

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実施状況報告書(平成22年度)

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ペプチドアレイを用いたアレルギー疾患病態モニタリングシステムの開発
研究機関・ 部局・職名	名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
氏名	大河内美奈

### 1. 当該年度の研究目的

本研究では、ペプチドアレイを用いたアレルギー疾患の病態モニタリングシステムの開発を目的としており、抗原タンパク質のアミノ酸配列に基づいたガラススライド型のペプチドアレイを作製し、短時間解析プロトコルの標準化について検討した。本解析法を多数の患者に適用することにより、従来のタンパク質レベルの解析では難しいアレルギー患者の高精度判別が可能となる。また、ペプチドアレイによる抗体エピトープ解析で得られた情報を細胞レベルで検証するため、アレルギー反応に関与するIgE受容体をもつ細胞である好塩基球や肥満細胞を用いた少数細胞におけるアレルギー応答の検出系を設計する。モデル細胞として、RBL-2H3細胞をアレイし、脱顆粒応答をカルシウム蛍光プローブにより可視化する。

### 2. 研究の実施状況

ガラススライド型ペプチドアレイの解析については、ミルクアレルギー患者血清中のIgEおよびIgG4抗体エピトープの短時間解析プロトコル標準化について検討した。ペプチドアレイは、主要抗原タンパク質である $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ S1-カゼイン、 $\alpha$ S2-カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、 $\kappa$ -カゼインのアミノ酸配列に基づいた16残基ペプチドライブラリーをアレイ化した。ハイブリチャンバーを用いた転倒攪拌法により血清、次に蛍光標識抗IgEと抗IgG4混合液と反応させたところ、それぞれ30分間の反応時間で従来法(血清:over night、抗IgE・IgG4混合液:3時間)と同等の感度で検出できた。これより、本解析法を抗体エピトープ解析の標準プロトコルとして用いることにした。現在、これまでに収集した患者血清を用いて100人規模のエピトープ解析を行っており、陽性患者と陰性患者の高精度判別について検討している。また、アレルギー陰性化の過程において重要となるペプチドを解析するため、フォローアップ検体を用いた解析についても実施している。

細胞アレイによるアレルギー応答検出については、モデル細胞としてIgE受容体を発現しており脱顆粒応答を示すRBL-2H3細胞を用い、抗原添加時の脱顆粒応答をカルシウム蛍光プローブFluo-4AMにより可視化した。ポリ-L-リジンコートアレイを用いて500細胞ずつスポットし、ジニトロフェニル基(DNP)を認識するIgE抗体を結合させたところ、DNP標識タンパク質濃度に応じてアレルギー応答がみられ、少数細胞でのアレルギー応答の検出が可能となった。また、DNP-Lysを抗原と同時に加えたところ、DNP-Lys濃度に応じてアレルギー応答が抑制された。これより、アレルギー反応の抑制に関与する抗体エピトープの検出系が確立した。

3. 研究発表等

雑誌論文 計1件	(掲載済み一査読有り) 計0件  (掲載済み一査読無し) 計0件  (未掲載) 計1件 Toshikazu Takeshita, Mina Okochi, Ryuji Kato, Chiaki Kaga, Yasuyuki Tomita, Satoshi Nagaoka, Hiroyuki Honda: Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis. Journal of Bioscience and Bioengineering (in press)
会議発表 計5件	専門家向け 計4件 ・Mina Okochi, Taku Matsumura, Hiroyuki Honda: Evaluation of invasive capacity of tumor cells using magnetically micropatterned multicellular spheroid. The 5 <sup>th</sup> International Workshop on approaches to single-cell analysis. March 4, 2011. The University of Tokyo, Tokyo. ・大河内 美奈、酒井 雄規、伊佐治 弥生、本多 裕之「赤血球を用いた糖尿病合併症リスク予測センサ」化学工学会第76回大会、2011年3月22日、東京農工大学、東京 ・落合崇、大河内美奈、本多 裕之「酵素阻害ペプチド探索のためのフォトリンカーペプチドアレイの構築」化学工学会第76回大会、2011年3月24日、東京農工大学、東京 ・大河内美奈、片山真、加藤竜司、松島充代子、川部勤、吉良茂樹、吉田安子、川瀬三雄、本多裕之「ペプチドアレイを用いたミルクアレルギー疾患の診断」2011年3月29日、横浜国立大学、横浜 一般向け 計1件 ・大河内美奈「ペプチドアレイによる食物アレルギーの疾患診断」 ナノバイオ Expo2011 第7回ナノバイオ国際シンポジウム、2011年2月16日、東京ビッグサイト、東京
図書 計0件	該当なし
産業財産権 出願・取得状況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	該当なし
国民との科学・技術対話の実施状況	該当なし
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	該当なし
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	113,000,000	0	70,974,000	42,026,000
間接経費	33,900,000	0	21,292,200	12,607,800
合計	146,900,000	0	92,266,200	54,633,800

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	70,974,000	0	70,974,000	1,593,518	69,380,482
間接経費	0	21,292,200	0	21,292,200	0	21,292,200
合計	0	92,266,200	0	92,266,200	1,593,518	90,672,682

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	1,590,788	Anti DNPモノクローナル、メディカルフリーザ等
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	2,730	振込手数料
直接経費計	1,593,518	
間接経費計	0	
合計	1,593,518	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名