

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24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

平成 23 年度までに開発した分子標的薬標的分子及びガンマーカ候補分子の定量系と小規模プロファイル解析の成果を踏まえ、平成 24 年度は、さらに解析規模を拡大し、タンパク質発現プロファイルを利用した、個別化治療の有効性検討を開始する。さらに、ガンマーカ候補分子については、高速定量系を構築し、タンパク質レベルでのマーカとしての評価を行う。また、診断への技術応用のため、腫瘍マーカの高速、多検体定量を可能にする技術の開発をおこなう。同時に、平成 23 年度に新規導入した質量分析装置による高精度定量に対応するためのデータ解析技術の開発をおこなう。

2. 研究の実施状況

前年度、第一例目を報告したタンパク質発現量に基づく脳腫瘍の個別化化学療法について、複数例を加えて実施を開始した。現時点で有効な結果が得られている。臨床試験と平行し、分子標的薬の標的分子およびガン関連分子のタンパク質発現情報の蓄積を順調に行っており、現在 50 例以上の発現プロファイル情報を得られている。その結果、原発、再発、転移組織等によって特徴的な発現の分子を見いだしている。

また、血液マーカに関しては、血液検体解析のための種々の高速化の技術の開発を行った。一つは、試料処理の改良であり、もう一つは、液体クロマトグラフィーの改良によって相反性能である高感度化と高速化を実現した。この技術開発によって約 100 検体を 1 昼夜で同時試料処理することが可能となり、また、質量分析解析も 24 時間で約 100 検体の解析が可能となり、スループットが劇的に改善された。共同研究先で同定されている 20 強種類の新規ガンマーカ候補タンパク質についてタンパク質定量系を構築し、上記開発技術をもちいて、同時定量によってマーカ性能の検証を行った。定量に用いた血液は 1ul(一滴以下)である。すべての検体で検出限界以上となった分子について評価を行った結果、優れた性能を有する分子が複数同定された。この分子については、今後、検体数を増加させ、さらに性能評価を行う予定である。また、一部の検体でのみ検出された分子については、感度上昇のための技術開発を進めており、技術構築の後、再度、評価を行う。

質量分析によるタンパク質定量には三連四重極型の質量分析装置を用いるため、同時定量できる分子数に限界がある。現在、信頼性のある定量を行った場合、37 分子を同時に定量できる。昨年度新たに導

様式19 別紙1

入した四重極-飛行時間型質量分析装置をさらにアップグレードを行い、SWATH と呼ばれる新しいデータ取得方法を導入し、タンパク質定量への応用を検討した。その結果、従来の上限を超える 200 分子の同時定量に成功した。また、独自に開発を行った定量解析ソフトウェアを改良することによって、この新規取得方法で得られたデータを自動で定量解析する手法を開発した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計7件</p>	<p>(掲載済み-査読有り) 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 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. <i>Pharm Res.</i> 2006-2016 (2012). ISSN: 1573-904X</li> <li>2. Y. Kazuki, K. Kobayashi, S. Aueviriyavit, T. Oshima, Y. Kuroiwa, Y. Tsukazaki, N. Senda, H. Kawakami, S. Ohtsuki, S. Abe, M. Takiguchi, H. Hoshiya, N. Kajitani, S. Takehara, K. Kubo, T. Terasaki, K. Chiba, K. Tomizuka, M. Oshimura: Trans-chromosomal mice containing a human CYP3A cluster for prediction of xenobiotic metabolism in humans. <i>Hum Mol Genet.</i> 22:578-592 (2012). ISSN: 1460-2083</li> <li>3. S. Ohtsuki, C. Ikeda, Y. Uchida, Y. Sakamoto, F. Miller, F. Glacial, X. Declèves, J.M. Scherrmann, P.O. Couraud, Y. Kubo, M. Tachikawa, T. Terasaki: Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. <i>Mol Pharm.</i> 10:289-296 (2012). ISSN: 1543-8392</li> <li>4. W. Obuchi, S. Ohtsuki, Y. Uchida, K. Ohmine, T. Yamori, and T. Terasaki: Identification of transporters associated with etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics. <i>Mol Pharmacol</i> 83:490-500 (2012). ISSN: 1521-0111</li> <li>5. T. Yoneyama, S. Ohtsuki, M. Ono, K. Ohmine, Y. Uchida, T. Yamada, M. Tachikawa, and T. Terasaki. Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated <math>\alpha</math>-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. <i>J Proteome Res</i> 12:753-762 (2013). ISSN: 1535-3907</li> </ol> <p>(掲載済み-査読無し) 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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アプローチ、薬学雑誌、132:479-487 (2012)</li> <li>2. 大槻純男: 定量的標的プロと恵美楠による生化学の新展開: 抗体を用いない汎用的タンパク質定量技術、生化学、84:911-919, 2012</li> </ol>
<p>会議発表 計17件</p>	<p>専門家向け 計14件 海外招待講演</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. S. Ohtsuki: Novel applications of LC/MS-based membrane protein quantification for transporter research and drug development. 3rd Annual Clinically Relevant Drug Transporters, 2012/10/22-24, London</li> </ol> <p>国内招待講演</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. 大槻純男: 薬物動態からアプローチする中枢疾患の理解と治療、神奈川県立こども医療センター講演会、2012年4月18日、横浜</li> <li>3. 大槻純男: 質量分析による次世代タンパク質定量システムの開発と創薬・臨床研究への応用、神戸大学 GCOE 学術講演会、2012年4月20日、神戸</li> <li>4. 大槻純男: 質量分析によるタンパク質定量解析を応用した生命現象の再構築、基礎生物学研究所研究会「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」、2012年5月14-15日、熊本</li> <li>5. 大槻純男: 分子薬物動態学と質量分析の融合によるファーマコプロテオミクスへの展開、第二回薬</li> </ol>

