

タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化に向けて

斎藤嘉朗[#], 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌

Toward acceleration of drug development with proteomic and metabolomic biomarkers

Yoshiro Saito[#], Keiko Maekawa, Kosuke Saito, Yoji Sato, Takayoshi Suzuki

Biomarkers, reflecting disease states or predicting/assessing drug efficacy or adverse reactions, are expected to play pivotal roles in effective drug development and promoting proper usage of drugs. To accelerate biomarker identification and usage, administrative guidance can direct to design appropriate exploration, validation and utilization studies and show examination procedures. However, very limited number of guidance or its draft were released from Japanese, US and European regulatory authorities so far. From 2012, we have been conducting proteomic and metabolomic studies using blood and urine samples from human and rat, in order to establish draft guidance for sampling/storage of these biofluid and for extrapolation of biomarker candidates from animals in the non-clinical to humans in the clinical studies. The results are still partial and the rest of the analysis is ongoing. However, we developed sensitive proteomic system for urine and found large inter-sex differences in the proteomic profiles of rat. In addition, matrix-, sex- and generation-differences were also observed in the metabolite levels in human blood, some of which showed over 2-fold differences. We continue this regulatory science studies for contribution to accelerated novel biomarker findings and its usage by generation of the draft guidance.

Keywords: Biomarker, Biofluid, Drug development, Metabolomics, Proteomics

はじめに

バイオマーカーは、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と米国のバイオマーカー定義ワーキンググループにて定義されている¹⁾。臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。疾患の状態や医薬品の有効性確保および安全性向上のための指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数は急増している²⁾。さらに医薬品の市販後においても、各患者における有効性を最大限に確保し、副作用を最小限に抑え

るために、その利用が期待されている。重篤な副作用は死亡や重い後遺症につながることもあり、バイオマーカーの診断費用を含めても医療経済学的に有用との研究結果もある³⁾。

バイオマーカー自体は、新しい概念ではなく、例えば肝障害におけるアラニンアミノトランフフェラーゼ (ALT) や腎障害におけるクレアチニンなど、古くから用いられているものも多い。しかし臓器障害がある程度重篤になってからしか上昇が見られない、または臓器特異性が低いなど、問題が多いマーカーも使われており、臨床現場では問題となっている。そのため、より早期に軽症の段階で検出しようとする新規バイオマーカーの探索が活発に行われている。

バイオマーカーとしては、遺伝子多型やmRNAレベル等のゲノムバイオマーカーに関する検討が多くなされており、近年ではマイクロRNAも注目されている。しかし、遺伝子多型に関しては、ヒトに固有であり、一部の代謝酵素等を除いて非臨床試験段階で検討することは難しく、臨床試験段階で初めて十分なデータが得られる

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoshiro Saito; Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9528; Fax: +81-3-3700-9788; E-mail: yoshiro@nihs.go.jp

ため、医薬品開発の初期から利用することは難しい。一方で、血液や尿などの体液に含まれるタンパク質⁴⁾や内在性代謝物⁵⁾は、種差が報告されている分子が一部存在するものの、非臨床で用いられる動物から、臨床におけるヒトへの外挿は、多くの場合、理論的に可能と考えられる。

1. バイオマーカーとしての要件

医薬品開発において有用なバイオマーカーは、

- 1) 種差なく共通して変化し、非臨床から臨床への外挿が可能、
- 2) 疾病や医薬品の有効性および安全性と、その早期段階から感度・特異度高く相関、
- 3) 食事や運動等の環境要因を含め、目的とする要因以外による影響を受けにくい、

ものと考えられる。さらにバイオマーカーを適切に評価するためには、正確度および精度高く測定することが必要であり、これには

- 4) 生体試料を測定する機器や方法（バイオアナリシス）の要件
- 5) 測定する試料の品質に関する要件

も重要となる。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、各製薬会社はその利用方法を模索している状態である。

2. 行政的な動向

各国の規制当局である日本の厚生労働省/医薬品医療機器総合機構、米国・食品医薬品庁（FDA）、欧州・医薬品庁（EMA）もバイオマーカーについては注目しており、その積極的な利用を促進するため、いくつかのガイダンス等が公開されている。しかし、そのほとんどはゲノムバイオマーカーを対象にしており、タンパク質や内在性代謝物は対象外となっているものが多い。また、手続きに関する記載が多く、評価要件など技術的なものは少ない。

ゲノムバイオマーカーに関しては、その定義を「正常な生物学的過程、発病過程、及び/または治療的介入等への反応を示す指標となる、DNAもしくはRNAの測定可能な特性」としたゲノム薬理学における用語集について（ICH E15）⁶⁾を始め、ゲノムデータの申請方法（FDA）⁷⁾、バイオマーカーと診断法の同時開発（EMA）⁸⁾、臨床試験の研究デザインやデータ解析方法（EMA, FDA）^{9,10)}、薬物動態解析におけるゲノムバイオマーカー利用のスキーム（EMA）¹¹⁾、医薬品の製造販売後監視におけるゲノムバイオマーカー利用の課題（EMA）¹²⁾、試料採取や保管・測定法・データ処理（EMA, FDA）^{13,14)}、に関するガイダンス（または案、コンセプトペーパーやリフレク

ションペーパーを含む）が公開されている。

一方、タンパク質や内在性代謝物に関してのガイダンスは、ほとんど無い。適格性確認のための資料における用法の記載要領、構成及び様式を定めた「医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー（ICH E16）」¹⁵⁾はゲノム以外のバイオマーカーを明示的には適用範囲としていないが、この文書に記載される原則は、タンパク質等の他のバイオマーカーについても適用可能としている。これ以外には、組織学的知見を陽性対照としたFDAの概要的ガイダンス案¹⁶⁾しかなく、実データを反映した明確な評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

このようにバイオマーカーの有用性を担保するための評価要件が確立していない状況では、不適切な試料の利用や不的確なバイオマーカーの利用により、かえって医薬品開発の遅延や混乱を招く可能性がある。今後は、ゲノム同様、タンパク質や内在性代謝物に関しても、測定試料の品質要件を始めとする多くのガイダンスを策定する必要がある。しかし、その策定の基礎となるデータは非常に乏しいのが現状である。

3. 体液中のタンパク質および内在性代謝物をバイオマーカーとする場合の、ガイダンス案策定に向けて

3-1. 研究班の目的、構成と期待される成果

平成24年度より厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究（研究代表者：斎藤嘉朗，研究分担者：熊谷雄治（北里大学），鈴木孝昌，前川京子）」が開始された。本研究は、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、特に問題となる測定用試料の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿性に関する評価要件案の作成を最終目標として、1) バイオマーカーの開発動向調査、2) 測定用血液・尿の採取等に関する要件の明確化、3) 動物モデルおよびヒト試料を用いた外挿性に関する実践的検討と、注意すべき評価要件の明確化、等を行うものである（図）。本研究の遂行により、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験への外挿に関する評価要件案が作成され、ガイダンス等として発出されると、本邦におけるバイオマーカーの開発および利用推進につながり、医薬品開発を効率化して新薬創出の増加に結びつくと期待される。またこれら試料採取に関する要件案および非臨床から臨床への外挿に関する評価要件案は、世界的にも例がなく、国際的にも

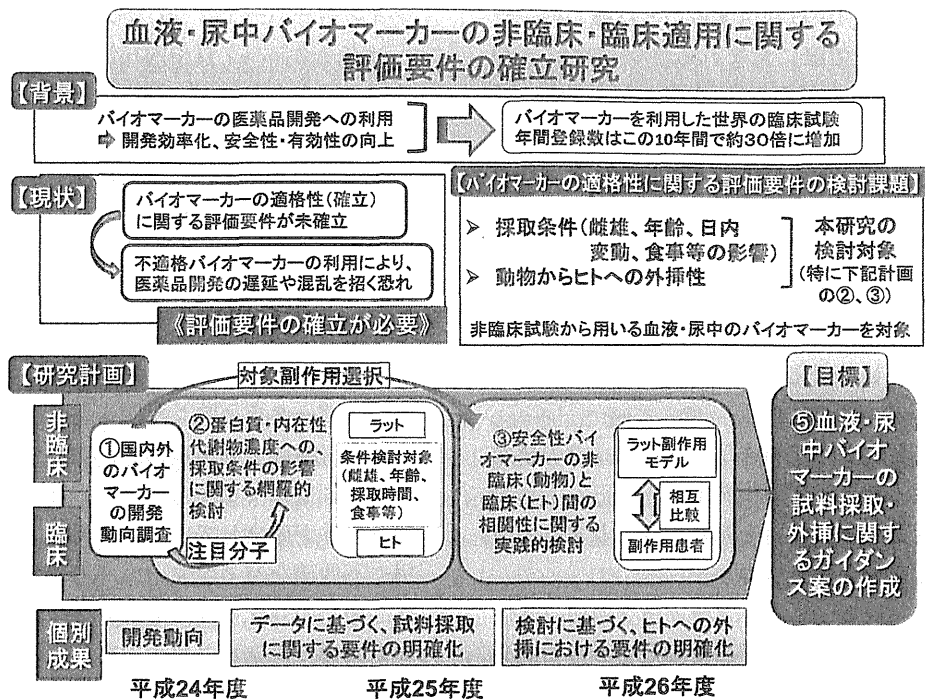


図 研究の背景、目的と計画

貢献できる研究である。

3-2. 研究の進捗状況

現在、三年計画の一年目が終了した段階であるが、下記の成果を挙げている。

3-2-1. バイオマーカーの開発動向調査

開発動向としては、腎障害マーカーとして尿中Kim-1等の新規バイオマーカーが有用であることが報告されている¹⁷⁾。さらにタンパク質マーカーとしては、抗がん剤ゲムシタピンによる重篤な血液毒性(好中球減少および血小板減少)の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること¹⁸⁾、血清中のアポリポ蛋白タンパク質Eのレベルが89%の正確性で薬物性肝障害患者と健常人を区別しうること¹⁹⁾等が報告されている。代謝物マーカーとしては、薬物性肝障害に関して、血中ALT+γ-グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること²⁰⁾、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾホスファチジルコリンの減少²¹⁾が報告されている。

