

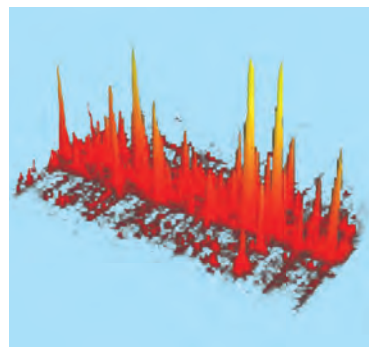
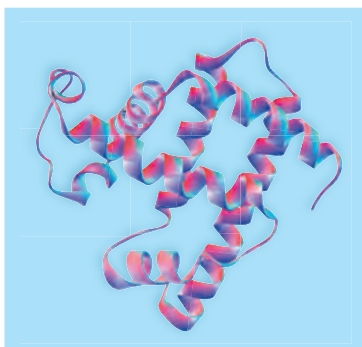
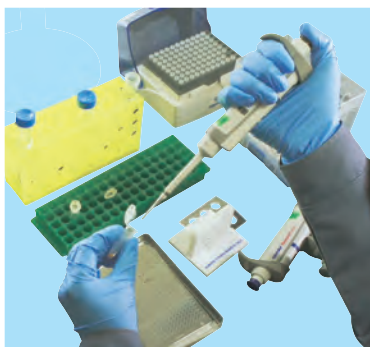
最先端研究開発支援プログラム(FIRSTプログラム)
次世代質量分析システム開発と創薬・診断への貢献



研究成果報告書

2010年3月～2014年2月

中心研究者：島津製作所 田中 耕一



最先端研究開発支援プログラム(FIRST プログラム)

次世代質量分析システム開発と創薬・診断への貢献

研究成果報告書

2010 年 3 月～2014 年 2 月

中心研究者: 島津製作所 田中 耕一

目 次

はじめに	1
§1 プロジェクト概要	2
§ 1-1 研究概要	2
§ 1-1-1 背景	2
§ 1-1-2 目標	2
§ 1-1-3 基本構想	3
§ 1-2 組織概要	5
§ 1-2-1 研究体制	5
§ 1-2-2 支援体制	6
§ 1-2-3 予算	7
§2 各グループの研究目的および成果	8
§ 2-1 次世代質量分析システムの開発	8
§ 2-1-1 革新的前処理法の開発	8
§ 2-1-2 超高感度イオン化技術の開発	32
§ 2-1-3 ハードウェアの開発	108
§ 2-1-4 データベース・解析ソフトウェアの増強	156
§ 2-1-5 次世代質量分析システムの総合評価	196
§ 2-1-6 その他関連技術の開発	205
§ 2-2 質量分析システムを用いた前立腺がんの研究	233
§ 2-2-1 尿中ペプチドをマーカーとする前立腺がん(肥大)の病態診断	234
§ 2-2-2 質量顕微鏡を用いた前立腺がんバイオマーカーの探索	241
§ 2-3 質量分析システムを用いた乳がんの研究	245
§ 2-3-1 HER2 糖鎖構造をマーカーとする病態診断	246
§ 2-3-2 質量顕微鏡を用いた乳がんバイオマーカーの探索	252
§ 2-4 質量分析システムを用いたアルツハイマー病の研究	259
§ 2-4-1 血漿中アルツハイマー病バイオマーカーの探索	260
§ 2-4-2 質量分析計を利用したアルツハイマー病診薬「タウ凝集体 PET プローブ」 スクリーニング装置の開発	263
§ 2-5 質量分析システムを用いた早期診断システムの構築	265
§3 全体のまとめ	267
§ 3-1 全体総括	267
§ 3-2 今後の展開	268
§4 成果リスト	269
§ 4-1 論文発表	269
§ 4-2 学会発表	274
§ 4-3 産業財産権	285
§ 4-4 学術シンポジウム等(主催したもの)	286
§ 4-5 アウトリーチ活動	287
§ 4-6 報道等	291

はじめに

最先端研究開発支援(FIRST)プログラム 30 課題の1つとして選ばれた「次世代質量分析システム開発と創薬・診断への貢献」プロジェクトは、課題名が示すとおり、人々の更なる健康と長寿に貢献するための次世代質量分析をつくる、という目標を掲げ、2010 年 3 月から4年余りもの期間と 40 億円もの公的資金、そして最大 80 名余りもの研究者・技術者の知恵と努力を活かして開発を続けさせていただきました。

