

した。その結果、Systems Biology Institute よりプロテオミクス用のツールとして無償で提供されている、mzStar と Pep3D というソフトウェアが有用であることがわかった (Li X-J, Pedrioli PGA, Eng J, Martin D, Yi EC, Lee H, Aebersold R. (2004) "A tool to visualize and evaluate data obtained by liquid chromatography / electrospray ionization / mass spectrometry." Anal Chem 76:3856-60)。

図3にAnalystQSにて得られたデータの例を示すが、mzStarはQstar-XLにて測定、保存されたwiff形式のデータファイルをより汎用性のあるmzXML形式のデータに変換するためのツールであり、これによりある程度rawデータの内容を把握することが可能となった。次にmzXML形式のファイルをPep3Dソフトにより読み込むことにより図4-5に示した様な、LC-MSデータの三次元グラフ化が可能となった。グラフにおいて横軸はLCの溶出時間であり、縦軸はペプチドのm/zの値である。そして、各スポットの濃さがピーク強度すなわちペプチドの存在量に対応する。0.5 m/z 以内の間隔で同位体ピークが縦に並んで観察されるのがペプチド由来のピークであり、多数のペプチドシグナルを観察することができた。溶出時間と質量数の関係を見ると、溶出時間が遅いほど分子量の大きいペプチドが検出されていることがわかり、逆相カラムによる分離による影響であると考えられる。また、重要な点として、観察できるペプチドのm/z値の上限は1200程度であり、TOFマスの測定範囲としてはこれ以上増やしてもあまりペプチドを検出できなことがわかった。これは、Q-TOF型の質量分析装置の特性とも考えられ、今後注意が必要な点である。

4. ラット尿中のタンパク、ペプチド検出に関する基礎検討

コントロールのラット尿サンプルを用いて、尿中タンパクおよびペプチドの網羅的解析系確立のための条件検討を行った。まず、尿検体の前処理に関しては、C18モノリスカラム (MonoTip® C18) によるペプチド精製、アセトン沈殿を検討した。

まず、直接尿検体 200 μ l を MonoTip カラム かけ MW40,000 以下のタンパク、ペプチドフラクションを濃縮、精製し、50 μ l の 60%アセトニトリル、0.1%TFA にて溶出し、2 μ l を用

いて LC-MS/MS による分析を行ったがペプチドピークを検出することができなかった。

次に、同じく 200 μ l の尿検体に 800 μ l のアセトンを加えて -20°C で一晚沈殿させ、200 μ l のリン酸緩衝溶液に溶解した。同時に、未処理の尿サンプル 200 μ l とともに、還元アルキル化後トリプシンで消化し、Monotip にて脱塩精製を行った。100 μ l の 60%アセトニトリル、0.1%TFA にてタンパク、ペプチドを溶出した後、濃縮乾固後、10 μ l の同溶液に溶解した。

本サンプル 2 μ l を用いて LC-MS/MS 解析を行ったところ、高濃度にペプチドが検出でき、27 倍希釈後も十分な量のピークが観察された。この結果より、尿サンプル量は解析に十分であることがわかった。流速 200 μ l/min による解析により最も多くのタンパク質が MASCOT 検索により同定された結果を表 2 に示す。

次に、安定同位体標識を使わずに、別々の LC-MS 分析のデータを、サンプル間で比較する手法について検討を行った。これまでに確立した Pep3D を用いた LC-MS データの可視化により、異なるランの間の LC-MS データを、3 次元グラフとして比較する事が可能となった。これにより、実際に 2 サンプル間の発現量の比較を、2 次元電気泳動等と同じく、イメージデータとして目視で比較することは可能であり、明らかに発現量の異なるスポットについては、この方法でも十分検出が可能であることがわかった。しかし、同一サンプルを 2 回分析し LC-MS の再現性を検討したところ、LC によるリテンションタイムのずれ、質量分析装置によるペプチドピーク強度の再現性に問題があることがわかった。

このうちリテンションタイムのずれに関しては、すでに報告があるように、m/z 値の正確性を手がかりに測定後にソフトウェア的に補正も可能であると考えられ、実際に MSlight というフリーソフトウェアを使って、二つのデータの重ね合わせを行った (図 6)。

その結果、許容範囲を超えてリテンションタイムがずれていたためか、重ね合わせがうまくいかない部分があり、独自のアルゴリズムでの検討が必要であることが判明した。グラフからも水平方向にずらすことによる重ね合わせは可能だと見られ、リテンションタイムのずれは補正可能と考えられるが、より深刻な問題として、シグナル強度の再現性が課題となった。

同一サンプルを測定した図 7 において、全体

としてのデータの再現性は良さそうであるが、細かい点を見てみると図中○囲みの部分に、強度の差のあるスポットが見受けられた。このペプチドピークのイオン化が何らかの理由により妨げられたか、LC からの溶出過程での問題かは不明であるが、同一サンプルを測定して、このような差が見られることは定量的比較の上では重要な問題である。相対的なシグナル強度の差については、一定時間領域の総シグナルや基準ピークを用いたノーマライゼーションによる補正が可能であると考えられ、ソフトウェア的にそれを行うための技術開発を進めているが、その補正を超えた変化が起こりうる可能性が示されたことより、ラット尿サンプルの解析には、当面はノンラベルではなく、2サンプルを同時に測定することにより、より定量的な比較が可能となる安定同位体ラベルを用いた方法を優先させて、系の開発を行うこととした。

5. 安定同位体 (ICAT) を使った定量比較に関する基礎検討

ICAT ラベルによる比較定量法の評価を行うため、既知タンパク質を一定の量比で混合した2種類のテストサンプルを調整した。これを用いて、ICAT 法による定量を行った。ICAT ラベル法では安定同位体にて9マス違いの質量タグでラベルされるため、図8に示すように、2サンプル中の対応するペプチドのピークが、2価イオンの場合で4.5 m/z 違いのピークとして観察され、それぞれのピークの面積比をアプライドバイオシステムズ社より提供されるソフトウェアである proICAT ソフトウェアにて定量するとともに、MS/MS のデータより同時に同定を行い、結果を得ることになる。当初、ProICAT を用いた自動解析は、理論値とは合わない測定結果を与えた。目視によるデータの確認の結果、これはピークエリアの算出のためのピークの選定に問題があるためと考えられた。そこで、同定されたペプチドに関してマニュアルで対応するピークのエリアを計算した結果、表3に示すように、理論値に比較的近い存在比の値が得られ、本手法の妥当性が確認できた。proICAT ソフトウェアに関しては、その後バージョンアップを行うことにより、問題は解決された。

次に実際のサンプルとして、ヒト肝サイトゾルの個人由来の4ロットに関して、プールド肝

サイトゾルとタンパクの存在比を比較した。その結果、表4に示すように各ロットに関して50前後のタンパク質が同定かつ定量された。このうち、多くのタンパク質に関してはすべてのロットにおいて共通に検出された。また、全体として各タンパク質の存在比は1に近かった。変化の見られたタンパク質としては、個別サイトゾルで増加したのものとして FAS (HK27, HG30)、HBB (HG23, HK27)、KAC (HK27) などが、減少したのものとして S108 (HK27)、DOPD (HG23)、ADH4 (HG43) などが観察された。

以上の基礎検討を踏まえ、実際のラット尿サンプルを用いて ICAT ラベル法のパフォーマンスチェックと解析系の確立を行った。ラットコントロール尿およびフェノバルビタール処理尿 (120µg protein 相当、300µl 程度) をそれぞれ、ICAT heavy および light reagent にて標識した。反応液 10µl (24ug protein) ずつを混合した後、トリプシン消化し、アビジンカラムにて精製を行った。ピオチンタグを除去後、20µl の最終反応液を得、このうち 4µl を LC-MS 分析に用いた。得られた LC-MS データの例を図9に示す。各スポットは、ラベル化タグの質量数差に対応するツインスポットとして観察されている。この対応するスポット間の定量比較を行えばよいことになる。しかし、現状で ICAT 解析を行うためのソフトウェアである ProICAT は、MS/MS データによる同定操作を前提として要求するため、まず通常の測定法である MS/MS 測定を含めた解析を行い、ProICAT によりタンパクの発現比を求めた。図9右側のグラフは MS/MS 同時測定を行った際の TOF-MS データであり、図中で青印をつけたスポットは自動 MS/MS 測定が行われたスポットである。自動測定によりかなり多くのスポットが MS/MS 測定されているが、図10に示したように、よく見ると MS/MS 測定に至らなかったピークも多く存在する。図11に示したように LC-MS チャート上は、明らかに差のあるペアのペプチドピークが観察されているにもかかわらず、右側のペアに関しては MS/MS 測定がされなかったため、同定されず、定量結果が得られなかった。ProICAT の解析結果では、図12に示したように、十分な信頼性を持って同定されたのは Ig kappa タンパクのみにとどまり、LC-MS 上存在量の多いことがわかった (後述) MUP や UP も同定されなかった。これは、QstarXL の MS to MS/MS の切り換えによる測定スピードが遅い

ことと、ピーク上の立ち上がり等で MS/MS 測定がされるため、十分な強度の MS/MS シグナルが得られないことに起因すると思われる。

以上の基礎検討を踏まえて、最終年度においては、ノンラベル法を用いた遺伝子傷害性肝発ガン物質を投与したマウス尿サンプルの解析および cICAT ラベル法を用いた肝毒性物質投与ラット尿サンプルの解析を行った。

6. ノンラベル化法によるマウス尿中のタンパク、ペプチド解析による遺伝子傷害性特異的マーカーの検出

安定同位体標識を使わずに、別々の LC-MS 分析のデータを、サンプル間で比較する手法について、マウス尿サンプルを用いて検討を行った。mzMore の機能を用いて異なるランの間の LC-MS データを、3次元グラフとして可視化した。(図 13-4) ほとんどのスポットについては変化がなく、全体として非常に再現性の高いデータが得られていることがわかる。目視による比較により、発現量の変化するスポットをマーカー候補とした結果、NNM からは 24 個、quinoline からは 32 個のペプチドシグナルが変化し、このうち 6 個が両方で共通していた(表 5)。これに対し、非遺伝子傷害性物質では共通した有意な変化は認められなかった。

次に共通して変化の見られたペプチドに対して、フォーカス同定を試みたところ、6 個のうち 1 つのペプチドについては novel member of major urinary protein (MUP) であることが同定できた。(図 15)

