

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 川崎ナナ

分担研究者

(1) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部	早川堯夫
(2) キリンビール(株)医薬開発研究所	井上 登
(3) 中外製薬(株)生物技術研究所	吉澤 博
(4) 持田製薬(株)製剤研究室	猶塚正明
(5) 日本ケミカルリサーチ(株)開発研究所	藤田 貢
(6) エーザイ(株)分析研究所	四方 靖
(7) (財)化学及血清療法研究所試作研究部	菅原敬信
(8) 山之内製薬(株)創薬研究本部	森啓太郎
(9) 住友製薬(株)製剤技術研究所	濱詰康樹
(10) 大阪大学大学院理学研究科	長谷純宏
(11) 近畿大学薬学部	掛樋一晃
(12) 京都大学大学院生命科学研究科	永尾雅哉
(13) 長岡技術科学大学工学部	城所俊一
(14) 静岡県立大学薬学部	藤井 敏

要 旨

バイオテクノロジー応用医薬品の構造決定法として、還元・BMPA化とプロテアーゼ固定化カートリッジを用いたペプチドマッピング、MALDI-TOFMSを用いたジスルフィド結合同定法、及びLC/MSを用いた糖分析法を開発した。また、物理的・化学的性質解析法として、表面プラズモン共鳴による糖鎖不均一性解析法、熱測定によるタンパク質・リガンド複合体立体構造及び相互作用解析法、並びに日本脳炎ウイルス同等性評価法を開発した。さらに、多機能性タンパク質エリスロポエチン、及びプロテインCインヒビター改変体の生物学的性質を評価した。

1. 研究目的

バイオテクノロジーの進展は目覚ましく、遺伝子組換え医薬品や細胞培養医薬品に引き続き、細胞治療用医薬品、トランスジェニック/クローン動物応用医薬品など、新しい技術に基づく医薬品が開発され、次々と実用化されようとしている。さらに今後、ゲノム・プロテオーム解析が進めば、これらの技術によって、続々と新たなタンパク質が医薬品候補として開発されてくるものと予想される。こうして産み出されてくる医薬品候補タンパク質を、優良な医薬品であるかどうかを素早く的確に評価して医療の場へ送り出し、品質の高い製品を供給し続けるためには、現代の科学技術・分析技術を駆使した、迅速、合理的かつ適切なバイオテクノロジー応用医薬品の構造、特性、品質、有効性、安全性評価技術の開発が不可欠である。

本研究の目的は、最先端の高度な分析技術を積極的に取り入れ、次々と開発されるバイオテクノロジー応用医薬品に素早く的確に対応するための評価技術を開発することである。本年度は、バイオテクノロジー応用医薬品の構造決定法、物理的・化学的性質、及び生物学的性質評価法に焦点を絞って研究を行った。特に、構造決定法については、従来のペプチド分析法、ジスルフィド結合同定法、及び糖分析法の問題点を指摘し、オンラインカートリッジや質量分析法(MS)を取り入れた改良法、及び新規解析技術の開発を行った。また、物理的・化学的性質解析法として、表面プラズモン共鳴による糖タンパク質不均一性の恒常性解析法、熱測定によるタンパク質・リガンド複合体立体構造と相互作用解析法、及び日本脳炎ウイルスの同等性評価法の開発を行った。さらに、多機能性タンパク質エリスロポエチン、及び抗DIC作用を増強したプロテインCインヒビター(PCI)改変体の生物学的性質を評価した。

2. 研究方法、及び研究成果

(1)構造決定

1) ペプチド分析

遺伝子組換え型タンパク質性医薬品の一次構造確認のための手法として、ペプチドマッピングが用いられる。この方法の問題点として、結果が得られるまでに数日を要する上、操作が煩雑であること、また、酵素消化中に様々な副生成物が生成することから、試料ごとに最適化が必要であることがあげられる。そこで、本年度は、副生成物の抑制、操作の簡略

化, 測定時間の短縮を目的とし, 試料の還元・N-β-Maleimidopropionic acid (BMPA) 化, 及びプロテアーゼ固定化カートリッジを用いたオンラインペプチドマッピングを検討した。

Fig. 1A は, 最も出現頻度の高いアミノ酸を選択した一次構造をもつ遺伝子組換え型インターフェロンα (CIFN, Consensus interferon) の非還元型についてプロテアーゼ固定化カートリッジを用いたオンラインペプチドマッピングを行った結果である。従来法によって得られたペプチドマップと同様なマップが得られること, また, 10-40 μg の範囲で定量性があることが確認された。Fig. 1B は CIFN を還元・BMPA 化し, オンラインペプチドマッピングを行った結果である。ジスルフィド結合を含むペプチド由来のピークが消失し, それらの還元されたペプチドのピークが新たに出現していることが確認できた。本分析法は, 部分還元体の還元部位の同定にも有用であった。本分析法によって, 非還元試料の場合は約2.5時間, 還元試料の場合は還元・BMPA 化の時間を含めて約7時間でペプチドマップを得ることが可能になった。以上の結果から, 還元・BMPA 化及びプロテアーゼ固定化カートリッジを用いたオンラインペプチドマッピングは, ペプチドマッピングの操作の簡略化, 及び測定時間の短縮に有用であることが明らかになった。

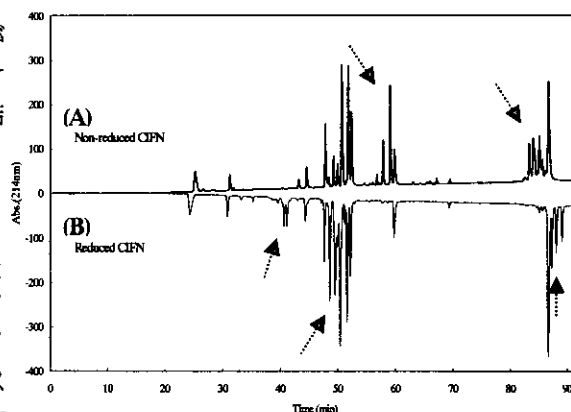


Fig. 1 On line peptide mapping of CIFN

2) ジスルフィド結合

従来のジスルフィド結合位置解析法では, 断片化したペプチドの同定, 並びにジスルフィド結合の確認に N 末端アミノ酸配列分析を用いるため, 非常に多くの時間を要することが問題となっている。そこで, 本研究では, MALDI-TOFMS をペプチド断片, 及びジスルフィド結合位置の同定に応用することで, 分析の迅速化と微量化を図った。

