

Le<sup>a</sup>抗原)を有する糖ペプチドを抗CA19-9モノクローナル抗体により効率よく単離する方法を確立した。膵癌患者尿中にはCA19-9抗原を有している糖たんぱく質が多く含まれていることが推定された。

#### E-11 大腸癌の糖脂質の構造解析

大腸癌細胞、大腸正常粘膜上皮細胞の糖脂質の構造を詳細に検討し、両者を比較することにより糖鎖の癌性変化のメカニズムを推測することができた。

#### E-12 同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者試料(血清・組織)のたんぱく質発現解析研究

各研究協力機関から提供された各種疾患(23疾患)及び日本人健常者を含む全ての血清(624検体)について、cICAT法による高発現血清たんぱく質(上位約140種類、累計約350種類)の同定と比較定量解析を完了させ、その解析結果及び臨床情報が連結可能なデータベースに格納した。これにより、日本人健常者と各疾患群血清との統計解析が可能になった。一例として、糖尿病患者と日本人健常者とを比較した結果、糖尿病の合併症の有無・種類により、有意差( $p < 0.01$ )のある十数種類のたんぱく質が見いだされた。このことは同様なアプローチが他の疾患でも適用可能であることを示した。低発現血清たんぱく質の解析法は、新規な疾患関連たんぱく質の探索に極めて重要である。今回、組織たんぱく質を介在させることにより、病変部位より漏出する血清低発現たんぱく質の解析法を構築した(特許出願)。一方、患者組織たんぱく質に関しては、主としてがん患者組織試料(がん・正常組織等、34検体)をcICAT法により解析した結果、スキルス胃がん細胞は本来血球系に発現しているたんぱく質(CD177等)を強発現していることが判明した(特許出願2件)。高分解能計測能をもつ高速度 SELDI-QqTOF-MS法を導入して、糖尿病患者(合併症有無)血清(124検体)及び健常人血清(40検体)を解析し、合併症で観察されるピークの一つを同定した。さらに検討を要するが、他

疾患にも応用可能であろう。

以上、主として、cICAT法を用いて解析してきたが、今後は、iTRAQ法等も取り入れて疾患関連たんぱく質を探索することが望まれる。また、見出した疾患関連たんぱく質の機能解析を明らかにすることが知的財産権確保に必要である。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### ①論文発表

1. 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.*, 30(2):218-223, 2007.
2. 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.*, 14(6):491-502, 2007.
3. 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.*, 117(1):11-9, 2007.
4. 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.*, 27(6):517-523, 2007.
5. Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035, 2007.
  6. Gao J.Q., Eto Y., Yoshioka Y., Sekiguchi F., Kurachi S., Morishige T., Yao X., Watanabe H., Asavatanabodee R., Sakurai F., Mizuguchi H., Okada Y., Mukai Y., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S. : Systemic Administration of PEGylated Adenovirus Vector Enhances Vector Accumulation and Gene Expression in Tumors and Improves Anti-tumor Effects in Cytokine Gene Therapy., *J. Control. Release*, 122(1):102-110, 2007.
  7. 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*, 62(8):569-573, 2007.
  8. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363:1027-1032, 2007.
  9. Shibata H., Kamada H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Tanai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB. Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of receptor-selective TNFs with agonistic activity., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
  10. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, in press.
  11. 堤 康央, 石井明子, 早川堯夫 : 第6節 機能性人工たんぱく質., *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, (株)エル・アイ・シー, p.369-378, 2007.
  12. Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y. : Development of new anti-TNF therapy., *Inflammation and Regeneration*, 27:512-515, 2007
  13. 向洋平, 堤康央, 中川晋作., *細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの応用技術.*, *絵で見てわかるナノ DDS.*, *遺伝子医学MOOK 別冊*, p.184-190, 2007.
  14. Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nat Med*, 13: 1234-1240, 2007.
  15. Takahashi H, Kurose Y, Sakaida M, Suzuki Y,

- Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. Ghrelin differentially modulates glucose-induced insulin secretion according to feeding status in sheep. *J Endocrinol*, 194: 621-625, 2007.
16. Sakamoto T, Mori K, Nakahara K, Miyazato M, Kangawa K, Sameshima H, Murakami N. Neuromedin S exerts an antidiuretic action in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 457-461, 2007.
17. Iwakura H, Akamizu T, Ariyasu H, Irako T, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E819-825, 2007.
18. Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. *Mech Ageing Dev*, 128: 182-186, 2007.
19. T. Naka, E. Katsumata, K. Sasaki, N. Minamino, M. Yoshioka, Y. Takei: Natriuretic peptides in Cetaceans: Identification, molecular characterization and changes in plasma concentration after landing. *Zool. Sci.*, 24, 577-587 (2007)
20. H. Yamaguchi, K. Sasaki, Y. Satomi, T. Shimbara, H. Kageyama, M.S. Mondal, K. Toshinai, Y. Date, L.J. Gonzalez, S. Shioda, T. Takao, M. Nakazato, N. Minamino: Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 282, 26354-26360 (2007)
21. Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglia chemotaxis. *Glia* 55 (2007) 604-616
22. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, BV., Jacobson, KA., Kohsaka, S. and Inoue, K.: UDP acting at P2Y(6) receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446 (2007) 1091-1095
23. Okamoto, N., Kubota, T., Nakamura, Y., Murakami, R., Nishikubo, T., Tanaka, I., Takahashi, Y., Hayashi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hosokai, N., Kohsaka, S. and Uchino, S.: 22q13 Microduplication in Two patients With Common Clinical Manifestations: A Recognizable Syndrome? *Am J Med Genet*. 143 (2007) 2804-2809
24. Irino, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., Kohsaka, S. and Ohsawa, K.: Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *J. Neurosci. Res.* (2008) in press
25. Setsuie, R., Wada, K. : The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 52 (2007) 105-111
26. Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T. and Wada, K.: Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem* 15 (2007) 6810-6818
27. Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. and Wada, K.: Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur. J. Neurosci.* (2008) in press

28. Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J., Miyoshi, K., Ogawa, N. and Murata, M.: Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinine formation. *Neurosci Res.* 60 (2008) 106-113
29. Murata, M., Hasegawa, K., 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.
30. 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* 18-3 (2007) 273-275
31. Tagawa, K., Marubuchi, S., Qi, M.L., Enokido, Y., Tamura, T., Inagaki, R., Murata, M., Kanazawa, I., Wanker, E.E. and Okazawa, H.: The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J. Neurosci.* 27-4 (2007) 868-880
32. Satake, W., Mizuta, I., Suzuki, S., Nakabayashi, Y., Ito, C., Watanabe, M., Takeda, A., Hasegawa, K., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M. and Toda, T.: Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population. *Neuroreport* 18 (2007) 937-940
33. Amino, T., Ishikawa, K., Toru, S., Ishiguro, T., Sato, N., Tsunemi, T., Murata, M., Kobayashi, K., Inazawa, J., Toda, T. and Mizusawa, H.: Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. *J. Hum Genet* 52 (2007) 643-649
34. 青木吉嗣, 山本敏之, 尾方克久, 大矢寧, 小川雅文, 村田美穂: 嚥下造影検査が重症筋無力症増悪の評価に有効であった1例. *臨床神経学* 47-10 (2007) 669-671
35. 村田美穂: パーキンソン病の治療、薬物療法. *Clini Neurosci.* 25 (2007) 82-85
36. 青木吉嗣, 岡本智子, 大矢寧, 小川雅文, 村田美穂, 山村隆, 大槻泰介: 多発性硬化症が疑われた頸髄海綿状血管腫の49歳女性例. *脊椎脊髄ジャーナル* 20-3 (2007) 273-278
37. 村田美穂, 長谷川一子: ディベート、パーキンソン病の初期治療はレボドパカ、ドパミンアゴニストか? *Clini Neurosci.* 25 (2007) 240-241
38. 村田美穂: パーキンソン病の診察のポイント. *MB Med Reha.* 76 (2007) 7-12.
39. 村田美穂: Parkinson病患者における日中睡眠過多と突発的睡眠. *神経内科* 60-1 (2007) 67-71
40. 村田美穂: パーキンソン病の治療戦略、早期患者への治療方針. *内科* 99-5 (2007) 787-791
41. 服部信孝, 村田美穂, 佐藤健一, 鈴木正彦: 内科医のためのパーキンソン病診療、座談会、パーキンソン病治療のこれから. *内科* 99-5 (2007) 884-894
42. 村田美穂: 薬物治療、我が国初の新規治療薬の開発に向けて - 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの開発 -. *最新医学* 62-7 (2007)
43. 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.* 298, 83-92, 2007
44. Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M. Role of IRS and

- PHIP on Insulin-Induced Tyrosine Phosphorylation and Distribution of IRS Proteins. *Cell Struct Funct.* 32, 69-78, 2007
45. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A. The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis.* 51, 1-8, 2007
46. Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, Watanabe A, Tabira T, Takahashi K, and Wakita H. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. *Exp. Neurol.* in press.
47. 渡邊 淳. 疾患プロテオミクス-質量分析計を用いた認知症の病態解析-基礎老化研究, 日本基礎老化学会, in press.
48. Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Hanai Y, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate enhances prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$ -induced VEGF synthesis via up-regulating SAPK/JNK activation in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 100:1146-1153, 2007
49. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Hosoi T, Harada A, Ohta T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses endothelin-1-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of p44/p42 MAP kinase activation. *FEBS Lett.* 581:1311-1316, 2007
50. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O. Limitation by p70 S6 kinase of PDGF-BB-induced IL-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Metabolism.* 56:476-483, 2007
51. Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Kozawa O. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt limits FGF-2-induced VEGF release in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 267:46-54, 2007
52. Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Yasuda E, Toyoda H, Kaneoka Y, Yamaguchi A, Kumada T, Kozawa O. Protein kinase C  $\delta$  regulates the phosphorylation of heat shock protein 27 in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 81:585-591, 2007
53. Tokuda H, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Doi T, Harada A, Takai S, Kozawa O. Rho-kinase regulates endothelin-1-stimulated IL-6 synthesis via p38 MAPK in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 362:799-804, 2007
54. Yamauchi J, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Doi T, Kato H, Ogura S, Kato K, Tokuda H, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits prostaglandin D<sub>2</sub>-stimulated HSP27 induction via suppression of the p44/p42 MAP kinase pathway in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77:173-179, 2007
55. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Ohta T, Kozawa O. Platelet-derived growth factor-BB amplifies PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts: function of phosphatidylinositol 3-kinase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77:187-193, 2007
56. 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.* 22:337-346, 2007
57. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S, Kozawa O. Potentiation by platelet-derived growth factor-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. *J. Bone Miner. Metab.* in press.
58. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Harada A, Hosoi T, Ohta T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits basic fibroblast growth factor-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* in press.
59. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. : The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem.* 2007 Dec 28;282(52):37298-302.
60. Mikami T & Takao T. : Selective Isolation of N-Blocked Peptides by Isocyanate-Coupled Resin. *Anal Chem.* 2007: 79: 7910-7915.
61. Nishiwaki T, Satomi Y, Kitayama Y, Terauchi K, Kiyohara R, Takao T, Kondo T. : A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* 2007 Sep 5;26(17):4029-37.
62. Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. : Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007 Sep 7;282(36):26354-60.
63. Sekine K, Fujiwara M, Nakayama M, Takao T, Hase T, Sato N. : DNA binding and partial nucleoid localization of the chloroplast stromal enzyme ferredoxin:sulfite reductase. *FEBS J.* 2007 Apr;274(8):2054-69.
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, *Anal Biochem* 364 (2007) 37-50.

