

臨床血清を用いた検証

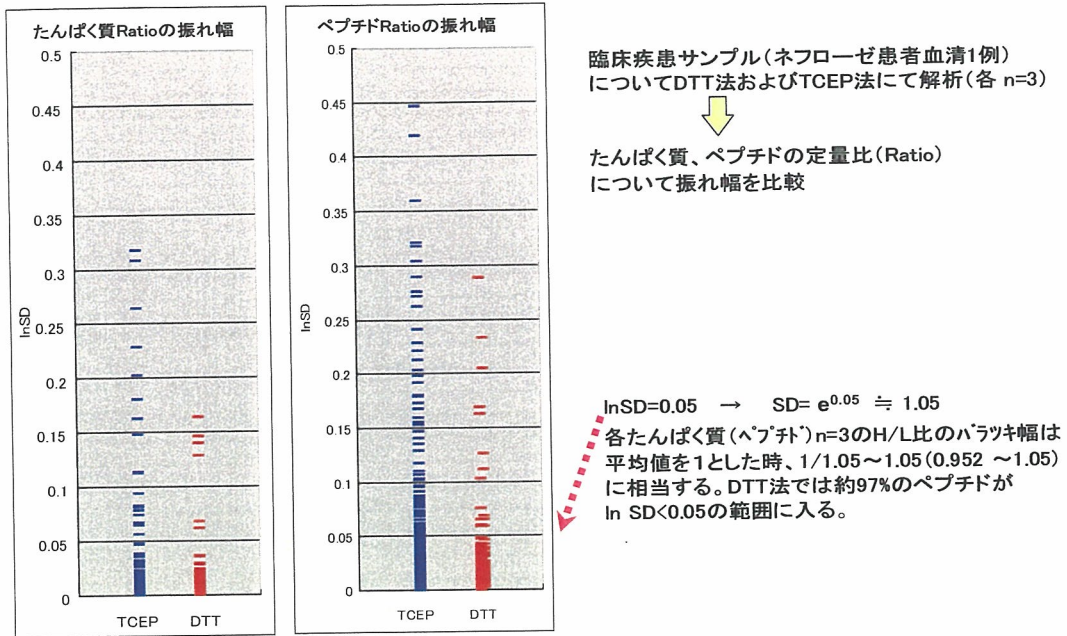


図 22. TCEP と DTT によるクエンチング条件の再検討

表 6. cICAT 法による高発現血清同定たんぱく質の分類表 (220種類一覧)

補体系(30)	Blood transport and binding protein(20)	Protease inhibitor(15)	その他(82)
complement component C1q, A chain	afamin	alpha 2 macroglobulin	aggrecan 1 isoform 1 precursor
complement component C1q, B chain	beta-2-glycoprotein 1	alpha-1 antiprotease, antitrypsin	amyloid beta A4 protein precursor isoform
complement component C1q, C chain	cholesterol ester transfer protein, plasma	alpha-1-antichymotrypsin	attractin isoform 2
complement component 1, r subcomponent	fc fragment of IgG binding protein	alpha-2-antiplasmin	beta actin
complement component 1, r subcomponent-like precursor	hyaluronan binding protein 2	antithrombin III	beta globin
complement component 1, s subcomponent	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	biglycine	cadherin 1 type 1 preproprotein
complement component 2	insulin-like growth factor 2	complement component 1 inhibitor	camosinase glutamate carboxypeptidase like protein
complement component 3	insulin-like growth factor binding protein 2	cystatin C	cartilage acidic protein 1
complement component 4A	insulin-like growth factor binding protein 3	heparin cofactor II	cartilage oligomeric matrix protein
complement component 5	insulin-like growth factor binding protein 4	inter-alpha (globulin) inhibitor H1	cathelicidin antimicrobial peptide
complement component 6	insulin-like growth factor binding protein 5	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	CD14 antigen
complement component 7	insulin-like growth factor binding protein 6	inter-alpha (globulin) inhibitor H3	CD163 antigen isoform a
complement component 8, alpha polypeptide	insulin-like growth factor binding protein 7	inter-alpha (globulin) inhibitor H4	CD44 antigen isoform 1 precursor
complement component 8, beta polypeptide	insulin-like growth factor binding protein, alpha	kallistatin precursor	CD5 antigen-like
complement component 8, gamma polypeptide	lactotransferrin	tissue factor pathway inhibitor	CD59
complement component 9	retinol-binding protein 4, plasma		cell adhesion molecule with homology to L1
complement factor H	selenoprotein P precursor	apolipoprotein(8)	chitinase, di-N-acetyl-
factor H-related protein 1	tetranectin	apolipoprotein A-II	chromosome 20 open reading frame 3
factor H-related protein 2	transthyretin, prealbumin	apolipoprotein B	collectin sub-family member 10
factor H-related protein 3	vitamin D-binding protein	apolipoprotein C-IV	cysteine-rich secretory protein 3
factor H-related protein 4		apolipoprotein D	defensin, alpha 1 preproprotein
factor H-related protein 5	Enzyme(24)	apolipoprotein E	delta globin
complement factor B	a disintegrin-like and metalloprotease (repro	apolipoprotein F	dermcidin precursor
complement factor I	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 3	apolipoprotein L(a)	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein
properdin P factor, complement	biotinidase	apolipoprotein M	extracellular link domain containing 1
complement factor D	butyrylcholinesterase		extracellular matrix protein 1 isoform 1
complement component 4 binding protein, alpha	carboxypeptidase N 83 kDa chain	Common circulating blood protein(14)	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor for CD
complement component 4 binding protein, beta	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD	alpha 1B-glycoprotein	fetuin B; fetuin-like protein
complement receptor type 2	carboxypeptidase U(carboxypeptidase B2)	alpha-1-microglobulin	fibroblast activation protein, alpha subunit
complement component c1a receptor	dipeptidylpeptidase IV	alpha-2-glycoprotein, zinc	fibulin 1 isoform C
	dopamine beta-hydroxylase	alpha-2-HS-glycoprotein	ficolin 2 isoform a
血液凝固・線溶・キニン系(20)	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodi	beta-2-microglobulin	ficolin 3 isoform 1
coagulation factor II	fucosidase	ceruloplasmin	folistatin like 1 precursor
coagulation factor V	lecithin-cholesterol acyltransferase	clusterin isoform 1	galectin 3 binding protein; L3 antigen
coagulation factor V II precursor isoform	glycozyme precursor	fibronectin 1 isoform 3	haptoglobin related protein
coagulation factor IX	mannan-binding lectin serine protease 1	gelsolin isoform a	heparan sulfate proteoglycan 2
coagulation factor X	mannan-binding lectin serine protease 2	hemopexin	HGF activator preproprotein
coagulation factor XI	matrix metalloproteinase 2 preproprotein	orosomucoid 1	hypothetical protein MGC45378
coagulation factor XII	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	orosomucoid 2	immunoglobulin J chain
coagulation factor XIII A chain	matrix metalloproteinase 9 preprotein	peptidoglycan recognition protein L	immunoglobulin superfamily, member 4
coagulation factor XIII B subunit	metalloproteinase inhibitor 1 precursor	vitronectin	interleukin 1 receptor accessory protein iso
protein C	pancreatic ribonuclease		intracellular adhesion molecule 2 precursor
protein S	paraoxonase 1	血小板由来(9)	keratin 1
protein Z	plasma glutathione peroxidase 3	glycoprotein V (platelet)	keratin 6A
histidine-rich glycoprotein	prenylcysteine oxidase 1; prenylcysteine ly	glycoprotein VI (platelet)	L1 cell adhesion molecule isoform 1 precu
plasminogen	tryptophan/serine protease	latent transforming growth factor beta bind	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
plasma kallikrein B		multimerin 1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, sub
kininogen(H+L)		platelet factor 4	lipopolysaccharide-binding-protein precursor
von Willebrand factor		pro-platelet basic protein	L-plastin 1
fibrinogen, alpha chain isoform alpha-E pre		secreted protein, acidic, cysteine-rich (oste	
fibrinogen, beta chain preproprotein		thrombospondin 1	
fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A		triggering receptor expressed on myeloid ce	

