

疾患標的プロテオミクスの臨床応用による「血管を標的とした」
抗加齢医学の確立

《研究の概要》

研究目的： 秦の始皇帝の時代より、「老いない、死なない」は人類究極の願いであり、これを実現すべく「老化研究」が発展してきた。「ヒトは血管とともに老いる」といわれるように、老化に伴う血管病はその中心課題である。本研究は、老化に伴う心血管病において、蛋白質翻訳後修飾・代謝解析を用いてその病因解明・新規マーカー開発を目的とする。すなわち本心血管研究では、遺伝子解析では全く同定できない老化に伴う蛋白質機能変化を代謝・翻訳後修飾変化から検討すると共に、心血管内及び血中の蛋白質修飾・代謝産物同定を進める。これは遺伝的素因が大きい、心血管病・癌研究には非常に有効な手法である事が期待される。これらを包括的に検討するために以下の検討を行った。

- 1) 酸化ストレス標的蛋白質のプロテオミクス：酸化ストレス説は加齢を科学的に説明する重要な仮説である。そこで、我々は心筋ホモジェネートを用いて酸化ストレスで標的となるグルタチオン化蛋白質のプロテオミクス解析で、約 20 種の蛋白質を検出した。
- 2) ヒト血小板放出因子のプロテオミクスにより、約 10 種類の蛋白質を同定した。
- 3) 加齢は虚血耐性を低下させるが、カロリー制限 (CR) はこれを軽減させる。この作用にアディポネクチン/AMP-activated kinase に依存する事が判明した。
- 4) 肥満・メタボリックシンドロームは現在中高齢者の合併症として極めて重要な問題となっている。この代表的動物モデルである Zucker Rat の血管について代謝・プロテオミクス解析を行い、以下の結果を得た。a) 代謝解析にて含硫抗酸化物質の低下、アルギニン代謝の変化、メチオニン代謝の変化を認めた。b) メチオニン代謝において、メチル化供与体 S-adenosylmethionine (SAM) の著明な低下を認めた。この事はメチル化蛋白質 (Assymmetrical dimethyl arginine (ADMA) 修飾蛋白質) の減少を伴った。
- 5) Zucker Rat の血管では NO 過剰産生による血管収縮能の低下が認められた。
- 6) 加齢マウスモデルについて心筋の代謝検討を基盤として、血管機能の検討を行った。内皮機能の低下が観察され、現在機序の検討中である。
- 7) これら、代謝変化・蛋白質変化、酸化ストレスをひと血液検体での評価に translational research を計画中である。

従って、加齢に伴う心血管病に付き以上の新規知見を得た。今後それらの病態への関与に付き更なる基礎検討を行う事により、臨床応用が可能であると考えられた。

共同研究者

- 川田 浩志 東海大学医学部 内科 准教授
研究の統括、加齢関連因子、臨床的評価
- 足立 健 防衛医科大学校 第一内科循環器 准教授
(前慶應義塾大学 医化学 准教授)
プロテオミクス解析、代謝解析、血管生物学
- 後藤 信哉 東海大学医学部 内科 教授
加齢が血小板血栓症に及ぼす影響、血小板血栓イメージング
- 新村 健 慶應義塾大学医学部 内科 講師
加齢心保護を目指した特異的治療法の開発
生理活性物質による細胞内シグナルの検討
- 佐野 元昭 慶應義塾大学医学部 内科 講師
加齢マウスモデルにおける血管機能障害

研究報告

I 研究目的

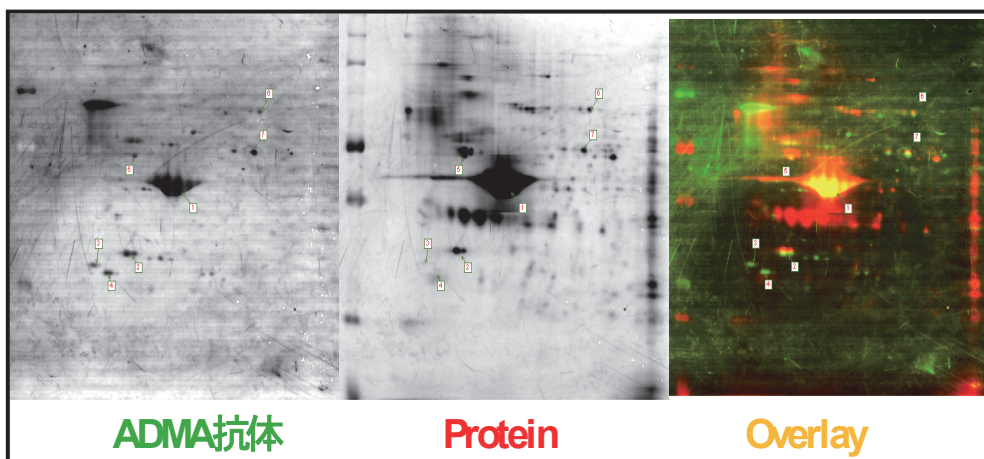
秦の始皇帝の時代より、「老いない、死なない」は人類究極の願いであり、これを実現すべく「老化研究」が発展してきた。「ヒトは血管とともに老いる」といわれるように、老化に伴う血管病はその中心課題である。本研究は、老化に伴う心血管病において、蛋白質翻訳後修飾・代謝解析を用いてその病因解明・新規マーカー開発を目的とする。足立は米国ボストン大学 NIH proteomics Center において酸化修飾プロテオミクスの手法を開発した。それを本研究目的である加齢による心血管内酸化修飾解析(グルタチオン化、ニトロソ化、亜硫酸化修飾検出)に応用する。特に、慶應義塾大学医科学研究棟内に設立したプロテオミクス研究室で、Ettan Dige 法を用いた二次元電気泳動のディファレンシャル解析装置と、同ビル内の MALDI-TOF Mass Spectrometry (MS)、Liquid Chromatography (LC) MS/MS を駆使して循環器疾患プロテオミクスの推進を行なった。加齢による動脈硬化症は典型的な後天性疾患であり、食生活、運動を含む生活習慣の要因が強く関与し、これらは細胞内代謝変動をもたらす。従って、細胞内レドックスやエネルギー産生系が強く関与する酸化修飾に加え、アミノ酸代謝が関与するメチル化修飾、糖・脂質代謝が関与するアセチル化修飾は、現代の心血管病の危険因子として最大の問題である加齢・肥満に深く関わっており、メチル化、アセチル化修飾蛋白質のプロテオミクス解析を推進する。また、蛋白質翻訳後修飾は代謝と深く関わっており、代謝解析も合わせて行なう。従って、本心血管研究では、遺伝子解析では全く同定できない老化に伴う蛋白質機能変化を代謝・翻訳後修飾変化から解析すると共に、心血管内及び血中の蛋白質修飾・代謝産物同定を進める。これは遺伝的素因が大きい、心血管病・癌研究には非常に有効な手法である事が期待される。また、血栓性動脈硬化疾患を考えるに当たり、血小板機能の加齢変化は重要な要因であり、血小板放出因子の評価も行なう。カロリー制限 (CR) は加齢に伴う心血管病に対する最も有効な治療法であり、虚血性心臓病についてその機序を検討する。すなわち本心血管研究では、遺伝子解析では全く同定できない老化に伴う蛋白質機能変化を代謝・翻訳後修飾変化から解析すると共に、心血管内及び血中の蛋白質修飾・代謝産物の同定を行い、病態マーカー検索と病態の機序に付き検討を行う。これは遺伝的素因が大きい、心血管病・癌研究には非常に有効な手法であると想定される。

