

課題番号	LS005
------	-------

**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23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	タンパク質絶対発現量プロファイルを基盤とする次世代がん診断技術の創出
研究機関・ 部局・職名	熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
氏名	大槻 純男

1. 当該年度の研究目的

研究代表者である大槻は、従来のプロテオミクスとは全く異なるコンセプトで質量分析計をもちいて複数の標的タンパク質の絶対発現量を高感度に一斉定量することに成功した。本定量技術は配列からタンパク質の定量系を構築すること、1アミノ酸の変異や修飾を特異的に検出すること、膜タンパク質を含めたタンパク質 40 分子を一斉に定量することが可能である。平成 23 年度は、質量分析を用いたがん関連分子の定量系を構築し、ヒトがん検体および血液において定量を行い定量系と定量値の評価をおこなう。定量値情報は随時、検体提供先の臨床医にフィードバックを行い、個別化治療への可能性について議論を行い、可能なケースについては、倫理委員会承認の上、個別化治療臨床試験の実施を行う。さらに、血液中のタンパク質の定量について新しい定量システムの開発と高感度高精度質量分析装置の導入をおこなう。

2. 研究の実施状況

前年度定量の設計を行った分子について質量分析を用いた高感度一斉定量系を構築した。この結果、現在市販されている分子標的薬の標的分子のうち受容体に関してはほぼ網羅する定量系が構築できた。また、血液診断で計測されるタンパク質マーカーについても一般診断マーカー15 種類、腫瘍マーカー6 種類の定量系が構築でき、1uL の血清を用いて定量が可能である事を明らかにした。この結果は、本システムを用いることによって微量の血液検体から多くの診断マーカーを同時に定量し、診断に応用する事が可能であることを示している。

構築した定量系を用い、患者腫瘍検体および血液検体の計測を行った。脳腫瘍の解析によって、正常脳には分子標的薬の標的分子タンパク質がほとんど発現していないのに対し、脳腫瘍検体においては異常高発現が認められる分子が存在し、その発現量は極めて個人差が大きいことを明らかにした。このことは、タンパク質発現量に基づく個別化治療の必要性を示している。脳腫瘍個別化治療に関しては第一例目の臨床試験結果を論文報告すると共に、新しい臨床試験を開始し、現在経過を観察中である。血液中のタンパク質定量について、イオン抑制を低減する技術と多検体を解析する技術の開発に成功した。後者の技術を用いて膵がん診断のマーカー候補分子の 97 検体を対象とした評価を行い、膵がん患者で有意に高値となることを示した。

