

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390006

研究課題名（和文） 胆汁酸と脂質・糖ホメオスタシスとの関連精査による
新たな代謝性疾患治療法の開発研究課題名（英文） Development of a new therapeutic treatment for metabolic diseases
based on the solution of the relationship between bile acids and
homeostasis of lipids and sugars

研究代表者

眞野 成康 (MANO NARIYASU)

東北大学・病院・教授

研究者番号：50323035

研究成果の概要（和文）：

胆汁酸刺激培養細胞中のプロテオームを解析し、 α -enolase や peroxiredoxin-1 の翻訳後修飾に変動が見られることが判明した。肝細胞中の胆汁酸結合タンパク質を調べたところ、peroxiredoxin-1 の他に、細胞内キャリアタンパク質や胆汁酸代謝に関与する酵素等が抽出された。 ^{18}O 一置換標識法を構築し、プロテオーム変動解析に応用可能であることが判明した。抱合型胆汁酸のメタボローム解析法を構築したところ、フォーカシングメタボロミクスにより、疾患特異的な代謝物を見出すことが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed proteome in cultured cells after bile acid stimulation, and found quantitative variation for posttranslational modifications of α -enolase and peroxiredoxin-1. By cleavable affinity gel extraction, we found intracellular carrier proteins and some enzymes for bile acid metabolism besides peroxiredoxin-1 as bile acid binding proteins in hepatocytes. We developed a method for one ^{18}O -atom labeling at C-terminal of tryptic digested peptides, which allowed application to quantitative proteomics. The method for comprehensive analysis of bile acid conjugates developed in this study was useful for finding specific metabolites in some diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、メタボロミクス、抱合型胆汁酸、プロテオミクス、翻訳後修飾、質量分析、胆汁酸結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は、肝においてコレステロールより生合成され、胆嚢に貯蔵されている。食物摂

取後、胆汁の主成分として十二指腸に到達し、脂溶性栄養素の吸収を促進した後、門脈を経由して肝に戻る。このとき、肝や腸におけるレベルとともに体循環中の胆汁酸レベルも

増大する。このように、体循環中の胆汁酸レベルは食物摂取と連動して日内変動しており、これが末梢組織に様々な形で情報を提供している。これまでに胆汁酸シグナルに関する多くの報告があるが、特に核内レセプター FXR や膜胆汁酸レセプター TGR5 を含む GPCR との結合に起因するシグナルが、上記の生活習慣病と密接に関わることが最近明らかにされつつある。

こうした観点から、生活習慣病の様々な病態と胆汁酸シグナルとの関連精査には、各種胆汁酸のメタボロミクスと、胆汁酸結合タンパク質や刺激変動タンパク質のプロテオミクスを組み合わせて、そのシグナル伝達メカニズムを明らかにすることが極めて重要となる。研究代表者らは、これまでに cleavable affinity gel を用いる新しい小分子結合タンパク質解析法を構築している。一方で、二次元ゲル電気泳動法を用いるディフレンシャルディスプレイにより、胆汁酸刺激変動タンパク質の解析に成功している。また、胆汁酸には多岐にわたる構造類似体が存在するが、申請者らは、これまでに胆汁酸およびその抱合代謝物を対象とした多くの高感度分析法を開発している。こうした研究成果を基盤とし、本研究では、(1) 胆汁酸刺激により変動するタンパク質の翻訳後修飾部位の解析、(2) 胆汁酸固定化 cleavable affinity gel を用いた結合タンパク質の解析、(3) 胆汁酸類のメタボロミクス手法の構築と生活習慣病患者試料への応用、(4) 胆汁酸刺激により変動するタンパク質群の定量的解析を並行して推進する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肥満や2型糖尿病、高グリセリド血症やアテローム性動脈硬化症などの様々な代謝性疾患における胆汁酸シグナルの関与について解析し、このような生活習慣病における脂質代謝、糖代謝の恒常性に対する胆汁酸の作用とそのメカニズムを明らかにすることである。

胆汁酸刺激により変動するタンパク質につき、その変動を量的及び質的な両面から捉えて解析する手法を構築する。これにより、胆汁酸シグナルの細胞に与える影響を包括的に解析し、その伝達経路を含めて変動のメカニズムを明らかにする。一方、生活習慣病の各種病態時における血液中及び尿中の胆汁酸類の包括的解析により、シグナルのトリガーとなる胆汁酸の組成変化・量的変化を含めた変動の本質を明らかにする。また、胆汁酸結合タンパク質を一挙に解析することにより、これまで明らかにされている TGR5 や FXR 以外の、胆汁酸をリガンドとする受容体

