

平成 2 0 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心プログラム
(大項目) 糖鎖機能活用技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 1 5 条第 1 項第二号

3. 背景及び目的・目標

(1) 背景及び目的

ヒトゲノムが解読されて以降のいわゆるポストゲノム研究の主要課題は、タンパク質や DNA、RNA をはじめとする生体分子の構造解析から機能解析へと展開を見せつつある。その代表的生体分子であるタンパク質の半数以上は糖鎖の修飾を受けており、糖鎖と一体化することによりはじめて様々な機能を発揮する一方で糖鎖の異常が様々な疾病を引き起こすことが明らかになりつつある。すなわち、糖鎖は、タンパク質等の安定性や局在性に深く関わっており、細胞表面にあっては認識分子として機能するなど、細胞の高次な生命機能の発現に重要な役割を果たしている。

従来より、こうした糖鎖機能の根本的な解明を行うことの重要性は認識されてはいたが、そのために必要な研究手段の開発が不十分であり研究のネックとなっていた。しかし、研究手段として不可欠であるヒト糖鎖合成関連遺伝子の取得数で我が国が世界のトップに立ち、さらに我が国が世界に先んじて糖鎖構造統合解析システムの開発や糖鎖合成装置の開発に成功するに至り、いよいよ糖鎖とタンパク質を一体として捉えて糖鎖構造を機能に結びつけて根本的に解明し、その知見を活用するための環境が整備されたと言える。

糖鎖研究は、平成 1 7 年 3 月に経済産業省において策定された技術戦略マップにおいて、創薬・診断分野の個別化医療の実現に向けた技術のうち、画期的な医薬品・診断技術の開発に資する重要技術であり、また、日本の強みが活かせる技術分野であって更なる強化を図るべき重要技術として位置付けられた。しかしながら、欧米も糖鎖研究の重要性を認識し研究の加速化を既に図り始めており、わが国の糖鎖研究の優位性を産業利用に役立つ形に結実させることは焦眉の課題であると言っても過言ではない。

本研究開発では、日本が優位性を有する、糖鎖合成関連遺伝子、糖鎖構造統合解析システム、糖鎖合成装置といった基盤的要素技術を活用することにより、生体サンプルから糖鎖や糖タンパク質などの極微量の目的分子を抽出する技術開発や、種々の疾患マーカーなどになり得る有用な特異的糖鎖を特定し、これらの糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術を開発し、糖鎖機能の解析を促進することを目的とする。さらに、機能が解明され重要と判断されたこれらの分子構造を選択的に認識させるための、特異的抗糖鎖プローブの開発により、糖鎖機能の活用を加速する。また、ヒト型糖鎖の大量合成法を開発し、新規な医用材料を開発することを目的とする。

これにより癌、免疫、感染症、再生医療などの分野における画期的な早期診断法の開発・実用化が期待されるとともに個別化医療に向けた最適な治療法や創薬への重要な手掛かりが得られるものと期待される。

(2) 目標

1) 最終目標 (平成22年度末)

産業上有用な機能を有する糖鎖マーカ―を、臨床サンプルから高効率に分画・精製・同定する技術を確立する(未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質50種類以上、及び既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上について解析を終える)。また、糖鎖マーカ―の精製や診断用糖鎖構造解析等に供される新たな装置またはデバイスを開発する。これらの糖鎖マーカ―の中から、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を30種類程度見いだす。さらに、10種類以上の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを複数個作製し、実用化可能な糖鎖認識プローブを数個開発する。大量合成技術については、100種類以上のヒト型糖鎖を10ミリグラムのオーダーで、また20種類以上のヒト型糖鎖をグラムオーダーで安価に合成する技術を開発する。

研究開発項目①「糖鎖マーカ―の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

産業上有用な機能を有する糖鎖を生体試料から高効率かつ迅速に分画・精製・同定する技術を確立する。これらの技術を活用し、未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質50種類以上、及び既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上について解析を行い、産業上有用な30種類以上の糖鎖(糖タンパク質)マーカ―を開発する。また、糖鎖マーカ―の精製や診断用糖鎖構造解析等に供される新たな装置、またはデバイスを少なくとも1種類開発する。

