

共同研究 研究紀要

2022
(2021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。

2021 年度共同研究（研究期間 2021.4.1 ～ 2022.3.31）

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	腫瘍溶解性ウイルスと微粒子性抗がん剤の併用による高効率ながん治療法の開発	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	病態診断・治療に資する薬剤開発研究	薬品物理化学研究室 教 授 向 高弘
5	輸送工学および共培養によるアルカロイド大量生産系の構築	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	アミロイド病を標的とした構造特異抗体の開発と生体イメージングへの展開	生命分析化学研究室 教 授 小林 典裕
8	シクロデキストリンを用いたモノフェノール化合物の取り込み、溶解性、安定性の改善	機能性分子化学研究室 教 授 中山 尋量
9	ヘテロ環骨格の新規構築法の開発を基盤とした革新的機能性分子の創製	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	酸触媒を用いる環式化合物の高効率合成と理論解析	生命有機化学研究室 教 授 波多野 学
12	脳疾患の病態制御に関わる分子メカニズムの解明	衛生化学研究室 教 授 長谷川 潤
13	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
14	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
15	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
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

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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
	田 中 晶 子	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	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					
癌の骨転移は、身体の一部にできたがん細胞が血液の流れにのって、骨に転移し、そこでがん細胞が増殖することで発生する。骨は、肝臓や脳のようながん細胞が転移しやすい部位の一つであり、肺がん、乳がん、前立腺がん、多発性骨髄腫の他、腎臓がん、肝臓がんが骨転移しやすいことが知られている。骨転移が発生して、腫瘍が大きくなると、強い痛みや骨折、麻痺が惹起され、日常行動が制限されることが多いため、早期発見・早期治療が重要である。骨転移した癌に対する治療は、主として、抗がん剤による内科的治療、放射線治療が行われる。抗がん剤による内科的治療を考えた場合、骨組織への血流量が少ないために、抗がん剤の骨移行量が少ないことが問題である。この問題点を克服するためには、骨組織に親和性のある化合物を利用した抗がん剤の骨組織への標的指向化が有効と考えられる。本研究では、癌の骨転移の効果的な化学療法の開発を目的に、薬物運搬体として、界面活性剤様の構造を持つ高分子の集合体（ミセル集合体）を利用し、骨組織に親和性のある化合物であるアスパラギン酸をミセル集合体の表面に化学的に結合させた。調製したアスパラギン酸修飾ミセル集合体の内部に抗がん剤パクリタキセルを封入し、静脈内投与後の骨転移癌組織への集積と抗腫瘍効果を検討した。 まず、放射性同位元素でラベルしたアスパラギン酸修飾ミセル集合体を動物に静脈内投与し、その後の体内分布を体外からイメージングしたところ、肩、下肢大腿、骨盤の関節部分に集積することが明らかとなった。これらの部位は、体内でも骨転移が生じやすい部位として知られている。次に、パクリタキセルを封入したミセル集合体の体内分布を測定した。アスパラギン酸修飾ミセル集合体に封入した場合、アスパラギン酸で表面修飾されていないミセル集合体に封入した場合と比較して、パクリタキセルの骨関節部位への集積が約 7 倍に増大することが明らかとなった。さらに、骨転移しやすいがん細胞を事前に静脈内投与し、人工的に骨転移を誘発させたモデル動物を作成した。骨転移誘発動物に対して、パクリタキセルを封入したアスパラギン酸修飾ミセル集合体を投与し、その抗腫瘍効果を測定したところ、体重 1 kg あたり 0.5 mg という低投与量のパクリタキセルでも、副作用なく、腫瘍の増殖を有意に抑制すること明らかとなった。 アスパラギン酸修飾ミセル集合体は、パクリタキセルだけではなく、様々な薬物を封入することが可能であり、癌骨転移だけではなく、様々な骨関連の疾病に応用可能である。アスパラギン酸修飾ミセル集合体は、骨関連の疾病に対する非常に有用な薬物運搬体であることが明らかとなった。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
勝見 英正、山下 修吾、 清水絵里加、中尾 優斗、 田中 晶子、古林 呂之、 森下 将輝、坂根 稔康、 山本 昌	日本薬物動態学会第 36 回年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
アスパラギン酸修飾に基づく骨指向性 dendrimer 型ナノミセルの開発と 骨転移治療への応用		2021年11月16日 ～11月19日	web 開催

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		腫瘍溶解性ウイルスと微粒子性抗がん剤の併用による高効率ながん治療法の開発			
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
	大 河 原 賢 一 櫻 井 文 教	神 戸 薬 科 大 学 大阪大学 大学院薬学研究科	薬 学 部 分子生物学分野	教 授 准教授	抗がん剤内封微粒子製剤の 体内動態および抗腫瘍効果 の評価 腫瘍溶解性ウイルスを用いた 検討全般
共同研究の成果					
初年度の研究では、腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスを担癌マウスに前投与することで、腫瘍内への微粒子性製剤（PEG 修飾リポソーム）の送達効率向上を試みた。R3 年度は、ヒト膀胱がん細胞株 BxPC-3 細胞を移植した担癌マウスにレオウイルスを投与後、DiO 標識 PEG 修飾リポソームを静脈内投与し、3D imaging により PEG 修飾リポソームの腫瘍内分布を解析した。BxPC-3 腫瘍は、比較的細胞外マトリックスが豊富な腫瘍を形成することが報告されている。その結果、レオウイルスを前投与したマウスでは PEG 修飾リポソームが PBS 前投与群と比較し、より内部まで分布していた。さらに、レオウイルスを前投与したマウス腫瘍における遺伝子発現解析を行ったところ、ファイブロネクチンやヒアルロン酸構成酵素など細胞外マトリックス遺伝子群の発現が低下する傾向を示した。またレオウイルス前投与群では、アポトーシス実行因子である Caspase 3 の活性化が検出された。以上の結果より、レオウイルスを前投与することにより、がん細胞の細胞死のみならず、細胞外マトリックスの産生が減少することにより、その後に投与する PEG 修飾リポソームが腫瘍内部まで移行しやすくなったことが示唆された。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
櫻井 文教、平田 聖也、 江口 真帆、石神 育歩、 細川 美香、大河原賢一、 水口 裕之	日本薬学会 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスの前投与による PEG 修飾リボソームの腫瘍内集積性の向上		2022 年 3 月 25 － 28 日	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 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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 病院循環器内科	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 循環器内科学分野	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。同時に遺伝子改変マウスを用いた生命科学的アプローチで肺高血圧症の病態の解明に挑戦した。 肺高血圧症のひとつの病型である慢性血栓塞栓性肺高血圧症は近年、治療法が進歩し、疾患の認知の高まりとも相まって近年症例数が増加している。特に日本で開発されたバルーンカテーテルを用いた肺動脈形成術は患者の生命予後を劇的に改善してきた。しかし、バルーンカテーテルを用いた肺動脈形成術と従来から有効な治療法として確立している血栓内膜摘除術との治療効果の優越は不明である。私たちは、血栓内膜摘除術とバルーン肺動脈形成術との臨床効果を詳細に比較検討し、両治療法に症状ならびに予後改善効果について優越はないことを示すと同時に、それぞれの臨床的位置付けについて新たな概念を提言した(Int J Cardiol. 2021)。また、慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症に対するバルーン肺動脈形成術後の臨床指標を後方視的に解析し、酸素化の改善効果について報告した(Int J Cardiol. 2021)。さらに、重症の慢性血栓塞栓性肺高血圧症例に対して緊急のバルーン肺動脈形成術を実施し救命し得た臨床症例(Respir Med Case Rep. 2021)および慢性血栓塞栓性肺高血圧症と鑑別が困難な肺動脈肉腫症例(Eur Heart J Case Rep. 2021)について報告し、慢性血栓塞栓性肺高血圧症の臨床的知見の集積に貢献することができた。一方、生命科学的なアプローチとして、肺高血圧症をきたす原因疾患として頻度の高い間質性肺炎の病態における血管内皮細胞の老化(Kobe J Med Sci. 2021a)およびエンドセリン(Kobe J Med Sci. 2021b)の役割について解明し、論文として発表した。 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6報の論文発表を行い、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			
Sumimoto K, Taniguchi Y, Emoto N, Hirata KI.	A rare case of intimal sarcoma mimicking pulmonary stenosis.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Eur Heart J Case Rep.	5	2021	ytab440.	

