

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670900

研究課題名(和文) 網羅的唾液プロテオソーム解析法による唾液機能的タンパク質研究プラットフォームの創設

研究課題名(英文) Establishment of new research platform of functional salivary proteins with comprehensive proteasome analysis

研究代表者

飯嶋 若菜 (IIJIMA, Wakana)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：50725207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液の機能の新しい検索法として、標準プール唾液を指標とした網羅的唾液プロテオソーム解析法を構築し、その有効性を検証した。唾液中のタンパク質を網羅的に解析する手法は唾液タンパク質成分と口腔内QOLの関連の検索に役立つことが示唆された。本研究により、健康といった新しい視点と網羅的唾液プロテオソーム解析法で、真の唾液重要成分の検索と口腔内QOLの関連の解明に取り組む研究プラットフォームを提言した。

研究成果の概要(英文)：New research approach for salivary proteins by using the comprehensive proteasome analysis of functional salivary proteins, with the pooled saliva samples as standard markers, had established. This simple and comprehensive method was effective to research the relationship between the parameter of oral quality of life and each component of salivary proteins. New research platform of functional salivary proteins was proposed with comprehensive proteasome analysis from the viewpoint of healthy salivary function.

研究分野：予防歯科学

キーワード：刺激唾液 網羅的解析 電気泳動 唾液タンパク質

1. 研究開始当初の背景

口腔の健康を良い状態に維持するためには、口腔を満たし口腔内環境を規定する唾液が大きな役割を担う。唾液は日常生活の中で口腔機能の運転に必要な性状を、時々刻々と変化させる極めて多機能な分泌体液である。唾液は、常時口腔内を湿潤している安静時唾液と、食事時に分泌される刺激唾液に大別される。我々は、これまでに安静時・刺激唾液の物理的性状や化学的性状を検索し、疾病予防と口腔内環境に関わる唾液性状を検索してきた。その過程で、疫学調査用の唾液採取法として、改良刺激唾液採取法と改良スワブ法を開発し、さらに高齢者の口腔乾燥症を評価するために、高齢者の体格や男女性差等に応じた安静時・刺激唾液の健常分泌閾を設定してきた。さらに、フィールド調査にて全身と口腔の各種検査値や病態評価値を用いて唾液との関連を検索し、構築した唾液データベースは、安静時唾液約 1,000 症例、刺激唾液約 500 症例を含む。この大規模データを解析して見えた問題点は、唾液の評価方法の指標の少なさと対象患者の有病状況等の全身状態の多因子の影響であった。唾液機能の健全性とは、疾病のリスクを受け流す冗長性であるならば、いわばリスクへの緩衝能を数値化する必要がある。器質的な視点から機能からの視点へ歯科医学のパラダイムシフトの必要性が叫ばれて久しいが、機能評価の手法、特に機能性唾液タンパク質の濃度測定法は、免疫学関連タンパク質以外は開発されていないことが唾液研究の一番の問題点である。

そこで、探索的アプローチとして成分タンパク質の分離と定性的解析を実施して唾液データベースと照会したところ、これまでの解析からでは見えなかった知見が得ることができた。この手法で、新しい研究手法で唾液の機能を再検討する研究の基盤を構築し、網羅的な唾液解析手法を実際に運用して有効性を確認すると共に、唾液中の機能に関わる重要成分を抽出することが可能となった。

近年の医学的生物学的研究は、強大なデータベースをバックボーンとしたバイオインフォマティクスの手法が大きな注目を浴び、網羅的な解析法が大きな成果を上げている。これらの手法は、ターゲットを絞りこんでいて解析を進める従来型の集中的研究とは異なり、詳細な全体像を網羅的に把握した上で問題に関連する構成要素を抽出する研究手法である。網羅的解析法としては、ゲノミクス解析では全ゲノムの解読やそれを基にした SNP 解析、トランスクリプトーム解析では EST 発現解析があり、強大なデータベースと強力な多数の遺伝子解読装置が必要となる。プロテオソーム解析では Mass Spectrometry (以下、マス) を使用した質量分析法が行われている。これらの機器の運転には強大な設備と莫大な運転資金が必要となる。

