

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析; 癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 ……	271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 ……	281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 ……	288
第4分野			
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 ……	307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 ……	315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 ……	319
第5分野			
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 ……	327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 ……	336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 ……	342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 ……	387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 ……	395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）

所属 国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子細胞医薬部

研究者 鈴木 孝昌

研究要旨 DNA マイクロアレイおよびプロテインチップの臨床診断への応用を目的とした、データの評価技術および判定基準の作成に関する基礎的検討を行うとともに、実用化へ向けた条件検討および手法の改良を行った。

分担研究者

(1) 第一化学薬品株式会社 牛沢 幸司

(2) 富士レビオ株式会社 伊勢 伸之

A. 研究目的

近年、DNA マイクロアレイやプロテインチップなど、ゲノム情報を利用した新しい解析手法をバイオマーカー等の検索に用いることにより、癌をはじめとする各種疾病の診断および薬剤の有効性の判定等に用いようとする研究が進められている。すでに欧米で初めての診断用 DNA チップとして P450 の多型を検出するための GeneChip が承認を受け、いよいよその臨床応用が始まりつつある段階にある。しかし、DNA マイクロアレイやプロテインチップなど全く新しい技術を診断手法として利用するには、用いるアレイやチップの品質の恒常性をどのように担保するか、また診断指標としての有効性をどのように評価するか等、今までにない視点に立った評価が求められる。すなわち、アレイやチップを用いた分子診断技術を迅速に臨床応用に結びつけるためには、品質や有効性の的確な評価手法の確立が急務で

ある。現在、その応用例として癌組織を使った遺伝子発現のパターンから、薬剤の有効性や予後の予測を行う試みがなされているが、この場合データそのものの評価とともに、蓄積されたデータの中からどのデータを診断指標とするのか、あるいはその診断指標の信頼性に関しても評価する手法を検討することが必要となる。そこで、本研究では、臨床応用により近いと考えられる SNP や感染菌種の特定制した遺伝子型に基づいた判定法への応用に注目して、DNA マイクロアレイを使った診断法のデータ評価を行った。この目的において、本研究では、これら新しい解析技術の現状における問題点を抽出解析し、その改良を行うことにより、より信頼性の高い診断技術の開発を行うとともに、その有効性の評価手法に関して基礎的な検討を行うことにより、今後予測される関連技術を用いた診断手法の評価における基礎を築くことができると期待できる。

一方、プロテインチップに関しては、質量分析計と組み合わせたシステムや、抗体などをスポットティングしたガラスアレイなどが開発されており、腫瘍マーカーの検索に有効であることなどが報告されているが、技術的には DNA マイクロアレイと比較してまだまだ開発途上にある技術であり、信頼されう

る診断データを得るためには、さらに手法の改良や、データの評価法の検討が必要であると考えられる。本研究では、ハイスループットな酵素免疫測定法としても期待される抗体プロテインチップの有効利用に関して、信頼性のあるデータを得るために必要なチップ作成上の問題点を検証し、その克服に向けた条件検討や実際のデータ解析を通じて、DNA マイクロアレイと同等の信頼性を持つプロテインチップの開発を試みるとともに、それらを用いた解析におけるデータ評価法および判定基準の確立をめざす。

これらの目的の達成のため、昨年度は既存の DNA マイクロアレイとして、染色体解析のための CGH (Comparative Genome Hybridization) 法に用いる CGH アレイを用いて、実際のデータを取得することにより、そのデータの評価と有効性の検証を行った。今年度はさらに、新しい CGH 法としても期待される一塩基多型(SNP)検出用 GeneChip を用いた検討を行い、SNP 判定の正確性と染色体解析への応用に関して検討を行った(国立医薬品食品衛生研究所)。

また、DNA マイクロアレイを使った解析では、通常蛍光ラベルしたプローブを用いたオーバーナイトのハイブリダイゼーションによるシグナルの検出が行われるが、蛍光色素の安定性や所要時間が長いと言った問題点があり、臨床応用へ向けた課題となっている。そこで、より迅速かつ安定した検出法として、DNA 2本鎖特異的挿入剤を用いた電流検出型の DNA チップの開発を、(株) 東芝の協力のもとに行い、モデルケースとしてヒトパピローマウイルス(HPV)の遺伝子型判定への応用に関する基礎検討を行ってきた。今年度は、これまでの基礎検討をベースに、臨床検体を用いて対象法であるシーケンス法との比較を行い本法の技術評価とその応用可能性について検討した(第一化学薬品)。

さらに、プロテインチップに関しては、抗原を固相基板に集積し、多数の抗原抗体反応を同一基板上で行うことにより、一度に大量の診断マーカーに関して同時に定量が可能なプロテインチップの開発をめざし、基礎的な検討を行った。プロテインチップ