## ②学会発表

1. 衛藤佑介, 吉岡靖雄, 森重智弘, 姚 醒蕾, 倉知慎之輔, 水口裕之, 堤 康央, 向 洋平, 岡田貴, 中川晋作 : 全身投与による癌遺伝子治療の最適化を目指した高分子バイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製., 遺伝子・デリバリー研究会 第7回シンポジウム, 東京, 2007年7月.
2. 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 : 抗腫瘍活性に優れたTNFレセプター指向性変異体の創製., 第23回DDS学会, 熊本, 2007年6月.
3. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向 洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : プロテオミクス創薬を志向した疾患関連たんぱく質抗体の迅速単離システムの開発., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
4. 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 腫瘍壊死因子- $\alpha$ の活性に及ぼす90番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
5. 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 萱室裕之,

- 袁輪恭子, 鎌田春彦, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : ファージ表面提示法を駆使した TNFR2 指向性アゴニストの創製., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
6. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 袁輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : 三酸化ヒ素の抗白血病治療効果発現に関連したたんぱく質の探索., 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
  7. Mukai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S. : Application of membrane-permeable Protein Transduction Domain (PTD) for efficient intracellular drug delivery., 第 5 回メンブレン・ストレスバイオテクノロジー (MSB) シンポジウム, 大阪, 2007 年 9 月.
  8. Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of phage library and 2D-DIGE., 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
  9. 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 細胞膜透過性 TAT ペプチドと膜融合性 HA2 ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
  10. 向 洋平, 今井直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一 : 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第 57 回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007 年 10 月.
  11. 今井直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  12. 長野一也, 今井直, 杉田敏樹, 向洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指したファージ抗体ライブラリの構築., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  13. 向洋平, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤康央 : TNF レセプター選択的阻害剤開発を目指した TNFR2-TNF 複合体の X 線結晶構造解析., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  14. 吉川友章, 杉田敏樹, 向洋平, 今井直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  15. 杉田敏樹, 吉川友章, 向洋平, 今井直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発-2., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  16. 吉田康伸, 吉川友章, 杉田敏樹, 向洋平, 今井直, 長野一也, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 新規細胞内移行ペプチドの創出と血管機能制御技術としての展開., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  17. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 袁輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : プロテオーム解析を用いた白血病における血栓症発症に関与するたんぱく質の探索., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007 年 11 月.
  18. 萱室裕之, 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 吉川友章, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤康央 : Intranasal immunization with mutant TNF

- induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice., 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007 年 11 月.
19. 吉田康伸, 今井直, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 小泉桂一, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 血管新生阻害剤を用いたリンパ管新生シグナル伝達経路の解析., 第 80 回日本生化学会大会, 横浜, 2007 年 12 月
  20. 杉田敏樹, 吉川友章, 長野一也, 鍋師裕美, 向洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 新規 Protein Transduction Domain peptide の細胞内 DDS キャリアーとしての特性解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  21. 阿部康弘, 向洋平, 角田慎一, 中川晋作, 堤康央 : 創薬プロテオミクスの実現に叶う機能性人工たんぱく質の迅速創出技術の開発., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  22. 今井直, 角田慎一, 中川晋作, 堤康央 : 疾患関連たんぱく質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  23. 鍋師裕美, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(1): トキシコプロテオーム解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  24. 吉川友章, 鍋師裕美, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(2): 細胞内局在解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  25. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 形山和史, 阿部康弘, 野村鉄也, 廣井隆親, 吉川友章, 角田慎一, 堤康央 : 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての応用., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  26. 長野一也, 吉川友章, 杉田敏樹, 今井直, 鍋師裕美, 向洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 免疫制御技術の開発に向けた制御性 T 細胞の抗体プロテオミクス研究., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  27. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 山本昌, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価(1): 関節リウマチモデルに対する治療効果の検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  28. 吉田康伸, 今井直, 杉田敏樹, 阿部康弘, 萱室裕之, 長野一也, 鍋師裕美, 野村鉄也, 小泉桂一, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 抗体プロテオミクスによるリンパ管新生関連分子の探索と機能評価に向けて., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
  29. 西森光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤康央, 八木清仁: ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
  30. 亀井数正, 向洋平, 小島拓記, 吉川舞, 角田慎一, 堤康央, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作: 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
  31. Minowa K., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Fujita T., Yamamoto A., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display system, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
  32. Tsunoda S., Imai S., Yoshida Y., Nagano K., Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y. : An efficient method for the production of monoclonal antibodies to tumor-related proteins using



- a combination of phage display library and 2-dimensional differential gel electrophoresis, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
33. Mukai Y., Nakamura T., Shibata H., Abe Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystal structure of the receptor subtype I selective antagonistic TNF revealed its molecular basis as the proteo-antagonist, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
34. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel therapeutic approach using an intracellular targeting strategy with membrane-permeable peptides., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
35. Nabeshi H., Kamada H., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Minowa K., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide alters expression and oxidative modification of the proteome in leukemic cells, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
36. Nomura T., Shibata H., Abe Y., Minowa K., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
37. Yoshikawa T., Imai S., Nagano K., Sugita T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simultaneous identification of tumor-specific proteins and their antibodies by combining a proteomics technique and phage display library, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
38. Yoshioka Y., Morishige T., Watanabe H., Tanabe A., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Okada N., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
39. Minowa K., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Kayamuro H., Shibata H., Fujita T., Yamamoto A., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
40. Abe Y., Nabeshi H., Nomura T., Kayamuro H., Minowa K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of the valuable cell line which evaluates the bioactivity through TNFR2 using chimeric receptor strategy., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
41. 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, 2007年6月.
42. 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-2., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2007年6月.
43. 堤 康央 : ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク Overview. 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
44. K. Sasaki, Y. Satomi, H. Yamaguchi, T. Takao, M. Nakazato, N. Minamino: Peptidomic identification of novel neuroendocrine