の存在についても調査する。

本研究の成果により、核内レセプター FXR や膜胆汁酸レセプター TGR5 を中心とした胆汁酸の各種受容体への結合をトリガーとするシグナル伝達と、脂質代謝、糖代謝、エネルギーのホメオスタシスとの関連を精査し、各種生活習慣病の新たな治療法の創生を目指す。

3. 研究の方法

(1) 胆汁酸刺激変動タンパク質の解析

HeLa S3 細胞にデオキシコール酸を添加し、0.5、1、2、4、および 8 時間後に細胞を回収して可溶性画分を取り出した。各試料中のタンパク質を二次元ゲル電気泳動法により分離し、CBB 染色して変動スポットを解析した。次いで、翻訳後修飾の変化と考えられる変動スポット (α -enolase, peroxiredoxin-1) 中のタンパク質につき、ゲル内消化し、質量分析法により同定を試みた。

(2) 胆汁酸固定化 cleavable affinity gel を用いた結合タンパク質の解析

ケノデオキシコール酸を固定化したアフィニティーゲルを調製し、Hep G2 細胞およびラット肝可溶性画分と混合して結合タンパク質を捕捉した。ゲルを洗浄後、ジチオスレイトールを用いてリンカーを選択的に切断し、上清に回収されたタンパク質群を質量分析法により解析した。

(3) 胆汁酸のメタボロミクス手法の構築

各種抱合型胆汁酸標品を用いて、低エネルギー CID による開裂パターンを調べた。次いで、抱合形式に特徴的な開裂を用いて、プリカーサーイオンスキャン、ニュートラルロススキャンにより、フォーカシング条件を検討した。さらに各抱合体の分離条件を精査した後、コレステロール代謝に異常を来す遺伝性疾患の新生児尿を分析し、本法の有用性を検証した。

(4) プロテオーム変動の定量的解析法の構築

牛血清アルブミンを用いて、 ^{18}O 標識水中のトリプシン消化によるラベル化反応条件を精査した。次に、 ^{18}O 一置換標識体と非標識体の混合試料を調製し、本法の直線性を調べた。さらに、健常人血清に対して疑似バイオマーカーとして鶏由来のリゾチームを添加した試料を用いて、本法と iTRAQ 法を比較した。

4. 研究成果

HeLa S3 細胞にデオキシコール酸（終濃度：50 μ M）を添加した後、 α -enolase の翻訳後修飾タンパク質を詳細に解析すると、刺激後 1 時間でスポットの塩基性側へのシフトが認められ、8 時間後にはほぼコントロールと同じパターンに戻る事が判った。また、peroxiredoxin-1 においてもほぼ同様の変化が認められ、刺激 1 時間後には最も酸性側のスポットの染色強度は極めて薄くなったものの、8 時間後にはほぼコントロールの状態に戻った。このことから、これらの変動は刺激により一過性に起こるものの、細胞内にその修復機構が存在することが示唆された。次に、各スポットに含まれるタンパク質を詳細に解析したところ、 α -enolase のスポットには、Rab GDP dissociation inhibitor beta、elongation factor 1-gamma 等の他のタンパク質も含まれていることが明らかとなった。

次に、ケノデオキシコール酸固定化 cleavable affinity gel を用いて、Hep G2 細胞やラット肝組織中の結合タンパク質の抽出を試みた。その結果、Hep G2 細胞から peroxiredoxin-1 の他、tubulin- α , β 、elongation factor 1、Importin-1,7、exportin-2、dihydrodiol dehydrogenase 等が、またラット肝可溶性画分から peroxiredoxin-1、3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、glutathione transferase、bile salt sulfotransferase、elongation factor-1 等が選択的に抽出された。特に、peroxiredoxin-1 は極めて効率よく濃縮されたことから、本タンパク質がケノデオキシコール酸と強く結合する可能性が示唆された。しかも、本タンパク質は、先述のようにデオキシコール酸刺激によって変動することも確認されており、両者の結果を考え併せると極めて興味深い。

