

# 共同研究 研究紀要

2009

神戸薬科大学

## 共同研究 研究成果報告

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。

### 2008（平成20）年度共同研究（研究期間 2008. 4. 1.～2009. 3. 31.）

承認番号	共同研究課題名（研究テーマ）	研究代表者
1	遺伝子欠損動物を用いた新規ビタミンD誘導体の骨疾患治療薬開発	衛生化学研究室 教授 岡野登志夫
2	経皮吸収型フェンタニル（持続性癌疼痛治療剤）の新規マトリックス製剤の適正使用とその評価に関する研究	製剤学研究室 教授 北河 修治
3	蛍光標識ペプチドを用いた脂質膜-タンパク質相互作用の解析	薬品物理化学研究室 教授 斎藤 博幸
4	胚発生過程におけるコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素-1の機能	生化学研究室 教授 北川 裕之
5	太陽電池構築を指向したSH基導入ポリエークロロフィル-ハイブリッド化合物の合成研究	生命有機化学研究室 教授 和田 昭盛
6	シクロ三リン酸塩による dendritic 分子のリン酸化	機能性分子化学研究室 教授 中山 尋量
7	ナノ粒子の自己免疫疾患に与える影響	薬理学研究室 教授 吉野 伸
8	高効率のドミノ型反応の開発と医薬品リード化合物合成への展開	薬品化学研究室 教授 内藤 猛章
9	LC/MSによるKU812細胞由来ヒスタミンの分析と生物活性物質への適用	生命分析化学研究室 講師 小山 淳子
10	イソキノリン型アルカロイドのゲラニル誘導体の生物活性	生薬化学研究室 准教授 岩佐 衣子
11	早産児の晩期循環不全における副腎皮質ステロイド生合成能に関する研究	病態生化学研究室 准教授 小林 吉晴
12	ケイヒ成分のタンパク質糖化反応に対する影響およびその反応生成物質の構造化学的研究	薬品物理化学研究室 講師 上垣内みよ子
13	蓮子心由来アルカロイドおよび関連化合物の合成と薬理作用に関する研究	薬化学研究室 教授 棚橋 孝雄
14	腸管腫瘍におけるAP1Bの役割	医療薬学研究室 教授 水野 成人

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 衛生化学研究室・教授

研究代表者氏名 岡野登志夫

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		遺伝子欠損動物を用いた新規ビタミンD誘導体の骨疾患治療薬開発			
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
	岡野登志夫	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究の統括
	加藤茂明	東京大学	分子細胞生物学研究所	教授	遺伝子改変・ゲノム解析
	榊利之	富山県立大学	工学部・ 生物工学研究センター	教授	ビタミンD誘導体の代謝解析
中川公恵	神戸薬科大学	薬学部	講師	ビタミンD誘導体の活性評価	
共同研究の成果					
<p>本研究では、ビタミンD受容体（VDR）欠損により活性型ビタミンD（1,25-D<sub>3</sub>）作用が全く現れないVDRKOマウス、1,25-D<sub>3</sub>生合成の鍵酵素であるビタミンD1位水酸化酵素遺伝子が欠損したマウス（1<math>\alpha</math>-OHase KO）、さらにVDRKOと1<math>\alpha</math>-OHase KOより作出できるダブルノックアウトマウス（WKO）を用い、新規ビタミンD誘導体の作用およびVDRの機能の解明を目的に研究を行った。我々が独自に作出したVDRKOや1<math>\alpha</math>-OHase KOおよびWKOマウスを用いることによって、投与する新規ビタミンD誘導体の生理活性を宿主個体内の1,25-D<sub>3</sub>の影響なく、VDRを介した作用とVDRを介さない作用を区別して解析することが可能となる。本研究により、ビタミンDの骨代謝研究において、有用な成果が期待できるだけでなく、骨粗鬆症や骨代謝疾患治療薬として有効性の高い新規ビタミンD誘導体の開発が期待できる。我々は、先に提出した研究計画に則り、以下の研究成果を挙げることに成功した。</p> <p>まず、岡野・中川は、骨粗鬆症治療薬として有効性の高い新規ビタミンD誘導体につき、in vitroの実験により骨粗鬆症治療薬としての有用性をスクリーニング解析した。その結果、現在、臨床的に骨粗鬆症治療薬として用いられているalphacalcidol（ALF）に比べ、新たに骨粗鬆症治療薬として開発されている新規ビタミンD誘導体のeldecalcitol（ED-71）が、骨芽細胞におけるVDRを介した転写活性が高く、骨形成作用に優れていることがわかった。そこでALFとED-71について、1<math>\alpha</math>-OHase KOマウスを用いて骨形成作用を比較解析した。この際、野生型マウスへの投与効果も検討した。その結果、ALFに比べ、ED-71を投与した1<math>\alpha</math>-OHase KOマウスにおいて、高い骨形成が認められた。また、ED-71を投与した野生型マウスにおいても骨密度の上昇効果が見られた。現在、これらED-71投与による骨形成作用に関して、<math>\mu</math>CT解析やpQCT解析および骨形態計測を行い、詳細な解析を進めている。また、加藤が作出したVDRKOマウスと岡野・榊・中川が作出した1<math>\alpha</math>-OHase KOマウスよりWKOマウスの作出を行った。両KOマウスのHomo接合体個体の雌雄は、いずれも生殖器官が形成不全となるため交配できないが、Hetero接合体同士の交配は可能である。また、1<math>\alpha</math>-OHase KOマウスは、離乳後から活性型ビタミンDを投与することにより、正常な成長を維持できるため、生殖機能が正常な1<math>\alpha</math>-OHase KO個体を作成できる。</p> <p>そこで、VDRKOマウスのHetero個体と1<math>\alpha</math>-OHase KOマウスのHomo個体を交配させる方法により、WKOマウスの作出を試みた。その結果、非常に高い確立でWKOマウスを作出することに成功した。現在、作出したKOマウスの表現型の解析を行っている。</p> <p>我々が作出した1<math>\alpha</math>-OHase KOマウスを用いた研究により、内因的に存在する1,25-D<sub>3</sub>の影響なく、骨形成効果に秀でた新規ビタミンD誘導体を見出すことに成功した。今後さらにVDRKOマウスやWKOマウスを用いた解析を行うことで、ビタミンD誘導体のVDRを介さない作用の解明や骨形成効果に秀でた新規ビタミンD誘導体の開発が可能になる。本研究成果は、従来のビタミンD製剤よりも安全でQOL（Quality of life）の向上に貢献できる骨代謝疾患治療薬・予防薬の創製に繋がるものである。</p>					

<学会発表>

発表者	学会名		
中川 公恵、加藤 茂明、 榑 利之、岡野登志夫	第58回日本薬学会近畿支部大会		
タイトル		開催日	開催場所
高カルシウム飼料で飼育した 25-Hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxykase 遺伝子欠損マウス (CYP27B1-KO) の表現型解析		2008年10月26日	神戸

発表者	学会名		
中川 公恵、加藤 茂明、 榑 利之、岡野登志夫	日本薬学会第129年会		
タイトル		開催日	開催場所
ヒトビタミンD依存性クル病 I 型モデルマウス (CYP27B1-KO) における骨形成異常の改善に対するカルシウム (Ca) 補給効果		2009年 3 月28日	京都

