

200809007A

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究-創薬バイオマーカー探索研究事業)

精神・神経疾患関連バイオマーカー探索による創薬基盤研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 後藤 雄一

厚生労働科学研究費（創薬基盤推進研究-創薬バイオマーカー探索研究事業）
総括研究報告書

精神・神経疾患関連バイオマーカー探索による創薬基盤研究

研究代表者 後藤雄一（国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部長）

研究要旨 精神・神経疾患はその病因、病態の複雑さのために、治療薬開発が最も遅れている分野である。平成15年度～平成19年度に行った精神・神経疾患プロテオーム研究において、血液を用いた解析に比べ、髄液を用いた解析では、数多くの神経特異的なたんぱく質の同定が可能で、中枢神経の状態を直接的に反映していることが実証された。本年度は、国立精神・神経センターにおいて、精神疾患（認知症他）、神経疾患（パーキンソン病、多発性硬化症等）、小児神経疾患（ミトコンドリア等）を対象に、髄液等を収集するシステムとプロテオーム解析系の稼働の準備が整った。

分担研究者

- (1) 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所 所長
- (2) 功刀 浩 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第三部長
- (3) 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部長
- (4) 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部長
- (5) 有馬邦正 国立精神・神経センター病院 第一病棟部長
- (6) 村田美穂 国立精神・神経センター病院 第二病棟部長
- (7) 沼知陽太郎 国立精神・神経センター病院 臨床検査部長
- (8) 中川栄二 国立精神・神経センター病院 小児神経科医長
- (9) 金子 勲 大正製薬(株)研究企画部 シニアリサーチアドバイザー
- (10) 小紫 俊 大正製薬(株)薬理機能研究所 標的分子研究室長
- (11) 茶木茂之 大正製薬(株)薬理機能研究所 創薬薬理第1研究室長

A. 研究目的

精神・神経疾患はその病因、病態の複雑さのため

に、治療薬開発が最も遅れている分野である。ヒトゲノムプロジェクトの成果を受けて、網羅的なゲノム解析手法で疾患関連遺伝子及びその産物が同定されてきているが、それらが病態にどう関わるかについて理解し、さらに創薬に結びつけるには、「たんぱく質レベル」の動態の把握が必要なことが周知の事実となっている。平成15年度～平成19年度に行った精神・神経疾患プロテオーム研究において、血液を用いた解析に比べ、髄液を用いた解析では、数多くの神経特異的なたんぱく質の同定が可能で、中枢神経の状態を直接的に反映していることが実証された。その手法を最大限活用し、各種の精神・神経疾患患者から採取した髄液のプロテオーム解析を出発点として疾患特異的に変動するたんぱく質を見だし、診断、病勢、薬効を判定する際に有効なバイオマーカーを同定し、さらにはそのたんぱく質及び関連するたんぱく質の機能解析を行うことで創薬に結びつけることが本研究の目的である。

B. 研究方法

1. 髄液等の患者試料と情報の収集

国立精神・神経センター病院（もしくは共同研究病院）で、IC取得後に試料と情報を収集、登録する。精神疾患担当（有馬、沼知、功刀）、神経疾患担当（村田、山村）、小児精神・神経疾患担当（中川）で行う。

髄液については、1対象疾患10~20例として、候補バイオマーカーを同定する。その後、候補バイオマーカーのバリデーションのために100例程度を収集する。場合によっては、他施設と共同してさらに多数の試料を収集する可能性がある。疾患ごとに適切に対応する。

ICに必要な説明文書、同意文書等の作成と倫理委員会からの承認に関する作業は後藤が担当。試料管理は中川が、情報管理は後藤が担当する。

2. プロテオーム解析

当センターにおいてcICAT法を中心としたプロテオーム解析を行い、また試料の一部をプロテオーム・リサーチ・センター（PRC）に送付し、測定結果を返してもらう。

3. 疾患特異的バイオマーカー同定に向けた研究

(1) バイオインフォマティクス解析（後藤、金子）

センター内で測定された結果及びPRCより返されたデータを解析し、候補バイオマーカーを選択する。

(2) バリデーション研究（村田、有馬、沼知、中川、和田、功刀、山村、後藤）

簡易測定系を開発し、バイオマーカーとして有用かどうかを判定するために、血液や尿などの採取しやすい試料での検討を行う。その結果を踏まえて、100例程度の血液等を用いたバリデーション研究を行う。