生体試料におけるタンパク質の定量はノイズの低減が高感度化と信頼性の高い定量に必須である。そこ

で、これまで使用してきた三連四重極型とは異なる原理である高感度高精度質量分析装置の導入を行った。導入のための予備検討において、ノイズ低減の効果が極めて高く、従来法と比較しさらに高感度化が可能な結果を得ている。ただし、データ量が膨大となるためデータ処理方法等について診断に適したシステムを今後構築する必要がある。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計11件
計14件	<ol style="list-style-type: none"> 1. K. Ito, Y. Uchida, S. Ohtsuki, S. Aizawa, H. Kawakami, Y. Katsukura, J. Kamiie, T. Terasaki: Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. J Pharm Sci. 100:3939-3950 (2011) 2. Y. Uchida, S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie, T. Terasaki: Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. J Neurochem. 117:333-345 (2011) 3. M. Fujiyoshi, M. Tachikawa, S. Ohtsuki, S. Ito, Y. Uchida, S. Akanuma, J. Kamiie, T. Hashimoto, K. Hosoya, T. Iwatsubo, T. Terasaki: Amyloid-β peptide(1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. J Neurochem. 118:407-415 (2011) 4. R. Shawahna, Y. Uchida, X. Decleves, S. Ohtsuki, S. Yosif, S. Dauchy, A. Jacob, F. Chassoux, C. Dumas, P.O. Couraud, T. Terasaki, J.M. Scherrmann: Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. Mol. Pharm. 8:1332-1341 (2011) 5. Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki: Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics (ppx): reconstruction of in vivo brain distribution of 11 p-glycoprotein substrates based on the bbb transporter protein concentration, in vitro intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther., 339:579-588 (2011) 6. S. Akanuma, Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, M. Tachikawa, T. Terasaki, K. Hosoya: Molecular-weight-dependent, anionic-substrate-preferential transport of β-lactam antibiotics via multidrug resistance-associated protein 4. Drug Metab. Pharmacokin., 26:602-311 (2011) 7. S. Ohtsuki, Y. Uchida, Y. Kubo, T. Terasaki: Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy and prospects. J Pharm Sci., 100:3547-3559 (2011) 8. O. Schaefer, S. Ohtsuki, H. Kawakami, T. Inoue, S. Liehner, A Saito, A. Sakamoto, N. Ishiguro, T. Matsumaru, T. Terasaki, T. Ebner: Absolute quantitation and differential expression of drug transporters, cytochrome p450 enzymes and udp-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. Drug Metab. Dispos. 40:93-103 (2012) 9. S. Ohtsuki, O. Schaefer, H. Kawakami, T. Inoue, S. Liehner, A Saito, N. Ishiguro, W.Kishimoto, E. Ludwig-Schwellinger, T. Ebner, T. Terasaki: Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochrome P450s and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. Drug Metab. Dispos. 40:83-92 (2012) 10. A. Yoshikawa, M. Nakada, S. Ohtsuki, Y. Hayashi, W. Obuchi, Y. Sato, C. Ikeda, T. Watanabe, Y. Kawahara, T. Hasegawa, A. Sabit, D. Kita, Y. Hayashi, T. Teraaki, J. Hamada: Recurrent anaplastic meningioma treated by sunitinib based on the absolute quantitative proteomics: a case report. Neuropathology and Applied Neurobiology. 38:105-110 (2012) 11. K. Ohmine, K. Kawaguchi, S. Ohtsuki, F. Motoi, S. Egawa, M. Unno, T. Terasaki: Attenuation of phosphorylation by deoxycytidine kinase is key to acquired gemcitabine resistance in a pancreatic cancer cell line: targeted proteomic and metabolomic analyses in PK9 cells. Pharm Res. Epub ahead of print.
	(掲載済み一査読無し) 計3件
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 内田康雄、大槻純男、寺崎哲也: Pharmacoproteomics (PPx)に基づく血液脳関門輸送機能の解明、遺伝子医学 MOOK19、148-154 (2011)