平成21年12月25日

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 製剤学研究室・教授

研究代表者氏名 北河修治

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		経皮吸収型フェンタニル（持続性癌疼痛治療剤）の新規マトリックス製剤の適正使用とその評価に関する研究			
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
	北河修治	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究全般の総括
	寺岡麗子	神戸薬科大学	薬学部	講師	実験、データの解析
	江本憲昭	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究企画
	八木敬子	神戸薬科大学	薬学部	講師	実験、データの解析
	沼田千賀子	特定医療法人 誠人会協和病院	薬剤科	薬剤科科長	患者データの収集、解析
平井みどり	神戸大学	医学部附属病院	教授・薬剤部長	研究企画	
共同研究の成果					
<p>2002年3月に発売されたフェンタニル貼付剤は、薬物貯蔵層中にフェンタニルを含むゲルを封入したリザーバータイプの製剤であるが、2008年7月に粘着層にフェンタニルを溶解させた、モノリス（マトリックス）型の製剤が新たに発売された。これまでの調査から、従来のリザーバー型の貼付剤を投与した場合、貼付部位のそう痒感や発疹など貼付剤特有の副作用が発現するために、QOLが著しく低下し、貼付を継続するのが困難な症例があることが明らかになっている。一方、新規の貼付剤は、リザーバー型製剤よりも薄い半透明なフィルム製剤であるため、従来の製剤よりも貼付感が向上することが予測される。しかし、皮膚トラブルや貼付感などを従来型と比較検討した報告はない。そこで、これら2種類のプラセボ経皮吸収型製剤を健常人に貼付し、貼付後の皮膚の外観や色の変化を測定し、皮膚トラブルの発生頻度を比較した。更に、被験者に貼付感を聞き取った。</p> <p>調査は、本研究の内容を口頭と文書で説明後、同意が得られた被験者20名（男性10名、女性10名、平均年齢22.2歳）にリザーバー型プラセボパッチ（リザーバー型）を直接、あるいは半閉鎖ドレッシング剤（テガダーム®）の上から上腕部に3日間貼付した。貼付後、パッチ下の水分量および皮膚の色を測定した。併せて、かゆみ、発赤、剥がれやすさなどの皮膚症状に関する聞き取り調査も行った。被験者5人にはモノリス型プラセボパッチ（モノリス型）も同時に貼付した。</p> <p>リザーバー型を貼付した場合、貼付前と比較して20人中16名は、皮膚の赤味が増し、4名は減少した。特に赤味が増大した被験者は強いかゆみも訴えていた。このリザーバー型下にテガダーム®を貼付した場合、12名において皮膚の赤味が増し、8名が減少し、テガダーム®を併用することによってかゆみなどの症状が軽くなった。これに対してモノリス型を貼付した場合、貼付前と比較して5人中4名に皮膚の赤味が増大し、1名は減少した。以上のようにいずれの貼付剤、貼付方法においても、貼付後の皮膚の赤味が増すことが明らかとなったが、肉眼的な所見ではリザーバー型の場合が一番強く、次にモノリス型、リザーバー型+テガダームであった。この結果は、測色計で皮膚の赤味を測定した場合も同様の傾向がみられた。皮膚症状の聞き取り調査の結果、満足度の順位でモノリス型を1位に上げている被験者は4名となり、この製剤の満足度が高い結果となった。しかし、剥がれやすいと指摘もあった。一方、貼付前の平均皮膚水分量は、33.1%であったが、貼付後は、3種類の間でほとんど相違が認められなかったが、パッチ下の水分量は、貼付前よりかなり上昇した。以上の結果から、モノリス型は、リザーバー型に比べてパッチサイズも小さく薄いため、ごわごわ感も低く、粘着面の粘着力も小さいため使用感に優れていたが、やや剥がれやすい欠点が見られた。経皮吸収型製剤は単位面積あたりの薬剤放出量が一定となるように設計されているため、皮膚と密着していない部分からの薬剤放出は起こらない。このことから、パッチと皮膚の密着度は、バイオアベイラビリティに影響する重要な因子であると考えられるので、貼付状況のきめ細かい確認が必要と考えられた。</p>					

<学会発表>

発表者	学会名		
沼田千賀子、寺岡 麗子、 江本 憲昭、八木 敬子、 平井みどり、北河 修治	第19回日本医療薬学会年会		
タイトル	開催日	開催場所	
経皮吸収型フェンタニル製剤の貼付後の皮膚障害 ーリザーバー型とMT型の比較ー	2009年10月24日 ～10月25日	長 崎	

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 薬品物理化学研究室・教授

研究代表者氏名 齋藤博幸

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		蛍光標識ペプチドを用いた脂質膜-タンパク質相互作用の解析			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	齋藤博幸	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究立案・統括
	田中将史	神戸薬科大学	薬学部	講師	ペプチド合成及び評価
	相本三郎	大阪大学	蛋白質研究所	教授	ペプチド合成
共同研究の成果					
<p>一アミノ酸の置換・欠失・挿入などにより疾患を引き起こすことが知られているタンパク質変異体の構造・機能評価において、対象となる部位を取り出したフラグメントペプチドを用いることは、それらの変異による影響をアミノ酸残基レベルで詳細に調べるために非常に有用である。本共同研究では、脂質膜への結合活性に影響を与えることなく蛍光標識したペプチドを合成する手法を確立し、脂質膜-タンパク質相互作用の分子論的解析に応用することを目的とした。</p> <p>アポ A-I はコレステロールを末梢細胞から引き抜いて HDL を新たに形成し、肝臓に運搬することにより抗動脈硬化作用を示すことが知られている。ヒトのアポ A-I は243アミノ酸残基からなり、そのC末端領域が細胞脂質膜への結合を担うとともに、細胞からのコレステロールの引き抜きに必須の部位であることが明らかにされている。また、C末端に位置する235位のグルタミン酸が欠失した変異体は、低 HDL 血症との関連が報告されている。そこで、このC末端変異部位に相当するフラグメントペプチドを作製し、変異による疾患発症の分子メカニズムの解明を行った。脂質結合性を評価するため、蛍光性のアミノ酸であるトリプトファン残基をアポ A-I のC末端ペプチドに導入し、二次構造及び脂質結合性を CD 測定により検証した。この領域には225位及び229位に2つのフェニルアラニンを含んでいるため、それぞれの置換体について検討を行った結果、水溶液中およびトリフルオロエタノール中ではトリプトファン導入の影響は観察されなかったが、脂質粒子存在下では229位の置換体ではヘリックス含量が減少した。そこで、225位のトリプトファン置換体を用いて野生型および変異型フラグメントペプチドの脂質結合性の評価を行った。その結果、グルタミン酸欠失変異型ペプチドの脂質結合性が低下しており、それに伴い細胞からのコレステロールの引き抜き能も低下していることが明らかとなった。また、グルタミン酸をアラニンに置換した変異体では脂質結合性は野生型と同等であったことから、グルタミン酸が欠失することでC末端ヘリックス部位の両親媒性アミノ酸配置が乱れることが脂質結合性低下の主な要因であることが示され、低 HDL 血症発症メカニズムの一部をアミノ酸残基レベルで解明することができた。今後は<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>Nでアミノ酸残基選択的に標識したペプチドを作製し、NMRやFT-IRといった蛍光以外の分光学的測定も併せて活用していく予定である。</p>					

<研究論文>

著者名	論文標題			
Tanaka, M., Tanaka, T., Ohta, S., Kawakami, T., Konno, H., Akaji, K., Aimoto, S., Saito, H.	Evaluation of Lipid-Binding Properties of the N-Terminal Helical Segments in Human Apolipoprotein A-I Using Fragment Peptide.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
J. Pept. Sci.	15 (1)	2009	36-42	

著者名	論文標題			
Tanaka, T., Tanaka, M., Sugiura, M., Kawakami, T., Aimoto, S., Saito, H.	Deletion of Single Amino Acid E235 Affects the Structure and Lipid Interaction of Human Apolipoprotein A-I C-Terminal Peptides.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Chem. Pharm. Bull.	57 (5)	2009	499-503	

<学会発表>

発表者	学会名		
大田 慎也、田中 将史、 川上 徹、相本 三郎、 斎藤 博幸	第58回日本薬学会近畿支部大会		
タイトル	開催日	開催場所	
急性期タンパク質血清アミロイドA (SAA) の脂質結合部位の特定	2008年10月25日	神戸	

