

平成 2 1 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) 健康安心イノベーションプログラム
(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

3. 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。

3. 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つける。

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「糖鎖マーカーの高効率な分画・精製・同定技術の開発」

生体試料から、既知の糖鎖マーカーである糖タンパク質10種類以上、未知の糖鎖マーカー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種類の糖鎖マーカー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つける。

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・生産技術研究所 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20年度までの事業内容

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」

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ー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。これまでに本項目にて、糖タンパク10種以上の基本的な分画・精製・同定技術を確立し、中間目標を達成した。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を最適化し実践に供した。また、上記最適化した条件をもとに自動エンリッチシステムの仕様を決定した（試作機はモリテックスが開発）。

(2) 抗体を用いるエンリッチメント

マーカー糖鎖をキャリアするタンパク質を、B I O - I T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最適化し実用研究に適用した。

(3) 硫酸化糖タンパク質のエンリッチメント

硫酸化糖タンパク質、酸性糖タンパク質（ムチン）の分離・検出システム（SMME法）の開発を行った。

(4) キャピラリー電気泳動

マーカー探索糖ペプチド解析手法の検討、および、がん細胞由来 O-結合型糖鎖ライブラリーの構築を行った。

(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、IgA ヒンジ糖鎖、肝内胆管癌等、研究開発項目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達成し、研究開発項目②および③より提供される数種の生体試料に由来する糖タンパク質糖鎖の糖鎖構造を解析した。

(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、培養細胞を中心にヒト糖タンパク質にて実施し、マーカー候補糖タンパク質の同定と N-結合型糖鎖の付加位置を網羅的に同定した。

(8) 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、各種ヒト培養細胞に応用した。

(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)

研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

(1) 「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。これにより、遺伝子改変動物 20、遺伝子改変細胞株 50、50 程度のヒト型糖鎖、糖鎖機能 10 種の間目標を達成。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。

(ア) ノックアウトマウス関連研究開発その他

糖鎖遺伝子プロジェクトで新規に発見した糖転移酵素の中から、ヒトの疾患との関連が示唆される遺伝子のノックアウトマウスを作製し、それらを用いて *in vivo* での糖鎖機能解析を行った。これまでに、筑波大学との共同で 11 遺伝子のノックアウトを行っており、ノックアウトマウス作製はほぼ終了し、それぞれのマウスで表現型の探索を行った。胎生致死の表現型を示したものは、発現組織をリアルタイム PCR と免疫組織染色により明らかにし、*cre-loxP* システムを用いた組織特異的なノックアウトマウスを作製した。また、ノックアウトマウスに化学的に疾患を導入するなど、糖鎖不全とヒトの疾患の関連を解析する試みも行っている。また、再生医療については、ヒト胚性幹(ES)細胞および間葉系細胞について、未分化・分化状態におけるマーカー指標を得た。

(イ) 糖鎖アレイチップ

アレイ・チップなど固定化用糖鎖ライブラリーの構築として、簡便にバリエーションを増やすことが可能な糖転移酵素を利用した糖鎖合成をおこなっている。平成 20 年度の成果として、高スループット性・高感度検出を目的としたアレイ作製用糖鎖ライブラリー、硫酸化の量と位置が異なる各種 GAG 糖鎖、そして、感染症研との共同で進めているノロウイルスの糖鎖認識特異性解析に関する血液型糖鎖抗原を有するビオチン化糖鎖ライブラリーなど 50 種類の糖鎖合成を行った。また、エバネッセント波励起蛍光検出系糖鎖アレイの試作・検証の基礎検討として、モノバレント糖鎖での固相化検討およびマルチバレント誘導体化・固定化・検出についても基礎検討を行った。

糖鎖アレイ・チップの応用として、ノロウイルスの糖鎖認識特異性に関して、糖鎖ライブラリーを用いた BIAcore 解析により血液型抗原に対する特異性の違いを明らかにした。三菱化学との共同で作製した GAG 固定化モノリスカラムを用いて、モデル GAG 結合性生理活性分子による吸着・溶離試験を行い、質量分析による解析を行った。(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) 「病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明」

