

にて検出した。その結果、わずか 1 回のパンニングにより TNF- α 発現ファージの割合が飛躍的に増大し、BIAcore を用いたパンニングによって、wtTNF- α 発現ファージが選択、濃縮されていることが確認された(図 24)

上記の結果は、TNF- α のような高分子たんぱく質を、ファージの外殻たんぱく質上に融合たんぱく質として発現させることが可能であり、さらに発現したたんぱく質が、結合活性を保持した状態で発現していることを示唆するものである。現在までのところ、ファージディスプレイ法を用いて、サイトカインなどの機能性たんぱく質をファージ表面へ発現させ得た例は我々がはじめてで、他には皆無である。本ファージディスプレイ法を用いることで、種々ターゲットへの(Biacore)パンニングなどが可能となったことから、今後種々疾患関連たんぱく質の活性・機能の解析が強力に推進出来るものと期待される。

さて TNF- α は、BCG 感作マウスにリポ多糖を投与した際に血液中に検出され、さらに Meth-A 繊維芽肉腫の出血壊死を惹起する生理活性物質として見いだされたが、*in vitro*において腫瘍細胞に対しては細胞傷害性を示すものの、正常組織細胞に対しては細胞傷害性を示さないことから、夢の抗がん剤として期待されつつも、臨床応用が断念された。これは、体内安定性の乏しさから大量頻回投与を余儀なくされ、全身投与において発熱、悪心、嘔吐、血圧低下、消化管障害、エンドトキシン様ショックなどの副作用を引き起こしてしまうため、その投与量は抗腫瘍効果に必要な量の 1/5~1/25 にまで減量せねばならず、期待通りの抗腫瘍効果が得られなかったためであり、その医薬品化は殆ど断念されかけていた。しかし、局所投与、組織灌流による投与では顕著な抗腫瘍効果が認められ、特に欧州ではその医薬品開発が再進行中であり、TNF- α の全身投与を可能とする創薬技術(薬物動態制御技術)の確立が待望されている。一方で TNF- α は、炎症メディエーターの一つとして、慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎といった自己免疫疾患などの発症、悪化と密接に関わ

っていることが示されており、「がんに対する医薬品シーズ」としてばかりでなく、「炎症性疾患に対する創薬ターゲット」としても注目されている。そこで本研究では、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の機能解析基盤を確立しようとする観点から、モデルたんぱく質として TNF- α を選択し、ファージ表面提示法を利用することで、まず TNF- α の構造変異体(アミノ酸置換体)ライブラリの作製を図った。すなわち、本検討では、II)-③で後述するように、医薬品シーズとしてのたんぱく質の安全性と有効性を確保できる基盤技術(体内におけるたんぱく質動態制御技術)の開発を念頭に(N 末端アミノ基を標的としたたんぱく質の PEGylation 方法の開発)、TNF- α 中に含まれる全 6 個のリジン残基を他のアミノ酸へ網羅的に置換した構造変異体ライブラリを作製した。

図 4 に示す方法で、ヒト wtTNF- α の全リジン残基を 20 種類のアミノ酸へ網羅的に一挙置換した構造変異 TNF- α をファージ g3p 先端に提示したライブラリを作製した。まず、第一回目の PCR により、Lys65、Lys90、Lys98 をコードしたコドン、全てのアミノ酸をコードし得る NNS 配列(N=A/T/G/C、S=G/C)に置換した 162bp の PCR 断片を作製した。この PCR 断片を用いた第二回目の PCR によって Lys112、Lys128 のコドンも NNS 配列に置換された 251bp の PCR 断片を得た。さらに、この断片をプライマーとして用い、ヒト wtTNF- α 遺伝子をテンプレートとして用いた第三回目の PCR により、TNF- α の 6 個のリジン残基が全て NNS 配列に置換された 463bp の PCR 断片を得た。この構造変異 TNF- α をコードした PCR ライブラリを、ファージミドベクターに組み込むことにより、全リジン残基がランダムなアミノ酸に置換された構造変異 TNF- α を発現するファージライブラリを作製した。その後、最適条件で大腸菌への形質導入、ファージ作製を行うことで、理論的ライブラリサイズ(20⁶種類=約 6000 万種類)に匹敵した質の高い構造変異体ライブラリの作製に成功した。このファージライブラリを用い、上述の最適化されたパンニングや BIAcore 解析を行ったところ、異

味深いことに TNF- α 中に含まれる全 6 個のリジン残基が他のアミノ酸に置換されているにも関わらず、wtTNF- α と同等以上の生物活性やレセプター親和性を保持した 2 種類のリジン欠損 TNF- α を見出した(表 9)。以後、この 2 種類のリジン欠損体を mTNF- α -K90R、mTNF- α -K90P と記す。これら両リジン欠損 TNF- α の pI 値は wtTNF- α と比較し大幅に減少しており、さらにたんぱく質表面電荷を GRASP 法により確認したところ、その表面電荷は明らかに負電荷を帯びていることが示唆された(図 25)。また TNF- α 特有の生物活性を評価するため、可溶性の mTNF- α -K90R もしくは mTNF- α -K90P を含んだファージ上清を用いマウス LM 細胞に対する細胞傷害性を検討したところ、いずれも TNF- α としての生物活性を十分に保持していることが示唆された。次に、mTNF- α -K90R、mTNF- α -K90P を、T7 プロモーター下に発現するベクターを構築し、大腸菌 BL21 株に導入することにより、2 種類のリジン欠損 TNF- α を作製した。これら両リジン欠損 TNF- α の 1 級アミノ量をフルオレスカミン法によって測定した結果、wtTNF- α (6 個のリジン残基+1 個の N 末端アミノ基で計 7 個の 1 級アミノ基を有している)と比較して、いずれも理論値通り約 1/7 に減少していたことから、確かに wtTNF- α 中の全 6 個のリジン残基(三量体としては 18 個)が他のアミノ酸に置換されていることが確認された(図 26)。また SDS-PAGE 解析したところ、wtTNF- α と同様にいずれも 17 kDa の単一のバンドとして観察された(図 27A)。さらにゲル濾過 HPLC により解析した結果、いずれのリジン欠損 TNF- α も wtTNF- α と同一の位置に溶出ピークを示した(図 27B)。以上の事実は、これら両リジン欠損 TNF- α では、これまでの点突然変異解析からホモ三量体形成に重要といわれてきた Lys11 が他のアミノ酸に置換されているにも関わらず、ホモ三量体形成していることを強く示唆している。次に、比活性を算出するため、マウス TNFR1 を介した *in vitro* における生物活性を、国際的な共通プロトコルであるマウス LM 細胞(L929 細胞の無血清培養株)に対する

細胞傷害性試験により評価したところ(図 28A)、mTNF- α -K90P は wtTNF- α と同等の比活性を有することが明らかとなった。一方、mTNF- α -K90R は、wtTNF- α の 5.6 倍もの強い比活性を有していた。これらの LM 細胞に対する傷害活性は、TNF- α の TNFR1 を介した活性発現を選択的に阻害できる抗 TNFR1 抗体で阻害されたことから、これら両リジン欠損 TNF- α が TNF- α 固有の生物活性を保持していることが示された。次に、これら両リジン欠損 TNF- α のヒト TNFR1 に対する生物活性をヒト Hep2 細胞に対する細胞傷害性試験を用いて評価した(図 28B)。その結果、mTNF- α -K90P は wtTNF- α と同等の比活性を、mTNF- α -K90R は wtTNF- α の約 10 倍という優れた生物活性を有することが判明した。なお、この mTNF- α -K90R は現存する人工 TNF- α の中で最強の比活性を有するものである。更に、TNFR2 を介した生物活性を、TNFR2 を強制発現させた PC60 細胞を用い、その GM-CSF 産生を指標に評価した(図 29)。その結果、両リジン欠損 TNF- α は共に、wtTNF- α と比較して、約 2 倍の生物活性を保持していることが明らかとなった。そこで BIAcore を用いて、両リジン欠損 TNF- α のヒト TNFR1、TNFR2 に対する解離定数を検討した(表 10 及び表 11)。その結果、TNFR1 に対しての解離定数はいずれも、wtTNF- α の約 70%に低下していたことから、TNFR1 に対する結合力が増大していることが示された。また、TNFR2 に対しては、wtTNF- α と比較して mTNF- α -K90R は約 50%、mTNF- α -K90P は約 60%にまで解離定数が低下しており、TNFR2 に対しても結合力が増大していることが示唆された。以上の事実は、これまでの点突然変異解析からレセプター結合に重要といわれてきた Lys65、Lys90 が他のアミノ酸に置換された両リジン欠損 TNF- α が、wtTNF- α 以上のレセプター結合能を有していることを示した興味深い知見である。

次に、wtTNF- α とヒト TNFR1 の結合モデルを構築し、mTNF- α -K90R、mTNF- α -K90P のレセプター結合力増大機構について考察した(図 30)。

wtTNF- α では Lys90 は Glu135 と水素結合し、レセプター結合領域と考えられるアミノ酸 84 番目から 89 番目のループ構造を安定化していると考えられる。mTNF- α -K90R では、Lys90 がアルギニンに置換されることでリジンと同様に Glu135 と水素結合し、ループ構造安定化に寄与していると考えられた。mTNF- α -K90P では Pro90 が Iso83 と疎水結合することで、ループ構造安定化に寄与していると考えられた。さらに、wtTNF- α の Lys65 は、TNFR の Lys78 と電気的、立体的に反発していると考えられる。両リジン欠損 TNF- α ともセリンに置換されることで、電気的、立体的反発が減少し結合力が上昇したと考えられる。現在、これらを実証するため両変異体の構造解析を X 線結晶構造解析法や NMR、電子顕微鏡などを利用して推進している。