2. 研究の目的

簡便な手法で実施出来る網羅的な唾液プロテオソーム解析手法を開発し、中規模疫学調査時と唾液の病態に関わる患者の診療時に本解析を実施してデータを解析し、その結果から本手法の有効性を検証すると共に、唾液の新たな重要成分を抽出して次の研究の課題を提案することを目的とした。本研究では、多くの実験室で使用できる機材や試薬を積極的に組み入れることにより実験結果の規格化を計り、各分画中に含まれる構成タンパク質をデータベース化して公開する事によって、世界中の研究拠点の研究者の唾液機能研究への参画を促し、それによってデータベースをさらに充実化させる仕組みも配慮した。さらに、機能性の唾液分画が得られた場合も、唾液データベースからそのタンパク質に関する情報が公開データベースから入手可能になり、唾液研究が加速化させることを考えている。

3. 研究の方法

本研究は 2 段の実験を行う。始めに、網羅的唾液プロテオソーム解析法の構築を行い、それを基として、網羅的唾液プロテオソーム解析法を応用した唾液機能性タンパク質の検索を実施した。これらの研究から、新たな唾液機能研究のための唾液機能研究プラットフォームを構築した。

(1) 網羅的唾液プロテオソーム解析法の確立

唾液の機能を評価するためには、まずその機能を担う機能性唾液タンパク質の同定と、その濃度を測定することが必要になる。ここで特定のプール唾液を従来型の生化学的実験装置を用いて網羅的解析を実施して明確に性状が決定された標準物質と位置づけ、その唾液プールサンプルを実験のコントロールとして使用すると、その標準物質から各検出分画にバイオインフォマティクスの情報をリンクさせることが可能である。即ち、唾液研究に於いては、詳細が解析済みの標準プール唾液をコントロールとして SDS-PAGE 法にて採取唾液の糖タンパク質を分離して定量化することによって、簡便でバイオインフォマティクスと関連付けられた唾液の網羅的解析を行うことのできる網羅的唾液プロテオソーム解析法を構築した。

刺激唾液は、改良刺激唾液採取法にて唾液を採取後、速やかに冷却しながら高速遠心にて(12,000rpm, 3min)浮遊固形物を除去し、上清に Laemmli のサンプルバッファを加えて凍結保存する。SDS-PAGE システムは、Bio-Rad の既成ゲル(ミニプロティアン® TGX™ プレキャストポリアクリルアミドゲル, Bio-Rad, CA, USA)と泳動バッファ・機材等を使用し、多くの研究室で同様な条件で実験可能であった。選択された唾液サンプルは、再度、電気泳動で分離され、全バンドを切り出して、マスにて構成タンパク質を同定し、唾液タンパク質ライブラリ/デー

データベースにタンパク質名を登録した。マスは、TOF-MS の 10 倍以上の分解能を持つ Orbitrap 型の装置を使用し、MS/MS ion search 法にて質量パターンを得、Swiss Port データベースにて Mascot 検索を実施して同定を行うので、修飾をうけた糖タンパク質でも最高精度の正確で精密な構成タンパク質の同定が可能であった。

(2) 網羅的唾液プロテオソーム解析法を応用した唾液機能性タンパク質の検索

完成した網羅的唾液プロテオソーム解析法を応用して、唾液データベースの登録数を増やして唾液機能に関わる唾液機能性タンパク質を抽出した。これには、歯科健診において同意を得られた方の刺激唾液を網羅的唾液プロテオソーム解析法にて検索した。全身の健康状態・生化学検査値・服薬の状態・口腔内の現症をデータベースに転記し、全身と口腔に関連する機能性唾液タンパク質の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 網羅的唾液プロテオソーム解析法の確立

網羅的唾液プロテオソーム解析法の構築として、定量的ゲル染色法とゲル撮影法の開発、唾液データベースの構築と解析法の確認の実験を実施した。100 を超える刺激唾液タンパク質の SDS-PAGE 泳動パターンを解析し、観察される特徴的なタンパク質バンドの全てを網羅する組み合わせを見いだした。それを元に、10 名の 20 代成人から刺激唾液を 30mL 提供していただき、特徴的なタンパク質バンドの全てを網羅する唾液セットを抽出・設定した。採取的には 4 名の刺激唾液を選択し、混合して SDS-PAGE 泳動用網羅的刺激唾液標準プールサンプルを数千回分制作し、ディープフリーザーに保存した。この網羅的刺激唾液標準サンプルの各バンドを質量分析計にかけて、内包する 1 千種類のタンパク質を同定し、網羅的唾液データベースの基盤情報を整理した。さらに、SDS-PAGE 泳動パターンの採取には、唾液中の各タンパク質の濃度が大きく異なるために、検出を鍍銀法の連続撮影を行い、各段階での染色濃度を比較することによって網羅的に SDS-PAGE 泳動パターンのタンパク質バンドの有無と濃度を決定する撮影法を構築した。定量的ゲル染色法とゲル撮影法の開発を行った。タンパク質検出は銀染色法を行うこととし、経時的な染色状況を追跡するために、染色台をシャーカステン上に設置して連続撮影を行う装置を組み上げ、安定して画像情報を取り込むことが可能となった。さらに、取り込んだ画像の一次処理として、明度・コントラストの補正と、ゲルの歪みの補正の規格化実施手法を決定した。これにより、刺激唾液データベースの構築と解析法が整った。以上より、網羅的唾液プロテオソーム解析法を確立した。