産業上有用な毒素・病原体と糖鎖の相互作用解明や病原性ウイルス等の精製法を確立した成果は、診断システムや血液浄化装置開発に役立った。また、糖鎖固定化条件の最適化、糖鎖を固定した局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) デバイスの作製により糖鎖利用診断システムの開発に目処をつけた。

(ア) 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やボツリヌス A 型 12S 毒素と糖鎖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装置 (SPR) により解析し、破傷風毒素において新たに 2 つの毒素-糖鎖結合を同定した。HCV のエンペロープ蛋白を精製すると共に HCV 細胞系からのウイルス部分精製法を確立した。また、HBV 持続産生細胞株を樹立し、培養上清からウイルス抗原を部分精製した。さらに、HIV のエンペロープ蛋白、感染性粒子の産生細胞株を作製し、エンペロープ蛋白を取得した。

(イ) 糖鎖利用診断システムの開発

(モデル) 糖鎖固定化条件の最適化を行った。また、糖鎖固定化材料表面への非特異吸着を抑制する技術を確立するとともに、糖鎖を固定化したチップの作製技術を確立した。さらに、確立した技術に基づき、(モデル) 糖鎖を固定した局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) デバイスを作製し、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)

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 (1) 及び (2) の技術開発を行った。これらの検討の中で、数個の実用化可能なマーカーを見いだして、検証を進めており、中間目標を達成している。

(1) 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。

(ア) フェージライブラリー法による糖鎖認識プローブ開発

がん関連糖鎖や I g A 関連糖鎖など、キーとなるいくつかの糖鎖・糖タンパク質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昨年引き続き実施した。さらに、得られた一本鎖抗体遺伝子を IgG 型に変換して発現させ、特異性を評価した。

(イ) 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。得られた抗体の認識エピトープ解析を行った。

(ウ) B 1 細胞を利用した抗糖鎖抗体の開発

B 1 細胞由来のモノクローナル抗体パネルを作製し、いくつかのがん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。さらに糖鎖アレイを用いて抗体エピトープの解析を行った。

(エ) 上記の (ア)~ (ウ) に必要な糖鎖/糖ペプチド/糖タンパク質の作製、供給し

た。

(2) 上記を基盤とする疾患マーカー利用診断技術の開発

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、I g A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。

(ア) 各種腫瘍

i) 子宮体部腫瘍

これまでに得られたマーカー候補分子について検証を行ない、Stage IIにある子宮体癌患者の発見に有用である事を見いだした。

ii) 卵巣腫瘍

臨床検体を系統的に解析する事で、Stage I期の卵巣癌患者の検出に有用である事を見いだした。

iii) 肺腺癌

肺がん60症例を解析する事で、見いだしていたバイオマーカーが肺腺癌を検出できる有用なマーカーである可能性が明白となった。

iv) 内分泌系腫瘍

甲状腺腫瘍 (papillary carcinoma) で、発現が上昇する糖タンパクを同定した。

v) 胃癌の腹腔内進展

見いだした候補分子における解析をすすめ、糖鎖の果たす役割を明らかにし、治療標的となる分子の可能性も見いだした。

vi) 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た。とくに、繊維化の進展を評価することで、肝炎から癌に至るステージを階層化できる血清バイオマーカーシステムを構築した。

vii) 胆道系腫瘍

候補分子選定を継続して行い、グライコプロテオミクスを実施し、胆道系腫瘍マーカー候補分子を多数、同定することができた。これらのうちから、腫瘍の発生と進展に相関する分子を見いだしつつある。

(イ) その他の疾患等の診断他

i) I g A腎症

I g A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を行い解析を実施した。

ii) 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候補について解析した。

iii) 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た細胞につき、感染力価と、ビトロネクチン親和性測定し、糖鎖修飾による効果を確認した。

(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、コンドロイチン硫酸を認識する抗体につき患者の疾患部位染色性を確認した。
(実施体制：北海道大学)

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ための細胞の探索、複雑な構造の糖鎖を製造するための糖鎖の修