発表者	学会名		
大田 慎也、田中 将史、 川上 徹、相本 三郎、 斎藤 博幸	第45回ペプチド討論会		
タイトル	開催日	開催場所	
ヒト Serum Amyloid A のN末端領域は脂質結合に重要な役割を果たす	2008年10月29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 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 生化学研究室・教授

研究代表者氏名 北川裕之

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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	胚発生過程におけるコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素-1の機能				
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	免疫組織学的解析と全体の総括
	三上雅久 菅原一幸	神戸薬科大学 北海道大学大学院	薬学部 生命科学学院	講師 教授	モルファントの表現型の解析 糖鎖の構造解析
共同研究の成果					
<p>コンドロイチン硫酸（CS）鎖は、多様な硫酸化修飾構造をもつ多糖鎖の一つであり、細胞接着、分化、神経回路網の形成などを調節する役割を果たしているが、その硫酸化構造と機能との相関は十分に解明されていない。そこで本研究では、CS鎖の主要な硫酸化であるGalNAcの4位の硫酸化を触媒する硫酸基転移酵素（C4ST-1）をノックダウンさせたゼブラフィッシュ胚（C4ST-1モルファント）を作製し、その表現型を解析することで、in vivoでのCS鎖の硫酸化の役割の解明を試みた。本共同研究実施期間中、構成員間で密な連携をとり、当初の研究計画を達成することができた。</p> <p>作製したC4ST-1モルファント由来のCSの二糖組成分析を行った結果、4-O-硫酸化されたCSの割合が野生型に比べ顕著に低下していたことから、C4ST-1の発現が効率よくノックダウンされていることがわかった。C4ST-1モルファントの表現型を解析したところ、体軸が曲がったり、ねじれたりする形態異常が観察された。この形態異常は種々のマーカー解析から、筋組織形成の異常に起因するものと考えられた。さらに、C4ST-1モルファントでは、野生型胚に比べ、腹側運動神経の異常投射の発生頻度が有意に高いことも分かった。これらの結果から、C4ST-1の働きにより生合成されるCSが、胚発生過程の筋形成および神経軸索誘導に積極的に関わる分化制御因子であることが強く示唆された。以上の成果を専門の欧文雑誌（Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H., and Sugahara, K., 2009, Biochem. J. 419 (2), 387-399）にて発表した。</p>					

< 研究論文 >

著者名	論文標題			
Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H., and Sugahara, K.	Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biochem. J.	419	2009	387-399	

< 学会発表 >

発表者	学会名		
安永 大輝、水本 秀二、 小林 直樹、三上 雅久、 三宅 歩、伊藤 信行、 菅原 一幸、北川 裕之	第28回日本糖質学会年会		
タイトル	開催日	開催場所	
ゼブラフィッシュ胚発生過程におけるコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素-1の機能	2008年8月18日 ~20日	つくば	

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 生命有機化学研究室・教授

研究代表者氏名 和田昭盛

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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	太陽電池構築を指向した SH 基導入ポリエン-クロロフィル-ハイブリッド化合物の合成研究				
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
	和田昭盛	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究全般の企画と光増感色素の合成
	山野由美子 小山泰	神戸薬科大学 関西学院大学	薬学部 理工学部	准教授 教授	光増感色素の合成 エネルギー変換効率の測定
共同研究の成果					
<p>光合成系を模倣した光増感色素として、クロフィル部に相当するポルフィリン-カルボン酸と金電極に結合させるためのチオール基を導入したカロテノイドに相当するポリエン-アルコールとをエステル結合により繋げた化合物をデザインした。チオール基はベンジルアルコールからの変換により導入することを、また、ポルフィリン-カルボン酸として入手容易なプロトポルフィリンIXを利用することを計画し、その合成法を検討した。</p> <p>市販の 4-ヒドロキシメチル安息香酸メチルからポリエン側鎖の延長とイオウ官能基の導入を検討した結果、共役鎖の短い段階でベンジルアルコール部をベンジルクロリドに変換後トリイソプロピルシリルチオラートを作用させることによりシリルチオ基を収率よく導入することができた。また、このものから共役鎖の延長を経由して、シリルチオ基を有するヘキサエノールおよびオクタエノールへと変換することができた。</p> <p>次に、これらとプロトポルフィリンIXとを結合させるため、プロトポルフィリンIXの2つのカルボキシル基の一方をTMSジアゾメタンを用いてモノメチルエステル化し、もう一方のカルボキシル基とシリルチオ基を導入したポリエン-アルコールとを向山らのエステル化条件を用いて縮合させ、酢酸の存在下TBAF処理によるシリル基の脱保護を行って、チオール基を持つポリエンとポルフィリン誘導体とのハイブリッド化合物を合成することに成功した。</p> <p>現在、これらハイブリッド化合物の太陽電池素材としての評価実験を進めているところである。</p>					

<学会発表>

発表者	学 会 名		
山野由美子、平野 亜季、 小山 泰、和田 昭盛	日本薬学会第129年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
太陽電池構築を目指したSH基導入ポリエン結合ポルフィリン誘導体の合成研究		2009年3月28日	京 都

発表者	学 会 名		
山野由美子、岩塚 欣也、 佐々木 俊、平野 亜季、 小山 泰、和田 昭盛	第23回カロテノイド研究談話会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
SH基を導入したポリエンとポルフィリン誘導体とのハイブリッド化合物の合成研究－太陽電池の構築を目指して		2009年9月17日	仙 台

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 機能性分子化学研究室・教授

研究代表者氏名 中山尋量

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		シクロ三リン酸塩による dendritic のリン酸化			
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
	中山尋量	神戸薬科大学	薬学部	教授	総括
	成相裕之	神戸大学	工学部	准教授	リン酸化剤の合成
	前田秀子	神戸薬科大学	薬学部	助教	リン酸化反応
共同研究の成果					
<p>本研究ではシクロ三リン酸塩 (<math>P_{3m}</math>) による dendritic のリン酸化反応を検討した。まず最初に、末端にアミノ基を持つジアミノブタン dendritic について検討した。HPLC-FIA の結果から、ジアミノブタン dendritic の第1世代 (DAB-G1) のリン酸化反応は、混合割合によって異なる二種類の生成物が得られることがわかった。DAB-G1 と <math>P_{3m}</math> との混合割合を等モルおよび DAB-G1 過剰で反応を行った場合、一種類の生成物が収率ほぼ100%で得られた。生成物の構造を <math>^1H</math> および <math>^{31}P</math> NMR で解析したところ、DAB-G1 の末端アミノ基の一ヶ所に三リン酸塩が結合した三リン酸塩誘導体であることがわかった。最適反応条件は、混合割合 0.1 mol/L : 0.1 mol/L、pH 12、40 °C であった。一方、<math>P_{3m}</math> 過剰で反応を行った場合、二種類の生成物が総収率80%以上で得られた。生成物の構造を各種 NMR で解析したところ、三リン酸塩誘導体であることがわかった。しかしながら、三リン酸塩が何ヶ所結合しているかが不明であったため、マスマスペクトル (ESI mass) により生成物を分析した。その結果、DAB-G1 の末端アミノ基の一ヶ所に三リン酸塩が結合した三リン酸塩誘導体と DAB-G1 の末端アミノ基の二ヶ所に三リン酸塩が結合した三リン酸塩誘導体であることがわかった。最適反応条件は、混合割合 0.1 mol/L : 0.5 mol/L、pH 12、25 °C であった。</p> <p>同様に、PAMAM dendritic と <math>P_{3m}</math> によるリン酸化反応を行い、生成物の構造及び生成物を得るための最適反応条件について検討した。用いた PAMAM dendritic は、コアにエチレンジアミン、分岐鎖にポリアミド、表面官能基にアミノ基を持つゼロ世代 (PAMAM-G0) から第2世代 (PAMAM-G2)、コアがシスタミンである PAMAM-Cys、末端官能基がヒドロキシル基である PAMAM-OH およびカルボキシル基である PAMAM-COOH である。Dendritic の世代によって反応性に違いが認められた。すなわち、Dendritic と <math>P_{3m}</math> との混合割合を等モルあるいは Dendritic 過剰条件で反応を行うと、世代が大きいものほど、生成物の生成速度が速く収率も高くなった。また、Dendritic のコアおよび表面官能基はリン酸化反応に影響を与えることがわかった。特に、表面官能基による影響は大きく、表面官能基がヒドロキシル基の場合、アミノ基の場合よりも生成物の生成速度は遅く、収率もはるかに少なかった。カルボキシル基の場合、<math>P_{3m}</math> と反応しなかった。主生成物は、いずれの Dendritic の場合も末端の官能基が一ヶ所リン酸化された三リン酸塩誘導体であることがわかった。主生成物の収率が最も高いのは、末端がアミノ基の Dendritic であり、その収率は90%以上であった。また、最適反応条件は、混合割合 PAMAM : <math>P_{3m}</math> = 3 : 1、pH 12、25 °C であることがわかった。PAMAM-G0 について <math>P_{3m}</math> 過剰で反応を行った場合、末端アミノ基の二ヶ所に三リン酸塩が結合した生成物が得られることがわかった。得られたリン酸化 dendritic の単離は、陰イオン交換クロマトグラフィーで行い、さらに陽イオン除去カラムでクリーンアップした。</p> <p>以上のような結果から、シクロ三リン酸塩による dendritic のリン酸化反応が新規なアニオン性 dendritic を得る簡便な方法であるといえる。</p>					