疾患プロテオーム情報を利用し、医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質を創薬領域で有効活用していくためには、①医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の生理的な機能を解明し、②医薬品として応用するための、治療目的に応じたたんぱく質の分子設計の最適化を行う必要がある。すなわち、多種多様なたんぱく質について、その構造変異体を網羅的に作製し、これらのレセプター・リガンド結合の様式・強度などをも含めた機能情報をハイスループットに評価可能な方法論の構築と、その立体構造との関連を網羅的に評価することが大きな研究課題となっている。この点、「ファージ表面提示法を駆使した構造変異たんぱく質の網羅的作製とその機能解析」は、有望なツールになり得ることが明らかとなった。本研究成果は、得られた数多くの構造変異たんぱく質の立体構造と機能特性との関連評価を通じて、「機能→構造」に関する知見の集積が可能となり、将来的に機能性人工たんぱく質を合理的設計し得るファーマコ・バイオインフォマティクスの構築にも貢献し得るものと期待している。

II)-③たんぱく質の安全性と有効性を向上させるための基盤技術の創出

たんぱく療法の最適化に向け、従来から産官学の多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた機能性人工たんぱく質などを創製するため、Kunkel 法といった点突然変異法を用いた構造変異たんぱく質(アミノ酸置換体)の作製を精力的に試みている。しかし点突然変異法では、まず構造変異たんぱく質の立体構造や機能をシミュレーションし、トライ・アンド・エラーで生理活性たんぱく質の構成アミノ酸を一つずつ別の特定アミノ酸に改変することにより、個々の構造変異たんぱく質を作製せねばならない。そのうえで目的とする機能性人工たんぱく質を探索・同定するため、作製した構造変異たんぱく質の諸機能を個別に評価する必要がある。そのため従来法では、時間ばかりが消費され、かつ作製し得る構造変異たんぱく質の多様性(種類)にも限界があるなど、期待通りの成果は得られていない。そのため、効率良く目的作用を有する機能性人工たんぱく質を創製できるテクノロジーの開発が望まれている。

一方で、上述した人工たんぱく質の創製にあたり、その候補たんぱく質として受容体を介したシグナル伝達により、生体内の恒常性を保つサイトカインが考えられる。サイトカインは、血球細胞や血管内皮細胞、また組織の実質細胞より分泌され、個体の発生・分化及び免疫反応など多彩な生理作用を有している。このサイトカインを利用することで、疾患の治療を実施しようとする試みが全世界的に行われているものの、未だ臨床応用されたものは数えるほどしかない。中でも、TNF- α は、それ自身の持つ抗腫瘍効果により、がん治療への応用が 20 世紀後半に期待されたものの、その副作用により臨床応用は叶わなかったサイトカインとして知られている。この TNF- α は、17 kDa の単量体あたり 6 個のリジン残基を有しており、ホモ三量体形成することで初めて活性型となる(三量体として 18 個のリジン残基を有する)。この TNF- α の抗腫瘍メカニズムは、1)直接的な腫瘍細胞傷害、2)血中の抗腫瘍エフェクター免疫細胞の活性化、3)腫瘍血管の特異的傷害により引

き起こされることが知られている。TNF- α 投与によって腫瘍血管特異的に血管透過性が亢進されることを我々は既に認めているので、TNF- α の血中滞留性を向上させれば、これら全ての作用を効率よく増強することが可能になるものと予想される。また、その副作用は肝臓、脾臓、小腸などの正常組織への移行により引き起こされてしまうため、TNF- α の血中滞留性を高めることができれば、副作用発現組織への移行を低減し、副作用軽減に直結することにもなる。従って、もし wtTNF- α よりも高い比活性を有し、かつ全リジン残基が他のアミノ酸に置換されたリジン欠損 TNF- α が作製できれば、Lowering pI 効果に起因する血中滞留性向上効果によって、その抗腫瘍作用を選択的に増強できるものと期待される。そこで前述した2種類のリジン欠損 TNF- α のうち、生物活性が10倍に増強した mTNF- α -K90R について、*in vivo* 抗腫瘍効果や毒性を Meth-A 担がんマウスにおける出血壊死作用などを指標に評価し、さらにその血中動態について検討した。

mTNF- α -K90R の *in vivo* における抗腫瘍効果は、Meth-A 担がんマウスに単回尾静脈内投与し、その24時間後の腫瘍出血壊死作用を指標に評価した(図31)。wtTNF- α 投与群では、3 μ g 投与でさえ十分な腫瘍出血壊死作用を発現できないうえ、実験に供したマウスの10%に突然死が見られるなど、強烈な副作用が認められた。一方、mTNF- α -K90R 投与群では0.3 μ g 投与において wtTNF- α 3 μ g 投与群と同等以上の出血壊死作用が認められ、3 μ g 投与により多くの完全治癒例も認められた。さらに、副作用の指標としての LD50 値を求めた結果、wtTNF- α では 390 μ g/kg であったのに対し、mTNF- α -K90R では 510 μ g/kg であり、その毒性は顕著に低下していた。従って、mTNF- α -K90R は、wtTNF- α と比較して、*in vivo* における抗腫瘍作用が10倍に、LD50 値は1.3倍となり、その治療域は wtTNF- α の13倍に向上していることが判明した。次に静脈内投与後の血中動態を検討した(図32及び表12)。その結果、wtTNF- α と比較して顕著な血

中滞留性の向上が認められ、mTNF- α -K90R の血中半減期、AUC はともに約2倍に増大していた。この、血中滞留性の向上は、カチオン性のリジン残基を他のアミノ酸へ置換したことによる Lowering pI 効果に起因したものであり、抗腫瘍作用増大、副作用軽減に寄与したものと考えられた。

本研究では、ファージ表面提示法を独自に改良することにより、たんぱく質中の多数のアミノ酸を各々20種類のアミノ酸へ一挙に置換することで、10⁶種類以上もの多様性を有した構造変異たんぱく質を Combinatorial Biosynthesis し、この中からレセプター親和性・特異性などの高い「医薬価値に優れた機能性人工たんぱく質」を効率良く同定できる基盤技術を確立した。例えばアラニン・スキャンといった従来の点突然変異法を用いた構造-活性相関研究により、TNF- α の Lys11 や Lys65、Lys90 はその立体構造(三量体)形成やレセプター結合に必須の役割を担っているものと考えられていた。これは TNF- α に限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性たんぱく質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうものと考えられていた。事実、これまで活性を完全に保持させたまま、たんぱく質中のリジン残基全てを欠損させ得た例(機能性リジン欠損体)は無い。しかし本研究では、TNF- α 中の全6個のリジン残基を一挙に他のアミノ酸へ置換しても、wtTNF- α と同等以上のレセプター親和性や生物活性を有するリジン欠損 TNF- α を創製することに初めて成功した。この wtTNF- α と同等以上の生物活性を有するリジン欠損 TNF- α は、wtTNF- α よりも血中滞留性に優れていること、その *in vivo* 抗腫瘍効果は、Lowering pI 効果により、wtTNF- α と比較して有意に向上しているうえ、その毒性は顕著に低下しており、その治療域は wtTNF- α の十数倍以上にも向上していることが明らかとなった。以上の事実は、ファージ表面提示法を駆使した基盤技術を利用することで、医薬品シーズとなるたんぱく質から、安全性と有効性に優

れた人工たんぱく質を産み出し得ることを強く示しており、他を圧倒する創薬的競争力を提供する可能性を示すものと期待している。

たんぱく質に水溶性高分子を結合させる高分子バイオコンジュゲーションは、たんぱく質の生体内挙動を制御でき、医薬品としてのたんぱく質に高い安全性と有効性を付与できる基盤技術として認識されている。この高分子バイオコンジュゲーションの中で、ポリエチレングリコール(PEG)を修飾高分子として用いた場合、PEGylation(ペギレーション; PEG化)と呼ばれている。このたんぱく質のバイオコンジュゲーションは、たんぱく質の分子量が増大することによる腎排泄速度の減少をもたらすだけでなく、バイオコンジュゲーションに用いた修飾高分子によりたんぱく質の分子表面が覆われ、プロテアーゼからの攻撃が立体障害的にブロックされることなどにより、たんぱく質の生体内半減期を延長させることが可能である。同様の立体障害効果によって、免疫応答においても抗原性が低下し、体内滞留性の延長に結びつく。以上に述べた総合的な体内安定性向上効果により、最終的にたんぱく質の投与量・投与回数の削減が可能となる。しかしながら、高分子バイオコンジュゲーションによるたんぱく性医薬品の実用化は、IFN- α などの例外を除き、アデノシン・デアミンナーゼ、L-アスパラギナーゼ、スーパーオキシド・ディスムターゼなど主に低分子物質を基質とする酵素たんぱく質に限られている。この最大の原因は、活性発現部位への高分子導入による致命的な比活性低下とバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性にある。これは、現在汎用されているバイオコンジュゲーション法が、たんぱく質のリジン ϵ アミノ基やN末端 α アミノ基へ、ランダムに高分子導入するものであることに起因している。従って、バイオコンジュゲーションを既知のたんぱく質に限らず、今後の疾患プロテオーム解析などによって見いだされる「医薬品シーズとなるたんぱく質」へも適用していくためには、これら問題点を克服できる新たなバイオコンジュゲーション法の開発が必要不可欠である。

これまで、高分子の修飾部位を制御することでたんぱく質の比活性低下を回避する試みは世界的に行われてきた。特に、遺伝子工学的に活性発現に無関係な部位に人為的にシステイン残基を導入した変異たんぱく質を作製し、遊離のチオール基をターゲットとした部位特異的バイオコンジュゲーション法に期待が寄せられている。そこでまず、TNF- α が分子内に遊離のチオール基を持たないことと、活性発現にN末端側は関与していないことより、活性発現に重要でないN末端側に新たなシステイン残基を導入し、そのチオール基をターゲットとすることで部位特異的バイオコンジュゲーションを試み、その有用性・汎用性を検討した。