3-2-2. プロテオミクス解析による尿中タンパク質に関する検討

ショットガンプロテオミクス法では、トリプシン消化後にタンパク質およびペプチド混合試料を、液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で分析するが、尿中に

は高発現量のタンパク質があり、そのため微量のタンパク質は検出できない²²⁾。そこで、雄ラット尿を用いて、有機溶媒による簡便な高発現タンパク質の除去に関する前処理条件の検討を行った。収率は低くなるものの高発現のタンパク質を効率的に除去し、低濃度のタンパク質を中心に一回の分析で700種以上を同定しうる系を構築した。これを用いて、ラット尿中のプロテオーム解析を行った。雌雄間の比較では、予想されたように差が認められ、特に雌雄のいずれかのみで発現が認められるタンパク質が、同定タンパク質数の約1/3程度を占めた。食事影響については、比較的小さいものであった。従って、非臨床試験に用いるラットの尿を対象としたタンパク質バイオマーカーの探索と候補の選択に当たっては、性差を十分考慮に入れる必要があると示唆された。一方、食事影響については、重要でないと考えられた。

さらに平成25年度の解析としては、高齢群の一部の個体において、ばらつきの原因となる高発現量のタンパク質の存在が明らかとなり、注意が必要であることが示唆されている。

3-3. メタボロミクス解析による血中内在性代謝物に関する検討

内在性代謝物は親水性の高いもの(糖リン酸や核酸等)から低いもの(リン脂質やトリアシルグリセロール等)まで、その分子論的な性質は多様である。このため、現在の技術では一つの方法で全ての種類の内在性代謝物を

測定することは不可能であり、複数の方法を組み合わせる必要がある。本研究では、大きく親水性代謝物と疎水性代謝物に分類し、前者はLC/MSとガスクロマトグラフ質量分析計にて、後者はLC/MSにて、カラム等の条件を変えて測定を行った。

まず絶食後のヒト血液試料に関し、内在性代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）および保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。測定可能であった代謝物数は、約550種である。血漿と血清間の比較では、親水性および疎水性代謝物共に、血液凝固に係る代謝物群など的一部分子種で、そのレベルが血漿・血清間で大きく異なることが明らかになった。2倍以上のレベル差を示した代謝物数は、若年男性、老年男性、若年女性、老年女性のいずれの群でも30種程度で、親水性代謝物が多かった。

男女差に関しては、有意なレベル差のある代謝物が、老年よりも若年で多く認められた。若年ではアミノ酸類が男性において、脂肪酸類が女性において有意に高いレベルを示した。また年齢にかかわらず、女性でスフィンゴミエリンレベルが有意に高い傾向を示した。男女間で2倍以上の差があった代謝物は、若年血漿、老年血漿、若年血清、老年血清で、それぞれ数種であった。

年齢（30歳程度と60歳程度）に関しては、レベルに有意な差のある代謝物は、男性よりも女性で多く認められた。女性では、黄体ホルモン代謝物等が若年において、胆汁酸代謝物やトリアシルグリセロール等が老年において有意に高いレベルを示した。若年・老年間で2倍以上の差があった代謝物は、男性血漿、男性血清、女性血漿、女性血清で、それぞれ10種程度であった。

さらに若年男性の血漿と血清に関し、凍結融解回数（2回と10回）による相違について検討を行った。凍結融解を繰り返した場合、親水性代謝物では、血清と比べ血漿で大きなレベルの変化が認められる分子種が多かった。一方、疎水性代謝物では、血漿・血清ともに、ほぼすべてのリン脂質分子種等で、20-30%程度のレベル減少が認められた。

以上の結果、健常人というバックグラウンドレベルで、各条件につき2倍以上の差が認められた代謝物は、バイオマーカーの探索・診断の際に十分注意すべきであると考えられた。また、臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、親水性代謝物の場合は凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましく、疎水性代謝物の場合は、血液凝固過程の影響を受けにくい血漿が望ましいこと、

2) 検出率が高く、試料背景間および各試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景の差異に対して、病気や薬剤反応性などによる差異が相対的に大きい代謝物（程度については、今後、検討予定）を選択すべきであること、が示唆された。

4. 研究の将来展望

今後は、健常ラットと健常人におけるタンパク質および内在性代謝物レベルの相違（外挿性）について検討を行う予定である。さらに、特定の副作用に関し、ラットのモデル系と副作用患者の試料を比較して、副作用マーカーの外挿性を検討する。

これらの知見を基に、バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿に関する血液・尿中バイオマーカーの評価要件案を作成する予定である。

5. おわりに

総合科学技術会議は平成25年4月17日の会議で、「個別化医療の世界的研究開発競争における日本の出遅れ、および創薬力の低下」を指摘している。本邦におけるバイオマーカー探索・同定とその医薬品開発への応用の早期実現は、まさに待ったなしの状況である。本研究の遂行によるガイダンス案の作成は、バイオマーカー評価の一部ではあるが、国としての基準を示すものとなり、本邦におけるバイオマーカー開発とその利用を通じた医薬品開発の活性化につながると期待される。今後とも医薬品の品質、有効性および安全性を確保するための研究機関として、医薬品の開発と適正使用の推進に向けた適切な規制のための研究という社会的な役割を十分に果たしていきたい。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究」（H24-医薬-指定-028）によるものである。

引用文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95 (2001).
- 2) Phillips, K.A., Van Bebber, S. and Issa, A.M.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 463-9 (2006).
- 3) Dong, D., Sung, C., Finkelstein, E.A.: *Neurology.* 79, 1259-67 (2012).
- 4) Feng, Z., Prentice, R. and Srivastava, S.: *Pharma-*

- cogenomics*. 5, 709-19 (2004).
- 5) Kell, D.B.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 329-33 (2007).
 - 6) ゲノム薬理学における用語集. 薬食審査発第0109013号, 薬食安発第0109002号, 平成20年1月9日
 - 7) Pharmacogenomic Data Submission. FDA, March 2005.
 - 8) Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and Assays in the context of drug development (Draft). EMA/CHMP/641298/2008, 24 June 2010.
 - 9) Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection (Draft). EMA/446337/2011, 9 June 2011.
 - 10) Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. FDA, January 2013.
 - 11) Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009, 12 December 2011.
 - 12) Concept paper on key aspects for the use of pharmacogenomic methodologies in the pharmacovigilance evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/917570/2011, 15 December 2011.
 - 13) Reflection paper on pharmacogenomic samples, testing and data handling. EMEA/CHMP/PGx-WP/201914/2006, 15 November 2007.
 - 14) Pharmacogenomic Data Submission-Companion Guidance (Draft). FDA, August 2007.
 - 15) 医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発における バイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載 要領, 資料の構成及び様式. 薬食審査発0120第1号, 薬食安発0120第1号, 平成23年1月20日.
 - 16) Use of histology in biomarker qualification studies (Draft). FDA, December 2011.
 - 17) Fuchs, T.C. and Hewitt, P.: *AAPS J.* 13, 615-31 (2011).
 - 18) Matsubara, J., Ono, M., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Honda, K., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S. and Yamada, T.: *J. Clin. Oncol.* 27, 2261-8 (2009).
 - 19) Bell, L.N., Vuppalanchi, R., Watkins, P.B., Bonkovsky, H.L., Serrano, J., Fontana, R.J., Wang, M., Rochon, J., Chalasani, N.; US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Research Group: *Aliment Pharmacol. Ther.* 35, 600-12 (2012).
 - 20) Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., Ikeda, S., Hirayama, A., Yamamoto, T., Yoshida, H., Otsuka, M., Tsuji, S., Yatomi, Y., Sakuragawa, T., Watanabe, H., Nihei, K., Saito, T., Kawata, S., Suzuki, H., Tomita, M. and Suematsu, M.: *J Hepatol.* 55, 896-905 (2011).
 - 21) Sun, J., Shannon, M., Ando, Y., Schnackenberg, L.K., Khan, N.A., Portilla, D., Beger, R.D.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-4, 107-113 (2012).
 - 22) Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.L. and Schanstra, J.P.: *Mol. Cell. Proteomics.* 7, 1850-62 (2008).

ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦と その原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析

中村里香, 酒井信夫, 藪島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子[#]

Comprehensive analyses of hydrolyzed wheat protein using shotgun proteomics

Rika Nakamura, Shinobu Sakai, Yuji Haishima, Chie Fukui, Takayoshi Suzuki, Ryosuke Nakamura, Akiko Hachisuka, Reiko Adachi, Reiko Teshima[#]

Hydrolyzed wheat protein (HWP; hydrolyzed gluten) is used in various types of products worldwide. Several cases of wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis following exposure to HWP (Glupearl 19S) in cosmetics have been reported. Glupearl 19S was produced from the gluten after partial hydrolysis with hydrogen chloride, and its allergenicity is larger than that of gluten (Adachi R, *Allergy* 2012;67:1392-9.). It is considered that provocation of allergic manifestations is caused by deamidated gluten in food and/or non-food products. Moreover, an increasing number of studies have shown that HWP can induce IgE-mediated hypersensitivity by skin contact and/or food ingestion. However, the essential molecular properties and profiles of HWP are still unknown. In this study, bioinformatic and multivariate analyses using shotgun proteomics have revealed that 27 proteins significantly decreased in Glupearl 19S compared with intact gluten as shown by the ratio of ion signal intensity of tryptic peptides. In contrast, a single protein significantly increased in HWP compared with intact gluten as shown by the ratio of ion signal intensity of tryptic peptides. Furthermore, we have identified six Glupearl 19S-specific peptides using shotgun proteomics, database searches on Mascot Sequence Query, and *de novo* sequencing. The six peptides were identified as the specific markers of Glupearl 19S.

Keywords: hydrolyzed wheat protein, shotgun proteomics, mass spectrometry, deamidation

緒言

近年、加水分解小麦 (hydrolyzed wheat protein, HWP) を含有する洗顔用石鹸の長期使用において、小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (Wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis; WDEIA) を発症した事例が数多く報告され、本邦にて大きな社会問題となっている¹⁻²⁾。このアレルギー病態の特徴は、当該石鹸の使用前には小麦アレルギーの既往症の無かった人が、石鹸中に含まれるHWP (グルパール19S[®], Glupearl 19S) によって経皮・経粘膜的に感作され、その後の小麦の摂食

によりWDEIAを発症することにある。

小麦タンパク質の主成分であるグルテンは、可溶性小麦タンパク質であるグロブリンを水で洗い流した後の残渣に含まれるエタノール可溶性画分に分画される。これを加水分解すると、タンパク質が部分的に切断されて可溶性が増大するため、起泡性や手触りを良くする目的で、シャンプー等の化粧品・医薬部外品にHWPが使用されている。グルパール19Sは、小麦グルテンを部分的に酸加水分解して製造された化粧品原料で、比較的分子量の大きなペプチド断片が残存している¹⁾。一般的にタンパク質を加水分解、低分子化することによりその抗原性は減弱すると考えられているが、HWPにおいては、酸加水分解によってグルテンよりも抗原性が増強することが明らかになっている¹⁻³⁾。酸加水分解によりグルテンの抗原性が増強する理由としては、可溶性の増大により生体内に侵入しやすくなっていること、更に酸によりタンパク質の一次構造に物理化学的変化が生じ、新たな

[#] To whom correspondence should be addressed:

Reiko Teshima; Division of Novel Foods and Immunology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1349; Fax: +81-3-3700-7438; E-mail: rteshima@nihs.go.jp

エピトープが生じている可能性等が考えられている。グルテンタンパク質の物理化学的変化としては、セリアック病でグルタミン残基の脱アミド化が抗原性に寄与していることが報告されている⁴⁾。我々は、グルタミン酸残基及びアスパラギン酸残基を特異的に切断する酵素であるV8プロテアーゼを用いて、グルパール19Sのタンパク質に含まれるグルタミン残基及びアスパラギン残基が脱アミド化修飾されていることを明らかにしている⁵⁾。ペプチドレベルでの研究は未だ行われていない。また我々は、グルテンを原料として酸加水分解を行ったHWPは、30分から1時間程度の部分的な分解によって抗原性が顕著に増強し、更に長時間分解を進めることにより、分子量の減少と共に抗原性が減弱することを明らかにしている⁶⁾。これらの知見から、ある特定の加水分解条件によって生成されたHWPのみが抗原性を有することが示唆されているが、分子量以外に抗原性の指標となるファクターは明らかにされていない。

そこで本研究は、強い抗原性を有するグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索を目的とし、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いた網羅的解析を行った。同時に、グルテンとHWPのペプチドプロファイリングを比較するショットガンプロテオミクスにより、酸加水分解によるHWPの一次構造の物理化学的変化を推察した。

実験方法

1. 試料

グルパール19S[®]は、株式会社片山化学工業研究所より入手した。グルテン(Sigma社)及びグルパール19S粉末に乾燥重量で100 mg/mLとなるよう1M Tris [tris (hydroxymethyl) aminomethane, pH 11.4]を加え、終夜室温で静置しストック懸濁液を調製した。また、抗原性が減弱したHWPとして、酸加水分解を24時間行った低分子化HWP(HWP24h)を調製した。酸加水分解は、0.1N塩酸中にグルテンストック懸濁液を終濃度1 mg/mLとなるよう加え、100°Cのヒートブロック上で所定の時間(0-24h)加熱して行った。その後、経時的に0.1M水酸化ナトリウム水溶液で中和して酸加水分解反応を停止した。グルテン、グルパール19S、及び経時的な酸加水分解により調製した8種HWPのSDS電気泳動パターンをFig. 1に示す。

LC-MSサンプルの調製は、以下に示す方法で行った。グルテン及びグルパール19Sのストック懸濁液に細胞溶解液[7M urea, 2M thiourea, 30 mM Tris, 4% (w/w) CHAPS: pH 8.5]を加えてタンパク質を溶解させた後、2-D Quant Kit (GE Healthcare社)を用いてタンパク質量を定量し、その20 µgをトリプシン消化に供し

た。Dithiothreitolで還元、IodoacetamideでSH基のカルボキシメチル化を行った後、Trypsin Gold, Protease MAX (Promega社)を加えて37°Cで終夜インキュベートした。10% Trifluoroacetic acid (TFA)を終濃度0.5%となるよう加えて酵素反応を停止し、得られたペプチドをバリアン社製OMIX Tip (C18, 100 µL)にて脱塩し、0.1% TFA含有2%アセトニトリルに再溶解した。

2. 装置

・質量分析計

Thermo Scientific社製リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計LTQ Orbitrap XL
測定前にTyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。

・Nano-LC

HTC-PALオートサンプラー (CTC Analytics)を装備したADVANCE nano UPLC (AMR)

・トラップカートリッジ

CERI社製L-Trap (0.3×5 mm, L-C18, 5 µm, 12 nm)

・分析用逆相カラム

CERI社製L-column Micro (L-C18, 0.1×150 mm, 3 µm, 12 nm)

LC-MS/MS条件

イオン源にはCaptive Ion Sprayシステムを使用し、試料のイオン化はESI positive ion mode (スプレー電圧1.6 kV)により行った。MSスペクトルはFT analyser (分解能30,000, 測定質量範囲m/z 300-1,400, Lock mass = フタル酸ジエチルヘキシル及びシロキサン, Profile mode)により取得し、XCalibur data dependent modeにより、スキャンにおけるイオン強度の高い3種のピークを順次選択してイオントラップによりMS/MSスペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間は150分間とし、価数判別機能を利用して1価イオンのMS/MSスペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LCの移動相には、A溶媒 (0.1%ギ酸含有2%アセトニトリル)とB溶媒 (100%アセトニトリル)を使用した。流速は300 nL/minとし、サンプル注入 (1.0 µg)はオートサンプラーを使用して行った。1分析あたりの溶出時間は150分とし、サンプル注入後、0-40% B/125 min → 40-55% B/130 min → 55-100% B/135 min → 100% B/145 min → 0% B/160 minのグラジエントプログラムで溶出した。

3. 試験操作

3.1. ショットガンプロテオミクスによる網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテン及びグルパール19SのMSデータは各2回ずつ取得し、全データを*i*-RUBYソフトウェア (メディカルプロテオスコープ) にアップロードし、Mascot/UniProt/NCBI nr (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、MS/MSスペクトル相同性に基づくピークマッチングと保持時間補正を行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

3.2. グルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の検討

ペプチド結合の開裂解析には、Proteome Discovererソフトウェア上でのMascot検索条件の消化酵素設定を“None”とし、同定されたペプチド配列のうち末端がトリプシン切断部位でない酸加水分解によるペプチド結合の切断の割合を算出した。

脱アミド化の分析には、Mascot検索条件のvariable modification設定に“deamidation (NQ)”を追加し、脱アミド化修飾されたペプチドを同定した。

3.3. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

グルテン、グルパール19S及びHWP24hのMSデータをプロテオーム定量解析ソフトウェアProgenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics社) にアップロードし、Swiss-Prot (Taxonomy; Green plants) データベースによるタンパク質同定、イメージ解析によるピークマッチングと保持時間補正を行い、3サンプル間各ペプチドピークのシグナル強度を比較した。タンパク質の同定はProteome Discovererソフトウェア (Thermo Scientific社) を使用したMascot検索 (NCBI nrデータベース, Taxonomy; Green plants) を並行して行った。