飾、ヒト型糖鎖の大量合成に適する新規プライマーの開発、糖鎖の大量合成方法の開発の成果により、中間目標であるヒト型糖鎖の大量合成技術の開発に目処をつけた。また、糖鎖の固定化技術の開発および糖鎖ポリマーを固定した毒素除去用の中空糸を開発したことで、中間目標である産業上有用な新規糖鎖材料の開発に目処をつけた。

(1) 糖鎖の種類を増やすための細胞の探索

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 94 種類のヒト型糖鎖を同定した。

(2) 複雑な構造の糖鎖を製造するための糖鎖の修飾

細胞法で用いられる糖鎖プライマーは脂溶性脂質部を有しているため、糖鎖自動合成装置(Golgi™)の基本システムである糖転移酵素法を用いて大量合成展開する際に化合物の溶解性が問題となるが、シクロデキストリン(CD)を添加することによって解決できることを発見した。この新たな手法により、細胞法によって調製される 10mg 以上のスケールのアジドアルキルグリコシド体が糖鎖自動合成装置(Golgi™)において利用することが可能となった。さらに、糖転移酵素を大量に調製し、実際に細胞が生産した糖鎖に作用させることによって糖鎖再修飾を施し、数種類の新しい糖鎖を得た。

(3) ヒト型糖鎖の大量合成に適する新規プライマーの開発

プライマーとしてチオグリコシドを用いる方法により、6 種類の細胞に関して糖鎖伸長物の収率を 50%増加できることを実証した。また、新規プライマーを利用した GM3 型糖鎖固定化材料を作製し、インフルエンザウイルスとの相互作用を調べた。

(4) 糖鎖の大量合成方法の開発

ハムスター法では、ハムスターで増殖したヒト浮遊細胞を用いて 100L スケールで糖鎖の大量合成を実施し、46mg の糖鎖伸長生成物を得た。

中空糸膜法では、半年以上の連続細胞培養の達成に加えて、マイクロキャリアとの組み合わせにより細胞増殖を高める方法を開発し、糖鎖の安定供給が可能となった。

また、阻害剤で天然糖鎖合成を阻害してプライマー由来の糖鎖生産量を増加できること、糖鎖生産は細胞懸濁液でも可能であることを見いだした。10mg オーダーの糖鎖生産に関しては現在 11 種類を合成済みで、新たに 10 種類の合成に着手している。

(5) 糖鎖伸長生成物の効率的分離精製技術の開発

安価な合成吸着剤を用いて大量の培地中から糖鎖を効率的に濃縮する方法、遠心液液分配クロマトグラフィーによる糖脂質類似化合物の分離・精製法を確立した。さらに、イオン交換樹脂で酸性糖鎖画分のみを容易に分離する技術を確立した。またフルオラス固層抽出による糖鎖伸長生成物の精製を行った。

(6) 糖鎖高分子、糖鎖 dendrimer 作成技術の開発

細胞が生産した糖鎖を用いて糖鎖高分子を合成すると共に、MPC (リン脂質を含むモノマー)との共重合体を合成し、これが細胞内のゴルジ体に運ばれることを発見した。さらに細胞で生産したアジドアルキル化糖鎖に種々の官能基を導入し、材料表面へ直接固定化する技術を開発した。また、アジドアルキル化糖鎖を還元して得られるアミノ基を有する化合物を用いてアミド結合型糖鎖 dendrimer を合成した。

(7) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発

電子線グラフト重合法を用いて糖鎖固定化技術を確立し、Gb3 固定化中空糸モジュールを試作した。また、固定化糖鎖の性能評価に必要な試験法 (バッチ法、循環法)を確立した。Gb3 固定化中空糸はベロ毒素 VT1 を 99%以上除去した。また 2 段階固定化法の開発により、同 VT2 の除去率も 99%以上とすることに成功し、除去目標を達成した。

(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)

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 一般勘定（百万円）	1,190	1,117	948		
特許出願件数（件）	14	12	17		
論文発表数（報）	51	64	33		
フォーラム等（件）	—	1	5		

