

■ 研究課題名

プロテオーム解析を応用した革新的機能性食品評価法の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①機能性食品の予防効能の立証並びに疾患予防マーカーの検証
（◎吉川敏一／京都府立医科大学）
- ②疾患予防マーカーの探索・同定
（高乗仁[H15-H17.8月]、西川浩司[H17.9月-H19.6月]、内田景博[H19.7月-H20.3月]／
（株）バイオマーカーサイエンス）
- ③疾患予防効能評価用抗体チップの開発
（大澤俊彦／名古屋大学大学院生命農学研究科）
- ④疾患予防効能評価用抗体チップの作製
（梅原徹[H15-H16.1月]、北村真一[H16.2月-H18.3月]、佐々木雅啓[H18.4月-H19.12月]、
平山健[H19.1月-H20.3月]／住商ファーマインターナショナル(株)）

■ 研究の目的

健康食品の機能性が注目される中、今後予防医療が進むにつれて疾患予防効果のある機能性食品の開発は急務であるが、その適切な評価方法は確立されていないのが現状である。本研究では、最先端のプロテオーム解析技術を駆使して、疾患発症リスクを判定できるようなバイオマーカー（疾患予防マーカー）を探索し、このマーカーの抗体チップを作製することにより食品の革新的な機能性評価法を確立する。

■ 主要な成果

- ①機能性食品の疾患予防効能の立証については、5種類の疾患モデル動物を用いて、8種類の食品素材を評価し、各素材が動脈硬化症等の疾患に対する予防効能をもつことを確認した（表1、図1）。
- ②疾患予防マーカーの探索・同定について、質量分析計を用いた手法を確立した（図2）。前処理ロボットで血液サンプルを分画、分注した後、微量タンパク質を定量的かつ網羅的に検出できる質量分析計 SELDI-TOF-MS（バイオリッド）で測定し、得られたスペクトルデータの中から変動のある因子を統計的に抽出する、マーカー探索システムを構築した（図2-1）。更に、各種タンパク質精製装置、試薬を組み合わせることで目的のマーカータンパク質を効率よく精製し、質量分析計を用いて同定する、精製・同定システムを構築した（図2-2）。この結果、マーカー探索から始まって、マーカー候補タンパク質を精製し、同定するまでの一連の技術をハイスループットで行えるようなシステムを確立することができた。
- ③3種類（糖尿病、糖尿病性腎症、動脈硬化症）の疾患予防マーカー（疾患発症前に検出されるマーカー）候補を疾患モデル動物の血清中に見出し、機能性食品を摂取させた群との比較解析により10種類のタンパク質を同定した（図3、表2）。また、研究初期の技術・手法の確立期においては、疾患特異的マーカー（疾患発症後に検出されるマーカー）や既知指標（血中コレステロール値など）と相関のあるマーカーも同定した（表2）。
- ④疾患予防マーカーのヒトでの検証を実施し、動物疾患モデル系で見つかったマーカー3つのうち、2つはヒトにおいても同様な挙動を示すことが確認できた。
- ⑤上記で見つかったマーカーのうち、既に抗体が市販されているものについてはそれを抗体チップに搭載すべく検討し、市販抗体のないものまたは市販抗体の特異性や反応性が不十分なもののうち、補体C3、アポリポタンパク質C1I1については新たにモノ

クローナル抗体の作製を実施した（図4、図5）。

- ⑥標準サンプル・ヒトプール血清・細胞抽出液中の糖尿病または糖尿病性腎症予防マーカー（hTTR、hAPO-C2、hC3a）を、3ステップ系（図6）にて複数同時に検出できる抗体チップを作製した（図7）。予備段階では、酸化障害、動脈硬化症、腫瘍関連マーカー検出用抗体チップも作製・評価した。検出系には蛍光が長期間安定な量子ドット（Qdot = Quantum dot：蛍光性半導体ナノ粒子）を採用した。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願PCT/JP2006/300115：糖尿病の予知・診断方法および糖尿病予知・診断用キット、出願人：(株)バイオマーカーサイエンス、吉川敏一
- ②特開2007 - 155691：物質の測定方法ならびに測定用組成物：住商ファーマインターナショナル株式会社
- ③Naito, Y., *et al.*：Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *BioFactors* 20: 49-59 (2004)
- ④Kato Y., *et al.*：Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine. *Free Rad Biol. & Med.* 38: 24-31 (2005)

