

電気泳動

第74回日本電気泳動学会総会抄録号

開催日：2023年5月18日（木）～20日（土）

会 場：石垣市民会館

総会長：近藤 格



主催：日本電気泳動学会

<https://www.jes1950.jp/>

シクロオレフィンポリマー (COP) でつくる マイクロ流路チップワンストップサービス

マイクロ流路チップに最適な素材のシクロオレフィンポリマー (COP)

シクロオレフィンポリマー(COP)は、日本ゼオンが独自の技術で開発した画期的な熱可塑性樹脂です。用途に応じた最適グレードの紹介や樹脂メーカーならではの視点で材料物性を活かした製品作りをサポート致します。



シクロオレフィンポリマー(COP)の特性

低UV吸収性

低蛍光特性

高い耐薬品性

低不純物

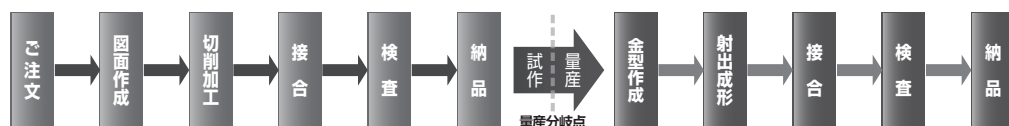
低吸着特性

低水蒸気透過性

卓越した成形性

低環境負荷

1個(試作)から量産までワンストップで受託します ※中量産の場合、簡易金型で費用を抑えることができます。



サービスの紹介やお問い合わせ



シクロオレフィンポリマー (COP) 製 マイクロプレート

ゼオングループの一員であるAurora Microplates社の高品質マイクロプレートは、シクロオレフィンポリマー (COP) で作られています。従来のマイクロウェルプレートと比較し、透明性、耐熱性、低自己蛍光性、平坦性、耐薬品性などの点で優れた特長を備えています。

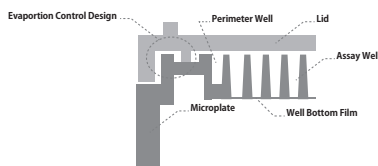
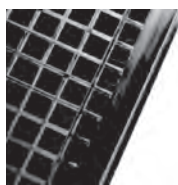
Aurora Microplates



※本製品は研究用です。医療用には使用できませんのでご注意ください。
※日本ゼオン株式会社は、Aurora Microplates 製品の日本総代理店（発売元）です。

製品の特長

高い光線透過率	透過する波長領域が幅広く、核酸やタンパク質の260nmと280nmの吸光度測定に適しています。
低い自家蛍光性	アッセイ時の S/N 比、感度を向上させることができます。
優れた耐薬品性	多くの有機溶媒への耐性があります。
高い耐熱性	低温保存やオートクレーブにもご使用頂けます。
優れた平坦性	高性能イメージングの検出速度向上に寄与します。
サンプル蒸発低減構造	独自の構造により、サンプル蒸発の低減が可能です。



お問い合わせメール



ZEON 日本ゼオン株式会社
高機能樹脂事業部

〒100-8246 東京都千代田区丸の内 1-6-2 新丸の内センタービル
☎ 03 (3216) 1769 ウェブサイト <https://www.zeon.co.jp/>

大会長 挨拶

大会長 近藤 格

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

電気泳動法はさまざまな研究において重要なツールとして使われてきました。タンパク質や核酸などの生体物質を物理的な特性にしたがって分離・分取し解析することで、私たちは生命現象の分子背景に迫る研究を行ってきました。電気泳動法は基礎研究のみならず疾患研究や臨床検査にも広く用いられ、多くの研究室や検査センターにおいて必須の技術として使われています。電気泳動法は我々の社会においてこれからも重要な位置を占めていくでしょう。

一方で、電気泳動法にはまだまだ発展の余地があること、そして長年の課題が依然として残されていることにも我々は目を向ける必要があります。たとえば、翻訳後修飾を受けたタンパク質を電気泳動を用いて効率よく分離・分取して解析する手法や、翻訳後修飾のデータを機能と結びつけて解析する方法は標準化されておらず、個々の研究者の経験や力量に委ねられています。また、ゲノム解析で同定される興味深い遺伝子の機能を調べるにあたりタンパク質の機能解析・構造解析・活性解析が必須になるわけですが、電気泳動はそのためのツールとして大いに可能性があるにも関わらずその方法論はいまだ確立されていません。また、大規模データに即して電気泳動を自動化し再現性よくデータを得たり結果をデータベース化する仕組みが長らく望まれており開発されていますが普及していません。このような課題に取り組んでいくことで、電気泳動法は時代に即してさらに発展していくことでしょう。



今回の学術大会では会員の方々が日常の些事を忘れて研究談義を楽しむことができるようにと、石垣島にて開催することにしました。石垣島は南の島として有名ですが、訪れる機会がなく今に至っておられる方は多いのではないかと思います。雄大な自然を背景に会員同士の交流を深め、本会のますますの発展につなげたいと思う所存です。日常から離れた空間で科学の将来を語り合うことで、明日への活力とアイデアを得ていただければ幸いです。本学術大会が皆様の交流の場として記憶に残ることを願いつつ皆様のご参加をお願いします。

参加者の方々へ

1. 抄録集の配布

ロビーにて抄録をお配りしています。部数が限られており全員に行きわたるように参加者1名につき1部だけお取りください。

2. 昼食など

- ソフトドリンクをロビーに御用意しました。ロビーにてお楽しみください。
- 会場近隣の飲食店、スーパー、コンビニエンスストアをご利用ください。

3. 情報交換会

事前登録者の方に会場をメールでご案内するほか、当日もご案内します。人数に限りがありますが当日の申込も可能ですので、会場スタッフにお申し出ください。

4. 会場内でのご注意

- 石垣市民会館の講演会場（ホール）内への飲食の持ち込みは禁止されています。飲食はロビーにてお願いします。
- 講演内容の撮影、携帯電話・スマートフォンでの会話はご遠慮ください。
- 体調不良の方は御参加を御遠慮ください。入退場時の手指消毒に御協力ください。

講演者の方々へ

1. 座長へのご案内

- 座長は担当セッション開始前に前方の席にて待機してください。
- セッションの進行は座長に一任いたします。時間厳守でお願いします。

2. 講演者へのご案内

1) 講演時間

特別企画は1講演20分、特別講演は1講演60分です。

シンポジウムおよび一般講演は座長の企画次第でセッションごとに異なります。座長の指示に従ってください。

2) 発表方法

- メモリースティック持参で備え付けPCをお使いください。
- 御自分のPCで講演されても構いません。その場合、御自身で接続してください。スクリーンセーバーや省電力モードにならないように設定してください。

タイムスケジュール

17 日（水）		
14:00 ～ 17:00	理事会	
18:00 ～ 20:00	情報交換会「日本電気泳動学会の将来の展望」	近藤 格
18 日（木）		
09:30 ～ 10:10	評議委員会 総会	近藤 格
10:10 ～ 11:40	受賞式・受賞講演	近藤 格
11:40 ～ 12:20	展示	
12:20 ～ 12:30	開会の挨拶	近藤 格
12:30 ～ 14:10	特別企画 1「私と電気泳動」	近藤 格
14:10 ～ 14:20	休憩	
14:20 ～ 15:20	特別講演 1	野口 玲
15:20 ～ 15:50	展示	
15:50 ～ 17:50	シンポジウム 1	小松 徹
19:00 ～ 21:00	情報交換会「学際的な研究における電気泳動の役割」	近藤 格
19 日（金）		
09:00 ～ 09:30	展示	
09:30 ～ 11:30	シンポジウム 2	亀山 昭彦
11:30 ～ 12:30	展示	
12:30 ～ 14:10	特別企画 2「私と電気泳動」	近藤 格
14:10 ～ 14:20	休憩	
14:20 ～ 15:20	特別講演 2	大崎 珠理亜
15:20 ～ 15:50	展示	
15:50 ～ 16:50	シンポジウム 3	野口 玲
16:50 ～ 18:00	一般講演 1	大崎 珠理亜
19:00 ～ 21:00	情報交換会「世代を超えて継承する電気泳動の技術」	小寺 義男
20 日（土）		
09:10 ～ 09:30	一般講演 2	小野 拓也
09:30 ～ 11:30	シンポジウム 4	曾川 一幸
11:30 ～ 12:30	展示	
12:30 ～ 14:10	特別企画 3「私と電気泳動」	近藤 格
14:10 ～ 14:20	休憩	
14:20 ～ 16:20	シンポジウム 5	井本 真由美
16:20 ～ 16:30	休憩	
16:30 ～ 17:30	一般講演 3	野口 玲
17:30 ～ 17:40	一般演題優秀賞投票結果の発表	近藤 格
17:40 ～ 17:50	閉会の挨拶	近藤 格
19:00 ～ 21:00	情報交換会「次世代の電気泳動の展望と課題」	近藤 格

抄録集



抄 録 集

目 次

第 62 回日本電気泳動学会 学会賞（児玉賞）受賞講演

非変性条件の 2 次元電気泳動による天然酵素およびその複合体の分離と機能解析

島崎 洋次

愛媛大学大学院理工学研究科.....(s1)

第 23 回日本電気泳動学会 奨励賞（服部賞）受賞講演

日本電気泳動学会奨励賞（服部賞）を受賞して

竹田 真由

藤田医科大学 医学部 難治疾患細胞制御学、藤田医科大学病院がんセンター..... (s2)

ゲノムより面白い！プロテオームを加えたマルチオミックス解析だ！：

がんのプロテオゲノミクス解析と網羅的キナーゼ活性解析

野口 玲

国立がん研究センター希少がん研究分野.....(s3)

特別企画 1「私と電気泳動」

1 私と電気泳動—ヘリコバクター・ピロリ菌と胃癌

伊東 文生

聖マリアンナ医科大学 消化器内科.....(s4)

2 私と電気泳動：はじまりはキャピラリー電気泳動

梶原 英之

農業・食品産業技術総合研究機構高度分析研究センター生体高分子解析ユニット.....(s5)

3 電気泳動でタンパク質機能を視る

島崎 洋次

愛媛大学大学院理工学研究科.....(s6)

4 私と電気泳動：プロテオーム解析からがんの研究へ

近藤 格

国立がん研究センター希少がん研究分野.....(s7)

5 蛍光二次元電気泳動法による悪性骨軟部腫瘍のバイオマーカー開発を目指したプロテオーム解析研究から臨床医の私が学んだこと

菊田 一貴

栃木県立がんセンター骨軟部腫瘍・整形外科.....(s8)

特別企画 2「私と電気泳動」

6 電気泳動学会と私

藏満 保宏

北海道医療大学 先端研究推進センター

（兼担）医療技術学部臨床検査学科.....(s9)

7 電気泳動の基礎老化研究への応用

三浦 ゆり

東京都健康長寿医療センター研究所.....(s10)

8 生体内シグナル伝達および疾患研究と電気泳動

武川 睦寛

東京大学医科学研究所 分子シグナル制御分野..... (s11)

- 9 液相等電点電気泳動法とマルチ PK 抗体を用いた細胞内プロテインキナーゼの解析
杉山 康憲
香川大学農学部 応用生物科学科……………(s12)
- 10 電気泳動法とがんの診断マーカー探索
長塩 亮
北里大学医療衛生学部医療検査学科臨床検査学
北里大学大学院医療系研究科応用腫瘍病理学
北里大学医療衛生学部附属再生医療・細胞デザイン研究施設細胞デザイン開発センター……………(s13)

特別企画3「私と電気泳動」

- 11 稀な症例解析はあきらめない心で立ち向かうべしー真実はいつもひとつー
井本 真由美
近畿大学病院 中央臨床検査部……………(s14)
- 12 私と電気泳動 等電点電気泳動法と歩んだ35年
飯島 史朗
文京学院大学 保健医療技術学部……………(s15)
- 13 2D-DIGE からセルロースアセテート膜電気泳動そして分子マトリックス電気泳動へ
亀山 昭彦
国立研究開発法人産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門……………(s16)
- 14 私と電気泳動 皮膚科臨床医の立場から
藤井 一恭
鹿児島大学病院皮膚科……………(s17)
- 15 診断マーカー探索における電気泳動の関わり
曾川 一幸
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室……………(s18)

シンポジウム1 タンパク質の「機能」を見る新技術

(オーガナイザー：小松 徹 東京大学 大学院薬学系研究科)

- S-1 機能性タンパク質と小分子の複合的利用による抗原可視化の新手法
小嶋 良輔
東京大学大学院医学系研究科……………(s19)
- S-2 小型抗体フォーマット「Fv-clasp」の開発とその応用
有森 貴夫
大阪大学 蛋白質研究所……………(s20)
- S-3 変性部位検出プローブの開発とプロテオミクス解析
佐藤 伸一
東北大学 学際科学フロンティア研究所……………(s21)
- S-4 オプトケモプロテオミクスによるマウス脳内受容体インタラクトーム解析
田村 朋則
京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻……………(s22)
- S-5 網羅的情報の潜在表現に基づく化合物に対する生体応答の記述
水野 忠快
東京大学大学院薬学系研究科……………(s23)
- S-6 「1分子計測リキッドバイオプシー」技術に基づく早期がん診断の事業化
坂本 眞伍
コウソミル株式会社……………(s24)

シンポジウム 2 糖鎖の「基礎・創薬・規制科学」

(オーガナイザー：亀山 昭彦 国立研究開発法人産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門)

- S-7 LC/CE 二次元分離に基づく超高感度・絶対定量グライコーム解析法の開発
川井 隆之
九州大学 大学院理学研究院 化学部門
理化学研究所 生命機能科学研究センター……………(s25)
- S-8 腸管恒常性維持における糖鎖の役割
奥村 龍
大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学……………(s26)
- S-9 悪性中皮腫の糖鎖修飾を認識する SKM9-2 抗体と抗体医薬への展開
辻 祥太郎
群馬医療福祉大学 医療技術学部 医療技術学科……………(s27)
- S-10 Multi-attribute method による抗体医薬品の品質評価
橋井 則貴
国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部……………(s28)

シンポジウム 3 私とがんのプロテオゲノミクス

(オーガナイザー：野口 玲 国立がん研究センター希少がん研究分野)

- S-11 がんプロテオミクスのためのソフト “OncoProGx” の開発
野口 玲
国立がん研究センター希少がん研究分野……………(s29)
- S-12 TCR-抗原特異性の予測に向けた技術的進展と取り組み
長谷川 嵩矩
東京医科歯科大学 M&D データ科学センター……………(s30)

シンポジウム 4 質量分析計による細菌同定の現状

(オーガナイザー：曾川 一幸 麻布大学 生命・環境科学部生化学研究室)

- S-13 MALDI-TOF MS による細菌同定の現状と将来性
藤永 あずみ
ブルカージャパン株式会社 ダルトニクス事業部 アプリケーション部……………(s31)
- S-14 MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理調査体制について
曾川 一幸
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室……………(s32)
- S-15 微生物検査領域における質量分析法を用いた菌種同定について
上地 幸平
琉球大学病院 検査・輸血部……………(s33)
- S-16 臨床微生物検査における MALDI-TOF MS の効果的な運用方法
大城 健哉
那覇市立病院 医療技術部検査室……………(s34)

シンポジウム 5 臨床検査の医療への貢献

(オーガナイザー：井本 真由美 近畿大学病院 中央臨床検査部)

- S-17 臨床検査の多様な貢献
山田 俊幸
自治医科大学臨床検査医学……………(s35)
- S-18 新型コロナウイルス検査キットの開発 ～ パンデミックから発売までの開発ヒストリー ～
保坂 憲光
栄研化学(株) 生物化学研究所第四部……………(s36)

S-19	脾疾患にミスリードしないためのアミラーゼアイソザイムの迅速な活用法 松村 充子 天理よろづ相談所 医学研究所.....	(s37)
S-20	反応過程異常精査や診断に役立つ蛋白電気泳動－患者の早期診断につながった事例－ 青木 絵美 慶應義塾大学病院 臨床検査科.....	(s38)
S-21	異常反応監視システムと検査結果自動解析システムを組み合わせた診断支援の取り組み 石嶺 南生 信州大学医学部附属病院 臨床検査部.....	(s39)
S-22	医療へ貢献するための当院検査部での ISO 15189 関連の取り組み 石原 香織 長崎大学病院検査部.....	(s40)
S-23	次世代シーケンサーを用いた臨床検査の展望 白石 直樹 近畿大学病院 ゲノム医療センター.....	(s41)
S-24	検査室における電気泳動検査の有用性と大学教育 清宮 正徳 国際医療福祉大学成田保健医療学部.....	(s42)

特別講演 1

オルガノイド培養技術のがん研究への応用 筆宝 義隆 千葉県がんセンター研究所.....	(s43)
---	-------

特別講演 2

ケミカルメディシン：化学に基づく新たながんセラノスティクス医療の実現 浦野 泰照 東京大学大学院薬学系研究科、東京大学大学院医学系研究科.....	(s44)
---	-------

一般講演 1

O-1	骨巨細胞腫 2 症例の新規患者由来細胞株（NCC-GCTB8-C1, NCC-GCTB9-C1）の樹立と電気泳動を用いた特性評価 安達 雄輝 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 旭川医科大学 外科学講座 肝胆膵・移植外科学分野.....	(s45)
O-2	ショットガン解析により同定した GPC1 の肺がん組織診断マーカーとしての有用性について 朽津 有紀 北里大・医療衛生・臨床検査 北里大・院・医療系・応用腫瘍病理 北里大・医療衛生・附置研・細胞デザイン.....	(s46)
O-3	卵巣がんの新規抗体医薬品標的タンパク質の網羅的同定 瓜生 開 福島県立医科大学医学部基礎病理学.....	(s47)
O-4	繊維肉腫様の隆起性皮膚線維肉腫の治療法開発に向けての患者由来細胞株を用いた研究 小野 拓也 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医療科学専攻.....	(s48)
O-5	質量分析によるウイルスの迅速同定とデータベースの構築 梶原 英之 農業・食品産業技術総合研究開発機構（農研機構）.....	(s49)

- O-6 MPO-ANCA 陽性 ANCA 関連血管炎患者由来好中球ミエロペルオキシダーゼにおける翻訳後修飾の網羅的解析
黒川 真奈絵
聖マリアンナ医科大学大学院 疾患バイオマーカー・標的分子制御学……………(s50)
- O-7 ゲル中のタンパク質の高感度検出を目指した試み
小寺 義男
北里大学理学部生命物理学研究室
北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター……………(s51)

一般講演 2

- O-8 Tandem Mass Tag を用いたタンデム質量分析法による膵臓癌の新規診断マーカーの解析
佐久間 佳乃
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室……………(s52)
- O-9 いくらアレルギーにおける新規アレルゲンの探索・同定
中野 月穂
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室……………(s53)
- O-10 グライコミクス解析による新規飲酒マーカーの探索と検証
増田 心
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室……………(s54)
- O-11 Tandem Mass Tag を用いたタンデム質量分析法による胆管癌の新規診断マーカーの解析
水口 海希
麻布大学生命・環境科学部生化学研究室……………(s55)

一般講演 3

- O-12 低濃度 SDS 抽出液を用いた SDS-PAGE によるタンパク質アグリゲートの解析
大石 正道
北里大学理学部物理学科固体物理学講座……………(s56)
- O-13 CIC-rearranged sarcoma の治療法の開発に向けての 3 つのアプローチ：
網羅的キナーゼ活性解析、抗がん剤ライブラリーのスクリーニング、融合遺伝子産物の複合体解析
大崎 珠理亜
国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野……………(s57)
- O-14 二次元電気泳動/ウエスタンブロット法によるがん患者由来自己抗体の新規網羅的同定法
小林 信
福島県立医科大学医学部基礎病理学……………(s58)
- O-15 細胞接着分子クロードイン 16 は卵巣癌の新規バイオマーカーである
茂村 碧
福島県立医科大学医学部基礎病理学……………(s59)
- O-16 ホルマリン固定パラフィン包埋検体からヒドロキシルアミンを用いて抽出したムチンの
分子マトリックス電気泳動を用いた糖鎖解析
杉浦 貴則
牛久愛和総合病院歯科口腔外科
東京歯科大学 口腔腫瘍外科学講座……………(s60)
- O-17 Online fluorescent imaging method for improving the accuracy of quantitative capillary electrophoresis
Chenchen Liu
Department of Chemistry, Graduate School of Sciences, Kyushu University……………(s61)

非変性条件の 2 次元電気泳動による天然酵素およびその複合体の分離と機能解析

島崎 洋次

愛媛大学大学院理工学研究科

私の研究活動のスタートは昆虫の複眼 1 個から視覚に不可欠なビタミン A の誘導体を抽出し、一斉に微量分析することで、眼の中での酵素反応が関与するビタミン A の代謝機構を明らかにする研究であった [1]。その後、神経のシナプス部などに存在する神経伝達物質の放出に関わるタンパク質複合体のうちの 25-kDa Synaptosome-associated protein がプロテインキナーゼ C のリン酸化基質であることを SDS-PAGE の電気泳動法を用いて解明した [2]。この論文は培養細胞での神経伝達物質の放出の調節とタンパク質のリン酸化をはじめ関連付けた研究と評価され、現在までに 215 件の論文に引用されている。

その後、本学会でもご活躍された愛媛大学の真鍋敬先生の研究室で、非変性条件のマイクロ 2 次元電気泳動法(2DE)によるタンパク質の微量分析やその機能解析に関する研究を始めた。特に、機能と関連して状態を変化させるタンパク質やその複合体をこの 2DE により捉えることができないかということを目標に研究を進めてきている。言わば、“様々な顔を持っているタンパク質の表情を電気泳動で捉える”というテーマに挑戦し続けている。

具体的には、大きく以下の 5 つの研究を進めてきている。①非変性条件の 2DE と質量分析を組み合わせることで、酵素活性などの情報を含んだ 2DE マップを構築した [3-6]。また、これらの 2DE マップは分離されている酵素の基質特異性や非特異性を調べる技術などに利用可能であることを示してきている。②種々の抗原で免疫された抗血清中のタンパク質を非変性条件の 2DE により分離し、これらを疎水性膜に転写することで、抗体を固定化した膜を構築した。この抗体を固定化した膜により、種々の生体試料から標的となる酵素やタンパク質をトラップし、それらの酵素活性や一次構造を直接的に分析する方法を構築した [7-10]。③アミロイド β タンパク質は凝集化し、脳などに蓄積することによりアルツハイマー病を引き起こすことが知られている。その凝集化されたアミロイド β をコンゴーレッド色素とアガロースゲル電気泳動法を組み合わせ分離・検出する方法を構築した。また、この方法により、凝集化アミロイド β 凝集体が分解する酵素の探索に利用できることを示した [11]。④等電点電気泳動法により非変性状態で分離された卵白タンパク質を移動させ、溶液状態で分取する方法とリゾチーム活性分析法を組み合わせた新たな方法を構築し、卵白中のリゾチームとオボトランスフェリンの複合体の分析を行った [12,13]。⑤非変性条件の 2DE で分離されたタンパク質複合体を電気泳動的に溶出し、その複合体中の酵素活性などを調べ、その複合体の生理的な役割を解明

する研究を行っている [14, 15]。

以上のように、非変性条件の 2DE を基軸に、生体酵素やその複合体の表情を捕えようと努力を継続しているが、まだまだ未解明な部分も多く残っている。今後も更に研究を推進していきたい。

最後に、今回、本学会「児玉賞」に推薦・選考いただいた皆様に心よりお礼申し上げます。本学会の発展のために、今後とも尽力いたします。どうぞよろしくお願い申し上げます。

[主な論文]

- [1] [Youji Shimazaki](#), Eisuke Eguchi. Journal of Comparative Physiology A 1995;176: 661-671.
- [2] [Youji Shimazaki](#), Tei-ichi Nishiki, Akira Omori, Mariko Sekiguchi, Yoichi Kamata, Shunji Kozaki, Masami Takahashi. Journal of Biological Chemistry 1996;71: 14548-14553.
- [3] [Youji Shimazaki](#), Yuki Sugawara, Yuki Ohtsuka, Takashi Manabe. Proteomics 2003;3: 2002-2007.
- [4] [Youji Shimazaki](#), Yoko Hiraka, Minatsu Uesugi, Takashi Manabe. Biochimica et Biophysica Acta 2004;1696: 51-57.
- [5] [Youji Shimazaki](#), Yuki Sugawara, Takashi Manabe. Proteomics 2004;4: 1406-1411
- [6] [Youji Shimazaki](#), Kenta Shimizu, Suzuna Masaoka. Talanta 2010;82: 1063-1067.
- [7] [Youji Shimazaki](#), Masayuki Miyamoto. Journal of Chromatography B 2010;878: 2852-2856.
- [8] [Youji Shimazaki](#), Takahiro Sakikawa, Ayaka Kimura. Clinica Chimica Acta 2012;413: 269-272.
- [9] [Youji Shimazaki](#), Ai Hashimoto. Talanta 2014;125: 400-404.
- [10] [Youji Shimazaki](#), Yuki Sato. Journal of Chromatography B 2016;1021: 108-113
- [11] Risa Kawano, Ayaka Nakanishi, Tamotsu Zako, [Youji Shimazaki](#). Separation Science Plus 2019;2: 322-328.
- [12] [Youji Shimazaki](#), Yoshiko Ochi, Kennosuke Fujimura. Electrophoresis 2018;39 (8): 1054-1061.
- [13] [Youji Shimazaki](#), Shunta Yabu. Separation Science Plus 2021;4: 377-383
- [14] Karin Nakao, [Youji Shimazaki](#). Journal of Electrophoresis 2022;66: 5-11.
- [15] [島崎洋次](#)、中尾香琳、福家麗. 電気泳動 (in press).

日本電気泳動学会奨励賞（服部賞）を受賞して

竹田 真由

藤田医科大学 医学部 難治疾患細胞制御学、藤田医科大学病院がんセンター

この度は、日本電気泳動学会奨励賞（服部賞）という身に余る賞を頂き、誠にありがとうございます。この服部賞は、「電気泳動に関する研究成果の発表を国内外において活発に行い、また当学会主催の研究集会あるいは当学会機関誌上において優秀な発表をした」研究者に与えられるものと存じます。私でよいのだろうかと考えましたが、これからの人生においても「研究」の継続を意識する機会となりました。改めて、選考委員の先生方に御礼申し上げます。

私が研究をスタートした当時、臨床検査の分野において遺伝子関連検査が実施されているものの、試薬のキット化も十分ではなく、私の研究室では「遺伝子検査の標準化」をテーマに色々な試みを行っていました。また日本においては、「OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing : 分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD ガイドライン」が全 OECD 加盟国により採択、承認されたことを受け、JCCLS 遺伝子関連標準化専門委員会によって「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン」¹⁾が策定されました。その中で、遺伝子関連検査の測定精度保証を確保するために「遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル」²⁾が策定されることとなり、私も一員として編集作業に取り組みました。現在では、「遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル（パート 2）新規測定技術・解析試料の品質管理承認文書」³⁾が発行されており、遺伝子関連検査の標準化に少しは貢献できているのではないかと考えます。

私が本学会にて発表した内容に「RNA 品質評価の検討」がありますが、RNA 溶液の保存の影響等をその当時ではユーザーも少ないオンチップ電気泳動装置を用いて検討を行っていました⁴⁾。それから数年が経過しましたが、私は現在大規模並列シーケンサーを用いたがんゲノム解析を行っております。ここでは、DNA の品質が重要となるため、TapeStation (Agilent Technologies) を用いて、FFPE から抽出した DNA 溶液の DIN (DNA Integrity Number) を測定し、ライブラリ調製に活用しています。取り扱う核酸は RNA から DNA に変わりましたが、現在でも核酸の品質評価に電気泳動を用いていることは変わりません。

私は臨床検査技師として、遺伝子関連検査に関わる電気泳動について考えてきました。遺伝子関連検査には精度管理の難しさがあり、理由としては、検査の複雑さ、試験方法の難しさ、検査前プロセスの重要性などが挙げ

られます。臨床検査技師を目指す学生教育に長く携わってきた経験から、核酸を取り扱う際に必要な知識や技術を身につけた検査実施者の育成が必須です。そのためには、核酸そのものの取り扱いだけでなく、電気泳動の活用例を示しながら、実験などを通じて手法の一つとして身近に感じられる計画を構築していきたいと考えています。

【参考資料】

- 1) 遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン（承認文書）. 日本臨床検査標準協議会, 2012.
- 2) 遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル. 日本臨床検査標準協議会, 2012.
- 3) 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル（パート 2）新規測定技術・解析試料の品質管理承認文書. 日本臨床検査標準協議会, 2017.
- 4) 竹田真由, 船渡忠男, 藤巻慎一, 岩谷良則. オンチップ電気泳動システムによる RNA の品質評価の検討. 生物物理化学 55(1): 1-4, 2011.

第 23 回日本電気泳動学会 奨励賞（服部賞）受賞講演

ゲノムより面白い！プロテオームを加えたマルチオミックス解析だ！：
がんのプロテオゲノミクス解析と網羅的キナーゼ活性解析

野口 玲

国立がん研究センター希少がん研究分野

がんは多様性に富んだ疾患であり、個別化医療の実現が求められる。個別化医療を推進するためにゲノム医療が全国に普及している。ゲノム医療においては、腫瘍のゲノム情報を用いて奏効するがん治療薬を同定しようとしている。すなわち、治療標的と目される遺伝子変異を調べ、もって治療薬の候補を挙げるというものである。しかしながら、誠に遺憾なことに、この方法で奏効性が同定できる抗がん剤は少ない。具体的には、国内外からの報告では、クリニカルシーケンス（臨床検体を用いたゲノム解析）を施行した症例のうち、奏効する治療薬の候補が決定される症例の割合はわずか 0.8-10% である。このようなことから、ゲノム情報だけでがんの治療方針を決定することには明らかな限界があると考えられている。そのため、がんの個別化医療の実現のためにはゲノム解析に加え、新しい角度からのアプローチも必要である。

我々はがん医療の開発に有効なアプローチとして、プロテオーム解析に注目している。がんはゲノムに発生した異常が原因で発生する疾患である。ゲノムの異常は mRNA に転写され、タンパク質に機能的に翻訳される。その後タンパク質は、リン酸化などの翻訳後修飾を受け、プログラムされた場所に移動し、さまざまな分子と相互作用しながら機能している。すなわち、タンパク質は、がんの性格・特徴を直接制御・決定している。DNA や RNA の情報からタンパク質の状態を正しく推定することは困難である。たとえば、mRNA の発現量とタンパク質の発現量の相関は多くの遺伝子において一致しない。したがって、がんの性質・特徴をモニターするためのバイオマーカーの開発には、ゲノムだけでなくプロテオームを調べることが重要である。さらに、分子標的薬の多くはタンパク質を標的としており、バイオマーカーの開発に加え抗がん剤の開発においてもプロテオームの異常を把握することは重要である。

我々は個別化医療を推進するためのバイオマーカー開発に有用なソフトウェアを開発している。タンパク質の発現を網羅的に調べる技術としては質量分析が主な手法である。質量分析のデータからタンパク質を同定する際に公共のデータベースを用いるのが一般的である。しかし、この公共データベースにはサンプル特異的なまれな変異をもつタンパク質は登録されておらず、そのようなタンパク質は同定できない。すなわち、特定の分子標的に奏効する比較的少ない症例でのみ発現しているタンパク質は、質量分析では同定できない。これは個別化医療を推進するうえで、由々しき問題である。この問題を解決するために、我々はサンプル毎のゲノム情報を用いてタンパク質を同定す

るためのソフトウェアである“OncoProGx”を開発した。OncoProGx では、サンプルごとの WES と RNA-seq のデータを用いて、仮想的なプロテオームデータを作成し、それを質量分析によるタンパク質同定に使用する。OncoProGx で同定される、症例ごとのユニークな変異を含んだタンパク質は個別化医療のためのバイオマーカーの候補となりうる。

我々は、キナーゼの網羅的な活性測定を行っている。がん研究において、キナーゼの研究は重要である。なぜならば、キナーゼの活性異常ががんの発生や進行を制御しているからである。キナーゼの活性異常は遺伝子のコピー数変化や変異などのゲノムレベルの異常で生じる。そのため、キナーゼをコードする遺伝子の増幅や変異が治療選択のバイオマーカーとして用いられている。しかし、バイオマーカーによる予測は万能ではなく、約 30-50% の症例では予測が外れている。それは、キナーゼの活性はゲノム異常だけでなく、エピゲノム・翻訳後修飾などの沢山の分子背景によって決められているからである。これは個別化医療の実現において看過しがたい問題である。すなわち、キナーゼの活性を知るためには、遺伝子の増幅や変異だけでなく活性そのものを測定することが必要である。我々は、三次元ペプチドアレイである PamChip を用いて、生検などの微量検体で約 100 種類のチロシンキナーゼの活性を網羅的に測定し、治療標的や薬剤奏効性バイオマーカーを同定している。具体的には、EGFR 感受性遺伝子変異を有する非小細胞肺癌症例において、多施設共同研究で得られたバイオブシー検体を用いて、薬剤奏効性バイオマーカーを同定した。

網羅的な解析技術は単独ではなく組み合わせて使用することで有効性が増す。我々は、患者由来がんモデルに対してこれらの技術を応用し、マルチオミックス解析による希少がんの治療標的及び奏効性を有する薬剤の同定に取り組んでいる。具体的には、希少性により新薬の開発が難しい肉腫を対象に、自分たちが樹立した患者由来肉腫細胞株約 100 株にてゲノム・プロテオーム・キノーム・薬剤感受性試験などのマルチオミックス解析を行っている。がんの性格や特徴という複雑な事象を理解するためには、複眼的な思考法が必要であり、研究活動を学際的に広げることによりがんをより深く理解できるだろう。革新的ながん治療法の開発に有用な医療シーズの発見を目的として、これからの研究に邁進していく所存である。

特別企画 1 「私と電気泳動」

1 私と電気泳動—ヘリコバクター・ピロリ菌と胃癌

伊東 文生

聖マリアンナ医科大学 消化器内科

ヘリコバクター・ピロリ菌感染は胃癌全体の 99%の原因と考えられている。しかし 980 年代に、特に本邦では、ヘリコバクター・ピロリ菌の存在は知られていたものの疾病との関連性には疑問が持たれていた。ようやくマーシャルらにより萎縮性胃炎、胃十二指腸潰瘍との関連性が示され（のち 2005 年にノーベル医学・生理学賞受賞）研究が広がり始める端緒になった。その後 1994 年に WHO の下部機関である IARC（International Agency for Reaserch on Cancer）が欧米での疫学データから胃癌の原因であると認定しているが、動物実験でのデータがないことなどから本邦では広く認められることはなかった。その後ヘリコバクター・ピロリ菌感染スナネズミが胃癌発症すること、本邦のデータでも感染者のみから胃癌が発症することが証明され、やっと広くヘリコバクター・ピロリ菌感染と胃癌の関連が注目されるようになった。2013 年には萎縮性胃炎に対するヘリコバクター・ピロリ菌除菌治療が保険適応されている。その後、胃癌発症の分子機構が広く研究されるようになり、特にピロリ菌感染との関連で着目され研究されてきたのが DNA メチル化に関連する研究である。DNA メチル化は 1990 年初頭までは単発の遺伝子について報告がありのみであった。この状況を大きく変化したのが、ゲノムワイドにメチル化を同定できる方法の開発であった。国立がん研究センター発がん研究部の牛島俊和先生の開発した MS—RDA 法および札幌医科大学第一内科の豊田実先生が留学先のジョンスホプキンス大で発表した MCA 法はメチル化研究をがん研究第一線に引き出すことに非常に大きな役割を果たした。胃癌においてはメチル化は癌化分子機構の最も重要なものと考えられている。これを基盤とした胃洗浄液を用いた分子診断法を開発し、国際特許を取得に至っている。この方法を用いると内視鏡室でヘリコバクター感染の有無、ヘリコバクター・ピロリ菌クラリスロマイシン耐性の有無が診断可能になった。現在は検査システムが発売になり、広く臨床応用が可能になっている。

特別企画 1「私と電気泳動」

2 私と電気泳動：はじまりはキャピラリー電気泳動

梶原 英之

農業・食品産業技術総合研究機構高度分析研究センター生体高分子解析ユニット

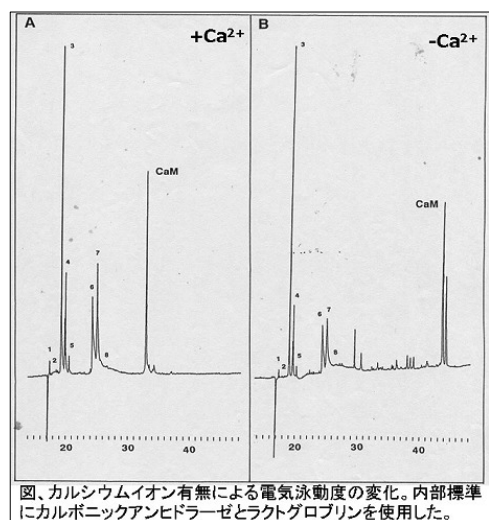
特別企画「私と電気泳動」ということで依頼されたが、正直、少々、困った。しかし、私も 2022 年度をもって定年、節目ということでちょうどいい機会だと思ったのでお引き受けさせていただいた。

私が電気泳動学会を知ったのは、キャピラリー電気泳動 (CE) を使ってカルシウム結合タンパク質 (CaBP) の分析を始めてからである。

今から 30 年ほど前、CE が最も優れた理論段数を持つ分析法ということで研究室に導入された。確かに、低分子化合物に対しては鋭いピークを示し、液クロよりずっと良かった。しかし、タンパク質の分析例はあまりなく、あってもリン酸などの酸性泳動液で、ピークもあまり鋭いものではなかった。そこで、色々な泳動バッファーを試すことから始めた。SDS-PAGE で使われるトリス塩酸系は最初こそいいものの、段々、電流値が変化し好ましくなかった。トリスグリシン系はまずまずだったが、トリストリシン系が非常に安定的で良い分離を示した。カウンターイオンがうまく働いたと思われた。

当時、これとは別にイネ葉で見出されたパルブアルブミン類似 CaBP を調べていた。このタンパク質の Ca 結合能の有無については奥山典生先生のところで実験し、確認した。CaBP は Ca によって立体構造が変化する。その結合は強固で、Ca の有無によって泳動速度が変化することが知られていた。実際、このタンパク質もわずかながらゲル電気泳動で泳動度が変化した。より、分離能の高い CE ならばもっとよくわかるのではないかと考えた。