3.4. *de novo* sequencingによるペプチド配列の推定

de novo sequencingにはPEAKS Studio v6.0 (インフォコム社) を使用した。消化酵素設定を“None”としてアミノ酸配列の推定を行った。TLC (Total Local Confidence) が60%以上のスコア値を示したアミノ酸配列を信頼度の高いデータと判断し、その配列をNCBI protein-protein BLAST (blastp) 検索 (Taxonomy; Green plants) に供した。

結果

1. SDS電気泳動による分子量の比較

グルテン、グルパール19S、及び経時的な酸加水分解

により調製した8種HWPのSDS電気泳動パターンをFig. 1に示す。グルテンでは構成タンパク質が明確なバンド状に現れるのに対し (lane G), グルパール19Sでは明確なバンドは認められず100 kDa以下にラダー状のパターンが認められた (lane 19S)。経時的な酸加水分解により調製したHWPでは、0.5h加水分解物がグルパール19Sと同様に高分子領域にラダー状のバンドを呈していた。加水分解の時間経過と共にラダーが低分子領域にシフトし、24h経過後には15 kDa以上の明瞭なバンドが完全に消失した。

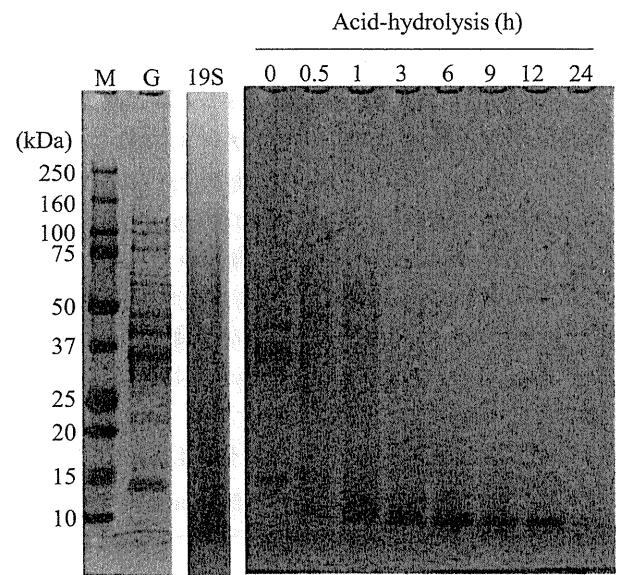


Fig. 1 SDS-PAGE pattern of gluten, Glupearl 19S and HWPs

Gluten, Glupearl 19S, and HWPs (2.5 µg protein/lane) were separated in a 10-20% acrylamide gel (D.R.C. Co., Ltd.) and the gel was stained with coomassie brilliant blue. Lane M, molecular weight marker; lane 19S, Glupearl 19S; lane G, native gluten

2. ショットガンプロテオミクスによるグルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルパール19Sとグルテンとの比較において、酸加水分解の過程でどのような構成タンパク質に変化が生じているかを明らかにするため、ショットガンプロテオーム解析を行った。グルテン及びグルパール19Sのトリプシン消化物より取得したMS/MSデータを、*i*-RUBYソフトウェアにてGreen plantsのタンパク質データベース内で検索したところ、発現比較の対象となるタンパク質の総数は5,074であった。そのうち変動比較の候補タンパク質をイネ科コムギ属 (*Triticum*) としたところ、954のタンパク質を絞り込むに至った。これら候補タンパク質のうち、グルテンとグルパール19Sとの間の発現比が5倍以上または1/5以下であるタンパク質は268 (28.1%)

であった。更に対象をコムギ (*Triticum aestivum*, common wheat) とし、候補タンパク質中の重複を除いた28タンパク質の発現比をTable 1に示した。

グルテンと比較して、グルパール19Sにおけるシグナル比が1/5以下に減少しているタンパク質数は27であり、 γ -グリアジン、LMW-グルテニン、HMW-グルテニン等の主要な小麦アレルゲンタンパク質が含まれていた。一方、グルテンと比較して、グルパール19Sにおけるシグナル比が5倍以上に増加したタンパク質数はわずか1であり、そのタンパク質はHistone H4であった。

3. グルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の分析

前項に示したショットガンプロテオーム解析では、グルテンにおいて検出されたトリプシン消化ペプチドの多くがグルパール19Sにおいては検出されなかった。この原因として、HWPはグルテンの酸加水分解過程において、ペプチド結合の非酵素的な開裂やグルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化が生じている可能性が考えられた。そこでペプチド結合の開裂とグルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化を分析するため、ト

リプシン消化ペプチドのMS/MS検索条件の消化酵素設定を“None”とし、NCBInrおよびSwiss-Protデータベース (Taxonomy; Green plants) 内でのデータベース検索を行った。その結果、グルパール19Sでは全911ペプチドがヒットし、そのうちペプチドの末端がトリプシン特異的残基 (Arginine, R; Lysine, K) 以外のアミノ酸残基、つまり非酵素的に切断されていたペプチドの総数は353 (38.7%) であった。一方、HWP 24hでは全496ペプチドがヒットし、そのうち299ペプチド (60.3%) の末端が非酵素的に切断されていることが明らかになった (データ示さず)。

また、グルタミン残基、アスパラギン残基の脱アミド化修飾を評価する目的で、データベース検索条件のvariable modification設定に“deamidation (NQ)”を追加し、グルタミンとアスパラギンの脱アミド化の解析を行った。その結果、Table 1に挙げられた小麦の主要アレルゲン (High molecular weight glutenin subunit, Gamma-gliadin, LMW-m glutenin subunit, alpha gliadin, Alpha/beta-gliadin) において、数種の脱アミド化修飾のバリエーションをもつ同一のペプチド配列が同定された (Table 2)。脱アミド化修飾部位をもたないペプチド

Table 1 Differences in the protein expression between gluten and Glupearl 19S

Hit Title	Description	Glupearl 19S/Gluten Ratio	Peptide Count	Max Protein Score	
1	gi 32400748	seed storage protein [<i>Triticum aestivum</i>]	0.002	3	104.74
2	gi 147883548	alpha-gliadin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.008	3	91.80
3	GDA9_WHEAT	Alpha/beta-gliadin MM1 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=1 SV=1	0.010	2	94.08
4	NLT2G_WHEAT	Non-specific lipid-transfer protein 2G OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=1 SV=1	0.017	2	29.09
5	GDA7_WHEAT	Alpha/beta-gliadin clone PW8142 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1	0.024	5	130.97
6	gi 94315065	1Bx high molecular weight glutenin subunit [<i>Triticum aestivum</i>]	0.040	5	154.19
7	gi 32400762	AmiB [<i>Triticum aestivum</i>]	0.050	5	138.05
8	GDA2_WHEAT	Alpha/beta-gliadin A-II OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=1	0.053	3	103.12
9	GDA0_WHEAT	Alpha/beta-gliadin OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=2	0.077	2	93.49
10	GDB0_WHEAT	Gamma-gliadin (Fragment) OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=2 SV=1	0.087	2	61.19
11	gi 209971843	gamma-gliadin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.096	11	316.23
12	gi 110341796	Y-type HMW glutenin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.098	8	136.29
13	gi 162415987	high molecular weight glutenin subunit [<i>Triticum aestivum</i>]	0.107	7	180.66
14	gi 21749	unnamed protein product [<i>Triticum aestivum</i>]	0.107	7	180.66
15	gi 4007846	beta purothionin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.114	2	71.28
16	gi 170743	HMW glutenin subunit Ax2* [<i>Triticum aestivum</i>]	0.114	11	179.43
17	gi 133741924	gamma gliadin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.136	6	348.99
18	gi 21743	high molecular weight glutenin subunit 1Ax1 [<i>Triticum aestivum</i>]	0.141	9	129.82
19	gi 32400760	unknown [<i>Triticum aestivum</i>]	0.141	2	66.43
20	gi 663263	15kDa grain softness protein [<i>Triticum aestivum</i>]	0.157	3	139.48
21	gi 238800252	low molecular weight glutenin [<i>Triticum aestivum</i>]	0.159	8	411.25
22	gi 164470672	LMW-m glutenin subunit 0877L13-M [<i>Triticum aestivum</i>]	0.162	7	390.57
23	GDBB_WHEAT	Gamma-gliadin B OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=1	0.162	5	254.97
24	gi 169788569	putative puroindoline-like protein [<i>Triticum aestivum</i>]	0.180	2	58.79
25	gi 221855615	gamma-gliadin [<i>Triticum aestivum</i> subsp. macha]	0.182	3	110.61
26	gi 148508784	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Triticum aestivum</i>]	0.195	3	129.82
27	GLT0_WHEAT	Glutenin, high molecular weight subunit DY10 OS= <i>Triticum aestivum</i> GN=GLU-D1-2B PE=3 SV=1	0.198	18	391.19
28	H41_WHEAT	Histone H4 variant TH011 OS= <i>Triticum aestivum</i> PE=3 SV=2	5.700	5	100.12

はその90%以上がグルテンにおいて検出されたのに対し、脱アミド化修飾数が1つ以上のペプチドは主としてグルパール19Sにおいて検出された。

4. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

次に、グルパール19Sのように強い抗原性を有するHWPに特徴的なペプチドを同定することを目的として、グルテン、グルパール19S、及び抗原性を示さないHWP24hから得られたペプチドのMSデータを多変量解析により比較し、グルパール19Sにのみ特徴的に発現するペプチドの探索を行った。

