

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670184

研究課題名(和文) 微小薬剤耐性細胞検出への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to the accurate detection of minimal drug resistant cells

研究代表者

大場 雄介 (Ohba, Yusuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30333503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フィラデルフィア染色体陽性白血病の発症原因は、染色体相互転座により形成される融合遺伝子産物BCR-ABLの恒常的チロシンキナーゼ活性であり、BCR-ABLの特異的チロシンキナーゼ阻害薬の導入によりその治療成績は劇的に向上した。しかし、治療開始時・途上を問わず薬剤耐性症例が認められるため、極少数存在する耐性細胞の検出を可能とする技術開発が望まれている。本研究では、我々が開発した薬剤耐性細胞検出技術を基に、FRETバイオセンサーの改良、検出法の開発と改良、解析法の改良により薬剤耐性細胞検出能を従前技術の100倍に向上することを目的とし、結果として162倍の高感度化を達成した。

研究成果の概要(英文)：In Philadelphia chromosome-positive leukemia, growth and survival of leukemia cells solely depend on constitutive tyrosine kinase activity of new fusion gene product BCR-ABL formed by chromosome reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. Therefore, the treatment for this disease has been radically improved by the introduction of the specific tyrosine kinase inhibitor of BCR-ABL. However, it is desired to develop new technologies that enable the detection of a minimal number of drug-resistant cells because substantial patients experience drug resistance regardless of the presence or absence of past and current treatment. We have previously developed a novel technique to detect relatively small number of drug resistant cells. Here, we challenged to centuplicate the detection ability by the improvement of the FRET biosensor, the detection method and the analytical method. As a result, we obtained 162-fold improvement throughout this study.

研究分野：実験病理学

キーワード：バイオイメージング 腫瘍 薬剤耐性 フローサイトメーター

1. 研究開始当初の背景

染色体相互転座 t(9;22)(q34;q11)により生じるフィラデルフィア染色体(Ph¹)には両染色体切断部位において融合遺伝子 *bcr-abl* が形成される。この転写産物である BCR-ABL の恒常的チロシンキナーゼ活性が慢性骨髄性白血病(CML, chronic myeloid leukemia)や Ph¹陽性急性リンパ性白血病(Ph-ALL, acute lymphocytic leukemia)の発症原因であるため、BCR-ABL の特異的チロシンキナーゼ阻害薬(TKI, tyrosine kinase inhibitor)イマチニブが導入され、多くの CML 症例が経口薬でコントロール可能となった。しかし、治療開始後は一定以上の TKI 感受性を示した症例でも、治療経過中に認められる場合も決して少なくはない。従って、治療開始時・途上においてその耐性機序を問わず、極少数存在する耐性細胞の検出を可能とする技術が、効果的かつ安全な治療方針の策定に望まれている。

申請者らは蛍光タンパク質と蛍光共鳴エネルギー移動(FRET, Förster resonance energy transfer)の原理を利用し、BCR-ABL の基質である CrkL を骨格に有するバイオセンサー Pickles を開発、*ex vivo* での BCR-ABL 活性を可視化・定量化し、分子標的薬の治療前効果判定に世界で初めて成功した。本技術は、従前の薬効判定手法に比し高感度で、1細胞レベルの薬剤感受性を判定可能であり、比較的少数の薬剤耐性細胞を検出可能である。臨床検体においても遺伝子変異の有無に関わらずチロシンキナーゼ阻害薬の感受性を判定することができるだけでなく、未治療症例における治療効果を予測できる可能性が示唆された(*Clin. Cancer Res.* 16: 3964, 2010)。

