

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

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
(H20-ハ^イオ-一般-010)

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

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
(H20-バイオ-一般-010)

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所

平成 22 (2010) 年 5 月

総括研究報告

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

後藤雄一 ----- 1

(資料) 検体採取のプロトコール ----- 6

(資料) 検体受け入れプロトコール ----- 8

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
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

主任研究者 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 本研究計画は（A）髄液等の患者試料と情報の収集、（B）プロテオーム解析、（C）疾患特異的バイオマーカー同定に向けた研究、（D）臨床応用と創薬研究、という大きな研究内容の区分がある。平成 21 年度は、（A）に関しては、各診療科との連携で、髄液試料確保のシステムが整備できた。また、当初の予定では医療的に髄液検査が必要な患者の研究へのリクルートのみを考えていたが、さらに研究的な髄液採取のプロトコールも倫理委員会の承認の元で動きだし、正常対照者、統合失調症等の精神疾患患者の髄液採取が軌道に乗り始めた。また（B）に関しては、先行研究で行われたプロテオームファクトリーに備えられていた質量分析装置 QSTAR3 台、前処理等に必要な複数台の HPLC、HiSpec 解析に必要なサーバーシステム等を国立精神・神経センターに移転させ、その動作確認とシステムの立ち上げを行った。さらに前処理法の検討を行い、プロテアーゼ阻害剤、SCX 分画の工夫などで、個々の患者の髄液（初期量 2mL）からの測定系がほぼ確立できた。

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
疾病研究第六研究部長
- (4) 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第四研究部長
- (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
外来部長
- (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) 林由起子 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第一室長
- (10) 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

- (11) 小紫 俊 大正製薬（株）薬理機能研究所
標的分子研究室長
- (12) 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. 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

全体計画

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。

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（林）、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

ア. バイオインフォマティクス（後藤、金子）

当センターでのデータ及び 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。

イ. 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。

ウ. 候補バイオマーカー関連物質の探求（後藤）

候補バイオマーカーに関連する物質の探求のために、それら物質のゲノム解析及びトランスクリプトーム解析等を行う。これにより、バイオマーカーとしての信憑性が高められることが期待できる。

エ. 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。

4) 臨床応用と創薬研究

ア. バイオマーカーの臨床応用（村田、沼知、有

馬、山村、中川）

多数例を用いて臨床的な有用性の確認を行う。

イ. 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。

本年度の研究方法

1) 髄液等の患者試料と情報の収集

(1) 髄液等の検体採取のプロトコール作成

多数に診療科に及ぶ試料収集であるため、検体採取プロトコールを作成し、関係者に配布し利用する。

(2) 髄液等の検体受け入れプロトコール

研究材料としての品質を保つために髄液や血液の採取後の速やかな処理を行う必要性から、受け入れ側においては検体受け入れプロトコールを作成する。

(3) 患者試料の登録

収集した試料をプロテオーム解析まで凍結保存する。

2) プロテオーム解析

(1) 移設機器の立ち上げ、確認

平成 20 年度の研究開始時とは事情が異なり、先行研究で用いていた質量分析計、サーバ類を国立精神・神経センターに移設して、あらたに測定系、解析系を立ち上げることが必要になった。

(2) 微量解析のための髄液前処理法の検討

先行研究として行われた厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）疾患関連創薬バイオマーカー探索研究（平成 15 年度～平成 20 年度）において、髄液を用いた cICAT 法による測定法の開発が進められており、初期量 10ml の髄液からの手順はできていた。しかし、個々の患者から 10mL を採取することは非現実的であり、初期量 2mL で測定可能な微量測定法の開発が必要であるため、先行研究の方法を改良することが必要である。

ア. プロテアーゼ不活化処理

プロテアーゼの不活化を目的としたインヒビター

(P1861 SIGMA) の有効性を検討する。

イ. SCX カラム処理の工夫

質量分析計 QSTAR-XL での MS/MS 測定前の最終段階で 25 分画を取得する。その際に個々の分画に存在するペプチド数を平均化することで測定タンパク数の増加が見込まれるため、その方法を工夫する。

