

共同研究 研究紀要

2014

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。

2013（平成 25）年度共同研究（研究期間 2013.4.1 ～ 2014.3.31）

承認番号	共同研究課題名（研究テーマ）	研究代表者
1	医薬融合アプローチによるエンドセリン拮抗薬臨床適応の再構築	臨床薬学研究室 教授 江本 憲昭
2	合成化学的手法を用いた天然カロテノイドの立体構造解明研究	生命有機化学研究室 教授 和田 昭盛
3	アレルギー疾患および自己免疫疾患の抗原特異的制御	薬理学研究室 教授 吉野 伸
4	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
5	高等植物ならびに地衣類を起源とする DNA 代謝酵素阻害剤の探索	薬化学研究室 教授 棚橋 孝雄
6	特異な縮環様式をもつ含窒素複素環化合物群の合成と抗癌活性評価	薬品化学研究室 教授 宮田 興子
7	分子イメージング薬剤の開発研究	薬品物理化学研究室 教授 向 高弘
8	抗体一本鎖 Fv フラグメントと酵素の融合タンパク質をプローブとする高感度迅速免疫測定法の開発	生命分析化学研究室 教授 小林 典裕
9	リン酸化生成物の単離法の開発	機能性分子化学研究室 教授 中山 尋量
10	中成薬およびその構成生薬の生物活性に関する研究	生薬化学研究室 講師 土反 伸和
11	新規摂食調節ペプチド adropin の食行動および情動に関する研究	病態生化学研究室 教授 加藤 郁夫
12	ビタミン K 合成酵素 UBIAD1 の構造機能解析	衛生化学研究室 教授 岡野登志夫
13	生体における分泌因子の役割の解明	微生物化学研究室 准教授 小西 守周
14	生活習慣病、加齢性疾患の早期発見と予防のためのコホート研究	医療薬学研究室 教授 水野 成人
15	Cocrystal 形成による医薬品の物性および安定性の改善	製剤学研究室 教授 北河 修治

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 様

研究代表者所属・職 臨床薬学研究室・教授

研究代表者氏名 江本 憲昭

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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	医薬融合アプローチによるエンドセリン拮抗薬臨床適応の再構築
--------	-------------------------------

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	研究の総括
八木 敬子	神戸薬科大学	薬学部	講師	疾患モデル動物解析
中山 和彦	神戸薬科大学	薬学部	助教	臨床データの解析
平田 健一	神戸大学大学院	医学研究科	教授	循環器疾患の診療統括

共同研究の成果

我々はエンドセリンの生理学的・病理学的役割の解明を、現在臨床応用されている肺高血圧症を中心に基礎的臨床的アプローチの両面から研究を行い、以下の成果を上げるとともに、さらに発展させて新たな研究を稼働させている。

1. 肺高血圧症の新規病態解明と治療法の開発

2005年進めている神戸大学でのエンドセリン拮抗薬を中心とした肺血管拡張薬による治療症例の集積を行っており、2014年11月現在で211名の肺高血圧患者の症例蓄積を完了した。我々は豊富な臨床経験より下記に挙げた肺高血圧症の臨床研究を行い、成果発表を行った。まず肺高血圧患者の夜間睡眠時の酸素飽和度が低下するという現象に注目し、簡易睡眠時無呼吸モニターを使用し肺高血圧患者の夜間無呼吸低呼吸指数と3%酸素飽和度低下指数の観察を行った。興味深い事に肺高血圧患者は無呼吸低呼吸指数が比較的正常に保たれているにもかかわらず、低酸素血症が著明であり、夜間における肺血管攣縮が低酸素血症の原因である可能性が示された。肺高血圧が重症な患者程低酸素血症を来しやすく、また低酸素血症が重症なほど3%酸素飽和度低下指数が高く、低酸素誘発性肺血管攣縮という肺血管の機能的異常が病態悪化に関与している事を証明した。本研究により在宅酸素療法を含めた夜間の酸素ケアーが肺高血圧症の治療に重要である可能性を示しており、臨床的にも意義深い研究と思われる。日本肺高血圧学会学術集会にその成果を発表した。

また今後社会的に患者数が全世界で増加している先天性心疾患由来肺高血圧症の肺高血圧発症メカニズム解明として、心房中隔欠損孔サイズが肺高血圧発症に関係しているという解析結果を110名の先天性心疾患患者で解析を行った。欠損孔サイズが小さいにもかかわらず肺高血圧症を発症してくる患者の存在が先行研究で示されているが、本邦における心房中隔欠損症では肺高血圧発症の独立した危険因子は女性・欠損孔サイズ、右心機能である事が明らかとなり、肺高血圧発症素因を有した患者がある一定量の短絡量による負荷がかかる事により肺血管リモデリングが進行し肺高血圧の発症を来すと考えられる。先天性心疾患由来肺高血圧症はその他の肺高血圧症とその病態メカニズムや予後が異なり、特殊な治療管理が必要とされるが、臨床上記のような患者に対する最適治療法を導入する際に非常に有意義な知見となるものと考えられる。

また慢性血栓塞栓性肺高血圧症は本邦の肺高血圧症の約半数を占める代表的な原因疾患であるが、血栓内膜摘除術や肺血管バルーン形成術などの強力な治療法によりかなりの患者で肺動脈圧の正常化が達成できるようになってきた。我々はこれら侵襲的治療により劇的に心機能が回復した症例とそうでない症例を比較し、罹病期間が長く術前に右心機能低下を示している症例で心機能回復が遅れるという事を証明した。これは早期診断早期治療の重要性を示す結果であり、臨床的な価値のある成果と思われる。

2. 遺伝学薬理学的・分子生物学的アプローチを用いたトランスレショナルリサーチ

我々は臨床研究のみでなく、臨床サンプルを基礎的な研究アプローチを用いて解析する基礎・臨床融合研究を推し進めている。肺高血圧患者から得られた採血検体よりDNAや血清中の生理活性物質を質量分析機により解析し、肺高血圧発症の遺伝学的素因解明や新規バイオマーカーの探索を目標に研究を進めている。薬物代謝に関わる100あまりの遺伝子を網羅的に解析するD-MET解析を終了し、肺高血圧重症化例・薬物難治例・エンドセリン拮抗薬副作用発症例を推定する候補遺伝子を抽出した。現在検証実験を行い我々の仮説を検証中である。また脂肪酸代謝産物を中心に新規バイオマーカーを網羅的に解析できる質量分析機器の条件を策定中であり、近い将来プレリミナリデータを発表する予定である。

これら新規基礎的知見がスムーズに臨床に還元されるように、基礎と臨床をつなぐ研究をさらに精力的に行きたくと考えている。

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Taniguchi Y, Emoto N, Miyagawa K, Nakayama K, Kinutani H, Tanaka H, Shinke T, Hirata KI.	Noninvasive and Simple Assessment of Cardiac Output and Pulmonary Vascular Resistance With Whole-Body Impedance Cardiography Is Useful for Monitoring Patients With Pulmonary Hypertension.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Circulation Journal	7	2013	2383-9	

著者名	論文標題			
Hartopo AB, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Suzuki Y, Yagi K, Nakayama K, Hirata K	Endothelin-converting enzyme-1 gene ablation attenuates pulmonary fibrosis via CGRP-cAMP/EPAC1 pathway.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Am J Respir Cell Mol Biol	48	2013	467-76	

著者名	論文標題			
Mayasari DS, Emoto N, Yagi K, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Miyoshi T, Miyata O, Hirata K	Rhodamine-labeled LDL as a tool to monitor the lipoprotein traffic in experimental model of early atherosclerosis in mice.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Kobe J Med Sci.	59	2013	E54-63	

著者名	論文標題			
D.A.A.Nugrahaningsih, N.Emoto, N.Vignon-Zellweger, E.Purnomo, K.Yagi, K.Nakayama, M.Doi, H.Okamura, K.Hirata,	Chronic hyperaldosteronism in Cryptochrome null mice induces high-salt- and blood pressure-independent kidney damage in mice			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Hypertension Res	37(3)	2014	202-9	

著者名	論文標題			
H.Ali, N.Emoto, K.Yagi, N.Vignon-Zellweger, K.Nakayama, K.Hatakeyama, Y.Asada, Y.Rikitake, K.Hirata	Localization and characterization of novel secreted protein, SCUBE2, in the development and progression of atherosclerosis.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Kobe J Med Sci	59	2013	E122-E131	

著者名	論文標題		
Purunomo E, Emoto N, Nugrahaningsih D, Nakayama K, Yagi K, Heiden, S, Nadanaka S, Kitagawa H, Hirata K	Glycosaminoglycan overproduction in the aorta increases aortic calcification in murine chronic kidney disease.		
雑誌名	巻	発行年	ページ
J. Am. Heart Assoc.	2(5)	2013	e000405.1-18

著者名	論文標題		
Kazuya Miyagawa, Emoto Noriaki	A New Class of Drug for Pulmonary Arterial Hypertension - Can a Rho-Kinase Inhibitor Break the Stagnation in Treating It?		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Circulation journal	77(10)	2013	2477-8

著者名	論文標題		
Hung Tran Van, Noriaki Emoto, Nicolas Vignon-Zellweger, Kazuhiko Nakayama, Keiko Yagi, Yoko Suzuki, Ken-ichi Hirata	Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor under hypoxia causes severe, human-like pulmonary arterial hypertension in mice: Potential roles of interleukin-6 and endothelin		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Life Sci		2014	In press

〈総説〉

著者名	論文標題		
中山 和彦、江本 憲昭	エンドセリン受容体拮抗薬の臨床研究と今後の課題		
雑誌名	巻	発行年	ページ
心臓	45(12)	2013	1503-1511