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 成松久氏のプロジェクトリーダーのもと、体制を見直し、当面30の共研先、2カ所の研究協力先と連携協力して以下の研究開発を実施し、さらに実用化に向けて体制を検討する。また、研究開発項目②及び④については東京大学・生産技術研究所 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。糖鎖の専門家以外の医学生物学・臨床等の専門家から成果の実応用に向けて必要となる情報を収集するとともに、必要に応じて適任者を体制に取り込むことも検討する。実施体制については、別紙を参照のこと。

5. 1 平成21年度事業内容

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、平成20年度までに最適化、仕様決定し試作機を作製したエンリッチ自動化装置を、実践に供することでシステムの検証作業を行い、適宜改良を行う。

(2) 抗体を用いるエンリッチメント

各種疾患におけるマーカー候補の同定に引き続き、抗体によるエンリッチを実践する。適宜、上記自動エンリッチシステムへの適用を検討し、試作機の性能が十分と判断される場合は、中規模（n>100）検証実験に導入し、高効率エンリッチメントシステムとしてのプロトコル確立を急ぐ

(3) 硫酸化糖タンパク質のエンリッチメント

平成20年度に開発した SMME 法の生体試料への応用実験を推し進め、手法の実証性を高めるとともに、スケールアップや各試料に対する最適化を含め系の応用範囲を検討する。

(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推し進めるとともに、腫瘍マーカーとなる可能性のある O-結合型糖鎖ライブラリーを整備拡張する。

(5) レクチンアレイ

確立した抗体を用いたレクチンアレイ改良技術（抗体、およびレクチンオーバーレイ法）を実践適用することでマーカー候補糖タンパク質の確認、絞り込みを行う。適宜(1)の自動エンリッチメント装置との適合性を図る。

(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、研究開発項目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

糖タンパク質糖鎖付加位置の検証を、ヒト培養細胞（がん細胞）糖タンパク質に実践

適用する。また、研究開発項目②および③との連携をより密に行うことで、がんマーカー候補の網羅的同定を加速度的に推し進める。

(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の糖鎖構造生成の理論的サポートを強固にするとともに、発現レベルから予測しうる糖鎖マーカーの開発を継続検討する。

(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)

研究開発項目②「糖鎖の機能解析・検証技術の開発」

(1) 「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いだす。

(ア) ノックアウトマウス関連研究開発その他

平成20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、その作製・飼育・維持を実施し、発現型の解析を継続する。作製した糖鎖遺伝子ノックアウトマウスはレクチンや質量分析装置を用いて糖鎖構造変化を検出する。表現型の現れたものは、ヒトの疾患病態との関連のもと、その責任分子を生化学的手法・グライコプロテオミクス的手法を用いて同定し、糖鎖の生体機能を分子レベルで解明する。表現型の見られないものは、生物的・化学的介入を積極的に行い、特に疾患に関わる糖鎖機能解析を行う。再生医療については、引き続きヒト幹細胞における検討を進める。

(イ) 糖鎖アレイチップ

合成糖鎖を用いたアレイのプロトタイプを作製し、試作糖鎖アレイの応用として、抗糖鎖抗体のエピトープ決定、ノロウイルスの特異性解析などへの有用性を検証する。また、さらに複雑な硫酸基修飾 GAG 糖鎖を含む固定化用糖鎖構造のバリエーションについても拡充する。

(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) 「病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明」

産業上有用な毒素・病原体と糖鎖との相互作用のスクリーニング及び、毒素やウイルスを精製し、表面プラズモン共鳴装置(SPR)等を用いた詳細な解析を実施する。糖鎖利用診断システムの開発は、糖鎖を固定した LSPR センサデバイスを作製してターゲットとなる病原体・毒素と糖鎖の相互作用を評価し、競合品(糖鎖を利用しない既存品も含めて)と診断精度や経済性を比較検討も併行実施し、必要な場合は、研究開発方針の転換も検討する。

