

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659383

研究課題名(和文)ペプチドのプロセッシングによる心血管病態制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cardiovascular pathologies by regulating the processing of the peptide

研究代表者

鈴木 亨 (Suzuki, Toru)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90359620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：心血管疾患の病態においては内分泌制御が関与することが明らかになり、心血管内分泌分野として近年注目されている。我々は動脈硬化時にみられる心臓に選択的な生理活性ペプチドがプロセッシングを受けて生じるフラグメントの生成メカニズムを追求した。ヒトリコンビナントがこの生理活性ペプチドをプロセスするか、質量分析計を用いて検討した。また、実際の血液でこの酵素の活性が見られるかどうかの検討を行い、病態との相関を検討した。その結果、冠動脈再狭窄の病態において、特定の生理活性ペプチドの断片が減少していることを明らかにした。今後の動脈硬化の新規診断薬、さらには抗動脈硬化薬の開発の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is revealed that endocrine control participates in the condition of a patient of the cardiovascular disease and in late years attracts attention as the field of cardiovascular endocrinology. We pursued the generation mechanism of the fragment which selective bioactive peptide caught the processing to heart seen at the time of arteriosclerosis. We examined whether human recombinant performed a process of this bioactive peptide using a mass spectrometer. In addition, we performed examination whether or not the activity of this enzyme was seen in blood and examined correlation with the condition of a patient. As a result, in the coronary restenotic condition of a patient, we made clear that a piece of the specific bioactive peptide decreased. It is expected future arteriosclerotic new diagnostic agent, that, besides, it is a beginning of the development of the antiarteriosclerotic drug.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 蛋白質 プロテオーム ストレス 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

我々はペプチド蛋白質と病態の関係を長年にわたり研究しており、循環器領域においては世界の中でもトップリーダーとして知られている。蛋白質バイオマーカーの開発、またペプチド蛋白質を検出するための技術開発を行ってきた。後者については、いち早く臨床領域に質量分析計を導入し、疾患蛋白質の検出に用いてきた。これらの活動と業績が認められ、現在は、世界のプロテオーム学会である HUPO (Human Proteome Organisation) の心血管部門の唯一の日本人として活躍している。今までの検討を通して、心血管生理ペプチドのプロセッシングをいち早く質量分析計で検討してきた。前述した心臓利尿ペプチドやアンジオテンシンについて、従来から知られていなかった新しいプロセッシング機構をすでに予備検討で見いだしている。その一例として、動脈硬化の進行病態である冠動脈疾患の再狭窄と密接に関わるペプチドのプロセッシングを最近見いだした。具体的には、冠動脈病変の再狭窄時に選択的にみられる心臓特異的なペプチドのプロセッシングを検出する系である。すでに約100例の症例で検討したが、冠動脈の再狭窄を完全に除外できることが示されたことから(感度100%)、世界ではじめての再狭窄の診断バイオマーカーとして臨床実用化を進めているところである(Clin Chem. 2013; 59: 1330-1337)。診断・検出系としては一定の成果がすでに得られているが、その背景にあるメカニズムであるペプチダーゼ反応については端緒についたばかりである。本研究では、このペプチダーゼ反応を解析し、関わる酵素またその活性制御の機構を明らかにしたい。それにより、動脈硬化の進展に関わる新しいメカニズムを明らかにし、創薬の糸口としたい。

我々は動脈硬化進行時に特異的にみられるペプチドのプロセッシング反応を見いだしている。すでに予備検討にて、その検出をもとにした診断系の開発を進めており、一定の成果が得られている。本研究を通してその反応に関わるペプチダーゼないしその制御機構を明らかにする。本プロセッシング反応に関わる酵素活性は動脈硬化抑制作用があると想定されることから、酵素を同定し、さらにそれに対する賦活剤を開発すれば、新規の抗動脈硬化効果を有する薬剤の開発が可能になると考えている。

このように、本研究を通して、動脈硬化を対象とした新しい機序に基づいた創薬が可能となると期待される。動脈硬化進行の特異的な検出(診断薬ないし測定計の開発)だけでも社会へのインパクトは大きいが、さらにその基礎反応に基づくペプチドのプロセッシングに対する治療薬の開発につながれば心血管疾患のみならず創薬領域全般においても画期的な成果が期待される。糖尿病領域で

