

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659452

研究課題名(和文) 褐色細胞組織に存在する新規生理活性ペプチドの系統的探索

研究課題名(英文) Systematic survey for biologically active peptides in pheochromocytoma tissue.

研究代表者

北村 和雄 (Kazuo, Kitamura)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50204912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では我々が独自に開発した検索法で生理活性ペプチドの系統的検索をヒト褐色細胞腫のペプチド分画で実施した。その結果、50以上のペプチドの単離・構造解析を行った。また、ヒト尿からBig angiotensin-25を内在性ペプチドとして発見し、測定系も確立した。さらに、測定系を確立し健常人や腎実感患者で尿中濃度を検討し、診断薬としての有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have performed the systematic survey for biologically active peptides in human pheochromocytoma tissue, using assay systems which we had originally established. We have purified and determined more than 50 peptides from human pheochromocytoma tissue. We discovered Big angiotensin-25 from human urine as an endogenous peptide. Further we have developed the assay system for Big angiotensin-25.

研究分野：医師薬学

キーワード：褐色細胞腫 受容体 新規生理活性ペプチド cAMP アミド化 血管作動性物質 Big angiotensin-25  
ラジオイムノアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムの解析が進み、遺伝子側からもいくつかの生理活性ペプチドの候補が明らかとなってきた。しかし、生体から取り出された生理活性ペプチドは、多くのものがアミド化やアシル化あるいは特異的プロテアーゼでの切断等の翻訳後の修飾を受けており、これらの修飾が生理活性の発現に重要である。これらの翻訳後修飾は遺伝子側からの解析では、推定が困難である場合が多く、本研究で行うようなペプチド側からの検索が極めて重要である。本研究では、ヒト褐色細胞種で産生される生理活性ペプチドに的を絞り、複数の検索法で生理活性ペプチドの網羅的かつ系統的検索を推進する他の施設では行われていない特色ある研究である。

## 2. 研究の目的

我々は、副腎髄質由来のヒト褐色細胞腫組織のペプチド分画を血小板の cAMP 増加活性を指標に系統的に探索することで、アドレノメデュリン (AM) を発見した。この課程で、ヒト褐色細胞種では、他にも未知の多くの生理活性ペプチドが産生されている可能性があり、ペプチド濃度が高く、精製が容易であることを知り得た。生理活性ペプチド発見のためには、ペプチドの精製や構造解析法とともに、生理活性ペプチドを検出するアッセイ法が重要である。本研究では我々が独自に開発した次の3つの検索法で生理活性ペプチドの系統的検索を推進する。(1) 副腎髄質由来の培養細胞 (TGW) の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索。(2) C末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索。(3) アンジオテンシン (Ang) 関連ペプチドの系統的検索。これらの検索法を用いることで、ヒト褐色細胞腫組織から新規生理活性ペプチドを発見したい。また、褐色細胞腫組織に加えて、ヒト尿や胎盤のペプチド分画からも同様なアッセイ系でペプチドの探索を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト褐色細胞腫組織からのペプチド分画の調製法、精製・構造決定法に関しては、アドレノメデュリンや PAMP を褐色細胞腫組織から発見した時に用いた方法を用いた。すでに、手術時に得られた褐色細胞腫より、ペプチドを抽出後、除蛋白と脱塩操作でペプチド分画を調製しており、このペプチド分画を本研究の出発材料とした。一方、新規生理活性ペプチドの発見を実現するためには、精製・構造解析法以外に、生理活性ペプチド探索のためのアッセイ法が重要となる。本研究では我々が独自に確立した次の3つの検索法で生理活性ペプチドの系統的かつ網羅的検索を推進した。(1) 副腎髄質由来の培養細胞 (TGW) の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索。(2) C末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索。(3) アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索。これらの検索法を用いることで、ヒト褐色細胞腫組織からアドレノメデュリンと PAMP に続く、新たな生理活性ペプチドの発見を目指す。また、褐色細胞腫組織に加えて、ヒト尿や胎盤のペプチド分画からも(1)~(3)のアッセイ系でペプチドの探索を行った。