今後、mzMore の機能が完成すれば、ペプチド間の比較は目視でなく、ソフトウェアにより自動的に行えることになる。

7. cICAT 法を用いた acetoaminophen 投与ラット尿サンプルの解析

ICAT ラベル法に関しては、共同研究者である第一三共(株)矢本博士より提供いただいたラットコントロール尿およびアセトアミノフェン処理尿(500 および 800mg/kg 投与、0-24 時間採取尿)を使用した。各群 5 匹のラットより得られた尿 110 to 160 μ l より、アセトン沈殿にて得られたタンパク質を図 16 に示したデザインにて ICAT heavy および light reagent にて標識した。反応液 10 μ l (24 μ g protein) ずつを混合した後、トリプシン消化し、アビジン

カラムにて精製を行った。ビオチンタグを除去後、20 μ l の最終反応液を得、このうち 4 μ l を LC-MS 分析に用いた。得られた LC-MS データの例を図 17 に示す。

ICAT 試薬によりラベルされたペプチドは、2 価イオンの場合には 4.5 マス、3 価イオンの場合は 3 マス、4 価イオンでは 2.5 マス差のペアピークとして観察されるので、この両者のピーク強度を比較することにより、解析に用いた 2 サンプル間の対応するペプチドの存在量の割合を知ることができる。今回は、対照としてプールした Heavy または Light ラベルペプチドを用い、これらを平均値と考え、薬物処理およびコントロールの各比較において、シグナル強度のバランスの変わったピークを目視にて拾い上げた(図 18)。(最終的にはこの作業は mzMore を用いて自動化できる予定であるが、現段階ではまだ機能として完成していないため、目視を用いた。)次に、拾い上げたピークに関して、比較したサンプル間で同じ方向に動いているものを探し、表 6 に示した 5 つのペプチドに関して、一致した結果を得た。いずれのペプチドに関しても、APAP 処理により発現が減少していた。

8. マーカー候補ペプチドのフォーカスト同定

cICAT 解析によりラット尿中に見つかったマーカー候補ペプチド 5 種類に関して、MS/MS 測定におけるインクルージョンリストを作成し、同一サンプルを用いた同定のための測定を行った。インクルージョンリストの作成により、指定した時間には、指定された m/z 値を持つ親イオンが優先的に選択され、MS/MS 測定が行われた。ただし、指定以外の時間においては、測定をしない設定はできないため、通常の MS/MS 測定が行われた。得られた Wiff データファイルより、MASCOT による MS/MS イオンサーチを行うためのピークリストを作成し、トリプシン消化、miss cleavage 許容数 1 にてデータベースサーチ(Swiss Prot)を行った。その結果、ペプチド 12-20 については、Major Urinary Protein Precursor、12-5 については Rat Serum Albumin であることが判明した。いずれも、比較的存在量の多いタンパク質であり、MASCOT サーチによるスコアも高いことから、ほぼ間違いのないと考えられる。

残り 3 ペプチドに関してはヒットしなかつ

たため、分解されたペプチドである可能性を考え、トリプシンフラグメントの条件をはずして検索を行った結果、2 ペプチドに関して可能性の高いヒットが見つかった。ペプチド 13-1 については、Retinoic acid receptor RXR-beta および Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase5 が候補として、13-10 に関しては、E3-ubiquitin-protein ligase rififylin が比較的良好な同定結果を与えた(表7)。さらに他検体を用いて、最終的な同定を行う予定である。

8. オリジナルデータ解析ソフトウェア「mzMore」の開発

これまでの検討において、LC-MS データの解析においては既存のソフトウェアは、必ずしも我々の要求する解析機能を備えていないことが明らかとなり、その克服が高感度解析系の確立のために重要な要件であることが判明したため、当初よりオリジナルなソフトウェア開発の構想を持った。そして、サンプル解析と平行して、LC-MS データに基づいた発現差解析のためのオリジナルソフトウェア“mzMore”の開発を、インド Rushmore 社の協力を得て進めてきた。

まず、データ解析のための基本的要素を図19に示した。質量分析装置から得られる生データは、Qstar の場合 wiff 形式という独自のフォーマットを持つため、この生データを一般性があるテキスト(数値)データとして扱いが可能なように、MZstar というフリーソフトにて MZxml 形式のデータに変換し、PEP3D ソフトウェアを使って3次元(2次元デンシティー)プロットとして可視化することができた。これにより、LC-MS データ全体像を捉えることができるとともに、目視によるサンプル間比較も可能となった。

次に重要な機能として、ピーク認識以降の一連のデータ処理を行うことになるが、最初のピーク認識の部分のアルゴリズムが一番難しくかつ重要なステップである。当初ソフトウェアの機能として、各種キャンより得られる2次元データを基に、スムージング等の処理をし、具体的なピークの認識を行った(図20)。左側のウィンドウ内にはある一時点での TOF マスデータが数値データとして表示されているが、独自のアルゴリズムを用いてピークの認識を行っており、ピークとして認識された領域が

オレンジ色で示されている。紫色の部分がピークトップに相当する。右側のウィンドウにリストされているのがこのスキャンに置いて認識された全てのピークの情報である。

この例では、上側のピークは比較的うまく認識されているが、下側のピークの裾野部分がうまく認識されていない。また、この手法では各スキャンごとにピークトップの位置(m/z)が微妙にずれるため、リテンションタイムを含めた正確なピークトップを決める際に問題が生じた。そこで、さらに効率的に単一のピークトップを検出するために、3次元処理によるアプローチを取ることにした(図21)。この方法では、経時データを含めたすべてデータポイントを同時に扱い、適当な区間の m/z 値についてそれらをまとめてシグナル強度の平均値をとり、リテンションタイムを横軸にとった2次元表を作成し、シグナル強度をマッピングした。そしてこの表から、シグナル強度の高い順にピークトップ位置を検出し、ピークトップが決まったら、それが含まれるピーク全体像を抽出し、この部分をマスクした後、それ以外の領域においてもっともシグナル強度の高い位置を次のピークトップに定め、同じ作業を繰り返すことにより、設定したバックグラウンドレベルに到達するまで次々にピークを検出していく手法をとった。この処理においてポイントとなるのが、ピークのマスクングであり、ピークの密集した領域においては、ピークどうしの重なり合いが生じるため、このような場合には、それぞれを重なりあうピークとして分離し、別ピークとして検出できるようにする工夫が必要であった。主に、多角的に傾きをチェックすることにより、新たなピークを検出できた(図22)。

さらに、課題となるシグナル強度の弱いピークを正しく検出するために、バックグラウンドノイズのソフトウェアによる軽減を試みた。質量分析データから得られるノイズには、測定機器由来のマシンノイズおよびルームコンタミネントまたは溶媒由来のケミカルノイズの2種類が存在する。前者は比較的低レベルであるので大きな妨害にはならないが、弱いシグナルを検出するためには邪魔になる。また、後者は通常のピークとは同じ形状をしており、測定全体にわたって観察される。

まず、マシンノイズに関しては、通常のピークに比べて比較的周期が長い、すなわち幅が広い形状をしているため、スキャンごとの2次元

ピークデータを、Fast フーリエ変換 (FFT) することにより効率的に取り除くことができました。次に、ケミカルノイズに関しては経時的にコンスタントに出現するという特徴から、タイムコースデータに関して FFT 処理を行うことにより、取り除くことが可能となった。

9. サンプルの前処理による高発現量タンパク質の除去

ラット尿中には、血清中と同様に高発現量で存在するタンパクがあり、これらが原因となって、LC-MS に導入するサンプル量が制限されるため、より高感度な解析をめざして、これら高発現量のタンパク質を前処理にて除去することを考えた。

18 年度の検討で、LC-MS/MS 解析を行った結果から、サンプル中にはラット血清アルブミンと同定されたスポットが数多く存在したため、尿中でもある程度アルブミンが主要なタンパク質となっていることがわかった。しかし、これ以外にもより強度の強いスポットが存在したため、これらの分子量を知り、LC-MS/MS データと併せた同定を行うために、2次元電気泳動を用いた解析を行った。

通常の1次元目に等電点電気泳動、2次元目に SDS-PAGE を用いた分子量分画による2次元電気泳動法を用いて、尿中タンパク質を分離した図を 23 に示す。ラット尿中における、クマシーブルー染色により染色される比較的発現量の高いタンパク質の種類はそれほど多くなく、2D ゲルイメージ上で、番号を付けたスポットについて、切り出し、ゲル内トリプシン消化の後、MALDI-TOF/TOF マス解析を行い、TOF マスデータによる PMF 解析および MS/MS データによる MS/MS イオンサーチにより同定されたタンパク名を下の表に示した。

主要なタンパクとして同定されたのは、alpha-2u-globulin (Major urinary protein precursor) の他、urinary protein 2 precursor, serum albumin, Alpha-amylase, prostatic steroid-binding protein chain C3 precursor, AY327506, RATVPSP であった。また、LC-MS による同定からは、urinary protein 2 precursor (UP2) のホモログとして、urinary protein 1 precursor (UPI) urinary protein 3 precursor (UP3) も検出された。

これより、ラット尿中には、血清中と同様に高発現量で存在するタンパクがあり、これらが

原因となって、LC-MS に導入するサンプル量が制限されるため、より高感度な解析をめざして、これら高発現量のタンパク質を前処理にて除去するため、まず同定されたタンパクに対して、合成ペプチドを用いた抗体作製を行った。MUP、UP に対する抗体の作製については、これらのアミノ酸配列情報より、特異的かつエピトープとして相応しい 7-8 残基を選択し (UPI-3 については共通部分の配列より選択)、これらに対する合成ペプチドを作製した。この2種の合成ペプチドを混合し、アジュバントとともに2匹のウサギに対して2週間間隔で計5回感作を行い、最終感作より1週後に採血を行った。得られた血清を、免疫に用いた合成ペプチドを結合したアフィニティーカラムにより精製した。溶出したフラクションに対して、合成ペプチドを抗原とした ELISA 法により反応性を確認したところ、12500 倍希釈においても安定した力価を示し、目的の抗体が得られていることが確認された。