Progenesis LC-MSソフトウェアを用いて3サンプル間のMS¹のピーク強度を比較した。観測された32,749本の総ピークより、グルテン及びHWP24hのピーク強度がグルパール19Sのピーク強度の1%未満である179本のピークを抽出し、更にタンパク質消化物由来すると考えられる10本のピークをグルパール19Sに特徴的なペプチドとして絞り込んだ (Table 3)。

Progenesis LC-MS上でMascot検索 (データベース: Swiss-Prot, Taxonomy: Green plants) を行ったところ、

2本のペプチドピークをPuroindoline A (#6) 及び α / β -gliadin clone PW1215 (#8) と同定した (Table 4)。

また、Proteome Discovererソフトウェアを用いたMascot検索 (データベース: NCBIInr, Taxonomy: Green plants) を行ったところ、更に2本のペプチドピークをHMW glutenin subunit (#1及び#5) と同定するに至った。これら4本のペプチド配列には、脱アミド化修飾が認められた。

残り6本の候補ピークについては、それらのMS/MSデータをPEAKS Studioソフトウェアにアップロードして*de novo* sequencingを試みた。TLCスコア60%以上を信頼度の高いデータと判断し、2本のペプチド配列 (#3及び#9) を予測するに至った (Fig. 2)。この予測配列をprotein-protein BLAST (blastp) 検索に供することにより、イネ科コムギ属 (*Triticum*) のタンパク質の部分配列であるNADP-dependent malic enzyme 1 (#3) 及びWIR1 (#9) がヒットした (Table 4)。残りの4本のピーク (#2, #4, #7, 及び#10) はMS/MSの取得情報が少なく、TLCスコア60%以上の信頼度において、それらのペプチド配列を予測することができなかった。

Table 2 List of representative deamidated peptides in the major wheat allergens

Peptide ID	Peptide sequence	Compositional ratio (%)		Count	Charge	m/z	Peak retention time
		Glupearl 19S	Gluten				
High molecular weight glutenin subunit							
2426	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R	3	97	33	3	1056.208	104.5
4225	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 1 Deamidated (NQ)	91	9	33	3	1056.537	106.9
1055	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 2 Deamidated (NQ)	95	5	33	3	1056.863	107.5
50	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 3 Deamidated (NQ)	99	1	33	3	1057.192	111.3
3535	K.AGSFYPSSETTPSQQLQQMIFWGIPALLR.R + 4 Deamidated (NQ)	99	1	33	3	1057.522	114.3
Gamma-gliadin							
3671	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S	2	98	14	3	952.8804	70.6
4406	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S + 1 Deamidated (NQ)	87	13	14	3	953.2072	71.3
1397	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S + 2 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.5348	72.6
36	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	953.8628	73.8
6220	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.1912	74.4
194	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S + 5 Deamidated (NQ)	100	0	14	3	954.5197	75.3
3200	R.RPLFQLVQGQGHQPQPAQLEVIR.S + 6 Deamidated (NQ)	83	17	14	3	954.8472	76.8
LMW-m glutenin subunit 0877L13-M							
1665	K.VFLQQQCSVPVAMPQSLAR.S	9	91	81	3	687.3517	58.0
273	K.VFLQQQCSVPVAMPQSLAR.S + 1 Deamidated (NQ)	98	2	81	3	687.6814	63.2
1456	K.VFLQQQCSVPVAMPQSLAR.S + 3 Deamidated (NQ)	100	0	81	3	688.3355	62.2
345	K.VFLQQQCSVPVAMPQSLAR.S + 4 Deamidated (NQ)	100	0	81	3	688.6638	63.6
Alpha gliadin							
3707	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L	0	100	4	4	1045.279	75.1
8911	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
5960	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7138	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 4 Deamidated (NQ)	87	13	4	4	1046.260	82.9
2715	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.L + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
3776	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q	0	100	4	4	1045.279	75.1
13628	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q + 2 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1045.765	73.7
10675	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q + 3 Deamidated (NQ)	95	5	4	4	1046.014	80.3
7256	R.DVIVLQQHNIHHESSQVLQSSYQVLQQLCCQQLR.Q + 5 Deamidated (NQ)	37	63	4	4	1046.505	84.1
Alpha/beta-gliadin							
2402	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.-	0	100	3	3	1119.559	100.9
3825	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 1 Deamidated (NQ)	90	10	3	3	1119.884	102.1
1257	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 2 Deamidated (NQ)	97	3	3	3	1120.213	103.4
6282	R.NLALQTLPAMCNVYIPPYCTIAPFGIFGTN.- + 3 Deamidated (NQ)	99	1	3	3	1120.543	104.6

Table 3 The specific peptides in Glupearl 19S

peptide No.	m/z [Da]	charge	Retention time [min]	Normalized abundance		
				Glupearl 19S	HWP24h	Gluten
1	652.821	2	32.59	50890	297	191
2	652.821	2	34.24	45905	220	285
3	500.759	2	56.88	37989	309	9
4	324.121	2	50.77	32961	97	275
5	486.297	2	45.97	32003	134	176
6	763.804	2	40.89	27374	194	120
7	566.723	2	32.95	8217	30	17
8	513.800	2	53.25	5804	0	2
9	518.250	2	53.16	5119	0	50
10	446.245	2	88.20	2964	0	0

Table 4 Sequences of the specific peptides in Glupearl 19S identified by bioinformatics

peptide No.	method	Sequence	Ion Score	ΔM [ppm]	Accession	Description
1	MS/MS ion search	Q *YE Q QP V VPSK	32	-1.70	gi: 162415987	high molecular weight glutenin subunit [Triticum aestivum]
2	-	not identified	-	-	-	-
3	de novo sequencing	TMYKP V VY	65	-	ABY25986.1	NADP-dependent malic enzyme 1 [Triticum aestivum] 638 MYTPV 642 192 PVVY 195
4	-	not identified	-	-	-	-
5	MS/MS ion search	LVA V S Q V V R	33	-1.16	gi: 14329763	high molecular weight glutenin subunit y [Triticum aestivum]
6	MS/MS ion search	G G C Q ELLG E CCSR	47	-1.75	P33432	Puroindoline-A OS=Triticum aestivum GN=PINA PE=1 SV=2 - [PUIA_WHEAT]
7	-	not identified	-	-	-	-
8	MS/MS ion search	NLAL Q TLPR	41	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
		NLAL Q TLPR	25	-1.53	P04726	Alpha/beta-gliadin clone PW1215 OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1 - [GDA6_WHEAT]
9	de novo sequencing	Y R CY A FR	70	-	CAA61018.1	WIR1 [Triticum aestivum] 70 YRCY 73 126 RCYAFR 131
10	-	not identified	-	-	-	-

* Modified residues are represented in Bold (Q, N: deamidation, C: carbamidomethylation).

考察

1. SDS電気泳動による分子量の比較

グルテンを酸加水分解して製造したグルパール19Sは、SDS電気泳動パターンがラダー状であった (Fig. 1)。これは、酸加水分解によりグルテン構成タンパク質のペプチド結合がランダムに切断されていることに加え、本来の小麦構成タンパク質よりも大きい分子量の重合体を形成していることに起因するものと考えられた。

グルテンを酸加水分解することにより調製したHWPは経時的に低分子領域にラダーがシフトし、加水分解時

間が長くなるに従いランダムなペプチド結合の切断が進んでいることが示唆された。また、HWP24hにおいては15 kDa以上の明瞭なバンドが完全に消失していたことから、分子量が抗原性を予測するファクターであるとの既報⁶⁻⁸⁾の結果を裏付ける結果となった。

2. ショットガンプロテオミクスによるグルパール19Sとグルテンの網羅的な構成タンパク質変動比較

グルテンの酸加水分解では、ランダムなペプチド結合の開裂と共に、タンパク質のグルタミン残基またはアス

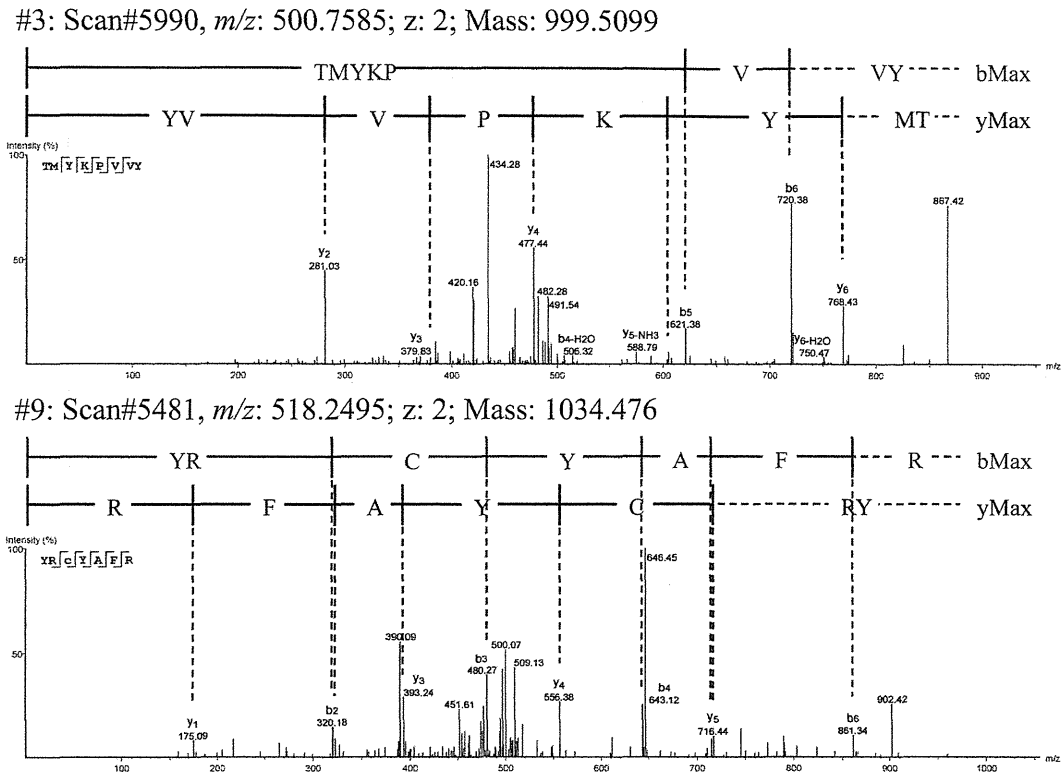


Fig. 2 Collision induced dissociation spectra of two *de novo* sequenced peptides from Glupearl 19S

The results of *de novo* sequencing of the peptides #3 and #9 using PEAKS software are shown.