まず、CaBP であるカルモジュリン (CaM) をモデルとし



図、カルシウムイオン有無による電気泳動度の変化。内部標準にカルボニックアンヒドラーゼとラクトグロブリンを使用した。

て実験法を確立した (図)。その結果、Ca の有無によって、CaM の溶出時間が大きく変化した。CaM には 4 つの Ca 結合サイトがある。Ca 濃度をうまく調整して泳動すると、エレクトロフェログラム上に Ca が 1、2、

3、4 個と段階的に結合したと思われるピークも出現した。他の CaBP だけでなく亜鉛結合タンパク質などについても泳動度の変化が見られた。

これらの結果を論文にして投稿した。実は 2 報目の投稿だったが、最初の論文がうまくいかず、こちらの方が先にアクセプトされた。その時のエディターかレフェリーが平井秀松先生だった。無事、印刷される運びとなった時、先生から電気泳動学会で発表するようにという直筆の手紙をいただいた。これによって電気泳動学会を知り、発表するに至った。

Ca の有無によって泳動度が変化するので、結合シフトアッセイ法と名付けた。論文などにもそう名付けて投稿し、戸田年総先生にも評価していただいたが、残念ながら今は使われていない。より一般的なアフィニティー CE という名称で呼ばれている。このアプローチは薬剤とタンパク質の結合を調べるのに使われたので、一定の貢献はできたと思う。アフィニティー電気泳動はそもそも電気泳動学会発の交叉電気泳動からと認識する。それを知りたいと思い、中村和行先生に初期の文献までお願いした。今から思うと恐縮至極である。

その後、別の植物由来ペプチド、抗リポリシス活性がありこれも金属が結合するのだが、CE を使って調べた。そして、論文博士を取得できた。残念なのは、ネーミングでの失敗と、本研究所が実用重視なので CE を使った研究があまり進められなかったことである。

一方、当時、二次元電気泳動したものをプロットし、PVDF 膜上のスポットを 10~20 個ほど集めて片一端から N 末端解析していた。質量分析装置ではなくタンパク質シーケンサを用いた方法である。前述のパルブアルブミン類似タンパク質も平野久先生と一緒に仕事をしていた時に見つけた。また、抗体を作る時にも 6 枚一度に泳動できる装置 2-4 台を 2 回転させ、両手を青く染めながらスポットをよく集めた。今はもっといい方法があるが、当時は力まかせで何でもできた。

院生時代は遺伝子を扱っていたので、アガロース電気泳動や長い平板ゲルを使って塩基配列解析をした。アガロース電気泳動のバンドはあまり鋭くない。当時は、Klenow fragment を使い、両手はアイソトープまみれ、ゲル版作製とサランラップ扱いは職人芸、200 塩基も読めれば万々歳、解読は手入力、だった。タンパク質は他と結合し、構造変化するという点で非常に興味を持った。これからは立体構造を意識した研究がより展開されていくと思うが、できることなら一つでも新知見を積み重ねたいと思う。

3 電気泳動でタンパク質機能を見る

島崎 洋次

愛媛大学大学院理工学研究科

電気泳動法によるタンパク質の分離分析の研究に携わって 30 年もの歳月が経った。学生時代やポストドク時代には、電気泳動というと SDS-PAGE によるサイズ分離しか実際に経験したことがなかった。平成 8 年から、本学会でも活躍された愛媛大学の真鍋敬先生の研究室に助手として採用されてから、電気泳動の分離分析技術の多様性や有効性について学びながら研究をはじめ、多数の学生さんとともに研究を地道に進めてきている。私が行ってきた電気泳動研究や教育活動の概要を紹介する。

非変性条件の等電点電気泳動法とサイズ分離電気泳動法を組み合わせた 2 次元ゲル電気泳動法(2DE)により、生体タンパク質をネイティブの状態で分離し、その分離されたタンパク質の酵素活性を解析していくとともに、質量分析計によるタンパク質の一次構造解析を行い、酵素活性などのタンパク質機能の情報を含んだ 2DE マップの構築を行った[1-3]。また、これらの 2DE マップは、酵素の薬剤などに対する特異性や非特異性を調べることに利用可能であること、および微量基質の検知するセンサーとして利用可能であることを示してきている[1,3]。また、種々の抗原で免疫された抗血清中のタンパク質をこの 2DE により分離し、PVDF 膜に転写することで抗体を固定化した膜(抗体膜)を微小デバイスとして作製した。この抗体膜に一滴の生体試料を滴下し、膜表面上にトラップされた抗原ペプチドやタンパク質を質量分析計で直接分析する手法を開発してきた [4,5]。さらに、卵白中に存在するリゾチームの活性と存在様式との関連について、非変性条件の等電点電気泳動法の分離や溶出法と組み合わせて分析する手法を開発してきた[6]。最近では、酵素を含有しているタンパク質複合体を 2DE により分離し、その複合体を構成しているタンパク質を分析するとともに、その複合体の生理的な役割を解明していく研究を進めている[7,8]。以上、電気泳動法により、インタクト状態のタンパク質を分離し、その機能を中心に調べる研究を進めている。

また、大学という教育機関に所属しているので、学生に分析化学の一分野としての電気泳動による分離分析の講義や実験を行ってきた。さらに、高校生を対象とするグローバルサイエンスキャンパス(愛媛大学)などで、「電気泳動による生体酵素の分離とその活性分析」についての体験講義と実験を行ってきた。他の機器を用いた分析法に比べて、ゲル電気泳動法で分離されたタンパク質は実際に視覚的にとらえやすいため、参加者は興味をもっていた。

以上のように、「電気泳動」は私の研究や教育などの基軸となっている。今後は、タンパク質複合体の分離分析技術の構築と、その複合体と疾患など生体機能との関連について研究を進めていきたい。また、電気泳動の体験実験などを通して、地域での理系教育の推進を継続していきたい。

参考文献

1. Shimazaki Y, Sugawara Y, Ohtsuka Y, Manabe T. Proteomics 2003;3: 2002-2007.
2. Shimazaki Y, Sugawara Y, Manabe T. Proteomics 2004;4:1406-1411.
3. Shimazaki Y, Shimizu K, Masaoka S. Talanta 2010;82:1063-1067.
4. Shimazaki Y, Miyamoto M. J Chromatogr B 2010;878:2852-2856.
5. Shimazaki Y, Nishimura Y, Saito M. J Pharm Biomed Anal. 2013;83:293-298.
6. Shimazaki Y, Ochi Y, Fujimura K. Electrophoresis 2018;39:1054-1061.
7. Nakao K, Shimazaki Y. J Electrophoresis 2022;:66:5-11.
8. 島崎洋次, 中尾香琳, 福家麗. 電気泳動;2023: in press.

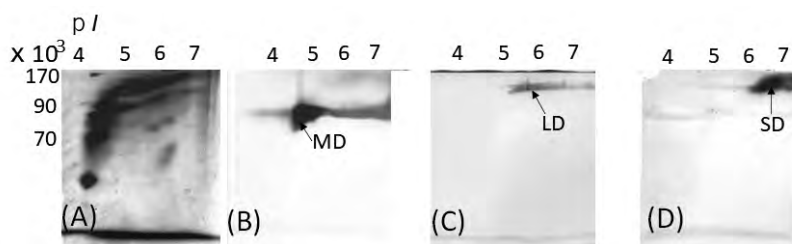


Fig. 1

Fig. 1: CBB staining (A), activity staining of malate dehydrogenase (MD) (B), activity staining of lactate dehydrogenase (LD) (C) and activity staining of sorbitol dehydrogenase (SD) (D) after cytosol proteins are separated by non-denaturing 2DE.

特別企画 1「私と電気泳動」

4 私と電気泳動：プロテオーム解析からがんの研究へ

近藤 格

国立がん研究センター希少がん研究分野

【はじめに】 私の研究生生活は、二次元電気泳動に始まり、がん研究に移行し、今に至っている。日本電気泳動学会で初めて発表したのは 30 年ほど前であり、思えば遠くへ来たものである。「私と電気泳動」という特別企画はたまたま思いついたのだが、電気泳動を軸に研究生生活を振り返ってみるというのは、考えてみると本学会ならではのユニークな試みではないかと自画自賛している。

【岡山大学時代（1992 年～）】 医学部を卒業したあとは病理医になるつもりだったのだが、先輩（近藤英作先生現新潟大学病理学教授）から、「大学院では基礎研究に集中し、学位をとってから病理にきた方がよい」とアドバイスされ、難波正義先生の研究室で大学院生活を始めた。細胞培養で有名な研究室だったのだが、「これからはタンパク質の時代なので君はタンパク質をしなさい」というのが私に与えられたテーマ（？）だった。基礎研究者の生活というと趣味的な牧歌的なものをイメージしていたのだが、その予想は完全に裏切られた。医学部出身なので実験のことは全くわからずモル数の計算も忘れていたところに O'Farrell の原法をわたされ、自分で実験系を立ち上げるようにと言われた。SDS もウレアも何も知らない状態から独学で始めたので、1 年目は銀染色にたどり着くのが精いっぱい。2 年目からようやく再現性云々の話しになり、シークエンスしたいスポットが決まったのが 3 年目。誰も使っていなかった液クロを立ち上げてエドマンシークエンスまでできるようになったのが 4 年目である。毎朝抄読会があるうえに実験は絶えず失敗するので、毎日、早朝から深夜まで緊張感が抜けることはなく、たいへんな 4 年間だった。今の時代の教育論からすると無茶苦茶なのだが、自分で調べ論文を読めば新しいことは始めることができる、という自信がこの荒行で見に着いた。

【ミシガン大学（1998 年～）】 とは言うものの、当時は分子生物学が普及し、新しい遺伝子が続々とクローニングされていた。質量分析のない時代であり、遅々として進まない実験はたいへんなストレスで、タンパク質はもう止めて他のことをしたいと切望していたのだが、二次元電気泳動しか知らないのでもうしょうもなかった。そこで、岡山大学で 2 年ほど助手をしたあとに、二次元電気泳動の大家だったミシガン大学の Samir Hanash 教授の研究室に留学した。Hanash 教授の研究室では、二次元電気泳動を使ってタンパク質の発現解析と DNA メチル化の解析（RLGS 法）を行っていた。タンパク質は日本で散々やっ

たので DNA がやりたい、とお願いして RLGS 法を始めた。新しい技術の習得もエピゲノミクスの研究もおもしろかったのだが、この分野ではとてもプロとしてやっていける気がせず、なんとか論文を仕上げて帰国することにした。

【国立がんセンター（2001 年～）】 1 年ほど岡山大学で助手をし、難波先生が御退官されるので次の就職先を探していたとき、ちょうど国立がんセンターのポストが公募にでており、応募したところ運よく採用された。国立がんセンターでは蛍光二次元電気泳動を始め、バイオマーカー開発のためにいくつか工夫をした。まず、超高感度の蛍光色素をレーザーマイクロダイセクションした試料に使えるようにし、次にインフォマティクスの技術でプロテオーム解析ができるようにした。そして大型の電気泳動槽を自作して網羅性を上げた。プロテオーム解析がブームの時代には多くの若い医者が私の研究室を訪れ滞在し、研究指導をした。国立がんセンターに来たばかりのころはがんには興味がなかったのだが、指導を通じてプロテオーム解析よりもがん研究の方がおもしろくなってきた。バイオマーカーの開発には蛍光二次元電気泳動法がベストなのか？という基本的なところを考えるようになり、研究室で開発されるバイオマーカーは臨床で使われるようになるものなのか？という、医療業界の構造も考えるようになった。

【国立がん研究センター（2014 年～）】 そうこうしているうちに厚労省が希少がんに力を入れることになり、中央病院に希少がんセンターができ、研究所で誰か希少がんをやらないかということになった。そこで、ラボを「希少がん研究分野」と改名し、心機一転して新しい研究をすることにした。希少がんに普遍的に存在する問題としてがんモデルが不足していることに注目し、患者由来がんモデルの開発を始めた。予想した以上に難しいところもあったが、優秀な部下に恵まれ解決でき順調にいくようになった。

【これからの研究活動】 希少がんの諸問題を解決する研究、臨床応用に通じる研究、事業・産業につながる研究など、挑戦してみたいことはたくさんある。社会を、未来を、よい方向に変えるような仕事がしたい。人材育成も課題である。自分のもっている何か価値あるものを後世に伝えるためにどうしたらよいのだろうか。おもしろいことがありすぎて、電気泳動の開発はしばらく休眠状態が続くそうである。

5 蛍光二次元電気泳動法による悪性骨軟部腫瘍のバイオマーカー開発を目指したプロテオーム解析研究から臨床医の私が学んだこと

菊田 一貴

栃木県立がんセンター骨軟部腫瘍・整形外科

我々、整形外科医が扱う悪性腫瘍は希少がんである肉腫である。希少がんの定義は年間発生数が人口 10 万人あたり 6 例未満の「まれ」な「がん」とされており、数が少ないがゆえに診療・受療上の課題がメジャーキャンサーに比べて大きいがん腫とされている。希少がんである肉腫の治療のパラダイムシフトは 1970 年代に広範切除による外科的切除法の確立、全身化学療法の導入による集学的治療が施行されるようになったことにある。それまで肉腫全体の 5 年生存率は 20% 程度であったが、集学的治療の導入により、肉腫全体の 5 年生存率は 60% 程度まで改善した。しかしながら、その後は、肉腫が希少がんであるために、さらなる治療成績向上に必要な新規診断治療法開発のための研究基盤は整備されず、患者数が少ないために臨床検体やデータの集積には限界があり、1970 年代の肉腫治療のパラダイムシフトから 50 年近く経過したが、治療法の大きな変化はなく、5 年生存率は頭打ちの状態である。そのため、肉腫治療を専門とする整形外科医は日々の肉腫診療に取り組むだけではなく、現在の治療法では治すことのできない患者のために、臨床だけではなく、肉腫の新規診断治療法開発につながるような何らかの研究活動に関わる責任がある。このような状況の中、今から約 20 年近く前になるが肉腫の新規診断治療法につながるようなバイオマーカー開発を目指し、大学院生として、肉腫研究の活動に関わるようになったのが私と電気泳動の出会いである。その当時、がんの病態に応じて変化する分子背景を網羅的に解析する、いわゆるオミクス研究が全盛期であった。そのため、私もタンパク質レベルで肉腫の病態に応じて変化する分子を網羅的に解析するプロテオーム解析を学ぶため、当時、この分野の第一人者である国立がんセンター（現国立がん研究センター）近藤 格先生の研究室に在籍した。研究室では、蛍光二次元電気泳動法の技術とデータマイニングの手法を組み合わせたプロテオーム解析を学んだ。本手法は、一度に 5000 種類近いタンパク質が肉腫の病態に応じて発現量が変化することを観察でき、肉腫の予後や化学療法奏効性、腫瘍の浸潤能の違いにより発現量が変化するタンパク質を捉えることが可能であった。肉腫の病態に応じて、発現量が変化する多数のタンパク質の中で、特に肉腫の病態に関わると考えられるタンパク質を見つけ出す作業は非常に困難なものであったが、データマイニングの手法と、自身が日々の臨床で培った経験が非常に役に立ち、がん研究のためには、基礎の技術と臨床の経験との融合が非常に大切であることを思い知ることができた。プロテオーム解析研究に可能性を見出した中で、この素晴らしい技

術を用いて、多彩な組織型を有する肉腫の中から、どのような肉腫を対象に研究を進めていくかが次の課題であった。肉腫は上皮性癌とは異なり、発生のピークが中高齢者だけでなく、小児・AYA 世代と言われる様々なライフイベントに直面しながら社会の中で重要な役割を担う若い世代にもあることである。そのため、このような未来のある若い世代の肉腫患者の治療がより良いものになってくれればという思いから、小児・AYA 世代の代表的な肉腫である骨肉腫と Ewing 肉腫を研究の対象とした。また、高齢社会にある我が国において、中高齢者の肉腫にも目を向ける必要があり、中高齢者で発生頻度の高い粘液線維肉腫も研究の対象とした。粘液線維肉腫は 2002 年に新たにその存在が明らかとなった肉腫であり、その当時、その浸潤性に伴う外科的切除後の再発率の高さが注目されていた。これらの肉腫を対象とし、骨肉腫では化学療法奏効性に関わるタンパク質を、Ewing 肉腫では予後に関わるタンパク質を、粘液線維肉腫では浸潤能に関わるタンパク質をそれぞれ同定しバイオマーカーとしての臨床応用を目指して研究をおこなった。結果として、骨肉腫では Peroxiredoxin2 を、Ewing 肉腫では Nucleophosmin を、粘液線維肉腫では DCBLD2 をそれぞれの病態に関わる可能性があるタンパク質として同定した。これらのタンパク質の発現を検証するために、実際の臨床検体を用いて施行した免疫染色で腫瘍細胞に発現が確認できた時の感慨は今でも忘れることはできない。一方で、がんの病態というのは沢山の分子が相互作用した結果として示されるものであり、その複雑性に対して、私の研究で、それぞれの肉腫で同定したタンパク質はわずか一つずつであり、残念ながら最終的に現在まで臨床応用に至ったものは一つもない。しかしながら、これらの研究を通して、研究のためには患者からの臨床検体やデータが必須であり患者の協力無くしては研究ができないこと、未来の新しい医療のための基礎研究の重要性、これらの土台の上に我々の日々の臨床が成り立っていることを深く理解することができた。将来の肉腫治療成績向上には、外科的切除など整形外科医の臨床技術の向上も大切、新規薬剤開発などの基礎研究も大切であり、どちらも欠くことはできず、基礎と臨床が一体となった取り組みが、肉腫治療の発展に大切であることを電気泳動という技術から学ぶことができたことは今でも財産である。現在は、どちらかと言えば、臨床に自身の主軸をおいて肉腫と戦っているが、これまで得ることができた経験を踏まえて、研究との連携を図り、肉腫患者の治療成績向上を目指して、今後も邁進できればと考えている。

特別企画2「私と電気泳動」

6 電気泳動学会と私

藏満 保宏

北海道医療大学 先端研究推進センター
(兼担) 医療技術学部臨床検査学科

はじめに

このたび石垣島で開催されます第74回日本電気泳動学会学術集会のシンポジウムで『電気泳動と私』という題目で発表するように国立癌研究センターの近藤格会長からご指名を受けて了承したものの、あまりにも過分な表題で、どのような内容にしようかと困惑しております。電気泳動学会学術集会のシンポジウムなので、前半は自分と日本電気泳動学会との絡み、後半は電気泳動技術を用いてきた研究を振り返って紹介させていただきます。

【日本電気泳動学会と私】

1997年5月に北海道大学医学部癌研究施設病理部門から山口大学医学部の生化学第一講座に転勤したのですが、その主任教授が中村和行先生、先代の教授が竹尾和典先生、さらに先々代の初代教授が中村正二郎先生という日本電気泳動学会とは切っても切れない存在の先生方を輩出してきた教室でした。中村正二郎先生は、生体物質同士の特異相互作用の検出のために開発した交叉泳動法(Cross Electrophoresis)を用いて、酵素・基質複合体や抗原・抗体複合体の検出に成功しました。この成果は、世界に先駆けるものでした。自然科学分野での研究において理論や技術の多くが欧米から輸入されていますが、交叉泳動法は日本で独自に開発されたものとして特筆すべきものです。竹尾和典先生は、酵素・基質複合体の研究に優れた業績をあげました。親和電気泳動法の理論的基礎を確立し、さらに2次元電気泳動法(Two-Dimensional Gel Electrophoresis: 2-DE)の原理を用いて、2次元親和電気泳動法(Two-Dimensional Affinity Electrophoresis: 2-DAEP)を開発し、体液中の多様な蛋白質の分析を行いました。中村和行先生は、2-DAEPを用いてマウス血清中の抗原特異ポリクロナール抗体を単一なモノクロナール抗体に分離することに成功し、さらに抗原刺激による抗体の多様性発現や親和性成熟の解析に成功していました。小生が山口大学に赴任したころは丁度2-DEを用いてヒトの生命現象の維持に連座する蛋白質の網羅的な研究(ヒトプロテオミクス)を行い始めた時で、合流するや否や小生もヒトプロテオミクス研究に引きずり込まれていきました。

後半は電気泳動を用いて行ってきた小生の研究をざっと紹介致します。

【癌組織・癌細胞のプロテオーム解析】

C型肝炎関連肝癌の癌組織と周辺非癌部組織の2次元電気泳動と質量分析を用いたプロテオーム解析を行いHSP70.1などの分子の増加と、Ferritin 軽鎖、Enoyl-CoA hydrataseなどの減少が認められました。臨床治療でHSP70.1のRNAを導入した樹状細胞を用いた細胞療法で2例の患者で腫瘍が縮小・消滅したという結果が得られ臨床応用への期待がもたれています。また、C型肝炎関連肝癌患者の血清中にHSP70.1の自己抗体が高発現していることを同定し、超高感度プロテインチップのプロトタイプを開発作製しました。この血清中の自己抗体同定については、同じ手法を用いて乳癌患者の血清中にcyclophilin Aとtriosephosphate isomeraseに対する自己抗体が同定できることも報告しました。

膵臓癌組織と膵臓癌細胞株からのプロテオーム解析からCofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L)が膵臓癌細胞に高発現しており、SSH1Lの発現が膵臓癌細胞の動きを上げて浸潤能を上げる事が明らかになりました。

悪性胸膜中皮腫の標的治療の蛋白質同定を目的にプロテオーム解析を行い、PEA-15が悪性胸膜中皮腫細胞内で特異的に発現増強しており、siRNAを用いたノックダウンで増殖が抑制されることが明らかとなりました。

【化学療法耐性膵癌のプロテオーム解析】

Gemcitabine 耐性膵癌細胞株のプロテオーム解析の結果、HSP27が耐性株に高発現していることを明らかにし、HSP27阻害効果が予想される様々な試薬や食品成分によってHSP27を抑制し、Gemcitabineとの併用効果を確認して報告して来ました。

【癌悪性化の制御を目指したプロテオーム解析】

実験的悪性化進展マウス腫瘍モデルを用いて、浸潤・転移抑制標的蛋白同定のためにプロテオーム解析を行った結果、HSP90、Cofilin-2、Fascin 1、GLO1等の蛋白質が増強していることが明らかになり、それらの抑制が腫瘍の悪性化に関与しているかを現在探索しています。

このような研究の流れを取りとめもなく話していこうかと考えております。

7 電気泳動の基礎老化研究への応用

三浦 ゆり

東京都健康長寿医療センター研究所

わが国は 2007 年に超高齢社会（65 歳以上の人口が全人口の 21%を超える）に突入したが、その後も世界に類を見ないほど速いスピードで高齢化が進み、2022 年には 65 歳以上が総人口の 29.1%を占め、100 歳以上の人口が 9 万人を超えるまでに至っている。この超高齢社会を健全に維持するためには、“健康寿命を延ばすこと”が最も重要であると考えられる。“少しでも長く健康でいたい”というのは、今や個人の願いであるだけでなく、社会全体の急務となっており、老化や老化関連疾患の予防や治療を対象とした研究はきわめて重要である。

タンパク質は、組織において様々な生命現象を担う分子であるため、タンパク質の発現、翻訳後修飾、相互作用などは、その時々々の健康状態を反映して臨機応変に変動する。そのため、タンパク質を詳細に解析することで老化や疾患による組織の機能低下のメカニズムを明らかにし、予防や治療のターゲットに繋げることができると考えられる。本シンポジウムでは、老化や老化関連疾患による組織の機能低下のメカニズムを明らかにするため、プロテオミクスを用いて行った研究を中心に紹介したい。

特別企画2「私と電気泳動」

8 生体内シグナル伝達および疾患研究と電気泳動

武川 睦寛

東京大学医科学研究所 分子シグナル制御分野

電気泳動技術は蛋白質、核酸、代謝物、翻訳後修飾など、さまざまな生体機能分子の解析に必須であり、基礎生物学研究のみならず、疾患研究や臨床医学研究をも包含する幅広い生命・医学研究に活用されてきた。我々はこれまで、MAP キナーゼカスケードや液-液相分離体「ストレス顆粒」を中心とする生体内シグナル伝達機構の制御メカニズムを分子レベルで明らかにするとともに、その破綻がもたらす疾患発症機構を解明し、癌や自己免疫疾患などの難治性疾患の克服に役立てることを目標に研究を推進してきた。近年、生体分子解析分野における飛躍的な技術革新に伴って、従来型電気泳動技術の活用範囲は狭まりつつあるものの、生体内情報伝達の制御において最も重要であると考えられる蛋白質分子の翻訳後修飾の分析などにおいては、電気泳動を基盤とする解析手法が未だ極めて有用であり、現在においてもなお、電気泳動技術を活用した新たな技術基盤が創出され続けている。本発表では、我々の研究室で得られた最新のデータを紹介しつつ、電気泳動法を活用した生体内情報伝達および疾患研究について議論したい。

9 液相等電点電気泳動法とマルチ PK 抗体を用いた細胞内プロテインキナーゼの解析

杉山 康憲

香川大学農学部 応用生物科学科

はじめに

プロテインキナーゼ(PK)はタンパク質のリン酸化を介して細胞内情報伝達機構において中心的な役割を担っており、様々な生命現象に関与している。ヒトではPK 遺伝子が 518 種類存在しているが、これらの PK が、いつ、どこで、どの程度発現し、どのように活性が制御されているか、その全貌は明らかでない。そのため、細胞内 PK の全体像を知ることができれば、生命現象の解明や疾病の原因究明において重要な意味を持つと考えられる。このような背景の中で、我々は多様な PK を幅広く認識できるモノクローナル抗体としてマルチ PK 抗体を作製した。

マルチ PK 抗体

従来の優れた抗体とは「抗原に対して厳密な特異性を持つ抗体」である。しかしながら、マルチ PK 抗体は「特定の PK だけではなく PK ファミリーのタンパク質を幅広く認識できる抗体」という逆転の発想から生まれた抗体である。マルチ PK 抗体は PK の触媒領域に存在する 12 か所のサブドメインの中でも最も高度に保存されたサブドメイン VIB 配列を認識することにより、PK ファミリーを特異的かつ幅広く認識することが可能である。得られた抗体には、Ser/Thr キナーゼを認識する M1C 抗体と M8C 抗体、Tyr キナーゼを認識する YK34 抗体の 3 種類が存在する。

液相等電点電気泳動法とマルチ PK 抗体

マルチ PK 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行うと、細胞抽出液から多数の PK バンドを検出することが可能である。しかしながら、同一分子量の PK を分離検出することができないという欠点も存在する。我々は細胞内 PK をプロファイルするため、一次元目に等電点電気泳動を行い、二次元目に SDS-PAGE を行う二次元電気泳動法に焦点を当てた。二次元電気泳動には、一次元目に固定化 pH 勾配ゲルを用いる手法が広く利用されている。この手法は、分離能が非常に優れており、再現性が得やすいという利点が挙げられるが、約 100 kDa 以上の高分子タンパク質の検出や分離できるタンパク質量に難点がある。そこで、一次元目にタンパク質を溶液中で等電点分離できる MicroRotofor (Bio-Rad Laboratories) を利用した。MicroRotofor はポリエステル膜で 10 の区画に分けられたサンプルチャンバーからなり、各区画をタンパク質が自由に透過できるようになっている。この装置を用いた場合、10 の区画にしか分離できないため分離能は低い、高分子タンパク質の分離に優れており、mg オーダーのタンパ

ク質の分離が可能である。そのため、マルチ PK 抗体と組み合わせた場合には、同一分子量の PK を問題なく分離することができ、分離後のサンプルを質量分析装置で解析する場合にも十分量のタンパク質を得ることが可能である。

がん微小環境に関連する PK の探索

がん細胞が形成する腫瘍の内部は低酸素および低栄養状態となっており、このような特殊な環境は腫瘍微小環境と呼ばれている。腫瘍微小環境はシグナル経路の変化、代謝系の変化、薬剤耐性の亢進などを促すため、がんの悪性化と密接に関わると考えられている。そのため、がんの発生や進行において腫瘍微小環境の重要性が注目されてきている。

我々は腫瘍微小環境に関連する Tyr キナーゼを探索するため、ヒト肝細胞がん由来 Huh7 細胞を 3D 培養することにより細胞塊を形成させ、細胞塊形成に伴って発現変動する Tyr キナーゼを YK34 抗体を用いて解析した。その結果、3D 培養によって発現量が増加する 56 kDa のバンドを見出した。次に、3D 培養した Huh7 細胞の細胞抽出液を MicroRotofor を用いて等電点分離し、56 kDa のバンドが検出された画分を質量分析装置により解析した。その後、候補 Tyr キナーゼの発現量をリアルタイム PCR により解析したところ、3D 培養によって発現量が増加する Tyr キナーゼとして serine/threonine/tyrosine kinase 1 (STYK1) が同定された。加えて、自作した抗 STYK1 抗体を用いた解析により、3D 培養によって STYK1 はタンパク質レベルにおいても増加することが示された。次に、3D 培養による STYK1 の発現制御機構を明らかとするため、Huh7 細胞をグルコース不含培地を用いて培養したところ、STYK1 はグルコース飢餓によって mRNA レベルおよびタンパク質レベルで発現量が増加することが明らかとなった。これまでに、STYK1 は上皮間葉転換、浸潤、転移などの癌悪性化に寄与することが報告されている。そのため、STYK1 は腫瘍形成に伴った腫瘍微小環境における栄養飢餓により発現量が増加してがん悪性化を促進すると考えられる。

おわりに

液相等電点電気泳動法とマルチ PK 抗体を組み合わせた手法を利用することにより、細胞内 PK を簡便に同定することが可能である。今後は、この手法が広く利用されることによって、様々な生命現象や疾病のメカニズムの解明に役立つことを期待する。

特別企画 2「私と電気泳動」

10 電気泳動法とがんの診断マーカー探索

長塩 亮

北里大学医療衛生学部医療検査学科臨床検査学

北里大学大学院医療系研究科応用腫瘍病理学

北里大学医療衛生学部附属再生医療・細胞デザイン研究施設細胞デザイン開発センター

私は大学院に入りたての頃、北里大学理学部物理学科の前田忠計教授の研究室でアガロースゲル二次元電気泳動法とゲル内消化の方法を教えていただき、それ以降、当研究室のマーカー探索技術として、なくてはならないものになっている。習い始めた当時の電気泳動像を図に示す。

初めは異なる組織型由来の細胞同士の単純な比較によるマーカー探索であったが、その後、異なる条件で培養した細胞間での比較や抗がん剤耐性株とその親株での比較、さらには山中 4 因子を導入したがん幹細胞様細胞とその親株との比較といった具合に比較対象を工夫することで様々なマーカー候補タンパク質を見出してきた。また、二次元電気泳動法で二次元に展開したタンパク質を PVDF 膜に転写し、希釈した肺がん患者血清を反応させるというシンプルな手法を行うことで、肺がん患者血清中からがんの診断に有用な自己抗体を検出することに成功している。さらに、当研究室で精力的に進めてきたランダム免疫法による単クローン性抗体の作製においても、免疫プロット法での抗原の確認や免疫沈降法による抗原同定などに電気泳動法を利用している。

本発表では電気泳動法を用いたマーカー探索研究について幾つか例を挙げて紹介したい。

①がん幹細胞様細胞を用いたプロテオーム解析

がん幹細胞は抗癌剤・放射線療法への抵抗性やがんの増殖や浸潤などの悪性度に寄与することが知られている。このがん幹細胞はがん組織中に極少数しか存在しないため、様々な研究に用いるのは困難である。我々は iPS 細胞化の技術を応用し、がん細胞からがん幹細胞様細胞を樹立し

た。このがん幹細胞様細胞とその親株の細胞を二次元電気泳動法にて比較することで新たな腫瘍マーカーの獲得を試みた。その結果、同定された NAP1L1 タンパク質は肺腺がんにおいてリンパ管侵襲や血管侵襲などと有意に相関した。また、独立した予後不良因子であることが分かり、診断マーカーとして有用な分子であった。

②二次元免疫プロット法を用いた自己抗体解析

がん患者血清中にはがん細胞などから放出された様々なタンパク質に対して作られた抗体（自己抗体）が存在しており、実際に p53 に対する自己抗体は医療現場において腫瘍マーカーとして利用されている。当研究室においても二次元電気泳動法にて二次元に展開したゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写後、希釈したがん患者血清を一次抗体に用いた免疫プロット法を行うことで新たな腫瘍マーカー候補となり得る自己抗体を多数検出している。

③ランダム免疫法による単クローン性抗体の網羅的作製

ランダム免疫法は精製したタンパク質やペプチドではなく、がん細胞自体を免疫源とすることでがん細胞が持っているあらゆるタンパク質に対する抗体を網羅的に作製する手法である。本手法で作製された抗体は抗原が不明なため、二次元免疫プロット法や免疫沈降法を用いた抗原同定が必要である。作製された単クローン性抗体にはがんの診断に有用な抗体が多数含まれており、マーカー探索法として優れた手法である。

このように、電気泳動法は日常的な手法であり、今後も工夫を凝らして新たなマーカー探索に利用していきたい。

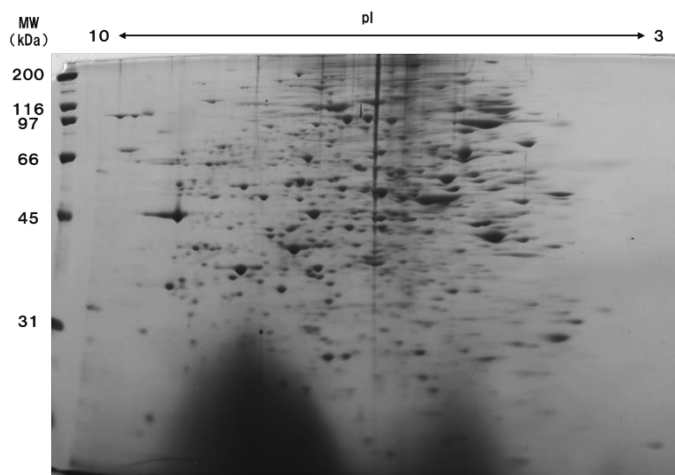


図. 肺大細胞性神経内分泌がん細胞（LCN1）を用いた二次元電気泳動像

11 稀な症例解析はあきらめない心で立ち向かうべし — 真実はいつもひとつ —

井本 真由美

近畿大学病院 中央臨床検査部

“臨床検査は宝の山”これは、故北村元仕先生が最初におっしゃった言葉である。しかし、ダイヤモンドの原石を磨いて価値のあるダイヤモンドにするのか、石ころのまま捨ててしまうかは、見つけた人次第である。私が近畿大学病院中央臨床検査部に就職してから早40年になるがその間、生体、免疫、生化学ふたたび生体、緊急検査、尿検査、細菌検査室を転々とし現在は採血室と治験の責任者である。私くらい専門外の部署でばかり働いている技師はいないと思う。27歳の時に遭遇した当時日本で3症例目の μ 鎖病に遭遇してから、私の電気泳動人生が始まった。当初、免疫電気泳動の所見は臨床検査医学のDrが書いていた。技師はきれいな泳動像を提供するだけの存在であった。 μ 鎖病との遭遇は、私が午後から電気泳動講習会に行くというタイミングで、本患者様の免疫電気泳動法像を判定した。明らかに μ 鎖の反応がおかしいことに気づいた。当時は検体の持ち出しにも何の制限もなかったことから、検体を持って講習会に参加した。そこで出会ったのが私の最初の恩師である自治医科大学の櫻林郁之介先生であった。おひげが素敵なダンディ（今の言い方でイケオジ）な先生で、超えらい先生であるにも関わらず、私のような初対面のものにも優しく、気さくで面倒がらず、だれに対しても面倒見がいいスケールの大きな先生であった。実習では私が持ち込んだ検体も試料として使用し先生にも像を見ていただいた。やはり μ 鎖病が疑われた。櫻林先生は、免疫固定法で、L鎖に反応しない事を確認し、ゲルろ過や、分子量をみないとだめだねと言われた。しかし当時の検査部には、指導者はおらず、免疫固定法もまだキット化されてなくて、ゲルろ過など聞いたこともなく、どこから取り掛かればよいのかもわからない状態であった。しかし、まず、出来ることから取り掛かろうと、電気泳動学会から出版されていた本をみながら、免疫固定法と薄層ゲルろ過法、免疫ゲルろ過法を何回も失敗しながら繰り返し行った。幸いなことに近畿大学にはライフサイエンス研究所といって実験を手伝ってくれる施設があり、そこでゲルろ過クロマトグラフィーを教わった。その後、生化学教室を紹介され、すべてお手製試薬、お手製ゲルでSDS-PAGEとイムノブロットを教わり、異常 μ 鎖の分子量解析を行った。勤務時間内で実験が出来なかったため、毎日早くて21時、遅くて23時頃まで実験をしていた。そして電気泳動学会に入会した次の年に、山口県宇部市での総会で、発表することができた。最初で最後の質の高い学会で報告できたことを思い出に仕事を続けようと思っていたのであるが、その後、次々と異常免疫グロブリンの稀な症例に遭遇し、櫻林先生に助

言いただきながら生化学教室の先生方に教わり、いろんな蛋白精製手法を学び、電気泳動とイムノブロットを駆使し、時にはプロテアーゼ処理をはじめとするいろんな物理学的解析ができる処理も学び、症例を解析し論文化してきた。一番時間がかかったのは、世界で1例目の半分子型7SIgMの症例解析で、半分子というだけではなく、異常 μ 鎖のN末端から20個のアミノ酸配列が、患者 κ 鎖のN末端から20個のアミノ酸配列と同一であり、21個目から今まで報告にないアミノ酸配列であることがわかった。そして本当に異常 μ 鎖が、 μ 鎖なのかを証明するために異常 μ 鎖をパインやリジルエンドペプチダーゼ処理し、その切片のアミノ酸配列から既知のheavy chainのvariable regionであることを証明し、抗 μ 鎖抗体と反応することを確認、晴れて半分子型7SIgM世界1例目報告¹⁾に至った。さらに稀な反応機序を持つ温度依存性蛋白や、免疫固定法でもL鎖が全く反応しないIgG結合IgD型M蛋白、低分子量 κ 鎖、半分子型IgGなど報告してきた。そしてこれらのノウハウを応用して、生化学、免疫、尿化学分野で遭遇する非特異反応の発生機序の解析を行ってきた。非特異反応の解析の師匠は、栄研化学研究所の渡辺勝紀先生である。渡辺先生には異好抗体の測定や疎水クロマトの実験の際にお手伝いいただき、異常反応解析の助言もたくさんいただいた。また、尿検査をしていた時には、“BJPが尿蛋白試験紙に反応する稀な症例”という論文に憤慨し、“尿タンパク試験紙にBJPが反応することの検証”²⁾を行った。査読では超過激バトルとなったが、電気泳動法を利用した実験結果により、論破することができた。今でも反応しないと書かれている文章を見ると残念であるが、検査提要35版（2020年）でようやく“反応性には違いがあるがBJPは尿蛋白試験紙に反応する”と修正された。

