

共同研究 研究紀要

2023

(2022 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。

2022 年度共同研究（研究期間 2022. 4. 1 ～ 2023. 3. 31）

< 共同研究課題名 (研究テーマ) >

1. 薬物動態解析に基づく新規薬物送達キャリアの開発
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
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
4. 病態診断・治療に資する薬剤開発研究
5. 薬用植物におけるアルカロイド生合成機構の解明と代謝工学
6. 小胞体ストレス応答を標的とする創薬化学研究
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
8. 紫外線曝露により生じる光老化メカニズムの解明
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
10. 視床下部神経ペプチドによる脳-全身連関に関する研究
11. 酸・塩基複合触媒を用いる高効率有機合成法と理論解析法の融合研究
12. 脳疾患の病態制御に関わる分子メカニズムの解明
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
14. 脳機能保護および修復に関する薬理学的研究
15. 老化疾患の病態形成機構の解明と制御

< 研究代表者 >

- 製剤学研究室
教授 坂根 稔康
- 薬剤学研究室
教授 大河原 賢一
- 臨床薬学研究室
教授 江本 憲昭
- 薬品物理化学研究室
教授 向 高弘
- 医薬細胞生物学研究室
教授 土反 伸和
- 薬化学研究室
教授 奥田 健介
- 生命分析化学研究室
教授 小林 典裕
- 機能性分子化学研究室
教授 田中 将史
- 薬品化学研究室
教授 上田 昌史
- 病態生化学研究室
教授 加藤 郁夫
- 生命有機化学研究室
教授 波多野 学
- 衛生化学研究室
教授 長谷川 潤
- 生化学研究室
教授 北川 裕之
- 薬理学研究室
教授 小山 豊
- 医療薬学研究室
教授 力武 良行

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	製剤学研究室
氏名	坂根 稔康

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割
	坂根 稔康	神戸薬科大学	製剤学研究室	教授	研究の統括
	古林 呂之	神戸薬科大学	製剤学研究室	准教授	動物実験
	田中 晶子	神戸薬科大学	製剤学研究室	助教	動物実験
	山本 昌	京都薬科大学	薬剤学分野	教授	データの解析
	勝見 英正	京都薬科大学	薬剤学分野	准教授	薬物の定量

共同研究の成果
<p>Oxytocin (OXT)は脳下垂体後葉から分泌されるペプチド性ホルモンで、自閉症スペクトラム障害の治療薬の可能性が指摘されている。しかしながら、一般に、ペプチドの脳移行性は低く、通常の投与方法で、OXTの脳移行性を確保し、薬理効果を得ることは困難と考えられる。一方、鼻腔に投与された薬物が血液を介さずに直接脳組織へ移行するルートが存在が指摘されており、すでに鼻腔内投与されたOXTがこのルートを通じて脳内に効率よく移行する可能性を明らかにしている。また、薬物の脳内薬物動態に影響を与える因子として、glymphatic system (GPsys) が報告されている。GPsys とは、脳細胞外液の循環システムであり、OXTの脳からの消失を支配する因子の一つであることから、GPsysを制御することで、鼻腔から直接移行したOXTの脳内滞留性を改善し、その薬理効果を高める可能性が期待される。そこで、本研究では、GPsysの阻害剤として、acetazolamide (AZA)を利用し、鼻腔内投与されたOXTの脳内動態に対するAZAの併用の影響を評価した。</p> <p>まず、AZAをマウスに経口投与し、その30分後、OXTを鼻腔内投与した。投与後60分までの血漿中濃度、脳内濃度を測定した。OXTの脳内動態を評価するために、採取した脳を鼻腔に最も近い嗅球、それに続く脳前半部、脳後半部の3部位に分割して、濃度を測定した。OXTの血漿中濃度には、対照群とAZA投与群で大きな相違は観察されず、OXTの吸収に対するAZAの影響は観察されなかった。対照的に、脳内濃度は、いずれの部位においても、対照群と比較して、AZA投与群が高値を示すことが明らかとなった。さらに、その相違は嗅球で顕著であった。これら知見は、鼻腔から直接、脳内に移行したOXTの脳内動態にGPsysが影響を及ぼすこと、さらに、GPsysを制御することによって、より効率的なOXTの治療法の開発が可能であることを示唆する結果と考えられる。</p>

<学会発表>

発表者	学会名		
田中晶子、谷口貴子、西野真由、井上大輔、勝見英正、山本 昌、古林呂之、坂根稔康	第 38 回日本 DDS 学会学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
鼻腔内投与による oxytocin の脳内送達 — Glymphatic system の影響 —	2022 年 6 月 29 日 (水) ~ 6 月 30 日 (木)	オンライン配信	

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	薬剤学研究室
氏名	大河原 賢一

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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
----------	--------------------------------------

		氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割
構 成 員	本 学	大河原 賢一	神戸薬科大学	薬剤学研究室	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
	連 携 先	櫻井 文教	大阪大学	大学院薬学研究科分子生物学分野	准教授	腫瘍溶解性ウイルスを用いた検討全般

共同研究の成果

R4年度の研究では、R3年度に引き続き、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。マウスメラノーマ細胞株B16細胞を移植した担癌マウスにレオウイルスを投与後、腫瘍内のアポトーシス細胞および免疫細胞の浸潤を検討したところ、腫瘍細胞のみならず、癌関連線維芽細胞のアポトーシス(Tunel陽性細胞)が観察された。また、レオウイルス投与後、CD8陽性T細胞の腫瘍内浸潤が促進されていた。次に、PEG修飾リポソームが腫瘍内のどのような細胞群に取り込まれているか、Flowcytometryを用いて解析したところ、PEG修飾リポソームは腫瘍細胞だけでなく、血管内皮細胞(CD31陽性細胞)やミエロイド系細胞(CD11b陽性細胞)にも効率よく取り込まれていることが判明した。さらにレオウイルスと抗がん剤(ドキシソルビシン)を内封したPEG修飾リポソームの併用療法を試みたところ、両者の併用群において、レオウイルスもしくはPEG修飾リポソーム単独作用群と比較し、優れた腫瘍増殖抑制効果を示した。一方で、併用群および単独作用群ともに、顕著な体重減少等の大きな副作用は観察されなかった。以上の結果より、レオウイルスと微粒子性抗がん剤の併用療法は優れたがん治療法となりうることを示唆された。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Eguchi M, Hirata S, Ishigami I, Shuware N, Ono R, Tachibana M, Tanuma M, Kasai A, Hashimoto N, <u>Ogawara K</u> , Mizuguchi H, <u>Sakurai F</u>	Pre-treatment of oncolytic reovirus improves tumor accumulation and intratumoral disposition of PEG-liposomes		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Journal of Controlled Release	354	2023	35-44

