

れていることから、糖ペプチドイオンであることが確認された。高 m/z 領域に、 m/z 1756 および 1959 の 203 u 差のフラグメントイオンが観察されており、これらのイオンはそれぞれ [peptide + H]⁺、および [peptide + HexNAc + H]⁺ と推測された。ペプチドに結合した GlcNAc が開環した $^{0.2}X_0$ イオン (m/z 1839) に相当するイオンも観察された。これらのイオンから、この糖ペプチドのペプチド部分の分子量は 1755 と推測された。

そこで、全プロダクトイオンから糖鎖由来のフラグメントイオンおよびペプチドより大きなフラグメントイオンを除いた加工データ、並びにペプチドの m/z 値 (1756) と価数 (+1) を用いて Mascot データベース検索をおこなったところ、このペプチドは $\alpha 1$ -antitrypsin 由来のペプチド YLGNATAIFFLPDEGK であることが示唆された (図 3)。このペプチドのプロダクトイオンスペクトル中には、YLGNATAIFFLPDEGK 配列から生じることが予想される b および y イオンが複数確認されたことから、このペプチドを $\alpha 1$ -antitrypsin 由来ペプチドと同定した。

同様に、 m/z 204 が検出された他の糖ペプチドの同定を行った。ペプチドは、プロダクトイオンスペクトル中に連続した 4 個以上のアミノ酸配列由来のフラグメントイオンが観察されたとき同定されたと見なした。

(2) 類似したプロダクトイオンスペクトルの積算による糖ペプチドのペプチド部分の同定

データベース検索によりペプチドを推定するには、ペプチドイオンの m/z 値と価数およびペプチド由来のフラグメントイオンの m/z 値が必要であるが、前述したように、糖ペプチドの場合は、イオン化効率が悪いいため、質の高いプロダクトイオンが得られないことがある。そこで、同一ペプチド鎖を持つ糖ペプチドの MS/MS スペクトルが、同様のフラグメントパターンを示すことを利用して、溶出時間が接近した複数の類似のスペクトルを積算した。一例として、図 4 に、 m/z 1115 と 1183 にプリカーサーイオンが観測された 3 個の

スペクトルの積算スペクトルを示す。積算データを加工し、データベース検索を行ったところ、このペプチドは IgM (P01871) の YKNNSDISSTR であることが示唆された。このように、複数のスペクトルを積算することで、ペプチドを同定することが可能となった。

このようにデータ依存的に収集したプロダクトイオンスペクトルを利用して、14 種の糖たんぱく質の 18 箇所の N 結合型糖鎖結合部位に相当する糖ペプチドを同定することができた (表 1)。

(3) 市販の糖たんぱく質を用いた糖ペプチドのペプチド部分の同定

上述の方法を用いても、血清主要糖たんぱく質から生じることが予想される糖ペプチドのうち、いくつかの糖ペプチドのマスマスペクトルを見つけて出すことができなかった。例えば、様々な疾患で糖鎖に変化が生じることが知られているハプトグロビン (糖鎖結合部位を 4 つ有する) の場合、予想される 3 つの糖ペプチドのうち 2 つの糖ペプチドについては直接帰属することが出来たが、2 箇所の糖鎖結合部位を含む糖ペプチド (NLFLN²¹¹HSEN²⁴¹ATAK) は帰属することが出来なかった。

そこで、市販のハプトグロビンを用いて作成したトリプシン消化物マップから得られた相対的な保持時間、主な糖ペプチドの m/z 値、及び価数を参考に、検出できなかった糖ペプチドの溶出位置を特定した。図 5(A) 及び挿入図は、市販のハプトグロビンのトリプシン消化物の LC/MS/MS によって得られた TIC、及び MS/MS で生じた m/z 204 のイオンピーク強度を示したものである。 m/z 204 が検出されたプロダクトイオンスペクトルを確認することによって、4 つの糖ペプチドの溶出位置を特定することが出来た (図 5(B-E))。2 つの糖鎖結合部位を含む糖ペプチドは、1 本の糖鎖が付加したペプチド、及び 2 本の糖鎖が付加したペプチドとして検出され、後者の方がイオンのピーク強度は高かった。

同様の手法により、ポリクローナル IgG、セル

ロプラスミンのペプチドマッピングを行い、血清トリプシン消化物マップ上のIgG4のFc領域の糖ペプチド、およびセルロプラスミンの3カ所分の糖ペプチドを同定することが出来た(表1)。

(4) 同定されたペプチドの糖鎖部分の解析

ペプチドが同定できた糖ペプチドの糖鎖部分は、糖ペプチドの分子量とペプチドの分子量の差から推定した。例えば、先に同定された α 1-antitrypsin (P01009)のペプチド YLGNATAIFFLPDEGKに結合している糖鎖は、糖鎖部分の分子量2204.8から、[HexNAc]₄[Hex]₅[NeuAc]₂と推定された。

プロダクトイオンスペクトルが得られなかったマイナー糖鎖を持つ糖ペプチドは、糖単位の分子量の差および同じペプチドを持つ糖ペプチドはほぼ同じ保持時間に溶出することを利用して、MSスペクトルを選び出し、単糖組成を推定した。

LC/MS/MSでは、MS/MSスペクトル測定中はMSスペクトル測定が中断されることから、同一ペプチドに結合している糖鎖の割合を算出するために、別途、MS/MSを伴わないLC/MSを行った(図2(C))。そして、同一ペプチドに2種類以上の糖鎖が結合している場合は、その糖ペプチド群の溶出画分の積算スペクトルから、それぞれの糖ペプチドイオンの最も強度の高い同位体のセントロイドイオン強度を用いて、結合比を算出した。こうして得られたたんぱく質ごとの部位特異的糖鎖プロファイルを表1にまとめる。この結果、IgGを除く多くのたんぱく質には主に2本鎖複合型糖鎖が結合していることが確認された。また、血清糖たんぱく質ではフコース付加の割合は低く、同一たんぱく質でもフコシル化の程度は、糖鎖結合部位によって異なることが明らかとなった。

ここで得られた結果を考察する。血清の90%以上はアルブミンと十数種類の糖たんぱく質などによって占められている。残りの僅かな成分から疾患関連マーカーを探索しようとするプロジェクトが進行する一方で、主要糖たんぱく質の糖鎖の変化をマーカーとして利用しようとする研究にも関

心が集まっている。本研究において、我々は、簡単な操作で、血清中に多量に存在する主な糖たんぱく質の部位特異的な糖鎖構造を解析する方法を開発し、血清トリプシン消化物の糖鎖プロファイルを作成した。

糖ペプチドのペプチド部分および糖鎖部分の両方を解析する方法として、MS/MSや多段階質量分析(MSⁿ)が汎用されている。四重極飛行時間型質量分析装置を用いたMS/MSでは、低 m/z 領域に糖鎖部分の開裂によって生じた m/z 204、186、366、及び292などの糖オキシニウムイオン(Bイオン)が、また、高 m/z 領域には糖鎖が順番に解離したYイオンが観察される。また、強度は低い、アミノ酸配列由来のフラグメントイオン(b及びyイオン)も観察される。これらのイオンを利用することによって、ペプチドと糖ペプチドを識別することが可能である。一方、イオントラップ型装置を用いたMSⁿでは、1/4効果によって糖鎖診断イオンを検出できない場合が多く、複雑なトリプシン消化物マップの中から糖ペプチドを選び出すことは困難と予想された。そこで、本研究では、イオントラップ型装置ではなく、四重極飛行時間型質量分析装置を用いたLC/MS/MSを選択し、糖ペプチドのMS/MSスペクトルを効率よく選び出すことができた。

こうして糖ペプチドのMS/MSスペクトルを選び出すことができて、従来は、糖鎖に由来するイオンが妨げになって、ペプチド部分を同定することができなかった。しかし、我々は、データを加工することによって、市販のデータベース検索エンジンを使って、糖ペプチドを同定することに成功した。これによって、糖たんぱく質を単離せず、混合物のまま糖鎖を解析することが可能となった。

これまで、糖ペプチドはイオン化効率が悪く、しかも糖鎖部分の不均一性によって複数の分子イオンが得られるため、データ依存的MS/MSでは良好なプロダクトイオンスペクトルが得られない場合が多かった。しかし本研究では、いくつかの

類似したスペクトルを積算することで、帰属可能な複数のイオンを得られることを見出した。積算スペクトルを用いることによって、単独スペクトルでは同定が難しいペプチドでも、データベースによる同定が可能となった。

さらに、LC/MS/MS とデータベース検索では見つけ出すことができなかった糖ペプチドについては、市販の糖たんぱく質のペプチドマッピングで得られた LC 上の保持時間、 m/z 値を参考として、血清トリプシン消化物マップ上の位置を特定することに成功した。

こうして主な糖ペプチドの溶出位置を特定した後、その周辺から糖鎖部分が異なる同一ペプチドを選び出し、糖ペプチドとペプチドの分子量差より糖鎖の分子量を計算した。さらに、LC/MS で得られたピーク面積比から糖鎖結合部位ごとに結合している糖鎖の割合を算出した。