N末端にシステイン残基を導入するため、システイン残基をコードするTCG配列を組み込んだプライマーを用いて、wtTNF- α 遺伝子をクローニングした。次に、T7プロモーター下にてたんぱく発現するベクターを構築し、大腸菌BL21株に導入することにより、リコンビナントたんぱく質を作製した。IPTGでTNF- α の発現を誘導後、インクルージョンボディから産出されたたんぱく質を回収し、可溶化、refolding操作を行った後、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーによって精製を行った。精製したたんぱく質の比活性をLM細胞に対する細胞傷害性試験により検討した結果、N-cys-TNF- α (wtTNF- α のN末端にシステイン残基を導入した変異体)の比活性はwtTNF- α と比較して、著しく低かった。これは、導入したシステイン残基のチオール基を介し様々な分子間、または分子内ジスルフィド結合が形成され、異常なフォールディングをきたしてしまつたためと考えられた。以上の結果から、たんぱく質の精製条件や、システイン残基の導入部位の決定には詳細な検討が必要であることが示唆された。また、これら精製条件や導入部位の検討には各々のたんぱく質についてその都度個々に行っていくことが必須と考えられた。そのうえ、活性を保持したシステイン残基導入変異たんぱく質が作製でき、部位特異的バイオコンジュゲーションが可能となった場合に

においても、チオール基への高分子導入効率の低さから、十分な収率でバイオコンジュゲート体が得られないという問題を抱えている。そこで次に収率に優れた「アミノ基をターゲットとしたバイオコンジュゲーション」を活用し、修飾部位を制御できる方法の確立を目指した。即ちリジン欠損体である mTNF- α -K90R に対する N 末端アミノ基への部位特異的バイオコンジュゲーションを試みることに、従来までのアミノ基を標的としたランダムバイオコンジュゲーションの問題(比活性低下と分子的不均一性)を一挙に解決し得るものと考えた。

wtTNF- α 及び mTNF- α -K90R のバイオコンジュゲーションは、最も汎用されている直鎖状で分子量 5,000 の活性化 PEG を用い、アミノ基を標的とした PEGylation を行った。各 PEGylation 産物を SDS-PAGE 解析したところ、wtTNF- α のリジン ϵ アミノ基・N 末端 α アミノ基に対してランダムに PEGylation した場合には、高分子側にシフトした複数のバンドが確認され、ヘテロな分子集団となっていることが判明した(図 33)。一方 mTNF- α -K90R の PEGylation では、TNF- α モノマーに対して PEG が 1 分子だけ導入されたバンドしか観察されなかった。以上の事実は、N 末端のアミノ基のみへ選択的に PEG 導入されていることを強く示唆するものである。次に N 末端アミノ基を標的とした部位特異的 PEGylation の有用性を評価するために、TNF- α 三量体あたり 1 分子の PEG だけが結合したモノ PEG 化 TNF- α をゲルろ過 HPLC などによって分取精製した。以後、mTNF- α -K90R の部位特異的モノ PEG 化体を sp-PEG-mTNF- α -K90R、wtTNF- α のランダム・モノ PEG 化体を ran-PEG-wtTNF- α と記す。これら両モノ PEG 化 TNF- α のマウス TNFR1 を介した比活性を LM 細胞に対する細胞傷害性を指標に検討した結果、ran-PEG-wtTNF- α では僅か 1 分子の PEG をランダム導入するだけで、未修飾 wtTNF- α の約 6%にまで比活性が低下していた(図 34)。一方、sp-PEG-mTNF- α -K90R では未修飾

mTNF- α -K90R の約 60%もの強い比活性を有していること、さらに未修飾 wtTNF- α よりも 3 倍以上強い比活性を保持していることが判明した。

次に、sp-PEG-mTNF- α -K90R の静脈内投与後の血中濃度推移を評価した(図 35 及び表 13)。その結果、Lowering pl 効果と PEGylation 効果による相乗作用により、その血中半減期及び AUC は、未修飾 mTNF- α -K90R の約 2 倍、wtTNF- α の約 4 倍にも向上していることが明らかとなった。sp-PEG-mTNF- α -K90R の *in vivo* における抗腫瘍効果は、Meth-A 担がんマウスに対し、単回尾静脈内投与し、その 24 時間後の腫瘍出血壊死を指標に評価した(図 36)。未修飾 wtTNF- α 投与群では、3 μ g の投与でさえ十分な出血壊死を誘導できなかった。また wtTNF- α に対してランダムにモノ PEGylation した ran-PEG-wtTNF- α では、wtTNF- α と比較して僅かな抗腫瘍効果の増大を認めただけで過ぎなかった。一方、sp-PEG-mTNF- α -K90R 投与群では 1 μ g 投与において、mTNF- α -K90R 3 μ g 投与群より強い抗腫瘍効果が認められ、その抗腫瘍効果は未修飾 mTNF- α -K90R の 3 倍以上にも増強していた。前述したように mTNF- α -K90R は、wtTNF- α よりも 10 倍強い *in vivo* 抗腫瘍効果を発揮することから、sp-PEG-mTNF- α -K90R は未修飾 wtTNF- α と比較して 30 倍も強い抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。また、副作用の指標としての LD50 値を検討した結果、wtTNF- α では 390 μ g/kg、mTNF- α -K90R では 510 μ g/kg、ran-PEG-wtTNF- α では 1290 μ g/kg、sp-PEG-mTNF- α -K90R では 780 μ g/kg であったことから、sp-PEG-mTNF- α -K90R の治療域は wtTNF- α の 60 倍に拡大していることが示唆された。次に腫瘍増殖抑制効果について検討した結果、sp-PEG-mTNF- α -K90R は mTNF- α -K90R より強い抗腫瘍効果が認められた(図 37)。

現在、数多くの製薬メーカーやバイオベンチャーが、たんぱく質の医薬品化を目指し、たんぱく質の

バイオコンジュゲーションを試みている。しかし、臨床応用されたものは酵素などの低分子化合物を基質とするものが大半である。その原因は、活性部位への高分子導入による著しい比活性低下と、分子的・機能的不均一性にある。そのため、バイオコンジュゲーションにおける比活性低下、分子的不均一性を克服する方法論の開発が世界的に試みられているものの、未だ十分な基盤技術の開発には至っていない。この点本研究で示したリジン欠損たんぱく質に対する部位特異的バイオコンジュゲーションは、従来までのランダムなバイオコンジュゲーションにおける様々な欠点を一挙に解決できること、Lowering pI 効果とバイオコンジュゲーション効果によって、たんぱく質の多様な *in vivo* 作用の中から目的とする治療作用を選択的に発現させ得ることを明らかとすると共に、sp-PEG-mTNF- α -K90R の新規抗がん剤としての有用性が示された。我々はこれまで、組織特異的移行能を有する高分子、PEG よりも血中滞留性に優れた高分子の開発にも成功しており、今後機能性人工たんぱく質の創製と部位特異的バイオコンジュゲーションとの融合システムを適用し、プロテオーム創薬のための動態制御技術のさらなる開発を目指す予定である。

II)-④たんぱく質の細胞内局在性を解析するための基盤技術の検討

プロテオーム解析により疾患状態で発現量が変動しているたんぱく質が同定された後の解析段階として、そのたんぱく質が疾患に及ぼす影響を解析するために、当該たんぱく質の機能解明が必要不可欠になってくる。たんぱく質の機能を推定するうえで、顕微鏡イメージングによる細胞内での局在および挙動解析は最も有用な手法のひとつである。細胞が生存した状態で、標的たんぱく質の細胞内局在を観察するためには、蛍光標識などの手法を用いる必要がある。green fluorescence protein (GFP)等の蛍光たんぱく質と標的たんぱく質との融合蛋白として細胞で発現させる方法などが考えられる。生細胞におけ

る細胞内たんぱく質の挙動を観察するためには GFP 融合たんぱく質を発現させる必要があるが、これは効率よく融合たんぱく質を発現させるためのベクターを構築する必要があること、GFP との融合により当該たんぱく質の機能・活性を損なう可能性があること、発現量が生理的な状態とは異なる可能性があることなど種々の問題がある。一方、抗体やアフィニティ分子を介して標識する免疫染色法は、生細胞での標識が困難であること、たんぱく質に tag などのアフィニティペプチドを付加する、あるいは特異抗体を作製する必要があるなどの問題を有するが、たんぱく質本来の局在・量を可視化することができる。したがって、これらの手法を適宜組み合わせることにより、たんぱく質の局在・挙動の効率よい解析が可能になるものと考えられる。

蛍光イメージングにおいて最も重要な問題は、蛍光物質の感度である。現在、間接標識に用いられている FITC をはじめとする有機蛍光色素は、一般に不安定で褪色し易いため、少量しか存在しない分子の染色や長時間の観察が困難である。したがって安定性が高く、高い輝度有する蛍光物質が望まれている。このような中、最近、半導体量子ドット (quantumdot; QD) と呼ばれる新たな蛍光物質が開発された。QD は Cd-Se(カドミウムセレン)などの半導体物質からなる直径数ナノメートルの粒子であり、光を照射すると、ナノメートルサイズという大きさに起因する量子効果により、粒子径の違いによって青色から赤色にわたる種々の波長の蛍光を発する。さらに QD は高輝度で極めて光安定性が高いことなど、多くの優れた光学特性を有することから、バイオイメージングの領域への応用が期待されている。そこで、たんぱく質の細胞内局在・挙動解析に QD を用いた蛍光イメージングを適用することを目的に、QD を用いた免疫染色法の確立と、光学特性の評価を試みた。