<学会発表>

発表者	学会名		
<u>櫻井文教</u> ^{1,2} 、江口真帆 ¹ 、平田聖也 ² 、石神育歩 ¹ 、田沼将人 ¹ 、笠井淳司 ^{1,2} 、橋本均 ^{1,2,3} 、細川美香 ⁴ 、 <u>大河原賢一</u> ⁴ 、水口裕之 ^{1,2,3,5} 、(1 阪大院薬、2 阪大薬、3 阪大先端、4 神戸薬科大、5 医薬健康研)	第 38 回日本 DDS 学会		
タイトル	開催日	開催場所	
レオウイルスの前投与による PEG 修飾リポソームの腫瘍集積の向上に関する検討	2022 年 6 月 29 日、30 日	オンライン開催	

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	臨床薬学研究室
氏名	江本 憲昭

2022年7月31日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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
----------	---------------------------

	氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割	
構 成 員	本 学	江本 憲昭	神戸薬科大学	臨床薬学研究室	教授	臨床検体を用いた細胞生物学的および分子生物学的解析
	連 携 先	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	臨床データの解析
		谷口 悠	神戸大学	医学部附属病院循環器内科	助教	臨床データの収集

共同研究の成果

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

肺高血圧症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症例数が増加している。特に血栓内膜摘除術や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。しかしながらこれらの侵襲的治療後も自覚症状が継続する症例が一定数存在することが新たな臨床的課題として浮かび上がってきた。

私たちは血栓内膜摘除術を受けた慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者の右心カテーテルを用いた血行動態評価から肺血管抵抗と肺動脈コンプライアンスの積が術後の症状と相関することを明らかにし、論文として公表した(IJC Heart & Vasculature, 2022)。これは血栓内膜摘除術の術後に新たな治療法を追加すべきかどうかの判断において有効な指標となることが期待される。また、バルーンカテーテルを用いた肺動脈形成術を受けた慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者の術後の症状残存を予測する方法としてDual-energy CTが有用であることを明らかにし、論文として公表した(Life (Basel), 2022)。この成果は、バルーンカテーテルを用いた肺動脈形成術を実施する前にその成否を予測できる指標となるため、手術の適応を判断するのに有効な指標を提供する。さらに、慢性血栓塞栓性肺高血圧症は高齢者に多く、慢性閉塞性肺疾患を合併する症例が多数認められる。合併している場合、慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する治療が自覚症状の改善に寄与するかどうかは術前には不明であった。私たちは149例の症例を解析し、慢性閉塞性肺疾患を合併している症例でもバルーンカテーテルを用いた肺動脈形成術が有効であることを示し、論文として公表した(J Am Heart Assoc., 2023)。

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		
Kenichi Yanaka, Kazuhiko Nakayama, Yu Taniguchi, Hiroyuki Onishi, Yoichiro Matsuoka, Hidekazu Nakai, Kenji Okada, Toshiro Shinke, Noriaki Emoto, Ken-ichi Hirata	RC time (resistance × compliance) is related to residual symptom after pulmonary endarterectomy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension		
雑誌名	巻	発行年	ページ
IJC Heart & Vasculature	40	2022	101031

著者名	論文標題		
Keisuke Miwa, Yu Taniguchi, Hiroyuki Fujii, Yoichiro Matsuoka, Hiroyuki Onishi, Kenichi Yanaka, Yu Izawa, Yasunori Tsuboi, Atsushi Kono, Noriaki Emoto, Kenichi Hirata	Microvasculopathy Evaluated by Dual-Energy Computed Tomography in Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension and Pulmonary Arterial Hypertension		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Life (Basel)	12	2022	1232

著者名	論文標題		
Hiroyuki Fujii, Yu Taniguchi, Sachiyo Yoneda, Keisuke Miwa, Yoichiro Matsuoka, Kenichi Yanaka, Yasunori Tsuboi, Noriaki Emoto, Kenichi Hirata	Efficacy and Safety of Balloon Pulmonary Angioplasty for Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension and Comorbid Chronic Obstructive Pulmonary Disease		
雑誌名	巻	発行年	ページ
J Am Heart Assoc.	12	2023	e026466

<学会発表>

発表者	学会名		
Yu Taniguchi, Sachiyo Yoneda, Hiroyuki Fujii, Noriaki Emoto, Ken-ichi Hirata	第 87 回日本循環器学会学術集会		
タイトル		開催日	開催場所
Sleep Apnea and Nocturnal Desaturation in Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension		2023/3/10	博多

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	薬品物理化学研究室
氏名	向 高弘

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	病態診断・治療に資する薬剤開発研究
----------	-------------------

構 成 員	氏 名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職 名	本研究における役割
	向 高弘	神戸薬科大学	薬品物理化学研究室	教授	研究統括・プローブ評価
	佐野 紘平	神戸薬科大学	薬品物理化学研究室	准教授	細胞・動物実験
	山崎 俊栄	神戸薬科大学	薬品物理化学研究室	講師	プローブ合成・物性評価
	萩森 政頼	武庫川女子大学	薬学部・薬品分析学研究室	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)、動脈硬化症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、2022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ヒアルロン酸を静電的相互作用により順次被覆させたナノ粒子型薬剤を作製し、本薬剤がCD44高発現がんへ高く集積することをインビボレベルで確認してきた。2022年度は、本薬剤の投与液中安定性評価および薬物動態パラメーター解析を実施し、これまでの研究成果と合わせて論文発表した。さらに、がんの温熱療法を目的として、ナノ粒子のコアを dendrimer から金ナノロッドに置換したナノ粒子型薬剤を新たに作製することに成功し、本薬剤がCD44高発現がんへ集積することを示した。また、我々はこれまでに、テトラジン誘導体を膜に導入した抗がん剤内包リポソームを作製し、テトラジン骨格と低分子ノルボルネンとの化学的反応によりリポソームからの薬物放出が促進されることを示すとともに、本手法がインビボレベルで機能することを明らかとしてきた。2022年度は、本リポソームの血清中安定性評価を実施し、これまでの研究成果と合わせて論文発表した。さらに、新規テトラジン誘導体を合成し、より迅速な薬物放出を達成できるリポソーム製剤の開発を進めた。

全身性アミロイドーシスについては、その核医学診断を目的として、我々はこれまでに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の開発を進めてきたが、2022年度は、既存のアミロイド検出プローブとの比較により、その有用性を明らかにできたことから、本研究成果を国内学会で1件発表した。