## 4. 研究成果

アドレノメデュリンはラット血小板中の cAMP の増加活性を指標に発見できた。副腎髄質には未知の生理活性ペプチドが存在し、その多くのものが副腎髄質に作用している可能性がある。我々は副腎髄質由来の培養細胞 (TGW) の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索の cAMP 増加を指標にしたアッセイ法を確立し、新規生理活性ペプチドの探索をすすめた。50以上の生理活性ペプチドの単離・構造解析に成功したが、精製されたペプチドは VIP, CGRP, アドレノメデュリン等のペプチドが修飾を受けた物であることが判明した。今後は、ラジオイウムノアッセイや LC/MS を組み合わせることで既知の生理活性ペプチドを除外して新たな生理活性ペプ

チドの発見をめざしたい。

一方生理活性ペプチドの特徴の一つに、C末のアミド構造があげられる。我々は、以前ペプチドのC末がアミド化されていることを指標に、ペプチドの検索を行い、ブタ心房から amidicin を単離・構造決定した。amidicin は心臓、腎臓等の循環器組織の高濃度存在し、新たな循環調節因子としての可能性が示された。興味深いことに、ヒトの褐色細胞腫にも amidicin が高濃度存在しちることを明らかにし、その精製をと構造解析をおこなった。さらに、ヒト amidicin のラジオイムノアッセイを確立し、血中にも循環していることを明らかにした。C末のアミド構造を指標に他の生理活性ペプチドの探索を進め、10以上のペプチドの精製を終了して構造解析をおこなったが、既知の生理活性ペプチドないし構造蛋白の一部がアミド化された物であり、生理活性ペプチド候補となるものは発見できなかった。

Ang のN末を認識するラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて、2006年にラット小腸より、アンジオテンシン I(AngI)のC末に2個のアミノ酸が付加した AngI-Leu-Tyr を内在性の強力な昇圧ペプチドとして発見し、プロアンジオテンシン-12(proang-12)と命名した。proang-12 は、ラット各組織において、AngI や Ang より高濃度存在していることから、組織 Ang 解明のカギとなるペプチド分子であることが示唆されている。本研究では Ang のN末を認識する RIA を用いて、ヒト褐色細胞腫組織に存在するアンジオテンシン関連ペプチドを系統的に単離した。その結果、ラット proang-12 に当たるものはヒトにはほとんど存在せず、Ang と別の分子型が主要なものであることが判明した。この活性はヒト胎盤や尿にも大量に存在しており、ヒト尿から単離構造解析をおこなった。精製したペプチドは 25 個のアミノ酸からなり、14 番目に 9 個の糖が結合しており、18 番目のシステインにはシステインが付加した構造であった。我々は、このペプチドをビ

ッグアンジオテンシン-25 ( Big angiotensin-25、略名 Bang-25 )と名付けた。さらに、Bang-25 の測定系を確立し健常人や腎疾患患者で尿中濃度を検討し、診断薬としての有用性を明らかにした。

## 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 24 件 )

- [1] Y. Matsuura, A. Yamashita, T. Iwakiri, C. Sugita, N. Okuyama, K. Kitamura, Y. Asada, Vascular wall hypoxia promotes arterial thrombus formation via augmentation of vascular thrombogenicity, *Thromb Haemost* 114 (2015). [査読有]
- [2] S. Kawano, Y. Kawagoe, K. Kuwasako, S. Shimamoto, K. Igarashi, M. Tokashiki, K. Kitamura, J. Kato, Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain, *Endocr Connect* 4 (2015) 43-49. [査読有]
- [3] S. Sakamoto, T. Tsuruda, K. Hatakeyama, T. Imamura, Y. Asada, K. Kitamura, Impact of age-dependent adventitia inflammation on structural alteration of abdominal aorta in hyperlipidemic mice, *PLoS One* 9 (2014) e105739. [査読有]
- [4] K. Kubo, M. Tokashiki, K. Kuwasako, M. Tamura, S. Tsuda, S. Kubo, K. Yoshizawa-Kumagaye, J. Kato, K. Kitamura, Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol, *Peptides* 57 (2014) 118-121. [査読有]
- [5] S. Koyama, T. Tsuruda, T. Ideguchi, J. Kawagoe, H. Onitsuka, T. Ishikawa, H. Date, K. Hatakeyama, Y. Asada, J. Kato,