■ 今後の展開方向

- ①測定できるようになった疾患予防マーカーを用いて、他の機能性食品の予防効果との関係を動物やヒトで更に検討し、評価する機能毎に有用なマーカーを選別する。この選別されたマーカーを用いることにより、新たな機能性食品の効率的な開発が可能となる。
- ②本コンソーシアムで確立した、タンパク質を探索・同定するプロテオミクス技術を応用し、食品に関する他の機能性を評価するマーカーを開発する。
- ③機能性評価マーカーに対する特異性の高いモノクローナル抗体作製技術を応用し、新規な有用モノクローナル抗体作製及び性能の不十分な市販抗体の改良に取り組む。
- ④本コンソーシアムで確立した抗体チップ作製技術を応用し、食品の機能性を総合的に判定できるような多マーカー同時測定用の抗体チップの開発・性能向上に取り組み、機能性食品開発を促進する。

■ 問い合わせ先

- ①機能性食品の予防効果の立証並びに疾患予防マーカーの検証：京都府立医科大学
(075-251-5508) (http://www2.kpu-m.ac.jp/~firstmed/index_j.html)
- ②機能性評価マーカーの探索・同定：(株)バイオマーカーサイエンス
(06-6943-1011) (<http://www.biomarker.co.jp/>)
- ③新規マーカーのモノクローナル抗体作製：名古屋大学大学院生命農学研究科
(052-789-4125) (<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~food/index.html>)
- ④抗体チップの測定系：住商ファーマインターナショナル(株)横浜研究所
(045-508-2171) (<http://www.summitpharma.co.jp/japanese/index.html>)

■ 研究成果の具体的図表

表 1 各種動物疾患モデル系における食品因子の機能性評価

動物疾患モデル	動脈硬化 (アポリポタンパク質E欠損マウス)	糖尿病性腎症 (db/dbマウス)	糖尿病 (OLETFラット)	メタリックシンドローム (KKマウス)	皮膚老化 (紫外線照射ヘアレスマウス)
食品因子	食品素材 G-1	動脈硬化抑制			
	食品素材 A-1	動脈硬化抑制			
	トコリエール	動脈硬化抑制			
	食品素材 D	動脈硬化抑制			
	アスタキサンチン		糖尿病性腎症予防	効果なし	内臓脂肪抑制
	オメガ3		糖尿病性腎症予防		
	食品素材 B			発症遅延、合併症予防	
	コエンザイム Q10				老化予防

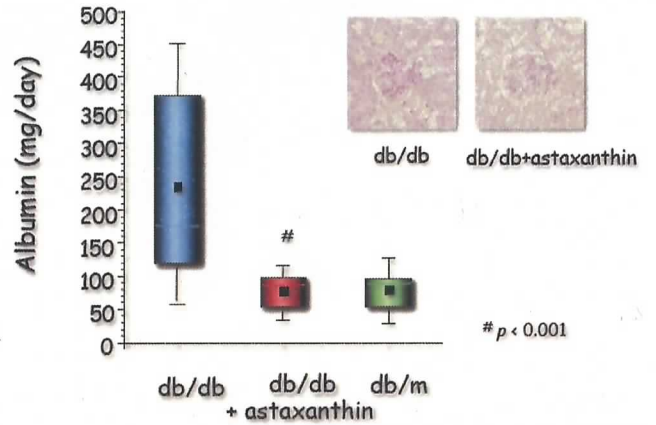


図 1 アスタキサンチンの糖尿病腎症発症予防効果
動植物に含まれ、抗酸化作用の強いカロテノイドの一種であるアスタキサンチンは、糖尿病性腎症の発症に伴って増加する尿中アルブミン量およびメサンギウム基質(右上図)を抑制した。
Albumin: 尿中アルブミン、db/db: 糖尿病マウス、db/db+astaxanthin: アスタキサンチン投与マウス、db/m: コントロールマウス

