

なお、保存期間の満了または保存の必要がなくなった場合、治験責任医師は速やかに医療機関に文書で報告する。なお、治験責任医師が長期間の保存を必要とする場合には、保存期間及び方法について医療機関の長と協議し、文書で定めることとする。

#### **2.14 金銭の支払い及び保険**

被験者及び医療機関への金銭の支払いについては、医療機関と治験責任医師との契約書または合意書に従う。

なお、重篤な有害事象の発現等による被験者への補償に備えて、治験責任医師は保険に加入する等の措置を取る。

#### **2.15 被験者の健康被害に対する補償**

本治験に関連して生じた被験者の健康被害の補償については、治験責任医師は法的責任が確定されていない場合であっても、原則として平成 21 年 11 月 25 日に医薬品企業法務研究会より公表(改訂)された「被験者の補償に関するガイドライン」に準じて補償を行う。その際、医療機関ならびに治験責任医師は因果関係の証明などについて被験者に負担を課すことがないように留意する。

なお、個々の補償の必要性、金額、方法などの詳細の決定にあたっては、個々の健康被害発生の状況と本治験の内容を考慮し、また、必要に応じて医療機関と協議する。

なお、次の場合には上記ガイドラインに基づき、治験責任医師は補償を行わないあるいは減額するものとする。

##### **<補償を行わない場合>**

- ①機会原因に起因する健康被害(治験中でなくとも起こったであろう事故原因に起因する場合)
- ②治験との因果関係を合理的に否定できる健康被害
- ③医療機関側に故意または重過失があった場合
- ④第三者の違法行為または義務などの不履行に因る場合

##### **<補償を減額する場合>**

次の場合には、健康被害の程度、状況を勘案し、補償を減額または補償の対象外とする。

- ①医療機関が治験実施計画書から著しく逸脱した場合
- ②被験者側にその健康被害の発生につき、故意または重過失がある場合

#### **2.16 公表に関する取り決め**

医療機関が本治験に関わる学会発表や論文発表などを行う場合には、事前に治験責任医師に連絡し、承諾を得ることとする。

#### **2.17 治験期間**

平成 27 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

(資料4)

アドレノメデュリンのPhase 1 試験

説明文書・同意文書（改訂案）

治験計画番号:

版番号:第2版

作成年月日:2014年3月13日

はじめに

潰瘍性大腸炎は若年～青年層に好発し、再燃を繰り返す原因不明の難病で、1975年より特定疾患治療研究対象疾患に指定されています。本邦においても患者数は増加傾向にあり、現在14万人を超えています。原因が不明で根治療法がない現状では、病勢をコントロールし、正常の社会生活を継続できる事が本疾患の治療目標となっています。しかし、種々の薬剤に治療抵抗性を示す症例も多く、新たな治療薬の開発が切に望まれています。

アドレノメデュリンは、全身炎症性反応症候群動物モデルの臓器障害を軽減させることが判明し、抗炎症作用を発揮することが明らかになっています。また、大腸潰瘍モデルラットおよび大腸炎モデルマウスにおいて、アドレノメデュリンが炎症改善作用を有することが判明しています。さらに、アドレノメデュリンはステロイド抵抗性の潰瘍性大腸炎患者の臨床症状、内視鏡所見を改善し、顕著な粘膜修復作用を有することが明らかとなっています。

以上の結果を踏まえ、本治験は日本で発見されたアドレノメデュリンの申請承認を目的とし、皆様方のご協力をお願いしたいと考えております。

これから、詳しい内容をご説明しますので、分からない言葉や表現、疑問点等があればどんなことでも遠慮せずに担当医師に聞いて下さい。分からないことは何度でも質問していただいて構いません。

## 1. 治験とは

「治験」とは、新しいお薬が病気に対して本当に効果があるのかどうか、また、どんな副作用がどのくらいあるのかなどについて、多くの方に協力してもらい調べることです。

薬が誕生するまでには、次のような過程をたどります。

### 薬の誕生まで

#### 第1相試験

新薬の開発において、動物実験で有効性・安全性が確認されると、次のステップとしてヒトを対象とした臨床試験をおこないます。その最初に実施されるのが第1相試験であり、安全性の確認を目的としています。原則として健康な成人男性が対象となります。

#### 第2相試験

第2相試験とは、第1相試験で治験薬の安全性（耐受性）と薬物動態を明らかにした後、その有効性が期待される患者を対象に、用法・用量などを検討する試験です。

#### 第3相試験

第3相試験とは、第2相試験で治験薬の有効性が期待された後、さらに有効性・安全性を確認するために、多数の患者を対象に多数の施設で行われる試験のことです。最近では国際的に何万人、何十万人規模の患者を対象に行われることも多くなってきました。

#### 第4相試験

第4相試験とは、医薬品承認後に行われる治療的使用で承認前より以上の知見を得るために行われる全ての臨床試験（市販後調査を除く）を指します。第3相試験までの治験では申請-認可に必要な最小限の情報が得られたわけであり、市販後に思わぬ有害性が明らかとなったり、有効性に疑問を生じたりすることも十分予想されま

治験で調べるお薬のことを「治験薬」といいます。患者さんに使用する前には、いろいろな動物を使って、治験薬の効果や安全性を確かめますが、人に用いるお薬である以上、人における効果や副作用を調べなければなりません。

治験は、国（厚生労働省）に届け出をした後、国が定めたルールに従って行われます。現在、病院や薬局で処方・調剤されているお薬は、治験で効果や副作用

を調べたのち、国から承認されたものです。

「治験」にはこれまでも多くの方が参加されています。治験は、参加される方の善意に基づくボランティアです。治験にご協力頂ける方がいない限り、薬は誕生しません。つまり、治験に参加するという事は、結果的に、病気で苦しんでいる人の為にもなり、「創薬ボランティア」として社会に貢献する事に繋がります。

## 2. 治験が研究を伴うこと

治験は、治験薬の効果や安全性を詳しく調べることを目的としています。必要なデータを得るために、あなたの症状を把握するための採血、尿検査などをお願いすることになります。

## 3. 今回の治験の目的

今回の治験の目的は、この治験薬(アドレノメデュリン)の安全性の確認です。今回の治験では、血圧、心拍数、体温、呼吸数、といった理学的検査や、血液検査、心電図検査により、安全性を確認します。また、治験薬の血液中の濃度も測定します。

## 4. 今回の治験の方法

最初に、あなたがこの治験への参加を希望されるかどうか確認させていただきます。

本説明文書を最後まで読み、説明を受けた後、治験への参加に同意される場合は、添付の同意文書に署名して下さい。その後、治験の参加に適しているかどうかを確認する為、診察・検査を受けて頂きます。今回の治験に参加する基準を満たしていない場合は、参加いただくことができません。

