

8) 心組織における心疾患関連たんぱく質の探索

9) 肺高血圧症関連たんぱく質の探索

10) 周産期心筋症の関連たんぱく質の探索

大阪府立成人病センター：

各種がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

大阪大学医学部：

1) 運動ニューロン病患者における原因たんぱく質の探索

2) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索 (1)

3) 乳がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索 (2)

4) 慢性呼吸器疾患 (COPD, 間質性肺炎) における原因たんぱく質の探索

5) 消化器癌 (胃癌、食道癌、大腸癌、肝細胞胆道癌、膵臓癌) の原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

6) びまん性大細胞型リンパ腫のたんぱく質の探索

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (HS 財団) ヒト組織バンク：

ヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSSRB) から提供されるヒト各種組織を利用した疾患プロテオーム解析研究

## 2) 研究協力機関からのヒト試料の受け入れ

前述の PF 倫理委員会で承認された研究課題に関して、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (疾患関連たんぱく質解析研究事業) の分担研究報告書および協力研究機関への配布試料 (「創薬プロテオームファクトリー (PF) へのヒト試料等の提供について」(資料 1) に基づき(1)、協力研究機関より送付されるヒト試料(臨床情報も含む)の受け入れを開始した。表 5 に各協力機関より送付された検体数の一覧表を示す。これまでに、各種疾患 22 症例 352 患者から 465 検体試料(血清、組織等)を受け入れ、そのうち、307 検体の血清

試料の解析を完了した

## 3) 血清高発現たんぱく質解析法の改良

昨年度に作成した cICAT 法により、臨床試料の血清高発現たんぱく質の解析を行ってきたが、大部分のペプチドでは問題なく正確な比 (H/L) が得られたが、一部のペプチドにバラツキが生じる場合があった。その原因を追求した結果、ABI 社が推奨する TCEP 1 mM によるクエンチング操作では充分でなく、立体構造上の関係で cICAT 試薬が反応しにくい部分がトリプシン処理後によりペプチドに分解されると、残存の cICAT 試薬が反応するためであることが分かった。そこで、TCEP の代わりに 10mM DTT を cICAT 反応後のクエンチング試薬として、TCEP 法と DTT 法で比較検討した。また、市販の cICAT 試薬(H, L)含量を測定し、ロット間のバラツキをなくした。その結果、前述の一部バラツキが生じたペプチドのバラツキ幅は小さくなり、より正確(97%)な比 (H/L) が得られた。ただし、トリプシンによるミスクリープは TCEP 法より多い傾向がみられ、一長一短であるが、総合的に判断して DTT 法が優位であるとして、以後の検体試料は DTT 法で行うことにした (図 22)。従来の TCEP 法でも十分な解析が可能であるので、TCEP 法で測定した臨床検体は TCEP 法で測定したことを言及してまとめて解析した。なお、両者に大きな相違は見当たらないが、当面の間、両者を纏めて解釈することはしない。本改良にともない、cICAT の 25 分画用の SCX-HPLC の濃度勾配溶媒系を KCl 系からギ酸・ギ酸アンモニウム系に、またカラムサイズを 2.1 x 35 mm に変更した。なお、cICAT 法でこれまでに同定した血清高発現たんぱく質の一覧表を表 6 に示す。

## 4) 各医療機関試料の解析状況

### (1) 国立国際医療センター：

同センターより提供された糖尿病患者血清のうち TCEP 法で処理した 20 検体 (基礎検討用試料

を含む) および DTT 法で処理した 15 検体糖尿病患者血清の解析結果(同定と比較定量値)を開示し、臨床情報との関係及び追加要望に関して協議した。このうち、TCEP 法で解析した 10 検体の同定された、たんぱく質数と H/L 比の度数分布を図 23 に示し、標準血清各たんぱく質と患者血清たんぱく質との比較定量比 (H/L: 患者血清/標準血清) との関係を図 24 に示す。また、臨床情報 (血糖値、BMI, 年齢、血清脂質値等) と各たんぱく質及び各たんぱく質同士の相関解析を行った。単純に、標準血清と比較すると、CD5 antigen-like (Scavenger receptor)等が増加傾向を示したが、後述するネフローゼで顕著な変化を示した ZAG には大きな変化は認められなかった (表 7)。

本疾患の検体は、同一患者の治療前後検体などではなく、慢性疾患でしかも多様な患者背景 (年齢、合併症の有無、治療法) がある検体である。従って、比較する対照血清をどのようにするかが問題である。今後、DTT 法による 40 検体を解析後、患者背景を考慮して上で、層別解析が可能なのかを検討する。また、比較定量値 (H/L) は、外国人プール血清を標準血清 (L) とし、患者血清(H)として計算したものである。日本人健常人との比較定量値ではない。しかし、表 7 および昨年の報告書に記したように(2)、血清高発現たんぱく質トップ 140 種類を、日本人 4 人と外国人 4 人との比較解析の結果、血小板由来のたんぱく質等 (ficolin 2 も含む)を除くと、殆どのたんぱく質 (94%)において両群に差はなかったが、今後は可能な限り日本人健常人の血清検体を解析し、日本人健常人の標準血清を構築したい。

## (2) 国立循環器病センター：

cICAT 法でのクエンチング剤の変更経緯を説明し、TCEP 法よりも DTT 法が総合的には優位であることを説明した (図 22)。DTT 法による脳動脈閉塞による急性期脳卒中症、腎血管性高血圧症、糖尿病治療前後の動脈硬化症、冠動脈疾患を有する家族性コレステロール血症、急性期心不全症の血清の解析を行い、そのうち、脳動脈閉塞に

よる急性期脳卒中症、糖尿病治療前後の動脈硬化症、急性期心不全症の血清の解析結果(同定と比較定量値)を同センターに提示した。治療前後のたんぱく質の変動を示し、また、同定・定量した各たんぱく質同士の相関解析結果も示した。いくつかのたんぱく質の変動が観察されたが、臨床情報がその時点では未だ送付されてなかったので詳細な関係は不明であった。今後は、臨床情報を送付して頂き、治療に伴うたんぱく質の変化と臨床情報との相関性解析を行いたい。また、今回、とりあえず、各疾患 3~5 例ずつ解析した結果を提示したが、しかし、解析した各疾患群の例数が少ないので詳細な解析が困難であった。今後は、疾患毎に解析を終了してから、纏めて提示することとした。

## (3) 国立成育医療センター：

昨年度に引き続き、同センターより提供された小児ネフローゼ症の血清試料 21 検体の血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った。そのうち、ステロイド治療を施した微小変化型ネフローゼ患者血清の解析結果を同センターに開示し、たんぱく尿および血清たんぱく質濃度などの臨床情報と、各たんぱく質の発現比率との相関性を詳細に検討した。その結果、血清循環糖たんぱく質であり脂質代謝に関与する zinc  $\alpha$  2-glycoprotein (ZAG)(5, 6)及び補体第 3 経路 (レクチン経路) の活性化に関与するたんぱく質分解酵素 (MBL-associated serine protease (MBLP1) ) の isoform 2 (MBLP1-isoform 2)(7, 8)がステロイド治療効果を反映するモニターたんぱく質であることを示した。このうち、MBLP1 は炎症系の原因に近い上流たんぱく質であり、発症原因が不明な本疾患のメカニズムの解明に役立つ可能性を示す。なお、ZAG と MBLP1-isoform 2 に関しては、別項で詳細に記述する。また、国立成育医療センターでは、臨床検体で得られた結果 (ZAG および MBLP1-isoform 2 の変化) が、本疾患の実験動物モデルの可能性のある、たんぱく尿、低たんぱく質血症、高脂血症を呈する ICGN マウス(9)でも確

認められるか現在検討中である。

(4) 国立長寿医療センター：

同センターより提供された骨粗しょう症の患者血清 15 検体と認知症患者血清 11 検体の血清各たんぱく質の同定・比較解析を行った。そのうち、骨粗しょう症 10 検体の解析結果(同定と比較定量値)を同センターに提示した。この場合も、対照とする日本人健常人血清との比較が問題であるが、少なくとも血清高発現たんぱく質の大部分については、標準血清(外国人プール血清)と殆ど変わらなかった。しかし、通常、標準血清及び日本人健常人血清では殆ど検出されない筋肉組織等由来のたんぱく質(profilin 1, filamin-1, peptidylprolyl isomerase A)が高値(H/Lが6~8)を示す場合が観察された(表7)。恐らく、患者血清中に漏出したこれらの組織たんぱく質が検出可能なまでにリークし増加したために測定が可能になったものと考えられる。これらの組織由来のたんぱく質が疾患特異的なのか或いは非特異的(寝たきり状態等による)なものなのかは今後の検討課題である。