まず、streptavidin 修飾された QD を用いて固定化細胞の細胞骨格 (tubulin) の染色を試みた。種々の染色条件検討の結果、十分な浸透化処理とブロッ

キングを行うことにより、Streptavidin 修飾された QD を用いることで、固定化培養細胞 (Hela、Hep3B) の細胞骨格を特異的に染色することができた (図 38)。さらに、QD と従来の有機蛍光色素の光安定性の比較を試みた。褪色防止剤を使用しない条件において、従来の蛍光色素の中では安定性が高いことで知られる Alexa や DAPI は、UV 連続照射により速やかに褪色し、1 分後にはほぼ消光した (図 39)。それに対して QD は 80 秒間の照射後でも全く蛍光強度の低下を示さず、極めて高い安定性を有することが判明した。これらの結果より、QD が蛍光トレーサーとして優れた性能を有することが明らかとなった。今後は、特異抗体と QD のコンジュゲート法の確立などを行うことにより、細胞内局在解析へ活用していく予定である。また一方、GFP 融合たんぱく質発現系を用いた生細胞でのたんぱく質の挙動解析法の確立を行い、これらを統合的に利用することにより、たんぱく質の機能の解明に展開する予定である。

D-3: 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

当センターでは、内部審査機関である高度先駆的医療・研究審査委員会で、研究実施計画の医学的、科学的妥当性について検討を行い、承認の後に倫理委員会に提出することが出来る。委員の半数は施設外の有識者で構成されており、倫理と法律的観点からの審議を経て妥当と判断されれば総長から研究実施の承認を得ることが出来る。疾患関連たんぱく質解析研究は、新たな国家的プロジェクトであるとともに、試料や臨床情報をプロテオームファクトリー施設に提供し、その解析結果はデータベース化されプロテオームファクトリーのコンソーシアム参加企業 22 社で医薬品開発に活用される新たな研究形態である。

当センター内で多数の研究実施計画が提出されると推定されたため、先ず疾患関連たんぱく質解析研究の計画全体の理念と当センター実施に関する

基本方針について倫理委員会の承認を受けた。個別の研究計画についても通常通りの審議過程 (高度先駆的医療・研究審査委員会、倫理委員会、総長裁可) をとって実施の可否が検討された。

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所、ヒューマンサイエンス振興財団、各医療機関、プロテオームファクトリー施設、コンソーシアム参加企業などが相互に契約を結ぶ複雑な形態を取るため、高度先駆的医療・研究審査委員会では研究の意思決定システム、知的所有権などの問題で多くの確認が必要であった。また、プロテオームファクトリー施設と当センターとの間で「プロテオーム解析による循環器疾患関連たんぱく質の探索研究における検体および臨床情報の提供に関する合意文書」(MTA) 策定の必要性も指摘され、合意文書を交わした。研究計画全体の申請時には、提供する臨床情報の内容、匿名化の方法、試料送付の添付書類が未整備であったことも重なり、承認に時間を要した。高度先駆的医療・研究審査委員会からは、多数の研究計画の倫理委員会審査・承認が必要となるため、研究計画全体の倫理的取り扱いについて承認が得られた際は、高度先駆的医療・研究審査委員会での医学的、科学的妥当性の認定と研究計画全体の倫理委員会の承認の総合により、個別研究計画を承認するという提案が付記された。

上記の高度先駆的医療・研究審査委員会の結論に基づき作成した計画書を倫理委員会に提出したところ、当初の提案は不承認となったが、その理由は、①個別の研究計画が多数でも、各々厳密な審査を行うことは不可欠である、②網羅的たんぱく質解析により、従来は不明であった個人情報や遺伝子情報とは質的に異なる重大な個人情報が明らかになる可能性がないか、などの指摘があり、たんぱく質解析においても遺伝子解析に近い個人情報管理が必要との認識が示された。更に、③たんぱく質の網羅的解析という手法が社会に受け入れられる状況とするため、啓蒙活動や情報公開なども必要であり、同意取得時には十分な説明、平易な説明資料の作

成などが要請された。健常者からの試料収集については、④当センターで多数の実績、蓄積があるので、各種研究で共有化、効率化を図り、健常者からの試料収集数を増加させない努力をすべきとの指摘も受けた。これらの改訂や資料追加を行い、研究プロジェクトの総論部分が最終承認を得た。

当センター内で循環器疾患関連たんぱく質解析研究の課題を募集したところ、50件に及ぶ研究提案を受けた。その中より本研究の主旨に則し、かつ有効な情報が得られると推定される課題、患者発生頻度や試料収集期間、研究実施体制への移行時間などを考慮し、研究実施計画の作成、高度先駆的医療・研究審査委員会、倫理委員会への申請を開始した。16年度中に6研究計画以上を申請し、3課題程度が承認される見込みである。「研究計画1-1. 脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究」については倫理委員会の承認が既に得られ、病院および研究所側での実施体制を構築して、試料採取、情報収集を開始している。

「脳動脈閉塞による急性期脳卒中関連たんぱく質の探索研究」では、脳動脈における血管内皮や中膜筋層の細胞増殖や間質のたんぱく質産生レベルでの構造や機能、量的異常が脳卒中の誘因・進展に繋がると仮定し、分泌されたたんぱく質の量的および質的变化を追跡する。このため、同一患者の脳卒中急性期と慢性期の血清たんぱく質の変化を網羅的に解析し、脳卒中発症関連たんぱく質ライブラリーを作成し、その中より脳卒中の病態生理に関わるたんぱく質の発見を目指している。

この他、「心不全に関連するたんぱく質の探索研究」では、心不全増悪期から緩解期への変化が劇的であり、前後で血液中たんぱく質の質的、量的な変化が想定されている。これまでレニン-アルドステロン系やBNP等の因子の変動が報告されているが、特にBNPは血管拡張剤であり、心不全の重症度指標として臨床で汎用されている。未発見、未同定のたんぱく質の中にも数多くの有用候補が存在すると考えられ、たんぱく質の網羅的解析より新たなマー

カーや治療標的発見へ展開させる。「冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症患者のLDL-アフエーシス治療施行前後の血中たんぱく質の探索研究」では、LDL-アフエーシスによりLDL粒子だけでなく多様なたんぱく質も同時に除去され、冠動脈疾患の再発予防に成果をあげている。このため、アフエーシス施行前後のたんぱく質解析により動脈硬化の発症、進展に関わるたんぱく質を同定でき、治療法などの開発へ発展できると考えられる。「難治性心疾患に関連するたんぱく質の探索研究」では、現在心臓移植しか治療法のない難治性心疾患について検討を行う。遺伝的背景、ウイルス感染、心筋炎などの多彩な発症原因が考えられているが、病態としては心筋細胞のアポトーシス、残存心筋の代償作用の欠落、心筋線維の脱落などが共通の現象として認められ、正常組織とのたんぱく質の網羅的比較により、病因究明や治療・創薬標的の同定に進むことが可能と考えられる。これら以外にも、たんぱく質網羅的解析・比較と量的変動の解析より、明確な解析結果が期待される疾患、症例、対象を選び、研究実施計画の選定、立案を進めた。

疾患関連たんぱく質解析研究は、将来の医薬品開発のシーズを目指した国家プロジェクトであり、厚生労働省の医療機関が疾患別に分担して参加する新たな研究形態をとり、研究結果を集積しデータベース構築を行うものである。当センターでは初期の研究計画全体の作成や承認に時間を要したが、高度先駆的医療・研究審査委員会、倫理委員会での詳細な審議、検討により、倫理、研究の両面において整った全体研究計画を作成でき、今後この全体研究計画に従い多くの個別研究実施計画が承認を受け、臨床試料・情報の収集が加速的に進むものと考えられる。研究実施体制もまだ修正、効率化が必要であるが、上記の倫理委員会の指摘事項を遵守しつつ、有用な情報、成果を発信できる基盤を整備する予定である。

D-4: 疾患関連たんぱく質解析研究の一環としての新規生理活性ペプチド、ニューロメジン S の発見

1) 新規オーファン GPCR リガンドの精製

我々はこれまでにオーファン GPCR である FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の内因性リガンドとして NMU (分子量 2642.9) をラット小腸より単離・同定した。この探索過程において、ラット脳から抽出したペプチド画分をゲルろ過展開したサンプルを用いて FM-4/TGR-1 発現細胞に対するアッセイを行った結果、2 峰性の活性ピークを見出した。1 つの活性ピークは NMU の分子量と一致したが、他方の活性はより分子量の大きな分画 (~4000) に溶出されていた。また、この活性は逆相 HPLC にてラット NMU と比較して明らかに親水性側に溶出され、これらの結果は NMU とは異なる FM-4/TGR-1 の新たな内因性リガンドがラット脳内に存在していることを示唆した。この新たな内因性リガンドを単一に精製した結果、510 g のラット脳から約 2.5 pmol のペプチドが得られた。

2) 新規ペプチドの構造解析

プロテインシーケンサーによる、精製した新規内因性リガンドのアミノ酸配列の解析により、N 末端からの部分配列を LPRLHTDSRMTIDFPKK と決定した。精製したペプチドの全構造を決定するために、このペプチドの前駆体をコードする cDNA をクローニングしたところ、ラットでは 152 アミノ酸残基からなる前駆体の構造が明らかになった。この前駆体にはたんぱく質の分泌に関わる N 末端シグナルペプチド配列と、プロセシングプロテアーゼによって限定切断を受ける 4 箇所の切断部位の存在が認められた。決定した N 末端配列は 3 番目の切断部位の直後から続いていたことから、精製したペプチドは 3、4 番目の切断部位で限定切断を受け産生されることが明らかになった。また、4 番目の切断部位の直前にはペプチドの C 末アミド化の供与体となるグリシン残基が存在したことから、新たな内因性リガンドの全構造を、C 末端がアミド化された 36 アミノ酸残基からなるペ