の実用化に当たっては、従来の試験方法で求められていた個々の試験精度にどれだけ迫れるかが課題となり、また、一方でマルチエンドポイントによる解析という面からも、新たな評価基準の導入も必要になる。DNA チップと比べて新しい技術であるため、データの安定性、再現性といったハードウェア面に関してまだ十分な検討が行われているとはいえ、臨床応用へ向けて解決すべき問題も多いと考えられる。本研究では、これらの検討課題を明確にし、信頼性のあるデータを取得しうるプロテインチップを開発することを目的とした。また併せて、実際に得られるデータを元に、新たな評価基準の作成に関する基礎的検討を行うことを目的とした。

この過程において、プロテインチップの開発には、これまで以上に抗体等の素材の品質を高める必要があることが判明したことから、今年度はより高品質な抗体を得るための検討を行った。モノクローナル抗体の作製には、従来遺伝子工学的に大腸菌、昆虫細胞あるいは動物細胞で発現させた蛋白質が免疫原として用いられてきたが、これらの手法では、発現量が少ない、本来の構造を維持して発現されない、宿主由来蛋白質により、目的の免疫原の効果が損なわれる等の問題点があった。それに対して、近年効率的に高品質の抗体を開発する方法として DNA 免疫法が注目されている。免疫動物自体の蛋白質発現機構により産生される抗原で抗体産生を誘導するため、抗原の作製期間の短縮とコストダウンが可能となる。特に抗原の調整が困難な場合には非常に有効となる。さらに、免疫原が本来持つであろう構造をおそらく 100%保持した状態で免疫誘導を行うことができるので、抗原に対して高い親和性を持つ理想的な抗体が確立されることが期待される。そのような期待から、高性能のプロテインチップを効率的に開発するには必要不可欠の技術と考えられ、本年度の研究の中で本 DNA 免疫技術の可能性を検証することとした(富士レビオ)。

B. 研究方法

1. SNP チップを用いた多型および染色体解析

1-1. 使用した SNP チップ

ヒト約 1 万 SNP サイトを網羅した Human Mapping 10K 2.0 Array (Affymetrix)を用いた。アレイには、420,000 以上のプローブセルが含まれ、各プローブセルは、フォトリソグラフィ製造法により同時合成された配列の明らかな 25 bp オリゴヌクレオチドプローブ、1 種類あたり 100 万コピー以上から構成される。各 SNP には、1 組が 4 つのプローブからなる 5 組のプローブが対応し、各組は、4 対のパーフェクトマッチプローブと mismatches プローブから成り、位置をずらして SNP1 個あたりの 25 bp オリゴヌクレオチド合計 40 種類により判定を行う。

1-2. ゲノム DNA の制限酵素による消化とラベル化

細胞より抽出したゲノム DNA 250ng を制限酵素 XbaI で消化し、XbaI シークエンスと続く PCR 増幅用のプライマー配列を持つアダプターをライゲーションした。その後、アダプター配列を認識する一種類のプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅した。この際、PCR 条件は 250~1,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するよう最適化してある。次に、増幅した DNA を断片化し、ピオチン標識した後、GeneChip Mapping 10K 2.0 Array にハイブリダイズした。

1-3. チップへのハイブリと、染色、洗浄およびシグナル検出

チップへのハイブリダイゼーションは、55 度にて一晩行い、ハイブリ溶液を除いた後、発現解析用チップと同様に Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックスステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン・フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

1-4. SNP の判定と LOH 解析

SNP の判定には、各 40 プローブずつのシグナル強度データを、専用の解析ソフトである GeneChip DNA Analysis Software (GDAS) ソフトウェアで解析した。SNP 判定を元に、GDAS によ

り LOH 領域が判定された。

1-5. ゲノムコピー数の解析

ゲノムコピー数の解析のため、Affymetrix 社より提供された、Copy Number Analysis Tool (CNAG)を当初用いた。しかし、満足な結果が得られなかったため、独自の手法を開発するとともに、フリーウェアとして利用可能であった、dCHIP (Lin et al., 2004) というソフトウェアを使用した。

2. 電流検出型 DNA チップを用いた HPV の遺伝子型判定

2-1. 測定プロセス

1 3 種の HPV 遺伝子型判定に対応するプライマーを準備し、3 種ないし 4 種の異なる対応プライマーを組み合わせ、マルチプレックスの増幅を行わせた。増幅法は、感度面および電流検出との適性より LAMP 法を選択し、抽出から測定までの条件を設定した。

2-2. 電流検出型 DNA チップ

DNA チップは、電極表面にプローブを固定化したものを用い、測定は DNA チップ自動検査装置 GLH-2C301 (試作機)を用いて行った。ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までのプロセスを自動化しており、2-1 の項で調整した LAMP 法による遺伝子増幅産物を専用の DNA チップカセットに注入後、装置にセット、DNA 解析を行った。

2-3. 測定対象

測定対象は、子宮頸部より採取された搔過細胞中より抽出されたヒトパピローマウイルス (HPV) 遺伝子を含む試料を用いた。

2-4. 標準品の作成

評価の基準となる 1 3 種の HPV の DNA につき調整した。HPV のタイプによって長さが異なったり、ベクターが異なると評価基準として適さないことから、合成 HPV 断片に合わせて標準プラスミドを作成、PCR により約 1 kb の断片を増幅させ、サブクローニングした。サブクローニング後、プラスミドを増幅・抽出後、増幅確認を行った。

