kyoto	

発 表 者	学 会 名		
Haruo Matsuzaki, Yuta Ito, Nanae Nokubo, Mayu Yawata, Norihiko Takeda, Masafumi Ueda	27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Synthesis of Pyrazoles from Conjugated Hydrazone through Acid-Promoted $\beta$ -Protonation/Nucleophilic Addition/Cyclization/Aromatization sequence		2019.9.2	Kyoto

発 表 者	学 会 名		
武田 紀彦、木戸 友策、岸本 一希、安井 基博、上田 昌史	第 45 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
連続ヘテロ原子を有するラクタムを利用したアルキン導入を伴う連続反応の開発		2019.10.28	岡山

発 表 者	学 会 名		
Haruo Matsuzaki, Yuta Ito, Norihiko Takeda, Motohiro Yasui, Masafumi Ueda	International Joint Symposium on Synthetic Organic Chemistry		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Synthesis of pyrazoles from conjugated hydrazone through acid-promoted $\beta$ -protonation/nucleophilic addition/cyclization/aromatization sequence		2019.11.22	Awaji

発 表 者	学 会 名		
Keiji Konishi, Motohiro Yasui, Norihiko Takeda, Masafumi Ueda	International Joint Symposium on Synthetic Organic Chemistry		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Copper-Catalyzed Synthesis of Multisubstituted Pyrroles by Cycloisomerization of Cyclopropenyl Oxime Ethers		2019.11.22	Awaji

発 表 者	学 会 名		
安井 基博、中尾 琴音、長谷川万輝、田中 義展、武田 紀彦、上田 昌史	日本薬学会第 140 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
連続的閉環 - 開環反応による構造多様性指向型イソキサゾロン合成法の開発		2020.3.26	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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、化学的及び免疫化学実験
	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
	浅野 真司	立命館大学	総合科学技術研究機構	客員教授	生理的研究
	中張 隆司	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	免疫化学の実験	
共同研究の成果					
<p>本研究は、消化管粘膜上皮、特に腸内分泌細胞に発現している各種化学物質受容細胞とその刺激により分泌される各種脳腸ホルモンを介した脳-腸相関及び各臓器間ネットワークを介したエネルギー代謝制御機構を明らかにすることを目的としている。近年、エネルギー代謝制御に関与する消化管ペプチドとして注目されている xenin の特異 ELISA の確立に成功し、本 ELISA 法を用い糖尿病肥満マウス消化管における IR-xenin について検討した。その結果、マウスにおいて IR-xenin は上部小腸に局在し、その発現は肥満や糖尿病で変動することが示唆された（第40回日本肥満学会、東京、2019年11月）。</p> <p>短鎖脂肪酸の一つであるプロピオン酸は、遠位結腸において腸管神経系を活性化し、求心性神経、介在神経及び遠心性神経からなる神経反射回路を経て管腔へのイオン分泌を起こすことが知られている。このイオン分泌反応は、二相性であり、一過性の <math>K^+</math> 分泌に次いで <math>Cl^-/HCO_3^-</math> が起こる。この反応の遠心性経路はコリン作動性神経を介する反応であるが、求心性の経路の同定は行われていない。プロピオン酸は腸内分泌細胞の一つである L 細胞に発現する短鎖脂肪酸受容体 FFA2/3 によって受容され、グルカゴン様ペプチド (GLP) -1 及び 2 の分泌を促進することから、分泌された GLP-1/2 は感覚神経を活性化することが考えられる。また、感覚神経の主要な神経伝達物質としてタキキニンが挙げられ、その受容体であるニューロキニン受容体 1 及び 3 が求心性経路に関与することが考えられる。本研究では、これらのペプチドとその受容体の短鎖脂肪酸によるイオン分泌反応の求心性神経反射経路への関与を検討した。ラット遠位結腸筋層の粘膜-粘膜下組織標本を用い Ussing chamber 法により短絡電流を測定してイオン輸送の指標として評価検討した。その結果、プロピオン酸によるイオン分泌反応の求心性神経反射経路は、GLP-2 やタキキニン介する経路であることが示唆された（第69回日本薬学会関西支部総会・大会、神戸、2019年10月、日本生理学会第112回近畿生理学談話会、草津、2019年11月）。</p> <p>更に、GLP-2 は CM 経路を介して脂質吸収を促進するが、一方で LPS の体循環への移行を阻害するがその経路は明らかになっていない。そこで本研究はラット空腸標本を用いて Ussing chamber 法による電気的パラメーターや還流法などで評価検討した。その結果、管腔内 LPS は CD36 及び脂質ラフトを介する経路で門脈に輸送され、GLP-2 はその LPS の門脈への取り込みを阻害することを明らかにした (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 318 (6) :G1070-G1087)。これらの知見は、「腸-肝臓軸」を介した全身性炎症の軽減に関連する新しい発見であり、LPS はメタボリックシンドローム、敗血症などの病因に関与しているため、CD36、脂質ラフト、および GLP-2 受容体は、LPS 関連疾患の予防のための治療標的となる可能性あると考える。</p>					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
多河 典子、浅野 真司、 中張 隆司、桑原 厚和、 丸中 良典、加藤 郁夫	第 40 回日本肥満学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
腸管ペプチド xenin の ELISA 法の確立とマウス小腸組織での定量		2019.11.3	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 生命有機化学研究室  
研究代表者職・氏名 教授・山野 由美子