私の検査技師人生は、電気泳動と私を支えてくれる多くの先生方とともにあった。人との出会いは神様からのプレゼントである。今思えば、東京医科歯科大学附属臨床検査技師学校時代に、芝紀代子先生の電気泳動の講義に感動し、学校の先輩でもある桑克彦先生の世界初症例の特別講義でも感銘を受けた。電気泳動と私は、この時点から赤い糸で結ばれていたのかもしれない。今後も、患者さんのために日常検査における異常反応解析と、部下の指導を行い、さらにISO15189のJAB審査員として今までの経験を活かした仕事をしていきたい。

参考文献

- 1) M.Imoto et.al, Clin Chim Acta 1999;282:77-88
- 2) 井本真由美 他、臨床化学 2014;43:217-225

特別企画3「私と電気泳動」

12 私と電気泳動 等電点電気泳動法と歩んだ35年

飯島 史朗

文京学院大学 保健医療技術学部

はじめに

電気泳動法は様々な物質の分離・同定に応用されるが、その高い分離能から生体内高分子の分析には最も適した方法であり、さらに病態分析にも応用可能と考えている。演者は1988年に日本電気泳動学会に入会以来35年間、電気泳動法に頼りながら研究を進めてきた。今回、これまでのタンパク質や糖鎖を用いて得られた知見をお話する機会をいただいたので、会員の皆様のすこしでもお役に立てればと考えながら、振り返っていく。

電気泳動との出会い

演者の初めての就職先は、東京医科歯科大学医学部附属病院検査部であり、初めて任された臨床検査項目は、セルロースアセテート膜を用いた血清タンパクの分画だった。1日100件程度の検体から様々なパターンが現れたが、当時まだ珍しかった血清タンパク分画自動分析装置を運用していたことより、初めての学会発表はこの機器の性能評価になった。その後、リボタンパク分画、LD・ALP・AMYアイソザイムなど当時生化学検査領域で行われていたほとんどの電気泳動を利用した分析を担当し、自動分析器では解らない多様な症例に遭遇し、電気泳動の素晴らしさに気づいた時代であった。当時、この検査部では、芝紀代子博士のご指導の下で、等電点電気泳動、SDS-PAGE、二次元電気泳動を用いた、最先端の分析法による研究が行われており、私もその一員として、日本電気泳動学会（以下 本学会）に入会した。初めての学会活動は、野口記念館でのシンポジウムだった。その会場では多くの検査技師の方々が活発に討論されており刺激を受けたことを覚えている。また、会場には故戸田年総博士がいらっしやり、セルロースアセテート膜等電点電気泳動に関する話を伺ったことが、その後の学位取得につながった。

電気泳動法講習会

入会当時、本学会では、櫻林郁之介先生、藤田清貴先生、本庄利男先生をはじめとする麻布大学の先生方が中心となって電気泳動法講習会が盛んに行われており、演者は講師として参加させていただいた。当時の検査部で行われていたタンパク分画法、免疫電気泳動法、免疫固定法、アイソザイム分析などの技術を取得するために、検査技師はもとよりメーカーの方も多数参加していた。技術の進歩に伴い、SSCPやRLFPなどの遺伝子分析や、二次元電気泳動法と質量解析を応用したプロテオーム解析まで守備範囲に加わるなど時代の変遷に合わせてきた講習会も現在は

中断した状態なのは残念ではあるが、これは電気泳動法という分析手段が当たり前の手法として日常に溶け込んだ結果なのかもしれない。

電気泳動を利用した基礎研究

縁あって大学教員として教育研究に携わることとなり、薬学部で電気泳動法に関する研究を推進してきた。等電点電気泳動法は、タンパク質を構成するアミノ酸のわずかな違いや、リン酸化、結合糖鎖の違いなど翻訳後修飾を含む分子のわずかな構造変化をとらえられる可能性がある。しかし、支持体として用いるアガロースやポリアクリルアミドゲルなどの取り扱いが煩雑であるため、臨床検査の現場での実施は困難であった。このため、臨床検査室で汎用されるセルロースアセテート膜を用いた等電点電気泳動法を開発した。この方法の最大の特徴は、セルロースアセテート膜を複数枚重ねた電気泳動を行い、全ての膜で同一の泳動パターンを得ることが可能である点である。また同一パターンを示すセルロースアセテート膜に対して異なる染色法を適用すれば、様々な情報を得ることができる。本法を応用して、CBBや銀コロイドによるタンパク質検出法、シッフ染色による糖タンパク検出、乳酸脱水素酵素を実施例とした酵素活性染色法、ウェスタンブロット法、レクチンを用いた糖鎖検出法を開発し、様々な角度からの臨床検体の解析を容易とした。

基礎から応用、そしてこれから

分析手法の開発からその応用に研究分野を移し、タンパク質およびタンパク質に結合している糖鎖構造変化の検出を通して、新たなバイオマーカーの発見につなげてきた。例えば、糖鎖は、がんの浸潤や転移など細胞接着に関与している報告があることから、がんの病態変化に伴った糖鎖構造変化を検出し「骨髄腫の新たなバイオマーカー」を明らかにしたほか、「新たな炎症マーカー開発のための急性相反応タンパクの糖鎖解析」、「尿中トランスフェリン分析による早期腎症の検出」に関する研究を行ってきた。

活動の場が臨床検査技師養成課程に移った現在、これまでの教育研究の実績が、本学会の児玉賞受賞理由として評価されたことに感謝している。臨床検査の現場では自動化の流れにあるが、おかしいと思う検体に出会ったときは電気泳動での解析が有用であることを、これからも後進に伝えていきたいと考えている。

本発表では、本学会でのこれまでの報告内容を中心に、臨床検査分野に電気泳動法を応用した研究成果を述べる。

13 2D-DIGE からセルロースアセテート膜電気泳動そして分子マトリックス電気泳動へ

亀山 昭彦

国立研究開発法人産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門

私の研究は糖鎖性腫瘍マーカーの有機化学的全合成研究から始まった。これは 50 段階程度の合成反応と精製、構造確認を積み上げていく作業だが、電気泳動が使われることは一切なかった。その後、自身が合成したシアリルルイス X という糖鎖性腫瘍マーカーが、血管内皮細胞接着分子 ELAM-1(E-セレクトイン)のリガンド分子であることが報告され、研究は抗炎症剤や癌転移阻害剤の創薬研究へと進展した。多数のシアリルルイス X の類縁体をデザインし合成する日々であったが、やはり電気泳動に関わることはなかった。アルバータ大学では癌の転移に重要な働きを担うとされていた糖転移酵素 GnT-V に対する阻害剤の研究を行っていた。私はコンビナトリアルケミストリーで 400 種程度の化合物ライブラリーを合成し、その中から GnT-V と強く結合する化合物をスクリーニングした。この時、利用した方法がフロンタルアフィニティークロマトグラフィーと質量分析計を連結したシステム(FAC-MS)であった。これはプロテオミクスを研究していた隣のラボとの共同研究で作られたものである。

出会い

ポストゲノム時代の幕開けの時期、ライフサイエンス企業に入社し、すぐ産総研に出向した。質量分析計を使用していたことがきっかけで、産総研での私のテーマはグライコプロテオミクスの技術開発になった。有機合成しか知らない私にとってプロテオミクスは全くの異世界であり、恩師の成松久先生の話は大変に新鮮に感じられた。まずはライフサイエンス企業の新宿の地下室で、2D-DIGE を用いたプロテオーム解析を文字通り手取り足取り習った。これが私の電気泳動との出会いである。2つの試料に含まれるタンパク質をそれぞれ蛍光波長の異なる 2 種類の色素で標識しておき、それらを混ぜ合わせて等電点電気泳動そして SDS-PAGE で 2 次元展開し、蛍光イメージャーで観察するとヒョウ柄模様のようなたくさんのスポットが現れ、しかもスポットの蛍光強度が 3 次元表示されて 2 種類の試料に含まれるタンパク質の量的な違いが一目瞭然だった。そして、そのスポットを全自動ゲルピッカーで摘み取り、ゲル内トリプシン消化してペプチドマスフィンガープリントをとるとそのタンパク質が同定できた。ライフサイエンスの驚くべき進歩、そして有機合成の進歩との歴然たる違いに驚愕した。

別れ

ある糖鎖遺伝子をノックアウトしたマウスの体内にお

いて、その遺伝子がどのタンパク質のどのような糖鎖修飾を担っているか、それを網羅的に調べることで糖鎖の機能解明に役立てる。それを目的として、2D-DIGE と レクチンや抗糖鎖抗体を組み合わせた技術開発を進めた。しかし、いくら頑張ってもノックアウトと WT の差を見出すことはできなかった。その糖鎖遺伝子の標的はムチンだったからである。2D-DIGE は素晴らしい技術だが、分離できるタンパク質は分子量や溶解性などに制限がある。2 年足らずで見切りをつけた。

再会

その後はグライコプロテオミクスではなく、糖鎖だけを調べるグライコミクスの技術開発を進めてきた。ムチンは難しい標的であり苦戦を続けていた。その頃、松野裕樹さんがポスドクで研究室に来てくれた。彼の博士論文を読んでいた時、セルロースアセテート(セ・ア)膜電気泳動でプロテオグリカンを分離分析する章が目に残った。これはムチンにも応用できるのではと思い試してもらったところ、これまでスミアにしかならなかったムチンがきれいな楕円のスポットとして染色された。2D-DIGE とは対照的に速くて安くて簡単というこのローテクの技術に感動した。

はぐくみ

ムチンを分離するだけでなく、その糖鎖を調べることが本来の目的である。セ・ア膜からムチンのバンドを切り取り糖鎖を遊離させ分析してみた。とても大きなシグナルが得られた。それはセルロースの断片であった。膜が分解したのであった。これを解決するため化学的に安定な PVDF 膜で電気泳動しようと考案した方法が分子マトリックス電気泳動である[1]。その後、PVDF 膜の特性を活かして染色法の改良、アフィニティ電気泳動への応用、赤外分光検出、抗体染色、レクチン染色などの周辺技術を整えていった。最近、新しい糖鎖の遊離法も開発した。こうして漸くムチンの研究を進められるようになってきた。まだまだ課題もあるが、引き続き大いに電気泳動を活用して研究を切り拓いていきたいと思う。

参考文献

1. 亀山 昭彦, 分子マトリックス電気泳動法の開発, 電気泳動, 2019, 63 巻, 1 号, p. 1-6

特別企画3「私と電気泳動」

14 私と電気泳動 皮膚科臨床医の立場から

藤井 一恭

鹿児島大学病院皮膚科

私が初めて電気泳動に関わったのは、医者になって初年度に水疱性エリテマトーデスという疾患の患者さんを受け持ったことがきっかけでした。エリテマトーデスという病気は様々な皮膚症状を呈しますが、みずぶくれを呈することは希です。私が（というより私の上司がですが）この現象に興味をもち、血清中の IgG を濃縮してウエスタンブロットを行ったところ VII 型コラーゲンと同じ位置にバンドを認めたという内容で欧文誌にアクセプトされました (Fujii K, et al. Br J Dermatol. 1998)。その後関連病院で研修を行ったり、大学院でマウスのかぶれの実験をしたりしていたこともあって、電気泳動とは縁のない生活をしていましたが、2002 年から国立がんセンター研究所（現：国立がん研究センター研究所）に国内留学をさせて頂く縁ができ、電気泳動と本格的に関わることになりました。当時まだ手法が確立されたとは言い難かった蛍光標識二次元電気泳動法や故障を繰り返していた質量分析器を用いてがん細胞のプロテオーム研究をさせて頂きました (Fujii K, et al. Proteomics 2005 など)。当時の主なターゲットは幹細胞とリンパ腫細胞であり、がんセンターを離れた後は縁がなくなるかと思っていましたが、その後の海外留学を経て皮膚リンパ腫を臨床面でも研究面でも主なターゲットとすることになり、電気泳動との縁が復活しました。2000 年代からヒストンのアセチル化をターゲットとしたヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤という薬が開発され、2010 年代前半には本邦でも皮膚リンパ腫を適応病名として使えるようになりました。前治療の種類に関わらず 30%程度の患者さんに効果が期待できる一方、初期から無効な患者さんや、一旦効果を認める患者さんでも途中から効果が減弱する患者さんがいるという問題点がある薬剤でした。HDAC のターゲットが多岐にわたることからそのメカニズムについては不明な点が多く残されていましたが、私はがんセンター留学中に構築したリンパ腫の細胞株のプロテオームデータベースを利用することで HSP72 というたんぱく質が HDAC 阻害剤の感受性に関与すること (Fujii K, et al. J Proteomics. 2012, Fujii K, et al. J Dermatol Sci. 2018)、HSP72 の阻害剤でもあるケルセチンに HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果の増強作用があること (Fujii K, et al. Int J Mol Sci 2021) を明らかにすることが出来ました。

現在私は基礎研究から離れ、臨床医として皮膚リンパ腫の診療、臨床研究にあたっていますが、リンパ腫の診断にあたってはサザンブロットによるリンパ球の腫瘍性の増殖の確認が必要になることもあります。また、皮膚科領域

では自己免疫性の疾患も多く、その診断にウエスタンブロットが必要/有用なことが多くあります。本講演では皮膚科の実臨床で電気泳動がどのように利用されているかについてもお話ししたいと思います。

15 診断マーカー探索における電気泳動の関わり

曾川 一幸

麻布大学生命・環境科学部生化学研究室

私は日本電気泳動学会に2012年に入会しました。電気泳動との出会いは、千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学(野村文夫先生)でのSDS-PAGEです。全く知識がなく、前処理もせずに血清を数 μ L流し、CBB染色後、アルブミンしか見えなかったことを記憶しています。血清及び尿の前処理方法は、北里大学物性物理学講座の小寺義男先生に教えて頂き、電気泳動を用いた疾患マーカー探索で報告(Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2011; The Journal of Veterinary Medical Science, 2015; British Journal of Cancer, 2016; International Archives of Allergy and Immunology, 2018; Journal of Electrophoresis, 2019; Medical Mass Spectrometry, 2021)しています。電気泳動を用いた研究を中心に紹介いたします。

【参考文献】

1. Sogawa K, Kadera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption – Detection and identification by a three-step serum proteome analysis –. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 35(2):211-217. 2011.
2. Maeda H, Sakaguchi K, Abe S, Sagizaka W, Mochizuki S, Horie W, Watanabe T, Shibata Y, Satoh M, Sanda A, Nomura F, Suzuki J, Sogawa K. Urinary albumin and transferrin as early diagnostic markers of chronic kidney disease. The Journal of Veterinary Medical Science. 77:937-943. 2015.
3. Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Kadera Y, Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein α -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. British Journal of Cancer. 115(8):949-956. 2016.
4. Sogawa K, Takahashi Y, Shibata Y, Satoh M, Kadera Y, Nomura F, Tanaka T, Sato H, Yamaide F, Nakano T, Iwahashi K, Sugita-Konishi Y, Shimada A, Shimojo N. Search for a novel allergen in hen's egg allergy using an IgE-immunoblotting assay. International Archives of Allergy and Immunology. 176(3-4):189-197. 2018.
5. Maeda H, Kobayashi K, Watanabe T, Satoh M, Nomura F, Sogawa K. Urinary carboxylesterase 5A fragment as an early diagnostic marker of cat chronic kidney disease. Journal of Electrophoresis. 63(1):39-45. 2019.
6. Maeda H, Igarashi K, Ishidoya M, Satoh M, Watanabe T, Nomura F, Sogawa K. Urinary kidney injury molecule-1 as early diagnostic marker of chronic kidney disease in cats. Medical Mass Spectrometry. 6(1):36-44. 2021.

シンポジウム 1 タンパク質の「機能」を見る新技術

S-1 機能性タンパク質と小分子の複合的利用による抗原可視化の新技术

小嶋 良輔

東京大学大学院医学系研究科

最も確実ながん治療はその外科的切除であるが、目視で微小ながんを完全に取り除く事は困難であり、これによる取り残しが再発の原因となっている。ここで、がんを認識して初めて蛍光を発する”activatable”なプローブによってがん部位を鮮明に可視化できれば、病変部位を完全に切除することが可能になると考えられる。我々の研究室を中心に、これまでにがん部位でのみ高い酵素活性により代謝されて初めてシグナルを発する様々な蛍光プローブ群が開発され、ヒト臨床検体を含むがん組織を高い Tumor/Non-tumor ratio で数分以内に可視化することが可能になってきた。しかしながら、がん種によってその性質は極めて多様であり、がん部位特異的な酵素活性を見いだせない場合も多い。そこで、別の戦略として、特別な酵素活性を持たないがんの表面抗原の存在を蛍光小分子でラベル化した抗体などを用いて activatable に可視化する試みも行われてきている。しかしながら、既存の手法は迅速性、シグナル強度、シグナルの増強度など様々な面において、それぞれ課題を抱えている。以上の背景を受けて、我々は、機能性タンパク質と機能性小分子の組み合わせによる独自技術を駆使して、① がん表面の抗原に結合して迅速かつ大きな activation を示す蛍光プローブの開発 ② Bio-orthogonal な蛍光プローブと、がん細胞内で選択的に活性化されるレポーター酵素ペアを利用した新規がんイメージング手法の開発 に取り組んだ。本発表ではその詳細についてご紹介する予定である。

S-2 小型抗体フォーマット「Fv-clasp」の開発とその応用

有森 貴夫

大阪大学 蛋白質研究所

抗体は、抗原に対して非常に高い特異性をもって結合する性質を有していることから、様々な研究分野においてツールとして利用されているだけでなく、創薬モダリティとしてもこの 10 年間で大きく成長している。医療、研究のどちらにおいても、多くの場合は全長抗体がそのまま利用されるが、用途によっては断片化して小さくした抗体（フラグメント抗体）が利用されている。150 kDa 程度の大きさの全長抗体の中で抗原結合を担うのは、 V_H および V_L ドメインから構成される Fv と呼ばれる約 25 kDa の領域である。フラグメント抗体を作製するうえでは、いかにこれらの抗原結合ドメインの構造を保持したまま小型化するかがポイントとなる。フラグメント抗体として最もよく用いられているのは、35 年ほど前に開発された単鎖抗体 scFv (single-chain Fv) である。scFv は、 V_H および V_L を長くフレキシブルなリンカーでつなぎ、両者の乖離を抑制したものである。しかしながら、 V_H/V_L 間の相互作用の弱さにより、scFv では構造的不安定化や抗原結合能の低下を招くことが多く、活性のある状態での試料の調製が困難なケースも少なくない。我々はこれらの問題の解決のため、 V_H および V_L の C 末端側に、ヒト Mst1 由来の SARAH ドメインを融合させた“Fv-clasp”というフラグメント抗体を新たに開発した（下図）。SARAH ドメインは逆平行コイル

ドコイル構造を持ち、その二量体構造の N 末端間距離は V_H/V_L ヘテロ二量体構造の C 末端間距離とほぼ一致するため、Fv の構造を崩すことなく両者の融合が可能である。そして SARAH ドメインのほとんどの領域は二次構造を形成しているため、融合により V_H/V_L の二量体構造が安定化されるが、我々はさらに、ポリペプチド鎖間にジスルフィド結合を導入することにより、分子全体の安定性を向上させた。実際、同じ抗体由来の scFv と比べると、Fv-clasp では熱安定性が概ね 5°C 以上高いことが分かっている。また、Fv-clasp は、大腸菌発現系や動物細胞による生産が可能で、特に大腸菌発現においては、scFv では調製が困難だった抗体も含め、どんな抗体でも同一のプロトコールで容易に生産でき、それらが元の抗体と同等の抗原結合能を保持することも確認している。さらに、Fv-clasp はそれ自身が堅い構造を持つため、構造生物研究とも相性が良く、抗体の構造解析が極めて容易になるだけでなく、構造解析が困難な分子の X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡単粒子解析においても、構造決定を促進させるツールとして有用であることが示されている。最近では構造生物研究にとどまらず、様々な分野の研究者に広く Fv-clasp を利用していただいている。本講演では、Fv-clasp のデザインおよび特長と、最近の成果を中心にその応用例を紹介する。

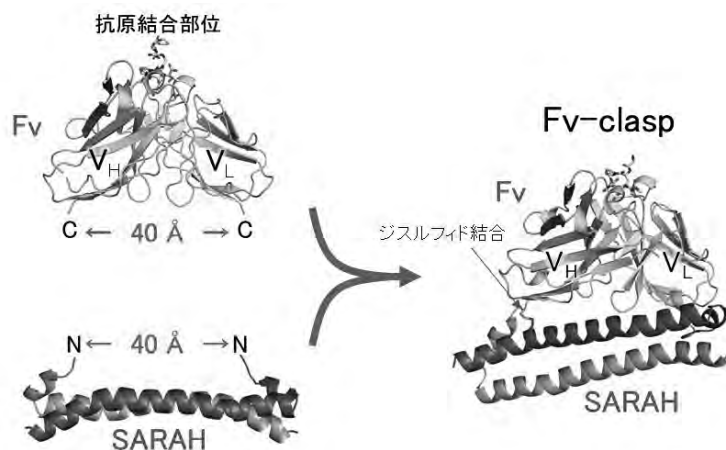


図) Fv-clasp のデザイン

シンポジウム1 タンパク質の「機能」を見る新技術

S-3 変性部位検出プローブの開発とプロテオミクス解析

佐藤 伸一

東北大学 学際科学フロンティア研究所

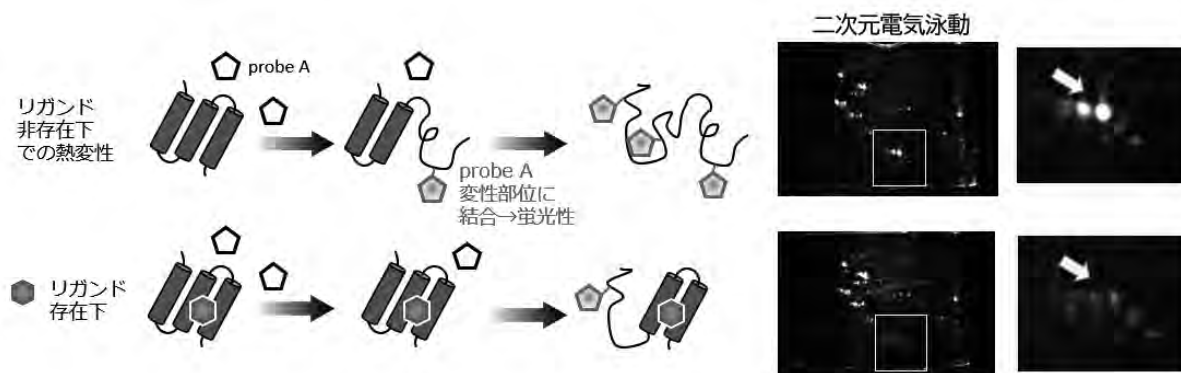
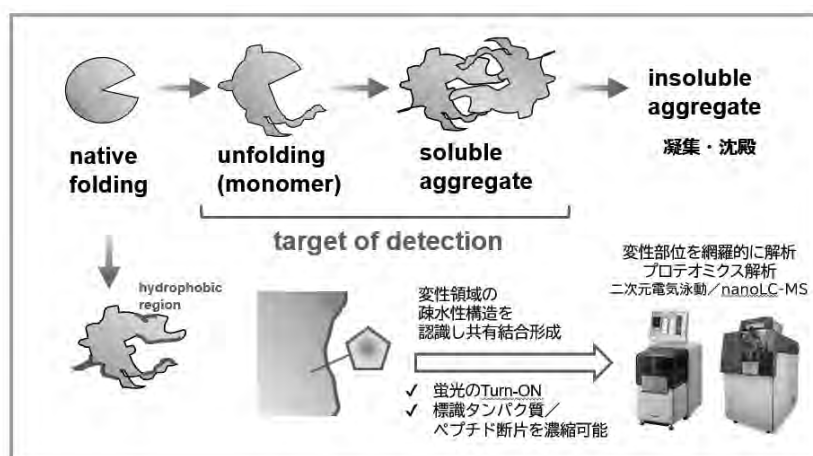
演者はタンパク質の構造中に共有結合によって機能団を導入する手法（タンパク質化学修飾）を研究している。独自のタンパク質修飾反応を開発する過程で、特定のタンパク質修飾剤（＝標識剤）は、タンパク質が変性する際にタンパク質表面に露出する疎水性構造と選択的に共有結合を形成し、変性タンパク質の変性部位を特異的に標識できることを明らかにした。

これまでに、タンパク質の変性領域に結合し、蛍光の輝度が向上する低分子プローブとして、SYPRO® OrangeやPROTEOSTAT®といった試薬が開発されているが、我々のプローブはこれらの従来法とは異なり、共有結合によって、変性部位と不可逆的な結合を形成する。反応前は無蛍光性の分子であり、変性タンパク質と共有結合を形成したときにのみ、蛍光を発するという特徴を有している。これまでに変性度への感受性が異なる複数種のプローブ分子

を開発しており、タンパク質変性・凝集の初期過程を効果的に捕捉できることが分かっている。また、プローブは共有結合で不可逆的に変性部位と結合しているため、トリプシンなどの酵素消化後もペプチド断片に結合した状態で質量分析により解析され、どのタンパク質のどの部位でどの程度変性が起きていたかを解析することが可能であり、部位レベルでのタンパク質変性の解析を可能にする。

一方、生物活性分子（＝リガンド）の添加によって結合タンパク質の熱変性に対する抵抗性が変化することが知られており、リガンド結合タンパク質の同定技術への応用が注目されている。そこで本技術を熱変性の初期過程を捉える手法として応用した。

本講演では、プローブについての開発の詳細と、リガンド結合タンパク質の熱変性に対する安定性変化を観測した事例について紹介したい。



S-4 オプトケモプロテオミクスによるマウス脳内受容体インタクトーム解析

田村 朋則

京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻

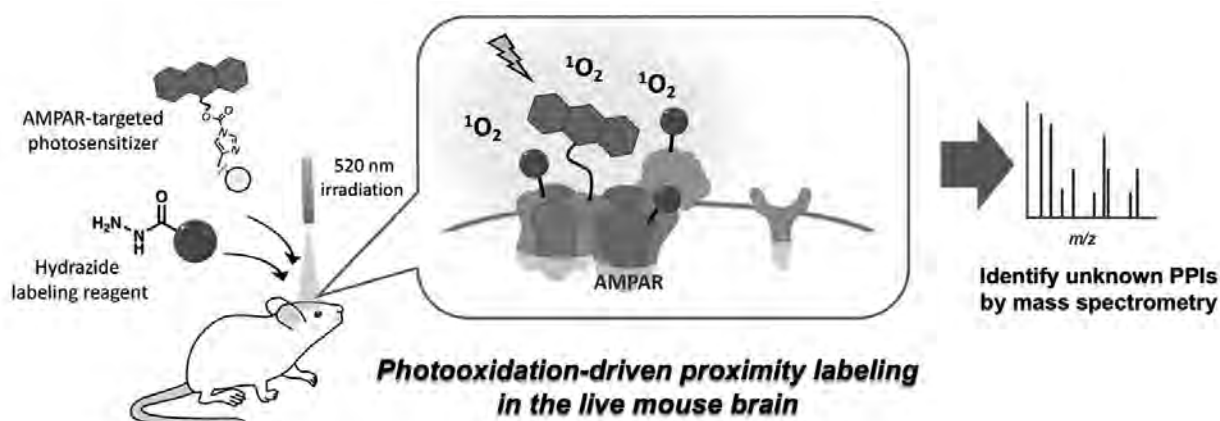
(英文)

An intricate network of protein-protein interactions involving neurotransmitter receptors is crucial determinants of synapse efficacy and plasticity, and thus the comprehensive characterization of the receptor interactome is a prerequisite for understanding the molecular basis of neural circuits. Here, we have established a workflow for mapping receptor interactome in the live mouse brain by PhoxID (photooxidation-driven proximity labeling for protein identification). We demonstrated the tissue and *in vivo* compatibility of PhoxID by identifying multiple members of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-type glutamate receptor (AMPA)- and γ -aminobutyric acid receptor (GABA_AR)-interactomes in the brains of live mice with just minutes of photoirradiation.

Keywords : Photo-triggered proximity labeling, Ligand-directed chemistry

(和文)

シナプス形成や可塑性の発現過程において、神経伝達物質受容体は他の足場タンパク質やシナプスオーガナイザーとの相互作用を介してポストシナプス膜上に適切に局在すると考えられている。しかし、*in vivo* 環境下で特定の受容体と相互作用するタンパク質群（インタクトーム）を網羅的に解析した例はいまだに無い。このような背景のなか、我々は時空間分解能に優れた新たな光駆動型タンパク質近傍ラベリング法として PhoxID 法 (photooxidation-driven proximity labeling for protein identification)を開発した。本手法ではまず、我々が長年開発してきたリガンド指向性化学を用いて生きたマウス脳内の標的受容体に光増感剤を修飾する。その後、求核性プローブ存在下光照射することで、受容体周辺タンパク質を網羅的にビオチン標識し質量分析によって同定することが可能である。実際に本手法を生きたマウスの脳内の AMPAR および GABA_AR に適用したところ、わずか数分の光照射で、これらの受容体の既知相互作用タンパク質を含む複数のタンパク質を同定した。



(参考文献)

- (1) T. Tamura, M. Takato, K. Shiono, I. Hamachi, Development of a Photoactivatable Proximity Labeling Method for the Identification of Nuclear Proteins, *Chem. Lett.* 49, 145 (2020).
- (2) H. Nonaka, S. Sakamoto, K. Shiraiwa, M. Ishikawa, T. Tamura, K. Okuno, S. Kiyonaka, E. A. Susaki, C. Shimizu, H.R. Ueda, W. Kakegawa, I. Arai, M. Yuzaki, I. Hamachi, Bioorthogonal chemical labelling of endogenous neurotransmitter receptors in living mouse brains, *bioRxiv*, 2023.01.16.524180; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.01.16.524180>
- (3) T. Tamura, I. Hamachi, Chemistry for Covalent Modification of Endogenous/Native Proteins: From Test Tubes to Complex Biological Systems, *J. Am. Chem. Soc.*, 141, 2782–2799 (2019)

シンポジウム 1 タンパク質の「機能」を見る新技術

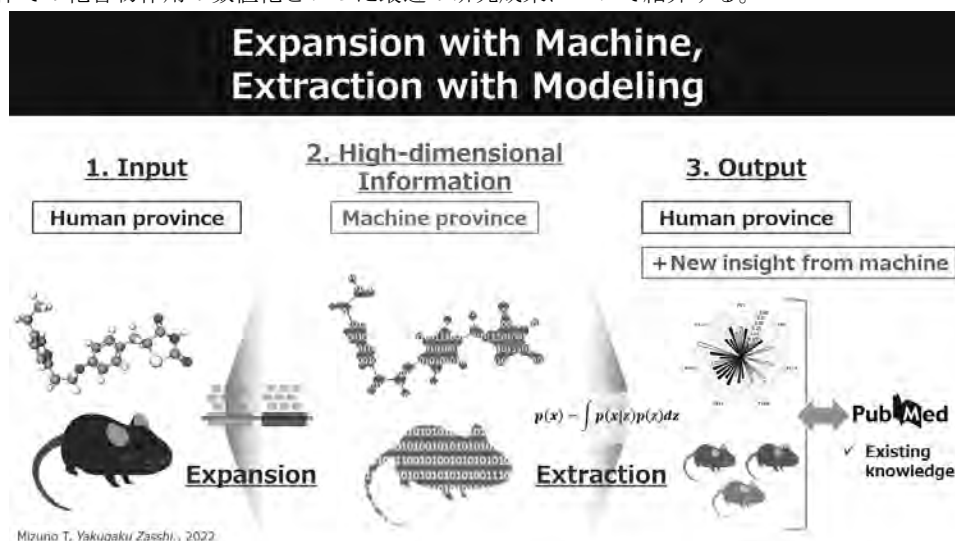
S-5 網羅的情報の潜在表現に基づく化合物に対する生体応答の記述

水野 忠快

東京大学大学院薬学系研究科

我々ヒトが化合物の特性を思い浮かべるとき、例えばある化合物は官能基 A を持ち、毒性 T を持つ分子量が M の化合物であるといった具合に認識する。このように我々が扱える次元はたかだか数次元であるものの、計算機を用いれば極めて高次元の情報を扱うことが可能となる。そのため、解析対象を恣意性なく網羅的に高次元の情報体として数値化することは、計算機を用いて我々の解析対象に対する認識を拡張する上で必須な操作である。同時に、このようにして拡張された高次元の情報を再び我々が認識可能な次元へと出力するモデリングも欠かせない。逆説的に、数値化とモデリングにより、我々は自身の認識を超えた情報量を扱い、解析対象の新たな側面を見出すことが可能になる。

我々は上述の「計算機による拡張とモデリングによる抽出」を信条に、化合物の理解と活用について研究を展開している。例えば化合物処理時の培養細胞の生体応答をトランスクリプトームデータで捉えて化合物の作用を表現し、潜在変数モデルにより縮約することで背後に潜む共通の機序を見出すといったアプローチが該当する。本発表では、様々な階層の網羅的な情報を対象とし、化合物をどのように表現するか？を焦点に、化合物の作用の分解、及び個体での化合物作用の数値化といった最近の研究成果について紹介する。



S-6 「1分子計測リキッドバイオブシー」技術に基づく早期がん診断の事業化

坂本 眞伍

コウソミル株式会社

リキッドバイオブシーとは、低侵襲で採取可能な体液サンプル中に含まれる生体分子の解析から病態を把握する方法論であり、生体組織診断や画像診断などと比較して迅速・低侵襲・低コストでの診断が可能となることが期待されている。現在、ctDNAやmiRNAなどの核酸分子の検出に基づくリキッドバイオブシーが盛んに開発されているが、発表者らのグループは、セントラルドグマの下流に位置するタンパク質の中でも特に表現型に密接する、酵素の「活性」の検出に基づく疾患診断技術の開発をおこなってきた。また、近年は activity-based diagnosis という概念が提唱されているように、疾患に直結する酵素の活性異常を直接評価することによって疾患の本質の理解に繋がる診断法を与えることへの期待が高まっている。その一方で、組織から全身を循環する血液中に放出され、低濃度で存在する疾患関連酵素を検出する目的においては、ELISA・質量分析法などの既存のタンパク質検出技術では検出感度に限りがあるということ、酵素の活性を集団で評価する既存の技術では、類似の活性を有する酵素群の分離検出が困難であること、などの課題があった。

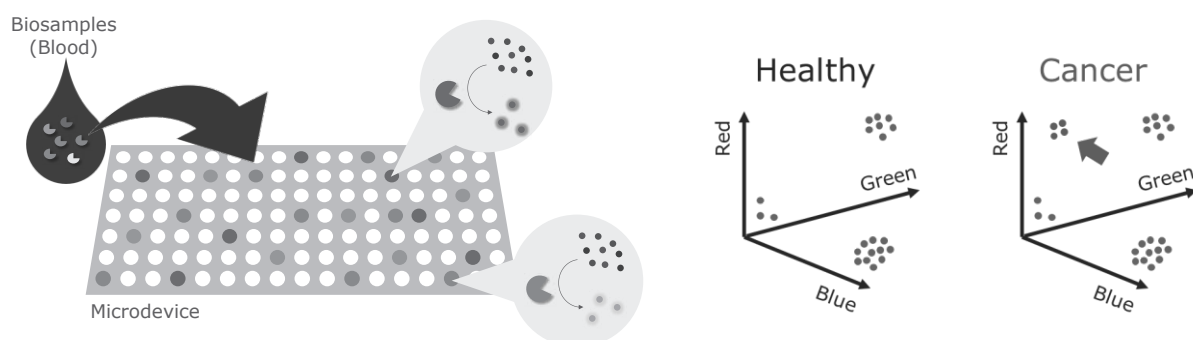
そこで発表者らのグループは、特定の酵素活性を蛍光シグナル変化によって検出する蛍光プローブと、活性の1分子計測を可能とするマイクロデバイスを用いて、生体サンプル中に存在する多様な1分子レベルの酵素をその活性の違いに応じて分類して網羅的に「数える」技術を考案した。具体的には、各チャンパー中に含まれる酵素を、異なる反応点と異なる蛍光波長を有する複数の蛍光プローブとの反応性の違いから1分子ごとにプロファイルし、これらを分離検出するという手法を考案し、血液中に存在する様々な酵素の活性の1分子レベルの検出を可能とする技術の開発をおこなった。

まず、代表的な血中酵素であり、様々な疾患に関連する複数のアイソザイムをもつ alkaline phosphatases (ALPs) をターゲットとして蛍光プローブ群の開発を行い、従来法ではこれらの活性を区別して検出することは困難であった、血液中の小腸型 ALP と組織非特異型 ALP を1分子レベルで判別しつつ検出することに成功した。

続いて、早期診断法の確立が求められているすい臓がんの診断バイオマーカーの探索を目的として、ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs) をターゲットとした蛍光プローブ開発を行った。その結果、血中で複数の ENPPs に由来する活性パターンを検出し、サブタイプの1つである ENPP3 と推測される酵素のすい臓がん患者における有意な増加を見出した。

さらに発表者らのグループは、1分子酵素活性バイオマーカーの網羅的探索を目的として、多種類の蛍光プローブを簡便な実験操作で同時並列に合成して装置によって自動精製する仕組みを確立し、疾患との関連性が知られている様々な酵素を対象とした1分子計測用蛍光プローブライブラリーを作成した。これに基づいて Stage I-II の早期すい臓がんの検体を用いたスクリーニングをおこなった結果、すい臓がん患者の一部で aminopeptidase N 活性が上昇していることを見出した。加えて、血液中の dipeptidyl peptidase IV には dimer とその半分の活性を持つ分子種が存在することを発見し、すい臓がん患者の一部で dimer の存在比が高くなっていることを見出した。

2022年4月、当技術による疾患早期診断薬の開発を目的として、コウソミル株式会社が創業された。現在は最初のパイプラインである早期すい臓がん検査薬の開発を進めており、数百例規模の症例対照試験にて良好な結果を得ることを目指している。その後健診クリニックでの販売、将来的には日本・米国での薬事承認・保険償還の取得を目標としており、「1分子計測リキッドバイオブシー」技術を用いた診断で一人でも多くの方の命を救うことを目指している。



S-7 LC/CE 二次元分離に基づく超高感度・絶対定量グライコーム解析法の開発

川井 隆之^{1,2}¹九州大学 大学院理学研究院 化学部門²理化学研究所 生命機能科学研究センター

がんなどの病変細胞では、糖タンパク質の糖鎖構造が変化していることが広く知られており[1], この糖鎖変化を標的とした次世代治療薬の開発が期待されている。しかし、病変細胞は組織の微小領域に局在することが多く、微量の細胞から糖鎖を定量的に検出する技術が求められている。そこで我々は、高感度な糖鎖分析法として知られるキャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光 (CE-LIF) に注目し、さらにキャピラリー内部で生体分子を高効率に濃縮するため、電場増強スタッキング法と過渡的等速電気泳動法を組み合わせた新規二重濃縮法「large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS) 法」を新たに開発した[2]。しかし LDIS-CE-LIF 分析では分離キャパシティが小さいために実際の測定では 50 程度のメジャーピークの同定しか行うことができず、多くのマイナー糖鎖ピークはメジャーピークと重なってしまい検出できなかった。そこでマイナー糖鎖ピークを含めた真の網羅解析を実現するため、本研究では分離原理の異なる親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と LDIS-CE-LIF を組み合わせた新規二次元分析システムの開発と性能検証を行った。

CE 分析では還元的アミノ化反応を用いて糖鎖を 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) で誘導体化することで電荷と蛍光を付与した。LDIS 濃縮では、キャピラリーの全長に試料を注入し、続いてアウトレットからリーディング液 (10 mM NaCl) を注入し、電圧を印加する。試料溶液とリーディング液の間の電気伝導度の差に基づいて電場強度に差が生じ、これにより試料溶液からリーディング液に侵入した際に糖鎖の電気泳動速度が減少する。この速度差によって糖鎖は濃縮され (電場増強スタッキング), 同時に電気浸透流および圧力によってインレット方向へと引き戻される。インレット付近まで押し戻された後、第二段階目の濃縮として、高速で泳動する Cl⁻イオンの後ろに糖鎖が濃縮される (過渡的等速電気泳動)。ピークが収束された後、速やかに CE 分離および LIF 検出が行われる。標品としてグルコースオリゴマーを APTS で誘導体化して LDIS-CE-LIF 分析したところ、濃縮無しの場合と比較して分離性能を一切損なうことなく約 2000 倍の高感度化を実現した。検出下限は 65 fM (91 zmol), 相対標準偏差は内部標準を用いた独自の補正検出時間において 0.11%, ピーク面積において 5.8% (ともに $n=96$) と高い分析性能が得られた。

続いて糖タンパク質試料から peptide-N-glycanase F で糖鎖を遊離させ、APTS で誘導体化を行い、CleanSEQ 磁気ビーズによる脱塩・精製を行った。得られた糖鎖混合試料を Amide HILIC カラムによって 100 程度の画分に分離し、各画分を乾燥させて脱イオン水に再溶解させ、順次 LDIS-CE-LIF 法で分析した。得られたデータは独自開発した python アルゴリズムによりアライメントし、Origin Pro ソフトウェアを用いて二次元データを生成した。その結果、bovine ribonuclease B 由来のハイマンノース型の中性糖鎖では HILIC と CE に分離選択性の差が見られなかったのに対し、図に示すように bovine fetuin 由来のシアル酸含有糖鎖ではピークが広く二次元展開され、大幅に分離能を向上することに成功した。標品による構造同定を行った結果、 α 2-3, α 2-6 型シアル酸から成る複雑な構造異性体を分離できていることが示唆された。HILIC では水素結合などの親水性相互作用に基づいたサイズ分離が行われ、CE ではサイズ/電荷比に基づいて糖鎖が分離されるため、特に電荷を持つシアル酸を有する糖鎖に対して効率的な分離が実現できる。また α 2-3, α 2-6 型シアル酸の分離選択性が HILIC と CE において異なるため、構造異性体の分離に有効であることが示唆された。

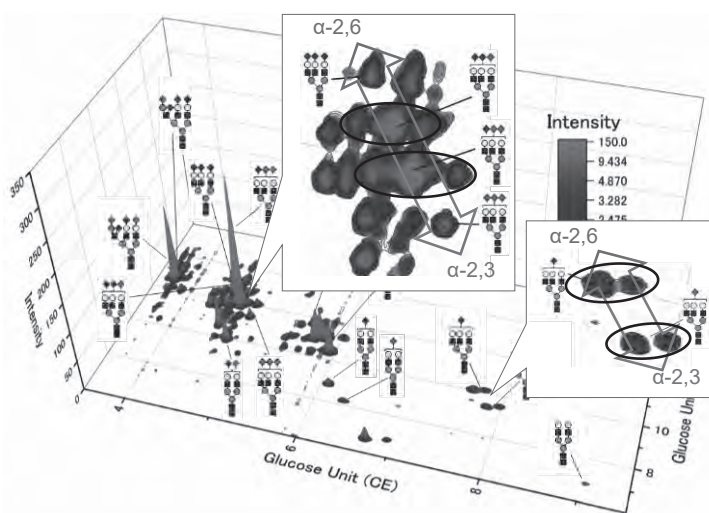


図. bovine fetuin 由来 N 結合糖鎖の LC/CE 二次元分析結果. シアル酸を含む多様な構造異性体の分離に成功した。

[1] K. Ohtsubo *et al.*, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1067.