著者名	論文標題		
宮川 一也、江本 憲昭	肺高血圧症診療の進歩		
雑誌名	巻	発行年	ページ
Medicina	50	2013	916-918

著者名	論文標題		
宮川 一也、江本 憲昭	特発性肺動脈性肺高血圧症		
雑誌名	巻	発行年	ページ
循環器内科	74	2013	556-562

〈学会発表〉

発表者	学会名		
Dyah Samti Mayasari, Noriaki. Emoto, Keiko. Yagi, Kazuhiko. Nakayama, Nur. Arfian, Hirowati. Ali, Ken-ichi Hirata	81st European Atherosclerosis Society Congress		
タイトル		開催日	開催場所
TARGETING CHONDROITIN SULFATE N-ACETYLGALACTOSAMINYLTRANSFERASE 2 IN THE MODIFICATION OF SUBENDOTHELIAL LIPOPROTEIN RETENTION AND FOAM CELL FORMATION		2013年6月 2～5日	フランス、 リヨン
発表者	学会名		
中山 和彦、 Anggoro B. Hartopo、 鈴木 陽子、 Sunu Budhi Raharjo、 江本 憲昭	第2回日本肺循環学会学術集会		
タイトル		開催日	開催場所
肺高血圧・肺線維症に対する新たなエンドセリン研究 - エンドセリン変換酵素阻害の可能性 -		2013年6月 22～23日	東京
発表者	学会名		
中山 和彦、江本 憲昭、 谷口 悠、絹谷 洋人、 鈴木 陽子、新家 俊郎、 平田 健一	第2回日本肺循環学会学術集会		
タイトル		開催日	開催場所
Focusing right heart function for predicting the oral medical efficacy in pulmonary hypertension		2013年6月 22～23日	東京
発表者	学会名		
絹谷 洋人、江本 憲昭、 中山 和彦、谷口 悠、 新家 俊郎、大竹 寛雅、 平田 健一	第2回日本肺循環学会学術集会		
タイトル		開催日	開催場所
慢性肺血栓栓症と鑑別が困難であった原発性肺血管肉腫の一例		2013年6月 22～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
谷口 悠、江本 憲昭、 絹谷 洋人、中山 和彦、 新家 俊郎、岡田 健次、 大北 裕、平田 健一	第2回日本肺循環学会学術集会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Comparison between Balloon Pulmonary Angioplasty and Pulmonary Thromboendarterectomy on Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension		2013年6月 22～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
谷口 悠、江本 憲昭、 絹谷 洋人、中山 和彦、 新家 俊郎、平田 健一	第2回日本肺循環学会学術集会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
肺動脈性肺高血圧症患者に対するエンドセリン受容体拮抗薬およびPDE5阻害剤追加併用療法の長期効果の検討		2013年6月 22～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
Hiroto Kinutani, Toshiro Shinke, Iromasa Otake, Tomofumi Takaya, Masayuki Nakagawa, Tsuyoshi Osue, Yu Taniguchi, Masamichi Iwasaki, Ryo Nishio, Akihide Konishi, Masaru Kuroda, Hachidai Takahashi, Daisuke Terashita, Noriaki Emoto, Kazuhiko Nakayama, Kazuya Miyagawa, Ken-ichi Hirata	European Society of cardiology 2013		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Hemodynamic Improvement through Beneficial Vessel Reaction Following Balloon Pulmonary Angioplasty for Distal-type Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension		2013年8月31日 ～9月4日	オランダ アムステルダム

発 表 者	学 会 名		
Y. Taniguchi, T. Shinke, H. Kinutani, H. Otake, N. Emoto, K. Hirata	European Society of cardiology 2013		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Efficacy and safety of balloon pulmonary angioplasty for inoperable patients with peripheral type chronic thromboembolic pulmonary hypertension		2013年8月31日 ～9月4日	オランダ アムステルダム

発表者	学会名		
Sunu B. Raharjo, Noriaki Emoto, Yoga Yuniadi, Kazuhiko Nakayama, Ganesja M. Harimurti	International conference of Endothelin (ET-13)		
タイトル		開催日	開催場所
Role of Bradykinin and Endothelin-Converting Enzyme-1 in Pulmonary Hypertension		2013年9月 8～11日	東京

発表者	学会名		
Nicolas Vignon-Zellweger, Susi Heiden, Kazuhiko Nakayama, Keiko Yagi, Marc Iglarz, Masashi Yanagisawa, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
タイトル		開催日	開催場所
Absence of ETA receptors on podocytes is not antialbuminuric in diabetic mice		2013年9月 8～11日	東京

発表者	学会名		
Kazuhiko Nakayama, Nicolas Vignon-Zellweger, Susi Heiden, Yoko Suzuki, Takuya Okano, Kazuya Miyagawa, Keiko Yagi, Masashi Yanagisawa, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
タイトル		開催日	開催場所
Endothelin converting enzyme inhibition attenuates early albuminuria and late renal failure in streptozotocin induced diabetic mice		2013年9月 8～11日	東京

発表者	学会名		
Nur Arfi an, Keiko Yagi, Kazuhiko Nakayama, Dwi C. Ratna Sari, Muhammad M. Romi, Untung Tranggono, Hary S. Muliawan, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
タイトル		開催日	開催場所
Increased of Heparanase expression in hipoxic endothelial cells and kidney ischemic-reperfusion injury associates with Endothelin-1 elevation and eNOS reduction		2013年9月 8～11日	東京

発 表 者	学 会 名		
Nur Arfi an, Keiko Yagi, Kazuhiko Nakayama, Nicolas Vignon-Zellweger, Susi Heiden, Tran V. Hung, Hary S. Muliawan, Gahan Satwiko, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Endothelial Cells-derived Endothelin-1 Exaggerates Kidney Fibrosis Through ETAR Activation in Renal Interstitial Cells		2013年9月 8～11日	東京

発 表 者	学 会 名		
Susi Heiden, Nicolas Vignon-Zellweger, Kazuhiko Nakayama, Keiko Yagi, Masahi Yanagisawa, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Renal Phenotype of Type 1 Diabetic Endothelial Cell Derived ET-1 Deficient Mice		2013年9月 8～11日	東京

発 表 者	学 会 名		
Daisuke Nakano, Noriaki Emoto, Kazuhiko Nakayama, Masashi Yanagisawa, Akira Nishiyama	International conference of Endothelin (ET-13)		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Endothelial cell-derived ET-1 contributes to the severity of septic kidney injury		2013年9月 8～11日	東京

発 表 者	学 会 名		
Hung Van Tran, Noriaki Emoto, Nicolas Vignon- Zellweger, Kazuhiko Nakayama, Keiko Yagi, Yoko Suzuki, Ken-ichi Hirata	International conference of Endothelin (ET-13)		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Analysis of ET-1 system in mild and severe pulmonary arterial hypertension in mice		2013年9月 8～11日	東京

発表者	学会名		
Kazuya Miyagawa, Kazuhiko Nakayama, Yoko Suzuki, Yu Taniguchi, Hiroto Kinutani, Toshiro Shinke, Ken-ich Hirata, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
	タイトル	開催日	開催場所
	Serum Endothelin-1 and big endothelin-1 in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension can be markers to predict hemodynamics after balloon pulmonary angioplasty	2013年9月 8～11日	東京

発表者	学会名		
Naoki Yoshimura, Tomonori Higuma, Masaya Aoki, Yoshinori Doki, Hideyuki Nagkaoka, Keiichirou Ibuki, Sayaka Ozawa, Keiichi Hirono, Fukiko Ichida, Kazuhiko Nakayama, Takuya Okano, Noriaki Emoto	International conference of Endothelin (ET-13)		
	タイトル	開催日	開催場所
	Distinct expression of endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in the lung of patients undergoing right heart bypass surgery : A preliminary study with Endothelin-1 elevation and eNOS reduction	2013年9月 8～11日	東京

発表者	学会名		
江本 憲昭	第 61 回心臓病学会		
	タイトル	開催日	開催場所
	肺高血圧症の診断および治療戦略の再構築	2013年9月 20～22日	熊本

発表者	学会名		
元地 由樹、田中 秀和、 福田 優子、佐和 琢磨、 山鳥 嘉樹、今西 純一、 三好 達也、望月 泰秀、 辰巳 和宏、松本 賢亮、 江本 憲昭、平田 健一	第 61 回心臓病学会		
	タイトル	開催日	開催場所
	肺高血圧症における左室局所心筋拡張能指標の有用性	2013年9月 20～22日	熊本

発 表 者	学 会 名		
大西 哲在、杜 隆嗣、 石田 達郎、江本 憲昭、 川合 宏哉、平田 健一、 横山 光弘	第 61 回心臓病学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
難治性高血圧症患者におけるロサルタンカリウム・ヒドロクロロチアジド の左室肥大に対する効果：Kobe-CONNECT 試験心エコー図サブ解析		2013年9月 20～22日	熊本

発 表 者	学 会 名		
谷口 悠、新家 俊郎、 絹谷 洋人、宮川 一也、 中山 和彦、大竹 寛雅、 江本 憲昭、平田 健一、 岡田 健次、大北 裕	第 61 回心臓病学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する薬物治療と経皮的肺動脈バルーン形 成術の治療効果の検討		2013年9月 20～22日	熊本

発 表 者	学 会 名		
宮川 一也、江本 憲昭、 中山 和彦、谷口 悠、 絹谷 洋人、新家 俊郎、 平田 健一	第一回日本肺高血圧学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
BPA 前後における血中 ET-1 濃度測定とバイオマーカーとしての応用		2013年10月 13～14日	東京

発 表 者	学 会 名		
新家 俊郎、谷口 悠、 絹谷 洋人、宮川 一也、 中山 和彦、大竹 寛雅、 高谷 具史、江本 憲昭、 平田 健一	第一回日本肺高血圧学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
慢性肺血栓塞栓症（CTEPH）治療におけるバルーン肺動脈形成術（BPA） の位置づけと治療手技の実際		2013年10月 13～14日	東京

発 表 者	学 会 名		
Yu Taniguchi, Noriaki Emoto, Hiroto Kinutani, Hiromasa Otake, Toshiro Shinke, Ken-ichi Hirata	TCT (Transcatheter Cardiovascular Therapeutics) 2013		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Efficacy and Safety of Balloon Pulmonary Angioplasty for Non-operable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension in Comparison to Pulmonary Endarterectomy for Operable Patients		2013年10月 28日～11月1日	サンフランシスコ

発表者	学会名		
Kazuya Miyagawa, Noriaki Emoto, Yu Taniguchi, Hiroto Kinutani, Kazuhiko Nakayama, Toshiro Shinke, Ken-ichi Hirata	American Heart Association 2013 Scientific Sessions		
タイトル		開催日	開催場所
Balloon Pulmonary Angioplasty Improves Clinical Status and Hemodynamics in Patients With Non-operable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension in Comparison to Pulmonary Endarterectomy in Operable Patients		2013年11月16～20日	米国・ダラス

発表者	学会名		
Noriaki Emoto	25th Weekend Course on Cardiology		
タイトル		開催日	開催場所
Are Hypertension and Diabetes Coming from Common Soil Hypothesis?		2013年11月	ジャカルタ

発表者	学会名		
Noriaki Emoto	25th Weekend Course on Cardiology		
タイトル		開催日	開催場所
Endothelial dysfunction in hypertension and diabetes		2013年11月	ジャカルタ