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	カロテノイド酸化代謝物の合成と生理作用に関する研究				
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
	山野 由美子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	化合物合成と全体の統括
	沖津 貴志	神戸薬科大学	薬学部	講師	化合物合成
	細川 雅史	北海道大学大学院	水産科学研究院	教授	生理作用の評価
共同研究の成果					
<p>カロテノイドは、抗酸化作用をはじめ多くの生理作用が認められることからヒトにとって有用な食品成分である。生体内においては、末端の環構造部分が様々な代謝を受けるほか、その一部は、側鎖二重結合部の酸化開裂を受けて代謝されることが知られており、代謝物の生理作用について近年注目されている。しかし、天然から得られるこれらの代謝物はごく微量であるため、作用メカニズムや種々の有用な生理作用の評価を行うことは難しく、さらなる研究の推進と応用展開には調製法の確立が必要であった。そこで、本研究では、個々のカロテノイドに特徴的な末端の環構造部分に二重結合部分の長さの異なる側鎖を導入したアナログを系統的に化学合成して、その生理作用について調べることにした。</p> <p>本年度は、ワカメやヒジキなどの褐藻類に多く含まれ、エポキシ環、共役ケトン、アレン構造など特徴的な構造をもつカロテノイドで、共同研究者が有用な生理作用を種々有することを明らかにしてきたフコキサンチンに着目した研究を行なった。</p> <p>まず、エポキシ環とヒドロキシ基を有する末端環構造部分に相当する炭素数11個のアルデヒドに対して別途調製した炭素数4個のビニルリチウム試薬を付加させて得られる化合物から、順次共役側鎖を延長し、種々の官能基変換を行なって、フコキサンチンの8'位、10'位、12'位の二重結合部の酸化開裂物に相当する3種類のアポフコキサンチナール類を合成した。</p> <p>次に、これらの生理作用として様々な疾病の発症基盤となる炎症に対する抑制効果をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いて調べた。リポポリサッカライド刺激によって、炎症性サイトカイン IL-6、IL-1<math>\beta</math> の mRNA 発現や IL-6 タンパク分泌はコントロールでは顕著に増加するが、10'- および 12'-アポフコキサンチナールを添加した細胞では抑制作用を示し、その作用はフコキサンチンの生体内代謝物であるフコキサンチノールと同程度であることがわかった。一方、8'-アポフコキサンチナールは抑制作用を示さなかった。また、抗炎症作用に関わる抗酸化酵素 HO-1 の mRNA 発現量についても調べた結果、10'- および 12'-アポフコキサンチナールの添加によって発現量は濃度依存的に増加し、その作用はフコキサンチノールよりも顕著に強いことがわかった。</p> <p>以上より、フコキサンチンの10'位および12'位二重結合部の酸化開裂物では炎症抑制能は維持されている一方、抗酸化酵素発現促進作用を新たに発揮する可能性が示唆された。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
N. Takatani, Y. Kono, F. Beppu, Y. Okamatsu-Ogura, Y. Yamano, K. Miyashita, M. Hosokawa	Fucoxanthin inhibits hepatic oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model mice			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biochem. Biophys. Res. Commun.	528	2020	305-310	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
高谷 直己、別府 史章、 沖津 貴志、山野由美子、 和田 昭盛、宮下 和夫、 細川 雅史	第 33 回カロテノイド研究談話会		
タイトル		開催日	開催場所
アポフコキサントノイドによる炎症抑制機構解析		2019.09.22	千葉