[2] T. Kawai* *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2018**, *1565*, 138.

S-8 腸管恒常性維持における糖鎖の役割

奥村 龍

大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学

夥しい数の腸内細菌が存在する腸管においては、粘液や抗菌ペプチドを中心とした上皮細胞により形成される粘膜バリアによって、腸内細菌の腸管組織への侵入が防止されている。そのため、粘膜バリアが破綻すると、腸内細菌の組織侵入を許し、その結果、腸内細菌に対する過剰な免疫応答によって、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患で見られる腸管の慢性炎症が起こる(図1)。

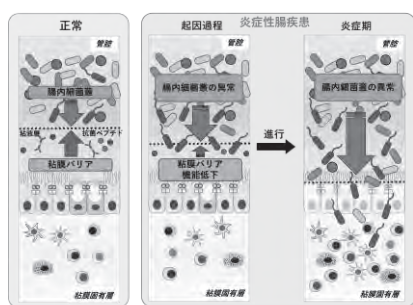


図1 粘膜バリア破綻による腸炎発症モデル

粘液の主成分であるムチンは、高度に糖鎖修飾された糖蛋白質であり、それらの分子に大量に付加されるO型糖鎖は、ムチンの機能維持に重要であるのみならず、腸内細菌にエネルギー源として取り込まれ、利用されており、正常の腸内細菌叢の維持に重要であることも明らかになっている。しかしながら、どのような糖鎖構造がどのようなメカニズムで、ムチンの機能維持や、腸内細菌叢の維持に寄与しているかは不明である。

糖鎖は、細胞内ゴルジ体で糖転移酵素を介してタンパク質に付加される。そのため約200種類といわれる糖転移酵素の発現パターンにより、細胞に発現するタンパク質に付加される糖鎖の構造が決定される。そこで我々は、上記の疑問点を明らかにするため、初めにRNAシーケンシングによりマウス腸管上皮に発現する各糖転移酵素の発現を解析した。その結果、B3galt5、St6galnac6、B3gnt7、Fut2、Chst4、B4galnt2といった糖転移酵素が、特に大腸の上皮細胞に高発現していることを見出した。本講演では、特にその中からガラクトース転移酵素であるB3galt5とシアル酸転移酵素であるSt6galnac6の粘膜バリア機能における役割について紹介する。

これら二つの糖転移酵素は、Lewis A 構造にシアル酸が2つ付加された Disialyl Lewis A (dSLeA) 糖鎖構造の生合成に関わることが報告されている。まずマウスおよびヒト大腸粘液にdSLeAが存在するかを、抗dSLeA抗体を用いた免疫染色で解析した。その結果、dSLeAのシグナルがマウスおよびヒトの大腸の粘液および杯細胞で観察された。次にB3galt5及びSt6galnac6のノックアウト(KO)マウスを作製し、両KOマウスの表現型解析を

行った。両KOマウスの大腸の抗dSLeA抗体を用いた免疫染色では、野生型マウスで観察された大腸杯細胞および粘液におけるdSLeAがほとんど観察されず、更に両KOマウスの大腸ムチンの糖鎖解析を、質量分析を用いて行ったところ、それぞれのKOマウスでdSLeA構造から脱シアリル化した糖鎖構造が検出された。続いて、この脱シアリル化が大腸粘液層のバリア機能にどのような影響を与えるかを解析したところ、両KOマウスの大腸では、粘液層の厚みが減少し、大腸組織への腸内細菌の侵入が観察され、それとともに大腸粘膜固有層の免疫応答が亢進し、さらに両KOマウスはデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎に対して高感受性になることが明らかとなった。以上の結果から、B3galt5とSt6galnac6によるムチンのシアリル化は、ムチンによって形成される粘液層のバリア機能維持に必須であることが明らかとなった。

次に、ムチン糖鎖のシアリル化が大腸粘液層の物性やネットワーク構造にどのように寄与するかを解析した。まず野生型マウスならびに両KOマウスから大腸ムチンを精製し、膜電気泳動法によって脱シアリル化によるムチン分子の電荷への影響を解析したところ、両KOマウス由来のムチンは陽極側への泳動度が減少しており、脱シアリル化により陰性電荷が減少している事が示唆された。次に粘液層の弾力性を原子間力顕微鏡で評価した結果、両KOマウスでは粘液層が硬くなり、潤滑性が低下していた。最後に大腸の粘膜表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果、野生型マウスの粘液層ではムチンによる多方向性のネットワーク構造が形成され、細菌の侵入を防いでいる像が観察される一方で、両KOマウスではそのネットワーク構造が特定の方向に配向し、細菌が配向性のあるムチンポリマーの間から侵入している像が観察された。これらの結果から、B3galt5とSt6galnac6という二つの糖転移酵素によるムチン分子のシアリル化は、腸内細菌の侵入を防止するためのムチンポリマーによる多方向性のネットワーク構造の構築に不可欠であることが示された(図2)。

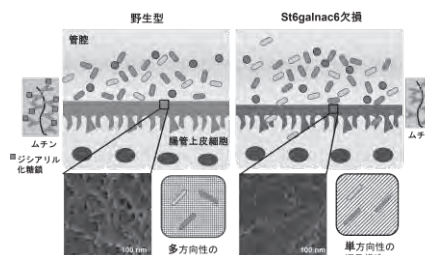


図2 ジシアリル化糖鎖は大腸粘液層のムチン網目構造の形成に不可欠である

S-9 悪性中皮腫の糖鎖修飾を認識する SKM9-2 抗体と抗体医薬への展開

辻 祥太郎

群馬医療福祉大学 医療技術学部 医療技術学科

悪性中皮腫（中皮腫）はアスベストの曝露によって発生する予後の悪いがんで、過去のアスベスト使用量に応じて発症件数が増加している。中皮腫は抗がん剤や放射線療法に抵抗性を示し、分子標的薬についても十分な効果を示すことができておらず、治療薬として長期有効なものは存在していない。さらに、中皮腫に特異性の高い診断マーカーが見いだされなかったため、病理学的な鑑別診断すら困難というように、临床上、多くの問題点を有するがんであった。我々は、中皮腫に特異性の高い病理診断マーカーを探索する過程で、中皮腫に特異性の高いモノクローナル抗体 SKM9-2 を樹立し、新しい中皮腫がん抗原としてシアル化 HEG1 を同定した。今回は、SKM9-2 抗体の研究開発の経緯と現在進めている治療用抗体医薬への応用の展望について紹介したいと思う。

SKM9-2 は中皮腫の免疫組織染色において特異度 99%、感度 92%と既存の中皮腫病理診断マーカーよりもはるかに優れた特性を示し、中皮腫診断の決め手となりうるマーカー抗体である。抗体分子としては、未知の膜型ムチン様分子 HEG1 内のペプチド配列と 2 本の O 型シアル化糖鎖を同時に認識するユニークな糖ペプチド認識抗体で、抗原認識領域の深い溝に HEG1 のペプチド鎖がはまり込み、2 つの糖鎖を抗体が両側から挟み込むように認識することが結晶構造解析から明らかとなっている。HEG1 は SKM9-2 陰性の組織でも発現が見られるため、HEG1 内の特定位置への特定の糖鎖付加が抗体の中皮腫への高い特異性を規定していることが示唆される。すなわち、SKM9-2 による中皮腫認識は疾患特異的な糖鎖修飾の検出の重要性を示す典型的な一例と言える。

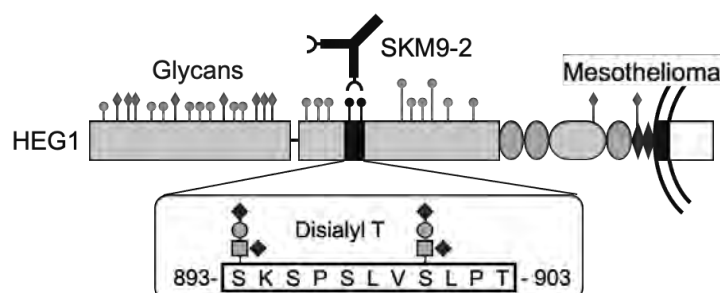
SKM9-2 はすでに国内外で特許が成立し、中皮腫の病理診断用研究試薬として臨床での利用が進んでいる。加えて、SKM9-2 は主要な臓器や健常組織にはほぼ結合せず中皮

腫に対して高い特異性を示すため、治療用の抗体医薬シーズとして有望と考えられた。しかし SKM9-2 は古典的な抗体医薬としての薬理活性は認められなかったため、現在我々は次世代抗体医薬として開発を進めている。

RI 標識した SKM9-2 を中皮腫の皮下移植モデルマウスに投与し抗体の特異的集積について解析を行ったところ、中皮腫腫瘍への SKM9-2 の特異的な集積が観察された。細胞内に取り込まれると蛍光を発する色素で標識された SKM9-2 を用いた観察から細胞上の HEG1 に結合した SKM9-2 は細胞内に取り込まれることが確認され、ADC や RI 抗体医薬への応用が可能と考えられた。現在、AMED の支援のもと、SKM9-2 をヒト化し医薬品製造用の国産 CHO を用いて抗体原薬の製造を行い、次世代 RI 抗体医薬として開発を進めている。

また、細胞性免疫を利用した T 細胞誘引二重特異性抗体の開発も進めている。SKM9-2 の Fab に抗 CD3 抗体の scFv を連結した Fab-scFv 型の二重特異性抗体（SKMOKT）をヒト末梢血単核球とともに中皮腫細胞株に加えると、100 ng/mL で全ての標的細胞が傷害され、SKMOKT が強力な殺細胞活性を有することが見いだされた。免疫不全マウスに中皮腫細胞株を移植した後に SKMOKT とヒト末梢血単核球を投与すると、腫瘍の増大に対して有意に抑制効果が見られ、in vivo においても抗中皮腫作用を持つことが観察された。

SKM9-2 を用いた次世代抗体医薬は極めて強力な殺中皮腫細胞活性を有し、霊長類体内で主要臓器への結合や蓄積も見られないことから中皮腫治療薬候補として極めて有望と期待される。実用化に成功すれば、糖鎖に関連した抗体医薬開発のモデルケースの一つにもなると期待されており、早期の医薬品化に向けて研究開発を進めている。



S-10 Multi-attribute method による抗体医薬品の品質評価

橋井 則貴

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

抗体医薬品は、細胞培養や精製などの製造工程で様々な修飾を受けることが知られている。ある種の修飾は、生物活性、薬物動態、免疫原性などに影響する可能性が示唆されており、それらは重要品質特性（CQA）の候補として扱われる。CQA とは、要求される製品品質を保証するため、適切な限度内、範囲内、分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質と定義されており、品質管理戦略構築の要となる考え方である。CQA を特定し、その変動が CQA に影響を及ぼす製造工程中の要因を特定して管理戦略を構築する、いわゆる Quality by design（QbD）の概念を導入した管理戦略が普及しつつある中、詳細な構造解析を行い、CQA 候補となりうる修飾を同定して有効性、安全性確保のための管理の必要性を評価することは、QbD アプローチの実践に不可欠となっている。

抗体の構造特性に関する知識の蓄積に伴い、抗体に共通する構造特性を解析するための手法がプラットフォーム化しつつある。中でも抗体の構造不均一性を評価するための手法として、キャピラリー電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー技術は十分に確立された手法である。一方、一つの解析手法で評価できる構造特性は限られており、複数種類の分析を実施する必要がある為、その煩雑さから評価手法の集約と簡略化が議論されるようになってきた。

液体クロマトグラフィー／質量分析（LC/MS）を用いたペプチドマッピングは、バイオ医薬品のアミノ酸配列を確認するために、さらにはペプチドレベルでの化学修飾等に

関連した構造不均一性を明らかにするために特性解析で汎用されている。ペプチドマッピングにより得られた構造不均一性に関する情報は、製造工程開発、ロット間の品質特性の比較、バイオ後続品と先行バイオ医薬品の構造類似性評価、及び製剤中の構造安定性評価など、様々な用途に利用されている。ペプチドマッピングが構造解析の中核を担う中で、近年、注目されている分析手法が Multi-attribute method（MAM）と呼ばれる定量的構造評価手法である（Fig.1）。MAM は 2015 年に Rogers らにより提唱された構造評価手法である。高分解能質量分析装置を用いた LC/MS によるペプチドマッピングを基盤技術とする手法であり、脱アミド化、酸化、および糖鎖付加などの複数の修飾を一回の測定でモニターできることが特徴である。また、製造工程の変更に伴う修飾の変化や宿主細胞由来タンパク質などの製造工程由来不純物のプロファイルの変化をモニターする目的での使用も期待されている。

本発表では、抗体医薬品に共通する修飾及びそれらの解析手法、並びに一般的な MAM について概説するとともに、これまでに我々が実施した MAM に関する研究について紹介する。

謝辞

本研究は、AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業／次世代抗体医薬品の実用化に向けた品質評価及び管理手法に関する技術的研究（課題番号 JP22ae0121013）の支援を受けた。

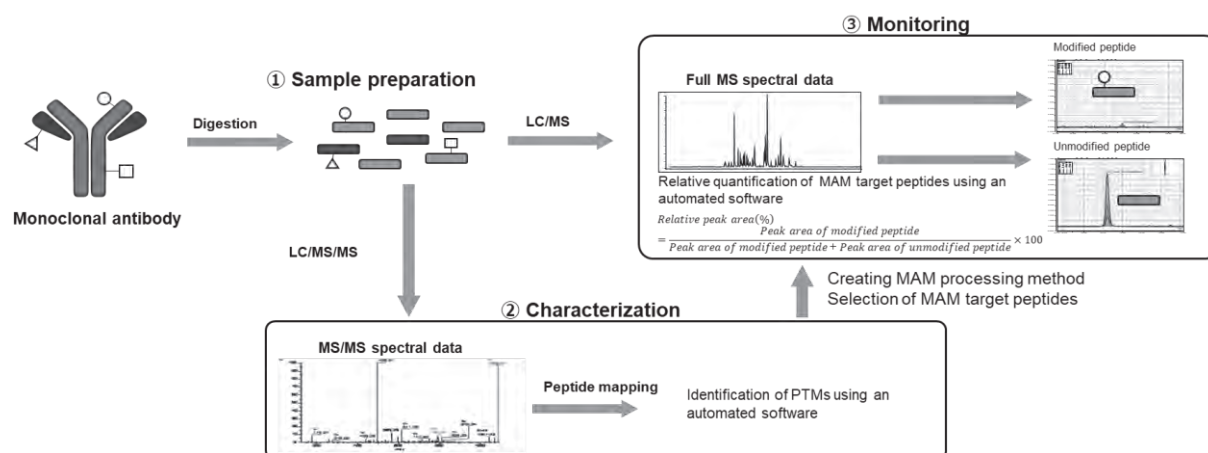


Figure 1. Typical MAM flowchart

シンポジウム3 私とがんのプロテオゲノミクス

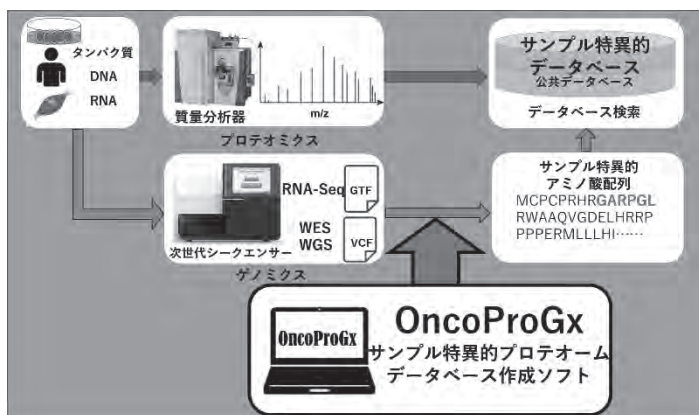
S-11 がんプロテオミクスのためのソフト “OncoProGx” の開発

野口 玲

国立がん研究センター希少がん研究分野

がん研究においてプロテオミクスは重要である。なぜならば、ゲノムの異常はプロテオームに翻訳されて、初めてがんの性格を決定するからである。質量分析がプロテオミクスの主な解析技術であるが、そこには大きな問題点が残されている。通常、質量分析のデータからタンパク質を同定する際に、公共のタンパク質データベースを用いる。公共のデータベースにはサンプル特異的な変異を持つタンパク質は登録されていない。したがって、サンプル特異的に発現するペプチドは質量分析で同定することができない。この問題を解決するために、サンプル毎のゲノム情報を用いてタンパク質を同定するためのソフトウェアである“OncoProGx”を我々は開発した。OncoProGxを使えば、サンプル特異的なプロテオームデータベースを作成することができる。入力ファイルとして、①発現情報のみもしくは②発現情報と遺伝子変異情報を使用する。①発現情報の入力ファイルは、RNA-Seqの結果をもとに作成したサンプルの転写産物の位置情報などの予測および発現量の情報ファイルである GTF (Gene Feature Format) と呼ばれる形式のファイルである。②遺伝子変異情報は全エクソームシーケンスや全ゲノムシーケンスなどのマッピング結果をもとに、リファレンス配列と異なる部分のみの情報を抽出した VCF (Variant Call Format) と呼ばれる形式のファイルである。OncoProGxは入力ファイルから遺伝子変異及び転写物の ID、位置情報を読み込み、読み込んだ位置情報を元に、リファレンスゲノム配列から各転写物の塩基配列を抽出する。その後、抽出した塩基配列を3フレームもしくは6フレームに変換し、塩基配列をアミノ酸配列に翻訳する。翻訳したアミノ酸配列を元に、オープンリーディングフレーム配列を予測し、タンパク質

分子量を算出する。最終出力ファイルは、サンプル特異的なアミノ酸配列のリストである fasta ファイルである。OncoProGxにより出力された fasta ファイルを用いて、タンパク質のデータベース検索をすると、サンプル特異的なペプチドおよびタンパク質を同定できる。OncoProGxを使えば、個々の症例では、ネオアンチゲンを同定でき、免疫療法に役立つ。また、症例群に特異的な変異ペプチド・融合タンパク質・新規転写産物などを同定できるので、バイオマーカーや治療標的の探索に有用である。本口演では、我々が開発した“OncoProGx”を紹介する。



S-12 TCR-抗原特異性の予測に向けた技術的進展と取り組み

長谷川 嵩矩

東京医科歯科大学 M&D データ科学センター

高齢化に伴い、健康寿命の延伸が求められる中において、がんは 2021 年の時点で日本人の死因のトップであり、次点の心疾患に比べて 1.8 倍以上の差をつけている。これは全死因の約 3 割程度を占める程であり、日本人の半数は死ぬまでにがん罹患するとされている。がんの治療法としては、外科的手術、化学療法、ホルモン療法、分子標的療法、放射線療法などがあるが、近年、がん免疫療法という新たな治療方法が注目を浴びている。がん免疫療法は、免疫システムによるがん抑制機構を利用した治療法の総称であり、20 世紀半ばから提唱されていたものの、Robert D. Schreiber を中心とするグループによってその重要性が再認識されるまでには数十年間の研究蓄積を要した。更に近年になり、T 細胞応答を抑制もしくは停止させる抑制因子として働く免疫チェックポイント・タンパク質 (PD-1 や PD-L1、CTLA-4 など) を標的とした、オプジーボを代表とする免疫チェックポイント阻害薬がヒトに対しても効果的に作用することが明らかになり、免疫系を利用したがん治療法の開発競争が加熱している。これら免疫チェックポイント阻害薬は、がん細胞が主に T 細胞の免疫機能を抑制し攻撃を逃れようとする仕組みを阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する。一方、以下で述べるネオ抗原による免疫療法は、T 細胞によるがん細胞の認識を強化することによる抗腫瘍効果の誘導であり、いずれも免疫システムによるがん細胞の認識機構を応用した治療戦略と位置付けることができる。

ネオ抗原とは、がん細胞中の DNA に発生する遺伝子変異によって生じる異常な配列を持つペプチドであり、特に T 細胞受容体によって認識され、免疫原性を持つペプチドのことを指すことが多い (より明確に、immunogenic neoantigen と呼ぶこともある)。ネオ抗原は正常細胞では発現しない、がん細胞に特異的なペプチドであるため、がん免疫療法のターゲットとなり得るため、その予測技術開発が積極的に行われている。ネオ抗原を同定するには、がん細胞の全ゲノム解析や RNA シークエンシングを用いる方法があるが、いずれの方法を用いた場合でも、同定した変異の情報を用いて変異ペプチドを生成し、HLA 分子との結合性予測を行うことで、ネオ抗原の候補を予測する。特に、HLA class1 とペプチドの結合性予測には、NetMHCpan4.1 と呼ばれるツールがよく用いられている。NetMHCpan4.1 は高い精度を持つとされ、多くの型の HLA-A、B、C に対応可能である。一方で、HLA class2 とペプチドの結合性予測には、NetMHCIpan-4.0 や MixMHC2pred、IEDB-AR と呼ばれるツールがよく用いられるが、HLA class2 とペプチドの結合性予測にはその予測精度において課題が残されており、性能の向上が望まれている。

このような方法を通して同定されたネオ抗原候補が T 細胞によって認識されるためには、peptide-MHC の結合親和性に加えて、TCR を加えた多体結合性を予測する必要がある。ネオ抗原と TCR の結合性予測には、TCR の可変領域の配列情報などを入力とする DeepTCR や iSmart、TCRGP などが提案されている。これらのツールは従来の機械学習手法に加え、深層学習を用いた手法を採用する方法であり、性能面においてはまだ課題が残されているが、開発競争が盛んに行われている。

更に、ネオ抗原予測を実際に研究などで利用する際には、変異 RNA の発現量など様々な情報が用いられることが多い。このような研究としては上述したように、ネオ抗原を同定することでがん免疫療法の足がかりにしようという研究のほかにも、がん細胞から予測されるネオ抗原の数などを用いることでがん細胞の特徴化を行い、免疫療法への感度を予測しようとする研究などもある。ネオ抗原に焦点を当てたがん免疫研究は近年数多く報告されており、本研究においては、計算機的な観点からこれらの研究の進展について紹介する。

シンポジウム 4 質量分析計による細菌同定の現状

S-13 MALDI-TOF MS による細菌同定の現状と将来性

藤永 あずみ

ブルカージャパン株式会社 ダルトニクス事業部 アプリケーション部

新しい微生物同定法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)を組み合わせた MALDI バイオタイパー(ブルカージャパン株式会社)が 2009 年に欧州で IVD-CE マークを取得したことを皮切りに、医療機器としての使用が世界的に広がった。現在、国内で 400 台以上、世界でも 5500 台以上のシステムが稼働している。これは臨床微生物検査の大きな技術革新として検査室のワークフローを一変させた技術であり、従来法の課題であった迅速性、正確性、低ランニングコストを実現したとも言われている。

MALDI-TOF MS が微生物同定の手法として広く認知される一方で、薬剤耐性検出への応用に対する期待は発売当初から大きく、論文などでもその成果が続々と報告されている。薬剤耐性菌に特徴的なピークの自動検出機能：MBT サブタイピングモジュールや、薬剤の加水分解により生じる質量変化で β -ラクタマーゼ活性を検出する機能：MBT STAR-BL モジュールについては、すでに製品化しソフトウェアに実装している。さらに、ハイエンドモデルである MALDI バイオタイパー sirius (ブルカージャパン株式会社)にはネガティブイオンモードが搭載されており、脂質マーカーピークを用いたコリスチン耐性の検出などのアプリケーションも可能となった。ブルカーでは菌種同定以外への MALDI バイオタイパーの応用、特に薬剤耐性への応用について継続して開発を進めている。

本講演では、MALDI-TOF MS による細菌同定の現状から将来への展望についてご紹介する。

また、MALDI-TOF MS では難しいアプリケーションの一つとして、菌株タイピングが挙げられる。迅速に菌株の相同性を確認することは臨床でのアウトブレイクの推測においても、各種メーカーにおける品質管理行程においても重要となるが、現状では遺伝子検査が主流となり、手間やコスト、時間がかかるといった難点がある。ブルカーではこの課題を解決するため、フーリエ変換赤外分光計(FT-IR)をベースとした IR バイオタイパーブルカージャパン株式会社)での菌株タイピングを提案している。IR バイオタイパーでは、菌株タイピングだけでなく、MALDI-TOF MS では難しい血清型の AI タイピングの有用性についても報告されており、今回、併せてご紹介したい。



IR バイオタイパー



MALDI バイオタイパー sirius

S-14 MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理調査体制について

曾川 一幸¹、上地 幸平²、奥村 元³、藤永 あずみ⁴、村上 正巳⁵、中山 智祥⁶

¹ 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室、² 琉球大学病院検査・輸血部、³ ビオメリュー・ジャパン株式会社、

⁴ ブルカー・ジャパン株式会社、⁵ 群馬大学医学部附属病院検査部、⁶ 日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野

【背景】

質量分析装置による細菌同定はサンプル調整が容易で、測定操作も簡便であり、一菌種約 5 分で同定結果が得られる。この特徴を活かして、煩雑な試料前処理を行わず、属や種を容易に識別することのできる手法として注目されている。2011 年に医療機器として認定され、細菌同定のツールとして運用されている。

2017 年 6 月に検体検査の品質・精度確保に関する医療法等改正法案が可決・公布され、それに伴い改正された厚生労働省令（医療法施行規則、臨検法施行規則）が 2018 年 7 月に公布、同年 12 月 1 日に施行された。この改正により、臨床検査を実施している施設には精度管理の法的基準が導入されることとなった。

近年、臨床微生物検査室を含む臨床検査室認定の国際規格「ISO 15189」（ISO ; International Organization for Standardization, 国際標準化機構）の認定を取得する施設が増加している。臨床微生物検査は、測定対象が微生物であるため、菌株、市販生培地、測定方法で変動が生じやすいという特徴がある。内部精度管理として、菌株は *Escherichia coli* を使用している施設が多いが、Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) の質量の校正として使用するため不适当である。市販生培地は、細菌同定には支障がないが、同定率（Score Value）に影響がある。日本医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス技術委員会 MALDI-TOF MS ワーキンググループにおいて、日常業務に適した MALDI-TOF MS による細菌同定における内部精度管理の実施要領を作成した。

外部精度管理には、一般社団法人日本臨床衛生検査技師会（日臨技）や都道府県の臨床検査技師会が実施する外部精度管理調査と試薬機器メーカーが主催するユーザーサーベイがある。しかしながら、質量分析装置による細菌同定の外部精度管理調査は行われていない。

今回我々は質量分析装置による細菌同定の外部精度管理調査について、同定一致率（Score Value）で評価する実施要領の作成に資する検討を行った。

【材料および方法】

1. 対象菌株

使用する株は ATCC® (American Type Culture Collection) から購入した *Klebsiella aerogenes* (ATCC13048)、*Enterococcus faecalis* (ATCC19433) を対象とした。

2. 測定機器

MALDI Biotyper（ブルカー・ジャパン株式会社）および VITEK MS（ビオメリュー・ジャパン株式会社）を使用し、得られたマススペクトルを MALDI Biotyper は MALDI Biotyper ver3.1 もしくは MBT Compass ver4.1、VITEK MS は KB v3.2 の専用解析ソフトで同定を行った。

3. 使用試薬

MALDI Biotyper の測定には、HCCA portioned 試薬（ブルカー・ジャパン株式会社）、VITEK MS の測定には MS-CHCA マトリックス試薬（ビオメリュー・ジャパン株式会社）を使用した。

4. 測定方法

ファインチューニング後と 14 日後の 2 回特定の曜日に測定した。血液寒天上のコロニーを爪楊枝で少量かきとり、ターゲットプレートのスポットに薄く均一になるように塗布後、専用のマトリックス試薬を 1 μL 添加し、十分に乾燥した後測定を行った。1 菌種、血液寒天培地 1 種類につき、ターゲットプレートに 3 スポット接種して同時に測定した。

5. 同定一致率・同定確率の算出について

同定一致率は各 MALDI-TOF MS の測定で菌種名が得られた割合とし、MALDI Biotyper は信頼性の指標である Score Value を用い、菌種レベルの同定は 2.000~3.000 である。Score Value において、属レベルの同定は 1.700~1.999、同定不可は 0.000~1.699 と数値で表示される 7,8)。また、VITEK MS は信頼性の指標である同定確率を用い、同定菌種名が 1 菌種であり、同定確率 99.9% とされるものが菌種レベルの同定とした。

【まとめ】

MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理実施要領の作成に資する検討より、①使用菌株：*Klebsiella aerogenes* (ATCC13048)、*Enterococcus faecalis* (ATCC19433)、②培養：マイクロバンクから常に同じ血液寒天培地に接種し、18~24 時間培養、③マトリックス試薬：MALDI Biotyper は HCCA portion 試薬、VITEK MS は MS-CHCA マトリックス試薬、④定期的なファインチューニングを提案する。今後、MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理実施要領を用いて、関連学会と連携して行っていく予定である。

シンポジウム 4 質量分析計による細菌同定の現状

S-15 微生物検査領域における質量分析法を用いた菌種同定について

上地 幸平

琉球大学病院 検査・輸血部

「微生物検査は結果報告までに時間がかかる」というのが今までの医療関係者の共通の認識であろう。しかし、現在の微生物検査も本当に時間がかかるままなのだろうか。

従来の臨床微生物検査における菌種同定検査は各種培地に発育した細菌および真菌のコロニー形態やそのグラム染色性から菌種(属)を推定し、生化学性状を用いた菌種同定検査が実施されていた。即ち、培養法を基にした微生物検査である。これらの方法は細菌や真菌の増殖速度に依存した検査であるため、時間がかかる。生化学性状を用いた菌種同定検査は試験管培地や簡易同定キットなどを用いて、細菌および真菌の糖分解などを測定するが、菌の増殖を基にした検査であるため、結果を得るまでに早くても4時間程度、多くは18時間以上を要する。現在は複数の生化学性状を同時に測定可能な全自動機器専用パネルが普及しており、省力化という点では改善されているものの、検査所要時間は変わっていない。また、結核菌などは菌の倍化時間が15時間程度であることがいわれており、従来の菌種同定では結果を中間報告するまでに数週間、薬剤感受性の最終結果報告までには数カ月単位の時間を要するのが現状である。

臨床微生物検査における技術革新とも呼ぶべき検査機器、即ち、質量分析装置は2011年に国内販売が開始された。現在、国内では臨床検査目的で2機種、VITEK MS(ビオメリュー)とMALDI Biotyper(ブルカー・ダルトニクス)が販売されており、大学病院等を中心に導入が進み、年々導入施設数が増加している。質量分析装置はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: MALDI)および飛行時間型質量分析法(Time of Flight Mass Spectrometry: TOF MS)を測定原理とし、リボゾームタンパクを主体として解析することで得られたマスペクトラムパターンを参照データベースと照合することで菌種を決定する(図1-1、1-2)。質量分析法のメリットとして、①菌種同定精度は16S rRNA遺伝子解析による菌種同定法と同等とされる、②1株あたり約10分程度で菌種同定が可能であり、迅速性に優れる、③ランニングコストが安価、④同定検査に係る作業の効率化が可能、などが挙げられる。一方、デメリットとしては、①初期投資費用やメンテナンス費用が高い、②同定精度はその参照データベースに依存するため、データベースのさらなる拡充が必要不可欠である、③16S rRNA遺伝子から合成されるリボゾームタンパクを主体として解析しているため、大腸菌と赤痢菌、肺炎球菌と口腔内常在性のレンサ球菌などのように、本遺伝子配列

の相同性の高い菌種は鑑別が難しい、などが挙げられる。しかし、菌種名が早期に判明することで、感染症の早期診断や適切な抗菌薬選択に繋がるという点では感染症診療に有用であることが報告されている。特に、血流感染症の原因微生物の同定という点においては、陽性となった血液培養ボトルから直接、質量分析装置を用いた菌種同定が可能であり、臨床的有用性が非常に高い。現在では、質量分析装置を用いた薬剤耐性菌の検出や毒素の検出、疫学解析に応用するなどの論文報告もあり、今後の可能性が期待されるところである。

本発表では質量分析法を用いた菌種同定検査の原理からその長所や短所、実際の運用、質量分析装置が臨床微生物分野に導入されたことで微生物検査がどう変化したか、今後の展望を含めて概説したい。

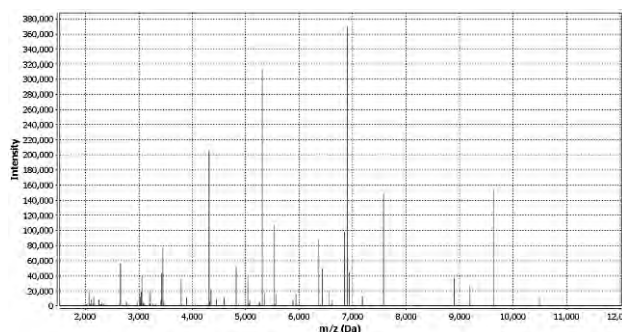


図1-1. 黄色ブドウ球菌のマスペクトラムパターンの一例

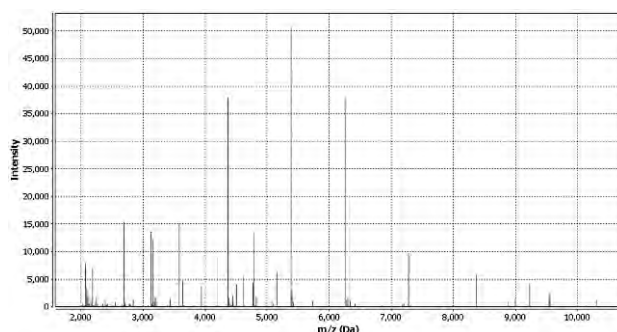


図1-2. 大腸菌のマスペクトラムパターンの一例

S-16 臨床微生物検査における MALDI-TOF MS の効果的な運用方法

大城 健哉

那覇市立病院 医療技術部検査室

感染症診療において、原因微生物を早期に同定し、適宜・適時報告することで抗菌薬適正使用につながり、患者の予後のみならず病院経営に影響を及ぼすと考えられる。まさに、われわれ臨床微生物検査室の腕の見せどころである。