< 研究論文 >

著者名	論文標題			
Maeda, H., Matsushita, M., Tshako, M., Nariai, H., Nakayama, H.	Phosphorylation of Polyamidoamine Dendrimers with <i>cyclo</i> - Triphosphate in Aqueous Solution.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Phosphorus Research Bulletin	23	2009	52-56	

< 学会発表 >

発表者	学会名		
前田 秀子、松下真由美、 津波古充朝、中山 尋量	第18回無機リン化学討論会		
タイトル	開催日	開催場所	
ポリアミドアミン dendrimer のシクロ三リン酸塩によるリン酸化	2008年10月8日	奈良	

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 薬理学研究室・教授

研究代表者氏名 吉野 伸

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		ナノ粒子の自己免疫疾患に与える影響				
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	
	吉野 伸	神戸薬科大学	薬学部	教授	実験計画・研究総括	
	水谷 暢明	神戸薬科大学	薬学部	講師	動物実験・細胞培養	
	河野 茂勝	神戸薬科大学	薬学部	教授	実験データの評価	
共同研究の成果						
<p>ナノ粒子はバイオ、医療などの多くの分野で使用されているが、ある種のナノ粒子はその特徴的な粒子形状や粒子サイズに起因していると考えられる細胞毒性を有している。たとえば、ナノ粒子は単細胞生物によって取り込まれ、食物連鎖によって動物の器官に蓄積される。また、人工炭素分子であるフラーレンと呼ばれるナノ粒子の存在下では、ミジンコや魚は致死的な障害を受けることが報告されている。そのため、食物連鎖の頂点に位置するヒトへのナノ粒子の影響が危惧されている。そこで、本研究においてはナノ粒子の自己免疫疾患に与える影響について検討した。また、これまでの研究から自己免疫疾患にはTh1およびTh17サイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆されている。したがって、ナノ粒子のこれらサイトカイン産生に対する効果について検討し、ナノ粒子の自己免疫疾患に与える影響のメカニズムについて調べた。自己免疫疾患モデルとして、マウスにおけるコラーゲン関節炎（collagen-induced arthritis, CIA）を用いる。CIAは7～9週齢の雄性DBA/1Jマウスに0.1mgのⅡ型コラーゲン（type II collagen, CⅡ）とcomplete Freund's adjuvant（CFA）とを混和したものを皮下注射・免疫することによって誘導する。ナノ粒子酸化亜鉛のCIAに与える影響を調べるため、種々の用量の酸化亜鉛をCⅡ免疫前3週間（day -21～day 0）および/あるいは免疫後4週間（day 0～day 28）経口投与した。CⅡ免疫後、経時的に関節炎の重症度を定量化した。Day 21に脾臓のT細胞を抗原提示細胞およびCⅡとともにin vitroで培養し、T細胞増殖反応抑制に与えるナノ粒子の影響について検討した。また、同培養上清中に産生・遊離されるIL-2、IFN-g（Th1サイトカイン）、IL-4およびIL-5（Th2サイトカイン）およびIL-17（Th17サイトカイン）を測定し、Th1、Th2およびTh17サイトカイン産生に対するナノ粒子の効果について調べた。さらに、Th1細胞依存性抗CⅡ抗体IgG2aおよびTh2細胞依存性の同抗原特異的IgG1およびIgEを測定した。その結果、酸化亜鉛暴露によってCIAの重症度および発症率は有意な影響を受けるという実験データは得られなかった。T細胞の増殖反応、Th1およびTh17細胞によってそれぞれ産生されるIL-2、IFN-gおよびIL-17レベルはいずれも酸化亜鉛による有意な影響を受けなかった。しかし、Th2細胞によるIL-4およびIL-5産生は酸化亜鉛暴露によって増強された。以上から、本実験条件下では、C自己免疫性関節炎CIAは影響を受ける可能性は少なくとも大きくないと思われる。今後、他のナノ粒子の種々の自己免疫疾患に与える影響について検討する余地が残されている。また、ナノ粒子酸化亜鉛によってTh2サイトカインの産生が増強されたことから、ナノ粒子はアレルギー性疾患に影響を与える可能性がある。</p>						

<研究論文>

著者名	論文標題			
Mizutani, N., Fuchikami, J., Nabe, T., Yoshino, S., Kohno, S.	Development of cigarette smoke solution and LPS-induced emphysema in guinea pigs.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biol Pharm Bull	32 (9)	2009	1559-64	

著者名	論文標題			
Mizutani, N., Aoki, Y., Nabe, T., Ishiwara, M., Yoshino, S., Takagaki, H., Kohno, S.	Effect of TA-270, a novel quinolinone derivative, on antigen-induced nasal blockage in a guinea pig model of allergic rhinitis.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Eur J Pharmacol	602 (1)	2009	138-42	

<学会発表>

発表者	学会名		
水谷 暢明、奈邊 健、 八巻 耕也、河野 茂勝、 吉野 伸	日本薬学会第129回年会		
タイトル		開催日	開催場所
マウス喘息症状における complement C3a の関与についての検討		2009年3月26日 ~28日	京都

発表者	学会名		
五島 浩文、水谷 暢明、 八巻 耕也、奈邊 健、 河野 茂勝、吉野 伸	日本薬学会第129回年会		
タイトル		開催日	開催場所
抗原特異的 IgE モノクローナル抗体によるアレルギー性気管支喘息誘導に関する研究		2009年3月26日 ~28日	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 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 薬品化学研究室・教授