次に、作製した抗体を Dynabeads ProteinG (Invitrogen) に結合させ、ラット尿を処理した後、2次元電気泳動にて、処理の有無によるタンパク質の変化を観察した。その結果図 24 に示したように、MUP および Urinary Protein Precursor のスポットは薄くなる傾向が見られた。ただし、処理した方には抗体由来と思われる新たなスポットが出現し、相対的に全体のタンパク量が減っている可能性を考えると、タンパク除去の効果は、それほど大きくなかった。

10. ヒト尿サンプルの解析

市販の正常男性由来尿サンプルを使って、同様な検討を行い、将来のヒトでのマーカー検出に向けた基礎的データを取得した。

ヒト尿では、そのタンパク含量がラット、マウスに比べて 0.2 mg/ml と 5-10 分の 1 以下であるが、それでも一回の測定に必要な量は 2 μ l と十分高感度な測定が可能であった。図 25 に LC-MS データの一例を示すが、マウスやラットに比べて高発現量のペプチドピークが少なく、さらに高分子量側にも多くのピークが見られており、一見して検出可能なペプチド数は多いことがわかった。

考察

プロテオミクスを用いた網羅的発現解析は、

タンパク、ペプチドといった生体成分の変化をバイオマーカーとして捉える上で重要な技術であり、本研究においても毒性に伴って変化するマーカーの探索への応用を試みた。プロテオミクスの手法は、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析手法とは異なり、まだ完成した技術として確立されておらず、2次元電気泳動をはじめ様々な手法が試されている。核酸と違いタンパク質は多様な性状を持った分子であり、増幅手法もないことから、高感度に網羅的な解析が難しく、ここが一番の課題となっている。2次元電気泳動による解析が一般的に用いられているが、検出感度、網羅性といった観点からはまだ不十分であり、検出できるタンパク質は発現量の多い一部のタンパクに限定されている状況である。分離技術としてのゲル電気泳動は、手軽ではあるが試料のロスなど高感度化をめざす際の障壁も多いため、我々は、液体クロマトグラム (LC) を用いた、オンラインでの LC-MS/MS 解析を用いてより高感度な検出法の確立をめざした。現在、質量分析計 (MS) の技術革新はめざましく、フェムトモルレベルでのペプチドの検出が容易になっている。検出器として MS を用いることにより、高感度なペプチドの検出が期待でき、さらに接続する LC に関しても、その流速を毎分ナノリットルレベルにまで落とすことにより、微量試料からの高感度分析が可能になると期待された。

こうした背景から我々は、オンラインナノ LC-タンデム MS/MS システムを用いた網羅的ペプチド解析系の構築へ向けて基礎的検討を行った。当研究機関にて利用可能なタンデム型質量分析装置は、四重極/飛行時間 (Q-TOF) 型の Qstar であり、この装置の特性を生かした分析条件について検討した。即ち、TOF を用いることにより高分解能な測定が可能であるため、複雑なサンプルの分離には向いていることがわかった。一方で、欠点としてはイオントラップ型などに比べ、MS と MS/MS のスイッチングによる測定に要する時間が少し長いこと、ペプチドが溶出する一定時間の間に MS/MS 測定可能な親イオンの数が制限されることになり、網羅性を高める上で一番の障壁となることがわかった。この解決策としては、2次元 LC などの前分離を行い、検出可能な親イオン数を増やすということが考えられるが、少数のサンプルには適応できても、多検体を比較しなければいけない本研究の目的からはやや現実的ではな

いと考えられた。そこで、精度の高い TOF マス測定を生かす意味で、MS/MS 測定による同定をいったんあきらめ、TOF マスのみを効率的に測定し、その中で発現の違いが見られたピークのみに着目して、もう一度同じサンプルを流し直して、それらのみを同定するというアプローチを取る事にした。測定条件の最適化により、数 μl の尿サンプルからでもペプチドのシグナルは十分検出可能であることがわかり、こうした多重解析は十分実現可能であることが判明した。

一方で、LC-MS から得られる膨大な量の質量分析データの解析には、既存の解析ソフトウェアである AnalystQS を用いた場合に、どうしても機能上制約があるとともに、解析精度に疑問点が残ったため、独自の解析を可能とするためのソフトウェアの必要性が生じ、オリジナルソフトウェアである「mzMore」の開発を平行して進めた。まず、生データの取り出しと加工に関しては、フリーのツールとして利用可能な mzStar というソフトウェアの機能を借り、Qstar 独自のファイル形式である Wiff ファイルから raw data を取り出し、一般性のある mzXML ファイルへと変換することができた。さらに、Pep3D という可視化ツールを使うことにより、2次元電気泳動と類似した3次元プロットを得ることができ、全体のペプチド溶出のパターンを把握することができた。この後 mzMore の機能として生データからのピークの自動認識を行うことになるが、当初質量分析装置の各スキャンから得られる 2次元データを基にピーク検出のアルゴリズムを作成していたが、リテンションタイムの情報を取り込んで3次元展開する際に問題が生じるなどの理由から、途中で3次元データに基づいたピーク検出のアルゴリズムを使用することに変更し、より効率的なピーク検出が可能となった。3次元グラフにおけるピーク検出は、人間の目で見ただけでは非常に簡単な作業に思われるが、これを PC 上で行わせるためにはかなり工夫が必要であり、特に重なり合ったピークを分離して検出するためのアルゴリズム開発には苦心した。最終的にかなり満足できるパフォーマンスが得られたが、より強度の弱いピークを検出するためには、ノイズ軽減の処理が必要であることがわかった。高感度な分析が可能になると、低レベルのマシンノイズおよび測定質の環境から由来する化学物質のノイズなどが問題とな

り、これらを除くことがより高感度な検出への課題となった。これらピークは、基本的に時間変化を伴わないという性質などを利用し、Fast Foulmer Transfer 法を用いたピーク形状の検討から、通常ピークとは分別してそれらを選択的に除去することができることがわかった。これら機能は、ほぼ完成の段階を向かえ、本研究の終了後、フリーソフトとして一般に公開する予定になっている。

また、今回の解析の過程において、ラット尿中には高発現量のタンパクがあり、これらが測定上の邪魔になることがわかった。この点は、血清を用いたプロテオミクスでは既に指摘されている問題で、これらを取り除く目的で、まず高発現量のタンパクの同定を行い、Major Urinary Protein Precursor および Urinary Protein Precursor 1-3 と同定した。これらに対する抗体を作製し、磁気ビーズに結合させ尿サンプルを前処理することにより、高発現量タンパクの除去を試みた。二次元電気泳動における検討により、目的のスポットの減少を確認できたが、まだ除去効率は低いためさらに実験条件の検討が必要であることがわかった。今後更なる効率化が図れば、特許化が可能であると考えられる。

最後に、定量的比較解析に向けては、安定同位体ラベルによる方法と、ノンラベルによる方法の二通りのアプローチを行った。質量分析計の定量性の問題から、より正確な比較を行うためには、安定同位体ラベル法を用いた方法が有効である。アプライドバイオシステム社から提供されている cICAT 試薬を用いてアセトアミノフェン処理ラット尿におけるバイオマーカー探索を行い、発現の異なるいくつかのマーカー候補を得た。このうち、サンプル間で普遍性のある数種のスポットに関して、MS/MS によるフォーカス同定を試みた。TOF マスから得られた情報を基にインクルージョンリストを作成し、目的ペプチドにターゲットを絞って MS/MS 測定することにより、通常の測定では選択できなかったイオンも効率的に測定でき、同定の精度は上がった。しかし、シグナルの弱いピークに関しては、十分な信頼性を持って同定に足るだけのデータが得られなかったため、今後、MS/MS 測定条件の最適化や、ソフトウェアによる同定の最適化、および 2 次元 LC を導入したサンプル導入量の向上などにより、同定効率を上げる試みを続けたい。また、異なる同定ソフ

トウェアによる解析結果の吟味と統合による総合判定の機能をオリジナルソフトウェア mzMore の同定機能として付加することも検討している。

cICAT 解析においては、定量性の向上もさることながら、むしろ複雑性の軽減による網羅性の向上が期待できるという感触を得た。すなわち、通常タンパク質をトリプシン消化することにより複数のペプチド断片になり、試料の複雑性が一気に増すことが解析を困難にしているが、cICAT ラベル化法によりシステイン残基をもつペプチドのみが修飾され、カラムで分離されるため、試料の複雑性を落とすことができる。これにより、より多くのタンパク質を LC-MS に導入することができ、低発現量のタンパクの回収率が上がることを期待できた。

一方で、cICAT という高価な試薬を使わず、より簡便な手法での比較を可能とするため、ノンラベルによる方法に関しても検討を加えた。当初、LC-MS データの再現性の問題から、独立した解析データの重ね合わせは難しいという印象を得たが、その後の LC-MS 測定条件の更なる最適化の結果、独立した測定間でかなり再現性が高い MS スペクトルが得られることが、データの可視化ツールの助けを得て確認でき、はっきりとした変化を示すシグナルに関しては、目視で検索が可能となった。今後、サンプル間のリテンションタイムの補正による、ピークの関連付けと、データ標準化による定量比較に関して、mzMore の機能として組み込めるよう開発を進める予定である。

本研究の最後に、将来ヒトへの適応を意識して、コントロールヒト尿サンプルに関する測定を行った。その結果、尿中のタンパク量がマウス、ラットに比べて少ないため、必要とする尿量は多いが、それでも数十 μl あれば十分であり、さらに解析を邪魔する高発現量のタンパク質が少なく、全体として得られるペプチドシグナル数が多いことがわかり、ラット、マウスに比べヒトサンプルのほうが効率的に解析可能であることが判明した。よって、今後ヒト臨床サンプルを使った解析に向けて大きな期待が膨らむとともに、本研究で得られた mzMore をはじめとする研究成果が今後の研究の展開に大きく貢献することが期待できる。

C-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の

開発

疾患モデルマウス 5 系統ならびにそれらの野生型であるマウス 3 系統、モルモットの尿試料を用いて NMR での病態時における解析を実施した。今回用いた疾患モデルマウスは EL マウス (てんかんモデル), ICGN/M マウス (ネフローゼモデル), GM1 マウス (リソゾーム病モデル), 4C30 マウス (心筋症モデル), C57BL/6J bg (Chediak-Higashi 病モデル) である。NMR 解析の結果を図 1 に示した。