3. 抗体を用いたプロテインチップに関する検討

3-1. 反応場の固相抗体量と感度との相関検討

プロテインチップの構築では、微小反応場によって固相抗体量が制限されるための感度限界がある。そこで、固相抗体濃度依存的な検出感度を把握する目的で、反応平衡論的な理論計算式の作成及び実験による検証を行い、さらに理論計算式を用いて、感度限界に関する考察を行った。

3-2. 抗体作製方法の検討

DNA 免疫法は、通常培養動物細胞で外来遺伝子を発現させる時に用いるプラスミドベクターを免疫動物に接種し、免疫動物内で遺伝子発現を起こさせ、遺伝子発現産物（蛋白質）に対する免疫誘導を行うことにより抗体の作製を行うものである。精製蛋白質を免疫原とする蛋白質免疫法に対する本 DNA 免疫法の有効性を検証するため、同じ IL-12 ヒトサイトカイン遺伝子を材料として蛋白質免疫と DNA 免疫を並行して行い、それぞれの手法により作製された抗体の性能評価を行った。

(倫理面への配慮)

正常ヒト由来の DNA サンプルとして、SNP チップには、Affymetrix 社より提供されたキット付属の DNA サンプルを対象として使用した。

病原性のウイルスを取り扱う実験においては、国際的なガイドラインである WHO の「実験室バイオセーフティ指針」、あるいは総理府作成の「組換え DNA 実験指針」、国立感染症研究所作成の「病原体等安全管理規定」に従って研究を行った。

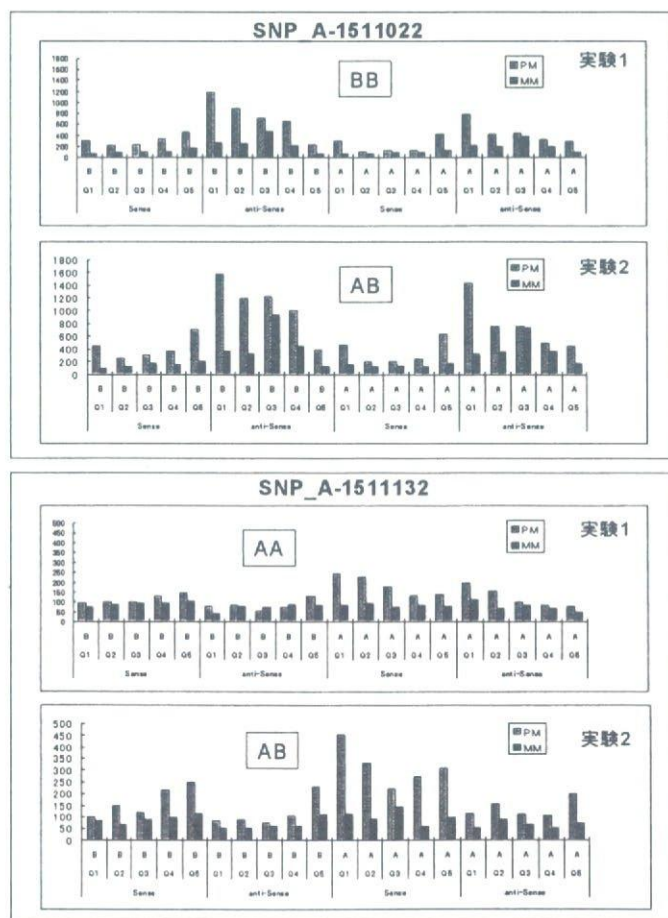
C. 研究結果

1. SNP チップを用いた多型および染色体解析

SNP チップによる解析結果は、GDAS という付属のソフトウェアにて解析され、アレル call は、AA、AB、BB のいずれかを取ることになる。判定がつけられない場合には、No call と判定され、この Call Rate が実験操作がうまくいっていたかどうかを判断する材料となる。実際に、初回の実験においては

この call rate が 70-80% と低く、この原因として制限酵素のロットが悪かったことが判明し、これを変更することにより Call rate は 95% 以上に回復した。この結果から、Call rate が試験のバリデーションとして有効であることが示された。次に、本試験系により得られるデータの再現性を検討するため、同一検体（コントロールの DNA）を用いた独立した実験での SNP call の比較を行った。まず、初回の call rate が低かったデータを用いた場合には、全体に再現性は高く、Error Rate は $308/10204 = 3\%$ であった。さらに、call rate が 95% 以上であったケースについて同様の検討を行ってみると、不一致例はわずか 4 箇所であり、Error rate は $4/10204 = 0.04\%$ と低いものであった。不一致例の内容を検討する意味で raw data の比較を行ってみると、全体としてシグナルの出方は共通していたが、シグナル強度の多少の差異により、判定結果に差が生じていることがわかった（図 1）。