II 研究計画及び材料と方法

1 プロテオミクス解析

1) 量的プロテオミクス解析・二群の発現量の違う蛋白質の同定：(足立、川田) 加齢により細胞内局所での蛋白質発現量がどのように変わるかは重要な課題である。また、蛋白質翻訳後修飾を比較するに当たり、その発現が違うものは比較が困難であり、予備的に検討する必要がある。これについて、Differential Display 法を用いて蛋白質の二次元マッピングを行なった。この方法に細胞・組織の分画化を組み合わせた。加齢に伴い、細胞膜NADPH oxidase (Adachi et al. Circ Res 2007)、ミトコンドリア呼吸鎖からの活性酸素放出が増大していることについては多数の報告があり、細胞膜・ミトコンドリア膜上の蛋白質局在の違いは新たな老化の病理につながる可能性が想定された。

図1：血管内メチル化修飾蛋白質の EttanDige 法による質的プロテオミクス：蛋白質を Cy5-Dye (赤) で蛍光染色した後に、二次元電気泳動法で分離し、抗メチルアルギニン抗体によりメチル化蛋白質を Cy2-蛍光 (緑) で蛍光染色した。蛍光二重染色によりメチル化の起こっている蛋白質のマッピングを成功した。



2) 質的プロテオミクス解析・蛋白質翻訳後修飾解析： 足立は独自の Ettan Dige を用いた二次元電気泳動法による蛋白質翻訳後修飾解析のシステムを開発した。(図1)この方法により、血管内のメチル化アルギニン修飾蛋白質の検出法を確立し、プロテオーム解析を行った。蛋白質の二次元マップをメンブレン上で蛋白質を Cy5-Dye (赤) で、メチル化アルギニン (ADMA : Asymmetrical Dimethyl-Arginine) に対する特異的抗体による二次元ウェスタン・ブロットを ECL-PLUS (Cy2:緑) で蛍光染色する事により、修飾蛋白質のマッピングを可能にした (図1)。メチル化を受けた蛋白質は同時に用意したゲルから切り出し、LC/MS/MS で同定を行った。この方法はアセチル化蛋白質の同定にも用いた。

2. ex vivo flow chamber を用いた血管壁と血球細胞の相互作用のイメージングと血管の老化に関与する血球細胞の役割の検討 (後藤、足立) 後藤らは、ヒト血液を用いた ex vivo 実験により、血管内皮細胞と血球細胞の相互作用を3次元イメージングすることを可能とする装置を確立した (Goto S, et al. J Am Coll Cardiol, 2005, 2006)。本法は小動物の in vivo 実験への応用も可能である (Kimura Y, et al. Thromb Res, submitting)。血管の内層に存在する血管内皮細胞には常に、血小板、白血球などの血球細胞が接着し、ころがりながら全身を循環している。血小板は濃染顆粒、 α 顆粒などに蓄積したセロトニン、CD40 Ligand, 各種サイトカインなどを刺激に応じて局所放出し、血管内皮細胞の機能に影響を与えている。核を有する白血球細胞は血管内皮との相互作用の過程で組織因子、サイトカインなどを細胞内で産生することにより、さらに複雑な血管機能調節に関与している。これら血球細胞から局所放出される物質の役割は従来十分に検討されていなかった。

1) 加齢時の抗血小板剤の薬効評価： 人高齢者の血小板、もしくは動物加齢モデル (Fisher Rat, mADH

欠損マウス)の血小板を用いる事により、上記薬剤の高齢者における有効性の評価を行う。若年者で認められたと同様に、血小板凝集抑制効果は少ないものの、コラーゲン受容体GPVI, ADP受容体P2Y₁, P2Y₁₂の阻害により *ex vivo*の血栓形成が強く抑制できる事が、高齢者にも適応されるか否かを検討した。**2) 血小板放出因子のプロテオーム解析**: 血小板を高張り応力に曝露して活性化させ、活性化血小板の放出する物質が血管・虚血性心筋傷害に影響を与えるか否かを明らかにする。以前、後藤等は活性血小板がIL-10を放出する事を見出した。同様に活性化血小板が放出した蛋白質を含むmediumを濃縮して、プロテオミクス解析を行なった。

3. 摘出灌流心を用いた虚血再灌流傷害軽減効果の評価 (新村・足立)