微生物の同定における新たな技術として、近年導入された MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry ; マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計) があげられる。MALDI-TOF MS は、日本国内では 2011 年 7 月に MALDI バイオタイパー (ブルカー・ジャパン) が、2011 年 8 月に VITEK MS (ビオメリュー・ジャパン) が発売され、2023 年 1 月時点で全国約 390 の医療関連施設に導入されている。当院には 2014 年 8 月に MALDI バイオタイパーが導入された。

MALDI-TOF MS では、コロニーから約 5 分、血液培養陽性ボトルから約 30 分で菌同定が可能であり、従来の生化学的性状などによる全自動同定装置や簡易同定キットの同定所要時間を大幅に短縮できる。

しかし、ただ単に MALDI-TOF MS を導入しただけでは臨床へのインパクトは不十分であり、ワークフローの見直しも必須となる。血液培養陽性ボトルからの迅速同定結果を AST (抗菌薬適正使用支援チーム ; Antimicrobial Stewardship Team) へ逐次報告し、積極的な AS (抗菌薬適正使用支援 ; Antimicrobial Stewardship) を行うことで抗菌薬適正使用につながり、患者の予後を改善し、在院日数を短縮するとされている。

積極的な AS には血液培養陽性ボトルからの迅速同定がキーとなる。しかし、すべての陽性検体について迅速同定を実施すると他の業務が滞り、全体的な報告遅延につながる可能性もある。迅速同定を実施するか否かの判断が必要であり、患者の状態を把握したうえで、迅速同定を実施する条件の設定も望まれる。

一方、令和 4 年度日本臨床衛生検査技師会精度管理調査結果報告書によると、同定検査 (試料 32) に参加した 1,264 施設中、MALDI-TOF MS を使用した施設は 261 施設 (20.6%) と、MALDI-TOF MS の臨床微生物検査室への導

入は未だ一部の施設に限られており、従来法である用手法検査は依然として重要と考えられる。

血液培養から分離されるグラム陰性桿菌の腸内細菌目細菌とブドウ糖非発酵菌、ビブリオ科細菌の鑑別方法として、生鮮標本による運動性の観察は特別な機器を必要とせず、安価で簡便で有用である。鞭毛を有するグラム陰性桿菌の運動性として、腸内細菌目細菌は周毛性鞭毛を有するため、回転性～蛇行性の運動性を示す。また、ブドウ糖非発酵菌とビブリオ科細菌は極毛性の鞭毛を有するため、直線性の運動性を示す。好気ボトルのみ発育で直線性の運動性を呈するグラム陰性桿菌はブドウ糖非発酵菌を疑い、嫌気ボトルにも発育するグラム陰性桿菌で直線性の運動性を呈する場合はビブリオ科細菌を疑う。また、運動性を有するグラム陽性レンサ球菌は *Enterococcus casseliflavus* や *Enterococcus gallinarum*、*Vagococcus* spp. と推定される。*E. casseliflavus* や *E. gallinarum* はバンコマイシン自然耐性であるため、グラム染色結果報告時に、バンコマイシン無効である可能性を合わせて報告することで抗菌薬適正使用につながると考えられる。

MALDI-TOF MS にて *Klebsiella pneumoniae* と同定されたものの、事前に生鮮標本にて運動性ありを確認していたため、運動性なしの *K. pneumoniae* と矛盾することから、誤同定に気づいたケースもあった。

また、MALDI-TOF MS では *Streptococcus pneumoniae* の同定は不可であり、16S rRNA 遺伝子配列の相同性が高い *Streptococcus mitis* や *Streptococcus oralis* との鑑別が必要になる。その鑑別に胆汁酸溶解試験は有用であり、胆汁酸溶解試験陽性で *S. pneumoniae* と同定される。

臨床微生物検査室にて MALDI-TOF MS を活かすために、ワークフローの見直しは必須となる。また、AST との連携も重要で、積極的な AS で患者の予後や病院経営に貢献できると考えられる。一方、従来法である各種用手法による同定も、新技術を支えるため永遠に不滅と考えられる。

シンポジウム当日は、会場の皆さまからもご意見やご提案をいただき、臨床微生物検査における MALDI-TOF MS の、より効果的な運用方法につながればと思う。

連絡先 : tohshiro@nch.naha.okinawa.jp

シンポジウム 5 臨床検査の医療への貢献

S-17 臨床検査の多様な貢献

山田 俊幸

自治医科大学臨床検査医学

医学・医療の3本柱は「診療、研究、教育」とされている。演者のような医科大学に勤務する者はこの3つをバランスよく日々実践していくことが求められるが、小規模施設であっても、この3つの視点は必要と考える。後述するように、所属施設を超えた様々な貢献も重要だからである。今回、「臨床検査の果たす貢献」をキーワードに臨床検査のあるべき姿、可能性を論じてみたい。

診療での貢献はわかりやすい。端的には患者に最良の診療が行われるよう、質の高い臨床検査を提供することである。質には、検査の精確さは勿論のこと、患者にとって快適なものである必要がある。スピードや心地よさなどである。POCTの台頭で議論になっているように時にこの2つの質は相反することがある。真に求められる患者サービスとは何か深く考える必要がある。幸いなことにISO15189をはじめとする施設認証の導入により、サービスの理念がかなり普及してきている。施設内においては、経営に対する貢献、タスクシェア・シフトをはじめとした他職種連携を通じたメディカルスタッフの業務改善への貢献なども、間接的ではあるが診療への貢献となる。臨床支援として、速く精確なデータの返却とプラス α の報告が工夫されている。いつかはAIの登場になるであろうが、まずはパニック値報告を含め臨床検査値の意味を知り尽くしたプロの報告を研ぎ澄ませることに邁進すべきであろう。

この電気泳動学会での活動はどのような貢献になるであろうか。臨床検査部門の実務者からの研究発表は、新しい電気泳動技術の基礎的臨床的検討や実用の工夫という前向きタイプの研究と、経験した症例を掘り下げた報告になる。蛋白分画やアイソザイムというパターン認識において想定外のものが経験され、その背景を解析した研究報告が30~40年前の本学会で多数蓄積された。2峰性アルブミン、酵素欠損症などの遺伝性異常、糖鎖異常などの腫瘍性変化、酵素結合免疫グロブリンなどのピットフォール現象などである。または、電気泳動以外の検査でM蛋白の干渉などで想定外の結果が得られた際の要因の解析に電気泳動を駆使したという類の研究もあった。これらの蓄積は、その後の診療に、特に無用の混乱を来さないという意味で多大なる貢献を示した。また後進にとっては貴重な教育的財産になった。昨今、このような報告をあまり見かけなくなっている。その要因は、経験はするものの新規性が低下した、電気泳動検査の実施頻度の低下あるいは検査の外注化などの背景があると思われる。懸念するのは、「気づき」があってもその背景を分析して報告する研究環境が乏しくなりつつあるのではないか、ということである。

研究が沈滞傾向にあるのは臨床検査分野に限ったことではないが、将来に向けてなんとかしなければならない。日本臨床化学会では、6年くらい前からピットフォール研究専門委員会を立ち上げ、説明困難な検査結果を示す事例について、その要因の解析を自施設で行うのが難しい場合に、その解析をチームプレーでサポートする取り組みを始めた。すでに多くの実績をあげ、試薬メーカーを巻き込み検査試薬や条件の改良に向かう事例もある。これは、大変意義のある研究活動で医療への貢献と言える。特筆すべきは、依頼主が規模の大きな施設の所属ではないということで、先に述べたように施設の規模によらず、「気づき」とその発展へのマインドを維持すること、同学の志でそれをサポートすることが肝要となる。

最後に、臨床検査を一般の方によく理解していただく「啓蒙」という社会貢献について述べたい。「臨床検査の値はどこからきているのか?」「臨床検査の精度とは?」「精度はどのようにして保たれているのか?」「施設によって値がばらつくというけど本当にそうなのか?」「基準範囲とは?カットオフとは?」。以上のことは実は医療関係者でもよく理解していないことが多く、一般の方はますますわからない。さまざまな活動を通して正しく臨床検査のことを理解してもらう努力が必要である。一般への理解が広がることが、ひいては行政などによる臨床検査の適正な理解につながるものと信ずる。

S-18 新型コロナウイルス検査キットの開発 ～ パンデミックから発売までの開発ストーリー ～

保坂 憲光

栄研化学（株）生物化学研究所第四部

2019 年末の中国・武漢で、のちに COVID-19 と呼ばれる原因不明の肺炎を発症した患者が確認されました。12 月 31 日に世界保健機関（WHO）から正式にその存在が公表されると、翌年 1 月には原因ウイルスの遺伝子配列が公開され、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による疾患であることが報告されました。この時点では世界中のどこにもこのウイルスを検査する手段はなく、日本に上陸した際には感染を把握する手立てもないことから、爆発的に流行することが懸念されていました。

弊社は、「ヘルスケアを通じて人々の健康を守ります。」の経営理念のもと、いち早く検査試薬をご提供するため、1 月初旬試薬開発に着手しました。多くの検査手段がある中、感染症のスクリーニング検査に使用できる感度があり、かつ迅速に開発が可能なことから、遺伝子検査試薬での提供を目指しました。遺伝子検査試薬の開発においては、検査に用いるプライマーの設計、反応を行う反応試薬の設計、陽性及び陰性コントロールの設計が必要となりますが、今回は迅速に開発することが最優先であったため、同じ RNA ウイルスを検出するための試薬である「Loopamp®A 型インフルエンザウイルス検出試薬キット」をベースに、プライマーと陽性コントロールのみ設計することとしました。既存製品を改良して開発することは、設計面だけでなく、生産手段と原材料が利用できること、実績のある操作法の採用によりユーザビリティの評価が済んでいること、測定プログラムや販促資料も既存のものを利用できるなど、迅速開発全体において非常に有効でした。

遺伝子配列公開以降、公表された新型コロナウイルスの遺伝子配列情報だけでなく、その類似ウイルス及び類似疾患の原因菌及びウイルスの配列情報も収集しプライマーの設計を実施しました。プライマー設計と並行して、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）とは試薬の開発状況についての連絡を密に行い、国立感染症研究所（NIID）には遺伝子の提供依頼を行いました。これにより、PMDA からは体外診断用医薬品の申請要件についての情報提供を受けるとともに、NIID から申請に必要な検体パネルの提供を受けることにより、迅速な薬事申請が可能となりました。

これらの結果として、弊社は WHO がパンデミックを宣言する 3 月には研究用試薬として試薬の提供を開始、また 4 月には体外診断用医薬品としての承認を受けた診断薬「Loopamp®新型コロナウイルス 2019（SARS-CoV-2）検出試薬キット」の販売も開始することができました。これは、現在目標となっている診断薬を 100 日以内に提供する「100 日ミッション」を達成するものでした。また、発売以降も、唾液などの適用検体種の追加、変異株の反応への影響に関する情報の提供、初めて遺伝子検査を利用されるお客様が多いことから品質管理を目的としたサーベイの実施など、よりよい検査を行うための活動を継続しております。

シンポジウム 5 臨床検査の医療への貢献

S-19 膵疾患にミスリードしないためのアミラーゼアイソザイムの迅速な活用法

松村 充子

天理よろづ相談所 医学研究所

アミラーゼは膵疾患以外にも異常高値となることが知られている。

唾液腺 (salivary) 由来の疾患である耳下腺炎や外傷性ショック、アミラーゼ産生腫瘍、そして免疫グロブリン結合型 (macro) などである。

アミラーゼは小腸に多く分布し、粘液性に富み、IgA との親和性が高い特徴を持つ。このような性質を持つ蛋白酵素であるが、異常高値となったとき臨床医は急性膵炎を念頭に於いて診療を進め、画像検査、造影検査へと繋がってゆくことが多い。

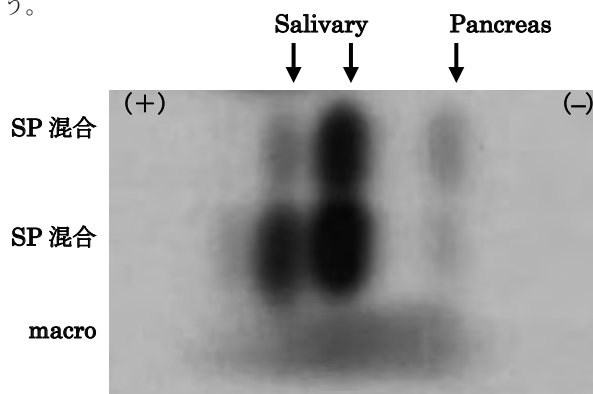
前述のようにアミラーゼは膵臓 (pancreas) への特異性が低い傾向にあり、単独の判読に寄らず、アミラーゼ以外に P 型アミラーゼとリパーゼを併用する必要がある。

特に膵疾患へミスリードしないためには、macro アミラーゼにおける P 型アミラーゼの特徴を捉え、迅速に電気泳動を実施することが重要と考える。

耳下腺炎、外傷性ショック、アミラーゼ産生腫瘍では S 型由来がアミラーゼ全体の大部分を占め、P 型アミラーゼ活性はほとんど認めない。

一方で急性膵炎、慢性膵炎では、P 型アミラーゼは 50～100% で、リパーゼは中等度から高度に上昇する。

膵疾患において P 型アミラーゼの測定値に幅があるのは、急性から慢性への移行や膵臓の侵襲度合いに個体差があるからで、macro が膵疾患と誤認されることに繋がってしまう。



アミラーゼアイソザイム像

macro は陽極から陰極にかけてテーリングし、免疫グロブリンとの結合が示唆される

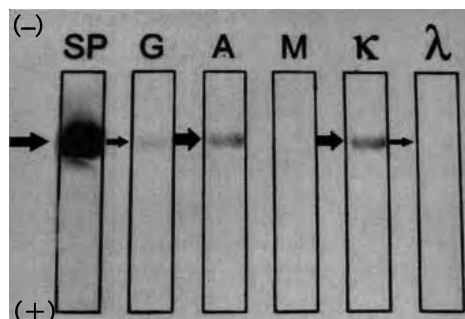
経験した 4 症例の macro は、アミラーゼ 401～630 U/L (平均 531)、P 型アミラーゼ 28～68% (平均 53)、リパーゼ 21～87 U/L (平均 52) で、P 型アミラーゼの占める割合が膵疾患に類似していた。(基準範囲はアミラーゼ 44～134 U/L、リパーゼ 13～55 U/L) 症例 1 は慢性甲状腺炎、症例 2 はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、症例 3 は肝硬変、症例 4 は前立腺癌で、アミラーゼアイソザイム像はテーリングを示し、アミラーゼと結合している免疫グロブリンは症例 1 と 2 は IgA/κ 型、症例 3 は IgA/κ、IgG/λ 型、症例 4 では IgA/λ 型であった。免疫グロブリンの同定は、免疫固定法を実施したのち泳動膜の乾燥をせず酵素染色をするとアミラーゼと結合している単クローン性の蛋白が反応する方法で実施した。

macro にて P 型アミラーゼが高値傾向となってしまう理由は、その測定方法に起因していると推察される。

P 型アミラーゼの測定原理は、抗ヒト抗 S 型アミラーゼ抗体にて S 型を阻害し、残存する血清中のアミラーゼを検出することによるが、macro においては反応液中で免疫複合体が巨大化してアミラーゼを包み込んで消去しきれず、残存するアミラーゼを P 型として捉えてしまうことにあると考える。

4 症例の macro の臨床的背景は、膵疾患とは関係がない基礎疾患を有していたが、アミラーゼ高値で P 型アミラーゼが軽度から中等度の上昇を認めたため、画像検査、造影検査が行われ過剰診療に繋がっていた。

これより、迅速に電気泳動が実施できる環境づくりが、診療を補佐する一助になると考える。



免疫固定後のアミラーゼ染色像

熱処理をせずアミラーゼ染色を実施すると、IgA/κ と IgG/λ 結合型と同定できる

S-20 反応過程異常精査や診断に役立つ蛋白電気泳動 ー患者の早期診断につながった事例ー

青木 絵美

慶應義塾大学病院 臨床検査科

〔はじめに〕

多発性骨髄腫は、形質細胞が腫瘍化し骨髄中で単クローン性に増殖する疾患であり、わが国においては年々罹患数の増加を認めている。腫瘍化した形質細胞から無効な免疫グロブリン（M 蛋白）が多量に産生され、M 蛋白は臨床検査領域において、しばしば異常反応を惹起することが知られている。

当検査室では M 蛋白の検出、同定に利用される蛋白電気泳動（蛋白分画、免疫固定法）を院内で実施しており、M 蛋白による異常反応の検出が可能である。

今回、当検査室で M 蛋白に起因する異常反応を認め、蛋白電気泳動による精査を迅速に行ったことから早期診断に至った 2 症例を紹介する。

【症例 1】60 代男性

【主訴】全身倦怠感、腰痛

【既往】精巣腫瘍

【経過】X 年より 1 年ごとの健診で Hb 濃度の漸減を認め、X+3 年 9 月の健診で Hb 10.2 g/dL、総蛋白 11.5 g/dL、アルブミン 3.5g/dL であったため、多発性骨髄腫疑いで当院血液内科を紹介された。

【検査所見】初回測定データで、総蛋白 11.7g/dL、アルブミン 3.0g/dL、IgM 50mg/dL を認めた。IgG、IgA は異常高値で測定範囲外エラー、Cu <10μg/dL（機械値 -5μg/dL：機器エラーなし）であった。Cu は反応過程を確認したところ、第一試薬との反応で吸光度上昇を認める異常反応パターンであった。希釈再検を実施したところ、IgG 6100mg/dL、IgA 990mg/dL、Cu 99μg/dL であった。Cu での異常反応および IgG、IgA がともに異常高値であることから迅速な精査が必要と判断し、血清蛋白分画、免疫固定法を実施した。その結果、蛋白分画で M 蛋白が疑われ、免疫固定法の結果、IgG (κ) および IgA (κ) 型 M 蛋白が同定された。

【症例 2】50 代男性

【主訴】血性鼻汁

【既往】自然気胸、うつ病

【経過】Y 年 10 月血性鼻汁を自覚、抗菌薬、ステロイド点鼻薬などで加療開始したが増悪傾向であり、血管炎性肉芽腫症疑いで当院耳鼻咽喉科を紹介された。

【検査所見】生化学用採血管（インセパック II-D: 積水メディカル株式会社）を採血後、3000rpm（約 1810g）6 分で遠心分離したところ、血餅と分離剤が融合し血清分離が

不良であることから M 蛋白の存在が疑われた。

初回測定データで、尿素窒素 34.5mg/dL、クレアチニン 3.25mg/dL と腎機能障害を認めた。初診時の検査に総蛋白、アルブミン、免疫グロブリン定量の依頼はなかった。そのため、担当医に連絡し、多発性骨髄腫の鑑別のために追加検査および血液内科へのコンサルテーションを依頼した。翌日、血清分離不良への対応として分離剤を含まないプレーン管での採血が実施された。生化学データは、総蛋白 13.8g/dL、アルブミン 2.1g/dL、Ca 14.0mg/dL、IgG 10070mg/dL、IgA 8mg/dL、IgM 7mg/dL であった。同日中に血清蛋白分画、免疫固定法を実施した。その結果、蛋白分画で M 蛋白が疑われ、免疫固定法の結果、IgG (κ) 型 M 蛋白が同定された。

〔まとめ〕

臨床検査領域では、検体中の多種多様な物質の影響を受け、異常反応、非特異反応を生ずる可能性がある。その要因の一つとして M 蛋白が挙げられ、しばしば検査前操作あるいは検査の測定系に様々な影響を及ぼす。そのため、日頃より日常業務で遭遇しやすい異常反応を認識し、的確に対応することが重要である。今回紹介した事例は、Cu の異常値あるいは遠心操作後の血清分離状態から、検体中に M 蛋白存在の可能性を見出した。当検査室では、総蛋白や免疫グロブリン定量を始めとする生化学スクリーニング検査と蛋白電気泳動を、同一部署内で共通の担当者が行っている。そのため、M 蛋白が測定系に与える影響についての知識と経験を有し、さらに精査のために必要な検査を臨床へ提案、実施することが可能であり、疾患の早期診断につながった。

蛋白電気泳動はコストや手間がかかる、操作や判読の技能を要する、必ずしも迅速性を求められる検査ではない、などの理由から院内実施する施設が減少している。しかし、血清蛋白分画は種々の疾患の病態把握や M 蛋白検出のための検査として、免疫固定法は M 蛋白の同定検査として疾患の鑑別、診断に非常に重要な役割を果たしている。これらを院内検査として行うことは、検査技師の知識や技術を維持するだけでなく、患者への的確で迅速な診断に貢献していると考えられる。

シンポジウム 5 臨床検査の医療への貢献

S-21 異常反応監視システムと検査結果自動解析システムを組み合わせた診断支援の取り組み

石嶺 南生

信州大学医学部附属病院 臨床検査部

臨床検査、特に臨床化学検査では分析精度の向上により、多項目の検査結果を大量に、迅速に提供することが可能となった。それらの結果をもとに医師が病態を判断し、診断や治療経過観察に用いるため、正しい結果を報告すること(検査過誤を防止すること)は重要であり、また結果をもとに臨床側に追加検査の推奨や結果の解釈などを提供することで診療をサポートする取り組みも近年注目されている。当院では 15 年以上前から検査過誤を防止するために分析装置で異常反応過程チェックを設定し、臨床検査システムでゾーン法や項目間チェックを行っている。診療サポートとしては、検査結果自動解析システムを用いて総蛋白、アルブミン、グロブリンのバランスを監視し、アンバランスな検体には血清蛋白電気泳動や免疫固定法などの追加依頼を打診するコメントをリアルタイムに発信している。当日はこれらの取り組みについて、実例を交えて紹介する。

S-22 医療へ貢献するための当院検査部での ISO 15189 関連の取り組み

石原 香織¹、長谷川 寛雄^{1,2}、木村 由美子¹、柳原 克紀^{1,2}¹長崎大学病院検査部、²長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態解析・診断学分野

【はじめに】

国際規格 ISO 15189「臨床検査室-品質と能力に関する特定要求事項」は臨床研究（治験）実施施設や臨床研究中核病院の承認要件の1つであり、第三者機関による客観的な評価が得られる。平成 28（2016）年の診療報酬改定に伴い、国際標準検査管理加算が新設され、多くの検査室が認定を取得するきっかけとなった。当院でも 2015 年 4 月にキックオフ、2017 年 3 月に初回認定、2021 年 3 月に第 1 回認定更新をした。

【当院の概要】

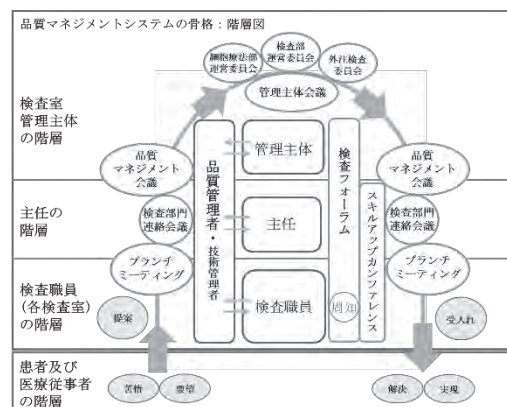
当院は病床数 874 床、職員数 2,535 名、平均外来患者数 1,600 人/日、病院機能評価・ISO 15189（検査部・細胞療法部）などの認定を外部評価認定として取得している。高度救命救急センター、特定機能病院、がんゲノム医療拠点病院、災害拠点病院、長崎県内唯一の大学病院として機能している。

【当院検査部の概要】

当院検査部には医師 7 人、臨床検査技師 59 人が在籍しており、検体検査分野で 2017 年 3 月に初回認定を受け、2023 年 3 月には生理学的検査を拡大申請した。業務は、検体検査（血液検査、一般検査、生化学検査、免疫血清検査、輸血検査、微生物検査、遺伝子検査室、FCM 検査室）、生理検査（心電図検査、呼吸機能検査、脳波検査など）、中央採血室から構成されており、検体検査は 365 日 24 時間体制、微生物検査は 365 日日勤体制で対応している。

【当院検査部の品質マネジメントシステム】

当院検査部の品質マネジメントシステムとして検査室管理主体、品質管理者・技術管理者、主任、検査職員などの各スタッフから成り立っており、各検査室のランチミーティング、検査部門連絡会議、品質マネジメント会議、管理主体会議等の検査部門内の会議体および検査部運営委員会などの病院内の会議体等などを経て様々な事項を管理している。



【検査の質の担保に関連する取り組み】

ISO 15189 導入前は精度管理、機材・試薬の管理、要員の教育など各検査室でバラバラであり、今振り返ってみると十分なものではなかった。ISO 15189 取得を機に、要求事項に沿って各プロセスにおける手順書を作成し、実施した記録を作成し、必要な教育を受けた要員が質の担保された検査結果を臨床に報告することができるようになった。報告した結果に対し、個々の臨床症例に対する助言や専門的判断などのアドバイスサービスを実施することができるようになり、サービスの利用者（臨床医）ともコミュニケーションがとりやすくなった。

また TAT（Turn Around Time）については、ISO 15189 導入前は外来迅速検体について年に 1 回、検体受付～検査結果報告までの所要時間を算出し、検査部運営委員会で報告していたが、ISO 15189 取得を機に、検査プロセスの品質指標として採血受付時間から検査結果報告時間までを 60 分未満と定め、毎月品質マネジメント会議で報告し、適切に時間内に結果報告がされていることを確認し、検査部門全員で共有している。

ISO 15189 取得がゴールではなく、常に検査部門全員で取り組み、改善点を模索し、維持していくことが大事である。

本セッションでは当院の医療に貢献するための ISO 15189 関連の具体的な取り組み例や、その評価について報告する。

シンポジウム 5 臨床検査の医療への貢献

S-23 次世代シーケンサーを用いた臨床検査の展望

白石 直樹

近畿大学病院 ゲノム医療センター

近年、がんゲノム医療推進を目的として、一度に大量の遺伝子解析が可能な次世代シーケンサー(NGS)を用いた遺伝子パネルの開発が進められてきた。肺癌診療においては、がんゲノムプロファイリング検査としての遺伝子パネル検査以外に、2019年6月に肺がんの特化したNGSを用いたマルチコンパニオン検査であるオンコマイン Dx 検査が保険収載された。EGFR,ALK,ROS-1,BRAF,RETの5つのドライバー遺伝子変異を同時に検出できるだけでなく、研究目的ではあるが MET14skipping,NTRK,ERBB2,KRASを含む42遺伝子も検索も可能である。これによりファーストラインで測定が求められるドライバー変異遺伝子を一括して測定ができ、治療の道筋が早期に建てることが可能となった。TATや検体薄切の労力、組織の消費量からしても多くのメリットのある検査である。

近畿大学病院ではオンコマイン Dx 検査の保険収載後、積極的にファーストラインでのドライバー変異遺伝子探索に用いてきた。しかし、当院での初期の検査成功率は低く、多くの検体でシングルプレックス検査への変更をやむなくされた。全国的にみても成功率はシングルプレックス検査に比べると低迷し、オンコマイン Dx 検査によるドライバー変異遺伝子探索を実施していない施設も多い。特に気管支内視鏡検体では腫瘍量や腫瘍細胞割合の点から、オンコマイン Dx 検査に提出できない施設が多い。

2020年6月からは近畿大学病院内でオンコマイン Dx 検査を行っている。院内にてNGS検査を実施できている病院はまだ全国には数えるほどしか存在しない。内製化の結果、検査実施率は97%、検査成功率は99%と、ほぼ全例でオンコマイン Dx 検査にてドライバー変異遺伝子探索をおこなえるまでに改善した。当日はNGSを用いた検査の注意点、他の検査方法との併用について、当院のNGS検査の使用経験を踏まえてお話ししたい。

S-24 検査室における電気泳動検査の有用性と大学教育

清宮 正徳¹、米根 鉄矢¹、小林 崇平¹、浅野 はるな²、川崎 健治²、松下 一之²¹ 国際医療福祉大学成田保健医療学部、² 千葉大学医学部附属病院検査部

【はじめに】

検査室から電気泳動の技術が失われ始めている。その理由として、至急対応が困難、コストが高い、他の特異性の高い各種検査法の充実などが上げられる。しかし生化学検査において不審な異常値が認められた際、電気泳動の活用は最も簡便かつ有効な原因究明手法である。また異常の原因が突き止められればその後の精査は不要となるなど、患者に余計な検査の負担や心配を与えずにすむと共に、検査室への信頼度合いが向上する。

一方検査技師を養成する大学の講義では、国家試験に頻出する内容に時間を割く傾向にある。卒業研究や大学院では電気泳動が良く利用されている。

【検査室における電気泳動検査の実施状況】

1) 蛋白分画検査：千葉大学病院における検査依頼数は30年前には一日500検体中100件日以上依頼があったが、現在は一日1000検体中25件程度に減少した。現在の目的はM蛋白の定量的評価や、ネフローゼや悪性リンパ腫などの診療ガイドラインに掲載されていることから依頼されていると考える。造血器腫瘍診療ガイドラインの骨髓腫編では、血清M蛋白量は、血清蛋白電気泳動のdensitometryで定量することが明記されている。5分画ではなくM蛋白の部分で算出できると良いと考える。

一方臨床化学検査における異常反応発生時に、院内で蛋白分画を実施しているとすぐにM蛋白の有無が確認できて便利である。M蛋白が初めて疑われた症例の場合は、担当医に連絡の上、免疫固定法の実施を進言することになる。近年では臨床化学検査における反応タイムコースの異常を積極的に発見する機能が備わりつつある。我々はタイムコース異常を発見した際にM蛋白の検索を行うシステムを臨床側同意の上実施した結果、一年間に20症例のM蛋白による異常反応を確認している。

2) 免疫固定法：M蛋白の有無の判定は、近年では免疫電気泳動よりも免疫固定法が主である。前出の骨髓腫ガイドラインではCR (complete response) の判定は血清と尿の免疫固定法が陰性であることの確認が求められている。千葉大における年間件数は2500件に達しており、手間がかかることから全自動化装置の開発が求められている。

3) LDアイソザイム：LDは組織特異性は無いが、LD活性値は各種病態をよく反映することから、原因不明のLDの上昇時にアイソザイムの測定は重要である。我々はLD5型は冷蔵～-20℃で不安定とされているため、分析まで室温または-80℃で保存し、週2～3回測定している。免疫グロブリン結合型LDでは血中の残存時間が長くな

るので高値化するが、LD上昇は病勢を反映しない。このようなアノマリーの精査は電気泳動が有用である。我々はこれまで免疫グロブリン結合型LDの他、H型サブユニットの遺伝変異によりアイソザイムが15本のバンドに分かれた例を経験している。

4) ALPアイソザイム：骨病変の評価（特に悪性腫瘍の骨転移）によく利用される。異常酵素ではLDと同様に免疫グロブリン結合型では血中の残存時間が長くなり高値化する他、小児の一過性高ALP血症 (transient hyperphosphatasemia; THP) で著増 (>10,000 U/L の経験あり) する。THPではALPに異常糖鎖が付き2～3型のバンドがわずかに陽極側にずれることから、電気泳動によって確認できる。またALP値は2か月程度で通常時レベルに低下するので、患者は経過観察のみで精査は不要となる。我々はALPのみが急上昇した症例にアイソザイム検査の実施を進言しており、THPの半数程度が検査室側からの意見により検出 (年間3件程度) されている。

5) そのほかの酵素：ASTのみの異常高値について近医より紹介受診した患者血清の、免疫グロブリン結合型ASTアイソザイムを2例経験した。いずれもASTのみ100U/L以上と異常高値であった。

【検査技師を養成する大学での教育状況】

検査技師を養成する大学では、国家試験に頻出しない内容に時間を割くのは現状では困難である。したがって免疫電気泳動 (免疫固定法)、蛋白分画、LDアイソザイム、PCR産物の増幅確認の解説・実習が主となる。実習に使用する試料は各種疾患による特徴的なパターンを網羅して実習させることが望ましいが、各種泳動法について教科書に掲載されているすべての病態をそろえるのは簡単ではない。一方卒業研究や大学院における基礎研究では、SDS-PAGEやウエスタンブロット、PCR産物の確認などが実施されている。

【まとめ】

電気泳動が診断の決め手になる疾患は多くはない。電気泳動装置を持たない検査室が増えるのは、検査室の省力化への要求に応じた結果と考えられる。しかし、電気泳動技術が正確な診断に必須な病態は間違いなく存在する。また異常反応症例や検査の不振などが出現した時に、電気泳動技術や、その知識の提供により正しい診断に貢献していくことは、検査室の本来業務であり、腕の見せ所である。大学教育においても可能な限りこのような電気泳動法の有用性を教育し、将来の“できる検査技師”の教育に力を尽くしたい。

特別講演 1

オルガノイド培養技術のがん研究への応用

筆 宝 義隆

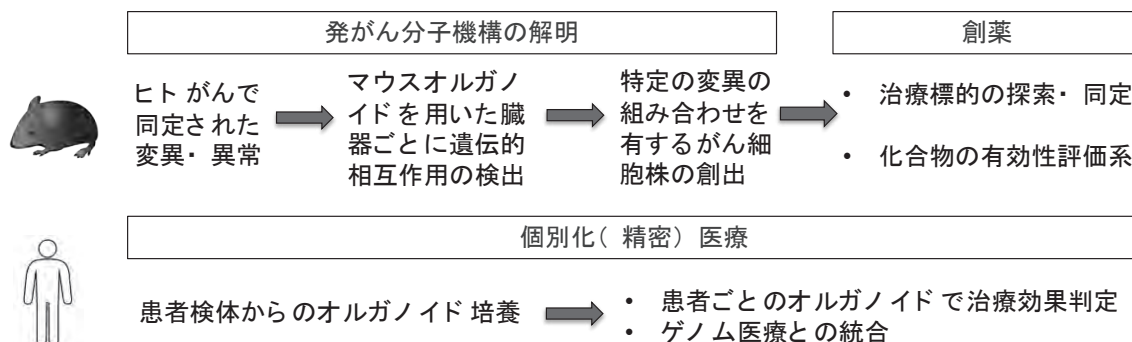
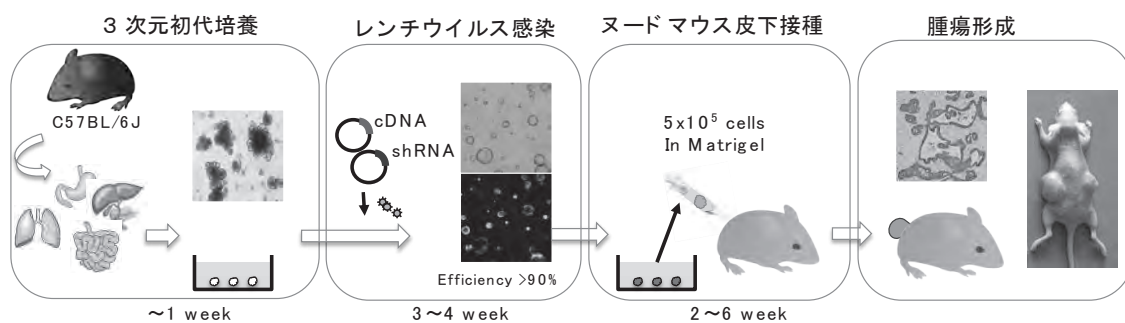
千葉県がんセンター研究所

これまでに多数のがん細胞株が手術検体などから樹立され、様々な研究分野で利用されてきました。しかし、創薬研究の前臨床モデルとして用いた場合には臨床試験での結果との乖離が大きい場合も多いことから、より生理的かつ外挿性の高いモデルへの移行が望まれています。こうした背景のもと、がん組織の免疫不全マウスへの移植によるゼノグラフト、スフェロイドによるがん幹細胞培養、あるいはオルガノイドによるがん・正常細胞培養など、他の患者由来モデルにも注目が集まっています。このうちオルガノイド培養は約 15 年前に確立された最も新しい手法であり、基底膜を模倣するマトリゲル中に幹細胞ニッチを再現することで、成体由来正常組織幹細胞の長期かつ生理的な増幅・維持を可能にしました。

同技術はその後様々な分野への応用が爆発的に進んでいますが、我々もマウス正常オルガノイドを用いた発がんモデルを複数の臓器で確立してきました。具体的には、レンチウイルスを用いた効率的な *in vitro* 遺伝子導入法を確立し、各腫瘍のがんで主要な遺伝子異常をオルガノイド中に再現した上で免疫不全マウス皮下に移植することで、多段階発がん過程が相当程度再現可能なことを確認しました。これらはいずれも少数の特定変異に依存して短期間で誘導されるがん細胞オルガノイドのため、分子標的薬のスクリーニング等での有用性が期待されます。一方で、臓器特異的な遺伝子改変マウスでの結果と乖離が生じる場合もあり、その場合は臓器の微小環境が重要な役割を果たしていることが強く示唆されます。また、遺伝子改変マウスを作成する際に、事前にどの変異の組み合わせで発がん性が高いかを調査するのにも有用です。

オルガノイド培養は基本的に無血清の培養であるために非生理的な選択圧が小さく二次的な変異の蓄積も少ないことから、元の腫瘍内あるいは腫瘍間の不均一性を保持しながら培養可能な点が大きな特長となっています。さらに、臓器様の 3 次元構築も再現していることから生理的な環境での薬理作用を模倣していることが期待されます。我々も婦人科がんや代表的な難治がんである胆道・膵臓領域のがんなど種々の患者由来オルガノイドの樹立を進めてきましたが、変異やマーカーの発現など腫瘍の元の性質が保存されていることや薬剤感受性測定が可能なことなどを確認しています。また、希少がんのオルガノイド培養に世界で初めて成功し、治療薬候補の同定につながった例もあります。

今後、がんの本態解明のみならず、創薬および精密医療においてもオルガノイドの利用が増大することが期待されることから、本講演ではオルガノイド培養技術の可能性と我々の取り組みについて紹介いたします。



特別講演 2

ケミカルメディシン：化学に基づく新たながんセラノスティクス医療の実現

浦野 泰照

東京大学大学院薬学系研究科、東京大学大学院医学系研究科

【はじめに】

蛍光イメージング技法は、生きている細胞や動物体内における各種生体応答を、リアルタイムかつ高感度に捉えることが可能であるため、現代の医学・生物学領域研究に必須の手法となっている。しかしほとんどの生理活性物質は無色透明な分子であるため、単純に通常の顕微鏡・スコープで観察しても、ターゲット生理活性分子の局在や動きを捉えることは出来ない。そこで観察対象物質と特異的に反応して、蛍光を発する様に変化する機能性物質である「蛍光プローブ」の精密開発が極めて重要となってくる。当研究グループでこれまでに、化学蛍光プローブの論理的精密設計を可能とする全く新たな分子設計法を確立し、様々な機能を有する新規蛍光プローブの開発を達成してきた。開発した蛍光プローブの中には、超解像イメージングや定量生細胞イメージングなど、これまで不可能であった観察を可能とさせる画期的なものも多くあり、実際にこれまでに数十種類が市販化され、現在では世界中の研究者が使用して、新たな研究が行われている。このような、最新化学技術の開発によって基礎生物学研究の進展を図る「chemical biology (ケミカルバイオロジー)」研究は、2000年代に入って一つの大きな科学の潮流として、全世界で極めて活発に遂行されている。

【ケミカルメディシン】

一方で、上述したリアルタイム可視化技術は、臨床技術としても極めて大きな可能性を秘めている。実際当研究グループではこれまでに、外科・内視鏡手術時にがん部位を精確に描出、摘出し、がんの取り残しによる再発を激減させることを目指し、がんが疑われる部位に散布するだけで、数分程度の迅速さでがん部位を明確に蛍光検出可能な **activatable** 型蛍光プローブを多数開発してきた。本講演では、ペプチダーゼ、グリコンダーゼなどの酵素活性を検出する蛍光プローブライブラリーの創製と、この新鮮臨床検体への適用による、新たな迅速がんイメージング蛍光プローブの開発とバイオマーカー酵素の発見について、技術の紹介とともに最新のイメージング成果を紹介する。(プローブライブラリーの活用によるバイオマーカースクリーニングのイメージを、右図に示した。)

中でも、乳がんの体外断端検査用途、食道がんの内視鏡下イメージング用途、神経膠芽腫の術中イメージング用途の蛍光プローブに関しては、外科・内視鏡臨床医、国内化学ベンチャー、体外蛍光イメージャーメーカーと協同し、ベンチャーキャピタルからの出資を得て毒性試験などの

非臨床試験を開始した。乳がん、食道がんに関しては必要な試験が完了し、PMDA との対面助言、病院倫理委員会審査を経て、前者に関しては臨床性能試験を開始し、後者に関しては内視鏡メーカーと協同して昨年 **first in human** 試験を完了した。術者が治療すべきがん部位を明確に判断し、より精確な蛍光内視鏡下手術、開腹外科手術を行う事ができる日も近いものと大いに期待している。このような最新化学技術の開発による臨床医療の発展を図る研究を、我々は「**chemical medicine** (ケミカルメディシン)」と呼び、現在も活発に遂行している。

【新たなセラノスティクス医療の実現】

さらに上記イメージング技術によって同定されたがんバイオマーカー酵素活性を活用することで、従来法とは異なる核医学イメージングやがん治療を達成する新たな **SPECT・PET** プローブ、治療薬の開発も可能となる。具体的には、バイオマーカー酵素によって構造が変化し、生細胞内に強く保持されるようになる低分子化合物の設計・開発に、当研究グループはごく最近成功し、この活用による新たながんの核医学イメージングや治療の実現に対する **POC** を得ることに成功した。本講演ではこれらに関する最新の成果も紹介し、患者毎に異なるバイオマーカー酵素活性をイメージングプローブで発見し、その活性を活用して治療を行うことで実効性のある個別化がん治療を実現する、新たなセラノスティクス医療技術としての機能性低分子プローブ・治療薬の魅力、意義をお伝えできればと考えている。

Kuriki Y, et al., *Chem Sci*, 2022, 13, 4474-4481.