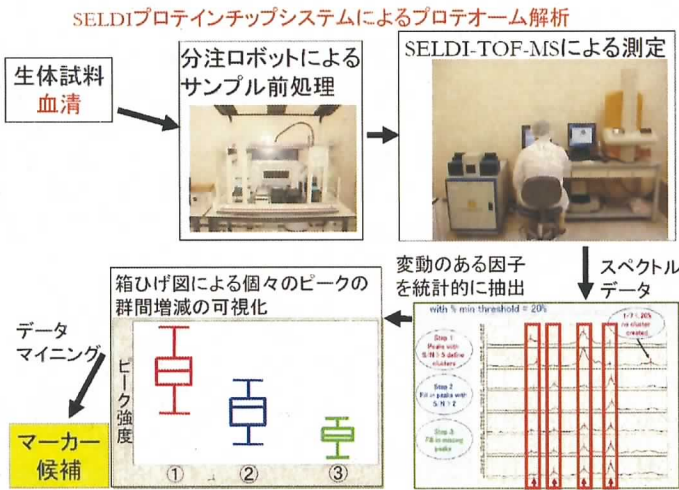


図 2-1 バイオマーカー探索技術の確立

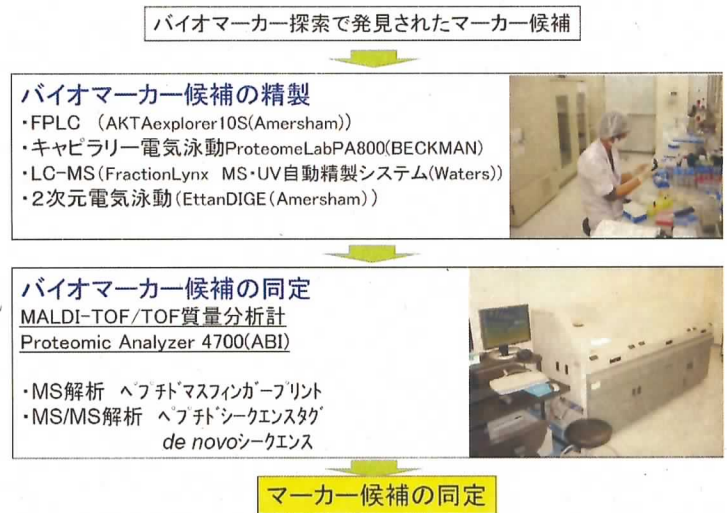


図 2-2 バイオマーカーの同定

糖尿病モデルラットの発症直前における糖尿病予防マーカー候補の増減

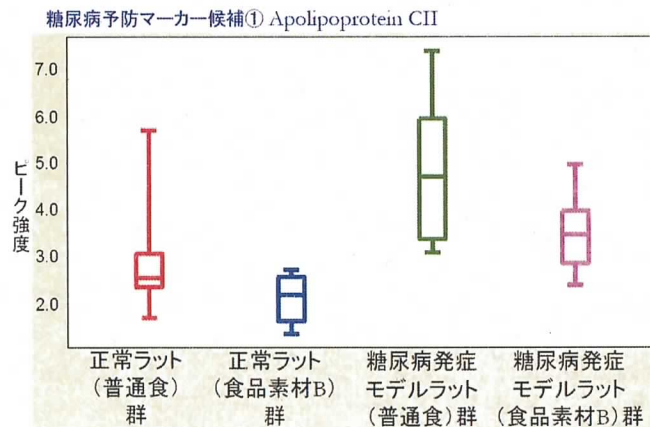


図 3 糖尿病モデルラットの発症直前における糖尿病予防マーカー候補(アポリポタンパク質 CII) の増減
アポリポタンパク質 CII は糖尿病発症リスク増大に伴って上昇し、食品素材摂取によって低下する。

表2 同定した疾患予防・特異的マーカー候補

糖尿病予防マーカー

分子量	タンパク質
8.3kDa	アポリポタンパク質 CII
13.8kDa	システニル化トランスサイレチン

糖尿病特異的マーカー

分子量	タンパク質
8.7kDa	アポリポタンパク質 CIII0
9.3kDa	アポリポタンパク質 CIII1
9.5kDa	アポリポタンパク質 CIII2
13.8kDa	システニル化トランスサイレチン
66.0kDa	アルブミン

糖尿病性腎症予防マーカー

分子量	タンパク質
7.9kDa	アポリポタンパク質 AII の断片
13.7kDa	トランスサイレチン
9.1kDa	補体 C3
9.3kDa	プロアポリポタンパク質 AII

動脈硬化予防マーカー

分子量	タンパク質
5.2kDa	アポリポタンパク質 AII の断片
7.0kDa	アポリポタンパク質 CI
8.7kDa	アポリポタンパク質 AII
21.0kDa	レチノール結合タンパク質

血中コレステロール上昇抑制機能評価マーカー

分子量	タンパク質
8.3kDa	β -2-ミクログロブリンの断片
8.9kDa	アポリポタンパク質 CII 前駆体

1G3, 1G7, 1H12, 2F3, 2G7, 2H12 (マウス1匹目: クローニング2回目)
1B8, 1F8, 3B9, 3G6 (マウス2匹目: クローニング1回目)