本申請は加齢による血管病を対象中心としているが、高齢者の動脈血栓性疾患の最終標的臓器は脳、心臓(心筋細胞)であり、冠動脈閉塞とそれに伴う再還流障害に与える加齢の影響は、本申請の最終テーマである高齢者のQOL改善のための最重要事項である。また、血液-冠動脈-心筋の間で取り交わされる情報伝達機構の加齢変化が、虚血時の心機能低下に関与していることも想定される。従って、加齢動物モデルを用いて心筋虚血再還流障害を作成して、加齢関連心筋保護因子、有効薬剤評価を行い、細胞内シグナル伝達機構の探索から加齢時の心筋保護に関与する分子機構を解明する。

若年および加齢ラット、マウスを用いる。麻酔下に心臓を摘出し、Langendorff 手技を用いて心臓を95%O₂/5%CO₂ガスで飽和した Krebs-Henseleit 緩衝液により灌流する。バルーンつきカテーテルを左室内に挿入し、左室拡張末期圧 10 mmHg の際の左室内圧、その微分成分である dp/dt、心拍数を測定する。30分の完全虚血後、120分間の再灌流を作成し、左室機能の回復の程度、灌流液中のCK、LDHの逸脱量、TTC染色による心筋梗塞サイズを指標とし、虚血再灌流傷害の程度を評価する。加齢心に加えて受容体、細胞内シグナルの一部をノックアウトしたマウスや過剰発現させたマウス心を用いることにより、臓器レベルでの虚血保護に至る細胞内シグナリングを検討した。

4. プロテオーム解析を用いたカロリー制限療法における抗加齢効果仲介因子の解明 (新村・足立) 老化制御の観点からこれまでに開発されてきたさまざまな抗老化療法のなかで、遺伝子改変を除き、多くの動物種で再現性を持って抗老化効果を認めた唯一のinterventionは、カロリー制限(CR)である。CRとは、栄養失調を起こさない程度のカロリー制限を生涯継続する一種の栄養療法であり、一般に食餌摂取量を自由摂取群から30 - 50%まで制限する。このカロリー制限は、平均及び最長寿命を大幅に延長するばかりか、癌などの老化関連疾患の発症を抑制し、加齢による臓器虚血耐性低下を改善する。最近の基礎老化研究の成果から、その機序として、酸化ストレスの軽減やIGF-1-成長ホルモン系抑制を機軸としたストレス応答とエネルギー応答の変化を推測しているが、その詳細な分子メカニズムは充分には解明されていない。新村はCRによる虚血耐性獲得がアディポネクチン・AMP-activatedキナーゼ経路に依存することを発表した。(Shinmura, Circulation, 2007) 本研究ではこの知見をさらに発展させて、プロテオーム解析によりCRの標的リン酸化蛋白質の同定の為に、アディポネクチン・AMP-activatedキナーゼの下流標的をプロテオーム解析する。また、CRは細胞内代謝変化により引き起こされるメチル化、アセチル化修飾を大きく変化させることが想定される。特に、ヒストン脱アセチル化酵素 Sirt 1の活性化は抗加齢に働くことが多数報告されている。従って、心筋代謝の中心をなすミトコンドリア内蛋白質のアセチル化修飾蛋白質のプロテオミクス解析を、CR・加齢マウスの心筋に行なった。

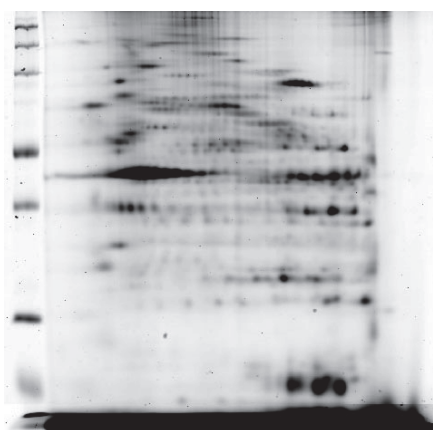
5. 加齢が血管機能に及ぼす影響(足立、佐野): 血管機能低下は加齢における血管障害に深く関わる。20世紀のVascular Biologyの発展により、内皮依存性血管拡張の低下が血管障害の最も鋭敏な指標である事が明らかとなった。血管の張力測定器により加齢による内皮機能変化や、上述の新規加齢関連因子・薬物の血管機能に与える影響を検討する。特に、ミトコンドリア・アルデヒド・デヒドロゲナーゼ変異

(DAL) マウスは、若年から加齢phenotype(骨粗鬆症、脱毛、痴呆)が進行する貴重なモデルである。しかも、生存期間が短縮しない事から、未知の抗加齢因子が働いている可能性がある。本年度は、DALマウスにおける心筋の抗加齢作用について代謝の側面から研究を報告した。(Endo et al., Circ Res 2009) 佐野、足立はこのモデルを含む加齢動物モデルにおける血管機能の変化、及び血管機能に関わる因子の解明に努める。また、この加齢マウスとApo-Eノックアウトマウスとの交配により加齢動脈硬化症モデルを製作して、その血管障害について検討を進める。

6. 加齢に伴う心血管内代謝産物解析 (メタボローム解析の応用) (足立、佐野) : NADPH oxidaseやミトコンドリア呼吸鎖から発生するフリーラジカルは、加齢に伴い蛋白質チオール酸化修飾を引き起こす。抗酸化能の検出のためにGSH/GSSGや各種酸化ストレスマーカーについてHPLC測定を用いて行う。特に防衛医科大学内に設置されたクールアレー法は様々な酸化ストレスマーカーや抗酸化物の測定が可能である。加齢、肥満によるエネルギー代謝変化評価のために、ATP/ADP/AMP測定法も確立した。また、細胞内メチル化を評価するために、その基質であるメチオニン、S-アデニルメチオニン (SAM)、S-アデニルホモシステイン (SAH)、ホモシステインの測定系と、メチル化アルギニン (ADMA/SDMA/L-NMMA) の測定系を確立した。これらを駆使して、心血管の代謝解析を行ない、加齢が代謝に及ぼす影響を検討する。これらの代謝変化は細胞内蛋白質翻訳後修飾に直接影響を与えられられる。

