

平成 2 2 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 2 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・同定する技術を確認する(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・同定する技術を確認する。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・同定する技術を確認する。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）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った。

(1) 生体試料の前処理システムの確立

複雑な組成を有する血清等の生体試料をレクチンアレイや質量分析などの糖鎖解析技術に供するため、平成20年度までに作製したGPバイオサイエンス社製を用い、さまざまな角度からの検証を行うとともに改良を施し、実用レベルに耐えるプロトコール開発を行った。

(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した。上記自動エンリッチシステムを用いて抗体ビーズを用いたエンリッチメントの有効性をほぼ達成することができた。カラム法についてもトライし問題点を洗い出した。

(3) 硫酸化糖タンパク質・ムチンの解析手法の開発

平成20年度に開発したSMME法の生体試料への応用実験をさらに推し進め、ムチンや硫酸化糖鎖について手法の効力を確認するとともに、実試料を用いた応用研究に積極的に着手し、本手法の有効性について確認した。

(4) キャピラリー電気泳動

各種癌細胞やノックアウトマウス由来の細胞を解析するとともに、O-結合型糖鎖ライブラリーの拡大を進めた。また、最小糖鎖単位である Tn (GalNAc α) をも回収し定量解析ができるシステムを確立した。

(5) レクチンアレイ

各種マーカー候補糖タンパク質の前検証段階において、エンリッチメントデバイスの性能評価と、抗体オーバーレイ法によるレクチンアレイ技術のブラッシュアップ、さらにレクチンマイクロアレイと類似の形態を持つ ELISA 法への落とし込みを、マーカー開発の進展度に応じ適宜実行した。

(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として新規エンリッチメント法 (SE 法) の開発に成功した。さらに、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への応用を図った。

(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した。本研究課題は腫瘍マーカー開発特命班として、癌マーカーの開発 (後述の研究課題) に重点をシフトし、より臨床研究の場面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た。

(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定量 RT-PCR によって網羅的に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した。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関連研究開発」

主として糖転移酵素のノックアウトマウスの解析を実施し、その表現型の変化により、糖鎖機能の解析を実施した。さらに、ノロウイルスの糖鎖認識特異性を中心に、ヒト型糖鎖の合成、糖鎖及び生体の相互作用解析システムの構築を進めた。

(ア) ノックアウトマウス関連研究開発その他

ノックアウトマウス作製をほぼ終了し、それぞれのマウスで表現型の探索を進めた。胎生致死の表現型を示したものは、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てヒトの疾患様表現型を見いだした。FTノックアウトマウスは化学的大腸がん誘導実験で、発がん頻度が顕著に上昇することがわかった。また、PL(B3gnt)ノックアウトマウスは細胞表面の共刺激タンパク質の糖鎖がなくなることにより、免疫細胞が恒常的に活性化することが明らかとなった。その他にも糖鎖欠損による組織構築異常、生活習慣病様病態表現型が見いだされた。また、再生医療については、平成20年度よりの未分化・分化状態におけるヒト胚性幹(ES)細胞および間葉系細胞のマーカー指標について、さらに精細に検討した。

(イ) 糖鎖アレイチップ

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のさらなる拡充、また各種GAG糖鎖を含む固相化用多硫酸化糖鎖ライブラリー化のための硫酸化糖転移酵素の改良、有用性の確認を行った。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てノロウイルスVLPのX線結晶構造解析を行った。

(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した。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の比較検討も併行実施している。

(ア) 病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明

ヒトポリオマウイルスと糖鎖との相互作用解析を行い、進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである JCV と強い結合を示す糖鎖を 9 種類、腎炎の原因となる BKV と強い結合を示す糖鎖を 7 種類見出した。また、皮膚がんから同定された MCV と結合する 2 種類の糖鎖を明らかにした。HBV 及び HCV については相互作用する糖鎖の探索を継続する。破傷風毒素は、これまで知られている GD1b、GT1b、GQ1b に加え、弱いながら相互作用するその他 2 種類の糖鎖を見出した。またボツリヌス B 型 16S 毒素については、ラクトースとの相互作用を確認した。

