

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11379

研究課題名(和文) モデフィコミクスによる歯周疾患のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Application of modifomic technologies to discover and identify biomarkers for periodontal diseases

研究代表者

土田 祥央 (Tsuchida, Sachio)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90410422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではモデフィコミクス(翻訳後修飾を特異的に検出する技術)を発展させ、歯周疾患に起こりうる代表的な翻訳後修飾である糖鎖修飾および最も広く研究されているリン酸化に焦点をあてて、歯周疾患における翻訳後修飾を網羅的探索により捉え、歯周疾患の早期診断および再発予測治療効果判定等に応用することを目的とした。

これまで網羅的な探索が行われてこなかった歯周疾患の翻訳後修飾を最新の質量分析技術により検出し、診断マーカーの可能性を追及することが可能となった。しかし、歯周疾患特異的リン酸化ペプチドでのアレイ作製まで至らなかったため、実現化に向けて今後も検討を重ねる予定である。

研究成果の概要(英文)：Proteomics provides a better understanding of cells by elucidating the structure, function, and interactions of proteins. Furthermore, post-translational modification (PTM) of proteins is required to control complex and dynamic cellular processes via regulating interactions between key proteins. To understand these regulatory mechanisms, it is critical to profile the PTM-dependent protein-protein interactions. Our findings indicate that PTM of protein may be involved in the progression of periodontal disease and is a potential biomarker of periodontal disease. Further studies using a larger sample size are required to verify the findings of this study. In the future, phosphoproteomics and glycomics may be applied to the study of periodontal disease.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯学 歯周病学 プロテオミクス 質量分析計

1. 研究開始当初の背景

プロテオーム解析技術の進歩と普及のおかげで、疾患プロテオミクス研究が急速に進展している。申請者らもプロテオーム解析を用い健常群、歯周疾患患者群から得た GCF 中のタンパク質の同定と共に定量を行った (PROTEOMICS 2013)。本検討の結果、619 のタンパク質が検出され、歯周疾患に関与すると思われるタンパク質が多数含まれていた。申請者らは歯周疾患を対象に、GCF において高発現しているタンパク質の疾患マーカーとしての意義を明らかにしてきた。しかし、発現量のみでの解析では歯周疾患がある程度進行しないと有意な変化として検出できない。大部分のタンパク質は糖鎖修飾およびリン酸化をはじめとする翻訳後修飾を受けて初めて本来の機能を発揮する。歯周組織においても疾患の初期の段階で特異的な翻訳後修飾が生じていることが予想されるので、その探索・同定が必須である。モディフィコミクスとはタンパク質の翻訳後修飾の網羅的な探索を行うことである。1980 年代からタンパク質やペプチドの質量分析装置が急速に発達してきた。この装置により高いスループットで簡単にアミノ酸配列や翻訳後修飾に関する情報が得られるようになった。また、最近では、翻訳後修飾されたペプチドを選択的に濃縮する技術が発達してきて量的に少ない翻訳後修飾ペプチドでもうまく質量分析装置によって解析できるようになった。従って、これまで網羅的な探索が行われてこなかった歯周疾患の糖鎖修飾およびリン酸化を最新の質量分析技術により検出し、診断マーカーの可能性を追及することが可能となった。

2. 研究の目的

プロテオーム解析技術の発展により、歯周疾患のバイオマーカーの開発が盛んに行われている。申請者らも、発現プロテオーム解析を駆使して歯周疾患のバイオマーカー探索を続けてきた。しかし、大部分のタンパク質が何らかの翻訳後修飾を受けて初めてその本来の機能を獲得することを考慮すると、従来の発現プロテオミクスに頼る手法では限界がある。従ってタンパク質の翻訳後修飾にも注目する必要がある。本研究ではモディフィコミクス (翻訳後修飾を特異的に検出する技術) を発展させ、歯周疾患に起こりうる

代表的な翻訳後修飾である糖鎖修飾および最も広く研究されているリン酸化に焦点をあてて、歯周疾患における翻訳後修飾を網羅的探索により捉え、歯周疾患の早期診断および再発予測治療効果判定等に应用することを目的とした。