分類参照: Molecular & Cellular Proteomics 1:947-955,2002

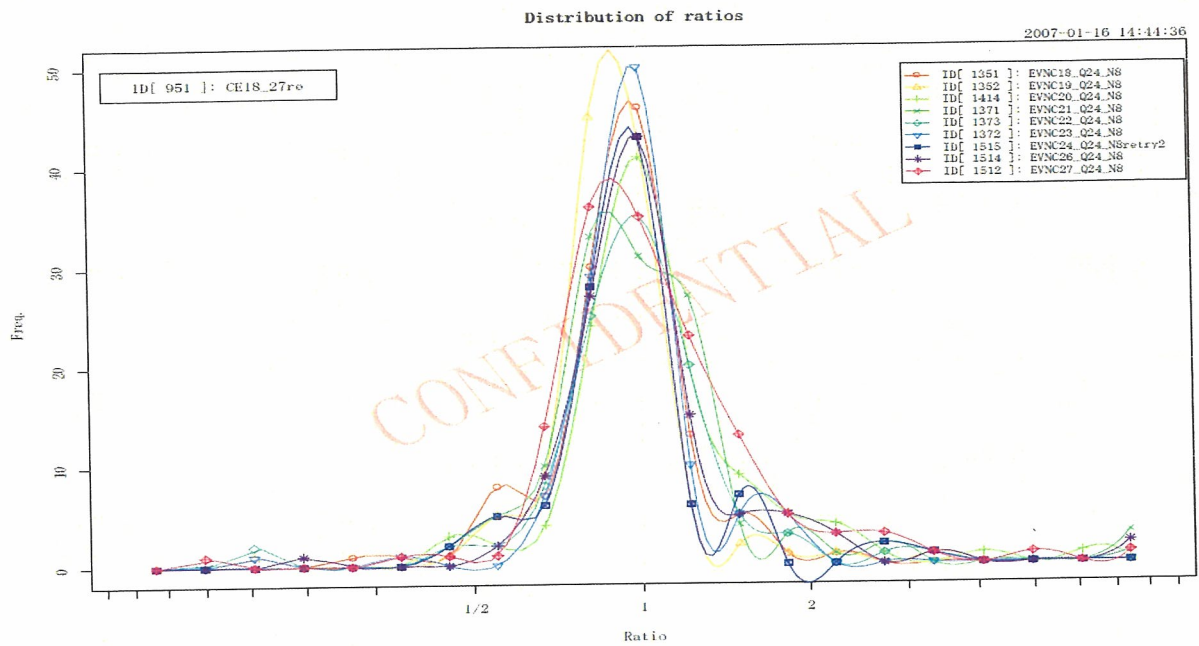


図 23. 糖尿病患者血清解析で得られた全たんぱく質の Ratio (H/L) の分布パターン

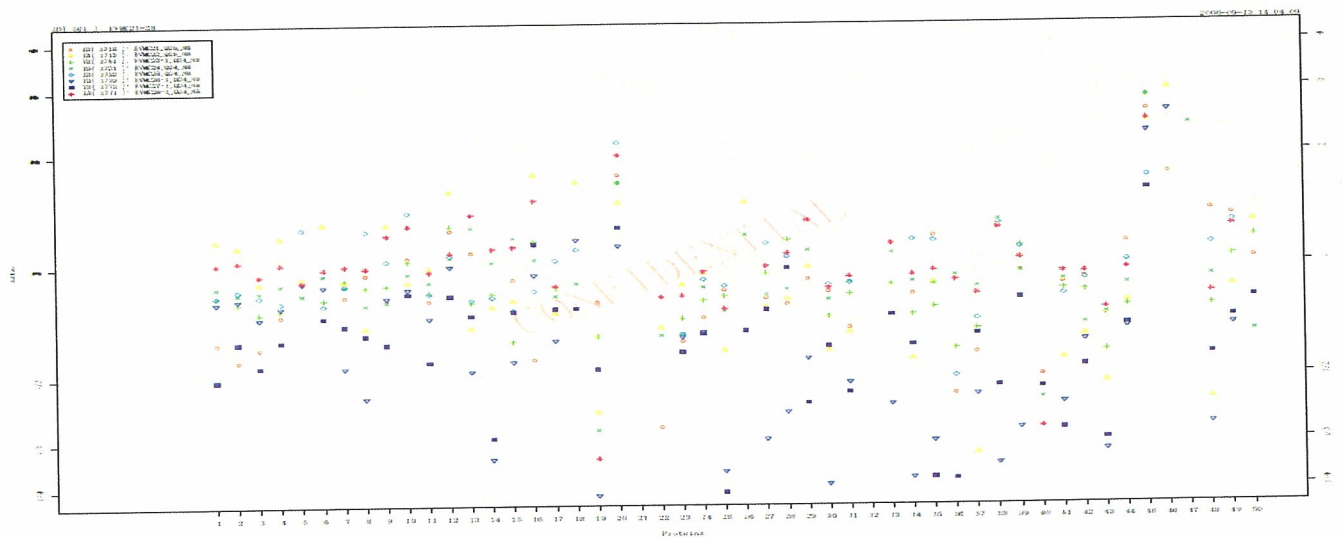


図 24-1. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L) の分布 (1)

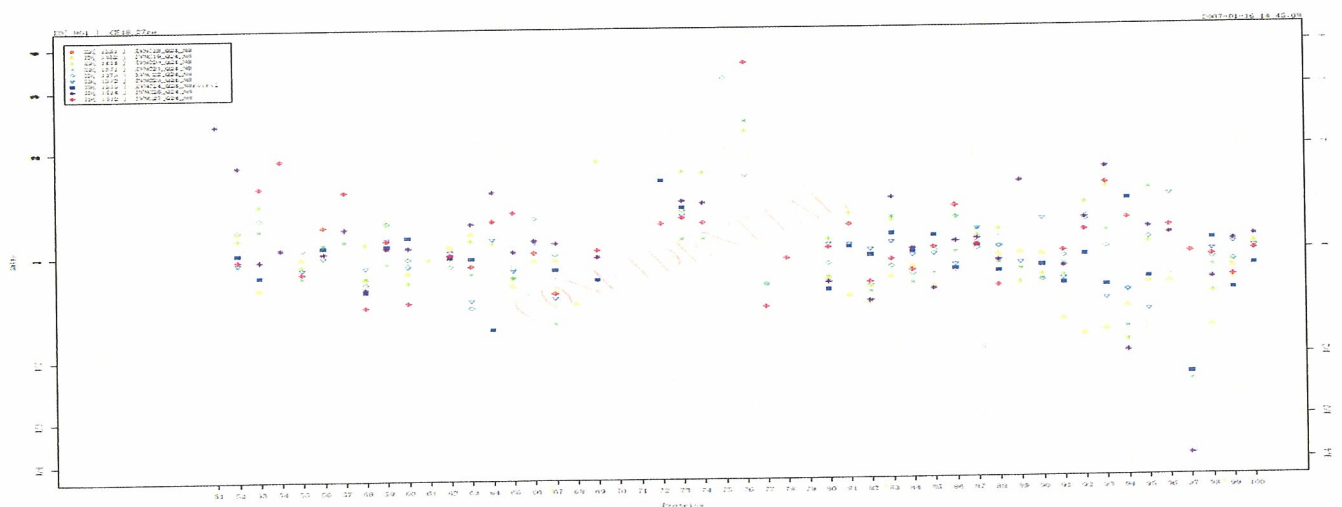


図 24-2. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L) の分布 (2)

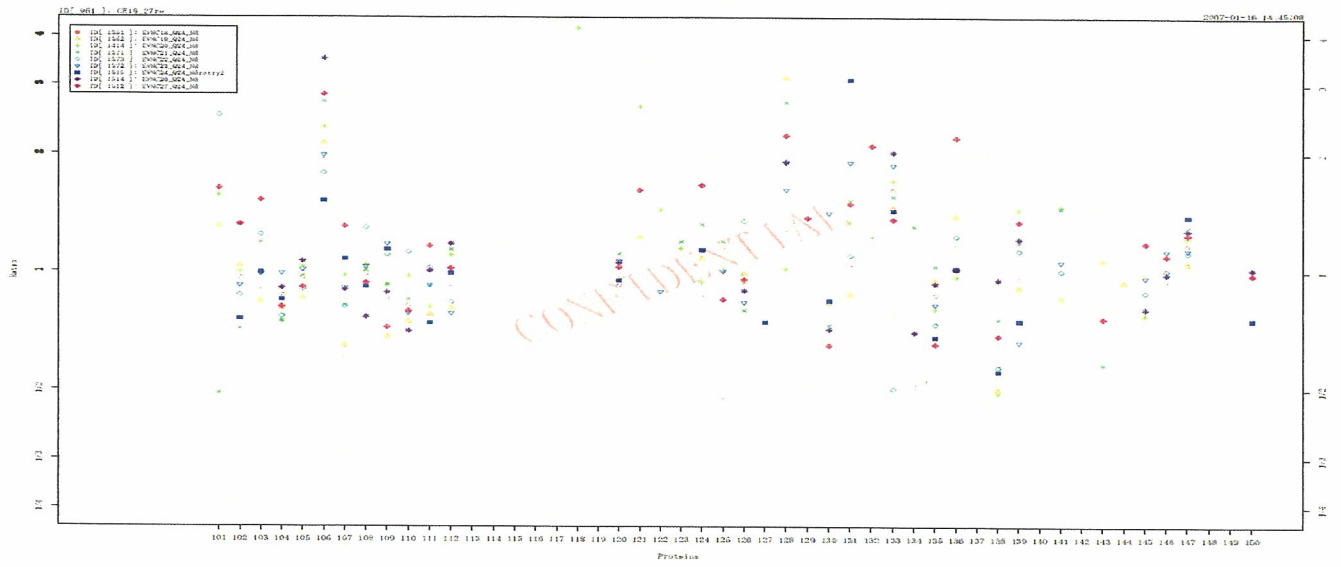


図 24-3. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L)の分布 (3)

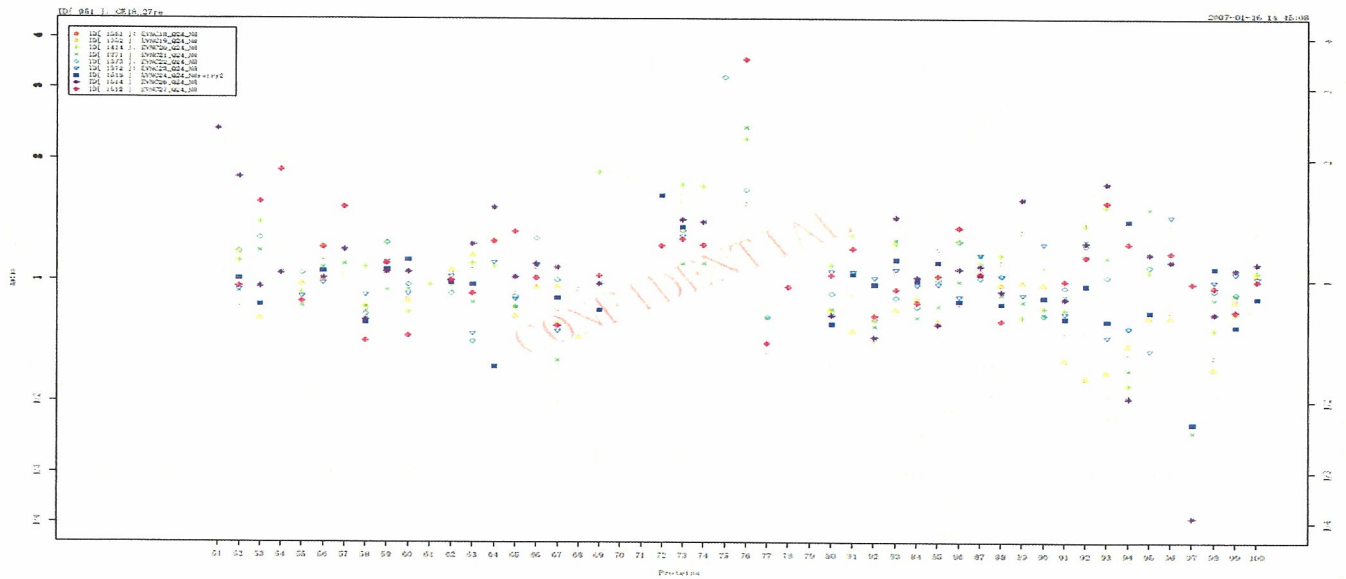


図 24-4. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L)の分布 (4)