著 者 名	論 文 標 題			
Sumimoto K, Taniguchi Y, Fujii H, Miwa K, Matsuoka Y, Tsuboi Y, Emoto N, Hirata KI.	Rescue balloon pulmonary angioplasty for life-threatening acute pulmonary embolism on chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Respir Med Case Rep.	33	2021	101415	

著 者 名	論 文 標 題			
Matsuoka Y, Taniguchi Y, Miwa K, Sumimoto K, Tsuboi Y, Onishi H, Yanaka K, Emoto N, Hirata K.	Assessment of oxygenation after balloon pulmonary angioplasty for patients with inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Int J Cardiol.	333	2021	188-194	

著 者 名	論 文 標 題			
Taniguchi Y, Matsuoka Y, Onishi H, Yanaka K, Emoto N, Nakai H, Okada K, Hirata K.	The role of balloon pulmonary angioplasty and pulmonary endarterectomy: Is chronic thromboembolic pulmonary hypertension still a life-threatening disease?			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Int J Cardiol.	326	2021	170-177	

著 者 名	論 文 標 題			
Ramadhiani R, Ikeda K, Hirata KI, Emoto N.	Endothelial Cell Senescence Exacerbates Pulmonary Fibrosis Potentially Through Accelerated Endothelial to Mesenchymal Transition.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Kobe J Med Sci.	67	2021	E84-E91	

〈総 説〉

著 者 名	論 文 標 題			
Soraya AI, Suzuki Y, Morimoto M, Ko CJ, Ikeda K, Hirata KI, Emoto N.	Protective Effects of Endothelin-2 Expressed in Epithelial Cells on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Kobe J Med Sci.	67	2021	E61-E70	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
谷 仲 謙一、中山 和彦、 谷 口 悠、大西 裕之、 松岡庸一郎、岡田 健次、 江 本 憲昭、平田 健一	第 6 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 PEA と BPA の治療効果の違い：RC time の重要性と意義		2021 年 5 月 6 ～ 8 日	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 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		病態診断・治療に資する薬剤開発研究			
構 成 員	氏 名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職 名	研究の役割分担
	向 高 弘	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	細胞・動物実験
	山 崎 俊 栄	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	助 教	プローブ合成、物性評価
	萩 森 政 頼	武 庫 川 女 子 大 学	薬 学 部	教 授	プローブ設計・合成、物性評価
共同研究の成果					
近年、がんやアルツハイマー病（アミロイドーシス）をはじめとする難治性疾患の病態が明らかとなりつつあり、これらの情報に基づく病態診断薬あるいは治療薬の開発に大きな期待が寄せられている。そこで本研究では、各種病態において重要な役割を果たす分子等を標的とした診断薬および治療薬の開発を目的とし、2021 年度は以下に示す研究成果を得た。 我々はこれまでに、樹状高分子であるアニオン性 dendrimer の放射性標識体をコアとして、カチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン、アニオン性ポリマーである γ-ポリグルタミン酸 (γ-PGA) を順次反応させ、静電的相互作用により自己組織化させたナノ粒子型プローブが、センチネルリンパ節の核医学的検出に有効であることを報告してきた。今年度は、最外被覆ポリマーについて γ-PGA の代わりにヒアルロン酸を用いた粒子を作製し、がんを高発現する CD44 の検出に有効であるか評価した。本薬剤は、混和するだけで精製を必要とすることなく合成することができた。また、CD44 高発現がん細胞へ高く結合・集積することをインビトロおよびインビボレベルで確認することができた。本研究成果については、国際学会 1 件および国内学会 1 件にて発表した。 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-Alder 反応することから生体での利用が期待されている。我々はこれまでに、テトラジン誘導体を膜に導入したリポソームを作製し、インビトロにおいて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、リポソームに内包した薬物が迅速に放出される結果を報告してきた。今年度は、本薬物放出制御法がインビボにおいて機能するか評価するために、担がんマウスを用いた検討を実施した。テトラジン誘導体含有リポソームを投与し、それががん部位へ高く集積したタイミングでノルボルネン誘導体を投与した結果、がん部位での薬物放出が顕著に促進されること、また、がん治療効果が増強されることを明らかとした。本研究成果については、国際学会 2 件、国内学会 3 件にて報告した。 全身性アミロイドーシスの核医学診断を目的として、アミロイドに対して高い結合親和性を示すチオフラビン T とコンゴレッドの化学構造を融合した新規放射性ヨウ素標識プローブを設計し、高い放射化学的収率および放射化学的純度で合成することに成功した。本薬剤は、チオフラビン T やコンゴレッド自体と比較して、アミロイドに対してより高い親和性を示した。さらに、全身性アミロイドーシスの一種である AA アミロイドーシスのモデルマウスを作製し、本薬剤の生体内放射能分布を評価した結果、アミロイドの沈着が認められた脾臓へ高く集積することを明らかとした。また、その組織内放射能分布はアミロイドの局在と一致していた。本研究成果については、国際学会 2 件にて発表するとともに、Bioorg. Med. Chem. 誌へ論文報告した。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Yoshie Haratake, Kohei Sano, Miki Tsuchiya, Kaori Minaki, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai	Development of a radioiodinated thioflavin-T-Congo-red hybrid probe for diagnosis of systemic amyloidosis.			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
Bioorganic & Medicinal Chemistry	56	2022	116591	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
Yoshie Haratake, Kohei Sano, Miki Tsuchiya, Kaori Minaki, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai	eSRS 2021 (virtual Society of Radiopharmaceutical Sciences meeting 2021)		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
A novel radioiodinated probe for diagnosis of systemic amyloidosis based on thioflavin-T and Congo-red hybrid structure.	2021/5/17-19	Online	

発 表 者	学 会 名		
Toshie Tanaka, Kohei Sano, Mamia Munemura, Masayori Hagimori, Rioh Moriyama, Azusa Yamamoto, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai	eSRS 2021 (virtual Society of Radiopharmaceutical Sciences meeting 2021)		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
Development of a radiolabeled self-assembled nanoparticles as an imaging probe for CD44-expressing tumors.	2021/5/17-19	Online	

発 表 者	学 会 名		
甘中 健登、佐野 紘平、宗兼 将之、山崎 俊栄、萩森 政頼、向 高弘	第 37 回日本 DDS 学会学術総会		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
生体直交型化学反応を介した薬物放出制御型リポソーム製剤の開発 －放出に関するインビボ評価－	2021/6/29	千葉 (ハイブリッド)	

発 表 者	学 会 名		
Kento Kannaka, Kohei Sano, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai	CRS 2021 Virtual Annual Meeting		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
In vivo evaluation of drug release via inverse electron demand Diels-Alder reactions in the liposomal membrane.		2021/7/25-29	Online

発 表 者	学 会 名		
甘中 健登、佐野 紘平、 宗兼 将之、山崎 俊栄、 向 高弘	第 80 回日本癌学会学術総会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
生体直交型反応による薬物放出を可能とする抗がん剤内封リポソーム製剤 の開発		2021/10/2	横浜 (オンライン)