治験に参加いただく方には、プラセボ(アドレノメデュリンの有効成分を含有せず)または低、中、高用量のいずれかのアドレノメデュリンを静脈内に8時間持続点滴して頂きます。どの薬剤が投与されるか事前にはわからないようになっています。

### 4-1 治験への参加予定期間

参加予定期間は、原則として以下のとおりです。なお、入院2日前から投与終了24時間後は、アルコール、カフェイン含有飲食物およびグレープフルーツの摂取及び喫煙を禁止いたします。

### 4-2 治験のスケジュール

#### ◆同意いただいた日から治験薬の最初の使用まで

あなたがこの治験の参加に適しているかどうかを確認するために検査を行います。検査では、治験を行っても安全かどうかを確認する検査（血液検査、心電図検査）を行います。この検査で、今回の治験に参加する基準を満たしていないことが分かった場合は、この治験に参加頂くことができません。

#### ◆治験薬の投与

上記の検査が終了した後、参加いただけることが確認されましたら、治験薬の投薬を使用します。

##### （１）治験薬の使用について

試験開始日より、プラセボ（アドレノメデュリンの有効成分を含有せず）又は低用量（3 ng/kg/min）、中用量（9 ng/kg/min）、高用量（15 ng/kg/min）のいずれかのアドレノメデュリンを静脈内に 8 時間持続点滴して頂きます。どの薬剤が投与されるか事前にはわからないようになっています。

##### （２）検査、採血について

治験薬の効果や副作用等の有無を評価するために、自・他覚症状の検査、理学的検査、心電図、臨床検査を行います。

治験薬投与前、投与 30 分後、投与 1 時間後、4 時間後、8 時間後、そして投与終了 1 時間後、及び翌日に医師の問診を受けて下さい。

治験薬投与前、投与開始 30 分後、1 時間後、4 時間後、8 時間後、そして投与終了 1 時間後、及び翌日に血圧、心拍数の検査を受けて下さい。

また、治験薬投与前、投与 1 時間後、8 時間後、そして投与終了 1 時間後、及び翌日に体温、呼吸数の検査を受けて下さい。

12 誘導心電図は、治験薬投与前、投与中、投与開始 24 時間後に、モニター心電図は、治験薬投与前より試験終了まで観察します。

臨床検査のための採血は、治験薬投与前、投与中、並びに投与終了後（投与開始より 8 時間 15 分後、及び翌日）に行います。

その他、アドレノメデュリンの血中濃度測定のため、治験薬投与開始後、5 分、10 分、20 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、投与終了後は、2 分、5 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、及び投与 24 時間後に採血を行います。

スケジュール表



ることによって症状が悪化した場合、あなたの故意または重大な過失によって生じた場合などは、補償の対象とならない、または補償が制限されることがあります。

#### 7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること

あなたがこの治験に参加するかどうかは、ご自身の自由な意思で決めて下さい。たとえ参加に同意されない場合でも、あなたは一切不利益を受けません。医師と気まずくなるのではないかと心配されるかも知れませんが、決してそのようなことはありません。

また、あなたが治験の参加に同意した場合であっても、いつでも治験への参加をとりやめることができます。その場合も、あなたが不利益を受けることはありません。

#### 8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合

この治験に参加している間に、あなたの安全性や参加の意思に影響を与えるような新しい情報（特に副作用に関連するもの）を得た場合には、担当医師が速やかにそのことをあなたに連絡し、説明します。その際、今後もこの治験に継続して参加するかどうかを、再び文書にて確認します。

#### 9. 治験への参加が中止となる場合

あなたが自分の意思で治験への参加をやめることができることは説明しましたが、それ以外にも次のような場合には治験への参加を中止いただくことがあります。

- (1) あなたにとってこのましくない症状（副作用等）がみられ、担当医師がこの治験を続けることが難しいと判断した場合
- (2) あなたが今回の治験に参加する基準を満たしていないことが明らかとなった場合
- (3) あなたが今回の治験について、担当医師から守るように指示されたことを守らず、担当医師がこの治験を続けることが難しいと判断した場合
- (4) この治験薬に関する新しい情報により、治験を依頼している会社または病院がこの治験をつづけることが難しいと判断した場合

治験への参加を中止する場合は、担当医師があなたの健康状態を確認します。

#### 10. あなたに関わるプライバシーが守られていること

治験では適切な識別コード（文字や数字を組み合わせたもの）を使用することにより、あなたのプライバシーは厳格に守られ、あなたの名前や個人を特定でき



る情報は公表されることはありません。

あなたが今回の治験に参加された場合、治験で得られたあなたに関する情報は、治験を依頼している会社や厚生労働省、医薬品医療機器総合機構に報告されます。治験の結果が学会や医学論文などで公表される場合もあります。

また、治験が正しく行われたかどうか、治験依頼会社に報告した情報に誤りがないかどうかを確認するために、この病院が保管しているカルテ（同時に受診している他の診療科のものを含む）など、あなたに関する情報が記録されている資料を、治験を依頼している会社の担当者や、この病院の治験審査委員会、場合によっては厚生労働省や医薬品医療機器総合機構の調査員が見ることがあります（「閲覧」といいます）。この際、カルテに記載されているあなたの情報を書き写したり、コピーする場合があります。

この治験の参加に同意された場合は、あなたのプライバシーを保護した上で、治験結果の利用とカルテなどの記録の閲覧をさせていただきますのでご了承下さい。

なお、治験に参加された後に参加を取りやめたり、治験への参加が中止となった場合でも、治験中の検査結果や治験終了後の経過については、今回の治験に関する情報として貴重な資料として使用させていただくこととします。

## 11. 治験中の検査費について

今回の治験で使用される治験薬、および検査（血液検査・尿検査・心電図など）の費用は、治験を依頼している宮崎大学が負担します。あなたの負担になることはありません。

## 12. あなたへの金銭等の支払い

あなたが治験に参加することによって生じる交通費等の負担を軽くするため、この治験に参加される場合に以下の金額をお支払します。治験の参加に同意された後に、治験で定められた診察・検査などのために来院された場合 10,000 円、治験参加のために入院した場合、入院 1 日につき 30,000 円、退院後検査のための来院時に 10,000 円を、あなたが指定する銀行または信用金庫の口座に、原則として治験参加の翌月に当大学から振込みます。