- regulatory peptide-1 and -2. 4th International Peptide Symposium (平成 19 年 10 月、Cairns)
45. N. Minamino, K. Sasaki, T. Osaki, Y. Satomi, T. Takao: Peptidomic analysis for identification of endogenous peptides and precursor processing pathway. 4th International Peptide Symposium (平成 19 年 10 月、Cairns)
  46. Murata, M., Horiuchi, E. and Kanazawa, I.: Zonisamide increases TH mRNA via T type Ca channel. Dopamine 50 years, Gothenburg, Sweden, 5.30-6.2, 2007.
  47. Toda, T., Satake, W., Mizuta, I., Watananbw, M., Takeda, A., Hasegawa, K., Yamamoto, M., Hattori, N. and Murata, M.: Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population. 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Istanbul, Turkey, 6.3-6.7, 2007.
  48. Murata, M., Hasegawa, K., Kanazawa, I., Zonisamide Study Group JAPAN.: Long-term efficacy and safety of Zonisamide in advanced Parkinson's disease. 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Istanbul, Turkey, 6. 3-6.7, 2007.
  49. 内野茂夫, 福村怜子, 田畑秀典, 平澤孝枝, 服部功太郎, 湯浅茂樹, 仲嶋一範, 高坂新一: 大脳皮質形成過程における NMDA 受容体を介した細胞移動の分子基盤. Neuro 2007, 横浜, 9.10, 2007
  50. 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵理, 井上和秀, 高坂新一: 細胞外 ATP 受容体 P2Y12 を介したミトクログリアの突起伸展調節機構の解析. 第 12 回グリア研究会, 名古屋, 11.17, 2007
  51. 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵理, 井上和秀, 高坂新一: 細胞外 ATP 受容体 P2Y12 を介したミトクログリアの突起伸展調節機構の解析. 第 30 回日本分子生物学会年会, 第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12.12, 2007
  52. 村田美穂, 久野貞子: パーキンソン病に対する深部脳刺激術の効果と満足度に関するアンケート調査. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16, 2007.
  53. 山下亮. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第 3 回メタボリズムネットワーク ワーク研究会, ポスター発表, 大磯, 3 月, 2007.
  54. 鎗木康志, 山下亮, 安田和基, 野田光彦. 初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 口演, 仙台, 5 月, 2007.
  55. 山下亮, 井狩高平, 安田和基, 関原久彦, 鎗木康志. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第 80 回の日本内分泌学会学術総会, ポスター発表, 東京, 6 月, 2007.
  56. 井狩高平, 山下亮, 郡司眸, 浜田圭子, 安田和基, 野田光彦, 鎗木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカーの 2D-DIGE による検索. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, ポスター発表, 東京, 7 月, 2007.
  57. 浜田圭子, 山下亮, 井狩高平, 安田和基, 鎗木康志. IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, ポスター発表, 東京, 7 月, 2007.
  58. 鎗木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカーの 2D-DIGE による検索. 第 7 回 Tokyo Diabetes Seminar, 口演, 東京, 7 月, 2007.
  59. 山下亮, 井狩高平, 安田和基, 鎗木康志. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第 30 回日本分子生物学会・第 8 回日本生化学 合同大会, 口演&ポスター発表, 横浜, 12 月, 2007.
  60. 井狩高平, 山下亮, 郡司眸, 浜田圭子, 安田和基, 鎗木康志. プロテオーム解析を用いた早期糖尿病性腎症・尿マーカーの検索. 第 30 回

日本分子生物学会・第8回日本生化学合同大会、  
口演&ポスター発表、横浜、12月、2007.

61. 高橋枝里、岡村匡史、井狩高平、平野久、安田和基、鎗木康志. LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析. 第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学合同大会、ポスター発表、横浜、12月、2007.
62. Watanabe A, Tabira T, Kalaria RN, and Takahashi K. Proteomic Analysis of microvessels of CADASIL brain. International Psychogeriatric Association, IPA 2007 Osaka Silver Congress, Osaka, Japan, Oct. (2007)
63. 田家亜由美, 高尾敏文: 内部データベース検索機能を搭載した nanoLC/ IonTrap-TOFMS によるヒト尿蛋白質のプロファイリング、第55回質量分析総合討論会(平成19年5月、広島)
64. 高尾敏文: 尿プロテオミクスによるバイオマーカー探索、第25回京阪泌尿器腫瘍セミナー(特別講演)(平成19年9月、大阪)
65. T. Mikami, A. Taya, N. Minamino, T. Takao:  $\alpha$ -アミノ基選択的反応による蛋白質N末端ペプチド単離法の開発 第80回日本生化学会大会(平成19年12月、横浜)
66. 宮本泰豪、是金宏昭、大腸癌の酸性糖脂質の解析と癌の糖鎖解析における laser microdissection の有効性の評価、第55回日本質量分析総合討論会(2007年5月、広島)
67. 信田京子、是金宏昭、御園生良子、能浦真吾、大植雅之、今岡真義、宮本泰豪、大腸癌の糖脂質の構造解析、第80回日本生化学会大会(2007年12月、横浜)

