

課題番号	LR016
------	-------

**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25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抗体エピトープ解析に基づいた食物アレルギー診断法の開発を目的とする。前年度までに、ミルクアレルギーを例に牛乳に含まれるタンパク質のアミノ酸配列に基づいたミルクペプチド網羅アレイの開発と臨床検体の解析を行った。本年度は、①患者群判別解析による重要エピトープの選出とミニアレイ作製②電気化学検出法によるアレルギー解析デバイスの開発③アレルギーマウスの作製と細胞レベルでのアレルギー応答試験によるペプチドエピトープの機能解析④ペプチドビーコンの開発による抗体の非標識検出について研究を推進する。ペプチドアレイを用いて各検体のアレルギー応答において重要となるエピトープを明らかにすることは、治療指針の提供につながり、新たなアレルギー治療法の開発に向けた研究の基礎となるものとする。

2. 研究の実施状況

①牛乳アレルギー臨床検体におけるアレルギー症状の経過に基づいた IgE および IgG4 エピトープの解析を行い、患者群判別において重要となる 50 ペプチドを選出した。これらのペプチドをプローブとしたミニアレイを作製し、患者血清 10 μl を用いた解析を行った。抗体エピトープ解析により、アレルギー寛解時期の推定が可能であると示唆され、アレルギー患者の治療指針を提供できる可能性が示された。

②半導体集積回路 MOSFET を作製し、前年度までに検討した検出法(酵素アルカリホスファターゼ標識抗 IgE 抗体を用いた脱リン酸化反応をポテンシオメトリー法にて検出する)において電極機能を評価した。抗原特異的 IgE 量に応じたシグナルが得られ、アレルギー検出に利用できることが示唆された。

③マウスに抗原タンパク質をアラムゲルと共に腹腔内投与することで免疫し、アレルギーマウスを作製した。抗原免疫 1 週間後に採血したところ、IgE 量の上昇がみられ、ペプチドアレイを用いた解析により抗体エピトープ情報を取得した。アレルギーマウスに抗原を投与すると直腸温の低下、げり、かゆみなどアレルギー応答が観察された。また、好塩基球 RBL-2H3 を用いて血清 IgE を感作したところ、抗原添加による脱顆粒応答がみられ、本アッセイ系による抗原エピトープの機能を解析できた。

④抗体の非標識検出に向け、抗体に特異的に結合する 8 残基ペプチドを IgG 受容体のアミノ酸配列から設計した。抗体結合ペプチドに結合するクエンチャーペプチドを設計し、抗体非存在下では消光し、存在下では蛍光を発する検出条件を検討した結果、抗体濃度依存的な応答が観察され、ペプチドビーコンを用いた抗体の非標識検出に成功した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計11件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tomoya Sugita, Makoto Katayama, Mina Okochi, Ryuji Kato, Takamitsu Ichihara, Hiroyuki Honda (2013) Screening of peptide ligands that bind to the Fc region of IgG using peptide array and its application to affinity purification of antibody. <i>Biochem. Eng. J.</i> 79: 33–40. 2. Tomoya Sugita, Mina Okochi, Hiroyuki Honda (2014) Design of quenching peptide probes incorporating tryptophan for rapid IgG detection. <i>Chem. Lett.</i> 43:550-552. 3. Mitsuhiro Shikida, Tatsuaki Sugito, Mina Okochi, Hiroyuki Honda (2014) Droplet-based biochemical assay by magnetic wire manipulation between multiple droplets. <i>Microsystem Technologies</i>, 20:315–323. 4. Akiko Yusa, Makoto Toneri, Seiji Ito, Taisuke Masuda, Shuhei Yamamoto, Mina Okochi, Naoto Kondo, Hiroji Iwata, Yasushi Yatabe, Yoshiyuki Ichinosawa, Seichin Kinuta, Eisaku Kondo, Hiroyuki Honda, Fumihito Arai, Hayao Nakanishi (2014) Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) using 3D Palladium Filter and its Application for Genetic Analysis. <i>PLOS ONE</i> 9(2), e88821 5. Hisayuki Sugiura, Noriyasu Okazaki, Toshimi Sugiura, Hiroyuki Honda, Mina Okochi (2014) Degranulation of basophilic leukemia cells on branched-chain peptide array with an OVA-DNP double epitope. <i>Biochem. Eng. J.</i>, 87:8-14. <p>(掲載済み一査読無し) 計6件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 大河内美奈 (2013) 医療診断への分離技術の新展開「磁性微粒子を用いた3次元細胞培養アレイの構築とがん細胞の浸潤評価」分離技術、43(2):1-5. 2. 大河内美奈、本多裕之 (2013) 1細胞から細胞ネットワーク形成に関する解析・操作技術「磁力制御による一細胞解析」生体医工学、51(3): 197-201. 3. 大河内美奈(2013)「ナノ磁性粒子を用いたテクノロジーの開発と応用」2012年度生物工学奨励賞、生物工学会誌、91(6):301-307. 4. 大河内美奈 (2013)「磁性細胞パターンニングによるがん細胞の浸潤・挙動評価」化学工学会バイオ部会ニュースレター、34, 12-15. 5. 大河内美奈、本多裕之 (2013) 「磁性ナノ粒子を利用したがん細胞の挙動解析」化学センサ、29(3), 93-99 6. 大河内美奈 (2013)「ペプチドアレイによるペプチドデザインとセンシングツールの開発」名古屋大学 PRESS e、34, 18.
<p>会議発表 計16件</p>	<p>専門家向け 計14件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 大河内美奈：牛乳アレルギー患者の IgE エピトープ解析法の開発、2013.4.26、電子情報通信学会(有機エレクトロニクス研究会) 2. Mina Okochi, Noriyasu Okazaki, Saori Ogihara, Hiroyuki Honda, Yasuko Yoshida, Sakura Sato, Motohiro Ebisawa: “Peptide array based analysis of IgE and IgG4 epitopes for evaluation and prediction of milk allergy outgrow.” Milano, Italy, 2013.6.25, European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy (EAACI/WAO 2013). 3. 大河内美奈、荻原沙緒理、岡崎宜恭、本多裕之、吉田安子、佐藤さくら、海老澤元宏：ペプチドアレイを用いた小児牛乳アレルギー患者の IgE エピトープ解析、横浜、2013.10.19、第50回日本小児アレルギー学会 4. 山本修平、大河内美奈、本多裕之：磁気細胞パターンニング法を用いたがん細胞の薬剤応答評価法の構築、岡山、2013.9.16-18、第45回化学工学秋季大会 5. 新井小百合、大河内美奈、花井泰三、本多裕之：磁性微粒子を用いた藍藻のアレイ状孤立培養技術の開発、岡山、2013.9.16-18、第45回化学工学秋季大会 6. 大河内美奈、古池真司、神谷知宏、本多裕之：液滴搬送システムを利用した腹腔洗浄液中の胃がん細胞の検出、広島、2013.9.18-20、第65回日本生物工学会大会 7. 杉浦寿之、大河内美奈、本多裕之：アレルギー応答検出のための2種エピトープペプチドアレイの構築、広島、2013.9.18-20、第65回日本生物工学会大会 8. 荻原 沙緒理、伊藤 浩明、大河内美奈、本多裕之：ペプチドアレイを用いた減感作療法患者のエピトープ解析によるアレルギー治療予測、広島、2013.9.18-20、第65回日本生物工学会大会 9. 丹羽宏介、酒井雄規、大河内美奈、本多裕之：ポテンシオメトリー法によるアレルゲンエピトープの解析、名古屋、2013.9.26、第1回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム 10. 大河内美奈、荻原沙緒理、岡崎宜恭、本多裕之：ペプチドアレイを用いた IgE エピトープによる牛乳アレルギー患者の解析、名古屋、2013.9.27-29、第7回バイオ関連化学シンポジウム 11. 杉田 智哉、大河内 美奈、本多 裕之：抗体結合ペプチドの探索とホモジニアス抗体検出への応用、名古屋、2013.9.27-29、第7回バイオ関連化学シンポジウム