細胞レベルでのメタボノミクス解析の前段階として、細胞の超音波破碎における試料の安定性評価、試料の前処理法の検討ならびに基礎解析を行った。細胞試料の作成法として超音波による細胞破碎を用い、氷冷酵素安定化バッファ中で細胞を超音波破碎し、酵素活性 (G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase), LD (Lactate dehydrogenase), NP (Nucleoside phosphorylase)) を有した状態で細胞破碎を行った。

細胞レベルでのメタボノミクス解析と遺伝子発現解析データとの比較解析を行った。細胞は THP-1 を用い、処理薬剤としてアセトアミノフェン、メトトレキサート、オメプラゾール、チオアセタミド、シスプラチン、ジエチルニトロソアミンを採用し、薬剤暴露 24 時間後の細胞より DNA/RNA を抽出するとともに、NMR 解析用の超音波破碎細胞液を作成し、アルブミン除去後、NMR にて解析を行った。

考察

病態モデルマウスの尿試料の解析結果から、実験動物を用いることによって病態時の毒性マーカーを見出すことは比較的容易であり、今後の更なる解析によって新たな毒性マーカーを見出すことができると思われる。しかし、実験動物は非常に厳密に制御された環境下で維持・管理されている動物であり、薬剤投与による毒性などの検出には非常に有用であると考えられるが、ヒト試料を考えた場合、生活環境・飲食物・体質など様々な要因によってスペクトラム変化が起こり、解析を困難にすることが容易に予測できる。今回用いたモルモットにおいても、食餌の違いを主とする主の違いが明らかであり、尿を試料とした場合には、それらをどのようにして克服するかが今後の課題となると考えられた。

細胞レベルでのメタボノミクス解析におい

ては、NMR が非常に高感度であり、煩雑な前処理を必要としないことから、細胞を薬剤処理し、一定時間後超音波破碎した細胞試料をアルブミン除去後解析する方法を検討し、実際に NMR 解析したところ、ノイズ等を気にすることなく解析が可能であるという結果を得ている。試料として用いる細胞破碎液に関してはいろいろな方法によって調製が可能であるが、簡便な方法であり、酵素活性も維持できるように、酵素安定化バッファ中での超音波破碎を実施した。本方法は発熱による酵素活性への永久尾が考えられるため、氷冷したバッファ中にて実施することにより、酵素活性を維持した状態での細胞破碎液調製を行うことができた。

薬剤暴露した細胞の遺伝子発現解析データはコントロールと比較して変動した遺伝子群を抽出し (図 2)、クラスター解析を行った (図 3)。その結果オメプラゾールとシスプラチン暴露のデータが他の薬剤と異なるグループとなる結果であった。

また、細胞レベルでのメタボノミクス解析においては、NMR が非常に高感度であり、煩雑な前処理を必要としないことから、細胞を薬剤処理し、一定時間後超音波破碎した細胞試料をアルブミン除去後解析する方法を検討しており、実際に NMR 解析したところ、ノイズ等を気にすることなく解析が可能であるという結果を得ている。試料として用いる細胞破碎液に関してはいろいろな方法によって調製が可能であるが、簡便な方法であり、酵素活性も維持できるように、酵素安定化バッファ中での超音波破碎を実施した。本方法は発熱による酵素活性への永久尾が考えられるため、氷冷したバッファ中にて実施することにより、酵素活性を維持した状態での細胞破碎液調製を行うことができた。

NMR を用いた薬剤処理細胞のメタボロームデータを PCA 解析すると、暴露した薬剤ごとにある程度分離できることがわかった。特に PCA 解析を行った時に、遺伝子発現のクラスター解析結果と薬剤の分類が一致していた (図 4)。この結果から薬剤暴露した細胞の破碎液によるメタボローム解析が遺伝子発現解析によるトキシコゲノミクスデータを補完するのに有効な方法であるといえる。

今後はメタボロミクス解析手法の開発を継続し、網羅的遺伝子発現解析データであるトキシコゲノミクスデータの表現型を補完する非

常に有効な手法として技術確立を継続する予定である。

D. 結論

D-I NMRを用いたメタボロミクス解析、高感度化技術の開発

¹H NMRによる尿成分のメタボロミクス解析手法を検討した結果、¹H専用高感度プローブを装備した¹H NMR装置を用いて、presaturation NOESYのパルスシークエンスで軽水シグナルの消去することにより、メタボロミクス解析が可能な¹H NMRスペクトルを測定することができた。メタボロミクス解析手法としては、主成分分析によるスペクトル全体の網羅的解析によって代謝物総体の変化を明らかにし、さらに毒性を特徴づける主成分軸上の特徴的なピークについてはNMR SUITEで解析することにより、代謝物の同定・定量が可能であることがわかった。この手法を用いて、APAPのラット肝障害モデルの尿のメタボロミクスを行ったところ、クエン酸や2-オキソグルタル酸などのエネルギー代謝系からの内因性代謝産物が肝障害のバイオマーカー候補となることが明らかとなった。また、APAP由来の代謝物の変動や、PB前処理の影響についても本手法を用いて解析することができた。以上、非侵襲試料を用いた医薬品の安全性予測系に資する手法として、¹H NMRによる尿成分のメタボロミクス解析手法を確立し、肝障害のバイオマーカー候補を明らかにすることができた。

D-II メタボロミクスによる安全性予測系の高感度化ならびに組織・血液・尿を試料とした毒性マーカーの3次元的解析手法の確立

D-II-1 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明：

新規高感度安全性予測系の構築を目指し、まずその前段階の肝障害の機序あるいは防御の機序の解明、毒性マーカーの検索のため、網羅的遺伝子発現解析等のデータと内在性代謝物の変動を結び付ける解析手法の開発を試みた。網羅的遺伝子発現解析に加え、肝臓の内在性代謝物（脂質）レベルの変動データよりLCA誘発肝障害と胆汁排泄される脂質の代謝異常との関連を考えた。これらの仮説を証明するために脂質動態を変動させることが考えられる、

ME3738とprobucoIをLCAと併用して解析を行い、胆汁へ排泄される脂質であるコレステロールやリン脂質の排泄を亢進させる機序が肝障害を軽減させる可能性を示した。網羅的遺伝子発現解析のデータより推測された防御機序を二つの化学物質により検証することに成功した。今後はさらに非侵襲試料を用いたメタボロミクス解析を組み込むことにより毒性マーカー等の検索に発展させていく必要が有る。

D-II-2 ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明：

Flutamideの加水分解で生じる主代謝物の5-amino-2-nitrobenzotrifluoride (FLU-1)とTCPOBOPを併用し、絶食を組み合わせることでマウス肝障害モデルを作製した。ヒト肝ミクロソームはFLU-1 N-水酸化活性を有し、CYP3A4が主にこの反応を触媒することが示された。TCPOBOPを投与した群では肝ミクロソーム中のFLU-1 N-水酸化活性が対照群と比較して約5倍上昇した。肝内GSHレベルはFLU-1・TCPOBOP併用群では有意な減少が認められた。FLU-1・TCPOBOP併用群で絶食を行わないと、ALT値は有意に低下した。FLU-1 N-OHをGSH、マウス肝細胞質画分とともに反応させると代謝産物としてFLU-1が検出された。またFLU-1 N-OHをミクロソームタンパクと反応させると37-75 kDaの間に複数の付加体タンパクが抗flutamideハプテン抗体を用いたイムプロット法により検出されたが、flutamide, OH-flutamide, FLU-1ではほとんど認められなかった。

以上の結果よりFLU-1のN-水酸化代謝物はタンパクとの反応性を有し、肝障害誘発に関与することが示唆された。GSH存在下でのFLU-1 N-OHのFLU-1への還元はFLU-1 N-OHの解毒機構の一つであると考えられ、flutamideによる肝障害誘発に、肝臓におけるFLU-1 N-OHの生成増加と肝内GSH枯渇の両方が重要であることが示唆された。

D-III LC/MS/MSを用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

D-IV メタボロミクスと病理の関連性についての解析

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発：

尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロ

ミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、ヒトで肝障害の発生が報告されているAPAPのラット肝障害モデルを用い、質量分析計を用いた尿サンプルのメタボロミクス手法の開発を行った。薬物を投与しない群（対照群）で検出されるピークのみをまず抽出した後、それらについて解析を実施することで投与薬物の代謝物の影響を取り除くことに成功した。さらに毒性指標との相関性等による絞り込みとPCA解析の絞り込みを組み合わせることでバイオマーカー候補を精度よく抽出出来ることが示された。以上のことよりバイオマーカー検索のための質量分析計を用いたメタボロミクス手法の基礎的な解析法が確立されたと考えられた。

D-V メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

1. メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究として、フラーレンのイオン化のしやすさをペプチドのソフトイオン化に利用することを考え、ペプチドのアミノ基にフラーレンを温和な条件で導入する試薬を開発した。開発したフラーレン骨格を有する一連の活性カルボン酸誘導体を用いて、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体化反応が完結すること、この誘導体化試薬を用いてペプチド類がTOF-MS分析により効率良く検出できることを確認した。また、ペプチドのアミノ基に重水素化したピリジン環を導入する試薬も開発し、合成した誘導体化試薬を用いることにより、リン酸化ペプチドの検出やPSDモードによるアミノ酸配列解析が可能であることを見出した。今回開発した誘導体化試薬は、ペプチドのアミノ基修飾試薬としてタンパク質の同定や相対的定量、リン酸化部位の同定に有効であり、定量的リン酸化プロテオーム解析によく用いられているICAT (Isotope coded affinity tag) 法と比べても有用である。また、イオン化効率を向上させる構造をもつためペプチド混合物のままリン酸化ペプチドを検出できる可能性があり、リン酸化ペプチドを精製することなく検出し、同定できることが期待できる。

2. 毒性軽減構造修飾法の開発

化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響の解析について、活性酸素消去作用を持ち脳梗塞急性期治療薬として認可されているエダラボンをモデル化合物として選び研究を行い、エダラボンの副作用として知られている腎毒性を軽減する目的で、脂溶性/水溶性を制御する種々の置換基を導入したピラゾロン誘導体を合成し、活性酸素消去能と構造との相関を調べた。その結果、4位にピリジル基を導入したピラゾロン誘導体が、エダラボンに優るすぐれた活性酸素消去能を有していることが明らかになり、構造修飾により毒性が軽減される可能性が示された。