以上の方法を用いることによって、血清トリプシン消化物から直接トランスフェリン、ハプトグロビンを含む 15 種類の糖たんぱく質の 23 箇所の糖鎖結合部位のマスマスペクトロメトリックな糖鎖プロファイルを得ることが出来た。これらの糖鎖結合部位の多くはすでに報告されているが、結合糖鎖の不均一性に関する報告は多くない。今回確立した手法、並びに得られた血清トリプシン消化物の糖ペプチドマップは、今後、わずかな血清しか入手できない患者血清を使った疾患関連血清糖たんぱく質、あるいは糖鎖の探索に役立つものと期待される。

2) 疾患関連たんぱく質に対する抗体作製

(1) メンブレンを用いたパンニング法の条件検討

本検討では、二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析により同定・回収される、疾患関連たんぱく質に対する抗体を作製するために、微量の抗原であっても効率よく抗体を作製しうる方法論の確立を試みた(図6)。微量のたんぱく質の固相化効率に優れたプロット用メンブレンを用いたアフィニティーパンニングを試みるにあたり、

各種条件設定を行った。プロット用メンブレンは、たんぱく質に対する高い吸着性を持つため、ファージの非特異的吸着を防止できる条件でパンニングを行うことが重要である。そこでまず、メンブレンのブロッキング条件を検討した。メンブレンとして、ニトロセルロース膜と PVDF 膜を、ブロッキング溶液には 4% skim milk, 10% skim milk, 10% skim milk / 25% Glycerol を使い、抗 KDR 抗体提示ファージの固相化 KDR に対する結合性を Dot blot により評価した。(図7) その結果、ニトロセルロース膜を 10% skim milk / 25% Glycerol でブロッキングした場合のみ、抗原特異的な反応性が観察され、その他の条件ではルシフェラーゼに対する抗体を表面提示した negative control phage を添加した群においても非特異的シグナルが認められた。したがって、ニトロセルロース膜を 10% skim milk / 25% Glycerol でブロッキングする条件下ではファージの非特異的吸着が抑制でき、アフィニティーパンニングが行えるものと考えられた。

そこで次に、抗原と結合した抗体提示ファージを解離させる条件について検討した(図8)。上記実験と同様の条件で、ニトロセルロース膜上に固相化した KDR に抗 KDR 提示ファージを作用させ、その後、結合を解離させるため、Gly-HCl (pH 2.0)、triethylamine (pH 12.0)、Gly-NaOH (pH 11.0) あるいは 0.5% SDS を添加してファージの解離を行った。その結果、Gly-HCl (pH 2.0) で解離を行った場合、ニトロセルロース膜からファージの解離が全く確認できなかった。一方で Gly-NaOH (pH 11.0)、0.5% SDS、triethylamine を用いた場合では、ファージは抗原から解離し、特に triethylamine を用いた場合には、結合したファージを最も効率よく解離・回収することができた。以上の検討により、メンブレンを用いたパンニングの条件を最適化することができた。

(2) メンブレンパンニングによる微量抗原を用いた抗体の単離

本項では、微量抗原に対する目的 scFv クロー

ンの濃縮効率を、BIAcore パンニングとメンブ
ランパンニングで比較した。5 μ g、50 ng、500 pg
の KDR を固相化用サンプルとして使用し、
BIAcore3000 のセンサーチップ、あるいは Dot
blot 装置のニトロセルロース膜へ固相化した。抗
KDR 抗体提示ファージと negative control ファ
ージ (scFv を提示していないファージ) を 1:100
で混合したものをモデルライブラリとし、パン
ニングを行うことで、抗 KDR 提示ファージの濃縮
効率を両システムで比較評価した (図 9)。抗 KDR
抗体提示ファージの濃縮をコロニーPCR による
インサートチェックで確認した結果、
BIAcore3000 を用いたパンニングでは、50ng の
抗原を用いた場合においても、output に目的ク
ローンが全く見られなかったのに対し、ニトロセル
ロース膜を用いたパンニングでは、僅か 500pg の
抗原を用いた場合でも、output に 16 クローン中
2 クローンの抗 KDR 抗体提示ファージが確認さ
れ、目的クローンの濃縮が確認された。
BIAcore3000 システムでは、抗原たんぱく質は
NHS 試薬によりセンサーチップ上に固相化され
るが、数 10 ng 以下の微量抗原量では効率のよい
固相化が困難であるためであると推察される。
BIAcore3000 を用いたパンニング法は、リアルタ
イムで抗原との結合レベルを測定でき、また、パ
ンニング操作を自動化可能であることから、ファ
ージ抗体ライブラリを用いた抗原特異的抗体の単
離に有用である。しかし、抗原が微量しかない場
合には、ニトロセルロース膜を用いたパンニング
法が適しているものと考えられる。

続いて、ニトロセルロース膜パンニング法を用
い、微量の抗原に対し、実際の非免疫ファージ抗
体ライブラリから目的抗体が単離可能かを確認し
た。固相抗原には 5 μ g、50 ng、500 pg の KDR
を用い、非免疫ファージ抗体ライブラリによるパ
ンニングを 3 回行った。その結果、いずれの固相
化抗原量においても output / input ratio の上昇
が確認され、わずか 500 pg の固相化条件でも、
1st パンニング後と比べ、約 2 倍の ratio 上昇が観

察された (図 10)。さらにパンニングの結果をよ
り詳細に評価するため、各ラウンドで回収された
ファージを 96 穴プレートにモノクローン化し、
大腸菌培養上清中に産生されたファージを用いて、
ファージ ELISA を行った (図 10)。その結果、
input ファージではほとんどのクローンで KDR
に対する結合性が見られなかったのに対し、3rd
パンニング後のクローンでは、いずれの固相化量
のパンニングにおいても、抗 KDR 抗体結合ファ
ージの数が顕著に増加していることが明らかとな
った。以上の結果から、本研究で作製した非免疫
scFv ファージ抗体ライブラリと、ニトロセルロ
ース膜を用いたパンニング法を駆使することで、僅
か 500 pg という微量なたんぱく質を抗原として
でも、モノクローナル抗体を効率よく単離可能
であることが判明した。今回用いた抗原 KDR-Fc
chimera は分子量が約 200 kDa であり、500 pg
の KDR-Fc chimera は、約 3 fmol 程度と概算さ
れる。この量は、2D-DIGE の検出感度である数
ng、あるいは高感度質量分析装置の検出感度
である数十 fmol を大きく下回るほどの微量であ
ることから、本システムは、2D-DIGE 法で検出可
能なあらゆる疾患関連たんぱく質に対する抗体を
ダイレクトに単離可能な方法論であることが示唆
された。

(3) 乳癌関連たんぱく質に対する抗体の単離

乳癌は、国内死亡者数が年間 70 万人、女性 10
人に 1 人が発症する疾患であり、病巣を切除した
場合においても転移・再発する機会が多いことが
知られている。近年、乳癌患者組織の 25%程度で
過剰発現が認められるヒト上皮増殖因子レセプ
ター 2 型 (Her-2) を標的とした抗体医薬品
Herceptin による抗体療法が日本でも承認され、
効果を挙げている。しかしながら、残りの 75%の
患者には本抗体療法は適用することができず、依
然として、患者の QOL を著しく低下させる、乳
房を切除した上での抗がん剤治療を行う方法しか
選択肢がないのが現状である。そのため、乳癌患
者における、Her-2 に代わる疾患関連たんぱく質

の同定、その蛋白質に対する抗体の作製による新たな抗体医薬品の開発が待望されている。

そこで、疾患関連たんぱく質の探索同定と、それに対する抗体作製のモデル実験を行った。まず乳腺細胞株から調製したたんぱく質を対照サンプルに乳癌細胞株から調製したたんぱく質をテストサンプルとして 2D-DIGE 法を試みた (図 11)。赤色で表示されたスポットは乳癌細胞で発現が上昇しているたんぱく質を、緑色で表示されたスポットは発現が低下しているたんぱく質を、黄色は発現差異のないスポットを示している。定量的解析を行った結果、スポット 1 では約 50 倍、スポット 2・6 では約 30 倍、スポット 3・4・5 では約 10 倍の発現上昇が認められた。特に発現上昇レベルの大きかった 6 個のスポットに対して、スポットをピックし、たんぱく質を抽出した。スポットから抽出したたんぱく質を、ニトロセルロース膜へと dot blot し、前項までに確立した方法に準じて非免疫ライブラリを用いたパンニングを行った。これまでと同様に input フェージ数に対する output フェージ数の割合 (Ratio) を評価したところ (図 12)、1st パンニング後と比較して 4th パンニング後では、これらのスポットに結合するフェージクローンが約 1,000 倍にも濃縮された。

以上の結果から、ニトロセルロース膜を用いた微量抗原に対する抗体単離法は、一般的なプロテオーム解析手法である二次元ディファレンシャル電気泳動により同定・回収された疾患関連たんぱく質に対しても適用可能であることが示された。今後は、濃縮されたフェージクローンの中からスポット特異的抗体の単離を試みるとともに、質量分析法によりこれらたんぱく質を同定し、獲得された抗体を用いた機能解析等を行う予定である。

本検討では、疾患状態の機能解明・診断・治療を目的として、2D-DIGE 法によって検出された疾患関連たんぱく質に対して迅速かつ網羅的に抗体を作製可能なシステムの開発を試みた。2D-DIGE 法によって検出された変動スポットに