2. 研究の目的

研究開始時の薬剤耐性細胞検出能は1/1,000個程度であり、また顕微鏡ベースの判定のため解析対象細胞数に限界がある。フローサイトメーターによる多細胞観察が解決策の候補の筆頭だが、現在普及している機器ではノイズレベルが高く、顕微鏡での観察細胞数に対して100倍の細胞を観察しても検出能は1/1,000のままである(未発表データ)。そこでFRETを定量的に解析することのできる蛍光寿命フローサイトメーター Flicymeを導入し、バイオセンサーおよびフローサイトメーター側、すなわちソフト面とハード面の双方の技術革新により、現在の100倍、1/100,000個の耐性細胞検出能の達成により、飛躍的に検出能を向上することが本研究のゴールである。

3. 研究の方法

(1) CrkL 切断部位の同定と改変型バイオセンサーの開発

分子内 FRET の測定には FRET のドナー CFP とアクセプター YFP が 1 対 1 の関係になることが必要であるが、我々のバイオセンサーを患者白血病細胞等に導入する際には、バイオセンサー内で切断が生じることが明らかになっており、この切断が生じた細胞は解析対象から外さざるをえない。現在まで切断が蛍光タンパク質ではなく CrkL 内で少なくとも 2 箇所生じることが明らかになっている。本研究では、蛍光観察とウエスタンブロッティングを用いて、切断部位の絞り込みとともに切断するタンパク分解酵素と認識配列を同定する。その結果を元に CrkL 内のタンパク分解酵素認識部位に変異を入れ、切断されないバイオセンサーを作製する。この際当初のバイオセンサーの高性能性を失わないように留意しながら開発する必要があるが、我々は多種多様なバイオセンサー作製経験があり、これまでに蓄積されたノウハウを活かす。本研究項目により解析対象細胞数について現状比 2 倍の増加を目指す。

最近 CrkL の類縁分子 CrkII について、タンパク質切断とアポトーシス誘導に関する報告が成された(*Nat Cell Biol.* 14:87, 2011)。研究の実施にはこの報告が参考になるとともに、病態の発症と CrkL 切断の関連性の解明についての新しい知見を有無いだすという副次的効果も期待される。

(2) 周波数ドメインでの蛍光寿命測定における励起レーザー周波数の検討

蛍光タンパク質が有する蛍光寿命成分は常に単一のものではなく、複数成分からなる場合も少なくない。我々の用いているバイオセンサーの FRET ドナーである ECFP についても少なくとも 4 成分からなることが知られている。蛍光寿命を測定する際にはそれぞれの成分に対し適切な周波数の励起光により励起する必要がある。実際我々は、励起レーザーの周波数を変化させることにより、ECFP 由来で FRET による蛍光寿命の短縮が変化することを発見し、当該技術に関する特許を出願している(特願 2012-065771)。この基本技術を元にバイオセンサーの FRET 効率変化について最大の感度が得られる測定系を開発する。

(3) 単一成分蛍光寿命蛍光タンパク質の導入

上記で述べたように ECFP の蛍光寿命成分は複数あるが、FRET のドナーとして使用可能な蛍光タンパク質には単一蛍光寿命成分のものも存在する。そこで、FRET のドナーをミドリイシシアン(MiCy)あるいは turquoise に

置換したバイオセンサーを作製する。さらにそれぞれに対し、上記の周波数変調法を適用することで、最適な周波数による検出を行い、最も優れた感度を示すバイオセンサーと計測系の組合せを見出す。

(4) 多次元取得パラメータからの耐性細胞検出法

多数の細胞から少数の耐性細胞を高感度に検出する際に重要なのは、同定された細胞が真に耐性細胞か否かすなわち特異度を高めることにある。Flicyme は蛍光寿命と同時に、通常のフローサイトメーターで計測する蛍光強度も同時に測定することが可能であることから、FRET 効率を判断するためのパラメータが多いことが特徴である。この特徴を生かし、蛍光強度比と蛍光寿命の両パラメータから FRET 効率の高低を判断することで確実に薬剤耐性細胞を同定する判定法を確立する。基本的なアルゴリズムに関しては基礎が確立されており（特願 2012-065769）この基本技術を元に研究開発を実施する。現状比 5 倍の高精度化を目指す。