その結果として、乳がん・前立腺がん・アルツハイマー病の早期診断に役立つ重要な手がかりを得ることができました。これら成果は、本プロジェクトに直接関わった人々だけでなく、様々な分野の方々のご理解とご努力がなければ成し得ませんでした。

中心研究者として、この場を借りてお礼申し上げます。

とりわけ当初の目標「1万倍性能向上」は、あくまでベストシナリオとして想定していた、にも関わらず、結果としてそれを大幅に上回る成果が得られたのは、従来の常識に囚われない自由な発想ができる特に若手研究者・技術者の活躍無しには成し得なかった、と思います。

この「1万倍性能向上」は、本プロジェクト内では まずは上記3つの疾患の診断に適用しましたが、特に基本である「微量を早期に見つける」能力を活かせる様々な疾患に幅広く応用することが期待できます。

質量分析自身の貢献は、医療・創薬に留まりません。現時点でも、犯罪・ドーピング検査、素材解析・モニタリング、環境分析、宇宙等のフロンティア分野への貢献、等々、極めて幅広い応用分野があります。

本プロジェクトでは、質量分析の4つの要素技術：前処理、イオン化、ハードウェア、ソフトウェア、個々に対しても、多くの開発が行え、システム全体としてだけでなく、個別の要素技術を用いるだけでも、膨大な応用範囲が想定できます。

本研究成果報告書は、その内容を正確・厳密に理解して頂けるように、主に各々の専門分野の方々のために、専門用語を用いた詳細な説明書きを中心にさせて頂きました。

本内容を、できる限り多くの方々にお伝えすることにより、質量分析の技術をより多くの分野に活用して頂ければ幸いです。



中心研究者 田中耕一

§ 1 プロジェクト概要

§1-1 研究概要

§1-1-1 背景

質量分析(MS)による生体分子の分析技術開発は20世紀における人類の大きな研究成果のひとつであった。質量分析技術は、世界的にはプロテオミクスで、日本に限ってみれば、特にトランスクリプトミクス(遺伝情報をタンパク質等に翻訳)・グライコミクス(糖鎖機能解明)・メタボロミクス(代謝機能解明)等で優れた学術的成果が得られている。しかしながら、それらはまだ十分に新産業創出や医療・創薬に寄与しているとは言いがたい。その大きな理由は、試料前処理・機器分析・データ処理という一連の解析プロセスが、各生体成分について最適化されておらず、まだまだ改良の余地があるからである。それには越えなければならない非常に高いハードルが背景として存在する。例えば、生体機能の発現に最も重要とされるタンパク質に限れば、生体内にはタンパク質だけでも約10万種類存在し、その存在量も10ケタ以上異なる(最多が100億個あっても最少は1個というダイナミックレンジがある)といわれる(図1)。量的には1 mLでmgレベルの血清アルブミンとngレベルの疾病関連タンパク質(バイオマーカー)の差があり、しかも個人・年齢・病態等によってもバイオマーカーは変化して、その多くが未知という背景がある。

このハードルを突破するためには、例えば、ターゲット分子のみ選び出す前処理法の大幅改良(超高選択性)、極微量でも検出できる超高感度検出法の開発、未知な化合物までも対応できるデータベース(例: MassBank/JST-BIRD, KEGG)の拡充、データマイニングやアルゴリズムの改良された解析用ソフトウェア開発(例: Mass++/JST)などが強く求められる。