研究代表者氏名 内藤猛章

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		高効率的多ミノ型反応の開発と医薬品リード化合物合成への展開			
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
	内藤猛章	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究計画の立案・総括
	宮田興子	神戸薬科大学	薬学部	教授	多ミノ型転位反応の開発
	上田昌史	神戸薬科大学	薬学部	助教	有機触媒型多ミノ反応の開発
宮部豪人	兵庫医療大学	薬学部・医療薬学科	教授	金属触媒型多ミノ反応の開発	
共同研究の成果					
<p>ラジカル反応を基盤とする多ミノ型反応の開発と医薬品リード化合物の合成として、本年度は、共役イミン類のヒドロキシスルフィド化反応の一般性および反応経路の解明について研究を行った。</p> <p>はじめに、前年度の本共同研究で見出した共役イミン類のヒドロキシスルフィド化反応の一般性について検討した。まず、種々のチオール類を用いて反応を行ったところ、電子求引基や電子供与基を有するチオフェノール類や無保護の水酸基を持つチオフェノール、さらに、鎖状のアルキルチオールとも効率良く反応が進行し、対応するβ-ヒドロキシスルフィドが得られた。次に、本反応におけるイミン部分の影響について検討した。共役ヒドラゾンを用いたヒドロキシスルフィド化反応は同様に収率良く反応が進行することが分かった。しかし、共役アルデヒドや共役ケトンの場合、ヒドロキシスルフィド化反応がほとんど進行せず、Michael付加反応が優先的に進行した。このことから、イミンは本ヒドロキシスルフィド化反応において、必須の官能基であることが明らかとなった。さらに、基質一般性について検討した。不斉補助基としてカンファースルタムをもつ基質で反応を行った場合は、高立体選択的に進行し単一のジアステレオマーとしてβ-ヒドロキシスルフィドが得られた。また、共役ケトオキシムエーテルの場合を基質とした場合は、高い<i>anti</i>選択性で反応が進行することが分かった。さらに、単純な環状共役オキシムエーテルや複雑な構造を有する共役オキシムエーテルでも同様に目的の反応が進行し、本反応が様々な基質に適応できることが判明した。本反応の推定反応経路は、まず、チオフェノールとラジカル開始剤であるトリエチルボランが反応し、エタンの発生を伴いジエチルフェニルチオボランが生成する。次に、ジエチルフェニルチオボランが酸素分子と反応することによりチイルラジカルが発生し、続いてチイルラジカルの付加、酸素分子による捕捉を経由して、ペルオキシラジカルが生成する。さらに、チオフェノールと反応することにより、チイルラジカルが再生すると同時に、ヒドロペルオキシドが生成し、ラジカル連鎖反応が展開する。最後にヒドロペルオキシドがチオフェノールにより還元され、ヒドロキシスルフィドが得られたと考えられる。</p> <p>以上のように、共役オキシムエーテルとチイルラジカルとの反応を検討し、α-イミノラジカルを空気中の酸素で捕捉する新規ヒドロキシスルフィド化反応の開発に成功した。本反応は、従来の有毒な重金属を用いる酸化反応とは異なり、酸化剤として空気中の酸素を利用するものであり、環境低負荷型新規反応と言える。今後は、本反応を応用し、医薬品のリード化合物の合成に展開していく予定である。</p>					

< 研究論文 >

著者名	論文標題		
Ueda, M., Miyabe, H., Shimizu, H., Sugino, H., Miyata, O., Naito, T.	Regioselective Hydroxysulfenylation of $\alpha$ , $\beta$ -Unsaturated Imines: Enhanced Stability of an Intermediate Radical.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>	47	2008	5600-5604

< 学会発表 >

発表者	学会名		
上田 昌史、木村 隆浩、清水 秀憲、宮田 興子、宮部 豪人、内藤 猛章	第58回日本薬学会近畿支部総会・大会		
タイトル	開催日	開催場所	
共役オキシムエーテル類への位置選択的ラジカル付加反応：水酸基導入反応への展開	2008年10月25日	神戸	

発表者	学会名		
上田 昌史、池田 祐紀、宮田 興子、宮部 豪人、内藤 猛章	第58回日本薬学会近畿支部総会・大会		
タイトル	開催日	開催場所	
N-アルコキシイミドイルブロミド類のクロスカップリング反応の開発とイソキサゾール合成への応用	2008年10月25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 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 生命分析化学研究室・講師

研究代表者氏名 小山淳子

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		LC/MS による KU812 細胞由来ヒスタミンの分析と生物活性物質への適用			
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
	小山淳子	神戸薬科大学	薬学部	講師	LC-MS 測定と活性試験
	小林典裕	神戸薬科大学	薬学部	教授	活性相関
	森田いずみ	神戸薬科大学	薬学部	助手	化合物の合成、供給
	木島孝夫	千葉科学大学	薬学部	教授	天然活性物質の供給
共同研究の成果					
<p>今日、日本国民の約4割が皮膚、目鼻、呼吸器のいずれかにアレルギー性疾患を持つと言われ、特に花粉症患者はその半数を占めることから社会問題となっている。花粉症は典型的なI型アレルギーで、薬物療法に期待が寄せられる。そこで、高性能ハイブリッド型分析法を基盤とし、ヒト培養細胞を用いる生化学的手法を融合させた新しいアプローチにより、植物成分をベースとする新規抗花粉症薬の開発を展開した。ヒト好塩基球細胞株 KU812 からのヒスタミン放出抑制率を指標とする抗アレルギー活性成分の探索法をもとめ、LC-ESI-MS/MS によるヒスタミンの微量定量を検討し、その測定方法を確立した。また、強い抗アレルギー作用をもつ <i>Taxus yunnanensis</i> にリグナンが多く含まれることより、リグナン類を集め、そのヒスタミン放出抑制活性を検討した。LC による従来のヒスタミン分析は、ヒスタミンの誘導体化、あるいは移動相へのイオン対形成試薬の添加を必要とすることが多い。しかし、今回の LC-ESI-MS 法では、こうした処理を施すことなく短時間の簡単な操作でヒスタミンを分析することに成功した。IL4 添加培地でヒト好塩基球 KU812 細胞を培養してヒスタミン産生量を増加させた後、カルシウムイオノフォアを添加して脱顆粒をおこさせた時のテスト化合物のヒスタミン放出抑制率を算出して、植物成分の抗アレルギー活性評価を行った。KU812 細胞の培養やヒスタミンの抽出等の実験プロトコルを確立すると同時に、LC や LC-MS の諸実験条件の最適化を行った。</p> <p>次に <i>Taxus yunnanensis</i> の木部と樹皮を水、水・メタノール、メタノールのエキスを分け、抗アレルギー活性評価を行ったところ、樹皮のメタノール層エキスにはほとんど活性が認められなかったが、木部の水・メタノール層エキス、メタノール層エキス、樹皮の水層エキス、水・メタノール層エキスの活性は強かった。木部のエキス中にはリグナンが多く含まれ、抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウムより強いヒスタミン遊離阻害作用を示すリグナンも存在した。このことより、<i>Taxus yunnanensis</i> 含有のリグナン類をカラムクロマトグラフィー、PTLC、HPLC を用いて単離精製するとともに、これらの分析手段では単離しにくかったリグナンを多く含有する画分を LC-APCI-MS/MS を用いて検索した。さらに他の植物由来のリグナンについても抗アレルギー活性評価を行うため、共同研究者である木島教授より恵与いただいたり、市販品を求めたりした。これらについては次年度にかけ引き続き検討している。抗アレルギー活性を求めるための指標であるケミカルメディエーターは preformed mediator であるヒスタミンなどと、newly generated mediator であるプロスタグランジンやロイコトリエンなどがある。そこで、KU812 細胞の脱顆粒により newly generated mediator が遊離していないか検討した。その結果、プロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) がカルシウムイオノフォア添加後比較的多く遊離しており、PGD<sub>2</sub> 遊離阻害活性率を測定できることが判明した。</p> <p>以上のことから、KU812 細胞由来ヒスタミンや PGD<sub>2</sub> を LC-MS を用いて測定することにより、リグナン類やその他の化合物の抗アレルギー活性を評価でき、抗花粉症薬の開発に有用であることがわかった。</p>					

