

学位論文

「ヒト血漿ペプチドームにて同定した
新規 NF- κ B 誘導因子と摂食抑制性因子」

DM17018 田口 朋

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 内分泌代謝内科学
指導教授 七里 眞義

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

血中ペプチドホルモンは本邦では長く探索研究が続けられ、多くの有用な因子が発見されてきた。古くは臓器や細胞から生理活性を指標に単離精製されてきたが、ヒトゲノムが明らかになるとオーファン受容体から遡ってリガンドを同定する逆薬理学的手法が用いられてきた。しかし 20 世紀になって脱オーファン化される受容体数は激減し、新規生理活性ペプチドもほとんど同定されなくなった。その後、バイオインフォマティクスを応用して、サリュエシンが同定されたが、ヒト血漿中のネイティブペプチドの構造決定そのものがきわめて難しいため、近年、新規因子はほとんど同定されなくなった。ヒト血漿中の蛋白成分の大部分を構成している高分子量蛋白に比較して、生理活性ペプチドやサイトカインなどの血中濃度はきわめて低い。そのため、現在の最も高精度の質量分析技術を使っても、膨大な蛋白の中からこれら未同定因子のアミノ酸構造を網羅的に決定してその中から強力な生理活性ペプチドを同定することは不可能と考えられていた。北里大学理学部プロテオミクスセンターでは、血漿中の高分子量タンパクをきわめて効率よく除去したのち、低分子量ペプチド分画の崩壊や喪失を最小化して濃縮・精製する Differential solubilization 法を開発し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析によって血中低分子量ネイティブペプチドを網羅的に多数同定することに成功した。

著者が所属する研究室ではこれまで同センターとの共同研究を継続し、血漿ネイティブペプチドの同定情報について、新規生理活性ペプチドおよび疾患バイオマーカーを探索するために構造解析を行ってきた。本邦では数多くのバイオインフォマティクス解析ツールが開発されてきたが、既知の生理活性因子の特性を有するものや、生理活性因子としての機能解析を行うことが可能であろうと推測されるアミノ酸構造を有すると考えられるネイティブペプチドを選択して化学合成しこれらの生理活性を探索した。

培養細胞を用いて細胞応答を示すペプチドを探索することと併行して *in vivo* 実験系では自由行動下マウスにおける摂餌・飲水・行動量を制御しうるペプチドを探索した結果、ヒトスプラバシンを前駆蛋白とする SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]が血管系で細胞増殖活性、抗アポトーシス作用、NF- κ B 誘導を介したサイトカイン発現誘導作用を示し、SBSN_HUMAN[279-295]は末梢性に強力な摂餌・飲水行動を示すことが明らかとなった。さらにこれら新規ペプチドの特異的抗体を作成して検討した免疫組織化学染色から、各主要臓器やヒト由来培養細胞系で広範な発現を認めた。

ペプチドーム解析は培養細胞から分泌されるペプチド分画を質量分析して同定された因子の中から従来の生理活性因子の構造的特徴を有する因子を探索して生理活性因子が同定されたことに由来する。しかし、上述のようにヒト血漿中に存在するネイティブペプチド総体を一齐に同定して得られた情報を基盤にした新規因子の発見は国際的にも例がなく本稿ではその経緯について詳説する。

目次

1. 序論	1
2. 目的	2
3. 材料と方法	2
3-1. 細胞株	2
3-2. ペプチドの合成	2
3-3. 細胞内 Ca^{2+} 変動解析	2
3-4. マウスの摂餌、飲水、運動量解析	3
3-5. 生細胞活性とアポトーシスの評価	3
3-6. リアルタイム RT-PCR	3
3-7. 受容体結合の評価	3
3-8. サイトカインアレイ解析	3
3-9. ウェスタンブロット	4
3-10. 免疫組織染色	4
3-11. 統計解析	4
3-12. 倫理上の配慮	4
4. 結果	4
4-1. スupraバシン由来ペプチドの生物学的反応のスクリーニング	4
4-1-1. 細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の変化	4
4-1-2. 摂餌、飲水、運動量の変化	5
4-2. SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]の細胞増殖、抗アポトーシス効果の評価	6
4-3. 培養細胞表面への結合の有無の評価	6
4-4. SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]の NF- κ B を介したサイトカイン誘導の評価	7
4-5. スupraバシン由来ペプチドの組織での発現評価	8
5. 考察	9
6. 総括	11
7. 今後の課題	11
8. 謝辞	12

9. 引用文献	12
10. 業績目録	14
10-1. 原著	14
10-2. 準原著・Proceedings	14
10-3. 症例、臨床治験報告	14
10-4. 著書	15
10-5. 総説・講座	15
10-6. 学会発表	15
10-7. 公開講座・教育講演	16
10-8. 研究費の取得状況	16

1. 序論

生活習慣病は血圧制御、糖代謝、脂質代謝などのホメオスタシスが破綻する状態を呈するが、これらの仕組みの適切な制御には、ペプチド性ホルモンを代表とする多彩な内因性の生理活性物質の役割が重要である。1921年に発見されたインスリンや1981年に同定されたグルカゴン様ペプチド-1は今や糖尿病治療には欠かせないペプチドホルモンである¹。また19世紀に同定された成長ホルモンは、1950年代から成人成長ホルモン分泌不全症の治療薬として治療に用いられてきた^{2,3}。古くからのペプチドホルモンの発見にはインスリンのように内分泌臓器から単離精製する方法が用いられたが、ヒトゲノムが解析されて以降はオレキシンのようにオーファン受容体から遡ってリガンドを同定する逆薬理学的手法によりいくつもの因子が同定されてきた⁴。2003年にはヒト全長濃縮 cDNA ライブラリーを基盤にバイオインフォマティクス技術を用いることで、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成される可能性が高い配列を予測して化学合成し、その機能を探索的に解析する *in silico* ペプチド探索法⁵が開発されてサリューションが同定されたが、この *in silico* ペプチド探索法は生体内には実在しないペプチド配列も推定するため、予測されたペプチドが生体内に存在することを証明する必要があった⁶。それ以後、新規生理活性ペプチドが同定されることは非常に少なくなったが、2007年に国内のグループはヒト甲状腺髄様癌由来細胞の培養上清のペプチド分画を精製して質量分析を行い、培養細胞が分泌するペプチドの網羅的同定を試み、これを「ペプチドーム解析」と呼称した⁷。生理活性因子はC末端にアミド化を有するものが多いことから、培養上清のペプチドームにより同定されたC端アミド化ペプチドにバゾプレシン分泌抑制作用があったことから、これを NERP と命名した⁷。