7. 加齢による血管障害関連因子の血液マーカーの開発 (川田、後藤、足立、新村) 本研究は、プロテオミクスと代謝解析を駆使した加齢血管病標的蛋白質と有効薬剤の評価を細胞・動物レベルで行うと共に、その臨床応用を評価する Translational Research を目的とする。昨年度より代謝解析が加わり、ホモシステイン上昇、SAMの低下、ADMA上昇、アミノ酸分布変化が加齢血清で変わると考えられた。そこで、高齢心不全患者、また加齢クリニック患者の血清を用いて、代謝産物、蛋白質、酸化ストレス測定を行ない、基礎研究を臨床応用へ結びつける。

III 研究成果 1 プロテオミクス解析: グルタチオン化蛋白質のプロテオミクス解析: (図2)



No.	Score	Cover		mass	pI
1	602	41%	Actin, aortic smooth muscle	41982	5.23
2	118	8%	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	85380	7.87
3					
4	204	19%	Heat shock protein HSP 90-beta	83229	4.97
	150	8%	Heat shock protein HSP 90-alpha	84762	4.93
5	142	29%	Vimentin	53700	5.06
6	203	18%	Tubulin beta-2C chain	49769	4.79
	178	19%	Tubulin beta-5 chain	49639	4.78
	127	16%	Tubulin beta-2A chain	49875	4.78
	127	16%	Tubulin beta-2B chain	49921	4.78
7					
8	229	14%	Alpha-actinin-1	102896	5.23
	175	12%	Alpha-actinin-4	104849	5.27
9					
10					
11	324	28%	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	59717	9.22
12	35	2%	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, mitochondrial precursor	116221	6.30
13	38	2%	Gelsolin precursor	86014	5.76
14	41	8%	14-3-3 protein epsilon	29155	4.63
15	73	5%	Serum albumin precursor	68686	6.09
16	149	10%	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35805	8.14
17	151	37%	Transgelin	22588	8.87
18					
19	252	22%	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	59717	9.22
20	448	39%	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	56318	5.19
21					
22					
23	57	18%	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	56493	6.63
24					
25	116	14%	Calponin-1	33323	8.92

図2. 心筋ホモジェネートにおける in vitro グルタチオン化蛋白質の LC/MS/MS 解析

加齢には酸化ストレスが強く関与していることが示唆されている。酸化ストレスは心血管内蛋白質のグルタチオン化に働く。グルタチオン蛋白質の同定は老化のマーカーとなると共に、その分子機構に関与する重要課題である。そこで、われわれはラット心筋内グルタチオン化蛋白質のプロテオミクス解析を行った。GSH-Beads と心筋ホモジェネートを混合後 peroxynitrite (100 microM) を加えてグルタチオ

ン化蛋白質を Beads 上で作成した。(Adachi et al. Nat Med 2004) DTT 処理で蛋白質を放出後、二次元電気泳動 で分離を行った。Sypro-Ruby 蛍光染色後、スポットを切り取り、トリプシン消化、LC/MS/MS 法にて解析を行った。解析は昨年よりさらに進んだ。興味深いことに、ミトコンドリア蛋白質 (Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase, ATP synthase) を含む代謝酵素が心筋のチオール標的蛋白質として同定された。心筋の加齢変化が代謝と深く結び付いていること、虚血再還流にミトコンドリアからの活性酸素種による酸化ストレスが関与することを考えると、加齢心筋疾患とミトコンドリアのチオール酸化との関連が示唆された。

図3 血管内メチル化蛋白質

2) 血管内メチル化アルギニン蛋白質のプロテオミクス解析：(図 1、3) アルギニンのメチル化修飾 (ADMA 修飾) は様々な蛋白質に起こることが示唆されているが、その詳細は不明である。また、その Degradation Product の Free ADMA は内因性の NO 合成酵素阻害物質として知られており、心血管病、腎疾患と深い関係がある。そこで、我々は血管内 ADMA 修飾蛋白質のプロテオーム解析を行った。血管の homogenate を Cy5 で蛋白質蛍光染色後二次元展開をして PVDF 膜に Transfer を行った。抗 ADMA 抗体によるウェスタン・ブロットを Cy2 蛍光 で取り込み二重蛍光をイメージングとして取り込み、メチル化蛋白質のマップを作成した (図 2)。これに基づき、蛍光染色したゲルから対応する spot を切り取り、トリプシン消化して LC/MS/MS 解析を行った。その結果、骨格蛋白質、カルシウム制御、代謝制御に働く蛋白質が同定された。肥満ではメチル化が低下傾向にあったが、個々の蛋白質での検討が必要である。特に、14-3-3、HSP90/70、PDI 等のインスリンシグナル関連分子も同定されている。

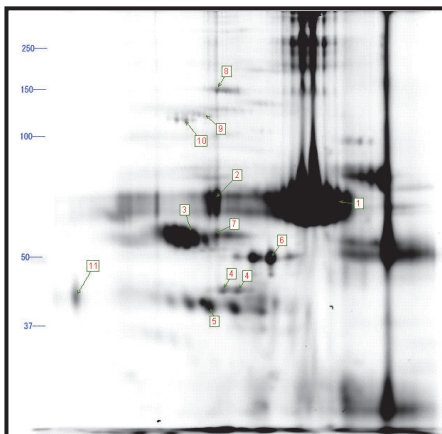


図3. 血小板放出因子のプロテオミクス解析：右は上清中の蛋白質を濃縮後二次元展開し、蛋白質の蛍光染色を行った。主要なスポットを切り取り、ペプチド消化後、日立 Nanoflow LC/MS/MS システムで測定後 Mascot Server にて蛋白質の同定を行った。