チド (LPRLHTDSRMTIDFPKKDPTTSLGRPF LFRPN-NH₂) と推定した。このペプチド構造から計算される理論 m/z 値 (4240.3) は、精製したペプチドでの実測値 (4240.2) とほぼ一致したことから、推定したペプチド構造は精製したペプチドの構造と一致していることが示された。このペプチドの N 末端部分 (29 アミノ酸残基) は既知のペプチド・たんぱく質と相同性を示さないため、このリガンドは新規生理活性ペプチドであることが明らかになった。また興味深いことに、本ペプチドのアミド化された C 末 7 残基の配列は、NMU と完全に一致していた。

3) 新規ペプチドの組織分布

この新規生理活性ペプチドについての組織分布をリアルタイム PCR で解析した結果、中枢神経系、脾臓、精巣で強い mRNA の発現が認められた。中枢神経系のなかでも視床下部での発現が顕著に高かったことから、脳内分布を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて解析した。その結果、視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus) で特異的な発現が認められたため、今回同定した新規生理活性ペプチドをニューロメジン S (Neuromedin S: NMS) と命名した。

本研究により、新規生理活性ペプチドである NMS を同定した。NMS の C 末端構造 (7 アミノ酸残基) は NMU と全く同一であった。この構造は NMU の活性発現・受容体への結合に必須であることから、NMS と NMU は受容体を共有していると推測される。実際、NMS と NMU は FM-3/GPR66、FM-4/TGR-1 の両方に対して同程度のアゴニスト活性、親和性を示した。

非常に興味深いことに NMS は、脳内では哺乳類の概日リズムの調節・発振をつかさどる視交叉上核に特異的に発現していた。このことは NMS が概日リズムの発振機構において何らかの重要な機能を担っている可能性を強く示唆している。今後、リズム異常に関連する疾患 (睡眠覚醒障害、時差ぼけ、躁鬱病など) と NMS との関わりを解明することにより、新たな治療・診断法の開発が期待できる。

また、ヒト NMS 遺伝子は 2 番染色体 q11.2 に位置し、この遺伝子座は肥満に関連する量的形質遺伝子座の 1 つと一致する。NMS は NMU と同一の活性部位配列を有すること、NMU は中枢性に摂食活動を抑制しエネルギー代謝調節に関与していることから、NMS も摂食調節に関与している可能性が示唆された。

GPCR は創薬の重要なターゲットとなっていることから、NMS の発見により新たな医薬品開発が期待される。

D-5: 高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立
(たんぱく質消化物としてのペプチドの分離・解析技術の確立)

ショットガン法でのペプチド解析モデルとして行ったマウス脳の分子量 3,000 以下のペプチド混合物は、たんぱく質のトリプシン消化物にほぼ相当する分子量であり、量や種類の点において非常に高い多様性を有し、参照するには適切な対象であった。

自動化したリニア 2 次元 HPLC システムの構成は、ステップ 2 次元 HPLC システムと基本的に同様である。リニア 2 次元 HPLC システムは、1 次元目を 1.0 x 150 mm のカラム、流速 5 μ l/min で 360 分間、2 次元目を 0.3 x 150 mm のカラム、流速 5 μ l/min で 50 分の直線濃度勾配で行った。トラップカラムは 0.5 x 10 mm の高炭素含量 C18 カラムを使用した。リジン残基とロイシン残基の割合を変更した 11 残基の電荷、疎水性の異なる 5 種類の標準ペプチド、およびブタ脳抽出物で条件検討を行ったが、ステップ 2 次元 HPLC システムと同様にマイクロカラム、キャピラリーカラムの使用により、通常分析用カラム (4.6 x 250 mm など) に比して相対的な保持力が低下し、イオン交換 HPLC、逆相系 HPLC において、それぞれ 250 mM ギ酸アンモニウム、35% アセトニトリルでほとんどのペプチドの溶出が終了した。同様に、トラップカラムに

おける保持が相対流量の多い場合には不十分となる傾向にあり、カラムサイズ、充填剤などの更なる検討が必要である。初期溶媒の濃度、グラジエントの領域、トラップカラムの吸着力などの問題は一応解決できたが、分析対象ペプチド量の変動によらず安定した回収率と分離を得るには、カラム充填剤などの更なる検討が必要である。特にトリプシン消化物は、pH 3.8 の酸性条件でも正電荷数が少なくイオン交換 HPLC の初期に溶出され、疎水性も比較的低いため、吸着力の強いカラム、充填剤とグラジエント初期溶出条件の至適化が必要である。

ペプチドーム解析では、約 0.8g のマウス組織由来のペプチドを使用して分子量 3,000 以下のペプチド、4,000 強を検出できたが、6 段階に分割したこのシステムでは 20% 程度しか検出できておらず、上記の溶出条件などの至適化により、この数を増加できると考えられる。MALDI-TOF-TOF 質量分析計による構造解析も含め、全行程を 2~3 日間で終了することができる。ステップ 2 次元 HPLC システムの 1 次元目では、予め設定した塩濃度でしか溶出できなかったが、リニア 2 次元 HPLC システムでは対象に適した濃度勾配溶出が可能で、システムの維持、使用には時間を要するが、総合的にはより有用な結果が得られると考えられる。

組織からのたんぱく質の抽出効率においては、変性剤と CHAPS、Triton などのディタージェントを含む抽出溶媒系が優れており、特に分析機器メーカー等から推奨されている抽出溶媒でホモジナイズすると、軟組織はほぼ完全に可溶化された。この段階で、一部は DTT で還元後、モノヨードアセトアミドでアルキル化を行った。脱塩・濃縮には、有機溶媒やトリクロロ酢酸などによるたんぱく質の沈殿法、小型の遠心型限外濾過を用いた。後者は簡便であるが、脱塩過程でたんぱく質の沈殿が程度の差はあれ生成し、それらの回収の有無によりたんぱく質量が変動した。たんぱく質沈殿法もたんぱく質濃度により沈殿形成速度や回収率が異なり、沈殿回収、洗浄後の再溶解が大きな問題であった。低濃度の尿素やディター

ジェント入りバッファーを一般に使用するが、不溶物が残ることが多く、超音波ホモジナイズした。この状態で一部についてはDTTで還元後、アルキル化を行った。還元アルキル化を行った試料については、再度限外濾過法か沈殿法でたんぱく質を回収し、同様に再溶解を行った。これらを約1/100量の自己消化抑制トリプシンにて37C、20時間程度消化を行い、消化中も溶液を攪拌した。消化物は酸性化後、逆相C18カートリッジにて脱塩、濃縮し、逆相HPLCで分離、解析した。

未だ解析途上であるが、処理段階が増えるにつれて回収率が下がり、不均一が発生する傾向にあり、抽出、濃縮、消化法については17年度に最終的な結論を出したい。この実験過程で2つの問題点があった。第一は、初期段階での還元アルキル化が処理過程としては有利であるが、過剰な試薬によるアミノ基のアルキル化などを含めた副反応が発生し、これらが質量分析計による検出、構造解析時に問題となることである。今一つは可溶化に使用するディタージェント類が、逆相HPLCやその後の質量分析などに悪い影響を及ぼすため、可溶化とその除去の兼ね合いが問題である。

生体内ペプチドを対象とするペプチドーム解析において開発してきたリニア2次元 HPLC システムは、たんぱく質の消化物を分析するショットガンプロテオーム解析においても有効であることが、マウス脳ペプチドの解析より確認された。ナノ、マイクロ流量で使用できる市販 2 次元 HPLC 機はまだ十分な評価が得られていないが、上記システムはカラム、樹脂、溶媒などに改良が必要であるものの、実用装置として使用可能と考えられた。ペプチド構造解析効率の評価なども含め来年度に解析を実施したい。

たんぱく質の抽出から還元アルキル化、酵素消化、2次元 HPLC までの方法論は大部分が確立されていると考えられていたが、実際の組織への適用によっても多くの問題があり、現代の高感度な質量分析によるペプチド解析に耐えうる一般的な方法論の構築が必要である。今後少量試料から出発した場合

は、これらの問題点が更に増幅、観測されるため、現段階で血管、心臓などの循環器系組織や細胞に対して至適な方法論を開発しておくことが、今後のプロテオーム解析には不可欠である。

D-6: 痴呆等の精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

(1) 研究試料の確保に関する研究

新規試料については、すでに本センターの倫理委員会での承認を得ている、「血液、尿、髄液を用いた脳神経疾患の病因・治療法の開発に関する研究」によって収集・保存が可能な疾患の内、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者の血漿、尿を本研究に利用するための倫理申請を行い、承認を得た。そして、2005年2月までに、10名のパーキンソン病患者血漿をプロテオームファクトリーに供給した。

(2) パーキンソン病モデルを用いた研究

I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを複製し発症前における初期変化を解析したところ UCH-L1 の凝集性が早期から高まっていることを見出した。この凝集性の亢進はユビキチン系とリソソーム系の連動により生じていることが明らかになった。また UCH-L1 が欠損する gracile axonal dystrophy マウスの機能形態学解析を行い、UCH-L1 は生体においてはアポトーシスに促進的な作用を有する可能性を見出した。

パーキンソン病、アルツハイマー病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだなされていないが家族性の成果を発展させることで、対症療法の高高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関しては国内外における研究から、たんぱく質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポ

トーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。さらに、近年では免疫学的機序の関与に注目が集まっており、喫煙者にパーキンソン病発症者が少ないという疫学的調査が明らかにされるなど生活習慣との関連でも注目を集めている。