- K. Kitamura, Osteoprotegerin is secreted into the coronary circulation: a possible association with the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy, *Horm Metab Res* 46 (2014) 581-586. [査読有]
- [6] J. Kawagoe, T. Ishikawa, H. Iwakiri, H. Date, T. Imamura, K. Kitamura, Association between adiponectin production in coronary circulation and future cardiovascular events in patients with coronary artery disease, *Int Heart J* 55 (2014) 239-243. [査読有]
- [7] T. Iwakiri, Y. Sato, Y. Matsuura, K. Hatakeyama, K. Marutsuka, A. Yamashita, S. Fujimoto, K. Kitamura, Y. Asada, Association between renal vasculature changes and generalized atherosclerosis: an autopsy survey, *J Atheroscler Thromb* 21 (2014) 99-107. [査読有]
- [8] K. Nishihira, K. Hatakeyama, Y. Shibata, K. Kitamura, Y. Asada, Organized thrombus in aspirated coronary materials can predict in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction, *Circ J* 77 (2013) 1275-1280. [査読有]
- [9] K. Nishi, S. Fujimoto, S. Hisanaga, O. Ogawa, K. Kitamura, Electrocardiographic assessment of incident atrial fibrillation in hemodialysis patients, *Ther Apher Dial* 17 (2013) 16-23. [査読有]
- [10] S. Nagata, K. Hatakeyama, M. Asami, M. Tokashiki, H. Hibino, Y. Nishiuchi, K. Kuwasako, J. Kato, Y. Asada, K. Kitamura, Big angiotensin-25: a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine, *Biochem Biophys Res Commun* 441 (2013) 757-762. [査読有]
- [11] K. Kuwasako, D.L. Hay, S. Nagata, M. Murakami, K. Kitamura, J. Kato, Functions of third extracellular loop and helix 8 of Family B GPCRs complexed with RAMPs and characteristics of their receptor trafficking, *Curr Protein Pept Sci* 14 (2013) 416-428. [査読有]
- [12] H. Komura, I. Nomura, K. Kitamura, K. Kuwasako, J. Kato, Gender difference in relationship between body mass index and development of chronic kidney disease, *BMC Res Notes* 6 (2013) 463. [査読有]
- [13] S. Hoshiko, M. Kawaguchi, T. Fukushima, Y. Haruyama, K. Yorita, H. Tanaka, M. Seiki, H. Inatsu, K. Kitamura, H. Kataoka, Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a suppressor of intestinal tumorigenesis, *Cancer Res* 73 (2013) 2659-2670. [査読有]
- [14] S. Ashizuka, H. Inatsu, K. Inagaki-Ohara, T. Kita, K. Kitamura, Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for inflammatory bowel disease, *Curr Protein Pept Sci* 14 (2013) 246-255. [査読有]
- [15] A. Yamashita, K. Nishihira, Y. Matsuura, T. Ito, K. Kawahara, K. Hatakeyama, T. Hashiguchi, I. Maruyama, H. Yagi, M. Matsumoto, Y. Fujimura, K. Kitamura, Y. Shibata, Y. Asada, Paucity of CD34-positive cells and increased expression of high-mobility group box 1 in coronary thrombus with type 2 diabetes mellitus, *Atherosclerosis* 224 (2012) 511-514. [査読有]
- [16] T. Tsuruda, K. Hatakeyama, S. Nagamachi, Y. Sekita, S. Sakamoto, G.J. Endo, M. Nishimura, M. Matsuyama, K.