発表者	学会名		
岡田 夕鶴、沖津 貴志、 和田 昭盛、高谷 直己、 細川 雅史、山野由美子	日本薬学会第 140 年会		
タイトル		開催日	開催場所
Fucoxanthin 酸化代謝物の合成と抗炎症効果		2020.03.26	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	妊娠に伴う神経系の可塑的变化				
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・遺伝子発現解析
	瀬木(西田) 恵里	東京理科大学	基礎工学部	准教授	細胞新生・生理学的解析
	中川 公恵	神戸薬科大学	薬学部	准教授	脳の形態変化・遺伝子解析
	北條 寛典	神戸薬科大学	薬学部	助教	末梢組織の組織学的解析
共同研究の成果					
<p>本研究においては、妊娠時の母体の組織構造変化とそれに伴う母体神経系の変化について明らかにすることを目的とした。</p> <p>① T細胞の分化・発育を担うことで細胞性免疫の中心として機能する胸腺は様々な刺激(生体ストレス)により退縮することが知られている。妊娠もそのような胸腺の退縮を引き起こすことが知られる生体ストレスの一つである。我々はマウスにおける妊娠時の胸腺退縮を検討した。時間的経過を追ったところ、妊娠後(膣栓確認後)7～10日目に胸腺のサイズ縮小が始まり、出産に至るまで縮小し続けることが分かった。この時の組織構造を観察したところ、皮質と髓質の境界線が崩れていること、また未妊娠時は髓質に限局しているIba1陽性細胞が、妊娠胸腺では皮質と髓質の両者に見られることが分かった。Iba1陽性細胞はおそらく活性化マクロファージだと思われるが、現在のところ抗F4/80抗体での染色像がきれいに得られていないため、今後更に確認を進めていく予定である。</p> <p>② 胸腺に投射する神経軸索のリモデリングを引き起こす可能性がある分子の探索を行うために、退縮胸腺及びコントロールとしての未妊娠胸腺からRNAを調製し、定量的RT-PCRを行った。その結果、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)及びGlial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の他、Semaphorinファミリー遺伝子の一部が退縮胸腺において高い発現を示すことが分かった。また形態学的解析により、PGP9.5陽性神経細胞が退縮胸腺で密になっていることが観察できた。抗PGP9.5抗体の染色では神経線維の細かい構造まで可視化することが難しいため、末梢神経細胞で特異的にCre recombinaseを発現するAdvillin-Creマウス及びレポーターとしてのRosa-Tomatoマウスを理化学研究所、熊本大学よりそれぞれ導入し、現在交配を進めているところである。</p> <p>③ 妊娠中には腹部皮膚の表面積が劇的に増加する。この際に、増大した皮膚組織において末梢神経の軸索伸長が起きているのかを組織学的及び分子生物学的に解析した。しかし、末梢神経の軸索伸長が起きていることを示す結果は得られなかった。</p> <p>④ エストラジオール製剤の服用は、脳梗塞や心筋梗塞のリスクを上昇させることが知られている。我々は、血管性認知症のモデルと考えられる光血栓性脳梗塞モデルの実験系を用いてきた。これを用いて、妊娠中の脳内血管閉塞がどのような予後をもたらすのか、それが未妊娠の時と異なるのかを検討する目的で、モデルの最適化を進めてきた。その結果、再現性の非常に高いモデル作製の方法が確立した。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
長谷川 潤、北條 寛典、 長田 理沙、Nurhanani Razali、中川 公恵、 瀬木-西田恵里	第92回日本生化学会大会		
	タイトル	開催日	開催場所
	妊娠初期のフタル酸エステル摂取による子宮の組織化学的变化	2019年9月18日	横浜

発表者	学会名		
外園 さや、坂本菜緒子、 濱元 千明、北條 寛典、 瀬木-西田恵里、中川 公恵、 長谷川 潤	第69回日本薬学会関西支部例会・大会		
	タイトル	開催日	開催場所
	妊娠時の末梢組織における軸索伸長機構の解明	2019年10月12日	神戸

発表者	学会名		
近藤 まゆ、齊藤 直人、 北條 寛典、瀬木-西田恵里、 中川 公恵、長谷川 潤	第69回日本薬学会関西支部例会・大会		
	タイトル	開催日	開催場所
	妊娠が海馬における細胞増殖に与える影響の解析	2019年10月12日	神戸

