

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05383・20K20389

研究課題名(和文)高感度ペプチドミクス技術を応用した疾患バイオマーカーの探索・同定

研究課題名(英文)Identification of disease biomarkers using highly sensitive peptidomics

研究代表者

七里 眞義(Shichiri, Masayoshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10206097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：高感度ペプチドミクス技術を用いて血漿ネイティブペプチドの網羅的同定技術を完成させ、数多くの配列情報を新たなデータベースとして登録し公開した。これらの配列情報を用いて、疾患バイオマーカー、および新規生理活性ペプチドホルモンの同定研究を行った。前者としては鋭敏な酸化ストレスバイオマーカー、心疾患発症予測因子、および体液量変動マーカーとなりうる候補因子を同定した。後者としては血管平滑筋細胞に対するNF- κ B活性化因子と末梢性摂食抑制性ペプチドホルモンを同定した。以上より「ヒト血漿ペプチドーム」は未知の生理活性因子や臨床バイオマーカーを探索・同定する有用な研究手法であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ヒト血中に存在する超微量ネイティブペプチドの配列を正確に決定することは不可能とされていたが、始めてその網羅的同定に成功し、新たなヒト血漿ネイティブペプチドデータベースを作成して公開した。同定したペプチドの中から3つの強力な生理活性を有する新規生理活性因子を明らかにし、これらが血中に確実に存在するペプチドホルモンであることを示した。さらに、研究の過程で疾患バイオマーカーとなりうる候補因子を3つ同定することができた。これまで新規生理活性因子やバイオマーカーの探索は困難をきわめていたが、「血漿ペプチドーム」はこうした創薬シーズ・マーカー探索研究を加速させる貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in developing a novel strategy to comprehensively identify low-molecular-weight native peptides using mass spectrometry. Peptides sequences were chemically synthesized to be used for identifying novel bioactive peptides, resulting in identification of two NF- κ B-inducers and one anorectic peptide. While analyzing native peptides in human plasma using peptidomics approach, we found potential disease biomarker proteins; oxidative stress markers, a potential cardiovascular disease predictor, and a potential body fluid indicator. This study illustrates a new approach for discovering unknown bioactive peptides and disease biomarkers in plasma via the generation of peptide libraries using a novel peptidomic strategy.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：ペプチド 生理活性因子 バイオマーカー 質量分析 NF- κ B 摂食抑制 ペプチドミクス 創薬シーズ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2000年代初頭以降、ヒト循環血中の新規生理活性因子はほとんど発見されなくなり、臨床的に有用なペプチド性バイオマーカーの探索は困難を極めるようになった。質量分析技術の発達した現在でも、血液試料中の蛋白質の分析は組織や細胞に比べて格段に困難である。これは血中に存在する膨大な高分子量蛋白を除去してはるかに低濃度しか存在しないペプチド性因子(図1)を分離・精製する技術がないため、循環血中の低分子量ペプチドを構造決定できなかったことによる。また、免疫学的な手法で正確な測定系を構築することも抗体作製・抗原特異性や抗体反応性の問題などのため時間がかかりすぎるうえに不正確なアッセイ系しか確立できないことが多く、多くの重要な内因性生理活性ペプチドやバイオマーカーの測定値は正確ではなかったと判明したのも数多い。研究代表者は過去に独自の新規生理活性因子探索法を考案し、複数の新規生理

