



Title	創薬バイオマーカー蛋白質の探索基盤に関する研究
Author(s)	今井, 直
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49660
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いま い すなお 今 井 直
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 8 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	創薬バイオマーカー蛋白質の探索基盤に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中 川 晋作 (副査) 教 授 東 純一 教 授 松 田 敏 夫 教 授 堤 康 央

論 文 内 容 の 要 旨

近年のプロテオミクス技術の進展に伴って、がんや自己免疫疾患をはじめとする各種難治性疾患に関連する創薬バイオマーカー蛋白質を探索・同定しようとする研究が、世界的規模で推進されている。この創薬バイオマーカー蛋白質には、1) 疾患の発症や悪化といった病態を的確に診断するための『疾患バイオマーカー蛋白質』や、疾患の発症や悪化に直接関与している『創薬ターゲット蛋白質』、疾患治癒に関与している『医薬品シーズ蛋白質』に加え、2) 医薬品の有効性や安全性等を高確度で予測・解析できる『有効性/安全性バイオマーカー蛋白質』、が含まれており、これらの情報を有効活用することで、画期的診断薬・治療薬の開発が可能になるものと期待されている。しかし、これまでの所、創薬プロテオミクス研究から画期的診断薬・治療薬の開発に成功した例は、世界的にみても極めて乏しいのが現状である。これは、疾患時の細胞や組織においては、数十から数百種類以上もの蛋白質が、質的・量的・時空間的に発現変動しており、これら膨大な数の発現変動蛋白質（疾患関連蛋白質）の中から真に有用な創薬バイオマーカー蛋白質を絞り込むシステムが確立されていないことに大きく起因している。本観点から申請者は、プロテオミクス研究で得られる膨大な情報を創薬研究に有効活用することを目的に、蛋白質の機能解析に最も有用で不可欠な“モノクローナル抗体”を利用し、創薬バイオマーカー蛋白質を効率よく絞り込む方法論を考案した。これはプロテオミクス研究によって同定される多数の疾患関連蛋白質に対して、独自のファージ抗体ライブラリ技術を駆使することで、僅か数週間で特異抗体を網羅的に作製すること、更に、得られた抗体を組織マイクロアレイ解析に適用することで、多症例の臨床検体において候補蛋白質を一挙にバリデーションを可能とするものである。本研究では、上記方法論、即ち『抗体プロテオミクス技術』の確立を図ると共に、創薬バイオマーカー蛋白質探索基盤技術としての有用性を検証した。

一般に、プロテオミクスで汎用されている二次元電気泳動（2D-DIGE）解析により同定され、そのゲルスロットから回収される蛋白質は100 ng以下と微量であり、また、一度の解析で数十から数百種類以上の候補蛋白質が同定されてくる。そのため、従来のハイブリドーマ技術による抗体作製法では、これら微量・多数の候補蛋白質に対する抗体作製は困難である。そこでまず、微量の疾患関連蛋白質に対する抗体を迅速に作製する方法の確立を試みた。本目的に対し、in vitroで多種多様な抗原に対する抗体を取得可能なナイーブファージ抗体ライブラリを用いた。独自に設計したVH及びVL遺伝子増幅のためのプライマーセットを用いることで、 2.4×10^9 CFUものライブラリサイズを有する多様性に優れたナイーブファージ抗体ライブラリの作製に成功した。続いて、微量蛋白質に対する抗体作製を目的として、蛋白質の固定化効率に優れたニトロセルロース膜にDot Blot装置を用いて抗原を固相化し、それに対してライブラリのアフィニティーに基づく選択・濃縮を行う方法（Dot Blotパンニング法）を考案した。本方法を実施した所、僅か0.5 ngの抗原を固定化した場合でも、特異抗体の単離に成功した。僅か0.5 ngの蛋白質を抗原として抗体を単離できた例はこれまでに報告がなく、本研究で構築したナイーブファージ抗体ライブラリとDot Blotパンニング法を用いた抗体選別のアプローチが、2D-DIGE解析で同定・回収される微量の疾患関連蛋白質に対して、直接的に抗体を作製しうる有効な方法論となることが示唆された。