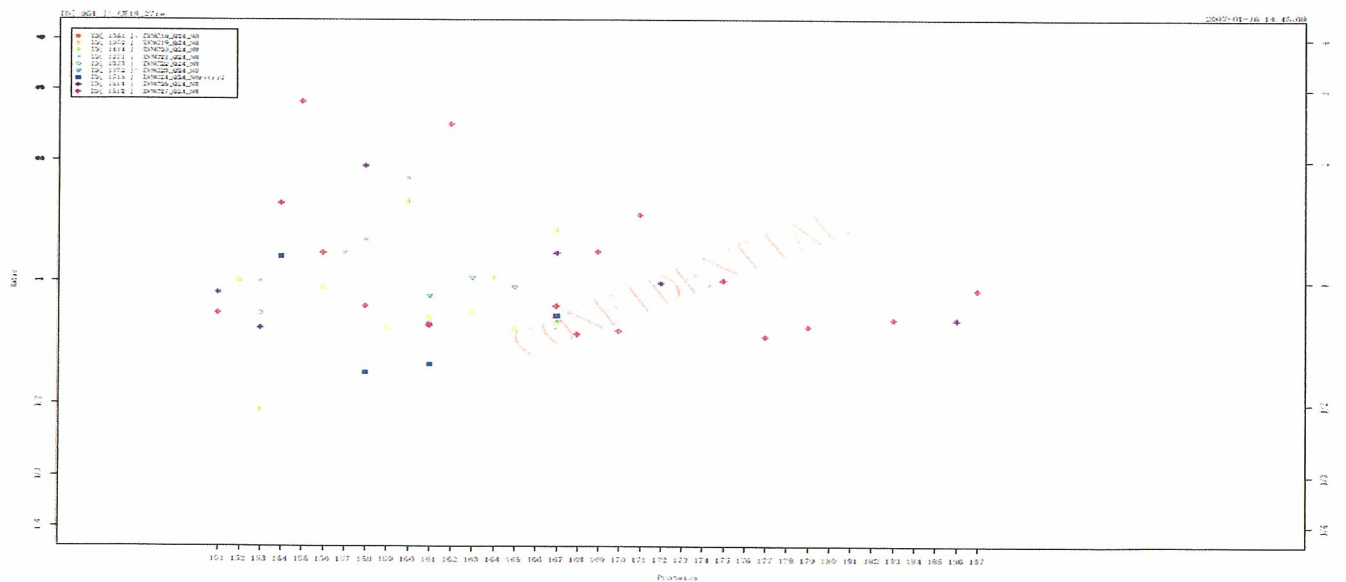


図 24-5. 糖尿病患者の血清各たんぱく質毎の Ratio (H/L)の分布 (5)

表7 各疾患における閾値を超えた (H/L: <0.63, >1.60) 代表的血清たんぱく質の解析結果 (H/L比)

	外国人(4名)	日本人(4名)	PD病(10名)	ネフローゼ(5名)			糖尿病(20名)	骨粗鬆症(15名)
				治療前	治療中	治療後		
Factor H-related 1	0.89 (0.15)	0.94 (0.22)	1.26 (0.23)	1.24 (0.21)	1.36 (0.23)	1.30 (0.14)	1.76 (0.21)	1.60 (0.36)
Factor H-related 3	1.12 (0.33)	N/A	1.34 (0.28)	1.42 (0.20)	1.12 (0.33)	0.79 (0.20)	1.53 (0.41)	1.81 (0.17)
CD5 antigen	1.16 (0.42)	1.14 (0.11)	1.02 (0.3)	0.74 (0.42)	0.59 (0.49)	0.78 (0.55)	1.86 (0.34)	1.14 (0.46)
ZAG	1.08 (0.40)	0.99 (0.15)	1.13 (0.46)	1.18 (0.43)	3.27 (0.57)	0.82 (0.24)	1.33 (0.46)	1.37 (0.29)
Ficolin 2	1.06 (0.42)	1.99 (0.30)	2.05 (0.15)	2.96 (0.47)	3.42 (0.55)	3.00 (0.69)	4.99 (0.54)	5.91 (0.20)
Filamin-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.24 (1.14)**
Profilin 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.28 (0.10)
Pancreatic RNAse	1.15*	N/A	1.03 (0.27)	0.98 (0.22)	0.94 (0.18)	0.76 (0.36)	1.67 (0.34)	2.21 (0.30)
Peptidylprorylisome A	ND	ND	2.55*	ND	ND	ND	N/A	8.27 (0.07)***
LPL(a)	0.94 (1.35)	0.47(1.25)	0.66 (0.86)	0.75 (0.89)	0.79 (0.89)	0.87 (0.82)	0.17 (0.85)	0.40 (0.6)
cf								
Vitamin D-BP	0.91 (0.11)	0.90 (0.09)	0.95 (0.11)	0.85 (0.13)	0.7 (0.20)	0.90 (0.10)	0.93 (0.12)	0.94 (0.11)
Apo B	0.87 (0.09)	0.94 (0.09)	1.03 (0.08)	1.04 (0.13)	1.06 (0.28)	0.86 (0.21)	0.78 (0.39)	1.24 (0.16)
Apo C-IV	0.87 (0.11)	1.01 (0.08)	0.90 (0.12)	1.02 (0.17)	1.24 (0.17)	0.89 (0.17)	0.73 (0.49)	1.25 (0.38)
Total proteins	0.96 (0.23)	0.95 (0.18)	1.18 (0.18)	1.00 (0.29)	0.99 (0.31)	1.20 (0.33)	1.22 (0.26)	1.41 (0.26)

標準血清をL、各血清をHとした時のH/L比を示す。閾値を <0.63, >1.60 とした時に、各疾患で閾値を超えたたんぱく質の値を表示し、また、疾患により変動しなかった Vitamin D-BP 及び食生活により変化しやすいとされる Apo B, Apo C-IV の値を参考として表示した。Total proteins は、各疾患で定量した全たんぱく質 (約 120-150 種類) の平均値を示す。()はSD(ln)を示す。N/A は比が定量できない場合。ND は検出できず。*: 1例、**: 2例、***: 3例のみ定量

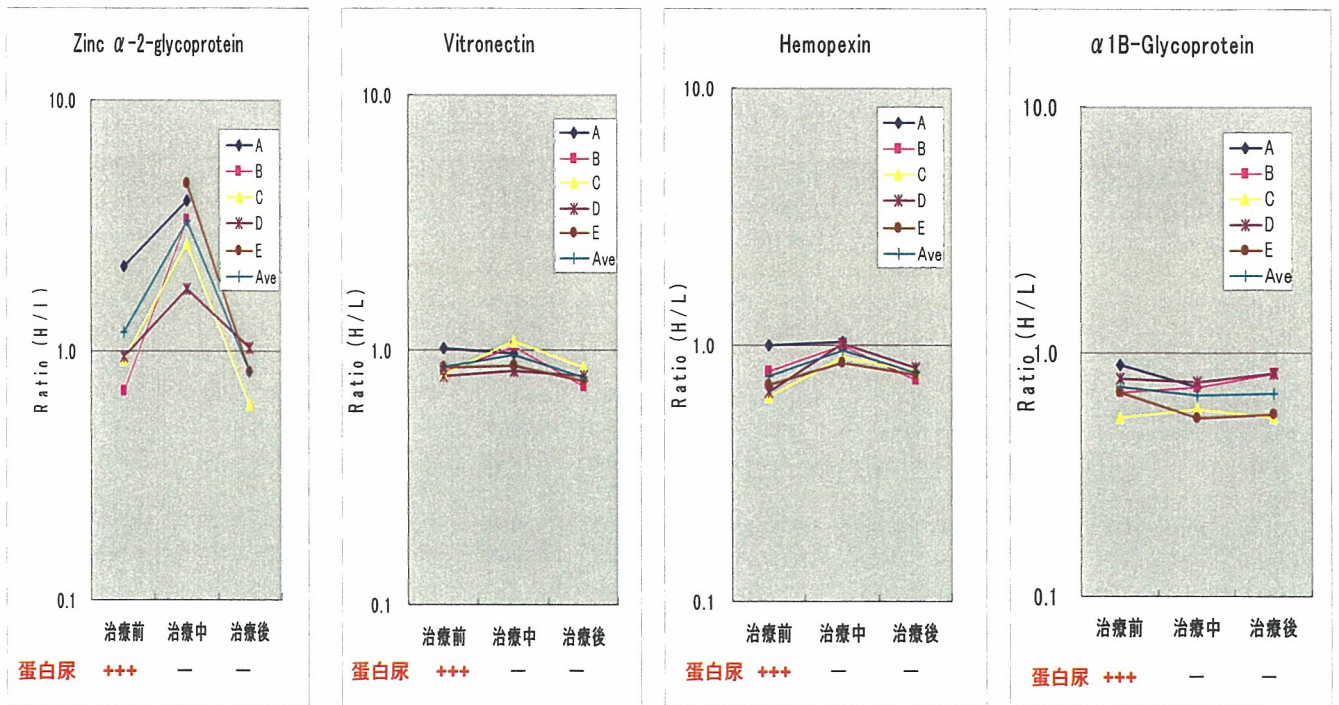


図 25. ネフローゼ（微小変化型）患者の蛋白尿およびZAG 血清たんぱく質の経時変化

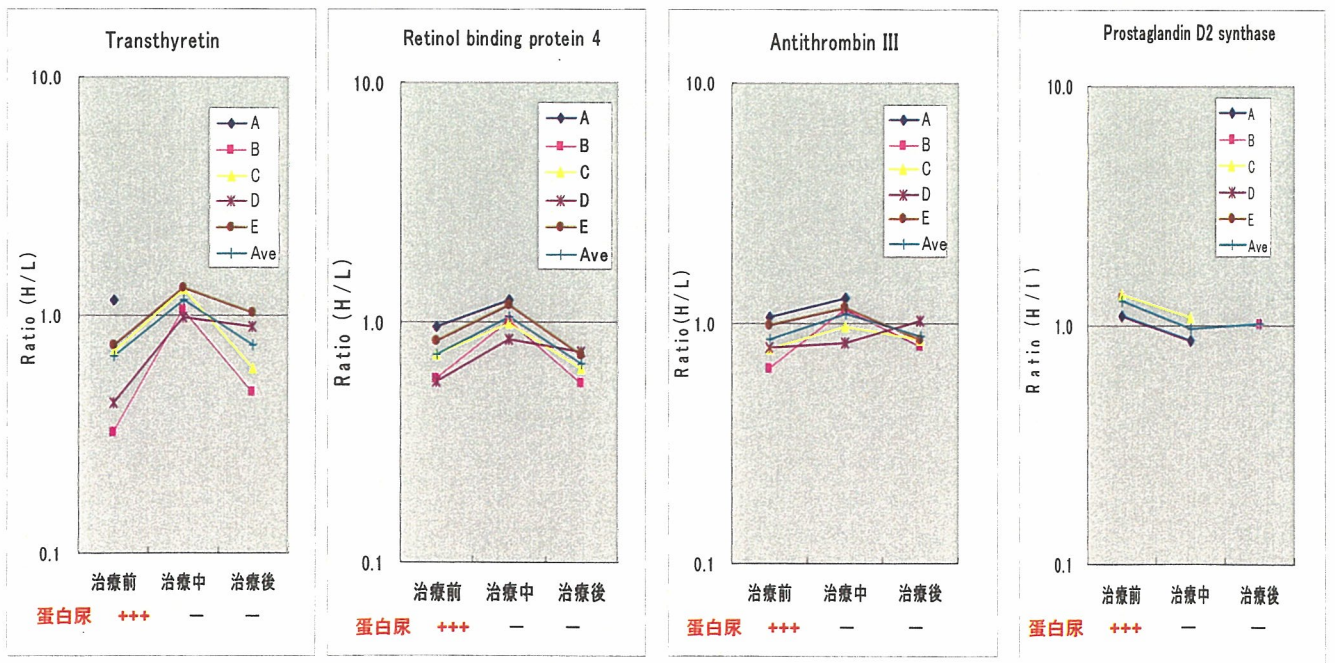


図 26. 既知マーカーたんぱく質 (transthyretin, retinol binding protein 4, antithrombin III, prostaglandin D2 synthase) の経時変化