(2) 網羅的唾液プロテオソーム解析法を応用

した唾液機能性タンパク質の検索

完成した網羅的唾液プロテオソーム解析法を応用して、唾液データベースの登録数を増やして唾液機能に関わる唾液機能性タンパク質を抽出した。さらに、唾液分泌タンパク質の生理的変動の観察と QOL との関連の検索も実施した。これには、安静時唾液と刺激唾液の差異の検索として、それぞれの唾液腺導管開口部から純唾液を採取して、構成唾液タンパク質の比率等を検索した。制作した網羅的唾液標準サンプルは、全唾液を遠心して使用しているため、刺激唾液と安静時唾液が混合しているため、両方の唾液解析に活用できた。解析は、特に唾液機能に関わる成分に注目し、その組成からそれぞれの唾液の生理学的機能を検証した。以上の結果では、有意に疾病や口腔内環境の状態に関連する唾液タンパク質は多くは抽出されなかったが、多くの口腔内現症と相関の観察される唾液構成タンパク質が見出され、今後の研究が期待される。

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 5 件)

Naoko Tanda, Yasushi Hoshikawa, Naoko Ishida, Takuichi Sato, Nobuhiro Takahashi, Ryoichi Hosokawa, Takeyoshi Koseki, Oral malodorous gases and oral microbiota: From halitosis to carcinogenesis, Journal of Oral Biosciences, 57, 2015, 175 - 178. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2015.05.004> (査読有)

Naoko Tanda, Yoshinori Hinokio, Jumpei Washio, Nobuhiro Takahashi, Takeyoshi Koseki, Analysis of ketone bodies in exhaled breath and blood of ten healthy Japanese at OGTT using a portable gas chromatograph, J. Breath Res. 8, 2014, 046008 (9pp), doi: 10.1088/1752-7155/8/4/046008. (査読有)

Ayako Hasegawa, Takuichi Sato, Yasushi Hoshikawa, Naoko Ishida, Naoko Tanda, Yoshiaki Kawamura, Takashi Kondo and Nobuhiro Takahashi., Detection and identification of oral anaerobes in intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma., Microbiol Immunol, 58, 2014, 375-381. doi: 10.1111/1348-0421.12157. (査読有)

Naoko Ishida, Takuichi Sato, Yasushi Hoshikawa, Naoko Tanda, Keiichi Sasaki, Takashi Kondo, Nobuhiro Takahashi., Microbiota profiling of bronchial fluids of elderly patients with pulmonary carcinoma., J Oral Biosci Published online: December 23, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.11>

.001 (査読有)

小関 健由, 玉原 亨, 百々 美奈, 加藤翼、口の健康と認知に関する歯科からの話題健康の基は食べることと話すこと、口の健康から全身の健康へ、認知神経科学、16、2014、1-8。(査読有)

[学会発表](計 10 件)

加藤 翼、細川亮一、丹田奈緒子、末永華子、菅崎将樹、佐久間陽子、飯嶋若菜、玉原 亨、百々美奈、福井玲子、山崎佐千子、笠原千秋、伊藤恵美、高橋 久美子、手代木史枝、馬目麻衣、小関健由、東北大学病院予防歯科におけるMRONJ患者の動向、第5回東北口腔衛生学会総会・学術大会、平成27年11月14日、岩手県歯科医師会館(盛岡市)

N.Tanda, N.Ishida, N.Takahashi, T.Sato, Y.Hoshikawa, R.Hosokawa, T.Koseki、Malodorous Gases from Saliva of Perioperative Patients of Lung Resection、第63回国際歯科研究学会、平成27年10月30・31日、福岡国際会議場(福岡市)