ウ. プール髄液検体と個人髄液検体の比較

これまで条件設定に用いてきたプールされた髄液 2 mL での結果と個人の 2 mL での結果を比較し、個々の患者髄液での測定法の確立を行う。

(3) コントロールの取扱

cICAT 法は 2 種類の同位体レベルを行う事で、タンパク質の存在比を測定する特徴がある。したがって、コントロールを常に一定にすることが不可欠であるが、健常者の髄液を入手することは容易ではない。当初は治療のために一度に 30mL 程度を採取する正常圧水頭症患者からの髄液をコントロールに用いることを想定していた。しかし、米国の VITAL PRODUCT 社から標準髄液 (病院の余剰髄液をプールしたもの) を購入し、使用可能かどうか検討する。

(倫理面への配慮)

研究者の所属する施設の倫理委員会に本研究に関する倫理申請を行い、承認を得て行った。診療上、髄液を採取する必要のある疾患患者に研究参加を依頼することを基本に研究計画を作成した。すでに、認知症及び神経疾患全般に関しては、余剰髄液を用いて行う研究が動いていたので、それに加えるプロトコルで研究計画を構築した。さらに本年度後半には、ボランティアにて髄液採取に協力していただける疾患患者、正常者からの髄液を研究利用するプロトコルも倫理委員会の承認を得て動きだした。

購入した米国人髄液 (VITAL PRODUCT 社) は、検査後余剰プール髄液 (IC あり) であり、FDA も購買リストに名が連なっている。

C. 研究結果と考案

1) 髄液等の患者試料と情報の収集

(1) 髄液等の検体採取のプロトコル作成

患者への説明、同意取得、検体採取等の一連の流れと必要書類、必要物品をパッケージとして病棟に配布し、それらを用いた「検体採取のプロトコル」を作成し、使用した (資料 1)。

(2) 髄液等の検体受け入れプロトコル

採取した検体を迅速に処理する必要性から、研究チームの中にプロテオーム・リサーチ・コーディネーター (PRC) を組織し、検体採取時に立ち会うこととした。また採取した検体の処理方法を明確化するために、「検体受け入れプロトコル」を作成し、使用した (資料 2)。

(3) 患者試料の登録

平成 22 年 3 月末までに 12 例の髄液採取ができており、小児神経科、神経内科、精神科からの髄液登録が着実に伸びている。特に統合失調症患者の髄液が徐々にその数が増加しており、来年度以降の解析に供する徒弟である。

2) プロテオーム解析

(1) 移設機器の立ち上げ、確認

主な移設機器

試料前処理装置

HPLC (日立 3 台)、(島津 5 台)

抗体除去、SCX 分画、脱塩処理

Vision 1 台 (アフライド バイオシステムズ)

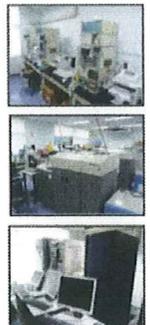
biotin 除去

SpeedVac 2 台 (ThermoElectron)

質量分析装置

Qstar 3 台 (nano-LC/MS/MS)

データ解析システム一式 (Highspec data 処理)



機器の移設と調整・確認作業

3月~4月 移設

4月~5月 業者による調整作業

6月 前処理用 LC の部品調達

QSTAR の部品調達

HiSpec 立ち上げ開始

7月 前処理用 LC と QSTAR の Running Test

8月 血清の cICAT 処理 Trial

QSTAR の BSA 評価

血清試料の QSTAR 解析と HiSpec 解析

9月 PF 戻りの患者髄液の cICAT 処理と

QSTAR 解析および HiSpec 解析

(2) 微量解析のための髄液前処理法の検討

ア. プロテアーゼ不活化処理

微量タンパク質を大量に検出するためには、採取後のプロテアーゼによる分解を最小限にする必要がある。その目的プロテアーゼインヒビター (P1860 SIGMA) が有効かどうかを検討した。髄液 2mL に対し 4 μL 添加し、通常の前処理を行い、質量分析計でペプチドを測定し、検出タンパク質数とその内容を検討した。

