

ブタ肝細胞を利用した人工肝臓の開発を国内で先進的に進めてきた長崎大学医学部と共同研究を開始した。人工肝臓は異種動物の細胞使用に関して未知の感染症、特にブタの内在性レトロウイルスの危険性を排除できないことからヒト細胞の使用へと向かっている。しかし、例えば細胞接着性の違いがあるように、ヒト肝細胞とブタ肝細胞はその特性が大きく異なる。新たなヒト細胞における至適条件の検討を行い、臨床用の回路の検討と開発、ヒト肝細胞のマイクロキャリアーとの接着方法、ヒト肝細胞の凍結保存の影響評価、ヒト肝細胞への大腸癌細胞の混入判別方法の確立。前臨床段階のミニリアクターを組み込んだ縮小回路を作成し機能評価を人工肝臓のグループと協力して行った。

さらに肝細胞に限らず収集した細胞を、直接的に評価する方法として、物質間相互作用を無標識、リアルタイムに解析できる表面プラズモン共鳴(SPR)を利用して、観察のための修飾や影響が極めて少ない、生きたままの細胞機能が評価できる新しい方法を発明した。

また再生医療の実現のための体制作りは、倫理委員会へ、研究および臨床応用の申請を行い承認を得た。さらにヒト組織を取り扱う上で重要な個人情報の管理として匿名化ソフト SCST21 を導入し非連結匿名化による情報管理を開始した。そして組織の供給を安定化させる体制を築くための細胞バンク設立準備として県下主要病院と提携しヒト肝組織の採取を行う体制を整備しヒト肝細胞の収集・保存を行った。

以上の活動により再生医療の実現に向けた準備が整い、術後肝不全・劇症肝炎における肝細胞移植の実施や人工肝臓の使用、また先天的代謝異常症での正常肝細胞移植や自分自身の肝細胞を正常化し移植する遺伝子治療を、今後フェーズⅢとして臨床応用する取り組みを、更に具体化し行っていく予定である。

2-6 . プロテオーム解析法

細胞や組織に含まれるタンパク質全てを網羅的に扱うプロテオーム解析という手法は、タンパク質の分離と同定という2つの技術が根幹となっている。二次元電気泳動は一枚のゲル上に数千のタンパク質をその等電点と分子量という性質によって分離する手法である。また、質量分析計は電気泳動によって分離されたスポットに含まれるごく微量なタンパク質やペプチドの質量を測定することにより、タンパク質を同定することが出来る。この「生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発」に対して 2002 年のノーベル化学賞が贈られている。ゲノムプロジェクトの進行に伴い、ヒトをはじめとする様々な生物種の全遺伝子配列情報が明らかになりつつある。この膨大な遺伝子情報の増加を背景にして、質量分析計によるタンパク質の同定という手法が現実的なものとなってきた。これによって初めて、細胞や組織に含まれるタンパク質全てを網羅的に解析するアプローチが可能となったのである。このプロテオーム解析を用いて、さまざまな生命現象における分子生物学的解析を行い、また新しいプロテオーム解析技術を開発することを目標に、本事業における1テーマとして選択された。

本事業のスタート時である平成 10 年には、プロテオームという概念やその技術は、ほとんど日本に普及していなかった。本事業においても、その立ち上げ時には、再現性と分離能がタンパク質をターゲットとした実際の分子生物学的研究に耐えうる二次元電気泳動像を作り出すことを最初の目標としていた。また質量分析計は英国の Micromass 社から当時最新鋭の装置である Q-TOF を日本で初めて導入した。この Q-TOF は今までの質量分析計とは異なり、分子データベースを必要とせずにアミノ酸内部配列を同定することが可能

であった。本テーマにおける研究業績は、高い分解能と再現性を持った二次元電気泳動と質量分析計 Q-TOF の性能を完全に引き出すことによって達成されたものと言えるだろう。

フェーズ 1 においては、二次元電気泳動によるタンパク質の分離と質量分析計によるタンパク質の同定というプロテオーム解析の流れをプロトコル化し、実際にさまざまな生命現象におけるタンパク質レベルの解析を行った。その中で最も特筆すべきことは、ラット肝細胞の活性化現象におけるプロテオーム解析である。星細胞の活性化は肝硬変に深く関わることが知られている。星細胞の活性化に伴うタンパク質構成の変化を網羅的に解析することによって、活性化現象の分子機構を明らかにすることを目標とした。活性化星細胞と正常星細胞の二次元電気泳動像による比較と質量分析計による同定は、活性化現象によって増減が見られた 42 個のタンパク質を明らかにした。またその中で、今までその存在を知られていなかった新規のタンパク質を同定できたことは驚くべきことであった。STAP と名付けられたこのタンパク質は、その機能を明らかにすることによって、星細胞活性化現象の分子機構の理解をさらに深めることが期待されている。

フェーズ 2 においては、フェーズ 1 と同じく生命現象のプロテオーム解析を継続させつつ、新たなプロテオーム解析法を開発することを目標とした。最初に挙げるべき成果は、リン酸化タンパク質の網羅的解析法の開発である。タンパク質は、その遺伝子配列によって転写翻訳された後に、さまざまな修飾を受けることによって初めてその本来の機能を発揮することが多い。その翻訳後修飾のなかでもリン酸化に関して網羅的な解析法を開発した。また、重水素ロイシンと質量分析計を組み合わせることによって様々なプロテオーム解析に対応できる新手法を開発している。

