

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－ 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－（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（総合研究報告）

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

期間 平成16年4月～平成18年3月

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。

B. 研究方法

1. CGHアレイおよびSNPチップを用いた染色体解析

1-1. CGH マイクロアレイ (MAC Array™)

Macrogen 社にて開発された MAC Array™ スライドを使用した。

1-2. 使用した細胞株

(HL60)

ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその亜株として増殖速度が亢進した株である HL60-RG 細胞を使用した。

(TK6)

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞株の tk (チミジンキナーゼ) 遺伝子変異体として、tk 遺伝子を含む 17 番染色体領域に欠失を持つことが、多型性マーカーを用いた解析から確かめられている S-11 および S-15 の 2 クロームを CGH 解析に使用した。

1-3. 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70% Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。

1-4. 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。

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。

3-3. 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。

3-4. 標準品の作成

評価の基準となる 1 3 種の HPV の DNA につき合成 HPV 断片に合わせて標準プラスミドを作成した。

3. 抗体を用いたプロテインチップに関する検討

3-1. プロテインチップ作製に関する基礎的検討

プラスチックやガラス基板をベースとして、これらの基板に効率的にかつ安定的に抗体を結合させる方法を確立すべく、基板の処理方法、抗体の結合方法について実験的検証を行った。

3-2. 反応場の固相抗体量と感度との相関検討

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。

3-3. 抗体作製方法の検討

精製蛋白質を免疫原とする蛋白質免疫法に対する 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、CGH アレイ解析には研究者本人の、もしくは委託解析用に企業が保持していた DNA サンプルを対象として使用した。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. CGH アレイおよび SNP チップを用いた解析

BAC-CGH アレイを用いた自前の解析では、あまり経験がなかったため、きれいなシグナルが得られず、メタフェーズ CGH の結果から予想される変化に対し、検出できない領域が見られた。次に開発元の MacroGen 社に委託解析を行ったところ、ムラがなく強いシグナルが得られ、メタフェーズ CGH の結果と一致した。Y 染色体上のプローブもすべて有意差が見られ、データの質の評価に有用であることがわかった。CGH アレイによる解析結果は、メタフェーズ CGH の結果とも良く一致し、より簡便な試験系としての有用性が確認できた。

Human Mapping 10K 2.0 Array を用いた検討により、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事がわかった。ただし、多型の検出は基本的にハイブリによる検出によるため、正確性という点で完全ではなく、この観点からは一塩基伸張反応を利用した方法が望ましいと考えられる。また、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り、実際に uni-parental

disomy を検出できた。

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。

2. 電流検出型 DNA チップによる HPV タイピング

HPV11 型、16 型、18 型、58 型の L1 領域に特異的な配列のプローブを固定化してある DNA チップカセットに、HPV の増幅産物 (2 型、4 型、16 型、18 型) を注入し、DNA チップ自動検査装置にて電流のカットオフ値をバックグラウンド電流 + 3SD に設定し遺伝子型の判定を行った。その結果、16 型と 18 型の増幅産物にのみ、対応するプローブからの特異的な電流信号が検出され、8 電極での同時再現性は CV 値で 5% 以下であった。次に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、測定プロセスを設定した。そして臨床検体として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、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。さらに、標準品 DNA の調整のため、13 種のプラスミドを増幅し抽出した結果、ハイリスク 12 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

基板に効率的にかつ安定的に抗体を結合させる方法を検討した結果、以下の知見を得た。①プラズマ

クリーニングによりプラスチック基板表面の濡れ特性、均質性が改善され、併せて物理吸着性能が付与された。②ポリスチレンはガラス基板より優位である。③物理吸着量が少ないポリプロピレン基板を活性エステル化 (OSu 化) し、リンカーを介して蛍光標識ストレプトアビジンを化学結合させたところ、均質性のある強いシグナルが得られた。

さらに、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。

D. 考察

DNA マイクロアレイの臨床への応用を考えた場合、判定結果が直接診断に結びつくという意味で、SNP や細菌等の遺伝子型を判定する目的で用いられるのが実用に近いと言える。今後は、使用目的に応じて、網羅性と迅速性という二極化した方向性が考えられるが、いずれの場合も、得られるシグナルの安定性、強度、均一性等が基本性能として重要であり、評価のための基準づくりが求められる。今回の検討において得られた知見を基に、今後マイクロアレイを用いた診断手法の評価法の確立に役立てていきたい。

一方、プロテインチップを臨床診断に応用することを考えた場合、やはり従来の診断プラットフォームと同様に、感度、精度、定量性を厳密に評価する必要がある。しかしながら、従来臨床診断マーカー一項目毎に臨床診断薬を開発して来たのに対して、同時に複数の (数十～数百項目の) 臨床診断マーカーを同じような定量性、精度及び感度で診断するには非常に大きな技術上の壁があるというのが現状である。定量性、精度及び感度において十分な性能を

有する診断薬を開発する技術を確立するには、既存の要素技術を根本から見直しさらに改良する必要があるものと思われる。

E. 結論

1. マイクロアレイを用いた CGH 法は、従来の手法に比べてより簡便で、詳細な解析が可能であり、染色体の増幅、欠失に関する解析において有効性が高いことが示された。また、得られたデータの質の評価に関して、Y 染色体上のプローブのデータの利用が有効であることがわかった。

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。ただし、検出には基本的にハイブリダイゼーションに基づいた原理によるため、判定の曖昧さが避けられない部分もある。その意味では、確実な診断法という観点においては一塩基伸長反応を原理とする他の方法がより望ましいと考えられる。

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検討を行った。電流のカットオフ値を、バックグラウンド電流+3SD に設定して評価した結果、配列特異的な検出が確認できた。チップ内での同時再現性は CV 値で 5% 以下であった。

さらに、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. プロテインチップ (抗体アレイ) 作成要素技術に関する調査結果に基づき、抗体の固相化方法の基礎を確立すべく検討を行った。そして、プラスチ

ック基板上に化学的結合方法で抗体を高密度に固相化可能であることが確かめられ、このことにより、今後、高感度で高精度なアッセイ系を構築できる可能性が示された。

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。

E. 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, Palanisamy Rajaguru, 小原有弘, 本間正充, 林 真, 高木篤也, 菅野 純, 山口照英
GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か
第 63 回日本癌学会総会 (2004.9.)

鈴木孝昌, 樂 洋, Palanisamy Rajaguru, 中嶋圓, 浜田修一, 兵庫淳志, 降旗千恵
DNA マイクロアレイの変異原性試験への応用に関する共同研究: GeneChip による指標遺伝子の選択
日本環境変異原学会第 33 回大会(2004.11)

鈴木孝昌

“-omics”解析がもたらす環境変異原研究の新展開
日本環境変異原学会第 33 回大会 4 研究会合同定例会(2004.11)

Takayoshi Suzuki

Current status in in vitro diagnostics in Japan
International Symposium on International Harmonization on Biopharmaceuticals-KFDA, Seoul, Korea (2004.10)

樂 洋, 本間正充, Suresh Thiruppathi, 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)

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)

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)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

・出願特許 P2004-181101 「核酸増幅法を用いたヒト乳頭腫ウイルスの検出」

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