PF戻りCSFのcICATラベル化試料解析結果

固定数: score20 以上で同定されたタンパク数

インヒビター	Light	Heavy	固定数
有	カラムthrough分画 (164μg)	カラムthrough分画 (133μg)	271
無	カラムthrough分画 (29μg)	カラムthrough分画 (25μg)	269

具体的な同定タンパクの例

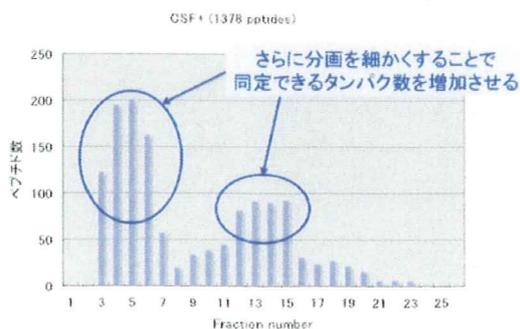
は中脳神経で発見

q51504819	400-7	muscle-like growth factor binding protein 7	q14507171	2242	neuronal protein, acidic, cytoskeleton
q15105841	306-1	glucosylase	q175014423	2261	SPLUNC1-like 5
q111602083	362-5	CD59domain surface glycoprotein 3	q119629729	2471	E1 cytochrome oxidase family 3, cytochrome B
q151529884	701-2	apolipoprotein H precursor	q14528116	2484	calyculin-related peptidase 4, cytochrome A precursor
q15116749	387-8	complement component 3a precursor	q156691006	2519	glycylglycyl aspartate aminotransferase
q151242755	147-6	Salivary gland 3 kDa protein 2	q13872035	2521	tyrosinase, cytochrome 1
q15107187	348-6	serpinin 1 precursor	q14627022	2575	serine/threonine phosphatase 2
q15162374	335-9	acidic glycoprotein 1, cytochrome-like	q165347875	2584	complement component 1, c subcomponent
q151722558	108-9	complement factor B precursor	q145570225	2584	multiple EGF-like domains 6
q151589039	206-9	complement component 2 precursor	q15020786	2583	EBP50-15.1N serine/threonine phosphatase 1
q15104881	290-9	α-synuclein 1 isoform 2	q151457120	2587	transmembrane protein
q14504297	242-3	serpinin 1A isoform 1 precursor	q117513329	2593	procollagen C1-1kDa domain 1 enhancer
q15103630	274-7	myo-factin factor 2 precursor	q111089371	2593	cell adhesion molecule 4
q15160280	208-6	α-actinin-2 precursor	q111448239	2584	complement factor 1, cytochrome 1
q151371249	208-7	serpinin 1A2 isoform 2 precursor	q14574240	2634	β-tubulin cytoskeleton-associated protein 4
q11132168	208-5	hemoglobin precursor	q14520207	2633	alpha-1-microglobulin domain 1 precursor
q111630261	208-3	complement factor 1 precursor	q14448366	2781	glycylglycyl aspartate aminotransferase 2, cytochrome 2
q151453706	267-6	β-actinin 1 isoform 1 precursor	q14420689	2745	neuronal cell adhesion molecule 1 isoform 1
q1514146202	250-3	Fc-γRIIIb or γ3c binding protein	q115116891	2742	neuronal cell adhesion molecule 2 precursor
q151162220	235-1	glycylglycyl aspartate aminotransferase 2 precursor	q115020201	2737	serpinin precursor isoform, cytochrome C, cytochrome 1
q151033542	254-7	serpinin 1 isoform 3 precursor	q14521617	2771	glycylglycyl aspartate aminotransferase