2. 血小板放出蛋白質プロテオミクス

ヒト血小板をずり応力で刺激した際の medium を集めて濃縮し、アセトン沈殿後二次元電気泳動で分離を行った。Sypro-Ruby で蛍光染色を行い、主要なスポット切り取り、トリプシンにより消化してペプチドを得た。日立 Nanoflow LC/MS/MS システムで測定後 Mascot Server にて蛋白質の同定を行った。この検索から、約 13 個の蛋白質が血小板 Medium 液中に同定された。なかでも Vitamin D-binding Protein (VDUP) は近年抗酸化酵素チオレドキシシン (TRX) を阻害することから、Redox control の役割を果たすことが示唆されている。ずり応力や、血栓形成に血小板や内皮における活性酸素種が働くことが多くの報告で示唆されており、血小板-内皮間の活性酸素種を介した Redox-signal に関与することが想定される。

3. 摘出灌流心を用いた虚血再灌流傷害軽減効果の評価

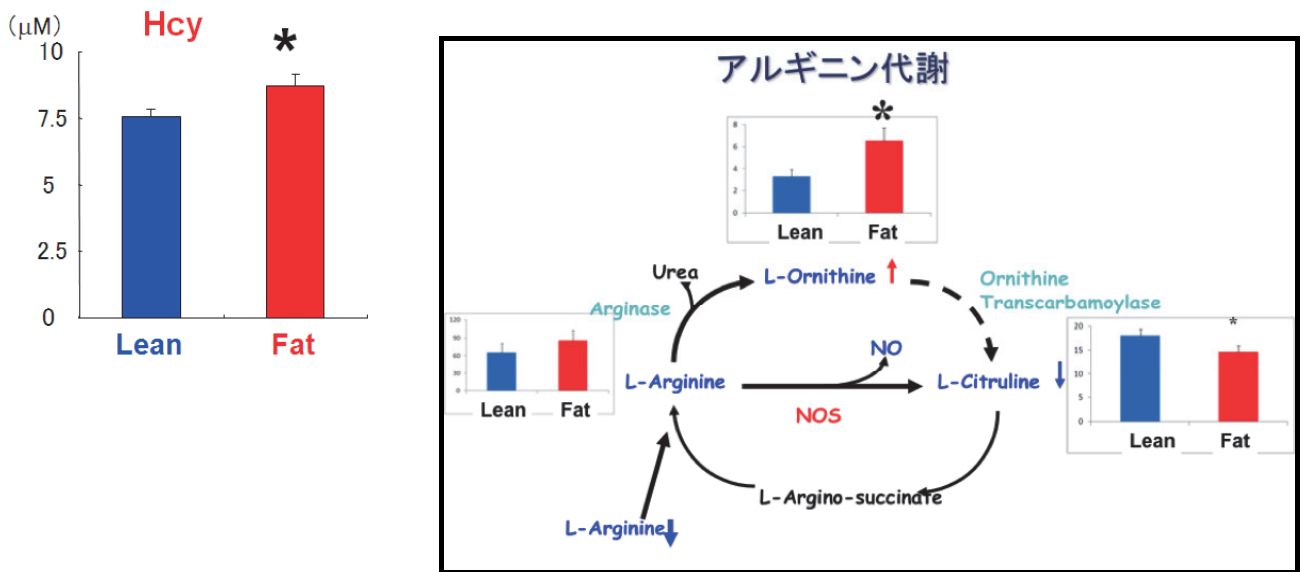
4 加齢心筋内ミトコンドリア アセチル化蛋白質のプロテオミクス解析:2)と同様に加齢心筋からミトコンドリアを抽出してアセチル化(リジン残基)蛋白質の解析を行った。Voltage-dependent anion channels, Cytochrome oxidase, Complex I, ATP synthase 等にアセチル化が起こっていることが判り、現在解析を続けている。これらのアセチル化が加齢で若年より亢進するか否か、CRで低下するか否かに付き更に検討中である。

5. 加齢血管での代謝解析 DAL マウスの血管リングを用いて、アセチルコリン及び Spermine NO/NOate による血管拡張反応を検討中である。DAL マウス(20週)では、これらの血管拡張反応が著明に低下している。これらのデータを蓄積すると共に、加齢の内皮機能低下が酸化ストレス、アルデヒド修飾と関連するか否かを検討する。アルデヒドはチオール修飾を引き起こすことから、1)で認めたチオール修飾蛋白質が老化内皮機能低下に関与するか否かを検討する。

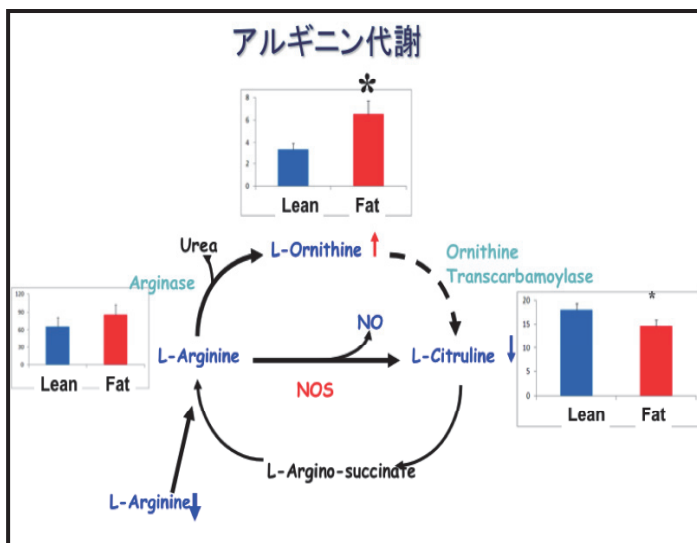
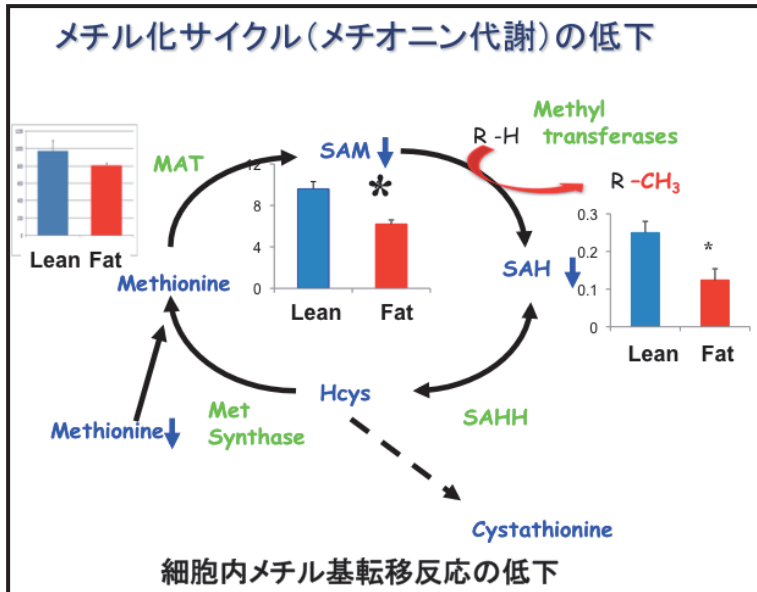
6. メタボローム解析