(5) 国立精神・神経センター：

昨年解析したパーキンソン病患者の他に新たに2例(合計12例)及びパーキンソン病症候群(多系統萎縮症)患者5例の血清の解析を行った。解析結果を同センターに開示する予定である。パーキンソン病に関しては12例を纏めて標準血清と比較したが、高発現血清たんぱく質の中では、本疾患に特異的と思われる血清たんぱく質は見出せなかった。今後、より病変部位に近い脳脊髄液の解析に向けて、その解析法等を検討する。

(6) 大阪府立成人病センター：

スキルス胃がん患者5名の手術前・後の血清高発現たんぱく質の解析を行った。また、胃がん組織に関しては、同センターの指導のもとに、組織染色、LMD技術を用いるcICAT解析法を構築し、高分化型腺がん患者1例の病変部位・正常部位の解析を終了した(後述)。また、スキルス胃がん組織の解析も開始した。これらの結果を同センタ

ーに開示し、今後の対応を討議する予定である。

7) 大阪大学医学部：

同大学より提供された運動ニューロン病(ALS)患者血清14検体のうち、10検体の解析を終了した。結果を近く同大学に開示し協議する予定である。また、組織解析系が構築されてきたので、今後は乳がん組織の解析も開始する。

5) 微小変化型ネフローゼ疾患患者血清の解析結果

多量のたんぱく尿と低たんぱく血症等を呈するネフローゼ症候群の一つ微小変化型ネフローゼ症候群(minimal change nephritic syndrome: MCNS)は、小児期の腎症の大部分および成年期の腎症の約15%を占める(10)。本疾患は、糸球体のろ過機能に異常が認められ、アルブミン等の血清たんぱく質が尿中に大量に漏出し、そのため、低たんぱく血症およびしばしば高脂血症を示す。また、凝固系阻害因子antithrombin III濃度が低下するため凝固系の亢進が観察されている(10)。しかし、本疾患は他の腎症と異なり、糸球体には殆ど組織学的な変化が見られず、また、免疫グロブリンや、補体の沈着も認められない。さらに、特別な自己抗体の存在も報告されていない。多くの症例では、急性に発症し、副腎皮質ステロイドホルモンや免疫抑制剤の投与により寛解するが再発しやすいなどの特徴点を有する。また、一部は難治性ネフローゼに移行することが報告されている。ステロイドホルモンの長期投与は発育期の小児には重大な副作用を引き起こす可能性があり、より副作用のない薬剤の開発、治療法の確立が望まれている。その発症原因仮説としては、T細胞機能異常(11)やヘモペキシンなどの糸球体透過性亢進因子の異常等(12)スリット膜関連たんぱく質の低下等(13)が提唱されているが、いずれも決定的ではなく、本質的な発症原因の解明が強く望まれている。我々は、同位体標識法の一つCleavable ICAT(cICAT)法(4)を用いて、健常人血清と、微小変化型ネフローゼ症候群患者血清

(治療前および治療後)の血清たんぱく質の網羅的発現差解析を行い、その解析結果と患者の臨床情報との相関関係を明らかにすることにより、本疾患に關与する疾患關連たんぱく質を特定することを試みた。

そこで、ステロイド治療を行った微小変化型ネフローゼ症候群患者5名(A, B, C, D, E)の治療前(発症中)、治療中(ステロイド等投与中)或いは治療後(ステロイド投与終了、緩解期)の患者の血清高発現たんぱく質(約140種類)に関して、標準血清との同定・比較定量解析をcICAT法により行った。また、常法により、患者の治療前(発症中)、治療中(ステロイド投与中)および治療後(ステロイド投与終了、緩解期)のたんぱく尿検査値、血清総たんぱく質量及びアルブミン/グロブリン比を測定した。

その結果、患者全例において、ステロイド投与治療により、尿中へのたんぱく質の漏洩は完全に停止(+++から-に改善)したが、それとともに、血清循環糖たんぱく質の一種であるzinc  $\alpha$  2-glycoprotein (ZAG)の(H/L比)は治療前では平均 $1.18 \pm 0.68$ であったのが、治療により平均 $3.27 \pm 0.82$ と約3倍に増加した(図25)。一方、他の血清循環糖たんぱく質のvitronectin, alpha-1B glycoprotein, hemopexinのH/L比は治療により、殆ど変化はしなかった。また、血清総たんぱく質量およびアルブミン/グロブリン比は治療により、上昇するものの治療中の時点では緩解期のレベルまでには回復していなかった(データ省略)。従って、治療によるzinc  $\alpha$  2-glycoprotein (ZAG)の増加は血清総たんぱく質量及びアルブミン/グロブリン比の正常値までの変化よりも先行した。また、治療後(緩解期)には、本たんぱく質のH/L比は正常値近くに戻り、増加はステロイド投与中にのみに限られた。

一方、ネフローゼ症候群で、発症し腎臓の糸球体のろ過機能が低下すると、血中濃度が低下し、治療によりろ過機能が改善すると、上昇することが知られている transthyretin (14), retinol

binding protein 4 (14), antithrombin III (15)は、ZAGより顕著ではないが、同様に、たんぱく尿の消失とともに上昇した(図26)。また、治療後(緩解期)には、これらのたんぱく質のH/L比は正常値近くに戻り、増加はステロイド投与中にのみに限られた。一方、逆に、発症時には高く、治療によりろ過機能が改善すると、低下することが報告されている、炎症系のkey酵素の一つ prostaglandin D synthase (16)は、僅かではあるがたんぱく尿の消失とともに低下した(図26)。

そこで、これら既知マーカー(モニター)たんぱく質とZAGの定量比(H/L)に関して、患者5名で得られた結果をまとめ、ZAGとの相関性があるか調べた。その結果、本たんぱく質(ZAG)は、ろ過機能改善と相関する retinol binding protein 4, transthyretin, antithrombin IIIとは強い正の相関性を示し、逆に、ろ過機能の低下と相関する prostaglandin D2 synthase とは強い負の相関性を示した(図27)。以上の結果は、本たんぱく質(ZAG)が、既知マーカー(モニター)たんぱく質と同様に、ネフローゼの病態変化を反映するモニターたんぱく質の一つであることを示す(特許出願 平成18年6月21日)。

ZAGには血中の脂質低下作用があると報告されており、また、ある種のがん患者ではその血中レベルが増加することも報告されている(5, 6)。また、ステロイド投与により組織のZAGのmRNAレベルが増加することも報告されているが、血清レベルも上昇させるかは定かではない。しかし、ステロイドでmRNAが増加しても、一般に高発現血清たんぱく質に属する本たんぱく質濃度が急激に上昇するとは考えにくい。それよりも、ZAGはアルブミンよりも低分子であり、糸球体のろ過機能が低下すると尿中に漏出しやすく、ステロイドの抗炎症作用により糸球体のろ過機能が回復すると漏出が止まり、リバンドで上昇するとした方が妥当と考えられる。ZAGと正に相関する retinol binding protein 4, transthyretin, antithrombin IIIは低分子であり、ろ過機能が低

下するため尿中に漏出し、そのため血中濃度が低下するとされている。一方、生体にとって、これらのたんぱく質濃度が低下すると、本来の機能が低下するので恒常性維持のために、その生合成能力が亢進することが知られている。従って、ネフローゼ患者にしばしば観察される高脂血症は、脂質低下作用がある ZAG が低下するために引き起こされるものであり、ろ過機能が改善され、尿への漏出がストップすると、ZAG 濃度は正常レベル以上に増加し、それとともに、血中脂質レベルが低下するのかもしれない。

なお、ZAG は、表 7 に示すように、他疾患群（パーキンソン病、糖尿病、骨粗鬆症）では、標準血清と比較すると、大きな変動は観察されていない。

さて、ZAG が既知のマーカー（モニター）たんぱく質と同様に、治療効果を反映するたんぱく質の一つではあるが、1) 完全緩解期ではそのレベルは正常に戻ることに、2) 他の疾患でも上昇することが知られているので、特異性の高いマーカーたんぱく質とは言いがたい。また、本疾患の原因に近い上流に位置するたんぱく質ではなく、むしろ、急性期たんぱく質群のように下流に位置するたんぱく質と考えたほうが妥当である。しかし、本ネフローゼ疾患で得られたステロイドの治療効果の一部を反映していることは確実である。