動脈硬化症については、不安定プラークの核医学診断を目的として、プラークの不安定化に関連する酵素を標的とした放射性標識薬剤の合成を進めた。得られた放射性標識体は、疾患に関連するマクロファージへ高く取り込まれることを明らかにした。今後、病態モデルマウスを用いた検討を進めていく予定である。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Kento Kannaka, Kohei Sano, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Masayori Hagimori, Takahiro Mukai	Enhanced therapeutic effect of liposomal doxorubicin via bio-orthogonal chemical reactions in tumors.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Molecular Pharmaceutics	19	2022	1400-1409

著者名	論文標題		
Toshie Tanaka, Kohei Sano, Mamia Munemura, Masayori Hagimori, Rihori Moriyama, Azusa Yamamoto, Kei-ichi Ozaki, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai	A radiolabeled nanoparticle probe coated with hyaluronic acid via electrostatic interaction to diagnose CD44-positive tumors.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Journal of Drug Delivery Science and Technology	73	2022	103473

<学会発表>

発表者	学会名		
原武 芳江, 佐野 紘平, 土屋 美希, 皆木 香織, 宗兼 将之, 山崎 俊栄, 萩森 政頼, 向 高弘	第16回日本分子イメージング学会総会・学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
全身性アミロイドーシスの核医学診断に資する放射性ヨウ素標識 thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブの開発	2022/5/26	京都	

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	医薬細胞生物学研究室
氏名	士反 伸和

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	薬用植物におけるアルカロイド生合成機構の解明と代謝工学
----------	-----------------------------

構 成 員	氏 名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職 名	本研究における役割
	士反 伸和	神戸薬科大学	医薬細胞生物学研究室	教授	研究統括
	山田 泰之	神戸薬科大学	医薬細胞生物学研究室	講師	転写因子などの機能解析と代謝工学
	寺坂 和祥	名古屋市立大学	薬学研究科医療機能薬学専攻	講師	生合成酵素などの探索と機能解析

共同研究の成果

アリストロキア酸(Aristolochic Acid; AA)はウマノズグサ属やカンアオイ属植物に広く存在するベンジルイソキノリンアルカロイド(BIA)の一種である。腎障害を引き起こすことが知られており、類似生薬への混入被害も報告されている。代謝工学的にAA生合成を遮断できれば、ウマノズグサ科植物の安全な利用や希少な中間体の生物活性解明も進むと期待されるが、AA生合成酵素のほとんどは未同定である。そこで、本年度は、日本に自生するウマノズグサ(*Aristolochia debilis*)のAA生合成経路の解明を目的に、中間体の生合成に関わると予想されるO-methyltransferaseの機能解析を行った。

先行研究においてウマノズグサから単離されていた2つのO-methyltransferase候補遺伝子の酵素機能を明らかにするために、大腸菌における発現誘導および精製を行い、いくつかの基質を用いて*in vitro*における酵素アッセイを行った。生成物のUPLC-MS解析の結果、2つの候補それぞれ、特定の基質に対する6位または7位の水酸基のメチル化活性を有することが明らかとなった。特に、候補の1つのタンパク質の酵素アッセイで検出された6位水酸基のメチル化体のうちの1つは、推定AA生合成経路中にも存在しており、本候補タンパク質がAA生合成における重要な生合成酵素の1つである可能性が示唆された。

さらに、AAの生合成のみならず、輸送や転写制御に関わる遺伝子をより効率よく網羅的に探索するために、AAの植物体における分布を詳細に解析した。ウマノズグサの植物体を組織ごとに細かく分け、各部位のAA蓄積量をUPLC-MSにより分析した結果、AAは全ての組織において蓄積が認められたが、特に特定の組織に高蓄積していることが示された。これらの結果をふまえ、AAを多く含む複数の組織からRNAを取得し、RNA sequencingと発現比較解析を行った。今後、それら組織において特に高発現している遺伝子や、上記でAA生合成に関わると推定された酵素遺伝子との発現相関の高い遺伝子を中心に、AA生合成との関連性を明らかにしていく予定である。

<学会発表>

発表者	学会名		
山田泰之, 松井俊樹, 野村史夏, 土反伸和, 寺坂和祥, 佐藤文彦	日本生薬学会第68回年会		
タイトル		開催日	開催場所
ウマノズクサのアリストロキア酸生合成に関わる O-methyltransferase の探索と機能解析		2022年9月11日	松山 (Web)

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	薬化学研究室
氏名	奥田 健介

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	小胞体ストレス応答を標的とする創薬化学研究
----------	-----------------------

	氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割	
構 成 員	本 学	奥田 健介	神戸薬科大学	薬化学研究室	教授	分子設計、合成、in vitroおよび培養細胞を用いた活性評価試験
		高木 晃	神戸薬科大学	薬化学研究室	講師	分子設計、合成の支援
	連 携 先	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. 栄養飢餓耐性解除能に着目したアリーリデン・ヘテロ5員環の構造活性相関研究
ベンジリデン・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ており、低栄養選択毒性に関するフェニル基上の置換基は許容範囲が広いものであることも2021年度までに明らかにしていた。今年度はさらに詳細なフェニル基上の置換基効果、ならびに置換フェニル基をナフタレン環ならびにヘテロ環へと変換した誘導体の構造活性相関に関しても検討を行った。その結果、ベンゼン環上の置換基としては強力な電子供与性基を除いては比較的許容されることが明らかとなった。ナフタレン環およびヘテロ環を有する誘導体の構造活性相関からも芳香環が適度な電子密度を有していることが活性に必要であ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創薬化学研究
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、がん細胞が獲得した栄養飢餓耐性の解除能を有することで注目されている天然物(-)-uvaridacol Lと立体構造が類似している点に着目して検討を進めた結果、期待通りに1,3,6-tribenzoyl体もがん細胞の獲得した栄養飢餓耐性の解除能を有することを2021年度においてすでに見出していた。そこで、栄養飢餓培地下における1,3,6-tribenzoyl体のがん細胞への影響の評価を蛍光顕微鏡を用いて行ったところ、細胞の収縮と細胞膜の崩壊とともに蛍光イメージングにより実際の細胞死状態が観察された。以上の結果、D-glucoseよりわずかに1行程にて合成可能な1,3,6-tribenzoyl-β-D-glucose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ことを裏付けた。

<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	第 72 回日本薬学会関西支部大会		
タイトル		開催日	開催場所
栄養飢餓耐性を解除するアリーリデン・ヘテロ環関連化合物の創薬化学研究		2022.10.8.	枚方