発 表 者	学 会 名		
田中 寿枝、佐野 紘平、 宗村真美亜、森山 理央、 千石 梓、宗兼 将之、 山崎 俊栄、萩森 政頼、 向 高弘	第 61 回日本核医学会学術総会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
CD44 を標的とする ¹¹¹ In 標識ヒアルロン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発		2021/11/4	名古屋

発 表 者	学 会 名		
甘中 健登、佐野 紘平、 宗兼 将之、山崎 俊栄、 萩森 政頼、向 高弘	第 61 回日本核医学会学術総会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
がんの内用療法に資する薬物放出制御型リポソーム製剤の開発		2021/11/4	名古屋

発 表 者	学 会 名		
Kento Kannaka, Kohei Sano, Hiromichi Nakahara, Masayuki Munekane, Masayori Hagimori, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai	Pacificchem2021		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Chemical reaction in the liposomal membrane accelerates release of the encapsulated drugs.		2021/12/19	Hawaii (Virtual)

発 表 者	学 会 名		
Yoshie Haratake, Kohei Sano, Miki Tsuchiya, Kaori Minaki, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai	Pacificchem2021		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Development of a radioiodinated thioflavin-T-Congo-Red hybrid compound for diagnosis of systemic amyloidosis.		2021/12/21	Hawaii (Virtual)

発 表 者	学 会 名		
甘中 健登、佐野 紘平、 宗兼 将之、山崎 俊栄、 萩森 政頼、向 高弘	日本薬学会第 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
がんにおける生体直交型化学反応を介したドキソルビシン内封リポソームの治療効果の増強		2022/3/27	名古屋 (オンライン)

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		輸送工学および共培養によるアルカロイド大量生産系の構築			
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、データ解析
	南 博 道	石 川 県 立 大 学	生物資源工学研究所	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や解析
共同研究の成果					
植物が生産する特化代謝産物は多様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場合があることや、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。 本研究では第一に、レチクリンを生産する大腸菌にアルカロイド輸送体 AtDTX1 を発現させ、生産効率を高めることを試みた。昨年度までに輸送体の発現により細胞内での生産や培地への放出が促進されること、AtDTX1 の発現により 1300 以上の遺伝子がコントロール株よりも 2 倍以上の変動を示していることなどを確認していた。本年度は、その論文化を中心に解析を進め、生合成中間体の定量解析や各種遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で検討した。これら解析から、AtDTX1 を介した培地への放出により、細胞内でのレチクリン濃度が減少し、その結果、生合成に関わる酵素遺伝子の発現が向上することで、最終的に細胞での生産および培地への放出が全体として向上することを明らかとした。これらの解析結果は Metabolic Engineering Communications に報告した。 第二に、微生物共培養による有用物質生産の研究も進めた。レチクリン生産性大腸菌とスチロピン生産性ピキア酵母の共培養による効率的なスチロピン生産系を検討した。その結果、ピキア酵母用の培地である BMMY 培地が生育および生産に適していることを明らかとし、共培養により炭素源であるグルコースからスチロピンを生産させることに成功した。これら結果は Microbial Cell Factories に報告した。 これら成果から、輸送工学および共培養を用いたより効率的な物質生産系の可能性が示されたと考えている。今後、さらにこれら技術を発展させ、効率的に有用代謝産物の生産を可能とするよう研究を進めていきたいと考えている。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Yamada Y., Urui M., Oki H., Inoue K., Matsui H., Ikeda Y., Nakagawa A., Sato F., Minami H., Shitan N.	Transport engineering for improving the production and secretion of valuable alkaloids in <i>Escherichia coli</i>			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
<i>Metabolic Engineering Communications</i>	13	2021	e00184	

著 者 名	論 文 標 題			
Urui M., Yamada Y., Ikeda Y., Nakagawa A., Sato F., Minami H., Shitan N.	Establishment of a co-culture system using <i>Escherichia coli</i> and <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>) for valuable alkaloid production			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
<i>Microbial Cell Factories</i>	18	2021	200	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
Yamada Y., Urui M., Oki H., Inoue K., Matsui H., Ikeda Y., Nakagawa A., Sato F., Minami H., Shitan N.	Metabolic Engineering 14		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Transport Engineering Enabled High Production and Secretion of Valuable Plant Alkaloids in <i>Escherichia coli</i>		6/11-15	Online

発 表 者	学 会 名		
Urui M., Yamada Y., Ikeda Y., Nakagawa A., Sato F., Minami H., Shitan N.	Metabolic Engineering 14		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Establishment of a Co-Culture System Using <i>Escherichia coli</i> and <i>Pichia Pastoris</i> for Valuable Alkaloid Production		6/11-15	Online

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 池田 義人、中川 明、 佐藤 文彦、南 博道、 土反 伸和	膜シンポジウム 2021		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
有用物質生産を目指した微生物共培養系の確立と輸送工学を用いた増産への応用		11/16	オンライン

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、佐藤 文彦、 南 博道、土反 伸和	日本生薬学会第 67 回年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
輸送工学による効率的なイソキノリンアルカロイド生産系の構築		9/19	オンライン

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 池田 義人、南 博道、 佐藤 文彦、土反 伸和	第 63 回天然有機化合物討論会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
有用アルカロイド生産を目指した大腸菌とピキア酵母共培養系の開発		9/16	オンライン

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、佐藤 文彦、 南 博道、土反 伸和	第 38 回日本植物バイオテクノロジー学会つくば大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
輸送工学を利用した効率的なアルカロイド生産系の確立		9/11	オンライン

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 池田 義人、中川 明、 佐藤 文彦、南 博道、 土反 伸和	第 38 回日本植物バイオテクノロジー学会つくば大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
大腸菌とピキア酵母の共培養による効率的なスチロピンアルカロイドの生産		9/11	オンライン

発 表 者	学 会 名		
潤井 みや、山田 泰之、 池田 義人、中川 明、 佐藤 文彦、南 博道、 土反 伸和	生合成若手シンポジウム 2021		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
大腸菌とピキア酵母の共培養系の開発～植物有用アルカロイド生産を目指して～		8/7	オンライン

発 表 者	学 会 名		
山田 泰之	日本農芸化学会 2022 年度京都大会 シンポジウム 4DS「植物特化代謝産物の空間的な局在性とダイナミクス」		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
輸送工学を用いた植物有用アルカロイドの効率的微生物生産系の開発		3/18	オンライン