上記のように、プロテアーゼインヒビターの使用の有無で検出タンパク数に大差なく、この処理は不必要と判断した。

イ. SCX カラム処理の工夫

各Fractionで同定されたpeptide数

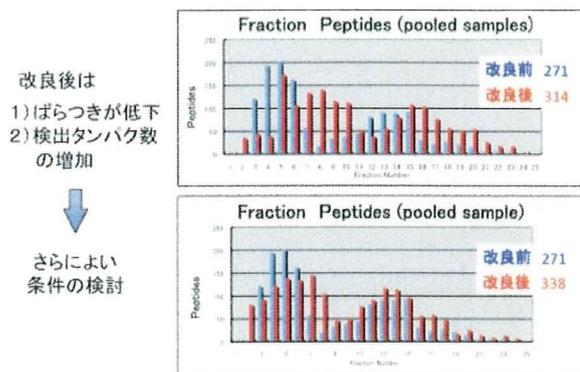


25 分画に存在するペプチド数が不均一であり、多くのペプチドが含まれている分画では、ある一定時間に一定量のペプチドを検出する質量分析においては、検出できないペプチドが増加することになる。分画間のペプチド数の平均化により検出タンパク質

の数の増加が望める。したがって、ペプチド数の多い分画時間を短縮し、少ない分画あたりを長くする工夫を行った。

これにより、改良前では 271 個のタンパク質の検出であったものが、314 個、338 個と増加させることが可能となった。

SCX分画条件改良



ウ. プール髄液検体と個人髄液検体の比較

これまでの条件設定に用いてきた髄液検体プール (5 検体の混合) とプールする前の一人の髄液検体をそれぞれ 2 mL から始めて、その差を検討した。

Pooled CSF vs Individual CSF

	Pooled CSF (5 samples)	Individual CSF (1 sample)
対照サンプル(ラベル)	Standard	Standard
同定タンパク総数	338	281
正常より増加したタンパク		
Ratio > 2.0 のタンパク数	22	24
Ratio > 3.0 のタンパク数	12	13
Ratio > 5.0 のタンパク数	4	6
正常より減少したタンパク		
Ratio < 0.5 のタンパク数	88	45
Ratio < 0.33 のタンパク数	50	20
Ratio < 0.2 のタンパク数	21	10

1検体毎 (2mL) の測定が可能になった

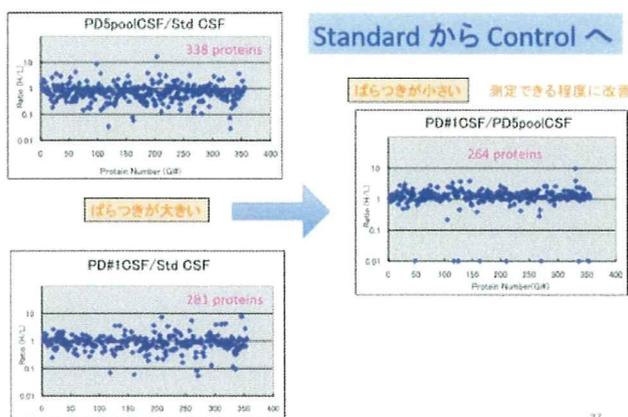
その結果、個人患者髄液での検出タンパク数はプール髄液より若干減少したが、正常より増加したタンパク数、減少したタンパク数には大きな差がみられず、個々の患者検体 2 mL からの測定系が確立できた判断した。

(3) コントロールの取扱

疾患に対するコントロール (対照) として、比較的大量に採取できる正常圧水頭症患者髄液と予定していたが、米国人のプール髄液を購入して、その使

用可能性を検討した。

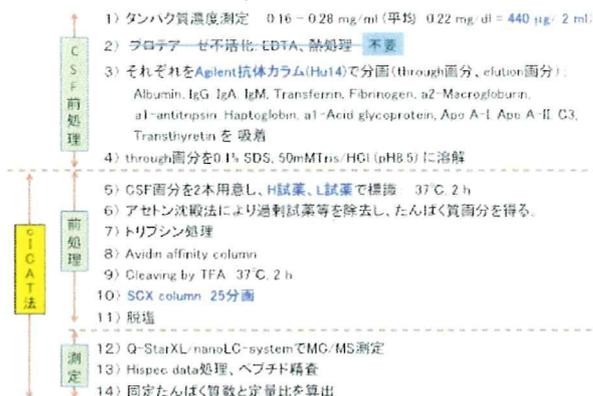
患者5人のプール髄液をHラベルし、購入標準髄液をLラベルした検討 (PD5poolCSF/StdCSF) と個人患者髄液をHラベルし、購入標準髄液をLラベルした検討 (PD#1CSF/StdCSF) では、H/L比のばらつきが大きかった (0.1〜10倍)。これらの2つデータを除することで、個人髄液とプール髄液での各タンパク質の存在比を計測できる (PD#1CSF/PD5poolCSF)。その結果多くのタンパク質が0.5〜5倍程度に収束したことで、購入髄液を標準として用いることが可能であると判断した。