3. 研究の方法

限外濾過装置を併用した抽出法により GCF からタンパク質を抽出した。キャリアプロテインの影響を受けずに高効率で再現性が良い有機溶媒沈殿法を用いて GCF からペプチドの抽出を試みた。

レクチンと呼ばれるタンパク質とグリカンの親和性を利用して濃縮するレクチンアフィニティー精製を用い糖タンパク質、ないしは糖ペプチドを濃縮した。N型糖タンパク質・ペプチドのバリディーションおよび歯周疾患特異的リン酸化ペプチドアレイの作製と多検体でのバリディーションを行った。歯周疾患マーカー候補N型糖タンパク質・ペプチドのバリディーションを行った。糖鎖及びタンパク質に特異的な抗体を購入し、Western blotting により検証した。歯周疾患マーカー候補N型糖ペプチドにおいては糖鎖及びペプチドに特異的な抗体を購入し、免疫沈降を行い、MALDI-TOF MS で測定し検証を行った。

4. 研究成果

限外濾過装置を併用した方法で GCF からタンパク質を、また、キャリアプロテインの影響を受けずに高効率で再現性が良い有機溶媒沈殿法を用いてペプチドを抽出した。次に、レクチンアフィニティー精製により糖タンパク質、ないしは糖ペプチドを濃縮し SDS-PAGE にて多数のバンドを確認した。従って、本計画の抽出法が確立された。

歯周疾患マーカー候補N型糖タンパク質・ペプチドのバリディーションおよび歯周疾患特異的リン酸化ペプチド多検体でのバ

リディーション法を確立した。免疫沈降と SDS-PAGE により GCF 中のコビキチン化タンパクのバンドを多数検出し、最終年度では質量分析技術とウエスタンブロットによりコビキチン化タンパク質を GCF 中から検出した (*Int J Pept Res Ther.* **2016**, *Int J Mol Sci.* **2017**)。従って、これまで網羅的な探索が行われてこなかった歯周疾患のコビキチン化を最新の質量分析技術により検出し、診断マーカーの可能性を追及することが可能となった。しかし、歯周疾患特異的リン酸化ペプチドでのアレイ作製まで至らなかったため、実現化に向けて今後も検討を重ねる予定である。

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 10 件)

1. Tsuchida S, Murata S, Miyabe A, Satoh M, Takiwaki M, Matsushita K, Nomura F. An improved in-house lysis-filtration protocol for bacterial identification from positive blood culture bottles with high identification rates by MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods.* **2018** Mar 30. pii: S0167-7012(18)30168-4. doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.014.
2. Takeuchi N, Segawa S, Ishiwada N, Ohkusu M, Tsuchida S, Satoh M, Matsushita K, Nomura F. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Infect Chemother.* **2018** Mar 10. pii: S1341-321X(18)30062-X. doi: 10.1016/j.jiac.2018.02.007.
3. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Takiwaki M, Ishige T, Miyabayashi Y, Iwasawa Y, Kobayashi S, Beppu M, Nishimura M, Kodera Y, Matsushita K, Nomura F. Assessment by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Effects of Preanalytical Variables on Serum Peptidome Profiles Following Long-Term Sample Storage. *Proteomics Clin Appl.* **2018** Jan 19. doi: 10.1002/prca.201700047.
4. Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Nomura F. Ubiquitination in Periodontal Disease: A Review. *Int J Mol Sci.* **2017** Jul 10;18(7). pii: E1476.
5. Ashizawa K, Murata S, Terada T, Ito D, Bunya M, Watanabe K, Teruuchi Y, Tsuchida S, Satoh M, Nishimura M, Matsushita K, Sugama Y, Nomura F. Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* **2017** Aug;139:54-60.
6. Kobayashi S, Hoshino T, Hiwasa T, Satoh M, Rahmutulla B, Tsuchida S, Komukai Y, Tanaka T, Matsubara H, Shimada H, Nomura F, Matsushita K. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. *Oncotarget.* **2016**;7(50):82493-82503.
7. Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Kodera Y, Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein α -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *Br J Cancer.* **2016**;115(8):949-956.
8. Kikuchi W, Nishimura M, Kuga T, Tsuchida S, Saito T, Satoh M, Noda K, Kodera Y, Tomonaga T, Nomura F. Fibrinogen alpha C chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9), a biomarker for various pathological conditions, is produced in post-blood collection by fibrinolysis and coagulation factors. *Clin Proteomics.* **2016**;13:27.