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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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。galnt17については、機能解析を目的として、galnt17を標的としたゲノム編集を行い、F0モザイク胚において80%以上のgalnt17遺伝子に変異が導入され、初期発生でgalnt17ノックダウン胚と同様に後脳発生に異常が起こる事を見出した。我々はさらに、F1ヘテロ変異体同士、F2ホモ変異体同士を掛け合わせてgalnt17ノックアウト個体を作製したが、表現型が回復し、異常が認められないことが分かった。最近、ある遺伝子の欠失による表現型異常が、その遺伝子と相同性の高い遺伝子の発現亢進により補完される機構の存在が報告された(Nature.2019.MA.El-Brolosy).galnt17欠失個体においても同様の補完機構が働いた可能性を調べるために、他のアインザイムの発現を定量的PCRにて確認したところ、galnt17と同じサブファミリーに属するgalnt8とgalnt9の発現が亢進していた。そこで次に、galnt17と相同性が最も高く、組織発現のパターンも似ているgalnt9を、galnt17と共に欠失した二重変異体を作製したが、表現型は正常であった。この事はgalnt9がgalnt17の機能を補完していないことを示している。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
山口 裕樹、中村 直介、 中山 喜明、小西 守周、 黒坂 光	日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会		
タイトル		開催日	開催場所
脊椎動物の脳におけるポリペプチド N アセチルガラクトサミン転移酵素 17 の機能解析		2019年12月4日(水)	博多

発表者	学会名		
中村 直介、辻本 優季、 中山 喜明、小西 守周、 黒坂 光	日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会		
タイトル		開催日	開催場所
ゼブラフィッシュにおける脊椎動物特異的ムチン型糖鎖合成酵素の多重欠 失体作製		2019年12月6日(金)	博多

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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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>非アルコール性脂肪性肝疾患は脂肪肝から脂肪性肝炎・肝硬変を経て肝癌へと病態が多段階に進行する病気である。病態の悪化には、脂肪肝から脂肪性肝炎への移行の段階であると考えられているが、この移行を引き起こし、炎症の慢性化を誘導する責任分子については解明されていない。</p> <p>硫酸化グリコサミノグリカンはサイトカインや受容体との相互作用を介して免疫反応を調節し生体の恒常性維持に関わることが知られている。硫酸化グリコサミノグリカンの生合成を調節する酵素の一つとして Exostosin-like 2 (EXTL2) が存在する。これまでに、EXTL2 を欠損させたマウスで起こる硫酸化グリコサミノグリカンの合成異常が、四塩化炭素による急性肝炎やリン負荷における血管の石灰化に密接に関連することを報告してきた。今回、野生型マウス及び EXTL2 ノックアウト (EXTL2-KO) マウスを用いて非アルコール性肝炎モデルを作り、各病態ステージを比較した結果、EXTL2-KO マウスでは野生型マウスよりも早い段階で肝細胞癌のステージへ移行することがわかった。脂肪性肝炎のステージにおいて炎症性サイトカイン (TNF-<math>\alpha</math> や IL-1<math>\beta</math>) の発現が EXTL2-KO マウスで有意に上昇していた。炎症性サイトカイン産生細胞であるマクロファージについて調べたところ、予想通り、炎症性サイトカインの産生が亢進していた。さらに、炎症性サイトカインの産生に関わる Toll-like receptor 4-NF<math>\kappa</math>B 経路について調べた結果、EXTL2 欠損下で合成される硫酸化グリコサミノグリカン鎖がこの経路を直接活性化することがわかった。以上の結果から、EXTL2 欠損によって合成された異常な硫酸化グリコサミノグリカン鎖が“くすぶるような低いレベルの炎症”を惹起し、これが慢性炎症の土壌を作り、非アルコール性肝疾患の進行に関与する可能性が示唆された。</p> <p>また、我々はこれまでに、親水性リンカーを介してビオチンを共有結合させた、同じ型で構成される数種類のコンドロイチン硫酸四糖を化学合成してきた。さらに、これらを用いてシグナルタンパク質やコンドロイチン硫酸に対する特異的抗体との相互作用を分子レベルで明らかにしてきた。今回、位置選択的硫酸化を経て、異なる型で構成されるビオチン化コンドロイチン硫酸四糖：<math>\beta</math> GalNAc4S (1-4) <math>\beta</math> GlcA (1-3) <math>\beta</math> GalNAc6S (1-4) <math>\beta</math> GlcA2S (CS-AD) と、<math>\beta</math> GalNAc6S (1-4) <math>\beta</math> GlcA2S (1-3) <math>\beta</math> GalNAc4S (1-4) <math>\beta</math> GlcA (CS-DA) を初めて化学合成した。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Nadanaka, S., Hashiguchi, T., and Kitagawa, H.	Aberrant glycosaminoglycan biosynthesis by tumor suppressor EXTL2 deficiency promotes liver inflammation and tumorigenesis through Toll-like 4 receptor signaling.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
FASEB J.	34	2020	8385-8401	