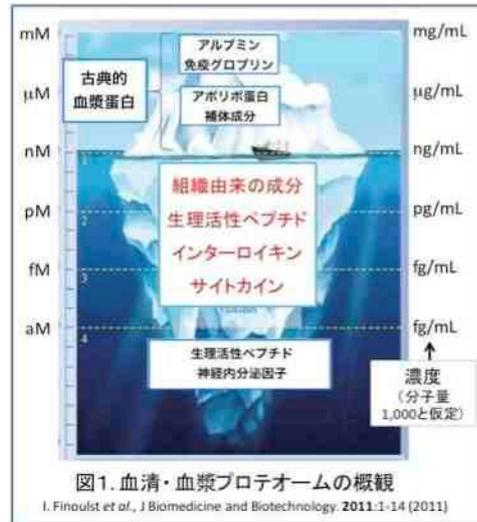


図1. 血清・血漿プロテオームの概観

I. Finoulet et al., J Biomedicine and Biotechnology, 2011:1-14 (2011)

活性ペプチドホルモンの同定に成功した(Shichiri et al. *Nature Medicine* 2003;9:1166-72)。この手法は「*In silico*ペプチド探索法」と呼称されるようになったが、ヒト全長 cDNA データベースをバイオインフォマティクス解析し、分泌性蛋白がプロセシングされて生理活性ペプチドとして生合成される可能性が高いアミノ酸配列の存在を予測して化学合成し、合成ペプチドの活性を確認したのち、最終的にヒト血中に存在するアミノ酸配列の存在を証明するというものであった。同定した因子は汎用実験用消耗器材に強く吸着する(Shichiri et al. *Nature Medicine* 2007;13:661-2)ものなど、特異な物理化学的性状を有し、従来の古典的手法では単離・同定できない特質を有していた。これらの結果から、新規ペプチド性生理活性因子やペプチド性バイオマーカーが、近年ほとんど同定できなくなった背景は、このような性状を有する未同定の因子を構造決定する技術的な問題に由来すると推察され、有用な未知因子を発見するためには技術的革新が必要と考え、研究分担者の小寺らと新技術の完成に努めてきた。

小寺らはヒト血漿中の高分子量蛋白を除去して微量ペプチド分画を高度に濃縮する「超高効率ペプチド抽出技術(differential solubilization法)」を開発した(Kawashima et al. *J Proteome Res* 2010;9:1694-705)。本法は従来の有機溶媒沈殿法、限外濾過法に比べて超微量・低分子量ペプチドの抽出効率が圧倒的に高く、血中に莫大な分子数で存在するキャリアプロテインに結合したペプチドも高効率に抽出可能な革新的手法であり、アルブミン除去カラムで検出できない成分の取り出しにも成功した。得られた血漿由来成分をトリプシン消化しないまま小分子量ペプチドを抽出し、逆相 HPLC 分画の濃縮・再溶解過程では質量分析を阻害しない界面活性剤を用いて最適化し、高分解能 MS に加え MS/MS スペクトルを取得したうえ、de novo sequencing ソフトウェアを活用して確実なアミノ酸同定結果をうるなどの改良を行ってきた。こうしてヒト血漿中のネイティブペプチドをわずか 200 μl 以下の血漿サンプルから質量分析計を用いてペプチド配列を直接同定するに至った。研究開始時点で達成した革新的な血漿中の小分子量ペプチドの濃縮・抽出法を用いたペプチド同定の精度は、ちょうど大きさの異なる豆や米粒で満杯になったオリンピックプールの中に埋もれた 100~1000 個程度のゴマを見逃すことなく捜し出す作業に相当する。ヒト血漿を濃縮・抽出してトリプシン非消化のまま、超微量低分子量ペプチド分画を抽出したのち小分子量ネイティブペプチドを網羅的に質量分析にて同定することは、当時の技術では不可能と信じられていたが、すでに 2000 種類の前駆体タンパク質に由来する数多くのペプチドを高い精度で構造決定することができた(False Discovery Rate 1%*:10000 種類以上)。この結果からこれまで新規ペプチドホルモンやバイオマーカーの同定を妨げてきた最大の技術的難題はすでに解決できたと考え、困難を極めていた臨床バイオマーカーの同定を容易にすることにより、本手法の有用性を証明したいと考えた。健康人血漿 200 μl から直接構造決定したペプチドには既知の因子以外に実に多くの関連プロセシング産物がヒト循環血漿に存在していることが明らかになりつつあった。この結果は内分泌学、代謝学、生理学の根本的な理解を転換する知見であり、日常の臨床検査で測定しているペプチド性因子は、きわめて多くの類似配列のごく限られた一部分しか観察できていなかったことを示している。血中ペプチドホルモンはヒトの種々の病態を修飾するものと信じられてきたが、血中には数多くのサイトカインなどの生理活性蛋白由来ペプチドに加えて、驚いたことにアルブミンや免疫グロブリン、細胞表面蛋白や可溶性受容体の断片ペプチドも多数存在し、その一部は生理活性を有する可能性も推測された。本計画における新規ペプチドの網羅的同定技術により、従来の方法では構造決定できないヒトペプチドホルモンも短期間に探索でき、新しい作用機序の創薬シーズとしての展開も期待される。構造決定した多数のヒト循環血中ペプチド配列を用いた臨床バイオマーカーの網羅的探索が可能となり、初の本格的な循環血漿ペプチドーム研究の一環として本計画を企画するに至った。