発表者	学会名		
谷口 悠、江本 憲昭、寺下 大輔、高橋 八大、黒田 優、小西 英明、絹谷 洋人、西尾 亮、岩崎 正道、大末 剛史、中川 雅之、高谷 具史、大竹 寛雅、新家 俊郎、平田 健一	第78回日本循環器学会総会		
タイトル		開催日	開催場所
Improvement of Cardiac Output after Balloon Pulmonary Angioplasty Depends on Preoperative Right Ventricular Function in inoperable Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension		2014年3月21～23日	東京

発表者	学会名		
Kazuya Miyagawa, Noriaki Emoto, Kazuhiko Nakayama, Yu Taniguchi, Hiroto Kinutani, Toshiro Shinke, Ken-ichi Hirata	第78回日本循環器学会総会		
タイトル		開催日	開催場所
Endothelin Receptor Antagonism can Increase Cardiac Output after Balloon Pulmonary Angioplasty and Serum Endothelin-1 Levels Predict the Effect of It		2014年3月21～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
Kazuhiko Nakayama , Yoko Suzuki, Takuya Okano, Kazuya Miyagawa, Keiko Yagi, Ken-ichi Hirata, Noriaki Emoto	第 78 回日本循環器学会総会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
The Potentiation of Calcitonin Gene-related Peptide Pathway by Suppressing Endothelin Converting Enzyme Attenuates Kidney Dysfunction in Type 1 Diabetic Mice.		2014年3月 21～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
Muhammad G, N Emoto, K Nakayama, K Yagi, K Hirata	第 78 回日本循環器学会総会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Possible Involvement of Estrogen on Endothelin-1 Transgenic Mice in the Hypoxia Induced Pulmonary Arterial Hypertension Model		2014年3月 21～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
Muliawan HS, Emoto N, Nakayama K, Yagi K, Hirata K	第 78 回日本循環器学会総会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Knockout of Endothelin-1 in Vascular Endothelial Cells Ameliorates Cardiac Remodelling induced by Cryoinfarction in Mice		2014年3月 21～23日	東京

発 表 者	学 会 名		
Muhammad G, N Emoto, K Nakayama, K Yagi, K Hirata	第 43 回日本心脈管作動物質学会 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Estrogen Role in Hypoxia Induced Pulmonary Arterial Hypertension using Endothelin-1 Transgenic Mice		2014年2月 15～16日	神戸

発 表 者	学 会 名		
Muliawan HS, Nakayama K, Yagi K, Miyagawa K Suzuki Y, Satwiko MG, Nugroho DB, Jeffilano AB, Emoto N	第 43 回日本心脈管作動物質学会 年会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Endothelin-1 Derived Vascular Endothelial Cells Importance for Cardiac Remodeling Induced by Cryoinfarction		2014年2月 15～16日	神戸

発表者	学会名		
Hung Tran Van, Nicolas Vignon-Zellweger, 中山 和彦、八木 敬子、 鈴木 陽子、江本 憲昭	第43回日本心脈管作動物質学会 年会		
タイトル		開催日	開催場所
Analysis of ET-1 system disturbance in severe pulmonary arterial hypertension in mice.		2014年2月 15~16日	神戸

発表者	学会名		
中山 和彦、亀田 真吾、 中原 大介、鈴木 陽子、 岡野 卓也、宮川 一也、 八木 敬子、江本 憲昭、 平田 健一	第43回日本心脈管作動物質学会 年会		
タイトル		開催日	開催場所
エンドセリン変換酵素阻害によるカルシトニン遺伝子関連ペプチド賦活を介した糖尿病性腎症進展抑制効果の検討		2014年2月 15~16日	神戸

発表者	学会名		
Muhammad G, Emoto N, Nakayama K, Yagi K, Hirata K	10th Asia Pacific Congress of Hypertension (APCH2014)		
タイトル		開催日	開催場所
Role of Estrogen in the Development of Pulmonary Arterial Hypertension in Hypoxia Induced Endothelin-1 Transgenic Mice		2014年2月 12~15日	フィリピン・セブ

発表者	学会名		
Muliawan HS, Emoto N, Nakayama K, Yagi K, Hirata K	10th Asia Pacific Congress of Hypertension (APCH2014)		
タイトル		開催日	開催場所
Role of Vascular Endothelial Cells Endothelin-1 in Cardiac Remodeling Induced by Cryoinfarction		2014年2月 12~15日	フィリピン・セブ

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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		合成化学的手法を用いた天然カロテノイドの立体構造解明研究			
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	研究の統括
	真岡 孝至	財団法人生産開発科学研究所	食物機能研究室	室長	カロテノイドの単離
	山野 由美子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	カロテノイドの合成と天然物との比較同定
共同研究の成果					
<p>カロテノイドの立体配置の確認は、機能や代謝経路の解明上重要であるが、明らかにされていないものが数多く存在する。そこで、このようなカロテノイドを立体構造決定が可能な方法で合成し、天然から単離したカロテノイドとの比較同定を行って立体構造を明らかにすべく、共同研究を実施した。</p> <p>1. アセチレンカロテノイドの一種である(3R,3'R)-alloxanthin は、CDのコットン強度が非常に小さいことから、CDスペクトルから両末端のヒドロキシ基の立体配置を決定することは困難である。そのため、これまで天然から単離されたalloxanthinの立体配置は最初に単離された(3R,3'R)-体と同じであろうと推定されているのみであった。最近、我々は(3R,3'R)-alloxanthinの立体選択的且つ効率的な合成手法を報告した。その合成手法に従って、(3S,3'S)-体およびmeso-体も全合成し、光学活性HPLCカラムを用いたこれら3種の立体異性体の分離条件を確立した。確立した分離条件を用いて、種々の水生動物から単離したalloxanthinの立体配置の確認を行った結果、多くは(3R,3'R)-体であったが、いくつかの生物種では、(3R,3'R)-体だけではなく(3S,3'S)-体やmeso-体も微量ながら存在していることを初めて明らかにすることができた。これらの結果と食物連鎖との関連を含めた考察について、学会発表および論文報告(Mar. Drugs, 2014, 12, 2623)を行った。</p> <p>2. アセチレンカロテノイドの一種で新規な3,6-dihydroxy-ϵ-末端構造を持つgobiusxanthinや3'-epigobiusxanthinのジオール部の立体配置は、6位がヒドロキシ基ではなく水素置換体である類似カロテノイドとのCDスペクトルの比較により推定されているのみであった。今回、gobiusxanthinのジオール部に関する4種の立体異性体をすべて全合成して天然物とCDスペクトルを比較することによって、gobiusxanthinのジオール部の立体配置は報告通りであったが、3'-epigobiusxanthinの立体配置は6'位のepi体の誤りであることを明らかにすることができた。また、CDスペクトルによって、ジオール部の立体配置は判断できるが、アセチレン末端部ヒドロキシ基の立体配置は判断できないことがわかった。そこでアセチレン末端部ヒドロキシ基が逆のgobiusxanthin立体異性体も全合成してHPLCによる立体異性体の分離条件の確立を行って、天然物と直接比較同定することにより立体構造を決定することにした。合成法等について学会発表を行った。HPLCによる天然物の立体配置の決定については、現在検討中である。</p> <p>3. 共同研究者が柑橘果実ガックから、lycopeneやγ-caroteneの5,6位(5',6'位)のジヒドロキシ体を新規酸化代謝物として単離した。しかし、ジオール部の立体配置については、相対配置さえもスペクトルデータからは決定できなかった。そこで、これらを全合成し、天然物とスペクトルを比較することによって、天然物のジオール部の相対配置を明らかにすることができた。これらの結果について学会発表を行った。現在、絶対立体配置を明らかにすべく、光学活性体での合成を進めている所である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Y. Yamano, T. Maoka, A. Wda	Synthesis of (3S,3'S)- and meso-Stereoisomers of Alloxanthin and Determination of Absolute Configuration of Alloxanthin Isolated from Aquatic Animals			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Marine Drugs	12	2014	2623-2632	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
山野由美子、栗本 博正、 庄司めぐみ、眞岡 孝至、 和田 昭盛	日本薬学会 第134年会		
タイトル	開催日	開催場所	
Gobiusxanthin 立体異性体の合成	3月29日	熊本	

発表者	学会名		
眞岡 孝至、山野由美子、 和田 昭盛	第28回 カロテノイド研究談話会		
タイトル	開催日	開催場所	
水産動物における Alloxanthin 立体異性体の分布, 食物連鎖と代謝の観点から	9月5日	金沢	

発表者	学会名		
眞岡孝至、江藤哲治、 山野由美子、和田昭盛	第28回 カロテノイド研究談話会		
タイトル	開催日	開催場所	
ガックに含まれる γ -Carotene の酸化代謝産物について	9月5日	金沢	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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	アレルギー疾患および自己免疫疾患の抗原特異的制御				
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
	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
	奈邊 健	京都薬科大学	薬学部	准教授	実験データの評価
共同研究の成果					
<p>抗体 Fab は特異的アレルゲンとは結合するが、Fc を欠損しているためエフェクター機能を有さない。本研究では、アレルゲン特異的モノクローナル抗体 (mAb) IgG1Fab によるアレルギー性鼻炎制御について検討した。方法として、BALB/c マウスを卵白アルブミン (OVA) あるいはスギ花粉 (JCP) /alum の腹腔内注射 (days 0 & 14) によって感作後、days 28-30 および day 35 に OVA および JCP の鼻腔内暴露によってアレルギー性鼻炎を惹起した。パパイン消化によって作製した抗 OVA (O1-10) あるいは JCP (P1-8) mAbIgG1Fab は、各アレルゲン惹起 15 分前に鼻腔内投与した。その結果、果 OVA および JCP 惹起によるくしゃみ回数、鼻掻き回数は、O1-10 および P1-8Fab によって有意に抑制され、またこの時、OVA および JCP 特異的血清 IgE および肥満細胞活性化の指標となる MMCP-1 産生の減少がみられた。また、鼻腔粘膜組織の肥満細胞および好酸球浸潤、杯細胞増殖も O1-10 および P1-8Fab によって抑制された。一方、Fab 化しない完全抗体投与によっては、くしゃみ回数、鼻掻き回数、好酸球浸潤、抗 OVAIgE 抗体産生は有意に増加あるいは増加傾向がみられた。in vitro において、前もって OVA を O1-10Fabs によって補足すると、補足された OVA に対する完全抗 OVA ポリクローナル抗体の結合は抑制された。しかし、この抑制は少量の抗体を用いた場合にみられ、大量の抗体の場合は無効であった。以上の結果から、アレルギー性鼻炎はアレルゲン特異的抗体 Fabs の鼻腔内暴露によって制御されることが考えられる。そのメカニズムとしては、Fabs 暴露後、鼻腔粘膜上でアレルゲンが Fabs によって補足され、アレルギー誘導に必須である抗原と完全抗体との結合が阻害されることによると思われる。</p>					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Nobuaki Mizutani, Takeshi Nabe, Shin Yoshino	IL-17A promotes the exacerbation of IL-33-induced airway hyperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice			
雑 誌 名		卷	発行年	ページ
Journal of Immunology		192	2014	1372-1384