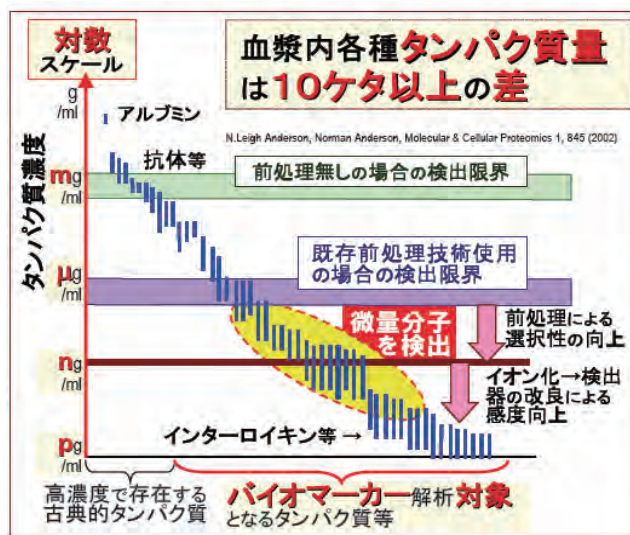


図1 タンパク質の種類と血漿内濃度の関係

§1-1-2 目標

研究開始当初は、本研究課題の目標を次の2点とした。

- 1) 次世代質量分析システムの開発によるプロテオーム解析技術の飛躍的向上:
 - a) 選択性向上: 数10倍、感度向上: 数10倍、総合で1,000倍以上の選択性/感度向上を目指す。
 - b) さらにこの高感度/高選択性を保持しながら、バイオマーカー探索における構造情報入手能力を大幅に向上させる。
- 2) 質量分析を用いた医療・創薬への貢献:
 - a) 新規がんバイオマーカー探索と臨床検査への応用: 乳がんの早期診断・病態評価、治療効果・副作用予測等に利用できるバイオマーカーの探索と、そのバイオマーカーを用いた検査・診断法への応用を検討する。
 - b) 新規がん創薬ターゲット探索: 乳がん組織の翻訳後修飾を含むプロテオーム解析を行い、がん組織特異的な生物学的機序を解明し、新たな創薬ターゲット分子の探索につなげる。

- c) 軽度認知機能障害・アルツハイマー病診断方法につながるバイオマーカーの探索：アルツハイマー病への進行阻止のために、軽度認知機能障害の診断法に利用できる新規バイオマーカーを探索する。これには次世代質量分析システムを駆使し、翻訳後修飾に注目してタウタンパク質を含む血中バイオマーカーを探索する。さらに、そのバイオマーカーを創薬シーズの足がかりの一助とする。

しかし、平成22年度に追加措置された加速・強化予算や、平成24年10月25日の最先端研究開発支援推進会議において決定された、田中プロジェクトの調査検討結果（以下、「推進会議の検討結果」という。）などを踏まえ、より重要なテーマへ選択と集中を行った結果、

- 1) 選択性/感度向上の目標値を10,000倍に修正するとともに、
 - 2) 乳がん、前立腺がんやアルツハイマー病のバイオマーカー探索研究を通じて、次世代質量分析システムの臨床研究への有効性を評価、検証する、
- こととした。

s1-1-3 基本構想

1 次世代質量分析システムの開発

本研究テーマは、島津製作所田中最先端研究所が中心となって進める。超高感度/高選択性 次世代質量分析システムの開発には、図2に示すような、「対象分子のみ選び出す方法（前処理）」「対象分子を高効率でイオンにする方法（イオン化）」「極微量でも検出できる高感度検出装置（ハードウェア）」「高度なデータ解析を可能とするプログラム（ソフトウェア）」の各要素が必要である。これらの課題要素それぞれに対応して、次のとおり取り組み、根本的課題の統合的解決を図る。

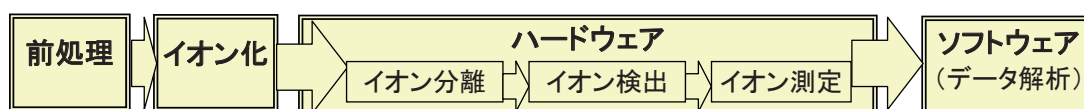


図2 質量分析システム一般における分析手順 概略

1-1 革新的前処理法の開発

微量の対象分子を検出し、精密分析するためには、多種多量に存在する非対象分子を事前排除し、対象分子のみ選出する前処理法を開発する必要がある。研究分担者らは、すでに抗体ビーズと質量分析システムを用いた超高感度検出法に成功している（免疫沈降を用いた生体試料の質量分析法、PCT/JP2007/069643）。

本研究では、ビーズに結合させる抗体に改良を加えることにより、更に超高選択性・超高感度検出法の開発を行う。また、選択性向上のため、通常のHPLC（高速液体クロマトグラフ）を用いて分離するOffline-LC/MALDI（比較対照）手法の改良も行う。