発表者	学会名		
高木晃, 北西悟司, 大橋憲太郎, 奥田健介	日本薬学会第 143 年会		
タイトル		開催日	開催場所
がんの栄養飢餓耐性を解除するアリーリデン・チアゾリジンジオン誘導体の開発		2023.3.25.-28.	札幌

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	生命分析化学研究室
氏名	小林 典裕

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職 名	本研究における役割
	小林 典裕	神戸薬科大学	生命分析化学研究室	教授	抗apoE抗体の設計・作製
	大山 浩之	神戸薬科大学	生命分析化学研究室	准教授	抗apoE抗体の評価
	森田 いずみ	神戸薬科大学	生命分析化学研究室	講師	抗apoE抗体の応用
	木口 裕貴	神戸薬科大学	生命分析化学研究室	特任助教	抗apoE抗体のscFv化
	斎藤 博幸	京都薬科大学	薬品物理化学分野	教授	apoE体内動態および病態発現の解析
	長尾 耕治郎	京都薬科大学	薬品物理化学分野	准教授	apoE抗体の応用
	扇田 隆司	京都薬科大学	薬品物理化学分野	助教	apoE抗体の物性評価

共同研究の成果

アポリポタンパク質E(アポE)は脳内HDLの主要タンパク質であり、神経細胞へのコレステロール供給を担うことで神経突起の伸長やシナプス形成に重要な役割を果たす。アポEには野生型のアポE3、高脂血症に関与するアポE2、アルツハイマー病発症危険因子として注目されるアポE4の主に3つの遺伝子多型(アイソフォーム)が存在する。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アポE4は、HDLコレステロール搬出・供給能力がアポE3に比べ著しく劣ることが報告されているが、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。

本研究では、アポE4およびE3に特異的なモノクローナル抗体を新規に作製し、dotblotによるアポE分子上の結合部位(エピトープ)の特定や可変部遺伝子のクローニングによる一次構造の決定など、免疫化学的な性質について詳細な解析を行ってきた。本年度は、dotblotの結果から192-221残基ヒンジ領域をエピトープとする抗体mAb#7-8(アポE3とE4に反応する)を一次抗体、N末端1-191残基領域をエピトープとする抗体mAb#14-4(アポE4にのみ反応する)を二次抗体として用いるsandwich ELISA系を構築し、アポE3とアポE4を識別して検出・定量することに成功した。また、昨年度クローニングした遺伝子の塩基配列を解析した結果、mAb#14-4の可変部(V_H および V_L)のサブグループは、それぞれIIA、IIであった。この抗体について、その V_H 遺伝子の3' 末端および V_L 遺伝子の5' 末端にリンカーの一部をコードする遺伝子を付加したのち両者を連結してscFv 遺伝子を構築した。これらを発現ベクターに組み込み、大腸菌に導入して可溶性scFvを得た。得られたscFvをWestern Blottingに付したところ、アポE4 特異的に結合することが確認された。今後、これらと発光酵素(ルシフェラーゼ)との融合タンパク質を作製することで、開発したELISA系のさらなる高感度化が可能であると期待される。また、これらを用いて各アイソフォームの体内動態を解析することで、上記の病態発現における機序解明の一助になるものと期待される。

<研究論文>

著者名	論文標題		
T. Ohgita, H. Kono, I. Morita, H. Oyama, T. Shimanouchi, N. Kobayashi, H. Saito	Intramolecular interaction kinetically regulates fibril formation by human and mouse α -synuclein		
雑誌名	巻	発行年	ページ
<i>Sci. Rep.</i>	13	2023	10885

著者名	論文標題		
Y. Kiguchi, I. Morita, A. Tsuruno, N. Kobayashi	Retrieving dissociation-resistant antibody mutants: An efficient strategy for developing immunoassays with improved sensitivities		
雑誌名	巻	発行年	ページ
<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	45	2022	1432-1437

著者名	論文標題		
I. Morita, Y. Kiguchi, S. Nakamura, A. Yoshida, H. Kubo, M. Ishida, H. Oyama, N. Kobayashi	More than 370-fold increase in antibody affinity to estradiol-17 β by exploring substitutions in the V _H -CDR3		
雑誌名	巻	発行年	ページ
<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	45	2022	851-855

<学会発表>

発表者	学会名		
河野 弘樹、鎌田 真央、南波 憲宏、扇田 隆司、森田 いずみ、大山 浩之、長尾 耕治郎、小林 典裕、斎藤 博幸	第 72 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
α シヌクレインの線維化及び細胞毒性に対する高凝集性領域の寄与		2022. 10. 08	枚方

発表者	学会名		
坂井 瑚都、中野 未悠、扇田 隆司、木口 裕貴、森田 いずみ、大山 浩之、長尾 耕治郎、小林 典裕、斎藤 博幸	第 12 回京都 4 大学連携研究フォーラム		
タイトル		開催日	開催場所
アポ E アイソフォームを特異的に検出可能なイムノアッセイ系の構築		2022. 11. 29	京都

発表者	学会名		
坂井 瑚都、福井 和華、南波 憲宏、扇田 隆司、木口 裕 貴、森田 いずみ、大山 浩 之、長尾 耕治郎、小林 典 裕、斎藤 博幸	日本薬学会 第143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のアポEアイソフォ ーム反応特性の物理化学的評価	2023.03.26	札幌	

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	機能性分子化学研究室
氏名	田中 将史

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	紫外線曝露により生じる光老化メカニズムの解明
----------	------------------------

	氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割	
構 成 員	本 学	田中 将史	神戸薬科大学	機能性分子化学研究室	教授	新規評価系の構築
	連 携 先	坂本光	北里大学	薬学部放射性同位元素研究室	講師	データの解析
		高瀬ひろか	北里大学	薬学部放射性同位元素研究室	助教	研究の遂行

共同研究の成果

ヒト角化細胞 HaCaTへのUVA 照射に伴う細胞傷害性を評価したところ、線量依存的なLDH放出の増加及び細胞生存率の低下が認められた。このUVA 誘導性細胞死がカスパーゼ阻害剤またはネクローシス阻害剤により抑制されたこと、及びUVA曝露角化細胞ではパイロトーシス活性を示すGasdermin DのN末端断片の増加が認められたことから、アポトーシス、ネクローシス及びパイロトーシスによる細胞死の誘導が考えられた。このUVA曝露角化細胞の培養上清にはdamage-associated molecule patterns (DAMPs)の一種であるHMGB1が検出された。そこで、UVA曝露により細胞外へ放出された因子の光老化に及ぼす影響を評価するために、UVA曝露角化細胞の培養上清を用いてヒト線維芽細胞Hs68を培養したところ、コラーゲン線維の分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ1(MMP-1)の発現が上昇した。なお、線維芽細胞へのHMGB1の単独処置においては、MMP-1の明らかな発現上昇は認められなかったことから、HMGB1が他のDAMPsと協調してMMP-1の発現上昇をもたらすことが推察された。また、カスパーゼ阻害剤、ネクローシス阻害剤またはHMGB1阻害剤を前処置したUVA曝露角化細胞の培養上清による培養ではMMP-1の発現上昇は認められなかった。以上の結果から、UVA曝露による光老化進行原因の一つとして、角化細胞の細胞死誘導により放出されるHMGB1をはじめとするDAMPsが、線維芽細胞に協調的に作用してコラーゲン線維の分解を促進することが考えられた。

