

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25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

前年度、高速定量システムの基本技術を構築すると共に、数十種類のマーカー候補タンパク質の血中濃度を計測し、複数の有望なマーカー候補分子を同定した。本年度は、これらの結果と技術を統合し、100検体超についてマーカーとしての性能を検証することを目的とする。一方で、血中濃度の計測の際、複数のマーカー候補タンパク質が検出限界以下となり、マーカー検証ができなかった。そこで、平成25年度は、抗体を用いた IP-MRM の技術を開発し、血中の超高感度タンパク質定量解析の技術の開発をおこなう。さらに、次世代のマーカー探索の新技术開発を目指し、前年度導入したデータ非依存型取得法と、新しいデータ統合アルゴリズムを用いて、超高感度網羅的定量解析技術の開発を行う。

2. 研究の実施状況

前年度、小規模検証によって新規腫がん有力マーカー候補として同定した複数種類の血中タンパク質について、同様に前年度構築した自動前処理装置及び質量分析によるタンパク質高速同時定量システムを用いた大規模検証を行った。東北大学大学院薬学研究科及び国立がん研究センター研究所との共同研究によって、複数種類のがん患者血漿およびコントロール健常者血漿の約 500 検体の定量解析を行い、有力マーカー候補の検証を実施した。3 種類のマーカー候補分子が本規模の検証においても腫がん患者で高値、1分子が低値をしめした。特に2分子がマーカーとしての性能に優れており、早期腫がん発見にも有用である可能性が示された。また、本解析の有力マーカー候補分子は、各々が胆道がん、肝がん、十二指腸がんの診断にも有用であることが示された。

抗体による免疫沈降と質量分析による血中タンパク質高感度定量に関しては、低濃度(pg/mL レベル)の血中ホルモンを標的として系の構築を行った。磁気ビーズやチューブ種類、前処理法の最適化を行うことによって、自動化が可能な IP-MRM の前処理システムを構築した。通常、血漿・血清は 0.1-0.2ul 相当しか定量解析を行うことができないが、本系を用いて 5mL の市販健常者血清から健常低値のきわめて低レベルの血中ホルモンの定量に成功した。

また、最新データ非依存型取得法である SWATH と質量情報データベースを用いて、タイムパフォーマンスに優れる高深度・高感度定量プロテオミクスの新技术の基盤を開発した。本基盤技術は、特許として出願を行った。タイムパフォーマンスが求められる臨床プロテオミクス解析において、本技術はバイオマーカー探索を加速する有用な技術になることが期待される。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計8件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計7件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, and Terasaki T. Validation of uPA/SCID Mouse with Humanized Liver as a Human Liver Model: Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. <i>Drug Metab Dispos.</i> 42:1039-1043 (2014). ISSN:1521-009X 2. Ito S, Ohtsuki S, Murata S, Katsukura Y, Suzuki H, Funaki M, Tachikawa M, and Terasaki T. Involvement of insulin-degrading enzyme in insulin- and atrial natriuretic peptide-sensitive internalization of amyloid-beta peptide in mouse brain capillary endothelial cells. <i>J Alzheimers Dis.</i> 38:185-200 (2014). ISSN:1875-8908 3. Ito S, Matsumiya K, Ohtsuki S, Kamiie J, and Terasaki T. Contributions of degradation and brain-to-blood elimination across the blood-brain barrier to cerebral clearance of human amyloid-beta peptide(1-40) in mouse brain. <i>J Cereb Blood Flow Metab.</i> 33:1770-1777 (2013). ISSN:1559-7016 4. Maeda T, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Ueda K, and Kanda T. Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines. <i>Clin Exp Neuroimmunol.</i> 4:326-338 (2013). 5. Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, and Terasaki T. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. <i>Fluids Barriers CNS.</i> 10:21 (2013). ISSN:2045-8118 6. Sakamoto A, Matsumaru T, Yamamura N, Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, and Terasaki T. Quantitative expression of human drug transporter proteins in lung tissues: Analysis of regional, gender, and interindividual differences by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. <i>J Pharm Sci.</i> 102:3395-3406 (2013). ISSN:1520-6017 7. Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Inoue T, Ohtsuki S, and Terasaki T. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset. <i>J Pharm Sci.</i> 102:3343-3355 (2013). ISSN:1520-6017 <p>(未掲載一査読有り) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ohtsuki S, Hirayama M, Ito S, Uchida Y, Tachikawa M, and Terasaki T. Quantitative targeted proteomics for understanding the blood-brain barrier: towards pharmacoproteomics. <i>Expert Rev Proteomics</i> (2014). Epub ahead of print. ISSN:1744-8387
<p>会議発表 計17件</p>	<p>専門家向け 計15件 海外招待講演</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. S. Ohtsuki: Metabolomics-like proteomics: quantitative targeted proteomics for diseases and pharmacokinetics. Indo-US Symposium on Mass Spectrometry Based Metabolomics in Disease Biology, Trivandrum, India, 23-24 Jan, 2014 2. S. Ohtsuki: Quantitative targeted absolute proteomics: LC-MS/MS-based protein quantification. Shimadzu Mini Omics Seminar, Bangalore, India, 25 Jan, 2014 3. S. Ohtsuki: Quantitative targeted absolute proteomics: LC-MS/MS-based protein quantification. Symposium in Center of Cellular and Molecular Biology. Hyderabad, India, 27 Jan, 2014. 4. S. Ohtsuki: Quantitative targeted absolute proteomics: LC-MS/MS-based protein quantification. Symposium in Vimta. Hyderabad, India, 27 Jan, 2014. 5. S. Ohtsuki: Quantitative targeted absolute proteomics: LC-MS/MS-based protein quantification. Shimadzu Omics Seminar, Milano, Italy, 29 Jan, 2014. 6. S. Ohtsuki: Quantitative targeted absolute proteomics: LC-MS/MS-based protein quantification. Avancées en spectrométrie de masse pour le diagnostic Clinique. Paris, France, 31 Jan, 2014. <p>国内招待講演</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. 大槻純男: 定量的量的プロテオミクスの進化と診断への応用、浜松医科大学、2013年4月9日、浜松 8. 大槻純男: 質量分析による次世代タンパク質絶対定量: 薬物動態と診断への応用、住友化学、2013年5月20日、大阪 9. 大槻純男: メンブレンプロテオミクスの進歩と応用、第8回トランスポーター研究会年会、2013年6月15日、熊本 10. 大槻純男: Quantitative analysis of transportosome biochemistry、第86回日本生化学会大会、2013年9月13日、横浜 11. 大槻純男: 質量分析を利用したタンパク質定量によるタンパク質科学の新展開、第37回 蛋白質と酵素