そこで、ネフローゼの発症原因を探るため、ZAG をベースにして、本疾患患者の解析で得られた約 140 種類の血清たんぱく質全てについての相関性を検討した。その結果、今まで報告されていない疾患原因の可能性のある複数のたんぱく質が ZAG と強い負の相関することが判明した（即ち、発症時には高く、治療によって低下する）。特に、興味あるたんぱく質としては、血清に存在するレクチンで腸バクテリアの糖鎖に結合する mannose binding lectin (MBL) に特異的に結合するたんぱく質分解酵素（MBL-associated serine protease (MBLP-1)）の isoform 2 (7,8) が強い負の相関性を示した。一方、MBLP-1 の isoform 1 には相関性が認められず、また、補体の第一経

路の C1s, C2 にも相関性は認められなかった（図 28）。MBLP-1 系は比較的最近に明らかにされた補体の第 3 経路（レクチン経路）(17) に関与する（図 30）。第 1 経路は抗原・抗体複合体で活性化される経路（古典的経路）であり、第 2 経路 (Alternative pathway) は微生物表面と C3 の結合により活性化される経路であり、第 3 経路は、腸管バクテリア等の微生物表面糖鎖と血清に存在するレクチン (MBL) が結合することにより活性化される。MBLP-1 の isoform 2, isoform 1 は補体第 3 経路の活性化に必要なセリンプロテアーゼ系のたんぱく質分解酵素である。なお、MBLP-1 の isoform 2 をベースにして他のたんぱく質の相関性を調べると、antithrombin III、transthyretin、retinol binding protein 4 とは強い負の相関性が見られた（図 29）。

以上のことから、本たんぱく質 (MBLP1) が発症時に高く、ステロイド投与治療効果とともに低下するステロイドの治療効果を反映するモニターたんぱく質の一つであると考えられる。しかし、MBLP1 は ZAG 等の炎症系等の下流のたんぱく質と異なり、炎症系の原因に近い上流たんぱく質である。MBLP1 が関与する補体第 3 経路は腸管バクテリアのたんぱく質でなく糖鎖を認識するので非特異的である（抗体産生の履歴が起らない）こと、また、小児ネフローゼと同様にステロイドが有効な他の小児特有の疾患（アトピー、食物アレルギー）との関連性を考慮すると、一つの可能性として、本疾患は、小児期の腸管免疫系の発育不全が基礎にあることが考えられる。すなわち、発育不全の腸管免疫系のバリアーを突破した腸管バクテリアが MBLP 補体第 3 経路を活性化して炎症を起こすものと考えられる。ステロイドは、MBLP 補体第 3 経路の活性化反応を阻害できないが、その後にかかる炎症を阻害することにより、治療効果（糸球体ろ過機能改善）を発揮するものと考えられる（図 30）。今後、この仮説を証明するためには多くの詳細な検討が必要であるが、本疾患のステロイドに代わる創薬ターゲットとして

は、例えば、糖鎖認識部位阻害剤、MBLP1特異的阻害剤などが考えられる（特許出願済み）。

## 6) cICAT 法による細胞・組織たんぱく質解析 (1) ヒト胃がん培養細胞株の解析：

昨年に引き続き、cICAT 法を用いて、異なる性質を示す胃がん細胞株同士（KATO-III, MKN-45, MKN-74）での発現たんぱく質の比較定量が可能かどうか検討した。このうち、Kato-III はスキルス胃がん細胞株、MKN-45 は充実型未分化型腺がん細胞株、MKN-74 は中分化型腺癌細胞株である。Kato-III 等の幾つかのスキルス胃がん細胞株に関しては、mRNA 発現解析の結果から、FGF-Receptor2 mRNA が強発現していることが知られている(18)。FGF-Receptor 2 およびその関連たんぱく質が実際のたんぱく質レベルでも強発現しているかは興味あるところである。

そこで、KATO-III(100 µg)を L 鎖試薬(1kit)で、MKN-45(100 µg) or MKN-74(100 µg)を H 鎖試薬(1kit)で標識し、常法により得られた SCX25 分画の各画分の cICAT ペプチドを Nano-LC/Q-Star XL で質量分析測定を行い、統合データベースシステム (HiSpec) で、ペプチド/たんぱく質の同定および H 鎖と L 鎖の比較定量比解析を行った。その結果、Refseq data base を用い、MASCOT で Rank 1, Peptide Score 20 以上を選択すると、約 700・1000 種類の細胞たんぱく質の同定・比較定量が可能であった。そのうち、KATO-III と MKN-45 の解析で同定可能なたんぱく質(758 種類)の機能(function)別(図 31)及び代謝経路(pathway)別(図 32)のカテゴリー分類(Panther)を示す。

機能別カテゴリー分類では、たんぱく質代謝・修飾関係(276 種)、核酸関連たんぱく質系(209 種)、シグナル伝達系(97 種)、細胞内たんぱく質(89 種)、細胞骨格系(82 種)、免疫反応系(62 種)、トランスポート系(63 種)などが上位を占めた。一方、代謝経路別カテゴリー分類では、presenilin pathway(21 種)、ubiquitin

proteasome pathway(19 種)、integrin signaling pathway(17 種)、inflammation pathway(17 種)、cytoskeletal regulation by Rho GTPase(17 種)とともに FGF receptor pathway(12 種)、EGF receptor pathway(13 種)、angiogenesis(12 種)、apoptosis pathway(12 種)、FAS signaling pathway(6 種)等が認められた。

図 33 は、KATO-III と MKN-45 の同定たんぱく質(758 種類)での、各たんぱく質の発現比較定量比(H/L:MKN-45 / KATO-III)を示す。なお、たんぱく質名は表記せず、番号で示した。その結果、KATO-III に 5 倍以上選択的なもの(Kato-III のみで同定されたものも含む)は 10 種類であり、その中には、mRNA レベルで強発現が報告されている FGF-receptor 2 が含まれていた。

図 34 に FGF-receptor 2 の cICAT fragment (DSGLYACTASR)の H および L の存在パターンを示す。一方、MKN-45 に 5 倍以上選択的なものは、carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 等の 46 種類が存在した。

なお、同様な比較を Kato-III と MKN-74(中分化型腺癌株)と比較した結果、FGF-receptor 2 は Kato-III にもみ強発現していることを確認した(データ省略)。以上の結果は、スキルス胃がん株 Kato-III での FGF-receptor 2 mRNA の選択的強発現を、たんぱく質レベルでも確認したことを示す。

今後、Kato-III 以外のスキルス細胞株及び実際のスキルス胃がん患者のスキルス癌部位ではどの程度の頻度で FGF-receptor 2 が強発現されているのかを検討したい。

## (2) ヒト正常胃組織の解析：

cICAT 法による培養細胞株を用いた比較検討が可能になったので、実際のヒト組織の解析をワークフロー(図 21)に従い検討した。HSSRB より購入したヒト正常胃組織を常法により切片を調製し、LMD により正常胃組織を部位特異的に分取し、研究方法の 1)に記載した方法で組織を可溶

化し、アセトン沈殿処理を行い、正常胃組織たんぱく質を得た。得られたたんぱく質を常法に基づき、cICAT-L鎖試薬およびH鎖試薬で標識した。この場合、後述するSCX25分画を用いて解析する時は、各100 $\mu$ gに各1kitのcICAT試薬を反応させ、SCX-Amide80で100分画して解析する時は各400 $\mu$ gに各4kitの試薬を反応させた。SCX25分画は血清および細胞株と同じ方法で行い、SCX-Amide80での100分画は、SCXで10分画し、その分画をAmide80で10分画し、合計100分画とした。各画分をQ-Starシステムで分析し、Hispecで同定・定量たんぱく質数を解析した。25分画の場合は、Q-Star 1 runで約670-740種類のたんぱく質が同定・定量可能(RefeSeq、rank 1, score 20以上)であり、Q-Star 3 runを纏めて解析すると、合計で993種類(精査済み)のたんぱく質の同定と比較定量が可能であった。また、SCX-Amide80を用いた100分画では、Q-Starで1 runで約1350種類、3 runの合計で2049種類(精査済み)のたんぱく質の同定・定量が可能であった。図35は、SCX25分画とSCX-Amide80の100分画との同定たんぱく質のベン図(精査済み)を示す。両者に共通なものは814種類であるが、SCX-Amide80の100分画でのみ同定されたものは1235種類に達する。