Tsubasa Kato, Ryoichi Hosokawa, Toru Tamahara, Masaki Sugazaki, Hanako Suenaga, Yoko Sakuma, Naoko Tanda, Mizuho Ono, Mina Dodo, Emi Ito, Fumie Teshirogi, Takeyoshi Koseki、The effect of mutual relationship between medical and dental team in Tohoku University Hospital、MASCC/ISOO 2015 Cancer Care Meeting、平成27年6月25-27日、Copenhagen (Denmark)

Emi Ito, Ryoichi Hosokawa, Keiko Sato, Chie Sarudate, Naomi Tamura, Toshimiti Nakaho, Takeyoshi Koseki、Oral care in palliative care center reduces salivary amylase activity、MASCC/ISOO 2015 Cancer Care Meeting、平成27年6月25-27日、Copenhagen (Denmark)

細川 亮一、伊藤 恵美、手代木 史枝、丹田 奈緒子、菅崎 将樹、末永 華子、百々美奈、佐久間 陽子、加藤 翼、玉原 亨、小関 健由、東北大学病院における緩和医療に関する学生ならびに歯科医師に対する意識調査、第64回日本口腔衛生学会学術集会、平成27年5月27日~29日、つくば国際会議場(つくば市)

原 美里、笠原 千秋、山崎 佐千子、福井 玲子、山田 桂子、手代木 史枝、高橋 久美子、伊藤 恵美、細川 亮一、丹田 奈緒子、末永 華子、菅崎 将樹、佐久間 陽子、飯嶋 若菜、菊池 瑞穂、玉原 亨、百々美奈、加藤 翼、小関 健由 / 開口障害と多発性う蝕と放射線性顎骨壊死の重篤な晩期有害事象、第4回東北口腔衛生学会学術集会、平成26年11月15日、福島県歯科医師会館(福島市)

山崎 佐千子、伊藤 恵美、福井 玲子、原 美里、笠原 千秋、細川 亮一、玉原 了、吉田 英子、丹田 奈緒子、菅崎 将樹、末永華子、百々 美奈、加藤 翼、菊池 瑞穂、小

関 健由、東北大学病院におけるがん支持療法としての取り組み、第8回日本歯科衛生学会学術集会、平成26年9月14-15日、大宮ソニックシティ(大宮市)

Ryoichi Hosokawa, Toru Tamahara, Emi Ito, Naoko Tanda, Wakana Iijima, Mina Dodo, Tsubasa Kato, Takeyoshi Koseki、HANGESHASHINTO, a Kampo medication, inhibit the development of radiotherapy induced oral mucositis head and neck cancer patients、MASCC Cancer Care Meeting、平成26年6月26-28日、Miami (USA)

Eiko Yoshida, Ryoichi Hosokawa, Mina Dodo, Hanako Suenaga, Masaki Sugazaki, Tsubasa Kato, Toru Tamahara, Mizuho Ono, Emi Ito, Sachiko Yamazaki, Takeyoshi Koseki、Mouth opening training device for trismus after surgery of head and neck cancer、MASCC Cancer Care Meeting、平成26年6月26-28日、Miami (USA)

加藤 翼、細川 亮一、玉原 亨、吉田英子、丹田 奈緒子、菅崎 将樹、末永 華子、百々 美奈、小野 瑞穂、伊藤 恵美、小関 健由、東北大学病院におけるがん支持療法としての口腔機能管理の取り組み、第63回日本口腔衛生学会学術集会、平成26年5月29-31日、熊本市市民会館(熊本市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯島 若菜(IIJIMA, Wakana)
東北大学・大学病院・医員
研究者番号: 50725207

(2)研究分担者

細川 亮一(HOSOKAWA, Ryoichi)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 40547254

丹田 奈緒子(TANDA, Naoko)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 00422121

小関 健由(KOSEKI, Takeyoshi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 80291128

菅崎 将樹(SUGAZAKI, Masaki)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 50444013

佐久間 陽子(SAKUMA, Yoko)

東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 9 0 7 3 5 5 3 1

末永 華子 (SUENAGA, Hanako)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号： 0 0 5 0 8 9 3 9

伊藤 恵美 (ITO, Emi)
東北大学・大学院歯学研究科・技術専門職員
研究者番号： 8 0 5 9 6 8 1 7