ヒト尿中から精製した可溶性トロンボモジュリン (uTM) に対して Asp-N 消化, 及び糖鎖除去を行い, 逆相 HPLC を用いて各ペプチド断片を分離した (Fig. 2)。ピーク 6 を分取し, 非還元及び還元条件において MALDI-TOFMS 分析を行った。Fig. 3 はピーク 6 のマススペクトルである。非還元条件の測定において, D425-F444+E445-P450+D461-C462 (S-S 結合 x3) に相当するイオン (m/z 2935.8) が観察された。また, D425-F444 (S-S 結合 x1) 及び E445-P450+D461-C462 (S-S 結合 x2) のフラグメントイオンが観察された。還元条件における測定では, m/z 2935.8⁺ のイオンが消失し, D425-F444 (S-S 結合 x0) に相当するイオンが検出された。以上のことから, 画分 6 は D425-F444+E445-P450+D461-C462 であり, C427, C433, C437, C446, C448, 及び C462 の 6 つのシステイン間で 3 対のジスルフィド結合が形成されていることが明らかになった。

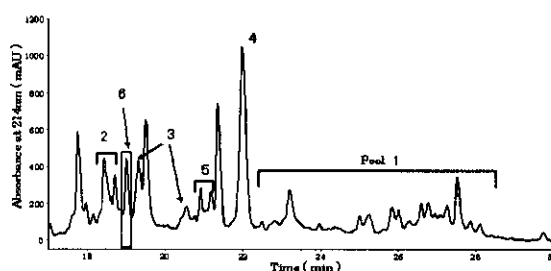


Fig. 2 Separation of Asp-N digested uTM

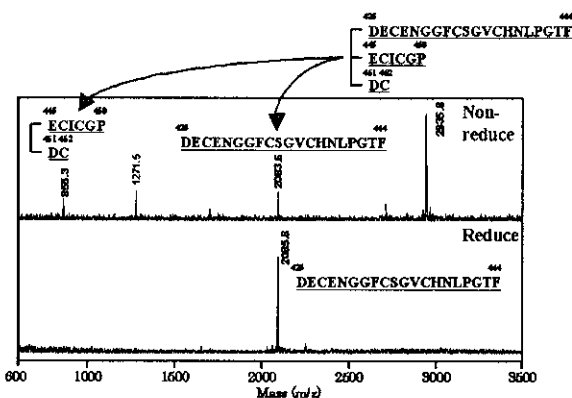


Fig. 3 MALDI-TOFMS of peak 6

さらに, 画分 6 をサーモライシンで断片化し, 逆相 HPLC で分画後, 各ピークについて MALDI-TOFMS 分析を行った。その結果, D425-C427+V436-F444 及び D425-G431+V436-F444 のペプチド断片が得られたことから, C427-C237 間でジスルフィド結合が形成されていることが明らかになった。また, I447-P450+D461-C462 に由来するイオンから C448-C462 間のジスルフィド結合, 及び D425-G432+F432-F444+E445-C446 に由来するイオンから C433-C446 間のジスルフィド結合が明らかになった。以下同様にして, uTM に存在する 26 対のジスルフィド結合のうち 17 対の結合位置を同定することができた。以上の結果から, MALDI-TOFMS を用いたジスルフィド結合同定法は, 微量の試料からジスルフィド結合位置を迅速に解析できる極めて有用な方法であることが明らかになった。

3) 糖鎖分析

糖組成 (シアル酸)

シアル酸は, カルボキシル基を含む炭素数 9 個からなる酸性糖の総称で, 培養細胞や培養条件等によって分子種や分布

が異なることが知られている。シアル酸は、活性や抗原性と密接に関係していることから、その分子種と分布を分析することは重要であるが、分解しやすいことや、分子種が30種類以上に及ぶことから、これまで一斉に分析して同定することが困難であった。そこで、本研究では、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB)によりプレカラム標識し、LC/MSで分析する新しいシアル酸分子種一斉分析法を開発した。

Fig. 4はマウス舌下腺 (A)、及び顎下腺 (B)から調製したシアル酸をDMB標識後、HPLCで分析した例である。多数のシアル酸分子種を一度の分析で分離することができた。また、各ピークのシアル酸分子種はLC/MSのSIMによって同定することができた。本分析法によって、シアル酸の分子種と分布を明らかにすることが可能となった。

N 結合糖鎖

糖鎖は、UV吸収が低いことや親水性が高く逆相HPLCでは保持されないことなどから、様々な誘導体化とHPLCを組み合わせた方法によって解析されている。しかし、従来法は、多量の試料を必要とすること、操作が煩雑で分析に時間がかかること、また、再現性を得るには習熟を要することなど多くの問題を抱えている。そこで、本研究では、キャピラリーLC/MS及びLC/MS/MSを用いた新しい迅速・簡便なN結合糖鎖の微量解析法を開発した。

Fig. 5AはキャピラリーLC/MSを用いて遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチンの糖鎖を分析した例である。50 ngのサンプルで複雑なエリスロポエチンの糖鎖を分離し、構造を特定することができた。Fig. 5Bは、糖鎖構造未知のNS0細胞産生肝細胞増殖因子の糖鎖を分析した例である。マススペクトルから、ピークaはフコシル複合型3本鎖糖鎖にヘキソース1分子とN-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) 2分子が結合した糖鎖、また、ピークbはヘキソース2分子とNeuGc 1分子が結合した糖鎖であることが示唆された。また、 α -ガラクトシダーゼ消化とLC/MS分析から、ヘキソースは非還元末端に α 結合したガラクトースであることが明らかになった。さらに、詳細構造はMS/MSによって解析することができた。Fig. 6はピークbのプロダクトイオンスペクトルである。フラグメントイオンから、ピークbの糖鎖はFig. 6に示すような構造であることが確認された。以上のように、キャピラリーLC/MS、及びLC/MS/MSは、微量のN結合糖鎖を迅速かつ簡便に解析できることが示された。

O 結合糖鎖

O結合糖鎖の分析は、糖鎖を遊離させるための適当な酵素がないこと、また、ヒドラジン分解は危険性が高く、糖鎖が一部分解することなどから困難であることが知られている。そこで、本研究では、 β -脱離後、糖アルコールをCarboPac PA-1カラムを用いたHPAEC-PADで分離し、ESI-MSで分析する方法を検討した。

Fig. 7は、複数のO結合糖鎖が存在するCHO細胞産生遺伝子組換え型ヒトトロンボポエチンの糖鎖を β -脱離後HPAEC-PADで分析した例である。各ピークを分取後、MS測定を行い、糖鎖構造を決定することができた。本分析法は簡便であり、操作中の糖鎖の分解を抑えられることから、O結合糖鎖の分析に有用であることが示された。