## 13. 今回の治験を担当する医師

今回の治験を担当する医師の氏名と連絡先は以下のとおりです。

治験責任医師： \_\_\_\_\_

治験分担医師： \_\_\_\_\_

連絡先： 〇〇〇〇クリニック

住所 〒 \_\_\_\_\_

TEL. (昼間) \_\_\_\_\_ FAX \_\_\_\_\_

(夜間) \_\_\_\_\_

なお、この治験やお薬に関してわからないことや疑問な点がありましたら、遠慮せずに担当医師にお聞き下さい。

#### 14. 治験に関する相談窓口

治験の内容やお薬に関してわからないこと、疑問に感じることもある場合は、遠慮せずに相談窓口にお問い合わせ下さい。相談窓口の連絡先は以下のとおりです。

\_\_\_\_\_ クリニック 治験事務局 \_\_\_\_\_

住所 : 〒 \_\_\_\_\_

連絡先： (昼間) TEL. \_\_\_\_\_ FAX \_\_\_\_\_

(夜間) TEL. \_\_\_\_\_

#### 15. あなたに守って頂きたいこと

もし、この治験に参加頂けた場合、この治験が終了するまで次の内容を守るよう心がけて下さい。ご協力をお願いします。

- ① 担当医師から指定された日に、診察・検査を受けるようにして下さい。もし、指定された日に受けられない場合は担当医師に連絡し、指示に従って下さい。
- ② 治験薬の投与1週間前から治験薬以外のお薬の服用はしないで下さい。もし、お薬を服用した場合は、担当医師に連絡し、指示に従って下さい。
- ③ 入院中は指示された飲食物のみを飲食し、その他のものは飲食しないで下さい。
- ④ 入院2日前から投与終了24時間後までは、アルコール、カフェインおよびグレープフルーツを含む飲食物は摂らないで下さい。

また、上記以外にも、担当医師に指示されたことは必ず守って下さい。

## 同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

### 記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 医療機関名/診療科\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_科

治験責任（分担）医師\_\_\_\_\_ (印)

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 説明者\_\_\_\_\_ (印)

同意日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 患者署名\_\_\_\_\_

## 同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

### 記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 医療機関名/診療科\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_科

治験責任（分担）医師\_\_\_\_\_ (印)

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 説明者\_\_\_\_\_ (印)

同意日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 患者署名\_\_\_\_\_

## 同意文書

私は、今回の治験について十分な説明を受け、説明文書を受け取り、内容を十分に理解した上で、治験に参加することに同意します。

### 記

1. 治験とは
2. 治験が研究を伴うこと
3. 今回の治験の目的
4. 今回の治験の方法
5. 予測される治験上の利益および不利益
6. 健康被害が起きた際の処置および補償
7. 治験への参加はあなたの自由意思であり、いつでも撤回できること
8. 治験および治験薬について新たな情報が得られた場合
9. 治験への参加が中止となる場合
10. あなたに関わるプライバシーが守られること
11. 治験中の医療費について
12. あなたへの金銭等の支払い
13. 今回の治験を担当する医師
14. 治験に関する相談口
15. あなたに守って頂きたいこと

説明日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 医療機関名/診療科\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_科

治験責任（分担）医師\_\_\_\_\_ (印)

（治験協力者が補足的な説明を行った場合は下記に記入のこと）

説明日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 説明者\_\_\_\_\_ (印)

同意日：西暦\_\_\_\_年\_\_月\_\_日 患者署名\_\_\_\_\_

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K.	Adrenomedullin: A novel therapy for intractable ulcerative colitis.	Inflamm Bowel Dis.	19	26-27	2013
Nagata S, Hatakeyama K, Asami M, Tokashiki M, Hibino H, Nishiuchi Y, Kuwasako K, Kato J, Asada Y, Kitamura K.	Big angiotensin-25: A novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine.	Biochem Biophys Res Commun.	441	757-762	2013
Ashizuka S, Inatsu H, Inagaki-Ohara K, Kita T, Kitamura K.	Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for inflammatory bowel disease.	Current Protein and Peptide Science.	14	246-255	2013
Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Murakami M, Kitamura K, Kato J.	Functions of third extracellular loop and helix 8 of Family B GPCRs complexed with RAMPs and characteristics of their receptor trafficking.	Current Protein and Peptide Science.	14	416-428	2013
北村和雄	アドレノメデュリンの展開研究.	心臓	45	1496-1502	2013
鶴田敏博、北村和雄	ストローマからみた心血管病。「ストローマをターゲットとした心血管病の治療」	循環器内科	74	125-131	2013

## REFERENCES

- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1911–1930.
- Pappa H, Grand R, Gordon C. Report on the Vitamin D status of adult and pediatric patients with inflammatory bowel disease and its significance for bone health and disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:1162–1174.
- Blanck S, Brensinger C, Lichtenstein G, et al. Vitamin D deficiency and its potential link to ulcerative colitis disease activity. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:S451.
- O'Neill R, Mahadevan U. Vitamin D status in inflammatory bowel disease: association with disease activity. *Gastroenterology.* 2011;140(Suppl 1):S430.
- Boothe D, Lakehomer H, Jacob V, et al. High dose vitamin D3 improves clinical activity in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(Suppl 2):S458.
- Shen B, Fazio VW, Remzi FH, et al. Comprehensive evaluation of inflammatory and noninflammatory sequelae of ileal pouch-anal anastomoses. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:93–101.
- Kuisma J, Nuutinen H, Luukkonen P, et al. Long term metabolic consequences of ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:3110–3116.
- Sandborn WJ. Pouchitis: risk factors, frequency, natural history, classification and public health prospective. In: McLeod RS, Martin F, Sutherland LR, et al., eds. *Trends in Inflammatory Bowel Disease 1996*. Lancaster: Kluwer Academic Publishers; 1997. p 51–63.

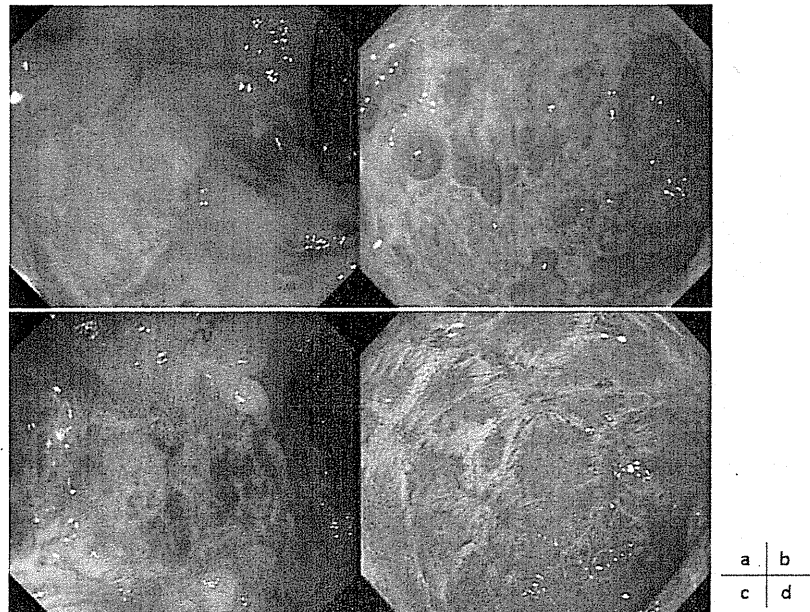


FIGURE 1. Colonoscopic findings. Wide and deep ulcers were observed in the transverse colon (a) and the sigmoid colon (b) before AM therapy. Two weeks after AM therapy (c,d), significant neovascularization and mucosal regeneration were observed at the margin and base of deep ulcers in the transverse colon (c). In the sigmoid colon, fibrosis (scarring) and vasodilation were seen in relatively shallow ulcers. Scarred regions had a reticulated, spider web-like appearance (d).