様式19 別紙1

	<p>剤学セミナー、2012年6月29日、熊本</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. 大槻純男: 質量を利用してタンパク質の量を測る新技術と臨床診断への応用、第1回熊本医薬シンポジウム、2012年7月22日、熊本</li> <li>7. 大槻純男: 定量とくすりからアプローチする疾患プロテオーム解析、北里疾患プロテオーム研究会、2012年8月23日、神奈川</li> <li>8. 大槻純男: 定量的標的プロテオミクスから切り拓くがん診断と個別化治療、臨床応用を目指した最前線セミナー、2012年9月28日、東京</li> <li>9. 大槻純男: 質量分析を用いたタンパク質の特異的一斉定量の薬理学への応用、新薬理学セミナー2012、2012年11月24日、熊本 (オーガナイザーとして開催)</li> <li>10. 大槻純男: 最新定量プロテオミクスの技術と将来展望: 脳腫瘍を含めた癌に対する応用、第6回金沢脳腫瘍セミナー、2013年1月19日、金沢</li> <li>11. 大槻純男: 診断イノベーションに挑戦する次世代定量プロテオミクス、熊本和光ライフサイエンスフォーラム、2013年2月22日、熊本</li> <li>12. 大槻純男: 創薬と診断を加速する新しいタンパク質定量技術、日本薬学会第133年会、2013年3月30日、横浜</li> </ol> <p>企業主催講演会</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>13. 大槻純男: 標的化からアプローチする生化学的プロテオミクス、ABSCIEX タンパク質発現解析セミナー、2012年8月28日、大阪</li> <li>14. 大槻純男: 標的化からアプローチする生化学的プロテオミクス、ABSCIEX タンパク質発現解析セミナー、2012年8月30日、東京</li> </ol> <p>一般向け 計3件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大槻純男: 脳を守るしくみと脳を治す薬、宮崎北高校教育講座、2012年9月8日、宮崎</li> <li>2. 大槻純男: タンパク質から再定義する創薬戦略と個別化療法、平成24年度九州大学大学院薬学研究院公開講座、2012年9月23日、福岡</li> <li>3. 大槻純男: 新技術を駆使したがん治療への挑戦、平成24年度熊本大学関西オフィスセミナー熊本大学から発信します「熊本発の創薬研究」、2013年1月12日、大阪</li> </ol>
<p>図書 計1件</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大槻純男: 抗体に依存しない新しいタンパク質定量技術の個別化治療への応用、実験医学別冊、羊土社、東京、30:1049-1056 (2012). ISBN: C</li> </ol>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計2件</p>	<p>(出願中) 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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、PCT/JP2012/003965、2012年6月18日</li> <li>2. 大槻純男、寺崎哲也、個別化治療診断のためのマーカータンパク質絶対量の定量方法、PCT/JP2012/005637、2012年9月5日</li> </ol>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.ohtsuki-lab.jp">http://www.ohtsuki-lab.jp</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>宮崎北高校における出張講義、および熊本大学、九州大学がそれぞれ主催する一般向け講座、セミナーにおいて講演を行い、研究概要および成果について紹介した。また、熊本大学オープンキャンパス・入試説明会において高校生および父兄にたいして研究概要を紹介した。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	<p>ありません</p>
<p>その他</p>	<p>ありません</p>

4. その他特記事項

ありません

## 実施状況報告書(平成24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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	128,000,000	74,890,000	28,820,000	24,290,000	0
間接経費	38,400,000	22,467,000	8,646,000	7,287,000	0
合計	166,400,000	97,357,000	37,466,000	31,577,000	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	680,506	28,820,000	0	29,500,506	29,322,185	178,321	0
間接経費	5,068,819	8,646,000	0	13,714,819	9,341,137	4,373,682	0
合計	5,749,325	37,466,000	0	43,215,325	38,663,322	4,552,003	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	22,003,697	質量分析装置アップグレード、遠心機等
旅費	682,894	研究成果発表、情報収集、共同研究打ち合わせ等
謝金・人件費等	816,396	事務補佐員人件費
その他	5,819,198	英文校正、修理、保守、学会参加費等
直接経費計	29,322,185	
間接経費計	9,341,137	
合計	38,663,322	

## 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
質量分析データ 取得コンピューター	DELL, OptiPlex 990	1	614,250	614,250	2012/4/27	熊本大学
液体窒素保存容器	サーモフィッシャーサイエ ンティフィック, CV50935- 70A	1	680,400	680,400	2012/11/9	熊本大学
微量高速冷却遠心 機	TOMY, MX-307	1	686,700	686,700	2012/10/3	熊本大学
質量分析アップグ レード	ABSCIEX, TT5600 アップグレードキット	1	2,310,000	2,310,000	2012/10/10	熊本大学
卓上超遠心機用水平 ローター(消耗 品)	ベックマン・コールター, TLS-55	1	735,000	735,000	2012/10/12	熊本大学
分光光度計	Eppendorf, バイオスペクト ロメーターベーシック	1	628,425	628,425	2012/10/15	熊本大学
高性能高速冷却遠 心機	ベックマン・コールター, Avanti HP-30I	1	4,987,500	4,987,500	2012/11/28	熊本大学
ケミルミイメー ジャー	OMEGA, LumG	1	1,575,000	1,575,000	2012/10/26	熊本大学
超純水製造装置	サーモフィッシャー サイエンティフィック, Lab TowerEDI 15	1	1,102,500	1,102,500	2013/2/13	熊本大学