平成 12 年 10 月から平成 13 年 3 月までの期間、本事業のプロテオーム解析グループは、科学技術振興事業団 RSP 緊急共同研究プロジェクト・戦略的権利化プログラムに移管した。実験室を株式会社広島テクノプラザに移し、「プロテオーム解析技術の開発」を課題として研究を進めた。この体制において、肝星細胞のプロテオームデータベースの構築、多検体対応型二次元電気泳動ゲルカッターの開発、リン酸化タンパク質の解析方法、重水素ロイシンによる新生タンパク質の解析、予備分画によるタンパク質濃縮法の確立を達成することができた。

株式会社福山臨床検査センターでは、本事業との共同研究としてプロテオーム解析法による疾病検査システムの開発を行った。様々な臨床検体の解析にプロテオーム解析を用いることで、疾病検査法として技術確立することを目標とした。そのために同社では対象疾患と対象検体は膀胱癌と尿として、膀胱癌患者と健常人から採取した尿中のタンパク質を比較解析し、その中から病勢を反映する複数のタンパク質の質的・量的変化を捉え、そこから得られる情報を総合的に判断する診断法の開発を目指した。

解析の方向としては膀胱癌患者と健常人の尿中タンパク質の違いをプロテオーム解析技術によって調べることを行った。まず始めに尿を濃縮してそこに含まれるタンパク質全体を二次元電気泳動法によって分離し、タンパク質のスポットパターンを比較した。多くの患者に共通してみられる顕著な変化として血尿に由来すると考えられるタンパク質が患者尿に検出された。血尿は多くの膀胱癌患者に共通して見られる症状の一つであり、膀胱癌に伴う病態の一側面を捉えたことになるが、既に血尿は尿試験紙法などにより簡便に検出する方法が確立されている。よって、我々は血尿以上に膀胱癌に密接に関連した複数のタンパク質を特異的に濃縮する手法の開発を目指した。濃縮した尿をそのまま電気泳動にか

けることは、感度的な問題があることが明らかであったので、尿を群特異性アフィニティ担体によって膀胱癌に関連性の高いタンパク質を選択的に濃縮する手法を開発した。これらのタンパク質と疾患の関連性について調べたところ、癌の深達度（腫瘍の浸潤の程度）とタンパク質スポットパターンに相関性があることが見出され、これによって臨床検査法としての応用へ向けて基礎的技術が確立できたと考えられる。

本事業の終了は平成 14 年 10 月であるが、それに先立ちプロテオーム解析グループは、毛髪再生グループと共に平成 13 年の 11 月に科学技術振興事業団における重点地域研究開発促進事業に公募し、平成 13 年度新規採択課題に採用された。これによって同グループは地域結集型共同事業から離脱し、13 年度 3 月から研究成果活用プラザ広島において、「毛髪再生療法および受託プロテオーム解析の事業化」をテーマとして研究活動を進めている。これは高品質な毛髪再生をプロテオーム解析の手法を用いて実現すること、及びその過程で開発された新規プロテオーム解析技術を用いた受託分析および受託研究ビジネスを行うことを最終目標としたものである。

研究成果活用プラザ広島にプロテオーム解析実験室として百平方メートルのスペースを設けて、あらたに質量分析を行うための恒温室や新たな電気泳動装置など充実したプロテオーム解析用の機器をそろえた。平成 14 年度においては、新研究室で上記研究テーマを達成するための研究活動を進めている。

フェーズ 3 においては研究成果の事業化への移行を求められている。本テーマにおいては、東和科学株式会社が 100% 出資を行い、プロテオーム受託解析を行うベンチャーとして、株式会社プロフェニックスを平成 14 年 4 月 1 日に登記した。広島企業化センター（クリエイトコア）に受託解析室を設けて、プロテオーム受託分析サービスを開始している。前述の研究成果活用プラザ広島での新事業において研究開発された新技術の受け皿となり、常に最新のプロテオーム解析サービスを提供するベンチャー会社を目指している。また、株式会社福山臨床検査センターにおいても、開発した膀胱癌の二次元電気泳動診断法を分析サービスに実用化することを計画しており、本事業における最終的な目標である事業化への移行は順調に進行中といえよう。

2-7 . カエルの利用法の開発

近年、生体内で営まれているホルモン作用に影響を与えることにより、生体の生殖機能を阻害し、あるいは悪性腫瘍を引き起こす等の作用を引き起こす化学物質（内分泌攪乱化学物質）の存在が指摘され、化学物質の評価方法について再検討が迫られている。現在まで、化学物質は、培養細胞やモデル動物を用いた毒性試験等に代表される方法により評価されてきた。しかしながら、内分泌攪乱化学物質は、生体に対し低用量でより大きな作用を引き起こすことが認められており、従来の毒性学の範疇では評価が困難であることから、現在までのところ、内分泌攪乱化学物質のスクリーニングおよびモニタリングに対して適合する評価方法は存在しない。また、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質として約 70 物質が挙げられているが、今後、評価を要する化学物質の数が飛躍的に増大するのは必至である。こうした背景に基づいて、生物に対する作用を指標とした、新たな化学物質のスクリーニング法および環境モニタリング法の開発が待たれている。