## Adrenomedullin: A Novel Therapy for Intractable Ulcerative Colitis

### To the Editor:

In May 2010, a 68-year-old woman undergoing treatment for diabetes presented with a 3-year history of ulcerative colitis (UC). The patient was steroid-dependent, so a regimen of mesalazine (5-aminosalicylic acid [5-ASA]), prednisolone (PSL), and azathioprine (AZA) was prescribed. Despite this therapy the patient experienced a rapid deterioration, with severe abdominal pain and bloody stool (>10 times/day). Further evaluation revealed deep ulceration and erosion throughout the large intestine, which



FIGURE 2. Colonoscopic findings. Three months after treatment with AM the ulcers had disappeared and ulcer scars were observed in the transverse colon (a) and the sigmoid colon (b). One year after the treatment with AM the mucosa of the transverse colon (c) and sigmoid colon (d) remained in remission without steroid therapy.

Supported in part by a Translational Research grant (09156271) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.22891

Published online 31 January 2012.

gave an Ulcerative Colitis Disease Activity Index (UCDAI) score of 12. Higher doses of PSL and AZA in combination with leukocytapheresis failed to induce remission (UCDAI score: 7). Addition of immunosuppressants or biologics was deemed unfeasible due to the patient's age, impaired glucose tolerance, and old tuberculosis, as well as the significant risk of concomitant infectious disease. After ruling out the presence of ischemic heart disease, cerebrovascular disorder, or other cardiovascular or malignant disease, adrenomedullin (AM; 1.5 pmol/kg/min) was intravenously administered for 8 hours per day for 12 days. A few days after starting the AM treatment the patient's abdominal pain and bloody stool appeared to go into remission. No adverse events were observed apart from a slight decline in blood pressure. Endoscopy at 2 weeks revealed significant mucosal regeneration (Fig. 1) and spider web-like scarring in some ulcers (Fig. 2), and the patient's UCDAI score had declined to 2. After 3 months, all of the patient's colonic lesions had healed with scarring and her UCDAI score had reached 0, so the PSL was discontinued.

AM was first identified as a biologically active peptide with potent vaso-dilating action,<sup>1</sup> but is now known to exert a wide range of physiological effects, including cardiovascular protection,<sup>2</sup> neovascularization, and suppression of inflammation and apoptosis. We previously reported that AM therapy was effective in an animal colitis model,<sup>3</sup> and that AM's mechanism of action is likely attributable to its suppression of inflammatory cytokines and activation of regulatory cytokines in intestinal intraepithelial lymphocytes, as well as to its protection of intercellular junctions and its antibacterial activity.<sup>4</sup> In addition, AM reportedly suppresses cytokine production in trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis,<sup>5</sup> and exerts beneficial effects on microvascular function<sup>6</sup> and the reepithelialization<sup>7</sup> of ulcers in an experimental model of colitis.

Although AM has potent hypotensive activity, we observed only minor hemodynamic effects after administering a dose of 1.5 pmol/kg/min, which we

considered safe based on human dose-response data in our possession.

Conventional treatment of active UC focuses on steroids, immunosuppressants, and biologics, but the use of these drugs is restricted in geriatric and immunocompromised patients.<sup>8</sup> AM, on the other hand, is a physiological peptide and is therefore anticipated to have excellent safety. Here we present the first reported case in which AM was used to treat a patient with intractable UC. AM treatment produced mucosal regeneration accompanied by marked neovascularization and vasodilation visible on endoscopic examination. These findings are suggestive of AM's potential to be a ground-breaking modality with a novel mechanism of action that differs from existing immunomodulation therapy.

**Shinya Ashizuka, MD, PhD**

**Toshihiro Kita, MD, PhD**

**Haruhiko Inatsu, MD**

**Kazuo Kitamura, MD, PhD**

Division of Circulation and  
Body Fluid Regulation  
Faculty of Medicine  
University of Miyazaki  
Miyazaki, Japan

#### REFERENCES

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192:553-560.
2. Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, et al. The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;56:413-419.
3. Ashizuka S, Ishikawa N, Kato J, et al. Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats. *Peptides*. 2005;26:2610-2615.
4. Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, et al. Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium. *Microbiol Immunol*. 2009;53:573-581.
5. Gonzales-Rey E, Fernandez-Martin A, Chomy A, et al. Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut*. 2006;55:824-832.
6. Talero E, Alvarez de Sotomayor M, Sanchez-Fidalgo S, et al. Vascular contribution of adrenomedullin to microcirculatory improvement in experimental colitis. *Eur J Pharmacol*. 2011;30:601-607.
7. Hayashi Y, Narumi K, Tsuji S, et al. Impact of adrenomedullin on dextran sulfate sodium-induced inflammatory colitis in mice: insights from in vitro and

in vivo experimental studies. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26:1453-1462.

8. Burger D, Travis S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1827-1837.

## Potential Oncogenic Properties of Mobilized Stem Cells in a Subpopulation of Inflammatory Bowel Disease Patients Infected with *Helicobacter pylori*

**To the Editor:**

Marlicz et al<sup>1</sup> concluded that Crohn's disease (CD) triggers the mobilization of various types of stem cells, such as hematopoietic stem progenitor cells, into peripheral blood in patients suffering from this disease, while the significance and precise role of these mobilized cells in repair of damaged intestine requires further study. However, the authors did not discuss the possibility of potential oncogenic properties of the mobilized stem cells, at least in the subgroup of patients possibly infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

In this regard, although relative data indicate an absence or inverse association between *H. pylori* and inflammatory bowel disease (IBD), the prevalence of *H. pylori* infection in the IBD patients appears to be 38.2%-47% in Europe.<sup>2</sup> Moreover, enterohepatic and gastric *Helicobacter* species have been documented in fecal specimens from children with CD using polymerase chain reaction (PCR), and *H. pylori*, for example, was recently found in the intestinal mucosa of a patient affected by CD.<sup>3</sup>