(3) 候補バイオマーカーの機能解析（和田、功刀、山村、有馬）

有力な候補バイオマーカーに関して、生物学的な機能を検討する。実験動物、ヒト由来の培養細胞、剖検脳などを使用して研究する。

5. 創薬研究（疾患担当者、小紫、茶木）

有力なバイオマーカーに関連するたんぱく質の探求やそれらの生物学的機能の理解を踏まえて、新薬開発に関する研究を行う。

C. 研究と考察

1. 倫理申請と髄液等の患者試料と情報の収集

本研究は、患者の試料と情報を用いる研究であり、臨床研究に関する倫理指針のガイドラインに準拠した研究計画として、施設の倫理委員会から承認を

得た。インフォームド・コンセントに関する手続きに専任の補助者を配置するなど、研究支援体制の準備を行った。

また、髄液採取については、医療上髄液検査を必要とする患者で研究に同意した方々を対象とするが、対象とする疾患毎で次のような準備を行った。

アルツハイマー病などの認知症では、脳脊髄液中のβアミロイド42濃度が低下し、リン酸化タウ濃度が上昇することの組み合わせで、診断感度85%、特異度87%と報告されている。国立精神・神経センター病院では、数年前からアルツハイマー病の補助診断として髄液バイオマーカー検査を導入していたが、本研究班発足を契機に、平成21年度からβアミロイド42濃度とリン酸化タウ濃度の測定を自施設内で実施するように検査システムを構築した。

神経疾患では、パーキンソン病において、適切な臨床情報を伴う血清、髄液収集のために、臨床情報シートを作成した。臨床情報シートは今後1年に1回（誕生日）ずつデータを更新し、経過を含めて評価できるものとする予定である。同様な臨床情報シートを他の神経疾患においても作成する予定である。

小児神経疾患では、バイオマーカー探索可能な小児の精神・神経疾患の選定とスムーズに検体収集を行うための方法について検討した。

2. プロテオーム解析

創薬基盤推進研究の基盤技術共同研究班で検討されたcICAT法による微量たんぱく測定系を、医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンター（PRC）から当センターへ移管するために、測定機器、サーバー等の移動手続きを行い、一部の測定機器、サーバー類は平成20年度に移動した。すべての移管は、平成21年度初めに完了し、稼働開始できる見込みである。

また、プロテオーム解析とは異なるウェスタンブロットによる髄液蛋白質の解析系を検討した。通常髄液濃度ではたんぱくの検出ができなかったが、20倍に濃縮した検体では、検出できた（図1）。また、一部の蛋白質については、高感度サンドウィッチELISA法の系を開発し、目的蛋白質を検出することに成功した。さらに目的たんぱく質の活性化状態を

評価できる方法も開発した。

D. 結論

プロテオーム解析から精神・神経疾患のバイオマーカーを探索する研究体制を構築した。倫理審査の承認を受け、平成 21 年度からの具体的な試料採取、プロテオーム測定系の活用が可能になった。

E. 健康被害情報

なし

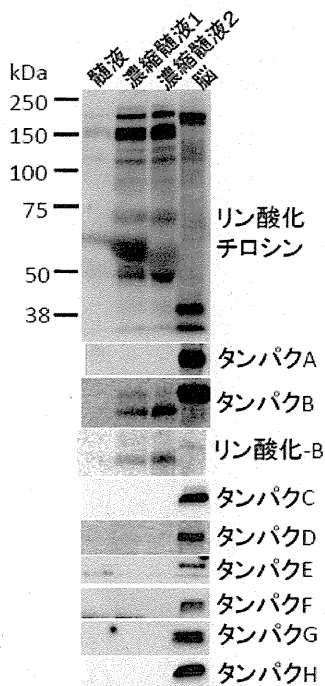
F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

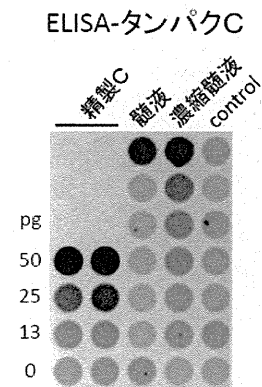
なし

図1 ウェスタンブロット



髄液中のタンパク濃度は組織・血液に比べて極めて低いため、フェムト・モルレベルの高感度検出系を用いた。髄液をそのままサンプル化し泳動した場合(図中、「髄液」)には目的タンパクをほとんど検出できなかったが、TCA沈澱法にて約20倍に濃縮したところ(濃縮髄液1、2)、複数のタンパクについて検出することができた。

図2 ELISA法



統合失調症との関連が疑われ、上記のウェスタンブロットにて髄液中に検出できなかったタンパクCについて、高感度サンドウィッチ ELISA を開発した。検出下限は数十 pg であった。これを用いたところ、濃縮髄液検体で目的タンパクの検出に成功した。さらに、目的タンパクの活性化状態も評価できる ELISA も開発した。