これまでの検討から、培養細胞を用いる *in vitro* のデータと組織等を用いる *in vivo* のデータに乖離があることが判明している。そこで、細胞を 3 次元的に培養し、通常の培養の場合とプロテオームを比較することとした。HepG2 細胞を用いて検討したところ、可溶性画分中の一部のタンパク質の存在量が全く異なることが判明した。特に、acyl-CoA binding protein や triosephosphate isomerase、cofilin-1 などの乖離が大きく、現在その理由を調査している。一方、より多種類のタンパク質を一斉に解析することを目的に nanoLC 分離の 2 次元化を試みた。強カチオン交換カラムを用いて分離したフラクションをオンラインで ODS 系の nanoLC カラムでさらに分離し、それぞれのプロテオームを解析したところ、1 次元分離に比べてより多種類のプロテオームを解析可能なことが判明した。

抱合型胆汁酸の各標品を用いて CID 条件を検討し、それぞれプリカーサーイオンスキャン、ニュートラルロススキャンによるフォ

ーカシング法を検討した。その結果、グリシン、タウリン抱合体はそれぞれ m/z 74、 m/z 124 のプリカーサーイオンスキャンで、硫酸抱合体は m/z 97 のプリカーサーイオンスキャンで、また *N*-アセチルグルコサミン抱合体は質量 203 のニュートラルロススキャンでフォーカシング可能であることが明らかとなった。

次に、各種抱合型胆汁酸のフォーカシングメタボロミクスを試みた。健常人およびコレステロール代謝に異常を来す遺伝性疾患の新生児尿につき比較検討したところ、健常人に比べて患者尿中に多量でかつ多種類の硫酸抱合型胆汁酸類が存在することが判明した。しかも、それぞれのフォーカシングマップの比較から、簡単にマルチ抱合体を特定でき、多くの多重抱合体が見出された。3 β -HSD 欠損症患者尿中には、酵素欠損により蓄積した 3 β -sulfooxy- Δ^5 系の胆汁酸類が多量に存在した。一方、Niemann-Pick 病 type C 患者の場合は、3 β -sulfooxy- Δ^5 系の胆汁酸の 7 β 位が *N*-アセチルグルコサミンで抱合され、かつ側鎖末端がグリシンあるいはタウリンにより抱合された多重抱合型胆汁酸類が高濃度で存在することが明らかとなった。

次いで、モデル試料として牛血清アルブミンを用い、還元アルキル化後、 ^{18}O 標識水中でトリプシンによる酵素消化に付した。反応液の pH、および酵素活性部位における競合剤として用いるモノエタノールアミン濃度の影響を調べたところ、50 mM のモノエタノールアミンを含む pH 11 のリン酸緩衝液中、37 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間インキュベートすると、最も効率よく ^{18}O 一置換反応が進行することが判った。次いで、 ^{18}O 一置換標識体と非標識体の混合試料を nanoLC/ESI-MS/MS 分析に付し、y イオン強度比を解析したところ、100 倍以上の混合モル比の範囲で相関が認められた。

次に、2 名の健常人血清各 1 μ L に対して疑似バイオマーカーとして鶏由来のリゾチームを 10 あるいは 100 pmol 添加した試料につき、血清アルブミン及び IgG を除去後、還元アルキル化し、一方を ^{18}O 標識水中で、他方を非標識水中で酵素消化した。両者を混合した後に nanoLC/ESI-MS/MS 分析し、疑似バイオマーカーの存在比を求めた。同じ試料を iTRAQ 法で分析し、得られた結果を比較したところ、今回開発した ^{18}O 標識法の方がより精度の高い結果が得られることが判明した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 50 件）以下すべて査読有