イラスト：ふるやまなつみ

一般講演 1

O-1 骨巨細胞腫 2 症例の新規患者由来細胞株 (NCC-GCTB8-C1, NCC-GCTB9-C1) の樹立と電気泳動を用いた特性評価

安達 雄輝^{1,2}、野口 玲¹、大崎 珠理亜¹、小野 拓也¹、大野 裕翔¹、吉松 有紀³、吉田 朗彦⁴、川井 章⁵、横尾 英樹²、近藤 格¹

¹ 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野、² 旭川医科大学 外科学講座 肝胆膵・移植外科学分野、

³ 栃木県立がんセンター研究所 患者由来がんモデル研究分野、⁴ 国立がん研究センター 中央病院 病理診断科、

⁵ 国立がん研究センター 中央病院中央病院 骨軟部腫瘍・リハビリテーション科

骨巨細胞腫 (Giant Cell Tumor of Bone: GCTB) は、マクロファージと破骨細胞様の巨細胞を伴う腫瘍性の単核間質細胞から構成される骨原発腫瘍である。臨床上是、良性和悪性の中間の悪性度であることを意味する “Intermediate (locally aggressive, rarely metastasizing)” に分類される[1]。標準治療は外科的切除・搔爬による完全摘出であり、一般に良好な経過を辿ることが多い。しかし、局所再発を繰り返す症例や肺などへの遠隔転移をきたす症例も一部には存在し、予後不良であることが知られている。このような症例に対しては、外科治療に加えて、デノスマブやビスフォスフォネート製剤による補助化学療法を行うことが予後改善につながる可能性が示唆されているが、現時点で確立した薬物レジメンは存在しない[2]。GCTB は全骨原発腫瘍発生数の約 5% に過ぎず、非常に稀な疾患である[3]。このような希少疾患に対し、大規模な臨床試験を実施することは困難であり、最適な治療法を同定するためには基礎研究で得られる研究結果が極めて重要である。

患者由来細胞株は、前臨床研究や基礎研究の分野で広く用いられてきた。特に、患者数の限られている疾患においては、腫瘍特性を評価する上で貴重な研究材料となる。これまでに樹立された GCTB の細胞株は世界で 16 株にとどまっており、研究目的に入手が可能な数はより少ないことから、さらなる新規細胞株の樹立が期待されてきた[4]。今回、我々は GCTB の 2 症例から患者由来細胞株を樹立することに成功し、それぞれ NCC-GCTB8-C1、NCC-GCTB9-C1 と命名した。

GCTB は顕微鏡下での形態学的所見や免疫組織化学染色による所見に基づいて病理診断が下されるが、遺伝子変異の検出も診断の根拠となる。GCTB は 1 番染色体上の H3F3A 遺伝子の変異が 95% 以上の症例に生じていることが明らかとなっている。今回は電気泳動を用いた解析により、上記の遺伝子変異を同定することで、NCC-GCTB8-C1、NCC-GCTB9-C1 が確実に GCTB 由来の細胞であるということを確認した。また、細胞株としての品質を担保する上で、細胞培養中に他の患者由来の細胞が混入していないか、マイコプラズマによる汚染がないかを調べることは欠くことのできない工程である。これらの問題についても、キャピラリー電気泳動を用いた短鎖リピート (short tandem repeat: STR) 解析やアガロースゲル電気泳動を利用したマイコプラズマ検査を実施することで対応した。

NCC-GCTB8-C1, NCC-GCTB9-C1 を用いて特性評価を行った。細胞増殖アッセイ (Cell counting Kit-8) や細胞

遊走・浸潤アッセイ (xCELLigence DP system)、スフェロイド形成アッセイにより、細胞の性質を評価した。さらに、214 種の抗がん剤を用いたハイスループットな薬効試験を行うことで、GCTB の新規治療薬となりうる薬剤の同定を目指した。

結果としては、NCC-GCTB8-C1 に比べて NCC-GCTB9-C1 の方が高い細胞増殖能と浸潤能を示した。一方で、薬剤への応答性については、共通した反応が確認された。今回同定された細胞増殖抑制作用の強い薬剤は、これまでに当研究室で樹立された 7 つの GCTB 細胞株に対しても有効であることが薬効試験で明らかとなったため、新規治療薬として臨床応用が期待される。

我々は GCTB 細胞株を新たに 2 つ樹立し、電気泳動を用いた各種解析と特性評価を行った。これらの細胞株は、GCTB における前臨床研究や基礎研究を進展させるものであると考える。しかし、GCTB の臨床的な多様性を考慮すると、さらなる細胞株の樹立とそれらを用いたより詳細な研究が求められる。

【References】

1. Antonescu CR, Who, Classification of Tumours Editorial B. Soft tissue and bone tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020.
2. Basu Mallick A, Chawla SP. Giant Cell Tumor of Bone: An Update. Curr Oncol Rep. 2021 Mar 22;23(5):51. doi: 10.1007/s11912-021-01047-5. PMID: 33754215.
3. Palmerini E, Picci P, Reichardt P, Downey G. Malignancy in giant cell tumor of bone: a review of the literature. Technol Cancer Res Treat. 2019.
4. Akiyama T, Yoshimatsu Y, Noguchi R, et al. Establishment and characterization of NCC-GCTB5-C1: a novel cell line of giant cell tumor of bone. Hum Cell. 2022.

一般講演 1

O-2 ショットガン解析により同定した GPC1 の肺がん組織診断マーカーとしての有用性について

朽津 有紀^{1,3}、西原 奈菜枝²、小寺 義男⁴、田村 慶介²、今井 基貴^{1,3}、村雲 芳樹⁵、三枝 信⁵、長塩 亮^{1,3}

¹ 北里大・医療衛生・臨床検査、² 北里大・院・医療系・応用腫瘍病理、³ 北里大・医療衛生・附置研・細胞デザイン、

⁴ 北里大・理・物性物理、⁵ 北里大・医・病理

本邦において肺がんはがん部位別死亡数第1位である。また、肺がんは初期症状に乏しく、診断時にはがんが進行しており治療困難な場合が多い。そのため、安全かつ簡易的な検査でより早期の肺がんを検出できるマーカーの獲得が求められている。現在、非小細胞肺がんの腫瘍マーカーとして、CYFRA21-1 や CEA などが用いられている。しかし、これらのマーカーの多くは早期の悪性腫瘍では上昇しないため早期発見が困難である。この問題を解決するマーカーの獲得のためにこれまで多くの研究が行われているが、臨床で有用であることが示されたマーカーは少ない。本研究では肺腺がんの新たな診断マーカーの獲得を目的として、肺腺がん細胞で特異的に発現している膜タンパク質の網羅的な同定を試みた。

組織型の異なる3種の肺がん細胞（腺がん由来 A549 細胞、扁平上皮がん由来 RERF-LC-AI 細胞、小細胞がん由来 N231 細胞）に対し、細胞表面タンパク質単離キットを用いて膜タンパク質を回収し、その効率を免疫ブロット法にて確認した。その後、A549 細胞、RERF-LC-AI 細胞および N231 細胞から回収した膜 fraction は質量分析装置を用いたショットガン解析を行うことで網羅的にタンパク質を同定した。その結果、それぞれ 1100 個、1742 個、1193 個のタンパク質が同定された。このうち、3 種類の細胞すべてにおいて同定されたタンパク質は 549 個あり、A549 細胞にのみ同定されたタンパク質は 254 個、RERF-LC-AI 細胞では 630 個、N231 細胞では 214 個であった（図 1）。これらの中からマーカー候補となる膜タンパク質として Glypican1 (GPC1) を見出した。

GPC1 発現量と臨床病理学的因子との関連性を統計学的に解析するため、非小細胞肺がん患者 198 症例を対象

として免疫染色を行った。その結果、GPC1 は扁平上皮がんではほぼ全例で高発現しており、一方、腺がんでは様々な程度で発現していた。腺がん細胞における GPC1 の高発現は性別、分化度の低下および腫瘍径の増大と有意に関連していた。また、GPC1 は間質の線維芽細胞にも発現しており、特に高発現している間質に囲まれたがん細胞は膜ではなく細胞質局在を示す傾向が認められた（図 2）。これらの染色性に着目してみると、膜局在群に比して細胞質局在群では、分化度低下、腫瘍径増大、胸膜浸潤あり、血管侵襲ありと有意な相関を示した（表 1）。以上より、GPC1 は肺腺がんの新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

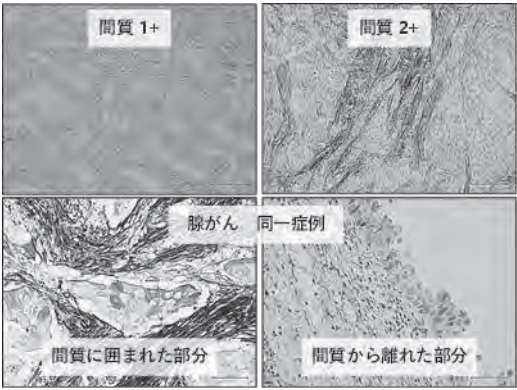


図 2. 肺腺がん組織の間質とその周囲のがん細胞における GPC1 の染色性

表 1. 肺腺がん組織における GPC1 の染色性と臨床病理学的因子との関係

臨床病理学的因子	間質<線維芽細胞>			細胞質局在		
	0, 1	2, 3	P値	あり	なし	P値
年齢 (years)						
<65	54	37	0.103	27	64	0.492
≥65	32	37		24	45	
性別						
女性	45	43	0.464	34	54	0.043
男性	41	31		17	55	
喫煙歴						
なし	40	36	0.787	21	51	0.273
あり	46	38		0	4	
分化度						
WD	58	33	0.004	13	78	<0.001
MD/PD	28	41		38	31	
腫瘍径 (cm)						
<3	58	30	0.001	19	69	0.003
≥3	27	44		31	40	
病理学的stage						
I	67	41	0.002	27	81	0.007
II III	19	33		24	28	
T因子						
1	58	26	<0.001	18	66	0.003
2-4	28	48		33	43	
N因子						
-	71	52	0.836	34	89	0.036
+	28	22		17	20	
胸膜浸潤						
-	32	26	0.426	14	44	0.222
+	8	10		7	11	
肺内転移						
-	39	33	0.340	21	51	0.326
+	1	3		0	4	
リンパ管侵襲						
-	26	17	0.451	21	51	0.328
+	9	9		0	4	
血管侵襲						
-	30	16	0.005	7	39	<0.001
+	6	15		12	9	

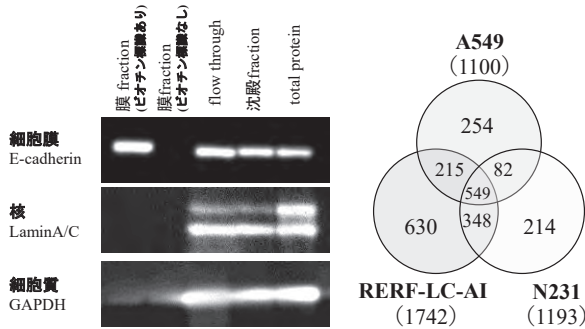


図 1. 膜タンパク質の回収効率確認（左）および各細胞株の膜 fraction から同定されたタンパク質数（右）

一般講演 1

O-3 卵巣がんの新規抗体医薬品標的タンパク質の網羅的同定

瓜生 開¹、小林 信¹、杉本 幸太郎¹、遠藤 雄大²、小林 靖幸³、田口 歩⁴、千葉 英樹¹¹ 福島県立医科大学医学部基礎病理学、² 福島県立医科大学医学部産科婦人科学、³ 福島県立医科大学医学部病理病態診断学、⁴ 愛知県がんセンター分子診断トランスレーショナルリサーチ分野

卵巣がんは最も致死率の高い婦人科がんであり、本邦においてその罹患率と粗死亡率は漸増傾向にある。自覚症状に乏しく早期診断法が確立されていないことから、約 75% が進行がんとして診断される。標準治療として外科手術と化学療法が併用されるが、半数以上の症例が再発し、再発例の 5 年生存率は約 20% に留まる。分子標的治療が実用化されて 20 年以上経過してなお、卵巣がんにおいては肺がんや乳がんにおける EGFR や HER2 のような腫瘍マーカーと治療戦略が一对一对応する理想的な分子標的が同定されておらず、他のがん種と比較して治療戦略の開発が相対的に立ち遅れている。

細胞表面タンパク質には、1) 受容体型チロシンキナーゼなど増殖や浸潤など腫瘍悪性形質を規定する種々の細胞内シグナルの最上流に位置する分子が多く含まれる、2) 薬剤の細胞膜透過性を考慮する必要がなく抗体療法などの治療標的としやすい、3) 断片が血液や組織間液に放出されることが多く血清中から検出されやすいなど、がんの診断・治療標的候補として有望な分子群が濃縮されている。この細胞表面に分布するタンパク質を網羅的に同定する研究手法はサーフェソーム解析 (Surface + ome) と呼ばれ、近年ではがんの新規診断マーカーの探索や免疫治療の標的を同定するための手法として用いられている。しかしながらタンパク質の構造解析や機械学習を用いた細胞表面タンパク質の予測が主として報告されており、実際にがん細胞表面のタンパク質を同定した報告は少ない。そこで本研究では卵巣がん細胞株の表面に発現するタンパク質を対象にサーフェソーム解析を行い、新規抗体医薬品の治療標的を同定することを目的とした。

卵巣がん細胞株 3 種 (OVCAR3, SKOV3, AMOC2) の表面に発現するタンパク質の網羅的同定を試みた。まず細胞株を生きた状態でビオチン化し、界面活性剤入りのバッファーで回収したのちアビジンビーズで濃縮した。一方、超音波破碎法で全細胞タンパク質を抽出したものをコントロールとし質量分析に供した (図 1)。その結果、全細胞画分から 2,787 個、細胞表面画分から 378 個、両者に共通して 6,302 個のタンパク質が同定できた。細胞表面画分には既知の細胞表面マーカーであるが複数含まれており、本法で細胞表面分子を濃縮できることが確認された (図 1)。またこれらの分子の中から The Cancer Genome Atlas と The Genotype-Tissue Expression データベースを用いて卵巣がん細胞株に高発現するが正常組織に発現しない分子群を抽出し、全細胞画分と細胞表面画分の比を算出することで新

規治療標的分子 40 個を選択した。Ingenuity pathway analysis の結果、これらは卵巣漿液性癌の細胞表面タンパク質シグネチャーを構成する分子群であることが分かった (図 2)。当日は、本シグネチャーに含まれる複数の分子について現在我々が進めている卵巣がん外科組織を用いた臨床病理学的検討とゲノム編集による分子機能解析を中心に発表する。

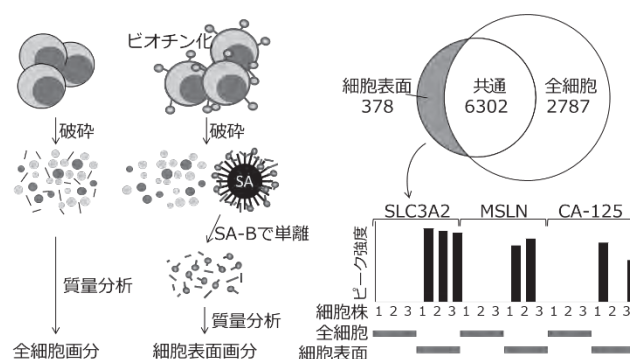


図 1. 卵巣がん細胞株 3 種から全細胞画分と細胞表面画分を抽出し、それぞれ質量分析した (左)。378 分子が細胞表面画分に偏在して分布しており (右上)、その中には既知の細胞表面マーカーが含まれていた (右下)。

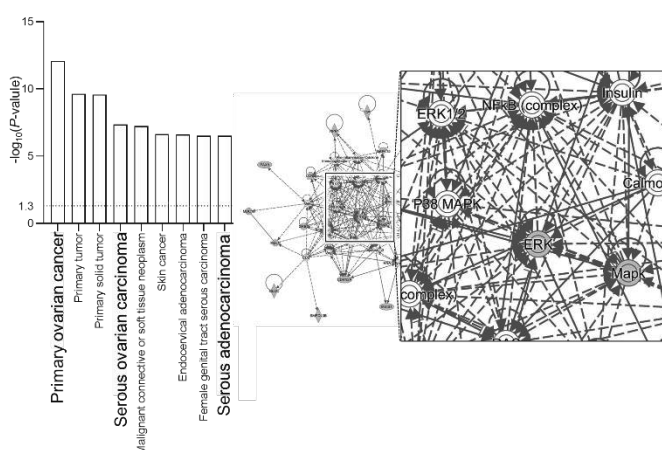


図 2. 選択した卵巣癌細胞の表面に発現するタンパク質群は有意に卵巣漿液性癌との相関を示し (左)、MAPK・ERK 等の癌増悪を正に制御するシグナルとの関連が最も強かった (右)。

O-4 繊維肉腫様の隆起性皮膚線維肉腫の治療法開発に向けての患者由来細胞株を用いた研究

小野 拓也^{1,2}、野口 玲¹、大崎 珠理亜¹、安達 雄輝¹、大野 裕翔¹、吉松 有紀³、吉田 朗彦⁴、川井 章⁵、近藤 格¹

¹ 国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野、² 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医療科学専攻、

³ 栃木県立がんセンター研究所 患者由来がんモデル研究分野、⁴ 国立がん研究センター 中央病院 病理診断科、

⁵ 国立がん研究センター 中央病院中央病院 骨軟部腫瘍・リハビリテーション科

隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP) は「花むしろ状の細胞形態および COL1A1-PDGFB の融合遺伝子を有し、皮下に発生する局所進行性の線維芽細胞様の悪性腫瘍」とされる[1]。日本での DFSP の罹患数は人口 10 万人あたり年間 0.5 人である。DFSP は中間悪性腫瘍に分類され、転移をすることは非常に稀である。しかし、全 DFSP 症例の 5-10% が線維肉腫様の Fibrosarcomatous DFSP となり、局所再発や遠隔転移する[2]。DFSP の治療は外科的切除が一般的であるが、切除不能や再発転移性の DFSP 患者に対しては imatinib が有効である[3]。一方で、Fibrosarcomatous DFSP には imatinib が奏効しないことが DFSP 治療の課題である[4]。したがって、Fibrosarcomatous DFSP にも奏効する治療法が必要である。

抗がん剤の有効性を評価するツールとして患者由来細胞株が用いられてきた[5]。DFSP の治療法を探索する際も細胞株は役立つことが考えられる。しかし、希少がんである肉腫の細胞株は非常に少なく、DFSP も例外ではない[6]。細胞株データベース Cellosaurus には DFSP の細胞株は 7 株登録されている。しかし、7 株のうち 4 株はその入手先情報が記載されておらず、公的バイオバンクから入手可能な DFSP 細胞株は 3 株のみである。加えて、その株が DFSP 患者由来であるのか、Fibrosarcomatous DFSP 患者由来であるのかは明記されていない[7]。Fibrosarcomatous DFSP の治療法を探索したい場合、このような情報不足の株は使いづらい株と言える。このように適切な細胞株が不足することで、研究者は細胞株を使った薬剤スクリーニングができず、奏効薬を絞り込むことができない。そこで本研究では、①DFSP の新規細胞株の樹立、②Fibrosarcomatous DFSP に奏効する薬剤を見出す、という 2 点を目的に進めた。

当研究室ではこれまで 19 症例から DFSP 細胞株の樹立を試み、5 株の樹立に成功した。3 症例は局所進行性の DFSP で術後の再発はなく予後良好であった。2 症例は Fibrosarcomatous DFSP で、このうち 1 症例では術後肺転移がみられた。DFSP に特有の融合遺伝子 COL1A1-PDGFB が樹立した細胞に含まれているかを電気泳動を用いて確認した。5 細胞株とも融合遺伝子を確認できたため、DFSP を 3 株、Fibrosarcomatous DFSP を 2 株樹立することに成功したと判断した。また、樹立した細胞株がマイコプラズマ陽性であるか否かも電気泳動を用いて調べ、5 細胞株すべてが陰性であることを確認した。次に 5 つの DFSP 細胞株を用いて 200 剤以上もの薬剤をスクリーニングし、DFSP への適応拡大が期待できる薬剤探索を行った。スク

リーニングの結果、DFSP の標準治療薬である imatinib[3] や肉腫治療で広く使われる doxorubicin[8] は 5 細胞株ともに薬剤曝露後の生存率が高いままであったのに対し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である romidepsin[9] およびプロテアソーム阻害剤である bortezomib[10] が特に高い増殖阻害効果を示した。よって、本研究により DFSP の新規細胞株の樹立に成功、細胞株を用いて Fibrosarcomatous DFSP に奏効する薬剤を見出すことに成功した。

参考文献

1. Antonescu CR, Who, Classification of Tumours Editorial B. Soft tissue and bone tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020. International Agency for Research on Cancer, 2020.
2. Li Y, et al. Clinicopathological features of fibrosarcomatous dermatofibrosarcoma protuberans and the construction of a back-propagation neural network recognition model. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2021; 16:48.
3. Labropoulos SV, et al. Imatinib in the treatment of dermatofibrosarcoma protuberans. Biologics. 2007; 1:347-353.
4. McArthur GA, et al. Molecular and Clinical Analysis of Locally Advanced Dermatofibrosarcoma Protuberans Treated With Imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. 2005; 23:866-873.
5. Wilding JL, et al. Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. Cancer Research. 2014; 74:2377-2384.
6. Hattori E, et al. Systematic Review of the Current Status of Human Sarcoma Cell Lines. Cells. 2019; 8.
7. Bairoch A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. J Biomol Tech. 2018; 29:25-38.
8. Judson I, et al. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014; 15:415-423.
9. Petrich A, et al. Use of class I histone deacetylase inhibitor romidepsin in combination regimens. Leuk Lymphoma. 2016; 57:1755-1765.
10. Adams J, et al. Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib). Cancer Investigation. 2004; 22:304-311.

一般講演 1

O-5 質量分析によるウイルスの迅速同定とデータベースの構築

梶原 英之、村上 理都子、久保田 健嗣、渡邊 聡子

農業・食品産業技術総合研究開発機構（農研機構）

ヒト感染症菌については、マトリックス支援飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF MS)を用いた臨床検査が実用化された。しかし、ウイルスについては行われていない。幾つかの要因があるが、その一つにウイルスを構成するコートタンパク質(CP)の分子量が大きいことがあげられる。一般に CP は 15,000 以上の質量を持ち、イオン化しにくいが多かった。そこで、CP をギ酸によって断片化し、イオン化を容易にした。また、ウイルスの精製には超遠心法その他、簡易法としてポリエチレングリコール(PEG)が使用される。これは精製後も残留することが多い。遺伝子解析では問題とならないが、PEG もペプチドと同時にイオン化し、解析を困難にした。この PEG を同時に分解させ、その影響を低減させることに成功した。また、マッチング検索のためのデータベースを作成したので合わせて報告する。

超遠心または PEG を用いて精製した動物、植物、および昆虫ウイルスを使用した。ウイルスは 98℃30 分間のギ酸処理によって断片化した。得られたペプチドはそのままニアポジティブモード m/z 800-20,000 の範囲で MALDI-TOF MS (autoflex II および microflex、ブルカダルトニクス社) によって測定した。得られた質量スペクトルは FlexAnalysis によって解析し、MALDI biotyper によってデータベース化した。

ウイルスをそのまま分析すると、一部のウイルスについては CP に由来すると思われるピークを検出できたが、多くは測定範囲内であるにも関わらず、ゲノム情報から予想されるところにピークは検出できなかった (図 1A)。

しかし、2.5%ギ酸処理によって CP を部分的に断片化することで、これらのピークが検出された (図 1B)。これはアナライトの質量が小さくなることでイオン化が容易になったためと考えられた。また、マイクロ波処理でも同様に断片化された (図 1C)。

ウイルス粒子を精製する方法として、超遠心を用いる方法と PEG を利用して通常の遠心機を用いる方法がある。前者はより純度の高いウイルス粒子を得ることができるが、時間がかかる。後者は簡便で、残留する PEG は分子生物学的な実験については阻害要因とはならないことが多い。しかし、今回用いたマトリックス α -シアノヒドロキシけい皮酸では、ウイルス粒子とともに PEG も連続的なピークとして検出された (図 2A)。ギ酸処理は CP を断片化させるとともに、PEG も分解し、それらのピーク高が低減することがわかった (図 2BC)。

植物ウイルスだけでなく、昆虫ウイルスおよび動物ウイ

ルスについても断片化でき、それに基づくピークを検出することができた (図 3)。各ウイルスから得られた質量スペクトルは MALDI biotyper を用いてデータベース化した。微生物同定用に使われるデフォルトのパラメータでは、残留した PEG によるピークのためにうまくマッチング解析できなかった。しかし、検索用パラメータをウイルス解析に合わせて変更すると、同定することができた。

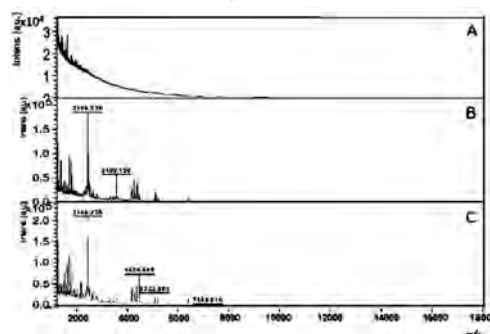


図 1、Rehmannia mosaic virus の分析。(A)ウイルスをそのまま分析。(B)加熱処理。(C)マイクロ波処理。

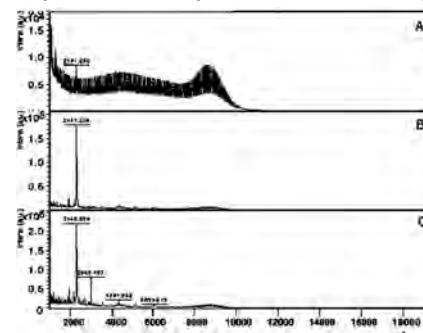


図 2、Paprika mild mottle virus の分析。(A)ウイルスをそのまま分析。(B)加熱処理。(C)マイクロ波処理。

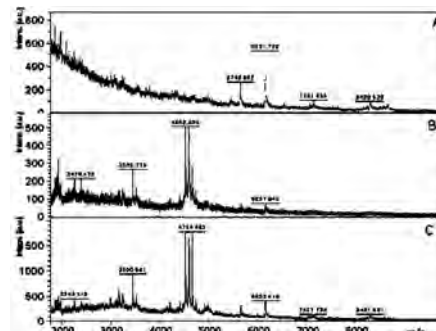


図 3、Newcastle disease virus の分析。(A)ウイルスをそのまま分析。(B)加熱処理。(C)マイクロ波処理。

O-6 MPO-ANCA 陽性 ANCA 関連血管炎患者由来好中球ミエロペルオキシダーゼにおける翻訳後修飾の網羅的解析

黒川 真奈絵¹、佐藤 政秋²、永井 宏平³、佐藤 利行²、土屋 貴大²、表山 和樹²、有戸 光美²、末松 直也²、加藤 智啓²

¹ 聖マリアンナ医科大学大学院 疾患バイオマーカー・標的分子制御学、

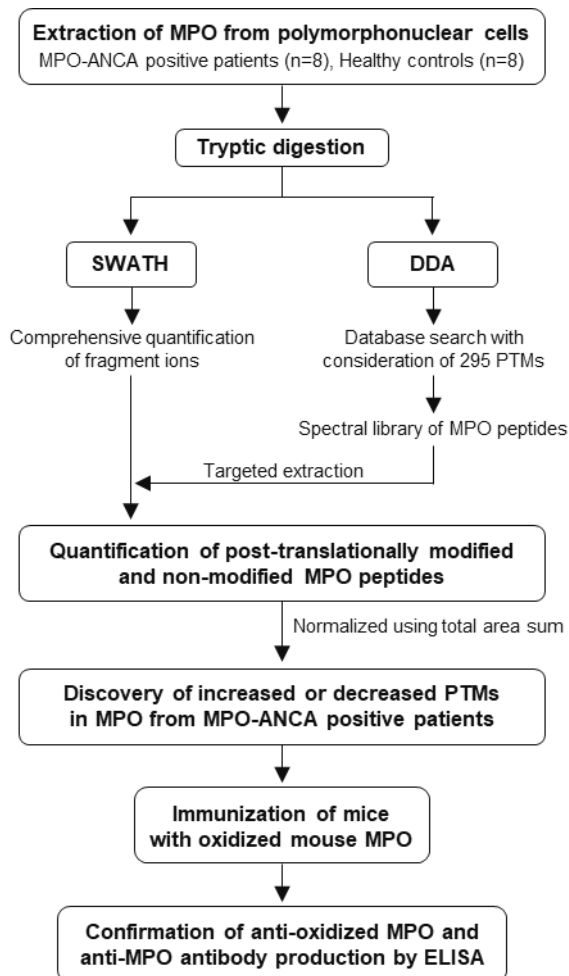
² 聖マリアンナ医科大学大学院 疾患プロテオーム・分子病態治療学、³ 近畿大学 生物理工学部遺伝子工学科

〔目的〕 好中球ミエロペルオキシダーゼを抗原とする抗好中球細胞質抗体(MPO-ANCA)の産生機序には不明な部分が残る。MPO-ANCA 陽性者では MPO に抗原性を形成する翻訳後修飾(PTM)の異常が起きているという仮説の下、本研究を遂行した。

〔方法〕 MPO-ANCA 陽性の ANCA 関連血管炎患者 8 例及び健常者 8 例の末梢血好中球より con A にて抽出した MPO をトリプシン消化後、nanoLC-MS を用いて MS/MS スペクトルを網羅的に取得した。PTM を含むデータベース検索を行い、MPO ペプチドを網羅的に定量した。

〔結果〕 38 種類の MPO 由来ペプチドが MPO-ANCA 陽性群で健常群と比較し増加しており($p<0.05$)、そのうち 9 種類には Met、Phe、Trp への酸化修飾が含まれていた。逆に 10 種類のペプチドが MPO-ANCA 陽性群で減少しており($p<0.05$)、そのうち 4 種類には糖鎖修飾が含まれていた。試験管内で過酸化水素処理した MPO(酸化 MPO)でマウスを免疫し、得られた血漿を一次抗体とした ELISA を行ったところ、酸化 MPO だけでなく未処理の MPO とも反応が見られた。未処理 MPO 免疫マウスから得られた血漿では、酸化 MPO 及び未処理 MPO との明らかな反応は見られなかった($p<0.05$)。

〔結論〕 MPO-ANCA 陽性者由来 MPO の PTM プロファイルは健常者由来 MPO のものと異なっており、酸化修飾を含む PTM の変化が MPO-ANCA 産生を惹起している可能性が示唆された。



O-7 ゲル中のタンパク質の高感度検出を目指した試み

小寺 義男^{1,2}、龍門 代里子¹、奥田 悠世¹、須藤 愛莉咲¹、松井 崇^{1,2}

¹北里大学理学部生命物理学研究室、²北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンター

生命活動において重要な役割を担っているタンパク質の機能は、翻訳語修飾や切断によって制御されている。しかし、現在のプロテオミクスのほぼ全ての研究で用いられているショットガンプロテオミクスでは、試料中のタンパク質を最初の段階で酵素消化し、そのペプチド混合物を LC-MS/MS 分析する。このため、生体内でのタンパク質の存在様式、特にタンパク質の切断状態に関する情報を得ることは困難である。これに対して、タンパク質の切断情報を解析する方法として、試料中のタンパク質を電気泳動で分離後にゲルを短冊状に切り出して酵素消化し、質量分析する One-dimensional SDS-PAGE followed by LC-MS/MS (GeLC-MS/MS 法¹⁾) が提案された。この方法は複雑な試料中のそれぞれのタンパク質の切断状態を解析する理にかなった方法である。しかし、従来のゲル内消化法は消化に伴うペプチドの損失が溶液中での酵素消化に比べて大きく、全アミノ酸中の検出されるペプチド数(カバレッジ)も少なくなる傾向にある。このため、タンパク質の切断状態を詳細に解析することが困難な場合がある。そこで、我々はゲル内消化法の高効率化と質量分析の高感度化によって、カバレッジを上げることを試みた。

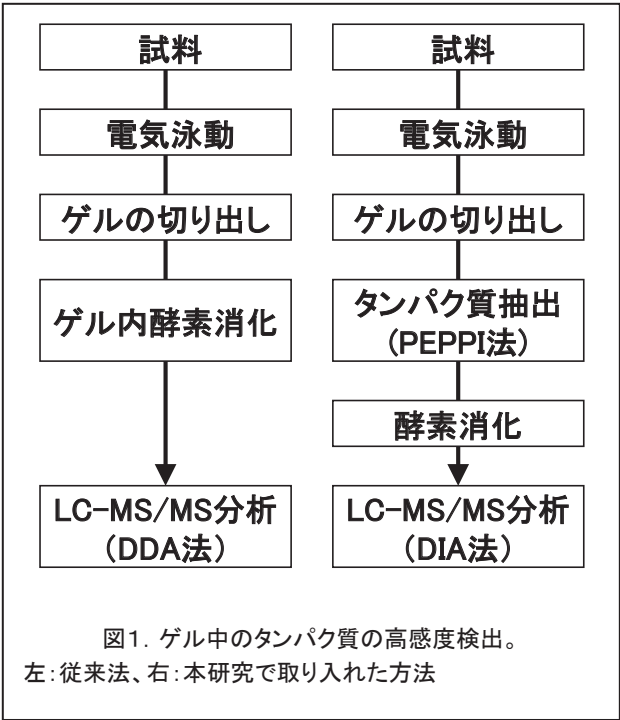
ゲル内消化においては電気泳動後にゲルを有機溶媒で処理することなく染色し、ゲルからタンパク質を酵素消化前に効率よく抽出する Passively Eluting Proteins from Polyacrylamide gels as Intact species for MS 法(PEPPI 法²⁾)と溶液中での酵素消化を組み合わせた方法を導入した。また、LC-MS/MS 分析では、従来の DDA (Data Dependent Acquisition) に代えて高感度検出が可能な DIA (Data Independent Acquisition) を導入した。その結果、MS スペクトルの強度も同定されたペプチド数も従来のゲル内消化法に比べて向上した。

発表では、PEPPI 法と DIA ならびに両方を組み合わせた分析の基礎的検討結果について報告する。

参考文献

1) E. Gokce, C. M. Shuford, W. L. Frank, R. A. Dean, D. C. Muddiman, Evaluation of normalization methods on GeLC-MS/MS label-free spectral counting data to correct for variation during proteomic workflows, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**: 2199-2208, 2011.