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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統括
	高 木 晃	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	助 教	分子設計、合成の支援
	高 嶋 一 平	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	特任助教	活性評価の支援
	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					
酸素及び栄養の不足で活性化するシグナル伝達系の一つとして知られる小胞体ストレス応答の unfolded protein response (UPR) シグナル伝達系は、がん微小環境における重要な適応機構であることが示され、難治性のがん細胞で特に活性化している。本共同研究では、このストレス応答バランスを崩す化合物の創製を目的としており、以下に当該年度での成果を述べる。 1. 4-フェニル酪酸バイオアイソスターの創薬化学研究 小胞体ストレスに干渉する分子シャペロンである 4-フェニル酪酸 (4-PBA) をリード化合物として薬化学研究室で構築中の化合物ライブラリーを活用し、培養細胞を用いたスクリーニングを行ったところ、4-PBA のバイオアイソスターであるアリーリデンチアゾリジンジオン (およびロダニン) 誘導体が低栄養選択毒性を有することを当研究室ではこれまでに見出し、その構造活性相関研究は共同研究としてすでに進行中であった。そこでさらなる最適化を行うべく、チアゾリジンジオン類縁体に焦点を当てた化合物ライブラリーの拡張を行い、培養細胞を用いた評価系に付いて構造活性相関の検討を行った。その結果、チアゾリジンジオン (およびロダニン) 部位を含む化合物はいずれにおいても、低栄養選択毒性に与えるフェニル基上の置換基は許容範囲が広いものであった。その一方、チアゾリジンジオンの酸性 N-H をアルキル化した場合において毒性が完全に消失したことにより、何らかの水素結合相互作用が活性に寄与していることが考えられた。また、ヘテロ五員環がチアゾリジンジオン (およびロダニン) の場合に認められた低栄養選択毒性は、スクシンイミド、メルドラム酸、およびバルビツール酸に変換した場合においてはいずれも毒性が消失していたことにより、マイケル受容体部位の電子親和性が活性に影響を与えていることが示唆された。 2. 栄養飢餓耐性解除能を有するベンゾイル化グルコース誘導体の構造活性相関研究 2020 年度において、がん細胞が獲得した栄養飢餓耐性の解除能を示すことで注目されている天然物 (-)-uvaridaccol L の世界初のラセミ体の全合成を当研究室で達成していた (<i>Org Lett</i> 23, 4083-4087 (2021))。この構造活性相関研究を展開する過程で、安価な D-glucose のベンゾイル化によって得られる 1,3,6-tribenzoyl-β-D-glucose が (-)-uvaridaccol L と立体構造が類似している点に着目し、1,3,6-tribenzoyl 体をはじめとする様々なベンゾイル化グルコースの合成を行い、培養細胞を用いた活性評価試験を行った。その結果、期待通りに 1,3,6-tribenzoyl 体には (-)-uvaridaccol-L よりやや弱い活性ではあるものの、がん細胞の獲得した栄養飢餓耐性の解除能が認められた。さらに種々のベンゾイル化グルコース誘導体の低栄養選択毒性を評価したところ、置換位置によらず導入されたベンゾイル基の個数にその活性は依存していることが明らかとなった。以上の結果により、安価に入手可能な D-glucose より短行程にて合成可能なベンゾイル化グルコース誘導体は、低栄養環境を特徴の一つとするがん微小環境を標的とするリード化合物として有用であると考えられた。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
北西 悟司、高木 晃、 高嶋 一平、大橋憲太郎、 奥田 健介	日本薬学会第 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
がん微小環境を標的とする 4-フェニル酪酸バイオアイソスターの創薬 化学研究		2022.3.25-28.	名古屋 (オンライン)

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		アミロイド病を標的とした構造特異抗体の開発と生体イメージングへの展開			
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	apoE 抗体の設計・作製
	大 山 浩 之	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	准教授	apoE 抗体の評価
	森 田 い ず み	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	講 師	apoE 抗体の応用
	斎 藤 博 幸	京 都 薬 科 大 学	薬 学 部	教 授	apoE 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 学 部	助 教	apoE 抗体の物性評価
共同研究の成果					
アポ E は、脳内 HDL の主要タンパク質である。アポ E の遺伝多型（アイソフォーム）はアルツハイマー病発症危険因子として注目されている。様々なアミロイドタンパク質線維との臓器や組織における共沈着が報告されており、アミロイド沈着促進／抑制因子としても注目される。アポ E4 は、野生型であるアポ E3 の 112 番目のシステインがアルギニンに置換された多型（アイソフォーム）の一つであるが、その HDL コレステロール搬出・供給能力がアポ E3 に比べて著しく劣ることが報告されている。しかしながら、このアポ E アイソフォームによる脳内 HDL 代謝調節異常と神経変性疾患病理発現との関連性については、不明な点が多い。各アイソフォームの体内での消長を追跡するうえで適切な手段に乏しいことが、研究の進展を妨げている。 そこで、昨年度は大腸菌を宿主として産生した組換えアポ E4 および E3 を免疫原としてモノクローナル抗体（mAb#7-8、#8-4、#14-4、#16-2）を新規に作製したが、本年度はその結合特異性を詳細に解析した。アポ E の各ドメインフラグメントに対する dot blotting の結果から、#7-8 が 192-221 残基領域、#8-4、#14-4、#16-12 が 1-191 残基領域にエピトープを持つことが示された。3 種類の mAb（#7-8、#8-4、#16-12）はアポ E3 とアポ E4 の両方に反応を示した一方で、mAb#14-4 はアポ E4 に反応するがアポ E3 には反応性を示さなかった。このうち #8-4 と #14-4 については可変部遺伝子をクローニングし、一次構造を決定した。以上、開発した新規抗アポ E モノクローナル抗体を用いることで、アポ E アイソフォームを特異的に検出できる可能性が示唆された。各アイソフォームの体内動態（体液中濃度や組織内分布）を解析することで、上記の病態発現の機序が明らかになるものと期待される。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Y. Kiguchi, H. Oyama, I. Morita, Y. Nagata, N. Umezawa, N. Kobayashi	The VH framework region 1 as a target of efficient mutagenesis for generating a variety of affinity-matured scFv mutants.			
		巻	発行年	ページ
<i>Sci. Rep.</i>		11	2021	8201

著 者 名	論 文 標 題			
H. Oyama, Y. Kiguchi, I. Morita, T. Miyashita, A. Ichimura, H. Miyaoka, A. Izumi, S. Terasawa, N. Osumi, H. Tanaka, T. Niwa, N. Kobayashi	NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassay.			
		巻	発行年	ページ
<i>Anal. Chim. Acta</i>		1161	2021	238180

著 者 名	論 文 標 題			
I. Morita, Y. Kiguchi, H. Oyama, A. Takeuchi, C. Tode, R. Tanaka, J. Ogata, R. Kikura-Hanajiri and N. Kobayashi	Derivatization-assisted enzyme-linked immunosorbent assay for identifying hallucinogenic mushrooms with enhanced sensitivity.			
		巻	発行年	ページ
<i>Anal. Methods</i>		13	2021	3954-3962

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
坂井 瑚都、中野 未悠、 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 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
新規抗アポ E モノクローナル抗体を用いたアポ E アイソフォーム特異的 検出系の構築		2022.03.26	名古屋 (オンライン)

発 表 者	学 会 名		
木口 裕貴、大澤 愛、 平野圭一郎、反田 瞳、 中村 仁美、大山 浩之、 森田いずみ、小林 典裕	第 71 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
免疫測定法の高感度化に資する高親和力変異抗体探索システム — Clonal Array Profiling (CAP) 法の構築と応用 —		2021.10.09	東大阪市 (オンライン)