D-VI LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

オンライン nanoLC-MS/MSを用い、定量と同定を分離した 2-step のアプローチにより、尿中のペプチドおよびタンパクを網羅的に解析する手法の確立を行なった。cICATを用いた手法により肝毒性物質であるアセトアミノフェン処理したラット尿サンプルを用い、投与により発現減少する数種のペプチドが得られた。これから、肝毒性予測のマーカーとなるかどうかは、普遍性を含め今後検討を加えなければいけないが、LC-MSを用いた高感度な分析によりマーカー候補を検出するまでのストラテジーについてはほぼ確立できたといえ、今後この手法を用いてヒトサンプルを含めた網羅的尿プロテオーム解析へと応用が可能であることが期待できる。また、cICATを用いた方法は、定量性ととも、システイン含有ペプチドの選択による試料の複雑性の軽減から、より低発現量のペプチドを検出できるという点で有効性が高い手法である。

ノンラベル化法による検討においても、データの再現性が高まったこともあり、ある程度発現差の大きいペプチドに関しては、検出が可能となった。マウス尿の解析で得られたペプチドに関しては、肝臓における遺伝子傷害性のマーカーとなりうる可能性があり、さらに検討を進めていきたい。

これら、LC-MSを用いた検討では、質量分析装置から得られるデータ処理の部分が研究の成否に向けて重要な意味を持つため、より効果的な解析を可能とするためのオリジナルソフトの開発が必須であった。このためのソフトウエア mzMore は、分析データの3次元グラフ化、

3次元ピーク認識と、FFT法による各種ノイズの軽減、ペプチドピークのアサインメントと定量を主な機能とするところまでは、ほぼ満足のいく機能が完成し、今後こうしたプロテオーム解析に有効なツールとして機能することが期待できる。今後は、同定の部分に関しても、より信頼性のある同定を行うためのアルゴリズムの開発や、複数のソフトウェアによる解析結果の統合とそれらの精査による評価機能をその機能の一部として備えられるよう、開発を続けていきたい。

D-VII 細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

ヒトに投与して初めて起こる副作用を予測するため網羅的な遺伝子発現解析が注目されトキシコゲノミクスと呼ばれる研究が実施されてきた。しかし毒性の予測までには至っていないのが現状である。本研究では非侵襲試料を用いたメタボロミクス解析手法を確立し、トキシコゲノミクスで得られた網羅的な遺伝子発現情報を補完し、毒性予測につながる評価系開発を行うことを目的とし、以下の研究を実施した。

1. マウス病態モデルを用いて、採取した尿試料のNMR解析を行い、薬剤による毒性マーカーと病態時のマーカーとの相互比較に利用できるマーカー検索を実施し、病態特異的なマーカー検出を行った。2. 細胞（各種臓器由来）のメタボローム解析に必要なサンプル調製法（特にアルブミン除去などの前処理法）の検討を行い、超音波破碎試料を用いたNMRによるメタボローム解析を実施した。3. 細胞への薬剤暴露時の網羅的遺伝子発現解析を実施するとともに、同じサンプルを用いたNMRによるメタボローム解析の検討を行い、メタボローム解析が遺伝子発現解析によるトキシコゲノミクスデータを補完するのに有効な方法であることを明らかにした。

E 健康危機管理情報

なし

F 研究発表

1. 論文発表

・NMRを用いたメタボノミクス解析、高感度化技術の開発

- 1) R. Shimazawa, N. Nagai, S. Toyoshima, H. Okuda, Present sate of new chiral drug development and review in Japan, *J. Health Sciences*, 54, 23-29 (2008).
- 2) K. Fukuhara, I. Nakanishi, A. Matsuoka, T. Matsumura, S. Honda, M. Hayashi, T. Ozawa, N. Miyata, S. Saito, N. Ikota, H. Okuda, Effect of methyl substitution on antioxidative property and genotoxicity of resveratrol, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 282-287 (2008).
- 3) S. Manda, I. Nakanishi, K. Ohkubo, Y. Uto, T. Kawashima, K. Fukuhara, H. Okuda, H. Hori, T. Ozawa, N. Ikota, S. Fukuzumi, and K. Anzai, Enhanced radical-scavenging activity of naturally-oriented Artepillin C Derivatives, *Chem. Commun.*, 626-628 (2008).
- 4) I. Nakanishi, T. Shimada, K. Ohkubo, T. Shimizu, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, T. Ozawa, K. Anzai, S. Fukuzumi, N. Ikota, K. Fukuhara, Involvement of electron transfer in the radical-scavenging reaction of resveratrol, *Chem. Lett.*, 36, 1276-1277 (2007).
- 5) K. Fukuhara, S. Oikawa, N. Hakota, Y. Sakai, Y. Hiraku, T. Shoda, S. Saito, N. Miyata, S. Kawanishi, H. Okuda, 9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3869-3873 (2007).
- 6) W. Hakamata, E. Yamamoto, M. Muroi, M. Mochizuki, M. Kurihara, H. Okuda, K. Fukuhara, Design and synthesis of \cdot -glucosidase inhibitor having DNA cleaving activity, *J. Appl. Glycosci.* 53, 255-260 (2006).
- 7) W. Hakamata, I. Nakanishi, Y. Masuda, T. Shimizu, H. Higuchi, Y. Nakamura, T. Oku, S. Saito, S. Urano, T. Ozawa, N. Ikota, N. Miyata, H. Okuda, K. Fukuhara, Planar catechin analogues with alkyl side chains, as a potent antioxidant and an \cdot -glucosidase inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6524-6525 (2006).
- 8) W. Hakamata, M. Muroi, T. Nishio, T. Oku, A. Takatsuki, H. Osada, K. Fukuhara, H. Okuda, M. Kurihara, N-linked oligosaccharide processing enzymes as molecular targets for drug

discovery, *J. Appl. Glycosci*, 53, 149-154 (2006).

- 9) K. Fukuhara, M. Nagakawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, S. Urano, S. Fukuzumi, T. Ozawa, N. Ikota, M. Mochizuki, N. Miyata, H. Okuda, Structural Basis for DNA Cleaving-Activity of Resveratrol on the Presence of Cu (II), *Bioorg. Med. Chem.* 14, 1437 - 1443 (2006).
- 10) I. Nakanishi, C. Nishizawa, K. Ohkubo, K. Takeshita, K. Suzuki, T. Ozawa, S. M. Hecht, M. Tanno, S. Sueyoshi, N. Miyata, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, K. Fukuhara, Hydroxyl Radical Generation via Photoreduction of a Simple Pyridine N-Oxide by an NADH Analogue, *Org. Biomol. Chem*, 3, 3263 - 3265 (2005).
- 11) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota, Electron-Transfer Mechanism in Radical-Scavenging Reactions by a Vitamin E Model in a Protic Medium, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 626 - 629 (2005).

・トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明:

- 1) M. Miyata, Y. Matsuda, H. Tsuchiya, H. Kitada, T. Akase, M. Shimada, K. Nagata, F. J. Gonzalez and Y. Yamazoe Chenodeoxycholic acid-mediated activation of the farnesoid X receptor negatively regulates hydroxysteroid sulfotransferase *Drug Metab. Pharmacokin.* 21, 322-330 (2006)
- 2) M. Miyata, H. Watase, W. Hori, M. Shimada, K. Nagata, F. J. Gonzalez, and Y. Yamazoe Role for enhanced fecal excretion of bile acid in hydroxysteroid sulfotransferase-mediated protection against lithocholic acid-induced liver toxicity *Xenobiotica* 36, 631-644 (2006)
- 3) M. Nomoto, M. Miyata, M. Shimada, K. Yoshinari, F. J. Gonzalez, S. Shibasaki, T. Kurosawa, Y. Shindo, Y. Yamazoe ME3738 protects against lithocholic acid-induced hepatotoxicity, associated with enhancement in biliary bile acid and cholesterol output. *Eur. J. Pharmacol.* 574, 192-200 (2007)

・ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明:

- 1) M. Ohbuchi, M. Miyata, D. Daichi, M. Shimada, K. Yoshinari and Y. Yamazoe Involvement of N-hydroxylation of flutamide metabolites and hepatic GSH depletion in flutamide-induced hepatotoxicity *Drug Metab. Rev.* 39, supplement 1 36 (2007)

・LC/MS/MS を用いた低分子内因性物質のメタボロミクス技術の開発

・メタボロミクスと病理の関連性についての解析

・質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発

- 1) 矢本 敬、真鍋 淳: 医薬品開発における毒性評価のバイオマーカー: ヒューマンサイエンス, 19(2)、22-26、2008

・メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高感度化試薬の開発ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

- 1) Takayoshi Suzuki, Osamu Nagae, Yuka Kato, Hidehiko Nakagawa, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, Photo-induced Nitric Oxide Release from Nitrobenzene Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (33), 11720-11726 (2005).
- 2) Takayoshi Suzuki, Azusa Matsuura, Akiyasu Kouketsu, Sinya Hisakawa, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Design and synthesis of non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors; identification of a selective histone acetylating agent, *Bioorg. & Med. Chem.*, 13, 4332-4342 (2005).
- 3) Takayoshi Suzuki, Yuki Nagano, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matsuura, Sakiko Maruyama, Mineko Kurotaki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates, *J. Med. Chem.*, 48 (4), 1019-1032 (2005).
- 4) Uhinya Usui, Takayoshi Suzuki, Yoshifumi Hattori, Kazuma Etoh, Hiroki Fujieda, Makoto Nishizuka, Masayoshi