1. Yuriko Saiki, Yuki Yoshino, Hiroko Fujimura, Tatsuya Manabe, Yuki Kudo,

- Miki Shimada, Nariyasu Mano, Tomohiro Nakano, Yoonha Lee, Shinjiro Shimizu, Shinya Oba, Sho Fujiwara, Hideyuki Shimizu, Na Chen, Zhaleh K Nezhad, Guo Jin, Shinichi Fukushima, Makoto Sunamura, Masaharu Ishida, Fuyuhiko Motoi, Shinichi Egawa, Michiaki Unno, and Akira Horii: DCK is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
2. Hiroaki Yamaguchi, Toshiko Takeuchi, Masahiro Okada, Minako Kobayashi, Michiaki Unno, Takaaki Abe, Junichi Goto, Takanori Hishinuma, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: Screening of antibiotics that interact with organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 using fluorescent probes. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 389-395 (2011).
 3. Nariyasu Mano, Marina Nozawa, Mayumi Sato, Masaru Mori, Hiroaki Yamaguchi, Katsuhiko Kanda, Makoto Nogami, Junichi Goto, and Miki Shimada: Identification and elimination of ion suppression in the quantitative analysis of sirolimus in human blood by LC/ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B*, **879**, 968-974 (2011).
 4. Nariyasu Mano, Mayumi Sato, Marina Nozawa, Yotaro Matsumoto, Masaru Mori, Hiroaki Yamaguchi, Junichi Goto, and Miki Shimada: An accurate quantitative LC/ESI-MS/MS method for sirolimus in human whole blood. *J. Chromatogr. B*, **879**, 987-992 (2011).
 5. Lee R. Hagey, Takashi Iida, Shoujiro Ogawa, Yuuki Adachi, Mizuho Une, Kumiko Mushiake, Masamitsu Maekawa, Miki Shimada, Nariyasu Mano, and Alan F. Hofmann: Biliary bile acids in birds of the Cotingidae family: Taurine-conjugated (24*R*,25*R*)-3 α ,7 α ,24-trihydroxy-5 β -cholestan-27-oic acid and two epimers (25*R* and 25*S*) of 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholestan-27-oic acid. *Steroids*, **76**, 1126-1135 (2011).
 6. Jun Hosogi, Hideyuki Tanaka, Kazuhiro Fujita, Takashi Kuwabara, Shigeo Ikegawa, Norihiro Kobayashi, Nariyasu Mano, and Junichi Goto: LC-MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17 β -estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **878**, 222-227 (2010).
 7. Rika Okihara, Kuniko Mitamura, Maki Hasegawa, Megumi Mori, Akina Muto, Genta Kakiyama, Shoujiro Ogawa, Takashi Iida, Miki Shimada, Nariyasu Mano, and Shigeo Ikegawa: Potential corticoid metabolites: Chemical synthesis of 3- and 21-monosulfates and their double-conjugates of tetrahydrocorticosteroids in the 5 α - and 5 β -series. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 344-353 (2010).
 8. Hiroshi Ohara, Rumiko Saito, Satoshi Hirakawa, Miki Shimada, Nariyasu Mano, Ryuhei Okuyama, and Setsuya Aiba: Gene expression profiling defines the role of ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation. *J. Dermatol. Sci.*, **58**, 143-151 (2010).
 9. Hiroaki Yamaguchi, Misa Sugie, Masahiro Okada, Tsuyoshi Mikkaichi, Takafumi Toyohara, Takaaki Abe, Junichi Goto, Takanori Hishinuma, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: Estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1. *Drug Metabol. Pharmacokinet.*, **25**, 314-317 (2010).
 10. Shoujiro Ogawa, Yuuki Adachi, Genta Kakiyama, Miki Shimada, Nariyasu Mano, Junichi Goto, and Takashi Iida: Chemical synthesis of (22*E*)-3 α ,6 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -chol-22-en-24-oic acid and its *N*-acylamidated conjugates with glycine or taurine: Precursors of the [22,23-³H] labelled tracers. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1103-1106 (2010).
 11. Masaru Mori, Kohei Abe, Hiroaki Yamaguchi, Junichi Goto, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: Production of ¹⁸O-single labeled peptide fragments during trypsin digestion of proteins for quantitative proteomics using nanoLC-ESI-MS/MS. *J. Proteome Res.*, **9**, 3741-3749 (2010).
 12. Lee R. Hagey, Genta Kakiyama, Akina Muto, Takashi Iida, Kumiko Mushiake, Takaaki Goto, Nariyasu Mano, Junichi Goto, Cleida A. Oliveria, and Alan F. Hofmann: A new, major C₂₇ biliary bile acid in the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*): (25*R*)-1 β ,3 α ,7 α -trihydroxy-5 β -cholestan-27-oic acid. *J. Lipid Res.*, **50**, 651-657 (2009).
 13. Genta Kakiyama, Akina Muto, Miki Shimada, Nariyasu Mano, Junichi Goto, Alan F. Hofmann, and Takashi Iida: Chemical synthesis of 3 β -sulfoxy-7 β -hydroxy-24-nor-5-cholenoid acid: an internal standard for mass spectrometric analysis of the abnormal Δ^5 -bile acids occurring in Niemann-Pick

- disease. *Steroids*, **74**, 766-772 (2009).
14. Nariyasu Mano, Sayaka Aoki, Takuma Yamazaki, Yoko Nagaya, Masaru Mori, Kohei Abe, Miki Shimada, Hiroaki Yamaguchi, Takaaki Goto, and Junichi Goto: Analysis of phosphorylated peptides by double pseudo-neutral loss extraction coupled with derivatization using *N*-(4-bromobenzoyl)aminoethanethiol. *Anal. Chem.*, **81**, 9395-9401 (2009).