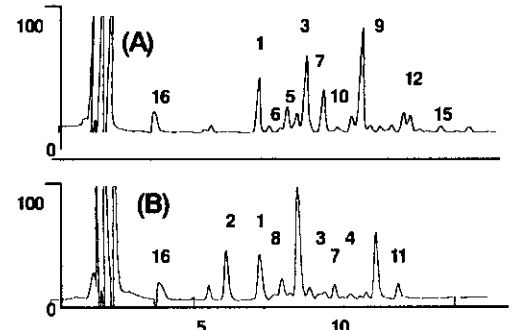


Fig. 4 HPLC of sialic acids

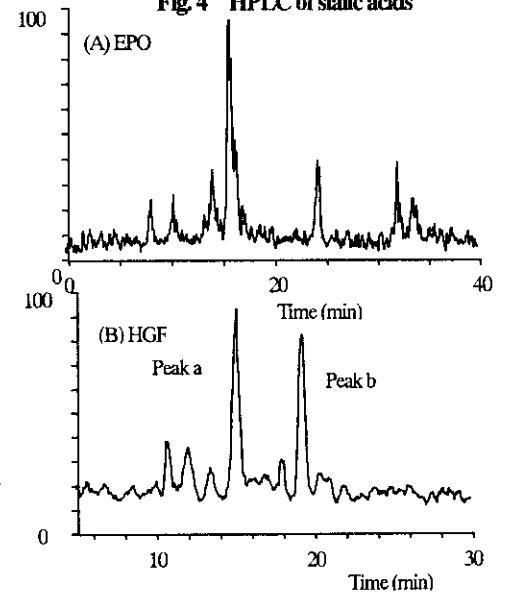


Fig. 5 LC/MS of N-glycans

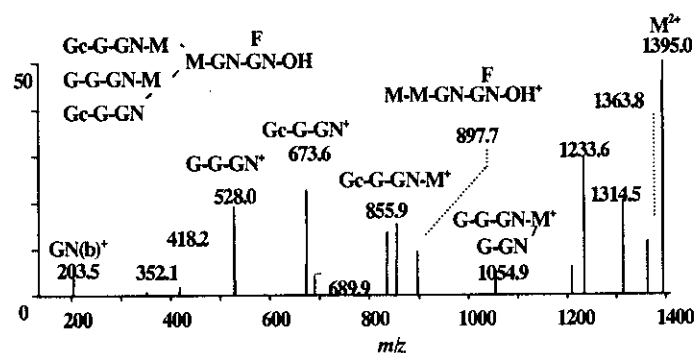


Fig. 6 LC/MS/MS of peak b in Fig. 5

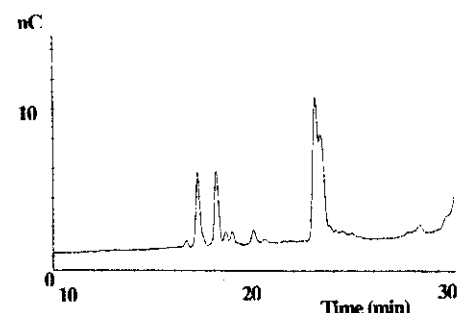


Fig. 7 HPAEC-PAD of O-glycans of TPO

(2)物理的・化学的性質等

1) 不均一性

バイオテクノロジー応用医薬品の特徴は、分子構造的に不均一な集団であることである。特に糖タンパク質性医薬品は様々なグリコフォームの集合体として存在している。不均一性は現在、HPLC、キャピラリー電気泳動法、及び等電点電気泳動法などを用いて解析されているが、糖鎖の変動を細かく解析することは不可能である。そこで、本研究では、新たな試みとして、特定の糖鎖の部分構造を認識するレクチンを用いた表面プラズモン共鳴による不均一性解析法の開発に着手した。

Fig. 8 はシアル酸を認識する SNA レクチンを固定化したセンサーチップに、様々な糖鎖を注入して得られたセンサーグラムである。シアル酸を含む糖鎖では特異的結合が認められたが、アシアロ糖鎖では確認されなかった。BiNA₁(モノシアロ 2 本鎖)糖鎖の濃度を横軸に、結合量の変化の対数を縦軸にプロットすると、15.6-500 nM の範囲で良好な直線性($R^2 > 0.99$)が得られた。同様に、様々なレクチンに対する各糖鎖の結合性を調べた結果、Table 1 のような結果が得られた。また、糖タンパク質及びその酵素消化物とレクチンとの反応性は Table 2 の通りであった。本分析法によって、糖鎖構造の変化を鋭敏に検出することが可能になった。活性に参与する糖鎖構造と特異的に結合するレクチンを選択することによって、有効性や安全性を反映した不均一性の恒常性評価が可能になる。例えば、標準品とレクチンとの参照プロフィールと被験物質のプロフィールを比較することによって、糖鎖の不均一性の恒常性を評価することができると思われる。

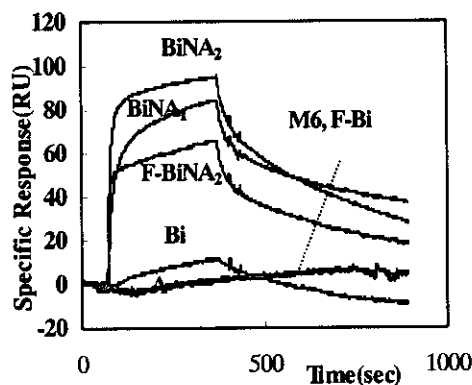


Fig. 8 Sensorgrams of N-glycans vs SAN lectin
Bi, biantennary; F, Fucose; NA, NeuAc, M, high mannose type

Table 1 Interaction of N-glycans with lectins

N-glycan	Lectin									
	ConA	PHA	ABA	SSA	MAM	DSA	NPL	ECA	AAL	EBL
Bi*	Md	Wk	No	No	No	No	No	Wk	No	Wk
F-Bi	Md	No	No	No	No	No	No	No	St	No
Tri a	No	No	No	No	No	No	No	Wk	No	Wk
Tri b	No	No	No	No	No	No	No	Wk	No	Wk
Tetra	No	No	No	No	No	St	No	No	No	No
F-Tri	No	No	No	No	No	St	No	No	No	No
F-Tetra	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
BiNA ₁	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
BiNA ₂				No	No	No	No	No	No	No
TriNA ₃				No	No	No	No	No	No	No
TetraNA ₃				No	No	No	No	No	No	No
M3	St	No	No	No	No	No	No	No	No	No
M5	St	No	No	No	No	No	No	No	No	No
M9	St	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Table 2 Interaction of glycopeptides with lectins