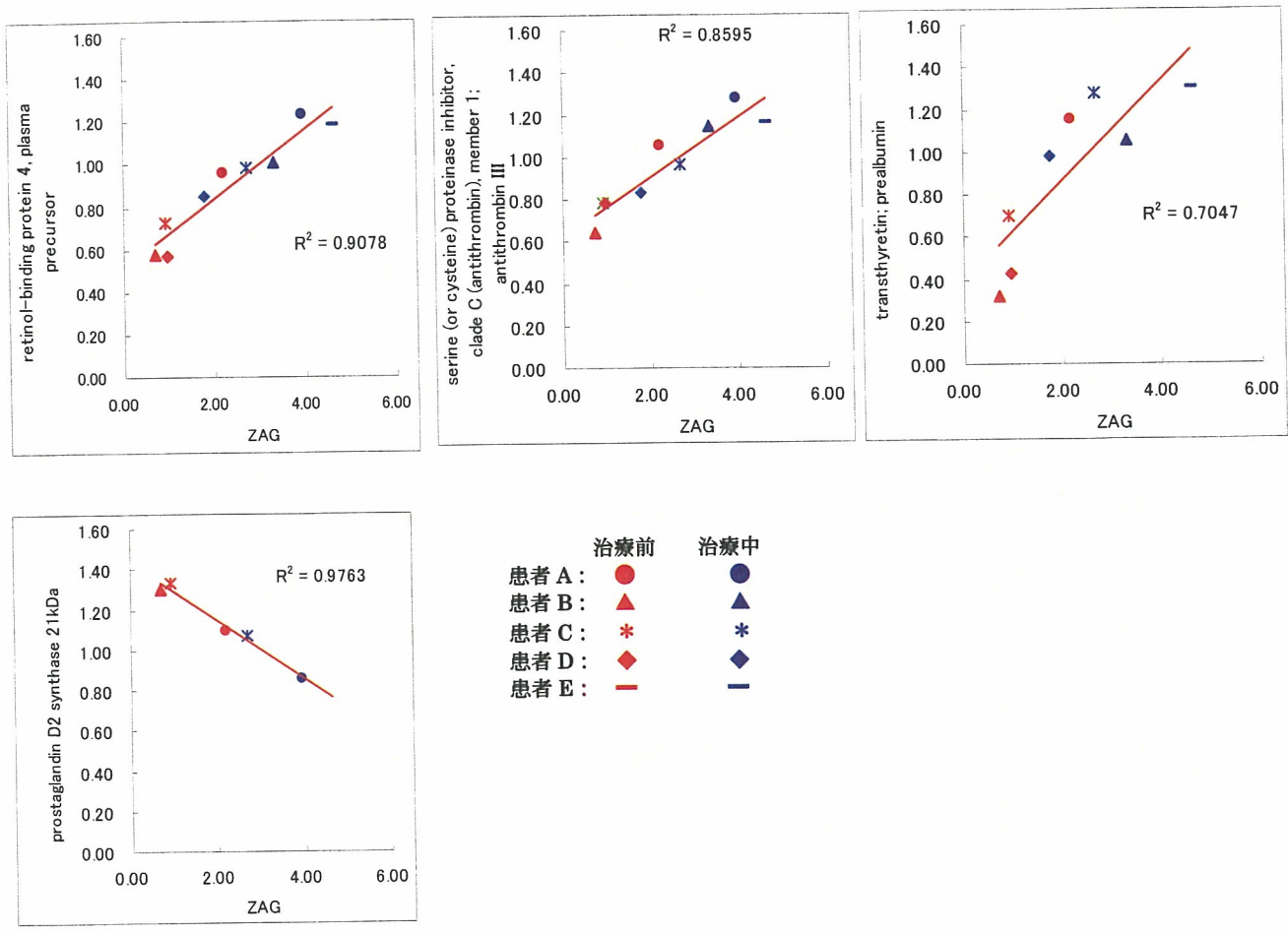


図27. ZAGと既知マーカーたんぱく質(antithrombin III, retinol-binding protein 4, transthyretin, prostaglandin D2 synthase) の相関性

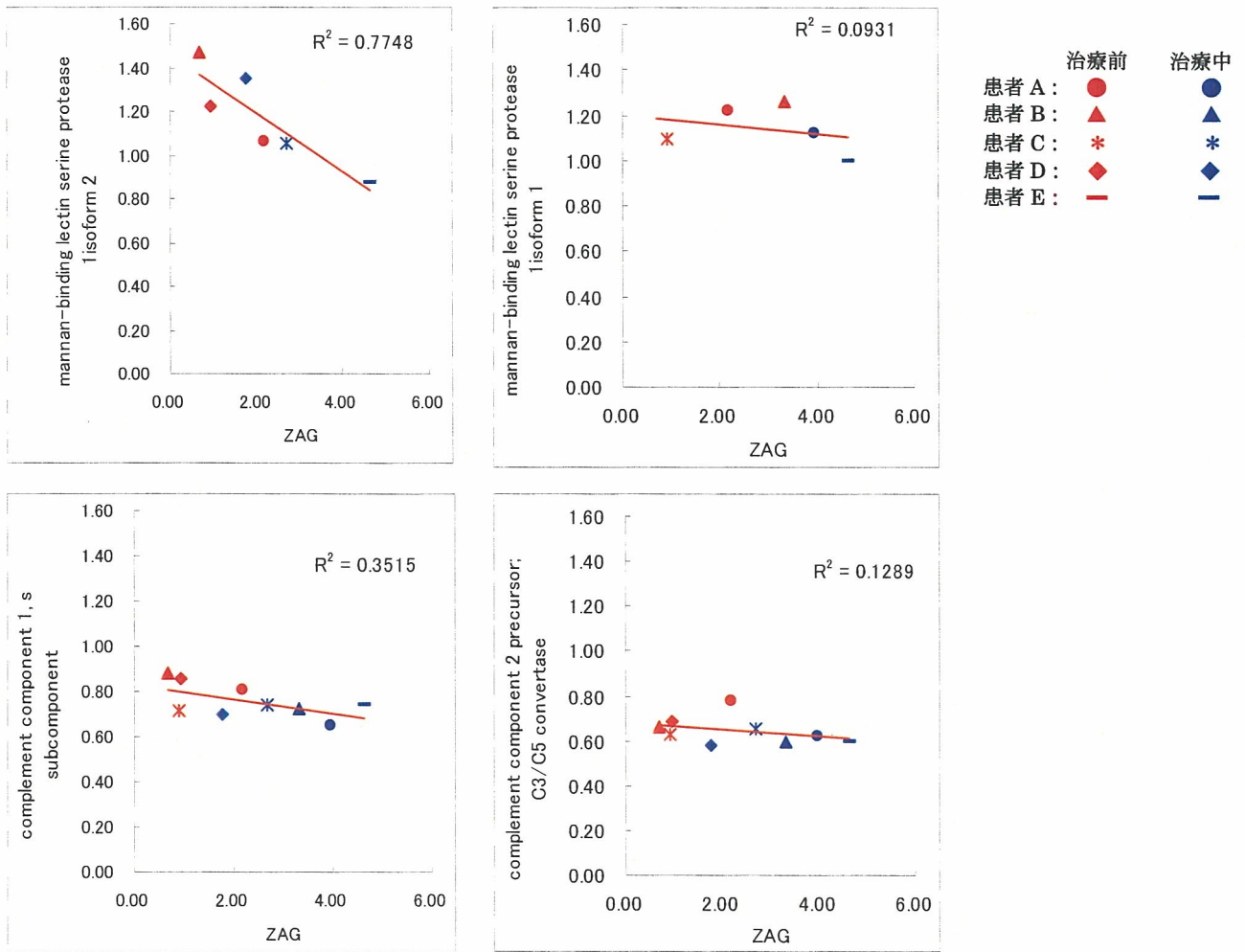


図 28. ZAG と MBL-protease 1 isoform 2 との負の相関性

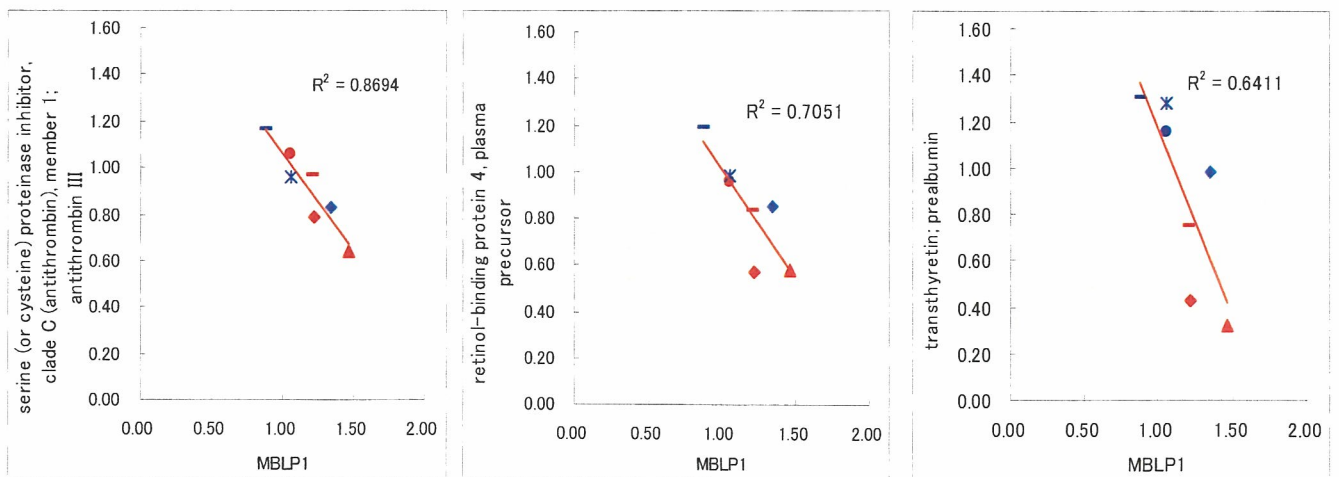


図29. MBLP1-isoform 2と既知マーカーたんぱく質 (antithrombin III, retinol-binding protein 4, transthyretin) との負の相関性 (記号は図28と同じ)