[学会発表] (計 121 件)

1. 鈴木裕之、工藤由起、相馬真志、菊地正史、木皿重樹、松浦正樹、久道周彦、江川新一、海野倫明、島田美樹、眞野成康：膝がんゲムシタピン療法の PK/PGx, *日本薬学会第132 年会(札幌)*, 2012.3.29-31.
2. 前川正充、森大、鈴木裕之、大野耕策、入戸野博、小川祥二郎、柿山玄太、飯田隆、後藤順一、島田美樹、眞野成康：タンデム質量分析法を活用した抱合型胆汁酸メタボローム解析法の構築, *第24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(大山)*, 2011.8.31-9.2.
3. Masamitsu Maekawa, Masaru Mori, Hiroyuki Suzuki, Takashi Iida, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: LC/ESI-MS/MS method for focusing metabolome of bile acid conjugates. *59th ASMS Conference (Denver, USA)*, 2011.6.5-6.9. (Poster)
4. Nariyasu Mano, Mayumi Sato, and Miki Shimada: LC/ESI-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of sirolimus in human whole blood, *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS 2011) (京都)*, 2011.5.22-5.26 (Invited lecture).
5. 大川星美、鈴木裕之、森大、前川正充、島田美樹、眞野成康：培養細胞中のソラフェニブおよび代謝物定量法の構築, *日本薬学会第131 年会(静岡)*, 2011.3.28-3.31.
6. 工藤由起、田村淳、前川正充、鈴木裕之、森大、島田美樹、眞野成康：HPLC によるゲムシタピンおよび代謝物の血中濃度測定法の構築, *日本薬学会第131 年会(静岡)*, 2011.3.28-3.31.
7. 前川正充、森大、鈴木裕之、坂本修、大浦敏博、虻川大樹、大野耕策、入戸野博、飯田隆、島田美樹、眞野成康：LC/ESI-MS/MS による抱合型胆汁酸のメタボローム解析法の検討, *日本薬学会第131 年会(静岡)*, 2011.3.28-3.31.
8. 前川正充、森大、鈴木裕之、島田美樹、眞野成康：疾患マーカー探索を目指した抱合型胆汁酸のメタボローム解析手法の検討, *第32 回胆汁酸研究会(仙台)*, 2010.11.6.
9. 佐藤真由美、野澤真里奈、森大、山口浩明、神田勝弘、野上真、後藤順一、島田美樹、眞野成康：血中シロリムスの LC/ESI-MS/MS 分析におけるマトリクス効果の排除, *第21 回クロマトグラフィー科学会議(西宮)*, 2010.10.21-10.23.
10. Nariyasu Mano, Kohei Abe, Masaru Mori, Koichi Sato, Hiroaki Yamaguchi, Miki Shimada, Takaaki Goto, and Junichi Goto: Analysis of chenodeoxycholate-binding proteins in rat brain and pituitary by mass spectrometry coupled with cleavable affinity extraction. *XXI International Bile Acid Meeting; Bile Acids as Metabolic Integrators and Therapeutics (Freiburg, Germany)*, 2010.10.7-10.8. (Poster)
11. Masamitsu Maekawa, Yasushi Misawa, Ayako Sotoura, Osamu Sakamoto, Toshihiro Ohura, Daiki Abukawa, Takehiko Inoue, Kousaku Ohno, Akina Muto, Hajime Takei, Hiroshi Nittono, Shoujiro Ogawa, Genta Kakiyama, Takashi Iida, Alan F. Hofmann, Junichi Goto, Miki Shimada, and Nariyasu Mano: Determination of multi-conjugated bile acids in the urine of patients with Niemann-Pick disease, type C by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *XXI International Bile Acid Meeting; Bile Acids as Metabolic Integrators and Therapeutics (Freiburg, Germany)*, 2010.10.7-10.8. (Poster)
12. 三澤靖、外浦亜耶子、後藤順一、島田美樹、眞野成康、前川正充、坂本修、大浦敏博、虻川大樹、井上岳彦、大野耕策、武藤晃奈、武井一、入戸野博、小川祥二郎、柿山玄太、飯田隆、Alan F. Hofmann：LC/ESI-MS/MS による Niemann-Pick 病 C 型患者尿中異常胆汁酸の高感度分析, *第6 回東日本胆汁酸研究会(東京)*, 2010.7.31.
13. 前川正充、三澤靖、外浦亜耶子、坂本修、大浦敏博、虻川大樹、井上岳彦、大野耕策、武藤晃奈、武井一、入戸野博、小川祥二郎、柿山玄太、飯田隆、Alan F. Hofmann、後藤順一、島田美樹、眞野成康：LC/ESI-MS/MS を用いた Niemann-Pick 病 C 型患者尿中の多重抱合型胆汁酸測定法, *第23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(松島)*, 2010.7.21-7.23.
14. 森大、島田美樹、眞野成康：プロテオーム変動解析を目的としたトリプシン酵素反応を活用する ¹⁸O 一置換標識法の性能評価, *第23 回バイオメディカル分析*