	IFN- α 2		Lysosome enzyme		
	NANase	NANase	α -Man ase	α -Fuc ase	β -HexNAc ase
ConA					
PHA		↑	↑	↑	↑
ABA	↓				
MAM					
DSA		↑		↓	
AAL					
EBL					↑

*Bi, biantennary; F, Fucose; M, high mannose type; NA, NeuAc; Tetra, tetraantennary; Tri, triantennary

St, strong; Md, middle; Wk, weak

2) ウイルスの同等性

現行の日本脳炎ワクチンはマウス脳を培養基材として製造されているが、まれにマウス脳由来不純物に対するアレルギー一応答が疑われる急性散在性脳脊髄炎の発症が認められる。また、ワクチンの安定供給、及び動物愛護の精神からも、培養基材の変更が望まれている。そこで、本研究では、Vero 細胞を培養基材とした日本脳炎ウイルスの大量培養法・精製法を開発すると共に、両者の同等性を評価するための日本脳炎ウイルスの物理的・化学的性状評価法を開発した。

その結果、粒子構造同等性評価には電子顕微鏡による観察、ショ糖密度勾配遠心、及びゲルろ過による評価法が有用であり、これらの方法によって、マウス脳由来、及び Vero 細胞産生日本脳炎ウイルスの大きさ、形、及び重さが同等であることが明らかになった。また、粒子を形成するペプチド、及び糖鎖構造の同等性評価には、SDS-PAGE 及びレクチンプロットが有用であった。これらの方法を用いて評価した結果、両ウイルスの構成ペプチドの大きさと数は同等であるが、糖鎖構造は異なることが明らかになった。本評価法は他のウイルス同等性評価にも有用であると思われる。

3) タンパク質・リガンド複合体立体構造、及び相互作用

タンパク質とそのリガンドとの複合体の立体構造や相互作用を解析することは、タンパク質性医薬品の有効性予測につながるものと期待される。本年度は、熱力学的にタンパク質と鏡像異性体阻害剤との相互作用を比較することによって、タンパク質・阻害剤複合体の精密立体構造、及び相互作用を予測する系の開発を行った。

まず、モデルタンパク質サーモライシンと鏡像異性体リガンド L 及び D-アミノ酸複合体の立体構造について計算機シ

ミュレーションを行い、X線結晶解析法によって得られたタンパク質・リガンド複合体立体構造と一致することを確認した。別に、従来、測定が困難であった熱測定法による、弱い結合に基づくタンパク質・リガンド解離定数の測定法を開発した。すなわち、サーモライシンとその基質として *furylacryloyl-glycyl-leucine-amide* を用い、15-50℃におけるL-及びD-アミノ酸の阻害物質定数 K_i を評価すると同時に、タンパク質とリガンドの結合に伴う微少な発熱・吸熱を等温型滴定熱量系で測定し、エンタルピー変化、標準エントロピー変化、Gibbs 標準自由エネルギー変化を決定した。そして、立体構造と熱力学的な安定性との間の様々な特徴を明らかにすることができた。今後、熱力学的手法を用いて、計算機シミュレーションやX線結晶解析では解析困難な水素イオン等の効果を明らかにしていく予定である。

(3)生物学的性質

1) エリスロポエチンの多機能性

エリスロポエチンは赤血球産生に不可欠な造血ホルモンであり、遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチンは腎性貧血薬として用いられている。我々は、エリスロポエチンは、赤血球系細胞に作用するだけでなく、神経系細胞にも作用して、虚血性神経細胞死を防御することや、子宮内膜系においては、血管新生促進因子として機能することを見出し、多機能性を有していることを明らかにしてきた。そこで、本年度は、雄性生殖器官でもエリスロポエチンが産生されているかどうかについて検討した。

Fig. 9 は成熟8週令マウスから摘出後、培養した精巣及び精巣上体器官の培養上清中のエリスロポエチン量を酵素抗体法で測定した結果である。精巣上体の方が精巣よりも多くエリスロポエチンを産生することが明らかになった。また、この産生はシクロヘキシミドで抑制されたことから、エリスロポエチンが新規に産生されることが明らかになった。Fig.10 は各週令における雄性生殖中のエリスロポエチンの mRNA 発現量を示したものである。エリスロポエチンの産生は成熟に伴い劇的に増加することが明らかになった。以上のことから、エリスロポエチンは精子の成熟を間接的に支える機能を有する可能性が示唆された。

2) 改変型ヒトプロテインCインヒビターの抗DIC作用

我々は、プロテインCインヒビター (PCI) はトロンビン及び血漿カリクレインの阻害を介して DIC における凝固系の異常亢進、及び炎症反応の亢進を抑制することを明らかにしてきた。本年度は、抗 DIC 作用の増強 (トロンビン及び血漿カリクレイン活性阻害を介した抗凝固作用/抗炎症作用の増強)、及び副作用の減弱 (活性型プロテインC阻害反応の減弱) を目的とした改変型 PCI の開発の一環として、Asn230Ser-PCI、Phe353Gly-PCI 及び Asn230Ser/Phe353Gly-PCI を作製し、その酵素阻害特性を評価した。

Peptidyl-pNA 基質 (S2238) を用いて各酵素に対する PCI 改変体の二次反応速度定数を求めた結果、Asn230Ser-PCI 及び Phe353Gly-PCI ではトロンビン及び血漿カリクレイン阻害活性が増強されていること、Asn230Ser/Phe353Gly-PCI ではトロンビン活性阻害が増強され、活性型プロテインC阻害活性が減弱されていることが確認された (Table 3)。以上のことから、今回作製した改変型 PCI は抗 DIC 薬となり得ることが示唆された。

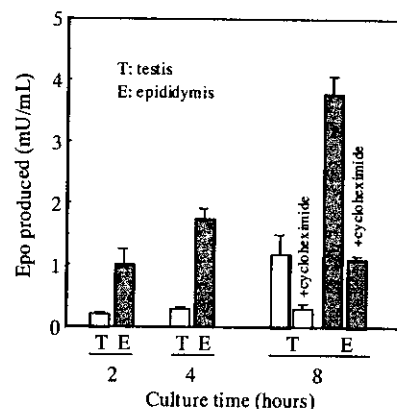


Fig. 9 Epo production by cultured testis and epididymis.