### ③ 総説

鎗木康志 脂肪細胞におけるインスリン作用  
カラー版 糖尿病学 基礎と臨床 からだの科学 西村書店、145-148, 2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### ①特許取得

1. 名称: アミノ末端修飾ペプチドの分離方法

発明者: 高尾敏文、三上寿幸

特許出願予定 (2008年2月10日)

### 2. 名称: 新規ペプチド

発明者: 山崎基生、高橋憲行、南野直人、佐々木一樹、高尾敏文、里見佳典

PCT/JP2006/314969号

日本、米国、ヨーロッパに移行予定 (2008年)

### 3. 名称: スキルス型がんの疾患関連たんぱく質およびその使用

出願日: 平成19年4月25日

出願番号: 特願 2007-115593

### 4. 名称: スキルス型がんの疾患関連たんぱく質およびその使用 (追加特許)

出願日: 平成19年10月24日

出願番号: 特願 2007-244433

### 5. 他2件出願予定

### ②実用新案登録

なし

### ③その他

なし

## I. 参考文献

- 1) Kirk, C. et al. Molecular & Cellular Proteomics. 2. 299-314(2003)
- 2) 金子勲: 疾患関連たんぱく質解析研究 平成16年度総括・分担研究報告書(長尾拓編) p254-286.
- 3) 金子勲: 疾患関連たんぱく質解析研究 平成17年度総括・分担研究報告書(山西弘一編) p.104-144
- 4) 金子勲: 疾患関連たんぱく質解析研究 平成18年度総括・分担研究報告書(山西弘一編) p.127-158
- 5) Ross, P.L. et al Mol Cell Proteomics 3, 1154-1169(2004)
- 6) Kondo, T., Seike M. et al. Proteomics. 3, 1758-1766 (2003)

- |   |       |   |
|---|-------|---|
| 7) Falk R. J., et al: Primary glomerular disease. In; Brenner and Rector' s The Kidney(ed by Brenner B.M.) p1293-1380, Saunders, Philadelphia, 2004 | 堤 康央  | 独立行政法人医薬基盤研究所<br>創薬プロテオミクスプロジェクトリーダー      |
| 8) スキルス胃がん 基礎と臨床 (Scirrhou carcinoma of the Stomach -A Multidisciplinary Approach<br>曾根融生、井藤久雄著(医薬ジャーナル社)   | 角田慎一  | 独立行政法人医薬基盤研究所<br>創薬プロテオミクスプロジェクト<br>主任研究員 |
| 9) 組織病理アトラス (Atlas of Histopathology) 第5版 小池盛雄、恒吉正澄、深山正久、森永正二郎著(分光堂)  | 鎌田春彦  | 独立行政法人医薬基盤研究所<br>創薬プロテオミクスプロジェクト<br>主任研究員 |
| 10) Temerinac, S. Et al: Blood 95, 2569-2576(2000)  | 宮澤 崇  | 国立循環器病センター研究所                             |
| 11) Matunobu, T., Ishiwata T. et al: Int. J. Onco, 2, 307-314 (2006)  | 宮里幹也  | 国立循環器病センター研究所                             |
| 12) DeSouza, L et al: J. Proteome Research 4, 377-386(2005)   | 佐々木一樹 | 同上 研究所 薬理部                                |
| 13) Abdi, F. Et al: J. Alzheimer' s Disease 9, 293-348(2006)  | 尾崎 司  | 同上 研究所 薬理部                                |
|   | 須藤浩三  | ヒューマンサイエンス財団流動研究員                         |
|   | 田家垂由美 | 文部科学省科学研究費特任研究員                           |
|   | 門田守人  | 大阪大学大学院医学系研究科<br>消化器外科学                   |
|   | 山本浩文  | 同上  |
|   | 中森正二  | 国立病院機構 大阪医療センター                           |
|   | 奥山明彦  | 大阪大学大学院医学系研究科<br>泌尿器科学                    |
| <b>J. 研究協力者</b>   | 野々村祝夫 | 同上  |
| 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所<br>生物薬品部 室長   | 中山雅志  | 同上  |
| 原園 景 国立医薬品食品衛生研究所<br>生物薬品部 主任研究官  | 中里雅光  | 宮崎大学医学部附属病院第三内科                           |
| 橋井則貴 国立医薬品食品衛生研究所<br>生物薬品部 研究官  | 芦谷淳一  | 同上  |
|   | 山口秀樹  | 同上  |

## 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんば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ば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10種の研究課題を作成し、第一段階の血液試料全てについてプロテオームファクトリー施設へ提供した。プロテオーム解析が終了した5課題については臨床情報との比較・解析に着手し、一部では方法論の妥当性が検証されただけでなく、可能性を示唆する結果も得られた。心不全を対照とする課題においては、第二段階の試料も採取、送付した。漸く研究の歯車が動き出し、今後の研究の発展が期待される。

### 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100万人を超え、その平均入院患者数も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。これらの事実は、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ばく質を網羅的に解析、データベース化し、疾患関連たんば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19年度は、当センターで実施中の10課題について試料や臨床情報の収集を終了し、創薬プロテオームファクトリー施設に第一段階の試料・情報提供を完了させた。次に、たんばく質解析データと臨床データの比較・解析を実施すると共に、必要に応じた症例や検体採取時期の最適化を行い、第二段階の試料収集を開始した。これらを通じて、研究を実質的なデータ解析段階から妥当性の検討、生理・病態生理的意義の解明に導

くことを目標とした。さらに血清以外に血漿試料、組織試料についても試料の収集、保管を行っているため、これらの解析についてプロトコールを完成し、研究所と協力して実施した。試料の採取、解析や情報管理に関しては、昨度までに作成した個人情報保護法、臨床研究指針などに基づく手順、実験処理マニュアルなどに従い、実施した。