さらに、機能別のカテゴリー分類で比較すると、receptor activity(binding)では25分画では25種類であったのが、100分画では57種類に、またtranscription factor activityは10種類から27種類に増加する等、いずれも大幅に増加することが分かった(表8)。

図36には、100分画で得られた同定された2049種類のたんぱく質のPantherによる分類(Score20以上、unclassifiedを除く)を示す。これらの正常胃組織たんぱく質解析で得られたデータは、いずれ、正常胃組織たんぱく質のデータベースの一部に利用したい。

一方、実際の臨床検体のがん組織、正常組織をLMDにより部位特異的に分取する時、100分画

に解析するだけの量を確保することが難しい場合が多く、また、質量分析に膨大な時間を要する。従って、通常は25分画に必要な100 $\mu$ gたんぱく質(各試料につき)を用いて解析し、100分画に必要な量が得られた場合は、可能なかぎり解析したい(血清高発現たんぱく質のルーチン解析状況を考慮する)。

### (3) ヒト胃がん患者試料(大阪成人病センター提供)のがん部位と正常胃組織の解析:

大阪成人病センターより提供された胃がん患者の組織検体の解析を開始した。同センターの病理部の診断では、本胃がんは高分化型腺癌に属することである。図37にがん病変部位および正常組織部位の組織を示す。図21のワークフローに従い、がん病変部位と周辺の正常胃組織をLMDで部位的に分取し、各部位のたんぱく質を得た。常法に基づき、正常胃組織たんぱく質100 $\mu$ gをH鎖cICAT試薬(H)、がん組織たんぱく質100 $\mu$ gをL鎖cICAT試薬(L)で標識し、トリプシン処理、脱試薬、アビジンカラム、SCX25分画などを行い、得られたcICATペプチドをQ-Starで質量分析測定を行い、血清の場合と同様に統合データベースシステム(HiSpec)を用いて、ペプチドおよびたんぱく質の同定・比較定量解析を行った。その結果、がん細胞株の場合と同様に、本胃がん患者のがん部位と正常組織部位の解析から、約700-1100種類のたんぱく質が同定・定量可能であった。図38には本解析で同定された1095種類のたんぱく質の機能別Panther分類表を示す。その内訳を解析すると、やはり、cytoskeletal protein, nucleic acid binding, oxidoreductase, extracellular matrix, cell adhesion molecule, selected regulatory protein類などが主要を占めるが、膜関連たんぱく質のReceptor類が26種類、Ion channel類が17種類、Transporter類が27種類が存在し、その他、Kinase類が20種類、Phosphatase類が10種類存在した。

図39には、がん部位と正常組織部位の各たん

ばく質の比較定量値 (H/L: 正常/ がん)を示す。がん部位に 10 倍以上選択的なものが 10 種類、正常組織部位に 10 倍以上選択的なものが 6 種類存在した。さらに、正確な発現比は測定できていないが、がん部位にてのみ同定されたものが存在するので、これら閾値から大きくずれているたんぱく質に注目したい。また、今後は、可能なかぎり 100 分画を用いて、より低発現の組織たんぱく質について解析したい。

### 7) 低発現血清たんぱく質の解析検討

血清高発現たんぱく質の解析の場合と同様に、アジレントイムノカラムで6種類の主要たんぱく質を除いた血清画分を大量に用いて、cICAT法で、最終的に分画数を100-200にして、Qstar-XL およびABI-4700で解析すると、約300-500種類のたんぱく質の同定と定量が可能であった(1)。しかし、膨大な処理時間と質量分析時間を要し、多数の臨床検体を迅速に解析し、結果を提供することは現実的には殆ど不可能である。一方、組織・細胞を血清高発現たんぱく質解析と同様に25分画数で解析すると、100 $\mu$ gのたんぱく質量で約1000種類の同定と定量が可能である。この差は、組織たんぱく質の場合、血清と異なり、各たんぱく質の濃度差が小さいためと考えられる。血清高発現 cICAT たんぱく質の上位たんぱく質は、factor H、C3、alpha 2-McG、C4BP、C4、fibronectin、C7、kininogen、ceruloplasmin、karikurein であり、全体の約30%を占める。そのため、上述の上位たんぱく質を除く手段を立てることにより、その分が低発現たんぱく質の方に振り分けられ、同定たんぱく数が増加することが予想された。そのため、アジレントイムノカラムで除いた素通り画分を、1) ベックマン社・シグマ社市販の新規イムノカラムにかけて上述たんぱく質を除く、2) 上述たんぱく質は分子量が100K以上であるので、限外ろ過膜等で100K以下のたんぱく質を解析する、3) 上述たんぱく質に対する自前の抗体カラムを作成し、除去する、4) 抗

体カラムの代わりにレクチンカラム等を利用すること等を検討した。このうち、3)の限外ろ過膜の使用により、通常の高発現血清たんぱく質(約140種類)の他に、新たなたんぱく質の同定・定量が可能になった。他の方法は、現在、検討中である。臨床検体ですでに高発現たんぱく質の解析結果が出ているので、上述の高発現たんぱく質を除いた検体を解析し、リンクすることにより、ネフローゼ血清解析で有効であった各たんぱく質・臨床情報の相関性解析が可能になり、所謂、網羅的な研究の特徴点を引き出せると考える。

これまでに、各研究協力機関より提供された各種疾患試料(合計465検体)のうちの、血清試料(307検体)に関しては、cICAT法による血清高発現たんぱく質の解析を終了した。残りの血清試料検体も本年度の5月末までには完了する予定である。今後は、各血清たんぱく質の発現解析結果と数値化した臨床情報との網羅的な相関解析を行うことにより、疾患関連たんぱく質を探索が可能なデータベースを作成することになる。この場合、疾患により変動した各たんぱく質の発現比が正確であることが必須条件の一つである。

今回、これを検証する意味で、小児ネフローゼ症候群(微小変化型)の患者5名のステロイド治療前後の血清たんぱく質の解析研究を行った。その結果、治療により、たんぱく尿が消失(+++から-)するのと連動して、血清循環糖たんぱく質の一種、zinc  $\alpha$  2-glycoprotein (ZAG)が、平均、約3倍に増加し、この増加と本疾患の既知たんぱく質マーカーである antithrombin III, retinol-binding protein 4, transthyretin 等とは強い正の相関性を、prostaglandin D2 synthase とは強い負の相関性を示した。このことは、ZAGが本疾患における、ステロイドの治療効果を反映するたんぱく質の一つであることを示す。さらに、ZAGを軸にして、本疾患患者の解析で得られた約140種類の血清たんぱく質全てについて網羅的な相関解析を行ったところ、腸管バクテリアに反応



する補体第3経路（レクチン経路）の第一ステップの律速酵素、MBL-associated serine protease (MBLP-1) isoform 2が強い負の相関性を示した（即ち、発症時に高く治療により低下する）。一方、類縁酵素には相関性は見られなかった。MBLP-1が炎症系の最上流部に位置するたんぱく質の一つであることを考慮すると、ネフローゼ（微小変化型）の発症機構は、図30に示したように、腸管細菌と補体第3経路活性化が関与している可能性を示唆する。仮説が正しければ、副作用の多いステロイドに代わる創薬ターゲットも考えられる（図30）。

一方、観点を変わると、本解析結果で得られたcICAT法による各たんぱく質の発現比が正確であり、臨床情報を反映していることを示唆する。従って、糖尿病等の複雑な素因を持つ慢性疾患の場合でも、臨床情報を数値化して、層別解析を行うことにより、疾患関連たんぱく質を見出せる可能性を示すものと考えられる。なお、最近、開発された同位体標識法のiTRAQ法を用いて標準血清（外国人プール血清）を解析すると、confidence 95%で約250種類の血清たんぱく質の同定と定量が可能であったが、MBLP-1や prostaglandin D2 synthase等は含まれていなかった。cICAT法はスループット性では劣るものの、システイン残基に特化するため、より低濃度のたんぱく質も解析できる利点を発揮したものと考えられる。

さて、創薬ターゲットを念頭に考えると、組織・細胞のたんぱく質の解析が重要である。今回、組織・細胞のcICAT法によるワークフローを構築し、実際の臨床検体（胃がん患者組織）の解析を開始した。血清の場合と異なり、組織の解析では、100 $\mu$ gを用いてcICAT法で解析すると、25分画で約700-1000種類、100分画では2000種類以上の組織たんぱく質の同定と定量が可能であった。この中には、受容体等も多数含まれる。今後、ルーチンの解析体制をさらに充実して臨床検体の解析を促進したい。