Experimental data indicate that *H. pylori* infection leads to development of chronic inflammation, hyperplasia, metaplasia, dysplasia, and recruitment

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.22911

Published online 16 February 2012.

www.ibdjournal.org | E27





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Big angiotensin-25: A novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine



Sayaka Nagata<sup>a</sup>, Kinta Hatakeyama<sup>b</sup>, Maki Asami<sup>a</sup>, Mariko Tokashiki<sup>a</sup>, Hajime Hibino<sup>c</sup>, Yuji Nishiuchi<sup>c,d</sup>, Kenji Kuwasako<sup>e</sup>, Johji Kato<sup>e</sup>, Yujiro Asada<sup>b</sup>, Kazuo Kitamura<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Circulatory and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan*

<sup>b</sup> *Pathology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan*

<sup>c</sup> *SAITO Research Center, Peptide Institute, Inc., Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan*

<sup>d</sup> *Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan*

<sup>e</sup> *Frontier Science Research Center, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 October 2013

Available online 5 November 2013

#### Keywords:

Bigangiotensin-25

Renin–angiotensin system

Glycosyl chain

Angiotensinogen

### ABSTRACT

The renin–angiotensin system (RAS), including angiotensin II (Ang II), plays an important role in the regulation of blood pressure and body fluid balance. Consequently, the RAS has emerged as a key target for treatment of kidney and cardiovascular disease. In a search for bioactive peptides using an antibody against the N-terminal portion of Ang II, we identified and characterized a novel angiotensin-related peptide from human urine as a major molecular form. We named the peptide Big angiotensin-25 (Bang-25) because it consists of 25 amino acids with a glycosyl chain and added cysteine. Bang-25 is rapidly cleaved by chymase to Ang II, but is resistant to cleavage by renin. The peptide is abundant in human urine and is present in a wide range of organs and tissues. In particular, immunostaining of Bang-25 in the kidney is specifically localized to podocytes. Although the physiological function of Bang-25 remains uncertain, our findings suggest it is processed from angiotensinogen and may represent an alternative, renin-independent path for Ang II synthesis in tissue.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

### 1. Introduction

The renin–angiotensin system (RAS) plays key roles in the regulation of blood pressure and electrolyte and body fluid dynamics. According to the classical concept, the systemic RAS consists of renin, angiotensinogen (Aogen), angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin (Ang) I, Ang II, and the Ang II type 1 and 2 receptors. Upon activation of the systemic RAS, renin is secreted from the juxtaglomerular apparatus in the kidneys into the circulation, where it acts on Aogen secreted from the liver to produce Ang I, which is in turn converted to Ang II by ACE [1,2]. Ang II then binds to Ang II type 1 and 2 receptors to exert its biological effects. In addition, it is now recognized that a wide variety of tissues and organs, including the heart, vasculature, kidney and nervous system, among others, produce Ang II, which then acts in an autocrine/paracrine fashion independently of the systemic RAS [3,4]. Within the heart, for example, local Ang II appears to contribute to both the maintenance of myocardial homeostasis and to adaptive responses induced by cardiac stress, such as those caused by prolonged hypertension. Ele-

vated levels of cardiac Ang II activity are also associated with diseases of the heart and vasculature, including cardiac hypertrophy, coronary artery disease and myocardial infarction. Similarly, excess local Ang II in the kidney is associated with glomerular sclerosis, diabetic nephropathy and renal arterial stenosis.

Over the past 20 years, novel components of the RAS, including the (pro)renin receptor, ACE2, Ang (1–7), Ang III and Ang IV, as well as their receptors, have been identified and studied [5–8]. To examine the biosynthesis of Ang II within tissue, we developed a radioimmunoassay (RIA) that recognizes the N-terminal sequence of Ang II. Then using that assay, we isolated and characterized proangiotensin-12 (proang-12), as a major molecular form in rat small intestine [9]. Proang-12 is an angiotensin-related peptide with the same amino acid sequence as Ang I plus two additional amino acids. When measuring tissue levels of proang-12 and Ang II in rats treated with RAS inhibitors or fed a low-salt diet, we found that the tissue levels of proang-12 and Ang II did not correspond to the circulating RAS activity. Instead, Proang-12 appears to be an important intermediate involved in the regulation of rat tissue Ang II [10,11].

Up to now similar angiotensin-related peptides had never been reported in humans. In the present study, however, we describe an angiotensin-related peptide isolated from human urine and assess the potential function of the novel peptide.

\* Corresponding author. Address: Circulatory and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan. Fax: +81 985 85 6596.

E-mail address: [kazuokit@med.miyazaki-u.ac.jp](mailto:kazuokit@med.miyazaki-u.ac.jp) (K. Kitamura).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

Urine samples were collected from healthy volunteers. Tissue samples were obtained from the Miyazaki University Hospital. Written informed consent was obtained from all patients, and the study protocol was approved by the institutional review board (No. 817).

### 2.2. Peptides and enzymes

Ang I and II were purchased from Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan) and Ang II + Cys was synthesized by Bex Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Renin and chymase substrate were synthesized by Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan). Aogen was purchased from Calbiochem. Renin and mast cell chymase were purchased from AnaSpec, Inc. (Fremont, CA, USA) and Elastin Products Company, Inc. (Owensville, MO, USA), respectively.

### 2.3. Radioimmunoassay for the N-terminal portion of Ang II

The radioimmunoassay (RIA) for the N-terminal portion of Ang II was performed using the method described previously [9]. The standard buffer was 50 mM sodium phosphate (pH 7.4) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.5% Triton X-100, 80 mM NaCl, 25 mM EDTA-2Na, 0.05% NaN<sub>3</sub> and 500 KIU/ml of aprotinin. The RIA incubation mixture was composed of 100  $\mu$ l of standard Ang II or the sample to be determined, 50  $\mu$ l of antiserum against the N-terminal of Ang II at a dilution of 1:5000, and 50  $\mu$ l of <sup>125</sup>I-labeled ligand (18,000 cpm). After incubation for 24 h, the reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l of 1%  $\gamma$ -globulin and 200  $\mu$ l of 23% polyethyleneglycol (#6000) in the standard buffer. After vigorous shaking, the mixture was incubated at 4 °C for 15 min and centrifuged at 2000 $\times$ g for 30 min. The radioactivity in the resultant pellet was measured in a gamma counter (Aloka ARC-600, Tokyo). All assay procedures were performed in duplicate at 4 °C, as with the RIA for the C-terminal region of adrenomedullin [12]. This RIA cross-reacted with Ang I and Ang III at levels of 50% and 12.5%, respectively, but did not cross-react with Ang IV or Ang (1–7).