研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を30種類程度見いだす。

糖鎖と感染症病原体の相互作用を検討し、感染症病原体の検出、診断、除去に関する画期的な技術を開発する。

研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

10種類の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを複数個作製して有用性を検証し、最終的に数個の実用化可能な糖鎖認識プローブを開発する。

研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

高価な合成材料を使用せずに、100種類以上のヒト型糖鎖を10ミリグラムのオーダーで合成する技術を開発する。また、20種類以上のヒト型糖鎖についてはグラムオーダーで安価に合成する技術を開発する。これらの糖鎖を用い、2種類以上の医用材料等を開発する。

2) 中間目標 (平成20年度末)

既知及び未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上に応じた分画・精製技術の確立に目途をつけ、これらの糖タンパク質10種類以上の構造を同定する。20種類程度の糖転移酵素遺伝子改変動物、50種類程度の糖転移酵素遺伝子改変細胞株、50種類程度のヒト型糖鎖を作成し、機能解析や糖鎖認識プローブ作製に利用することにより、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を10種類程度見いだす。さらに、5種類の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを作製し、有用性を検証する。また、ヒト型糖鎖の大量合成技術の開発に目処をたてる。

産業上有用な機能を有する糖鎖マーカ―(未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質50種類以上、及び既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質20種類以上)を、臨床サンプルから高効率に分画・精製・同定する技術を確立する。これらの中から、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を30種類程度見いだす。さらに、10種類

以上の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを作製し、実用化可能な糖鎖認識プローブを数個開発する。大量合成技術については、高価な合成材料を使用せずに、100種類以上のヒト型糖鎖を10ミリグラムのオーダーで、また20種類以上のヒト型糖鎖をグラムオーダーで合成する技術を開発する。また、これらを用いた2種類以上の医用材料等を開発する。

研究開発項目①「糖鎖マーカ―の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

生体試料から、既知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質10種類以上、未知の糖鎖マーカ―である糖タンパク質10種類以上に応じた分画・精製技術の確立に目途をつけ、これらの糖タンパク質10種類以上の構造を同定する。

研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

20種類程度の糖転移酵素遺伝子改変動物、50種類程度の糖転移酵素遺伝子改変細胞株、50種類程度のヒト型糖鎖を作成し、機能解析や糖鎖認識プローブ作製に利用する。また、特許出願可能で産業上有用な糖鎖機能を10種類程度見いだす。

研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

5種類の糖鎖マーカ―に対する糖鎖認識プローブを複数個作製し、有用性を検証するとともに、プローブ作製技術の開発に目途をつける。

研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

ヒト型糖鎖の大量合成技術の開発に目処をたてる。また、これらの糖鎖を用い、産業上有用な糖鎖材料の開発に目処を立てる。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

研究開発項目①～③については、独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター センター長 成松久氏を、研究開発項目②及び④については東京大学・国際・産学共同研究センター教授 畑中研一氏をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発を実施した。

4. 1 平成19年度までの進捗状況

(1) 研究開発項目①「糖鎖マーカ―の高効率な分画・精製・同定技術の開発」

生体試料からの分析法として、質量分析と、レクチンアレイを基盤とする分析に抗体利用の手法も加味し、疾患関連糖鎖バイオマーカ―検出のための試料濃縮と分析の全体システム設計を進め、各要素技術に要求される感度・精度・再現性に基づいた技術の絞り込みを進めた。糖鎖をキャリアするタンパク質に着目し、これらをバイオインフォーマテックス技術にて絞り込み、抗体を用いて糖タンパク質を選択的に取得、レクチンアレイ、質量分析及び従来法に用いて、疾患糖鎖を精度感度よく検出する測定系の構築を進めた。以下個別の項目について述べる。