2. 研究の目的

独自に開発しつつあった血中超微量ペプチドの高効率抽出・精製技術と超高感度(探索感度～pM)・高精度質量分析技術を組み合わせた高感度ペプチドミクス技術を完成させ、翻訳後修飾を含めて構造決定した多数のヒト血中ネイティブペプチドを用いて in silico 構造解析を行った。これらの中にはメチオニン・アルギニン酸化、C末端アミド化、糖化を始めとする翻訳後修飾を示すものも非常に多く、様々な疾患や病態を反映する可能性の高い因子が含まれることが特に注目された。また、健康人血漿中に一アミノ酸置換が見られることも多く、遺伝子レベルの一塩基置換の疾患発症予測よりもはるかに疾患感受性が高いものが見出される可能性が明らかになった。そこで、循環血中ネイティブペプチドの同定作業を継続しつつ、膨大な血漿ペプチド配列の中から、翻訳後修飾やアミノ酸置換の配列情報を含めて網羅的かつ詳細に探索し、健康人および各種疾患のアミノ酸翻訳後修飾、アミノ酸置換情報と比較することにより、従来手法では得られなかった疾患診断や発症・進展予測、治療効果判定のための臨床バイオマーカーとして有用な配列を探索し、臨床的に有用な因子を選択して開発研究を行うこととした。各種疾患において有用な疾患バイオマーカーになりうる因子を探索し、開発することを目的とした。さらにヒトネイティブペプチドライブラリーデータベースの国際的な始動にも寄与することとした。临床上、重要な疾患バイオマーカーは内因性生理活性ペプチドであることが多いため、併行して新規ヒトペプチドホルモンを同定することもめざすこととした。

3. 研究の方法

高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)を用いて、すでに研究開始時点で健康人のヒト循環血中に確認できた多数のネイティブペプチド配列について正確な分布や特性の解析を行った。分泌蛋白由来かどうか、疎水性や親水性などの性状、翻訳後修飾やアミノ酸置換を含むアミノ酸配列までその詳細な多様性を明らかにすることとした。これらの中から疾患診断や発症・進展予測、治療効果判定のための臨床バイオマーカーとして有用である可能性のある配列を探索し、健康人および各種疾患の臨床サンプルを用いて、正確な定量アッセイ法を構築し、さらに翻訳後修飾、アミノ酸置換情報などを比較検討することにより、臨床バイオマーカーとして有用なものを探索した。臨床的意義の高い因子を選択して開発研究を行うこととした。

血中蛋白の翻訳後修飾のうち酸化ストレスの初期状態を鋭敏に反映するメチオニン酸化については、長年、技術的な困難さと不安定性の問題から血中蛋白でそのまま定量解析することは不可能だと信じられていた。しかし、膨大な解析結果から血中蛋白のトリプシン酵素による完全消化物は質量分析で酸化メチオニンと非酸化メチオニンが同定可能であることを確認しつつあったため、これらを安定性がきわめて高い状態で定量解析できるかどうかを検討した。ネイティブペプチドを含めて臨床検査レベルで最も有用な酸化ストレスマーカーになりうるものを探索し、酸化ストレスの臨床バイオマーカーとなりうるか検討した。