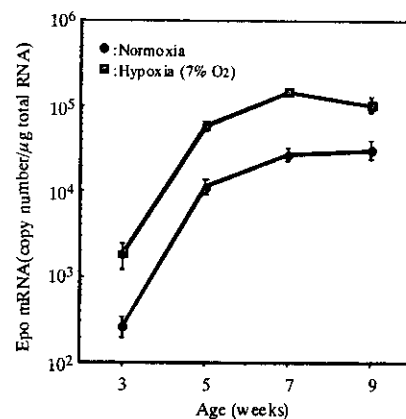


Fig. 10 Developmental change of epididymal Epo mRNA

Table 3 The protease inhibition rates of wt-PCI and the mutants of PCI

PCIs	k_2 ($M^{-1}min^{-1}$)			Tb/APC	PK/APC
	Tb*	PK	APC		
wt-PCI	3.6×10^5	5.9×10^5	4.5×10^4	8.0	13.1
Asn230Ser-PCI	9.2×10^5	1.5×10^6	5.8×10^4	15.9	25.9
Phe353Gly-PCI	4.7×10^6	1.2×10^6	6.0×10^4	7.8	20.0
Asn230Ser/Phe353Gly-PCI	1.7×10^6	7.4×10^5	2.0×10^4	85.0	37.0

*Tb, thrombin; PK, plasma kallikrein; APC, activated protein C

3. 考察

(1) 構造解析法

遺伝子組換えタンパク質性医薬品は、一次構造は人為的に制御し、立体構造、及び翻訳後修飾はタンパク質自身や宿主細胞の性質に委ねて合成される。従って、生物活性、及び安全性を確保するためには、一次構造、立体構造、及び翻訳後修飾の解析は不可欠である。一方で、タンパク質の構造解析技術はここ数年、目覚ましい進展を遂げている。MS や NMR などに代表されるように、低分子化合物の構造決定に利用されていた分析技術が、タンパク質構造解析のための一般的な技術となり、HPLC 等についても微量化・オンライン化が進められている。我々は、一次構造、立体構造、及び翻訳後修飾解析に用いられているペプチド分析、ジスルフィド結合同定法、及び糖分析法について、従来法の問題点を指摘し、最新の分析技術を取り入れた改良法及び新規分析法を開発した。

1) ペプチド分析

タンパク質の一次構造確認のための手法として、従来からペプチドマッピングが用いられてきた。ペプチドマッピングは、タンパク質を酵素消化し、HPLC で分析するペプチド分析の一般的な手法であるが、試料調製段階、すなわち、タンパク質の還元アルキル化や酵素消化の操作が煩雑で、副生成物が生成し、試料ごとに最適化が必要となるなどの問題点を抱えていた。本研究では、これらの問題点を改善するために、還元 BMPA 化と消化酵素固定化カートリッジを用いたオンラインペプチドマッピングの検討を行い、迅速・簡便に再現性の高いペプチドマップが得られることが確認された。

2) ジスルフィド結合分析

ジスルフィド結合はタンパク質の立体構造の保持、すなわち、生物活性の保持に重要な役割を担っている。バイオテクノロジー応用医薬品の製造段階において、正しいフォールディングが行われたかどうかを評価する上でジスルフィド結合の同定は重要である。本研究では、ジスルフィド結合解析に MALDI-TOFMS の導入を検討した。その結果、26 対ものジスルフィド結合を有する μ TM について 17 対の結合を明らかにすることができた。この方法は、今後開発されてくるジスルフィド結合を多く含むタンパク質性医薬品のジスルフィド結合の解析にも極めて有用であると思われる。

3) 糖鎖分析

翻訳後修飾の中でも、糖タンパク質の糖鎖は、活性、体内動態、安定性、溶解性に寄与しているだけでなく、ある種の構造は糖鎖抗原となって安全性にも影響を及ぼすことが明らかにされている。また、糖鎖部分は、宿主細胞が持つ糖転移酵素の活性によって決められることから、培養細胞や培養条件に最も影響されやすい部分でもある。しかし、糖鎖構造は非常に複雑で、多様性に富み、しかも不均一性を有することから解析が難しく、従来から解析には多くの時間と試料が費やされてきた。本研究では、新しい糖分析法として、DMB プレカラム標識と LC/MS によるシアル酸分子種の解析法、及びキャピラリー LC/MS を用いた迅速・簡便な微量糖タンパク質の N 結合糖鎖の糖鎖解析法を開発した。また、これまで解析が困難であった O 結合糖鎖の構造を HPAEC 及び ESI-MS で解析する改良法を開発した。

本研究で開発した分析法は、医薬品の構造決定に留まらず、開発研究段階における新規生理活性タンパク質の構造解析等、幅広い分野での応用が可能であると思われる。

(2) 物理的・化学的性質

バイオテクノロジー応用医薬品の物理的・化学的性質等を明らかにするためには、不均一性や高次構造に関する情報が得られる各種 HPLC、電気泳動法、分光学的性質等の解析が有用であり、医薬品管理段階においては、物理的・化学的性質が製造ロット間で一定であることを評価する必要がある。本年度は、糖鎖に起因する不均一性の新しい恒常性評価法、ウイルス粒子構造等の同等性評価法、及びタンパク質・リガンド複合体の立体構造と相互作用解析法の開発を検討した。

1) 不均一性

不均一性はバイオテクノロジー応用医薬品の特徴の一つであり、これが最も問題となるのは糖タンパク質性医薬品の場合である。糖タンパク質は各糖鎖結合部位に様々な糖鎖が付加した多様なグリコフォームの集合体で、各グリコフォームの割合の変化は活性等に直接影響するため、恒常性を維持することが重要である。従来は、等電点電気泳動法やキャピラリー泳動法を用いてグリコフォームの分布の恒常性が評価されてきたが、糖鎖の微妙な変化を捉えることはできなかった。そこで、本研究では、レクチン固定化チップを用いた、表面プラズモン共鳴を利用した糖鎖の恒常性評価法の開発に着手した。本分析法では、特定の糖鎖構造を認識するレクチンを選択することによって、糖鎖構造の変化を鋭敏に感知することが可能である。これは、糖鎖の構造と機能の関係が明らかな場合、生物学的性質を反映した不均一性恒常性評価が可能になることを示唆している。例えば、生物活性に重要なシアル酸の場合、シアル酸を認識するレクチンによって、シアル酸の恒常性を評価することができる。今後、本分析法を糖分析や安定性評価などにも応用していきたいと考えている。