2) Takemori A, Butcher DS, Harman VM, Brownridge P, Shima K, Higo D, Ishizaki J, Hasegawa H, Suzuki J, Yamashita M, Loo JA, Loo RRO, Beynon RJ, Anderson LC, Takemori N. PEPPI-MS: Polyacrylamide-Gel-Based Prefractionation for Analysis of Intact Proteoforms and Protein Complexes by Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* **19**:3779-3791, 2020.



一般講演 2

O-8 Tandem Mass Tag を用いたタンデム質量分析法による膵臓癌の新規診断マーカーの解析

佐久間 佳乃¹、高野 重紹²、小寺 義男³、大塚 将之²、曾川 一幸¹

¹ 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室、² 千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学、

³ 北里大学理学部物理学学科物性物理学講座

【目的】

膵臓癌は様々な悪性腫瘍の中でも予後不良の癌である。膵管腺癌（PDAC）は、すべての膵臓腫瘍の 85～90%を占めている。すべての PDAC 患者の生存期間の中央値は 6 か月未満であり、最近の 5 年生存率は約 10%である。予後不良である最も重要な理由の 1 つに、PDAC の早期診断マーカーの不足が挙げられる。これを改善するには、高感度で特異的なマーカーを特定することが急務となる。現在広く使用されている炭水化物腫瘍関連抗原 19-9（CA19-9）および癌胎児性抗原（CEA）の血清循環マーカーは、初期診断マーカーとして使用するには十分に正確でない。

【方法・対象】

ヒト PDAC 細胞株（MIA PaCa-2、PANC-1、および BxPC-3）から得られた培養培地を用い、Tandem Mass Tag を用いたタンデム質量分析法（TMT 法）により細胞分泌タンパク質を比較分析し、新たな腫瘍マーカー候補タンパク質の探索を行った。候補タンパク質は、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）を用いて、健常者 20 名、慢性膵炎患者 10 名、膵臓癌患者 20 名の術前後の血清検体を用いて測定し検証した。

【結果】

TMT 法により細胞分泌タンパク質を比較分析し、ヒト PDAC 細胞株 3 株すべてに発現している分泌タンパク質は 13 種類検出された。文献検索を行い、膵臓癌との関連性が報告されていない分泌蛋白質として、Protein X を検出した。血清フコシル化 Protein X 濃度は、健常者で 50.5 ± 6.0 ng/mL、慢性膵炎患者で 53.9 ± 5.1 ng/mL、膵臓癌患者で 61.6 ± 7.6 ng/mL であり、膵臓癌患者は健常者及び慢性膵炎患者に比べ、 $p < 0.01$ と有意に高値を示した。また、膵臓癌患者 20 名において、術前血清検体は術後血清検体に比べ、 $p < 0.01$ と有意に高値を示した。

【結語】

血清フコシル化 Protein X は、新規膵臓癌診断マーカーとして有用であることが示唆された。今後、検体数を増やして臨床応用可能かどうか検証していく予定である。

一般講演 2

O-9 いくらアレルギーにおける新規アレルゲンの探索・同定

中野 月穂¹、藤田 雄治²、宮本 学²、小寺 義男³、吉原 重美²、曾川 一幸¹¹ 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室、² 獨協医科大学医学部小児科学、³ 北里大学理学部物理学科物性物理学講座

【目的】

魚卵アレルギーは食物アレルギーの中で、食生活の広がる幼児期以降で主要な原因のひとつであり、1歳児で7%、2.3歳児で5%を占めている。さらに、いくらアレルギーは近年、消費拡大に伴って増加しており、アナフィラキシーショックを呈する頻度は全食物アレルギーの中でも高いと報告されている。従って、いくらアレルギーに関して新たな知見を得ることにより、今後の食物アレルギーの治療に役立てることは重要である。今回、いくらアレルギーに着目し、新規アレルゲンの検索・同定および鱈、飛魚、柳葉魚の魚卵との交差反応の解析を行った。

【方法・対象】

獨協医科大学病院小児科に受診したいくらアレルギー患者9名、大豆アレルギー患者1名の血清検体を用いた。すべての患者から同意を得た上で行った。0.1gのいくらと500 μ Lのサンプルバッファーを混合し、21130gで遠心後、上清をタンパク質抽出液とした。一次抗体はブロッキングバッファーで20倍希釈したいくらアレルギー患者血清、二次抗体はMouse Anti human IgE抗体、三次抗体はMouse Immnoglobulins/HRPを用い、検出はLight-Capture II (Cooled CCD Camera System)を用いた。ウェスタンブロット法で検出したタンパク質はSDS-PAGE後CCB染色を行い、バンドを切り出し、トリプシン消化後、LC-MS/MSにより同定した。

【結果】

ウェスタンブロット法にてアレルギー患者9名で4バンドが検出され、Vitellogenin及びVitellogeninの分解産物が同定された。Vitellogeninの分解産物は鱈、柳葉魚の魚卵からも検出され、交差反応を確認した。

【結語】

いくらアレルギーのアレルゲンタンパク質はVitellogenin及びVitellogeninの分解産物である。今後、Vitellogeninのエピトープ解析を行う予定である。

一般講演 2

O-10 グライコミクス解析による新規飲酒マーカーの探索と検証

増田 心¹、小寺 義男²、瀧澤 弘隆³、野村 文夫⁴、曾川 一幸¹

¹ 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室、² 北里大学理学部物理学科物性物理学講座、

³ 財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニック、⁴ 千葉大学医学部附属病院遺伝子診療部

【目的】

アルコール摂取の継続は脂肪肝に始まり、肝炎、肝線維症へと移行し、最終的には肝硬変、肝臓癌を引き起こす。アルコール性肝障害の診療の第一歩は正確な飲酒歴を知ることであり、個人の飲酒習慣の実態が反映される客観的なマーカーが必要である。 γ -GT がよく知られているが、アルコール以外の要因、たとえば肥満に伴う非アルコール性脂肪肝などでも高率に上昇する。また、過度の習慣飲酒でも γ -GT が上昇しない non-responder も存在する。欧米では飲酒の診断マーカーとして糖鎖欠損トランスフェリン/トランスフェリン (%CDT) 値が用いられている。2016 年 7 月にわが国においても体外診断用医薬品として認可された。本試薬を用いた検討では日本酒換算で毎日 3 合以上の飲酒を継続している健診受診成人男性の 61% が異常高値を示したが、感度の面ではまだ十分とはいえない。飲酒量を正確に把握する新規マーカーが必要である。

能かどうか検証していく予定である。

【方法・対象】

断酒目的で入院したアルコール性肝硬変患者計 2 名の入院時、断酒後 2 週間、断酒後 8 週間の血清検体を用いた。グライコプロテオミクス解析は患者血清から AAL (Aleuria aurantia Lectin) がコートされたマグネットビーズを用い、糖タンパク質を抽出した。各サンプルを安定同位体標識試薬 TMT (Tandem Mass Tag) で標識し、糖タンパク質を比較分析し、新たな飲酒マーカー候補タンパク質の探索を行った。その候補タンパク質は、Lectin Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Lectin ELISA) を用いて、非飲酒者 30 名、日本酒換算で毎日 1-2 合の飲酒者 30 名、日本酒換算で毎日 3 合以上の飲酒者 30 名の血清検体を用いて測定し検証した。

【結果】

TMT で標識した糖タンパク質を比較分析し、入院時より断酒後 8 週間で 3 倍以上増えていたものが 3 種類検出された。特に 3.6 倍の違いがある Protein X に注目した。血清フコシル化 Protein X 濃度は非飲酒者 0.17 ± 0.07 AU/mL、日本酒換算で毎日 1-2 合の飲酒者 0.08 ± 0.01 AU/mL、日本酒換算で毎日 3 合以上の飲酒者 0.04 ± 0.00 AU/mL であり、3 群間で $p < 0.001$ と有意に違いを示した。

【結語】

フコシル化 Protein X は、飲酒マーカーとして有用であることが示唆された。今後、検体数を増やして臨床応用可

一般講演 2

O-11 Tandem Mass Tag を用いたタンデム質量分析法による胆管癌の新規診断マーカーの解析

水口 海希¹、高野 重紹²、小寺 義男³、大塚 将之²、曾川 一幸¹¹ 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室、² 千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学、³ 北里大学理学部物理学科物性物理学講座

【目的】

胆管癌は様々な悪性腫瘍の中でも予後不良の癌である。その主な理由として早期発見が困難なことから切除率が低く、有効な補助療法が確立されていない事が挙げられる。従って、胆管癌を早期に発見・診断し外科的切除および分子標的治療薬を含む化学療法等での集学的治療をいち早く行うことにより治療成績の向上を図ることが急務である。また、膵頭部癌と遠位胆管癌は膵頭部領域に発生し、さらに病理組織学的にも類似していることから両疾患の鑑別は困難な場合がある。膵臓癌と胆管癌では手術や化学療法が異なるため、鑑別することができる新規バイオマーカーが必要であると考えられた。

【方法・対象】

グライコプロテオミクス解析はヒト胆管癌細胞株 (HuCC-1、HuH-28、および TKKK-1) から SSA (Sambucus Sieboldiana Lectin) アガロースを用い、糖タンパク質を抽出した。各サンプルを安定同位体標識試薬 TMT (Tandem Mass Tag) で標識し、糖タンパク質を比較分析し、新たな腫瘍マーカー候補タンパク質の探索を行った。候補タンパク質は、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を用いて、健常者 18 名、胆管炎患者 10 名、胆管癌患者 26 名、膵臓癌患者 5 名の血清検体を用いて測定し検証した。

【結果】

TMT 法により細胞分泌糖タンパク質を比較分析し、ヒト胆管癌細胞株 3 株すべてに発現している分泌糖タンパク質は 141 種類検出された。文献検索を行い、肝管癌との関連性が報告されていない分泌糖タンパク質として、Protein X を検出した。胆管癌患者血清から免疫沈降法により Protein X を抽出し、糖鎖解析を行い、シアル酸が付加していることを確認した。血清シアル酸化 Protein X 濃度は健常者 0.69 ± 0.03 AU/ μ L、胆管炎患者 0.63 ± 0.14 AU/ μ L、胆管癌患者 0.83 ± 0.06 AU/ μ L、膵臓癌患者 0.65 ± 0.07 AU/ μ L であり、胆管癌患者は健常者及び胆管炎患者に比べ $p < 0.01$ と有意に高値を示した。また、胆管癌患者は膵臓癌患者に比べ $p < 0.01$ と有意に高値を示した。

【結語】

血清シアル酸化 Protein X は、新規胆管癌診断マーカーとして有用であることが示唆された。今後、検体数を増やして臨床応用可能かどうか検証していく予定である。

O-12 低濃度 SDS 抽出液を用いた SDS-PAGE によるタンパク質アグリゲートの解析

大石 正道、桐山 諒太、根岸 茉由、津田 輝幸、吉永 隼也

北里大学理学部物理学科固体物理学講座

タンパク質解析における電気泳動の主な役割はタンパク質の分離と精製である。従来はできるだけ多くのタンパク質を網羅的に解析するため、タンパク質を変性させ可溶化することが必然だった。タンパク質の機能性を考慮することなく、タンパク質のアミノ酸配列や翻訳後修飾構造だけを維持することが優先された。しかし、タンパク質は本来、立体構造を保ち、他のタンパク質や DNA などの生体分子と複合体を形成し、他の分子と相互作用することで初めて生体内で機能を発揮できる。

我々は、界面活性剤 SDS がタンパク質の立体構造を壊し、アレルゲンの抗原性を失わせるばかりか、加熱変性したタンパク質を未変性のタンパク質と区別できないことを示してきた¹⁾。そこで、タンパク質のアグリゲートを壊さずに解析し、タンパク質の加熱変性によるアグリゲート形成を調べる手法を開発した。具体的には、タンパク質抽出液中に含まれる SDS 濃度を 0%~0.1% に抑え、生体試料からタンパク質を抽出後、低速遠心でタンパク質のアグリゲートを沈殿除去した後、その上清を SDS-PAGE や二次元電気泳動で解析する方法である。この方法を使えば、筋肉や大豆などの加熱変性や、アレルゲンの加熱変性に伴う抗原性の低下などを調べることができる。特にアレルゲンの抗原性については、ドットプロット法とウェスタンブロッティングの結果を比較することで、SDS がどれだけ抗原性を失わせたか確認することができる²⁾。

今回、我々はこの方法を使って、さまざまな二価金属イオンが大豆タンパク質のアグリゲート形成に関与するかを解析したので、本大会で報告する。

生体内において、二価金属イオンは酵素の補酵素として機能したり、タンパク質の立体構造維持に役立ったりするなど不可欠であるにも拘わらず、重金属のように生体機能に悪影響を及ぼすこともある。生体内に存在する金属イオンの量は生物ごとにほぼ決まっていて、大豆の場合、100g 中に数 mg しか存在しない Fe, Mn, Cu のような金属 (A グループ) と、数百 mg 存在する Mg や Ca のような金属 (B グループ) がある。A と B の違いが何によるものかを確認するために、低濃度 SDS 抽出法と低速遠心、SDS-PAGE とを組み合わせで解析を行った。

硫酸鉄では大豆ホモジネートに添加量が 0.5mM を越えると、SDS-PAGE のバンドが急激に薄くなった。一方、塩化カルシウムでは 0.5mM を越えると少しバンドが薄くなったが、添加量を増加させても徐々に薄くなるだけで急激に薄くなることはなかった (図 1)。

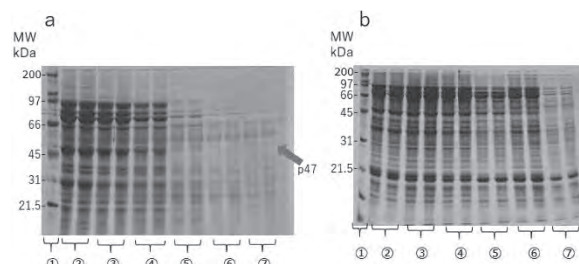


図1 硫酸鉄添加(a)と塩化カルシウム添加(b)時における大豆タンパク質可溶成分の SDS-PAGE
p47:ImageJ で測定したバンド

①: 分子量マーカー ②: 金属イオン添加なし ③: 0.1mM添加
④: 0.3mM添加 ⑤: 0.5mM添加 ⑥: 0.7mM添加 ⑦: 1.0mM添加

さらに特筆すべきは、硫酸銅を大豆ホモジネートに添加した場合、1.0mM 添加した場合 p21 のバンドが上清に増加したことである (図 2)。

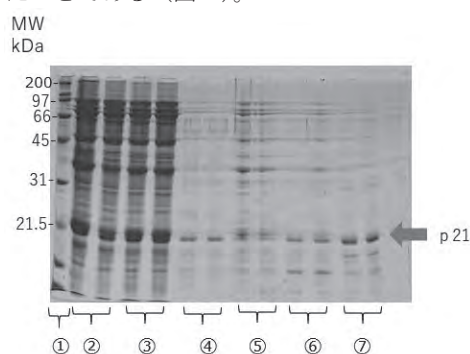


図2 硫酸銅添加時における大豆タンパク質可溶成分の SDS-PAGE

①: 分子量マーカー ②: 金属イオン添加なし ③: 0.1mM添加
④: 0.3mM添加 ⑤: 0.5mM添加 ⑥: 0.7mM添加 ⑦: 1.0mM添加

以上のことから、低濃度 SDS 抽出液を用いて、さまざまな金属イオンと大豆タンパク質のアグリゲート形成を調べることができ、p21 のように金属イオンと相互作用して可溶化するタンパク質を調べる新たな手法を開発することができた。

文献

- 1) 大石正道, 渡邊沙巴羅, 松本開夢: 低濃度 SDS 抽出液を用いた SDS-PAGE によるタンパク質加熱変性過程の解析 電気泳動 2022; 66:59-62.
- 2) 大石正道, 内野滯旺, 石嘉儀: 低濃度 SDS 抽出液を用いた甲殻類アレルゲンの解析 電気泳動 2023;67: (印刷中)

一般講演 3

O-13 CIC-rearranged sarcoma の治療法の開発に向けての 3 つのアプローチ：
網羅的キナーゼ活性解析、抗がん剤ライブラリーのスクリーニング、
融合遺伝子産物の複合体解析

大崎 珠理亜、野口 玲、近藤 格

国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

CIC-rearranged sarcoma は、CIC 遺伝子と関連遺伝子の融合により発生する悪性度の高い希少な肉腫である。CIC 遺伝子というのは染色体 19q13.1 にある転写抑制因子である。ETV1、4、5 の発現を抑制し、受容体チロシンキナーゼシグナル伝達経路を制御している。CIC-rearranged sarcoma の 95% の症例において、関連遺伝子は DUX4 遺伝子である。DUX4 遺伝子は 4q35 または染色体 10q26.3 のいずれかにあるダブルホメオボックス転写因子である。通常ヒトの胚で一時的に発現し、以後はサイレンシングされる遺伝子である。CIC-DUX4 は転写活性因子として機能し、発がんに寄与している (PMID: 32788348)。CIC-rearranged sarcoma は化学放射線療法に強い抵抗性を示し、根治的な治療法は外科的切除しかない。肺への高頻度な遠隔転移を認め、5 年生存率は 17-43% と極めて予後不良であり、新規治療法の開発が求められている。

患者由来がんモデルは、発がんやがんの進展機序の解明、新しい治療法の開発に必要不可欠である。研究に必要な患者由来がんモデルを入手出来ないことが CIC-rearranged sarcoma の治療法の開発を滞らせていた。我々は、CIC-DUX4 融合遺伝子を有する CIC-rearranged sarcoma の腫瘍組織、ゼノグラフトを用いて、3 種類の細胞株 (NCC-CDS1-X1-C1, NCC-CDS1-X3-C1, NCC-CDS2-C1) の樹立に世界で初めて成功した (PMID: 28680140, 31898195)。ゼノグラフト腫瘍組織から樹立した細胞株を用いて、チロシンキナーゼの基質ペプチドアレイを行い、手術検体と類似したキナーゼ活性を有すことを確認した。これらの患者由来がんモデルは CIC-rearranged sarcoma の治療法の開発に貢献してきた。Okimoto らは CCNE-CDK2 複合体が治療標的となり得ること、および ETV4 の抑制が肺転移を減少させることを示した (PMID: 31329165)。Ponce らは WEE1 が治療標的となることを示唆した (PMID: 35315355)。また、Carrabotta らは AKT/mTOR 二重阻害剤とトラベクテジンの組み合わせが有効であることを示した (PMID: 34903601)。しかし、これまでの研究で同定されてきた治療標的の阻害剤で臨床応用されたものは未だない。

そこで、我々は複数症例に由来する患者由来がんモデルを用いて①網羅的キナーゼ活性解析を行い、治療標的となるチロシンキナーゼを同定する、②既存の抗がん剤の増殖抑制効果をスクリーニングし、適用拡大可能なものを同定する、③融合遺伝子産物の形成するタンパク質複合体の構成成分から治療標的を同定する、という 3 つのアプローチで治療法の開発をすることとした。①、②は既存の抗がん剤から CIC-rearranged sarcoma に有効な薬剤を同定する方

法で、新規治療薬の開発に比べ短時間で治療法の開発が出来るという点で優れている。さらに、抗がん剤として使用される分子標的薬は、チロシンキナーゼを標的としたものが多いため、網羅的なキナーゼ活性解析により治療法が開発できる可能性が高い。しかし、①、②で同定される既存の抗がん剤は、腫瘍特異的に奏功するものではないため、副作用が生じる可能性がある。

一方で、③のアプローチは新しい抗がん剤を開発する方法である。①、②と比較し治療法の開発に時間と費用がかかるのが欠点である。しかし、腫瘍細胞に特異的なタンパク質の機能を標的とするため、副作用の少ない治療法の開発が可能である。融合遺伝子は腫瘍に特異性が高く、融合遺伝子産物は酵素または転写因子として腫瘍内では機能する。融合遺伝子産物が酵素として機能する場合、抗がん剤の治療標的としやすい。例えば、慢性骨髄性白血病や一部の肺がんでは、その発生原因となる融合遺伝子産物を治療標的とした抗がん剤が開発され臨床的に使用されている。一方で融合遺伝子産物が転写因子として機能する場合、融合遺伝子産物そのものが治療標的となった例はない。しかし、Ewing 肉腫では、融合遺伝子産物の形成する複合体中の RNA helicase A が治療標的となることが報告され、臨床試験で評価されている (PMID: 16740692, 25564528)。そこで我々は、CIC-rearranged sarcoma も融合遺伝子産物そのものを標的とすることは難しいが、融合遺伝子産物が形成する複合体の構成成分 (酵素) を治療標的とすることで、新規治療法の開発が可能であると考えた。

今回我々は、樹立した 3 株と CIC-DUX4 肉腫細胞株である kitra (PMID: 31676869) を用いて、①Pamstation12 (PamGene International, BJ's-Hertogenbosch, The Netherlands) による網羅的キナーゼ活性解析を行い、全細胞株に共通して高い活性を示すキナーゼを同定した。また、②214 剤の既存の抗がん剤の増殖抑制効果をスクリーニングし、適用拡大可能だと考えられる抗がん剤を同定した。Off-target の効果を除外するため①、②の結果を統合し、網羅的キナーゼ活性解析と抗がん剤スクリーニングで共通して同定される抗がん剤を発見した。

今後我々は、CIC-DUX4 融合遺伝子産物の形成するタンパク質複合体の構成成分から治療標的の同定を行い、CIC-rearranged sarcoma の新規治療法の開発を進めていく予定である。

O-14 二次元電気泳動 / ウェスタンブロット法によるがん患者由来自己抗体の新規網羅的同定法

小林 信¹、杉本 幸太郎¹、瓜生 開¹、遠藤 雄大²、小島 学²、千葉 英樹¹

¹ 福島県立医科大学医学部基礎病理学、² 福島県立医科大学医学部産科婦人科学

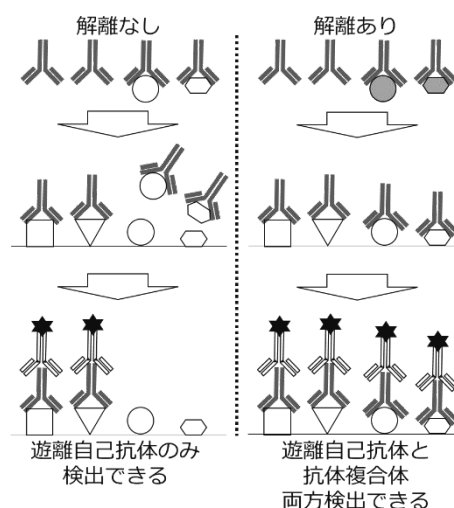
卵巣がんは最も予後不良な婦人科がん、その理由は第一に早期発見が困難なことにある。不正性器出血で自覚されることが多い子宮がんとは異なり、卵巣がんは約 75% がステージ III 以上、半数が根治手術不能例として診断される。そこでこれを解決すべく CA125 と経膈超音波検査を用いた早期卵巣がん検診が英国で実施されたが、予想に反して生存期間の延長に貢献しなかった (Jacobs *et al.*, *Lancet*, 2016; Menon *et al.*, *Lancet Oncol*, 2021)。よって早期病変を鋭敏に検出できる新規バイオマーカーの開発が望まれている。

自己反応性の異常抗体である自己抗体はがん患者の血清中に存在することが知られており、早期から検出可能なこと、比較的安定して保存可能なことから現在までに多数の候補分子が報告されている。最近我々はタンパク質マイクロアレイを用いて卵巣がん患者血清中の自己抗体を網羅的に同定すると共に、異常な翻訳後修飾によって形成される抗原抗体複合体が卵巣がんの早期診断に資する可能性を明らかにした (Kobayashi *et al.*, *Cancers*, 2020)。一方これらの研究は IgG のみを解析対象としており、IgM や IgA など他のクラスは含まれていない。またこれまでの自己抗体研究は早期診断を目標としてきたこともあり、もっぱら血清中に存在する遊離自己抗体を探索の対象としてきた。しかし近年、卵巣がん患者腹水中に含まれる自己抗体は血清中のそれに比して高力価であることが報告された。そこで発表者らは、腹水を用いてこれまでよりも網羅性を高めた新規自己抗体ライブラリを構築しようと考えた。

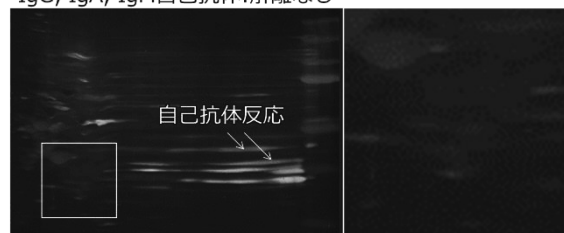
培養細胞と数例の患者腹水を用いて予備実験を実施した。まず卵巣がん細胞株 (OVCAR3, SKOV3, AMOC2) の全細胞抽出物を二次元電気泳動で展開したものを抗原とし、精製した患者腹水を一次抗体としてウェスタンブロットした。陰性対照は健常者血清を用いた。なお今回は腹水中に含まれるアルブミンやトランスフェリンといった主要血清タンパク質を除く目的で、まず硫酸分画法により患者腹水から免疫グロブリンを精製し一次抗体としている。その結果、卵巣がん患者腹水のみで強い反応を認めるスポットが 100 以上検出された。また Ig クラス・サブクラスによって異なる反応性を認めた。また酸性条件下で抗原抗体結合体を解離して反応させると、解離しないものと比べて約 1.5 倍のスポットが検出された (右図)。これは患者腹水中には抗原と結合した状態の自己抗体が多数含まれることを示している。

二次元電気泳動法は抗原タンパク質の翻訳後修飾を保

持したまま各タンパク質の単離ができることから、本法は腫瘍特異的な翻訳後修飾をエピトープとする自己抗体を網羅的に同定することができる強力な方法である。今後は Ig サブクラス別に自己抗体の認識した抗原の同定を進め卵巣がん特異的な自己抗体シグネチャーを同定する。さらに複数の候補分子から成る診断マーカーパネルを構築し、ELISA アッセイ系による血清診断への展開を目指す。



IgG, IgA, IgM自己抗体: 解離なし



IgG, IgA, IgM自己抗体: 解離あり

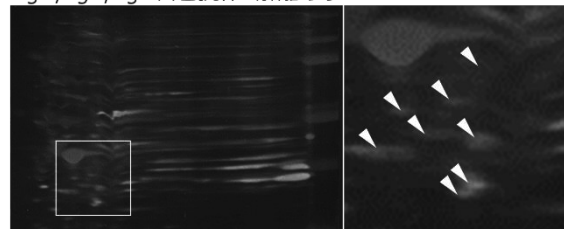


図. 卵巣がん腹水に含まれる様々な自己抗体を検出した腹水から自己抗体を精製し抗体複合体を解離した(上図)。複合体の解離後にシグナルの上昇が認められる複数のスポットを検出することに成功した(下図)。

一般講演 3

O-15 細胞接着分子クロードイン 16 は卵巣癌の新規バイオマーカーである

茂村 碧¹、小林 信¹、杉本 幸太郎¹、遠藤 雄大²、小林 靖幸³、千葉 英樹¹¹ 福島県立医科大学医学部基礎病理学、² 福島県立医科大学医学部産科婦人科学、³ 福島県立医科大学医学部病理病態診断学

細胞間接着分子は細胞同士を物理的に接着する糊としての役割だけでなく、様々なシグナル伝達の場合としても機能している。その中でもクロードインは最も上極に位置するタイトジャンクションの主要構成分子で、20 種類以上からなるファミリーを形成している。クロードインは組織ごとに異なった発現パターンを示し、細胞の腫瘍化に伴って正常では発現しないクロードインの異所性発現や本来発現するクロードインの発現消失がみられる。よって種々のがんで診断マーカーや治療標的分子としての有用性が報告されており、また異所性発現するクロードインが細胞増殖や転移など腫瘍の悪性形質制御に関わっていることも報告されている。我々はクロードインが関与するシグナル経路の同定 (Sugimoto *et al.*, *PNAS*, 2018) をはじめ、特異抗体の開発を通してクロードイン 6 とクロードイン 9 が子宮体がんの予後マーカーであること (Kojima *et al.*, *Cancers*, 2020; Endo *et al.*, *Int J Oncol*, 2022)、クロードイン 12 が子宮頸がんの予後マーカーであること (Rahman *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2021) をそれぞれ報告してきた。しかしながらクロードイン 16 (図 1) は卵巣がんに顕著に高発現するにも関わらずほとんど報告されていない。

そこで本研究ではクロードイン 16 特異抗体を樹立すること、卵巣がんにおける組織診断マーカーとしての有用性を示すこと、がん増悪促進機構を解明することを目的とした。抗体作製にはラットリンパ節法を用いた。まず細胞融合により得られたハイブリドーマの上清を用いて ELISA 法による一次スクリーニングを行い、免疫原ペプチドと反応するクローンを 300 個得た。これらを対象にクロードイン 16 タンパク質を一過性過剰発現した 293T 細胞のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて免疫染色を行い、過剰発現細胞と強い反応性を示すクローンを選択した (図 2)。本抗体はクロードイン 16 とアミノ酸配列の相同性が高いクロードイン 12 を含む他のクロードインと交差反応性を示さず、クロードイン 16 に対する特異性の高い抗体であった。次に卵巣がん外科組織 114 例を用いた免疫染色を施行したところ、クロードイン 16 は様々な程度に発現を認め、約 73% の症例に中程度以上の染色を認めた。Immune reactive score 法により染色強度と染色範囲から判定スコアを算出し、クロードイン 16 発現と臨床病理学的因子との関連を検討したところ、クロードイン 16 の発現亢進は漿液性癌、ステージの進行、pT 因子、腹膜播種、再発と有意に正の相関を示し、無再発生存期間を短縮させる傾向が示唆された。今後は卵巣がん細胞株を対象にゲノ

ム編集による機能喪失、遺伝子導入による機能獲得株を樹立し、クロードイン 16 が寄与する卵巣がん悪性形質制御機構の全容解明を目指す。

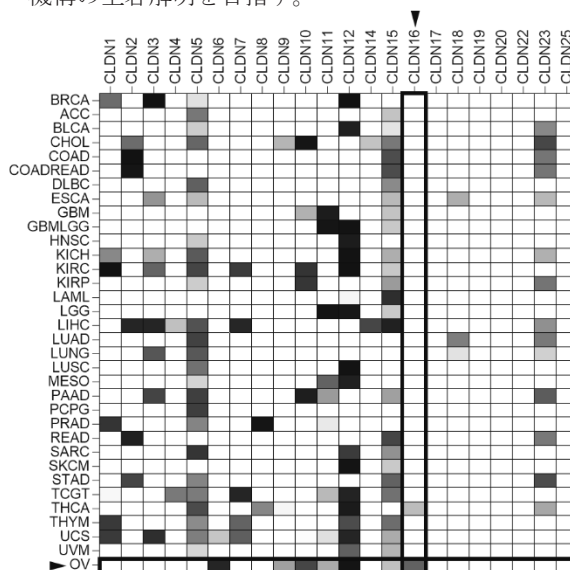


図 1. クロードイン 16 遺伝子は卵巣がん組織に高発現する (The Cancer Genome Atlas)

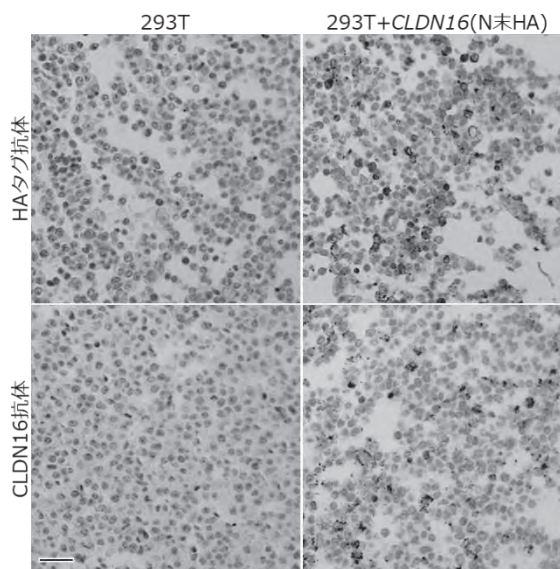


図 2. ホルマリン固定パラフィン包埋標本を免疫染色できるクロードイン 16 抗体を樹立した

O-16 ホルマリン固定パラフィン包埋検体からヒドロキシルアミンを用いて抽出したムチンの分子マトリックス電気泳動を用いた糖鎖解析

杉浦 貴則^{1,2}、野村 武史²、亀山 昭彦³¹ 牛久愛和総合病院歯科口腔外科、² 東京歯科大学 口腔腫瘍外科学講座、³ 産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門

【背景】

ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded : FFPE) 検体とは、ホルマリンで固定した検体を脱水、脱脂後にパラフィンへと置換し包埋処理をした検体のことであり、検体の保存、保管に最も広く使用されている手法の1つである。臨床において FFPE 検体は病理組織学的解析に用いられるとともに、保管された FFPE 検体は、後ろ向き研究にとって価値のある試料とされる。また、ムチンは多量の糖鎖で修飾された粘膜上皮に存在する高粘性の糖タンパク質であり、粘膜の保護、保湿、潤滑に役立ち、その糖鎖は感染防御や免疫応答さらには炎症や発がんに関与することが示唆されてきた。ムチンは数 MDa の分子量を持ち、糖鎖部分はその分子量の 5~8 割を占めるため通常のプロテオミクスの手法で分析することが困難であったが、亀山らによって開発された分子マトリックス電気泳動法 (SMME) によって分析が容易となった¹⁾。これまで我々は、SMME を用い、唾液腺悪性腫瘍である粘表皮癌の凍結組織検体において、産生されるムチンに特徴的な糖鎖が発現することを明らかにした²⁾。一方で、唾液腺悪性腫瘍は年間発生数が人口 10 万人あたり 2.5~3.0 人と稀な疾患である。そのため、十分な症例・検体を収集することは困難を極める。また、FFPE 検体からのムチン抽出に関しても確立された手法はない。FFPE 検体からのムチン抽出法の確立は、唾液腺腫瘍における今後の研究の発展において、重要な課題であると考えられた。

【目的】

そこで本研究では、ブタ顎下腺をモデルとして FFPE 検体からのヒドロキシルアミン (HA) を用いたムチン抽出法の検討および、抽出したムチンの糖鎖を分析した。

【方法】

ホルマリン固定パラフィン包埋 : ブタ顎下腺 80 mg を 10%ホルマリン液にて固定後にエタノール、キシレンにて脱水、脱脂しパラフィンに浸漬し FFPE 検体を作成した。

脱パラフィン : FFPE 検体をキシレンにてパラフィンを除去し、エタノールにてキシレンを除去した。

HA 処理 : 25%ヒドロキシルアミン水溶液 200 μ L 加えた後にアセトン 200 μ L 加えた。

ムチン抽出 : アセトンパウダーを作成後、PBS 500 μ L を用いて水溶性ムチンを抽出した。

ムチン濃縮 : 水溶性ムチン抽出液を 5%酢酸カルシウム水溶液に調整後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿

物を 8M ウレア水溶液 80 μ L に溶解したものを SMME 分析に用いた。

SMME : 既報に従い PVDF 膜 (Immobilon P) にポリビニルピロリドンとポリビニルアルコールの重量比 3:2 の混合物溶液を処理して SMME 膜を作成した。泳動緩衝液として 0.1 M ピリジン-ギ酸 (pH 4.0) を用い、1 mA/cm にて 30 分の通電を行った。泳動後は、アルシアンブルー染色によりムチンを可視化した。

糖鎖解析 : 染色されたスポットを切り取り還元 β 脱離後、得られた糖鎖を完全メチル化し MALDI-TOF 型質量分析計により分析した。

【結果および結論】

SMME 分析にて HA 処理と未処理の FFPE 検体を比較し、HA 処理にて FFPE 検体から水溶性ムチンを抽出可能であると考えられた。凍結組織検体のムチン分画とは異なる位置にアルシアンブルー陽性スポットの出現を認め、HA はアスパラギン、グリシン間のペプチド結合を切断することが知られており、その影響が考えられた。

糖鎖解析にて凍結組織検体と HA 処理を行った FFPE 検体のムチンの糖鎖を比較し、同様の糖鎖を認めた。

本結果より、ホルマリン固定パラフィン包埋検体から HA を用いてのムチン抽出は可能であり、抽出したムチンの糖鎖も凍結組織検体と同様であることから、FFPE 検体を用いてのムチン抽出、糖鎖解析の可能性が示唆された。

今後は最適な HA 処理の条件の検索、糖鎖への影響を検討し、ムチン分析の発展に寄与したいと考えている。

文献

- 1) Matsuno YK, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A. Anal. Chem. 2009;81(10):3816-23.
- 2) Isaka E, Sugiura T, Hashimoto K, Kikuta K, Anazawa U, Nomura T, Kameyama A. Characterization of tumor-associated MUC1 and its glycans expressed in mucoepidermoid carcinoma. *Oncol Lett.* 2021; 22(4): 702.

O-17 Online fluorescent imaging method for improving the accuracy of quantitative capillary electrophoresis

Chenchen Liu¹, Yamaguchi Yoshinori², Kawai Takayuki¹, Kubo Takuya³, Otsuka Koji³

¹Department of Chemistry, Graduate School of Sciences, Kyushu University,

²Department of Applied Physics, Osaka University,

³Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Fluorescent detection based quantitative capillary electrophoresis (qCE) is a popular method in biomolecule analysis for its merits of high sensitivity, high specificity, cost effective and abundant commercially available products. However, the accuracy of qCE still requires improvement due to bio-sample's compositional complexity. Here we report a method to reduce photobleaching induced quantitative error via using an online fluorescent imaging approach.

Photobleaching induced quantitative error occurs during on-column fluorescent detection, which is characterized with a signal collection process through a detection window on the separation capillary column (Fig. 1). During electrophoretic separation, analytes migrate in different mobilities and pass through the on-column detection window. There, they are illustrated by an excitation light, and emit photons via a fluorescence process. Due to the difference in mobility, the analytes' passing time are different, as well as their duration of taking excitation irradiation. Photobleaching is an unavoidable process occurs at the same time with the excitation irradiation. Consequently, there are difference in the photobleaching duration among analytes, which will introduce a mobility-based-bias to the analyte's fluorescent intensity. Quantitative analysis takes the peak height/peak area of analyte's electrophoretic bands, it is thus biased due to the inequivalent photobleaching of analytes.