① 生体試料の前処理システムの確立

レクチンアレイ、質量分析、あるいは免疫科学的な分析法に供するため、組織切片、血液細胞、腹腔洗浄液等々についてそれぞれの試料に対応する前処理法開発を進めた。

② 抗体を用いるエンリッチメント

マーカ―糖鎖をキャリアするタンパク質を、バイオインフォーマテックス技術による絞り込み、対応する抗体を利用したエンリッチメントシステムシステム構築を進めた。

③ 硫酸化糖タンパク質のエンリッチメント

硫酸化糖ペプチドの濃縮システム構築を行った。

- ④ キャピラリー電気泳動
マーカー探索のための糖ペプチド解析手法の検討を行った。
- ⑤ レクチンアレイ
抗体オーバーレイ・レクチンアレイ技術等の、レクチンアレイ改良技術開発を実施した。さらに従来法を用いて、腹腔洗浄液、I g Aヒンジ糖鎖、肝内胆管癌等、研究項目③より提供される試料につき、糖鎖プロファイリングを実施した。
- ⑥ 糖鎖の質量分析
完全メチル化、抗体利用等による感度向上を検討したほか、研究項目②および③より提供される未知糖鎖構造決定を行った。
- ⑦ 糖タンパク質の質量分析
これまで、線虫、マウスで進めてきた、糖タンパク質糖鎖付加位置検証をヒト糖タンパク質にて実施すべく、その基盤整備を進めた。また、糖鎖付加率解析法を検討した。
糖転移酵素発現量解析による糖鎖構造予測
臨床検体の糖転移酵素発現量を核酸レベルで解析することによる、糖鎖疾患マーカー検出技術の基盤整備を終了した。
(実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

(2) 研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

A. 「ノックアウトマウス (KO) 関連研究開発」

糖鎖合成関連遺伝子を導入・削除して糖鎖を改変した動物・細胞株を多数樹立し、糖鎖改変による細胞機能・生体機能の変化を生化学的、生物学的、病理学的に解析することで糖鎖機能を解明する、糖鎖改変による糖鎖の生物学的機能解析を実施した。さらに、多様な糖鎖および糖鎖複合体等を用い、糖鎖及び糖鎖複合体と病原体表面蛋白質等との相互作用認識解析技術等を開発するための、ヒト型糖鎖ライブラリーを用いた機能解析システム開発を実施した。

- ① ノックアウトマウス関連研究開発
糖鎖構造と生物学的機能との関係が示唆されるものを対象に糖転移酵素ノックアウトマウスを前年度に引き続きその作成・養育を実施した。ノックアウトを実施した、10の遺伝子のうち、5遺伝子が作製を終了し、系統保持と解析を実施した。残る5遺伝子のうち、3遺伝子については作製終了に近く、残る2遺伝子について注力中。解析の結果、免疫関連で異常の観察されたKOマウスについて、各種免疫検出系に展開中である。
- ② 糖鎖アレイチップ
糖鎖アレイチップについては、高感度化を目指したマトリックスゲルチップの開発から、GAGオリゴマーを含む各種糖鎖の調製→糖鎖固定化→チップ作製→検出法全体の調整を進めた。検出については、SPRを用いる方法と、エバネッセント波を用いる方法について検討した。

(実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

B. 「病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明」

クロストリジウム神経毒素である破傷風毒素およびボツリヌス毒素と糖鎖との相互作用を市販の糖鎖アレイおよび表面プラズモン共鳴法により検討し、これらがGT1bなど5種類の糖鎖と結合する可能性が見いだされた。また、C型肝炎ウイルスではE1, E2持続産生細胞株を樹立、エンベロップ蛋白を精製した。B型肝炎ウイルスに関しては持続産生細胞株の作成を実施した。エイズウイルスはエンベロップ蛋白および全ゲノムの産生細胞系を作成した。また、アジド基を有するGM3型糖鎖をクリック反応を利用してフィルターペーパーに固定化し、インフルエンザウイルスとの相互作用を検討した。糖鎖利用診断システムに関してはチオールを介して糖鎖を金基板に固定化し、局在