加齢血管のメタボローム解析術に先駆けて、肥満ラットの血液・血管内代謝の解析を行った。肥満動物では血液中のホモシステイン濃度の上昇を認めた。ホモシステインは加齢、腎機能低下に伴い上昇することが知られている。また、高ホモシステイン血症は低メチル化を起こすことも知られており、加齢に伴う蛋白質低メチル化に関与している可能性がある。これらを考え、本年は血管内のメタボローム解析術を行い、以下のデータを得た。

図4 肥満血管での高ホモシステイン血症



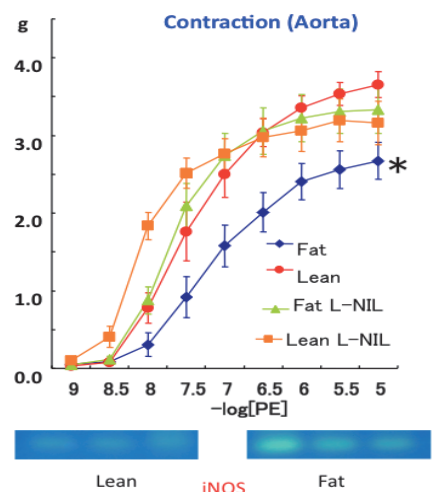
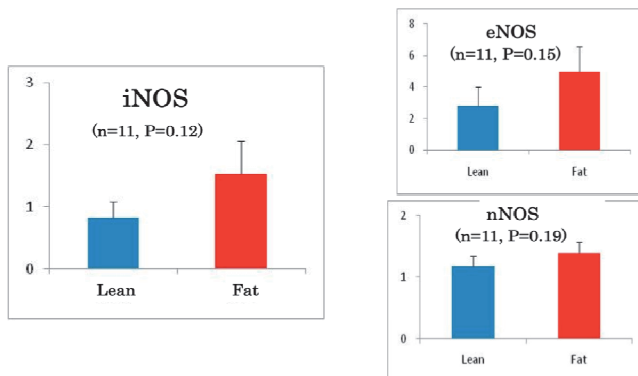
a) 血管内 GSH、hypotaurine の低下、b) オルニチンの上昇、シトルリンの低下等のアルギニン代謝の変化、c) S-adenylmethionine (SAM) の低下が認められた。このうち、a) は酸化ストレス、酸化修飾に関与し、c) は低メチル化に関与すると考えられた。



5) iNOS の関与

大動脈リングを用いて PE による血管収縮を検討した。MS では血管収縮の低下を認めた。iNOS 阻害剤 L-Nil 投与後その差は消失した。RT-PCR 法で iNOS 発現を検討した所、上昇する傾向にあり iNOS からの ROS/RNS が病態に関わった可能性が示唆された。

NO合成酵素の発現 (RT-PCR)



V 研究成果の発表

研究代表者 1 川田 浩志 (東海大学医学部内科 准教授)

1. Nishizaki Y, Kuwahira I, Kawada H, Kubo A, Kataoka K, Tanaka S, Sueno T, Isozaki M, Kobayashi H, Nakamura Y, Tanino R, Ishii N, Inoko H. Beneficial Effects of Medical Advice Provided to Elderly Persons under the Anti-Aging Health Check-Up System at Tokai University Tokyo Hospital. Tokai J Exp Clin Med. 2009;34:142-51.
2. Imai M, Watanabe M, Suyama K, Osada T, Sakai D, Kawada H, Matsumae M, Mochida J. Delayed accumulation of activated macrophages and inhibition of remyelination after spinal cord injury in an adult rodent model. J Neurosurg Spine. 2008;8:58-66.
3. Tsuboi K, Kawada H, Suzuki R, Murayama H, Ohmachi K, Nakamura N, Ogawa Y, Ando K. Granulocytic sarcoma of the prostate presenting with urinary obstruction which progressed to acute myeloid leukemia. Rinsho Ketsueki. 2008;49:1562-5.
4. Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Okamura K, Fukagawa S, Tsuboi K, Kikuchi A, Kobayashi H, Shintani A, Ogawa Y, Kawada H, Hotta T, Ando K. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia in an unselected patient population. Int J Hematol. 2007;86:422-8.
5. Fujita J, Mori M, Kawada H, Ieda Y, Tsuma M, Matsuzaki Y, Kawaguchi H, Yagi T, Yuasa S, Endo J, Hotta T, Ogawa S, Okano H, Yozu R, Ando K, Fukuda K. Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. Stem Cells. 2007;25:2750-9.
6. Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Fukagawa S, Tsuboi K, Kobayashi H, Shintani A, Ogawa Y, Kawada H, Hotta T, Ando K. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. Br J Haematol. 2007;138:624-31.
7. Morita Y, Takizawa S, Kamiguchi H, Uesugi T, Kawada H, Takagi S. Administration of hematopoietic cytokines increases the expression of anti-inflammatory cytokine (IL-10) mRNA in the subacute phase after stroke. Neurosci Res. 2007;58:356-60.
8. Ieda Y, Fujita J, Ieda M, Yagi T, Kawada H, Ando K, Fukuda K. G-CSF and HGF: combination of vasculogenesis and angiogenesis synergistically improves recovery in murine hind limb ischemia. J Mol Cell Cardiol. 2007;42:540-8.