### 2.4. Purification procedure

After collecting 5.5 L of urine from three healthy subjects, the urine was applied to a Sep-Pak C18 cartridge (35 ml, Waters) and eluted with 60% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. The eluted sample was lyophilized, dissolved in 10 mM NH<sub>4</sub>COOH (pH 4.0), and then applied to a CM 52 column (2.5  $\times$  75 cm). After washing the column with 10 mM NH<sub>4</sub>COOH (pH 4.0), the fraction containing immunoreactivity was eluted with 100 mM NH<sub>4</sub>COOH (pH 4.0). The eluate was concentrated and subjected to gel filtration on a Sephadex G-50 column (3.0  $\times$  150 cm), after which the fraction showing immunoreactivity was subjected to reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a diphenyl column (0.46  $\times$  25 cm, Grace Vydac Inc., Deerfield, IL, USA). The fraction with immunoreactivity was then further purified on an affinity column (Affi-Gel 10 Active Ester Agarose; Bio Rad, Tokyo, Japan), which had been prepared with anti-Ang II N-terminal antiserum. Finally, the purified peptide was subjected to RP-HPLC using an ODS-120A column (0.46  $\times$  15 cm, Tosho, Tokyo, Japan). During these purification steps, levels of immunoreactive Ang II N-terminal were monitored using RIA described previously [9].

### 2.5. Structural determination

To determine the amino acid sequence and molecular weight of the purified peptide, a tandem mass spectrometric analysis was performed using a positive electrospray ionization with a QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System (AB SCIEX, USA), and the amino acid sequence was determined using a Procise 494 HT Protein Sequencing System (Applied Biosystems, USA). For mass spectroscopy, the sample was dissolved in a solution of 50% acetonitrile in 0.1% formic acid. To characterize the glycosyl chain, the conditions used for the enzymatic release, fluorescent labeling, separation and structural identification of N-glycan were the same as reported previously [13,14]. Briefly, the delipidated extract was subjected to proteolysis catalyzed by pepsin plus glycoamidase A, and the resultant peptides were further digested to amino acids using pronase. After purification on a Bio-Gel P-2 column, the reducing ends of the released N-glycans were labeled with fluorescent 2-aminopyridine, and any excess reagents were then removed by Sephadex G-15 chromatography. The pyrimidylamino (PA)-glycans were then separated based on charge on a TSK-gel diethylaminoethyl (DEAE)-5PW column (Tosoh, Tokyo, Japan), after which each separated fraction was applied to a Shim-pack HRC octadecyl silica (ODS) column (Shimadzu, Kyoto, Japan) for separation based on hydrophobicity, and the elution time of each peak was expressed as a glucose unit (GU) value. The molecular mass of each PA-glycan fraction was then analyzed using Maldi time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Fractions containing two types of glycan were further subfractionated based on molecular size using a TSK-gel Amide-80 column (Tosoh), and the elution positions were calibrated in GU values. Sample PA-glycans were mapped on the basis of their GU and molecular mass values, and their coordinates were compared with those of reference PA-glycans in the GALAXY database.

### 2.6. Renin and chymase kinetics

Human Bang-25 and NonG-Bang-25 were synthesized by Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan). Renin substrates (Bang-25, NonG-Bang-25, Aogen) at a concentration of 1–200  $\mu$ M were incubated with 25 ng of recombinant human renin for 0, 30 or 60 min at 37 °C in 0.5 M PBS buffer (pH 7.4) containing 0.02% BSA. The reaction was stopped by addition of 4 volumes of acetic acid and boiling for 5 min. Ang I was then quantified using the previously described RIA for Ang I [9].

Chymase substrates (Bang-25, NonG-Bang-25, Aogen) at a concentration of 1–200  $\mu$ M were incubated with 10.85 mU of mast cell chymase for 0, 30 or 60 min at 25 °C in 0.6 M Tris-HCl + 3 M NaCl (pH 8.0). The reaction was stopped by addition of 4 volumes of HPLC Buffer A (10% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% trifluoroacetic acid) and boiling for 5 min. Ang II was quantified using the aforementioned RIA for Ang II [9].

### 2.7. Immunohistochemical staining of human Bang-25

Human Bang-25 was detected using antiserum raised in rabbit against the C-terminal portion of the peptide. Thereafter, the polyclonal antibody was affinity purified by Scrum Inc. (Tokyo, Japan) using Bang-25-(18–25) as the antigen. For subsequent immunohistochemical staining, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were cut into 4- $\mu$ m-thick sections and labeled using the anti-Bang-25 antibody (100 $\times$  dilution in PBS). As a negative control, the antibody was replaced with non-immune rabbit serum (Dako Japan, Inc.). Then after blocking endogenous peroxidase activity using hydrogen peroxide, the sections were incubated with an EnVision+/HRP System (Dako Japan, Inc.), and the staining was developed using 3,3'-diaminobenzidine. Finally the sections were counterstained with Meyer's hematoxylin.

### 2.8. Statistical analysis

Values are presented as means  $\pm$  S.E. Comparisons of enzyme kinetics data were made using analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