表面プラズモン共鳴デバイス（LSPRデバイス）を作成し、レクチンとの特異的結合を確認した。

（実施体制：（財）化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター）

（3）研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

ここでは、下記A及びBの技術開発を行った。

A. 疾患糖鎖マーカー認識プローブの開発

B. 糖鎖関連疾患の診断技術開発

A. 疾患糖鎖マーカー認識プローブの開発

臨床検体等の生体試料中の糖鎖マーカーを特異的に高い親和性を持って認識するための糖鎖／糖蛋白質認識プローブを作製するための技術開発と、それに必要な糖鎖／糖ペプチド／糖タンパク質の作製を実施した。

① フェージライブラリ法による糖鎖認識プローブ開発

癌関連糖鎖やIgA関連糖鎖など、キーとなるいくつかの抗原標品を集中研より供給し、それらについてスクリーニングを実施。さらに、シャペロン分子を利用した新規ライブラリを作製して、スクリーニングを実施した。

② 糖鎖合成酵素ノックアウトマウスを利用した抗糖鎖抗体分子の開発

糖脂質系とN-型糖鎖糖転移酵素KOマウスを用いた癌糖鎖抗原認識プローブの作製を継続して実施した。

③ B1細胞を利用した抗糖鎖抗体の開発

B1細胞のライブラリを作製し、いくつかのガン細胞を抗原とする糖鎖認識抗体のスクリーニングを実施した。

④ ①～③に必要な糖鎖／糖ペプチド／糖タンパク質の作製、供給した。

B. 糖鎖関連疾患の診断技術開発

癌マーカー開発を中心とし、その他にも糖鎖関連疾患として、IgA腎症、アルツハイマー病、ノロウイルス、の診断、再生医療における治療用細胞評価の標準化、さらに、糖鎖を利用した遺伝子治療技術等を含む、糖鎖関連診断技術の開発を本項目で進めた。具体的には下記の項目について開発を進めた。

① 各種腫瘍

・ 複数の候補糖ペプチドの選定を達成

子宮体部腫瘍について腫瘍血清から候補糖ペプチドを選定した。

・ 医学的検出系が進展した腫瘍

卵巣腫瘍ではステージIaの粘液性がん、明細胞がんを検出できる系を作製した。肺腺癌では組織アレイによる解析を行い、肺腺癌の予後不良が予測可能。内分泌系腫瘍では不定愁訴の原因となるカルチノイドや、褐色細胞腫、ラ氏島腫瘍等、甲状腺髄癌、を検出

・ 候補分子の選定を達成

胃癌の腹腔内進展についてレクチンアレイによる候補分子の選定を達成
肝臓癌、大腸癌および前立腺については複数の候補分子選定を達成

・ 候補分子の選定を実施中

胆道系腫瘍について候補分子選定を実施中

② その他の疾患等の診断他

・ IgA腎症

IgA腎症患者由来のヒンジペプチド調製と糖鎖分析法の統一的処理基準を確立した。

・ アルツハイマー病、正常圧水頭症

アルツハイマー病と正常圧水頭症の分別可能な糖鎖関連マーカーの開発

を実施

- ・ 子宮内膜症

卵巣癌との差別化可能なマーカーについて知見を得た。

- ・ ノロウイルス

18株のウイルス様中空粒子 (VLP) と4種類の合成糖鎖のSPRによる親和性解析により、ノロウイルスは血液型抗原のタイプ間の違いを認識していることが明らかとなった。

- ・ 間葉系細胞を利用した再生医療

間葉系幹細胞の規格化について、まずマウスでの規格化を終了し、ヒト細胞の規格化に着手した。

- ・ 糖鎖を利用した遺伝子治療

レトロウイルス産生細胞に6種の糖鎖遺伝子発現ベクターをそれぞれに導入し、感染力価と、ビトロネクチン親和性測定を実施した。

(実施体制:産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

加えて、抗コンドロイチン硫酸 (CS) 抗体のエピトープが卵巣癌患者血清中で高いことを示し、エピトープの八糖構造を決定した。CS-E認識抗CSフェージ抗体がE二糖単位 [GlcUA1-3GalNAc(4,6-O-sulfate)] およびiE二糖単位 [IdoUA1-3GalNAc(4,6-O-sulfate)] を認識し、マウスルイス肺癌細胞株やヒト卵巣癌細胞を認識することを見いだした。肺癌細胞株由来のグリコサミノグリカン標品に対する抗体産生ハイブリドーマを作成し、また、CS-EとCS-H標品 (iEを含む) に反応する抗体を産生するハイブリドーマを作成した。