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		シクロデキストリンを用いたモノフェノール化合物の取り込み、溶解性、安定性の改善			
構 成 員	氏 名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職 名	研究の役割分担
	中山 尋量	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	研究総括
	田中 将史	神戸薬科大学	薬 学 部	教 授	物性評価
	梶 並 昭彦	神 戸 大 学	工 学 研 究 科	准教授	メカノケミカル法での固体の調製
	前田 秀子	神戸薬科大学	薬 学 部	講 師	分光学的な解析
共同研究の成果					
フェルラ酸をはじめとするモノフェノール化合物は、抗酸化作用、抗炎症作用を有することが示されている。また、メラニン生成を抑制し、色素沈着を改善することができるため化粧品としての利用も提案されている。しかしながら、単体では水溶性は低いため、シクロデキストリンを用いた溶解性の改善を目指した。 まず、フェルラ酸について α-, β-, γ-シクロデキストリン (CD) および修飾 CD (ヒドロキシプロピル-α-, β-, γ-CD, メチル-β-CD, スルホブチルエーテル-β-CD) のうち、いずれの CD を用いた場合に安定な包接化合物を形成するかを検討した。 フェルラ酸の濃度は 2.5×10^{-4} mol/L、CD の濃度を 0 から 0.01 mol/L に変化させ、スペクトルを測定し、285 nm における吸光度の変化より、包接化合物の安定度定数を求めたところ、α-CD および HP-α-CD を用いた場合が安定度定数の値が高いことがわかった。特に HP-α-CD との安定度定数は、約 5000 L/mol と高い値であった。 そこで、フェルラ酸と HP-α-CD との包接化合物の構造を Job's plot および ^1H-^1H ROESY NMR により調べた。その結果、フェルラ酸と HP-α-CD は、1:1 で包接複合体を形成していること、フェルラ酸のフェニル基が HP-α-CD の空洞内に包接された構造であることがわかった。 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、フェルラ酸と HP-α-CD との固体複合体が生成するかを調べた。 X 線回折装置 (XRD) および示差走査熱量計 (DSC) の測定結果より、フェルラ酸結晶に特徴的なピークが、凍結乾燥法を用いて作製した固体では、消失することがわかった。したがって、作製した固体のうち、凍結乾燥法で作製した固体のみ、包接複合体が形成されることがわかった。 そこで、フェルラ酸の原末と凍結乾燥法を用いて作製した固体複合体を用いて溶出試験を行い、溶解性の改善を評価した。溶出試験は、pH 4 の緩衝液を用い、25℃で行ったところ、フェルラ酸原末では、40% 程度の溶出率を示したが、凍結乾燥法による固体複合体では、60% の溶出率を示した。以上の結果より、凍結乾燥法により作製した固体複合体は、フェルラ酸の溶解性を改善することがわかった。 さらに、凍結乾燥法で作製した固体複合体のチロシナーゼ阻害活性試験を行ったところ、1.25 mM 以上でフェルラ酸原末と同程度のチロシナーゼ阻害活性があることが判明した。すなわち、固体複合体を形成してもチロシナーゼ阻害活性は保持されていることがわかった。 今後は、HP-α-CD を架橋剤と反応させたシクロデキストリンナノスポンジを作製し、フェルラ酸の取り込み量を増加させることで、より溶解性の向上が期待できる。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
前田 秀子、花川 りな、 松尾 莉佳、北吉 姫乃、 田中 将史、梶並 昭彦、 中山 尋量	第 30 回無機リン化学討論会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
美白成分の浸透性の向上を目指したジホスホン酸塩によるリン酸修飾 (II)		2021/9/16	京都

発 表 者	学 会 名		
前田 秀子、室川 遥華、 南平 麻那、田中 将史、 梶並 昭彦、中山 尋量	日本薬学会第 142 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メトキシサリチル酸の溶解性の改善とチロシナーゼ阻害活性の評価		2022/3/26	オンライン 開催

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		ヘテロ環骨格の新規構築法の開発を基盤とした革新的機能性分子の創製			
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	反応開発
	安 井 基 博	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	助 教	反応開発
	松 原 浩	大 阪 府 立 大 学 大 学 院	理 学 系 研 究 科	教 授	反応機構解析
共同研究の成果					
3-(2H)-イソオキサゾロンは天然物や医薬品など様々な生物活性化合物に含まれる重要骨格であるが、既存の合成法には位置選択性、基質適用範囲、特殊な原料合成に要する工程数の増大など様々な課題がある。一方、金触媒を用いたオキシアリール化反応は多重結合に対してアルコキシ基とアリール基を一度に導入できるため、近年注目されている反応である。しかし、イノン構造を有する基質に対してはプロトン化の進行が懸念されるため実現されていない。加えて、5-endo-dig 型分子内反応の例も報告されていなかった。そこで本研究では 3-(2H)-イソオキサゾロン骨格の構築、アリール基の導入、および官能基導入を同時に実現できる効率的な手法の開発を目指し、5-endo-dig 型分子内オキシアリール化を検討した。課題となるプロトン化を抑制する戦略として、環状アルコキシプロピオール酸アミドを基質として用いることで、プロトン化の原因として考えられるヒドロキシ基由来のプロトンをマスクすることとした。これにより、課題となるプロトン化を抑制できるだけでなく、オキシアリール化に続く求核剤による開環反応が進行することで、官能基を導入できると期待した。 まず、我々が既に見出している連続的ヨード環化/アミド化反応で用いたアセトニトリルを溶媒としてオキシアリール化を検討したところ、オキシアリール化は進行したものの、アミド化反応は全く進行しなかった。そこで溶媒を検討したところ、DMF-H₂O 混合溶媒を用いることで、ヒドロキシ基の導入された 3-(2H)-4 アリールイソオキサゾロンが得られることを見出した。その後、金触媒、酸化剤、温度、操作手順など多角的な検討を行うことで、最適な反応条件を探索した。その結果、ボロン酸存在下、金触媒として PPh₃AuNTf₂、酸化剤として Selectfluor を用い、85℃ に加熱する条件が最適であることを見出した。また、本反応では目的物のホルミル化体も混在していたため、メタノールと炭酸カリウムで後処理することで、ヒドロキシ基を有する目的物を単一で得ることに成功した。 続いて、見出した反応条件の基質一般性について検討した。その結果、様々なボロン酸および環状アルコキシプロピオール酸アミドに適用できることが明らかになった。中でも、ケトカルボニル基のような高反応性官能基や、遷移金属との反応が懸念される一置換アルケン存在下でも本反応は適用可能であることが確認され、優れた官能基許容性をもつことが実証された。さらに、プロトンがマスクされていない N-ヒドロキシプロピオール酸アミドで本反応を試みたところ、アリール化体は低収率でしか得られず、ほとんどがプロトン化体として得られることが確認された。 金触媒を用いたオキシアリール化の先行研究および我々の報告した連続的ヨード環化/アミド化反応では溶媒としてアセトニトリルを用いているが、我々の検討では全く目的物が得られなかった。この実験結果を更に検証するために、大阪府立大学大学院松原研究室において、反応経路の計算化学的実証を試みた。その結果、アセトニトリルを用いた場合は中間体および遷移状態が確認できなかったのに対し、DMF および水は中間体と容易に反応することが明らかにされ、実験結果と矛盾しない計算結果が得られた。 以上、本研究では 3-(2H)-イソオキサゾロンの骨格構築およびアリール基とヒドロキシ基の導入を一挙に行う効率的な手法を開発し、その反応経路の詳細を計算化学的に実証することに成功した。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Motohiro Yasui, Maki Inoue, Kotone Nakao, Norihiko Takeda, Masafumi Ueda	Sc(OTf) ₃ -Catalyzed Iodocyclization/Ritter-Type Amidation of <i>N</i> -Alkoxypropiolamides: A Synthetic Strategy for Isoxazol-3(2 <i>H</i>)-ones			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
The Journal of Organic Chemistry	86	2021	15498-15508	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
安井 基博、田原奈央子、 武田 紀彦、松原 浩、 上田 昌史	第 41 回有機合成若手セミナー		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
金触媒を用いたオキシアリール化によるイソオキサゾロン合成法の開発		2021.8.4	オンライン

発 表 者	学 会 名		
田原奈央子、安井 基博、 武田 紀彦、松原 浩、 上田 昌史	第 71 回日本薬学会関西支部大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
<i>N</i> -アルコキシプロピオール酸アミドの金触媒によるオキシアリール化反応－イソオキサゾロンの新規合成法の開発－		2021.10.9	オンライン