E. 結論

平成21年度においては、(A) 髄液等の患者試料と情報の収集、(B) プロテオーム解析、(C) 疾患特異的バイオマーカー同定に向けた研究、(D) 臨床応用と創薬研究、という研究内容の区分のうち、(A) 髄液等の患者試料と情報の収集、及び (B) プロテオーム解析の研究内容に終始した。(A) については、疾患患者髄液の収集が軌道に乗ったものの、当初の予定よりやや少なく、(B) については、個々の患者髄液2mLからの解析手法が確立できた。以上から、全体としては達成度80%である。

脳脊髄液(CSF)2mLを用いた質量分析法



また、今後の展望として、個々の患者の測定が開始できる体制が整ったので、次の段階である (C) 疾患特異的バイオマーカー同定に向けた研究が実施できる。特に、疾患を絞って戦略的な測定を行うことを考えており、①多発性硬化症の治療薬使用前後の比較研究、②認知症症例、③パーキンソン病症例、④統合失調症症例を重点的に解析してゆく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「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」 検体採取のプロトコール

●このパッケージに含まれるもの

- ①本プロトコル
- ②説明文書、同意文書(3枚つづり)、同意撤回書
- ③特殊検査伝票(髄液用、血液用、2枚つづり各1部)
- ④患者臨床情報シート
- ⑤髄液採取用チューブ・スポイト(滅菌・個別包装)
- ⑥真空採血管

●手順1(インフォームド・コンセント)

- ①同意取得→説明文書を用いて同意を得てください。

説明文書 } 患者さん用
同意撤回書 }

同意文書: 1枚目→本パッケージに戻してください。
2枚目→患者さん用控え
3枚目→カルテ添付用控え

- ②特殊検査伝票→エンボスでID・名前を入れ、内容を記入し
1枚目→本パッケージに戻してください。
2枚目→カルテ添付用控え

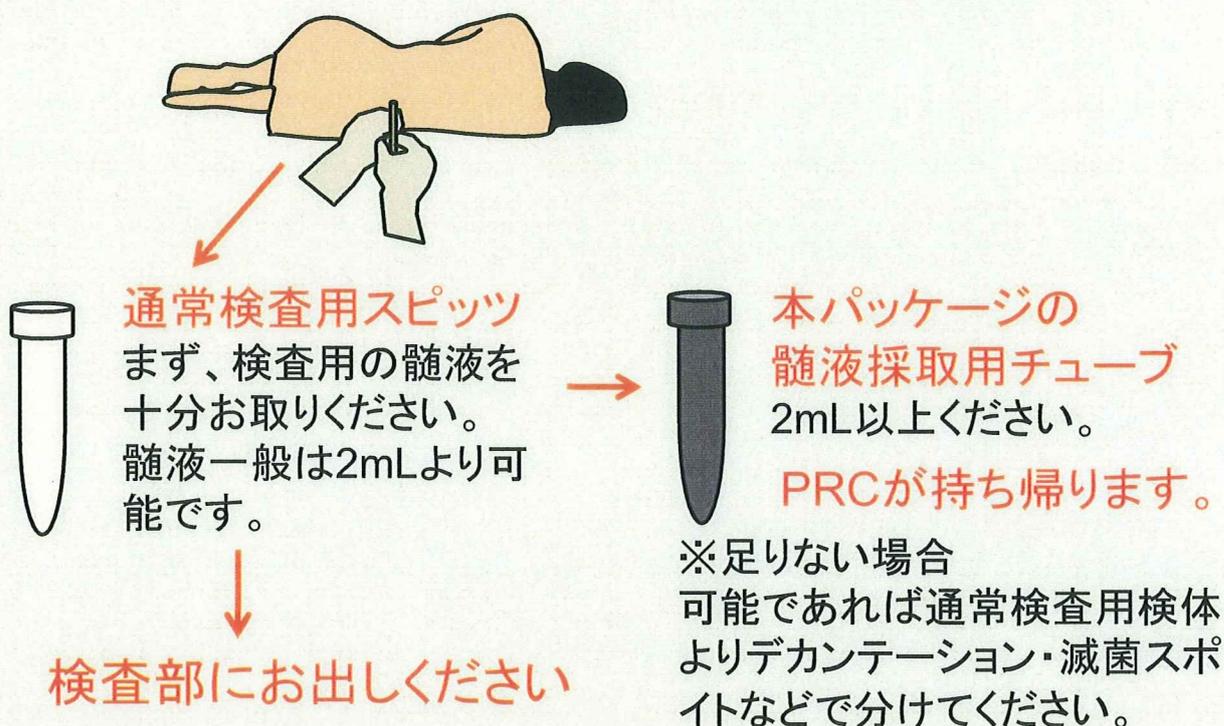
- ③日時決定→プロテオーム・リサーチ・コーディネーター
(PRC, 下記)に検査予定日時、場所、連絡先
をご連絡ください。