(イ) 糖鎖利用診断システムの開発

糖鎖アミノアルキル化合物 7 種類程度を 96 ウェルマイクロプレート型 LSPR センサデバイスに搭載した「LSPR 糖鎖アレイチップ」を作製し、C 型肝炎ウイルス及びボツリヌス B 型 16S 毒素との相互作用解析を実施した。その際の各ウェルあたりの糖鎖化合物使用量の低減化により、実用化が図れる価格になる可能性を示した。

また、研究用キットとしての実用化に向けて、競合品である Biacore-SPR との性能比較を実施した。流路型である Biacore-SPR に対し、本開発品の LSPR センサデバイスは 96 ウェルマイクロプレート型であるため、簡便性、スループット性で優位、また糖鎖とターゲット物質の相互作用解析では、Biacore-SPR とほぼ同等の結合・解離定数、結合・解離速度定数が得られることがわかった。

更に、Biacore-SPR では必須な洗浄工程を省いても良好な信号が得られることがわかり、「簡便性」における本開発品の優位性が示された。

(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、下記(1)及び(2)の技術開発を行った。これらの検討の中で、実用化可能なマーカーを見だし、それらの検証を進めた。

(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継続して実施している。

(ア) フェージライブラリ法による糖鎖認識プローブ開発

これまでのマーカー探索において、見いだされてきた腫瘍や疾患に関連する糖鎖を中心として、是を認識するプローブを、集中研より供給された糖鎖抗原をもとに、フェージライブラリ法を用いて開発し、多数の候補を取得し、その絞り込みを実施した。得られた一本鎖抗体遺伝子を IgG 型へ変換して特異性を評価するとともに、IgG 型抗体発現のための発現系を検討した。

(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

糖脂質系糖転移酵素ノックアウト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い、さらに各種がん組織標本を用いて免疫組織染色を行った。

(ウ) B1 細胞を利用した抗糖鎖抗体の開発

平成20年度まで得られた、がん細胞を抗原とするB1細胞由来のモノクローナル抗体につき、糖鎖アレイを用いて抗体エピトープの解析を継続して進めた。さらにその特性を解析するとともに、いくつかの抗体は免疫組織染色などのアプリケーションを検討した。

(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、専門の機関を新規に体制に加え、加速して実施した。

(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につき、疾患組織との反応性を検討した。

(カ) 上記の(ア)～(オ)に必要な糖鎖/糖ペプチド/糖タンパク質を作製し、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、腎疾患、輸血副作用、正常圧水頭症の診断等、における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、卵巣腫瘍

子宮体部腫瘍と卵巣腫瘍は発生母地を同じくするものがあるので、これまでに得られたマーカー候補分子は、同腫瘍の検出や、子宮内膜症との鑑別診断に有用である。平成21年度は、卵巣腫瘍の検出のみならず、子宮内膜症と卵巣腫瘍を鑑別できるマーカー候補を見いだした。さらに、有用性の検証を行うための、洗浄液を用いた診断検出系を構築した。

ii) 肺がん

肺に生じる小細胞がん、腺がんを検出できるマーカー候補分子を見いだした。それぞれの分子に付いて、検出系を構築すると共に、患者血清からの検出を試みた。また、臨床サンプルの解析機器を整備して、解析を加速した。

iii) 内分泌系腫瘍

甲状腺の腫瘍発生に 관련된新しい糖鎖構造の変化を見いだした。これに並行して、糖鎖構造変化を検出できるプローブの特性解析を実施した。

iv) 胃癌の腹腔内進展

レクチンアレイによる糖鎖変化を検出するレクチンの選抜を終了し、IGOTによるグライコプロテオミクス解析法を実施するための準備を行った。

v) 肝疾患

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。また、開発した線維化マーカーを用いる事で、効果的に線維化の進展を評価できる事を明らかにすると共に、臨床現場で使用されている検査検出系機器に適合させるための実用化開発を開始した。肝細胞がんについては、マーカー候補分子の絞り込みを継続して進めた。