著者名	論文標題			
Akasaka-Manyu, K., Manyu, H., Nadanaka, S., Kitagawa, H., Kondo, Y., Ishigami, A., and Endo, T.	Decreased ADAM17 expression in the lungs of <i>a</i> -Klotho reduced mouse.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
J. Biochem.	167	2020	483-493	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
灘中 里美、宮田 真路、田村 純一、北川 裕之	第 38 回日本糖質学会年会		
タイトル	開催日	開催場所	
神経可塑性に関わるセマフォリン 3A が認識する糖鎖構造の解析	2019/8/19	名古屋	

発表者	学会名		
田村 純一、上村明寿美、松下 健也、中田 有美、灘中 里美、北川 裕之	第 38 回日本糖質学会年会		
タイトル	開催日	開催場所	
ビオチン化コンドロイチン硫酸四糖の合成とその分子親和性	2019/8/19	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	脳機能保護および修復に関する薬理学的研究				
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
	小山 豊	神戸薬科大学	薬学部	教授	脳損傷・脳梗塞
	久米 利明	富山大学	薬学部	教授	脳梗塞・アルツハイマー病
	八巻 耕也	神戸薬科大学	薬学部	准教授	精神疾患（自閉症）
	泉 安彦	神戸薬科大学	薬学部	講師	パーキンソン病
共同研究の成果					
<p>脳疾患の多くは難治性で、画期的な予防・治療法の開発が求められている。中枢神経系を構成する細胞には、神経細胞とその維持や再生に関与するアストロサイトやミクログリアといったグリア細胞が存在する。また神経-血管-グリア相互作用も脳機能の調節に重要な役割を果たす。さらに、脳と腸は自律神経系やサイトカインなどを介して密接な情報のやり取りがある。本研究では脳疾患の病態形成における神経細胞以外の寄与に注目し、非神経細胞が神経細胞傷害に与える役割を明らかにすることを目的とした。研究代表者の小山は、これまでに脳損傷時に上昇するエンドセリンがエンドセリン ETB 受容体を介してアストロサイトの活性化を誘導し、血管原生浮腫が生じることを明らかにしてきた。さらに、エンドセリン ETB 受容体拮抗薬は、アストロサイトの angiopoietin-1/Tie-2 シグナルおよび Na/K/Cl 共輸送体の発現低下を介して脳浮腫を抑制することを解明しており、脳機能保護薬としての可能性が期待される。富山大学の久米は、アストロサイトが神経保護作用に寄与する機序について検討した。その結果、アストロサイトから分泌されるケモカイン CCL6 がホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 経路の活性化を誘導することで神経保護作用を示すことが明らかになった。また、神戸薬科大学の泉が見出した青ジソ由来化合物がアルツハイマー病との関連の深いアミロイドβ (Aβ) 誘発神経細胞死を抑制することを報告した。さらに、この神経保護作用には、青ジソ由来化合物が有する Aβ 凝集抑制作用が重要であることを明らかにした。神戸薬科大学の八巻は、免疫細胞が関与するアレルギーと精神疾患との関連について、hairless 変異を有する HR マウスを用いて検討した。HR マウスでは IgE 依存的アナフィラキシー反応が増強することを確認した。また、HR マウスは行動学的解析により精神機能への影響も有することから、末梢の免疫細胞と精神疾患の関連が示唆される。神戸薬科大学の泉は、第Ⅱ相解毒酵素や抗酸化遺伝子の発現誘導に関与する Nrf2 活性化薬がパーキンソン病モデルマウスにおいて、ドパミン神経保護作用を示すことを組織学的および行動学的に明らかにした。この神経保護作用には、アストロサイトにおけるヘムオキシダーゼ-1 の発現誘導が関与することを報告した。さらに、この Nrf2 活性化薬はミクログリアの炎症性活性化を抑制することでも、ドパミン神経保護作用に寄与することを見出した。本共同研究の成果として、脳疾患は神経機能が障害を受けることで発症するが、神経以外の細胞の関与が重要であることが改めて明らかになった。さらに、非神経細胞の機能を調節することで脳疾患の克服が可能であることが示唆され、有望な治療標的を見出すことができた。</p>					

<研究論文>

著者名	論文標題			
Nakagawa S, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T.	Increased CCL6 expression in astrocytes and neuronal protection from neuron-astrocyte interactions.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biochem Biophys Res Commun.	519	2019	777-782	

著者名	論文標題			
Iwasaki M, Izuo N, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T.	Protective Effect of Green Perilla-Derived Chalcone Derivative DDC on Amyloid $\beta$ Protein-Induced Neurotoxicity in Primary Cortical Neurons.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biol Pharm Bull.	42	2019	1942-1946	