プロテオーム・リサーチ・コーディネーター(PRC)

- 1: 加藤万由子(神経研究所 疾病2部研究員)内線5826
- 2: 服部功太郎(神経研究所 疾病3部室長)内線5831
- 3: 後藤雄一(神経研究所 疾病2部部長)内線3021

●手順2(髄液採取)

- ①通常の髄液穿刺の用意に加え、本パッケージの髄液採取用滅菌チューブ・スポイトもご用意ください。
- ②検査15-30分前にPRCにご連絡ください。
病棟にまいりましたら、パッケージ(同意文書・検査伝票入り)をお渡しください。
- ③腰椎穿刺はPRC到着前に始めていただいで結構です。



●手順3(血液採取)

- A: 同時に採血する(した)場合→PRCにお渡しください。
- B: 後日採血する場合
→採血が済みましたら、PRCにご連絡ください。
1時間以内に取りにまいります。

●手順4(患者臨床情報シート記入)

検査部より髄液・血液の検査結果が戻りましたら、必要な情報を記入し、所内便にてPRC加藤(神経研究所・疾病研究第2部)にお送りください。

「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」 検体受け入れプロトコール

●アイスボックス持参

●病棟にて受け取るもの

①同意文書(1枚目)

②髄液用伝票(1枚目)→血液の混入などを記入する。

③髄液検体→受け取ったら氷中へ

④血液用伝票(1枚目)

⑤血液検体(同時採血の場合)→室温で輸送

同時採血の場合

●病棟に残すもの(パッケージに入れ担当医に渡す)