ヒト血漿はプロテオーム解析に必要な多くの情報を潜在的に備えているものの、血漿中の低存在量のペプチド配列を同定することはきわめて困難であり、血漿プロテオームデータベースには組織、臓器、分泌性産物由来の蛋白のトリプシン消化物の配列情報がそのほとんど全てであり、とくに血漿中に高濃度で存在する血清アルブミン(約 0.5 mM)や免疫グロブリン(約 0.2 mM)などの蛋白成分の酵素消化産物が中心である。ペプチド創薬のシーズとなるべき未知の強力な活性を有するペプチドホルモンやサイトカイン、病態を反映するはずの疾患バイオマーカーなどははるかに低濃度であり、高分子量・高存在量蛋白の 1 億分の 1 (1 pM) 程度しか存在しないものも多いため、高濃度蛋白質の存在がこれら微量成分の分析を難しくしている。そのため、内因性の血漿ネイティブペプチド配列をそのままの状態と同定する血漿ペプチドームの研究分野からは、国際的にもほとんどの研究者がすでに撤退してしまった経緯がある。

北里大学プロテオミクスセンターでは過去に血清・血漿中のペプチドならびに低分子量蛋白質を酵素消化なしで高効率に抽出し⁸、さまざまな精製・濃縮技術^{9,10}に液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)を組み合わせた超高感度血中ペプチド・低分子量蛋白質分析技術の改良を繰り返してきた。濃縮した溶出液から残余血漿蛋白を除去し、末梢血中の低分子量ペプチドを大量に同定するためのペプチド濃縮の高効率化を実現した¹¹。

北里大学発のヒト血漿ペプチドームについては、ヒト血漿中の大分子蛋白を変性除去し、

分離させた低分子量ペプチドを効率よく回収する既報の Differential solubilization 法を用い^{8,12}、精製・濃縮の過程でもペプチドの吸着を防止する様々な工夫を凝らしたうえで、溶出液の逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 分画に当たっても cyclic sampling という新たな工夫^{9,10}を凝らした上で LC-MS/MS 解析を行う。その結果、PEAKS データベース解析により低分子量ネイティブペプチドを網羅的に多数同定することに成功した¹¹。その結果、False discovery rates (FDR) 0%の同定精度でケラチン由来蛋白以外に少なくとも 7959 個のネイティブペプチド配列が確認できた。今回、上記方法で作成したネイティブペプチドライブラリーを in silico にて解析しながら選択した配列について順次、化学合成したうえでペプチドが十分溶解されているかどうかを LC-MS/MS にて確認し、これら合成ペプチドの中からバイオフィンフォマティクスにて選択した配列を化学合成したうえで生理活性の有無を探索した。その結果、新たな生理活性ペプチドを同定することに成功し、ヒト血漿ペプチドームを利用した新規ペプチド探索法として提唱することが可能となった¹¹。

2. 目的

ヒト血漿ペプチドームによるネイティブペプチドライブラリーを用いて in silico 探索を行って選択し化学合成したペプチドの生理活性スクリーニング、生理機能の探索、組織・細胞での発現解析方法を示し、ペプチドライブラリーを用いた新規生理活性ペプチド同定の新手法を明らかにする。

3. 材料と方法

3-1. 細胞株

初代培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (Promo Cell 社) を 37°C、5%CO₂ 下にて培養した¹¹。培地は、血管平滑筋細胞専用培地 (Promo Cell 社) にインスリン、血管内皮増殖因子、肝細胞増殖因子、5%非働化ウシ胎児血清を添加して用いた。

3-2. ペプチドの合成

ネイティブペプチドライブラリーから既報の方法¹¹で選択し、順次、化学合成したペプチドを溶解して LC-MS/MS 解析することにより、合成物が 99%程度以上に精製されているかどうか、そして溶媒に十分溶解されているかどうかを検証してから以下の生物学的な活性の検討に用いた。また、活性が認められた SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259] の両ペプチドについては N 末端を 5-カルボキシフルオロセイン (FAM) 標識ペプチドを化学合成した (スクラム社)。

3-3. 細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 変動解析

培養細胞に対して Fluo-4 acetoxymethyl ester (同仁化学研究所) をハンクス緩衝溶液 Ca²⁺含有で 37°C、5%CO₂ 下で 30 分間、反応させた。各合成ペプチドを培養細胞に添加し、POWESCAN HT microplate reader (Bio Tek Instruments 社) にて励起光 485nm、蛍光 535nm で解析し [Ca²⁺]_i

を計測した。さらに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を示すペプチドに対して、nicardipine 前処置にてその作用が減弱するかどうか観察した。

3-4. マウスの飲水、摂餌、運動量解析

オス C57BL/6J マウス(クレア・ジャパン社)を 22-25°C、12 時間の明暗期サイクル下、自由飲水、摂食可能な環境で飼育した。少なくとも 7 日間、生理食塩水の腹腔内注射を続けて順化させ、暗期開始 30 分前に滅菌水 100 μ l で溶解した各種合成ペプチドまたは滅菌水を非麻酔下で、27G 針にて腹腔内投与した。摂餌量、飲水量、運動量は ACTIMO-100M と付属する MFD-100(シンファクトリー社製)にて経時的に記録解析した¹³。

3-5. 生細胞活性とアポトーシスの評価

各 well に vehicle、SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]を濃度 10^{-6} M で添加し、37°C、5%CO₂ 下で 0、24、48、72 時間培養後、Cell counting kit(同仁化学研究所)を添加し、90 分、37°C で反応させた後、450nm の吸光度を測定した。

ApopTag Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit(EMD Millipore 社)を用いて、製造者の標準プロトコルに従い、TUNEL 染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710(Carl Zeiss 社)で評価した¹¹。

3-6. リアルタイム RT-PCR

TRIzol(Invitrogen 社)で細胞をホモジナイズした。クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行い、70%エタノールで洗浄し、total RNA の抽出を行った。1 本鎖 cDNA 合成キット(タカラバイオ、滋賀)を用いて、製造者の標準プロトコルに従い、tRNA から逆転写し cDNA を合成した。カパサイバー・ファストワンステップ qRT-PCR キット(日本ジェネテクス、東京)、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories 社)を使用して、PCR を行った。増幅反応は 94°C、3 分間変性し、(94°C、10 秒)→(55°C、10 秒)→(72°C、30 秒)の 40 サイクルで行った¹¹。