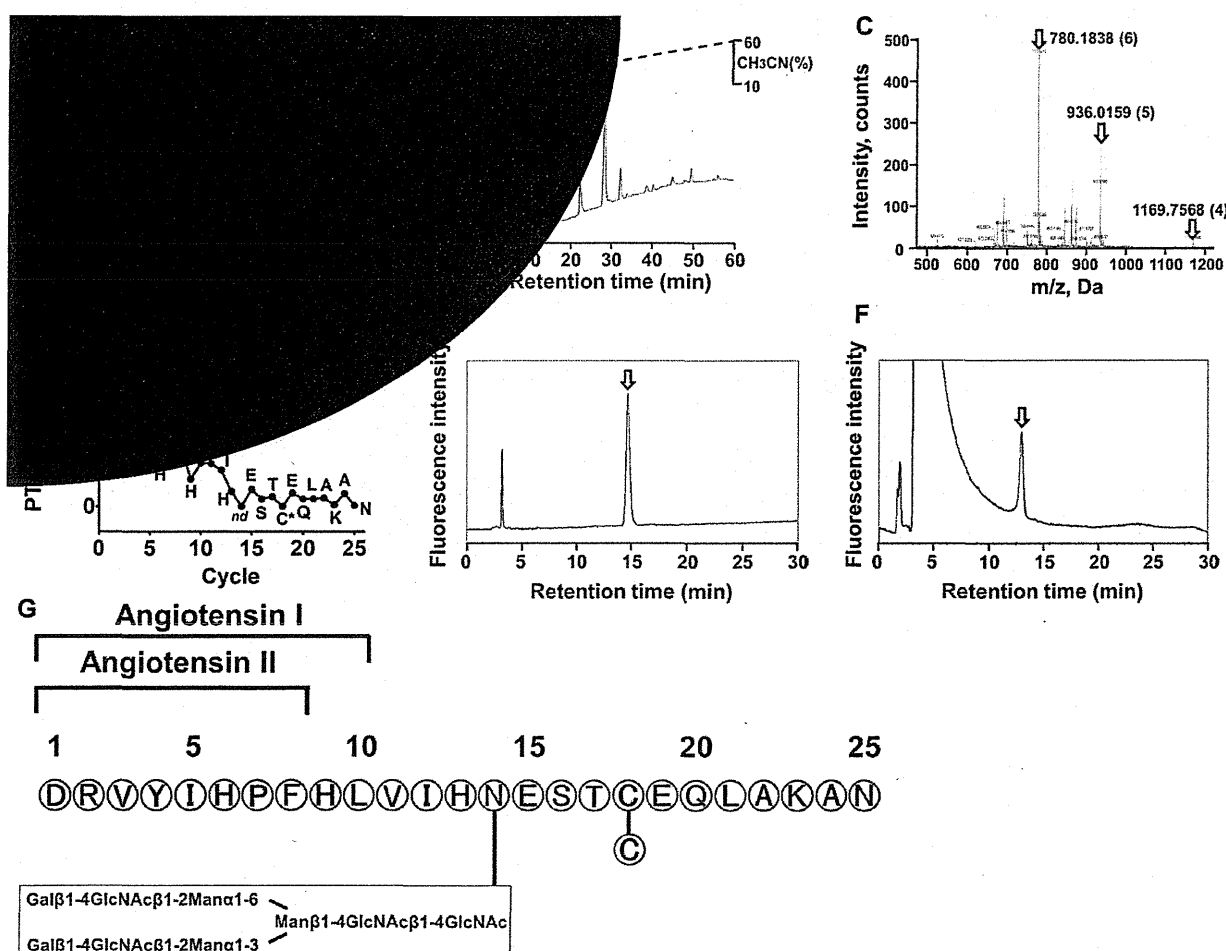
### 3. Results and discussion

When we screened human urine gel filtration fractions for peptides using an antibody raised against the N-terminal portion of Ang II, we found a highly immunoreactive peptide with an apparent molecular weight of about 5000 (Fig. 1A). Notably, this peptide was present at concentrations estimated to be more than 100 times higher than those of Ang I and Ang II.

We next purified this peptide from 5.5 L of human urine using ion-exchange, gel-filtration and affinity chromatography steps, and then finally RP-HPLC, which yielded a single peak (Fig. 1B). With this protocol we obtained 200 pmol of purified peptide from the 5.5 L of urine. When the sample of purified peptide was subjected to mass spectrometry, we found a hexahydric charged ion with  $m/z = 780.18$ , a pentaivalent ion with  $m/z = 936.02$ , and a

quadrivalent ion with  $m/z = 1169.76$  (Fig. 1C), which collectively indicate the molecular weight of the purified peptide to be 4675.1. The amino-acid sequence of the peptide was then determined to be DRVYIHPFHLVIHX<sup>1</sup>ESTX<sup>2</sup>EQLAKAN (X, not identified), and from the known amino acid sequence of Aogen [15], X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> were identified as Asn and Cys, respectively (Fig. 1D). In addition, because we found a MS/MS peak for a glycosyl chain, the purified peptide was digested with N-glycosidase and again subjected to mass spectrometry. Under these conditions, the pentaivalent ion had a  $m/z = 611.71$  and the quadrivalent ion had a  $m/z = 764.39$  (data not shown), which indicates the molecular weight of the deglycosylated peptide to be 3053.6 and confirms that X<sup>2</sup> is Cys.

Structural analysis of the glycosyl chain was delegated to GLY-ENCE Co., Ltd. After using diethylaminoethyl (DEAE) and ODS column chromatography to purify the glycosyl to a single peak (Fig. 1E), the resultant ODS fraction was subjected to MALDI-TOF-MS glycoanalysis using the three MS axes and the chromatography database (GALAXY) [14,16]. The results showed the peptide in this fraction to have a molecular mass of 1720 Da and to give rise to an oligosaccharide of 9.8 (ODS) and 6.9 (DEAE) GU, which corresponds to reference PA-glycan code No. 200.4 in



**Fig. 1.** (A) Immunoreactive Ang II N-terminal in human urine. Extract of human urine was subjected gel filtration (Sephadex G50), and the immunoreactive Ang II N-terminal in each fraction was assayed using a specific RIA: closed circles, immunoreactive Ang II N-terminal (fmol/tube); open circles, absorbance at 280 nm (mg/ml). The arrow indicates the highly immunoreactive Ang II N-terminal fraction. (B) Final purification by RP-HPLC. An elution gradient of 10–60% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% trifluoroacetic acid was run for over 60 min at a flow rate of 1 ml/min. (C) Determination of the molecular weight of the purified peptide based on quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometry. (D) Amino acid sequence analysis using a protein sequencer; 25 amino acid residues were detected. (E) Primary structural analysis of the glycosyl chain. A single peak was detected. (F) Secondary structural analysis of the glycosyl chain. Both the candidate (arrow) and GALAXY glycosyl chains were run on an ODS column. (G) Structure of human Bang-25 isolated from urine. GlcNAc: N-acetylglucosamine, Gal: galactose, Man: mannose.

the GALAXY database. The identity of this sample was then confirmed using co-chromatography (Fig. 1F) and MALDI-TOF-MS analyses, which showed the glycosyl chain to be a complex sugar chain consisting of nine sugars, which is often found with N-linked glycosylation. The complete structure of the molecule is shown in Fig. 1G. We are calling this novel peptide Big angiotensin-25 (Bang-25), because it consists of a 25-amino acid peptide that is N-glycosylated on Asn14 and has a cysteine linked to Cys18. Human Aogen contains four putative asparagine-linked glycosylation sites (Asn14, 137, 271, 295) and contains four cysteines (Cys18, 138, 232, 308) [15,17–19], with Cys18 and Cys138 linked by a disulfide bridge. From its structure it appears clear that Bang-25 is a derivative of Aogen.