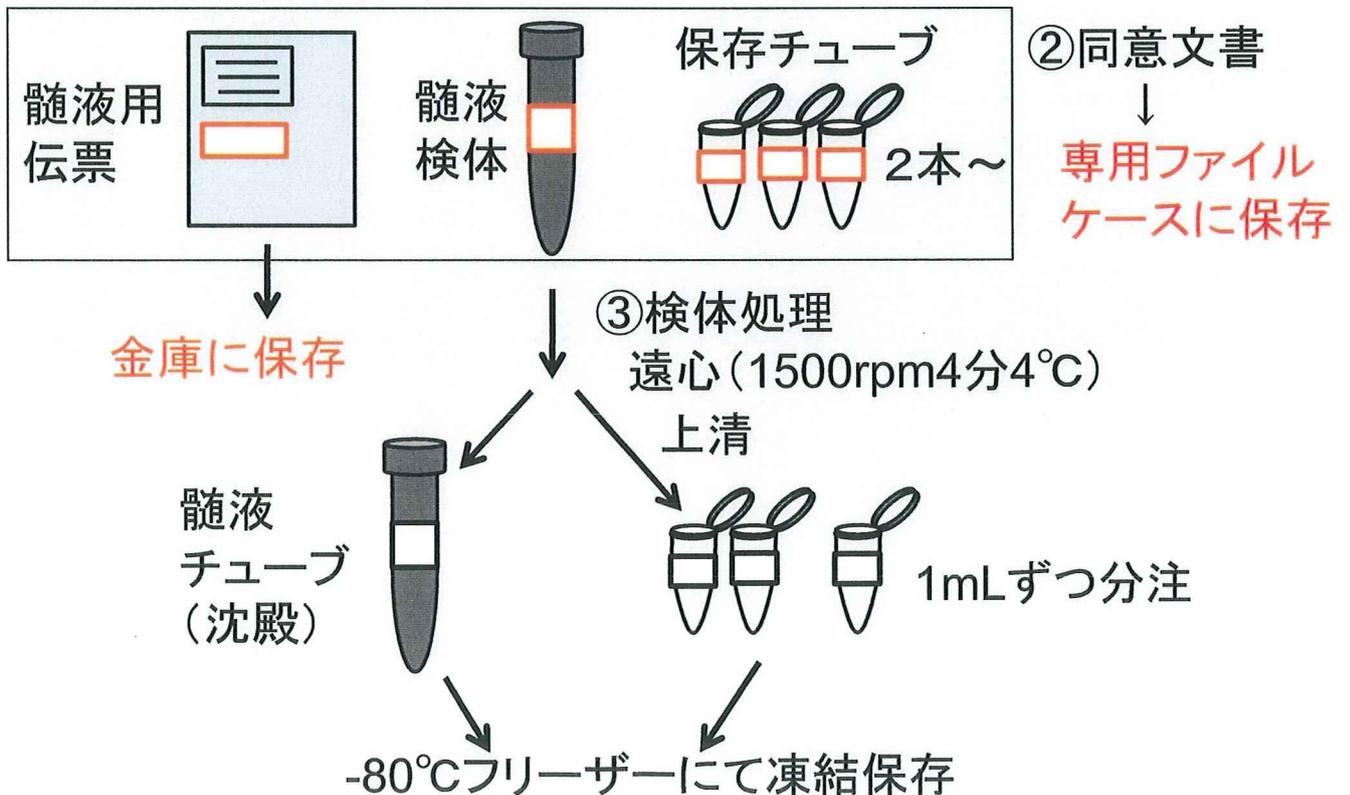
本プロトコル・患者臨床情報シート・カルテ添付用伝票控え(2枚目)

血液用伝票、真空採血管 後日採血の場合

————— ゲノムセンターに運搬 —————

●髄液検体の受け入れ

①匿名化シールを貼る



●血液検体の受け入れ

髄液採取済みの場合

●持ち帰るもの

血液検体・血液用伝票(1枚目)

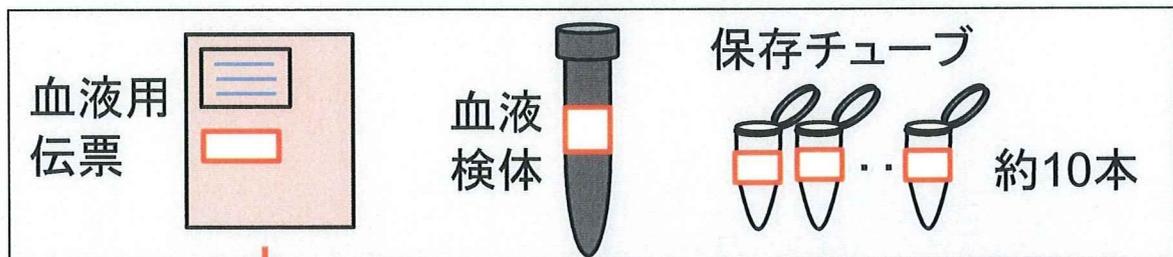
●病棟に残すもの(パッケージに入れ担当医に渡す)

本プロトコル・患者臨床情報シート

カルテ添付用伝票控え(2枚目)

ゲノムセンターに運搬

①匿名化シールを貼る(髄液検体とは別番号)



金庫に保存

③検体処理(血清分離)

室温1時間(又は37°C30分)静置
遠心(3000rpm10分4°C)



-80°Cフリーザーにて凍結保存