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治 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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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 田村 純一	神戸薬科大学 鳥取大学	薬学部 地域学部・地域環境学科	教授 教授	生合成および機能の解析と全体の総括 糖鎖合成
共同研究の成果					
<p>コンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸を含む硫酸化グリコサミノグリカン鎖は、多様な硫酸化修飾構造をもつ多糖鎖の一つであり、細胞接着、分化、神経回路網の形成などを調節する役割を果たしているが、その硫酸化構造の生合成と機能との相関は十分に解明されていない。本研究では、糖鎖有機合成の専門家の協力により、有機化学的に合成された糖鎖を用いて、硫酸化グリコサミノグリカン鎖の精密な生合成機構と機能を明らかにすることを目標としている。</p> <p>本年度は、以下のように有機化学的に合成されたヘパラン硫酸鎖四糖を用いてヘパラン硫酸を分解するヘパラーゼ活性を阻害する構造を明らかにし、そのヘパラーゼ阻害活性を示すヘパラン硫酸鎖の生合成機構も明らかにした。</p> <p>細胞外マトリクスに存在するヘパラーゼは癌の転移に密接に関わっており、その阻害薬は抗がん剤の候補として有望である。我々は、basal-like型に分類されるヒト乳癌細胞株の細胞内に遊離グルコサミン (GlcNH₃⁺) 残基を含むヘパラン硫酸鎖が蓄積することを見いだした。そこで、この構造がヘパラーゼに耐性を示すのではないかと想像した。予想通り、GlcNH₃⁺構造を含む合成四糖は <i>in vitro</i> でヘパラーゼ活性を阻害し、さらに乳癌細胞の浸潤を抑制する活性をもつことがわかった。通常、ヘパラン硫酸に含まれるグルコサミン残基は、アセチル化あるいは硫酸化されていることが多く、遊離の GlcNH₃⁺ 残基が存在することは珍しいと考えられてきた。そこで、この生合成機構についても調べた。新生直後のヘパラン硫酸は <i>N</i>-アセチルグルコサミン残基を含み、二つの機能を併せ持つ酵素である <i>N</i>-デアセチラーゼ/<i>N</i>-硫酸基転移酵素-1 (NDST-1) によって脱アセチル化された後、硫酸化される。この2つの酵素反応の中間体として GlcNH₃⁺ 構造が存在するため、NDST-1 のデアセチラーゼ活性と <i>N</i>-硫酸基転移酵素活性のバランスが GlcNH₃⁺ 残基の生成を制御している可能性を考えた。解析の結果、ヘパラン硫酸の合成に係ると考えられている糖転移酵素 EXTL3 (exostosin-like 3) が NDST-1 と複合体を形成することで、NDST-1 の <i>N</i>-硫酸基転移酵素活性を阻害し、GlcNH₃⁺ 残基の生成に関わることが判明した。</p> <p>Nadanaka, S. <i>et al.</i> J. Biol. Chem. 289, 15231-15243 (2014).</p>					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Nadanaka, S., Purunomo, E., Takeda, N., Tamura, J., and Kitagawa, H.	Heparan Sulfate Containing Unsubstituted Glucosamine Residues: Biosynthesis and Heparanase Inhibitory Activity.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
J. Biol. Chem.	289	2014	15231-15243	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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	高等植物ならびに地衣類を起源とする DNA 代謝酵素阻害剤の探索				
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
	竹仲 由希子	神戸薬科大学	薬学部	講師	成分の構造決定
	水品 善之	神戸学院大学	栄養学部食・健康学部門	准教授	活性の評価
共同研究の成果					
<p>これまでに、ベトナム産の <i>Pyrenula</i> 属の地衣の培養地衣菌より新規ポリケタイド pyrenulic acid 類を単離・構造決定し、DNA ポリメラーゼ阻害活性ならびにヒトがん細胞 HCT116 の増殖抑制活性を示すことを明らかにしてきたが、さらに再実験を行い活性について精査し、構造-活性相関について知見を得た。また rDNA の ITS 領域のシーケンス解析を行い、<i>Pyrenula</i> 属地衣菌と、pyrenulic acid 類と類似の代謝物を生産する <i>Cladobotryum</i> 属の菌類の相同性について明らかにした。それらの結果を論文として報告した。</p> <p>ベトナムとタイでそれぞれ採取した <i>Garcinia mangostana</i> の葉部と果皮のクロロホルム可溶画分について成分検索を行い、friedelin とともに計 14 種の既知キサントン誘導体を単離・同定した。そのうち 8 種のキサントン誘導体の DNA polymerase α, β および κ に対する阻害活性を評価し、構造活性相関を調べたところ、β-mangostin が従来から活性が報告されている α-mangostin より強い活性を示し、その活性は 8 種のキサントン誘導体の中で最も強かった。また、ヒト子宮がん細胞増殖抑制活性は、DNA ポリメラーゼ阻害活性と同じ傾向を示し、β-mangostin の増殖抑制活性が最強であった。このことからキサントン骨格のプレニル基とメトキシ基の数と位置が DNA ポリメラーゼ阻害活性に重要な影響を与えることが明らかとなった。</p>					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
Duy Hoang Le Yukiko Takenaka, Nobuo Hamada Yoshiyuki Mizushima Takao Tanahashi	Polyketides from the Cultured Lichen Mycobiont of a Vietnamese <i>Pyrenula</i> sp.			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
J. Nat. Prod.	77	2014	1404-1412	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
竹仲由希子、神前 祥子、 坂井 奈々、多田 彩華、 Duy Hoang Le, 棚橋 孝雄、 小野寺威文、坂本 裕香、 水品 善之、山浦 高夫	日本薬学会第 135 年会（発表予定）		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
<i>Garcinia mangostana</i> の葉部と果皮のキサントン類の DNA ポリメラーゼ阻害活性	2015年3月 25～28日	神戸	

発 表 者	学 会 名		
小野寺威文、坂本 裕香、 竹仲由希子、神前 祥子、 棚橋 孝雄、水品 善之	日本農芸化学会 2015 年度大会（発表予定）		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
マンゴスチン (<i>Garcinia mangostana</i>) から単離したキサントン類の DNA 合成酵素阻害活性と抗がん作用について	2015年3月 26～29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 北河修治様

研究代表者所属・職 薬品化学研究室・教授

研究代表者氏名 宮田 興子

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題		特異な縮環様式をもつ含窒素複素環化合物群の合成と抗癌活性評価			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	宮田 興子	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究計画の立案・総括
	上田 昌史	神戸薬科大学	薬学部	准教授	候補化合物の合成
	松野 研司	岡山大学大学院	医歯薬学総合研究科	准教授	候補化合物の抗癌活性評価
共同研究の成果					
<p>新規含窒素複素環の構築法を開発する目的で、本研究では、ラジカル環化反応の開発研究を行った。ラジカル反応は、厳密な無水条件を必要とせず、比較的穏和な条件下でも進行する環境に優しい反応である。まず、環状アミノ酸の合成研究を行った。環状アミノ酸をペプチドに組み込めばそのコンホメーションに影響を及ぼし、抗インフルエンザ活性や抗菌活性などの多彩な生物活性を示すことが知られている。さらにペプチダーゼなどの分解酵素に対する耐性を示す。そのため、環状アミノ酸の合成法の開発は重要な研究課題の一つである。そこで、抗癌活性をもつ環状アミノ酸の探索研究として、分子内に不飽和エステルとオキシムエーテルをもつ基質の分子間ラジカル付加反応と続くラジカル閉環反応を組み合わせたドミノ型反応による環状アミノ酸の合成を検討した。本基質は、2つのラジカル受容体が存在するため、官能基選択的なラジカル反応を開発しなければならない。種々反応条件を検討した結果、硫黄ラジカルおよび炭素ラジカルが、官能基選択的に不飽和エステルに付加することが明らかとなった。すなわち、ラジカル開始剤としてAIBNを用いる硫黄ラジカルの付加-閉環反応、またはラジカル開始剤としてトリエチルボランを用いる炭素ラジカルの付加-閉環反応によってそれぞれ異なる置換基をもつ環状アミノ酸の合成に成功した。さらに、本手法を用いて4級炭素をもつ環状アミノ酸や、長鎖アルキル基をもつ環状アミノ酸の合成にも成功した。</p> <p>次に、これまでに効率的な合成法および生物活性に関する研究がほとんど報告されていなかった複素環化合物として、ベンゾ[2.3-b]ピロール類の合成法の開発研究を行った。共役オキシムエーテルを基質とし、ラジカル反応条件に付すと、炭素ラジカルの位置選択的付加と[3,3]-シグマトロピー転位が進行し、ベンゾ[2.3-b]ピロール骨格が効率的に合成できることを見出した。さらに、ベンゾ[2.3-b]ピロールの不斉合成にも成功した。今後は、これら化合物群の抗癌活性を評価する予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Norihiko Takeda, Masafumi Ueda, Seiko Kajisa, Kenji Matsuno, Takeaki Naito and Okiko Miyata.	Preparation of Cyclic β -Amino Acid Derivatives with Quaternary Carbon Center via a Radical Addition-Cyclization Sequence			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Heterocycles</i>	89	2014	143-169.	