本研究の経過中も循環血中ペプチドのアミノ酸配列の決定を継続しながら、オーファン受容体や創薬シーズ探索研究者のためのリガンド情報データベースを構築することとした。すなわち、本計画は研究代表者・分担者だけが新規バイオマーカーを発見するためだけに行うのではなく、広く国内外の研究者が新規生理活性因子の同定や創薬研究のシーズ探索に活用できるよう、新たに国際的なネイティブペプチド情報データベースを構築し公開する計画とした。

本研究で獲得する膨大なネイティブペプチドライブラリーの配列情報は、疾患バイオマーカーを同定するための有用なツールとなるだけでなく、新規生理活性ペプチドホルモンが含まれている可能性があるため、配列情報についてバイオインフォマティクス解析を行い、生理活性ペプチドの候補因子を選択し、化学合成したペプチドを溶解したうえ、十分な純度・溶解性を示した因子について、各種培養細胞系を用いて、細胞応答を示すかどうかスクリーニングを行い、応答を示すペプチドについて細胞表面への結合性や細胞内情報伝達経路の検討を行った。さらに惹起したシグナルから推測される生理活性を解明するために in vitro および in vivo 実験系を用いて、内因性生理活性因子としての役割を明らかにした。十分な生理活性を示した因子については、各種濃度の安定同位体標識ペプチドをヒト血漿にスパイクし、標識ペプチドならびに血漿中の内因性ペプチドの extracted ion chromatogram から血漿中濃度を測定した。

4. 研究成果

LC-MS/MSを用いた解析によって出力された質量データファイルを当初、Mascot Distiller (version 2.5.1.0, Matrix Science) と PEAKS Studio (version 7) を用いてアミノ酸配列を算出し、SwissProt_2015_02.fasta database 検索を行って、ペプチド同定偽発見率(FDR)1%で同定されたペプチドのうちケラチン由来のものを除く 18552 種類の生データを新たなネイティブペプチドデータベースとしてプロテオーム質量分析データのリポジトリである PRIDE に公開した。その後、PEAKS Studio (version X) と SwissProt_2020_03.fasta を用いて再解析した結果、FDR 0% または 1% のレベルで、それぞれ 7,959 または 11,256 種類のペプチド配列を同定した (Taguchi et al. *Scientific Reports* 2021;11:e1047)。これらの中には分泌性蛋白由来の低分子量プロセッシング産物に加えて、大分子量高存在量蛋白の大量の分解産物が含まれていたため、これらのヒト血漿ネイティブペプチドーム情報を基盤に、(1) 疾患バイオマーカー、および (2) 新規生理活性ペプチド

ホルモンの同定をめざした解析を行った。

(1) 疾患バイオマーカーの同定解析

酸化ストレス予測因子：血清アルブミン(Met-147)

酸化ストレスは老化現象のみならず癌・心血管病・神経変性疾患などの発症・進展に関連する。糖尿病や高血圧などにおいては、酸化ストレスの亢進が各種臓器障害の重要な進展促進因子となりうる可能性が注目され、生体内の酸化ストレスレベルを正確に評価できるバイオマーカーの開発は重要な臨床的課題とされている。生体内蛋白の酸化を鋭敏に反映するアミノ酸の代表はメチオニン残基であるが、その酸化状態はきわめて不安定であると信じられてきた歴史があり、実験の過程で容易に酸化・還元反応が併行して進行するため、特に血液中の酸化ストレスレベルを正確に捉えるのはきわめて困難と考えられてきた。これまでの血液を用いたプロテオミクス解析の経過において安定した前処理技術と質量分析技術によってヒト血中酸化ストレスレベルをわずかな血清からきわめて安定的に定量化することに成功した(Suzuki S. *Scientific Reports* 2016;6:e38299)。今回の研究過程でとくに血清アルブミンと Ig 1 chain C region のいくつかのメチオニン残基のうち、特にアルブミン(Met-111 と Met-147)と Ig1 chain C region(Met-135)の酸化レベルは、2型糖尿病群や慢性腎不全群で高い酸化レベルを示したことから、これらの酸化レベルが循環血中蛋白の酸化ストレス状態を反映している可能性が示された。そこで本解析では血漿中のネイティブペプチドとして同定されたアルブミン断片ペプチドを用いるのではなく、これらのメチオニン残基を含む血清アルブミンのトリプシン消化ペプチドを用いて、酸化型・非酸化型メチオニン残基を含む安定同位体標識ペプチドを血液サンプルにスパイクして酸化レベルを正確に測定する方法によって定量したところ、糖尿病、慢性腎不全、健常喫煙者では健常非喫煙者に比較して、有意に酸化レベルが亢進していた。また、糖尿病症例において持続血糖計測を用いた血糖変動評価を行ったところ、血糖変動が大きい群では酸化比が高いことから、糖尿病患者において血糖変動が酸化ストレスの亢進に関与している可能性も示された(Momozono A. *Scientific Reports* 2020;10:e1038)。今回の結果から、このメチオニン残基、とくに血清アルブミン(Met-147)の酸化状態が、血中の酸化ストレス状態を直接、反映する最も正確かつ鋭敏なバイオマーカーになり得る可能性が示され、直ちに臨床検査として応用可能なレベルにまで安定的に測定できることが示された。