- Imagawa, Hidehiko Nakagawa, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, Design, synthesis and biological activity of novel PPARgamma ligands based on rosiglitazone and 15d-PGJ2, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 15, 1547-1551 (2005).
- 5) Takayoshi Suzuki, Azusa Matsuura, Akiyoshi Kouketsu, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Identification of a potent non-hydroxamate histone deacetylase inhibitor by mechanism-based drug design, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 15, 331-335 (2005).
 - 6) T. Suzuki, N. Miyata, Non-hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 12, 2867-2880 (2005).
 - 7) Hidehiko Nakagawa, Ryo Ohyama, Ayako Kimata, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Hydroxyl radical scavenging by edaravone derivatives: Efficient scavenging by 3-methyl-1-(pyridin-2-yl)-5-pyrazolone with an intramolecular base. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(23), 5939-5942 (2006).
 - 8) Takayoshi Suzuki, Keiko Imai, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, 2-Anilinobenzamides as SIRT Inhibitors. *ChemMedChem*, 1, 1059-1062 (2006),
 - 9) Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Yukihiro Itoh, Shinya Hisakawa, Satoko Maeda, Minoru Yoshida, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate. *J. Med. Chem.*, 49(16), 4809-4812 (2006).
 - 10) Shinya Usui, Hiroki Fujieda, Takayoshi Suzuki, Naoaki Yoshida, Hidehiko Nakagawa and Naoki Miyata, Identification of novel PPARalpha ligands by the structural modification of a PPARgamma ligand, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 16, 3249-3254 (2006).
 - 11) Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Rational design of non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*, 6(5), 515-526 (2006).
 - 12) Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. *Curr. Med. Chem.*, 13(8), 935-58 (2006)
 - 13) Shizuka Ban, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Novel mitochondria-localizing TEMPO derivative for measurement of cellular oxidative stress in mitochondria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 2055-2058 (2007).
 - 14) Takayoshi Suzuki, Shinya Hisakawa, Yukihiro Itoh, Sakiko Maruyama, Mineko Kurotaki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Identification of a potent and stable antiproliferative agent by the prodrug formation of a thiolate histone deacetylase inhibitor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 1558-1561 (2007).
 - 15) Shizuka Ban, Hidehiko Nakagawa, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Novel membrane-localizing TEMPO derivatives for measurement of cellular oxidative stress at the cell membrane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 1451-1454 (2007).
 - 16) Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Nobuaki Suzuki, Satoko Maeda, Minoru Yoshida, Hidehiko Nakagawa, and Naoki Miyata, Design, Synthesis, Structure-Selectivity Relationship, and Effect on Human Cancer Cells of a Novel Series of Histone Deacetylase 6-Selective Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 50, 5425-5438 (2007).
 - 17) Ayako Kimata, Hidehiko Nakagawa, Ryo Ohyama, Tomoko Fukuuchi, Shigeru Ohta, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, New Series of Antiprion Compounds: Pyrazolone Derivatives Have the Potent Activity of Inhibiting Protease-Resistant Prion Protein Accumulation, *J. Med. Chem.*, 50, 5053-5056 (2007).
 - 18) Shinya Usui, Hiroki Fujieda, Takayoshi Suzuki, N. Yoshida, Hidehiko

- Nakagawa, Michitaka Ogura, Makoto Makishima, Naoki Miyata, Synthesis and Evaluation of 2-Nonylaminopyridine Derivatives as PPAR Ligands, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 1053-1059 (2007).
- 19) Takayoshi Suzuki, Shinya Hisakawa, Yukihiro Itoh, Nobuaki Suzuki, Katsumasa Takahashi, Masatoshi Kawahata, Kentaro Yamaguchi, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Design, synthesis, and biological activity of folate receptor-targeted prodrugs of thiolate histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 4208-4212 (2007).
- 20) Hiroki Fujieda, Shinya Usui, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Michitaka Ogura, Makoto Makishima, Naoki Miyata, Phenylpropanoic acid derivatives bearing a benzothiazole ring as PPARdelta-selective agonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 4351-4357 (2007).
- 21) Hidehiko Nakagawa, Nobuko Komai, Mitsuko Takusagawa, Yuri Miura, Tosifusa Toda, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa, Nobuo Ikota, Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome C is associated with caspase-cascade inactivation, *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 15-20 (2007).
- 22) Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R, Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells, *Leukemia*, 21, 2344-53 (2007).
- 23) Hiroki Tsumoto, Chie Murata, Naoki Miyata, Kohfuku Kohda, Ryo Taguchi, Efficient identification and quantification of proteins using isotope-coded 1-(6-methylnicotinoyloxy) succinimide s by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 815-24 (2007).
- 24) Ikuo Nakanishi, Tomokazu Shimada, Kei Ohkubo, Sushma Manda, Takehiko Shimizu, Shiro Urano, Haruhiro Okuda, Naoki Miyata, Toshihiko Ozawa, Kazunori Anzai, Shunichi Fukuzumi, Nobuo Ikota, Kiyoshi Fukuhara, Involvement of electron transfer in the radical-scavenging reaction of resveratrol, *Chemistry Letters*, 36, 1276-1277 (2007)
- 25) Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Kiyotada Kanagawa, Tomoko Shoji, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Miho Tanaka, Naoki Miyata, Iron-chelating agents never suppress Fenton reaction but participate in quenching spin-trapped radicals, *Analytica Chimica Acta*, 599, 315-319 (2007).
- 26) Kiyoshi Fukuhara, Shinji Oikawa, Nana Hakoda, Yasunori Sakai, Yusuke Hiraku, Takuji Shoda, Shinichi Saito, Naoki Miyata, Shosuke Kawanishi, Haruhiro Okuda, 9-Nitroanthracene derivative as a precursor of anthraquinone for photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 3869-3873 (2007).
- 37) Tomoko Shoji, Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Masahiro Ogata, Yoshihisa Ishimoto, Ryoko Gonda, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Michihisa Uemoto, Naoki Miyata, DMPO-OH radical formation from 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) in hot water, *Analytical Sciences*, 23, 219-221 (2007).
- 28) Hiroki Tsumoto, Katsumasa Takahashi, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, Preparation of C60-based active esters and coupling of C60 moiety to amines or alcohols, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 657-660, (2008).
- 29) Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Atsuko Matsuoka, Tomohiro Matsumura, Sachiko Honda, Mikiko Hayashi, Toshihiko Ozawa, Naoki Miyata, Shinichi Saito, Nobuo Ikota, Haruhiro

Okuda, Effect of Methyl Substitution on the Antioxidative Property and Genotoxicity of Resveratrol, *Chem. Res Toxicol.*, 21, 282-287 (2008).

・LC/MS/MSを用いた網羅的プロテオミクス・ペプチドミクス技術の開発ならびに解析

- 1) Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.*, 586, 1-17, 2005.
- 2) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 94, 303-309, 2005.
- 3) Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M
- 4) Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment. *Proteomics.* 16, 4287-4295, 2005.
- 5) Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ci in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.
- 6) Zhan, L., Honma, M., Wang, L., Hayashi, M., Wu, D., Zhang, L., Rajaguru, P., Suzuki, T. Microcystin-LR is not Mutagenic in vivo in the λ /lacZ Transgenic Mouse (MutaTMMouse). *Genes and Environment*, 28: 68-73, 2006.
- 7) Dertinger, S. D., Bishop, M. E., McNamee, J. P., Hayashi, M., Suzuki, T., Asano, N., Nakajima, M., Saito, J., Moore, M., Torous, D. K., Macgregor, J. T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol Sci.* 94: 83-91, 2006.
- 8) Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C. Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR. *Genes and Environment*, 29:115-127, 2007.
- 9) Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res.*, 619:113-123, 2007.
- 10) Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J Biol Chem.*, 282:33507-33514, 2007.
- 11) Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R. Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia.* 21:2344-2353, 2007.
- 12) Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ci in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.

・細胞レベルでのメタボロミクス技術の開発

- 1) Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.* 2005 586 (1):1-17
- 2) 小原有弘, 水澤博 JCRB 細胞バンクの事業の概要 分子細胞治療 vol. 5 no. 2 (2006)
- 3) 小原有弘, 水澤博, JCRB 細胞バンク: 厚生労働省、細胞工学 2007;26(10):1177-8.
- 4) 水澤博, 小原有弘, 増井徹, 我国におけるヒト研究資源の現状と将来, 医学のあゆみ 2007;222(2):113.
- 5) Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007 May 21;.
- 6) Ono K., Satoh M., Yoshida T., Ozawa Y., Kohara A., Takeuchi M., Mizusawa H., Sawada H., Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2007 43:168-175 (2007)
- 7) 小原有弘, 大谷梓, 小澤裕, 塩田節子, 増井徹, 水澤博 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査, *Tiss. Cult. Res. Commun.* 26: 159-163 (2007)
- 8) 水澤博, 増井徹, 竹内昌男, 小原有弘 -190C 気相式液体窒素保存システム, *Tiss. Cult. Res. Commun.* 26: 155-170 (2007)
- 9) 水澤博, 小原有弘, 増井徹
- 10) バイオ研究の舞台裏—細胞バンクと研究倫理— (ポピュラーサイエンス 282) 裳華房 (2007)
- 11) 水澤博, 小澤裕, 小原有弘, 増井徹, 佐藤元信, 岩瀬秀, 深海薫, 西條薫, 中村幸夫, 培養細胞で頻発するクロスコンタミネーションへの警戒, 実験医学, 印刷中 (2008)
- 128 年会, 横浜 (2008, 3).
- 2) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保 敬, 深井直樹, 小澤俊彦, 宮田直樹, 浦野四郎, 福住俊一, 安西和紀, 奥田晴宏, リジン側鎖を有する平面型カテキン誘導体の合成とラジカル消去活性, 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008, 3).
- 3) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, S. Urano, H. Okuda, N. Ikota, K. Anzai, S. Fukuzumi, T. Ozawa, and K. Fukuhara, Structure-Activity Relationships in the Radical-Scavenging Reaction of Polyphenolic Flavones, Oxygen Club of California 2008 World Congress, California, USA (2008, 3).
- 4) 福原 潔, 及川伸二, 今井耕平, 正田卓司, 中村朝夫, 川西正祐, 奥田晴宏, 新しい光線力学療法剤の開発研究, 日本酸化ストレス学会関東支部会, 東京 (2007, 12).
- 5) K. Fukuhara, I. Nakanishi, A. Matsuoka, T. Ozawa, N. Miyata, N. Ikota, and H. Okuda, Effect of Methyl Substitution of Antioxidative Properties and Genotoxicity of Resveratrol, International Conference on Food Factors for Health Promotion (ICoFF2007), Kyoto, (2007, 12).
- 6) T. Kawashima, I. Nakanishi, K. Ohkubo, S. Manda, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, N. Ikota, K. Anzai, and S. Fukuzumi, Effects of Interaction between Curcumin and Metal Ions on the Radical-Scavenging Reaction, The 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and Japan 2007 (SFRR A+J 2007), Kyoto, (2007, 12).
- 7) 福原 潔, 中西郁夫, 松岡厚子, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 奥田晴宏, 抗酸化成分レスベラトロールのラジカル消去活性の増強と遺伝毒性の軽減, 第 40 回酸化反応討論会, 奈良 (2007, 11).
- 8) K. Fukuhara, I. Nakanishi, M. Obara, K. Ohkubo, T. Kawashima, T. Ozawa, N. Ikota, K. Anzai, S. Fukuzumi, N. Miyata, S. Saito, and H. Okuda, Intramolecular Base-Accelerated Radical-Scavenging Reaction of a Planar Catechin Derivative Having a Lysine Moiety, 14th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Washington, D. C., USA, (2007, 11).
- 9) I. Nakanishi, T. Shimada, K. Ohkubo, S. Manda, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, T. Ozawa, K. Anzai, S. Fukuzumi, N.