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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、免疫化学的実験
	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
	浅 野 真 司	立 命 館 大 学	薬 学 部	教 授	生理的研究
共同研究の成果					
本研究は、消化管粘膜上皮に発現している特殊な腸内分泌細胞であ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。昨年度までに、我々は生体でのエネルギー代謝に重要な脳腸ペプチドである GLP-1 や PYY と同様に食欲の制御に関与する消化管ペプチドとして近年注目を集めている xenin について研究を行い、ラットにおいて xenin が消化管管腔側の栄養素などの刺激により、腸内神経の反射回路を活性化させ小腸でのイオン輸送制御に関与していることを見出し報告した (Am. J. Physiol., 316, G785-G796, 2019)。また、高感度 xenin 特異 ELISA 法を確立し、本法によりマウスで xenin は上部小腸で高濃度に発現しており、その発現は 2 型糖尿病で減少することを明らかにした (第 60 回日本臨床化学会年次学術集会、東京、2020 年 10 月)。さらに、xenin はラットにおいて、摂食刺激により腸内分泌細胞から分泌され、内在性求心性神経を介して食後の遠位結腸輪走筋収縮に対して重要なモジュレーターとして作用していることを示した (Physiol. Rep., 9(4), e14752, 2021)。本年度は、xenin と構造類似の neurotensin のイオン輸送に対する作用を比較検討した。即ち、合目的に化学合成した xenin および neurotensin フラグメントを用い、ラット回腸における $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 分泌作用を Ussing チャンバー法により比較検討した。その結果、回腸で $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 分泌を誘導する xenin の最小生物学的活性発現配列は C 末端ペプチドであり、その 21 位のアルギニン残基が生物学的活性を保持するために重要であることを明らかにした (Peptides, 147, 170680, 2022)。本研究の成果は、これら消化管ホルモンの分泌異常により発症する糖尿病や肥満症等のエネルギー代謝障害などの診断、病状評価、さらには予防や治療のための新薬開発における基礎的知見を提供できるものと考ええる。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Y. Kuwahara, K. Takahashi, M. Akai, I. Kato, T. Kozakai, S. Asano, T. Inui, Y. Marunaka, A. Kuwahara	Minimum biological domain of xenin-25 required to induce anion secretion in the rat ileum.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Peptides	147	2022	170680	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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・波多野 学

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		酸触媒を用いる環式化合物の高効率合成と理論解析			
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
	波 多 野 学	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	教 授	研究の総括
	沖 津 貴 志	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	講 師	有機合成実験の遂行
	坂 田 健	東 邦 大 学	薬 学 部	教 授	理論計算化学の遂行
	吉 川 武 司	東 邦 大 学	薬 学 部	准教授	理論計算化学の遂行
共同研究の成果					
医薬品や機能性材料などの有用な化学物質は環式化合物であることが多く、それらを化学選択的かつ立体選択的に望みどおりに創り上げる合成技術の開発は、現代の有機合成化学において最も重要な課題のひとつである。特に、有害物質の使用を抑えつつ、廃棄物を低減する環境低負荷な合成法が開発できれば、グリーンサステナブル・ケミストリーに立脚した現代ニーズに適合する。申請者（波多野学グループ・神戸薬科大学）は、天然に豊富で、安全・安価かつ環境低負荷な典型元素の利用に着目している。そのうちのひとつとして、ホウ素を中心とするルイス酸触媒の機能の活用を目指している。ホウ素ルイス酸触媒を用いるシリルアルキノールのタンデム型脱水-求電子の環化反応では、高収率かつ高立体選択的に環式化合物を合成できることを既に見出している。この反応は、ホウ素ルイス酸触媒が特異な作用を発現することにより進行していると考えられるが、反応機構の詳細については依然として未解明である。こうした観点から、当該反応に関わるさらなる基盤研究の推進は、実験化学だけでなく理論計算化学による考察が必要となった。そこで、理論計算化学を専門とする共同研究者（坂田健グループ・東邦大学）と共同研究を行い、実験と計算の両方向から反応機構を解明し、より高効率な触媒の環化反応の開発へと展開することを研究目的とした。 当該反応において、当初はホウ素-炭素結合を形成した不安定なボレート中間体を想定していた。ところが、DFT 計算により想定されるいくつかの反応経路をエネルギーマップで可視化した結果、反応系中に存在する水がホウ素ルイス酸に配位し、反応系中でプレnstेटド酸を形成するという興味深い可能性が示唆された。最終的には、当該プレnstेटド酸がアルキン部位を活性化し、ボレート中間体を經由することなく、エン反応形式で反応が進行することがより確からしいことがわかった。この結果は、改めて実施した水に関わる比較対照実験の結果と非常に良い一致を示した。本研究成果は、日本薬学会第 142 年会（名古屋、2022 年 3 月 25-28 日、オンライン開催）で発表した。 以上のように、ホウ素ルイス酸触媒を用いるシリルアルキノールの環化反応において、実験化学と理論計算化学を協同的に駆使することにより、環式化合物の高効率合成と反応機構の解明を行った。反応経路をエネルギーマップで可視化して、実験化学だけでは不明だった活性中間体を明らかにした。得られた結果を実験的に再び精査検証し、反応機構を明らかにした。2022 年度も引き続き、実験的手法に併せて理論計算化学に基づく DFT 計算を継続する予定であり、反応機構を理解してさらなる高効率合成につなげる。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
沖津 貴志、吉川 遼、 湯田 静、青木 心呂、 吉川 武司、坂田 健、 波多野 学	日本薬学会 第 142 年会（名古屋）		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
シリルアルキノールのタンデム型脱水－環化反応		2022年3月25-28日	名古屋 (オンライン開催)

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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		脳疾患の病態制御に関わる分子メカニズムの解明			
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
	長 谷 川 潤	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	教 授	研究総括・分子生物学的解析
	瀬木(西田) 恵里	東 京 理 科 大 学	先 進 工 学 部	教 授	生理学・行動学的解析
	中 山 啓	神 戸 薬 科 大 学	薬 学 部	助 教	形態学・組織学的解析
共同研究の成果					
本共同研究においては、脳疾患の病態進行におけるグリア細胞及び血管内皮細胞の役割と、それらの細胞種を結び付けるシグナル伝達系の解明を行うことを目的とした。 (1) 脳梗塞の一種であるラクナ梗塞及び血管性認知症の動物モデルとして考えられるマウス光血栓性脳梗塞モデルを用い、ミクログリア及びアストロサイトの動態を検討した。その結果、脳梗塞が発症するとまずミクログリアの集積が観察され、それに引き続きアストロサイトの集積が認められた。ミクログリアの活性化が先行して起きていたことから、ミクログリアの活性化がアストロサイトに何らかの影響を与えていると考え、ミクログリア阻害剤として知られるミノサイクリンを投与する実験を行った。脳梗塞作製後にミノサイクリンを連日投与したところ、脳梗塞作製 3 日後のアストロサイトの反応性はむしろミノサイクリン投与により増加した。このことから、脳梗塞病変部（特にペナンプラ領域）のミクログリアはアストロサイトの反応性を抑制していると考えられた。また遺伝子発現解析の結果、ミノサイクリン投与はアストロサイトによる Fatty acid binding protein 7 (FABP7)、Transforming growth factor α (TNF α)、Osteomodulin receptor の発現を上昇させたことから、ミクログリアはアストロサイトによるこれらの分子の産生を抑えることで、脳梗塞部位の炎症を制御している可能性が考えられた。 (2) 脳梗塞のコア領域とペナンプラ領域を明確に識別することは、病態を検討していくにおいて必須である。しかし、現在までこの境界は主観的に決められていることが多かった。そこでコア領域とペナンプラ領域の境界を客観的に明らかにするために、人工知能を用いた計算的画像解析技術の開発を行った。オープンソースソフトである ilastik と ImageJ を用いてマウス光血栓性脳梗塞モデルの染色切片を解析し、画像処理のアルゴリズムを作成することで、ペナンプラ領域を客観的に明確化することに成功した。そのアルゴリズムを用いて非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) が脳梗塞の病態に及ぼす影響を検討したところ、NSAID を投与するとコア領域が減少し、ペナンプラ領域が増加することが分かった。 (3) 脳梗塞発症部位における血管の免疫染色法の検討を行い、良い染色条件の確立が出来た。脳梗塞コア領域においては、脳梗塞作製 1 日後にはほとんど血管が観察されないのに対し、脳梗塞作製 3 日後以降は PECAM1 陽性の血管が観察されるようになった。また PECAM1 と CD34、VEGF receptor 1 の染色像はそれぞれ異なり、脳梗塞部位の血管はそれぞれの部位により異なる性質をもつことが予想された。また、脳梗塞部位外の血管はアストロサイトとの接触が見られるが、コア領域にはアストロサイトが全く認められない一方、PECAM1 陽性の血管が観察されたことから、血管のアストロサイト依存性も部位により異なると考えられた。次世代 RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析の結果、血管内皮細胞に由来すると考えられるいくつかの分泌性因子の候補が得られたので、現在それらの発現パターンを検討中である。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
近藤 真理、岡崎 晴夏、 中山 啓、北條 寛典、 瀬木(西田)恵里、長谷川 潤	フォーラム 2021 衛生薬学・環境トキシコロジー		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
光血栓性脳梗塞モデルマウスにおけるミクログリアとアストロサイトの動態		2021年9月9日～ 10日	オンライン