The upper panel (#3) showing the fragmentation of TMYKPVVamide and the lower panel (#9) showing the fragmentation of YRCYAFamide. The b- and y-type fragment ions and the theoretical fragment ion masses found in the spectra are indicated in the spectra.

パラギン残基に脱アミド化を生じるものと考えられる。そのためグルパール19Sにおけるショットガンプロテオミクスでは、グルテンのトリプシン切断によって生じるペプチドピークが消失していることが予想された。グルパール19Sとグルテンの構成タンパク質の差異を比較解析した結果、実際に、データベースに記載されているペプチドのシグナル比はグルテンよりもグルパール19Sで減少し (Table 1), トリプシン消化によって生じるペプチドが非酵素的に切断され、脱アミド化修飾している可能性が考えられた。グルパール19Sでシグナルが減弱していたタンパク質として同定された γ -グリアジン, LMW-グルテニン, HMW-グルテニンは主要な小麦アレルゲンとして知られている。本研究の結果は、グルテンの酸加水分解が主要な小麦アレルゲンタンパク質の一次構造に影響を及ぼしていることを示唆しており、HWPアレルギーが従来的小麦アレルギーとは異なるアレルゲンが原因であると主張した既報の結果¹⁻²⁾を強く支持している。一方、グルテンと比較して5倍以上のシグナル比が得られたHistone H4に関しては、当該タンパク質が酸性条件下において抽出されやすく、グルパール19Sの製造過程で酸性溶液中に溶出してきた、または酸加水分

解によるペプチド結合の開裂に伴いトリプシンがアクセスしやすくなることに起因し、ペプチドピークが特異的に生じたものと考えられた。

3. データベース検索によるグルパール19Sのペプチド結合開裂及び脱アミド化の分析

酸加水分解によるグルテンの物理化学的変化について、MS/MSデータからペプチド結合の切断とグルタミン残基及びアスパラギン残基の脱アミド化を検討したところ、抗原性の強いグルパール19Sではランダムにペプチド結合が切断されたペプチドや、脱アミド化修飾のバリエーションをもったペプチドが多く検出された (Table 2)。更に、HWP24hにおいては、ペプチド結合が非酵素的に切断されているものが多く検出されていた。グルテンのトリプシン消化では、グルタミン残基の多い繰り返し配列部分は切断されず、ペプチドが得られなかったが、HWP24hでは繰り返し配列部分が非酵素的に切断されていたため、部分的なペプチド配列を検出することができた (データ示さず)。

これらの結果より、グルパール19Sにおいてはグルテン構成タンパク質のランダムなペプチド結合の切断と共

に、アミノ酸残基の脱アミド化修飾が生じ、これらタンパク質の物理化学的な構造変化は酸加水分解が進行することにより更に起こりやすくなることが示唆された。

4. 多変量解析によるグルパール19Sに特徴的なペプチドの探索

強い抗原性を有するグルパール19Sに特徴的に発現するペプチドを探索することを目的として、(1)グルテンを加水分解することにより新たに生じたペプチドであり、かつ(2)長時間の酸加水分解によって抗原性が消失したHWP24hにおいては発現していないペプチドを対象として多変量解析を行った。Table 3に示した10本のペプチドピークは、いずれもグルパール19Sにのみ十分なピーク強度が得られた。これら候補ペプチドピークのMS/MS相同性検索の結果、HMW-グルテニンや α/β -グリアジンといった小麦アレルゲンに由来する脱アミド化修飾されたペプチドが同定された (Table 4)。一方HWP24hでは、加水分解の進行に伴い脱アミド化修飾及びペプチド結合の開裂が進んだために、グルパール19Sにのみ特徴的に発現するペプチド由来のピークが消失したと考えられた。de novo sequencingはデータベースに因らずMS/MS取得データのみにより配列を予測するため、コムギ (*T. aestivum*) のようにプロテインデータベースが完全に整備されていないものや、グルパール19Sのように酸加水分解によるペプチドへの非酵素的な修飾が考えられる場合には、有用な情報を与える。本研究では、MS/MS取得データから断片的なペプチド配列を予測し、その配列をデータベース検索することで、タンパク質を予測するボトムアッププロテオミクスが有用であった。他方、de novo sequencingを用いても配列が予測できなかった4本のペプチドに関しては、MS¹ピーク強度としては十分なものもあったことから、ペプチドの特性により得られたMS/MSシグナルが少なかったものと考えられた。

本研究において、グルパール19Sに特徴的なペプチドとして10本の候補ペプチドを抽出した。これらのペプチドが抗原性を示すHWPのマーカーとなることを確認するためには、in vivoによる皮膚感作性試験等との整合性を十分に検討した上で、加水分解条件(処理方法や時間)の異なるHWPを用いた確認試験を行う必要があると考えられた。

まとめ

グルテンのトリプシン消化ペプチド由来ピークの多くが、グルパール19Sでは減弱していた。グルパール19Sにおいては、グルテンのトリプシン消化ペプチドがランダムに切断されたものや、グルタミン残基の一部が脱ア

ミド化修飾されたペプチドが多く検出された。

強い抗原性を有するHWPに特徴的なペプチドの候補として10本のペプチドピークを抽出し、そのうち4本の配列をデータベース検索にて、2本の配列をde novo sequencingにて同定した。

引用文献

- 1) Fukutomi Y, Itagaki Y, Taniguchi M, Saito A, Yasueda H, Nakazawa T, Hasegawa M, Nakamura H, Akiyama K: *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:531-533.e 1-3.
- 2) Chinuki Y, Morita E: *Allergol Int.* 2012;61:529-37.
- 3) Adachi R, Nakamura R, Sakai S, Fukutomi Y, Teshima R: *Allergy* 2012;67:1392-9.
- 4) Mothes T: *Adv Clin Chem.* 2007;44:35-63.
- 5) Nakamura R, Nakamura R, Sakai S, Adachi R, Hachisuka A, Urisu A, Fukutomi Y, Teshima R: *J. Allergy Clin. Immunol., in press*
- 6) Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Itagaki Y, Fukutomi Y, Teshima R: *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;160:259-64.
- 7) 手島玲子: *ファルマシア* 2013;49:116-20.
- 8) Chinuki Y, Takahashi H, Dekio I, Kaneko S, Tokuda R, Nagao M, Fujisawa T, Morita E: *Contact Dermatitis* 2012;68:86-93



ヒトES・iPS細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性をどう見るか？

中島啓行, 安田 智, 佐藤陽治

ヒト多能性幹細胞を加工して製造される再生医療製品（ヒト多能性幹細胞加工製品）は、従来の方法では治療困難な疾病・損傷に対するブレイクスルーとして期待を集めている。その開発においては想定されるリスク評価や品質・安全性確保に対する方策が求められる。特に造腫瘍性の評価が重要な課題であるが、ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験のガイドラインは今のところ存在しない。ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験は製造工程上の目的別に3つに分けられ、その目的に応じて各種造腫瘍性関連試験法を選択する必要がある。本項では、製品の品質・安全性評価における造腫瘍性関連試験の考え方とその適用について概説する。

はじめに

ヒト多能性幹細胞に分化誘導などの加工を施した**再生医療製品**は、従来の方法では治療が困難な疾病・損傷に対するブレイクスルーとして期待されており、国内外で研究開発が盛んに行われている。このような、一昔前には想定されていなかった全く新しい製品の開発においては、想定されるリスクの評価法や品質・安全性確保のための基盤技術の整備が必須である。ヒト由来の胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）といった多能性幹細胞は**造腫瘍性**をもっていることから、多能性幹細胞を用いて製造される製品においては造腫瘍性の評価と品質管理が重要な課題となっている。しかしながら、移植による治療目的で患者に投与するヒト由来の生細胞を対象にした造腫瘍性試験のガイドラインは、今のところ存在しない。本項では、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の実現において不可避である造腫瘍性評価の現状と課題について概説する。

