HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Discovery Research of Novel Biomarkers in Osteoarthritis using Glycoproteomics [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	石原, 武
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第6915号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56248
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Ishihara_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏　名　　石　原　　武

審査担当者	主　査	教　授	西村　紳一郎
	副　査	教　授	幸田　敏明
	副　査	教　授	綾部　時芳
	副　査	准教授	比能　洋
	副　査	特任助教	天野　麻穂

学 位 論 文 題 名

Discovery Research of Novel Biomarkers in Osteoarthritis using Glycoproteomics
(グライコプロテオミクスによる変形性関節症の新規バイオマーカー探索に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

近年の著しい高齢化に伴い、変形性関節症(OA)の患者数は増加している。しかしながら、OA に対する薬物治療は抗炎症あるいは疼痛治療薬による対症療法にとどまり、損傷を受けた軟骨組織を修復、再生することができる治療薬は未だ存在しない。その原因の１つとして、OA 治療薬の創薬研究の中で実用的なバイオマーカーが無く、研究開発に多大なコストと時間を要することが挙げられる。特に、関節部位における軟骨の減少により発症する OA の進行は非常に遅く、治験において、薬効評価期間が長期間要することが課題である。

本論文では、根本的な OA 治療薬に期待が持てる軟骨再生薬の創製をめざし、軟骨の再生過程を評価できる分化マーカーおよび OA に対する開発化合物の臨床研究で使用する疾患マーカーを探索することを試みた。新規バイオマーカー探索方法として、今まで活用されているバイオマーカーの多くが複合糖質であることから、糖タンパク質に着目した戦略をとった。また、昨今、Glycoblotting 法の開発による迅速かつ網羅的な N 型糖鎖解析、また、グライコプロテオミクスによる網羅的な糖タンパク質の検出および同定が可能になったことも、本研究を進めるにあたっての原動力となった。

軟骨分化マーカーの探索研究において、まず、マウス軟骨前駆細胞(ATDC5 cells)を軟骨細胞へ分化誘導後、経時的に回収した細胞の抽出物を用いて、Glycoblotting 法により N 型糖鎖のプロファイリングを実施した。その結果、ハイマンノース型糖鎖が軟骨分化に伴い顕著に増加するという新知見を得た。次に、この変動糖鎖を起点として、ハイマンノース型糖鎖を提示する糖タンパク質を ConA レクチンによる精製および LC/MS によるタンパク質

同定を実施したところ、246 個の糖タンパク質を同定できた。*In vitro* 薬効評価系に用いる有用な分化マーカーとしてのクライテリアを細胞表面タンパク質かつ軟骨既知マーカー(II 型コラーゲン)より早期に発現上昇する分子が適当であると考えた。そこで、遺伝子発現解析等を実施し、さらに絞り込んだところ、上記クライテリアを満たす分子を 15 個見出した。最後に、臨床予測性の向上のため、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨分化系において、これら 15 遺伝子の量的変動を確認したところ、5 つの遺伝子において、軟骨既知マーカー(II 型コラーゲン)より早期に発現上昇することが確認された。

OA の疾患マーカーの探索研究において、まず、新規血中バイオマーカー探索を行うためのグライコプロテオミクス法を構築した。血中バイオマーカー探索を行う上での大きな課題点は、血中に含まれるタンパク質の含有量の約 99%がアルブミンや免疫グロブリンなどの典型的な血液構成タンパク質であること、また、全てのタンパク質の濃度のダイナミックレンジは 10^{10} あり、病変組織から染み出た、バイオマーカー候補となりうるタンパク質は、10^{5}pg/mL 以下と非常に低濃度で存在していることである。そこで、本論文では、抗体カラムを用いて、高濃度タンパク質を除去し、ヒドラジドビーズで糖ペプチドを濃縮後、2 次元液体クロマトグラフィー/MALDI-TOF-MS で解析する方法を確立した。その結果、10^{3}〜10^{6} pg/mL の糖タンパク質が再現良く、同定できることがわかった。また、MS シグナルによる定量解析も可能であることも確認した。次に、約 2 年間のフォローアップ期間中において、病態（関節間隙狭小化）の進行が見られた OA 患者(OA 進行群)と見られなかった OA 患者(OA 非進行群)の血漿サンプルを入手した。そして、本解析法を用いて、群間で有意な差があり、関節間隙狭小化の程度と相関する分子を探索した。その結果、OA の進行度に相関する疾患マーカーとして、4 つの分子を見出した。

以上、本論文の著者は、グライコプロテオミクスを駆使することにより、OA 治療薬創製を目指した、薬効評価マーカーや疾患マーカーなど、複数個の有用な新規バイオマーカーを見出した。これにより、根本的な OA 治療薬に期待が持てる軟骨再生薬の創製に対して、貢献するところ大なるものがある。

よって著者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。