vi) 大腸癌および前立腺癌

これらの疾患について、予後予測および治療反応予測を可能とするマーカー候補分子の同定をすすめ、前立腺癌においてその候補分子を複数個同定し、さらに候補分子選定加速のため高感度解析機器を整備した。

vii) 胆道系腫瘍

肝内胆管がんの存在を検出できる検査系の構築に成功し、その臨床的有用性の検

討を開始した。

(イ) その他の疾患等の診断他

i) 腎疾患

IgA腎症患者および健常者について、ELISA、レクチンアレイ、質量分析装置による糖鎖構造比較解析を実施した。また、臨床サンプルの解析機器を整備して、解析を加速した。

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について、糖鎖プロファイリング、質量分析を利用して解析をすすめた。

iii) 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開始した。

(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、精製を検討した。そのうち1種類については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した。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装置の安全性、有効性を評価した。またフルオラス糖鎖プライマーを固定化した有用性の高い糖鎖フィルターを開発した。

(1) 糖鎖の種類を増やすための細胞の探索

これまで得られた90種類以上の糖鎖の中から、ウイルスや毒素と相互作用の見られた有用糖鎖について、合成効率を高めるための細胞培養条件を検討した。接着細胞であるCOS7細胞によるガングリオ系列の糖鎖合成効率の向上には、培地へのN-アセチルマンノサミンの添加が有効、また浮遊細胞であるHL60細胞より得られるネオラクト系列の糖鎖の合成効率の向上には、培地へのN-アセチルグルコサミンの添加が有効であることを示した。

(2) 複雑な構造の糖鎖を製造するための糖鎖の修飾

ウイルスや毒素との結合活性試験に使用することを目的に、平成20年度までに進めた糖鎖合成の細胞法と酵素法を融合させる基盤研究を元に、非天然型有用糖鎖をはじめ細胞法によってカバーしきれない有用糖脂質候補化合物の合成を酵素法で行った。

(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

細胞により生産されたフルオラスプライマー含有糖鎖のメディカル資材への応用として、感染症病原体や毒素の除去用フルオラスフィルターを開発している。平成21年度は、ドットプロット法でフルオラス糖鎖をフィルター上へ固定化する方法により、PEG鎖を有するフルオラス糖鎖プライマーを固定化したフルオラスフィルターが糖鎖認識能を有し、糖鎖フィルターとして機能する可能性を示した。

プライマーおよび糖鎖伸長生成物が細胞の酵素で分解され難いドデシルチオラクトシドを用い、糖鎖の効率的な大量合成を行った。GM3型糖鎖に関しては生理活性評価に必要な10mgオーダーの生産方法が確立できたため、本検討は平成21年度で終了する。

(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合成検討(10mgオーダー)を実施した。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

合成した。用いる細胞の種類により培養の最適法が異なるが、多くの接着細胞では中空糸培養法が有効であることを見出した。また、複雑な構造のガングリオシドを多種産生する細胞と比較的単純な構造のガングリオシドを収率よく産生する系を見出した。特にGM3合成系ではグラムスケールの生産法を示した。さらに、グリコリルシアル酸を含むガングリオシド生産に適する細胞を示した。また、ハムスター法で培養した細胞を用いてパイロットプラントスケールの糖鎖合成反応を行い、有用糖脂質の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した。

(5) 糖鎖伸長生成物の効率的精製検討

フルオラス糖鎖プライマーによるバイオコンビナトリアル合成で得られる複数種類の糖鎖をフルオラスシリカゲルで容易に分離精製できる手法を確立することができたので、本検討は平成21年度で終了する。