図1 2回の実験で SNP コールが食い違った事例

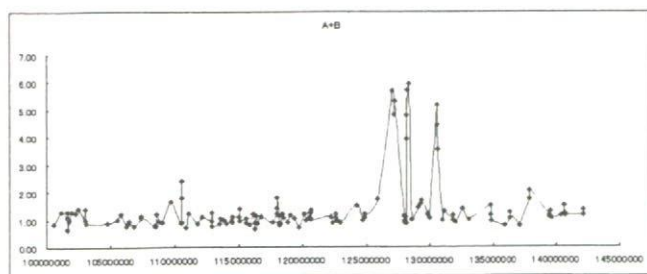


SNP チップでは、基本的にオリゴマーのハイブリッドシグナル強度に基づき判定を行うが、一塩基の差での比較となるため、どうしても厳密な判定が難しい。正しく判定されているケースにおいても、すべてのプローブが正しいシグナルを出すとは限らないため、判定の厳密性が要求される場合には、注意が必要であると考えられる。

一方、SNP アレイはその網羅性と解像度からゲノムワイドな LOH の診断法としても非常に注目される技術である。その有用性を確かめるため、すでに染色体欠失領域が CGH アレイ等により確認されているヒトリンパ種細胞株 TK6 の変異クローンを用いて、SNP call の変化を調べた。SNP 解析の結果欠失があると思われる部分においてヘテロ接合性の欠失、すなわち AB call の消失が認められた。この結果は、昨年度の検討において得られた CGH によるデータと一致した。GDAS ソフトウェアは染色体のコピー数まで考慮して判定をしないため、A/- または B/- の判定はできない。しかし、raw データを見ると図 1 のように、シグナルの強度からある程度コピー数を算出可能であると考えられる。そこで、独自の解析法として、マニュアルでの判定法を開発した。この手法を利用して HL60 細胞の増殖を持つことが知られている 8 番染色体 c-myc 領域のコピー数の変化を調べてみると、アレイ CGH の結果では一箇所の増幅領域として捕まっていたものが、図 2 に示したとおり、少なくとも 3 つの独立した増幅領域からなることが明らかとなった。

さらに、HL60 細胞の亜株である RG 株と親株の比較により、これまでに全く予想できなかった 1 番染色体全領域の LOH が新たに見いだされた。

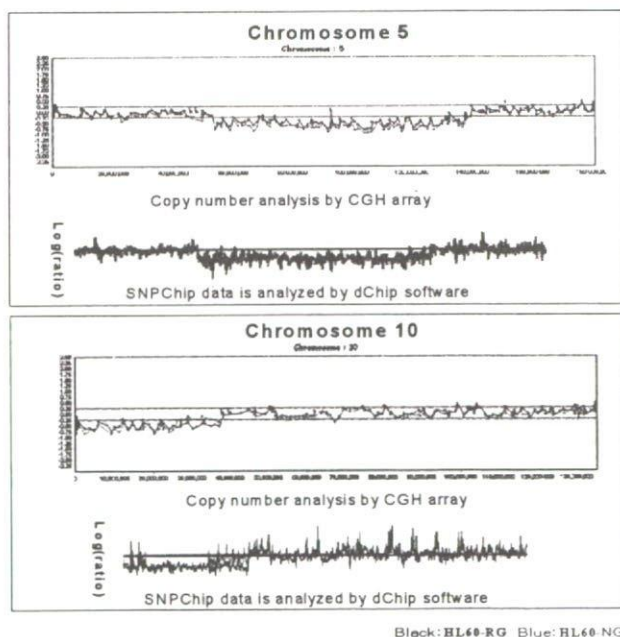
図2 HL60 細胞における 8 番染色体 c-myc 近傍領域のコピー数変化



CGH 解析の結果からも染色体の量的変化は起こっていないため、父もしくは母由来の染色体の片側が消失し、片親由来の染色体に置き換わった uniparental disomy が起きていると結論できる。

一方、染色体解析において欠失の見られた 11 番染色体短腕領域は、同様にしてヘテロ接合性の消失が見られるが (AA 若しくは BB call)、CGH の結果からもこの部位では染色体コピー数が半減していることより、それぞれ A/- または B/- という欠失型の LOH であると結論できる。染色体コピー数の増減に関しても検討を加えるため、オリジナルな解析法と同時に Web 上のフリーソフトとして利用可能な d-CHIP ソフトウェアを使って検討を行った。d-CHIP を使った解析においては、図 3 に示すように BAC CGH とほぼ同様の結果が得られた。即ち、5 番染色体においては NG, RG 株とも同じ領域において染色体の欠失が検出でき、10 番染色体短腕部における欠失に関しては、RG 株の方がやや長い欠失領域を持つという CGH の結果が SNP チップでも再現された。以上の結果より、SNP チップは染色体の増減解析において CGH 解析と同様に使用することができ、その際に、d Chip という解析ソフトウェアが有効であることが示された。