(ア) 病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明

これまで、診断システム、血液浄化装置開発のため、市販の糖鎖アレイおよび表面プラズモン共鳴装置(SPR)を用いて、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、糖鎖と破傷風毒素、ボツリヌスB型16S毒素、および他の病原体(ヒトポリオーマウイルス、呼吸器系感染関連の毒素・細菌など)との相互作用を市販の糖鎖アレイを用いてスクリーニングする。そして、病原体・毒素と糖鎖の詳細な相互作用については、肝炎ウイルス、クロストリジウム神経毒素などの精製を行い、SPR等を用いて解析する。

(イ) 糖鎖利用診断システムの開発

国立感染症研究所との連携を強化し、細胞培養法により調製した種々の糖鎖を固定化したLSPRセンサデバイスの作製と、ターゲットとする病原体・毒素の結合評価を進める。ウイルスやトキシンの臨床検査については、本開発技術（LSPR法）が実用上、競合品よりも優れている点を示し、これを実証する。並行して、既存品（糖鎖を利用しない既存品）と診断精度や経済性等を比較し、糖鎖利用診断のポジショニングを明確にする。

（実施体制：（財）化学技術戦略推進機構、東京大学、慶應義塾大学、東京工科大学、産業技術総合研究所・北海道センター）

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（１）及び（２）の技術開発を行う。

（１）疾患糖鎖マーカー認識プローブの開発

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。

（ア）フェージライブラリ法による糖鎖認識プローブ開発

作製した一本鎖抗体の発現系の検討、認識エピトープの解析など、抗体の評価を行う。また、引き続き集中研より供給した抗原標品を用いて、スクリーニングを実施する。

（イ）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。がん組織切片を用いて免疫組織染色を行い、得られた抗体の評価を実施する。

（ウ）B 1 細胞を利用した抗糖鎖抗体の開発

得られた抗体の評価を免疫組織染色、糖鎖アレイなどで実施する。

（エ）既存バイオマーカーの改良

性能アップが期待される既存プローブの改良を、新規に専門の機関を体制に加えることにより従来に加速して実施する。

（オ）抗グリコサミノグリカン抗体の開発

いくつかの抗グリコサミノグリカン抗体を開発し、疾患組織との反応性を検討する。

（カ）糖鎖、糖ペプチドの合成

（ア）～（オ）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。

（２）疾患マーカー利用診断技術の開発

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、アルツハイマー、正常圧水頭症、輸血副作用の診断を含んで、糖鎖関連診断技術の開発を対象疾患の重点化しつつ本項目で進める。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。その際には平成21年より変更される臨床研究に関する倫理指針に対応した、バイオマーカーのバリデーションを実施できる体制を構築し実施する。

（ア）各種腫瘍

i) 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。

ii) 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。

iii) 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し、さらに臨床サンプルの解析機器を整備して加速する。

iv) 肺小細胞癌

高感度解析系を整備し、選抜したマーカー候補の有用性検討を加速する。

v) 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。

vi) 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。

vii) 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。さらに、この絞り込みを効率的に実施すべく、検査専門機関を新たに体制内に加え、有効性の実証までを加速して進める。特に前立腺癌については、臨床サンプルの解析機器を整備し、マーカー開発を加速する。

viii) 胆道系腫瘍

候補分子選定を継続する。

(イ) その他の疾患等の診断他

i) 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の症例数を増やして継続する。

ii) 輸血副作用

輸血副作用の原因究明と防止のための抗原マイクロアレイの開発を実施する。

iii) 腎疾患

臨床サンプルの解析機器を整備し、マーカー開発を加速する。

(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)

研究開発項目④「糖鎖の大量合成技術の開発」

細胞培養して得られた糖鎖や修飾された糖鎖の中から有用な糖鎖の見極めや絞込みを行い、スケールアップ培養、精製を検討する。少なくとも1種類はグラム単位的大量生産が可能な大量製造スキームを産業化の観点から示す。病原体・毒素除去装置の開発については、Gb3固定化モジュールを用いたベロ毒素除去の実用性、安全性試験を実施する。また有用性の高いメディカル資材等への応用を検討する。