も GLP-1/DPP-IV 阻害剂等ペプチドのプロセッシング制御を対象とした薬剤が開発され、最近注目されていることから、心血管領域でも同様にペプチドのプロセッシングに基づく創薬が可能になれば容易に受け入れられるとも思われ、絶大な社会的なインパクトが期待される。

2. 研究の目的

心血管疾患は糖尿病代謝疾患同様に内分泌制御がその病態制御に関与することが明らかになり、心血管内分泌分野として近年注目されている。具体的には、心臓血管疾患の病態発症に関わる生理活性ペプチドである心臓利尿ペプチド、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン等の生理活性ペプチドが、心血管細胞に対して作用することで病態形成に関与することが知られている。今までもこれら生理活性ペプチドを標的とした治療法が開発されてきたが、受容体等を対象としたものが多く、作用機転は終末因子や段階を対象としたものが中心であった。

近年、糖尿病・代謝領域では GLP-1 (glucagon-like peptide-1) 製剤・DPP-IV (dipeptidyl peptidase-IV) 阻害剤が画期的な新規機序に基づく治療薬として期待されている。当製剤の作用機序は生理活性ペプチド GLP-1 の(不)活性化に関わるペプチダーゼ DPP-IV に基づくものであり、ペプチド酵素への薬剤介入またそれにより生理活性ペプチドのプロセッシングを制御する。

心臓血管病態でも生理活性ペプチドのプロセッシングを対象としたその制御が可能になれば画期的な治療薬の開発が可能となる。すでに我々は予備検討により、動脈硬化性疾患に選択的に見られる心血管生理活性ペプチドの新規プロセッシング機序を見いだしている。この系に作用する酵素についてもある程度見当がついている段階であるが、特定までさらに検討が必要である。この検出系を用いることで動脈硬化疾患の発症と密接に関わるペプチダーゼ活性を担う新規酵素の発見が可能と考えている。本研究では、この動脈硬化抑制ペプチダーゼを同定し、創薬への糸口としたい考えである。

3. 研究の方法

本研究では前述したように、我々がすでに開発した動脈硬化進行時にみられる心臓に選択的な生理活性ペプチドのプロセッシング機構の検出系を用いて、その反応の基礎反応であるペプチダーゼならびにその制御機構を解明する。

達成すべき目標は、そのペプチダーゼを追求し、その過程に関わる酵素またその活性制御の機構を明らかにする。血中で見られるプロセッシング機構であるが、生化学的な検討を行うために、まず細胞実験系で再構築する必

要がある。現時点では、冠動脈由来の内皮細胞を用いた細胞系で一定の再現ができています。細胞を用いたスクリーニングにおいては、各種のペプチダーゼ阻害薬を用いてペプチドと反応させ、プロセシングの有無を検討する。化学的な特性からある程度酵素は絞り込んでいるが、現時点では既知の酵素と異なる性質を示す知見も見られており、新規の酵素である可能性がある。新規の酵素である可能性も考え、活性をもとに精製も試みる。細胞の大量調製が困難であることから、分画化を最適化したうえで微量蛋白質の検出を可能とした質量分析技術で同定する予定である。最終的には、同定した酵素を *in vitro* で再構成して前述のプロセシング反応が起きるかを検討する。

臨床検体として用いる血液は東京大学附属病院循環器内科に入院する患者のうちインフォームドコンセントの得られた患者から採取する。このシステムはすでに確立しており、これまでに1,500検体以上の収集を終えている。これらの検体は詳細な臨床情報が付与されている電子カルテシステムと連動しており、必要に応じてその情報を取得することが可能となっている。このような詳細な臨床情報の付与された質の高い検体が収集できることは疾患診断マーカーを探索・開発する上で非常に重要な条件である。