著者名	論文標題			
Masafumi Ueda, Yuta Ito, Yuki Ichii, Maiko Kakiuchi, Hiroko Shono and Okiko Miyata	Direct Synthesis of Benzofuro[2,3- <i>b</i>]pyrroles through a Radical Addition/[3,3]-Sigmatropic Rearrangement/Cyclization/Lactamization Cascade			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Chem. Eur. J.</i>	20	2014	6763-6770	

〈総説〉

著者名	論文標題			
Yuta Ito, Masafumi Ueda, and Okiko Miyata	Synthetic Routes towards Benzofuro[2,3- <i>b</i>]pyrroles and Benzofuro[2,3- <i>b</i>]indoles			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Heterocycles</i>	89	2014	2029-2052	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
上田 昌史、土井 信佳、 山本 拓、宮川 仁紀、 三好 哲也、松野 研司、 宮田 興子	第 33 回有機合成若手セミナー		
タイトル	開催日	開催場所	
トリクロロメチルシクロプロパンカルボン酸エステルの位置選択的開環反応の開発	平成25年 8月2日	神戸	

発表者	学会名		
上田 昌史、伊藤 勇太、 三好 哲也、宮田 興子	第 43 回複素環化学討論会		
タイトル	開催日	開催場所	
ドミノ型ラジカル付加-転位反応を利用したベンゾフロ [2,3- <i>b</i>]ピロールの合成	平成25年 10月17日	岐阜	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

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 向高弘

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	分子イメージング薬剤の開発研究				
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 佐治英郎	神戸薬科大学 京都大学大学院	薬学部 薬学研究科	教授 教授	研究総括 動物による評価
共同研究の成果					
<p>・ジェネレータより得られる Ga-68 を標識核種とする PET 薬剤の開発を目指し、標的組織の認識部位と金属核種結合部位とを一分子内に独立して有する二官能性キレートという分子設計概念の基に、安定な Ga-DOTA 錯体において2つの COOH 基が錯体形成に関与していないことに着目して、この COOH 基に、機能性分子を導入するという新規薬剤設計を考案した。そこで、2分子の低酸素領域認識部位 (metronidazole : MN) を導入した二官能性キレート、DOTA-MN2 を合成し、半減期が長く、取り扱いの容易な Ga-67 による標識を行った。標識反応については、マイクロ波照射により、短時間で合成に成功した。次に、マウス乳がん細胞 (FM3A) を移植したマウスに、Ga-67-DOTA-MN2、別途合成した MN を1分子有する Ga-67-DOTA-MN1、MN 骨格を持たない Ga-67-DOTA をそれぞれ投与し、経時的に各臓器の放射能を測定した。その結果、Ga-67-DOTA-MN2 と Ga-67-DOTA-MN1 は、Ga-67-DOTA と比べて腫瘍組織に有意に高く集積し、また、Ga-67-DOTA-MN2 の腫瘍/血液比は、Ga-67-DOTA-MN1 と比較して高い傾向を示したことから、MN 骨格を DOTA に2分子導入する有用性が示された。さらに、腫瘍組織における放射能分布を評価すべく、Ga-67-DOTA-MN2 のオートラジオグラフィを行い、ピモナゾールをマーカーとした免疫組織化学染色と比較したところ、両者の局在はよく一致していたことから、Ga-67-DOTA-MN2 が低酸素領域を認識していることが確認された。以上の結果は、Ga-DOTA を基本骨格とする二官能性キレートの分子設計の有用性を示すものと考えられる。</p> <p>・生体内における亜鉛イオンの動態や作用の解明を目的に、亜鉛蛍光プローブの開発が行われている。我々は蛍光団と亜鉛イオンとの錯体形成部位を同じにする分子設計により低分子量することによって溶解性や細胞膜透過性が向上することを見出し、今回、亜鉛イオンへの親和性の向上を目指し誘導体化を行った。亜鉛イオンに対する解離定数は、亜鉛イオン濃度変化時における蛍光強度から算出したところ、大きな親和性の向上が見られた。また、¹H NMR 等を用いて亜鉛イオンとの配位様式の検討を行った結果、亜鉛イオンとの配位に関与しない異性体の発生を抑えることが強く影響していることが明らかとなった。さらに RAW264 細胞において、亜鉛濃度依存的に蛍光の増強を認められた。今後、開発したプローブの応用を検討していく予定である。</p> <p>・アミロイドーシスの疾患鑑別を目的に、蛍光色素のアミロイド繊維への結合選択性の評価を行った。共通構造としてベンゾチアゾール骨格を有する4化合物を異なる濃度で、SAA 形成繊維あるいは Aβ 形成繊維と反応させ、蛍光スペクトルの変化をプロットしたところ、側鎖の構造を変えることで結合選択性に違いが見られることがわかった。今後、疾患鑑別に向けて特異性を向上すべく引き続き検討を行っていく予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Kohei Sano, Mayumi Okada, Hayato Hisada, Kenta Shimokawa, Hideo Saji, Minoru Maeda, Takahiro Mukai	<i>In vivo</i> evaluation of a radiogallium-labeled bifunctional radiopharmaceutical, Ga-DOTA-MN2, for hypoxic tumor imaging			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Biological and Pharmaceutical Bulletin	36	2013	602-608	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
萩森 政頼、水山奈央子、 向 高弘、山口 泰史、 富永 義則、佐治 英郎	第 24 回日本微量元素学会学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
生体内亜鉛イオンのイメージングを目的とした低分子量蛍光プローブの開発	2013年 6月30日	大阪	

発表者	学会名		
長谷川純子、平野 優里、 田中 将史、小野 正博、 萩森 政頼、佐治 英郎、 向 高弘	第 63 回日本薬学会近畿支部大会		
タイトル	開催日	開催場所	
チオフラビン T 誘導体のアミロイド線維選択性の評価	2013年 10月12日	京田辺	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属・職 生命分析化学研究室・教授
研究代表者氏名 小林 典裕

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26年3月31日付けをもって終了し、次の成果を得ましたので報告いたします。

記

共同研究課題	抗体一本鎖 Fv フラグメントと酵素の融合タンパク質をプローブとする 高感度迅速免疫測定法の開発				
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	小林 典裕	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究の統括
	大山 浩之	神戸薬科大学	薬学部	助教	融合タンパク質の作製
	森田 いずみ	神戸薬科大学	薬学部	助手	分析系の構築
	丹羽 俊文	東北大学大学院・医学系研究科	保健学専攻	准教授	分析系の臨床応用
共同研究の成果					
<p>免疫測定法は抗原抗体反応に基づく分析法で、臨床診断マーカーや環境汚染物質などの検出と定量に重用されている。近年、遺伝子操作の発達により、特異抗体の可変部を連結して人工の低分子抗体フラグメント（一本鎖 Fv フラグメント；scFv）に変換し、さらに酵素や蛍光タンパク質などのシグナルタンパク質を直結させることが可能になった。これらの融合タンパク質は、免疫測定法の感度や利便性を大幅に改善しうる理想的なプローブとして期待される。以上の観点から、下垂体副腎疾患マーカーのコレチゾール（CS）を測定対象として取りあげ、抗 CS 抗体 scFv と酵素の融合タンパク質を新規に調製し、高感度免疫測定法の開発における有用性を検討した。</p> <p>CS-3-O-カルボキシメチルオキシムの BSA 結合体を BALB/c マウスに繰り返し免疫投与し、血中抗 CS 抗体価の上昇を確認したのち、脾細胞をミエロマ細胞との融合に付した。樹立したハイブリドーマ細胞株 6 種のうち、クローン #10 が分泌する抗体（Ab#10; アイソタイプは $\gamma 2b, \kappa$）は競合 ELISA で高い感度を示し、^3H 標識 CS を用いる Scatchard プロットにより K_a を算出したところ、$4.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ であった。そこで、#10 ハイブリドーマ細胞から総 RNA を抽出し、5' RACE 法により可変部 (V_H および V_L ドメイン) 遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。これら V_H および V_L 遺伝子を overlap extension PCR で連結して scFv 遺伝子 (scFv#10) を構築し、これを先に当研究室で調製した ALP 遺伝子と連結し、scFv-ALP 遺伝子を構築した。この融合遺伝子を大腸菌内で発現させて得られる scFv-ALP タンパク質を用いて競合 ELISA を行った。すなわち、CS-BSA 結合体を固定化したマイクロプレートに scFv-ALP および遊離 CS (0.1-100 pg) を加えて 37°C で一定時間インキュベートした。未反応の抗体を洗浄して除去したのち、固相に残存する ALP 活性を 4-メチルウンベリフェリルリン酸を基質とする蛍光光度法により測定した。その結果、検量線の 50% 阻害値 (midpoint) は 6 pg/assay であり、従来の CS の免疫測定法と比べて極めて高感度であった。今後、さらに高感度で簡便な ELISA 系を目指して、scFv-蛍光タンパク質融合体の調製も試みる予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Oyama H., Tanaka E., Kawanaka T., Morita I., Niwa T., Kobayashi N.	Anti-Idiotypic scFv-Enzyme Fusion Proteins: A Clonable Analyte-Mimicking Probe for Standardized Immunoassays Targeting Small Biomarkers			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Anal. Chem.</i>	85(23)	2013	11553-11559	

著者名	論文標題			
Oyama H., Yamaguchi S., Nakata S., Niwa T., Kobayashi N.	"Breeding" Diagnostic Antibodies for Higher Assay Performance: A 250-fold Affinity-matured Antibody Mutant Targeting a Small Biomarker			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
<i>Anal. Chem.</i>	85(10)	2013	4930-4937	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
大山 浩之、中田 茂利、 丹羽 俊文、小林 典裕	日本薬学会第 133 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (5). 改良型 scFv を用いるヒト血清中エストラジオールの測定	2013年3月28日	横浜	

発表者	学会名		
森田いずみ、大山 浩之、 渡部 芳郎、平井 杏奈、 太田 光熙、小林 典裕	日本薬学会第 133 年会		
タイトル	開催日	開催場所	
実用診断試薬を創出する試験管内分子進化 (6). 改良型 scFv を用いるヒト尿中コチニン ELISA の確立	2013年3月28日	横浜	

発表者	学会名		
大山 浩之、森田いずみ、 太田 光熙、小林 典裕	生物化学的測定研究会 第 18 回学術集会・総会		
タイトル	開催日	開催場所	
試験管内親和性成熟 scFv を用いるヒト尿中コチニンの ELISA	2013年6月7日	京都	

発表者	学会名		
大山 浩之、森田いずみ、 太田 光熙、小林 典裕	第 53 回日本臨床化学会年次学術集会		
タイトル	開催日	開催場所	
高親和力 scFv 融合タンパク質を用いるコルチゾールの高感度 ELISA	2013年8月30日	徳島	

発 表 者	学 会 名		
Kobayashi N., Oyama H., Morita I., Niwa T.	Fifth Annual PEGS Europe : Protein & Antibody Engineering Summit		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Anti-Idiotypic scFv-Enzyme Fusion Proteins Work as a Clonable Analyte-Mimicking Probe That Enables Standardization of Hapten Immunoassays		2013年11月5日	Lisbon

発 表 者	学 会 名		
Oyama H., Niwa T., Kobayashi N.	Fifth Annual PEGS Europe : Protein & Antibody Engineering Summit		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
"Breeding" Diagnostic Antibodies: A 250-Fold Affinity-Matured scFv Mutant for Measuring Human Serum Estradiol-17 β		2013年11月5日	Lisbon