は、1 ng から数 μg 程度の微量なたんぱく質しか含まれておらず、これまでの抗体作製法では、直接抗体を作製することができない。また、これらのスポットは、プロテオミクス研究の最も大きな利点ともいえるべき、翻訳後修飾に関する情報をも内封している。従って、これらに対する有効な抗体分子を創製してゆくためには、疾患スポットからのダイレクトな抗体単離法が必要である。

そこで本項では、まず、微量な抗原たんぱく質を用いることでモノクローナル抗体が単離可能なシステムの開発を目的として、ニトロセルロース膜を用いた新たな抗体単離法について検討を行った。一般にハイブリドーマ法では免疫する際に数百 μg ~数 mg の抗原を必要とし、また、ファージ抗体ライブラリを用いる場合でも、従来のパンニング法では数十 μg の抗原が必要である。本研究開発したメンブランパンニング法を用いて、どの程度微量な抗原たんぱく質から抗体が単離可能かを評価したところ、500 pg という極めて微量な抗原たんぱく質を用いることで、非免疫ライブラリから抗体を選択・濃縮することが可能であった。500 pg の抗原からのモノクローナル抗体単離は、ハイブリドーマ法はもとより、ファージ抗体ライブラリを用いた検討でもこれまで報告がない。目的クローンのスクリーニング等さらなる検討は必要であるが、本研究で開発したメンブランパンニング法の有用性が明らかとなった。さらに疾患サンプル中の疾患関連たんぱく質からダイレクトに抗体を取得する方法論の実証を目的に、乳癌細胞株と乳腺細胞株の 2D-DIGE 解析から同定される疾患関連たんぱく質を抗原として、メンブランパンニング法を用いてモノクローナル抗体の単離を試みたところ、検討した全ての乳癌関連たんぱく質候補に対して、目的クローンの選択・濃縮が確認された。乳癌関連たんぱく質の同定、濃縮されたフェージから目的クローンをスクリーニングする方法の確立など、さらなる検討が必要であるものの、最適化された非免疫フェージ抗体ライブラリを用いること、メンブランを固相化担体とし

たパンニング法を駆使することにより、「疾患関連たんぱく質に対する、迅速かつ網羅的な抗体作製システム」が確立できたものと考えられる。今後は、実際の疾患患者由来サンプルにおける発現変動たんぱく質の探索・同定を行うとともに、疾患関連たんぱく質特異抗体を創出することで、機能解析研究や治療・診断を目指した研究へ展開していく予定である。

3) 細胞内薬物導入に向けたペプチド性キャリアの開発

(1) Tat ペプチドをベースにしたペプチドライブラリの作製

新たな細胞内移行ペプチドを創製するために、Tat ペプチド(11mer;47-57; YGRKKRRQRRR)のアルギニン以外のアミノ酸を他のアミノ酸に網羅的に置換したペプチドライブラリを作製した(図 13)。Tat ペプチドの細胞内への移行にはその配列に含まれるアルギニンの電荷が寄与していると言われている。そこで細胞内移行に重要と考えられるアルギニンを残し、それ以外のアミノ酸を網羅的に置換したペプチドのファージディスプレイライブラリ構築することで、細胞内移行能を保持しつつ、さらに優れた特性を有する PTD を効率よく創製・スクリーニングできるものと考えた。

全 20 種類のアミノ酸をコードし得る NNS 配列を導入したプライマーを用いて PCR を行い、その PCR 断片をファージミドベクターに組み込んだ。このベクターを大腸菌 TG1 株に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、多様な種類のペプチドをファージマイナー外殻たんぱく質である g3p の先端に発現するファージライブラリを作製した。このライブラリの理論的なサイズは $20^5=3.2 \times 10^6$ CFU であるのに対し、実際に作製したライブラリサイズは 1.6×10^7 CFU であり、理論値を十分に網羅したライブラリの構築に成功した。

また、ライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シーケンスを解析した結果、

Tat ペプチドのアルギニン以外のアミノ酸残基がランダムに置換されており、独立したクローンで構成されていることを確認した(表 2)。本節で構築したライブラリはサイズ・質ともに十分なライブラリであったことから、本ライブラリを用いて以降の検討を行った。

(2) PSIF (たんぱく質合成阻害因子) を用いた新規 PTD のスクリーニング

細胞内移行能を有するペプチドをスクリーニングするため、作製した Tat ペプチドのアミノ酸置換体発現ファージライブラリを用いて、ヒト角化細胞である HaCaT 細胞に対するパンニングを行った(図 14)。パンニングの際にどのような細胞を用いるかによって、得られてくるペプチドの細胞特異性が異なることが考えられる。今回は、将来的なペプチド・たんぱく質性医薬品の経皮吸収への応用を見据えてヒト角化細胞を用いたが、今後、脳神経細胞や血管内皮細胞など目的に応じて他の細胞でパンニングすることで、異なる特徴を有するペプチドを得ることができるのではないかと期待している。本研究ではセルパンニングを 3 回行い、選択・濃縮されたクローンについて以降のスクリーニング操作を行った。

パンニング後のライブラリ遺伝子を PSIF 発現ベクターに一挙に組み換え、大腸菌培養上清中に産生させたペプチドと PSIF との融合体を用い、PSIF による細胞傷害性を指標にペプチドの細胞内移行活性を評価した(図 15)。PSIF 自体は単独では細胞内移行能を持たないため、ペプチドが細胞内移行活性を持たない限り細胞傷害性を示さない(図 16)。ペプチドと PSIF との融合体を産生した大腸菌培養上清を用いてスクリーニングを行った結果、パンニングを繰り返すことで細胞内へ侵入する能力をもつクローンが選択・濃縮されていることを確認した(図 17)。大腸菌の培養上清中に産生されるたんぱく質濃度は各クローンで異なるため厳密な比較はできないが、現在最も導入効率が優れていると言われる Tat ペプチドよりも導入効率の高いクローンが多数得られた。このことか

ら、今回提起する「新たなファージ表面提示法」が新規 PTD を効率よく創出する有効なテクノロジーとして機能することが示唆された。

Tat ペプチドよりも細胞傷害性が強かったクローンのうち、スクリーニング結果の再現性が得られたクローンの一部についてシーケンス解析を行った。その結果を表 3 に示す。各クローンに共通して塩基性アミノ酸の増加が見られた。このことから、Tat ペプチドの細胞内への移行にはやはりアルギニンなどの塩基性アミノ酸が大きく寄与していることが考えられる。しかし、鎖長の異なるポリアルギニンペプチドの膜透過効率の検討から、アルギニン数が多ければ多いほど効率が高いというわけではないこともすでに報告されている。したがって、その細胞内移行活性はアルギニン残基数の数、つまり塩基性の高さのみに依存するのではないと考えられ、アルギニン以外の構成アミノ酸の関与も否定できない。その他の要素として、今回シーケンス解析を行った結果では、①プロリン (P) の増加、② 8 番目のアミノ酸のグルタミン酸 (Q) の保存、あるいはセリン (S)、アスパラギン酸 (N)、アルギニン (R) への置換が多く見られた。プロリンは特異な構造特性を有し、たんぱく質やペプチドの構造上重要なアミノ酸であり、たんぱく質の構造に大きく寄与している。現在 Tat ペプチドの立体構造については、特定の立体構造はもたないという報告もなされているが、一方で、 α -ヘリックス構造をとっているという報告もあり、その詳細については明らかになっていない。今回の結果から、Tat ペプチドがある一定の立体構造を有しており、プロリンの増加による立体構造の変化が導入効率の向上に何らかの影響を与えた可能性も示唆された。また、8 番目のアミノ酸のグルタミン酸の保存、セリン、アスパラギン酸、アルギニンへの置換についても、これまで網羅的にアミノ酸を置換し、その配列と活性との比較を行ったという報告は皆無であり、非常に興味深い知見である。今後、より多くのペプチドのアミノ酸配列と細胞内移行活性との相関を調べ

ることで、Tat ペプチドの細胞内移行に関する新たな知見が得られるものと期待される。

(3) 候補クローンの細胞内移行能の評価

前項でのスクリーニングにおいて Tat ペプチドよりも細胞傷害性が強かったクローンのうち、スクリーニング結果の再現性がとれたクローンの一部について FITC 修飾したペプチドを合成した。大腸菌培養上清を用いたスクリーニングでは、培養上清中に産生されるたんぱく質濃度が各クローンによって異なるため、詳細に比較することはできない。したがって、合成ペプチドを用いることで、定量的に各クローンの細胞内移行能を比較検討した。検出はペプチド由来の緑色蛍光を FACSscan Flow Cytometer により確認した。その結果、すべてのクローンが Tat ペプチドと同等の細胞内移行活性を有することが示唆された(図 18)。さらに 2-8 については導入効率が Tat ペプチドの 2.5 倍、2-19 では約 3 倍であることがわかった。これは本研究で構築した新規 PTD の探索システムが有効に機能していることを強く示唆する結果である。

また一般に、融合させる物質の分子量によって Tat ペプチドの導入効率が異なり、その分子量が大きくなるほど導入効率が低下すると言われている。これまでの我々の検討から行ってきたスクリーニングでは Tat ペプチドに分子量約 42,000 の PSIF を融合させ、その導入量を検討しているのに対し、本検討では分子量約 400 の FITC で標識したペプチドの導入量を検討しており、いわばペプチド単独での導入効率を評価したことになる。前節のスクリーニングではペプチドとたんぱく質との融合体の状態でもより効率よく細胞内導入可能なペプチドを評価するという特徴を有しており、今回得られた候補クローンは分子量の大きな物質を細胞内に導入するのに適した PTD である可能性も考えられる。したがって、今後候補クローンと PSIF を融合させた精製たんぱく質を作製し、その導入効率を比較することで、これらのクローンの真の細胞内導入能を評価することができるの