<学会発表>

発表者	学会名		
小林 咲帆、高瀬 ひろか、村瀬 未遊、田中 将史、坂本 光	日本薬学会第 143 年会		
タイトル		開催日	開催場所
UVA 曝露皮膚細胞の細胞死が光老化に及ぼす影響		2023 年 3 月 27 日	札幌

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	薬品化学研究室
氏名	上田 昌史

2022年4月1日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割
		本学	上田 昌史	神戸薬科大学	薬品化学研究室	教授
		武田 紀彦	神戸薬科大学	薬品化学研究室	准教授	反応開発
		安井 基博	神戸薬科大学	薬品化学研究室	助教	反応開発
	連携先	松原 浩	大阪公立大学	理学研究科	教授	反応機構解析

共同研究の成果

β -ラクタムは様々な生物活性が報告されており、医薬品シードとして高い潜在性を秘めたヘテロ環である。そのため、その骨格の効率的合成法の確立は重要な課題の一つである。簡便に β -ラクタムを合成する手法として、プロパルギルアミンを基質としたカルボニル化を経る合成法が報告されている。しかし、この方法は高圧一酸化炭素を必要とすることが問題として挙げられる。また、可視光条件でカルバモイルクロリドから β -ラクタムを合成する手法が報告されている。しかし、基質一般性や収率に課題が残されていた。そこで、本研究では、プロパルギル位の炭素-水素結合の結合エネルギーが比較的小さいことに着目し、*N*-プロパルギルカルバモイルクロリドを用いた β -ラクタムの合成を検討した。初めに*N*-フェニルプロパルギルカルバモイルクロリドを用いて反応条件を検討した。まず、可視光レドックス触媒存在下での反応条件を検討したが、全く期待した反応は進行しなかった。そこで、次にラジカル開始剤としてジメチル亜鉛を用いて行ったところ、 β -ラクタムが中程度の収率で得られた。次に、ジメチル亜鉛を系中で発生させる目的で、亜鉛とヨウ化メチルを用いたところ75%の収率で β -ラクタムを得ることができた。次に基質適応範囲について検討を行った結果、本反応は様々な基質に適用可能で、特に、嵩高い置換基をもつ基質でも適用可能であることが判明した。また、プロパルギルアミンから β -ラクタムを合成できるワンポット化にも成功した。本反応の反応機構は、当初は以下のように推定していた。ジメチル亜鉛から発生するメキシラジカルがプロパルギル位の水素を引き抜き、プロパルギルラジカル生成と異性化を経てアレニルラジカルが生じ、ハロゲン原子移動が進行してカルバモイルラジカルが生成し、最後に4-*exo*-環化が進行することで、 β -ラクタムが生成していると考えていた。しかし、計算化学による反応機構の解析を行った結果、全く異なるラジカル連鎖反応が進行している事が示唆された。現在は、計算化学によって見出された反応機構を証明するための様々な検証実験を行っている。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Motohiro Yasui, Naoko Tahara, Hiroshi atsubara, Norihiko Takeda, and Masafumi Ueda	Gold-Catalyzed Oxyarylation/Hydroxylation of <i>N</i> -Alkoxypropionamides for Chemoselective Synthesis of 4-Aryl-3-(2 <i>H</i>)-isoxazolones		
雑誌名	巻	発行年	ページ
<i>Adv. Synth. Catal.</i>	364	2022	3708-3715

<学会発表>

発表者	学会名		
(¹ 神戸薬大・ ² 阪公大院理) 安井基博 ¹ 、永井皓也 ¹ 、寺尾まりな ¹ 、武田紀彦 ¹ 、松原浩 ² 、上田昌史 ¹	第42回有機合成若手セミナー		
タイトル		開催日	開催場所
カルバモイルクロリドのラジカル環化による短工程β-ラクタム合成法の開発		2022年 8月10日	オンライン

発表者	学会名		
(¹ 神戸薬大・ ² 阪公大院理) 安井基博 ¹ 、永井皓也 ¹ 、寺尾まりな ¹ 、武田紀彦 ¹ 、松原浩 ² 、上田昌史 ¹	第72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
カルバモイルクロリドのラジカル環化による短工程β-ラクタム合成法の開発		2022年 10月8日	摂南大学

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	病態生化学研究室
氏名	加藤 郁夫

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	視床下部神経ペプチドによる脳-全身連関に関する研究
----------	---------------------------

構成員	氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割
	加藤 郁夫	神戸薬科大学	病態生化学研究室	教授	研究総括、化学的、免疫化学的実験
	浅川 明弘	鹿児島大学	医歯学総合研究科心身内科学分野	教授	鹿児島大学での研究管理および生理学的実験

共同研究の成果

本研究は、ネスファチンやオキシトシンなどの視床下部神経ペプチドが脳-全身機能の調節に与える影響を検討する研究の一環として、エネルギー代謝や行動などとの関連を検討することを目的とした。視床下部ネスファチン-1の主要な活性化因子として血中グルコース、膵からのインスリンや腸内分泌細胞からのGLP-1が知られているが、これらのホルモン連関によるエネルギー代謝制御に関しては明らかになっていない。本研究では、ネスファチン-1の全身作用を解析する研究として、まず合成ネスファチン-1を用いて膵機能の調節を検討し、さらにその全身作用へと進展させて行く。ネスファチン-1は、82アミノ酸残基からなり、化学合成において限界ともいえる極めて長鎖のポリペプチドであり、その全合成を達成し生理学的な研究に必要な十分量を得るには、従来のペプチド合成化学の知見に基づいた、より周到な合成計画が必要である。本研究では、連続フロー方式によるFmoc-固相合成法を採用し、各段階のFmoc-アミノ酸誘導体の反応性を考慮して、新規のプログラムを確立することによりネスファチン-1の全合成を達成した。本合成ネスファチン-1を用い、絶食下のマウス消化器系におけるエネルギー代謝ペプチドに対するin vivoの検討で、ip投与ネスファチン-1は、GLP-1分泌を増加することによりインスリン分泌を促進することを示した(Mol Med Rep, 2023, 27(1), 7.)。今後は、ネスファチン-1のアナログを用いた展開研究へと進展させて行きたい。