3-7. 受容体結合の評価

FAM 標識を行ったスプラバシン由来ペプチド(10^{-6} M)をそれぞれの培養細胞に添加し、37°C、5%CO₂ 下で 30 分間、反応させ、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。核を DAPI で染色した。LSM710 で蛍光の有無を評価した¹¹。

3-8. サイトカインアレイ解析

製造者の標準プロトコルに従い、Proteome Profiler Human XL Cytokine Arrays (R&D Systems 社)で培養上清中のサイトカイン、ケモカインの発現量を評価した。サイトカインアレイのシグナルは ImageQuant LAS 4000 digital imaging system(GE Healthcare 社)で評価し、ImageJ(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて解析した¹¹。

3-9. ウェスタンブロット

RIPA Lysis and Extraction Buffer(Thermo fisher Scientific 社)と protein inhibitors(Thermo fisher Scientific 社)で細胞を溶解した。4-20% グラジエントポリアクリルアミドゲルで蛋白質を分離した後、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンはブロッキングワシ(ナカライテスク)で 1 時間ブロッキングを行い、1 次抗体を一晩浸しシェーカーで振盪させた。TBS-T で 7 分、3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ二次抗体(1:10000)を室温で 1 時間反応させた。ECL prime(GE Healthcare 社)で化学発光させ、それぞれのバンドを ImageQuant LAS4000 で検出した。

3-10. 免疫組織染色

33 臓器のヒト組織パネルである MN0341(US Biomax 社)を用いて、各組織でのスプラバシン由来ペプチドの発現を観察した。組織試料を脱パラフィン処理し、クエン酸緩衝液(pH 6.0)中に浸し、抗原賦活化のためオートクレーブで加熱処理した。次に内因性ペルオキシダーゼ不活化のため、0.3%過酸化水素水/メタノールに浸漬した。内因性アビゲン・ビオチンブロッキングキット(ニチレイバイオサイエンス)でブロッキング処理した。SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]、SBSN_HUMAN[279-295]の特異抗体を 1%血清含有 PBS で希釈(1:1000)し、4℃、オーバーナイトした。ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体(1:3000)、60 分室温で反応後、Vectastain ABC kit(Vector Laboratories 社)を用いて、アビゲン・ビオチン・コンプレックスペルオキシダーゼ法で可視化し、DAB で発色した。その後、ヘマトキシリン染色で核染色、試料を観察した¹¹⁾。

3-11. 統計解析

データは GraphPad Prism software 5.02. を用いて、平均±SEM で記載した。多群間の比較は Kruskal-Wallis 検定を行い、事後検定として Dunn の検定を行った。2 群比較は正規性に従い、Mann-Whitney U 検定を行った。有意水準 5%未満を統計学的有意差ありとした。

3-12. 倫理上の配慮

全ての動物実験は北里大学医学部動物実験・倫理委員会によって承認された(2016-144)。手順は北里大学医学部動物実験ガイドラインに従い行った。ヒト血液検体は北里大学病院、医学部倫理委員会によって承認された(C19-245)。インフォームドコンセントは血液検体を提供した健康ボランティアから得られた。

4. 結果

4-1. スプラバシン由来ペプチドの生物学的反応のスクリーニング

4-1-1. 細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の変化

各種培養細胞に合成ペプチドを添加した結果、初代培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞にお

いて、13 アミノ酸残基 (SBSN_HUMAN[225-237]) と 17 アミノ酸残基 (SBSN_HUMAN[243-259]) の 2 つのペプチドが細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇を示し (図 1 a, b)、後者の方がその作用は強かった。カルシウム拮抗薬のニカルジピン前処置によって SBSN_HUMAN[243-259] の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用は減弱したことから、同ペプチドによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は細胞外からの Ca^{2+} 流入による可能性が考えられた (図 2 c)。

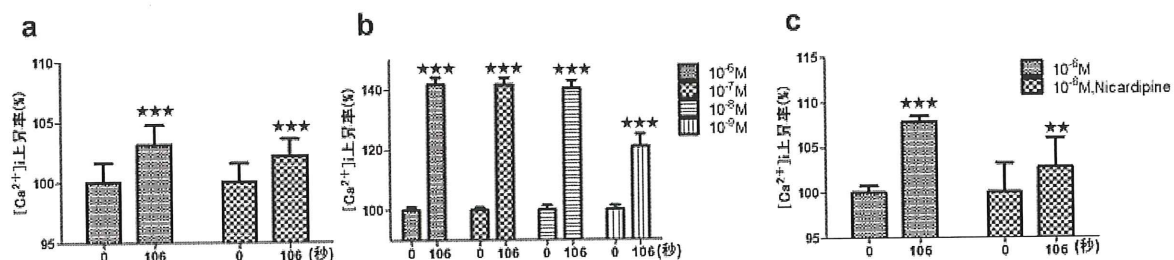


図 1. SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259] ペプチド添加前後の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の比較

培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞を Fluo-4 標識したのち、各濃度の (a) SBSN_HUMAN[225-237]、(b、c) SBSN_HUMAN[243-259] を添加し、それぞれ 0 秒と 106 秒後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を計測した。(c) SBSN_HUMAN[243-259] 刺激前に Nicardipine (10^{-5} M) を添加し、Nicardipine 非添加細胞と刺激前後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を比較した。0 秒時を 100% とした。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 。

4-1-2. 摂食、飲水、運動量の変化

マウスに合成ペプチドを順次、腹腔内投与し、摂餌、飲水、運動量に変化があるかを調べた。暗期の始まる前にペプチドを含まない滅菌水のみ、または合成ペプチド (100 pM) を腹腔内投与し、暗期全体の摂餌量、飲水量、運動量の総量を計測した。その結果、SBSN_HUMAN[279-295] の投与後、摂餌・飲水量が有意に抑制されたことが明らかとなった (図 2)。しかし、運動量には有意な変化が見られなかった。このことから SBSN_HUMAN[279-295] は摂食抑制効果を示すことが示唆された。