ではないかと考えている。

本項において、新たな細胞内移行ペプチドを創製するために、Tat ペプチド (11mer;47-57) のアミノ酸配列のうち、細胞内への移行に重要であると言われるアルギニンを除く 5つのアミノ酸を他のアミノ酸に網羅的に置換したペプチドライブラリを作製し、理論的なライブラリサイズ (多様性) を十分に網羅したライブラリの構築に成功した。本ライブラリをヒト角化細胞である HaCaT 細胞に対してパンニングし、細胞表面に結合する、あるいは細胞内へ侵入するクローンを選択・濃縮した。さらに PSIF (たんぱく質合成阻害因子) を用いた独自のスクリーニングシステムを確立することで、迅速かつ網羅的な新規 PTD の創出を試みた。その結果、現在最も導入効率に優れていると言われる Tat ペプチドと同等、もしくはそれ以上の導入効率を有するクローンを多数得ることに成功した。

さらにそれらのクローンについて詳細な検討を行うため、FITC 修飾した Tat ペプチドを合成し、その導入効率を検討したところ、2-8 では導入効率が Tat ペプチドの約 2.5 倍、2-19 では約 3 倍であることが判明した。Tat ペプチドのアミノ酸を網羅的に置換し、Tat ペプチドよりも導入効率に優れたペプチドが得られたという報告はこれまで皆無である。

以上の結果は、本研究で構築した「新たなフェージ表面提示法を駆使した新規 PTD の創製システム」が有効に機能していることを明示するものである。また、本テクノロジーは新規 PTD の迅速かつ網羅的な創出だけでなく、網羅的に置換したアミノ酸配列と活性との相関から Tat ペプチドの細胞内移行メカニズムを解明する新たなアプローチとなるものと考えられる。

今後、パンニングやスクリーニングの条件を変えることで、導入効率の向上だけでなく様々な目的に応じた、次世代ターゲティング療法にかなう新規 PTD を創製できるテクノロジーが確立でき

るものと期待される。

D-2: 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

疾患関連たんぱく質解析研究の国立循環器病センターにおける実施に関して全体計画を作成し、内部審査機関である高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会で十分な審議を受け、数多くの改善などを行った後、承認を受けた。また、倫理委員会の指摘により、創薬プロテオームファクトリー施設と MTA を締結した。この全体計画に基づき、各研究課題について個別に高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会に申請、承認を受けた。具体的には応募のあった多数の研究課題から 10 課題を選択し、17 年度までに研究計画を作成した。この内、血液を対象とする 7 課題、心臓を対象とする 1 課題について倫理委員会の承認を 17 年度末までに受けた。18 年度は、申請中であった以下の研究課題について承認が得られ、当初計画の 10 課題全てを実施に移した。新規 2 研究課題の趣旨は以下の通りである。

研究計画 4-3. 肺高血圧症関連たんぱく質の探索研究：肺動脈性肺高血圧症は比較的稀であるが予後不良な疾患である。各種薬剤の開発により予後はかなり改善してきたが、治療法が開発が急務であることに変わりはない。遺伝子学的解析により原因遺伝子も解明されつつあるが、本疾患の原因は多岐にわたるため、遺伝子異常は一部でしか見出されず、病変や病態についても不明な部分が多い。そのため、本疾患の本質的な理解にはたんぱく質の解析が必要不可欠であると考えられ、肺高血圧症に関連した新たなたんぱく質の同定、解析により本疾患の予防や治療に対する新たなアプローチへと展開できると考えられる。具体的には、肺高血圧症による右心不全急性増悪期および治療後慢性期、肺高血圧症患者と健常者の血中たんぱく質の比較・解析より、肺高血圧症に関連するたんぱく質の探索を行い、病因の究明、医薬品、診断法、予防法などの開発を目指す。

研究計画 6-1. 周産期心筋症に関連するたんぱく質の探索研究:「周産期心筋症」は妊娠を契機として発症する心疾患で、米国では約 3000 分娩に 1 例の割合で起こり、妊産婦死亡の 20-25%を占めるといわれている。本疾患は近年増加しつつあると推定されるが、わが国においては発症頻度すらも調査されていない。その原因は未だ不明であり、妊娠による心負荷増大のほか、免疫説、ウイルス説などが提唱されている。一般的な心不全に対してはこれまでも様々な研究が行われてきた(本研究事業でも、研究計画 4-1 で実施中)が、臨床的にはかなり状況が異なる。本研究では、周産期心筋症患者の発症時および回復期、周産期心筋症患者と正常妊産褥婦の血中たんぱく質の比較・解析より、周産期心筋症に関連するたんぱく質の探索、同定を行う。本研究の実施により、周産期心筋症の病因究明、予防や治療に対する新たなアプローチ、診断法などの開発が可能と期待される。

上記 2 研究課題においては、当該疾患患者からだけでなく対応する健常者からも血液試料を採取し、血中たんぱく質の解析を行う。このため、倫理委員会などにおいて、健常者の定義、募集方法、同意取得などについて意見や修正点が示され、それらの検討、改善を行い最終的な承認を受けた。

プロテオーム解析については技術的な問題が数多く残されており、特に定量解析の方法、精度については研究開始時には不明であった。また、個々の血中たんぱく質量の生理的変動、個人差等についても信頼できる解析結果は得られていなかったため、採血時期等も含め解析結果に従い至適化する必要があると考えられた。一方、各研究課題内においても推定される発症原因は多様であることが多く、解析可能な限定された試料を一度に収集、解析すると、疾患関連たんぱく質の効率的探索という立場から危険度が高いと考えられた。このため、研究課題は全て二段階の実施形式とし、第一段階として変動が最も観測されやすいと予測される複数の時期に同一患者より採血を行い、解析結果に基づき対象、採血時期を修正、至適化して第

二段階の試料収集を実施する計画とした。しかし、創薬プロテオームファクトリー施設からたんぱく質解析の一部が最初に示されたのは 18 年 12 月で、3 課題の各 3-4 症例(複数時期)についてであった。このため、対象患者数が得にくい本年度承認を受けた 2 課題と、心組織を対象とする 1 課題以外については第一段階の試料収集、送付を終了しているが、第二段階に進めない状態にある。

研究計画 3-2 はヘパリン採血血漿試料のみを、研究計画 2-1、3-3、4-1、4-2、4-3、6-1 では血清に加えて血漿試料を採取した。血漿試料の採取・分離、保管条件等についてもマニュアルを作成し、凝固線溶系の活性化を防ぎ均一な試料調製が可能となるように努めた。また、一部の初期試料を除き、血漿試料の品質を保持させるため、プロテアーゼ阻害剤カクテル添加を行い、より確実にプロテアーゼを抑制し試料を保管している。

血漿試料においてはたんぱく量に比してペプチド量が極めて少ないが、血清試料では凝固線溶系の活性化により大きく増加しているため、上記血液試料を使用し当センター内で独自の研究を開始した。

動物組織のプロテオーム解析の実施結果、経験などに基づき、剖検時の心組織試料の採取様式や部位の区分、記録、抽出用に使用する組織細分化と保存形態、数量、凍結・保管などの手順を決めてマニュアル化し、病理部の協力を得て実施した。

17 年度からは個人情報保護法が施行され、検体試料と臨床情報などの両面において、法令に従った手順、保管体制を作成、実施した。本研究では遺伝子は取り扱わないが、これに準ずる取り扱いを行うよう倫理委員会より求められたため、匿名化は研究に関与しない研究機器管理室長が行い対応表を保管すると共に、厳密に認証管理された条件下で担当者だけが管理時にのみアクセスできる環境を設定、実施している。

上記以外にも各段階で個人情報の管理に努め、例えば試料と臨床情報は 5 人分(通常 10 検体)を基準とし速やかに匿名化を行っている。さらに

保管試料、情報に問題が発生しないように保管方法、機器や体制についても異常時の確認、対応法なども含め、より安全性の高いシステムを目指し改善を進めた。これら手順、方法で問題等は発生していない。

疾患関連たんぱく質解析研究は、医薬品開発のシーズ探索を目指した官民共同の国家プロジェクトである。その中で、循環器疾患を担当する高度医療センターとして適切と考えられる 10 研究課題について、18 年度当初までに倫理委員会の承認を受け、試料や情報の収集、匿名化保存を進めた。7 件の研究課題の第一段階採取試料は創薬プロテオームファクトリー施設に送付したが、いずれの課題においてもまだ解析が終了していないため解析結果と臨床情報の解析等が実施できず、第二段階の試料収集に進めない状況である。これは配列決定が主体であるゲノム解析と異なり、本プロテオーム解析が非常に大きな量的違いのある血中たんぱく質の定量的解析を目指す研究であり、技術的に未だ開発途上であることに起因する点が大と考えられる。たんぱく質定量解析技術の開発、確立と継続的研究が、収集した試料、情報を活かすために不可欠と考えられる。