外因性ホルモンと定義したrubiscolin-6は、主に視床下部のNPY/AgRPやオレキシン神経を活性化して摂食促進作用を発現するが、消化管運動に対する効果は知られていないため、本研究では、rubiscolin-6の消化管運動に対する作用を検討した。Rubiscolin-6は、 δ -オピオイド受容体を介して急速に食後胃運動抑制作用を示し、その作用が消失した後に摂食行動を増加させることを明らかにした(Mol Med Rep, 2022, 26(5), 340.)。また今後も引き続き、外因性ホルモンとしての性質の解明を行い医薬への展開を目指して研究を行って行く。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Tagawa N, Ogura H, Miyawaki H, Asakawa A, Kato I.	Intraperitoneal administration of nesfatin-1 stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in fasted mice.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Mol Med Rep	27(1)	2023	7

著者名	論文標題		
Ataka K, Asakawa A, Kato I.	Rubiscolin-6 rapidly suppresses the postprandial motility of the gastric antrum and subsequently increases food intake via δ -opioid receptors in mice.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Mol Med Rep	26(5)	2022	340

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	生命有機化学研究室
氏名	波多野 学

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	酸・塩基複合触媒を用いる高効率有機合成法と理論解析法の融合研究
----------	---------------------------------

	氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割	
構 成 員	本 学	波多野 学	神戸薬科大学	生命有機化学研究室	教授	研究の総括
		平田 翼	神戸薬科大学	生命有機化学研究室	助教	有機合成実験の遂行
	連 携 先	坂田 健	東邦大学	薬学部 薬品物理化学教室	教授	理論計算化学の遂行
		吉川 武司	東邦大学	薬学部 薬品物理化学教室	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の合成反応におけるマルチ制御は、現代有機化学に課せられた大きな課題の一つである。特に有害物質の使用を抑え、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。本研究では協奏的な酸・塩基複合触媒システムを開発し、触媒キャビティ内での協奏的な機構により酸部位と塩基部位で基質と反応剤をそれぞれ活性化する。こうした次世代の触媒の創製や改良には、活性化された複数の分子を含む中間体や遷移状態の反応メカニズムの考察が不可欠であるが、低分子化合物はフレキシブルで不安定なため、実験化学的な追跡は困難である。こうした点を補うために、理論計算化学に基づくDFT計算を行い、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することにより、最も確からしい反応機構を導き、実験化学と計算科学の両輪で研究を推進した。本年度は、亜鉛(II)触媒とグリニャール反応剤を用いるアト型活性中間体を經由するニトリルへの高選択的アルキル付加反応について取り組んだ。その結果、化学量論量よりも触媒量の亜鉛(II)種の使用が反応を著しく促進するという通常では考えられない興味深い実験結果を得た。この反応は、亜鉛(II)アト錯体の形成が鍵となり円滑に進行していると考えられるが、多核錯体である可能性が高く、東邦大学・坂田健グループによる協力のもとで反応機構の詳細をDFT計算して解明に挑んだ。その結果、多段階に渡る多核亜鉛(II)アト錯体の形成とその反応関与が強く示唆される計算結果が得られた。現在のところ、これらの過程で触媒量の使用が優れる理由が含まれていると推測しており、解明を続けている。一方、化学選択的な高効率エステル化反応に有効なリン酸エステル触媒の酸性度(pKa)評価もDFT計算で行った。その結果、pKaによる影響は小さく、動的挙動による影響や、フレキシビリティの変化に伴う触媒会合が強く示唆された。どちらの研究テーマも、実験結果と計算結果が酸・塩基複合触媒の特性の根拠につながっている。これらの研究成果は、日本化学会第103春季年会(2件)、第72回日本薬学会関西支部総会・大会などで発表した。

<学会発表>

発表者	学会名		
青木 心呂、吉川 武司、吉川 遼、湯田 静、沖津 貴志、波多野 学、坂田 健	日本コンピュータ化学会 2022 年春季年会		
タイトル		開催日	開催場所
アルキノールの脱水-求電子的環化反応の理論的研究		2022 年 6 月 1-3 日	東京工業大学 (オンラインハイブリッド開催)

発表者	学会名		
波多野 学、平田 翼、坂田 健、吉川 武司	第 72 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
Grignard 反応剤を用いるニトリルへの触媒的アルキル付加反応		2022 年 10 月 8 日	摂南大学 枚方キャンパス

発表者	学会名		
沖津 貴志、吉川 武司、坂田 健、矢倉 隆之、波多野 学	第 48 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
シリルアルキノールのタンデム型脱水-環化反応		2022 年 11 月 28-29 日	千葉市民会館

発表者	学会名		
波多野 学、桑野 葵咲、飛鳥居 里穂、永吉 絢子、星原 遥花、平田 翼、梅澤 美帆、椿 紗穂里、吉川 武司、坂田 健	日本化学会第 103 春季年会 2023 (野田)		
タイトル		開催日	開催場所
塩化亜鉛触媒とグリニャール反応剤を用いるニトリルへのアルキル付加反応		2023 年 3 月 22-25 日	東京理科大学 (野田)

発表者	学会名		
椿 紗穂里、梅澤 美帆、吉川 武司、坂田 健、桑野 葵咲、飛鳥居 里穂、永吉 絢子、星原 遥花、平田 翼、波多野 学	日本化学会第 103 春季年会 2023 (野田)		
タイトル		開催日	開催場所
塩化亜鉛触媒とグリニャール反応剤を用いるニトリルへのアルキル付加反応の理論的研究		2023 年 3 月 22-25 日	東京理科大学 (野田)

発表者	学会名		
青木 心呂、篠木 政孝、平田 修都、吉川 武司、坂田 健、沖津 貴志、矢倉 隆之、波多野 学	日本薬学会第 143 年会 (札幌)		
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-環化反応に関する量子化学的検討		2023 年 3 月 25-28 日	北海道大学

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	衛生化学研究室
氏名	長谷川 潤

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職 名	本研究における役割
	長谷川 潤	神戸薬科大学	衛生化学研究室	教授	研究統括・遺伝子発現評価
	中山 啓	神戸薬科大学	衛生化学研究室	助教	組織構造・細胞動態の評価
	瀬木(西田) 恵里	東京理科大学	先進工学部生命システム工学科	教授	神経新生・神経活動の評価

共同研究の成果

本共同研究においては、脳梗塞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つけるシグナル伝達系の解明を行うことを目的としている。