< 研究論文 >

著 者 名	論 文 標 題			
Koyama, J., Takeuchi, A., Tode, C., Shimizu, M., Morita, I., Nobukawa, M., Nobukawa, M., Kobayashi, N.	Development of an LC-ESI-MS/MS method for the determination of histamine: Application to the quantitative measurement of histamine degranulation by KU812 cells.			
雑 誌 名	巻	発行年	ページ	
J. Chromatogr. B	877	2009	207-212	

< 学会発表 >

発 表 者	学 会 名		
清水 真希、小山 淳子、 竹内 敦子、森田いずみ、 小林 典裕	第58回日本薬学会近畿支部総会・大会		
タ イ ト ル		開 催 日	開 催 場 所
LC/ESI-MS による KU812 細胞由来ヒスタミンならびに生体アミン類の分析		2008年10月25日	神 戸

発 表 者	学 会 名		
森田いずみ、小山 淳子、 清水 真希、小林 典裕、 信川真智子、信川真貴子	第129年会日本薬学会		
タ イ ト ル		開 催 日	開 催 場 所
LC-APCI-MS/MS による <i>Taxus yunnanensis</i> 中の成分研究		2009年 3月27日	京 都

発 表 者	学 会 名		
清水 香衣、小山 淳子、 森田いずみ、小林 典裕、 木島 孝夫	第130回日本薬学会		
タ イ ト ル		開 催 日	開 催 場 所
LC-ESI-MS/MS による <i>Taxus yunnanensis</i> 中の抗アレルギー活性成分研究		2010年 3月29日	岡 山

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 生薬化学研究室・准教授

研究代表者氏名 岩佐衣子

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		イソキノリン型アルカロイドのゲラニル誘導体の生物活性			
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
	岩佐衣子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	研究の企画・総括 合成・生物活性試験
	杉浦真喜子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	LC/NMRの測定・考察
	竹内敦子	神戸薬科大学	薬学部	講師	LC/MSの測定・考察
	都出千里	神戸薬科大学	薬学部	助手	LC/NMRの測定・考察
	武田收功 徳田春邦	横浜薬科大学 京都府立医科大学分子医科学教室	漢方薬学科	教授 助教	構造活性相関 発がんプロモーター抑制活性試験
共同研究の成果					
<p>Simple isoquinoline 型の <i>N</i>-ゲラニル誘導体 2 個、<i>O</i>-ゲラニル誘導体 3 個、1-benzylisoquinoline 型の <i>N</i>-ゲラニル誘導体 2 個、<i>O</i>-ゲラニル誘導体 1 個、protoberberine 型の <i>N</i>-ゲラニル誘導体 3 個を合成し、立体構造を含めそれらの構造を決定する事ができた。また、Simple isoquinoline 型、1-benzylisoquinoline 型、protoberberine 型の <i>N</i>-及び <i>O</i>-ゲラニル誘導体について数種の生物活性試験を行った結果、以下の知見を得る事ができた。</p> <p>1. 抗菌活性試験</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>グラム陽性菌の <i>Staphylococcus aureus</i> に対し simple isoquinoline 型では <i>N</i>-及び <i>O</i>-ゲラニル化で活性の増大が認められ、特に <i>N</i>、<i>N</i>-ゲラニル誘導体で著しく活性が増大し、ポジティブコントロールの benzethonium chloride に匹敵する活性を示した。<i>N</i>-メチル及び <i>N</i>、<i>N</i>-ジメチル化体では活性を示さないことからゲラニル基、特に、ゲラニル化による 4 級化が抗菌活性に寄与していることが示唆された。</li> <li>1-Benzylisoquinoline 型の <i>O</i>-及び <i>N</i>-ゲラニル化、2, 3, 9, 10-酸素置換 protoberberine 型の <i>N</i>-ゲラニル化で多少の活性の増大は認められたが、活性は低かった。このことからゲラニル化される親化合物の構造が活性の増大に重要であることが示唆された。</li> </ul> <p>グラム陰性菌の <i>Escherichia coli</i> に対しては simple isoquinoline 型の <i>N</i>、<i>N</i>-ゲラニル誘導体で著しい活性の増大が認められた。菌種によっても差があると考えられる。</p> <p>2. 抗酸化活性 いずれのタイプのアルカロイドにも抗酸化活性はあったが、ゲラニル化による活性の増大はほとんど認められなかった。</p> <p>3. In vitro Epstein-Barr ウイルス (EBV) 活性化抑制試験</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Simple isoquinoline 型では <i>N</i>-ゲラニル化で活性の増大が認められ、特に <i>N</i>、<i>N</i>-ゲラニル化で顕著であり、その活性はポジティブコントロールの ginsenoside-Rg1 を凌ぐものであった。<i>N</i>-メチル及び <i>N</i>、<i>N</i>-ジメチル化では活性の増大は認められないことからゲラニル化が活性の増大に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの結果は抗菌活性試験の結果と一致している。</li> <li>Benzylisoquinoline 型では <i>N</i>-ゲラニル化による活性の増大はほとんど認められないが、<i>O</i>-ゲラニル化で活性の増大が認められた。この点は今後の検討課題である。</li> <li>Protoberberine 型では <i>N</i>-ゲラニル化による活性の増大はほとんど認められないが、活性はポジティブコントロールの ginsenoside-Rg1 に匹敵する値であることから今後検討が必要である。</li> </ul> <p>4. ヒト培養がん細胞に対する細胞増殖抑制活性試験</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>3 タイプのアルカロイドいずれでも、タイプ、細胞株の種類、ゲラニル基の数により差は認められるものの、<i>O</i>-或いは <i>N</i>-ゲラニル化による活性の増大が認められた。</li> <li>1-Benzylisoquinoline 型の <i>N</i>-及び <i>N</i>、<i>N</i>-ゲラニル誘導体は試験された全ての細胞株で強い活性を示したことから有望であると考える。</li> <li>1-Benzylisoquinoline 型の <i>O</i>、<i>O</i>-ゲラニル誘導体及び simple isoquinoline 型の <i>N</i>、<i>N</i>-ゲラニル誘導体は HL-60 細胞株に対し強い活性を示し、この細胞株に特異性があることが判明した。</li> <li>2, 3, 9, 10-酸素置換 protoberberine 型は DU145 及び KBvin に対し活性を示し、これらの細胞株に特異性があることがわかった。</li> <li>SRB 法と MTT 法による測定値の差は細胞株で異なるが、傾向は同じであることがわかった。</li> <li>MTT 法と WST-8 法による HL-60 細胞株に対する測定値はほぼ同じであることが判明した。</li> </ul> <p>5. 抗マalaria 活性 Protoberberine 型のゲラニル誘導体にマalaria 原虫に対する比較強い阻害活性が認められ、選択毒性も示すことから抗マalaria 活性が期待できる。</p> <p>以上 5 種の生物活性試験のうち 4 種の試験でタイプによっては顕著なゲラニル化の活性への寄与が認められることが判明し、アルカロイドのタイプとゲラニル化を上手く組み合わせれば更に活性の増大が見込まれ、医薬品のリード化合物として役立つと考える。今回の結果は Heterocycles に投稿受理された。</p>					

<研究論文>

著者名	論文標題			
Iwasa, K., Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Tode, C., Sugiura, M., Takeuchi, A., Tokuda, H., Takeda, K. 他	Geranyl derivatives of salsolinol show increased biological activities.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Heterocycles	77	2009	1355-1369	

## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 病態生化学研究室・准教授

研究代表者氏名 小林吉晴

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		早産児の晩期循環不全における副腎皮質ステロイド生合成能に関する研究				
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	
	小林吉晴	神戸薬科大学	薬学部	准教授	代表者	
	多河典子	神戸薬科大学	薬学部	講師	分担者	
	楠田聡	東京女子医大	母子総合センター	教授	分担者	
共同研究の成果						
<p>近年、出生後2～4週間後の早産児において、低Na血症、低血圧、乏尿を伴うショック症状（晩期循環不全）を示す症例が多施設から報告されており、この晩期循環不全は、慢性肺障害の悪化因子の一つと考えられている。発症原因として副腎皮質機能不全に伴うcortisol分泌低下が示唆されているが、血中cortisol濃度について、これまでに一致した見解が得られておらず、immunoassayによる測定が問題ではないかとも考えられている。そこで、本研究では、immunoassayで問題となる交差反応を考慮し、GC-MS法により発症群と非発症群の血中cortisolとその前駆ステロイドレベルを測定し、本疾患との関連について検討した。</p> <p>対象とした早産児には、内分泌や遺伝学的疾患などの患者は含まれず、2群間の在胎週数、体重、性別および合併症などの背景には差を認めなかった。血清検体は、固相抽出及びHPLCで精製後、各ステロイドレベルを測定した。</p> <p>ショック発症例（n=20）では、副腎機能不全により、血中cortisolは低値となると予測されたが、発症者の血清cortisol（中央値（4分位偏差）：2.65（1.73）<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>、<math>P&lt;0.05</math>）とその前駆ステロイドであるpregnenolone（10.5（8.58）<math>\text{ng}/\text{ml}</math>、<math>P&lt;0.01</math>）、17-OH-pregnenolone（2.37（1.74）<math>\text{ng}/\text{ml}</math>、<math>P&lt;0.05</math>）濃度は、ともに非発症群（n=17、順に、0.848（1.73）<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>、2.79（4.44）<math>\text{ng}/\text{ml}</math>、0.344（0.456）<math>\text{ng}/\text{ml}</math>）より有意に高値であった。しかし、発症者の前駆ステロイドレベルが高値となっていることから、cortisol合成障害が考えられた。すなわち、肺障害などのストレスにより、多量のcortisolの分泌を必要としている発症者では、この程度のcortisolの上昇はストレス応答に見合った量となっていないと考えられ、ショック症状を起こしたと考えられた。これらの成果はPediatric Res. Vol.63, No.6, 686-690（2008）で公表した。</p>						

< 研究論文 >

著者名	論文標題		
Masumoto, K., Kusuda, S., Tagawa, N., Kobayashi, Y. et al.	Comparison of serum cortisol concentrations in preterm infants with or without late-onset circulatory collapse due to adrenal insufficiency of prematurity.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Pediatric Res.	63	2008	686-690

< 学会発表 >

発表者	学会名		
Tagawa, N., Kusuda, S., Kobayashi, Y. et al.	The 13 <sup>th</sup> International Congress of Endocrinology		
タイトル		開催日	開催場所
Steroid synthetic functions in preterm infants with late onset circulatory collapse due to adrenal insufficiency of prematurity		2008年11月9日	Brazil, Rio de Janeiro

発表者	学会名		
楠田 聡、多河 典子、小林 吉晴 他	第54回日本未熟児新生児学会		
タイトル		開催日	開催場所
早産児における3β-hydroxysteroid dehydrogenase 活性の発達		2009年11月30日	横浜



## 神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 薬品物理化学研究室・講師

研究代表者氏名 上垣内 みよ子

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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	ケイヒ成分のタンパク質糖化反応に対する影響およびその反応生成物質の構造化学的研究				
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
	上垣内 みよ子	神戸薬科大学	薬学部	講師	生薬の抽出、阻害活性測定
	石田 寿昌	大阪薬科大学	薬学部・薬学科	教授	構造-活性相関解析
友尾 幸司	大阪薬科大学	薬学部・薬学科	准教授	タンパク質のX-線構造解析	
共同研究の成果					
<p>タンパク質糖化反応生成物である AGE (Advanced glycation end products) は、加齢依存的に蓄積すると共に、病的には動脈硬化症での血管壁や糖尿病のような高血糖状態が引き起こす様々な合併症の各病変部に多量の発現が認められている。従って、これらの症状改善及びアンチエイジングに AGE 生成阻害剤は有用であり開発研究がなされているが現在臨床に使用される医薬品は無い。我々は種々の漢方薬や生薬についてその AGE 生成反応に対する効果を調べており、その過程で AGE 生成阻害効果が期待される生薬として、ケイヒ (桂皮、Cinnamon Bark) を見いだした。ケイヒは濃度依存的に比較的強い AGE 生成阻害活性を示す水溶性成分と、強い AGE 生成促進活性を示す脂溶性成分の両方を含有している事が明らかになった。D-Glucose と Albumin 及び Lysozyme を用いた AGE 生成試験による阻害活性強度を指標として、ケイヒエキス成分についてカラムクロマトや HPLC により活性成分の分離・精製を行い水溶性分画からケイヒタンニン (-)-Epicatechin, と二量体である Procyanidin B-2 を同定した。このケイヒタンニン (-)-Epicatechin は AGE 生成阻害活性試験で IC50=2.5 μg/ml を示し、また Procyanidin B-2 は IC50=1.8 μg/ml を示しており、これらのケイヒタンニンは強い AGE 生成阻害活性を有していることが明らかになった。また脂溶性分画中の強い AGE 生成促進活性物質としてシナモンオイル中のフェニールプロパノイドである Cinnamaldehyde を同定した。Cinnamaldehyde の AGE 生成促進に対する影響を知る目的で、タンパク質 Lysozyme との反応物質についてクロマト精製を行い MALDI TOF/MS, 1H-, 13C-NMR 等のスペクトル法を用いて調べた。その結果 Cinnamaldehyde の 1 分子ないし 2 分子が Lysozyme と共有結合した Cinnamylidene-Lysozyme が生成して、さらに D-Glucose との反応が加わることにより結果として AGE 生成を促進していた事を明らかにした。又、糖化 Lysozyme-糖化 Lysozyme 間に共有結合による 2 量体や 3 量体の生成があることも明らかにした。更に、この Cinnamaldehyde の 1 分子が Lysozyme と共有結合した Cinnamylidene-Lysozyme をクロマトにより精製を加え、結晶化を行い得られた単結晶を X-線結晶構造解析法を用いて構造を解析し、Cinnamaldehyde が Lysozyme の Arg73 のアミノ基と結合していることを明らかにした。これらの研究により、生薬ケイヒの有する AGE 生成抑制/促進両効果の解明と共に AGE 生成促進に寄与する化合物の構造化学的解明ができた。本研究により AGE 生成の機構解明とアンチエイジング薬および動脈硬化症等の疾病の AGE 生成阻害に起因する治療薬開発における重要な情報を提供できた。これらの結果は日本生薬学会 (第55回年会)、日本薬学会近畿支部大会 (第58回)、日本薬学会 (第129回年会)、及び日本生薬学会 (第56回年会) において発表した。</p>					

<学会発表>

発表者	学 会 名		
前川友紀子、杉浦眞喜子、 竹内 敦子、上垣内みよ子	日本生薬学会第55回年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
ケイヒ成分のタンパク質糖化反応に対する影響		2008年9月19日 ～20日	長 崎

発表者	学 会 名		
前川友紀子、杉浦眞喜子、 竹内 敦子、上垣内みよ子、 友尾 幸司、石田 寿昌	第58回日本薬学会近畿支部大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
ケイヒ成分のタンパク質糖化反応に対する影響およびその反応生成物質の 構造化学的研究		2008年10月25日	神 戸

発表者	学 会 名		
前川友紀子、杉浦眞喜子、 竹内 敦子、友尾 幸司、 石田 寿昌、上垣内みよ子	日本薬学会第129年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Lysozyme 糖化反応生成物の構造について		2009年3月26日 ～28日	京 都

発表者	学 会 名		
前川友紀子、上垣内みよ子、 友尾 幸司、石田 寿昌	日本生薬学会第56回年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Cinnamaldehyde と Lysozyme の反応生成物である Cinnamylidene- lysozyme の結晶構造		2009年10月3日 ～4日	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 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 薬化学研究室・教授