当センターでは全体計画、個別 10 研究計画の計 11 件について内部委員会である高度先駆的医療・研究審査委員会と倫理委員会に申請承認を受けた。詳細な審議により承認を得るまでに時間を要したが、倫理、研究の両面において整った計画を作成でき、研究協力者（患者、健常者）、遺族などに対するきめ細かい説明、承諾の確認などの手順を採用できた。各研究課題の実施時における手続き、試料や情報の収集、管理体制もこれに従ったシステムを構築でき、臨床研究の指針、個人情報保護法に従い、かつ遺伝子研究に準ずる形式で研究実施環境を整備できたと考えている。

D-3:疾患関連たんぱく質解析研究の一環としてのエネルギー代謝調節に関与する生理活性ペプ

チドの探索

(1) α -MSH の単離・同定

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ブタ脳から抽出したペプチド画分をゲル濾過で分離した各分画についてアッセイを行った結果、分子量約 2,000 の分画に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。その活性は day0 の脂肪細胞でも見られたが、day4 及び day8 の細胞で特に強く見られた。この活性分画をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離、精製し、マススペクトロメーターによる質量分析を行ったところ、13 残基のアミノ酸からなる α -MSH が同定された。

(2) 脂肪組織抽出物のスクリーニング

各分化段階の 3T3-L1 細胞に対して、ラット脂肪組織から抽出したペプチド画分をゲル濾過したサンプルを用いてアッセイを行った結果、分子量約 3,000-5,000 の分画に細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。その活性分画をイオン交換 HPLC 及び逆相 HPLC により分離し、複数の細胞内 cAMP 上昇活性を確認した。各分画の活性は、day0 でのみ見られるものや、day0 及び day4, day8 ではほぼ同等の強さを示すものが見られた。今後、各々の活性分画を逆相 HPLC により精製し、プロテインシーケンサーおよびマススペクトロメーターにより単離・同定する予定である。

本研究により、ブタ脳より脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドとして、 α -MSH を同定した。 α -MSH は、脂肪細胞より分泌され中枢において強力な摂食抑制作用を有するレプチンの下流シグナルを担う生理活性ペプチドであり、中枢性摂食調節ペプチドとして作用し、生体のエネルギー代謝調節に関与することが知られている。さらに、脂肪細胞には α -MSH の受容体であるメラノコルチン受容体が発現しており、 α -MSH は脂肪細胞に作用してレプチンの分泌を抑制すること、また脂肪分解を促進することが報告されている。

我々は昨年、3T3-L1 細胞を用いて、中枢において強力な摂食促進作用を有する NPY をブタ脳よ

り単離・同定したことを報告した。今回、同様の手法により、中枢性摂食抑制ペプチドである α -MSH を単離・同定した結果から、脳及び脂肪組織を軸とした、生理活性ペプチドを介した生体のエネルギー代謝調節システムが存在する可能性が示唆され、本研究で用いた手法が、エネルギー代謝系の調節に関わる生理活性ペプチドの探索において有用であることが確認された。

本研究ではさらに、ラットの脂肪組織から抽出サンプルを調製し、各分化段階の 3T3-L1 細胞に添加し、複数の細胞内 cAMP 濃度上昇活性を見出した。脂肪細胞における細胞内 cAMP 濃度変化は、脂肪細胞の増殖・分化や脂肪分解に重要な役割を果たすことが知られており、これらの活性分画を精製し生理活性ペプチドの単離・同定を進めることにより、生体のエネルギー代謝調節に関わる内因性ペプチドの同定が期待できる。

今後、この手法により脂肪細胞に作用する生理活性ペプチドの探索を進めることにより、メタボリックシンドロームの発症基盤としての肥満及び脂肪細胞機能に関与する新たな生理活性ペプチドの同定や、脂肪細胞の分化・増殖を制御する新たな治療薬の開発が期待できる。

D-4: 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

組織抽出物についても、たんぱく質のみならずペプチドの分析も行うために、組織採取直後に加熱処理を行いプロテアーゼ失活させた。このために大分子量たんぱく質をはじめとする多くのたんぱく質は不溶化、排除されたが、ゲル濾過後のたんぱく質画分（分子量 1 万以上）重量は分子量 6K 以下のペプチドの数倍以上に達していた。

還元アルキル化後のたんぱく質画分のトリプシン消化物の 2D-HPLC による分離、解析結果からは、心筋細胞特異的な筋組織形成たんぱく質、細胞骨格たんぱく質、細胞質やミトコンドリア局在たんぱく質が数多く検出された。今回の分析では 1 次元目の分画数が少ないこともあるが、同定

されたペプチド数に比して前駆体蛋白数は増加せず、たんぱく画分のショットガン解析を徹底して行っても、有意な情報量の増加はあまり期待できないと考えられた。

還元アルキル化後の 6K-3K、3K ペプチド画分の 1 次元 nano HPLC による解析からは、 α -心房性ナトリウム利尿ペプチド(α -ANP)並びにその代謝的分解物と考えられる断片が観測された。ANP について心房組織に多いと考えられる BNP（組織濃度が ANP の 1-2%）については、観測できなかった。一方、上記たんぱく画分にて検出された筋組織形成たんぱく質、細胞骨格たんぱく質などの断片が数多く観測されたが、塩基性アミノ酸の C 末側以外で切断を受けた断片が大部分であることから、代謝的分解物あるいは抽出・精製過程における切断や加水分解により生成したペプチドと推定された。しかし、分子量 3,000 付近においては α -ANP がマスキング上最も顕著なピークを示すことから、組織中に存在するペプチドの回収は十分行われているものの、多量に存在するたんぱく質のごく一部が切断を受けた分解ペプチドや代謝生成ペプチドが解析を困難にしていると推定された。

心房に比してペプチド含量少ない心室組織のペプチド画分についても予備的な検討を行った。実際にペプチド画分の対たんぱく質重量比は心房より小さく、構造たんぱく質の分解に由来すると推定されるペプチドが大部分であった。

血液試料からのペプチド抽出については、昨年度までに検討した逆相系固相抽出カートリッジを使用した。抽出物をゲル濾過にて分離後、逆相 nano HPLC で分離し MalDI 質量分析計で解析した。厳密に調製、迅速処理した血漿試料中の分子量 6K 以下のペプチド画分は極めて少なく、たんぱく質との重量比で 1 万分の 1 以下と推定された。血漿試料を一度凍結・融解するだけでペプチド量は明確に増加し、例えばブラジキニンとその Arg 欠失ペプチドが明確に観測された。血漿試料にプロテアーゼインヒターカクテルを添加すること

によりペプチド生成は明確に抑制されたが、完全ではなかった。血清試料においては、分子量 6K 以下のペプチドが大きく増加しており、補体系、キニノ系、凝固線溶系などのたんぱくに由来するペプチドが多数観測された。特に C3f に由来するものが多く観測されるが、単一なペプチドではなく C 末端の Arg 欠失ペプチド、N 末端から exopeptidase により順次消化されたペプチドが観測された。血漿試料も経時的に同様の断片が増加してくること、C 末端に Arg を有するペプチドが多いことから、補体系、凝固系などの活性化によりこれらのペプチドが生成すると推定された。

上記試料の分子量 6K 以上のペプチドから低分子量たんぱく質にかけての領域においては、血漿試料においても明確なピークがある程度の数存在し、血清ではこれらが変化しつつピーク数も増加した。そこで、限外濾過膜などにて大分子量たんぱく質を除去後、固相抽出を行い、Seldi 質量分析計などで解析を開始すべく準備を始めた。しかし、分析試料調製過程に使用する器具類、処理条件などにより観測結果が変動するなどの問題が認められたため、実試料の解析まで進めなかった。

ペプチドーム解析において開発した 2D-HPLC 系を活用することにより、心房組織のショットガン解析で多数のたんぱく質のトリプシン消化ペプチドを同定できた。しかし、同定されたたんぱく質の大部分は細胞や組織を形成する構造たんぱく質や代謝関連たんぱく質であった。ほぼ同じ条件で実施した脳のたんぱく質解析結果と比較した場合、同定されたたんぱく質数はむしろ少なく、心臓組織には組織濃度の高いたんぱく質が一定数存在し、これらの消化物が構成要素の大部分を占めるためと推定された。このため、主要たんぱく質の除去を行わない場合、ショットガン解析法で検出たんぱく数を増加させるには、より大規模な分離、展開を徹底して行なう必要があると考えられた。

心房組織は分泌顆粒を含み、内分泌組織に次い

でペプチド量が多い組織と推定される。今回の解析でも ANP は強く検出され、量は少ないが ANP の分解ペプチドも多種検出され、この水準は脳内ペプチドのレベルを大きく上回っていた。しかし、ペプチド画分にも上記の構造たんぱく質に由来する代謝・分解ペプチドが多数存在し、低濃度のペプチドの検出、解析を妨害した。より低レベルのペプチドを検出するためには、脳と同様により徹底したプロテアーゼの迅速不活性化が不可欠である。心室組織も ANP, BNP に加え幾つかのペプチドホルモンを産生しているが、心房 ANP の 1/100 程度の組織濃度であるため、現状の手法ではこれらのレベルのペプチドを直接検出することはできなかった。しかし、心房組織のペプチドを例にとると、ANP の 1/10 以下のペプチドであっても mg レベルの組織で十分検出、解析可能であり、1 次元 HPLC で観測される数百ペプチド中の幾つかが疾患などで生成・消失、変動すれば、十分に観測可能であることが確認された。