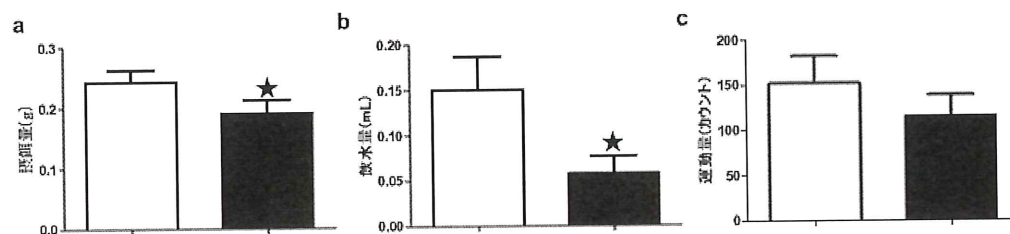


図 2. 摂餌、飲水、運動量の解析結果

暗期が開始する 30 分前に SBSN_HUMAN[279-295] を各マウスに腹腔内投与し、(a) 摂餌量、(b) 飲水量、(c) 運動量を 45 分後に測定した。棒グラフの白色は滅菌水投与群、黒色は SBSN_HUMAN[279-295] (100pM) 投与群。★ $p < 0.05$ (n=6-7)。

4-2. SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]の細胞増殖、抗アポトーシス効果の評価

SBSN_HUMAN[225-237]と SBSN_HUMAN[243-259]はヒト大動脈血管平滑筋細胞において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を誘導することから細胞増殖、抗アポトーシス効果を有することが予想されたため、これらペプチドを血管平滑筋細胞に添加後、生細胞活性、また染色体の断裂像(TUNEL染色)に変化があるか、また細胞増殖系の mRNA を誘導するかを評価した。ヒト大動脈血管平滑筋細胞に SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]を添加翌日、非添加細胞と比較し、どちらのペプチドも有意に相対的な生細胞活性が上昇した(図 3 a)。また血清除去処理後の核の断片化を観察したところ、合成ペプチド添加により明らかに抑制された(図 3 b, c, d)。また合成ペプチドをヒト大動脈血管平滑筋細胞に添加し、*c-myc* 遺伝子誘導が見られた(図 3 e, f)。以上の結果から、SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]はヒト大動脈血管平滑筋細胞において増殖効果、抗アポトーシス効果を有することが示唆された。

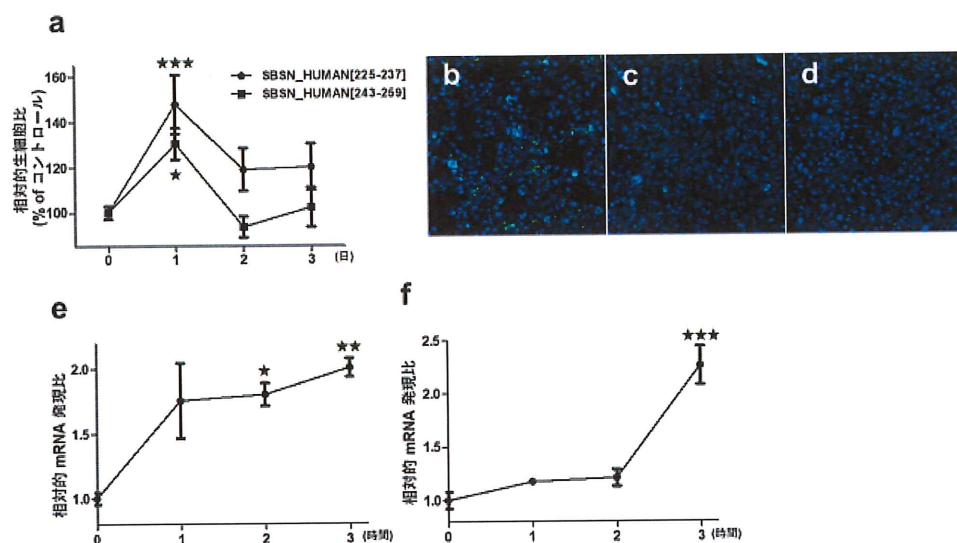


図 3. 細胞増殖、細胞死制御作用の検討

(a) ヒト大動脈血管平滑筋細胞に SBSN_HUMAN[225-237] (10⁻⁶M)、SBSN_HUMAN[243-259] (10⁻⁶M)を添加し、生細胞数の変化を観察した。(b-d) ヒト大動脈血管平滑筋細胞に血清除去処理によりアポトーシスを誘導し、TUNEL 染色で核の断片化を観察した。(b) 血清除去処理のみ、(c) 血清除去処理後 SBSN_HUMAN[225-237] (10⁻⁶M)を添加、(d) 血清除去処理後 SBSN_HUMAN[243-259] (10⁻⁶M)を添加した。青：DAPI、緑：断片化された核。(e, f) ヒト大動脈血管平滑筋細胞に SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]を添加し、0～3 時間後の *c-myc* mRNA をリアルタイム RT-PCR で評価した。(e) SBSN_HUMAN[225-237] (10⁻⁷M)、(f) SBSN_HUMAN[243-259] (10⁻⁷M)を添加した。★★★*p*<0.001、★★*p*<0.01、★*p*<0.05。

4-3. 培養細胞表面への結合の有無の評価

SBSN_HUMAN[225-237]と SBSN_HUMAN[243-259]が細胞表面に結合するかを評価した。FAM

標識 SBSN_HUMAN[225-237]および SBSN_HUMAN[243-259]を大動脈血管平滑筋細胞に添加して共焦点レーザー顕微鏡で細胞表面に結合した蛍光を評価したところ、陰性コントロールとして FAM-ペプチドを添加していない細胞では、蛍光が見られなかった(図 4 a)のに対し、ヒト大動脈血管平滑筋細胞で生理活性がみられた SBSN_HUMAN[225-237]と SBSN_HUMAN[243-259]添加細胞表面には明らかな蛍光が観察された(図 4 b, c)。

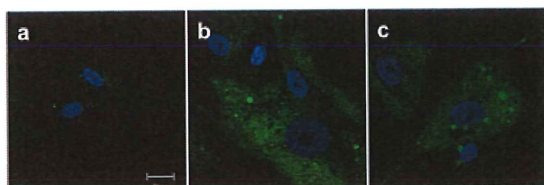


図 4. 培養細胞表面への結合の有無の結果

(a-c) ヒト大動脈血管平滑筋細胞に (a) 陰性コントロール (FAM-ペプチド非添加)、(b) FAM-SBSN_HUMAN[225-237] (10^{-6} M)、(c) FAM-SBSN_HUMAN[243-259] (10^{-6} M) を添加し、細胞表面の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で評価した。青：DAPI、緑：FAM-スプラバシン由来ペプチド。スケールバー：20 μ m。

4-4. SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]の NF- κ B を介したサイトカイン誘導の評価

SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]をヒト大動脈血管平滑筋細胞に添加し、培養上清中に発現する蛋白をサイトカインアレイで評価した。SBSN_HUMAN[225-237]は主に VEGF、DKK1、Endoglin、u-PAR、Cystatin C の産生増加が確認できた(図 5 a)。SBSN_HUMAN[243-259]は HGF、VEGF、DKK1、OPN、IL-6 の産生増加が見られた(図 5 b)。これらの結果をもとにリアルタイム PCR にて遺伝子レベルで発現の増加が見られるかを確認した。VEGFをはじめとする多くの遺伝子発現も同様に増加していた。これらサイトカインの転写誘導に nuclear factor κ B (NF- κ B)が関与していることが知られているため NF- κ B シグナルの関与を検討したところ、両ペプチド添加後の I κ B- α の崩壊が確認できた(図 5 c)。さらに VEGF の遺伝子発現においてプロテアーゼインヒビターである MG-132 の前処置によりヒト大動脈血管平滑筋細胞の VEGF の遺伝子発現が抑制された(図 5 d)。このことから、SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]のサイトカイン誘導には NF- κ B シグナルを介している可能性が示唆された。

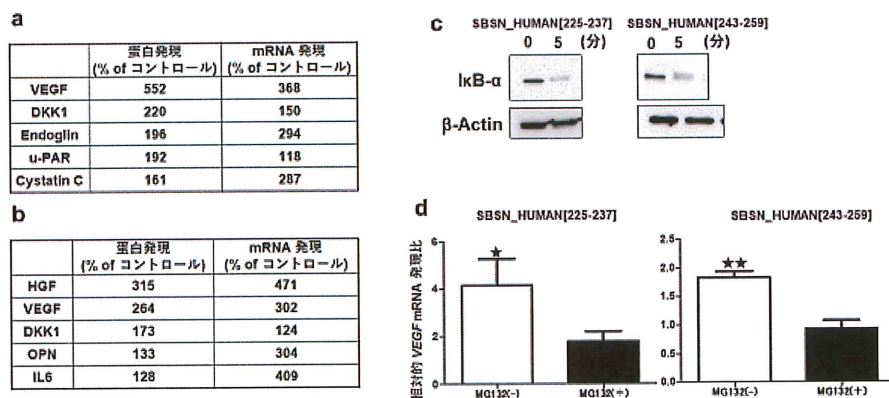


図 5. サイトカインアレイと NF κ B の誘導の結果

サイトカインアレイ、リアルタイム PCR での (a)SBSN_HUMAN[225-237] または (b)SBSN_HUMAN[243-259] による各種サイトカイン誘導。(c)SBSN_HUMAN[225-237] または SBSN_HUMAN[243-259] による I κ B- α の崩壊をウエスタンブロットで評価した。(d) ヒト大動脈血管平滑筋細胞に MG-132 で 30 分間、前処置した細胞と未処置の細胞に SBSN_HUMAN[225-237] (10^{-7} M) または SBSN_HUMAN[243-259] (10^{-7} M) を添加し、VEGF の mRNA の発現を比較した。MG-132 未処置かつ vehicle を添加した群の VEGF mRNA の発現を 1 とした。
★★ $p < 0.01$ 、★ $p < 0.05$ 。

4-5. スupraバシン由来ペプチドの組織での発現評価

抗 SBSN_HUMAN[225-237] 抗体、抗 SBSN_HUMAN[243-259] 抗体、抗 SBSN_HUMAN[279-295] 抗体で免疫組織染色を行い、各組織でのスプラバシン由来ペプチドの発現を評価した。SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[279-295] は各組織全体に発現を認めたのに対し、SBSN_HUMAN[243-259] は肝臓、脾臓のみに発現を認めた。表 1 に各組織での発現のまとめを示す。

Tissue	SBSN_HUMAN[225-237]	SBSN_HUMAN[243-259]	SBSN_HUMAN[279-295]
大脳皮質	++	-	+
下垂体前葉	+	-	++
甲状腺	-	-	+
胃	+	-	+
肝臓	++	+	++
小腸	-	-	+
大腸	+	-	+
肺	+	-	+
心臓	+	-	++
腎臓	+	-	++
脾臓	+	+	++

副腎	+	-	+
骨格筋	-	-	-
皮膚	+	-	++

表 1. 各組織の染色の結果

-:陰性、+:陽性、++:強陽性。

5. 考察

今回、国際的に始めて作成されて ProteomeXchange Consortium via the PRIDE¹⁴ を介してヒト血漿ペプチドームデータベースとして登録されたネイティブペプチドライブラリーを探索して選択し化学合成したペプチドを用いて、3 つの新規生理活性ペプチドを同定するプロセスを示した。このデータベースを利用した新規ペプチド探索法は、今後、さらに新規の生理活性ペプチドや疾患バイオマーカーの探索同定にも大いに活用できる可能性がある。

これまでに多くの新規生理活性因子が同定されてきたが、近年は新規生理活性ペプチドはほとんど同定されていない。生体組織や細胞を用いた生理活性ペプチドの同定さえ、きわめて難しいことにもいくつかの理由がある。まず、組織内の存在量そのものも非常に少ないうえに、蛋白質からの非生理的分解ペプチドが混入し、かつ生理活性ペプチドの分離を阻害されやすく、ペプチドは生体内で蛋白質分解酵素により分解されやすいことなどが挙げられる¹⁵。さらに、血液中の蛋白分画はアルブミンや免疫グロブリンなどの数少ない高分子量高存在量蛋白がそのほとんどを占拠しており、強力な生理作用を有する生理活性ペプチドの濃度は、例えば心房性利尿ペプチドなどは1億分の一程度の濃度であるにすぎない。従って、これまでの質量分析技術を駆使しても、血液から高存在量蛋白を除去して未知のペプチド性因子を同定することは不可能と考えられてきた。これまで北里大学で改良が重ねられてきたヒト血漿ペプチドームが完成するまでには、血漿中の高分子量蛋白を変性させて高次構造を変化させて沈殿させて除去する Differential solubilization 法を基盤にし、溶出に用いるアセトニトリル濃度を 70%から 80%に上げることで分子量 5000 以上の成分の除去効率をさらに向上させ¹²、低分子量ペプチド分画の崩壊や喪失を最小化するための界面活性剤の利用¹⁰、効率的でペプチドの損失の少ないシリコン製品の使用、LC-MS/MS 同定確率を向上させるための cyclic sample pooling 法を用いた逆相 HPLC による分画⁹などに加えて高精度質量分析計を組み合わせ、血中濃度が 10^{-13} M 程度にいたる微量ネイティブペプチドの構造決定が可能となった¹⁶。このようにしてトリプシン消化を経ずにペプチド本来の構造を保ったままヒトの血漿ネイティブペプチドの総体を明らかにするという試みが行われてきた。ここで同定されたペプチドが果たして血液中にそのままの分子型で存在するのかどうかという点については、安定同位体標識ペプチドを合成して血液中にスパイクし、同じ手法にて内因性ペプチドと安定同位体標識ペプチドの両者を同時同定することにより、その存在と血中濃度の測定も可能となる。今回のスプラバシン由