ヒト多能性幹細胞の造腫瘍性

多能性幹細胞は無限の自己複製能とあらゆる種類の細胞へと分化できる分化多能性によって定義される。その能力は、免疫不全マウスに移植した場合にテラトーマ（奇形腫）と呼ばれる腫瘍を形成することによって確認されるが、これは同時に、ヒト多能性幹細胞を製造基材とする再生医療製品（ヒト多能性幹細胞加工製品）は、未分化なヒト多能性幹細胞

再生医療製品：再生医療・細胞治療に使用されることが目的とされている動物のうち、ヒトまたは動物の細胞に培養その他の加工を施したもの、細胞・組織加工製品とも呼ばれる。

造腫瘍性：動物に移植された細胞集団が増殖することにより、良性または悪性の腫瘍を形成する能力。

表1 多能性幹細胞に由来する再生医療製品の造腫瘍性に影響を及ぼす要因の例

多能性幹細胞に起因する要因	その他の要因
<ul style="list-style-type: none"> ・目的細胞への分化の難しさ ・原材料となる体細胞の種類* ・初期化の方法* ・初期化因子の残存* ・細胞増殖の条件（培地・添加物など） ・ゲノムの安定性およびインテグリティ 	<ul style="list-style-type: none"> ・投与部位 ・投与細胞数 ・目的細胞の種類（特定の液性因子の分泌など） ・製造工程における処理（分化誘導・純化など） ・患者の免疫状態 ・共時投与物（マトリゲルなど）の有無

* iPS細胞の場合のみ

の残留・混入により腫瘍を形成する可能性があることを示している。ヒトES細胞を用いた研究では、線維芽細胞と懸濁したわずか数百個のES細胞の投与によって免疫不全マウス（SCIDマウス）に腫瘍が形成されることが報告されている¹⁾。

現在、高効率の分化誘導法や残存する多能性幹細胞の除去法などが精力的に研究されているが、100%の純度で目的細胞を調製・製造することは非常に困難である。したがって、製品にどれくらい未分化な多能性幹細胞が残存しているのか、最終製品は投与部位で造腫瘍性をもつのか、といった点を適切な試験系を用いて評価することが、実用化に向けての必須事項である。

1. 造腫瘍性の2つのリスク

「造腫瘍性のリスク」は、安全性上の視点から大きく2つ、すなわち「腫瘍による物理的障害のリスク」と「悪性腫瘍形成のリスク」に分けられる。「腫瘍による物理的障害」とは、腫瘍形成により周辺組織が圧迫などを受けることによる障害で、関節再生・脊髄損傷再生などのケースで問題となる。この場合はたとえ良性であっても腫瘍自体がリスクファクターとなる。一方、「悪性腫瘍形成」は、腫瘍の悪性度がリスクファクターとなる。

実は、ヒトES/iPS細胞が免疫不全マウス内で増殖分化して形成される奇形腫は多くの場合、良性であり、正常2倍体のヒトES細胞を免疫不全マウスに移植して悪性腫瘍が発生したという報告はない。しかしながら、ヒト由来iPS細胞に関しては、免疫不全マウスに投与した場合に悪性腫瘍が形成されたという報告が存在する²⁾。再生医療製品の製造基材としてのヒト多能性幹細胞に内在する奇形腫悪性化にかかわる因子・機序の詳細は明らかではないが、iPS細胞樹立時の細胞初期化過程は、悪性形質転換の研究で従来用いられてきた発がんフォーカス形成試験（*in vitro*での遺伝子導入による悪性肉腫形成試験）との類似性が指摘され、共通の機序の存在が提唱されている³⁾。

2. 造腫瘍性に影響を及ぼす要因

ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品の中に残存する未分化細胞の造腫瘍性には、さまざまな要素、すなわち、目的細胞への分化の難しさのほか、ヒトiPS細胞の場合には、原材料となる体細胞の種類や初期化因子残存の有無²⁾など製造基材としての多能性幹細胞に付随する要因と、投与部位、投与細胞数、製造工程における処理、患者の免疫状態、マトリゲルなどの共時投与物の有無といった要因とが影響を及ぼす（表1）。したがって、最終製品

の造腫瘍性に影響する製造基材（多能性幹細胞）の品質特性プロファイルは目的とする最終製品ごとに異なり、不適格な製造基材をどのような評価法で事前に排除するか、その方策も最終製品ごとに明らかにする必要がある。

造腫瘍性試験国際ガイドライン

前述の通り、多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性評価は、再生医療の実現における重要な課題であるが、現在、再生医療製品を対象とした造腫瘍性試験ガイドラインは存在しない。細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関（WHO）の生物薬品標準化専門委員会第47次報告（1998）（Technical Report Series No. 878：TRS 878）にあるAnnex I「生物薬品製造用の*in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」^{4) 5)}である（以下、WHO TRS 878とする）。

WHO TRS 878にある造腫瘍性試験の目的は、セル・バンクの造腫瘍性の程度を品質特性指標として把握し、その変化を細胞特性上の異常発生の検知のために利用することにある。ただし、ここで注意しなければならないのは、この試験の適用対象は生物薬品（ワクチンやタンパク質製剤など）を製造する際に用いられる動物由来細胞株であり、ヒトに投与される再生医療製品およびその製造基材は対象としていない点である。WHO TRS 878の試験は、あくまで細胞株のセル・バンクという均一な細胞集団の造腫瘍性評価を対象にしているため、ごくわずかに混入する未分化・造腫瘍性細胞に起因する再生医療製品の造腫瘍性の評価を目的とした場合、そのまま転用することには感度などの面で無理がある。混入するごく少数の未分化・造腫瘍性細胞に起因する再生医療製品の造腫瘍性を評価するにはWHO TRS 878よりも感度を上げるなど、目的に応じた適切な評価系の開発が必要となる。

ヒト多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性試験は、目的別に次の3つが存在している（図）。

- ①製造基材となる細胞の品質管理のための造腫瘍性試験
- ②製造工程（中間製品）評価のための造腫瘍性試験
- ③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

①および②は品質試験、③は非臨床安全性試験という位置づけとなる。

細胞集団の造腫瘍性あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞の検出には、表2に示す*in vitro*/*in vivo* 試験法が知られており、これらを組み合わせることで、それぞれの目的に応じた評価が可能であると考えられる。次に、上記3種の造腫瘍性試験の特徴と方法について、WHO

WHO TRS 878にある造腫瘍試験の概要：「ヌードマウスなどの動物10匹に10⁷個の細胞を投与して16週間（1998年版では12週間）観察する。陽性対照としてはHeLa細胞などを用いる」というもの。

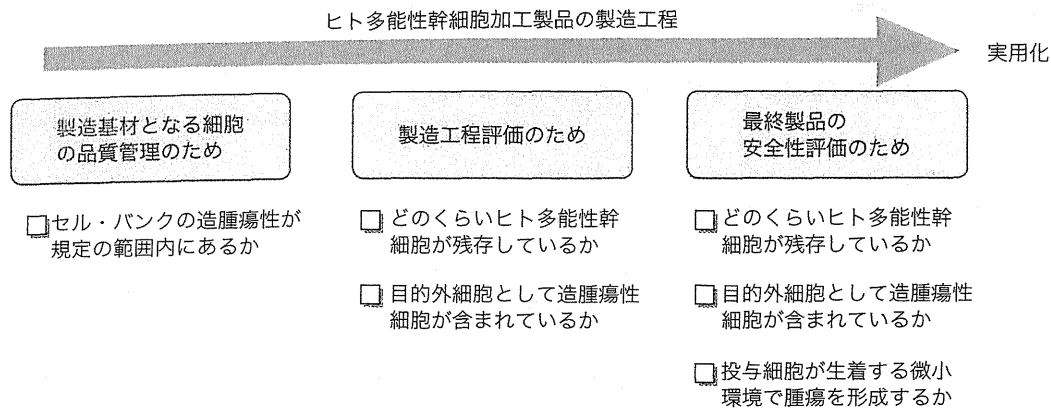


図 造腫瘍性試験が必要な3つの目的と各段階での懸念事項

TRS 878 との関連も含めて述べる。

1. 製造基材となる細胞の品質管理のための造腫瘍性試験

製造基材となる多能性幹細胞の品質管理のための造腫瘍性における懸念事項は、「セル・バンクの造腫瘍性が規定の範囲内にあるか」という点にある。多能性幹細胞加工製品の製造基材であるヒトES・iPS細胞バンクの造腫瘍性の程度に大幅な変化が生じた場合、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、細胞特性に何らかの異常が起こったということが示唆される。つまり、ヒトES・iPS細胞バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の1つとして評価すれば、ヒトES・iPS細胞バンクの異常を検出し、品質管理に活用することができる。その評価方法については、セル・バンクという均一な細胞集団を対象とするため、WHO TRS 878の方法を準用することが可能であると考えられる。

2. 製造工程（中間製品）評価のための造腫瘍性試験

ヒト多能性幹細胞加工製品の中間製品となる細胞集団には、「目的細胞」、「目的細胞の前駆細胞」、「残存多能性幹細胞」および「その他の目的外細胞」の4種類が含まれている可能性がある。したがって、

- ①どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか
- ②目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれているか

という2点が、製造工程（中間製品）評価における造腫瘍性の懸念事項となる。

1) どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか

①については、未分化多能性幹細胞特異的なマーカーを指標としたフローサイトメトリーや定量RT-PCRによる評価が可能である。この評価法の利点は感度が高い点にあり、われわれは初代培養ヒト体細胞中にヒトiPS細胞を添加して評価した結果、フローサイトメトリーでは0.1%、定量RT-PCRの場合には0.002%の存在比のヒトiPS細胞を検出すること

表2 主な造腫

in vivo 試験法	
試験法	
ノドマウスへの	
NOD-SCID マウス	移植
NOG/NSG マウス	移植
in vitro 試験法	
試験法	
細胞増殖特性解析	(所定培養期間を超過培養)
フローサイトメト	
qRT-PCR	
軟寒天コロニー形	
核型分析	
染色体CGHおよび	イCGH
蛍光in situハイブ	ゼーション (FISH)

2)

表2 主な造腫瘍性関連試験の能力と限界

in vivo 試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
ヌードマウスへの移植			定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	時間 (数週間~数カ月)・費用がかかる 膀胱がん, 乳がん, グリア細胞腫, リンパ腫, 白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCIDマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	ヌードマウスよりも高感度	時間 (数週間~数カ月)・費用がかかる 定量化の方策が未整備 胸腺腫を自然発症
NOG/NSGマウスへの移植			INOD-SCIDよりも高感度/ 胸腺腫なし	時間 (数週間~数カ月)・費用がかかる 定量化の方策が未整備

in vitro 試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	簡便・安価 ときにはヌードマウスよりも高感度 (不死化していても腫瘍形成のないケース)	わずかな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー タンパク質発現	造腫瘍性細胞・未分化細胞の検出	短時間 (~1日)・簡便 ときには軟寒天コロニー試験よりも高感度 細胞を識別・分離・回収できる	特定のマーカー発現細胞だけが検出できない (=マーカー (-) の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ) ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー 遺伝子発現		短時間 (~1日)・簡便 ときにはフローサイトメトリーよりも高感度	特定のマーカー発現細胞だけが検出できない (=マーカー (-) の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ)
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的増殖の検出	in vivo 試験より短時間 (数週間~1カ月程度) 安価 ときにはヌードマウスよりも高感度	浮遊系細胞に使用できない わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ヒトES/iPS細胞は検出不能 (分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・ サイズ・形			相関性の問題 (染色体異常⇔造腫瘍性) わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体CGHおよびアレイCGH	ゲノムDNAの コピー数異常	染色体異常の 検出	技術的に確立	
蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) 分析	特定遺伝子の 位置・コピー数			

ができることを明らかにしている⁶⁾。

2) 目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれているか

一方, ②を検出するための試験系としては, 細胞増殖特性解析 (増殖曲線による不死化細胞の検出) や, 軟寒天コロニー形成試験による足場非依存的増殖細胞の検出が挙げられる。われわれは軟寒天コロニー形成試験において, ヒトテラトカルシノーマ細胞を1%の検出限界で検出可能であることを報告している。しかしながら, ヒト多能性幹細胞はシングルセルにまで分散させるとアポトーシスを起こすという特異な性質をもつため, 残存するヒト多能性幹細胞の検出 (①) に, 軟寒天コロニー形成試験は不向きである⁴⁾。

また, ②の評価に in vivo の方法を活用することも可能である。しかしながら, 均一な細

実用化

性幹
か
腫瘍性
か
微小
るか

は, 「セル・
加工製品の製
場合, 既知
がん遺伝子
うことが示唆
として評価す
できる。その
WHO TRS

目的細胞の前
られている可

トメトリー
あり, われ
サイトメト
出すること

1)

胞集団を対象とした WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験では、正常細胞中にわずかに混入する未分化・造腫瘍性細胞を検出するには感度が低く、結果が偽陰性になってしまう恐れが高いため、より感度の高い系を用いる必要がある。そこで有力な選択肢として挙げられるのが、Rag2- γ C double-knockout (DKO)⁷⁾、NOD/SCID/ γ C^{null} (NOG)⁸⁾、NOD/SCID/IL2rgKO (NSG)⁹⁾ などの重度免疫不全マウス系統を利用する検出系である。これらのマウスはT細胞、B細胞およびNK細胞を欠失しており、ヌードマウスなどの従来の免疫不全マウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高く、ヒトがん細胞を非常に高い効率で生着させることが可能といわれている¹⁰⁾¹¹⁾。われわれがNOGマウスにマトリゲルと懸濁したHeLa細胞を皮下投与し、腫瘍形成に必要な細胞数を検討した結果、WHO TRS 878にある造腫瘍性試験に比べ、2,000倍以上の感度の上昇が認められた(投稿準備中)。重度免疫不全マウス系統を利用した試験系開発における課題としては、a) 試験系の検出限界・感度・精度、b) 陽性・陰性コントロールのあり方、c) 投与細胞数、d) 観察期間、e) 投与経路、f) 投与方法、g) ヌードマウスとの比較、などを検討していく必要がある。

3. 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験

2)

ヒト多能性幹細胞加工製品の最終製品には、中間製品と同じく、「目的細胞」、「目的細胞の前駆細胞」、「残存多能性幹細胞」、および「その他の目的外細胞」の4種類が含まれている可能性がある。ただし中間製品の場合とは異なり、最終製品の造腫瘍性試験においては、生着部位での腫瘍形成能を考察できることが要求される。そのため、

①どのくらいヒト多能性幹細胞が残存しているか

②目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれているか

③投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか

ということが最終製品における造腫瘍性の懸念事項となる。①、②については、中間製品評価の場合と同様、多能性幹細胞のマーカータンパク質/マーカー遺伝子の検出(①)、不死化細胞の検出や足場非依存性増殖細胞の検出(②)などでそれぞれ評価が可能であると考えられる。

一方、③については、*in vivo* 造腫瘍性試験による評価が必要となる。その場合に考慮すべき点として、a) 試験系の検出限界、b) 陽性・陰性コントロールのあり方、c) 投与細胞数、d) 観察期間、e) 投与部位、f) 例数などが挙げられる。特に、投与部位に関しては、生着部位の違いによって腫瘍形成能や、腫瘍のタイプが異なる恐れがあるため、可能な限りヒトでの投与部位に相当する部位にするべきである(表2、図)。

4. 新技術による造腫瘍性評価の可能性

ヒト多能性幹細胞は、細胞株と培養条件によっては遺伝子・染色体に異常が生じることが報告されている¹²⁾¹³⁾。そのため、ヒト多能性幹細胞加工製品および製造基材であるヒトES・iPS細胞の造腫瘍性評価に次世代シーケンサーを使えないかという議論がある。

おわ

1) 次世代シーケンサーによる造腫瘍性評価

全ゲノムシーケンスや全エクソンシーケンスのデータを用いて遺伝子変異を網羅的に検出し、造腫瘍性細胞の混入を検知する、というのがその狙いである。しかしながら、こうしたアプローチは現実的にはあまり用をなさない。主な理由は、ヒト多能性幹細胞加工製品の安全性との因果関係が明瞭な遺伝子変異の具体例は乏しく、個々の最終製品の安全性の指標としてどのような変異の検出が有用なのか明らかではないからである。感度面でも、次世代シーケンサーでは細胞集団中の1%未満のみが保持しているようなマイナーな変異を検出するのは難しく、充分とはいえない。

また、ヒトES・iPS細胞由来製品の造腫瘍性を評価するうえでは、「製造基材となる幹細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点に最大の注意が必要である。すなわち、臨床適用に際しては、原材料や製造基材ではなくあくまで最終製品としてのヒトES・iPS細胞由来製品の造腫瘍性評価が最も重要であることに常に留意しなければならない。したがって、製造基材としての多能性幹細胞のシーケンスデータ中のどの遺伝子を確認対象にするかによっては、最終製品による腫瘍形成への寄与がきわめて低い遺伝子変異しか含まないような多能性幹細胞までも不適切として排除してしまうことになり、合理性が失われる恐れもある。

2) 先端技術による評価における注意点

この例のように、新しい技術が開発されても、「先端的技術だから」という理由のみでは、それをただちに製品の品質・安全性評価に適用することはできない。その技術による試験の結果を受けた後に、製品開発、製造および臨床の場において具体的にどのような判断が可能なのか明らかでなければ、「手元にある当該製品の安全対策」としては意味をなさないということに注意が必要である。つまり現状では、遺伝子変異を指標にして造腫瘍性細胞の混入を検知しようとするならば、発がんリスクと非常に高い相関があることが既知である特定の遺伝子変異に限定し、より高感度かつ高精度で検出する方法を開発する方がむしろ有用である。

なお、再生医療製品の開発における次世代シーケンサーの可能性としては他に例えば、製造基材であるES・iPS細胞の同一性評価を目的とした利用（STRなどの代替としての利用）や、製造基材ES・iPS細胞および製品中の細胞のゲノム不安定性の評価を目的とした利用（CGHなどの代替としての利用）が考えられる。それぞれにおける有用性を議論するためには、レギュラトリー・サイエンス研究、すなわち、各目的に応じた試験系の性能と限界についての科学的な理解が必須である。

おわりに

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む再生医療製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインはいまだに存在しない。現時点では、再生医療製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品について、本項で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し、総合的に判断すべき