ガングリオシド型の糖脂質に関しては、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、HPLCなどが有効であるが、安価な合成樹脂吸着剤を用いた吸着・溶出と再結晶法との組み合わせがさらに有効であることを見出し、実用的な糖鎖の精製技術確立に大きく前進した。

(6) 糖鎖高分子および糖鎖 dendrimer 作成技術の開発

クリック反応による糖鎖の導入法を確立した。その際、mg スケールにも対応できる条件を確立した。

糖鎖のポリマーへの導入に関しては、クリック反応による導入および活性エステルを用いたアミド化による導入を検討した。

(7) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発

Gb3 固定化法の最適化(電子線照射2段階法)を図り、ペロ毒素除去装置としての安全性、有効性を評価した。Gb3 固定化中空糸の血液適合性は、各評価項目で変動はみられず安全性が確認された。毒素除去性能は、緩衝液中において1型、2型毒素とも99%以上を示した。2型毒素ではヒト血漿中で除去能の低下がみられ、毒素とGb3の相互作用を阻害する因子の存在が示された。

ボツリヌスB型16S毒素においては、ラクトース固定化中空糸を用いることで90%以上の除去性能を示すことが確認された。

また、病原体除去については、Gb3 固定化中空糸によって、HIV が吸着、除去されることを見出した。

(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)

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	939	989	
特許出願件数（件）	14	12	17	11	
論文発表数（報）	51	64	33	49	
フォーラム等（件）	—	1	5	2	

5. 事業内容

研究開発項目①～③については、(独)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の共同実施先、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22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

主としてレクチンアレイ解析に供するためのエンリッチメントデバイス（現在プロトタイプ）をさらに改良し、カラム対応のエンリッチメント手法をハード、プロトコール両面で完成させる。臨床試料の解析を可能な限り実行しエンリッチメントデバイスシステムの検証作業を終了させる。

(2) 抗体を用いるエンリッチメント

上記エンリッチメントデバイスを用いて、臨床実試料を可能な限り多く解析するが、エンリッチメント操作におけるプロトコールは、被検体（がん種）ごとに最適化する必要があるため、各種疾患におけるマーカー候補の同定に引き続き、各種抗体によるエンリッチプロトコールの最適化を完成させる。

(3) ムチン型糖タンパク質のエンリッチメントと構造解析

SMME法の生体試料への応用実験をさらに推し進め、本手法のムチン解析法としてのプロトコールを完成させる。また、がん細胞などが分泌するムチンを本手法でエンリッチ後質量分析に供し、構造解析への実用性を確立する。

(4) キャピラリー電気泳動

腫瘍細胞、KOマウス由来細胞から糖鎖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さらに整備拡張するとともに、各種がん細胞からAuto Glyco CutterによってO-結合型糖鎖の切り出し、構造解析へと結びつける解析プロトコールを完成させる。

(5) レクチンアレイ

抗体、およびレクチンオーバーレイ法を基盤とした先端技術を、各種マーカー探索か

ら得られた成果をもとに、汎用性の高い ELISA 系などへの落とし込みをシスメックス社との連携のもとで行うとともに、自動エンリッチメント装置との適合性を図ることでマーカー検出の実用化システムを完成させる。

(6) 硫酸化糖鎖の質量分析

硫酸基に着目した SE 法の解析プロトコールを、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生体試料へと応用し、エンリッチメントと質量分析を組み合わせた構造解析技術を完成させる。

(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」

主として糖転移酵素のノックアウトマウスの解析を継続して実施する。さらに、ノロウイルスの糖鎖認識特異性解析をさらに進めるとともに、糖鎖及び生体の相互作用解析システムの構築を終了させる。

(ア) ノックアウトマウス関連研究開発その他

糖鎖改変ノックアウトマウスについては、その作製及び表現型の解析を完了させる。疾患モデルマウスは知財化・論文化を進め、そのたの知見と併せて最終的にデータベースとして整理する。再生医療については、引き続き得られたマーカー指標によるヒト幹細胞での検証を進め、糖鎖バリデーションの構築を終了させる。

