

氏名	こばやし ひろのり 小林 弘典
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	甲第158号
学位授与年月日	平成16年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	多種類タンパク質発現量自動測定システムの開発に関する研究
学位論文審査委員	(主査) 水本 洋 (副査) 田中久隆 河田康志 有井士郎

## 学位論文の内容の要旨

臨床現場において、組織や細胞の中に含まれるがんの増殖機序に関連する可能性の高いタンパク質の存在を検知し、そのタンパク質の存在量からがん細胞の薬剤に対する感受性について特徴付けることが可能になれば診断の精度や治療の効果を高めることができると期待される。本学位論文の主題は、診断や治療を支援するタンパク質解析システムを実現する第一歩となる、がんの増殖に関連したタンパク質の量を示す発現量を自動的に測定できるシステムの研究・開発である。この研究・開発においては、臨床現場で使用できるシステムを実現するために、実験室で行われているような組織や細胞試料の遠心分離や精製、電気泳動などの手作業を不要にすることや短時間で多数項目のタンパク質を測定できることを考慮している。さらに測定に必要な試薬の種類やその使用量を少なくしてランニングコストを低くすることも考慮している。

本論文ではまず、自動化に適した粗タンパク質直接固相法 (CPDIB 法) と名付けたタンパク質発現量の測定方法について述べている。この測定方法は、従来技術の欠点を解決するために他の研究者と行った討議の中で着想を得たものである。粗タンパク質直接固相法を具現化するときの技術課題を解決するためには、新規に要素部品や装置などを設計・開発する必要が生じた。本論文では、主な新規開発要素について、タンパク質発現量自動測定システムの構成要素としての性能を評価している。新規開発要素の1つで ImmobiChip と名付けた免疫反应用部品はタンパク質を固相化するメンブレンを保持する器具で、CPDIB 法を実現するための要となる要素である。この ImmobiChip には独立した免疫反応を実現できる区画を設けることにより、一度に複数の試料から多種類のタンパク質をメンブレン上に固相化させて検出することを可能にしている。本論文では、ImmobiChip の設計から、独立した免疫反応区画を実現するために ImmobiChip の構成部品に施した精密加工について詳述している。

つぎに本論文では、タンパク質発現量測定システムを構成する ImmobiChip やその保持具、試料分注ロボット、廃液ポンプなどの各ハードウェアを密接に、有機的に結び付ける標準手順を策定し、その手順に従ってすべての動作を効率よく進行させ、監視・制御するソフトウェアについて述べている。このようにして完成されたタンパク質発現量自動測定システムを使って、雑多なタンパク質を含むがん由来の種々の培養細胞からがんの増殖に関連性があると考えられている4種類のタンパク質について発現量を測定し、本研究で開

発した測定システムの能力について考察した。その考察をもとに本論文では、各培養細胞を多種類のタンパク質の発現量で特徴付けできることを示すとともに、培養条件によってタンパク質の発現量が増加することを明らかにして、がん細胞の薬剤に対する感受性を検知できる可能性について述べている。

これまでに、未精製の組織由来の細胞に含まれる多種類のタンパク質の発現量を自動的に測定できるシステムは存在せず、本研究により初めて一台の自動測定システムとしてまとめあげられた。このタンパク質自動測定システムは、発現量測定を単なるタンパク質研究の一つの手法から、臨床現場で実施される新たな検査法へとその価値を変化させると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は生体試料中に含まれる各種タンパク質の発現量を自動的に測定できるシステムの開発に関する研究をまとめたものである。このシステムの開発目的は医療現場での診断や治療を支援することである。これまでもタンパク質の発現量をタンパク質の抗原抗体反応を利用して測定する方法は数種開発されている。しかしながら、それらの方法は研究室や実験室での作業を前提とするものであり、熟練オペレータによる複雑な処理手順を必要とするため、臨床での使用には不向きであった。

そこで本論文ではまず、従来のタンパク質発現量測定方法を改良した「粗タンパク質直接固相法」(CPDIB法)と名付けた測定方法を提案している。提案されたCPDIB法は処理の自動化が可能であり、抗原抗体反応に必要な試薬などの消費量も節減できるなど臨床での使用に適していると認められる。

次に本論文では、このCPDIB法を具体化するに当たって必要となる要素部品や装置、ソフトウェアなどの設計・製作について述べられている。特に新規開発要素の1つであるImmobiChipと名付けた器具は多数の区画を持ち、それぞれの区画ごとにタンパク質を固相して免疫反応させるもので、CPDIB法を実現するための要となる要素である。本論文ではこのImmobiChipの設計から製作に至るまでの過程が詳述されている。このImmobiChipのほか、試料分注ロボットや廃液ポンプなどによりタンパク質発現量自動測定システムが構成される。本論文では測定の自動化をめざしてこれらの各ハードウェアを密接・有機的に結び付けるために開発された制御ソフトウェアについて述べられている。以上のハードウェア、ソフトウェアの設計・製作は工学的手法により適切かつ合理的に行われたものと認められる。

最後に本論文では、完成されたタンパク質発現量自動測定システムを使って、がん由来の培養細胞中のがんの増殖に関連する4種類のタンパク質の発現量の自動測定を試みている。その結果、各培養細胞を4種類のタンパク質の発現量で特徴付けできることを示すとともに、培養条件によってタンパク質の発現量が増加することを明らかにできた。このことは、がん細胞の薬剤に対する感受性を本システムによって検知できる可能性を示すものと評価できる。

これまでに、生体試料に含まれる多種類のタンパク質の発現量を自動的に測定できるシステムは存在しておらず、本論文において述べられた工学的手法によって初めて自動測定システムとしてまとめあげられた。したがって、本論文の完成により、タンパク質発現量測定を単なる研究手法から、臨床で実施可能な新たな検査法へ発展させることが可能となり、その社会的意義は大きいと判断できる。

以上により本論文は博士(工学)の学位論文に値するものと認められる。