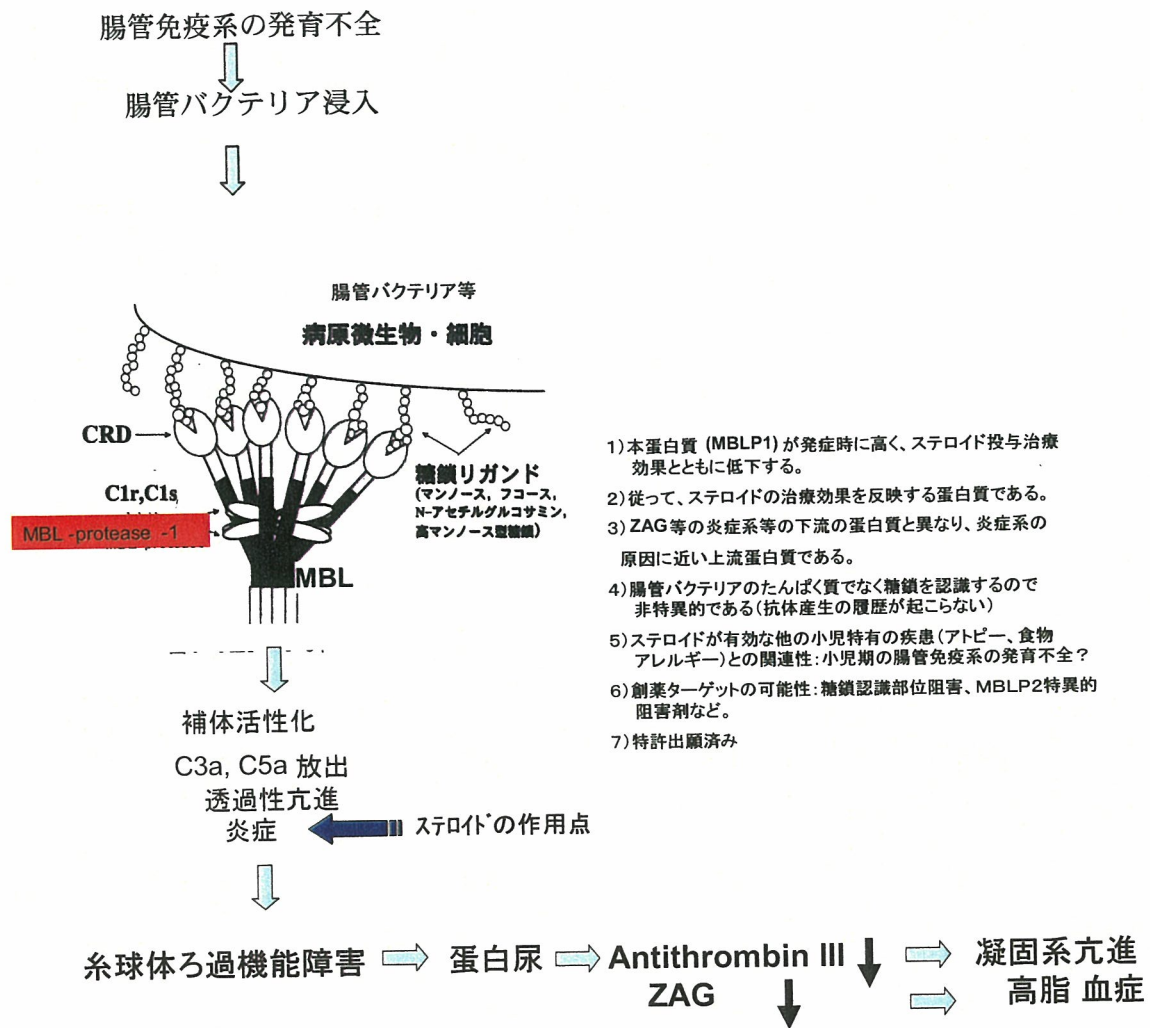


図30. MBL複合体による補体第3経路(レクチン経路)の活性化の模式図およびネフローゼ(微小変化型)の発症原因仮説

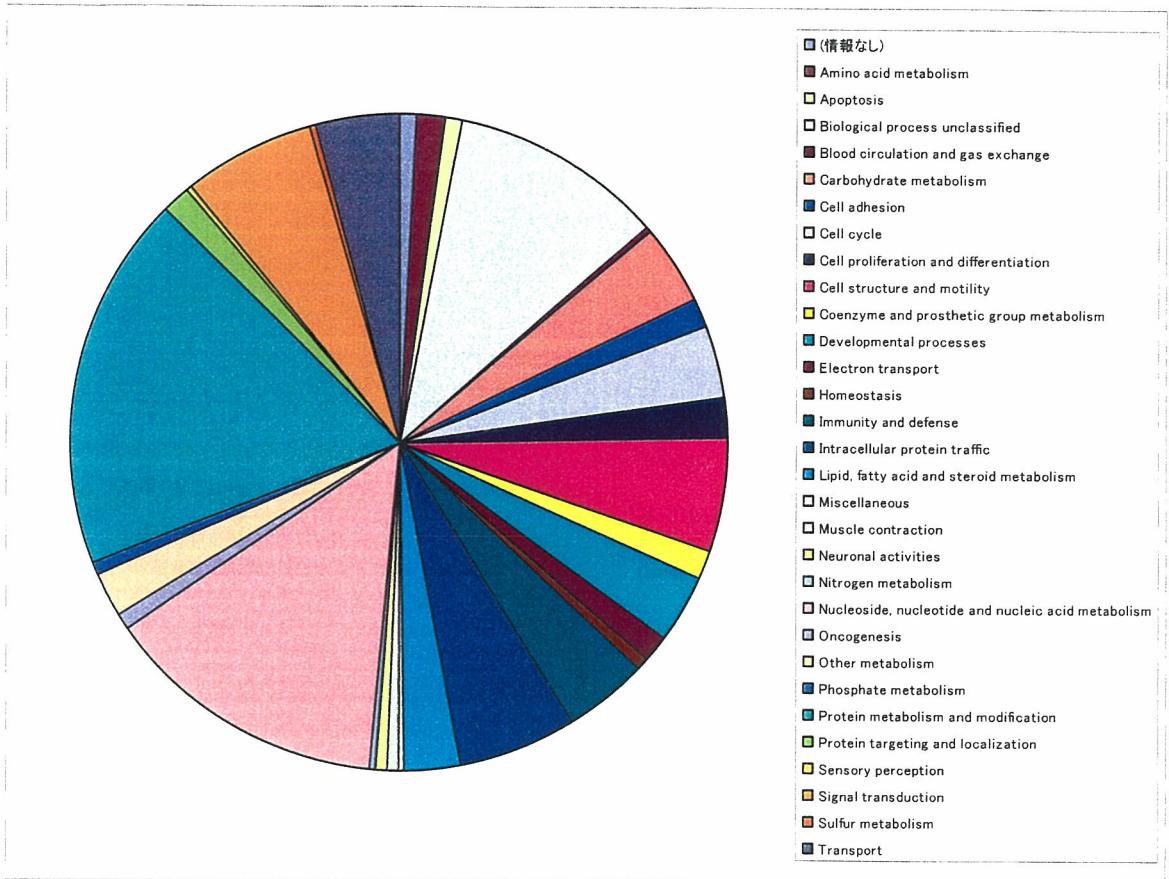


図31. KATO-IIIとMKN-45の解析でcICAT同定可能なたんぱく質の機能別カテゴリー分類

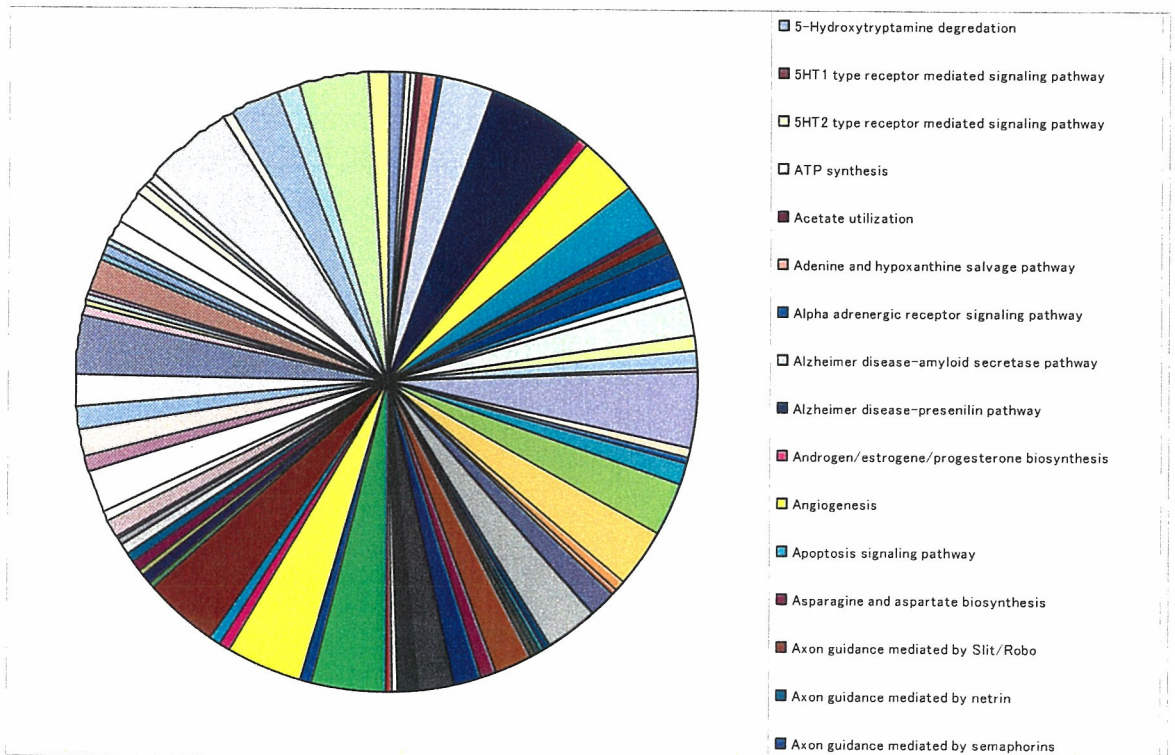


図32. KATO-IIIとMKN-45の解析で同定可能なたんぱく質の代謝経路別カテゴリー分類

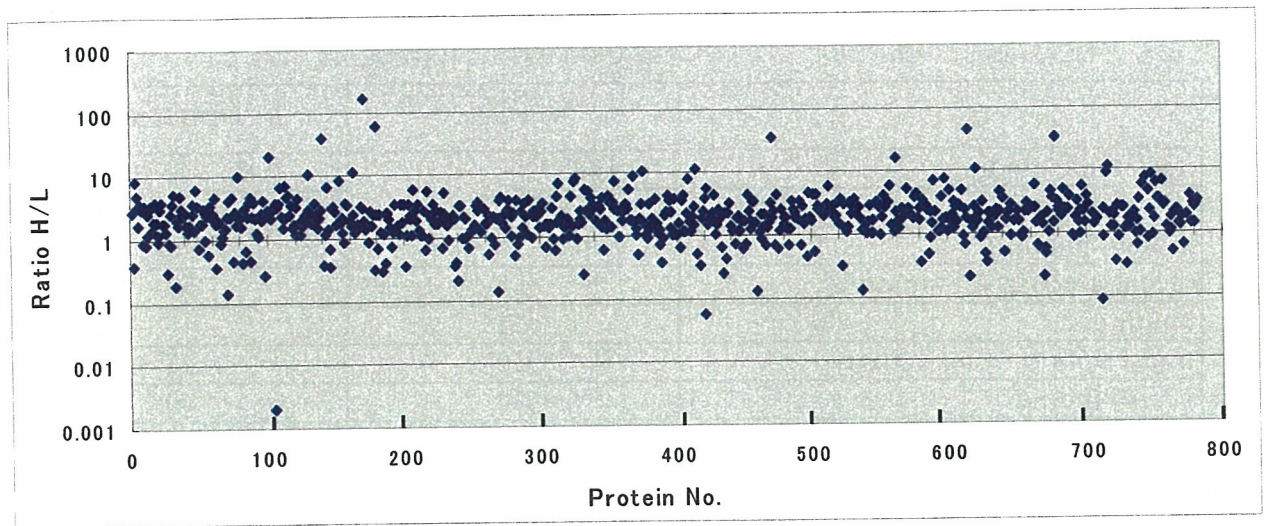


図33. Kato-IIIとMKN-45の各たんぱく質の発現比較定量比(H/L:MKN-45 / KATO-III)