著者名	論文標題			
Koyama Y., Sumie S., Nakano Y., Nagao T., Tokumaru S., Michinaga S.	Endothelin-1 Stimulates Expression of Cyclin D1 and S-phase Kinase-Associated Protein 2 by Activating the Transcription Factor STAT3 in Cultured Rat Astrocytes.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
J Biol Chem.	294	2019	3920-3933	

<総説>

著者名	論文標題			
Michinaga S., Koyama Y.	Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function After Brain Damage			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Int J Mol Sci.	20	2019	571	

<学会発表>

発表者	学会名		
道永昌太郎、井上 杏奈、山本 隼人、龍 亮太郎、水口 博之、小山 豊	第135回日本薬理学会近畿部会		
タイトル	開催日	開催場所	
エンドセリン受容体拮抗薬 Bosentan による頭部外傷後の血管原生脳浮腫に対する抑制効果	2019/6/21	岐阜	

発表者	学会名		
猪瀬 由莉、泉 安彦、片岡 春恵、小山 豊、金子 周司、久米 利明	第135回日本薬理学会近畿部会		
タイトル	開催日	開催場所	
新規 Nrf2-ARE 活性化物質のヘムオキシゲナーゼ-1 を介した抗パーキンソン病作用	2019/6/21	岐阜	

発 表 者	学 会 名		
松本 真実、宮本 萌里、 澤幡 雅仁、小田 果奈、 泉 安彦、赤池 昭紀、 久米 利明	第 135 回日本薬理学会近畿部会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
低酸素処置によるゼブラフィッシュ脳虚血モデルの作出と薬効評価系の構築		2019/6/21	岐阜

発 表 者	学 会 名		
道永昌太郎、田邊 彩美、 山本 隼人、龍 亮太郎、 水口 博之、小山 豊	生体機能と創薬シンポジウム 2019		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
エンドセリン ETB 受容体拮抗薬 BQ788 による頭部外傷マウスにおける血管修復因子 Angiotensin-1 の発現増加および Tie-2 受容体の活性化		2019/8/29	東京

発 表 者	学 会 名		
立本 愛、泉 安彦、 有福 萌波、堀内奈緒子、 杉山 峰是、井川紗央里、 八巻 耕也、久米 利明、 小山 豊	生体機能と創薬シンポジウム 2019		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
ミクログリアにおける Nrf2-ARE 経路活性化物質による炎症性サイトカインの抑制作用とその機序の解析		2019/8/30	東京

発 表 者	学 会 名		
猪瀬 由莉、泉 安彦、 片岡 春恵、小山 豊、 金子 周司、久米 利明	次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2019		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
新規 Nrf2-ARE 活性化物質のヘムオキシゲナーゼ-1 を介したドパミン神経保護作用		2019/8/31	東京

発 表 者	学 会 名		
福澤 萌香、泉 安彦、 木下 慎一、西峠 和馬、 一村 涼夏、小山 豊、 金子 周司、久米 利明	次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2019		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
DAT 遺伝子へのインテグリン $\alpha 5$ 遺伝子ヘテロノックイン ES 細胞の作製と神経分化効率に関する検討		2019/8/31	東京

発表者	学会名		
立本 愛、泉 安彦、 有福 萌波、堀内奈緒子、 杉山 峰是、井川紗央里、 八巻 耕也、久米 利明、 小山 豊	次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2019		
タイトル		開催日	開催場所
ミクログリアにおける新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質による炎症性サイトカインの抑制作用とその機序の解析		2019/8/31	東京

発表者	学会名		
八巻 耕也、小山 豊	第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会		
タイトル		開催日	開催場所
IgA の感作抑制作用と並行して誘導される B 細胞活性化抑制と抗原分布変化		2019/10/12	神戸

発表者	学会名		
泉 安彦、立本 愛、 有福 萌波、堀内奈緒子、 杉山 峰是、井川紗央里、 八巻 耕也、久米 利明、 小山 豊	第 136 回日本薬理学会近畿部会		
タイトル		開催日	開催場所
Nrf2 活性化薬によるミクログリア活性化の抑制作用とその機序解析		2019/11/23	大阪

