

氏名	大谷 敬亨		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	学術		
学位授与番号	博甲第4230号		
学位授与の日付	平成22年 9月30日		
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	細胞表面マーカー遺伝子発現ボディマップの作成およびリガンドスクリーニングを目的とした分子デザイン		
論文審査委員	教授 妹尾 昌治	教授 尾坂 明義	教授 大槻 高史

学位論文内容の要旨

早期診断技術として従来から開発されてきている DNA マイクロアレイに着目してその網羅的な情報解析技術とその応用に関する研究を行った。DNA マイクロアレイは、複雑な因果関係を含む膨大な情報を網羅的に取得することが可能であるため、診断領域での実用化が期待されているもののまだ解決すべき課題が多い。そこで本研究では、①疾病との関連が深く個々の細胞の生命維持機能に重要な役割を担っていると同時に細胞表面マーカーとしても利用可能な膜結合型タンパク質に焦点を絞り、②膨大なアレイ情報を3次元的なネットワークで表示することを可能にする球面自己組織化マップ(sSOM)を用いて高次解析を行うことを試みた。sSOMは一定の学習アルゴリズムにより、マイクロアレイから得られる遺伝子発現の多寡を示すデータを客観的に並べ変えるだけでなく、あるカテゴリー条件を満たす遺伝子の特定にも利用可能である。さらに、解析により特定されるある細胞に特異的な細胞表面マーカーが、疾病と関連する場合には、これに対するリガンドの分子設計を行い、設計された候補分子の中から、治療に有効なリガンドをスクリーニングすることで、実用的な治療方法の確立を効率化することを目的とした。

まず、独自に開発した細胞表面マーカー-DNA マイクロアレイを用いて正常マウスの複数の臓器に対して遺伝子発現プロフィールの解析を行い、sSOMにより表現される正常臓器ごとのボディマップを作成し、細胞表面マーカーによる各臓器の比較分類の可能性について検討した。次に心臓に焦点を絞り、sSOMを利用して心臓に特異的に高発現している細胞表面マーカーを選抜した。選抜した候補遺伝子について、組織中の mRNA を確認し、同時にタンパク質へ翻訳されていることを免疫化学的に確認することで、当該細胞表面マーカー-DNA マイクロアレイの実験結果と解析結果の整合性を確認した。加えて、選抜された細胞表面マーカーの治療へ応用していくために膜結合部分を除き、細胞外ドメインを用いて、リガンドスクリーニングに適切な分子としてデザインした可溶性受容体が、設計通りに機能していることが確認できた。以上より、細胞表面マーカー-DNA マイクロアレイおよび sSOM によるデータの high-resolution 解析の有用性が、正常組織のボディマップという形で示された。今後は、このボディマップを基にして、疾病モデルとの差異について解析を行っていくことで、新しい診断マーカーの探索に有効に活用できるものと考えられる。また、このような解析は、正常な臓器の細胞表面だけでなく疾病に特異的な細胞表面マーカーの特定にも結びつくことが容易に予想され、目的とする細胞表面マーカーが特定された場合、これを用いた分子デザインがリガンドスクリーニングのために適切であることを示唆することができた。

論文審査結果の要旨

早期診断技術として従来から開発されてきている DNA マイクロアレイは、複雑な因果関係を含む膨大な情報を網羅的に取得することが可能であるため、診断領域での実用化が期待されているもののデータの取得ならびに解析方法に関しては、解決すべき課題が多い。そこで本論文では、独自に開発した細胞表面マーカー DNA マイクロアレイを用いて正常マウスにおける主要な臓器の遺伝子発現プロファイルを作成し、膨大なアレイ情報を球面自己組織化マップ (sSOM) により解析し、ボディマップという従来には無い形で表現し、大規模データの可視化を可能にした。さらに、このボディマップから、細胞表面マーカーによる各臓器の比較分類の可能性について検討したところ心臓および肺などで、組織間の類似性が示されるといった新規知見が得られた。次に、心臓に焦点を絞り、sSOM を利用して心臓特異的に発現している細胞表面マーカー遺伝子候補を抽出したところ、候補遺伝子 ADP-ribosyltransferase 3 が見出され、組織中 mRNA の存在と同時にタンパク質への翻訳を免疫化学的に確認した。これにより、当該細胞表面マーカー DNA マイクロアレイと sSOM の組み合わせによるデータ解析の有効性と実用性が示された。このような方法で特定された遺伝子の詳細解析をはじめ分子標的治療を目的としたリガンドのスクリーニング方法を開発するために、疾患との関連性がよく知られている上皮成長因子受容体 (ErbB1、2、3 および 4) ファミリーをモデルとして、可溶性受容体を設計した。まず、ErbB の細胞外ドメインのみを利用した可溶性領域に抗体分子のヒンジ領域を融合して二量体形成を可能にし、分子の検出や固相化を容易にするために Flag タグを導入した。これらの可溶性受容体 ErbB は、既知のリガンドであるベータセルリンやヘレギュリンと本来の細胞膜結合型受容体と同等な親和性を示し、設計通りの機能的な分子が構築されていることが確認できた。以上より、当該細胞表面マーカー DNA マイクロアレイおよび sSOM によるデータの高次解析が、正常組織のボディマップという形で可視化でき、今後、疾病モデルとの差異を解析していくことで、新しい診断マーカーの探索や薬効の評価などに活用できると考えられる。また目的とするマーカーが特定された場合、細胞や組織を特異的に標的する分子のデザインが可能になり、臓器組織をピンポイントで標的可能なシステムを構築して新しい診断や治療に結びつけることができるものとして有望であると認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。