(著書)

1. 川田浩志 (単著) 『見た目が若いと長生きする 35歳からのアンチ・エイジング 15のルール』(筑摩書房) 印刷中
2. 川田浩志 (単著) 『ドクター由美の脳力育成 HACKS!』(ディスカヴァートゥエンティワン) 2010年
3. 川田浩志 (単著) 『健康 HACKS!』 (ディスカヴァートゥエンティワン) 2009年
4. 川田浩志 (共著) 『ヘルスケアプロフェッショナルのためのアンチエイジング Q&A』 医歯薬出版 2009年
5. 川田浩志 (監修) 『特定健診 そのあとに...』(保健同人社) 2008年

6. 川田浩志 (監修) 『なりたい自分 BOOK』 (保健同人社) 2008 年
7. 川田浩志 (単著) 『サクセスフルエイジングのための 3 つの自己改革』 (保健同人社) 2007 年
8. 川田浩志 (共著) 『専門医がやさしく教える 老化判定&アンチエイジング』 (PHP 研究所) 2007 年

共同研究者 1 足立 健 (防衛医科大学第一内科学教室 准教授)

- 1) N. Takano, T. Yamamoto, **T. Adachi**, M Suematsu; Assessing a shift of glucose biotransformation by LC-MS/MS-based metabolome analysis in carbon monoxide-exposed cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010;662:101-7
- 2) Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, **Adachi T**, Nakamura H, Ohsuzu F. High plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with unstable angina. *Atherosclerosis.* 2009 209(1):206-10
- 3) Tanaka K, Ito M, Kodama M, Hoyano M, Kimura S, Mitsuma W, Hirono S, **Adachi T**, Watanabe K, Nakazawa M, Aizawa Y. Long-term Carperitide Treatment Attenuates Left Ventricular Remodeling in Rats With Heart Failure After Autoimmune Myocarditis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 54(3):232-9
- 4) Okamura K, Ito M, Tanaka K, Chinushi M, **Adachi T**, Mitsuma W, Hirono S, Nakazawa M, Kodama M, Aizawa Y. Comparative effects of olmesartan and azelnidipine on atrial structural remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology.* 2009;83(6):360-366.
- 5) **Adachi T** and Ohsuzu F. Cosmic effects of rosuvastatin in COSMOS. *Circ J* 2009 73(11):2015-6
Endo J, Sano M, **Adachi T**, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. et al. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ Res.* 2009 105(11):1118-27
- 6) X.Y. Tong, J. Ying, D. Pimentel, M.P. Trucillo, **T. Adachi**, R.A. Cohen; High glucose oxidizes SERCA Cysteine-674 and prevents inhibition by nitric oxide of smooth muscle cell migration. *J Mol Cell Cardiol.* 44(2):361-369, 2008.
- 7) M. Yamamoto, Y. Izumi, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, M. Kohno, M. Watanabe, M. Kawamura, **T. Adachi**, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi; Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res, in press*, 2008.
- 8) M Nakagawa, S. Hori, **T. Adachi**, K. Miyazaki, S. Inoue, M. Suzuki, H. Mori, H. Nakazawa, N. Aikawa, S. Ogawa: Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels prevent extension of myocardial ischemia to subepicardium during hemorrhagic Shock. *Shock*, 30(2): 178-183, 2008.
(TA is the correspondence author)
- 9) Y. Yukutake, S. Tsuji, Y. Hirano, **T. Adachi**, T. Takahashi, K. Fujihara, P. Agre, M. Yasui, M Suematsu; Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporine-4-reconstituted proteoliposomes. *Biol Cell*, 100(6): 355-363, 2008.

共同研究者 2 後藤信哉 (東海大学医学部内科 教授)

- 1) Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S.

- Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl₃-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(6):807-14.
- 2) Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, Uchiyama S, Ikeda Y. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(6):878-87.
- 3) Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S, Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010 Jan;31(1):17-28.
- 4) Goto S, Toda E. Antiplatelet therapy after coronary intervention in Asia and Japan: the Asian perspective of antiplatelet intervention. *Hamostaseologie.* 2009 Nov;29(4):321-5.
- 5) Cacoub, T, Abola MT, Baumgartner I, Bhatt DL, Creager MA, Liao CS, Goto S, Röther J, Steg PG, Hirsch AT, on behalf of the REACH Investigators Cardiovascular risk factor control and outcomes in peripheral artery disease patients in the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Atherosclerosis*, in press
- 6) Mehta RH, Bhatt DL, Steg PG, Goto S, Hirsch AT, Liao CS, Röther J, Wilson PW, Richard AJ, Eagle KA, Ohman EM; on behalf of the REACH Registry Investigators. Modifiable risk factors control and its relationship with 1 year outcomes after coronary artery bypass surgery: insights from the REACH registry. *European Heart J.* (2008) 10:1093-11018
- 7) Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, and Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of effi cacious platelets from mouse embryonic stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, 205: 1917-27, 2008
- 8) Angiolillo DJ, Capranzano P, Goto S, Aslam M, Desai B, Charlton RK, Suzuki Y, Box LC, Shoemaker SB, Zenni MM, Guzman LA, Bass TA. A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: results of the OPTIMUS-2 study. *European Heart Journal.* 2008, in press 29 : 2202-11,2008
- 9) Goto S, Bhatt DL, Röther J, Alberts M, Hill MD, Ikeda Y, Uchiyama S, D'Agostino R, Ohman EM, Liao CS, Hirsch AT, Mas JL, Wilson PWF, Corbalán R, Aichner F, Steg PG, on behalf of the REACH Registry Investigators. Prevalence, Clinical Profile and Cardiovascular Outcomes of Atrial Fibrillation Patients with Atherothrombosis. *Am Heart J.* 2008;156:855-863.
- 10) Li M, Zhao MQ, Kumar SS, Xie LX, Zhang HX, Kum WF, Goto S, and Liao FL. Protective effect of tetramethylpyrazine and salvianolic acid B on apoptosis of rat cerebral micorvascular endothelial cell under high shear stress. *Clin Hemorl Microcirc* 38:177-187, 2008
- 11) Origasa H, Goto S, Uchiyama S, Shimada K, Ikeda Y, and J-TRACE Investigators. The Japan Thrombosis Registry for Atrial fibrillation, Coronary or Cerebrovascular Events (J-TRACE): A nation-wide, prospective large cohort study; The study design. *Circulation Journal* in press
- 12) Roether J, Alberts MJ, Touzéc E, Mas JL, Hill MD, Michele P, Bhatt DL, Aichner FT, Goto S, Matsumoto M, Ohman EM, Okada Y, Uchiyama S, D'Agostinom R, Hirsch AT, Wilson PWF, Steg PG, on behalf of the REACH Registry Investigators. Risk Factor Profile and Management of Cerebrovascular Patients in the REACH Registry. *Cerebrovascular Disease*, 25(4) 366-374, 2008
- 13) Liu CL, Xie LX, Duralrajan SSK, Li M, Goto S, Huang JD, Salvianolic acid B inhibit hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling. *Plos One* 2 (12), e1321