発表者	学会名		
小山 豊、濱田 靖祥、 井高佐知子、長田 彩夏、 道永昌太郎	第 136 回日本薬理学会近畿部会		
タイトル		開催日	開催場所
エンドセリン ETB 受容体を介するアストロサイト Na-K-Cl 共輸送体 -1 (NKCC1) の発現増加		2019/11/23	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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	老化疾患の病態形成機構の解明と制御				
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
	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	講師	細胞培養と解析
	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>本研究では、神経系と脳血管系との相互作用に焦点を当てて認知症の病態形成機構を解明して新規治療標的を探索するとともに、免疫系の役割に焦点を当てて動脈硬化の形成機構を解明して新規治療標的を探索した。</p> <p>(1) アルツハイマー病の病態形成機構: 脳では神経系と脳血管系の間相互作用が存在し、機能的ユニット(神経血管ユニット)を構成しており、アルツハイマー型認知症などの神経変性疾患では、この神経血管ユニットの機能破綻がみられる。血管老化によって神経血管ユニットが破綻するか明らかにするために、血管内皮特異的に TERF2-dominant negative 体を過剰発現する血管内皮特異的的老化マウス(TIE2-TERF2DN-Tg)を用いて血管透過性について検討した。3ヶ月齢の TIE2-TERF2DN-Tg マウスではアストロサイトの活性化が見られ、血管透過性を制御しているアクアポリン-4の局在が変化していたが、血管透過性は亢進していなかった。また、アルツハイマー型認知症の病態形成機構における血管老化の役割を明らかにするために、TIE2-TERF2DN-Tg マウスとアルツハイマー病モデルマウス(PSAPP マウス)を交配して血管老化アルツハイマー病モデルマウス(TIE2-TERF2DN-Tg/PSAPP)を作出し、認知機能について解析した。Aβプラークが形成され始める6ヶ月齢では、PSAPP マウス、TIE2-TERF2DN-Tg/PSAPP マウスともに認知機能は低下していなかった。</p> <p>(2) 動脈硬化抑制に関わる分子の探索: 動脈硬化の病態形成におけるケモカイン受容体 CCR4 の役割を明らかにするために、動脈硬化モデルマウスに CCR4 の阻害薬を投与し、免疫応答および動脈硬化病変について解析した。阻害薬の投与により、動脈硬化血管周囲のリンパ組織において、抗炎症作用を有する制御性 T 細胞(Treg)の減少とともに、動脈硬化病変の形成が促進される傾向を認めた。さらに、この分子の遺伝子欠損マウスと動脈硬化モデルマウスを交配して作出したマウスの表現型の解析を進めている。</p> <p>(3) 炎症制御による動脈硬化の新規治療法の開発: 発光ダイオードの技術を生かした特定波長の紫外線 B 波(UVB)照射装置を用いて、動脈硬化モデルマウスに UVB を照射し、Treg の誘導と動脈硬化の抑制に有効な波長を探索した。Treg の誘導に有効な UVB 波長を見出し、その照射により動脈硬化病変の形成は有意に抑制された。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
渡辺奈津子、堀部 紗世、 岸本 星都、船越 恵美、 森本万智子、池田 宏二、 江本 憲昭、河内 正二、 佐々木直人、平田 健一、 力武 良行	第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会		
タイトル		開催日	開催場所
ミクログリア活性化における脳血管内皮細胞老化の役割		2019/10/12	神戸

発表者	学会名		
岸本 星都、堀部 紗世、 船越 恵美、森本万智子、 渡辺奈津子、河内 正二、 佐々木直人、池田 宏二、 江本 憲昭、平田 健一、 力武 良行	第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会		
タイトル		開催日	開催場所
アルツハイマー病モデルマウスの成熟期における認知機能に対する血管内皮細胞老化の影響		2019/10/12	神戸

発表者	学会名		
Hilman Zulkifli Amin, Naoto Sasaki, Sayo Horibe, Shoji Kawauchi, Kazuhiko Matsuo, Takashi Nakayama, Yoshiyuki Rikitake.	The 91st AHA Scientific Sessions		
タイトル		開催日	開催場所
Pharmacological blockade of C-C chemokine receptor 4 exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.		2019/11/16	米国、 フィラデルフィア

発表者	学会名		
森本万智子、堀部 紗世、 岸本 星都、船越 恵美、 渡辺奈津子、河内 正二、 佐々木直人、池田 宏二、 江本 憲昭、平田 健一、 力武 良行	第 42 回日本分子生物学会年会		
タイトル		開催日	開催場所
脳血管内皮細胞老化からの SASP を介したミクログリアの活性化		2019/12/5	福岡

発表者	学会名		
佐藤加奈子、河内 正二、 杉原 成美、高杉晃太郎、 堀部 紗世、佐々木直人、 池田 宏二、江本 憲昭、 平田 健一、力武 良行	日本薬学会第 140 年会		
タイトル		開催日	開催場所
血管内皮特異的老化マウスにおける脳血管周囲への AQP4 の局在低下		2020/3/28	京都

発表者	学 会 名		
森本万智子、堀部 紗世、 岸本 星都、船越 恵美、 渡辺奈津子、河内 正二、 佐々木直人、池田 宏二、 江本 憲昭、平田 健一、 力武 良行	日本薬学会第 140 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
ミクログリアの活性化における脳血管内皮細胞老化の役割		2020/3/28	京都