(実施体制:北海道大学)

(4) 研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

糖鎖の種類を増やす技術開発はこれまで用いた細胞に加え乳腺細胞および神経細胞などを用いることにより90種類のヒト型糖鎖を同定した。また細胞により生産された糖鎖を自動合成装置(Golgi™)で再修飾する方法を検討し、シクロデキストリンによる水溶性の向上や水溶性ポリマーサポート法の応用などを確立した。ヒト型糖鎖の大量合成技術の開発は4種類の方法を使用して検討しているが、マイクロキャリア法では細胞別に培養条件を検討し、10mg以上の糖鎖生産に成功した。ハムスター法ではハムスターで増殖したヒト細胞を用いて糖鎖生産方法を確立した。チオグリコシド法はチオグリコシドプライマーを用いて効率的に糖鎖を合成する方法で収率50%増を達成した。中空糸法は細胞培養に適する素材を細胞別に選択し、血清培地とプライマーの繰り返し投与により、6ヶ月以上の細胞培養に成功し、連続した糖鎖生産に用いている。また、阻害剤の添加で天然糖鎖合成を阻害することにより、プライマーを原料としたヒト型糖鎖生産量が増加されることも判った。

糖鎖の効率的精製に関しては、安価なポリスチレン系吸着剤を用いて、大量の培地より生産糖鎖を効率的に濃縮する方法を確立した。また液液分配クロマトグラフィーを用いて個々の糖鎖の精製法も確立した。フルオラスタグを有する糖鎖プライマーを種々合成し、細胞による糖鎖生産に用いることによって、フルオラスシリカによる分離精製を検討した。糖鎖高分子および糖鎖 dendrimer 作成技術の開発では、細胞により生産したアジドアルキル化糖鎖を用いて、a.糖鎖高分子を合成した。b.クリック反応を用いて種々の官能基を導入可能となった。c.材料表面への直接固定化を実施できた。また、アミド結合型糖鎖 dendrimer の合成にも成功した。

病原体・毒素除去装置の開発では電子線グラフト重合法、アミノ基含有糖鎖を利用した2段階固定化法など中空糸に糖鎖を固定化する技術が確立出来た。また、Gb3を固定化した中空糸モジュールを試作し、ペロ毒素を実用化レベルまで除去出来ることを見出した。さらに、性能評価手法の開発にも取り組み、バッチ法、循環法を確立した。

4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度
実績額推移 一般会計(百万円)	1,190	1,117			
特許出願件数(件)	14	12			
論文発表数(報)	51	64			
フォーラム等(件)	—	1			

5. 事業内容

研究開発項目①～③については、独立行政法人 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター センター長 成松久氏を、研究開発項目②及び④については東京大学・国際・産学共同研究センター 教授 畑中研一氏をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発を実施する。実施体制については、別紙を参照のこと。

5. 1 平成20年度事業内容

(1) 研究開発項目①「糖鎖マーカーの高効率な分画・精製・同定技術の開発」

疾患の臨床診断や再生医療技術開発を実施する上で、臨床検体等生体試料中に微量に含まれる糖鎖マーカーを高効率に分画・精製し、必要に応じて同定するために、以下の技術開発を行う。