9. Ishige T, Nishimura M, Satoh M, Fujimoto M, Fukuyo M, Semba T, Kado S, Tsuchida S, Sawai S, Matsushita K, Togawa A, Matsubara H, Kaneda A, Nomura F. Combined Secretomics and transcriptomics Revealed Cancer-Derived GDF15 is Involved in Diffuse-Type Gastric Cancer Progression and Fibroblast Activation. *Sci Rep*. **2016**;6:21681.

10. Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Wakabayashi M, Ishige T, Beppu M, Nishimura M, Matsushita K, Nomura F. Detection of Ubiquitinated Dermcidin in Gingival Crevicular Fluid in Periodontal Disease. *Int J Pept Res Ther*. **2016**;22(2): 249-253

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 土田 祥央, 宮部 安規子, 村田 正太, 齊藤 知子, 瀬川 俊介, 佐海 知子, 上原 麻美, 中村 恵海, 渡邊 正治, 曾川 一幸, 滝脇 正貴, 西村 基, 佐藤 守, 松下 一之, 野村 文夫. 37mm クオリティモニターを用いた MALDI-TOF-MS による血液培養ボトルからの迅速細菌同定の検討. 第 42 回日本医用マススペクトル学会年会. 2017 年 9 月 14 日 ~ 15 日, 東京一ツ橋講堂
2. 土田 祥央, 佐藤 守, 梅村 啓史, 曾川 一幸, 滝脇 正貴, 西村 基, 小寺 義男, 松下 一之, 野村 文夫. 保存された臨床検体 (血清) の質量分析による劣化の評価 The effects of preanalytical variables on serum peptidome profiles following long-term storage. 日本プロテオーム学会 2017 年大会 (JHUPO 第 15 回大会), 2017 年 7 月 26 日 ~ 28 日, ホテル阪急エキスポパーク
3. 土田 祥央. 保存された臨床検体 (血清) の質量分析による劣化の評価. 第 3 回クリニカルバイオバンク研究会, 2017 年 7 月 7 日 ~ 9 日, 千葉大学医学部記念講堂
4. 土田 祥央, 村田 正太, 齊藤 知子, 宮部 安規子, 瀬川 俊介, 佐海 知子, 上原 麻美,

中村 恵海, 渡邊 正治, 芦澤 一穂, 寺田 崇, 佐藤 守, 西村 基, 松下 一之, 野村 文夫. MALDI Biotyper を用いた rapid BACproII の有用性に関する検討. 第 28 回日本臨床微生物学会総会, 2017 年 1 月 20 日 ~ 22 日, 長崎ブリックホール

5. 竹内 典子, 石和田 稔彦, 大楠 美佐子, 瀬川 俊介, 村田 正太, 土田 祥央, 佐藤 守, 野村 文夫. 質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用い Haemophilus influenzae の荚膜型決定法の検討. 第 28 回日本臨床微生物学会総会, 2017 年 1 月 20 日 ~ 22 日, 長崎ブリックホール

6. 村田 正太, 齊藤 知子, 宮部 安規子, 瀬川 俊介, 佐海 知子, 上原 麻美, 中村 恵海, 渡邊 正治, 芦澤 一穂, 寺田 崇, 土田 祥央, 佐藤 守, 西村 基, 野村 文夫, 松下 一之, 血液培養陽性ボトルからの迅速同定における rapid BACpro の有用性に関する検討. 第 27 回日本臨床微生物学会総会, 2016 年 1 月 29 日 ~ 31 日, 仙台国際センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

土田 祥央 (Tsuchida, Sachio)
千葉大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：90410422

(2)研究分担者

佐藤 守 (Satoh, Mamoru)
千葉大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：20401002

(3)連携研究者

青木 章 (Aoki, Akira)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・講師
研究者番号：30302889

(4)連携研究者

小林 宏明 (Kobayashi, Hiroaki)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・助教
研究者番号：50396967