(1) 糖鎖の種類を増やすための細胞の探索

これまでに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、これらの中から既に着手している糖鎖とウイルス・毒素との相互作用の研究を進め、糖鎖の専門家以外の医学生物学・臨床等専門家からの意見も参考にして有用となる糖鎖の見極めや絞込みを行い、有用糖鎖の合成効率を高めるための細胞培養条件を確立する。

(2) 複雑な構造の糖鎖を製造するための糖鎖の修飾

非天然型有用糖鎖をはじめとした細胞法によってカバーしきれない種類の有用糖脂質に関しては、酵素反応や糖鎖自動合成装置(Golgi™)を用いて糖鎖再修飾を行い、合成する。

(3) ヒト型糖鎖の大量合成に適する新規プライマーの開発

新規プライマーを利用した有用性の高いメディカル資材等への応用を検討する。

(4) 糖鎖の大量合成方法の開発

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) の実施を予定する。ターゲットとしては相互作用する可能性が高いガングリオシド等の酸性糖脂質を大量に合成する。また、ヒト細胞を培養して得られる有用糖鎖の少なくとも 1 種類の糖鎖について、グラム単位の大量生産が可能な大量製造スキームを、産業化の観点から示す。

(5) 糖鎖伸長生成物の効率的精製検討

構築した安価な合成吸着剤による大量の培地中からの糖鎖の効率的濃縮、遠心液液分配クロマトグラフィーによる糖脂質類似化合物の分離・精製、さらに、酸性糖鎖画分のみを容易に分離するイオン交換樹脂による分離技術やフルオラス固相抽出による精製法を大量生産される糖鎖化合物の精製に応用すると同時に、多種の糖鎖に対応できる精製方法を確立する。

(6) 糖鎖高分子および糖鎖 dendrimer 作成技術の開発

新規糖鎖高分子および糖鎖 dendrimer を合成し、バックボーンの形状などの違いによる機能性の差異 (毒素との相互作用など) を検討する。

(7) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発

電子線グラフト重合法による Gb3 固定化条件の最適化を図り、Gb3 固定化モジュールを用いたベロ毒素除去の実用性、安全性試験を実施する。また、その他の毒素やウイルスの除去対象についても除去検討を行う。糖鎖を利用した病原体及び毒素除去カラムは現在競合品がないことから、新たな市場開拓に向けて実証試験を進める。一方、既存品 (糖鎖を利用しない既存品) と診断精度、経済性の既存品との比較検討も併行実施し、必要な場合は、研究開発方針の転換も検討する。

(実施体制：(財) 化学技術戦略推進機構、東京大学、慶應義塾大学、埼玉大学、産業技術総合研究所・北海道センター)

研究開発項目⑤ 総合調査研究

(1) 研究開発項目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、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、開発情報調査収集の実施により、迅速な研究進捗と効率的な知財整備に貢献する。さらに、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) 研究開発項目④及び②の一部

総合調査研究委員会を 2 回実施し、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。パテントマップを見直して、特許戦略を再構築すると共に、糖鎖の産業利用について、大量生産可能な糖鎖の新規産業利用の情報発信・獲得を目的としたシンポジウムの開催 (学会内開催を含む) 等を企画する。

(実施体制：(財) 化学技術戦略推進機構)

5. 2 平成 21 年度事業規模

委託事業

一般勘定

981 百万円 (継続)

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) 運営・管理

(ア) 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。

(イ) 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。

(2) 複数年度契約の実施

平成21～22年度の複数年度契約を行う。(但し、(財)化学技術戦略推進機構、東京大学、慶應義塾大学、東京工科大学、埼玉大学及び産業技術総合研究所・北海道センターに対しては、平成21年度のみ単年度契約とする。)

7. スケジュール

本年度のスケジュール：平成21年12月・・・研究開発推進委員会

8. 実施方針の改定履歴

- (1) 3月5日、制定。
- (2) 6月9日、分担研究先の事業譲渡により改訂(実施体制)。
- (3) 8月25日、委託先選定(追加)により改訂(実施体制)。
- (4) 12月21日、加速予算の追加に伴う変更。

「糖鎖機能活用技術開発」実施体制図