### B. 研究方法

当センターで実施した循環器疾患関連たんば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ていた。その指示に従い、創薬プロテオームファクトリー施設とMTAを締結し、これに基づいて試料や情報の授受を行った。18年度末までに10課題が倫理委員会で承認され研究に着手したが、これらの試料収集を完了させた。

具体的には、各課題の内容は二段階の実施形式としており、第一段階として各疾患においてたんばく質変動が予測される時期に同一患者より複数回の採血を行った。各課題の総検体数の1/2～1/3を第一段階の研究に当てた。創薬プロテオームファクトリー施設からたんばく質解析結果が通知されると、臨床パラメータも含めた比較・解析を行い、先ず既存の臨床生化学検査などにおけるたん

ばく質や酵素活性などの結果との比較を行い、解析データの妥当性を検討した。次に、各課題内での症例の絞り込み、試料採取時期の再検討などを行い、本研究目的に従った結果が得られるように症例や試料採取時期を至適化すべく検討を行った。至適化した症例、時期に基づき第二段階の試料収集を行い、さらに詳細な臨床データとの比較・解析を実施した。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、各種の循環器疾患に関連するたんぱく質の発見、さらにバイオマーカーとしての有用性、たんぱく質の機能解析や病態生理的意義の解明へと展開する研究を行った。

血清と血漿でたんぱく質、ペプチドの分子型の大きな変化が予測されたため、17年度後半より血清試料以外に血漿試料についても採取、保管、送付した。採血などの試料採取、処理、保管法でもマニュアルの精密化、均一化を進め、血漿についてはプロテアーゼインヒビターの添加、融解・再凍結の禁止などでプロテアーゼ類の活性化を抑制した。しかし、創薬プロテオームファクトリー施設では本研究期間中に血漿の解析を実施しないことが決定されたため、当センター内部で2次元電気泳動法をはじめとした異なるプロテオーム解析手法を用いて分析を開始した。17年度承認を受けた心臓組織のプロテオーム解析研究についても、マニュアル化した試料収集、抽出用組織の前処理・保存、保管を実施し、上記と同様に、当センター内での解析に着手した。また、昨年度までに作成、改善した個人情報保護法、臨床研究指針などに基づく手順、実験処理マニュアルなどに従い、事故等がなく研究計画を実施できる体制を完成させた。

### C. 研究結果

当センターの循環器疾患関連たんぱく質解析研究においては、以下の10課題が高度先駆的医療、研究審査委員会で医学的、科学的検討を受け、倫理委員会で倫理面での承認を得た。各課題の目的

や対象症例などの詳細、方法、試料採取時期などの詳細は、これまでの報告書に記載した。

- 研究計画 1-1. 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 2-1. 腎血管性高血圧関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 3-1. 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 3-2. 冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症の LDL-アフェレーシス治療施行前後のたんぱく質の探索研究
- 研究計画 3-3. 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 4-1. 急性期心不全関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 4-2. 急性心筋梗塞症および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 4-3. 肺高血圧症関連たんぱく質の探索研究
- 研究計画 5-1. 心組織における心筋症関連たんぱく質の探索研究
- 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

このうち、研究計画 5-1. 心組織、研究計画 6-1 の健常者についてのみ対象者が少なく、19年度の採取終了時期までに第一期の予定試料数を採取できなかった。研究計画 5-1 の心臓組織は、本研究期間内では創薬プロテオームファクトリー施設で解析を行わないことが決まったため送付しなかったが、それ以外の血液試料については、血清、血漿を含め全ての送付を完了した。しかし、本年度になり、研究期間内に創薬プロテオームファクトリー施設では血漿試料の解析は困難との通知を受けたため、血漿試料の返還を求めた。特に、研究計画 3-2 においては、症例及び処置の実施上、血漿試料のみしか採取できないので、上記心臓組織を含めて当センター内部での解析に着手した。

一方、5課題については本年度6月から11月にプロテオーム解析結果が創薬プロテオームファク

トリ施設より示され、内容に関する説明も行われた。当センターは、当該症例に対する詳細な臨床データを創薬プロテオームファクトリー施設に提供した。しかし、解析結果が紙媒体でしか提供されなかったため、現状では一部の手入力データとの解析、検討を行うに留まっている状況である。その概要と解析結果の評価などを以下に示した。

1) 研究計画 1-1. 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究：

脳梗塞患者の急性期(入院当初)と慢性期(発症後7~14日目)の比較では、多くの血中たんぱく質の変動が確認された。一部は、特定の治療薬(抗血小板薬、抗凝固薬など)の投与前後での変化、生体反応(血小板たんぱく質、各種凝固・線溶系因子の変動など)をとらえていると推定された。症状悪化や改善などの臨床経過や病型、病態に特異な変動も含まれている可能性があったが、今回の限定された症例数と解析データだけでは、これ以上の解析は困難であった。

2) 研究計画 3-1. 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索研究：

糖尿病患者を対象に有酸素運動を主とした運動療法を3ヶ月間行い、その前後での血清たんぱく質の比較を行った。全ての症例で共通した変動を示したたんぱく質はなかったが、ある程度の数の症例で1.5倍以上の上昇が認められたたんぱく質が見出された。このたんぱく質は生理的な変動で増減することが知られ、最近の報告では肥満などとも関連する可能性も示唆されているものの、運動と本たんぱく質分子の関連などを報告したものはなく、今後さらに病態生理的意義を含め検討していく必要があると考えられた。