昨年度までの研究で、血漿中のペプチド量は極めて少なく疾患マーカー探索対象として有望であることが示されている。しかし、採血条件、保存、濃縮などの処理過程で二次的に補体系、凝固系などのプロテアーゼが不可避免的に活性化され、本来の血液中にはない分解ペプチドが多数、急速に生成することが示された。プロテアーゼインヒターカクテルの添加は有効であるが、完全な抑制にはほど遠いと言わざるをえない。また、凍結・融解などの操作だけでもプロテアーゼが活性化されてたんぱく質は分解しペプチドが生成するため、ペプチドや低分子量たんぱく質を臨床現場で使用する診断用マーカーとするには、かなり安定的に存在し量的にも多い対象を選択する方が望ましいと考えられる。最近、Villanueva らは血液中の主要なたんぱく質の断片ペプチドが腫瘍マーカーとして利用でき、かつ exopeptidase で消化された一連のペプチドのパターン解析で腫瘍の有無や種類などが診断可能と報告している (J Clin Invest. 116: 271, 2006, Mol Cell Proteomics. 5: 1840,

2006.)。解析対象は厳格に管理されているが血清であり、かつかなり高濃度存在するペプチドである。これらのことを総合すると、従来想定されていた疾患マーカーの対象を、量的に多いペプチドや低分子量たんぱく質にまで広げ再検討する必要があると考えられた。

D-5: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

(1)研究試料の確保に関する研究

新規試料については、すでに国立精神・神経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、2007年2月までに、12名のパーキンソン病患者及び10名のパーキンソン症候群患者の血漿をプロテオームファクトリーに提供した。また、カルテ等から臨床情報の抽出を行い、暗号化した情報として創薬プロテオームファクトリー施設に提供した。

さらに、パーキンソン病及びパーキンソン症候群患者40名程度の連結不可能匿名化された髄液を確保し、倫理委員会において本研究における使用の承認を得た。

(2)モデル動物の解析、創薬標的分子開発に関する研究

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子産物 super oxide dismutase (SOD) の3種の変異体 (A4V, G85R, G93A) を細胞に一過性に強発現しユビキチン系とリソソーム系のそれぞれの阻害薬を用いて凝集性の亢進や代謝の変動、細胞機能に及ぼす影響を解析したところ、SODはこれまで報告されていたユビキチン系に加えてマクロオートファジー・リソソーム系でも制御を受け、マクロオートファジー・リソソーム系が変異SODの神経毒性の抑制に寄与していることを明らかにした。またUCH-L3は網膜では視細胞に局限した発

現を示し、UCH-L3欠損マウスに認められる視細胞死はミトコンドリアの形態変化を伴い、アポトーシス非依存的な神経細胞死であることを明らかにした。

パーキンソン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、蛋白質の構造変化、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、尿中蛋白質の網羅的解析を行うことにした。今年度までにパーキンソン病患者12名とパーキンソン症候群10名の試料を供給し、創薬プロテオームファクトリー施設において第一次解析結果を得る段階まで進展した。今後は、更なる検体での解析の続行による疾患特異的蛋白質の同定を図るとともに、より中枢神経の病態を反映している髄液サンプル活用が可能になった。

これまでに独自に作成した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く有している新規モデルであることを見出したが、今年度はさらにUCH-L1の近縁分子であるUCH-L3がガスパーゼ非依存的神経細胞死に関与すること、家族性

筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子産物である SOD の変異体の細胞毒性がマクロオートファジーでも制御を受けることを見出した。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。

D-6: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

(1)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に、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糖尿病患者24人分の血清サンプルを創薬プロテオームファクトリー施設に平成17年3月発送した。それに加えて、糖尿病診断マーカーの本格的解析に使用する糖尿病患者血清サンプルを本年度までに104人から収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。

早期糖尿病性腎症の尿たんぱくプロファイルを本施設内にて解析するために、微量アルブミン尿のある或いはない糖尿病患者から尿たんぱくを各15例以上、健常者コントロール由来尿たんぱくを5例以上収集した。

糖尿病以外の疾患

慢性閉塞性肺疾患診断の血清マーカー検索の予備検討用として、慢性閉塞性肺疾患患者血清を10人分収集し、創薬プロテオームファクトリー施設に発送した。

(2)臨床サンプルでのプロテオーム解析

糖尿病

創薬プロテオームファクトリー施設にて、最初に発送した基礎検討用血清の一部を用いてcICAT法による予備的な解析を行った後に、基礎検討用血清9例、本格的解析用血清15検体を用いて高発現120血清たんぱく質のcICAT法による解析を行った。得られたデータについて、臨床情報との関連性を相関関係位解析等の統計学的手法にて解析中である。

糖尿病性腎症患者由来尿たんぱく質の解析につ

いては、まず健常者由来尿を濃縮後にAlbumin and IgG Removal Kit(GE)を用いた高含有量たんぱく質の除去を行い、二次元電気泳動ゲル上でアルブミン、IgGがほとんど消失することを確認した。次に、この手法で処理した尿サンプルを2D-DIGE法で解析し、微量アルブミン尿を有する糖尿病患者由来尿にて健常者由来尿と比較して有意に変動するたんぱく質スポットを増加83個、減少6個の計89スポット認めた。一部のたんぱく質スポットについてLC-MS/MSにて同定した結果では、既に糖尿病性腎症にて有意に変動することが報告されているTransferrin, Ceruloplasminの増加、Uromodulinの減少が確認された。

糖尿病以外の疾患

慢性閉塞性肺疾患患者血清10人分を発送後、創薬プロテオームファクトリー施設での高発現血清たんぱく質のcICAT法による解析結果を待っている。

(3)2DE, LC-MSを用いたプロテオーム解析 糖尿病

国立国際医療センター研究所・代謝疾患研究部にて、臨床サンプルを用いたたんぱく質の多次元液体クロマトグラフィーによる分離、LC-MSを用いた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を解析し、86個のたんぱく質を同定したが、そのうち10個はHepG2の分泌たんぱく質としては未報告であった。

また、脂質代謝を制御して高脂血症や動脈硬化症などに深く関与するLXRのアゴニスト(T0901317)をHepG2細胞の培養液に添加し、培養上清中のたんぱく質について二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析(2D-DIGE)を行った。その結果、T0901317による刺激によって有意に増加した全てのスポットがapolipoprotein E (apoE)として同定された。apoEは幅広いpIレンジと分子量にわたって複数のスポットとして点在していることも併せて確認され、このうちの一部は二次元電気泳動ゲルのProQ Emerald染色によっ

て、糖鎖の修飾を受けていることが推定された。これより、LXRは肝臓からのいくつかの分泌たんぱく質の誘導を促し、他の臓器においても遠隔的に脂質代謝の調節を行う可能性が示唆された。

糖尿病以外の疾患

肺組織内で感染防御に関与している組織マクロファージの機能に重要なたんぱく質を網羅的に解析するために、健常者末梢血液から採取した単球をM-CSFあるいはGM-CSFといったヒトサイトカインで分化させ、分化後に発現量の変化するたんぱく質を2DEにて網羅的に解析し、それぞれに特異的に発現したたんぱく質の同定を試みた。培養開始から48時間経過後ではGM型で103個及びM型では157個、7日目(168時間)経過後ではGM型で190個及びM型で231個、培養開始から7日目(168時間)経過後に結核菌を感染させ、さらに48時間経過したものではGM型で190個、M型で231個のたんぱく質を同定した。このうちGM型、M型共通の分泌型たんぱく質一種とM型に特異的に高発現した非分泌型たんぱく質一種に対して、ウエスタンブロット法ならびにプロテアーゼ活性測定を行い個別に解析を進めている。

プロテオームファクトリーのプロジェクトの3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のための予備検討用血清サンプルの解析、本格的解析用の血清の収集及び解析が行われた。次年度は、創薬プロテオームファクトリー施設での解析結果と臨床情報をバイオインフォマティクスによって多角的に解析することによって、疾患あるいは病態に固有なたんぱく質プロファイルを抽出する。尿たんぱくについては、本研究所内にて確立した方法で前処理法を用いて、糖尿病患者及び健常者の尿検体を2DEにて解析し、アルブミン以外の糖尿病性腎症に特異的な早期診断マーカーを検索する。また、血清たんぱく質及びペプチドについて、創薬プロテオームファクトリー施設にて

SELDI-TOFを用いて解析する予定である。

糖尿病以外の疾患については、今年度発送した呼吸器疾患(慢性閉塞性肺疾患)患者由来血清の創薬プロテオームファクトリー施設での解析結果を待つ。

また、組織マクロファージのプロテオーム解析については、今年度の研究で得られたM-CSFあるいはGM-CSFでの分化後に変化するたんぱく質発現プロファイルを元にして、多次元HPLC、質量同位体標識試薬、蛍光標識試薬を用いた定量的精密分析系を構築する。これによってGM型、M型マクロファージの成長経時変化および結核菌感染前後の変化に伴い増減するたんぱく質を同定することを目指す。

D-7: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

本年度は、昨年度に引き続き小児腎疾患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10月から平成18年10月までの検体総数は56検体で患者数26名、男性19名、女性7名で、検体提供時の年齢は図19に示す。