発 表 者	学 会 名		
Morita I., Oyama H., Banzono E., Ohta M., Kobayashi N.	Fifth Annual PEGS Europe : Protein & Antibody Engineering Summit		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
"Breeding" Diagnostic Antibodies: An Affinity-Matured scFv for Urinary Cotinine ELISA to Monitor Tobacco Smoke Exposure		2013年11月5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 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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		リン酸化生成物の単離法の開発			
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
	中山 尋量	神戸薬科大学	薬学部	教授	総括
	成相 裕之	神戸大学	工学研究科	教授	リン酸化剤の調製
	前田 秀子	神戸薬科大学	薬学部	講師	リン酸化反応および単離
共同研究の成果					
<p>まず最初に NH₂ 基を有する有機化合物の γ-アミノ酪酸、β-アラニン、タウリンについて、シクロ三リン酸塩 (P_{3m}) によるリン酸化反応を行った。リン酸化生成物の収率を HPLC により調べた結果、いずれの化合物についても、P_{3m} によって容易にリン酸化されることがわかった。最適反応条件は、P_{3m} に対して反応物の濃度を過剰に加え、pH は 12、温度は 25°C が良いことがわかった。リン酸化生成物の構造は、³¹P, ¹H, ¹H-³¹P 2D HMBC NMR の結果より、NH₂ 基に三リン酸が結合した構造であることがわかった。次に得られた生成物の単離精製について検討した。例として γ-アミノ酪酸の生成物の単離について示す。最適反応条件で反応を行った溶液に 2-プロパノールを加え、未反応の P_{3m} および γ-アミノ酪酸と生成物とを分離することが出来た。有機溶媒については、エタノール、アセトン、2-プロパノールについて検討した結果、2-プロパノールが最も生成物の分離がうまくいくことがわかった。三リン酸塩誘導体である生成物は、2-プロパノール存在下では安定である（純度 90%以上）が、2-プロパノールを飛ばして固体にすると生成物が純度 50%まで分解することがわかった。我々は生成物が三リン酸塩誘導体であるため、分解しやすいと考えた。そこで、生成物が一リン酸塩誘導体である化合物を探し、リラクゼーション作用を持つ機能性アミノ酸である L-テアニンの P_{3m} によるリン酸化生成物が一リン酸塩誘導体であることを見つけた。L-テアニンの生成物について γ-アミノ酪酸と同様な方法で単離を行い、純度 80%で生成物を単離出来た。この方法は、N-P 結合を有する一リン酸塩誘導体の単離に応用が可能である。</p> <p>次に OH 基を有する有機化合物のイノシン、リバビリン、ビダラビンについてジホスホン酸塩 (DP) によるリン酸化反応を行い、その反応の最適条件を探った。リン酸化生成物の構造に関しては、各種 NMR および ESI-MS より明らかにした。例としてイノシンの DP によるリン酸化反応および生成物の単離について述べる。イノシンの DP によるリン酸化反応は、イノシンのリボースの 2' 位または 3' 位で起こった。リン酸化の最適反応条件は、DP 過剰、pH 11、10°C で、その時の収率は 98%であった。そこで、得られた生成物の単離精製について検討した。まず、Wakosil®40C18 を充填した逆相カラムクロマトグラフィーにより、生成物と未反応のイノシンとを分離した。生成物は 2 種類あるが、逆相カラムクロマトグラフィーだけでは、それぞれを単離することはできなかった。そこで、生成物を多く含む画分を HPLC で分取した。2 種類の生成物は、HPLC での保持時間に違いを示したため、1 種類の生成物のみを単離することに成功した。これまで、数種類の生成物の混合物としての単離しか出来なかったが、この方法により、一つの生成物のみを取り出すことが可能となった。この単離法については、イノシン以外の核酸関連化合物にも応用が可能である。</p>					

〈研究論文〉

著 者 名	論 文 標 題			
H. Maeda, Y. Atarashi, C. Nakayama, H. Nishida, H. Nariai, and H. Nakayama	"Phosphonylation of Inosine with Sodium Diphosphonate in Aqueous Solution"			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Phosphorus Res. Bull.	29	2014	1-5	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
前田 秀子、新 千奈、 中山千加子、西田 裕美、 津波古充朝、成相 裕之、 中山 尋量	第23回無機リン化学討論会		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
ジホスホン酸塩によるイノシンのホスホニル化反応および生成物単離法の検討	9月20日	高知	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属・職 生薬化学研究室・講師
研究代表者氏名 士反伸和

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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		中成薬およびその構成生薬の生物活性に関する研究			
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
	守安正恭	神戸薬科大学	薬学部	教授	統括
	西山由美	神戸薬科大学	薬学部	講師	活性試験 (in vivo, in vitro)
	士反伸和	神戸薬科大学	薬学部	講師	活性試験 (in vitro)
	中谷典義	株式会社カーヤ	薬事管理部		生薬製剤の分析
渡邊恵美子	株式会社カーヤ	薬事管理部		生薬製剤の分析	
共同研究の成果					
<p>「清宮寿桃丸」は、中国・清の時代に不老長寿、補腎強精、滋養強壯を目的に用いられた「蟠桃丸」を基に開発された製剤である。本製剤については、老化による代謝機能や内循環の失調を改変し、老化の諸症状を緩和調整する作用があるとされている。本研究では、「清宮寿桃丸」の効能に関連して数種の試験を行っており、まず老化と関連の深い抗酸化活性について検討した結果、本製剤が抗酸化活性を有すること、また、その抗酸化活性を担う生薬として、ホコツシ、コトウイ、ヤクチなどを確認した。</p> <p>一方、慢性化した炎症による刺激が、内循環を悪化させ各種臓器障害や炎症性疾患を増悪させることがわかっている。そこで、本製剤が炎症に対してどのような影響を与えるかを検討するために、RAW 264.7 細胞を用いて NO および TNF-α の産生抑制試験を行った。その結果、本製剤に NO 産生抑制活性が認められたが、試料の細胞に対する影響から、TNF-α に関しては評価することが困難であった。しかし、TNF-α に関しては、マウスを用いた実験で、本製剤の4日間連続投与は、LPS 起炎による血中 TNF-α の上昇を抑制することがわかった。そこで、今回は RAW 264.7 細胞を用いて iNOS、TNF-α および IL-6 の mRNA 発現に対する影響をリアルタイム PCR 法により検討した。</p> <p>その結果、本製剤は iNOS の mRNA 発現に対して、濃度依存的に強い抑制効果を示した。TNF-α の mRNA 発現に対しては、濃度依存的ではないが、抑制効果が認められ、IL-6 の mRNA 発現には、濃度依存的な抑制効果が認められた。以上の結果より、清宮寿桃丸は LPS 刺激による iNOS の mRNA 発現を抑制する事により、NO の産生を抑制する事がわかった。また炎症性サイトカインである TNF-α および IL-6 の mRNA の発現を抑制することにより、炎症を抑えることが示唆された。このことより、清宮寿桃丸は免疫反応を介した抗炎症作用を有すると考えられ、慢性的な炎症による老化の促進や成人病発症の予防に寄与している可能性が考えられる。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Yumi Nishiyama, Miyuki Mori, Nobukazu Shitan, Masataka Moriyasu, Noriyoshi Nakatani, Emiko Watanabe, Taisuke Sasaki	Anti-inflammatory activity of Shingujuto-gan on LPS-induced RAW 264.7 cells.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Journal of Ethnopharmacology (投稿準備中)				

〈学会発表〉

発表者	学会名		
森 美幸、宇都宮愛子、福田 裕未、須々木沙織、西山 由美、土反 伸和、守安 正恭、中谷 典義、渡邊恵美子、佐々木泰介	日本薬学会第 135 回年会		
タイトル	開催日	開催場所	
RAW 細胞を用いた清宮寿桃丸の炎症メディエーター発現に対する影響	2015年3月 25～28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 北河修治 様