## E. 結論

本年度の疾患関連たんぱく質解析研究により、以下の結論を得た。

1. 血清糖たんぱく質の糖鎖は、ある種の疾患に関連して変動することが知られている。本研究では、血清糖たんぱく質の部位特異的な糖鎖の変動を一斉に分析することを目的として、LC/MS/MSを用いた血清主要糖たんぱく質の部位特異的糖鎖プロファイリング法を開発し、血清トリプシン消化物の標準的糖鎖プロファイルを作成した。

ニトロセルロース膜を固相化担体として用いる新規アフィニティーパンニング法を用いることにより、500pgという微量のたんぱく質を抗原として目的抗体クローンを単離しうることを明かとし、臨床サンプルから見出される疾患関連たんぱく質に対するモノクローナル抗体を、迅速かつ効率的に創製可能であることが示唆された。

安全性・有効性に優れた新規PTD（Tatペプチドのアミノ酸置換体）の創製を目指し、独自の最適化されたファージ表面提示法を駆使したところ、Tatペプチドよりも導入効率に優れた新規PTDを得ることに成功した。

2. 国立循環器病センターにおいて、循環器疾患領域でプロテオーム解析に適切と考えられる10課題を選択し、倫理委員会の承認を受けて研究を実施に移した。検体数の収集に時間を要する3課題以外については18年度に第一段階の試料収集、創薬プロテオームファクトリー施設への送付を完了し、解析結果が得られ次第、臨床情報を含めた比較・解析、第二段階の試料収集に移行できる状況とした。試料の採取、処理、情報の取得、これらの保管、保護などについては、臨床研究の指針、個人情報保護法に従うだけでなく、倫理委員会の結論や指示に従ったより厳しい手順を作成し、実際に運用、実施した。問題の発生なくより確実に研究が実施でき、高度な情報が得られるように改善を続けている。

3. エネルギー代謝調節に関与する生理活性ペプ

チドの探索を培養脂肪細胞系を用いて行い、ブタ脳より  $\alpha$ -MSH を単離・同定した。また、ラット脂肪組織抽出物中に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を示す複数の分画を確認した。今後、脂肪細胞機能を制御する新しい生理活性ペプチドの同定が期待できる。

4. 組織内の微量のたんぱく質をショットガン解析法で解析し病態との関連を検索するためには、2D-HPLC を含めた高度の分離法と高感度の解析法が必要である。ペプチド解析も困難ではあるが、たんぱく質の分解を抑制する方法論が確立できれば、疾患マーカーには十分使用可能で、かつたんぱく質より分離・解析が容易である。血液についても、補体系や凝固系などのプロテアーゼがコントロールできれば、ペプチドや低分子量たんぱく質も大きな標的であることが確認された。

存在量に極端な違いのあるプロテオームやペプチドームを解析対象とし標的たんぱく質やペプチドを探索するには、一定濃度以上で存在し且つ安定な物質に対象が絞られる上、実際に疾患マーカーとして使用するには、安定性や検出の容易さも不可欠な要件である。Villanueva らの報告のように、特定の切断や断片化に着目する手法もペプチド解析と関連して重要と考えられ、特異的な標的、微量たんぱく質やペプチドが対象という立場を一度離れ、再検討する必要があると考えられた。

5. 患者検体を用いたプロテオーム解析により、パーキンソン病において変動するたんぱく質の第一次候補が得られた。さらに供給数を増加させるとともに、髄液を用いた研究アプローチが可能になった。また、UCH-L3 欠損マウスの病態解析を行い、変異 SOD 凝集に関する新たな機序を見出した。

6. ポストゲノム時代に疾患に関連した遺伝子情報が集積した上で、これらの情報を疾患の診断及び治療にいかにかかすかが今後の課題になる。特に糖尿病の特徴は、国内患者：740 万人、潜在的には推計 1620 万人と患者数が多い上にさらに増

加傾向にあること、患者の 90%以上を占める 2 型糖尿病がインスリン分泌低下及びインスリン抵抗性が合併して発症する多因子性疾患であることである。このため、本プロジェクトにて糖尿病患者由来サンプルを大規模に収集し、蛋白の網羅的同定を行い、蛋白プロファイルと様々な臨床情報との関連性についてバイオインフォマティクス技術を用いて多変量解析することによって、遺伝子素因、環境因子、合併症等の影響が加味された上での病態に合わせた新しい治療法の開発、病態や病期を診断可能な新規のバイオマーカー開発によって、糖尿病の診療に貢献することが期待される。また、呼吸器疾患等の糖尿病以外の疾患においても、同様のアプローチは有用であると考ええる。また、*in vitro* でヒトサイトカインにて分化させたマクロファージのプロテオーム解析によって、組織マクロファージへの分化の分子機構及びその感染防御における役割の解明が期待される。

7. 小児のネフローゼ症候群の患者においてプロテオーム解析を行った。バイオインフォマティクスを用いた解析により、数種類のたんぱく質が統計学的に有意に関連があることが明らかになったが、今後生物学的・医学的関連性について解明を行っていく必要があると考えられた。

8. 加齢関連疾患（認知症・骨粗鬆症）の臨床検体の創薬プロテオームファクトリー施設への提供を継続した。nanoLC-MS/MS を用いた微量たんぱく質の解析システムによって AD 患者ならびに他の疾患さらには健常人の脳脊髄液から、主要なたんぱく質を同定した。また、CADASIL 脳のプロテオーム解析から微小血管に Notch3 の細胞外領域が蓄積していることを明らかとした。培養骨芽細胞において、FGF-2 による VEGF 産生に SAPK/JNK が関与し、p70 S6 キナーゼによるネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

9. 乳癌、閉塞性肺疾患、運動ニューロン病などの血清又は組織のプロテオーム解析を実際に進めていく段階に達した。さらに解析に必要な検体数を

確保するために、検体の集積を続けていく予定である。今後、プロテオーム解析によって得られた結果の、詳細な解析に入る。

10. 尿 10~15ml を出発材料として分子量 10 kDa 以上の蛋白質画分に対して、イオン交換クロマトグラフィー (82 分画) nanoLC/ESI-MS/MS により、約 300~400 種のたんぱく質の同定が行えることがわかった。また、その内約 1/3 が膜たんぱく質由来であるという興味深いデータが得られた。

尿由来糖たんぱく質・糖ペプチドの糖鎖構造を nanoLC/ESI-MS/MS により網羅的に解析できることがわかった。また、尿から糖ペプチドを効率よく分離、MS による検出が行える方法を確立した。

健常者 (7 例) 及び患者尿 (24 例) の比較解析より、肺癌患者尿よりマーカー候補ペプチド (X) を見出した。さらに、16 例の患者尿についてペプチド X の存在様式を調べた。また、ペプチドの定量解析は、安定同位体  $^{18}\text{O}$  標識法と MALDI-MS により再現性よく行うことができた。その結果、ペプチド X は特定の癌種において尿中への排泄量が増えていることが示唆された。

11. レーザーマイクロダイセクション法を用いて大腸癌細胞に発現する酸性糖脂質及び、N 型糖鎖構造を、詳細に解析した。

12. これまでに、疾患関連血清たんぱく質解析フロー (cICAT 法) に基づき、各研究協力機関から提供された各種疾患試料 (合計 465 検体 (主として血清試料)) の約 66% の解析を完了し、疾患関連たんぱく質データベースに入力した。創薬プロテオームファクトリー施設で得られたたんぱく質発現解析結果を各研究協力機関に開示し、臨床情報および変動するたんぱく質との相関性解析をすることにより、疾患関連たんぱく質の探索を行った。その結果、小児ネフローゼ症候群 (微小変異型) において、発症に関与する可能性のある複数の疾患関連血清たんぱく質を見出した (特許 2 件出願)。他疾患でも同様な解析が可能であることを

示すものとする。創薬ターゲットの可能性を多く含む組織たんぱく質の解析については、部位特異的組織のたんぱく質解析 cICAT ワークフロー法 (約 700 - 1000 種類を同定・定量) を構築し、研究協力機関より提供された組織試料 (胃がん・正常組織等) のルーチン解析を開始した。以上、得られた各たんぱく質発現比および臨床情報の数値化を行い、疾患関連たんぱく質を探索する可能にするデータベース作成に着手した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Yoshinao Wada, Parastoo Azadi, Catherine E. Costello, Anne Dell, Rudolf Geyer, Kazuki Kakehi, Niclas G. Karlsson, Koichi Kato, Nana Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Soohyun Kim, Akihiro Kondo, Kazuyuki Nakamura, Hisashi Narimatsu, Milos V. Novotny, Nicolle H. Packer, Helene Perreault, Jasna Peter-Katalinic, Gottfried Pohlentz, Vernin N. Reinhold, Pauline M. Rudd, Akemi Suzuki, And Naoyuki Taniguchi: Mass spectrometry of glycoprotein glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional study. *Glycobiology*, in press
2. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS<sup>n</sup> for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press

3. Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Toru Kawanishi: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
4. Yanyang Zhao, Satsuki Itoh, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, and Jianguo Gu: Deletion of core fucosylation on  $\alpha 3\beta 1$  integrin down-regulates its functions, *J. Biol. Chem.*, 281, 38343-38350 (2006)
5. Yanyang Zhao, Yakatoshi Nakagawa, Satsuki Itoh, Kei-ichiro Inamori, Tomoya Isaji, Yoshinobu Kariya, Akihiro Kondo, Eiji Miyoshi, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, Jianguo Gu: N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on  $\alpha 3\beta 1$  integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.*, 281: 32122 – 32130
6. 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, 早川堯夫監修, エル・アイ・シー (東京) 印刷中
7. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 印刷中
8. 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第7回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 印刷中
9. 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる第5回, *Pharm. Tech. Japan*, 22, 91-99 (2006)
10. 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: 糖タンパク質性医薬品の試験法に関する研究 – LC/MS/MS を用いたペプチドマッピング. *医薬品研究*, 37, 438-447 (2006)
11. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 日向昌司, 川西 徹: 局方組換えタンパク質性医薬品の糖鎖試験法に関する研究 – LC/MSn を用いた糖鎖プロファイリング. *医薬品研究*, 37, 448-456 (2006)
12. Imai S., Mukai Y., Nagano K., Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nomura T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies., *Biol. Pharm. Bull.*, 29(7): 1325-1330, 2006.
13. Mukai Y., Sugita T., Yamato T., Yamanada N., Shibata H., Imai S., Abe Y., Nagano K., Nomura T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel protein transduction domain (PTD) mutants by a phage display-based high-throughput screening system., *Biol. Pharm. Bull.*, 29(8): 1570-1574, 2006..
14. Kawamura M., Shibata H., Okamoto T., Mukai Y., Sugita T., Abe Y., Imai S., Nomura T., Nagano K., Mayumi T., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Kamada H., Tsunoda S. : A novel method for construction of gene fragment library to searching epitopes., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346: 198-204, 2006.
15. Mukai Y., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Sugita T., Imai S., Abe Y., Nagano K., Nomura T., Kamada H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., Tsunoda S. : Optimization of anti-tumor necrosis factor-alpha single chain Fv displayed on phages for creation of functional antibodies., *Pharmazie*, 61: 889-890, 2006.
16. Yoshikawa T., Imazu S, Gao J.Q., Hayashi

- K., Tsuda Y., Okada N., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S. : Non-methylated CpG motif packaged into fusogenic liposomes enhance antigen-specific immunity in mice. *Biol Pharm Bull.* 29: 105-109, 2006.
17. Yoshikawa T., Okada N., Tsujino M., Gao J.Q., Hayashi A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Yamamoto A., Nakagawa S. : Vaccine efficacy of fusogenic liposomes containing tumor cell-lysate against murine B16BL6 melanoma. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 100-104, 2006.
  18. Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. : Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain., *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
  19. Gao J.Q., Kanagawa N., Motomura Y., Yanagawa T., Sugita T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S. : Cotransduction of CCL27 gene can improve the efficacy and safety of IL-12 gene therapy for cancer., *Gene Ther.*, in press.
  20. Hayashi A., Wakita H., Yoshikawa T., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Mukai Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S. : A strategy for efficient cross-presentation of CTL-epitope peptides leading to enhanced induction of in vivo tumor immunity., *J Control Release.*, in press.
  21. Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library., *Pharmazie*, in press.
  22. Tanimoto T., Yamamoto S., Tani M., Taniguchi M., Ariyasu H., Ushio C., Aga M., Mukai Y., Tsutsumi Y., Ariyasu T., Ohta T. and Fukuda S. : The combination of IFN- $\alpha$ 2 and IFN- $\alpha$  8 exhibits synergistic antiproliferative activity on renal cell carcinoma (RCC) cell lines through increased binding affinity for IFNAR-2., *J. Interferon. Cytokine. Res.*, in press.
  23. Harada M., Kondoh M., Ebihara C., Takahashi A., Komiya E., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y. : Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem Pharmacol.*, in press.
  24. Ebihara C., Kondoh M., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y. : Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol.*, in press.
  25. Abe Y., Shibata H., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nakagawa S. : Promotion of optimized protein therapy by bioconjugation as a polymeric DDS., *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agent's*, 6: 251-258, 2006.
  26. 鎌田春彦, 堤 康央 : 創薬の立場からの DDS: プロテオーム創薬からの DDS 開発, *最新医学*, 61(6): 73-79, 2006.

27. Yoshikawa T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., :  
Development of nanomedicine using  
intracellular DDS., *Nippon Rinsho*, 64:  
247-252, 2006.
28. 堤 康央 : レクチャーノート : DDS の新しい  
潮流(5)~疾患プロテオミクス研究と DDS  
~, *Drug Metabolism and  
Pharmacokinetics.*, 21: 8-11, 2006.
29. 鎌田春彦, 鈴木 宏治 : MC-FAN 血液さら  
さら度への血小板の寄与., *血栓と循環*, 14(2),  
79-83, 2006.
30. 堤 康央, 石井明子, 早川堯夫 : 機能性人工  
タンパク質., *バイオ医薬品の品質・安全性評  
価<増補改訂版>*, in press.
31. Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y. :  
Development of new anti-TNF therapy., *日  
本炎症再生医学会誌*, in press.
32. 向 洋平, 堤 康央, 中川晋作 : 膜透過性ペ  
プチド., *遺伝子医学*, in press.
33. Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H,  
Miyazato M, Date Y, Nakazato M,  
Kangawa K, Murakami N. Effects of  
ghrelin and des-acyl ghrelin on  
neurogenesis of the rat fetal spinal cord.  
*Biochem Biophys Res Commun*, 350:  
598-603, 2006.
34. Date Y, Shimbara T, Koda S, Toshinai K, Ida  
T, Murakami N, Miyazato M, Kokame K,  
Ishizuka Y, Ishida Y, Kageyama H, Shioda  
S, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral  
ghrelin transmits orexigenic signals  
through the noradrenergic pathway from  
the hindbrain to the hypothalamus. *Cell  
Metab*, 4: 323-331, 2006.
35. Chen T, Zhou M, Walker B, Harriot P, Mori  
K, Miyazato M, Kangawa K, Shaw C.  
Structural and functional analogs of the  
novel mammalian neuropeptide,  
neuromedin S(NmS), in the dermal  
venoms of Eurasian bombinid toads.  
*Biochem Biophys Res Commun*, 345:  
377-384, 2006.
36. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG,  
Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal  
MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N,  
Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M.  
Des-acyl ghrelin induces food intake by a  
mechanism in-dependent of the growth  
hormone secretagogue receptor.  
*Endocrinology*, 147: 2306-2314, 2006.
37. Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M,  
Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M,  
Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, Kangawa  
K, Murakami N. Maternal ghrelin plays  
an important role in rat fetal development  
during pregnancy. *Endocrinology*, 147:  
1333- 1342, 2006.
38. K. Komori, M. Konishi, Y. Maruta, M.  
Toriba, A. Sakai, A. Matsuda, T. Horii, M.  
Nakatani, N. Minamino and T. Akizawa:  
Characterization of a novel  
metalloproteinase in Duvernoy's gland of  
*Rhabdophis tigrinus tigrinus*. *J. Toxicol.  
Sci.*, 31, 157-168 (2006)
39. S. Nagata, J. Kato, K. Sasaki, N. Minamino,  
T. Eto, K. Kitamura: Isolation and  
identification of proangiotensin-12, a  
possible component of the  
renin-angiotensin system. *Biochem.  
Biophys. Res. Commun.*, 350, 1026-1031  
(2006)
40. Hattori, K., Uchino, S., Isosaka, T.,  
Maekawa, M., Iyo, M., Sato, T., Kohsaka, S.,  
Yagi, T. and Yuasa, S.: Fyn is required for  
haloperidol-induced catalepsy in mice. *J.  
Biol. Chem.* 281 (2006) 7129-7135
41. Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Nakamura,  
Y., Ondo, Y., Uchiyama, T., Tsutsumi, M.,