1-2 超高感度イオン化技術の開発

生体内の微量物質をMSで高感度に検出するためには、ターゲット物質のイオン化効率を高めることが有効な方法である。中心研究者らは、既に世界で注目される高効率イオン化試薬（マトリックス）を種々開発しているが、それでもまだ（定量性を保ちながら）イオン化することが困難な場合がある。これを解決するため、特に本研究では、桁違いの高効率でターゲット分子をイオン化する技術開発を、従来の概念に囚わ

れない発想と方法で選択・合成し、評価を行う。

1-3 次世代のイオン分離/検出/測定技術(ハードウェア)の開発

これまでのバイオマーカー探索の研究成果を見ると、複雑な構造を持つ糖鎖の差異を代表例とする翻訳後修飾異常等が数多く報告されている。したがって、疾患診断で用いられる質量分析装置としては、MSⁿによる詳細な構造解析機能が必須であり、そのうえで感度の向上、質量分解能の向上、分析速度の向上を図らなければならない。

そこで、前処理による濃縮やイオン化効率が不十分な場合でも分析ができるように超高感度計測ができるハードウェアとして、質量分解能と分析速度を向上させた、新しいMALDI-DIT-TOFMS装置の開発を行う。さらにタンパク質の翻訳後修飾・糖鎖・代謝物等を解析するためには、複雑な微細構造情報の入手が不可欠であるため、MS/MS, MSⁿ 装置の大幅な性能向上にも取り組む。

1-4 データベース・解析ソフトウェアの増強

次世代質量分析システムに適した新規な自動分析ソフト、構造解析ソフト、表示ソフトを開発するとともに、バイオマーカー探索のための新たなデータベースを構築する。

1-5 次世代質量分析システムの総合評価

上記4つの要素技術開発を踏まえ、次世代質量分析システム全体としての評価を行う。

2 質量分析を用いた医療・創薬への貢献

本研究テーマは、京都大学大学院薬学研究科が中心となって進めていた研究テーマである。しかし、推進会議の検討結果に従い、独立したテーマとしては平成25年1月を以て廃止し、開発する質量分析システムおよび個別技術の評価・検証に有用な部分にのみ絞って資源の再配分を行う事とした。具代的には、京都大学大学院医学研究科、及び国立長寿医療研究センターで、乳がん、前立腺がん、アルツハイマー病患者及び健常者の検体(血液・尿・組織)を、次世代質量分析システムを用いて比較解析しバイオマーカー探索を行う研究過程を通じて、次世代質量分析システムおよび各要素技術の有用性を評価・検証する。

§1-2 組織概要

§1-2-1 研究推進体制

1 具体的な研究推進体制

当初、本プロジェクトは、島津製作所田中最先端研究所、京都大学大学院薬学研究科最先端創薬研究センターおよび科学技術振興機構（JST）の三者で開始したが、推進会議の検討結果に従い、これまで創出した研究成果や若手人材などの様々な資産を十分に活かしつつ、次世代質量分析システムを医療の場にいち早く展開することを前倒して実施可能な体制となるよう、平成25年1月より体制の再構築を行った。結果、図3のように、研究を全て島津に集約し、次世代質量分析システム開発および性能の評価・検証に必要な研究を行うグループと共同で研究開発を行う体制とした。

具体的には島津製作所が開発した次世代質量分析システムやその要素技術を用いて、京都大学医学研究科及び長寿医療研究センターで乳がん・前立腺がん・アルツハイマー病のバイオマーカー探索研究な