様式19 別紙1

	<p>の構造と機能に関する九州シンポジウム、2013年9月27日、雲仙</p> <p>12. 大槻純男:次世代定量プロテオミクスによるトランスポーター研究の新展開、第57回日本薬学会関東支部大会、2013年10月26日、東京</p> <p>13. 大槻純男:基礎と医療と薬をつなげるプロテオミクス、第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月23日、仙台</p> <p>企業主催国内講演会招待講演</p> <p>14. 大槻純男:進化するタンパク質定量解析-MRM, MRMHR そして SWATH へ-, ABSCIEX タンパク質の網羅的定量解析セミナー、2013年7月17日、東京</p> <p>15. 大槻純男:進化するタンパク質定量解析-MRM, MRMHR そして SWATH へ-, ABSCIEX タンパク質の網羅的定量解析セミナー、2013年7月19日、大阪</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>1. 大槻純男:くすりのがんの闘い:がん克服に向けた最先端薬学研究、小林高校平成25年度大学出前講義、2013年6月22日、宮崎</p> <p>2. 大槻純男: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、FIRST EXPO、2014年2月28日、東京</p>
図書 計0件	ありません。
産業財産権 出願・取得状況 計4件	<p>(取得済み) 計2件</p> <p>1. 上家潤一、大槻純男、寺崎哲也、質量分析装置を用いた代謝酵素群の一斉タンパク質定量に用いるペプチド、特許登録第5299956、2013年6月28日</p> <p>2. 大槻純男、上家潤一、寺崎哲也、質量分析装置を用いたタンパク質定量のための評価用ペプチド、人工標準タンパク質、及びタンパク質の定量方法、特許登録第5317336号、2013年10月16日</p> <p>(出願中) 計2件</p> <p>3. 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、米国出願14/233,592、2014年1月17日、欧州出願12817205.3、2014年1月8日</p> <p>4. 大槻純男、質量分析におけるペプチドピークの同定・定量のためのデータベース作成方法、特願2013-147591、2013年7月16日</p>
Webページ (URL)	http://www.ohtsuki-lab.jp 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物薬学分野
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>1. 大槻純男、くすりのがんの闘い:がん克服に向けた最先端薬学研究、小林高校平成25年度大学出前講義、2013年6月22日、宮崎、高校生約20名</p> <p>2. 伊藤慎悟、大槻純男:効くくすりを決める新技術、熊本大学薬学部オープンキャンパス、2013年8月10日、熊本、高校生及び父兄1,290名(個別対応60名)</p> <p>3. 大槻純男、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、FIRST EXPO、2014年2月28日、東京、期間中(2月28日~3月1日)来場者数約1,400名</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計3件	<p>1. 日刊工業新聞電子版「アルツハイマー病、Aβ消失に関与-熊大・東北大が解明」 http://www.nikkan.co.jp/news/nkx0720131007eaaa.html</p> <p>2. 熊本日日新聞「アルツハイマー病の原因物質、分解・排出の仕組み確認」2013年10月10日(ページ026)</p> <p>3. 毎日新聞「アルツハイマー病の原因物質、除去の仕組み解明(21面)」2013年10月18日</p>
その他	<p>テレビ報道 熊本県民テレビ テレビタミン、2013年10月4日</p>

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	103,710,000	24,290,000	0	
間接経費	38,400,000	31,113,000	7,287,000	0	
合計	166,400,000	134,823,000	31,577,000	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	178,321	24,290,000	0	24,468,321	24,468,321	0	
間接経費	4,373,682	7,287,000	0	11,660,682	11,660,682	0	
合計	4,552,003	31,577,000	0	36,129,003	36,129,003	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,502,374	超高性能液体クロマトグラフィ、試薬 等
旅費	1,151,455	共同研究打合せ、情報収集、成果発表 等
謝金・人件費等	4,510,527	事務補佐員人件費
その他	2,303,965	実験機器保守・修理費、学会参加費等
直接経費計	24,468,321	
間接経費計	11,660,682	
合計	36,129,003	

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
超高性能液体クロ マトグラフィ	エービーサイエツ クス社・ekspert microLC 200 System with AB SCIEX MS kit	1	5,460,000	5,460,000	2013/6/26	熊本大学
安全キャビネット	米国サーモフィッ シャーサイエン ティフィック社・ Class II 安全キャ ビネット ThermoScientific	1	1,134,000	1,134,000	2013/7/29	熊本大学