様式19 別紙1

	<p>12. Mina Okochi, Tomoya Sugita, Yuji Asai, Hiroyuki Honda: “Screening of lactic acid binding peptides using peptide array and its enhanced probiotic effect for intestinal cells”、横浜、2013.12.9-11、第23回日本MRS年次大会</p> <p>13. 杉浦寿之、大河内美奈、本多裕之：アレルギー応答検出のための2種エピトープペプチドアレイの構築、岐阜、2014.3.18-20、化学工学会第79年会</p> <p>14. 大河内美奈、萩原さおり、岡崎宜恭、本多裕之：IgE抗体エピトープによる小児牛乳アレルギー患者群の判別、岐阜、2014.3.18-20、化学工学会第79年会</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>1. 大河内美奈：生物工学と私の夢、大阪、2013.5.24、生物工学会第18回生物工学懇話会</p> <p>2. 大河内美奈：バイオチップを用いた解析と診断、豊田、2013.7.23、中部経済連合会主催 第8回NEXT30産学フォーラム</p>
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
Webページ (URL)	<p>名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻バイオテクノロジー講座生物プロセス工学研究グループ本多研究室</p> <p>http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/proc/index.html</p> <p>東京工業大学大学院理工学研究科化学工学専攻大河内研究室</p> <p>http://www.chemeng.titech.ac.jp/~lab-okochi/2Research.html</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>・名古屋大学オープンキャンパス 2013年8月8日、名古屋大学(豊田講堂・シンポジオン)、高校生対象、約50名、「女性研究者からみた名古屋大学」について紹介した。</p> <p>・名古屋大学工学研究科主催「テクノ・フェア名大 2013」2013年9月6日、名古屋大学(豊田講堂)、政府・自治体関係者、中部地区の経済界及び企業の研究開発担当者等を対象、約1000名、「ペプチドアレイを用いた食物アレルギー高精度診断法の開発」に関するポスター発表を行った。</p> <p>・名古屋大学予防早期医療創成センター 第4回ワークショップ、2014年1月29日、名古屋大学野依記念館、約60名、「ペプチドアレイを用いた小児牛乳アレルギー患者のIgEエピトープ解析」について講演した。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	<p>電気新聞、2013年7月29日、Next30産学フォーラム中京大で初出張開催</p>
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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せん

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	113,000,000	97,752,000	15,248,000	0	0
間接経費	33,900,000	29,325,600	4,574,400	0	0
合計	146,900,000	127,077,600	19,822,400	0	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	1,122,453	15,248,000	0	16,370,453	16,370,453	0	0
間接経費	3,533,078	4,574,400	0	8,107,478	8,107,478	0	0
合計	4,655,531	19,822,400	0	24,477,931	24,477,931	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	15,931,529	ペプチドシンセサイザー、消耗品等
旅費	339,550	研究発表、情報収集旅費等
謝金・人件費等	0	
その他	99,374	物品修理、学会参加費等
直接経費計	16,370,453	
間接経費計	8,107,478	
合計	24,477,931	

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
全自動マイクロウェーブ ペプチド合成装置	BiotageAB Initiator+AI	1	7,875,000	7,875,000	2013/12/25	名古屋大学
倒立蛍光顕微鏡	独国ライカマイクロス テムス社製 DMI3000B 蛍光・	1	2,412,900	2,412,900	2014/2/21	名古屋大学
				0		