研究代表者所属・職 病態生化学研究室・教授
研究代表者氏名 加藤 郁夫

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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		新規摂食調節ペプチド adropin の食行動および情動に関する研究			
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	神戸薬科大学での研究管理および研究主体
	乾 明夫	鹿児島大学	大学院歯学総合研究科	教授	鹿児島大学での研究管理
	浅川 明弘	鹿児島大学	大学院歯学総合研究科	准教授	鹿児島大学での研究主体
	多河 典子	神戸薬科大学	薬学部	講師	神戸薬科大学での研究
藤波 綾	神戸薬科大学	薬学部	講師	神戸薬科大学での研究	
共同研究の成果					
<p>本研究は新規摂食調節ペプチドである adropin の食行動や情動に関する研究の一環として、げっ歯類を用いた adropin の中枢における作用解析、および adropin 発現の変動と摂食障害や代謝異常などの病態との関連を検討することを目的とする。本年度は、以下の項目について検討を行った。</p> <p>1. 高純度 adropin 標準品および免疫抗原と標識抗原の作製： 本研究に必須であるマウスおよびヒトの高純度 adropin 標準品を化学合成して得た。また、本研究の手段として根幹をなす ELISA 系の確立に必要であるマウスおよびヒトの高純度免疫抗原と標識抗原を作製した。マウスおよびヒト adropin は、ジスルフィド結合を有する 43 アミノ酸残基から成る長鎖のポリペプチドであるが、合成した標準品、免疫抗原およびビオチン化標識抗原のいずれについても、逆相 HPLC による分析、アミノ酸分析および、MALDI-TOF MS による質量分析を行い、高純度かつ目的物であることを同定・確認し、効率的合成法として確立できた。</p> <p>2. 抗 adropin 特異抗血清の作製： 上記1で得た合成 adropin を免疫抗原として家兎に免疫して抗 adropin 抗体を作製した。得られた抗血清は、高い抗体価を有することを確認した。本抗血清を用い、ウエスタンブロット法により C57BL/6J マウス肝臓組織での adropin 発現を検討したところ、14～16 kDa 付近にマウス adropin と認められるバンドを確認した。さらに、本抗体による ELISA 系の確立を検討中である。</p> <p>3. げっ歯類での adropin の発現動態： Adropin は、遺伝子 <i>Enho</i> にコードされている。本研究では、視床下部および末梢脂肪組織での <i>Enho</i> 発現を以下の2項目について検討した。</p> <p>1) 摂食・絶食状態での比較： 正常マウスでは、絶食により、視床下部および脂肪組織の <i>Enho</i> mRNA の発現が自由摂食群に比べ低下した。従って、Adropin は、摂食抑制作用に関わっていると考えられた。</p> <p>2) 肥満・糖尿病発症機序の異なる3種類のモデルマウスでの比較： レプチン欠損(1因子変異)による肥満モデルである <i>ob/ob</i> マウスの視床下部の <i>Enho</i> mRNA 発現は、コントロール群より低下が認められたが ($P < 0.05$)、多因子変異による自然発症糖尿病・肥満モデルである TSOD マウスおよび高脂肪食誘導肥満 (DIO) マウスでは、コントロール群と差は認められなかった。また、腸間膜脂肪組織の <i>Enho</i> mRNA 発現は、<i>ob/ob</i> マウスでは、コントロール群との差は認められなかったが、TSOD マウスおよび DIO マウスでは有意な上昇が認められた。これらの結果より、<i>Enho</i> mRNA の発現にはレプチンの発現が関与していることが示唆された。またレプチンを発現している TSOD マウスおよび DIO マウスでは、過食や高脂肪食によって過栄養状態となった消化液が小腸から吸収され、腸間膜脂肪組織は、その血液にさらされるため、<i>Enho</i> mRNA 発現が増加して adropin 発現を増加させ、肥満や高血糖状態を回避しようとする防衛的な作用が働くことが考えられた。</p> <p>以上の結果より、視床下部および末梢脂肪組織で adropin は、摂食抑制作用および抗肥満作用を発揮することが示唆された。本研究成果は、肥満・糖尿病治療薬開発への一つの道を拓くものと考えられる。今後、エネルギー代謝、肥満・糖尿病に関わる臓器について <i>Enho</i> および adropin 発現を網羅的に検討する予定である。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
多河 典子、浅川 明弘、藤波 綾、乾 明夫、加藤 郁夫	第 25 回 日本臨床化学会近畿支部総会		
タイトル	開催日	開催場所	
エネルギー代謝ペプチド adropin のマウス視床下部及び脂肪組織での発現について	平成27年2月 14日(土)	大阪大学コンベンションセンター	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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	ビタミン K 合成酵素 UBIAD1 の構造機能解析				
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
	岡野 登志夫	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究の統括
	須原 義智	芝浦工業大学	システム理工学部	教授	リガンド合成
	中川 公恵	神戸薬科大学	薬学部	准教授	分子生物学的解析
共同研究の成果					
<p>我々が食事から摂取するビタミン K は主に植物由来のフィロキノン (PK) と発酵食品由来のメナキノン類 (MK-n) であるが、生体内にはメナキノン 4 (MK-4) が高濃度に存在する。申請者は、これまでに生体内で PK や MK-n から MK-4 が変換生成すること、この変換反応を担う鍵酵素が Ubia prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1) であることを明らかにしている。本研究では、UBIAD1 の機能解析および本酵素の基質となるビタミン K の新規誘導体を開発を行った。岡野・中川は、UBIAD1 の生体における役割を明らかにするため、全身性に UBIAD1 遺伝子を欠損したマウス (UBIAD1-KO マウス) の作出を行った。その結果、ヘテロ欠損マウスは正常に出生したが、UBIAD1-KO マウスは出生せず、胎生早期 (7.5 日齢) で致死となることがわかった。そこで、胎生期の致死が MK-4 を供給することで改善されるかを調べるため、交配時から妊娠・出産までの期間 MK-4 の補給を行った。その結果、MK-4 を与えることにより、胎仔の生存期間が延長されることがわかった。しかし、MK-4 の供給により延命される割合は非常に低かったことから、UBIAD1 には MK-4 の合成だけでなく、個体発生過程において別の重要な機能を有する可能性があると推察された。また、最近ゼブラフィシュの UBIAD1 が CoenzymeQ10 (CoQ10) の合成活性を持つことが報告されたことから、CoQ10 の補給による効果についても検討を行った結果、MK-4 と同様の効果があることがわかった。しかし、UBIAD1-KO マウス由来 ES 細胞を用いて、CoQ9 (マウスの場合は CoQ10 ではなく CoQ9 が主生成物) 合成能を調べた結果では、CoQ9 の合成能の低下は認められなかった。このことから、マウスにおいては、UBIAD1 は CoQ9 の合成に対する寄与は少ないと考えられた。また、須原が合成した重水素標識ビタミン K 化合物を用い、PK が MK-4 へ変換する機構について、側鎖切断における責任組織および側鎖切断体の同定を行った。その結果、腸管内で PK の側鎖が切断されてメナジオン (MD) となり、リンパ管を介して吸収され、各組織で MK-4 に変換されていることを明らかとなった。須原は、重水素標識ビタミン K 化合物を合成するとともに、MK-4 が有する神経細胞分化誘導活性と同等の活性を持つ新規ビタミン K リガンドとして、ヘテロ原子を導入した新規ビタミン K 誘導体を合成することに成功した。以上より、UBIAD1 が個体発生において必須の因子であることが明らかとなり、ビタミン K の体内動態についても解明することができた。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, Takeuchi A, Sawada N, Kamao M, Wada A, Okitsu T, Okano T.	Menadione (vitamin K ₃) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K ₁) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K ₂) in rats.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
J. Biol. Chem.	288(46)	2013	33071-33080	

著者名	論文標題			
Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y, Uchino Y, Suhara Y, Hasegawa T, Amizuka N, Okamoto T, Tsugawa N, Kamao M, Funahashi N, Okano T.	Vitamin K ₂ biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice.			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
PLoS One	9(8)	2014	e104078	

〈著者〉

著者名	著書名		
岡野登志夫 編 (著者：岡野登志夫、中川公恵、須原 義智 他)	ビタミン K と疾患		
出版社	発行年	ページ	
医薬ジャーナル社	2014	1-287	

〈学会発表〉

発表者	学会名		
川人 夕依、中川 公恵、洲崎 里枝、大江 和樹、中西 彩子、須原 義智、岡野登志夫	日本ビタミン学会第 66 回大会		
タイトル	開催日	開催場所	
ゼブラフィッシュにおけるビタミン K ₂ (メナキノン-4) 合成能の解析	2014年6月13日	姫路	

発表者	学会名		
岡野登志夫、廣田 佳久、津川 尚子、中川 公恵、鎌尾 まや、内野 由理、須原 義智、沖津 貴志、和田 昭盛	日本ビタミン学会第 66 回大会		
タイトル	開催日	開催場所	
ビタミン K 側鎖切断組織の同定と側鎖切断体の探索	2014年6月13日	姫路	

発 表 者	学 会 名		
坂根 里枝、大西 創、 須原 義智	日本ビタミン学会第 66 回大会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
側鎖末端にヘテロ原子を導入したビタミン K 誘導体の合成と生物活性評価		2014年6月13日	姫路

発 表 者	学 会 名		
Nakagawa K, Hirota Y, Tsugawa N, Uchino Y, Suhara Y, Okano T	ASBMR 2014 Annual Meeting-American Society of Bone and Mineral Research		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
Menaquinone-4 (Vitamin K ₂) in Bone Originates from Menadione (Vitamin K ₃) Released from Oral Phylloquinone (Vitamin K ₁) During Intestinal Absorption		2014年9月14日	Houston, Texas, USA

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

研究代表者所属・職 微生物化学研究室・准教授
研究代表者氏名 小西 守周

平成25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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		生体における分泌因子の役割の解明			
構 成 員	氏名	所属学校・研究機関等名	学部・学科等名	職名	研究の役割分担
	小西守周 三宅歩	神戸薬科大学 京都大学	薬学部 薬学研究科	准教授 講師	培養細胞による解析 遺伝子改変動物を用いた解析
共同研究の成果					
<p>多細胞生物においては、個々の細胞同士が相互に情報を交換し、協調的に働くことが必要となる。この情報交換の際に用いられるツールが細胞外分泌因子である。本研究では、我々が新たに同定した細胞外分泌因子の生理的な役割を明らかにすることを目的とし、特に免疫機構を中心に共同研究を行った。</p> <p>①ニューデシンの生理的な役割の解明 ニューデシンは、生体の様々な臓器において発現する細胞外分泌因子である。昨年度までに得られた組換えタンパクの薬理作用の知見より、このニューデシンが免疫細胞の機能や分化に関わることを期待された。そこで、本共同研究では、ニューデシンノックアウトマウスの免疫担当組織の解析を試みた。当初は、制御性 T 細胞の分化成熟にニューデシンが関わる可能性を期待していたが、ニューデシンノックアウトマウスの脾臓、胸腺ともに制御性 T 細胞の割合に野生型のものと同じ大きな差は認められなかった。一方、胸腺において、CD4 陽性 T 細胞の割合が増加し、一方で CD8 陽性 T 細胞の割合が減少することを明らかにした。CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞は同じ細胞(CD4 陽性 CD8 陽性細胞)から分化することが知られている。したがって、ニューデシンは CD4 陽性細胞と CD8 陽性 T 細胞の分化の方向を決定することに関わる可能性が示唆された。今後は、この再現性を確認しつつ、T 細胞分化のメカニズムにおけるニューデシンの役割について、さらに検討を進める必要があると考えられる。またニューデシンがエネルギー代謝を抑制することも共同研究の過程において明らかにした。本知見に関しては、現在論文にまとめて、投稿中である。</p> <p>② FGF21 の生理的な役割の解明 ニューデシンと同じ細胞外分泌因子 FGF21 についても、胸腺において発現し、FGF21 ノックアウトマウスでは CD8 陽性細胞の有意な減少が認められる。そこで、胸腺における FGF21 の発現細胞、さらには FGF21 の作用する細胞について検討を試みた。FGF21 は胸腺内でも、T 細胞系列ではなく胸腺上皮細胞において発現することが明らかとなった。胸腺上皮細胞は、胸腺内で起こる T 細胞の分化成熟をサポートする役割を持つ重要な細胞である。さらに、FGF21 は T 細胞に直接作用して T 細胞の分化を制御するのではなく、髄質などに存在する胸腺上皮細胞に作用することにより、間接的に T 細胞の分化を制御している可能性を明らかにした。今後は T 細胞機能が関わる疾患などにおける FGF21 の意義を検討する必要があると思われる。さらに FGF21 に関しては、個体のエネルギー状態が変化する環境において、様々な役割を担っていることを明らかにしている。特に本年においては、ケトン食飼育時や、脂質を経口負荷した直後の糖質脂質代謝の変化に FGF21 が大きく影響していることを見いだした。近年、代謝調節にも免疫機構の一つである炎症が関わるということが明らかになりつつあるため、今後は、代謝と免疫をつなぐ因子としての FGF21 の可能性についても検討を行うことを計画している。</p>					

〈総 説〉

著 者 名	論 文 標 題			
Ikuo Kimura, Yoshiaki Nakayama, Ying Zhao, Morichika Konishi, Nobuyuki Itoh	Neurotrophic effects of neudesin in the central nervous system			
雑 誌 名	卷	発行年	ページ	
Frontiers in Neuroscience	7	2013	111,1-5	

〈学会発表〉

発 表 者	学 会 名		
小西 守周、西尾 恭史、持山 喬之、三宅 歩、増田 有紀、伊藤 信行	日本薬学会第 134 年会		
タ イ ト ル	開催日	開催場所	
高脂肪低炭水化物食負荷時における Fgf21 の生理的意義	2014年3月28日	熊本市 総合体育館	