我々はこれらの近年の知見を参考に、血液、尿などの末梢サンプルにおいても新たな知見が生み出される可能性が高いと考え、神経変性疾患患者、特にパーキンソン病における血液、尿中たんぱく質の網羅的解析を行うことにした。今年度はパーキンソン病患者とパーキンソン症候群、及び、プロテオームファクトリーが保存する正常対照者とを比較検討するための試料がファクトリーに供給できる体制が確立できた。また、検体処理に精通するためモデル動物を用いたサンプル処理とたんぱく質の網羅的解析技術を構築した。

昨年度は独自に作成したI93M UCH-L1発現トランスジェニックマウスが既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多々有している新規モデルであることを見出したが、今年度さらにその初期変化としてユビキチン系とリソソーム系の運動によるUCH-L1の不溶性亢進を見出した。本成果の意義は大きく、根本的治療に向けて新たな治療標的が見出される可能性が高まった。今後これらの初期変化を規定する遺伝子産物の機能解析を通して新たな創薬の標的分子を見出す予定である。

D-7: 糖尿病等代謝性疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立に関する研究

【臨床サンプルの収集】

・ 糖尿病

糖尿病患者由来血清の予備検討のため、過去に他の研究計画(ミレニアム・プロジェクト)の際に採取されていた血清サンプルを、再同意を取得した上で創薬プロテオームファクトリー施設に発送する準備

を整えた(H17年3月発送予定)。また、データベース構築用、動脈硬化診断マーカー検索用の糖尿病血清収集については、本センター及び創薬プロテオームファクトリー施設の倫理委員会での承認を受け、検体の収集、提供の体制が確立した。早期糖尿病性腎症の尿たんぱく質解析については、本センター内にて尿たんぱく質の濃縮、脱塩、2DEでの予備的解析を行ったが、患者検体収集及び創薬プロテオームファクトリー施設での本格的解析については、同施設での尿たんぱく質、ペプチドの解析法の確立を待っている段階である。

・ 糖尿病以外の疾患

気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患について、早期診断、治療効果の判定に寄与する診断マーカー開発を目的として、当センターの研究所・呼吸器疾患研究部及び病院・呼吸器科を中心に、臨床サンプル(血清)の提供体制を確立するよう、院内関係者と調整した。

【LC-MSを用いたプロテオーム解析】

当センター研究所・代謝疾患研究部にて、臨床サンプルを用いた多次元液体クロマトグラフィーによるたんぱく質の分離、LC-MSを用いたたんぱく質の網羅的同定の予備検討として、ヒト肝細胞由来細胞株HepG2の培養上清に含まれる分泌たんぱく質の解析を行った。培養上清回収時に限外ろ過にて低分子量側(50kDa以下)のたんぱく質を回収、前処理として還元・アルキル化法あるいは熱変性といった方法を組み合わせて、得られたペプチドを2-D LC-MS/MSにより解析することによって、400以上のたんぱく質の同定が可能であった。

また、翻訳後修飾を受けたたんぱく質の解析のために、抗リン酸化たんぱく質抗体をコンジュゲートしたビーズ、レクチン等を用いたアフィニティー・クロマトグラフィーによる精製、2DEゲルでの翻訳後修飾を受けたたんぱく質を染色する色素(ProQ Diamond, ProQ Emerald)を用いた基礎検討を行

った。

【SELDI-TOF】

糖尿病患者由来サンプル中の低分子量たんぱく質及びペプチドを解析するために、当センター研究所 代謝疾患研究部のSELDI-TOFを用いて健康人の血清・尿のプロファイリングのレファランス作りを行い、採取及び保存条件の違いを検討した上で糖尿病の病態や治療効果を反映する血清・尿マーカーを検索した。

プロテオームファクトリーのプロジェクトの2年度目として、創薬プロテオームファクトリー施設での糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築、糖尿病患者での動脈硬化性疾患及び糖尿病性腎症早期診断マーカー検索のための臨床サンプル収集の準備、当センターでの臨床検体でのたんぱく質の翻訳後修飾の網羅的解析のための予備検討を行った。次年度からは、創薬プロテオームファクトリー施設での血清、尿の採取法及び輸送法が確立し次第、倫理委員会での審査・承認を受けた上で、糖尿病関連たんぱく質のデータベース構築、動脈硬化に特有なマーカー検索のための糖尿病患者由来血清の収集及び発送を開始する。創薬プロテオームファクトリー施設にて尿たんぱく質、ペプチドの解析法が確立し次第、糖尿病患者での尿検体も収集する。低分子量たんぱく質及びペプチドについては、当センター及び創薬プロテオームファクトリー施設のSELDI-TOFを用いた解析を開始する。糖尿病以外の疾患については、呼吸器疾患(気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患)患者由来血清の収集を当センター及び創薬プロテオームファクトリー施設の手続きが完了し次第開始する。また、気管支洗浄液や関節液等の血清以外の臨床検体の解析法について、創薬プロテオームファクトリー施設と協力して検討していく。

たんぱく質の翻訳後修飾の網羅的解析については、2DEと共にon-lineあるいはoff-lineでの液体クロマトグラフィーを用いた解析法の検討を

行う。詳細な解析を行うために、創薬プロテオームファクトリー施設のhybrid MS等を用いた予備検討を行う。

in vivoでのインスリンの主要な標的臓器である肝臓、骨格筋、脂肪組織からの検体採取は困難であり、さらに採取時の状態によってたんぱく質のプロファイルが大きく変化する可能性がある。このため、比較的採取が容易な組織(脂肪組織等)のみにて、in vitroでの解析を検討していく。

D-8: 小児免疫・アレルギー疾患関連因子の探索 ならびに微量たんぱく質解析技術の確立

プロテオームを解析するプロテオミックスの方法は、細胞機能を演出するたんぱく質の大規模な動態研究に適しており、その適応範囲は生命科学を基盤とする能楽や環境科学などを含めて多岐にわたる。しかしながら、現在最も注目されているのは、高度医療技術、とりわけ臨床医学や創薬への応用である。創薬は、多彩な学問領域から提供される複合的な知識と技術が求められる知識集約的な産業であるが、ゲノム科学とりわけプロテオミックスは、疾患メカニズムの解明、創薬ターゲットの同定、臨床所見に依存しない医薬品の薬効や副作用評価など、基礎から臨床まで幅広い適応範囲を有する。多くの薬物の直接的な標的となるたんぱく質を解析の対象とするプロテオミックスは、先駆医療とりわけ「メカニズムに基づく合理的な創薬」を加速するテクノロジーとして期待される。現在知られているヒトの一生で疾患の原因となる遺伝子の第一位はほとんどが酵素遺伝子であるが、現在用いられている薬物の標的は受容体が約半数を占めている。このことは、酵素が代謝の恒常性維持に重要であるという事実とともに解析可能な疾患や開発可能な医薬品の種類や増加が医薬品の標的となる分子の探索や評価のためのテクノロジーの発展に依存していることを示しているものと考え

られる。従って疾患の原因を調査し、薬物をスクリーニングするための新しいテクノロジーが開発されれば、従来とは異なる遺伝子やたんぱく質を標的とする新しい医薬品が生み出される可能性がある。複数の遺伝的因子と環境因子の複雑な相互作用によって生じる生活習慣病などの疾患原因の解明にはゲノミクスからの情報とともに病理組織などでの現場検証、すなわちプロテオミクスからの情報が必要不可欠である。プロテオミクスは癌をはじめとする様々な疾患のマーカーの探索や病院の解明、創薬に向けた研究に応用されているが、本研究課題では、小児の免疫アレルギー疾患の解明に、患者由来の組織・血清・尿を用いて発現プロテオミクスの研究に取り組む。

本年度は、小児腎疾患の代表例である糸球体腎炎・ネフローゼ症候群の患者より血清を採取し血清中のプロテオーム解析を行った。平成16年度成育医療センターにて採取した検体の内訳は以下の通りである。

採取検体(血清)総数:31検体

疾患内訳:ネフローゼ症候群21例(このうち3例はステロイド抵抗性)、IgA 腎症2例、巣状硬化症7例(このうち6例は腎移植後の症例)、膜性増殖性糸球体腎炎1例であった。血清中のプロテオームについては、現在解析中である。

免疫アレルギー疾患に関する研究のみならず、様々な疾患・生体システムにおける遺伝子発現や形態変化から生物機能を解明しようとする研究には、プロテオーム解析の技術は cDNA マイクロアレイなどのトランスクリプトーム解析の技術とともに非常に有効となる。しかしながら、たんぱく質の解析には当然ながらDNAに対するPCRのような増幅手段は使えず、さらに、疾患関連分子は、一般に細胞内発現が少なく修飾や変動が激しいものが多い。従って、現状においても病態に関連する非常に微量なたんぱく質の検出や同定などに関しては技術的に諦めざるおえない場面にしばしば遭遇する。しかし、質量分

析機器(MALDI-TOF MS、LC-ESI MS/MS)とその周辺機器(蛋白分離・検出・抽出処理装置やHPLC やデータ解析ソフトなど)を中心にたんぱく質の分析感度・分離能は格段に進歩し、さらにより高い感度と分離能と解析速度をもつたんぱく質構造解析技術開発も世界中で盛んに行われている。また、これらの解析結果をもとに、出来るだけ多くのその分子に関連する情報が短時間で得られるようなバイオインフォマティクスも世界中で開発されてきている。このことは、プロテオミクス解析の将来的な可能性に対する世界中の研究者の期待の現れであると考えられる。ゲノム解析におけるPCR や cDNA マイクロアレイなどに匹敵するような生体たんぱく質の翻訳後修飾を含むたんぱく質構造と機能の解析システムが今後どこまで高度に構築できるか更にはゲノム科学・たんぱく質科学・医学・情報科学・細胞生物学・医薬化学等の相互作用による効果的な共同体が如何に形成されるかが今後の治療と予防を目指した疾患研究におけるプロテオーム解析の課題となると考えられる。