3) 研究計画 3-3. 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索研究：

遺伝的背景のない高コレステロール血症症例に対して、アトルバスタチンの服用開始前、服用開始3ヶ月後に採血を行い、臨床化学検査などとプロテオーム解析を実施した。リポたんぱく質を構成する主要なたんぱく質であるアポリポたんぱく

質を例にとると、アポリポたんぱく質Bは臨床化学検査でも有意な低下を認め、プロテオーム解析においても同様の低下を観測することができた。その他のアポリポたんぱく質類については、臨床化学検査においてもプロテオーム解析においても変動を認めず、既知のたんぱく質の変動をプロテオーム解析にて正確に評価できることが検証された。今後、詳細な臨床情報との比較・解析を行うことにより、脂質代謝や動脈硬化に関わる未知のたんぱく質の探索とその病態生理的機能を検出、同定できる可能性が示唆された。

4) 研究計画 4-1. 急性期心不全関連たんぱく質の探索研究：

急性心筋梗塞の急性期と慢性期に採血を行い本疾患の病態と関連する特異的なたんぱく質の変動はないか検討した。多数のたんぱく質に本疾患の病期に応じた変動が確認されたが、確認症例数が10例と少なく心筋梗塞部位や梗塞サイズ、合併症の有無、併用薬剤の違いなど治療法にも違いがあり、今回観測されたたんぱく質の変動の意味を解析することは現状では困難と思われた。今後、疾患発症の病態と治療法なども考慮して症例を集め、たんぱく質解析を実施する必要性が認識された。

5) 研究計画 4-2. 急性心筋梗塞症および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索研究：

心不全の急性増悪のために緊急入院した患者を対象として、急性期心不全の治療前後に変化するたんぱく質について検討した。当センター受診前に何らかの治療が行われた患者や、基礎心疾患として虚血性心疾患、重篤な弁膜疾患を持つ患者を除き、治療内容については制約を設けなかった。10名の1次試料のプロテオーム解析結果を検討したところ、補体関連たんぱく質、ホルモン結合たんぱく質などが変化する可能性が示された。これらを確認し、臨床情報とたんぱく質情報をより広範に比較・検討するため、本研究計画においてのみ重症度の高い心不全患者を含む10名の2次試料採取までを行い、現在解析中である。

一方、創薬プロテオームファクトリー施設で解

析を行わないことが決定した研究計画 3-2 の血漿試料、研究計画 5-1 の心組織試料については、国立循環器病センター研究所で 2 次元電気泳動法を主体とした方法で解析を開始した。血漿については、抗体アフィニティーカラムで主要 14 種の血清たんぱく質を除去した後、当センター研究でこれまで実施されてきた技術、解析機器を用いて比較、解析を実施したが、現状ではまだ十分な解析結果が得られていない。

#### D. 考察

本年度に入り、創薬プロテオームファクトリー施設よりたんぱく質の解析結果を報告頂くことができ、漸く本研究も稼働しだしたというのが実感である。困難を伴う定量解析であることもあり、解析対象となるたんぱく質は最大 200 程度であるが、従来から想定されていたプロテオーム解析データの定量値や信頼度について、実データから明確な実感を担当医師、研究者に与えることができ、意義があった。解析結果の算出を行う基礎となる各タンパク質の ICAT 標識トリプシンペプチド数がたんぱく質の量比や分子内システイン残基数により異なること、存在するたんぱく質濃度が大きく異なることなどより、変動値が算出されてもその信頼度は大きく異なることと推察された。しかし、データが提供された際には、数値データは全て同一の重みを持つと判断されるため、信頼度を示すパラメータを導入し、解析結果の評価時に使用する必要があると考えられた。

各課題での解析結果の概要より分かるように、全体としては症例数が少ないためにこれらの結果から有意な結論を導き出すことは困難であるが、何れの課題でも数多くのたんぱく質で変動が認められたことは、その意義は今後の検討を待つとしても、担当者のプロテオーム解析への意欲を生み出すものであった。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と精度については不明であった。また、血中たんぱく質量の生理的変動、個人差について

も信頼できる情報はなかったが、研究計画 3-3 で示されたように、当該疾患に関連し臨床生化学検査で測定される既知たんぱく質群について、今回報告されたプロテオーム解析結果で同様の変動、非変動が確認された意義は大きい。今後より微量かつ多様なたんぱく質まで解析対象を拡大することにより新規の疾患関連バイオマーカー候補、疾患関連の機能性たんぱく質の同定へアプローチできる可能性を示したものと考えている。実際、研究計画 4-2 では、補体関連たんぱく質、ホルモン結合たんぱく質などが変化する可能性が示され、より重症な不全患者を含む 10 名の 2 次試料採取まで研究を進めた。また、研究計画 3-1 では、糖尿病患者の 3 ヶ月間の有酸素運動療法の前後で、変動傾向を示す可能性のある血清たんぱく質が見出された。このたんぱく質の機能は不明であるが、肥満などとも関連する可能性もあり、今後さらなる生理、病態生理的意義を検討していく予定である。一方、研究計画 1-1. の脳梗塞患者の急性期と慢性期の比較では、血中たんぱく質を変動させる抗血小板薬、抗凝固薬などの治療薬が投与されるため、その投与前後での変化、生体反応をとらえている可能性が高く、治療法などの詳細も含めた症例の設定、研究計画の作成が必要である。

提供試料についてはできるだけ均一な対象を選び、作成したマニュアルに従い採取、処理、保管を実施したので、試料提供側としては十分な品質を確保できたと考えている。臨床データとの詳細な解析結果に基づき、同一課題内でも疾患原因や病態、治療内容などの均一化、採血時期の至適化などを図り、2 次、3 次試料を解析することにより、有用な結果が得られると期待される。