2. 学会発表

・NMR を用いたメタボノミクス解析, 高感度化技術の開発

- 1) 中西郁夫, 島田知一, 大久保 敬, Sushma Manda, 清水健彦, 浦野四郎, 奥田晴宏, 宮田直樹, 小澤俊彦, 安西和紀, 福住俊一, 伊古田暢夫, 福原 潔, プロトン共役電子移動を経由するレスベラトロールのラジカル消去反応, 日本薬学会第

- Ikota, and K. Fukuhara, Electron-Transfer Mechanism in the Radical-Scavenging Reaction of Resveratrol, 14th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Washington, D. C., USA, (2007, 11).
- 10) 福原 潔、中西郁夫、小原美紀、大久保敬、川島知憲、小澤俊彦、伊古田暢夫、安西和紀、福住俊一、宮田直樹、斎藤慎一、奥田晴宏、分子内にリジン部位を有する平面型カテキン誘導体のラジカル消去反応, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム、東北、(2007, 9).
 - 11) 福原 潔、及川伸二、箱田奈南、平工雄介、正田卓司、宮田直樹、川西正祐、奥田晴宏、光線力学療法剤の開発: 9-ニトロアントラセン誘導体からのアントラキノンの生成と DNA 切断反応, 第 29 回日本光医学・光生物学会、富山(2007, 7).
 - 12) 川島知憲、中西郁夫、大久保 敬、Sushma Manda、福原 潔、奥田晴宏、小澤俊彦、伊古田暢夫、安西和紀。福住俊一、クルクミンによるラジカル消去反応における生体関連金属イオンの効果, 第 17 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2007), 京都(2007, 6).
 - 13) 中西郁夫、大久保 敬、宇都義浩、川島知憲、Sushma Manda、福原 潔、奥田晴宏、堀 均、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、小澤俊彦、天然フェノール性抗酸化物質を基本骨格にした新規抗酸化物質の開発, 第 7 回 AOB (Antioxidant Biofactor) 研究会、台大醫院國際會議中心(2007, 6).
 - 14) 福原 潔、及川伸二、箱田奈南、平工雄介、正田卓司、宮田直樹、川西正祐、奥田晴宏、新しい光線力学療法剤の開発: 光照射下における 9-ニトロアントラセン誘導体の DNA 切断反応, 第 29 回日本フリーラジカル学会学術集会、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第 31 回大会合同学会、名古屋(2007, 6).
 - 15) 福原 潔、中西郁夫、松岡厚子、小澤俊彦、伊古田暢夫、宮田直樹、奥田晴宏、レスベラトロールをテンプレートとした新規抗酸化剤の開発, 第 29 回日本フリーラジカル学会学術集会、日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第 31 回大会合同学会、名古屋(2007, 6).
 - 16) 福原 潔、石川亜希、袴田 航、斎藤慎一、奥田晴弘、N-ニトロソフェンフルラミンの毒性反応機構の解析 - 活性酸素毒性の可能性 -, 日本薬学会第 127 年会、富山(2007, 3).
 - 17) 中西郁夫、宇都義浩、大久保 敬、川島知憲、Sushma Manda、金澤秀子、永澤秀子、堀 均、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、福住俊一、伊古田暢夫、安西和紀、抗酸化作用の増強を目的としたアルテピリンC誘導体の開発, 日本薬学会第 127 年会、富山(2007, 3).
 - 18) 福原 潔、中西郁夫、松岡厚子、松村友博、本田幸子、林美貴子、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、斎藤慎一、奥田晴宏、新規抗酸化剤の開発 - レスベラトロールのメチル誘導体 -, 日本薬学会第 127 年会、富山(2007, 3).
 - 19) 川島知憲、中西郁夫、大久保 敬、Sushma Manda、金澤秀子、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、クルクミンのラジカル消去活性における金属イオンの効果, 日本薬学会第 127 年会、富山(2007, 3).
 - 20) 川島知憲、中西郁夫、葉丸晴子、乳井美奈子、Sushma Manda、大久保 敬、金澤秀子、福原 潔、奥田晴宏、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、安西和紀、分子内に塩基性部位を有する新規ビタミン E 誘導体の合成とラジカル消去活性評価, 第 18 回ビタミン E 研究会、長崎(2007, 1).
 - 21) 福原 潔、中西郁夫、松岡厚子、松村友博、本田幸子、林美貴子、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、斎藤慎一、奥田晴宏、抗酸化作用の増強と遺伝毒性の軽減を目的としたレスベラトロール誘導体の開発, 日本環境変異原学会第 35 回大会、大阪(2006, 11).
 - 22) 中西郁夫、宇都義浩、大久保 敬、川島知憲、Sushma Manda、金澤秀子、永澤秀子、堀 均、奥田晴宏、福原 潔、小澤俊彦、伊古田暢夫、福住俊一、安西和紀、ESR による新規アルテピリンC 誘導体のラジカル消去活性評価, 第 45 回電子スピンスイエンス学会年会、京都(2006, 11).
 - 23) T. Kawashima, I. Nakanishi, K. Ohkubo, Y. Uto, S. Manda, K. Suzuki, H. Kanazawa, K. Fukuhara, H. Okuda, H. Nagasawa, H. Hori, K. Anzai, T. Ozawa, N. Ikota and S. Fukuzumi, Radical-Scavenging Reactions of 4-Propenylphenol Derivatives, 13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), USA (2006, 11).
 - 24) I. Nakanishi, K. Ohkubo, T. Kawashima, K. Kawaguchi, M. Nyui, M. Takusagawa, S. Manda, T. Suenobu, K. Fukuhara, H. Okuda, H. Kanazawa, N. Miyata, T. Ozawa, K. Anzai, S. Fukuzumi and N. Ikota, DNA Cleaving-Activity of Water-Soluble C70 under Visible-Light Irradiation, 13th

- Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), USA (2006, 11).
- 25) 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保 敬, ○川島知憲, Sushma Manda, 金澤秀子, 永澤秀子, 堀 均, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 福住俊一, 安西和紀 アルテピリンCおよびその誘導体のクミルペルオキシラジカル消去活性, 日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第30回大会, 東京(2006, 9).
 - 26) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, 鈴木桂子, Sushma Manda, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀 均, 福住俊一, 安西和紀, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 4-プロペニルフェノール化合物によるフリーラジカル消去反応における構造活性相関, 第2回分子情報ダイナミクス研究会, 大阪(2006, 9).
 - 27) 川島知憲, 中西郁夫, 大久保 敬, Sushma Manda, 金澤秀子, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 安西和紀, クルクミンのラジカル消去活性に対する金属イオンの効果, バイオ関連化学合同シンポジウム(第21回生体機能関連化学部会・第9回バイオテクノロジー部会・第9回生命化学研究会), 京都(2006, 9).
 - 28) 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保 敬, 川島知憲, Sushma Manda, 金澤秀子, 永澤秀子, 堀 均, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 福住俊一, 安西和紀, アルテピリンCおよびその誘導体のラジカル消去活性, バイオ関連化学合同シンポジウム(第21回生体機能関連化学部会・第9回バイオテクノロジー部会・第9回生命化学研究会), 京都(2006, 9).
 - 29) K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Kawashima, A. Tada, H. Yakumaru, K. Ohkubo, H. Kanazawa, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi and N. Ikota, Synthesis, Radical-Scavenging Activity, and Redox Behavior of Planar Catechin Derivatives, XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Switzerland (2006, 8).
 - 30) T. Kawashima, I. Nakanishi, K. Ohkubo, Y. Uto, S. Manda, H. Kanazawa, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Suzuki, H. Nagasawa, H. Hori, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi and N. Ikota, Kinetic Study on the Radical-Scavenging Activity of Natural Antioxidants Having 4-Propenylphenol Structures, XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Switzerland (2006, 8).
 - 31) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, 鈴木桂子, Sushma Manda, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀 均, 福住俊一, 安西和紀, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, プロペニルフェノール化合物によるフリーラジカル消去反応, 第6会AOB研究会, 札幌(2006, 6).
 - 32) 福原 潔, 中西郁夫, 松村友博, 斎藤慎一, 宮田直樹, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, レスベラトロールをシースとした新規抗酸化剤の開発, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006, 5).
 - 33) 中西郁夫, 大久保 敬, 川島知憲, 川口久美子, 乳井美奈子, 田草川光子, 末延知義, 福原 潔, 奥田晴宏, 金澤秀子, 宮田直樹, 小澤俊彦, 安西和紀, 福住俊一, 伊古田暢夫, 水溶性C70フラーレンの光反応による活性酸素生成とDNA切断, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006, 5).
 - 34) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, Sushma Manda, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀 均, 福住俊一, 安西和紀, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 天然および合成4-プロペニルフェノール誘導体のラジカル消去活性, 第28回日本フリーラジカル学会学術集会, 三重(2006, 5).
 - 35) 福原潔, 箱田奈南, 及川伸二, 平工雄介, 境保統, 斎藤慎一, 宮田直樹, 川西正祐, 奥田晴宏, 光線力学療法剤の開発: 9-ニトロアントラセン誘導体からのアントラキノン生成とDNA切断反応, 日本薬学会第126年会, 仙台(2006, 3).
 - 36) 川島知憲, 中西郁夫, 葉丸晴子, 乳井美奈子, 大久保敬, 金澤秀子, 福原潔, 奥田晴宏, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 分子内に塩基性部位を有するビタミンE誘導体の合成とラジカル消去活性, 日本薬学会第126年会, 仙台(2006, 3).
 - 37) 中西郁夫, 川島知憲, 川口久美子, 大久保敬, 乳井美奈子, 田草川光子, 末延知義, 福原潔, 伊藤攻, 奥田晴宏, 金澤秀子, 宮田直樹, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, 水溶性C70-シクロデキストリン錯体による光DNA切断, 日本薬学会第126年会, 仙台(2006, 3).
 - 38) 川島知憲, 中西郁夫, 宇都義浩, 大久保敬, 鈴木桂子, 川口久美子, 金澤秀子, 福原潔, 奥田晴宏, 永澤秀子, 堀 均, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 4-プロペニルフェノール構造を有する抗酸化物質のラジカル消去活性の評価,