心疾患発症予測因子：2-マクログロブリン

ヒト血漿ペプチドームの解析では 2-マクログロブリン分子の様々なプロセッシング産物が血液中に確認された。2-マクログロブリンはヒト末梢循環中の高濃度タンパク質の中で最大の非免疫グロブリン分子であり種々の生理活性が報告されてきたが、そのヒト血中濃度の報告は文献によって6桁に及ぶほどの隔たりがあった。その分子型については「2M心臓型アイソフォーム」と呼ばれる 182 kDa のタンパクが心筋梗塞で上昇しており、これが心肥大を直接誘導することが示されたが、我々はこのタンパクはアイソフォームではなく 2-マクログロブリンそのものであることを質量分析法を用いて確認していた(Takada T. *Atherosclerosis* 2013;228:270-276)。今回、抗 2-マクログロブリン抗体を用いて高感度特異的 ELISA 系を確立し、心血管系疾患や糖尿病などの各種疾患におけるヒト血中濃度を測定したところ、糖尿病患者では従来の報告とは異なり、血中 2-マクログロブリン濃度は持続血糖計測装置を用いて測定した血糖値とも関連せず、脈波伝播速度(baPWV)、最大頸動脈内中膜複合体厚(maxIMT)と相関したうえで、運動負荷試験の陽性例と冠動脈狭窄所見のある群で高値であった。重回帰分析を行うと血清 2-マクログロブリン値には baPWV と尿中アルブミン排泄率が独立して有意に影響する因子であった(Yoshino S. *Scientific Reports* 2019;9:e12927)。古くから糖尿病性腎症の進展予測因子とされてきた尿中微量アルブミンは心血管疾患の予測因子とされるようになったが、今回の解析結果から、糖尿病性腎症の進展にともない尿中微量アルブミンが出現する時点では、より小分子量のアルブミン分解産物が微量アルブミンとともに大量に尿中に排泄されている可能性が高く、そのため肝における蛋白合成が亢進しつづけ、相対的に尿中に排泄されない 2-マクログロブリンのような大分子蛋白が血中に蓄積してゆく可能性が高いことを示しており、その結果、

2-マクログロブリンの心肥大や心血管疾患の惹起作用が誘発される可能性が考えられた。

体液量予測因子：プロレニン

ヒトにおけるレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系はわずかに血漿レニン活性と血漿アルドステロン濃度によって臨床的に評価される。これらは体位や塩分・水分摂取量、服用中薬剤、血中アンギオテンシノーゲン濃度などの諸条件による変動が大きく測定値の評価に苦慮するため、原発性アルドステロン症のスクリーニング検査に用いられるにすぎず、細胞外液量や循環血漿量の変化を推定するバイオマーカーとしては用いられていない。プロレニン分子はいくつものトリプシン消化部位を有するにもかかわらず、最新の国際的なプロテオミクスデータベース the Human Plasma Peptide Atlas (*J Proteome Res* 2017;16:4299-4310)にもわずか2つの酵素消化断片配列しか記載されておらず、我々の血漿ネイティブペプチドームでも recombinant プロレニン配列は全く認められなかった。recombinant プロレニンをプロレニンプロセグメント領域に特異的な抗体を用いた免疫沈降により回収した抽出物中には質量分析にてプロレニン配列が検出されるのに対し、ヒト血漿中のプロレニン