神戸薬科大学共同研究成果報告書

神戸薬科大学

学長 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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	生活習慣病，加齢性疾患の早期発見と予防のためのコホート研究				
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
	水野 成人	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究・解析の統括
	渡邊 能行	京都府立医科大学	地域保健医療疫学	教授	研究・検診の統括
	栗山 長門	京都府立医科大学	地域保健医療疫学	准教授	研究・検診の担当
	尾崎 悦子	京都府立医科大学	地域保健医療疫学	助教	研究・検診の担当
共同研究の成果					
<p>J-MICC スタディは、協力者（参加者）の健康状況を長期に追跡し、生活習慣、遺伝子型、血液成分と疾患の関係を検討する全国規模の多施設共同コホート研究である。神戸薬科大学と京都府立医科大学の共同研究では、京都府下の J-MICC スタディ協力者を対象として、栄養摂取状態、運動習慣、血液成分、ヘリコバクター・ピロリ感染による慢性的な胃機能低下などが骨粗鬆症、がんをはじめとする生活習慣病や加齢性疾患に与える影響に着目し、検討を進めている。</p> <p>平成25年度も、各種背景因子と代表的な加齢性疾患である骨粗鬆症の関連について解析した。</p> <p>共同研究者の尾崎は、J-MICC スタディ京都フィールドに参加した日本人閉経女性903名（平均年齢60.5 ± 5.8歳）を対象に、肥満度と骨質の関連性について検討した。身長、体重、腹囲の計測、超音波骨密度計による（透過波減衰、皮質骨厚、海綿骨骨密度、海綿骨弾性定数、座屈比、断面係数）測定、生活習慣、推定栄養素摂取量の算出を行い、BMI値を基にやせ群（18.5kg/m²未満）、標準群（18.5kg/m²以上25kg/m²未満）、肥満群（25kg/m²）に分けて比較した。その結果、肥満群は他の群と比べて透過波減衰、海綿骨骨密度、座屈比が有意に高く、皮質骨厚、断面係数は有意に低く、肥満は骨質を劣化し骨全体の強度を低下させることを示した。やせ群は海綿骨弾性定数が他の群より有意に低く、骨粗鬆症の危険性が高いことが判明した。また、肥満群は標準群と比べて脂肪摂取量が有意に多く、ビタミンB1やカルシウムの摂取量が他の群より少なかった。以上より、肥満、やせは骨質に悪い影響を与え、骨脆弱性に関与すると考えられた。</p> <p>水野は、血清抗ヘリコバクター・ピロリ抗体価とペプシノゲン値から見た胃粘膜の状態が超音波骨密度測定装置から見た骨質劣化に影響があるかについて検討した。対象は J-MICC スタディに参加した50代および60代の男性230名である。血清抗ヘリコバクター・ピロリ抗体陽性者は陰性者に比較して海綿骨骨密度が低値となるリスクが高く、血清ペプシノゲン値から見た胃粘膜萎縮陽性者は陰性者に比較して海綿骨骨密度が低値となるリスクが高かった。血清抗ヘリコバクター・ピロリ抗体陽性かつ血清ペプシノゲン値から見た胃粘膜萎縮陽性者は両方が陰性である者に比較して、海綿骨骨密度および海綿骨弾性定数が低値となるリスクが高かった。</p> <p>これらの結果から、体重の異常（肥満およびやせ）とヘリコバクター・ピロリ感染に伴う胃粘膜の変化は、骨質劣化の危険因子となり、早期の介入が必要であることが示された。</p> <p>今後も、経時的なデータを集積するとともに収集したデータの解析を進め、検討結果の公表を行っていく予定である。</p>					

〈研究論文〉

著者名	論文標題			
尾崎 悦子、栗山 長門、 松井 大輔、渡 邊功、 稲葉 雅章、今西 康雄、 水野 成人、宮谷史太郎、 山本 俊郎、金村 成智、 堀井 基行、渡邊 能行	日本人閉経女性における肥満と骨質に関する検討			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Osteoporosis Japan	22	2014	465-468	

著者名	論文標題			
Shigeto Mizuno, Daisuke Matsui, Isao Watanabe, Etsuko Ozaki, Nagato Kuriyama, Yoshiyuki Watanabe	Serologically determined gastric mucosal condition is a predictive factor for osteoporosis in Japanese men			
雑誌名	巻	発行年	ページ	
Digestive Diseases and Sciences		2015		

〈学会発表〉

発表者	学会名		
尾崎 悦子、栗山 長門、 松井 大輔、渡邊 功、 稲葉 雅章、今西 康雄、 水野 成人、宮谷史太郎、 米田勇太郎、渡邊 能行	第15回 日本骨粗鬆症学会		
タイトル	開催日	開催場所	
日本人閉経女性における肥満と骨質に関する検討	2013年10月 11~13日	大阪	

発表者	学会名		
栗山 長門、堀井 基行、 稲葉 雅章、三島 譽史、 水野 成人、黒川 正夫、 岩佐 弘一、山本 俊郎、 米田勇太郎、渡邊 能行	第15回 日本骨粗鬆症学会		
タイトル	開催日	開催場所	
慢性的な睡眠不足における骨量低下リスクに関する検討	2013年10月 11~13日	大阪	

発 表 者	学 会 名		
尾崎 悦子、栗山 長門、 松井 大輔、渡邊 功、 稲葉 雅章、三島 誉史、 水野 成人、弘田 真央、 米田勇太郎、渡邊 能行	第 16 回 日本骨粗鬆症学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
60代女性における橈骨皮質骨厚および橈骨海綿骨骨密度の脆弱要因の検討		2014年10月 23～25日	東京

発 表 者	学 会 名		
松井 大輔、米田勇太郎、 真野 功、渡邊 功、 栗山 長門、尾崎 悦子、 水野 成人、大谷 隆彦、 渡邊 能行	第 16 回 日本骨粗鬆症学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
男性剣道有段者における橈骨骨密度の検討		2014年10月 23～25日	東京

発 表 者	学 会 名		
栗山 長門、尾崎 悦子、 稲葉 雅章、堀井 基行、 水野 成人、黒川 正夫、 岩佐 弘一、松井 大輔、 米田勇太郎、渡邊 能行	第 16 回 日本骨粗鬆症学会		
タ イ ト ル		開催日	開催場所
短時間睡眠者における骨量低下リスクおよび自律神経活動に関する横断的検討		2014年10月 23～25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 北河修治様

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25年7月19日付けで承認を受けた下記の共同研究は、平成26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	Cocrystal 形成による医薬品の物性および安定性の改善				
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
	北河修治	神戸薬科大学	薬学部	教授	研究企画・統括
	寺岡麗子	神戸薬科大学	薬学部	准教授	測定、データ解析
	湯谷玲子	神戸薬科大学	薬学部	助手	測定、データ解析
	都出千里	神戸薬科大学	薬学部	講師	測定、データ解析
	上田晴久	星薬科大学	薬学部	教授	研究企画、データ解析
	長瀬弘昌	星薬科大学	薬学部	准教授	測定、データ解析
古石誉之	星薬科大学	薬学部	助教	測定、データ解析	
共同研究の成果					
<p>【目的】原薬の物理化学的特性が cocrystal 化によって改善されるとの報告がいくつか見られるが、cocrystal の光安定性評価については十分に検討されているとは言えない。そこで、Cocrystal の医薬品としての有用性を明らかにするために、光に不安定なフロセミド (FS) とインドメタシン (Ind) などについて cocrystal を調製し、その光安定性を原薬と比較した。</p> <p>【方法】① Cocrystal の調製 フロセミドについては文献記載の尿素 (UREA)、ニコチンアミド (NCT) との cocrystal を、インドメタシンについてはサッカリン (Sac) とニコチン酸 (新規、NIC) の cocrystal を調製した。cocrystal の生成は粉末 X 線回折測定と示差走査熱量測定で行った。</p> <p>②調製した結晶の光および熱安定性 調製した試料の光安定性については、錠剤に成形し、D65 ランプ下で光安定性試験を行い、経時的に表面色を測色し、着色あるいは退色過程を追跡した。また、cocrystal の UV スペクトルと光源の分光放射エネルギー分布の比較から、光安定性を予測した。更に、測定可能な Cocrystal については結晶構造解析や固体 NMR 測定を行い、結晶構造や分子運動性と Cocrystal の安定性との関連を検討した。</p> <p>【結果】FS-NCT cocrystal は、これらの物理的混合物よりも有意に光安定性が改善した。FS-NCT cocrystal においては、光安定性は改善されなかった。これら2種類の cocrystal の固体 UV-Vis スペクトルは、FS-UREA cocrystal の場合、FS とほぼ同じ極大波長を示したが、FS-NCT cocrystal の場合、吸収波長範囲が低波長側にシフトした。一方、インドメタシンについては Sac との cocrystal においてインドメタシン α 形、γ 形、物理的混合物より光照射による着色が顕著に抑制され、NIC との cocrystal ではこれらの物理的混合物と同じであった。これらの cocrystal の固体状態での吸収極大波長は違いが認められなかったが、吸収係数は Ind-Sac より Ind-NIC で著しく高い値を示した。</p> <p>【考察】Cocrystal 化により原薬の UV-Vis 吸収スペクトルが変化することが明らかになった。光安定性試験に用いられている D65 ランプの分光放射エネルギー分布は、紫外部領域の放射割合が小さく、可視部領域の放射割合が大きいことから、cocrystal の UV-Vis 吸収スペクトルが紫外部領域側にシフトすると、光安定性が改善されると考えられる。</p>					

〈学会発表〉

発表者	学会名		
大西 裕哉、寺岡 麗子、 湯谷 玲子、北河 修治	日本薬剤学会第 28 年会		
タイトル		開催日	開催場所
Cocrystal 形成による Furosemide の光安定性改善		2013年5月23日	幕張メッセ

発表者	学会名		
大西 弘道、古石 誉之、 長瀬 弘昌、上田 晴久、 都出 千里、湯谷 玲子、 寺岡 麗子、北河 修治	日本薬学会第 134 年会		
タイトル		開催日	開催場所
Cocrystal 形成によるインドメタシンの光安定化		2014年3月30日	熊本

発表者	学会名		
寺岡 麗子、大西 弘道、 湯谷 玲子、都出 千里、 古石 誉之、長瀬 弘昌、 上田 晴久、北河 修治	日本薬剤学会第 29 年会		
タイトル		開催日	開催場所
2 種類の Coformer を用いたインドメタシン Cocrystal の光安定性比較		2014年5月20日	大宮