様式19 別紙1

	<p>2. 元井冬彦、川口桂、大峰健、大槻純男、大塚英郎、力山敏樹、片寄友、江川新一、寺崎哲也、海野倫明: 腫がん個別化医療-分子生物学形跡を中心に-, 外科, 73:1073-1078 (2011)</p> <p>3. 立川正憲、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也: 定量的絶対標的プロテオミクスに基づくヒト血液脳関門におけるトランスポーターの発現と生理機能、脳 21, 14:42-48 (2011)</p>
<p>会議発表 計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <p>1. S. Ohtsuki: Quantitative Targeted Proteomics for Drug Development. APISX2011, Tainan, Taiwan, Apr 22-25, 2011</p> <p>2. Y. Uchida, S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C. Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie, T. Terasaki: Quantitative targeted absolute proteomics (qtap) of human blood-brain barrier transporters and receptors. APISX2011, Tainan, Taiwan, Apr 22-25, 2011</p> <p>3. 大槻純男: タンパク質発現からみたがんの個人差と薬剤感受性機構、第 6 回がん・エピゲノム研究会、2011 年 4 月 27 日、仙台</p> <p>4. 大槻純男: 質量分析を用いたタンパク質定量解析によるバイオマーカー評価と臨床応用、第 61 回日本電気泳動学会シンポジウム・第 7 回臨床プロテオーム研究会 2011 連合大会、2011 年 5 月 9-10 日、山口</p> <p>5. 大槻純男: 定量的プロテオミクス(MRM 法)によるターゲット探索から創薬研究応用まで、第 15 回薬物動態談話会セミナー、2011 年 8 月 24-26 日、大阪</p> <p>6. 大槻純男: 量と活性からの生体内でのトランスポーター機能の再構築、日光シンポジウム、2011 年 12 月 17 日、日光</p> <p>7. 大槻純男: 質量分析による次世代タンパク質定量法と創薬臨床研究への応用、プロテオミクスを基盤とした病態システムズバイオロジー教育研究拠点の構築主催セミナー、2012 年 2 月 23 日、熊本</p> <p>8. 大槻純男: 定量的プロテオミクスによる創薬ターゲット探索と医薬品開発への利用、育薬塾セミナー、2012 年 3 月 9 日、千葉</p> <p>一般向け 計 3 件</p> <p>1. 大槻純男: 定量的標的プロテオミクスによるファーマコプロテオミクスへの展開、三井情報バイオサイエンスセミナー、2011 年 11 月 28 日、東京</p> <p>2. 大槻純男: 定量的プロテオミクスを分子生物学のツールとして使うための限界と工夫、ABSCIEX タンパク質定量セミナー、2012 年 2 月 9 日、大阪</p> <p>3. 大槻純男: 定量的プロテオミクスを分子生物学のツールとして使うための限界と工夫、ABSCIEX タンパク質定量セミナー、2012 年 2 月 15 日、東京</p>
<p>図書 計 3 件</p>	<p>1. 大槻純男: 中枢への薬物分布におけるトランスポーターの機能と役割、創薬研究の戦略(上)、日本薬理学会編、金芳堂、京都、169-176 (2011)</p> <p>2. 内田康雄、大槻純男、大峰健、寺崎哲也: 血液脳関門における薬物トランスポーターの役割、トランスポートソームの世界 —膜輸送研究の源流から未来へ—、金井好克、竹島浩、森泰生、久保義弘編、京都廣川書店、東京、282-290 (2011)</p> <p>3. 大峰健、久保義行、大槻純男、内田康雄、寺崎哲也: 定量的トランスポート解析のための質量分析による膜タンパク質絶対定量法、トランスポートソームの世界 —膜輸送研究の源流から未来へ—、金井好克、竹島浩、森泰生、久保義弘編、京都廣川書店、東京、405-410 (2011)</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 2 件</p>	<p>(取得済み) 計 1 件</p> <p>1. 上家潤一、大槻純男、寺崎哲也、質量分析計を使った膜タンパク質の定量方法、Method of quantifying membrane protein by using mass spectrometer、韓国特許登録第 10-1035213 号、2011 年 5 月 11 日</p> <p>(出願中) 計 1 件</p> <p>1. 大槻純男、寺崎哲也、質量分析における安定同位体標識標的ペプチド断片の作製方法、特願 2011-161351、2011 年 7 月 22 日</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.ohtsuki-lab.jp</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>東北大学オープンキャンパスでの高校生への研究概要の紹介(ポスター掲示、説明者を配置し随時参加者に説明) 2011 年 7 月 27 日、28 日、参加者数 2,940 名(2 日間のべ合計人数)</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載計0件	ありません
その他	ありません

4. その他特記事項

ありません

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	128,000,000	24,890,000	50,000,000	53,110,000	0
間接経費	38,400,000	7,467,000	15,000,000	15,933,000	0
合計	166,400,000	32,357,000	65,000,000	69,043,000	0

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	当該年度返還 額
直接経費	24,693,566	50,000,000	0	74,693,566	74,013,060	680,506	0
間接経費	7,407,000	15,000,000	0	22,407,000	17,338,181	5,068,819	0
合計	32,100,566	65,000,000	0	97,100,566	91,351,241	5,749,325	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	59,066,984	質量分析、保存機器、遠心機、実験試薬等
旅費	1,316,921	研究成果発表旅費(国内、国外学会)等
謝金・人件費等	0	
その他	13,629,155	質量分析装置リース代、学会参加費
直接経費計	74,013,060	
間接経費計	17,338,181	
合計	91,351,241	

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
リアルタイムPCR	StepOne Plus	1	2,976,750	2,976,750	2011/11/21	東北大学
超低温槽	CLN-51UW	1	1,932,000	1,932,000	2012/2/29	熊本大学
高分解能質量分析 装置	ABSCIEX TripleTOF5600	1	46,042,500	46,042,500	2012/3/19	熊本大学
安全キャビネット	1355	1	1,134,000	1,134,000	2012/3/19	熊本大学
濃縮遠心システム	CC-105	1	1,050,000	1,050,000	2012/3/22	熊本大学
微量高速冷却遠心 機	MX-307	1	1,312,500	1,312,500	2012/3/22	熊本大学