(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作製を完了させる。さらに、ノロウイルスと糖鎖の相互作用については立体構造含めての特異性解析を完了させる。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一連のバリエーションを確立する。

(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」

細胞により生産した糖鎖とウイルス・毒素との相互作用の知見を集積するとともに、実用化に向けた「LSPR 糖鎖アレイチップ」のプロトモデルを提案し、新規なウイルス、毒素との相互作用解析における有用性を実証する。

(ア) 病原体・毒素と糖鎖の相互作用の解明

平成 21 年度までに見出されたウイルス・毒素と糖鎖の相互作用を、開発中の LSPR 装置を用いて検証する。また他の病原体（インフルエンザウイルス、呼吸器系感染関連の毒素・細菌など）との相互作用解析も行ない、さらに知見を集積するとともに、検出装置、除去装置の開発に繋げる。

(イ) 糖鎖利用診断システムの開発

LSPR センサデバイスへの再現性の高い糖鎖固定方法、非特異吸着の防止技術を確立する。更に、使用糖鎖量の低減、及び洗浄工程不要条件下でのデータ信頼性向上を図ることにより、性能・コスト両面から実用化に向けた「LSPR 糖鎖アレイチップ」のプロトモデルを提案し、新規なウイルス、毒素との相互作用解析における有用性を実証する。

(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とそれに必要な糖鎖／糖ペプチド／糖タンパク質の作製を完了させる。

以下に具体的項目を示す。

(ア) ファ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各種発現系の検討、認識エピトープの解析など通じて、得られたプローブ候補を絞り込み、評価し、本法によるプローブ作成法を完成させる。

(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

本法により得られた抗体の評価通じて、本法による作製技術を確立させる。

(ウ) B 1 細胞を利用した抗糖鎖抗体の開発

B 1 細胞をより得られた抗糖鎖抗体を評価し、本法を確立させる。

(エ) 既存バイオマーカーの改良

既存プローブの改良を、昨年度体制に加わった専門の機関を含めて、従来に加速して実施することにより、肝疾患プローブをはじめとして年度末までに終了させる。

(オ) 抗グリコサミノグリカン抗体の開発

抗グリコサミノグリカン抗体評価を継続してすすめ、疾患組織対する特異性検討を完了させる。

(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、腎疾患、輸血副作用の診断を含んで、糖鎖関連診断技術の開発を完了させる。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し、それぞれを完了させる。

(ア) 各種腫瘍

i) 子宮体部腫瘍

子宮体部内膜腫瘍のマーカー開発を展開して、子宮内膜症に合併する診断マーカーの構築と、実用化を行う。

ii) 卵巣腫瘍

洗浄液を用いた卵巣がん診断の検出系の構築に成功したことから、その有効性の検証に着手する。

iii) 肺腺癌

グライコプロテオミクス解析によって得られた候補分子について、検出系を構築すると共に、患者血清からの検出と病理組織学的検討を行う事によって、その絞り込みを終了させる。

iv) 肺小細胞癌

グライコプロテオミクス解析によって得られた候補分子について、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してすすめ、終了させる。

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、検出を実施し、終了させる。

vi) 胃癌の腹腔内進展

レクチンアレイによる糖鎖変化を検出するレクチンの選抜を終了したので、IGOTによるグライコプロテオミクス解析法を実施して完了させる。

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。この絞り込み

を効率的に実施すべく、新たに体制内に加えた検査専門機関を含め、海外の試料をも含めて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、予後予測、治療反応予測を可能とするマーカー候補分子の同定を達成したことから、収集を進めた臨床サンプルを対象として、整備した高感度解析機器を用い、マーカー開発を加速し、終了させる。肝疾患マーカーについては、糖鎖構造を決定してマーカーとしての検証を強化するとともに、中国で検査可能性を実証する。

viii) 胆道系腫瘍

候補分子選定を実施し、完了させる。

(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につき、症例数を増やして実施し、候補分子の選定を完了させる。