26名の患者の内訳を表4に示す。26名中、ネフローゼ症候群21名、FSGS腎移植後2名、IgA腎症2名、その他1名であった。

ネフローゼ症候群の患者において発症時(たんぱく尿陽性)、治療時(たんぱく尿陰性)、寛解時(たんぱく尿陰性)の検体を用いて血清中のプロテオーム解析を行ったところ疾患及び病態と関連して変動するZinc-alpha2-glycoprotein(ZAG)がバイオインフォマティクス解析により同定された。

ZAGとネフローゼ症候群との関連性を明らかにするためにネフローゼ自然発症モデルマウス(ICGN)を用いて血中ZAGの解析を行った。コントロールマウス及び疾患モデルマウスそれぞれ3匹についてウエスタンブロット法を用いて血清中のZAGの解析を行ったところコントロールマウスに比べてネフローゼ症候群を発症している病態モデルマウスではZAGが減少していること

が示唆された (図 20)

小児腎疾患の中でも特にネフローゼ症候群に関連する因子の探索同定を行うためにネフローゼ症候群の様々な病態における血清を採取した。プロテオーム解析ならびにバイオインフォマティクスを用いた解析により数種類の因子が疾患及び病態と関連することが示唆されたが、生物学的関連性については今後明らかにしていく必要がある。更に大規模な患者の解析やモデル動物を用いた解析により生物学的関連性を確認し、また疾患における蛋白の分子生物学的意味について解明していく必要がある。

D-8: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

認知症および骨粗鬆症患者の血清について検体採取・保存および創薬プロテオームファクトリー施設への提供を継続し、これまでに認知症 15 例、骨粗鬆症 17 例の提供を行った。診療情報の提供もあわせて行った。

AD6 例、軽度認知障害 2 例、非 AD4 例、健常人 2 例の脳脊髄液 250 μ l の網羅的な解析から 500 程のたんぱく質をリストアップした。血漿由来のたんぱく質のみならず、細胞内由来の微量なたんぱく質の同定も可能となった。しかしながら、AD のみに共通といったたんぱく質は同定出来なかったため、相関係数などをもとに数値化して比較を試みている。

CADASIL 脳および対照脳から微小血管を含む画分を精製し、免疫組織化学的検討を行ったところ、CADASIL 脳の一部の微小血管では Notch3 の細胞外領域を認識する抗体 N2 で反応性を示した。一方、対照脳では全く反応性を示さなかった。また、細胞内を認識する抗体 C2 ではともに反応性が見られなかった。

さらにウエスタンブロットでは、RIPA buffer 可溶性画分、Urea/Thiourea 可溶性画分で CADASIL 脳と対照脳で N2 によるバンドのパタ

ーンに違いがみられた。CADASIL 脳ではギ酸可溶性画分にも反応性がみられ、Notch3 の細胞外領域が変性し蓄積していることが明らかとなった。一方、C2 では各画分での違いはなかった。各々の画分は直接トリプシンで消化し、nanoLC/MS/MS によってショットガン分析を行った。主要なたんぱく質のほとんどが両者に共通して存在しており際立った違いは見られなかった。また、血管を構成するたんぱく質以外にも神経細胞やグリア細胞由来のたんぱく質が多く見られた。

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、FGF-2(70 ng/ml)は 60 分まで時間依存性に p70 S6 キナーゼのリン酸化を促進し、刺激後 20 分で最大となった。p70S6 キナーゼの阻害剤であるラパマイシンは FGF-2 による VEGF 産生および mRNA 発現を増強した。ラパマイシンは FGF-2 による p70S6 キナーゼのリン酸化を抑制した。一方、FGF-2 は既報の p44/p42 MAP キナーゼおよび p38 MAP キナーゼのリン酸化に加えて SAPK/JNK のリン酸化を促進したが、ラパマイシンはこれらのうち SAPK/JNK のリン酸化のみを増強した。SAPK/JNK の阻害剤である SP600125 は、FGF-2 により惹起される VEGF 産生・mRNA 発現を抑制した。FGF-2 による VEGF 産生・mRNA 発現および SAPK/JNK のリン酸化に対するラパマイシンの増強作用は SP600125 により抑制された。さらに siRNA による p70 S6 キナーゼのノックダウンは FGF-2 による SAPK/JNK のリン酸化を増強した。

認知症および骨粗鬆症について、創薬プロテオームファクトリー施設への臨床試料提供を継続した。認知症については担当診療科医師に周知を図った結果、提供試料の増加が見られた。また骨粗鬆症については内科からの提供が見られた。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。引き続き試料提供体制の充実を図るとともに、治療による修飾について検

討したい。

脳脊髄液などヒト試料の解析において最も難しい点は、用いた研究試料が必ずしも均質な母集団ではないことである。実際 AD と診断されていても、血管性認知症等の疾患を有する複合型の認知症や、臨床症状は現れていないが既に脳内に AD の病理学的特徴を有する AD 予備群も存在するなど、純粋に正常ならびに AD と判断するのは極めて難しい症例がある。今後、多くの試料を解析することで AD と関連するたんぱく質を検索し、定量化することが AD の診断法を確立するために重要であると考えられる。

CADASIL 脳および対照脳全体のたんぱく質の解析では大きな違いが見られなかったため、病理学的特徴が顕著にみられる微小血管を分離し、血管内のたんぱく質に変化がないか解析を試みた。しかしながら、電気泳動及び質量分析からは、Notch3 以外に際立った変化が見られなかった。今回用いた微小血管の精製方法では神経細胞やグリア細胞の混入がみられることから、CADASIL における血管変性メカニズムを知るためには、より高度な微小血管の精製を行い、それらの比較を行う必要があると思われる。

骨芽細胞により産生された FGF-2 は骨器質内に埋入され、骨のリモデリングにおける骨吸収と骨形成のカップリングに関与するとともに、骨折に際しては骨芽細胞における発現が亢進することが知られており、骨の形成促進の場面において特に重要な役割を果たしていると考えられている。今回、培養骨芽細胞系において、FGF-2 が p70 S6 キナーゼのリン酸化を促進することが明らかとなった。今回検討した Thr389 のリン酸化は p70 S6 キナーゼの活性化とよく相関することが知られており、骨芽細胞における FGF-2 の作用に p70 S6 キナーゼの活性化が関与することを強く示唆すると思われる。また FGF-2 により p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼに加えて SAPK/JNK のリン酸化が促進されることが明らかとなった。MAP キナーゼはリン酸化により活

性化されることが知られており、FGF-2 により SAPK/JNK が活性化されると考えられた。VEGF は微小血管床の形成をはじめ、骨リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが知られているが、私どもは FGF-2 による VEGF 産生は p44/p42 MAP キナーゼを介すること、および p38 MAP キナーゼにより抑制的に制御されることを明らかとしている。今回、ラパマイシンおよび p70 S6 キナーゼのノックダウンが FGF-2 により惹起される VEGF 産生・mRNA 発現および SAPK/JNK のリン酸化を増強したことは、p70 S6 キナーゼと SAPK/JNK の間にクロストークが存在し、巧緻な細胞機能の制御のもとに VEGF 産生が行われていることを示唆している。今後さらに解析を進めることにより、細胞レベルでのたんぱく質の翻訳後修飾による機能制御機構、ひいては疾患発症・進展等の病態制御機構の解明に資することが期待できる。

D-9:疾患関連たんぱく質解析に関する研究

乳癌 9 例、閉塞性肺疾患 32 例、運動ニューロン病 20 例をプロテオーム解析中である。臨床データも随時収集、蓄積されている。したがって、それらの最初の結果について、平成 19 年度のはじめに検討できる予定である。

消化器癌は現在組織を集積中であり、近日プロテオーム解析を開始できる見込みである。

リンパ腫に関しては、腫瘍組織と同じ患者の正常組織を確保することには、倫理的に問題があり、慎重に検討した結果、リンパ腫以外の疾患で外科的に切除された検体に含まれるリンパ節で、診断に必要な部分を除いた残余部分を使うことで、近日解析に入る予定である。

臨床データが入力された検体について、プロテオーム解析を実際に進めていく段階に達し、その結果が待たれる。

今後、最終目的である治療方法の開発、診断マーカー、治療評価マーカーなどについて、臨床デ

ータと比較検討していく予定である。

臨床データの入力に関しては、検体採取後の経過も重要であり、個人情報保護法を尊重しながら、最新のデータを入力し、さらに適宜更新していく。

D-10:疾患関連たんぱく質解析のための質量分析法の確立

(1)尿たんぱく質のプロファイリング法の確立とデータベース構築。

分子量10 k Da以上のたんぱく質画分について、酵素消化の後、イオン交換クロマトグラフィー(82分画)→各々の画分について逆相カラムを用いたオンラインnanoLC/ESI-MS/MSにより、たんぱく質プロファイルを効率よく得る方法を確立した。その結果、健常者および癌患者尿10~15mlから約300~400種のたんぱく質を同定することができ、個々人の尿たんぱく質データベースの構築が可能となった。