来ペプチドにおいてもその計測を行っており、大凡の血中濃度も測定済みである¹¹。

このようにすでに包括的かつ多量に決定されたペプチドの一次構造からなるネイティブペプチドデータベースに登録されたペプチド情報の中の非機能性の分解ペプチドの中から、重要な機能を有する内因性の活性ペプチドを同定することが新規因子の同定プロセスとなり、本稿ではそのプロセスを示した。まず網羅的に同定されたネイティブペプチドライブラリーから、過去に用いた *in silico* 解析⁵を行って、生理活性を有する可能性が高いと考えられる配列を順次、化学合成した。多くの生理活性ペプチドは G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) に結合することから、Gq α をサブユニットとした GPCR を介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に注目し、合成ペプチドを用いてスクリーニングを行った結果、SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259] が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を示した。なお、スプラバシン由来ペプチドについては細胞内 cAMP 濃度の変化も検討したが有意な変化は示さなかった。さらに *in vivo* においては SBSN_HUMAN[279-295] が自由行動下マウスにおける摂餌、飲水の抑制作用を認めた。これらの検討により最終的にスプラバシンという同じ前駆体蛋白に由来する 3 つの新規生理活性ペプチドを同定した。

今回の検討では SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259] は内因性の NF- κ B シグナル、サイトカインの誘導物質であることが明らかになった。NF- κ B シグナルは免疫グロブリン κ 軽鎖の遺伝子エンハンサー配列に結合する蛋白分子として B リンパ球の核抽出液中に発見された¹⁷。このシグナルはがん、動脈硬化性疾患や自己免疫疾患の発症に関与している¹⁸⁻²⁰。さらに SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259] は c-Myc の発現を誘導し、大動脈血管平滑筋細胞で細胞増殖、抗アポトーシス作用が見られた。なお、本稿では示していないがヒト単球白血病細胞からスプラバシン由来ペプチドが発現していることも明らかになっており¹¹、ヒト生体内での動脈硬化形成にあたり、マクロファージが血管平滑筋内に侵入して泡沫化する過程で、マクロファージから産生されたスプラバシン由来ペプチドがパラクライン作用を介して血管平滑筋に作用し、血管平滑筋細胞の増殖、さらに動脈硬化巣の形成に寄与している可能性が考えられた。またヒト大動脈血管平滑筋細胞からもスプラバシン由来ペプチドが発現がみられたことから、オートクラインにより動脈硬化層の形成に関係していることも推察されている¹¹。

今回発見したスプラバシン由来ペプチドの前駆蛋白であるヒトスプラバシンは主に表皮の有棘層から分泌され、ヒトケラチノサイトの分化マーカーとして発見された²¹。その後、癌の進行、浸潤、転移に関与している可能性があることが報告されている²²⁻²⁷。SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259] が細胞増殖作用、抗アポトーシス作用を有していることから、これらスプラバシン由来ペプチドはヒトスプラバシンの生理機能を担っている可能性がある。ヒトスプラバシンはグリシン-グルタミン-グリシンやヒスチジン-ヒスチジン-アラニン等いくつかの連続したアミノ酸配列が繰り返し出現する。これはヒトコラーゲンでも同様の特徴を備えており、アミノ酸配列を繰り返すことによって、蛋白質の安定性を保持していると考えられる。スプラバシン由来ペプチドの配列も類似したアミノ酸配列を有していることと関連し、SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259] は生理

活性の強度に差はあるものの、同じ生理機能を有していた。しかし SBSN_HUMAN[279-295] は前者 2 つとは異なり、大動脈血管平滑筋細胞には生理活性を全く示さず、摂餌、飲水作用を発揮した。この事実はこれら 3 つの共通の N 末端アミノ酸配列(グリシン-グルタミン-グリシン)以外の構造がそれぞれの活性に関与している可能性が考えられる。これは N 末端に FAM 標識を行っても、SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259] が大動脈血管平滑筋細胞に結合しえたことでも示される。さらにスプラバシン由来ペプチドは強い親水性を有していることも特徴的であった。通常、ペプチドは疎水性の強いものが多く、親水性が強いと逆相液体クロマトグラフィーの分画の際に、カラムにペプチドを拾い上げることが難しい。スプラバシン由来ペプチドは血漿中の濃度測定の際にリテンションタイムが非常に短かった。これはスプラバシン由来ペプチドが親水性の強いペプチドであることを意味し、グリシンリッチなアミノ酸配列が関連している。

低濃度(100 pM)の SBSN_HUMAN[279-295] の腹腔内投与により摂餌、飲水行動が抑制された¹¹が、摂食を司る視床下部には自律神経の調節に関与している室傍核、摂食・体重調節を行っていると考えられている背内側核、満腹中枢といわれる腹内側核、摂食中枢の外側視床下部、さらに満腹・摂食の情報を統合する神経核として弓状核が存在している。視床下部弓状核には摂食亢進系ペプチド(グレリン、ニューロペプチド Y)と摂食抑制系ペプチド(プロオピメラノコルチン)を産生しているニューロンが多数分布している²⁸。SBSN_HUMAN[279-295] は腹腔内投与で摂餌、飲水行動を抑制したことから、末梢血中に存在する SBSN_HUMAN[279-295] が中枢神経系に直接作用したか、もしくは腸管から求心性に視床下部へ間接的に作用し、摂食を抑制した可能性がある。また SBSN_HUMAN[279-295] は大脳皮質にも存在するため、中枢神経系で発現している SBSN_HUMAN[279-295] がオートクライン、パラクラインに作用していることも考えられ、複数の経路から摂食調節をしている可能性もあり、さらなる今後の検証が必要と考えられた。