4. 研究成果

平成24年度は、動脈硬化時にみられる心臓に選択的な生理活性ペプチドがプロセシングを受けて生じるフラグメントの生成メカニズムを追求した。培養細胞として、ヒト心筋細胞を用い、血中で見られるプロセシングのモデル系の構築を行った。その結果、血中で見られるプロセシングと同様のフラグメントを検出しうる培養細胞モデル系の構築に世界で初めて成功した。このプロセシングのメカニズムにはある種のプロテアーゼが関与しているということを実験仮説として、システムチックにプロテアーゼの阻害剤をこのモデル系に加え、検討した。その結果をもとに、データベースの検索を行ったところ、このプロテアーゼは因子Xではないかと考えられた。さらに因子Xのヒトリコンビナントがこの生理活性ペプチドをプロセスするかどうかについて、質量分析計を用いて検討した。

平成25年度は、因子Xのヒトリコンビナントがこの生理活性ペプチドをプロセスするかどうかについて、質量分析計を用いて検討した。また、実際の臨床検体においてこの酵素の活性が見られるかどうかの検討を行い、病態との相関を検討した。その結果、冠動脈再狭窄の病態において、特定の生理活性ペプチドの断片が減少していることを明らかにした。メカニズムとして、その酵素の活性が減少していることが示唆された。

このような検討は、今後の動脈硬化の新規診断薬、さらには抗動脈硬化薬の開発の糸口となることが期待される。

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 14 件)

1. Fujimoto H, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Komuro I, Nagai R. Processed B-Type Natriuretic Peptide Is a Biomarker of Postinterventional Restenosis in Ischemic Heart Disease. *Clin Chem*. 2013; 59: 1330-1337.
2. Enokoku K, Ikeda H, Kato R, Kume Y, Yoshida H, Ono T, Aizawa K, Suzuki T, Yamzaki T, Yatomi Y. Inverse correlations between serum ADAMTS13 levels and systolic blood pressure, pulse pressure, and serum C-reactive protein levels observed at a general health examination in a Japanese population: a cross-sectional study. *Clin. Chim. Acta*, 2013; 421:147-151.
3. Suzuki T, Bossone E, Sawaki D, Jánosi RA, Erbel R, Eagle K, Nagai R. Biomarkers of aortic diseases. *Am Heart J*, 2013; 165:15-25.
4. Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Nagai R. Comparison of Analytical Performance of Two Single-step Measurement Devices of B-type Natriuretic Peptide. *Int Heart J*, 2012; 53:320-3.
5. Suzuki T, Tomiyama H, Higashi Y. Vascular dysfunction even after 20 years in children exposed to passive smoking - alarming results and need for awareness. *Arteriosclerosis, Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:841-842.
6. Suzuki T, Isselbacher EM, Nienaber CA, Pyeritz RE, Eagle KA, Tsai TT, Cooper JV, Januzzi JL Jr, Braverman AC, Montgomery DG, Fattori R, Pape L, Harris KM, Boohar A, Oh J, Peterson M, Ramanath VS, Froehlich JB. Type-selective benefits of medications in treatment of acute aortic dissection; (from the International Registry of Acute Aortic Dissection [IRAD]). *Am J Cardiol* 2012; 109:122-127.

[学会発表](計 34 件)

