

## 2-1-1 研究成果

中テーマ名：分泌タンパク質マッピング技術の開発 サブテーマ名：動物細胞の分泌タンパク質に対する分析技術の開発と応用	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名） 横浜市立大学木原生物学研究所 所長	宮崎 香
研究従事者（所属、役職、氏名） 横浜市立大学木原生物学研究所 準教授 (財)木原記念横浜生命科学振興財団	安光英太郎 安田知永 森山佳谷乃
キリンビール(株) フロンティア技術研究所 主幹研究員 (株)ファンケル 中央研究所 主任研究員	水谷 悟 宮田 智
研究の概要、新規性及び目標	
①研究の概要 動物組織中の細胞は、増殖因子、細胞接着分子、タンパク質分解酵素など自己および周囲の細胞が分泌する多様なタンパク質によって調節されている。また、これらの分泌タンパク質は様々な生理現象や疾病に関与することから、創薬の標的因子、診断マーカー、医療器材など、いろいろな形で医療への応用が期待されている。本研究では細胞機能を調節する重要な分泌タンパク質を効果的に分析する技術を開発し、その技術を用いて癌や皮膚のバイオマーカーの開発を目指す。	
②研究の独自性・新規性 分泌タンパク質のプロテオーム解析は、これまでに報告されていない。また、本研究で開発したマーカータンパク質の殆どは、これまでにバイオマーカーとして報告されていない。	
③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） フェーズⅠでは効率よく分泌タンパク質を分析できる技術を確立する。 フェーズⅡでは正常上皮細胞と癌細胞（乳癌、肺癌、膵臓癌など）の比較から、正常あるいは癌細胞が特異的に分泌するタンパク質を同定し、癌の診断や治療に役立つ腫瘍マーカーを開発する。 フェーズⅢではヒト表皮角化細胞の細胞老化に伴って変化するタンパク質を同定し、皮膚の健康状態や老化度の判定に用いるマーカーを開発する。また、アトピー性皮膚炎で特異的に発現するタンパク質を同定し、アトピー性皮膚炎の症状の診断マーカーを開発する。	
研究の進め方及び進捗状況	
(1) ヒト正常上皮細胞と癌細胞を無血清培地で培養し、培養上清を濃縮する事により細胞分泌タンパク質を回収した。調製したサンプルを、二次元電気泳動法により分離した。癌細胞で特異的に分泌されるタンパク質を質量分析により同定し、重要と思われたタンパク質に関しては抗体による確認を行った。さらにいくつかの候補タンパク質については、イムノブロッティング法やSandwich-ELISA法によりヒト臨床検体（血清・尿）での発現を分析した。	
(2) ヒト表皮角化細胞の若い細胞と老化した細胞から得られた培養上清液を、二次元電気泳動により分離した。若い細胞および老化した細胞に特異的に発現しているタンパク質を同定し、さらにイムノブロッティングによる発現の確認を行った。また、重要と思われたタンパク質に関しては、ヒト皮膚組織の免疫組織染色や角質チェッカー法によるヒト皮膚組織検体での発現分析を行った。アトピー性皮膚炎マーカーについては、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚およびアトピー性皮膚炎患者の角質チェッカー検体を用いて、炎症により変動するタンパク質を同定した。	
主な成果	
具体的な成果内容： (1) 癌細胞が特異的に分泌するタンパク質を中心に、106個のタンパク質を同定した。その中から特異抗体を用いたイムノブロッティング法により、多くの癌細胞で分泌が確認された8種類のタンパク質を腫瘍マーカーの候補として決定した。そのうち2個が、イムノブロッティング法により癌患者の検体（血清・尿）で検出された。またSandwich-ELISA法では2種類のタンパク質に関して検定系を樹立し、癌患者で微量ではあるが上昇を確認した。	
(2) 表皮角化細胞の細胞老化に伴って分泌が増加するタンパク質を64個、また逆に分泌が減少するタ	

ンパク質を32個同定した。さらにイムノブロッティングによる分析によって、細胞老化に伴い顕著に増加するタンパク質15個 (maspin, cystatin A, PAI-2, matrilysin, GRP94, HSP70, HSP90, enolase-1, annexin II, ezrin/moesin/radixin, galectin-1, galectin-3, galectin-7,  $\beta$ 2-microglobulin)、また減少するタンパク質3個 (PAI-1, uPA, gelatinase B)を同定した。一方、細胞骨格タンパク質であるケラチン分子種の分析では、細胞老化に伴って増加するケラチン分子種が9個 (keratin 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20) 検出された。そのうち、細胞の増殖刺激によって顕著に減少する3個 (keratin 7, 15, 19) が老化マーカーとして有望と思われた。keratin 15については、ボランティアからの角質チェッカー検体を用いて発現量を分析したところ、皮膚の加齢変化とよく相関した。

(3) 一方、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚組織の分析から、炎症により変化するタンパク質49個を同定した。さらにイムノブロッティングによる解析から、発現が低下するタンパク質としてgalectin-1, -3, -4, -7, -8, desmin, moesin, HSP70, HSP90, annexin II, enolase-1, FABP4, PARK7を、一方発現が増加するタンパク質として、Rho GDI, vimentin, apolipoprotein A1, FABP5を同定した。また、ボランティアによるアトピー性皮膚炎患者の皮膚組織の分析から、疾患で増加するタンパク質としてannexin II, enolase-1, SCCA2, apolipoprotein A1を、減少するタンパク質としてPARK7を決定した。

特許件数：9      論文数：28      口頭発表件数：12

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

本研究で見出したバイオマーカーの殆どは、これまでにマーカータンパク質として知られていない。またこれらタンパク質の機能解析は、腫瘍増殖、皮膚老化、アトピー性皮膚炎発症の機構解明に役立つと思われる。

2 実用化に向けた波及効果

今後さらに下記の検討が必要であるが、腫瘍診断、肌の健康度チェックおよびアトピー性皮膚炎の症状診断に、さらには個人の肌に応じたオーダーメイド化粧品の開発に役立つことが期待される。

残された課題と対応方針について

(1) 培養細胞で見出した腫瘍マーカー候補が実際に腫瘍の診断に使用可能かどうか確認する必要がある。このために、重要な分子に絞ってSandwich-ELISA検定系を確立し、ヒト臨床検体（正常および癌患者血清）での分析を行う。また、本研究で見出した分泌タンパク質の腫瘍の悪性増殖への関与を明らかにして行く。

(2) ヒト皮膚老化マーカーに関しては、さらに多くのボランティアの角質チェッカー検体を分析しその応用性を確認するとともに、マーカータンパク質のより簡便な検出方法の開発を進める。アトピー性皮膚炎マーカーについては、さらにヒトのアトピー性皮膚炎の検体数を増やして患者の症状と発現量の関係を確認する必要がある。また、これらタンパク質の生理的および病理的役割の解明を進める。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	0	0	0	11,007	12,271	3,971	27,249	5,266	15,160	10,800	4,656	4,619	3,358	43,859	71,108
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	0	0	5,888	6,414	3,791	16,093	0	18,340	8,136	2,998	3,489	3,219	36,182	52,275
旅費	0	0	0	42	167	36	245	0	0	0	0	0	0	0	245
その他	0	0	0	16	11	4	31	0	0	0	0	0	0	0	31
小計	0	0	0	16,953	18,863	7,802	43,618	5,266	33,500	18,936	7,654	8,108	6,577	80,041	123,659

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備：

地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する