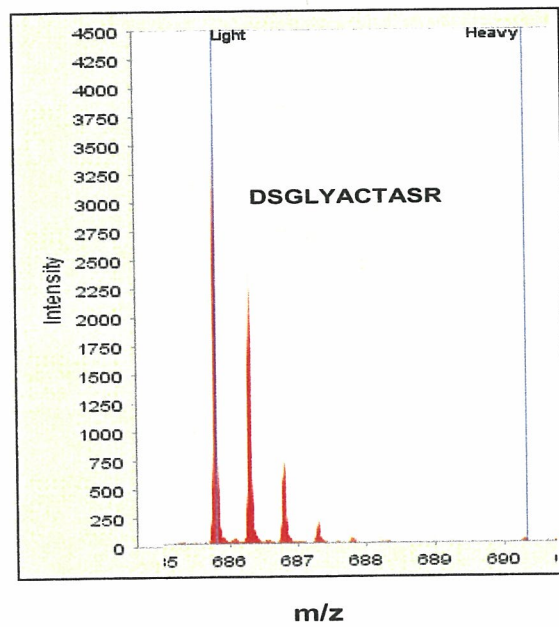


図34. FGF-receptor 2のcI-CAT fragment DSGLYACTASRのHおよびLの分布パターン

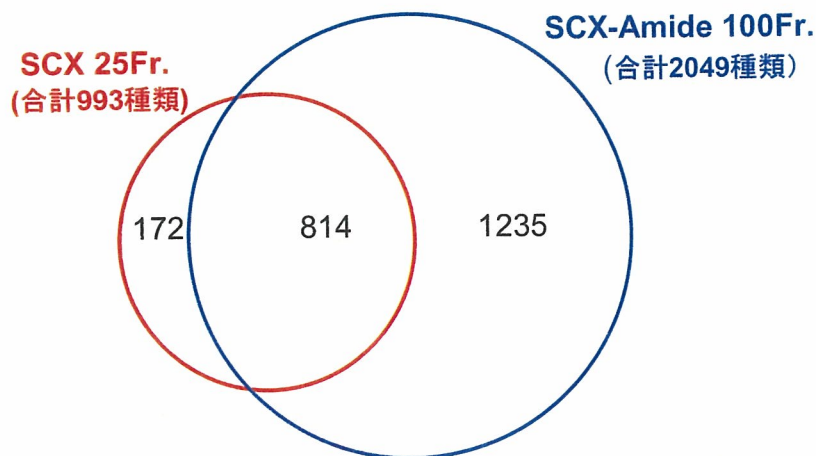


図35. SCX25分画とSCX-Amide80の100分画との同定たんぱく質のベン図 (精査済み)

表8. 胃正常組織での機能別たんぱく質分類での25分画と100分画との比較

	SCX 25Fr.		SCX-Amide 100Fr.	
	nucleotide binding	148	180	294
DNA binding	32	63		
protein binding	36		109	
receptor activity, binding	25		57	
binding	21		45	
transcription factor activity	10		27	
RNA binding	34		49	
protein kinase, phosphatase activity	4	16	12	35
signal transducer activity	12		23	