研究代表者氏名 棚橋孝雄

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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	蓮子心由来アルカロイドおよび関連化合物の合成と薬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
	棚橋孝雄	神戸薬科大学	薬学部	教授	統括
	西村克己	神戸薬科大学	薬学部	講師	化学合成
	山田潤	横浜薬科大学	薬学部・臨床薬学科	教授	活性評価
	杉本由美	横浜薬科大学	薬学部・臨床薬学科	准教授	活性測定
共同研究の成果					
<p>スイレン科の植物ハス (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.) の種子「蓮子」の中にある胚芽「蓮子心」には多くのアルカロイドが含まれており、その生物活性に興味を持たれている。本研究では、ハスのアルカロイドの中でも蓮子心に特徴的なビスベンジルイソキノリンの効率的な不斉合成法を開発することができた。すなわち、パリンに由来するオキサゾリジンキラル補助基とする不斉アルキル化および Ullmann カップリングを鍵反応として、先に当研究室で蓮子心から単離、構造決定した新規微量アルカロイドを合成し、薬理活性試験に供することができた。また、蓮子心の主アルカロイドであるネフェリンは、二つの不斉中心を有するため、四つの立体異性体が存在可能である。本研究では、これらの立体異性体のうち、天然物以外の3種の立体異性体すべてを不斉合成し、ネフェリンの立体化学が薬理活性に及ぼす影響について検討した。さらに、ベンジルテトラヒドロイソキノリン骨格の効率的な不斉構築法として、1-(1-ナフチル)エチル基をキラル補助基とする新たな Pictet-Spengler 反応を開発し、ネフェリンの誘導体を不斉合成することができた。薬理活性試験は、マウスを用いる自発運動量抑制や疼痛反応、強制水泳試験などを行い、本研究で合成した蓮子心の新規微量アルカロイドやネフェリンの立体異性体および誘導体すべてが自発運動量抑制作用を有することが明らかとなった。また、蓮子心に比較的多く含まれるリエンシニンやイソリエンシニンについても薬理活性試験を行い、これらのアルカロイドが中枢に関する薬理作用を有することを明らかにすることができた。</p>					

< 研究論文 >

著者名	論文標題		
Sugimoto, Y., Furutani, S., Itoh, A., Tanahashi, T., Nakajima, H., Oshiro, H., Sun, S., Yamada, J.	Effects of extracts and neferine from the embryo of <i>Nelumbo nucifera</i> seeds on the central nervous system.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Phytomedicine	15	2008	1117-1124

< 学会発表 >

発表者	学会名		
堀居 真二、西村 克己、 棚橋 孝雄、杉本 由美、 山田 潤	日本生薬学会第55回年会		
タイトル	開催日	開催場所	
蓮子心のアルカロイド Neferine の誘導体の合成	2008年 9月19日	長崎	

発表者	学会名		
杉本 由美、山田 潤、 西村 克己、伊藤 篤子、 棚橋 孝雄、山本 雅美、 中島 宏、大城日出男、 孫 樹 建	日本生薬学会第55回年会		
タイトル	開催日	開催場所	
蓮子心に含有されるアルカロイドに関する研究（第9報）Liensinine および isoliensinine のホルマリン及び酢酸誘発疼痛反応に対する影響	2008年 9月19日	長崎	

発表者	学会名		
堀居 真二、西村 克己、 棚橋 孝雄、杉本 由美、 山田 潤	日本薬学会第129年会		
タイトル	開催日	開催場所	
蓮子心のアルカロイド Neferine の立体異性体の合成と薬理活性	2009年 3月28日	京都	

発表者	学会名		
山田 潤、杉本 由美、 西村 克己、伊藤 篤子、 棚橋 孝雄、中島 宏、 大城日出男、孫 樹 建	日本薬学会第129年会		
タイトル	開催日	開催場所	
蓮子心に含有されるアルカロイドに関する研究（第10報）強制水泳試験における Neferine の不動時間短縮作用とセロトニン受容体との関連	2009年 3月28日	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 棚橋孝雄 様

研究代表者所属・職 医療薬学研究室・教授

研究代表者氏名 水野成人

平成20年9月12日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成21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		腸管腫瘍における AP1B の役割			
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
	水野成人	神戸薬科大学	薬学部	教授	薬大での研究管理
	三木生也	神戸薬科大学	薬学部	講師	研究の指導
	増田充弘	神戸薬科大学	薬学部	助教	薬大での研究主体
	東健	神戸大学	医学部	教授	神大での研究管理
	吉田優	神戸大学	医学部	准教授	研究の指導
斧山美津子	神戸大学	医学部	大学院生	神大での研究主体	
共同研究の成果					
<p>AP 複合体はクラスリン被覆小胞の被覆成分として、クラスリンのオルガネラ膜への結合に際してアダプターとして働くとともに、積み荷蛋白質の輸送シグナルの認識も行う。また、AP1B は上皮細胞のみに発現し、トランスゴルジネットワークから基底膜側への輸送に関与している事が知られている。AP1B 欠損マウスでは上皮細胞間の結合が脆弱で、上皮細胞の増殖能が増大することが分かっている。上皮増殖因子受容体は腫瘍の増殖に深く関与している因子であり、細胞レベルでは、AP1B の欠損によりその発現量の変化が捉えられている。本研究は、AP1B が大腸腫瘍の発生・増殖にどのように関与するかを検討することを目的とした。</p> <p>本共同研究に関わる検討により、腸管に自然に腫瘍を発生する APCmin+/-マウスのポリープ部において、AP1B の発現が mRNA および蛋白レベルで正常部と比較して有意に低下していることが確認された。また、AP1B 欠損マウスの小腸組織において、コントロールマウスと比較して細胞増殖能の増大 (ki-67陽性細胞の増加) が認められた。これは、腫瘍の発生あるいは増殖に AP1B の発現量が関与する可能性を示唆する結果であった。</p> <p>APC は Wnt signal において <math>\beta</math>-catenin の分解を誘導し、この経路を抑制することが知られている。APC の変異は <math>\beta</math>-catenin の安定化をもたらして Wnt signal が恒常的に活性化し、これは大腸ポリープや大腸癌の発症に重要な役割を果たしている。そこで、APC に変異のある SW480 細胞と、SW480 に正常な APC を発現させた細胞を用いて AP1B の発現を western blotting で比較した。その結果、APC 変異のある SW480 細胞では正常な APC を発現している SW480 細胞と比較して、AP1B の発現が低下していた。</p> <p>次に、APC 変異の有無で AP1B 発現が変化していることから、Wnt signal により AP1B 発現が制御されているかを検討した。正常な APC を発現している SW480 を Wnt3a agonist で刺激し、AP1B の発現を確認した。Wnt3a で刺激しても、AP1B 発現の低下は mRNA でも蛋白レベルでも認めなかった。この結果から、AP1B の発現は Wnt による刺激には制御されていないと考えられた。</p> <p>また、AP1B 欠損が腸管の腫瘍の発生にどのように関与するかを検討するために、AP1B 欠損マウスと APCmin+/-マウスを交配し、交配したマウスの腸管における腫瘍数を評価する実験を行った。しかし、AP1B 全身欠損マウスは容易に死亡し、交配したマウスでの評価が困難であることが分かった。この点については、現在腸管特異的 AP1B 欠損マウスを譲り受け、評価を行っている。ヒト大腸腫瘍における AP1B の発現量の評価については、本研究期間中に実施することができず、今後の検討課題と考えられた。</p> <p>なお、論文文化のためにはいくつかの追加実験が必要と考えられ、今後も腫瘍の発生・増殖能と AP1B の発現量の関連について検討し、小腸あるいは大腸における腫瘍発生メカニズムの解明につなげていきたいと考えている。</p>					