発 表 者	学 会 名		
長谷川 潤、近藤 真理、 岡崎 晴夏、中山 啓、 北條 寛典、瀬木(西田)恵里	第 142 回日本薬学会年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
脳梗塞発症後のアストロサイト活性制御に対するミクログリアの役割		2022年3月25日 ～28日	オンライン

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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、増殖、分化、神経回路網の形成、がん細胞の浸潤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。 申請者らは、トリプルネガティブ型乳がんのサブタイプであり、特に予後が悪いことで知られる basal-like 型乳がん細胞の浸潤能がコンドロイチン硫酸 E (CS-E) によって促進されることを見出している。これまでに、乳がん細胞上の CS-E の標的分子について調べた結果、乳がんに関連の深い Wnt ファミリーに属する Wnt5a 及びその受容体として知られている Ror 1 である可能性が示唆された。本年度の共同研究により、CS-E 鎖中に含まれる E unit と呼ばれる特徴的な硫酸化二糖構造が Wnt5a を介して Ror1 に結合し、浸潤能を促進させるシグナルを細胞内に入力することを明らかにした (Nadanaka, S., <i>et al.</i> (2022) <i>Front. Oncol.</i> 12, 914838)。さらに、E unit を欠損させると、浸潤能だけでなく増殖能も低下するため、E unit による増殖制御機構についても調べた。E unit を含むコンドロイチン硫酸は N-カドヘリン / β-カテニン経路を介してマトリクスメタロプロテアーゼの発現を誘導し、細胞表面のプロテオグリカンの一つ、シンデカン-1 を膜近傍で切断する。生じたシンデカン-1 の細胞質ドメインがプロテインキナーゼ B (AKT) の SUMO 化による活性上昇を起こし細胞増殖を促進することが明らかになった (Nadanaka, S., <i>et al.</i> (2021) <i>Front. Cell Dev. Biol.</i> 9, 659428)。 マウス脳において、発生過程早期には 6 位が硫酸化された糖鎖構造が多く、この構造は成長に伴い減少する。6 位が硫酸化された糖鎖構造は神経可塑性に関与することが明らかになっており、この糖鎖構造を成獣になってからも高いレベルで発現するトランスジェニックマウスでは可塑性が維持される。今回、6 位が硫酸化された糖鎖構造をもともと発現しないマウスについて、英国ケンブリッジ大学の Fawcett 博士らのチームとともに、加齢にともなう記憶・認知に関する表現型解析を行った。もともと 6 位が硫酸化された糖鎖構造をもたないマウスでは、加齢にともなう記憶力低下が加速し、この糖鎖構造の発現を回復させると記憶力低下が改善することが示された (Yang, S., <i>et al.</i>, (2021) <i>Mol. Psychiatry</i> 26, 5658-5668)。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
<u>Nadanaka, S.</u> , Bai, Y., and <u>Kitagawa, H.</u>	Cleavage of Syndecan-1 Promotes the Proliferation of the Basal-like Breast Cancer Cell Line BT-549 via Akt SUMOylation.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Front. Cell Dev. Biol.	9	2021	659428	

著 者 名	論 文 標 題			
Yang, S., Gigout, S., Molinaro, A. Naito-Matsui, Y., Hilton, S., Foscari, S., Nieuwenhuis, B., Tan, C. L., Verhaagen, J., Pizzorusso, T., Saksida, L. M., Bussey, T. M., <u>Kitagawa, H.</u> , Kwok, J. C. F., and Fawcett, J. W.	Chondroitin 6-sulphate is required for neuroplasticity and memory in ageing.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Mol. Psychiatry	26	2021	5658-5668	

著 者 名	論 文 標 題			
<u>Nadanaka, S.</u> , <u>Tamura, J.</u> , and <u>Kitagawa, H.</u>	Chondroitin Sulfates Control Invasiveness of the Basal-like Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 through ROR1.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Front. Oncol.	12	2022	914838	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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					
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。脳疾患の病態形成において、神経細胞以外の寄与が近年、注目されている。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。したがって、脳疾患の治療標的として、神経細胞のみならずグリア細胞や血管内皮細胞も考慮しなければならない。しかし、それらの詳細は明らかにされておらず、非神経細胞を標的にした治療薬も非常に限られる。本共同研究では、脳疾患において非神経細胞が神経細胞傷害に与える役割を明らかにし、病態形成機序の解明を試みることを目的とした。 本年度、研究代表者の小山は、脳損傷時においてアストロサイトから放出されるエンドセリンが脳血管内皮細胞に与える影響を解析し、エンドセリンが血管内皮細胞において細胞間接着分子を発現させる機序を明らかにした。脳損傷時の浮腫や神経炎症に対する治療薬の開発に繋がる可能性がある。また、連携先の久米は、ゼブラフィッシュを用いた脳梗塞モデルを構築し、脳虚血に対する神経保護薬のスクリーニング系としての有用性を示した（J Pharmacol Sci. 2021, 147:138-142.; Brain Res Bull. 2021, 173:45-52.）。ゼブラフィッシュの胚は透明であり、脳実質細胞および血管構造やその血流の観察が容易であるため、脳疾患時の脳血管内皮細胞と神経細胞の相互作用の解明に大きく貢献すると考えられる。八巻は、hairless 遺伝子変異が免疫異常だけでなく、精神行動にも影響することを見出した。これは、うつ病や不安症などの脳精神疾患への免疫細胞の関与を示唆するものである。泉は、本共同研究で見出した新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質が培養ミクログリアの炎症性活性化を抑制することを報告したが、これは Nrf2-ARE 経路とは別に ERK 経路の抑制作用に起因することを明らかにした（J Pharmacol Sci. 2022, 149:1-10.）。神経炎症が関与する脳疾患において本化合物が治療効果を示す可能性がある。本共同研究の成果として、脳疾患における非神経細胞、すなわち、アストロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、免疫細胞の関与が重要であることを明らかにでき、脳疾患の克服につながる非神経細胞の有望な治療標的を複数見出すことができた。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Sawahata M, Izumi Y, Akaike A, Kume T.	In vivo brain ischemia-reperfusion model induced by hypoxia-reoxygenation using zebrafish larvae.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Brain Res Bull.	173	2021	45-52.	