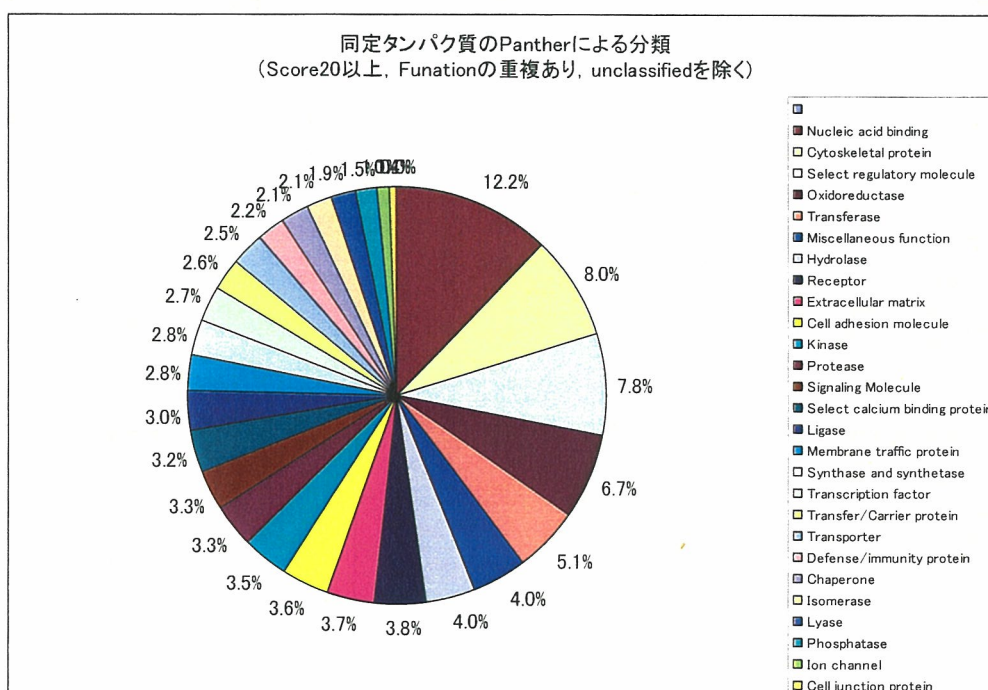


図36. 正常胃組織たんぱく質解析でcICAT同定可能たんぱく質の機能別カテゴリー分類

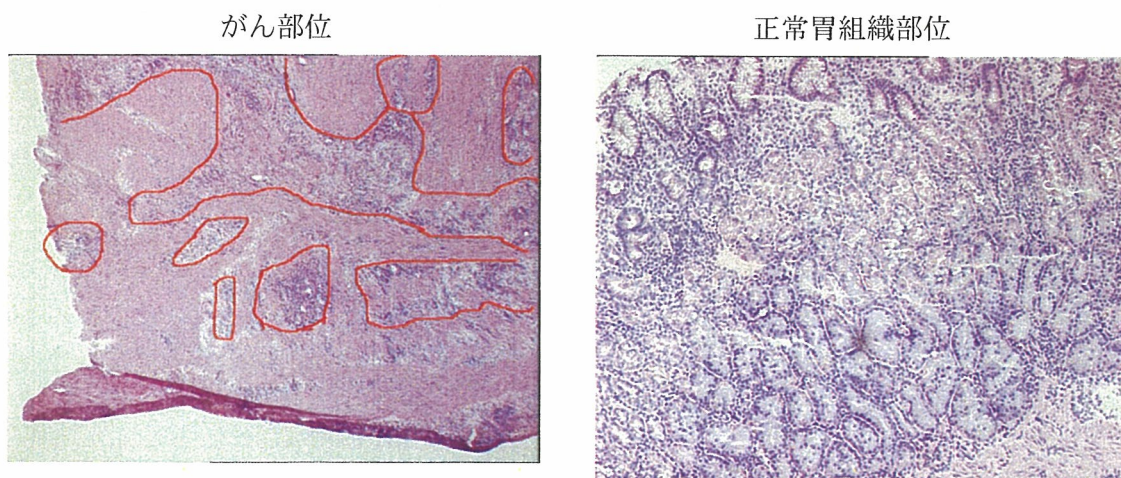


図37. 胃がん患者（高分化型腺癌）のがん組織部位と正常胃組織部位
赤線は切除部位を示す。

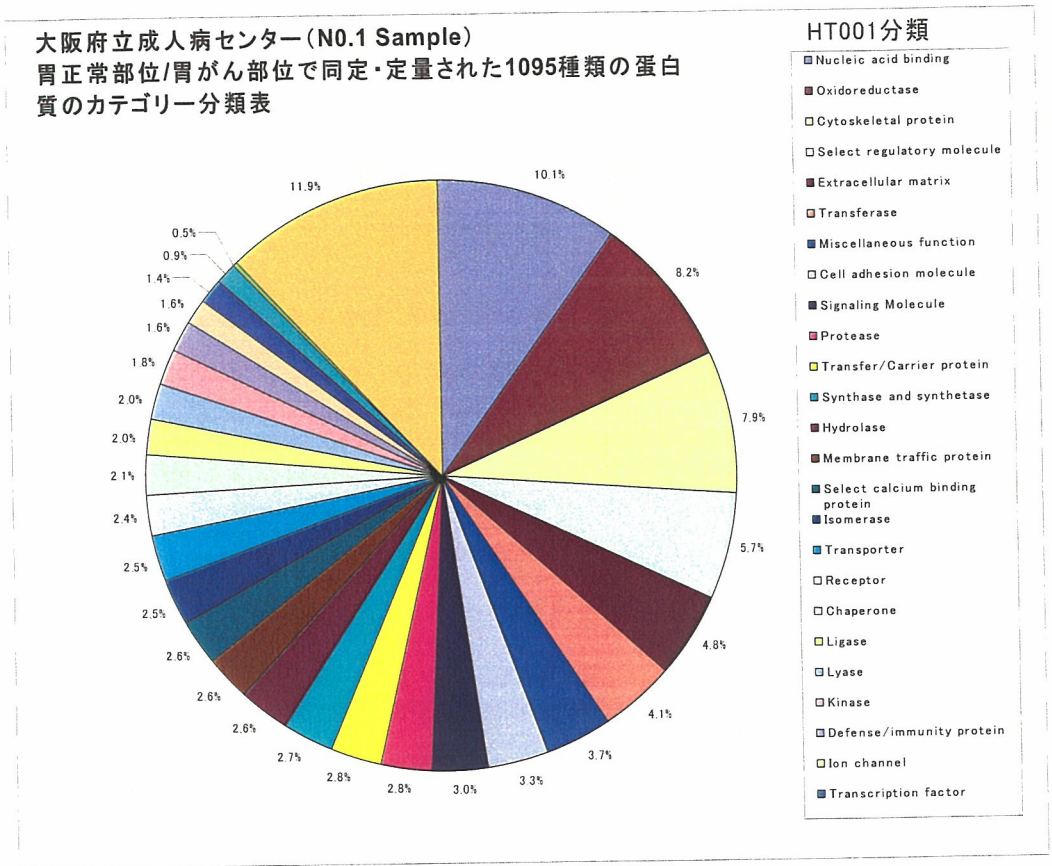


図38. cICAT胃がん/正常胃組織たんぱく質解析で同定された1095種類のたんぱく質の機能別カテゴリー分類

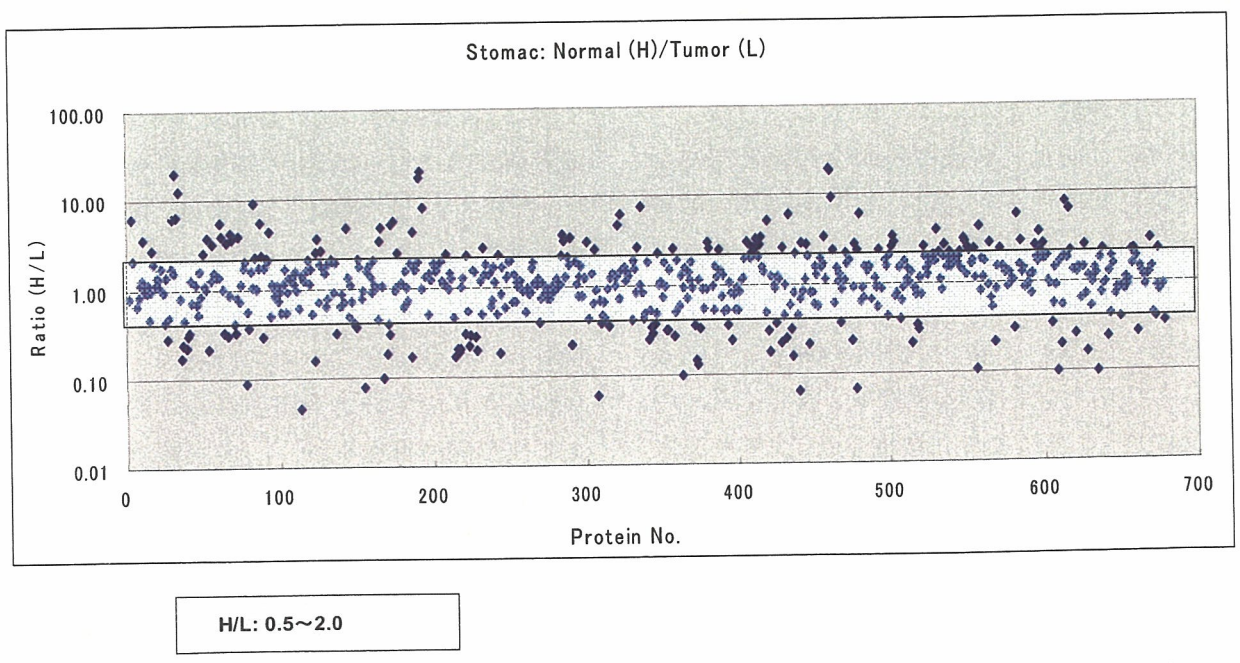


図39. 胃がん患者のがん部位と正常組織部位の各たんぱく質の比較定量値 (H/L: 正常/がん)

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）
分担研究報告書

高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

分担研究者 友池仁暢（国立循環器病センター病院長）

高血圧症、心臓病や脳血管疾患などの循環器系疾患に関連するたんぱく質を見出し新たな医薬品開発のシーズとするため、当センターでは創薬プロテオームファクトリー施設と協力してたんぱく質を解析、データベース化する研究計画を 10 課題を選択、作成し、倫理委員会で承認を受けた。各研究課題は二段階の試料収集形態とし、収集時間の要する検体以外の第一段階の血清試料をプロテオームファクトリー施設へ送付した。血漿試料の採取も開始し、組織試料についても採取・処理手順を作成、実施した。

A. 研究目的

心臓病や脳卒中をあわせた年間死亡数は、1 位のがんに匹敵する 30 万人に達する。循環器疾患全体での年間患者数は、がん患者の約 8 倍で 1000 万人を超え、平均入院患者数も 30 万人に上る。また、要介護などの認定者数は 400 万人に達するが、第一原因は脳血管疾患の後遺症がその 3 割を占める。これらの事実、超高齢化社会を迎えた我が国において、循環器疾患の制圧が最重要課題であることを明示している。

本研究の目的は、血液や組織を対象として循環器疾患に関連するたんぱく質を網羅的に解析、データベース化し、疾患関連たんぱく質を見出すことにより、新たな診断、治療法開発のシーズを発見し、それに基づく医薬品開発を可能とすることである。平成 18 年度は、当センターの実施課題を 10 課題までに増加させ、試料や臨床情報の収集を拡大し、創薬プロテオームファクトリー施設に第一段階の試料提供を完了させる。次に、たんぱく質解析データに基づき研究計画を修正をした後、第二段階の試料収集を開始し、研究を実質的なデータ解析段階へ導くことを目標とする。更に血清以外に血漿試料、組織試料についても試料収集、保管などに関する手続き

やプロトコールを完成し、研究所と協力して実施する。これらの試料や情報に関しては、個人情報保護法、臨床研究指針等に厳重に従い、マニュアル化して実施する体制を作る。

B. 研究方法

プロテオームファクトリー施設と協力して実施する循環器疾患関連たんぱく質解析研究の全体計画については、16 年度に倫理委員会の承認を得た。承認内容に従い研究計画の申請を行い、17 年度末までに 8 課題が倫理委員会で承認された。最終的に 10 課題につき申請、承認を受け実施する。

各課題の内容は二段階の実施形式とし、第一段階として各疾患においてたんぱく質変動が最も観測されやすいと予測される時期に同一患者より複数回の採血を行う。各課題の総検体数の 1/2～1/3 を第一段階の研究に当てる。次に、創薬プロテオームファクトリー施設からたんぱく質解析結果が提供された段階で臨床パラメータも含めた比較・解析を行い、各課題内での対象患者の絞り込み、試料採取時期の再検討などの修正を行う。絞り込んだ対象群、時期で第二段階の試料収集を行い試料の送付、解析を実施す

る。これらの解析結果、臨床情報を総合し、創薬プロテオームファクトリー施設と共同して、各課題の循環器疾患に関連するたんぱく質の発見を目指す。

17年度後半より血清試料以外に血漿試料の収集を開始したので、この違いを血中たんぱく質、ペプチドの変動などに結びつけるべく、センター内部での研究を開始する。また、昨年度承認を受けた心臓組織のプロテオーム解析研究の試料収集、抽出用組織の前処理・保存、保管が均一な条件で実施できるようマニュアルを作成する。また、個人情報保護法、臨床研究指針を厳守した情報管理、研究実施に向けたマニュアルを更に改善し、事故等がなく研究計画を実施できる体制を構築する。

C. 研究結果

疾患関連たんぱく質解析研究の当センターにおける実施に関して全体計画を作成し、内部審査機関である高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会と十分な審議を受け、数多くの改善などを行った後、承認を受けた。また、倫理委員会の指摘により、創薬プロテオームファクトリー施設とMTAを締結した。この全体計画に基づき、各研究課題について個別に高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会に申請、承認を受けた。具体的には応募のあった多数の研究課題から10課題を選択し、17年度までに研究計画を作成した。この内、血液を対象とする7課題、心臓組織を対象とする1課題について倫理委員会の承認を17年度末までに受けた。18年度は、申請中であった以下の研究課題について承認が得られ、当初計画の10課題全てを実施に移した。新規2研究課題の趣旨は以下の通りである。

研究計画 4-3. 肺高血圧症関連たんぱく質の探索研究：肺動脈性肺高血圧症は比較的稀であるが予後不良な疾患である。各種薬剤の開発により予後はかなり改善してきたが、治療法の開

発が急務であることに変わりはない。遺伝子学的解析により原因遺伝子も解明されつつあるが、本疾患の原因は多岐にわたるため、遺伝子異常は一部でしか見出されず、病変や病態についても不明な部分が多い。そのため、本疾患の本質的な理解にはたんぱく質の解析が必要不可欠であると考えられ、肺高血圧症に関連した新たなたんぱく質の同定、解析により本疾患の予防や治療に対する新たなアプローチへと展開できると考えられる。具体的には、肺高血圧症による右心不全急性増悪期および治療後慢性期、肺高血圧症患者と健常者の血中たんぱく質の比較・解析より、肺高血圧症に関連するたんぱく質の探索を行い、病因の究明、医薬品、診断法、予防法などの開発を目指す。

研究計画 6-1. 周産期心筋症に関連するたんぱく質の探索研究：「周産期心筋症」は妊娠を契機として発症する心疾患で、米国では約3000分娩に1例の割合で起こり、妊産婦死亡の20-25%を占めるといわれている。本疾患は近年増加しつつあると推定されるが、わが国においては発症頻度すらも調査されていない。その原因は未だ不明であり、妊娠による心負荷増大のほか、免疫説、ウイルス説などが提唱されている。一般的な心不全に対してはこれまでも様々な研究が行われてきた（本研究事業でも、研究計画4-1で実施中）が、臨床的にはかなり状況が異なる。本研究では、周産期心筋症患者の発症時および回復期、周産期心筋症患者と正常妊産婦の血中たんぱく質の比較・解析より、周産期心筋症に関連するたんぱく質の探索、同定を行う。本研究の実施により、周産期心筋症の病因究明、予防や治療に対する新たなアプローチ、診断法などの開発が可能と期待される。

上記2研究課題においては、当該疾患患者からだけでなく対応する健常者からも血液試料を採取し、血中たんぱく質の解析を行う。このため、倫理委員会などにおいて、健常者の定義、募集方法、同意取得などについて意見や修正点

が示され、それらの検討、改善を行い最終的な承認を受けた。

プロテオーム解析については技術的な問題が数多く残されており、特に定量解析の方法、精度については研究開始時には不明であった。また、個々の血中たんぱく質の生理的変動、個人差等についても信頼できる解析結果は得られていなかったため、採血時期等も含め解析結果に従い至適化する必要があると考えられた。一方、各研究課題内においても推定される発症原因は多様であることが多く、解析可能な限定された試料を一度に収集、解析すると、疾患関連たんぱく質の効率的探索という立場から危険度が高いと考えられた。このため、研究課題は全て二段階の実施形式とし、第一段階として変動が最も観測されやすいと予測される複数の時期に同一患者より採血を行い、解析結果に基づき対象、採血時期を修正、至適化して第二段階の試料収集を実施する計画とした。しかし、創薬プロテオームファクトリー施設からたんぱく質解析の一部が最初に示されたのは18年12月で、3課題の各3〜4症例（複数時期）についてであった。このため、対象患者数が得にくい本年度承認を受けた2課題と、心組織を対象とする1課題以外については第一段階の試料収集、送付を終了しているが、第二段階に進めない状態にある。

研究計画3-2はヘパリン採血血漿試料のみを、研究計画2-1、3-3、4-1、4-2、4-3、6-1では血清に加えて血漿試料を採取した。血漿試料の採取・分離、保管条件等についてもマニュアルを作成し、凝固線溶系の活性化を防ぎ均一な試料調製が可能となるように努めた。また、一部の初期試料を除き、血漿試料の品質を保持させるため、プロテアーゼ阻害剤カクテル添加を行い、より確実にプロテアーゼを抑制し試料を保管している。