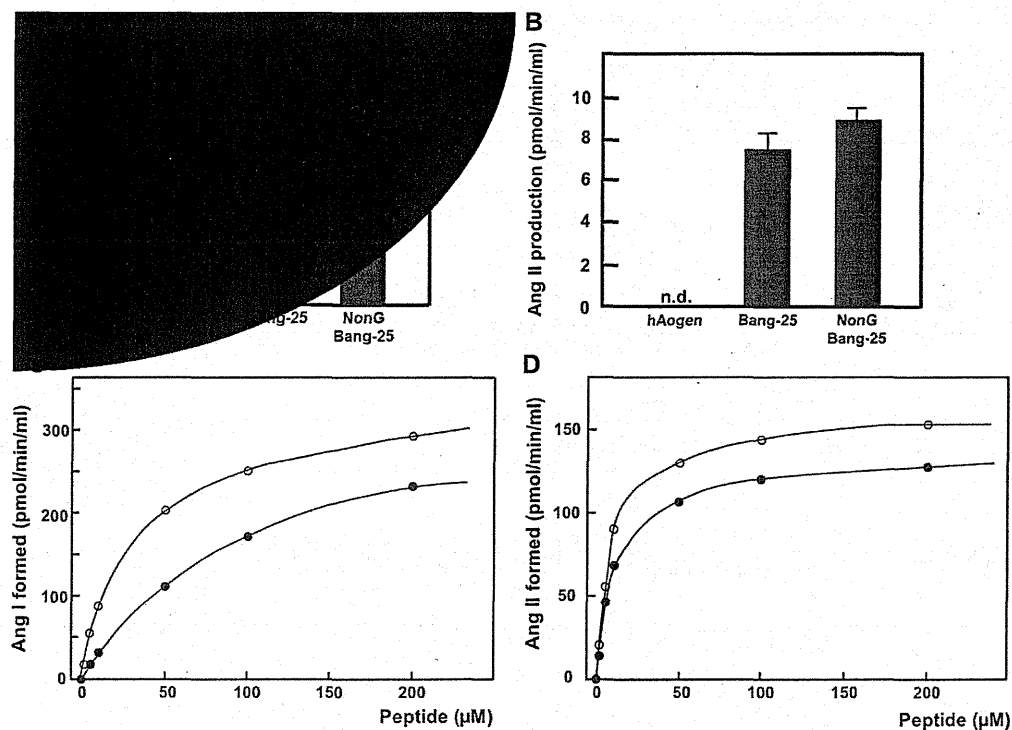
Knowing the structure, we synthesized Bang-25 using a combination of solid phase and liquid phase techniques, which will be described elsewhere. The synthetic peptide was confirmed by amino acid analysis, MALDI-TOF-MS analysis and RP-HPLC. With the RP-HPLC, for example, native and synthetic Bang-25 emerged at the exact same elution position.

Using the synthetic peptide, we found that renin processed Bang-25 into Ang I, but the rate was slow (Fig. 2A and C). By contrast, chymase rapidly digested Bang-25 to produce Ang II (Fig. 2B and D). When we compared Aogen, Bang-25 and nonglycosylated Bang-25 (NonG-Bang-25), each at a concentration of 1  $\mu\text{M}$ , as substrates for renin and chymase ( $n = 6$  for each reaction), we found that renin rapidly produced Ang I from Aogen, but production of Ang I from Bang-25 was much slower (Fig. 2A). Consistent with that result, the  $K_m$  for Aogen was estimated to be 1.2  $\mu\text{M}$ , which is comparable to the value reported previously [17,19], while the  $K_m$  and  $V_{max}$  for Bang-25 were 95  $\mu\text{M}$  and 340 pmol/min/ml (Fig. 2C). In addition, the  $K_m$  and  $V_{max}$  for NonG-Bang-25 were

24  $\mu\text{M}$  and 307 pmol/min/ml (Fig. 2C). It therefore seems doubtful that Bang-25 functions as a substrate for renin in vivo. Moreover, renin catalyzed significantly greater production of Ang I from NonG-Bang-25 than from Bang-25, indicating the glycosyl chain protects the peptide from renin (Fig. 2A and C). This is consistent with the earlier observation that N-linked glycosylation on Asn14 is an important inhibitor of binding to renin. Still, renin does not cleave NonG-Bang-25 as efficiently as it cleaves Aogen. Given that the Aogen N-terminus is linked to the rest of the molecule by a disulfide bridge between Cys-18 and Cys-138, which plays a key role in the peptide's binding to renin [19] and is absent from Bang-25, it is not surprising that Bang-25 is cleaved less efficiently by renin than is Aogen, with or without glycosylation.

Chymase, by contrast, does not act on human Aogen (Fig. 2B) [20], but it efficiently digests both Bang-25 and NonG-Bang-25 (Fig. 2B and D). The  $K_m$  and  $V_{max}$  were 9.6  $\mu\text{M}$  and 129 pmol/min/ml for Bang-25 and 7.5  $\mu\text{M}$  and 155 pmol/min/ml for NonG-Bang-25 (Fig. 2D). And although production of Ang II from NonG-Bang-25 tended to be greater than from Bang-25, the difference was not statistically significant in the present experiment (Fig. 2D). This suggests Bang-25 functions as a substrate for chymase, which is consistent with our finding that the tissue Ang II concentration was much higher than the Ang I concentration.

We then assessed the distribution of Bang-25 in tissues by immunostaining with an antiserum raised against the C-terminal portion of the peptide. We found that Bang-25 was abundantly expressed in a number of human tissues, including kidney (Fig. 3G and H), heart (Fig. 3C), adrenal gland (Fig. 3A), pancreas (Fig. 3B) and placenta (Fig. 3D–F), among others (Table 1). For practical reasons, we used the placenta as an exemplar for further study. There we found Bang-25 to be localized to extravillous trophoblasts. The



**Fig. 2.** (A) Velocity of renin-catalyzed Ang I formation at a substrate concentration of 1  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ). The results are shown as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. NonG-Bang-25 and  $P < 0.01$  vs. hAogen. \*\* $P < 0.01$  vs. hAogen. (B) Velocity of chymase-catalyzed Ang II formation at a substrate concentration of 1  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ). The results are shown as means  $\pm$  SEM. (C) Michaelis-Menten plots for the renin-catalyzed release of Ang I from Bang-25 (closed circles) and NonG-Bang-25 (open circles) ( $n = 2-6$ ). The  $K_m$  and  $V_{max}$  were 95  $\mu\text{M}$  and 340 pmol/min/ml for Bang-25 and 24  $\mu\text{M}$  and 307 pmol/min/ml for NonG-Bang-25. (D) Michaelis-Menten plots for the chymase-catalyzed release of Ang II from Bang-25 (closed circles) and NonG-Bang-25 (open circles) ( $n = 2-6$ ). The  $K_m$  and  $V_{max}$  were 9.6  $\mu\text{M}$  and 129 pmol/min/ml for Bang-25 and 7.5  $\mu\text{M}$  and 155 pmol/min/ml for NonG-Bang-25.