- ① 生体試料の前処理システムの確立
レクチンアレイ、質量分析、あるいは免疫科学的な分析法に供するため、前年度までに開発してきた生体試料前処理システムを確立する。すなわち組織切片、血液細胞、腹腔洗浄液等の具体的な生体試料にたいして、個々に前処理法を確立する。
- ② 抗体を用いるエンリッチメント
継続してマーカー糖鎖をキャリアするタンパク質を、バイオインフォーマテックス技術による絞り込み、対応する抗体を利用したエンリッチメントシステム、測定システムの整備を進める。
- ③ 硫酸化糖タンパク質のエンリッチメント
引き続き硫酸化糖ペプチドの濃縮技術を進展させ、システムを確立する。
- ④ キャピラリー電気泳動
マーカー探索のための糖ペプチド解析手法の改良をすすめ、研究項目②および③より提供される試料から各種疾患マーカー候補を探索する。
- ⑤ レクチンアレイ
継続して、抗体を用いたレクチンアレイ改良技術の開発をすすめる。さらに、前年度に引き続き、従来法にて、研究項目③にて開発される各種腫瘍マーカー等を従来のレクチンアレイシステムを用いて探索評価の支援を継続する。
- ⑥ 糖鎖の質量分析
質量分析を用いた硫酸化糖鎖の分析技術を進めるほか、研究項目②および③より提供される未知糖鎖の構造決定を実施する。
- ⑦ 糖タンパク質の質量分析
これまで、線虫、マウスで進めてきた、糖タンパク質糖鎖付加位置検証をヒト糖タンパク質にて実施し、疾患糖鎖マーカー開発の支援をする。
- ⑧ 発現解析による糖鎖構造予測
臨床検体の糖転移酵素発現を核酸レベルで解析することによる糖鎖疾患マーカー検出技術の構築を継続する。

(実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

(2) 研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

A. 「ノックアウトマウス関連研究開発」

糖鎖改変による糖鎖の生物学的機能解析を実施する。すなわち、糖鎖合成関連遺伝子を導入・削除して糖鎖を改変した動物・細胞株を多数樹立し、糖鎖改変による細胞機能・生体機能の変化を生化学的、生物学的、病理学的に解析することで糖鎖機能を解明する。さらに、ヒト型糖鎖ライブラリーを用いた機能解析を実施する。すなわち、多様な糖鎖および糖鎖複合体等を用い、糖鎖及び糖鎖複合体と病原体表面蛋白質等との相互作用認識解析技術等を開発することにより、有用な糖鎖および糖鎖機能を見出す。

① ノックアウトマウス関連研究開発

前年度に引き続き、疾患関連糖鎖合成にかかわる糖転移酵素のノックアウトマウスについて、その作成・養育を実施し、発現型の解析を継続する。中でも免疫に関連する酵素のKOマウスについては特に解析範囲を拡大して実施する。

② 糖鎖アレイチップ

糖鎖アレイチップについては、感度を重視した方向で、システムを統合して開発を進める。さらにノロウイルスを中心とするウイルスタイプの解析による診断技術開発については、研究項目③において実施する。

(実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

B. 「病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明」

これまで、検出デバイス開発のため、市販の糖鎖アレイを用いた解析系について検討を重ね、破傷風毒素とボツリヌス A 型 12S 毒素と相互作用する糖鎖のスクリーニングを行った。今後、プロジェクト内で細胞を用いて合成した糖鎖を用いて、破傷風毒素、ボツリヌス A 型 12S 毒素および他の細菌や毒素との相互作用を解析する。糖鎖利用診断システムの開発については、局在 (LSPR) デバイスの金基板表面への修飾法の検討を重点的に実施し、プロジェクト内で合成した Gb3 をチオール法で固定化し、ペロ毒素 B サブユニットの特異的結合を測定した。今後、金コロイド表面にリポゾーム法で糖鎖を固定化する手法を検討し、Gb3/ペロ毒素 B サブユニット系で局在表面プラズモン共鳴法 (LSPR) センサデバイスの有用性を評価する。また、プロジェクト内で細胞により合成された糖鎖も順次評価していく。

(実施体制：(財)化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター)