著 者 名	論 文 標 題			
Matsumoto M, Miyamoto M, Sawahata M, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Kume T.	Establishing a high throughput drug screening system for cerebral ischemia using zebrafish larvae.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
J Pharmacol Sci.	147	2021	138-142.	

著 者 名	論 文 標 題			
Izumi Y, Tatsumoto A, Horiuchi N, Arifuku M, Uegomori M, Kume T, Koyama Y.	TPNA10168, an Nrf-2 activator, attenuates inflammatory responses independently of Nrf2 in microglial BV-2 cells: Involvement of the extracellular-signal-regulated kinase pathway.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
J Pharmacol Sci.	149	2022	1-10.	

著 者 名	論 文 標 題			
Yamaki K, Terashi M, Yamamoto S, Fujiwara R, Inoue J, Shimizu K, Yanagita S, Doi Y, Kimura K, Kotani K, Sugihara M, Koyama Y.	Immunoglobulin a suppresses B cell receptor-mediated activation of mouse B cells with differential inhibition of signaling molecules.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Immunopharmacol Immunotoxicol.	44	2022	76-86.	

〈総 説〉

著 者 名	論 文 標 題			
Koyama Y.	Endothelin ETB Receptor-Mediated Astrocytic Activation: Pathological Roles in Brain Disorders.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Int J Mol Sci.	22	2021	4333	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
中村はるか、寺田 夏実、伊藤 恭介、泉 安彦、久米 利明、小山 豊	第71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	
新規 Nrf-2 活性化薬 TPNA10168 によるマウス培養アストロサイトでのグルタチオン生合成系の亢進	2021年10月9日	東大阪 (オンライン)	

発 表 者	学 会 名		
泉 安彦、小林 史佳、 八巻 耕也、久米 利明、 小山 豊	日本薬学会第 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
ミクログリアにおける Nrf2 活性化薬 TPNA10168 による抗炎症性作用の 機序		2022年3月28日	名古屋 (オンライン)

発 表 者	学 会 名		
八巻 耕也、小山 豊	日本薬学会第 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
マウス脾臓 B 細胞の B cell receptor 刺激による活性化に対する IgA の 抑制効果		2022年3月28日	名古屋 (オンライン)

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学 学長 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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					
(1) アルツハイマー病の病態形成機構：アルツハイマー病 (AD) の病態形成において血管老化が果たす役割を解明するため、血管内皮特異的細胞老化マウス (TERF2DN-Tg) と AD モデルマウス (APP/PS1) を交配して血管内皮特異的細胞老化 AD モデルマウス (APP/PS1;TERF2DN) を作出し、認知機能や脳表現型を解析した。APP/PS1 マウスで見られるアミロイド β ($A\beta$) プラーク形成や認知機能低下、神経突起変性は、APP/PS1;TERF2DN マウスでは軽減し、血管内皮細胞老化は保護的に機能することが明らかになった。保護作用発現の機序として、ミクログリアの機能変化が関与していると考えられた。 (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、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を解析した。コントロールマウスと比較して、CCR4 遺伝子欠損動脈硬化マウスでは、末梢リンパ組織および動脈硬化病変部において炎症性免疫応答の増強を認め、動脈硬化病変形成は有意に促進された。その機序として、制御性 T 細胞 (Treg) の炎症抑制作用の減弱が関与していると考えられた。 (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。最も短い波長側の UVB 照射により動脈硬化は有意に抑制されたが、他の波長の UVB では顕著な影響を認めなかった。この UVB 波長による動脈硬化抑制機序として、Treg の増加とその抑制機能関連分子の発現上昇が関与していると考えられた。					

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
Toru Tanaka, Naoto Sasaki, Hilman Zulkifli Amin, Ken-ichi Hirata, Yoshiyuki Rikitake	第 5 回日本循環器学会基礎研究フォーラム		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Identification of specific wavelengths of ultraviolet B for preventing atherosclerosis and their mechanisms of action.		2021年9月11日	大阪

発 表 者	学 会 名		
溝上 真生、堀部 紗世、神田 弥音、駒林和可葉、坂口ともみ、成松 芽衣、前田 桂子、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 44 回日本分子生物学会年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
血管内皮細胞老化はアルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能低下を抑制する		2021年12月3日	横浜

発 表 者	学 会 名		
前田 桂子、堀部 紗世、神田 弥音、駒林和可葉、坂口ともみ、成松 芽衣、溝上 真生、河内 正二、田中 亨、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 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
血管内皮細胞老化によるアルツハイマー病モデルマウスの認知機能低下の抑制		2022年3月26日	名古屋

発 表 者	学 会 名		
成松 芽衣、堀部 紗世、神田 弥音、駒林和可葉、坂口ともみ、前田 桂子、溝上 真生、河内 正二、田中 亨、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 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
糖尿病と認知症の相互連関における血管内皮細胞老化の役割		2022年3月26日	名古屋

発 表 者	学 会 名		
Aga Krisnanda、佐々木直人、 田中 亨、Hilman Zulkifli Amin、 赤井 瑞希、池内 一真、 石坂 麻衣、伊藤 謙、 岡本 拓朗、倉敷 治央、 田原 由貴、野尻 真那、 堀部 紗世、平田 健一、 力武 良行	日本薬学会第 142 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
特定波長の紫外線 B 波が免疫反応および動脈硬化に与える影響		2022年3月28日	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 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

2021 年 7 月 5 日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2022 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					
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。 (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。本学が保有する質量分析装置（高分解能質量分析計 [LTQ Orbitrap Discovery LC/MS/MS system]、高分子質量分析計 [autoflex maX MALDI-TOF MS] およびタンデム型質量分析計 [API3000 LC/MS/MS system]）を用いて、種々の生理活性物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った。遺伝性疾患の診断と治療効果の判定への応用性を検討する。遺伝性疾患のバイオマーカーになる生体内生理活性物質成分の新たな分析法を確立し、それらの尿中含有量と疾患との関係について引き続き検討した。この結果から診断と治療効果の判定に適応可能であると考えられた。また、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い、いくつかの候補を提案できた。 (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た。レチノイン酸の 4 位ラベル化体の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、どのような結晶状態であるかの判別を行った。 (3) その他の分析法により、先天性代謝異常症の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る。また、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。これを発展させて非侵襲的に採取した乾燥濾紙スポット試料を用いて、種々の遺伝子疾患の診断に応用できる方法を確立するため、まずは PCR の条件を検討した。テンプレート量、DBS の処理法、酵素の種類、温度条件、サイクル数などについて検討し、最適条件の方法を確立した。また、遺伝子疾患に関与する DNA セグメントを autoflex maX MALDI-TOF MS で分析する方法を確立した。					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Wijaya YOS, Nishio H, Niba ETE, Shiroshita T, Kato M, Bouike Y, Tode C, Ar Rochmah M, Harahap NIF, Nurputra DK, Okamoto K, Saito T, Takeuchi A, Lai PS, Yamaguchi S, Shinohara M.	Dried Blood Spot Screening System for Spinal Muscular Atrophy with Allele-Specific Polymerase Chain Reaction and Melting Peak Analysis.			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
Genet Test Mol Biomarkers	25	2021	293	

著 者 名	論 文 標 題			
Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Ar Rochmah M, Takarada T, Takeuchi A, Kimizu T, Okamoto K, Saito T, Awano H, Takeshima Y, Shinohara M	Stability and Oligomerization of Mutated SMN Protein Determine Clinical Severity of Spinal Muscular Atrophy.			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
Genes	13	2022	205	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
竹内 敦子、三村 昂央、 都出 千里、西尾 久英	日本薬学会第 142 年会		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
MALDI-TOF MS を用いた SMN 遺伝子セグメントの分析	2022.3.26	名古屋	