- Hirasawa, T. and Kohsaka, S.: Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor. *J. Neurochem.* 97 (2006) 1203-1214
42. Yogosawa, S., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Kominami, E., Shiba, Y., Nakayama, K., Kohsaka, S. and Akazawa, C.: Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability. *BBRC.* 350 (2006) 82-90
43. Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M. and Wada, K.: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. *Am. J. Pathol.*, 169 (2006) 132-141
44. Kabuta, T., Suzuki, Y. and Wada, K.: Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 30524-30533
45. Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kowan, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M. and Wada, K.: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int.*, 50 (2007) 119-129
46. Murata, M.: Pharmacokinetics of L-dopa special reference to food and aging. *J. Neurology* 253(2006) [Suppl 3] III 47-52
47. Murata, M., Hasegawa, K. and Kanazawa, I.: The Japan Zonisamide on PD Study Group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study. *Neurology* 68(2007) 45-50.
48. Funayama, M., Li, Y., Tomiyama, H., Yosino, H., Imamichi, Y., Yamamoto, M., Murata, M., Toda, T., Mizuno, Y. and Hattori, N.: LRRK2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. *Neuro Report* (in press)
49. Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Mol Cell Biochem.* in press.
50. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Harada A, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S, Ohta T, Kozawa O. Negative regulation by p70 S6 kinase of FGF-2-stimulated VEGF release through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* in press
51. Hanai Y, Tokuda H, Takai S, Harada A, Ohta T and Kozawa O. (2006) Minodronate suppresses prostaglandin F2 $\alpha$ -induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *Horm. Meta. Res.* 38:152-158.
52. Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Kato K and Kozawa O. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt plays a role in sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 98:1249-1256.
53. Hanai Y, Tokuda H, Ishisaki A, Matsushima-Nishiwaki R, Nakamura N, Yoshida M, Takai S, Ohta T, and Kozawa O. (2006) Involvement of p44/p42 MAP kinase in insulin-like growth factor-I-induced

- alkaline phosphatase activity in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 251:42-48.
54. Hanai Y, Tokuda H, Ohta T, Nishiwaki-Matsushima R, Takai S and Kozawa O. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt auto-regulates PDGF-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 99:1564-1571.
  55. Takai S, Tokuda H, Yoshida M, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kato K, Kozawa O. (2006) Prostaglandin D2 induces the phosphorylation of HSP27 in osteoblasts: function of the MAP kinase superfamily. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75:61-67.
  56. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt plays a part in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Horm. Meta. Res.* 38:563-569.
  57. Tanabe K, Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Hirade K, Katagiri Y, Dohi S and Kozawa O. (2006) Modulation by the steroid/thyroid hormone superfamily of TGF- $\beta$ -stimulated VEGF release from vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biochem.* 99:187-195.
  58. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S.: Mono-unsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion., *Developmental Cell*, 11, 791-801 (2006) (co-corresponding author).
  59. Watari A, Takaki K, Higashiyama S, Li Y, Satomi Y, Takao T, Tanemura A, Yamaguchi Y, Katayama I, Shimakage M, Miyashiro I, Takami K, Kodama K, Yutsudo M.: Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. *Oncogene* 25, 7373-7380 (2006).
  60. Yokosuka T, Yoshinari K, Kobayashi K, Ohtake A, Hirabayashi A, Hashimoto Y, Waki I, Takao T. Information-Based-Acquisition (IBA) technique with an ion-trap/time-of-flight mass spectrometer for high-throughput and reliable protein profiling. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20, 2589-95 (2006).
  61. Kita K, Okumura N, Takao T, Watanabe M, Matsubara T, Nishimura O, Nagai K.: Evidence for phosphorylation of rat liver glucose-regulated protein 58, GRP58/ERp57/ER-60, induced by fasting and leptin. *FEBS Lett.* 580, 199-205 (2006).
  62. 高尾敏文: 質量分析の可能性 -未知生体分子の探索ツールとして-, 生体の科学、金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院、Vol.56, 621-625 (2005)
  63. H. Korekane, K. Shida, K. Murata, M. Ohue, Y. Sasaki, S. Imaoka, Y. Miyamoto, Evaluation of laser microdissection as a tool in cancer glycomic studies, *Biochem Biophys Res Commun* 352 (2007) 579-586.
  64. H. Korekane, S. Tsuji, S. Noura, M. Ohue, Y. Sasaki, S. Imaoka, Y. Miyamoto, Novel fucogangliosides found in human colon adenocarcinoma tissues by means of glycomic analysis, *Analytical Biochemistry*, in press.

## G-2. 学会発表

1. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴,



- 松石 紫, 川西 徹: LC/MS<sup>n</sup> を用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第 6 回日本蛋白質科学年会 (2006, 4)
2. Kotone Sano, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yasunori Miyamoto, Haruko Ogawa: Reduced glycosylation of vitronectin modulates the tissue lytic system and stellate-cell spreading during liver regeneration. International Symposium on Extracellular Glycomatrix in Health and Disease. (2006, 6, 15-17) Awajishima
  3. Yanyang Zhao, Jianguo Gu, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Naoyuki Taniguchi: Deletion of core fucosylation on  $\alpha 3 \beta 1$  integrin down-regulates its functions. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  4. Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi: Differential analysis of N-linked oligosaccharides in kidney of human systemic lupus erythematosus (SLE) model mouse by LC/MS. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  5. Kotone Sano, Kimie Asanuma, Nana Kawasaki, Fumio Arisaka, Haruko Ogawa: How Glycosylation Activates Multifunctional Extracellular Matrix Glycoprotein, Vitronectin, during Liver Regeneration. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  6. Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Nakajima, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi: Glycosylation analysis of IgLON family glycoproteins in rat brain by LC/MS<sup>n</sup> (II). 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  7. Yasuhiko Kizuka, Nobuaki Maeda, Nana Kawasaki, Toshisuke Kawasaki, Shogo Oka: A unique type of HNK-1 carbohydrate expressed on phosphacan is biosynthesized by GlcAT-P. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  8. Makoto Baba, Bruce Y. Ma, Matsuishi Yukari, Nana Kawasaki, Makoto Hirano, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki: The lectin jacalin induces T lymphocyte activation through CD45 signaling. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  9. Makoto Hirano, Yong B. Ma, Nana Kawasaki, Kazumichi Okimura, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki: Mannan-binding protein binding to metalloproteases meprin  $\alpha$  and  $\beta$  results in the proteolytic activity inhibition and the complement activation. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  10. Nobuko Kawasaki, Risa Inoue, Motoki Terada, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki,