(3) 研究開発項目③「糖鎖認識プローブの作製技術の開発」

ここでは、以下の技術開発を行う。

A. 疾患糖鎖マーカー認識プローブの開発

B. 糖鎖関連疾患の診断技術開発

A. 疾患糖鎖マーカー認識プローブの開発

臨床検体等の生体試料中の糖鎖マーカーを特異的に高い親和性を持って認識するための糖鎖/糖蛋白質認識プローブを作製するための技術開発と、それに必要な糖鎖/糖ペプチド/糖タンパク質の作製を継続する。また、作製した糖鎖/糖ペプチドは、糖鎖アレイにも利用する。具体的には下記の項目を継続実施する。

① フェージライブラリー法による糖鎖認識プローブ開発

集中研より供給した抗原標品を用いて、改良スクリーニング方による糖鎖プローブ作製を継続して実施する。

② 糖鎖合成酵素ノックアウトマウスを利用した抗糖鎖抗体分子の開発

複数の癌種について癌細胞を認識する抗体の開発を継続して実施する。

③ B1細胞を利用した抗糖鎖抗体の開発

複数の癌種について癌細胞を認識する抗体の開発を継続して実施する。

④糖鎖、糖ペプチドの合成

①～③に必要な糖鎖／糖ペプチド／糖タンパク質の作製、供給を継続して実施する。

B. 糖鎖関連疾患の診断技術開発

癌マーカー開発を中心とし、その他にも糖鎖関連疾患として、IgA腎症、アルツハイマー病、ノロウイルス、の診断、再生医療における治療用細胞評価の標準化、さらに、糖鎖を利用した遺伝子治療技術等を含んで、糖鎖関連診断技術の開発を本項目で進める。具体的には下記の項目について開発を進め、開発の進んだ項目については順次評価に供する。

①各種腫瘍

・子宮体部腫瘍

子宮体部腫瘍血清から、複数の候補糖ペプチドの選定を達成したので、その絞り込みと有効性の検証に着手する。

・卵巣腫瘍

ステージIaの粘液性がん、明細胞がんを検出できる系を作製したことから、例数を増やして有効性の検証に着手する。

・肺腺癌

組織アレイによる解析を行い、肺腺癌の予後不良が予測可能となったので、例数を増やして検討する。

・内分泌系腫瘍

不定愁訴の原因となるカルチノイドや、褐色細胞腫、ラ氏島腫瘍等、甲状腺髄癌、検出を継続して実施する。

・胃癌の腹腔内進展

レクチンアレイによる候補分子の選定を達成したので、その有効性検証に着手する。

・肝臓癌、大腸癌および前立腺癌

複数の候補分子選定を達成したことから、その絞り込みを進める。

・胆道系腫瘍

候補分子選定を継続する。

②その他の疾患等の診断他

・ IgA腎症

IgA腎症患者由来のヒンジペプチド調製と糖鎖分析法の統一的処理基準を確立したことから、患者に特徴的な糖鎖としての候補分子の選定を継続して実施する。

・アルツハイマー病、正常圧水頭症

アルツハイマー病と正常圧水頭症の分別可能な糖鎖関連マーカーの開発を継続する。

・子宮内膜症

卵巣癌との差別化可能なマーカーについて知見を得たことから、候補分子の絞り込みを進める。

・ノロウイルス

糖鎖アレイチップを用い、ウイルスの血液型抗原認識のタイプ間の相関検証を進める。

・間葉系細胞を利用した再生医療

間葉系幹細胞の規格化について、ヒト細胞の規格化を継続して実施する。

・糖鎖を利用した遺伝子治療

糖鎖を変化させたレトロウイルス産生細胞につき、感染力価と、ビトロネクチン親和性測定を継続して実施する。

(実施体制：産総研糖鎖医工学研究センター、バイオテクノロジー開発技術研究組合)

加えて抗CS抗体やファージ抗体エピトープの種々のヒト培養癌細胞での発現の有無、エピトープ発現癌細胞の増殖、浸潤などに対する阻害効果を評価する。新たに作成したマウス肺癌細胞株由来グリコサミノグリカン(GAG)標品に対する抗体とCS-E/CS-H抗体の特異性や癌細胞に対する反応性を解析する。マウス骨肉腫細胞由来GAGに対するマウス単クローン抗体の作成を継続する。ファージディスプレイ抗体をスクリーニングし、抗GAG抗体が得られれば、その特異性を解析する。