2) ウイルスの同等性評価

日本脳炎ワクチン製造のための日本脳炎ウイルスの培養基材をマウス脳から Vero 細胞に変更する際のウイルス同等性評価法として、電子顕微鏡による粒子構造の観察、シヨ糖密度勾配遠心法、及びゲルろ過法、レクチンプロット法が有用であることを確認した。これらの同等性評価法は、他のワクチン製造においても応用可能であると期待される。

3) タンパク質・リガンド複合体の立体構造、及び相互作用

タンパク質とリガンドとの相互作用を解析することは、医薬品の生物学的性質を評価する上で重要である。X 線結晶解析によるタンパク質やタンパク質・リガンド複合体の立体構造の解析は有用な手段の一つであるが、立体構造のみから相互作用の定量的予測は困難である。一方、実際のタンパク質・リガンド相互作用を評価する際に、最も精密に測定可能な方法は熱測定法であるが、適応できるケースが限られていた。本研究では、鏡像異性体のリガンドを用いて、それらのタンパク質との相互作用を熱力学的に測定し、計算機シミュレーションを行うことによるタンパク質・リガンド間相互作用の定量的予測法の検討を行った。本年度は、モデルタンパク質としてサーモライシンを用い、熱測定と計算機シミュレーションによる複合体立体構造の理論計算が、X 線結晶解析で明らかになった精密立体構造と一致することを確認した。さらに、これまで解析が困難だった結合の弱いタンパク質・リガンド相互作用を熱測定で解析する手法を開発した。今後、X 線結晶解析や計算機シミュレーションでは観測できなかった水素イオンや水酸化物イオンの効果の観測に役立つと期待される。

(3) 生物学的性質

生物学的性質は、構造決定や物理的・化学的性質の解析とは異なり、画一的な解析方法ではなく、目的タンパク質の個々の特性を考慮した適切かつ合理的な方法を開発しなければならない。そこで、本研究では現在、腎性貧血治療薬として用いられているが、神経系細胞や子宮内膜系細胞に対しても生物活性を示す多機能性タンパク質エリスロポエチン、及び本研究で開発した抗 DIC 作用を増強した PCI の生化学的性質について解析した。

1) エリスロポエチン

我々はこれまで、エリスロポエチンが赤血球産生促進因子としてだけでなく、虚血性細胞死の防御機能を持つ神経栄養因子や子宮における血管形成促進因子としても機能する多機能性タンパク質であることを明らかにしてきた。本年度は、新たに精巣や精巣上体でもエリスロポエチン産生が見られることを明らかにした。特に、精巣上体では性成熟ともなってその発現が上昇すること、精細管自身ではなくその周辺の間質細胞で産生されることから、精子の成熟を間接的に支える機能を有する可能性が示唆された。今後雄性生殖器におけるエリスロポエチンの機能を解明していきたいと考えている。

2) 抗 DIC 作用を増強した PCI 改変体

我々はこれまで、PCI が抗 DIC 治療薬として用いられている低分子量ヘパリンよりも優れた抗 DIC 作用を示すことを見出し、その抗 DIC 作用を増強させた改変体の作製を行ってきた。その結果、Asn230 を Ser に変換した Asn230 糖鎖欠損 PCI ではトロンビンや血漿カリクレイン等の酵素阻害活性が増強することが明らかになった。本年度は、トロンビンや血漿カリクレイン阻害活性を保存し、活性型プロテイン C の活性は阻害しない改変体の開発を目的に、アンチトロンビン III を参考として、PCI の反応部位の Phe353 を Gly に変換した改変体を作製した。作製した変異体の生化学的性質を調べた結果、Asn230Ser-PCI 及び Phe353Gly-PCI は野生型よりもトロンビン及び血漿カリクレイン阻害活性が増強されていること、また Asn230Ser/Phe353Gly-PCI はトロンビン活性阻害は増強されているが、活性型プロテイン C の活性阻害は野生型より弱いことが明らかになった。今後、エンドトキシン誘発 DIC モデルラットを用いた有効性評価を行っていく予定である。

4. まとめ

バイオテクノロジー応用医薬品の構造決定法として、従来のペプチド分析法を改良した還元・BMPA 化及びプロテアーゼ固定化カートリッジを用いたオンラインペプチドマッピング、MALDI-TOFMS を用いた新しいジスルフィド結合同定法、及び LCMS 等を用いた新規糖分析法及び糖鎖解析法を開発した。また、物理的・化学的性質評価法として、レクチン固定化チップを用いた表面プラズモン共鳴を利用した糖タンパク質不均一性評価法、ウイルスの同等性評価法、及び高精度熱測定によるタンパク質・リガンド複合体立体構造及び相互作用解析法の開発を検討した。さらに、多機能性タンパク質エリスロポエチン、及び抗 DIC 作用を増強した PCI 改変体の生物学的性質を解析し、エリスロポエチンは雄性生殖器でも産生されていること、また PCI 改変体は、トロンビンや血漿カリクレイン阻害活性が増強され、活性型プロテイン C 阻害活性は減弱されていることが明らかになった。