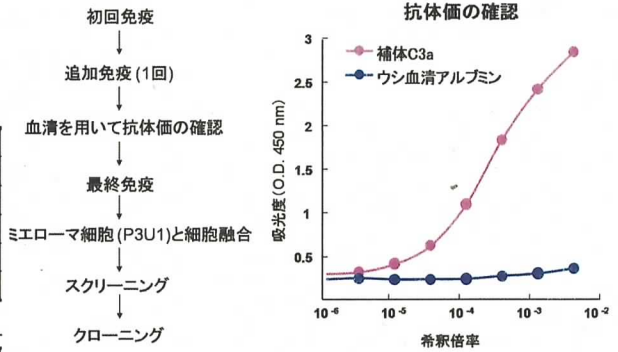
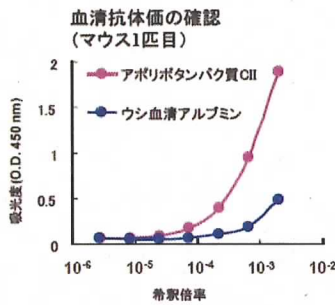
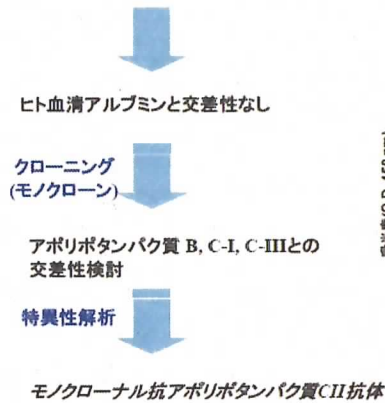
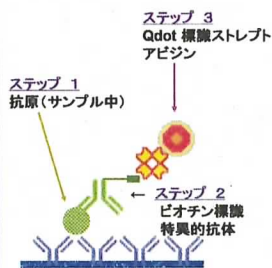
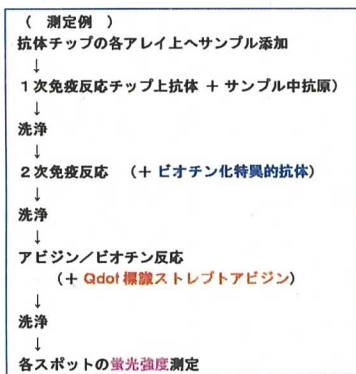


図4 抗補体 C3a 抗体の作製

C3a を 2 匹のマウスに免疫し、追加免疫後に ELISA による抗体価の確認を行った。その結果、抗体価の上昇が認められたマウス 1 匹について、最終免疫した後、細胞融合を行い、抗補体 C3a 抗体産生細胞のクローニングを実施した。

図5 抗アポリポタンパク質 CII 抗体の作製

アポリポタンパク質 CII を免疫したマウスの血清においてアポリポタンパク質 CII の抗体価が上昇したことを ELISA で確認した後、細胞融合を行い、抗アポリポタンパク質 CII 抗体産生細胞をクローニングした。クローニングの過程でヒト血清アルブミンとの交差性はみられず、モノクローナル抗アポリポタンパク質 CII 抗体を作製することができた。



ヒト血清中の3抗原(アポリポタンパク質 CII: hApoC2、補体 C3a、トランスサイレチン: hTTR)を、サンドイッチアッセイ系にて同時に検出できた。

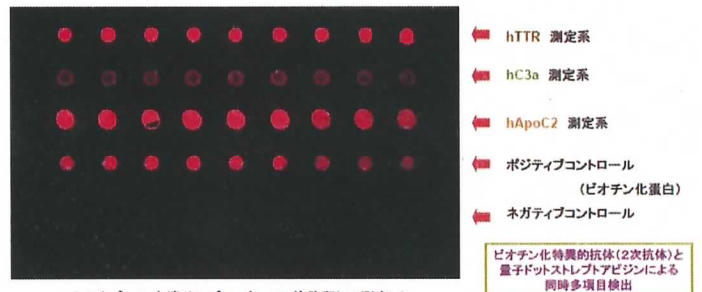


図6 抗体チップによる3ステップ測定系

- ステップ1: 1次免疫反応
- ステップ2: 2次免疫反応
- ステップ3: アビジン/ビオチン反応

図7 抗体チップによる3項目同時測定例 (ヒト血清)

- ポジティブコントロール: ビオチン化 BSA
- ネガティブコントロール: BSA