6. 総括

ヒト血漿ペプチドームデータベースに登録されたネイティブペプチドライブラリーから in silico 解析にて選択した合成ペプチドの機能をスクリーニングする手法によって 3 つの新規生理活性ペプチドを同定したプロセスを詳述した。いずれもスプラバシンを前駆体とする関連ペプチドで SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]、SBSN_HUMAN[279-295] と命名した。SBSN_HUMAN[225-237] と SBSN_HUMAN[243-259] は血管平滑筋細胞増殖作用、細胞死抑制作用に加えて、NF- κ B を介した炎症誘導作用を有していた。また SBSN_HUMAN[279-295] はマウスに対して摂餌、飲水抑制作用を有していた。これらペプチドは全身の組織に発現しており、様々な疾患の病態に大きく関与している可能性があることが示唆された。

7. 今後の課題

ヒト血漿ペプチドームは新規生理活性ペプチド同定における有用性が示されたことから、

さらなる新規因子やペプチド性疾患バイオマーカーの探索への応用が期待される。さらに新規因子である SBSN_HUMAN[225-237]、SBSN_HUMAN[243-259]、SBSN_HUMAN[279-295]の病態生理学的役割や創薬シーズとしての応用が今後の重要なテーマとなる。

8. 謝辞

本論文は筆者が北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程臨床医科学群内分泌代謝内科学に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻教授 七里眞義先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表する。北里大学理学部物理学科物性物理学講座教授・理学部疾患プロテオミクスセンター センター長 小寺義男先生にはプロテオミクス研究に関する研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表する。疾患プロテオミクスセンター 斎藤 達也 様、中川 譲 様、川島 祐介 様、加藤 利佳 様、大橋 潤子 様、北里大学医学部内分泌代謝内科学 大庭 和人 様、加藤 由起子 様、藤本 和実 様には研究における多大なる技術支援を頂いた。ここに深謝の意を表する。本研究は北里大学大学院医療系研究科院生プロジェクトからの助成金により研究を行った。研究デザイン、データの収集・分析、発表の決定、原稿作成には資金提供者は関与していない。さらに、この研究のために追加の外部資金は供与されていない。

9. 引用文献

- 1 Holst, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews* **87**, 1409-1439, doi:10.1152/physrev.00034.2006 (2007).
- 2 Ranke, M. B. & Wit, J. M. Growth hormone - past, present and future. *Nature reviews. Endocrinology* **14**, 285-300, doi:10.1038/nrendo.2018.22 (2018).
- 3 Raben, M. S. Growth hormone. 1. Physiologic aspects. *The New England journal of medicine* **266**, 31-35, doi:10.1056/nejm196201042660109 (1962).
- 4 Sakurai, T. *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573-585, doi:10.1016/s0092-8674(00)80949-6 (1998).
- 5 Shichiri, M. *et al.* Salusins: newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities. *Nature medicine* **9**, 1166-1172, doi:10.1038/nm913 (2003).
- 6 Fujimoto, K. *et al.* Identification and quantification of plasma free salusin- β , an endogenous parasympathomimetic peptide. *Scientific reports* **7**, 8275, doi:10.1038/s41598-017-08288-0 (2017).
- 7 Yamaguchi, H. *et al.* Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* **282**, 26354-26360, doi:10.1074/jbc.M701665200 (2007).
- 8 Kawashima, Y. *et al.* High-yield peptide-extraction method for the discovery of

- subnanomolar biomarkers from small serum samples. *Journal of proteome research* **9**, 1694-1705, doi:10.1021/pr9008018 (2010).
- 9 Kawashima, Y. *et al.* Cyclic sample pooling using two-dimensional liquid chromatography system enhances coverage in shotgun proteomics. *Biomedical chromatography : BMC* **27**, 691-694, doi:10.1002/bmc.2864 (2013).
 - 10 Kawashima, Y. *et al.* Enhanced recovery of lyophilized peptides in shotgun proteomics by using an LC-ESI-MS compatible surfactant. *Proteomics* **13**, 751-755, doi:10.1002/pmic.201200462 (2013).
 - 11 Tomomi Taguchi, Y. K., Kazuhito Oba, Tatsuya Saito, Yuzuru Nakagawa, Yusuke Kawashima, Masayoshi Shichiri. Suprabasin-derived bioactive peptides identified by plasama peptidomics. *Scientific reports*.
 - 12 Saito, T. *et al.* Establishment and application of a high-quality comparative analysis strategy for the discovery and small-scale validation of low-abundance biomarker peptides in serum based on an optimized novel peptide extraction method. *Journal of Electrophoresis* **57**, 1-9, doi:10.2198/jelectroph.57.1 (2013).
 - 13 Nakano-Tateno, T. *et al.* Prolonged effects of intracerebroventricular angiotensin II on drinking, eating and locomotor behavior in mice. *Regulatory peptides* **173**, 86-92, doi:10.1016/j.regpep.2011.09.011 (2012).
 - 14 Vizcaíno, J. A. *et al.* ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nature biotechnology* **32**, 223-226, doi:10.1038/nbt.2839 (2014).
 - 15 斎藤祐見子、児島将康. 新規生理活性ペプチドの探索方法の進歩. *実験医学* **29**, 80-85 (2011).
 - 16 小寺, 義. 電気泳動を基盤とした体液疾患プロテオーム解析法の開発と応用. *電気泳動* **60**, 1-5, doi:10.2198/electroph.60.1 (2016).
 - 17 Sen, R. & Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716, doi:10.1016/0092-8674(86)90346-6 (1986).
 - 18 Grilli, M., Chiu, J. J. & Lenardo, M. J. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *International review of cytology* **143**, 1-62, doi:10.1016/s0074-7696(08)61873-2 (1993).
 - 19 Beg, A. A. & Baldwin, A. S., Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development* **7**, 2064-2070, doi:10.1101/gad.7.11.2064 (1993).
 - 20 Okamoto, T. NF-kappaB and rheumatic diseases. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* **6**, 359-372, doi:10.2174/187153006779025685 (2006).
 - 21 Matsui, T. *et al.* Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-alpha/beta and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13.1. *Genomics* **84**, 384-397, doi:10.1016/j.ygeno.2004.03.010

- (2004).
- 22 Formolo, C. A. *et al.* Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme. *Journal of proteome research* **10**, 3149-3159, doi:10.1021/pr200210w (2011).
 - 23 Glazer, C. A. *et al.* Integrative discovery of epigenetically derepressed cancer testis antigens in NSCLC. *PloS one* **4**, e8189, doi:10.1371/journal.pone.0008189 (2009).
 - 24 Pribyl, M. *et al.* Aberrantly elevated suprabasin in the bone marrow as a candidate biomarker of advanced disease state in myelodysplastic syndromes. *Molecular oncology* **14**, 2403-2419, doi:10.1002/1878-0261.12768 (2020).
 - 25 Alam, M. T. *et al.* Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer science* **105**, 1533-1540, doi:10.1111/cas.12549 (2014).
 - 26 Shao, C. *et al.* Suprabasin is hypomethylated and associated with metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *PloS one* **7**, e48582, doi:10.1371/journal.pone.0048582 (2012).
 - 27 Zhu, J. *et al.* Overexpression of Suprabasin is Associated with Proliferation and Tumorigenicity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Scientific reports* **6**, 21549, doi:10.1038/srep21549 (2016).
 - 28 影山晴秋、竹ノ谷文子、柴加奈子、塩田清二. ガラニン様ペプチド(GAALP)による摂食・代謝調節と肥満克服の新戦略. *実験医学* **29**, 67-71 (2011).