(5) 臨床検体を用いたバリデーション

これまでの手法で確立された手法を用いて、倫理委員会の承認を得た後、実際の CML 患者検体を用いて検査を実施する。匿名化に関しては北海道大学病院高度先進医療支援センターの協力を仰ぐ。検査結果と検査後 1 年の臨床所見を対比しその特異度を検討する。

4. 研究成果

(1) バイオセンサー切断部位の同定と改良型バイオセンサーの開発

蛍光観察とウエスタンブロッティングを用いて、バイオセンサーに用いている CrkL 分子内に 2 ヶ所の切断部位があることを同定した。そのうち 1 ヶ所については既知のタンパク分解酵素認識配列であり、当該部位に変異を入れたバイオセンサーを作製した。その結果、バイオセンサー切断は有意に抑制され、検出感度が 2 倍以上向上した。この成果は特許出願した。また他の 1 箇所についても切断部位を詳細に検討した結果、Pickles バイオセンサーのセンサードメイン近傍に存在することが判明し、変異の導入が不可能であった。そこで、全長の FRET と切断型 FRET の細胞内局在から、切断が細胞内の特定のドメインで生じているという仮説を立てた。それを実証するために、バイオセンサーに各種局在化シグナルを付加したバージョンを複数作製し検討したところ、切断が有意に抑制され検出感度が 3 倍程度向上した。本成果も PCT 出願した。

(2) 周波数ドメインでの蛍光寿命測定における励起レーザー周波数の検討

バイオセンサーに含まれる ECFP の蛍光寿命は 4 成分からなることが知られている。周波数ドメインを用いて蛍光寿命を検出場合、用いるレーザーの周波数により蛍光寿命の成分のうち検出しやすいものとし難いものがあることがわかった。我々は励起レーザーの周波数を変調することで、それぞれの成分のいずれかを効率よく検出する方法を開発した。本法を用いることで、従前にもし蛍光寿命の変化を 3 倍高感度に検出することが可能となった。

(3) 単一成分蛍光寿命蛍光タンパク質の導入

上記と並行して、ECFP に代わり 1 成分の蛍光寿命を有する蛍光タンパク質を FRET のドナーとして用いたバイオセンサーを作製した。ドナーのみの変更では FRET 効率の変化が認められなかったが、適切なアクセプターを用いることで、蛍光強度の変化において従来型に迫る性能を有するバイオセンサーの開発に成功した。

(4) 多次元取得パラメータからの耐性細胞検出法

蛍光強度比と蛍光寿命の両パラメータから FRET 効率の高低を判断することで確実に薬剤耐性細胞を同定するアルゴリズムと判定法を確立し、検出感度の 3 倍の向上を達成した。このアルゴリズムと上記で検討した励起レーザー周波数の最適化で、9 倍程度の高感度化が達成できた。また単一成分蛍光寿命を持つ蛍光タンパク質の導入で 3 倍の感度上昇も達成済みである。

(5) バリデーション

種々数の耐性細胞を含むサンプルを用意し、結果当初の目標であった 1 ml 中に含まれる数個の耐性細胞が検出できた。

本研究全体の進捗は、上述したように研究実施計画通りに行うことができた。本研究計画においては各研究項目で具体的な検出感度の向上数値を上げ、全体として 100 倍の高感度化を計ることを目標として研究を開始した。平成 25 年度には、研究計画 1 については 2 ヶ所ある切断部位のうち 1 ヶ所を阻害するのみで、2 倍以上の改善が、研究項目 2 で約 3 倍の向上が認められた。また平成 26 年度に実施した研究により、研究項目 1 については 2 倍を見込んでいたが、結果予想を上回り 6 倍程度となった。結果、 $6 \times 9 \times 3 = 162$ 倍の高感度化を達成し、目標であった 100 倍をクリアすることができた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

1. Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane. Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba. **Anal. Sci.**, 31(4): 267-274, 2015, 査読有, doi: 10.2116/analsci
2. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. T. Tsukiyama, A. Fukui, S. Terai, Y. Fujioka, K. Shinada, H. Takahashi, T.P. Yamaguchi, Y. Ohba, and S. Hatakeyama. **Mol. Cell. Biol.** 35(11): 2007-2023, 2015, 査読有, doi: 10.1128/MCB.00159-15
3. CRK adaptor protein induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells via HGF/c-Met feedback loop. R. Matsumoto, M. Tsuda, L. Wang, N. Maishi, T. Abe, T. Kimura, M. Tanino, H. Nishihara, K. Hida, Y. Ohba, N. Shinohara, K. Nonomura, and S. Tanaka. **Cancer Sci.**, in press, 査読有, doi: 10.1111/cas.12662.
4. P18/Stathmin1 is regulated by miR-31 in ovarian cancer in response to taxane. M.K. Hassan, H. Watari, T. Mitamura, Z. Mohamed, S.F. EL-khamisy, Y. Ohba, and N. Sakuragi. **Oncoscience** 2(3): 294-308, 2015, 査読有, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394135/>
5. Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low dose metronomic paclitaxel. K. Akiyama, N. Ohga, Y. Hida, N. Maishi, Y. Ohba, A.M. Towfik, T. Kawamoto, H. Ohmura, K. Yamada, C. Torii, M. Shindoh, and K. Hida. **Am. J. Pathol.** 185(2): 572-580, 2015, 査読有, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.10.017
6. Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. K. Terada, T. Horinouchi, Y. Fujioka, T. Higashi, P. Nepal, M. Horiguchi, S. Karki, C. Hatate, A. Hoshi, T. Harada, Y. Mai, Y. Ohba, and S. Miwa. **J. Biol. Chem.** 289(51): 35283-95, 2014, 査読有, doi: 10.1074/jbc.M113.544171
7. Sustained elevation of Snail promotes Glial-Mesenchymal Transition after irradiation in malignant glioma. R. Mahabir, M. Tanino, E. Aiman, L. Wang, T. Kimura, T. Itoh, Y. Ohba, H. Nishihara, H. Shirato, M. Tsuda, and S. Tanaka. **Neuro-Oncology** 6(5): 671-685, 2014, 査読有, doi: 10.1093/neuonc/not239
8. Histone Deacetylase Inhibitors Sensitize Lung Cancer Cells to Hyperthermia: Involvement of Ku70/SirT-1 in Thermo-Protection. M. K. Hassan, H. Watari, A.E. Salah-Eldin, A.S. Sultan, Z. Mohamed, Y. Fujioka, Y. Ohba, and N. Sakuragi. **PLoS One** 9(4): e94213, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0094213
9. Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. M. Matsuda-Lennikov, F. Suizu, N. Hirata, M. Hashimoto, K. Kimura, T. Nagamine, Y. Fujioka, Y. Ohba, T. Iwanaga, and M. Noguchi. **PLoS One** 9(1): e79795, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0079795
10. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba and N. Sakuragi. **Biomed Res. Int.** 2014: 150845, 2014, 査読有, doi: 10.1155/2014/150845
11. A Ca²⁺-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. Y. Fujioka, M. Tsuda, A. Nanbo, T. Hattori, J. Sasaki, T. Sasaki, T. Miyazaki and Y. Ohba. **Nat. Commun.** 4: 2763, 2013, 査読有, doi: 10.1038/ncomms3763
12. Beneficial innate signaling interference for anti-bacterial responses by a TLR-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis. H. Negishi, K. Matsuki, N. Endo, H. Sarashina, S. Miki, A. Matsuda, K. Fukazawa, N. Taguchi-Atarashi, H. Ikushima, H. Yanai, J. Nishio, K. Honda, Y. Fujioka, Y. Ohba, T. Noda, S. Taniguchi, E. Nishida, Y. Zhang, H. Chi, R. A. Flavell, and T. Taniguchi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110(49): 19884-19889, 2013, 査読有, doi: 10.1073/pnas.1320145110
13. Inhibition of influenza A virus infection by Galectin-9. T. Hattori, J. Maruyama, Y. Fujioka, Y. Nakayama, Y. Ohba, T. Niki, T. Arikawa, T. Miyazaki, M. Hirashima, and H. Kida. **Jpn. J. Vet. Res.** 61(1&2): 5-18, 2013, 査読有, doi:10.14943/jjvr.61.1-2.5
14. All members of the EPI64 subfamily of TBC/RabGAPs also have GAP activities toward Ras. H. Nagai, S. Yasuda, Y. Ohba, M. Fukuda, and T. Nakamura. **J. Biochem.** 153(5): 283-288, 2013, 査読有, doi: 10.1093/jb/mvs147
15. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. S. Chiba, M. Baghdadi, H. Akiba, H. Yoshiyama, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, Y. Fujioka, Y. Ohba, J.V. Gorman, J.D. Colgan, M. Hirashima, T. Uede, A. Takaoka, H. Yagita and M. Jinushi. **Nat. Immunol.** 13(9): 832-842, 2012, 査読有, doi: 10.1038/ni.2376