図3 d-Chip ソフトウェアによるコピー数の解析結果と CGH アレイによる結果の比較

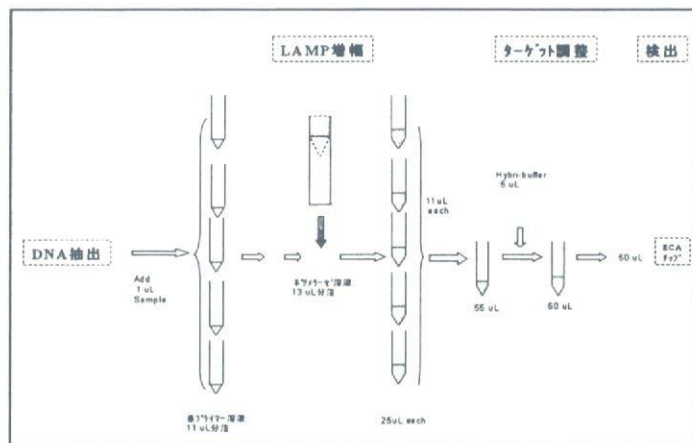


2. 電流検出型 DNA チップを用いた HPV の遺伝子型判定

(1) 測定プロセスの設定

マルチプライマーセットを用いて、high risk グループの増幅について検討した結果、図4のような測定プロセスと設定した。

図4 HPV タイピング試薬の測定プロセス概要



(2) 臨床検体の測定

市販の DNA 抽出キット(Qiagen)を用いて DNA を抽出し、特異的に増幅するマルチプレックスのプライマーの組み合わせにより、LAMP 増幅産物を調製し、DNA チップを用いて測定した。その結果、コンセンサスプライマー-PCR 増幅物のシーケンス結果と本 LAMP-DNA チップ法による結果は、表1に示すようにほぼ一致し、LAMP-DNAチップによる方法でPCRの結果を全て含む結果となった。

表1 臨床検体による HPV タイピング結果

No.	検体番号	PCR-ダイレクトシーケンス法	LAMP-DNAチップ法
1	186	51	51
2	187	18	18
3	188	58	58
4	189	39	39,45,52
5	190	-	-
6	191	58	58
7	193	31,59	31,51
8	194	58	58
9	195	31,39,51,52	31,39,51,52
10	196	52	52

-: Negative sample
赤字: 一致したもの

(3) 標準品DNA

13種のプラスミドを増幅し抽出した結果、ハイリスク1

2種で60分以内にLAMP増幅反応の開始が確認できたことから、標準品として評価に有用である結果が得られた。

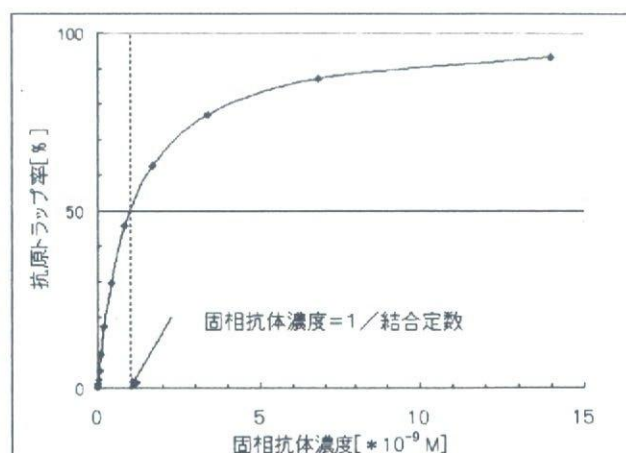
3. 抗体を用いたプロテインチップ作製に関する基礎的検討

(1) 反応場の固相抗体量と感度との相関検討

免疫平衡反応に関する一般式を基に実際のイムノアッセイの仮定を織り込むことにより理論計算式を作成した。抗体の結合定数 K として 10^9 L/M、測定対象物質の濃度を終濃度 1.7×10^{-10} M 程度として、市販品として確立している実際のイムノアッセイ系により妥当性を評価したところ、抗原あるいは抗体の濃度パラメータ変化に対する直線性を含め、ほぼ理論値に近い挙動を示すことがわかった。

本理論式によると、十分な固相面積を確保し、測定対象物質の濃度に対して抗体過剰の条件でイムノアッセイを行う限り、結合抗原/添加抗原 $\times 100$ (%) で表される抗原トラップ率は90%近くとなり、高感度な条件でイムノアッセイ系が構築できることがわかった(図5参照)。一方、その条件から固相抗体濃度を下げると抗原のトラップ率は低下し、固相抗体濃度が結合定数の逆数 ($1/\text{結合定数}$) になる条件で50%のトラップ率となり、それ以下になると急激にトラップ率が低下することがわかった。通常のELISAあるいは高感度イムノアッセイ系である化学発光系イムノアッセイプラットフォーム(商品名: Lumipulse) と比べ、一般的なガラスあるいは

