

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K01134

研究課題名(和文) 古人骨のプロテオミクス・ホルモン分析による妊娠マーカー検出法の開発

研究課題名(英文) Identification of proteomic and hormonal markers of pregnancy in human skeletons

研究代表者

澤藤 匠(葛谷匠)(Tsutaya, Takumi)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・助教

研究者番号：80758813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：受理済みの倫理審査において設定した枠組みのもと、現代人の歯髄資料を収集した。出産後に歯科治療に訪れた患者さん複数人、および、対照群の位置づけとなる妊娠経験のない患者さん複数人を対象とした。抜去歯より取り出した歯髄からタンパク質を抽出し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計によって、組織中に存在するタンパク質を網羅的に同定した。また、密閉された土器の内部に残存した有機物の古代プロテオミクスも実施した。しかし、分解が非常に進んでおり、確実なタンパク質は同定されなかった。この結果より、タンパク質抽出法の改善が必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中や出産中に特異的に発現する妊娠特異的なタンパク質を歯髄より検出できるかどうかを検証することを目的のひとつとして、本研究を実施した。COVID-19のパンデミックの影響もあり、検体の収集が期待通りに進まず、妊娠出産特異的なタンパク質の同定はできなかった。現在データ解析を進め、この結果が本当にネガティブかどうかを確かめている。しかし、本研究によって歯髄中に存在するタンパク質を網羅的に同定したことで、口腔内の病変によるプロテオームの変化を捉えることのできる参照プロテオームを提供することができた。こうした基礎的な知見は、文化財科学だけでなく、歯科治療や予防医療にも役立つものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Under the framework of accepted ethical review, dental pulp samples from contemporary human individuals were collected. Several patients who came for dental treatment after childbirth and several patients who had never been pregnant were included in the study. Proteins were extracted from dental pulp sampled from extracted teeth, and the proteins present in the tissues were comprehensively identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Ancient proteomics of the organic material remaining inside the sealed pottery vessel was also performed. However, degradation was so advanced that no reliable protein identification was made. This result indicates that improvements in protein extraction methods are necessary.

研究分野：自然人類学

キーワード：妊娠 ホルモン プロテオミクス 古人骨 歯髄 胎盤

1. 研究開始当初の背景

妊娠出産は、ヒトの生殖や生死に関わり、生物考古学や古人口学において重要な研究トピックである。しかし、人骨から妊娠出産に関する情報（妊娠出産経験や、死亡時に妊娠していたかどうかなど）を引き出す確実な手法が存在しない。骨盤に残された骨の窪みである「妊娠痕」から、過去の妊娠経験を間接的に推定する形態的な手法があるが、男性にも「妊娠痕」が見られる場合があるなど、この手法の妥当性には疑問が残る [1]。また、妊娠期間中には母体内の窒素動態が変化するが、人骨の窒素同位体比（窒素動態と食性の指標）からはその個体が妊娠中かどうかは判別できないことが示されている [2]。

もし、人骨から直接、その個体の妊娠出産に関する情報を引き出せれば、歴史文献に残らない先史時代や庶民の妊娠出産の実態を復元し、当時のジェンダーや生殖をとりまく状況を考察できる。また、集団中の妊婦の数が復元できれば、死亡率と異なりこれまで推定の難しかった考古時代の出生率を推定できる。

2. 研究の目的

本研究では、ある女性人骨が、死亡時やその直前数ヶ月以内に妊娠状態にあったかを判別するための、分子的な手法の開発を目指した。妊娠出産の際には母体ではたらくタンパク質やホルモンの状態が変化する。たとえば、胎盤由来のプロテアーゼである PAPP-A や、妊娠初期から濃度が増加する糖タンパク質である hCG は、妊娠期間の女性のみで発現しており、妊娠のマーカーとして生殖医療でも用いられている [3]。胎児で発現している血液タンパク質の AFP は、妊娠中の母体の血中からも検出される [4]。また、妊娠中期からは、プロゲステロンやエストロゲンが胎盤から放出されて濃度上昇して妊娠の維持にはたらき、後期や末期にはプロスタグランジン濃度が増加し、分娩への準備がはじまる [5]。妊娠末期にはリラキシンが放出され子宮を弛緩させ、分娩への準備を整える [6]。こうした、妊娠期間中やその直後のみに検出されるタンパク質や、妊娠期間に特異な濃度や動態を示すホルモンを、人骨が死亡時に妊娠していたかを知るためのマーカーとして利用できる可能性がある。

具体的には、本研究では、妊娠中または出産直後の女性の歯髄から、妊娠関連タンパク質・ホルモンの検出を目指した。まずは、妊娠に関する情報が既知である現代人の抜去歯を利用して、妊娠に関連するタンパク質・ホルモンのマーカー検出と分析系の開発を試みた。その後、開発した手法を適用し、古人骨からも妊娠マーカーが検出できるかを検討した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、妊娠に関する情報が既知である現代人の抜去歯を利用して、手法開発を試みた。妊娠マーカーであるタンパク質や、妊娠特異的なホルモン動態が、妊婦や出産直後の母親の抜去歯のみから検出されることを確かめ、同時に、どの分子マーカーの感度や検出可能性が高いのかを検討することを目指した。