1. 鈴木亨. 質量分析技術の臨床応用 - 冠

- 動脈疾患のバイオマーカーの開発 - . 最先端研究開発支援プログラム (FIRST) 永井プロジェクト 第 3 回公開シンポジウム (東京) 2014.3.12.
2. 鈴木亨. 質量分析技術を用いた診断法の開発: 循環器疾患における挑戦. 最先端研究開発支援プログラム (FIRST) 田中 ms3d プロジェクト(東京)2014.1.26.
 3. 鈴木亨. 「BNP の臨床応用の現状と最新知見」(4) BNP の血中の分子型について. 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (大阪) 2013.11.22.
 4. 鈴木亨. FMDJ 研究から見てきたこと 1 (血液バイオマーカー). 第 36 回日本高血圧学会総会 フォーカスセッション (大阪) 2013.10.24.
 5. 鈴木亨. 質量分析器具を用いたプロテオーム診断の臨床応用 循環器疾患を中心に. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会 (名古屋) 2013.9.26.
 6. 相澤健一、鈴木亨、藤本宏隆、澤城大悟、石田純一、安東治郎、藤田英雄、小室一成、永井良三. プロセッシングを受けた B 型ナトリウム利尿ペプチドは、虚血性心疾患における心臓カテーテル治療後再狭窄のバイオマーカーである. 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会 (名古屋) 2013.9.26.
 7. 鈴木亨. 招待講演「質量分析器具を用いたプロテオーム診断の臨床応用-循環器疾患を中心に」. JASIS 2013(分析展 2013 (第 51 回)) / 科学機器展 2013 (第 36 回)(千葉) 2013.9.4-6.
 8. Aizawa K, Suzuki T, Fujimoto H, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Komuro I, Nagai R. Processed B-type natriuretic peptide is a biomarker of post-interventional restenosis in ischemic heart disease. HUP0 12th Annual World Congress (Yokohama, Japan). 2013.9.14-18.
 9. 鈴木亨. モーニングレクチャー 心血管バイオマーカー. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京) 2013.3.21-23.
 10. Aizawa K, Suzuki T, Fujimoto H, Sawaki D, Ishida J, Ando J, Fujita H, Nagai R, Komuro I. Processed B-type natriuretic peptide measured by immuno-mass spectrometry is a biomarker of postinterventional restenosis in ischemic heart disease. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京) 2013.3.21-23.
 11. Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Sawaki D, Ishida J, Komuro I, Nagai R: Histone H2AX is Important in the Regulation of Cardiac Hypertrophy. 第 77 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜) 2013.3.15-17.
 12. Mizuno Y, Suzuki T, Kohro T, Imuro S, Yamazaki T: B-type Natriuretic Peptide and Subclinical Atherosclerosis in Healthy Population. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012.11.3-7.
 13. Suzuki T, Isselbacher EM, Eagle KA, Nienaber CA, Sawaki D, Hagan LM, Montgomery DG, Froehlich JB: Effect of Medical Treatment for Aortic Dissection on In-Hospital Mortality and Follow-Up Aortic Expansion in Patients with and Without Marfan Syndrome; Observations from the International Registry of Acute Aortic Dissection. American heart association scientific sessions 2012 (Los Angeles, USA). 2012.11.3-7.
 14. Suzuki T: Biomarkers of aortic disease. ESC CONGRESS 2012 (Munich, Germany). 2012.8.25-29
 15. Suzuki T: KLF6 in cardiovascular and metabolic disease. 2012 FASEB Science Reserch Conferences (Colorado USA). 2012.8.5-10
 16. Suzuki T, Fujimoto H, Nagai R. Towards Development of New Biomarkers of Atherosclerosis - Use of New Proteomic Technologies. 第 76 回日本循環器学会学術集会. 福岡. 2012.3.18
- 〔図書〕(計 2 件)
1. 相澤 健一, 鈴木 亨. 新しい動脈硬化のバイオマーカー開発 : 新しいプロテオーム技術を用いて(3. 動脈硬化のバイオマーカーの臨床的意義, <特集>第 76 回日本循環器学会学術集会). 循環器専門医 : 日本循環器学会専門医誌. 20(2); 237-244, 2012
 2. 相澤 健一, 鈴木 亨. バイオマーカーの探索・発見・同定の試 (5 . 今後のバイオマーカーの展望, 特集: 循環器病のバイオマーカー企画・構成 / 井上晃男). Heart View. 16(12); 306-310, 2012
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)
- 名称 : 心疾患診断マーカー
発明者 : 鈴木亨、日本電気株式会社 宮崎賢司 他、積水メディカル株式会社
権利者 : 東京大学、NEC、積水メディカル
種類 : 特許出願
番号 : 2011-175982
出願年月日 : 2011年8月11日
国内外の別 :

名称：血液試料を用いて心筋虚血状態を評価
する方法
発明者：鈴木亨、藤本宏隆
権利者：国立大学法人東京大学、株式会社島
津製作所
種類：特許出願
番号：PCT/JP2008/65444
出願年月日：2008年8月28日
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
ユビキタス予防医学講座ホームページ
<http://plaza.umin.ac.jp/upm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：90359620

(2) 研究分担者

相澤 健一 (AIZAWA KENICHI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：70436484

(3) 連携研究者

なし