図5 免疫反応平衡時抗原トラップ率曲線



プラスチック基盤上へスポットするタイプの抗体チップを想定した場合、理論的な反応場面積は 10~100 倍縮小したものを想定する必要がある。その場合を本理論式で計算すると、トラップ率は 5%程度にまで低下するものと考えられ、それに伴い感度は 20%以上低下することになる。以上の結果から、単純にイムノアッセイ系を微小場において構築することを考えると、大幅な感度低下を招くこととなる。今回作成した理論計算式を用いて、現行のイムノアッセイ系の感度を損なわずに高感度のプロテインチップを構築する条件を考えると、微小場において可能な限り多くの固相抗体量を確保する技術が確立するか、あるいは、固相抗体減少分を高アフィニティの抗体により代償する方法が考えられ、それらの効果の相乗によって実現可能になるものと考えられた。

(2) 抗体作製方法の検討

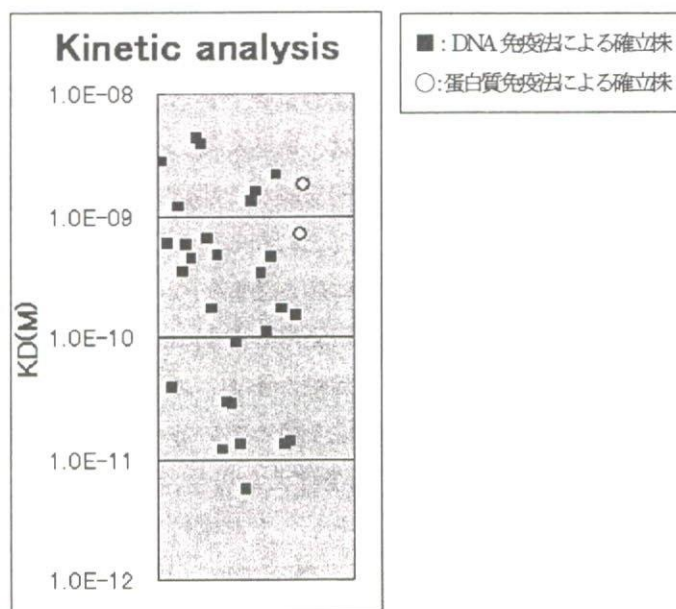
CHO 発現 IL-12 蛋白質による蛋白質免疫法、IL-12 遺伝子を直接マウスに接種する DNA 免疫法の有効性を比較検討した。まず両免疫方法の免疫誘導効果を比較したところ、蛋白質免疫法に比較して DNA 免疫法の方が、免疫誘導効果が圧倒的に高いことがわかった。6 匹程度のマウスに免疫して、ELISA での抗原反応性のある閾値を指標に得られた抗体株数を比較すると、蛋白質免疫法では 2 株の抗体しか得られなかったのに対して、DNA 免疫法ではその 15 倍に相当する約 30 株以上の抗体株が確立された。

さらにそれぞれの免疫法によって樹立された抗体について、免疫原とした IL-12 に対する感度及び IL-12 に対するアフィニティ等の抗体性能を比較評価した。蛋白質免疫法によって樹立された抗体ペアと DNA 免疫法によって樹立された抗体ペアによるサンドイッチ ELISA での IL-12 に対する反応性を比較したところ、前者に対して後者の方が 5 倍程度高いシグナルを示し、圧倒的に感度が高いことが示された。また、Biacore による Kinetic analysis により IL-12 に対するアフィニティを比較評価したところ、解離定数で比較して、最高で約 100 倍程

度のアフィニティの開きが確認された(図6参照)。蛋白質免疫法で得られた抗体は 10^9 程度の解離定数しか持たなかったが、一方 DNA 免疫法では最高 10^{11} 程度の解離定数を持った抗体が確立されていることがわかった。

以上の結果から、従来の蛋白質免疫法に比べ DNA 免疫法は動物に対する免疫誘導効果に優れ、尚且つより免疫原に対して高親和性の抗体を誘導できる技術である可能性が示唆された。

図6 確立抗体のアフィニティ評価



D. 考察

SNP チップは網羅的に多型を検出する系としてその有効利用が期待される。既に、P450 の多型検出のための製品が欧米で認可されて使用されているが、それと同様の原理に基づく SNP チップを用いた検討により、本手法の問題点が明らかとなり、今後の評価基準作成の上で有用なデータとなった。基本的に本手法においては、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて塩基配列の違いを検出する事になるが、統一した条件下でハイブリを行うこともあり、一塩基のみの違いにより差をハッキリと出すことが難しい。そのため一つのサイトに対して mismatches プローブも含めた 20 個のプロロー

ブが設計され、最終的な判定を下すことになる。この結果、再現性等に関して非常に信頼性の高い結果が得られるようになってきているが、判定に関して一部曖昧さが残る。ハイブリダイゼーションのフィデリティが、SNP 検出上の課題となると考えられ、この問題をクリアするためには、他の原理に基づく SNP 検出が重要となると考える。フィデリティに着目した場合、DNA ポリメラーゼによる伸長反応を利用した方が、有用性が高いと考えられる。これには、パイロシーケンス法、インベーター法、TaqMan 法などの手法が開発されており、網羅性を求めない場合にはこうした手法が有効であると考えられる。