現代人の抜去歯は、受理済みの倫理審査のもと、山梨大学医学部附属病院にて収集した。出産後に歯科治療に訪れた患者さん複数人、および、対照群の位置づけとなる妊娠経験のない患者さん複数人より、本人の同意のもと、歯科治療のために抜去された歯を収集した。得られた抜去歯は横に二分し、断面から歯髄を取り出した。得られた歯髄はホルモン分析とプロテオーム分析のために二分した。プロテオーム解析の対象とした歯髄からはタンパク質を抽出し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) によって、組織中に存在するタンパク質を網羅的に同定した。

ポジティブコントロールとなる考古遺物は、相模小田原藩大久保家屋敷跡第2・北新網町町屋跡遺跡（東京都港区）より出土した胞衣埋葬容器と考えられる合わせ口のかわらけ内部に含まれていた有機物を利用した。2020年9月にこの合わせ口かわらけの開封作業に立ち会い、現代のタンパク質やDNAのコンタミネーションを可能な限り排除した状態で試料を分析採取した。考古遺物の分析に特化した専用のクリーン実験室において、内部に含まれていた有機物からタンパク質を抽出した。抽出物はLC-MS/MSによって分析し、この試料中に存在するタンパク質を網羅的に同定した。

4. 研究成果

現代人の歯髄については、対象群の検体5点と、比較群の検体4点を分析した。全体で1000以上のタンパク質が同定され、現代人の歯髄について以前報告されていた342種類のタンパク質が同定されたという結果を上回るものとなった [7]。しかし、そのなかに妊娠出産特異的なタンパク質は含まれていないようであった。したがって、本研究の狙い自体は達成されなかった。現在、この結果が本当にネガティブであるのかを確認するためのデータ解析を実施するとともに、歯髄のプロテオームの記述を行なっている。

合わせ口のかわらけ内部に含まれていたミイラ化した胎盤と予想される有機物については、

試料の取扱や処理に由来する現代のものと考えられるタンパク質（ケラチンやトリプシンなど）およびブランクから検出されたタンパク質をコンタミネーションと考えて除くと、5種類のタンパク質が同定された表1。うち4種類では質量分析計スペクトルとペプチド配列のマッチングの質が悪く、結果は不明瞭であった。V型コラーゲン α 1鎖（COL5A1）のペプチド配列のみが、ある程度の確実性で同定された。しかし、検出された2種類のアミノ酸配列は脊椎動物のさまざまな分類群でよく保存された配列であり、種の特定には至らなかった。また、COL5A1は特定の器官に発現するタンパク質ではなく、それ以外に特定の器官を同定できる他のタンパク質は検出されなかった。そのため、内容物がどのような生物の体のどの部位に由来するかは依然として不明である。内容物の分解が想定以上に進んでいたために結果が良好ではなかった可能性がある。

歯髄の分析、考古遺物の分析の両方において、タンパク質抽出法を改良して、微量にしか含まれない目的のタンパク質を効果的に分離する必要があるかもしれない。また、LC-MS/MSの結果を解析する際、どのようなデータベースを利用するかについても検討する必要がある。

<引用文献>

1. Igarashi 1992. J Anthropol Soc Nippon 100:311-319.
2. Nitsch et al. 2010. J Archaeol Sci 37:3191-3199.
3. Boldt & Conover 2007. Growth Horm IGF Res 17:10-18.
4. Seppälä & Ruoslahti 1972. Am J Obstet Gynecol 112:208-212.
5. Wood 1994. "Dynamics of human reproduction"
6. Plant & Zeleznik 2015. "The physiology of reproduction"
7. Eckhardt et al. 2014. J Endodont 40:1961-1966.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 蔦谷匠、島村繁、谷川章雄、福原瑤子、澤藤りかい	4. 巻 88
2. 論文標題 531号遺構出土の合わせ口かわらけ内容物の古代プロテオーム分析および古代DNA分析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 相模小田原藩大久保家屋敷跡第2・北新網町屋跡遺跡	6. 最初と最後の頁 125 ~ 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 澤藤りかい、蔦谷匠	4. 巻 -
2. 論文標題 質量分析を利用したプロテオミクスの考古学・古人類学における応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anthropological Science (Japanese Series)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1537/asj.200213.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木下こづえ	4. 巻 54
2. 論文標題 排泄物中のホルモンから動物をとりまく環境を知る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ヒトと動物の関係学会誌	6. 最初と最後の頁 13-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔦谷匠、島村繁、板垣徹、鈴木美和、谷川章雄、澤藤りかい
2. 発表標題 近世の合わせ口かわらけ内容物の古代プロテオミクス分析
3. 学会等名 第75回日本人類学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木下 こづえ (Kinoshita Kodzue) (50724233)	京都大学・野生動物研究センター・助教 (14301)	
研究分担者	澤藤 りかい (Sawafuji Rikai) (50814612)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・日本学術振興会特別 研究員 (CPD) (12702)	
研究分担者	安達 登 (Adachi Noboru) (60282125)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------