発表者	学 会 名		
船越 恵美、堀部 紗世、 岸本 星都、森本万智子、 渡辺奈津子、河内 正二、 佐々木直人、池田 宏二、 江本 憲昭、平田 健一、 力武 良行	日本薬学会第 140 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
アルツハイマー病の病態形成における脳血管内皮細胞老化の役割		2020/3/28	京都

発表者	学 会 名		
嶋本 美咲、佐々木直人、 野口 恵美、有地 珠里、 大内友梨香、 Hilman Zulkifli Amin 、 堀部 紗世、河内 正二、 松尾 一彦、中山 隆志、 平田 健一、力武 良行	日本薬学会第 140 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
ケモカイン受容体 CCR4 の阻害薬投与による動脈硬化モデルマウスの病変形成の促進		2020/3/28	京都

発表者	学 会 名		
大内友梨香、佐々木直人、 有地 珠里、嶋本 美咲、 野口 恵美、 Hilman Zulkifli Amin 、 堀部 紗世、河内 正二、 平田 健一、力武 良行	日本薬学会第 140 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
動脈硬化モデルマウスにおける病変形成抑制に有効な紫外線 B 波の波長の特定		2020/3/28	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 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

2019年7月4日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2020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>生理活性物質は、生物の生理に特有な作用を示し、身体を調節する役割を有するため、生体に対して重要な役割を果たす。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的として研究を行った。その結果、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できる分析法を確立した。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、脊髄性筋萎縮症 (SMA) 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 定量法を確立した。さらに、それらの尿中含有量と疾患との関係から診断と治療効果の判定に適応可能かどうかについて検討した。その成果を日本医用マススペクトル学会や日本薬学会年会で報告した。今後は疾患の治療薬を開発することを目的として、影響を及ぼす化合物の検索を継続して行う予定である。</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て研究を行った。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ている。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。今後はロキソプロフェンNa製剤中の主成分の結晶変化について、継続して検討する予定である。</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て研究を行った。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研究を行った。乾燥血液スポット (DBS) は、血液サンプルを採取、運搬、保管するための簡単な手法であり、サンプル量が最小限ですむことから、DBSへの関心が高まっている。SMAの診断にDBSを用い、新たなスクリーニング法を確立した。その成果を Kobe J. Med. Sci. で論文として報告した。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Takeuchi A., Tode C., Nishino M., Wijaya Y.O.S., Niba E.T.E., Awano H., Takeshima Y., Saito T., Saito K., Lai P.S., Bouike Y., Nishio H., Shinohara M.	Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy: DNA Preparation from Dried Blood Spot and DNA Polymerase Selection in PCR.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Kobe J. Med. Sci.</i>	65	2019	E95-E99	

著者名	論文標題			
Shinohara M., Niba E.T.E., Wijaya Y.O.S., Takayama I., Mitsuishi C., Kumasaka S., Kondo Y., Takatera A., Hokuto I., Morioka I., Ogiwara K., Tobita K., Takeuchi A., Nishio H., for the SMA-NBS PILOT STUDY Group	A Novel System for Spinal Muscular Atrophy Screening in Newborns: Japanese Pilot Study.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Int. J. Neonatal Screen.</i>	5	2019	41-53	

〈総説〉

著者名	論文標題			
都出 千里、竹内 敦子、 岡本健太郎、西尾 久英、 齊藤 利雄、篠原 正和	脊髄性筋萎縮症治療薬剤の開発			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Precision Medicine</i>	2	2019	1275-1282	

著者名	論文標題			
倉重 毅志、大下 智彦、 竹内 敦子、岡本健太郎、 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解析 - SMN1 遺伝子内変異 p.Ala2Val に関連して -			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>BIO Clinica</i>	34	2019	1054-1061	

著者名	論文標題			
岡本健太郎、竹内 敦子、 西尾 久英、加藤 雅子、 坊池 芳裕、齊藤 利雄、 篠原 正和	脊髄性筋萎縮症の医学的管理			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>BIO Clinica</i>	34	2019	1165-1172	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
竹内 敦子、都出 千里、 西尾 久英	日本薬学会第 140 年会		
	タイトル	開催日	開催場所
	UGT1A1 活性が薬物代謝に及ぼす影響の検証	2020/3/26	京都

発表者	学会名		
竹内 敦子、都出 千里、 西尾 久英	第 44 回日本医用マススペクトル学会		
	タイトル	開催日	開催場所
	Survival of motor neuron (SMN) タンパク質の定量	2019/9/13	名古屋