様免疫活性には検出できなかった。ヒト血漿中のプロレニン様免疫活性は recombinant プロレニンよりも分子量が大きく、N 型結合型糖鎖切断酵素や強力な還元剤により分子サイズが減少するため、ヒト血中のプロレニンは翻訳後修飾されていることが示された。そこで翻訳後修飾の影響を受けにくいプロレニンプロセグメント領域の N 端と C 端の抗体を用いてサンドイッチ ELISA 系を確立してヒト血清・血漿中プロレニン濃度を測定したところ、国際的に市販されているプロレニン ELISA キットの測定値(60-8000 pg/ml)の報告と比較して、驚くべきことに、1,000 ~ 10,000 倍高値の濃度を示した。recombinant プロレニンを抗原として作成されたプロレニン抗体は、血漿中の翻訳後修飾を受けたプロレニン分子を認識しないことが明らかになり、血中レニン、血中プロレニンは従来、信じられてきた濃度より遙かに高濃度で存在することが明らかになった(Fujimoto K, *Hypertens Res* 2021 in press)。血中プロレニン濃度の臨床バイオマーカーとしての有用性を現在解析中である。

(2) 新規生理活性ペプチドホルモンの同定

PEAKS Studio (version X) と SwissProt_2020_03.fasta を用いて FDR 0% にて同定した 7,959 種類のネイティブペプチド配列の中から、分泌性蛋白由来のもの、翻訳後修飾やアミノ酸置換がないもの、アミノ酸残基数が 38 以下のもの、極端な疎水性でないものなどの構造上、活性の検討が可能と思われる条件の配列を選択し、それらを順次化学合成して高純度精製したうえ、実験用溶液への十分な溶解性やペプチドの安定性を LC-MS/MS にて再確認した後、まず培養細胞系において細胞応答を示すものを選択し、明らかな細胞内シグナル伝達を惹起する因子については、その細胞内シグナルから推察される生理活性を探索するための新たな実験系を用いて詳細な活性研究を行った。さらに、摘出臓器を用いた生理実験系、in vivo 摂食量・飲水量・行動量計測系、in vivo 投与における内因性蛋白誘導解析、さらに特異的抗体を作成したのちに各種主要臓器における発現分布解析などに及んだ。本研究で同定した以下の 3 つの新規生理活性因子はいずれも同一の前駆体蛋白に由来する低分子量ペプチドホルモンであった(Taguchi et al. *Scientific Reports* 2021;11:e1047)。各種濃度の安定同位体標識合成ペプチドをヒト血漿サンプルにスパイクして LC-MS/MS 解析を行ってヒト血中の正確な分子型の濃度を測定した。

SBSN_HUMAN[225-237]: GQGIHHAAGQVGK 13 アミノ酸 精密質量 1259.6603

血管平滑筋細胞に対する増殖促進作用、アポトーシス抑制作用を有し、NF- κ B 活性化を介して VEGF、dickkopf-related protein 1 (DKK1)、endoglin、urokinase plasminogen activator receptor (uPAR)、cystatin C、GM-CSF)、VCAM1 の産生・分泌を促進する。ヒト組織では中枢神経系、胃、肝臓、肺、心臓、腎臓、副腎など広範囲な臓器に発現が認められ、また、ヒト由来培養細胞では、血管平滑筋細胞やマクロファージ細胞のほか、単球、マクロファージ、ケラチノサイト、肝癌由来細胞株での発現が認められた。健常人における血中濃度は 0.3 nM であった。