2022年度は、特にステロイドホルモンシグナルとの関連について検討を行い、以下の結果を得た。
 (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、マイクログリア及びアストロサイトの動態を指標に各種シグナルが脳梗塞の病態をどのように変化させるかを検討している。脳梗塞はストレス負荷が過剰になるときに発症リスクが高まるため、発症前のストレス負荷が発症後の病態進行にどのように影響するのかを検討した。代表的なストレスホルモンであるコルチコステロンまたは対照としての溶媒を4日間投与し、その後に光血栓性脳梗塞モデルを作製、術後7日目に組織学的解析を行った。コア領域とペナンブラ領域の境界にはアストロサイトが集積し、明瞭な境界を作るが、コルチコステロン投与群では溶媒群に比べてこの境界が不明瞭であった。DAPI染色による核の観察により境界部への炎症系免疫細胞の集積が少ないこと、また抗IBA1/AIF1抗体による免疫染色により境界部でのマイクログリアの活性化が減弱していることが示唆された。一方、抗GFAP抗体により、コルチコステロン投与群ではアストロサイトの反応性が上昇していることが分かった。これらのことから、発症前のストレス負荷は脳梗塞部位での炎症反応を減弱させ、その結果、グリア瘢痕の形成を乱す可能性が考えられた。

(2) 脳梗塞は女性においては閉経後の発症が多い。そこでエストロゲンの有無が脳梗塞発症後の病態進行にどのように影響するかを明らかにするため、雄マウスに光血栓性脳梗塞モデルを作製し、エストラジオールまたは溶媒を8日間投与した。その翌日に解析した。マイクログリアとアストロサイトの動態を観察したところ、エストラジオール投与は、脳梗塞部位におけるマイクログリアの活性にはほとんど影響を与えなかった。一方、アストロサイトの反応性はエストラジオール投与により減弱していた。このことから、閉経後のエストロゲン欠乏はアストロサイトの反応性上昇を促し、グリア瘢痕の形成を促進させる可能性が示唆された。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Mari Kondo, Haruka Okazaki, Kei Nakayama, Hirofumi Hohjoh, Kimie Nakagawa, Eri Segi-Nishida, Hiroshi Hasegawa	Characterization of astrocytes in the minocycline-administered mouse photothrombotic ischemic stroke model		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Neurochemical Research	47	2022	2839-2855

<学会発表>

発表者	学会名		
近藤 真理, 岡崎 晴夏, 中山 啓, 瀬木一西田 恵里, 長谷川 潤	第49回 日本毒性学会学術年会		
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いてミノサイクリンが病態進行に与える効果	2022年 7月2日	札幌	

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	生化学研究室
氏名	北川 裕之

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割
本学	北川 裕之	神戸薬科大学	生化学研究室	教授	生合成の解析と全体の総括
	灘中 里美	神戸薬科大学	生化学研究室	准教授	糖鎖の機能解析
連携先	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。

骨組織の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって維持されている。遺伝性疾患であるRaine(レイン)症候群の骨硬化症状が、カゼインキナーゼとして知られていたFAM20Cというタンパク質の変異によって誘発されるコンドロイチン硫酸鎖の異常な構造変化に起因すること、FAM20Cはコンドロイチン硫酸の4位の硫酸化に関与する硫酸基転移酵素(C4ST-1)と相互作用することで、コンドロイチン硫酸鎖の微細な硫酸化糖鎖構造の形成に影響を与え、Raine症候群に特徴的な骨硬化症状を引き起こすことを明らかにした(Koike, T., et al. (2022) Nature Commun. 13, 7952.)。

コンドロイチン硫酸は硫酸化糖鎖構造依存的に機能を発揮するため、特定の硫酸化構造を認識する抗体により機能ドメインの空間的分布を解析したり、対象の硫酸化糖鎖構造を抗体によりブロックし機能を阻害することが可能になる。そのため、今回新たに $[\beta \text{GalNAc}4\text{S}(1-4) \beta \text{GlcA}(1-3) \beta \text{GalNAc}6\text{S}(1-4) \beta \text{GlcA}2\text{S}]$ や $[\beta \text{GalNAc}6\text{S}(1-4) \beta \text{GlcA}2\text{S}(1-3) \beta \text{GalNAc}4\text{S}(1-4) \beta \text{GlcA}]$ の二種のオリゴ糖を化学合成し、コンドロイチン硫酸に対する抗体の1つであるMO-225のエピトープ構造の解析を行った(Uemura, A., et al. (2023) Bioorg. Med. Chem. 81, 117191.)。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Koike, T., Mikami, T., <u>Tamura, J., and Kitagawa, H.</u>	Altered sulfation status of FAM20C-dependent chondroitin sulfate is associated with osteosclerotic bone dysplasia.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Nature Commun.	13	2022	7952

著者名	論文標題		
Uemura, A., <u>Nadanaka, S., Kitagawa, H., and Tamura J.</u>	Synthesis of biotinylated chondroitin sulfate DA and AD tetrasaccharides composed of heterotype disaccharide units, and their interactions with the mAb MO-225.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Bioorganic & Medicinal Chemistry	81	2023	117191

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	薬理学研究室
氏名	小山 豊

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	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	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割
本学	小山 豊	神戸薬科大学	薬理学研究室	教授	脳損傷モデルの解析
	八巻 耕也	神戸薬科大学	薬理学研究室	准教授	うつ病モデルの解析
	泉 安彦	神戸薬科大学	薬理学研究室	講師	パーキンソン病モデルの解析
連携先	久米 利明	富山大学	学術研究部薬学・和漢系(応用薬理学)	教授	脳梗塞・アルツハイマー病モデルの解析

共同研究の成果

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。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が、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浮腫を引き起こす機序を新たに明らかにした。エンドセリンがアストロサイトでの低酸素誘導因子(HIF-1 α) mRNA 発現を上昇させ、核内へ移行したHIF-1 α タンパクがNa⁺-K⁺-Cl⁻共輸送体(NKCC1)遺伝子のプロモーター活性化を誘導することが脳浮腫に寄与することが示唆された。本成果は、脳損傷時の浮腫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、アルツハイマー病関連変異を有するノックインマウスの解析を行い、グリア細胞のHIF経路に機能異常が起こっていることを見出した。この知見は、HIF経路を調節することがグリア細胞の過剰な活性化を抑制し、アルツハイマー病の潜在的治療標的になる可能性を示唆している。八巻は、hairless遺伝子変異マウスに食物アレルギーを起こすと免疫異常だけでなく、巣作り行動が低下することを見出した。これは、脳精神疾患と末梢免疫細胞の関連を示唆するものであり、新たな治療標的の提案になりえる。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マイクログリアにおいて炎症性活性化を抑制する機序を検討した。その結果、炎症性サイトカインの発現に関与する複数の細胞内シグナル経路を阻害していること、また、その作用にNrf2-ARE経路が関与しないことを明らかにした。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、脳疾患において非神経細胞、すなわち、アストロサイト、マイクログリア、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		
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	巻	発行年	ページ
J Pharmacol Sci.	149	2022	1-10.