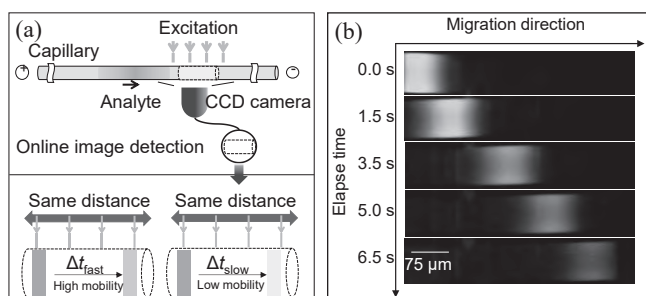


Figure 1. (a) an illustration of online imaging detection system and the photobleaching of analytes with different mobilities. (b) the photobleaching process of an electrophoretic band (double strand DNA) during the fluorescent detection process.

To reduce the inequivalent photobleaching induced error, this work proposed and demonstrated the effectiveness of an online fluorescent imaging detection method. The online imaging

detection system can record the photobleaching process of an analyte's electrophoretic band. An image analysis method (Fig. 2 (a)) was developed to compute analytes' fluorescent intensities against their excitation irradiation time, in other words, the fluorescent intensity against elapse time. By taking the fluorescent intensities at the same elapse time for quantitative analysis, it is possible to cancel the inequivalent photobleaching induced error. For example, Fig. 2 (b) plots the real-time fluorescent intensities from two electrophoretic bands (fast and slow) after the image analysis. The quantitative analysis could be carried out by taking the peak areas of at any given but same elapse time.

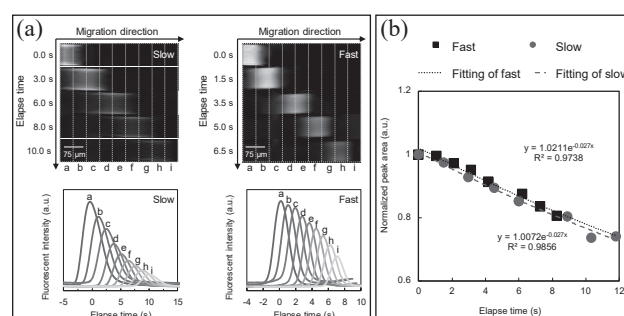


Figure 2 (a) An illustration of the image analysis method. The detection window was equally sectioned as a-b. The fluorescent intensity of electrophoretic band passing by each section was calculated. The elapse time was calibrated as zero when the electrophoretic band pass through the section a. (b)

Experimental demonstration for the proposed method was carried out by using DNA-dye conjugations. Three different dyes were studied including Sybr Green I, YOYO-1, and Cy 3. It was found that YOYO-1 labeled DNA was more tolerant to excitation irradiation than the other two. Quantitative performances were evaluated with standard DNA samples. Result showed that our method provided a lower relative error of the peak area ratio of 0.3–3.2 % and a more practical operation because the efforts to restrict the photobleaching are exempted.

Reference:

[1]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2020**, 319, 128035.

謝 辞

第 74 回日本電気泳動学会学術大会にご協賛いただきました下記企業・研究機関様に御礼申し上げます。

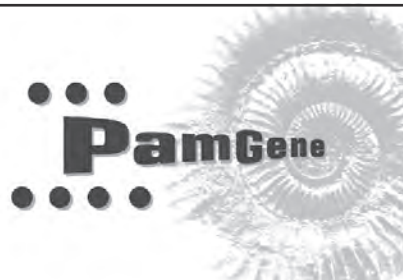
岩井化学薬品株式会社
株式会社 AFI テクノロジー
エーエムアール株式会社
株式会社キーエンス
株式会社クリムゾンインタラクティブ・ジャパン
sainome 株式会社
ジャクソン・ラボラトリージャパン株式会社
株式会社東陽テクニカ
トミーデジタルバイオロジー株式会社
株式会社ナード研究所
日京テクノス株式会社
日本ゼオン株式会社
バイオ・ラッド
理科研株式会社
株式会社ワールドインテック

電気泳動 第 67 巻 Supplement 号（電子版）別刷

令和 5 年 5 月 18 日
発行所 日本電気泳動学会
<https://www.jes1950.jp/>
〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1
国立がん研究センター研究所希少がん研究分野
E-mail: secretariat@jes1950.jp

第 74 回日本電気泳動学会学術大会事務局
〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1
国立がん研究センター研究所希少がん研究分野
大会長 近藤 格
E-mail: jes2023ishigaki@gmail.com

編集／印刷 中西印刷株式会社
〒602-8048 京都市上京区下立売通小川東入ル
Tel: 075-441-3155

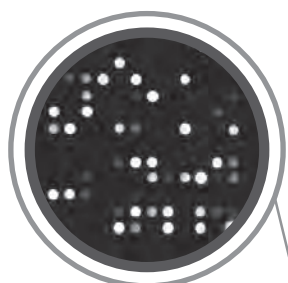


PamGene社ではキナーゼや核内受容体の特異的な活性を測定する新しい技術を提供しております。世界中のキナーゼや阻害剤研究をしているがん研究者、核内受容体とそのリガンド研究者によりこの革新的なプラットフォームは利用されております。

キナーゼ・核内受容体の 活性プロファイリング

PamChip[®] マイクロアレイ

PamStation[®] 12



BioNavigator

付属ソフトによる測定データの様々な可視化



Heatmap



Spot Images



Array Images



Kinetic curves



Customized views



Bar graphs



Dose Response Curves



Peptide response Profiles



Principal Component Analysis

国内輸入販売元

岩井化学薬品株式会社

本社: 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町 3-2-10

営業本部: 〒101-0032 東京都千代田区岩本町 1-5-12

営業所: 筑波・多摩・三島・川崎・柏

▶資料請求・製品に関するお問合せは

企画開発課

TEL: 03-3241-2573 FAX: 03-3279-6397

<https://www.iwai-chem.co.jp/>

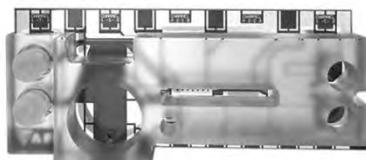


ラベルフリー細胞分離システム

ELESTA®

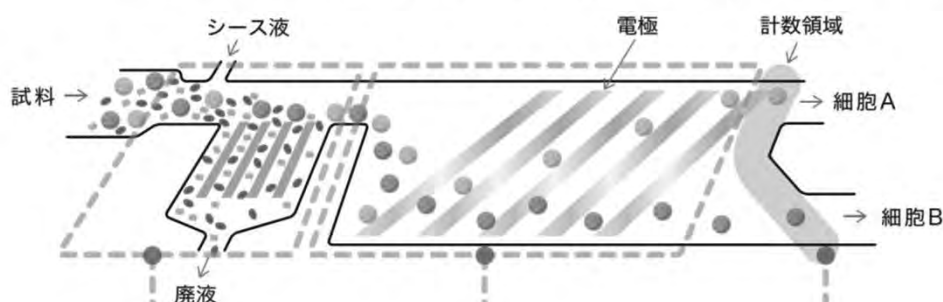
CROSSORTER®

エレスタ クロスソーター



マイクロ流路と電気特性分離による革新的フィルター技術

数多（あまた）の細胞の中から、
欲しい細胞だけを無傷で取り出す



サイズ分離

血液からの赤血球除去

微生物除去

培養液中残渣の除去

電気的特性分離

細胞種による分離

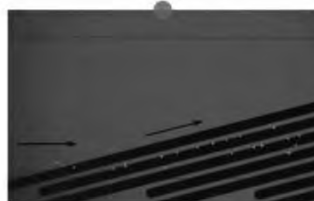
死細胞の除去

微生物の精密除去

分離特性解析

細胞状態の確認

(分離特性カーブの)
変動確認



株式会社AFI テクノロジー

〒606-8397 京都市左京区聖護院川原町53
京都大学メディカルイノベーションセンター2階
Phone 075-762-3131 Web site <https://afi.co.jp/>

製品ホームページ
こちらから



プロテオミクス用ナノHPLC

EVUSEP

EVOSEP ONE

キャリーオーバーのない多検体プロテオミクス

Evosep Oneは、「臨床プロテオミクスを100倍強固に、10倍高速化」という信念のもと、従来のHPLCとは異なるコンセプトを持つ革新的なHPLCとして開発されました

Evotip sample Preparation

専用ステージチップ「Evotip」によりキャリーオーバーが少なく、カラムとMSの汚れを最小限にして装置への負担を減らします。装置の稼働率が大幅に向上し、プロテオミクスのさらなる高速化やハイスループット化を実現するHPLCです。



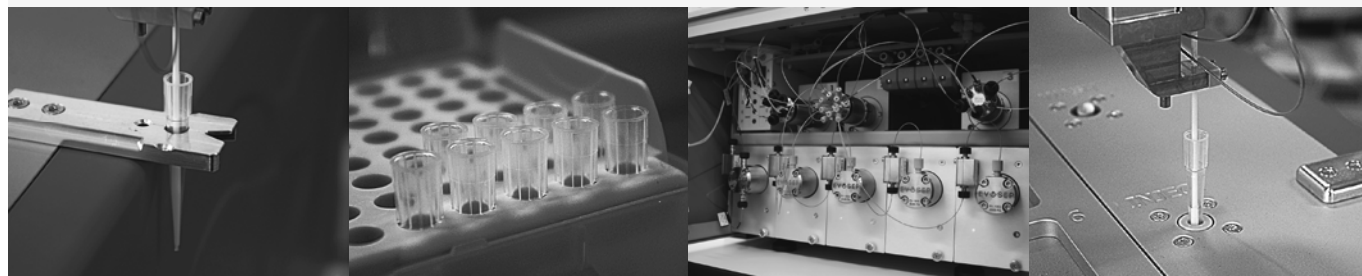
Methods

メソッドは目的に合わせて固定メソッドから選択。
1日最大300サンプルの分析を行うハイスループット分析メソッド、
1日わずか30サンプルでより包括的なプロテオーム分析を行うメソッド
網羅的プロテオーム解析やシングルセル解析用メソッドなど、
臨床研究の可能性を広げる新たなメソッドも次々登場しています。



Webinar

メーカー主催ウェビナーで最新情報を随時発信中！
ウェビナーはオンデマンド配信で視聴可能です。



その他取り扱い製品（一部抜粋）

タンパク質前処理カートリッジ S-Trap
ナノUHPLCカラム PepSepカラム
ナノUHPLCカラム Aurora Generation 3
マルチノズルエミッター M3エミッター
ナノスプレーエミッター Stinger Emitters
エレクトロスプレーエミッター Sharp Singularity Emitter
エレクトロスプレーエミッター LOTUS Emitter

エーエムアール株式会社

〒152-0031 東京都目黒区中根2-13-18

Tel 03-5731-2281/Fax 03-5731-2283

<https://www.amr-inc.co.jp/>

エーエムアール



AMR
AMR INCORPORATED

1台で何役も。進化する顕微鏡。

Overlay

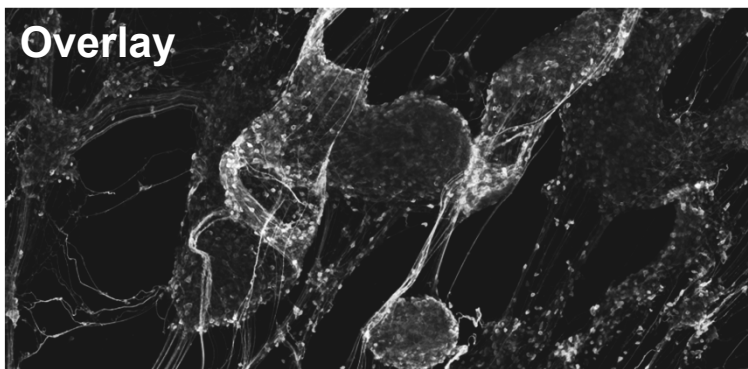
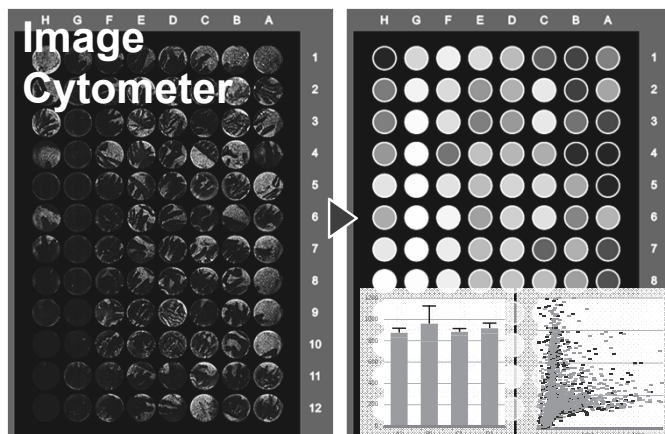


Image
Cytometer



Optical Sectioning

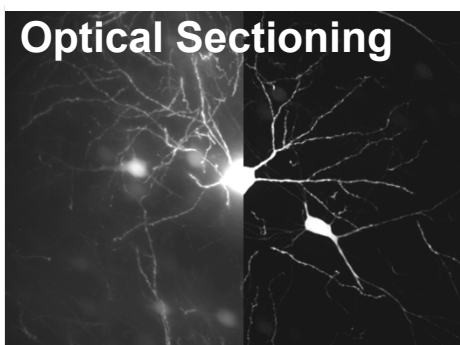
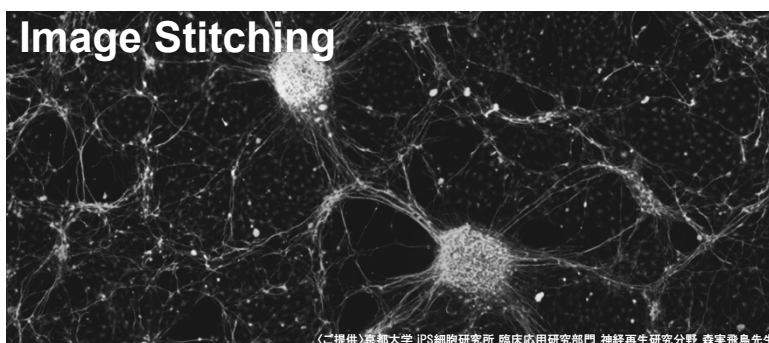
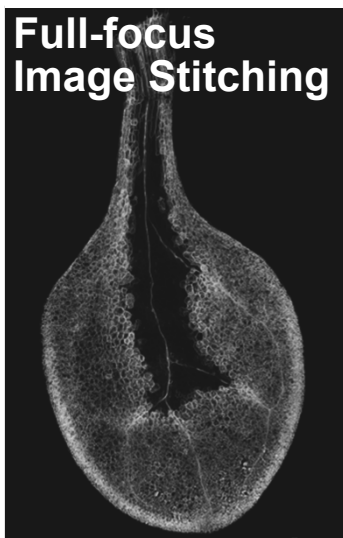


Image Stitching

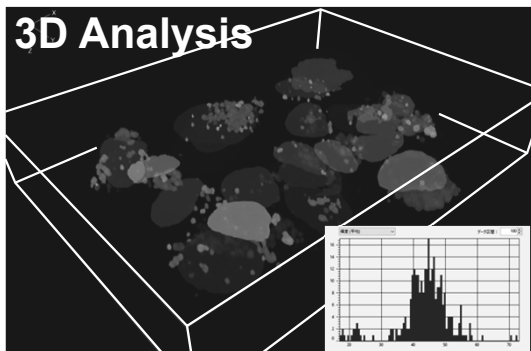


(ご提供) 京都大学 iPS細胞研究所 臨床応用研究部門 神経再生研究分野 森実飛鳥先生

Full-focus
Image Stitching



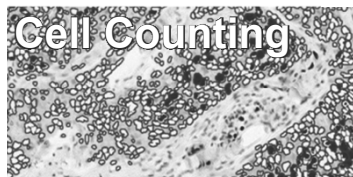
3D Analysis



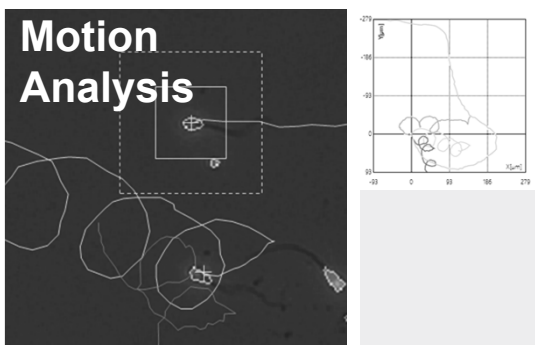
データ撮りの
ご依頼は
こちらまで

www.keymsp.jp/BZ

Cell Counting



Motion
Analysis



株式会社 キーエンス

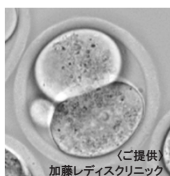
本社・研究所／マイクロ스코プ事業部
〒533-8555 大阪市東淀川区東中島1-3-14 Tel 06-6379-1141

顕微鏡
お客様相談窓口



0120-739-007

Copyright© 2018 KEYENCE CORPORATION. All rights reserved.



(ご提供)
加藤レディクリニック

国際舞台で輝くために・・・

研究発表グローバル化のための 言語ソリューションがあります



学術論文の英文校正・投稿支援サービスなら、エナゴへ



リジェクトされない
「英語の質」を保証します。

英文校正エナゴは、学術研究論文に特化したネイティブチェックサービスを提供しています。
論文の英語を磨き上げ、国際ジャーナルへの投稿をサポートします。

エナゴの選ばれる理由

2段階チェック

1. 「分野の専門家」と「英語の専門家」2名によるチェックで、洗練された学術英語にブラッシュアップ。

専門分野に
合致した校正者



×

アカデミック英語に
習熟した校正者



2.

業界初のポイントプログラム

ご利用ごとに貯まるポイントで、
研究活動に役立つ特典サービス
をご利用いただけます。



3.

査読対応込みの再校正

論文のご修正と加筆に何度でも
再校正を行う「査読対応オプシ
ョン」。



標準レベルの英文校正が、業界最安値の1単語**4.5円**～！



学術論文の翻訳なら、翻訳ユレイタスへ

お客様満足度 **99.45%**

論文翻訳ユレイタスは、研究論文に特化した日英・英日翻訳サービスを提供します。
論文専門の翻訳チームが、研究成果の世界への発信をサポートいたします。

ユレイタスの選ばれる理由

ボリューム割引
最大40%

1.

分野に合致した翻訳者

1117の専門分野の中か
ら、原稿の内容と最も合致
する翻訳者を選びます。

2.

修士・博士による翻訳

平均10.4年の学術論文
翻訳の経験を有するスベ
リシャリストです。

3.

回数無制限の修正保証

何度でも翻訳の手直しを
行う「あんしん保証」(日
英翻訳)。

第74回日本電気泳動学会学術大会ご参加者限定

英文校正・翻訳新規割引コード: **GKJP84AD** 有効期限: 2023年6月30日(金)

見積もりフォームへのコードご入力で新規割引 **20%**

(英文校正サービスの割引上限額2,500円)

英文校正・校閲エナゴ:

www.enago.jp

論文翻訳・学術翻訳ユレイタス:

www.ulatus.jp

メールには24時間対応
request@enago.com

request@ulatus.com

電話受付時間: 月～土 10:00～19:00

03-4580-9713

電話受付: 月～金・日 10:00～20:00 土 12:30～21:30

03-4580-9713

WELCOME TO JAX MOUSE SEARCH

<https://mice.jax.org/>



実験動物マウスが必要な時に、とりあえずアクセスしてください。
日々増えていく研究用のマウスを、マウスの系統、特性、特徴での絞り込みや
そのマウスを用いた研究者から提供された情報も確認いただけ
ご自身のご研究に最適な系統を見つけることができます。

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社

WEBサイトURL: www.jax.or.jp | お問い合わせアドレス: ask@jax.or.jp

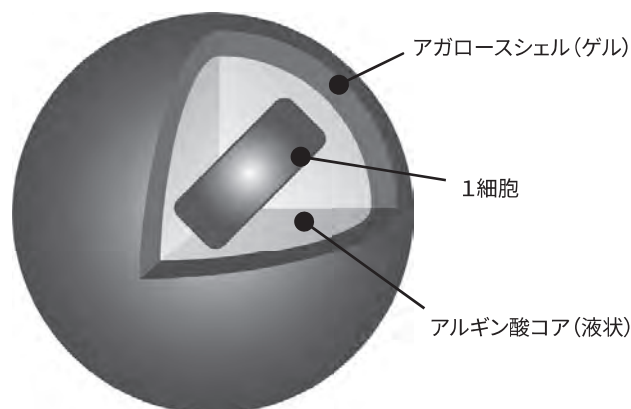
“はかる”技術で未来を創る

1細胞全ゲノム解析用

AGM™ 試薬キット

シングルセルゲノミクスのドアオープナー

- 微量サンプルから均質な1細胞全ゲノム増幅を安価・簡便に
- 専用機器は不要。既存のラボ設備ですぐに実験可能



AGM (アガロースゲル・マイクロカプセル)

理化学研究所の特許技術による1細胞包埋技術です。
ピコリットルスケールの微小カプセル内でDNA増幅させ
100%近いゲノムカバー率でのシーケンスを実現します。



<https://www.toyo.co.jp/agm/>

マイクロチップ2次元電気泳動システム

MC-2DEシリーズ

開発中

バイオマーカー開発のための新技術

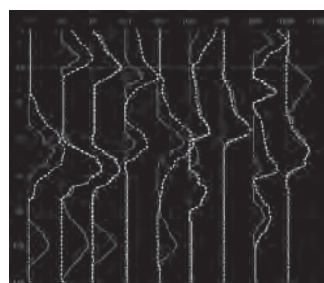
- より網羅的、より高い再現性、より高感度にプロテオミクスを支援
- 微量サンプル、自動化、パターン解析による臨床検査への応用可能性



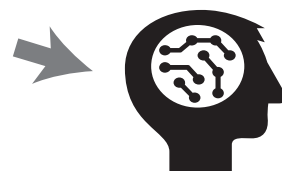
MC-2DEでの2次元電気泳動像



MC-2DEマイクロチップ2次元電気泳動システム



数値データ化



ビッグデータ解析

 東陽テクニカ

www.toyo.co.jp

ONE TECH
ONE TECHNOLOGIES COMPANY

株式会社 東陽テクニカ

ワン・テクノロジーズ・カンパニー

〒103-8284 東京都中央区八重洲1-1-6

TEL.03-3279-0771 E-Mail : agm-sales@toyo.co.jp

BioLegend社のウェスタンブロット関連試薬

ウェスタンブロット (WB) は、重要なシグナル伝達経路やタンパク質の会合、様々な細胞株や組織におけるタンパク質発現、薬剤やその他の処理の影響をタンパク質レベルで調べるために役立つ、基本的な技術です。

BioLegendでは、タンパク質の分子量マーカーや基質溶液から特異性の高い抗体まで、WBに役立つツールをご用意しています。

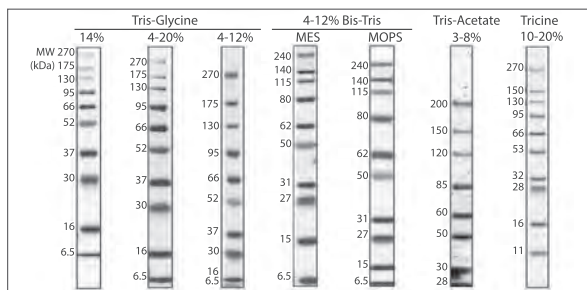
明確で解釈しやすいWBの結果を得るために、これらの製品をお試しください。

正確なタンパク質分子量マーカー

Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder は、6.5 kDaから270 kDaまでの幅広い分子量をカバーする、10種類の着色済みリコンビナントタンパク質（色数は3色）が含まれている分子量マーカーです。SDS-PAGEにおけるタンパク質分離の確認や、WBにおけるメンブレンへの転写の確認、タンパク質サイズの推定に最適です。

Description	Size	Cat. No.
Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder	50 µL 500 µL	773301 773302

SDS-PAGE用の異なる種類のゲルとバッファーで明確に分離されたシャープなバンドが得られます



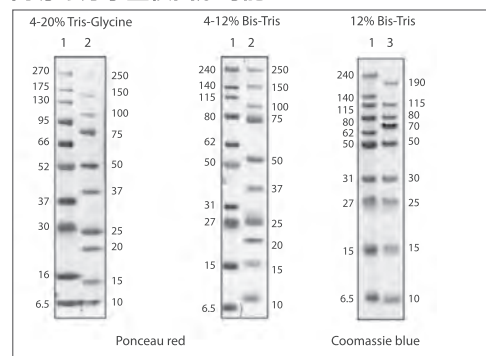
Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder 3 µLを異なる種類のゲルと泳動バッファーを用いて電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写しました。各タンパク質の分子量 (MW) (kDa)は、未染色のタンパク質スタンダードに対するキャリブレーションによって決定しました。

注：記載しているすべてのMWは概算値です。

WB用試薬と抗体の詳細はこちら：
biolegend.com/ja-jp/western-blot



他社のタンパク質分子量マーカーと同等の分子量検出が可能



Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder 3 µLを、図に示した異なる種類のゲルを用いて電気泳動しました。その後、タンパク質をCoomassie blueで染色、あるいはニトロセルロースメンブレンに転写後にPonceau redで染色しました。

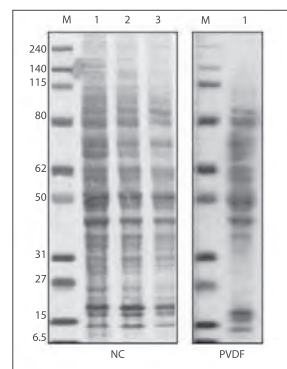
注：記載しているすべてのMWは概算値です。

Lane 1: Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder

Lane 2: 他社1のタンパク質分子量マーカー製品

Lane 3: 他社2のタンパク質分子量マーカー製品

WBにおける転写効率にも優れています



Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder 3 µLと全細胞溶解液（総タンパク質15 µg）を4-12% Bis-Trisゲル、MOPS泳動バッファーを用いて電気泳動しました。その後、ニトロセルロースメンブレン (NC) およびPVDFメンブレンに転写し、Ponceau redで染色しました。

注：記載しているすべてのMWは概算値です。

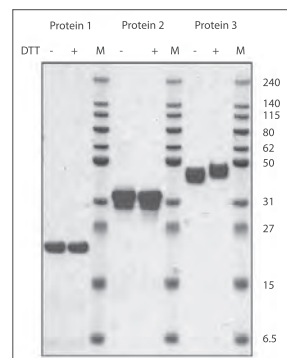
Lane M: Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder

Lane 1: HeLa細胞

Lane 2: Jurkat細胞

Lane 3: NIH3T3細胞

タンパク質精製における分子量推定にも適しています



Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder 3 µL (Lane M)と、分子量の異なる3種類のリコンビナントタンパク質1, 2および3（各2 µg）を12% Bis-Trisゲル、MES泳動バッファーを用いて電気泳動し、Coomassie blueで染色しました。

注：記載しているすべてのMWは概算値です。

輸入販売元



Digital Biology®

トミーデジタルバイオロジー株式会社

〒112-0002 東京都文京区小石川1-1-17 日本生命春日駅前ビル3階
email: info_ap@digital-biology.co.jp phone: 03-6240-0843





リン酸化プロテオミクス試薬

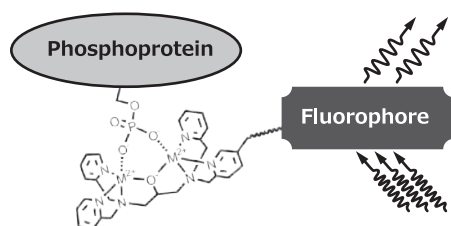
わかる 集める 見える Phos-tag technology

NARD institute, ltd.

Phos-tag(フォスタグ)とは、広島大学の医薬分子機能科学研究室が開発したリン酸モノエステルアニオン ($R-OPO_3^{2-}$) を中性 pH(生理的 pH) において捕捉する機能性分子です

Phos-tagTM Gel Stain ゲル内リン酸化タンパク質を高効率かつ高選択的に蛍光検出

生理 pH で染色可能な リン酸化蛍光イメージング解析用の試薬です
pSer、pThr、pTyr、pHis、および pAsp 残基に選択的に結合します

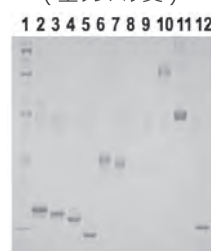


- 1: Marker
- 2: α-casein(9P)
- 3: ALP-treated α-casein
- 4: β-casein(5P)
- 5: ALP-treated β-casein
- 6: ovalbumin(2P)
- 7: ALP-treated ovalbumin
- 8: pepsin(1P)
- 9: ALP-treated pepsin
- 10: β-galactosidase
- 11: bovine serum albumin
- 12: carbonic anhydrase

Phos-tagTM Yellow
(リン酸化タンパク質)



CBB G-250
(全タンパク質)

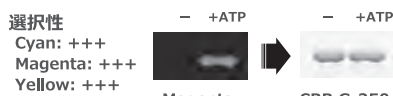


解析例：バクテリア 2 成分伝達系リン酸化タンパク質

データご提供：広島大学医薬分子機能科学研究室 木下恵美子 先生、木下英司 先生、小池透 先生

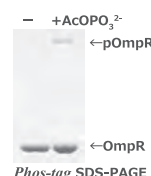
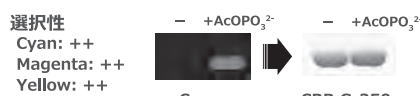
pHis- タンパク質の検出例

EnvZ: 浸透圧センサー

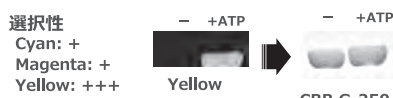


pAsp- タンパク質の検出例

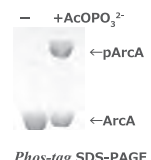
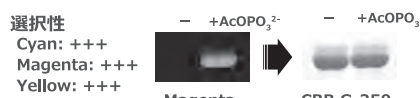
OmpR: 転写調節因子 (←EnvZ)



ArcB: 酸化還元センサー



ArcA: 転写調節因子 (←ArcB)



Phosphoprotein Gel Staining	内容量	製品の特徴	希望小売価格(税込)
Phos-tag TM Yellow (cat# nPGS-Y01)	0.2mg	Ex/Em=505nm/514nm 遮光、冷蔵保管	¥22,000
Phos-tag TM Magenta (cat# nPGS-M01)	0.2mg	Ex/Em=547nm/561nm 遮光、冷蔵保管	¥22,000
Phos-tag TM Cyan (cat# nPGS-C01)	0.2mg	Ex/Em=643nm/661nm 遮光、冷蔵保管	¥22,000
Phos-tag TM Aqua (cat# nPGS-A01)	0.2mg	Ex/Em=551nm/564nm 遮光、冷蔵保管	¥22,000
親水性を向上させた製品です			
Mixed reagents for Phos-tag TM Common Solution 5x (cat# nPGS-MR1)	500mL溶液用	500mL容器入り	¥5,500

株式会社ナード研究所 神戸研究所 コーポレート研究部



<https://www.nard.co.jp>

〒650-0047 神戸市中央区港島南町 5-4-1
TEL:078-958-7026 FAX:078-958-8026
E-mail:corporate@nard.co.jp

微量サンプルの脱塩・濃縮 SPE C-TIP

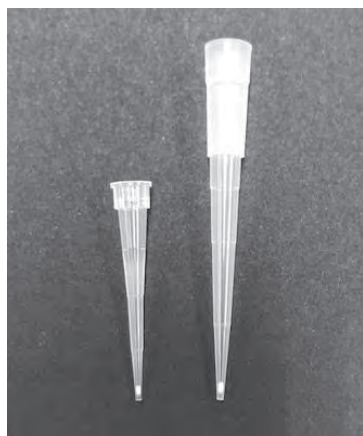
チップの先端にサンプル溶液の脱塩・濃縮をする為の固相抽出用メンブレンフィルターを装着致しました。この SPE C-TIP は溶液試料をカラムベッドの上方から下方へ 1 方向に溶液を排出させるため、コンタミの心配が無く、固形物(ゲル等)がろ過される為フィルターとしての機能も兼ね備えています。回収には遠心機を使用する方法やシリンジで加圧して回収する方法があります。それぞれのサンプル容量に応じてチップサイズをお選びください。

SPE C-TIP とは

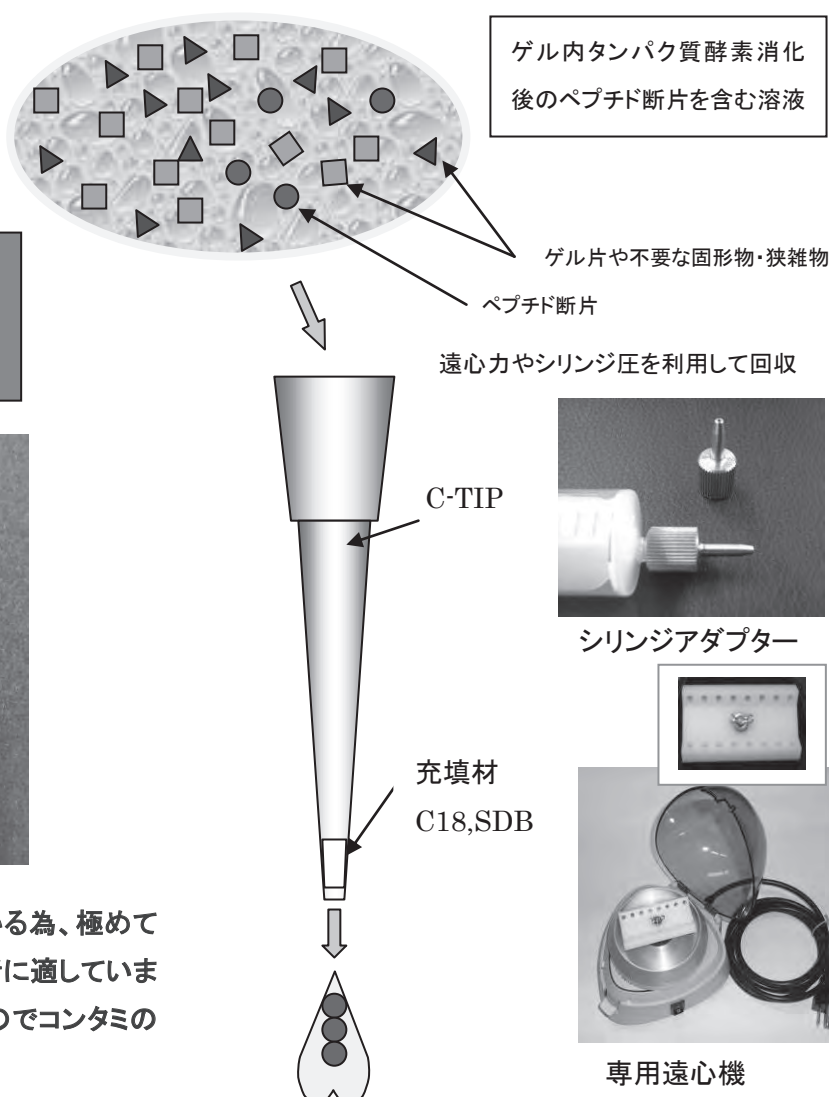
Solid Phase Extraction(固相抽出)Tip のことです。

- ・ 狭雑物の除去
- ・ 無機塩等の除去
- ・ 必要物の濃縮

- ・ 微量化に対応
- ・ ハイスループット
- ・ 高回収率



充填材が均一に固定されている為、極めて高い回収率を有し極微量分析に適しています。溶液の流れは一方方向なのでコンタミの心配がありません。



参考文献: Anal. Chem. 2003, 75, 663-670 Rappsilber, Ishihama, Mann



日京テクノ株式会社

東京都文京区本郷 2 丁目 17-8

特販課

TEL03-3814-2066 FAX03-3814-2060 <http://www.nikkyo-tec.co.jp>

GelDoc Go

イメージングシステム



- コンパクト設計 (設置面積 W36.0 x D44.8 cm)
- 高解像度撮影 (630万画素)
- スマホライクな簡単操作

主な対応アプリケーション

- ・ 蛍光染色や可視染色ゲルの撮影・解析
- ・ 切り出し対応
- ・ 最大撮影サイズ: 21 x 14 cm

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
bio-rad.com/info/geldocgo

デモのご依頼はこちら



BIO-RAD

*本製品は研究用であり診断目的にはご利用いただけません。

Z12624L 2103b

好きを武器に挑み続ける

技術力と人間力で、未来を切り拓く研究者集団

弊社は無期雇用型派遣事業を通して、
研究補助領域ではなく、
研究コア領域でのプロジェクトに参画し、
生涯、研究開発職としての道を歩み続けます。

プロジェクト先は
大手メーカー、ベンチャー、大学、公的機関を中心に
全国で300機関のプロジェクトに参画中

1,300名以上の研究者が在籍し、
研究開発を支援しておりますので、
研究者を必要としている研究機関様、
研究開発に従事し続けたい研究者の皆様、
研究者として、新たな選択肢を創造します。



ワールドインテックRD

技術力と人間力で、未来を拓く研究者集団



☎ **0120-941-820**

受付時間 平日9:30~18:00

✉ rd-recruit@witc.co.jp

24時間受付:返信には2営業日程頂きます



日本患者由来がんモデル学会学術集会 2023年10月24-26日

主催

近藤格（国立がん研究センター研究所希少がん研究分野）

開催様式

オンライン

運営事務局

日本患者由来がんモデル学会事務局

国立がん研究センター希少がん研究分野

〒104-0045東京都中央区築地5-1-1 TEL : 03-3542-2511 (ext 3463)



“着る”

LABTAS+

SHIPS
uniform works

『着た瞬間に、いつもと違う、楽しくなる』LABTAS+WHITE COAT を届ける想い。SHIPS が基本とするファッション性と機能性を備えた、ものづくりへの想い。

LABTAS+ と SHIPS uniform works の二つの想いのコラボレーション。スタイリッシュでありながら、メディカルやラボラトリー、あらゆるシーンで着ていただくための基本性能を満たしたWHITE COAT です。

Men : S/M/L/LL

Women : S/M/L

¥6,500- (税込¥7,150-)



で革新とひらめきを