血漿試料においてはたんぱく量に比してペプチド量が極めて少ないが、血清試料では凝固線

溶系の活性化により大きく増加しているため、上記血液試料を使用して当センター内で独自の研究を開始した。

動物組織のプロテオーム解析の実施結果、経験などに基づき、剖検時の心組織試料の採取様式や部位の区分、記録、抽出用に使用する組織細分化と保存形態、数量、凍結・保管などの手順を決めてマニュアル化し、病理部の協力を得て実施した。

17年度からは個人情報保護法が施行され、検体試料と臨床情報などの両面において、法令に従った手順、保管体制を作成、実施した。本研究では遺伝子には取り扱わないが、これに準ずる取り扱いを行うよう倫理委員会より求められたため、匿名化は研究に関与しない研究機器管理室長が行い対応表を保管すると共に、厳密に認証管理された条件下で担当者だけが管理時のみアクセスできる環境を設定、実施している。

上記以外にも各段階で個人情報の管理に努め、例えば試料と臨床情報は5人分（通常10検体）を基準とし速やかに匿名化を行っている。さらに保管試料、情報に問題が発生しないように保管方法、機器や体制についても異常時の確認、対応法なども含め、より安全性の高いシステムを目指し改善を進めた。これら手順、方法で問題等は発生していない。

D. 考察

疾患関連たんぱく質解析研究は、医薬品開発のシーズ探索を目指した官民共同の国家プロジェクトである。その中で、循環器疾患を担当する高度医療センターとして適切と考えられる10研究課題について、18年度当初までに倫理委員会の承認を受け、試料や情報の収集、匿名化保存を進めた。7件の研究課題の第一段階採取試料は創薬プロテオームファクトリー施設に送付したが、いずれの課題においてもまだ解析が終了していないため解析結果と臨床情報の解析等が実施できず、第二段階の試料収集に進めな

い状況である。これは配列決定が主体であるゲノム解析と異なり、本プロテオーム解析が非常に大きな量的違いのある血中たんぱく質の定量的解析を目指す研究であり、技術的に未だ開発途上であることに起因する点が大と考えられる。たんぱく質定量解析技術の開発、確立と継続的研究が、収集した試料、情報を活かすために不可欠と考えられる。

当センターでは全体計画、個別 10 研究計画の計 11 件について内部委員会である高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会に申請承認を受けた。詳細な審議により承認を得るまでに時間を要したが、倫理、研究の両面において整った計画を作成でき、研究協力者（患者、健康者）、遺族などに対するきめ細かい説明、承諾の確認などの手順を採用できた。各研究課題の実施時における手続き、試料や情報の収集、管理体制もこれに従ったシステムを構築でき、臨床研究の指針、個人情報保護法に従い、かつ遺伝子研究に準ずる形式で研究実施環境を整備できたと考えている。

E. 結論

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、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
分担研究報告書

疾患関連たんぱく質解析研究の一環としての
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

分担研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 副所長

近年、心筋梗塞などの循環器疾患の発症リスクとしてのメタボリックシンドロームが注目されており、その発症基盤としての肥満及び脂肪細胞の機能解明が重要な課題となっている。従来、脂肪細胞は単なるエネルギー貯蔵臓器と見なされてきたが、最近では、様々な生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌する内分泌臓器として生体のエネルギー代謝調節に関与していることが明らかにされつつある。一方、脂肪細胞の機能制御に関わる生理活性ペプチドが存在すると考えられるが、これまで同定されていなかった。本研究では、脂肪細胞の機能解析に有用な培養細胞系であるマウス胎仔由来線維芽細胞（3T3-L1細胞）を用いて細胞内cAMP濃度変化を指標としたスクリーニングを行い、ブタ脳組織より α -melanocyte-stimulating hormone(α -MSH)を単離・同定した。さらに、ラット脂肪組織抽出物を各分化段階の3T3-L1細胞に添加し、細胞内cAMP上昇活性を示す複数の分画の存在を確認した。脂肪細胞における細胞内cAMP濃度変化は、脂肪細胞の増殖・分化や脂肪分解に重要な役割を果たすことが知られており、本研究により脂肪細胞機能を制御する新しい生理活性ペプチドが存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、糖尿病、高血圧、高脂血症などのリスクファクターが単一個体に重複して発症すると、動脈硬化性疾患の発症頻度がきわめて高率になることが明らかにされ、これらの病態を一元的に捉える疾患概念としてメタボリックシンドロームが注目されている。メタボリックシンドロームの発症基盤として肥満及び脂肪細胞機能が重要であり、脂肪細胞が様々な生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌する内分泌臓器として生体のエネルギー代謝調節に関与していることが明らかにされつつある。一方、脂肪細胞に作用して種々の機能制御に関わる生理活性ペプチドが存在すると考えられるが、これまで同定されていなかった。我々はこれまでに、生体のエネルギー代謝調節に関与する新規生理活性ペプチドの探索を行い、オーファンGPCRであった成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとしてグレリンの同定に成功し、循環器系やエネルギー代謝調節での役割を解明することにより創薬や臨床応用へむけての基盤研究を行ってきた。また、オーファンGPCR

であるFM-3/GPR66、FM-4/TGR-1の内因性リガンドとしてニューロメジンU(NMU)をラット小腸抽出物より単離・同定した。NMUの生理機能は発見以来20年間不明であったが、受容体の同定によって摂食・エネルギー代謝調節において重要な役割を担うことが明らかとなり、メタボリックシンドロームの発症基盤である肥満の成因に密接に関係していることを示した。さらに、FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1の第2の内因性リガンドとして、ニューロメジンS(NMS)をラット脳抽出物より発見し、NMSが概日リズムの発振機構や摂食調節において重要な機能を担っていることを明らかにしてきた。本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究の一環として、脂肪細胞の増殖・分化や代謝などの制御に関わる生理活性ペプチドの探索を行い、ブタ脳より α -melanocyte-stimulating hormone(α -MSH)を単離・同定し、生理的機能及び疾患との関わりを考察した。また、細胞内cAMP濃度変化を指標としたラット脂肪組織抽出物のスクリーニングを行い、細胞内cAMP上昇活性を示す複数の分画の存在を確認した。

B. 研究方法

1) マウス胎仔由来線維芽細胞 (3T3-L1 細胞) の培養、分化誘導とアッセイ: 3T3-L1 細胞を 96 穴プレートで培養し、confluent の 2 日後を 0 日 (day0) とした。また、3T3-L1 細胞の分化誘導は、day0 にデキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリンを含む培地で培養を行い、day2 にインスリンのみを含む培地に交換し、day4 以降は 2 日おきに 10% 牛胎仔血清を含む培地で培地交換を行った。各分化段階の 3T3-L1 細胞 (day0, day4, day8) に、ブタ脳及びラット脂肪組織から抽出したペプチドサンプルを添加し、細胞内 cAMP 濃度変化を指標としてアルファスクリーン法を用いて測定した。

2) 抽出および精製: ブタ脳及びラット脂肪組織を既報のとおり、100°C で 5 分間熱処理後、1 N 酢酸にてペプチドを抽出した。アセトン沈殿、Sep-Pak C18 カートリッジによる処理の後、陽イオン交換 (SP-Sephadex) にて得られた強塩基性画分のゲル濾過を行った。さらに活性画分は、CM-イオン交換 HPLC、逆相 HPLC により分離、精製した。

3) 構造解析: 精製したペプチドの構造は、プロテインシーケンサーおよびマススペクトロメーター (Voyager-DE PRO) を用いた MALDI TOF/MS により解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては当施設のカイドラインに従い、その愛護に留意し投与実験や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるように十分に配慮した。

C. 研究結果

1) α -MSH の単離・同定

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ブタ脳から抽出したペプチド画分をゲル濾過で分離した各分画についてアッセイを行った結果、分子量約 2,000 の分画に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。その活性は day0 の脂肪細胞でも見られたが、day4 及び day8 の細胞で特に強く見られた。この活性分画をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離、精製し、マススペクトロメーターによる質

量分析を行ったところ、13 残基のアミノ酸からなる α -MSH が同定された。

2) 脂肪組織抽出物のスクリーニング

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ラット脂肪組織から抽出したペプチド画分をゲル濾過したサンプルを用いてアッセイを行った結果、分子量約 3,000-5,000 の分画に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。その活性分画をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離し、複数の細胞内 cAMP 上昇活性を確認した。各分画の活性は、day0 でのみ見られるものや、day0 及び day4, day8 でほぼ同等の強さを示すものが見られた。今後、各々の活性分画を逆相 HPLC により精製し、プロテインシーケンサーおよびマススペクトロメーターにより単離・同定する予定である。

D. 考察

本研究により、ブタ脳より脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドとして、 α -MSH を同定した。 α -MSH は、脂肪細胞より分泌され中枢において強力な摂食抑制作用を有するレプチンの下流シグナルを担う生理活性ペプチドであり、中枢性摂食調節ペプチドとして作用し、生体のエネルギー代謝調節に関与することが知られている。さらに、脂肪細胞には α -MSH の受容体であるメラノコルチン受容体が発現しており、 α -MSH は脂肪細胞に作用してレプチンの分泌を抑制すること、また脂肪分解を促進することが報告されている。

我々は昨年、3T3-L1 細胞を用いて、中枢において強力な摂食促進作用を有する NPY をブタ脳より単離・同定したことを報告した。今回、同様の手法により、中枢性摂食抑制ペプチドである α -MSH を単離・同定した結果から、脳及び脂肪組織を軸とした、生理活性ペプチドを介した生体のエネルギー代謝調節システムが存在する可能性が示唆され、本研究で用いた手法が、エネルギー代謝系の調節に関わる生理活性ペプチドの探索において有用であることが確認された。

本研究ではさらに、ラットの脂肪組織から抽出サンプルを調製し、各分化段階の 3T3-L1 細胞に添加し、複数の細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。

脂肪細胞における細胞内 cAMP 濃度変化は、脂肪細胞の増殖・分化や脂肪分解に重要な役割を果たすことが知られており、これらの活性分画を精製し生理活性ペプチドの単離・同定を進めることにより、生体のエネルギー代謝調節に関わる内因性ペプチドの同定が期待できる。

今後、この手法により脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドの探索を進めることにより、メタボリックシンドロームの発症基盤としての肥満及び脂肪細胞機能に関与する新たな生理活性ペプチドの同定や、脂肪細胞の分化・増殖を制御する新たな治療薬の開発が期待できる。

E. 結論

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 α -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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Sato 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.
- ②Date 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.

- ③Chen 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.
- ④Toshinai 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 independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 147: 2306-2314, 2006.
- ⑤Nakahara 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.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

宮澤 崇 (国立循環器病センター研究所)
宮里幹也 (国立循環器病センター研究所)