5. 研究発表

- 1) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA: The usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals* (in press)
- 2) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITO and Takao HAYAKAWA: Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid chromatography/mass spectrometry and spectrometry. *Methods Molecular liquid chromatography/tandem mass Biology* (in press)
- 3) Nana KAWASAKI, Yuji HAISHIMA, Miyako OHTA, Satsuki Ito, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Structure analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology* (in press)
- 4) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 910, 1-11 (2001)
- 5) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: 糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究 (III) エリスロポエチン製剤 その3. 衛研報告, 119, 65-69 (2001)
- 6) 日向昌司, 川崎ナナ, 日向須美子, 太田美矢子, 伊藤さつき, 早川堯夫: 表面プラズモン共鳴 (SRP) イムノアッセイによるフォリスタチンの迅速定量. 衛研報告, 119, 57-60 (2001)
- 7) Nana KAWASAKI: Analysis of interactions between carbohydrates and proteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 13, GT-C04E (2001).
- 8) Omori M., Mizuguchi H., Ohsawa K., Kohsaka S., Hayakawa T., Abe K., Shibasaki F. Modification of a fiber protein in an adenovirus vector improves in vitro gene transfer efficiency to the microglial cell line. *Neurosci. Lett.* (in press)
- 9) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or av integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing TGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther.* (in press)
- 10) Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J. Control Release* (in press)
- 11) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene* (in press).
- 12) Masato TAKAHASHI, Naohiko SEKI, Toshinori OZAKI, Masaki KATO, Tomoko KUNO, Takahito NAKAGAWARA, Ken-ichi WATANABE, Koh MIYAZAKI, Miki OHIRA, Shunji HAYASHI, Mitsuchika HOSODA, Hisashi TOKITA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Satoru TODO, Akira NAKAGAWARA: Identification of the p33^{ING1}-regulated genes which include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmuMG. *Cancer Res.* (in press)
- 13) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Enhanced Anti-tumor Effect and Reduced Vector Dissemination with Fiber-modified Adenovirus Vectors Expressing Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase. *Cancer Gene Ther.* (in press)
- 14) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Tet-Off System is More Effective than Tet-On System for Regulating Transgene Expression in Single Adenoviral Vector. *J. Gene. Med.* (in press)
- 15) Takahito NAKAGAWA, Masato TAKAHASHI, Toshinori OZAKI, Ken-ichi WATANABE, Satoru TODO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, and Akira NAKAGAWARA: Autoinhibitory Regulation of p73 by ?Np73 to Modulate Cell Survival and Death Through p73-Specific Target Element Within the ?Np73 Promoter. *Molecular and Cellular Biology* (in press)
- 16) Yuji NAGAYAMA, Masako Kita-FURUYAMA, Takao ANDO, Kazuhiko NAKAO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Katsumi Eguchi, and Masami NIWA: A Novel Murine Model of Graves' Hyperthyroidism with Intramuscular Injection of Adenovirus Expressing the Thyrotropin Receptor. *J Immunol.* (in press)
- 17) Shingo Niimi, Mai Horikawa, Taiichirou Seki, Toyohiko Ariga, Tetsu Kobayashi, Takao Hayakawa: Effects of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by Epidermal Growth Factor in primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 18) Shingo Niimi, Tadashi Oshizawa, Masaaki Naotsuka, Sumiaki Ohba, Akira Yokozawa, Tomoyo Murata and Takao Hayakawa: Establishment of a Standard Assay Method for Human Thrombomodulin and Determination of the Activity of the Japanese Reference Standard. *Biologicals* (in press)
- 19) Naoki Okada, Tomomi Saito, Yasushige Masunaga, Yukiko Tsukada, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Kohei Mori, Yuka Okada, Takuya Fujita, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, and Akira Yamamoto: Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res.* 61, 7913-7919 (2001)
- 20) Yuka Okada, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Makiko Kanehira, Naoko Nishino, Koichi Takahashi, Nobuyasu Mizuno, Takao Hayakawa, and Tadanori Mayumi: Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors, *Cancer Letter* 8,177(1),57-63(2002)
- 21) Yuka Okada, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Hiroyuki Mizuguchi, Koichi Takahashi, Nobuyasu Mizuno, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Takao Hayakawa, and Tadanori Mayumi: Tumor necrosis factor α -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors. *Jap.,J.,Cancer Res.* (in press)
- 22) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA, Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system. *Biochim Biophys Acta*, 1568, 21-29 (2001)
- 23) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko Watabe-ISHII, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Efficient Gene Transfer by Fiber-Mutant Adenoviral Vectors Containing RGD Peptide. *Biochim Biophys Acta*, 1568, 13-20 (2001)
- 24) Kouji MARUYAMA, Yasuto AKIYAMA, Noriko NARA-ASHIZAWA, Takashi HOJO, Jin-YAN CHENG, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA and Ken YAMAGUCHI: Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells. *J. Immunotherapy*, 24, 345-353 (2001)
- 25) Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA: Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 272, 149-156 (2001)
- 26) Akiko EGUCHI, Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, Haruhiko YOKOI, Hachiro INOKUCHI, Shigeo FUJITA, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA, and Mahito NAKANISHI: Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 26204-26210 (2001)