著者名	論文標題		
Yamaki K, Ohta K, Kobayashi N, Morita I, Kiguchi Y, Oyama H, Ito K, Nanbo A, Oh-Oka H, Koyama Y, Kawata Y, Fujisawa H, Ohta M.	Purification of Emu IgY for Therapeutic and Diagnostic Use Based on Monoclonal Secondary Antibodies Specific to Emu IgY.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Biol Pharm Bull.	45	2022	1022-1026.

著者名	論文標題		
Yamaki K, Terashi M, Yamamoto S, Fujiwara R, Inoue JI, Shimizu K, Yanagita S, Doi Y, Kimura KI, 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	巻	発行年	ページ
Immunopharmacol Immunotoxicol.	44	2022	76-86.

著者名	論文標題		
Maki T, Sawahata M, Akutsu I, Amaike S, Hiramatsu G, Uta D, Izuo N, Shimizu T, Irie K, Kume T.	APP Knock-In Mice Produce E22P-A β Exhibiting an Alzheimer's Disease-like Phenotype with Dysregulation of Hypoxia-Inducible Factor Expression.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Int J Mol Sci.	23	2022	13259.

<学会発表>

発表者	学会名		
泉 安彦	第 96 回日本薬理学会年会・第 43 回日本臨床薬理学会学術総会		
タイトル		開催日	開催場所
Nrf2-ARE 経路活性化物質の探索と疾患の予防や治療に向けて		2022/12/3	横浜

発表者	学会名		
後藤 仁、泉 安彦、久米利明、八巻 耕也、小山 豊	第 72 回日本薬学会関西支部大会		
タイトル		開催日	開催場所
ミクログリアの炎症性活性化に関与する細胞内シグナル伝達経路に対する Nrf2 活性化薬 TPNA10168 の作用		2022/10/8	枚方

発表者	学会名		
八巻 耕也、太田 潔江、小林 典裕、森田 いずみ、木口 裕貴、大山 浩之、伊藤 謙、南保 明日香、大岡 宏造、小山 豊、河田 幸樹、藤澤 博基、太田 光熙	日本薬学会 第 143 年会		
タイトル		開催日	開催場所
Emu IgY に特異的なモノクローナル二次抗体の作製とそれを用いた emu IgY の精製		2023/3/27	札幌

発表者	学会名		
牧 俊人、天池 将平、澤幡 雅仁、歌 大介、泉尾 直孝、清水 孝彦、入江 一浩、久米利明	日本薬学会 第 143 年会		
タイトル		開催日	開催場所
アミロイドβの毒性コンホマーによるアルツハイマー病発症機構と低酸素誘導因子 (HIF) 経路の関与		2023/3/27	札幌

共同研究 成果報告書

神戸薬科大学 学長 様

所属	医療薬学研究室
氏名	力武 良行

2022年7月14日付けで承認を受けた下記の共同研究は、2023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

共同研究テーマ名	老化疾患の病態形成機構の解明と制御
----------	-------------------

構成員	氏名	所属大学・研究機関等名	部局・学科等名	職名	本研究における役割	
						所属
構成員	本学	力武 良行	神戸薬科大学	医療薬学研究室	教授	研究の統括
		佐々木 直人	神戸薬科大学	医療薬学研究室	准教授	実験とデータ解析
		堀部 紗世	神戸薬科大学	医療薬学研究室	講師	実験とデータ解析
	連携先	平田 健一	神戸大学	大学院医学研究科	教授	データ解析

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、ADモデルマウスと血管内皮細胞老化ADモデルマウスからミクログリアを単離し、シングルセルRNAシーケンス解析をおこない、両マウスではミクログリアの分化様式が異なることが明らかになった。また、糖代謝異常はADの病態形成を促進することが知られているが、血管内皮細胞老化ADモデルマウスでは、ADモデルマウスで見られる糖代謝異常も認知機能と同様に軽減していることを見出した。

(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動脈硬化病変形成は有意に促進された。上記マウスから単離した制御性T細胞(Treg)を動脈硬化マウスに細胞移入して表現型を解析することで、CCR4による動脈硬化抑制機序として、血管へのTreg遊走の制御が関与することを見出した。

(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を介する抗炎症性免疫応答の増強と抗炎症性脂質メディエーターの産生増加が関与することを見出した。

<研究論文>

著者名	論文標題		
Kawauchi S, Mizoguchi T, Horibe S, Tanaka T, Sasaki N, Ikeda K, Emoto N, Hirata KI, Rikitake Y	Gliovascular interface abnormality in mice with endothelial cell senescence		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Glia	71(2)	2023	467-479

著者名	論文標題		
Kasahara K, Sasaki N, Amin HZ, Tanaka T, Horibe S, Yamashita T, Hirata KI, Rikitake Y	Depletion of Foxp3 ⁺ regulatory T cells augments CD4 ⁺ T cell immune responses in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mice		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Heliyon	8(7)	2022	e09981

<学会発表>

発表者	学会名		
佐々木直人、田中亨、福永淳、力武良行	第44回日本光医学・光生物学会		
タイトル		開催日	開催場所
動脈硬化抑制に有効な紫外線B波の波長の探索		2022年 6月25日	東京都文京区

発表者	学会名		
佐々木直人、力武良行	第54回日本動脈硬化学会総会		
タイトル		開催日	開催場所
獲得免疫系による動脈硬化制御機構の解明と治療応用		2022年 7月24日	福岡県久留米市

発表者	学会名		
高橋彩加、堀部紗世、清水裕美子、田中友理、土肥なな子、田中亨、佐々木直人、池田宏二、江本憲昭、平田健一、力武良行	第72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
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における認知機能低下の抑制機序		2022年 10月8日	大阪府枚方市

発表者	学会名		
Aga Krisnanda, Naoto Sasaki, Toru Tanaka, Sayo Horibe, Yoshiyuki Rikitake	第 87 回日本循環器学会学術集会		
タイトル		開催日	開催場所
Effects of specific wavelengths of ultraviolet B irradiation on immunoinflammatory responses and atherosclerosis progression.		2023 年 3 月 11 日	福岡県福岡市