

氏名 渡 邊 浩 之

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 工 学

学位授与番号 博乙第 3451 号

学位授与の日付 平成 12 年 3 月 25 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第 4 条第 2 項該当)

学位論文の題目 生理活性ペプチド・タンパク質の高感度酵素免疫測定法の
確立および生体機能解析への応用

論文審査委員 教授 山田秀徳 教授 穴戸昌彦 教授 大森齊

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

生理的条件では活性物質が極微量しか存在しないようなペプチドやタンパク質の生理的機能を解析するため、生理的条件下での活性体を高感度に定量する方法を確立することが必要不可欠である。一方、医薬品として開発すること等も試みられている組換えタンパク質の体内動態を正確に知るためには、本来生体に存在する野生型と選択性よく区別して測定できることも必要となる。

本研究では、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) および、bFGF の組換えタンパク質である bFGF-CS23 を例として取り上げ、それらの高感度で特異的な酵素免疫測定法を確立し、実用性の検証を行った。

まず、ヒト血漿中 ANP を 5pg/ml まで測定できるサンドイッチ型酵素免疫測定法を設定した。本測定系を応用することで、心筋症等の疾患で高値の ANP を検出することができ、本測定系が心疾患の診断に利用できる可能性が示唆された。

次に、生物活性を持つ bFGF を特異的に 1 pg/assay まで測定できるサンドイッチ型酵素免疫測定法を設定した。本測定系を応用することで、種々の部位における腫瘍が bFGF を産生し血管新生を誘導していることを示唆する結果を得た。一方、ディシェンヌ型筋ジストロフィー患者でも、骨格筋細胞からの bFGF の漏出が骨格筋の線維化および退化を引き起こしていると思われる結果を得ることができ、bFGF が増悪因子としての生理的意義を持つ疾患の存在が示唆された。

最後に、bFGF の組換えタンパク質である bFGF-CS23 に特異的で天然の bFGF と区別して測定できるサンドイッチ EIA を設定した。これを利用して、bFGF-CS23 をトランスフェクトした細胞株を移植したマウス尿中に bFGF-CS23 を検出し、腫瘍由来の bFGF-CS23 が尿中に排出されることを示し、がん患者尿中に腫瘍由来の bFGF が排出されることを裏付けることができた。

このようにそれぞれの研究目的に適した高感度で特異的な酵素免疫測定法が確立でき、それを応用することにより病態関連因子としての機能に関する新たな知見を得ることができたことからその実用性も証明することができた。今後、生理活性が未知のペプチドやタンパク質が同定された際に、それらの生理的な意義の解明を目指すうえで、このような手法の重要性が高まるであろう。

論文審査結果の要旨

極微量の生理活性ペプチドあるいはタンパク質の高感度定量法を確立することは、その生理的機能を解析するために必要不可欠である。また、医薬品等として生体に投与された組換えタンパク質の体内動態を正確に知るためには、本来生体に存在する野生型と選択性よく区別して測定できることも必要となる。

申請者は、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)および、bFGFの組換えタンパク質である bFGF-CS23 を例として取り上げ、それらの高感度で特異的な酵素免疫測定法の確立に成功した。さらに、それらを応用することでいくつかの重要な知見を得ている。

まず、ヒト血漿中 ANP を 5pg/ml まで測定できるサンドイッチ型酵素免疫測定法を設定した。さらに、設定した測定系を応用することで、心筋症等の疾患で高値の ANP を検出することができ、ANP 濃度の測定が心疾患の診断に利用できる可能を示した。

次に、生物活性を持つ bFGF を特異的に 1 pg/assay まで測定できるサンドイッチ型酵素免疫測定法を設定した。設定した測定系を応用することで、種々の部位における腫瘍が bFGF を産生し血管新生を誘導している可能性を示した。一方、ディシェンヌ型筋ジストロフィー患者でも、骨格筋細胞からの bFGF の漏出が骨格筋の線維化および退化を引き起こしていると思われる結果を得、bFGF が増悪因子としての生理的意義を持つ疾患の存在を示した。

最後に、bFGF の組換えタンパク質である bFGF-CS23 に特異的で天然の bFGF と区別して測定できるサンドイッチ EIA を設定した。これを利用して、bFGF-CS23 をトランスフェクトした細胞株を移植したマウス尿中に bFGF-CS23 を検出し、腫瘍由来の bFGF-CS23 が尿中に排出されることを示すことにより、がん患者尿中に腫瘍由来の bFGF が排出されることを示した。

このように、申請者はそれぞれの研究目的に適した高感度で特異的な酵素免疫測定法を確立することに成功した。さらに、それらを応用することにより病態関連因子としての機能に関する新たな知見を得ることにより、それらの実用性も証明した。これらの成果は、今後未知のペプチドやタンパク質が同定された際に、それらの生理的な意義の解明を目指すうえでの重要な指針を示すものであり、極めて重要である。よって、博士の学位を授与するにふさわしいと認める。