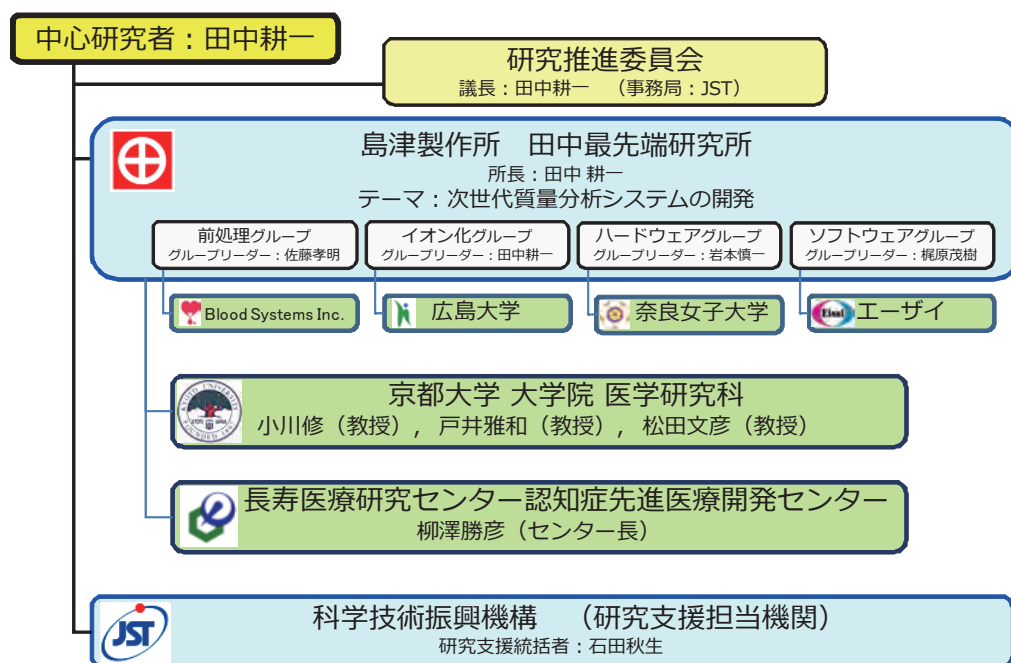


図3 体制再構築後の研究推進体制

どを行うことで、次世代質量分析システムやその要素技術の評価・検証を行う事とした。

2 研究推進における工夫点

本プロジェクトでは、各研究機関の主要メンバーで構成する「研究推進委員会」を設置し、3ヶ月に1度程度開催した。この委員会では、プロジェクトの運営に係る事項、例えば研究計画の検討や進むべき方向性の議論、予算案の調整や予算執行状況の確認等を行い、重要な情報の伝達・共有や意思決定を速やかに実施した。

また本プロジェクトでは、全ての研究メンバーが参加する事のできる「研究推進会議」を設置し、1～3ヶ月に1度程度開催した。この会議では、各研究グループの研究成果を発表し、今後の方向性を議論することで、研究開発の現状を把握すると共に研究開発全体の進捗を管理した。プロジェクト全体の研究進捗情報

の共有機能とPDCAサイクルの確認機能も有しており、研究者同士が異なる視点でアドバイスをしたり、議論から新しい着想を得たり、実務者レベルで連携を積極的に推進する等の効果があった。

§1-2-2 支援体制

本プロジェクトは当初、島津製作所と京都大学による産学連携・異分野融合プロジェクトとしてスタートした。この研究開発を高いレベルで確実に推進するため、島津製作所・京都大学・JSTは、中心研究者をはじめとする多くの研究者が研究開発活動に専念できる「カスタムメイドな支援体制」を構築する目的で、以下のような取り組みを行った。

1 プロジェクト支援体制の構築

島津・京大・JSTは、既存組織の枠組みに囚われないFIRST支援専門グループを設置した。その上で各支援グループが密接な連携を行う事で、プロジェクト全体として研究者が研究開発活動に専念できる環境作りを実施した。

JSTは、「本部(東京)」と「島津製作所内(京都)」の2か所に人を配置することで、「JSTが持つノウハウを活かした支援」と「研究現場の直接的な支援」を共に行った。JST本部には、JSTが支援する5つのFIRSTプロジェクトの研究支援統括者 及び 本プロジェクトの担当支援員を配置した。研究支援統括者は、JSTが組織として有する戦略的創造研究推進事業(ERATO型やCREST型等)等での経験や他のFIRSTプロジェクトの事例を俯瞰し、様々な助言を行った。本プロジェクトの本部支援員は、日本学術振興会(JSPS)や内閣府との連絡調整を一括して担う事で、外部との情報全般を把握すると共にJST本部が対応する案件に対しては中心となって支援した。また、島津 田中最先端研内に1名の現地支援員が常駐し、そこから京大にも頻繁に足を運ぶことで、各々の支援グループとFace to Faceで研究進捗も含めた相互の情報共有を行った。更に、現地支援員は日常的に直接中心研究者の意向を確認しJST本部や各支援グループと共有することで、中心研究者の意向に沿った支援を迅速かつ機動的に行った。