- 日本薬学会第126年会、仙台(2006, 3)
- 39) 袴田航, 室井誠, 長田裕之, 福原潔, 奥田晴宏, 栗原正明, 新興ウイルス感染症に対する新規抗ウイルス剤の開発`糖鎖プロセッシング酵素を分子標的として`、日本薬学会第126年会、仙台(2006, 3)
- 40) T. Kawashima, I. Nakanishi, S. Manda, K. Fukuhara, H. Okuda, H. Nagasawa, H. Hori, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi, and N. Ikota, Radical-Scavenging Activity of Natural Antioxidants Having 4-Propenylphenol Structures, XXth Annual Meeting of the Oxygen Club of California, Santa Barbara, California, USA, (2006, 3)
- 41) I. Nakanishi, T. Kawashima, A. Tada, H. Yakumaru, K. Ohkubo, H. Kanazawa, S. Urano, H. Okuda, N. Miyata, K. Anzai, T. Ozawa, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, Synthesis and Radical-Scavenging Activity of Planar Catechin Derivatives Having Alkyl Side Chains, XXth Annual Meeting of the Oxygen Club of California, Santa Barbara, California, USA, (2006, 3)
- 42) K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Kawashima, H. Yakumaru, H. Kanazawa, H. Okuda, K. Ohkubo, T. Ozawa, S. Fukuzumi, N. Ikota, Enhanced radical-scavenging activities of planar catechin derivatives having alkyl side chains, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, USA, (2005, 12)
- 43) Nakanishi, C. Nishizawa, K. Ohkubo, K. Takeshita, K. T. Suzuki, T. Ozawa, S. M. Hecht, M. Tanno, S. Sueyoshi, M. Takusagawa, N. Miyata, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, Hydroxyl Radical Generation via One-Electron Reduction of Pyridine N-Oxides as a Key Structure of Antitumor Agents for Hypoxic Solid Tumours PACIFICHEM 2005, Honolulu, Hawaii, USA, (2005, 12)
- 44) 福原 潔、中西郁夫、浦野四郎、小澤俊彦、伊古田暢夫、宮田直樹、奥田晴宏、カテキンをテンプレートとした新規化学予防物質の開発、第24回メディシナルケミストリーシンポジウム、大阪(2005, 11)
- 45) 福原 潔、中西郁夫、川村義彦、川島知憲、金澤秀子、浦野四郎、小澤俊彦、伊古田暢夫、石井明子、川崎ナナ、川西徹、宮田直樹、奥田晴、Enhanced radical-scavenging activities and cell growth inhibitions of planar catechin analogues having alkyl side chains、第34回日本環境変異原学会、東京(2005, 11)
- 46) Nakanishi, T. Kawashima, M. Nyui, K. Kawaguchi, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota, Solvent Effect on the Radical-Scavenging Mechanism of Phenolic Antioxidants PACIFICHEM 2005, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2005.
- 47) T. Kawashima, I. Nakanishi, M. Nyui, H. Yakumaru, K. Ohkubo, H. Kanazawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, T. Ozawa, K. Fukuhara, and N. Ikota, Base-Catalyzed Radical-Scavenging Reactions by Phenolic Antioxidants 12th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), Austin, Texas, USA, November 16-20, 2005.
- 48) 福原 潔、中西郁夫、石井明子、川崎ナナ、川西 徹、浦野四郎、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、カテキンの立体構造固定による抗酸化効果の増強と生物作用、第20回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋、(2005, 9)
- 49) 川島知憲、中西郁夫、宇都義浩、大久保敬、川口久美子、金澤秀子、福原 潔、奥田晴宏、永沢秀子、堀 均、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、4-プロペニルフェノール誘導体のラジカル消去活性、第20回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋、(2005, 9)
- 50) 西澤千穂、中西郁夫、大久保 敬、竹下啓蔵、鈴木和夫、宮田直樹、奥田晴宏、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、福原潔、NADH 誘導体によるピリジンN-オキシド誘導体の光還元による活性酸素生成、第20回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋、(2005, 9)
- 51) 箱田奈南、福原 潔、及川伸二、及川佐枝子、平工雄介、奥田晴宏、宮田直樹、川西正介、紫外線照射下におけるアントラセン誘導体によるDNA損傷、第64回日本癌学会学術総会、札幌、(2005, 9)
- 52) 福原 潔、石井明子、川崎ナナ、川西 徹、宮田直樹、奥田晴宏、脂溶性平面型カテキンの抗酸化作用とがん細胞増殖阻害効果、第64回日本癌学会学術総会、札幌、(2005, 9)
- 53) 福原 潔、奥田晴宏、がん予防を目的とした天然カテキンの誘導化、第11回日本がん予防研究会、岐阜(2005, 7)
- 54) 川島知憲、中西郁夫、乳井美奈子、川口

- 久美子, 大久保 敬, 金澤秀子, 奥田晴宏, 福原 潔, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, プロトン性溶媒中におけるフェノール性抗酸化剤のラジカル消去反応に対する金属イオンの触媒作用, 第15回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2005), 大阪 (2005, 6)
- 55) 福原 潔, 中西郁夫, 小原美紀, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 斎藤慎一, 奥田晴宏, 新規抗酸化物質の開発-平面型カテキン誘導体へのリジンの導入-, 第27回日本フリーラジカル学会学術集会, 岡山, (2005, 6)
- 56) 中西郁夫, 川島知憲, 乳井美奈子, 葉丸晴子, 川口久美子, 大久保 敬, 金澤秀子, 奥田晴宏, 福住俊一, 小澤俊彦, 福原 潔, 伊古田暢夫, フェノール性抗酸化剤のラジカル消去反応における塩基触媒作用, 第27回日本フリーラジカル学会学術集会, 岡山, (2005, 6)
- 57) K. Fukuhara, I. Nakanishi, Y. Kawamura, T. Kawashima, H. Kanazawa, S. Urano, N. Ikota, A. Ishii, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Ozawa, H. Okuda, Planar Catechin Analogues as a New Type of Synthetic Flavonoids, International Society of Cancer Prevention Symposium (ISCaP) symposium, Kyoto, (2005, 5)
- よる抑制 日本薬学会第126回年会, 2006. 仙台
- 6) M. Miyata FXR-dependent enhancement of biliary lipid excretion is a critical determinant for protection against cholic acid-induced liver toxicity. Symposium: Modulation on Phase I metabolizing Enzymes Expression, 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006. Jeju, Korea
- 7) M. Miyata, M. Nomoto, T. Mizuki, S. Yokokawa, S. Ninomiya, Y. Yamazoe Hepatic phospholipid depletion and LCA-induced cholestatic liver injury. 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006. Jeju, Korea
- 8) 水木朋宏, 野本眞博, 永易美穂, 大淵雅人, 宮田昌明, 山添 康 リトコール酸誘発肝障害に対する防御機序-生体内脂質レベルの変動 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006. 名古屋
- 9) 宮田昌明, 野本眞博, 水木朋宏, 横川伸也, 二宮真一, 山添 康 網羅的遺伝子発現解析から予測されるリトコール酸誘発肝障害の機序 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006. 名古屋
- 10) 野本眞博, 宮田昌明, 芝崎茂樹, 黒沢 亨, 神藤康弘, 山添 康 リトコール酸誘発肝障害の防御因子としてのケレステロール排泄促進-リトコール酸誘発肝障害モデルマウスにおける ME3738 の有効性 - 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006. 名古屋
- 11) 宮田昌明, 野本眞博, 水木朋宏, 横川伸也, 二宮真一, 山添 康 新規リトコール酸誘発肝障害に対する防御機序: 生体内脂質レベルの検討 第4回東日本胆汁酸研究会, 2006. 東京
- 12) M. Miyata, W. Hori, H. Watase, M. Shimada and Y. Yamazoe, 2次胆汁酸誘発肝毒性の防御におけるヒドロキシステロイドスルホトランスフェラーゼの役割 シンポジウム: Phase II 代謝酵素と薬効・毒性 第21回日本薬物動態学会年会, 2006. 東京
- 13) 宮田昌明, 松田良樹, 野本眞博, Frank J. Gonzalez, 山添 康 肝内胆汁酸レベルの調節における胆汁酸吸収の役割 第21回 日本薬物動態学会 2006 東京
- 14) 宮田昌明, 野本眞博, 松田良樹, 小原有弘, 横川伸也, 二宮真一, 山添 康網羅的遺伝子発現解析からのコール酸誘発肝障害 第34回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007. 東京
- 15) 高松 裕樹, 松田良樹, 宮田昌明, 山添 康 アンピシリンの併用はコール酸による肝毒性を増強する 第34回日
- ・トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の機序解明:
- 1) 渡瀬 広崇, 宮田昌明, Frank J Gonzalez, 山添康 Lithocholic acid 誘発肝障害に対する防御機構の検討-防御因子としての Cyp3a と hydroxysteroid sulfotransferase 第32回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005. 東京
- 2) 永易美穂, 堀 弥, 宮田昌明, 山添 康 リトコール酸誘発肝障害に対する防御機構の解明-プロボールの効果-第44回日本薬2学会東北支部大会, 2005. 仙台
- 3) 水木朋宏, 堀 弥, 宮田昌明, 山添 康 リトコール酸誘発肝障害へのNOドナーの影響 第126年会 日本薬学会 2006. 仙台
- 4) 宮田昌明, 渡瀬広崇, 堀 弥, 永田 清, Frank J. Gonzalez, 山添 康 Hydroxysteroid sulfotransferase による2次胆汁酸誘発肝障害の防御機序-硫酸抱合型胆汁酸の体内動態の解析 第126年会 日本薬学会 2006. 仙台
- 5) 松田良樹, 宮田昌明, 永田 清, Frank J. Gonzalez, 山添 康 Hydroxysteroid sulfotransferase 発現の FXR シグナルに