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 西出真也他、FRET イメージングによる BMAL1-CLOCK 相互作用の解析、第 92 回日本生理学会、2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場(兵庫県 神戸市)
2. Yusuke Ohba et al. Development of FRET-based biosensors for detection of CML cells resistant to molecular target drugs. International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Function and Molecular Activities. 2015 年 1 月 26-27 日国立京都国際会館(京都府 京都市)
3. Yoichiro Fujioka et al. Ca²⁺ signaling mediated influenza virus internalization into host cells. International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Function and Molecular Activities. 2015 年 1 月 26-27 日国立京都国際会館(京都府 京都市)
4. Yoichiro Fujioka et al. Ca²⁺ signaling is involved in influenza virus entry into host cells. The 2014 ASCB/IFCB meeting. 2014 年 12 月 7 日. Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, PA, USA)
5. 藤岡真理他、FRET バイオセンサーを用いた CML 生細胞における BCR-ABL 活性測定、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
6. 堀内浩水他、Ras-PI3K によるエンドサイトーシス制御に関する因子の機能解析、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
7. 佐藤 絢他、Ras-PI3K シグナルによるエンドサイトーシス制御に関する分子の探索、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
8. 藤岡容一朗他、Ca²⁺シグナルを介したインフルエンザウイルス宿主細胞侵入メカニズムの解明、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
9. 大場雄介、光による細胞の『観察』から『操作』へ、第 37 回日本分子生物学会(招待講演) 2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
10. 大場雄介、イメージング技術を用いた分子標的治療薬効果判定法の開発と応用、第 4 回北海道探索病理学研究シンポジウム(招待講演) 2014 年 10 月 25 日、京王プラザホテル札幌(北海道 札幌市)
11. 大場雄介、癌細胞におけるシグナル伝達イメージングとその応用、第 87 回日本生化学会大会(招待講演) 2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館(京都府 京都市)
12. 南保明日香他、ウイルス-宿主相互作用を可視化する、第 87 回日本生化学会大会(招待講演) 2014 年 10 月 15 日、国立京都国際会館(京都府 京都市)
13. Yusuke Ohba、Clinical application of fluorescence imaging、第 73 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
14. 藤岡容一朗他、カルシウムシグナルを介した外来因子の細胞取り込み機構、第 94 回北海道医学大会生理系分科会、2014 年 8 月 30 日、北海道大学学術交流会館(北海道 札幌市)
15. 佐藤絢他、Ras-PI3K シグナルによるエンドサイトーシス制御機構の解明、第 94 回北海道医学大会生理系分科会、2014 年 8 月 30 日、北海道大学学術交流会館(北海道 札幌市)
16. 藤岡容一朗他、インフルエンザウイルスの Ca²⁺シグナルを介した宿主細胞侵入機構、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11-13 日、奈良県新公会堂他(奈良県 奈良市)
17. 大場雄介、フェルスター共鳴エネルギー移動を用いたシグナル伝達の可視化とその応用、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16-18 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県 鹿児島市)招待
18. Y. Fujioka, et al., Involvement of Ras-PI3K-mediated calcium signaling in the regulation of endocytosis. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16-18 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県 鹿児島市)
19. Y. Fujioka, et al., Influenza viruses internalize into host cells via calcium signaling、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸国際会議場他(兵庫県 神戸市)
20. 秋山廣輔他、P-gp 阻害剤はメトロノミッドケモセラピーの血管新生阻害効果を強める、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