- Yoshimura, Y. Sato, T. Onitsuka, T. Imamura, Y. Asada, K. Kitamura, Inhibition of development of abdominal aortic aneurysm by glycolysis restriction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (2012) 1410-1417. [査読有]
- [17] T. Toida, K. Fukudome, S. Fujimoto, K. Yamada, Y. Sato, S. Chiyotanda, K. Kitamura, Effect of lanthanum carbonate vs. calcium carbonate on serum calcium in hemodialysis patients: a crossover study, *Clin Nephrol* 78 (2012) 216-223. [査読有]
- [18] K. Sakata, T. Tsuruda, T. Imamura, K. Kitamura, Postinfarction dissecting intramyocardial haematoma in a patient treated with immunosuppressant, *BMJ Case Rep* 2012 (2012). [査読有]
- [19] Y. Matsuura, K. Hatakeyama, T. Imamura, T. Tsuruda, Y. Shibata, T. Kodama, K. Kitamura, Y. Asada, Different distribution of pentraxin 3 and C-reactive protein in coronary atherosclerotic plaques, *J Atheroscler Thromb* 19 (2012) 837-845. [査読有]
- [20] K. Kuwasako, K. Kitamura, S. Nagata, N. Nozaki, J. Kato, Characterization of the single transmembrane domain of human receptor activity-modifying protein 3 in adrenomedullin receptor internalization, *Biochem Biophys Res Commun* 420 (2012) 582-587. [査読有]
- [21] K. Kuwasako, D.L. Hay, S. Nagata, T. Hikosaka, K. Kitamura, J. Kato, The third extracellular loop of the human calcitonin receptor-like receptor is crucial for the activation of adrenomedullin signalling, *Br J Pharmacol* 166 (2012) 137-150.
- [22] Y. Komatsu, N. Kida, N. Nozaki, K. Kuwasako, S. Nagata, K. Kitamura, J. Kato, Effects of proangiotensin-12 infused continuously over 14 days in conscious rats, *Eur J Pharmacol* 683 (2012) 186-189. [査読有]
- [23] J. Kato, N. Yokota, N. Tamaki, S. Kariya, T. Kita, T. Ayabe, T. Eto, K. Kitamura, Differential blood pressure reductions by angiotensin receptor blocker plus calcium channel blocker or diuretic in elderly hypertension with or without obesity, *J Am Soc Hypertens* 6 (2012) 393-398. [査読有]
- [24] T. Iwakiri, Y. Yano, Y. Sato, K. Hatakeyama, K. Marutsuka, S. Fujimoto, K. Kitamura, K. Kario, Y. Asada, Usefulness of carotid intima-media thickness measurement as an indicator of generalized atherosclerosis: findings from autopsy analysis, *Atherosclerosis* 225 (2012) 359-362. [査読有]
- [学会発表] (計 9 件)
- [1] K. Kubo, M. Tokashiki, K. Kuwasako, M. Tamura, S. Tsuda, S. Kubo, K.K. Yoshizawa, J. Kato, K. Kitamura: Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol. The European Society of Cardiology Congress 2014, 2014-9/3, Barcelona (Spain).
- [2] K. Kitamura: Twenty years from adrenomedullin discovery: From basic study to translational research. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9/10, ホテルグランヴィア京都(京都府・京都市).
- [3] K. Kuwasako, K. Kitamura, S. Nagata, J. Kato J: Novel functions of two G protein-coupled receptor kinases: their marked inhibitory effect on

- adrenomedullin type 1 receptor signaling. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9/10, ホテルグランヴィア京都(京都府・京都市).
- [4] S. Nagata, K. Kitamura: Big angiotensin-25: a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9/10, ホテルグランヴィア京都(京都府・京都市).
- [5] 北村和雄, 永田さやか: アンジオテンシン関連ペプチドの新展開. 第37回日本高血圧学会総会, 2014年10月17日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- [6] 永田さやか, 北村和雄: アンジオテンシノーゲンの14番目アミノ酸に結合するN型糖鎖の構造解析. 第37回日本高血圧学会総会, 2014年10月17日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- [7] S. Nagata, K. Hatakeyama, M. Asami, H. Hibino, Y. Nishiuchi, K. Kuwasako, J. Kato, Y. Asada, K. Kitamura: Big angiotensin-25: a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. 第36回日本高血圧学会総会, 2013年10月24日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).
- [8] 永田さやか, 北村和雄: ヒト尿中の主要なアンジオテンシン関連ペプチド Big angiotensin-25 の単離・同定. 第36回日本高血圧学会総会, 2013年10月24日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).
- [9] 北村和雄: アドレノメデュリンの診断薬・治療薬としての可能性. 第16回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2012年11月23日, 東京大学本郷キャンパス(東京都・文京区).

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

- [1] 名称: 長時間作用型アドレノメデュリン誘導體  
発明者: 北村和雄, 加藤丈司, 久保恵是, 桑迫健二, 久保茂, 熊谷久美子  
権利者: 国立大学法人宮崎大学  
種類: 特許  
番号: 特願2014-058225  
出願年月日: 2014年3月20日  
国内外の別: 国内(海外も予定)
- [2] 名称: 新規ペプチドおよびその用途  
発明者: 北村和雄, 永田さやか, 浅田祐士郎  
権利者: 国立大学法人宮崎大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2013/080614  
出願年月日: 2013年11月6日  
国内外の別: 国内, 米国, 欧州

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/medicin1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 50204912

### (2) 研究分担者

桑迫 健二 (KUWASAKO KENJI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授

研究者番号: 20381098

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)

宮崎大学・医学部・特任助教

研究者番号: 00452920