血漿試料、心組織試料の解析については、国立循環器病センター研究所で 2 次元電気泳動法などを用いて開始した。現状では解析可能なたんぱく数が限られているため、さらに使用血液量などを増加して意義のあるデータが得られるようにしたい。

また、新しい研究領域における異なる研究機関



の共同研究には種々の問題が発生するので、それらに対して相互に積極的な情報交換、修正などを行っていく必要があると思われる。

#### 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実施した。一次試料として予定した試料の大部分は採取を終え創薬プロテオームファクトリー施設へ送付を完了し、解析結果が提供された 5 課題については臨床情報を含めた比較・解析を行い、1 課題については第二段階の試料収集に移行した。その結果、解析法の信頼性、精度がある程度確認されると共に、変動を示唆する結果も得られ始め

ている。当センター内では倫理、情報、試料採取・処理、管理などにおいて一応整ったシステムを作成できたので、今後も積極的にプロテオーム解析を推進していきたい。

#### 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

## 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 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、これまでほとんど同定されていなかった。本研究では、これまでにグレリンの新たな分子型や、新規生理活性ペプチド neuromedin S (NMS) を発見している。また、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 neuropeptide Y (NPY), peptide YY (PYY) 及び  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) を同定している。今回、3T3-L1 細胞を用いた細胞内 cAMP 濃度変化を指標としたスクリーニングにより、ラット小腸組織より gastric inhibitory polypeptide (GIP) を単離・同定し、ラット脂肪組織より pituitary adenylate cyclase activating polypeptide 38 (PACAP38) と考えられるペプチド分画を精製した。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いる。本研究を基盤として、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される。

### 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、これまでほとんど同定されていなかった。

我々はこれまでに、循環器疾患に関連する新規生理活性ペプチドの探索を行い、オーファン G たんぱく質共役型受容体 (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た。本研究では、グレリンの新たな分子型の同定により、循環器系やエネルギー代謝調節に関連する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 neuromedin 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。本研究では、FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の第 2 の内因性リガンドとして、neuromedin 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。

さらに、疾患関連たんぱく質解析研究の一環として、グレリンの新たな分子型や、新規生理活性ペプチドNMSの発見に加え、培養脂肪細胞系である 3T3-L1 細胞を用いて NPY, PYY 及び  $\alpha$ -MSH を同定している。今回、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、ラット小腸組織より gastric inhibitory polypeptide(GIP)を単離・同定し、またラット脂肪組織よりクロマトグラフ上の特性から pituitary adenylate cyclase activating polypeptide38(PACAP38)と考えられるペプチド分画を精製した。さらに、GIP や PACAP38 の脂肪細胞に対する機能及び疾患との関わりを考察した。

## 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、ラット小腸及び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：

ラット小腸及び脂肪組織を既報のとおり、100℃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、陽イオン交換クロマト(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) GIP の単離・同定

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ラット小腸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 3,000~4,000 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、day4 及び day8 の脂肪細胞で検出されたが、特に day8 で強く認められた。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、プロテインシーケンサー及びマススペクトロメーターによる構造解析を行った結果、42 残基のアミノ酸からなる GIP の N 末端 27 残基(GIP [1-27])のペプチドが同定された。

### 2) PACAP38 の単離・精製

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 4,000~5,000 の分画に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。その活性は day0、day4 及び day8 の脂肪細胞で検出されたが、day0 の細胞で強く認められた。この活性分画をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離・精製を行った結果、クロマトグラフィー上の特性及び合成品との比活性の検討より、この分画に含まれるペプチドは PACAP38 と考えられた。今後、精製したペプチドを、プロテインシーケンサー及びマススペクトロメーターに

より構造決定する予定である。

#### D. 考察

本研究により、ラット小腸より脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドとして、GIP を同定した。また、ラット脂肪組織より PACAP38 と推定されるペプチドを精製した。GIP は、グルコースや脂肪の経口摂取により小腸の K 細胞から分泌され、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進するインクレチンとして知られている。また、GIP の受容体が脂肪細胞に発現しており、脂肪細胞の分化に伴ってその発現が増加すること、脂肪細胞に作用して lipoprotein lipase の活性を亢進し、脂肪細胞への脂肪取り込みを促進することが報告されている。さらに、高脂肪食負荷肥満マウスに GIP の antagonist を投与すると、肥満の改善とともに、糖・脂質代謝プロファイルの改善を認めることより、GIP の antagonist がメタボリックシンドロームの治療薬になる可能性が示唆されている。

PACAP は、中枢神経から末梢神経まで広く分布する神経伝達物質で、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進することが知られている。また、脂肪細胞において PACAP 受容体が発現し、PACAP が脂肪細胞への糖取り込みを促進することや、脂肪細胞の分化を促進することが報告されている。

我々はこれまで、3T3-L1 細胞を用いて、中枢性摂食促進ペプチドである neuropeptide Y (NPY) 及び中枢性摂食抑制ペプチドである  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) 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、膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進し、脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドを同定した結果から、脳、腸、膵臓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。

今後、この手法を用いて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、ラット小腸より GIP を単離・同定した。また、ラット脂肪組織より PACAP38 と推定されるペプチド分画の精製を行った。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

① Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nat Med*, 13: 1234-1240, 2007.

② Takahashi H, Kurose Y, Sakaida M, Suzuki Y, Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. Ghrelin differentially modulates glucose-induced insulin secretion according to feeding status in sheep. *J Endocrinol*, 194: 621-625, 2007.

③ Sakamoto T, Mori K, Nakahara K, Miyazato M, Kangawa K, Sameshima H, Murakami N. Neuromedin S exerts an antidiuretic action in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 457-461, 2007.

④ Iwakura H, Akamizu T, Ariyasu H, Irako T, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am J Physiol*