21. 間石奈湖他、血管内皮細胞によるがん転移促進、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3-5日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
22. 大場雄介、細胞機能とシグナル伝達の蛍光イメージング、日本生化学会北海道支部例会第50回記念大会、2013年7月26日、北海道大学医学部学友会館（北海道札幌市）招待
23. 大場雄介、細胞機能の蛍光バイオイメージング、第33回日本骨形態計測学会2013年7月4-6日、アクティシティ浜松コングレスセンター（静岡県浜松市）招待
24. Y. Fujioka, et al., Involvement of Ras-PI3K signaling in the uptake of exogenous factors into cells, 第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月19日、ウインクあいち（愛知県名古屋市）

〔図書〕(計2件)

1. Ohba Y, Fujioka Y, Nakada S and Tsuda M. Fluorescent Protein-Based Biosensors and Their Clinical Applications. **Fluorescence-Based Biosensors-concepts and applications. Progress in Molecular Biology and Translational Science** Morris MC (.ed) Elsevier, London, 429 pages (p313-348)2013(ISBN:978-0-12-386932-6)
2. [特集]細胞の少数制と多様性に挑むシングルセルアナリシス 患者血液とFRETバイオセンサーを用いた薬効効果予測. 大場雄介. **生体の科学** (金原出版) 65(2): 171-175 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計4件)

1. 名称：フェルスター共鳴エネルギー移動用ポリペプチド
発明者：大場雄介
権利者：北海道大学
種類：特許
番号：2013-080738
出願年月日：2013年4月8日
国内外の別：国内
2. 名称：フェルスター共鳴エネルギー移動用ポリペプチド
発明者：大場雄介
権利者：北海道大学
種類：特許
番号：PCT/JP2014/060185
出願年月日：2014年4月8日
国内外の別：国外

3. 名称：FRET計測措置及びFRET計測方法
発明者：中田成幸、大場雄介ほか
権利者：三井造船株式会社、北海道大学
種類：特許
番号：PCT/JP2013/058325
出願年月日：2013年3月22日
国内外の別：国外

4. 名称：FRET計測措置及びFRET計測方法
発明者：中田成幸、大場雄介ほか
権利者：三井造船株式会社、北海道大学
種類：特許
番号：PCT/JP2013/058317
出願年月日：2013年3月22日
国内外の別：国外

取得状況 (計3件)

1. 名称：FRET計測措置及びFRET計測方法
発明者：中田成幸、大場雄介ほか
権利者：三井造船株式会社、北海道大学
種類：特許
番号：5585973
出願年月日：2014年8月28日
取得年月日：2014年8月1日
国内外の別：国内
2. 名称：FRET計測措置及びFRET計測方法
発明者：中田成幸、大場雄介ほか
権利者：三井造船株式会社、北海道大学
種類：特許
番号：5695190
出願年月日：2014年8月28日
取得年月日：2015年2月13日
国内外の別：国内
3. 名称：BCR-ABLチロシンキナーゼ活性測定試薬
発明者：大場雄介、近藤健
権利者：北海道大学
種類：特許
番号：5665262
出願年月日：2008年5月23日
取得年月日：2014年12月19日
国内外の別：国内
6. 研究組織
(1)研究代表者
大場 雄介 (OHBA, Yusuke)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30333503