島津・京大でも、新たに支援組織を設置し専任の支援員を配置した。この支援組織が、各機関が元々備えている知財・法務・総務等の既存組織と有効に連携しながら各機関の規定を順守しつつ研究を支援することで機関の独自性を担保すると共に、JST現地支援員や本部支援員を介して各々の支援組織が密接に連携した。

2 研究成果の効果的な発信・公開

田中最先端研内に常駐しているJST支援員がプロジェクトホームページ(図4)を管理運営する事で、プロジェクトの日々の活動について、中心研究者が自らの言葉で分かり易い記事に書き下ろし、直ちに掲載するなど、中心研究者の意図を汲んだ情報を迅速に掲載出来る体制を敷いた。

本ホームページでは、これまでの約4年間でトピックス160件以上(最近の2年間は、平均 1週間に1トピック以上の新着情報を掲載)、開発ソフトウェアのセットアップファイルやビデオチュートリアル、その他質量分析を行う上で役立つ技術資料等を広く公開し、利用者に「当サイトに来れば、質量分析に係る最新の研究成果や有益な情報が手に入る」と実感して頂けるコンテンツ作りを行った。

また開発したソフトウェアの一部をホームページ上で公開し(図5)、関心のある研究者はダウンロードして使用できるようにするとともに、利用者からの要望や質問を直接受け付け開発に反映させる事で、更に多くの方に使用して頂けるソフト作りに活かした。



図4 プロジェクトホームページ トップ画面

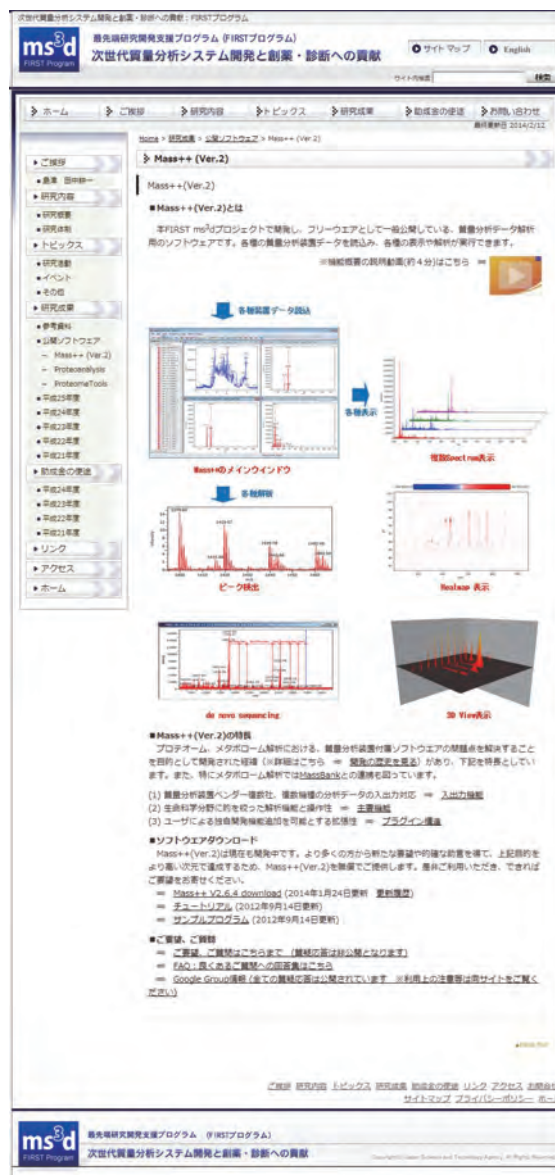


図5 ソフトウェア公開ページ トップ画面

§1-2-3 予算

表1 プロジェクト予算

(単位:百万円)

	H21・22	H23	H24	H25	合計
経費A	925	708	571	604	2,808
経費B	84	82	75	83	324
経費C	66	57	54	58	235
小計	1,075	847	700	745	3,367
加速・強化事業	655	0	0	0	655
総計	1,730	847	700	745	4,022