(実施体制：北海道大学)

(4) 研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

糖鎖の種類を増やす技術開発では細胞とプライマーの種類を検討することにより90種類以上のヒト型糖鎖を同定したが、今後、これまでの知見および糖鎖自動合成装置での糖鎖の再修飾法の確立、加水分解酵素、糖転移酵素の応用による糖鎖の再修飾、遺伝子導入による酵素生産や細胞改変などにより10種類以上の糖鎖を同定する。糖鎖の大量合成技術の開発は4種類の方法を使用して検討しているが、マイクロキャリア法、ハムスター法、チオグリコシド法、中空糸培養法の4種類を検討中。それらの方法の利点を生かし、有用と考えられる20種類の糖鎖のスケールアップ検討(10mgスケール)を実施予定。また、特に効果のある糖鎖の大量合成検討(1gスケール)を試みる。

糖鎖の効率的精製検討ではカラムクロマト、イオン交換クロマトなどの分離技術の確立を行うと同時に高速液体クロマトグラフィ(HPLC)での分離分析技術の確立を目指す。また、フルオラスタグを有する糖鎖プライマーを合成し、細胞を用いたバイオコンビナトリアル合成により得られた糖鎖生成物のフルオラスシリカによる分離法を検討する。糖鎖高分子や糖鎖 dendriマーの合成検討は、細胞を用いて生産したアジドアルキル化糖鎖のクリック反応やアジド基をアミノ基に変換してからの縮合反応を用いて糖鎖ポリマー・糖鎖 dendriマーを合成し、その機能を解析する。

病原体・毒素除去装置の開発では電子線グラフト重合法、アミノ基含有糖鎖を利用した2段階固定化法など中空糸に糖鎖を固定化する技術が確立でき、ベロ毒素を実用化レベルまで除去出来ることがわかったので今後、金型を用いて中空糸モジュールを作製し、Gb3などの糖鎖の固定化を実施し、性能評価を行うと共に生物学的安全性試験の実施、動物を用いた有効性の評価を行う。

(実施体制：(財)化学技術戦略推進機構、産業技術総合研究所・北海道センター)

(5) 総合調査研究

(1) 研究項目①～③

本プロジェクトを効率的に推進するため、共同研究の実施・推進、研究開発進捗状況の検討・調整を行う研究開発委員会及び分科会(エンリッチ・分析分科会、IgA腎症分科会、ノックアウトマウス関連分科会、再生医療・生殖分科会、糖鎖チップ・アレイ・感染症分科会、プローブ関連分科会、腫瘍マーカー関連分科会)の開催、内外の最新技術調査、開発情報収集の実施、成果報告書作成、外部発表等を実施する。特に、糖鎖科学コンソーシアムシンポジウムや糖質学会などの学会を通じて国内の第一線の研究者と合同して該研究分野の最新の情報収集を図るとともに、糖鎖構造解析、糖鎖合成、糖鎖関連酵素、糖鎖機能等の分野の専門家から技術指導を適宜受ける。

(実施体制：バイオテクノロジー開発技術研究組合)

(2) 研究項目④及び②の一部

総合調査研究委員会を2回開催し、外部有識者委員から技術指導を受ける。また、関連する外部の研究開発状況などを把握し、適切な研究推進を図る。

(実施体制：(財)化学技術戦略推進機構)

5. 2 平成20年度予算規模

一般会計 950百万円(継続・委託事業)
事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

NEDO 技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年度に、事後評価を平成23年度に実施する。

(2) 運営・管理

①当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

②委託先において、プロジェクトリーダー、各研究開発項目に係わるチームリーダー、関連研究分野の有識者等を委員とした研究開発委員会を年2回以上開催する。

6. スケジュール

平成20年 7月： 中間評価
12月： 研究開発推進委員会

「糖鎖機能活用技術開発」実施体制図