- 27) Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Masashi HYUGA, Miyako OHTA, Rie SHIBAYAMA, Toru KAWANISHI, Sadako YAMAGATA, Tetsuya YAMAGATA and Takao HAYAKAWA: Ganglioside GD1a Inhibits HGF-Induced Motility and Scattering of Cancer Cells through Suppression of Tyrosine-Phosphorylation of c-Met. *Int. J. Cancer*, 94, 328-334 (2001)
- 28) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, and Takao HAYAKAWA: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 165-176 (2001)
- 29) Takao HAYAKAWA: Specifications For Biotechnological Substances. Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 121-128 (2001)
- 30) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Improvement of Adenovirus Vectors for Gene Transfer. *Animal Cell Technology* (in press)
- 31) Takao HAYAKAWA: Biotech Process Evaluation. Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 73-77 (2001)
- 32) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Mark A. KAY, Takao HAYAKAWA: A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.*, 8, 730-735 (2001)
- 33) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- *Dev Biol Stand.*, Basel, Karger, (in press)
- 34) Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Involvement of a calcium-independent pathway in plasmin-induced platelet shape change. *Life Sci.*, 69, 945-960 (2001)
- 35) Nagayama, Y., Nishihara, E., Namba, H., Yokoi, H., Hasegawa, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Hamada, H., Yamashita, S., and Niwa, M.: Targeting the replication of adenovirus to p53-defective thyroid carcinoma with a p53-regulated cre/loxP system. *Cancer Gene Ther.*, 8, 36-44 (2001)
- 36) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, Takao HAYAKAWA: In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector. *Bio Techniques*, 30, 1112-1116 (2001)
- 37) Naoki OKADA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA, and Tadanori MAYUMI: Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 173-179 (2001)
- 38) Yuji NAGAYAMA, Eijun NISHIHARA, Hiroyuki NAMBA, Haruhiko YOKOI, Mamoru HASEGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Hirofumi HAMADA, Shunichi YAMASHITA and Masami NIWA: Targeting the Replication of Adenovirus to p53-Defective Thyroid Carcinoma with a p53-Regulated Cre/loxP System. *Cancer Gene Therapy*, 8, 36-44 (2001)
- 39) Sachiko MATSUI, Reiko ADACHI, Kaoru KUSUI, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi KASAHARA, Takao HAYAKAWA and Kazuhiro SUZUKI: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells. *Cell. Signalling*, 13, 17-22 (2001)
- 40) 早川 堯夫 : バイオ医薬品の規格及び試験方法, 安定性試験. *PHARMSTAGE*, 1(3), 9-17 (2001)
- 41) 早川 堯夫, 石井 (渡部) 明子: 生物薬品の開発の現状とトランスレーショナルリサーチへの条件. *医学のあゆみ*, 200, 539-543 (2002)
- 42) 水口 裕之, 早川 堯夫 : プラスミド構築に基づいた組み換えアデノウイルスベクター作製技術. *BIO INDUSTRY*, 18, 5-14 (2001)
- 43) 早川 堯夫: バイオテクノロジー製剤の特徴と品質上のポイント. 医薬品開発評価の基礎と臨床, 医薬品開発評価の基礎と臨床研究会編, pp.411-442 (2001), デジタルプレス, 東京
- 44) 早川 堯夫, 真弓 忠範, 黒澤 努, 豊島 聡, 山口 照英, 川西 徹: トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討. *医薬品研究*, 32, 223-246 (2001)
- 45) 早川 堯夫: バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質および安全性確保の評価科学. *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, 3, 57-64 (2001)
- 46) 早川 堯夫, 水口 裕之: 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて—次世代アデノウイルスベクターの開発—. *医薬ジャーナル*, 37(5), 1514-1546 (2001)
- 47) 豊田 淑江, 山口 照英, 内田 恵理子, 押澤 正, 早川 堯夫: 好中球機能分化と増殖の制御. *炎症*, 12, 101-109 (2001)
- 48) 早川 堯夫: 細胞基材の品質・安全性評価, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川 堯夫, 山崎 修道, 延原 正弘編, pp.33-49 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 49) 早川 堯夫: 製品の特性解析・品質規格, 安定性及び Comparability: バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川 堯夫, 山崎 修道, 延原 正弘編, pp.205-230 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 50) 早川 堯夫: 細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性の確保, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川 堯夫, 山崎 修道, 延原 正弘編, pp.397-419 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 51) 川崎 ナナ, 早川 堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川 堯夫, 山崎 修道, 延原 正弘編, pp.255-284 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 52) 早川 堯夫: 遺伝子治療用医薬品の品質, 安全性等の確保, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川 堯夫, 山崎 修道, 延原 正弘編, pp.341-350 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 53) Izutani, W., Fujita, M., Nishizawa, K., and Koga, J.: The trimannosyl cores of N-glycans are important for the procoagulant protease-inhibitory activity of urinary protein C inhibitor. *Thromb. Res.*, 104, 65-74 (2001)
- 54) Fijita, M., Izutani, W., Takahashi, K., Nishizawa, K., Shirono, H., and Koga, J.: Role of each Asn-linked glycan in the anticoagulant activity of human protein C inhibitor. *Thromb. Res.*, 105, 95-102 (2002).
- 55) Wakabayashi, H., Natsuka, S., Honda, M., Naotsuka, M., Ito, Y., Kajihara, J. and Hase, S.: Structural analysis of the sugar chains of human urinary thrombomodulin. *J. Biochem.*, 130, 543-552 (2001).
- 56) Shoji, Y., Mita, T., Isemura, M., Mega, T., Hase, S., Isemura, S., and Aoyagi, Y.: A Fibronectin-binding Protein from Rice Bran with Cell Adhesion Activity for Animal Tumor Cells *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1181-1186 (2001)
- 57) Monodane, T., Kawabata, Y., Yang, S., Hase, S., and Takada, H.: Induction of Tumour Necrosis Factor- α and Interleukin-6 in Mice in vivo and in Murine Peritoneal Macrophages and Human Whole Blood Cells in vitro by Micrococcus luteus Teichuronic Acids. *J. Med. Microbiol.*, 50, 4-12 (2001)

- 58) Yang, S., Sugawara, S., Monodane, T., Nishijima, M., Adachi, Y., Akashi, S., Miyake, K., Hase, S., and Takada, H. : *Micrococcus luteus* Teichuronic Acids Activate Human and Murine Monocytic Cells in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner Infection and Immunity, 69, 2025-2030 (2001)
- 59) Otake, Y., Fujimoto, I., Tanaka, F., Nakagawa, T., Menon, K. K., Yazawa, S., Hase, S., Wada, H., and Ikenka, K. : Analysis of *N*-linked Oligosaccharides Expressed in Human Sera from Healthy Controls and Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *J. Biochem.* (2001) in press
- 60) Kakahi, K., Kinoshita, M., Kawakami, D., Tanaka, J., Sei, K., Endo, K., Oda, Y., Iwaki, M., and Masuko, T.: Capillary electrophoresis of sialic acid-containing glycoprotein. Effect of heterogeneity of carbohydrate chains on glycoform separation using alpha1-acid glycoprotein as model. *Anal. Chem.* 73, 5422-5428 (2001).
- 61) Kawabata, A., Kinoshita, M., Nishikawa, H., Kuroda, R., Nishida, M., Araki, H., Arizono, N., Oda, Y. and Kakehi, K. : The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection: roles of endogeneous calcitonin gene-related peptide and tachykinins. *J. Clin. Invest.* 102, 1443-1450 (2001).
- 62) Kinoshita, M., Inagake, K., Oda, Y., and Kakehi, K.: Fluorometric determination of mucin-type glycoproteins by galactose oxidase-peroxidase methods. *Anal. Biochem.*, 284, 87-92 (2001).
- 63) Kawabata, A., Morimoto, N., Oda, Y., Kinoshita, M., Kuroda, R., and Kakehi, K.: *Anal. Biochem.*, 283, 119-121 (2001).
- 64) Kawabata, A., Morimoto, N., Nishikawa, H., Kuroda, R., Oda, Y., and Kakehi, K.: Activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) triggers mucin secretion in the rat sublingual gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 298-302 (2000).
- 65) Yasuda, Y., Musha, T., Tanaka, H., Fujita, H., Utsumi, H., Matsuo, T., Masuda, S., Nagao, M., Sasaki, R., and Nakamura, Y. "Inhibition of Erythropoietin Signaling Destroys Xenografts of Ovarian and Uterine Cancers in Nude Mice." *Br. J. Cancer*, 84, 836-843 (2001)
- 66) Nagao, M., Masuda, S., Chikuma-Esaki, M., Kobayashi, T., Yasuda, Y., and Sasaki, R.: Production of erythropoietin in female reproductive organs and its angiogenic function in uterus. *Reproductive Biotechnology* (Miyamoto, H., and Manabe, N. Ed.) Hokutoshobo, 147-152 (2001).
- 67) Fujii, S.: Structural bases of recognition motif for adenine moiety. *Nucleic Acid Research, Supplement*, 1, 53-54 (2001)

6. 知的所有権の取得状況

1) 特許出願

藤田 貢, 高橋健一: 改変型ヒトプロテインCインヒビター (特願 2000-195490)

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社