DNA チップを用いた手法では、個々の使用目的に応じた評価基準の作成が重要であると考えられる。網羅性を高める場合には、ある程度の正確性が犠牲にならざるを得ず、標的を絞った場合には、より高い正確性が要求されることになる。そして、前者はスクリーニング、後者は確定診断的な用途に使用されると考えられる。今回使用した Human Mapping 10K アレイは、その網羅性からも、スクリーニング系としては十分な正確性を持っていると判断できる。

SNP チップの応用面を考えた場合、我々は本研究において CGH 解析法としても非常に有効であることを示すことができた。最近では、100k、および 500k の SNP チップも利用可能となっており、さらに詳細な検討が可能である。SNP チップを用いた場合には、組み換え型の LOH の検出という CGH アレイや他の手法では検出できない異常を検出可能であり、より守備範囲の広い染色体解析手法として、今後の利用が期待される。

次に、電流検出型 DNA チップを使ったヒトパピローマウイルスの遺伝子型判定の系の構築に関しては、測定プロセスを設定するとともに、臨床検体を用いて PCR-シーケンス法と同等以上の検出感度・特異性が示唆するデータを収集することができた。また、基準 DNA の作成に着手し、増幅できることが確認され、今後評価する上で、有用な基準品となることが考えられた。今後、さらに臨床検体を用いて、データを蓄積し、臨床において信頼性・実

用性の高い遺伝子型判定システムの実用化に向けた検討予定である。加えて、本研究課題で得られた成果を基に、DNA マイクロアレイを原理とする診断手法の判定基準作り、およびその妥当性を検証する予定である。

さらに、免疫平衡反応に関する一般式を基に既存イムノアッセイ系の反応パラメータを当て嵌めてシミュレーションを行うことにより、高感度イムノアッセイ系を構築する上での必要条件を確認した。測定対象物に対するトラップ率が感度を決定付けることになるが、高レベルのトラップ率を達成するには、微小場において同程度の固相抗体量を確保するか、あるいは、固層抗体減少分を高アフィニティーの抗体により代償する必要があるものと考えられた。そのためには今後以下の検討を行う必要があるものと考えられた。

(ア) 高密度抗体固相化法の確立

単位面積当たりの抗体固相化量を向上させる。例えば、多孔質材料等を用いることにより、見かけ上の単位面積に対して、実質上の表面積を上げる方法が考えられる。あるいは、枝分かれ高分子を固相化のためのリンカーとして用い、多数の抗体を 3 次元的に高密度に配置する方法が考えられる。

(イ) 抗体アフィニティーの向上

免疫方法を改良する、あるいは、確立抗体の配列に細工を加えることにより、測定対象物に対する抗体アフィニティーの向上をはかる。

以上のような考察を踏まえ、本年度は高アフィニティーの抗体を確立する手法についても注目し、検討を行った。本年度は IL-12 という一つの項目に対する抗体作製に限定した検討であったので一般論として結論付けることは出来ないかとは思われるが、ただ、従来 of 蛋白質免疫法と比べると明らかな差異が認められた。今回検討した結果から、蛋白質免疫法と比較して 10 倍以上免疫反応誘導効果が認められ、確立抗体による IL-12 測定系の感度、確立抗体の IL-12 に対するアフィニティーにおいても、DNA 免疫法が優れていた。特にアフィニティーに関しては、DNA 免疫法で二桁程度高性能の抗体を確立で

き、微小反応場においても高感度のサンドイッチイムノアッセイ系を構築できる可能性が示された。以上のように、DNA 免疫法は、抗体作製の効率性、及び高性能の抗体作製の両方を満足するものであり、高品質のプロテインチップを効率的に開発する上で非常にメリットとなるものと期待される。

今後は本年度の検討結果を踏まえ、抗体を高密度に固相化する技術を確認すると共に、あらゆる測定対象に対して高アフィニティーの抗体を確認し、これらの技術をベースに実際に高感度プロテインチップを構築したい。また、複数の項目を同時に測定するためには、各測定対象に対して至適のアッセイ条件を同時に成立させる必要がある。プロテインチップの実用性の評価、評価基準の策定のため、まずは複数項目の血清蛋白質を対象に実検体を用いた検討を行い、早急に実用化のための目処を立てたい。

E. 結論

1. SNP 検出用 GeneChip はデータの信頼性も高く、網羅的な SNP 検出系として有用である。

また、SNP チップではシグナル強度から染色体コピー数の算出も可能であり、より詳細な CGH 法としても有用であることが、BAC クローンを用いた CGH アレイとの比較により明らかになった。さらに、SNP アレイでは LOH を簡便に検出でき、特にこれまで他の方法では検出が難しかったコピー数の変化を伴わない組み換え型の染色体変化を検出できる点で有効であることが示された。