(2)糖鎖構造解析法の検討

尿たんぱく質・ペプチドは糖鎖修飾を受けているものが少なからずあり、それらを効率よく分離、特異的に検出・構造解析する方法をオンラインnanoLC/ESI-MS/MSを用いて検討した。その結果、親水性クロマトグラフィーによる糖ペプチドの濃縮が可能であること、また、MS/MSによる特定のフラグメントイオン(オキシニウムイオン)をもとに糖ペプチドの特定を容易に行えることを見出した。さらに、分子量5kDa前後の比較的サイズの大きい糖ペプチドの解析においても糖鎖構造を同定できることがわかった。

(3)肺癌患者尿から同定したマーカー候補ペプチドの精査

大腸癌患者5例、膵臓癌4例、胃癌1例、肝臓癌5例、前立腺癌4例、肺癌5例、健常者尿7例の比較解析(10 k Da以下のペプチド画分)から、特定の癌種で、細胞質たんぱく質由来の特異なペプチド(X)が比較的多量に尿中に排泄されていることを見出した。さらに検体を増やして調べた結果(前立腺癌患者8例、腎細胞癌4例、健常者4例)、半定

量的だが、肺癌、前立腺癌患者の数例において、上記のペプチドが比較的多量に検出された。現在、各種肺癌症例(24例)に対してさらに詳しく調べている。また、ペプチドの定量は、H17年度確立した安定同位体¹⁸Oで標識したペプチドを尿試料にスパイクし、内部標準とすることで行った。また、尿中ペプチド量は対クレアチニン(mg)量として求めた。

尿たんぱく質プロファイルにおいては、一回の採尿試料を用いて約300~400種のたんぱく質(その内約1/3が膜たんぱく質由来)がルーチンに同定できるが、スペクトルの再現性、検索結果の信憑性には未だ問題がある。また、個体差や日間変動もどのくらいあるのか明らかとなっていない。尿たんぱく質データベース構築においては上記2つの問題を解決していく必要があり、MSのハード・ソフトウェアの最適化、あるいは、多数の試料を分析することでこれらの問題を明らかにしていきたい。現在、LC/ESI-MS/MSの測定においては、同一試料を2~3回分析して同定率を上げる方法を評価している。

尿たんぱく質・ペプチドには糖鎖が付加したものが多く存在することがこれまでの解析から明らかとなっている。また、ペプチドの解析にはMALDI-MS/MSを用いてきたが、糖ペプチドの同定には利用できないことがわかっている。糖鎖の解析には、しばしばESI-MS/MSが利用されている。MS/MSでは、一般に、糖鎖の組成、配列、そして分岐構造の情報が得られるが、尿たんぱく質、ペプチドのルーチン解析においても、それらの情報が効率よく得られることがわかった。しかし、MS/MSで通常行う中性ガスによる衝突活性化開裂では、ペプチド鎖の開裂は殆んど起きないため、たんぱく質同定が困難となる。現在、糖鎖(N-結合型)を切断する酵素(PNGaseF)で処理した後にたんぱく質同定を行っているが、2回の分析が必要となることや糖鎖結合部位に関する情報が得られないといった問題がある。この問題

を克服するために、今後、新しい技術（電子捕獲解離法）を導入し、評価していく予定である。

また、糖ペプチドと糖修飾のないペプチドの混合物の分析では、MS における測定モードやパラメーターが異なること、LC での分離が両者に対して一度には不十分であることから、糖ペプチドを特異的に濃縮する方法を種々検討した（レクチンカラム、ほう酸カラム、親水性樹脂等）。その結果、尿由来糖ペプチド・たんぱく質の濃縮には親水性樹脂が有効であることがわかった。現在、種々分離条件の最適化を行っている。以上の研究をもとに、今後、糖鎖構造、並びに、それらにより修飾されているたんぱく質と病態との関連について調べていく予定である。

具体的な疾患マーカーの探索については、本年度、1 種類の候補ペプチドを見出しており、現在それに対して検体数を増やして検証作業を行っている。また、これまでに蓄積したデータの詳細な比較解析を引き続き進め、新たなマーカー候補ペプチドの洗い出しを行っていく予定であるが、個人間および個人内での変動や疾患による変動等を区別するためには、さらに多くの試料についてデータを蓄積していく必要がある。

^{18}O 標識による定量解析については、H16 年度開発の“Isotopica”を用いることで、上記マーカー候補ペプチドの定量を正確に行うことができた。しかし、 ^{18}O 標識化ペプチドの調製については、現在行っている酵素や酸触媒を用いる方法には限界があり、アミノ酸配列によっては適用できない場合もある。この問題を解決すべく、 ^{18}O 標識ペプチド調製法を新たに確立する準備をしている。

D-11:大腸癌の N 型糖鎖及び酸性糖脂質の構造解析技術の確立

(1)大腸癌の酸性糖脂質の構造解析

酸性糖脂質は、肝臓転移を伴った大腸癌症例 3 例の大腸癌原発部位、および肝臓転移部位の構造解析を行った。さらに正常大腸粘膜の解析も行った。癌組織では主要な 22 種類の酸性糖脂質を同

定するとともに、個々の relative ratio も明らかにした。それらは、硫酸付加されたもの(SM3)1 種類、lacto-series(Sialyl Le^a)1 種類、6 種類の ganglio-series および 14 種類の neolacto-series の酸性糖脂質で構成されていた。癌特異抗原として知られている sialyl-Le^x, sialyl-Le^aなども検出された。ほとんどの糖鎖はすでに報告されているものであったが、以下に示す 2 種類の新規のフコース含有糖鎖を見出すことができた。

NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc,

NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3-Gal β 1-4Glc.

レーザーマイクロダイセクションを用いずに癌組織をそのまま解析した場合であっても、大腸正常粘膜とでは、酸性糖脂質の構造に差は認められた。しかし、レーザーマイクロダイセクション法を用いることにより、以下に記すような癌細胞に特異的に蓄積される糖脂質の構造が、いっそう鮮明となった。癌部位においては非還元末端へのシアル酸付加が α 2-6 結合で付加されたものの割合が α 2-3 で付加されものよりもはるかに多く、また、フコースがラクトサミン鎖の GlcNAc や galactose 結合したものが、多く認められた。

(2)大腸癌の N 型糖鎖の構造解析

N 型糖鎖に関しては、レーザーマイクロダイセクションを用いない場合にも、大腸癌症例における癌原発部位と正常粘膜部位とでは糖鎖構造パターンにわずかな差は認められた。しかし、酸性糖脂質の場合と同様に、レーザーマイクロダイセクション法を用いることによつてのみ、癌部において顕著に減少する 7 種類の糖鎖の存在が明らかになった。それらの糖鎖構造をすべて同定したところ、構造的特徴として bisecting GlcNAc 構造を有する二本鎖型の糖鎖である点が挙げられた。

今年度は、昨年度までに確立した N 型糖鎖及び酸性糖脂質の微量構造解析の技術を用いて大

腸癌および大腸正常粘膜の糖鎖構造解析を行った。酸性糖脂質においては、2種類の新規糖鎖構造を見出した。さらに大腸癌細胞においては α 2-6 terminal sialylation 及び α 1-2, α 1-3 fucosylation が著増していた。一方、N型糖鎖では新規の構造を見出すことはできなかったが、bisectig GlcNAc 構造を有する糖鎖が大腸癌細胞では著減していることが明らかとなった。これらの結果は、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、解析対象の癌細胞を高率に抽出した場合に極めて明瞭に認められた結果であり、レーザーマイクロダイセクション法を用いずに癌組織をそのまま whole tissue として解析した場合には、判断が難しい、あるいは見落とされた結果であった。よって、プロテオーム解析や transcriptome 解析と同様に、レーザーマイクロダイセクション法は糖鎖構造解析においても重要な tool であることが判明した。今後は他の癌の糖鎖構造を解析していくとともに、今回の解析で明らかとなった大腸癌に特徴的な糖鎖構造が、転移などに関与するか否かを含めた機能解明を推し進めていく必要がある。

D-12: 同位体標識法(cICAT)による各種疾患患者試料(血清・組織)のたんぱく質発現解析研究

1) 創薬プロテオームファクトリー施設(PF)倫理審査委員会での審査結果:

本年度は、2回のPF倫理審査委員会が開催され、7研究協力機関およびヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSSRB)からのヒト試料の受け入れおよび研究計画(新規および継続)について審議し、いずれも承認された。PF倫理審査委員会の構成メンバーおよび研究課題を下記に示す。

創薬プロテオームファクトリー施設(PF)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: 脇舩 光廣 ((基盤研)、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

(同志社女子大学薬学部、外部委員)

同 委員: 玉岡 かおる (作家、外部委員)

同 委員: 手嶋 豊

(神戸大学大学院法医学研究科、外部委員)

研究課題

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:

1) 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

2) パーキンソン病等の精神・神経疾患に関連する髄液微量たんぱく質解析

国立長寿医療センター:

痴呆、骨粗鬆症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:

1) 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 (1)

2) 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 (2)

3) 閉塞性肺疾患の原因たんぱく質の探索

国立循環器病センター:

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

2) 腎血管性高血圧症関連たんぱく質の探索

3) 糖尿病治療前後の動脈硬化関連たんぱく質の探索

4) 冠動脈疾患を有する家族性高コレステロール血症の LDL-アフェレーシス治療施行前後のたんぱく質の探索

5) 急性期心不全関連たんぱく質の探索

6) 高コレステロール血症患者における疾患関連たんぱく質の探索

7) 急性心筋梗塞および類似疾患における疾患関連たんぱく質の探索