- Bruce Y Ma, Toshiyuki Kawasaki:  
Characteristic endogenous ligands for  
mannan-binding protein expressed on  
SW1116 human colon cancer cells. 20<sup>th</sup>  
IUBMB International Congress of  
Biochemistry and Molecular Biology and  
11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
11. 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴,  
中島 紫, 山口照英, 早川堯夫, 川西 徹:  
LC/MS を用いた血清糖タンパク質の部位特  
的糖鎖解析. *Pharmacology and Therapeutics* シンポ  
ジウム (2006, 6, 30) 東京
  12. 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴,  
中島 紫, 川西 徹, 山口照英: LC/MS/MS  
を用いたヒト血清グライコプロテオームの  
解析. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会  
(2006, 7, 18-19) 東京
  13. 佐野琴音, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴,  
安川然太, 佐藤ちひろ, 北島 健, 旭 美穂,  
宮本泰則, 小川温子: 肝再生におけるマトリ  
ックス分子ビトロネクチンの糖鎖変化の定  
量解析とその意義. 平成14~18年度文部  
科学省科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖  
によるタンパク質と分子複合体の機能調節」  
第4回夏期シンポジウム (2006, 8, 8-9) 浜  
松
  14. 野村一也, 水口惣平, 野村和子, 出嶋克史,  
永石貴之, 村田大輔, 安藤恵子, 三谷昌平,  
瀬古 玲, 山下克子, 泉川友美, 北川裕之,  
菅原一幸, 川崎ナナ, 松石 紫, 權 娟大,  
成松 久: 遺伝子破壊による線虫糖鎖関連遺  
伝子の機能解析. 第26回日本糖質学会年  
会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  15. 旭 美穂, 佐野琴音, 橋井則貴, 伊藤さつき,  
川崎ナナ, 柳橋麻衣子, 宮本泰則, 小川温子:  
肝再生過程におけるラット血漿フィブロネ  
クチンの糖鎖構造. 第26回日本糖質学会年  
会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  16. 吉田奈央, 竹原弥生, 佐野琴音, 向山恵津子,  
川崎ナナ, 伊藤さつき, 穂山 浩, 吉岡靖雄,  
米谷民雄, 小川温子: スギヒラタケレクチン  
の精製とその糖特異性. 第26回日本糖質学  
会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  17. 井上里抄, Kay-Hooi Khoo, 寺田基剛, 川崎  
ナナ, Ma Bruce Yong, 川寄敏祐, 川寄伸子:  
血清マンナン結合タンパク質(MBP)に結合  
するヒト結腸ガン細胞上のリガンド糖タン  
パク質. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8,  
23-25) 仙台
  18. 馬場亮人, Ma Bruce Yong, 松石 紫, 川崎  
ナナ, 平野 真, 川寄伸子, 川寄敏祐: レク  
チン jacalin による CD54 を介した T 細胞の  
活性化に関する研究. 第26回日本糖質学会  
年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  19. 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景,  
中島 紫, 山口照英: 細胞治療/再生医療にお  
ける糖鎖解析の重要性と糖鎖を利用した細  
胞特性解析への挑戦. 第4回糖鎖科学コン  
シウムシンポジウム (2006, 10, 23,24) 東京
  20. 長野一也, 向 洋平, 今井 直, 杉田敏樹, 山  
名田夏枝, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦,  
角田慎一, 堤 康央: 非免疫ファージ抗体ラ  
イブラリを用いた疾患関連蛋白質抗体の迅  
速単離法の確立., 第22回日本DDS学会学術  
集会., 東京, 2006年7月.
  21. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 大川亜紀子,  
岡田直貴, 中川晋作, 真弓忠範, 角田慎一,  
堤 康央, 鎌田春彦: TNFR1ヘターゲティ  
ング能を付与した構造変異 TNF- $\alpha$  の創製.,  
第22回日本DDS学会学術集会., 東京, 2006  
年7月.
  22. 鎌田春彦, 阿部康弘, 柴田寛子, 野村鉄也, 鍋  
師裕美, 蓑輪恭子, 角田慎一, 堤 康央, 中  
川晋作: ファージ表面提示法を用いた構造  
変異生理活性蛋白質の創出., 第4回JHUPO  
大会., 東京, 2006年7月.
  23. 阿部康弘, 鎌田春彦, 柴田寛子, 野村鉄也, 鍋  
師裕美, 蓑輪恭子, 角田慎一, 堤 康央, 中

- 川晋作：構造-活性相関情報の迅速集積を目指したレセプター指向性構造変異体の作製., 第4回 JHUPO 大会., 東京, 2006年7月.
24. 今井 直, 向 洋平, 長野一也, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央, 中川晋作：ファージ抗体ライブラリを用いた疾患関連蛋白質抗体の迅速単離法の確立., 第4回 JHUPO 大会., 東京, 2006年7月.
  25. 蓑輪恭子, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 藤田卓也, 山本 昌, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤康央：レセプターへのターゲティング能を付与したアンタゴニスト蛋白質の作製., 第2回創剤フォーラム若手発表討論会., 京都, 2006年10月.
  26. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 角田慎一, 堤 康央, 鎌田春彦, 中川晋作：Gene Shuffling ライブラリによる TNFR1 にターゲティング能を付与した構造変異体の創製., 第2回創剤フォーラム若手発表討論会., 京都, 2006年10月.
  27. 山名田夏枝, 向 洋平, 杉田敏樹, 今井 直, 長野一也, 岡田直貴, 鎌田春彦, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央：細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行性ペプチド(PTD)の機能評価., 第2回創剤フォーラム若手発表討論会., 京都, 2006年10月.
  28. 長野一也, 向 洋平, 今井 直, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 岡田直貴, 鎌田春彦, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央：ファージ抗体ライブラリを駆使した細胞内抗体（イントラボディ）の創製検討., 第2回創剤フォーラム若手発表討論会., 京都, 2006年10月.
  29. 鎌田春彦, 柴田寛子, 阿部康弘, 中川晋作, 眞弓忠範, 角田慎一, 堤 康央：作用の点でのターゲティング能を付与した機能性人工蛋白質の創出., 第56回日本薬学会近畿支部総会・大会, 京都, 2006年10月.
  30. 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央, 中川晋作：「アンタゴニスト活性を有する TNF 変異体の創製と抗炎症治療薬への応用」ファーマ・バイオフィォーラム 2006., 東京, 2006年12月.
  31. 阿部康弘, 柴田寛子, 野村鉄也, 鍋師裕美, 蓑輪恭子, 岡田直貴, 中川晋作, 眞弓忠範, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央：特異的結合能を有する構造変異体のスクリーニング条件の最適化., 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.
  32. 鎌田春彦, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 蓑輪恭子, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央：TNFR1 指向性変異体を目指した新規ファージライブラリの作製., 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.
  33. 柴田寛子, 蓑輪恭子, 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央：アンタゴニスト活性を有した TNF 変異体の創製に関する基礎的検討-1., 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.
  34. 鍋師裕美, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央：三酸化ヒ素刺激による酸化的修飾のプロテオーム解析., 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.
  35. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川 晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央：TNF レセプターの機能解析を目指した TNFR2 指向性変異体の作製., 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.
  36. 蓑輪恭子, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央：アンタゴニスト活性を有した TNF 変異体の創製に関する基礎的検討-2., 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年3月.
  37. 向 洋平, 中村照也, 柴田寛子, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 山縣ゆり子,

- 堤 康央： TNFR1 特異的アンタゴニスト TNF; 3-1C の X 線結晶構造解析., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
38. 今井 直, 向 洋平, 長野一也, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 鎌田春彦, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一： ファージ抗体ライブラリを用いた疾患関連蛋白質抗体の迅速単離法の確立., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  39. 長野一也, 向 洋平, 今井 直, 杉田敏樹, 山名田夏枝, 吉川友章, 鎌田春彦, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央： ファージ抗体ライブラリを用いたイントラボディの効率的創製法の開発., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  40. 杉田敏樹, 山名田夏枝, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央： 細胞内薬物療法の最適化を目指した細胞内移行性ペプチド (PTD) の特性評価., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  41. 角田慎一, 山名田夏枝, 杉田敏樹, 長野一也, 今井 直, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 堤 康央： 細胞内への薬物送達を志向したペプチドキャリアーの特性評価., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  42. 角田慎一, 吉川友章, 長野一也, 今井 直, 向 洋平, 鎌田春彦, 長田直樹, 堤 康央： カニクイザル遺伝子資源に対応する網羅的な抗体作製に向けた基礎検討., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  43. 森重智弘, 吉岡靖雄, 渡辺 光, 鎌田春彦, 向洋平, 角田慎一, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作： 抗腫瘍活性・リンパ組織形成能に優れた機能化 LIGHT 変異体創製に関する基礎的検討., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  44. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向洋平, 角田慎一, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作： 人工リンパ組織構築を目指したリジン欠損リンフォトキシン変異体創製に関する基礎的検討., 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月.
  45. 鎌田春彦, 堤 康央: 新規抗 TNF 療法の開発を目指して., 第 27 回日本炎症・再生医学会., 東京, 2006 年 7 月.
  46. 堤 康央 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発., 小野薬品工業特別講演会, 大阪, 2006 年 9 月.
  47. 堤 康央 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発., ベンチャーキャピタル特別講演会, 東京, 2006 年 9 月.
  48. 鎌田春彦: DDS を視点とした構造変異蛋白質の作製., 第二回 DDS 熊本シンポジウム, 熊本, 2006 年 7 月.
  49. 鎌田春彦: 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2006 年 5 月.
  50. 角田慎一: ゲノム・プロテオーム解析技術の癌診断・治療への応用., 平成 18 年度大阪大学薬友会卒後研修会第 4 回, 大阪, 2006 年 9 月.
  51. 角田慎一: 疾患関連たんぱく質に対する抗体作製とその応用., 小野薬品工業特別講演会, 大阪, 2006 年 9 月.
  52. 角田慎一: 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2006 年 5 月.
  53. Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Tomohiro Morishige, Xinglei Yao, Hikaru Watanabe, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa : Transductional and transcriptional tumor-targeting using adenoviral vector with PEGylation and TERT promoter on systemic administration into tumor-bearing mice., AACR (American Association for Cancer Research) 97th Annual Meeting,