2. 電流検出型 DNA チップを用いた HPV の遺伝子型判定について臨床検体を用いて検討を行った結果、本 HPV 検出系は、DNA マイクロアレイを原理とする診断手法の判定基準作りおよびその妥当性を検証する具体的なケースとして臨床応用可能な系であると考えられた。

3. 抗体を用いたプロテインチップに関する検討においては、理論反応式による抗原抗体反応シミュレーションと、実際に構築したイムノアッセイ系による検証を行い、反応場の固相抗体量と感度との相関を厳密に評価し、高感度プロテインチップ構築の必

要条件の確認を行った。また、抗体作製方法の改良検討を行い、DNA 免疫法が通常の蛋白質免疫法よりも一桁から二桁以上高アフィニティーの抗体を取得し得る方法であることが確認され、高感度プロテインチップ開発において非常に大きな可能性をもたらす技術であることが確認された。

4. 各種の DNA マイクロアレイおよび抗体アレイを用いた検討において、これらを臨床診断として用いる際の基本的な要件に関して理解が深まった。今後は得られた知見を発展させて、こうした新規診断手法に関する評価基準を作成するとともに、実際に臨床応用可能な製品の開発を進めてゆきたい。残念ながら、その行政的有用性が十分に評価されず、本年度にて本研究班は終了することとなったが、この2年間で得られた成果を活用し、今後も引き続き検討を続けていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M.

Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment.

Proteomics. 16, 4287-4295. (2005)

2. 学会発表

鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy 田中剛太郎, 中嶋圓, 浜田修一, 三浦知弘, 降旗千恵

Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS: Quantitative RT-PCR analysis on the selected genes by the GeneChip

日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)

欒 洋, 本間正充, Suresh Thirupathi, 小木 美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌

Application of CGH and SNP arrays for chromosome analysis

日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)

鈴木孝昌, 降旗千恵

Transcriptomics – Can gene expression profiles distinguish the genotoxic hepatocarcinogens?
日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)

三浦知弘, 欒 洋, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光,
鈴木孝昌, 田代英夫, 降旗千恵

DNA マイクロアレイを用いた非遺伝子傷害性肝発
癌物質投与マウス肝臓における遺伝子発現解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

原田基裕, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓,
浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之,
降旗千恵

Original oligonucleotide microarray による 5 種類
の遺伝子傷害性肝発がん物質と phenobarbital と
ethanol の遺伝子発現解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

宮島正樹, 欒 洋, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 村上勝彦,
野村靖幸, 降旗千恵

大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス
(Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP10
の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイクロアレイ
を用いた解析
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

鴻野貴司, 欒 洋, 鈴木孝昌, 野村靖幸, 太田浩良,
降旗千恵

8 ヶ月齢の老化促進モデルマウス
(Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP8
海馬における Transthyretin の発現低下
第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

Toshie Kanayasu-Toyoda, Tomofumi Fujino,
Tadashi Oshizawa, Takayoshi Suzuki, Tomoko
Nishimaki-Mogami, Yoji Sato, Jun-ichi Sawada,
Kazuhide Inoue, Koichi Shudo, Yasuo Ohno,
Teruhide Yamaguchi

HX531, a retinoid X receptor antagonist,
inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding
with steroid receptor coactivator-1 as detected by
surface plasmon resonance
第 78 回日本生化学会大会(2005.10)

Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi
Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi, Suzuki,
Haruhiko Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi
Ninomiya and Tetsuji Sudo

Gene expression profiles of hepatotoxin-treated
human hepatocytes can be used to cluster
unknown compounds according to their mode of
actions
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.6)

横川 伸也, Declan Mulhern, 清水 和, 小原 有弘,
北島 正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木 孝昌, 奥田 晴

宏, 宮田 直樹, 二宮 真一, 須藤 哲司

網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒性予測モ
デルの構築
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.6)

Takayoshi Suzuki

Organ-specific toxicity of aristolochic acid;
studied by the transgenic mouse mutation assay
and the DNA microarray
2nd International Conference and Exposition on
the Modernization of Traditional Chinese
Medicine (成都、中国)

Suzuki, T., Luan, Y., Honma, M., Kogi, M., and
Yamaguchi, T.

Application of microarrays for chromosome
analysis
第 9 回国際環境変異原学会サテライトシンポジウム
"トキシコゲノミクス" (ハワイ、米国)

C Furihata, K Tobe, Y Nakachi, Y Kondoh, M
Nakajima, S Hamada, C Namiki, T Suzuki, A
Hyogo, M Hoshino, M Harada, T Tashiro, H Ito, H
Inazumi, Y Sakaki and H Tashiro

Original oligonucleotide microarray-
based gene expression profile induced by genotoxic
carcinogens and Phenobarbital in mouse liver
第 9 回国際環境変異原学会サテライトシンポジウム
"トキシコゲノミクス" (ハワイ、米国)

鈴木孝昌

変異原処理による in vivo/in vitro 遺伝子発現
日本動物実験代替法学会第 19 回大会(2005.12)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社