10. 業績目録

10-1. 原著

1. Tomomi Taguchi, Yoshio Kodera, Kazuhito Oba, Tatsuya Saito, Yuzuru Nakagawa, Yusuke Kawashima, Masayoshi Shichiri, Suprabasin-derived bioactive peptides identified by plasma peptidomics., *Sci Rep*; in press
2. Inoue Mitsuko, Hayashi Akinori, Taguchi Tomomi, Arai Riina, Sasaki Sayaka, Takano Koji, Inoue Yusuke, Shichiri Masayoshi, Effects of canagliflozin on body composition and hepatic fat content in type 2 diabetes patients with non-alcoholic fatty liver disease., *J Diabetes Investig* 2019; 10(4): 1004-1011
3. Sayaka Sasaki, Tomomi Taguchi, Yoshio Kodera, Masayoshi Shichiri, Isolation and detection of cell surface angiotensin II receptor using chemical crosslinking. *Kitasato Medical Journal*; in press

10-2. 準原著・Proceedings なし

10-3. 症例、臨床治験報告

1. 田口 朋、坂本 和太、橋本 洋、谷上 芙久子、橋本 朋子、大和田 雅彦、菅原 隆、川村 実、八重樫 弘：マラソン大会で発症した熱中症による死亡例。岩手県立病院医学雑誌 53(2):114-153 2013
2. 井上 光子、鎌田 裕二、坂東 慧、田口 朋、村田 秋穂、新井 梨衣那、佐々木 紗也加、林 哲範、高野 幸路、七里 眞義：インフルエンザワクチン接種後に発症した

急性発症 1 型糖尿病。糖尿病 62(4):214-219 2019。

3. 横山三尚、田口朋、細木 茂、松尾 哲、山崎 有人、笹野 公伸：両側副腎に片側性多発副腎皮質微小結節の病態に類似した病変を伴った顕性クッシング症候群の 1 例。ホルモンと臨床。62(11):907-916 2014。

10-4. 著書 なし

10-5. 総説・講座 なし

10-6. 学会発表

- ・田口朋：Fournier 壊疽、臀部ガス壊疽を合併した未治療 2 型糖尿病患者の 1 例。第 52 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会，2015，東京。
- ・田口朋：画像、副腎静脈サンプリング、病理所見が解離し、診断に苦慮したアルドステロン症の一例。第 88 回日本内分泌学会学術集会総会，2015，東京。（日本内分泌学会雑誌，91：396，2015）
- ・田口朋：難治性慢性膵炎急性増悪による膵液瘻を認めた MEN1 型の一例。第 26 回臨床内分泌代謝 Update，2015，神戸。（日本内分泌学会雑誌，91：833，2015）
- ・田口朋：副腎偶発腫で発見された褐色細胞腫。第 89 回日本内分泌学会学術集会総会，2016，京都。（日本内分泌学会雑誌，92：295，2016）
- ・田口朋：両側副腎偶発腫瘍で発見され、術前診断に苦慮した副腎皮質癌の一例。第 17 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会，2016，東京。（日本内分泌学会雑誌，92：295，2016）
- ・田口朋：GH 補充を終了後に骨密度の低下を来した下垂体前葉機能低下症の一例。第 43 回日本神経内分泌学会学術集会，2016，浜松。（日本内分泌学会雑誌，92：295，2016）
- ・田口朋：GH 補充に加えてヒドロコルチゾンの補充により肝酵素が低下した一例。第 27 回臨床内分泌代謝 Update，2017，神戸。（日本内分泌学会雑誌，93(2):555，2017）
- ・田口朋：集学的治療で救命しえた 1 型糖尿病ケトアシドーシスと甲状腺クリーゼの 1 例。第 55 回日本糖尿病学会関東甲信越地方会，2018，新潟。
- ・田口朋：下肢深部静脈血栓症ヘリバロキサバン開始後に下垂体卒中を呈したプロラクチノーマの一例。第 19 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会，2018，東京。
- ・田口朋：GH 欠乏を伴う若年骨粗鬆症に GH 補充を行った 3 例。第 45 回日本神経内分泌学会学術集会，2018，東京。（臨床神経内分泌優秀賞受賞）
- ・田口朋：GH 補充で速やかに脂肪肝、体組成が改善した頭蓋咽頭腫術後の一例。第 28 回臨床内分泌代謝 Update，2018，福岡。
- ・清水順也、田口朋、他：先端巨大症の治療により改善した中毒性多結節性甲状腺腫瘍の一例。第 29 回臨床内分泌代謝 Update，2019，高知。（日本内分泌学会雑誌，95(2):790，2019）
- ・大島康宏、田口朋、他：未破裂脳動脈瘤の合併を認めた先端巨大症の 1 例。第 29 回臨床内分泌代謝 Update，2019，高知。（日本内分泌学会雑誌，93(2):713，2019）
- ・田口朋：GHRP-2 負荷試験における高反応と低反応症例での GH 補充量の検討。第 20 回日本内分泌学会関東甲信越地方会，2019，東京。
- ・田口朋：バセドウ病の加療中に多発性関節炎とドケルバン病を発症した一例。第 63 回日

本甲状腺学会学術集会, 2020, 奈良.

・ 田口朋 : GH 補充療法による肝臓内脂肪への効果を IDEAL IQ 法を用いて評価した検討. 第 31 回一般社団法人日本間脳下垂体腫瘍学会, 2021, 東京.

10-7. 公開講座・教育講演 なし

10-8. 研究費の取得状況

1. 北里大学大学院 医療系研究科 平成 29 年度 院生プロジェクト