- 科学シンポジウム(松島), 2010.7.21-7.23.
15. 前川正充、三澤靖、外浦亜耶子、坂本修、大浦敏博、虻川大樹、井上岳彦、大野耕策、武藤晃奈、武井一、入野野博、小川祥二郎、柿山玄太、飯田隆、Alan F. Hofmann、後藤順一、島田美樹、眞野成康：LC/ESI-MS/MSによるNiemann-Pick病C型患者尿中多重抱合型胆汁酸の高感度分析，第17回クロマトグラフィースンポジウム(広島)，2010.6.3-6.5.
 16. Nariyasu Mano, Takuma Yamazaki, Sayaka Aoki, Masaru Mori, Takaaki Goto, and Miki Shimada: Double pseudo-neutral loss extraction coupled with specific derivatization for analysis of phosphoproteins. 58th ASMS Conference (Salt Lake City), 2010.5.23-5.27. (Poster)
 17. Masaru Mori, Miki Shimada, Nariyasu Mano: Quantitative performance of a novel trypsin-catalyzed ^{18}O -single labeling method for serum proteomics. 58th ASMS Conference (Salt Lake City, USA), 2010.5.23-5.27. (Poster)
 18. 森大、島田美樹、眞野成康： ^{18}O 一置換標識法とnanoLC/ESI-MS/MSによる血清プロテオーム解析法の有用性，日本薬学会第130年会(岡山)，2010.3.28-3.30.
 19. 野澤真里奈、島田美樹、山口浩明、後藤順一、眞野成康：LC/MS/MSを用いる血中シロリムス濃度測定法の改良，第49回日本臨床化学会年次学術集会(長崎)，2009.9.18-9.20.
 20. 森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、島田美樹、眞野成康：プロテオーム変動解析を目的としたトリプシンを用いる ^{18}O 一置換法，第34回日本医用マススペクトル学会(大阪)，2009.9.10-9.11.
 21. 三澤靖、佐藤光市、森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、島田美樹、眞野成康：新規アフィニティー抽出法を用いたラット肝組織中ケノデオキシコール酸結合タンパク質の解析，第34回日本医用マススペクトル学会(大阪)，2009.9.10-9.11.
 22. 森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、島田美樹、眞野成康： ^{18}O 一置換標識法によるプロテオームの量的変動解析に関する検討，第22回バイオメディカル分析科学シンポジウム(各務原)，2009.7.15-7.17.
 23. 三澤靖、外浦亜耶子、阿部幸平、山口浩明、柿山玄太、飯田隆、後藤順一、島田美樹、眞野成康：LC/ESI-MS/MSによる三重抱合型異常胆汁酸の高感度定量法の構築，第22回バイオメディカル分析科学シンポジウム(各務原)，2009.7.15-7.17.

〔図書〕(計5件)

1. Jan Sjövall, William J. Griffiths, Kenneth D. R. Setchell, Nariyasu Mano, and Junichi Goto: "Chapter 10. Analysis of Bile Acids" in "Steroid Analysis Second Edition" edited by H. L. J. Makin and D. B. Gower, Springer, pp.837-966 (2010).
2. 眞野成康：薬学分析科学の最前線，第7章 質量分析法の展開，質量分析法による生体内分子の高感度分析と挙動解析(じほう) pp.118-119 (2009).

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hosp.tohoku.ac.jp/Study/gyous eki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞野 成康 (MANO NARIYASU)
東北大学・病院・教授
研究者番号：50323035

(2) 研究分担者

島田 美樹 (SHIMADA MIKI)
東北大学・病院・准教授
研究者番号：10196488