次に、上記抗体創製技術と組織マイクロアレイ解析を融合させた『抗体プロテオミクス技術』の構築を試みた。組織マイクロアレイ解析では、抗体さえ調製できれば、一度の解析で数十から数千症例もの臨床検体における抗原の発現プロファイルを取得でき、更に各組織には患者の病期や転移の有無、予後等の臨床情報がリンクしているため、それらの情報と発現プロファイルの相関解析を行うことで、効率よく創薬バイオマーカー蛋白質のバリデーションが可能である。本抗体プロテオミクス技術の有用性を検証する目的で、『乳がん』と『肺がん』に関連するがん細胞株と正常細胞株を用いて、2D-DIGE解析・MS解析・上記抗体創製技術を行い、僅か2週間で、候補蛋白質を同定すると同時に抗体作製に成功した。更に作製した抗体を用いて、がん・正常組織が搭載された組織マイクロアレイの免疫染色を行い、発現プロファイリングを取得すると共に臨床情報（リンパ節転移の有無等の情報）との相関を解析した。その結果、がんの診断・治療に有用な創薬バイオマーカー蛋白質の候補として、TRAIL-R2、RREB-1、Cytokeratin 8、EPHA10、Vimentin、OSBPL5、CALU、PSAを同定することに成功した。この中でもTRAIL-R2、EPHA10は、既存の乳がんマーカー蛋白質Her-2に代わる新たな創薬ターゲット蛋白質になりうる可能性を秘めており、特にEPHA10はがんの浸潤や腫瘍血管新生の抑制ができることが判明した。また、RREB-1、EPHA10、Vimentin、OSBPL5、CALU、PSAはがんの最大の死亡要因であるリンパ節転移を予測・評価が可能なバイオマーカー蛋白質であることも新たに判明し、今後の臨床応用が期待される。本研究では、乳がんや肺がんをモデル疾患として、それに関する創薬バイオマーカー蛋白質のバリデーションについて有効性を検証してきたが、本技術基盤を、異なる対象疾患に適用することで、目的疾患に応じた創薬バイオマーカー蛋白質のバリデーションに有効であると考えられる。

以上、本研究で確立した『抗体プロテオミクス技術』は、従来まででは不可能であった創薬バイオマーカー蛋白質の迅速かつ効率的なバリデーションを可能とし、特に本研究の結果から、世界に先駆けて、上記で紹介した非常に有望な創薬バイオマーカー蛋白質の同定を僅か数週間という短期間で行うことに成功した。今後、本研究成果が創薬プロテオミクス研究の推進に大きく貢献できることを期待している。

論文審査の結果の要旨

近年の質量分析技術をはじめとする各種プロテオミクス解析技術の進展に伴って、1) 疾患の病態を的確に把握するための疾患バイオマーカー蛋白質や、有効性に優れた医薬品・医療技術の開発に資する創薬ターゲット／医薬品シース蛋白質と、2) 医薬品あるいはその候補の有効性・安全性を高度に予測・解析できる有効性/安全性バイオマーカー蛋白質を示す、これら“創薬バイオマーカー蛋白質“の探索と医薬品開発等への展開を目指す創薬プロテオミクス研究が世界で競争的に推進されている。本研究では、プロテオミクス研究によって見出されてくる数十から数百種類もの疾患関連蛋白質の中から、迅速かつ効率的に創薬バイオマーカー蛋白質を絞り込み、バリデーションを行いうる基盤技術の開発を試み、以下の結論を得た。

1. 抗体遺伝子（VLおよびVH遺伝子）を増幅するためのプライマーセットを独自に改良・設計することで、多様性と品質双方に優れたナイーブファージ抗体ライブラリの構築に成功した。
2. 1 ngという微量の蛋白質を効率よく抽出可能なゲル溶解法を利用したDot Blotを用いたパンニング法を開発し、2D-DIGE解析で見出される多種類の微量蛋白質（100 ng以下）に対する複数種類の抗体を、ナイーブファージ抗体ライブラリから僅か2週間で単離することに成功した。
3. 抗体プロテオミクス技術を駆使することで、乳がんの診断・治療に有効な新規バイオマーカー蛋白質（TRAIL-R2、RREB-1、Cytokeratin 8、EPHA10）および、リンパ節転移の診断・治療に有用な新規リンパ節転移マーカー蛋白質（Vimentin、OSBP5、CALU、PSA）を見出した。
4. 上記、プロテオミクス技術、抗体作製技術、組織マイクロアレイ解析を統合し、創薬バイオマーカー蛋白質の効率的な絞り込みを可能とする技術として、「抗体プロテオミクス技術」を確立した。

本研究で確立した「抗体プロテオミクス技術」は、従来まででは不可能であった創薬バイオマーカー蛋白質の迅速かつ効率的なバリデーションを可能とし、特に本研究の結果から、世界に先駆けて、Her-2に代わる乳がんの予測・分子創薬標的として有効なTRAIL-R2、Cytokeratin 8、EPHA10の同定や、リンパ節転移の予測・評価に有用なVimentin、OSBP5、CALU、PSAの同定を僅か数週間という短期間で行うことに成功した。本技術基盤を、異なる対象疾患に適用することで、目的疾患に応じた創薬バイオマーカー蛋白質のバリデーションに有効であると考えられる。以上本研究成果は、将来的に創薬バイオマーカー蛋白質の探索や医薬品開発等への有効活用を目指した創薬プロテオミクス研究の推進に大きく貢献できるものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。