共同研究者 3 新村 健 (慶應義塾大学医学部内科 助手)

- 1) Li Q, Guo Y, Ou Q, Cui C, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Lanceta LB, Sanganalmath SK, Dawn B, Shinmura K, Rokosh GD, Wang S, Bolli R. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase affords cardioprotection by upregulating heme oxygenase-1 via a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Circulation*. 2009 Sep 29;120(13):1222-30.
- 2) Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1477-88.
- 3) Shinmura K, Tamaki K, Bolli R. Impact of 6-mo caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Dec;295(6):H2348-55.
- 4) Shinmura K, Tamaki K, Saito K, Nakano Y, Tobe T, Bolli R. The cardioprotective effect by short-term caloric restriction is mediated by adiponectin via the activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 2007 Dec 11;116(24):2809-2817.
- 5) Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Bolli R. Loss of ischemic preconditioning in ovariectomized rats: Possible involvement of impaired protein kinase C ϵ phosphorylation. *Cardiovasc Res* 2008 Aug 1;79(3):387-94.
- 6) Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Aug 15;373(1):30-5.

共同研究者 4 佐野 元昭 (慶應義塾大学医学部再生医学教室 講師)

- 1) Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsuhashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2009 Nov 20;105(11):1118-27.

主な発表

- 1) 足立 健; 血管内皮細胞におけるガス分子による Akt 調節; 第 25 回 Cytoprotection 研究会, 2007 年 3 月 9 日.
- 2) 足立 健; 血管病における一酸化窒素・一酸化炭素による蛋白質翻訳後修飾; 第 17 回脳血管シンポジウム, 2007 年 9 月 1 日.
- 3) T. Adachi, M. Suematsu; Post-translational protein modifications modulated by NO and CO. 4th International Redox Meeting. 2007 Nov 1st
- 4) T. Yamamoto, N. Takano, T. Iwabuchi, T. Adachi, M. Suematsu; Role of stress-inducible CO in

regulation of protein methylation and metabolism. Nobel Forum Symposium for Global COE Program "Gas biology in medicine" 2007 Nov, Stockholm, Sweden

- 5) N. Takano, T. Yamamoto, T. Iwabuchi, **T. Adachi**, M. Suematsu; CO regulates glucose metabolism via protein arginine methylation. Global COE Satellite Symposium "Metabolic Systems Biology and Liver Disease" 2007 Oct, Tokyo, Japan.
- 6) **T. Adachi**; Post-translational oxidative modifications in redox-sensitive mechanism. 第33回日本微小循環学会 2008年2月21日. 東京 (邦文)
- 7) T. Yamamoto, N. Takano, T. Iwabuchi, T. Hishiki, **T. Adachi**, M. Suematsu; CO regulates the glucose metabolism via protein methylation. 第33回日本微小循環学会 2008年2月21日 東京 (邦文)
- 8) **T. Adachi**, M. Suematsu; Global COE for humanoid metabolomics system Biology. GCOE symposium in UC Davis 2008年4月10日
- 9) **T. Adachi**; Hypomethylation of aortic proteins in metabolic syndrome. GCOE symposium in UC Davis 2008年4月10日
- 10) **T. Adachi**, M. Kajimura, T. Yamamoto, M. Suematsu; Vascular Effects of Carbon Monoxide; Symposium in 8th Nitric Oxide Society of Japan, 2008年5月9日 (邦文)
- 11) T. Adachi, M. Yamamoto, K. Ishiwata, S. Ikeda, Y. Hirayama, T. Soga, M. Suematsu; Characterization of Vascular Metabolism in Zucker Rat **10th MOVD 2009, 3rd June Matsushima, Miyagi, Japan**
- 12) 足立 健, 曾我 朋義, 末松 誠; 心血管病における代謝解析術の応用
第4回 埼玉 PPAR 研究会学術講演会 2009年12月1日高脂血症における酸化ストレス標的蛋白質の
プロテオミクス解析 小野医学研究財団、第18回 研究成果発表会 2007年6月2日.
- 13) Application of metabolome for cardiovascular pathophysiology; CVI seminar, Department of Medicine, Boston University, 7th March 2008.
- 10) Applications of metabolome analysis for cardiovascular diseases. Global COE, Summer School Lecture, 2008 Aug, Tokyo, Japan.
- 14) メタボローム解析術の血管生物学への応用 第2回 **Fantasy** 研究会 2009年2月15日
- 15) 酸化ストレスの血管病への関与, トトロの会 2009年3月5日
- 16) 酸化ストレスと蛋白質翻訳後修飾 第3回 腎、心、脳関連の会 2009 7月 1日
- 17) 酸化ストレス、代謝異常と心血管病 所沢医師会 2009年10月19日
- 18) 酸化ストレス、アミノ酸代謝異常と心血管病 動脈硬化研究会 2009 11月7日