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完了させる。

iii) 腎疾患

臨床サンプルの解析機器を整備してマーカー開発を加速し、候補分子の取得を終了させる。

(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」

これまでに得られた糖鎖の中からウイルス・毒素との相互作用が見られた糖鎖について構造解析を詳細に行うとともに、酵素による糖鎖の修飾により有用な糖鎖への変換を行う。また、簡便で実用的な糖鎖精製技術を完成させて主要糖鎖をグラムオーダーで合成できる製造技術を実証する。さらに、機能性分子や機能性材料への変換を基盤として、ウイルス・毒素の除去装置を開発する。

(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得られた90種類以上のヒト型糖鎖の中から、ウイルス・毒素との相互作用が見られた糖鎖について詳細な構造決定を行う。

(2) 複雑な構造の糖鎖を製造するための糖鎖の修飾

引き続き、有用糖鎖の探索をすすめる。特に本年度は活性の鍵となるフコースやシアル酸の結合様式による活性相違に着目し、ウイルスや毒素における糖鎖必要部位を解明する。

(3) 糖鎖の大量合成方法の開発

スケールアップ反応や、パイロットプラント反応を重ねて行い、ガングリオシド型ネオラクトシド型などの糖脂質を供給し、産業上有用な糖鎖材料の生産技術に目処をつける。また、有用糖鎖の合成効率を高めるための細胞培養条件や効率的精製法を大量合成に適応し、主要糖鎖をグラムオーダーで合成できる製造技術を実証する。

(4) 糖鎖伸長生成物の効率的精製検討

ガングリオシド型糖脂質および中性糖脂質について、安価な合成吸着剤を用いた吸着・溶出と再結晶法の組み合わせによる簡便で実用的な精製技術を完成させる。さらに、精製した糖鎖の品質管理（不純物の同定）を実施する。

(5) 糖鎖高分子および糖鎖 dendrimer 作成技術の開発

細胞法により調製される糖鎖のクリック反応による dendrimer 化、また、ポリペプ

チドや多糖をポリマー骨格とし、クリック反応とアミド化による糖鎖ポリマーの合成を実施し、糖鎖アレイ、除去装置開発に材料提供する。

(6) 糖鎖機能分子利用病原体・毒素除去装置の開発

電子線照射による糖鎖固定化（2段階法）技術と dendrogram 作製技術を活用してウイルス吸着用中空糸材料の開発を進める。両技術を利用して HIV の高捕捉能を有する糖鎖固定化材料を開発し、産業上有用な HIV 除去装置を開発する。さらに HBV、HCV への展開を図り、有効性を検証する。

また、有用性の高いメディカル資材等への応用として、細胞で生産された糖鎖を固定化して、感染症病原体を除去する糖鎖フィルター作成技術を確立する。

（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・細胞糖鎖マーカー分科会、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等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及び評価を受ける。また、関連する外部の研究開発状況などを把握し、実用化に向けた適切な研究推進を図る。また、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・獲得を目的とした成果発表を国際シンポジウム等で行うことを企画する。

（実施体制：（財）化学技術戦略推進機構）

5. 2 平成22年度事業規模

委託事業

一般勘定 **919** 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) 評価の方法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO」という。）は、技術的および政策的観点から、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への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成23年度に実施する。

(2) 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。

7. スケジュール

本年度のスケジュール：平成22年12月・・・研究開発推進委員会

8. 実施方針の改定履歴

- (1) 平成22年3月9日、制定。
- (2) 平成22年5月31日、実施体制変更。
- (3) 平成22年6月1日、加速予算の追加に伴う変更。
- (4) 平成22年8月31日、資産解体撤去に伴う変更。

「糖鎖機能活用技術開発」実施体制図