特に、小児免疫アレルギー疾患の中でもネフローゼ症候群や糸球体腎炎はその原因ならびに根治療法が確立していない疾患である。このような疾患において、遺伝子レベル、たんぱく質レベルで疾患関連因子の網羅的検索は疾患の原因究明とともに診断の指標・治療の標的として今後有用になるものと期待されさらに解析の検体を増やすことにより、関連因子の同定が可能になる物と考えられる。

D-9: 加齢関連疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立

PF との協議により、当初対象疾患の典型例について、血清サンプルの提供を行うこととなった。ワークシートへの入力、匿名化・保存および搬送については、専任のリサーチレジデントの業務とし、検体採取・保存を開始した。

SDS-PAGE あるいは MALDI-TOF-MS による解析では、ヒト尿には、分子量1万以上のシグナルは得られなかった。硫酸沈殿法で得られた沈殿は 6 M 尿素にて溶解し、二次元電気泳動法による解析を試みた。これは健常者由来の尿たんぱく質マップ作成に供することとした。上清は凍結保存し、疎水性クロマトグラフィーあるいは逆相クロマトグラフィーによる解析を予定した。

MC3T3-E1 細胞において、T3 は p38 MAP kinase のリン酸化を促進した。p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 および PD169316 は T3 により惹起されるオステオカルシンの産生を抑制した。それに対して、p44/p42 MAP kinase の上流の kinase である MEK の阻害剤、PD98059 および U0126 は T3 により惹起されるオステオカルシンの産生に何ら影響しなかった。DBcAMP は、T3 により惹起されるオステオカルシン産生および mRNA の発現を減弱した。Gs の活性化物質であるコレラトキシンは T3 によるオステオカルシン産生を減弱した。アデニル酸シクラーゼの活性化物質であるフォルスコリンは T3 により惹起されるオステオカルシン産生および mRNA の発現を減弱した。PKA の阻害剤である KT5720 はフォルスコリンの T3 によるオステオカルシン産生抑制作用を部分的に解除した。DBcAMP およびフォルスコリンは T3 による p38 MAP kinase のリン酸化を減弱した。さらに PACAP は T3 により惹起されるオステオカルシン産生を抑制した。

痴呆、骨粗鬆症および褥創の三疾患について、PF への臨床試料提供が可能となった。これらの疾患はいずれも高齢者医療においてその対策が急務となっているものであり、疾患関連たんぱく質の解析が待たれる。

AD の治療には疾患の早期発見が極めて重要であり、血清あるいは尿など採取の容易な試料での疾患関連たんぱく質が見出されれば、臨床への貢献は大きい。尿中たんぱく質の分析から、健常者の尿たんぱく質マップ作成ひいては AD 疾患関連たんぱく質の探索に有力な情報が得られることが期待され

る。

一方、本年度は続発性骨粗鬆症の疾患モデルとして甲状腺機能亢進状態に着目し、培養骨芽細胞を用いて細胞レベルでの機能たんぱく質の解析を行った。甲状腺機能亢進状態において、オステオカルシンの血中レベルが高値となることが良く知られている。一方で MAP kinase スーパーファミリーは種々の細胞において、細胞機能の制御に関与することが知られている。既に私どもは骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において T3 によって活性化される p44/p42 MAP kinase が、アルカリホスファターゼ活性を抑制的に制御することを報告している。このたび本細胞において T3 により p38 MAP kinase のリン酸化が促進されたことから、p38 MAP kinase を活性化することが明らかとなった。さらに T3 によるオステオカルシン産生の促進作用は p38 MAP kinase の阻害剤で抑制されたが、MEK の阻害剤は何ら影響しなかったことから、p44/p42 MAP kinase ではなく p38 MAP kinase を介することが強く示唆された。

アデニル酸シクラーゼ-cAMP 経路は、骨芽細胞において様々な刺激のメディエーターとして重要である。今回、本経路の活性化が T3 によるオステオカルシン産生促進および p38 MAP kinase のリン酸化促進に抑制的に作用することが明らかとなった。オステオカルシンは成熟骨芽細胞により産生・分泌される γカルボキシル化されたカルシウム結合たんぱく質で、骨のリモデリングにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。骨芽細胞におけるアデニル酸シクラーゼ-cAMP 経路の活性化が、甲状腺機能亢進状態における骨リモデリングの亢進に対し、p38 MAP kinase 活性化の減弱を介して抑制的に作用する可能性が強く示唆された。これら細胞レベルでの機能たんぱく質の解析結果は、疾患関連たんぱく質の動態を詳細に解析する際、極めて重要な示唆を与えるものと考えられる。

D-10: 乳癌、消化器癌組織のプロテオーム解析に

関する研究

乳癌、消化器癌の臨床データと残余組織の保存については倫理的問題が解決され、保存の準備が整った。リンパ腫の生検組織と閉塞性肺疾患の血清については現在倫理的問題について検討中である。リンパ腫については、すでに臨床データと生検組織の準備は整っている。運動ニューロン病の血清については現在倫理的問題について検討を開始した。

検体保存については、検体採取から保存場所までの時間を如何に短縮でき、蛋白解析が均一なサンプルで行えるかなどの問題がある。また、生検材料の場合は、採取して保存までの時間に問題はないが、得られる残余検体量が少なく、現在の手法での解析が可能かどうか問題が残る。また、臨床データをどこまで記載するか、また臨床の様々なパラメーターと組織の蛋白解析で得られた疾患特異的蛋白の統計学的解析方法をどうするかなどの問題も残った。これら研究は個人情報保護法に抵触しないよう慎重に研究を進める必要がある。

D-11: 疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

1) 尿たんぱく質・ペプチドのプロファイリングとマーカー探索

癌などの早期診断及び予後診断においてマーカーとなる物質の存在は重要である。最近、たんぱく質や糖鎖をターゲットとした分野において疾患マーカーの探索研究が盛んに行われるようになった。我々は、その材料として、比較的未知の領域で、採取が最も容易な尿中のたんぱく質・ペプチドに注目した。尿中には膨大な量の代謝産物や塩などが存在するので、まず、これら複雑な混合物の中からのたんぱく質・ペプチドの単離を迅速に行える方法を確立した。次に、尿たんぱく質・ペプチドの変動や個体間での差などについて検討した。特に、尿ペプチドの多くはた

んぱく質の分解産物であるため、これまでその全体の存在様式はほとんど調べられていなかった。

まず、健常者から採取した尿を用いて、単離した尿ペプチドの安定性や、個人での日内変動、個体間での差を1D-LC(RP-HPLC)により調べた。その結果、凍結融解(2回)では全く分解は起こらず、37°Cで24hインキュベーションを行うと一部のペプチドについて分解が見られた。日内変動については非常に少なく、また、個体差についてはプレリミナリーな結果ではあるが、年齢による差が見られた。

今回さらに、より多くのペプチドリストを得る目的で2D-LC(イオン交換とnano-LC)による方法を確立し、この方法を用いて健常者、及び、疾患患者の尿について分析を行った。その結果、いくつかの検体から健常者と有意に異なるペプチドが同定された。

2) デュアルスプレーヤー/高電圧スイッチングによる精密質量測定法の開発

新規なデュアルスプレーヤー/高電圧スイッチング法により、ナノESI、及び、ナノLC/ESI-MSにおいてサブピコモル量の微量ペプチドやたんぱく質消化物のミリマス測定が可能となった。カルボキシメチル化BSAのLEP消化物100fmolのLC/ESI-MSにおいては ± 2 mDa以内の精度での測定を達成できた。本システムはたんぱく質の同定確度の向上や未知修飾の構造解析に有効と考えられる。実際に、本装置を装着したMS/MSにより、マウス由来トランスデュースインγサブユニットのC末端ファルネシル化修飾を決定することができた。

3) 安定同位体標識(^{18}O)による量変動解析のためのソフトウェア(Isotopica)の開発(キューバ国立遺伝子工学・バイオテクノロジーセンターとの共同研究)

本ソフトウェアにより、MSあるいはMS/MSスペクトルとデータベース検索等で得られた候補配列や分子式を自動で照合することが可能となった。さらに、同位体分布を詳細に解析することができるので、 ^{18}O

標識のようにわずかな質量差(2Da)しか与えない場合においても、標識体と非標識体の比を解析することが可能となった。本ソフトウェアは、<http://coco.protein.osaka-u.ac.jp/isotopica/>にて既に公開しており、インターネットにより利用可能である。

4) 糖ペプチドの分析による糖たんぱく質糖鎖の部位特異的解析

糖ペプチドの質量分析による部位特異的糖鎖構造解析の有用性を検証するため、ヒト血清トランスフェリンを用いて実験を行った。カルボキシメチル化したヒト血清トランスフェリン(100fmol)の酵素消化物をnanoLC/MSにより解析したところ、既知の2箇所の糖鎖結合部位(Asn432、Asn630)の他に、Asn491にも全体の2%だけ糖鎖が結合していることを見出した。この部位は、Asn-X-Cysモチーフという非常にまれな糖鎖結合部位で、ヒト血清トランスフェリンで8例目となる(文献7)。Asn491には、2分岐複合型の糖鎖のみが検出されたが、Asn432とAsn630では2分岐複合型糖鎖に加え、Fucの結合した糖鎖、3分岐複合型の糖鎖も微量成分として検出された。ESI-MSで得られた糖ペプチドのシグナル強度比から、それぞれの糖鎖結合部位に結合している糖鎖の種類と存在比を求めた。次に、質量情報のみでは分からないFucの結合部位を調べるため、糖ペプチドのMS/MS解析を行った。これまでの報告からFucの結合部位は、還元末端のGlcNAcに結合したFuc(α 1-6)修飾と分岐のGlcNAcに結合したFuc(α 1-3)修飾[Le^x]が考えられる。Asn432では、Le^xの存在を示すオキシニウムイオン(512、803)のみが検出され、Le^x型のFucのみが含まれていることが分かった。一方、Asn630はLe^x型Fucの他に、Fuc(α 1-6)修飾の存在を示す還元末端側フラグメントイオンが検出された。そこで、 α 1-3/4フコシダーゼによりFuc(α 1-3)修飾を除き、それにより残存する還元末端Fuc(α 1-6)結合型糖ペプチドの存在比をシグナル