SBSN_HUMAN[243-259]: GQGAHHAAGQAGNEAGR 17 アミノ酸 精密質量 1588.7323

血管平滑筋細胞に対する増殖促進作用、アポトーシス抑制作用は、SBSN_HUMAN[225-237]よりも強力で、NF- κ B 活性化を介して HGF、VEGF、DKK1、osteopontin、interleukin 6 など、種々の強力な増殖因子やサイトカインの産生・分泌を促進する。ヒト組織における発現は肝臓と膵臓に発現し、ヒト由来培養細胞では、血管平滑筋細胞やマクロファージ細胞に加えて、単球、マクロファージ、ケラチノサイト、肝癌由来細胞株での発現が認められた。健常人におけるヒト血中濃度は 0.3 nM であった。

SBSN_HUMAN[279-295]: GQGVHHTAGQVGKEAEK 17 アミノ酸 精密質量 1732.8725

本ペプチドは上述の SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259]とは異なり、血管系細胞をはじめ検討した各種上皮系培養細胞の中に細胞応答を示すものは見いだせなかった。しかし、摂食量・飲水量・行動量計測装置を用いてマウスの自発的行動解析を行ったところ、暗期開始前に 10 pmol の単回腹腔内投与にて 2 時間にわたり摂食量を抑制した。飲水量も抑制したが、自発運動量には影響を与えなかった。ヒト組織では中枢神経系、胃、肝臓、肺、心臓、腎臓、副腎など広範囲な臓器に発現が認められ、また、ヒト由来培養細胞では、血管平滑筋細胞やマクロファージ細胞のほか、単球、マクロファージ、ケラチノサイト、肝癌由来細胞株での発現が認められた。健常人における血中濃度は 0.6 nM であった。

以上、重要な疾患バイオマーカーとなりうる上記の 3 つの新規生理活性因子を同定するに至った。いずれもスプラバシンを共通の前駆体蛋白とし、ヒト各種主要臓器や細胞系において発現が確認され、ヒト末梢循環血液中に検出されるペプチドホルモンであった。SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259]は血管平滑筋細胞に対して NF- κ B 経路を活性化して種々の増殖因子、サイトカイン、ケモカインを誘導するユニークな作用を有する内因性因子であり、SBSN_HUMAN[279-295]は、きわめて強力な末梢性摂食抑制性ペプチドホルモンであった。これらの結果から、本研究で開発した「ヒト血漿ペプチドーム」が、未知の生理活性因子や臨床バイオマーカーを探索・同定する有用な研究方法であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshino S, Fujimoto K, Takada T, Kawamura S, Ogawa J, Kamata Y, Kodera Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular form and concentration of serum 2-macroglobulin in diabetes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49144-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hoshiyama A, Fujimoto K, Konno R, Sasaki S, Momozono A, Kodera Y, Shichiri M	4. 巻 66
2. 論文標題 Identification of plasma binding proteins for glucose-dependent insulinotropic polypeptide.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 621-628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Momozono A, Kodera Y, Sasaki S, Nakagawa Y, Konno R Shichiri M	4. 巻 10
2. 論文標題 Oxidised Met147 of human serum albumin is a biomarker of oxidative stress, reflecting glycaemic fluctuations and hypoglycaemia in diabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-57095-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shichiri M, Nonaka D, Lee L, Tanaka K	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of the salusin- receptor using proteoliposomes embedded with endogenous membrane proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17865:1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35740-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toki T, Kodera Y, Konno R, Hirata Y, Saito T, Shichiri M	4. 巻 63
2. 論文標題 A novel strategy to identify autoantigens by proteomic analysis of plasma IgG-bound proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 99:e1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/jelectroph. 63.99	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino S, Takada T, Fujimoto K, Shiono T, Shichiri M	4. 巻 49
2. 論文標題 Serum 2-macroglobulin levels in ischemic heart disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kitasato Medical Journal	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshiyama A, Fujimoto K, Konno R, Sasaki S, Momozono A, Kodera Y, Shichiri M	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of plasma binding proteins for glucose-dependent insulinotropic polypeptide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 e1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ18-0472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチド及びその使用	発明者 七里眞義 小寺義男	権利者 学校法人 北里 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2020-217311	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小寺 義男 (Kodera Yoshio) (60265733)	北里大学・理学部・教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関