強度から割り出した。以上の結果より、それぞれ3つの糖鎖結合部位での糖鎖構造と存在比を明らかにすることができた。今回の解析で、ヒト血清トランスフェリンにおいてAsn630にのみ2分岐複合型の糖鎖にFuc(α 1-6)修飾が存在することが明らかとなったが、この糖鎖構造は、山下らによって肝臓癌患者で増加することが報告されている。山下らの報告はトランスフェリンの糖鎖全体の変化についてのものであるが、今回の結果から、Asn630における糖鎖変異(Fuc(α 1-6)付加)が肝臓癌における糖鎖の主要な構造変化であることが推測される。

5) リン酸化部位の決定

概日リズムに関わるたんぱく質のリン酸化部位をnanoLC/ESI-MS/MSにより決定した。その結果、隣り合うSer-431とThr-432の2箇所がリン酸化されたもの、どちらか一方がリン酸化されたもの、そして、リン酸化されていないもの計4種類の分子種が同定された。確認のため、上記4種のリン酸化ペプチドを化学合成したものに對し同様な測定を行い、観測されたフラグメントイオンの検証を行った。

尿の前処理、及び、ペプチド・たんぱく質の分離法については、ほぼルーチン化できた。現在、分子量1万以下の低分子ペプチドについて個々人のプロファイルを蓄積しているが、高分子量画分のプロファイルを今後データとして追加していく予定である。また、現プロトコールにおいては、陽イオン交換、逆相クロマトグラフィーを用いて1200画分に分画してプロファイルを得ているが、微量成分の検出には未だ十分とは言えない。今後、自動化のための装置開発を検討し、より多くの分画を効率よく得て分析できる方法を確立したい。

量変動解析については、たんぱく質画分に対しては、既に、酵素消化による¹⁸O標識と“Isotopica”を用いて量変動解析が行えることを実証したが、ペプチド画分については量変動解析は行えないため、今後の最重要課題として取り組みたい。

健康人と疾患患者の尿のペプチド画分の比較解

析から幾つかの疾患マーカー候補が得られている。今後、再現性と症例を増やして検証していく予定である。

尿中には糖たんぱく質や糖ペプチドが多く存在している。糖たんぱく質糖鎖のプロファイルを効率よく取得でき、それらの構造解析を高感度で行える方法を確立し、糖たんぱく質糖鎖と病態との関連を精査する予定である。特に、本年度の成果で見出したトランスフェリンの Asn630 における還元末端 Fuc 修飾については、(肝)癌との関連において、実際の患者血清由来のトランスフェリンを用いて調べることで実証したい。

データ処理に関しては、尿の分析で得られる膨大な質量スペクトルデータを自動で効率よく解析するに至っていないが、質量分析計付属のデータ解析ソフトウェアにより作成される二次データをもとに視覚的に解析が行えるソフトウェアを開発している。一方、安定同位体を利用する変動解析は今後の重要な課題であるが、ハイスループットで量変動解析を行うことのできる方法を開発する予定である。

D-12: 癌組織を用いたプロテオーム解析技術の確立

組織の固定は、95%エタノール、1分で、たんぱく質の流出、分解は認められなかった。脱脂処理に関してはアセトン、クロロホルム:メタノール(2:1)の処理を検討したが、脱脂処理により膜たんぱく質が効率よく可溶化される傾向は認められなかった。染色法では、癌細胞の顕微鏡下での観察、同定されやすさにより、ヘマトキシリンの希釈率を変える必要がある。通常は原液の3倍希釈が適当である。また、エオジン染色は、エオジンがたんぱく質から解離されにくく、その後の解析に悪影響を及ぼす可能性があるため、極力避けるべきである。組織染色後、切片を自然乾燥させ、レーザーマイクロダイセクションを行うが、できるだけ早急にダイセクションを行うほうがホイルか

らのたんぱく質の回収率がよい。乾燥後1週間以上経過すると、ホイルからのたんぱく質の抽出率は非常に低下する。レーザーマイクロダイセクションで回収された癌細胞は 8M Urea、2% CHAPS、50mM Tris buffer(pH 7.4)に溶解させるが、その際、超音波処理を5分間行うことにより、ほぼ全量のたんぱく質が回収できる。たんぱく質を 200 μ g 程度回収するには、比較的癌細胞が密に存在する癌組織であれば、癌切片 5-10 枚、癌細胞密度が低い癌組織では、癌切片 30 枚程度必要であった。

上記方法で大腸癌サンプルから回収した癌細胞を可溶化後、2次元電気泳動に供した。SYPRO Ruby で非常に薄く染色されたものから濃く染色されたものまで 10 スポットをカットし、in gel digest 後、LC/MS/MSを行った結果、全スポットのたんぱく質が同定可能であった。同じサンプルをトリプシン処理後、2次元液体クロマトグラフィー/MS/MS システムでの解析を行った。約 500 種類のたんぱく質が同定でき、そのほとんどが癌細胞に由来するたんぱく質と思われる。しかし、一部にコラーゲンなどの間質の成分、血管内の残存血液成分が含まれており、わずかではあるが癌細胞以外のたんぱく質成分が混入していた。

癌組織のプロテオーム解析のクオリティを高めるため、レーザーマイクロダイセクション法により癌細胞を選択的に切り出し、たんぱく質を抽出する前処理法を検討し、プロトコルはほぼ確立された。ただし、たんぱく質量で 200 μ g 得るには、癌細胞の組織内の密度によるが、半日から2日要する。この方法で抽出された癌細胞由来のたんぱく質は、2次元電気泳動や2次元液体クロマトグラフィー/MS/MS システムなどの通常のプロテオーム解析に用いることができる。

D-13: 生体サンプル由来たんぱく質の前処理法の確立及び生体中微量たんぱく質の各種分離技術の確立

1) 創薬プロテオームファクトリー施設倫理審査委員会の設立:

研究協力機関(7医療機関)より提供される患者試料を用いてプロテーム解析を行う場合、業務計画内容のみならず臨床情報、ヒト試料等の匿名化、送付・受領法に関して、倫理的配慮の下で適正であるか審査を受けなければならない。そのため、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針(平成16年12月28日改正)」に従い、本施設の倫理審査委員会を設置し、各研究協力機関独自の倫理審査とあいまって慎重かつ適正な審査体制を整備した。倫理審査委員会のメンバーは、内部委員1名、外部委員6名であり、以下の通りである。

創薬プロテオームファクトリー施設倫理審査委員会
同 委員長:岡田 善雄((財)千里ライフサイエンス振興財団、外部委員)
同 委員長代行:横田 正幸((財)ヒューマンサイエンス振興財団、内部委員)
同 委員:脇舛 光廣(武田薬品工業(株)、外部委員)
同 委員:神崎 俊彦(一般市民、外部委員)
同 委員:谷本 剛(医薬基盤研究所、外部委員)
同 委員:玉岡 かおる(作家、外部委員)
同 委員:手嶋 豊(神戸大学大学院法学研究科、外部委員)

これまでに、6回の倫理審査委員会が開催され、5研究協力機関からのヒト試料の受け入れおよび研究計画について審議し、いずれも承認された。なお、既に3研究協力機関(国立成育医療センター、国立精神・神経センター、国立国際医療センター)よりヒト試料を受け入れた。

研究課題 (審査順)

国立成育医療センター:腎疾患および免疫・アレルギー疾患における原因たんぱく質の探索

国立精神・神経センター:パーキンソン病およびパーキンソン症候群における原因たんぱく質の探索

国立長寿医療センター:痴呆、骨粗鬆および褥瘡疾患における原因たんぱく質の探索

国立国際医療センター:糖尿病合併症動脈硬化性疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーの探索

大阪府立成人病センター:各種がん疾患における原因たんぱく質および疾患マーカーたんぱく質の探索

2) 匿名化システムの構築:

創薬プロテオームファクトリープロジェクトでは、ヒト試料等提供者の個人情報を厳重に守るため、研究協力機関(一次匿名化)とPF(二次匿名化)で二重に匿名化され、限定された人以外、提供者を特定することができないシステムを構築した。

すなわち、研究協力機関側で発行される一次匿名化番号は、試料の提供元を表すID、患者のID、試料の種類を表すID、同じ患者からの試料の採取回数、分注本数で構成した。研究協力機関側から、一次匿名化番号シールを貼付したチューブに分注した試料、匿名化番号ごとのヒト試料等提供通知書、臨床情報通知書および暗号化した臨床情報(Excelシート)をPFに送付して頂くことにした。なお、臨床情報はPFの個人情報管理室内の鍵付きの保管庫に厳重に保管した。(図40)

一方、プロテオームファクトリー施設側で発行する二次匿名化番号は、固定文字P、試料提供元を表すID、プロジェクトを表すID、試料、試料区分、同じ患者からの試料の採取回数、分注本数で構成した。番号体系を定義付けることで、担当者が取り扱う試料を判別し易くし、試料の取り間違いなどの人為的なミスが無いようにした。なお、二次匿名化は厳重に管理されている個人情報管理室で個人情報管理者によって行われる。(図41)

3) 試料管理システム(Laboratory Information