

## 日本語概要 プロテインフィンガープリントとデータ処理を用いる 新規なバイオ計測システムの唾液検体への応用

富永祐希, 臼井健二, 平田晃義, 伊藤博夫, 軒原清史

### 概要

歯周病は、成人人口の約 8 割が罹患している口腔疾患とされる。しかし、その原因は数百の細菌が関与しており、明確な原因は不明である。そのため客観的な指標を与える検査法は無く、歯科臨床現場では歯科医の技量に依存した検査が行われてきた。一方で、歯科医の技量に依存する従来の検査法では、歯科医ごとに検査結果が異なるため、客観的な指標を与える検査法の開発が求められている。本論文では、歯周疾患の検査において、ハイベップ研究所独自の技術である PepTenChip® システムを応用した検査法を記載した。PepTenChip® は中分子蛍光標識プローブを用いたマイクロアレイであり、プローブ側が蛍光標識されているために検体を標識する必要がなく、またプローブと検体間の相互作用を蛍光強度変化で測定するために、検査対象が未知の場合にも威力を発揮する。本研究では健康唾液と擬似的に作製した疾患検体を用いて検出を行い、得られたデータを多変量解析によって解析した。その結果、健康唾液と疾患検体では全く異なる分類がなされ、また含まれるタンパク質の種類によっても分類が可能であった。PepTenChip® を歯科の臨床現場で使用することで、これまで客観的な指標の無かった歯周疾患の診断に指標を与えることが可能である。本研究で用いた PepTenChip® は歯周疾患に焦点を当てて設計したが、マイクロアレイに用いるペプチドの種類を検討することにより、血液、尿、髄液など、幅広い検体に応用が可能である。

### はじめに

歯科臨床領域では、成人の 8 割が歯周病は罹患している重要な疾病とされる。これまでの研究で口腔内に存在する数百種類の細菌により引き起こされること推定されているが、原因の解明には至っていない。そのため、歯周病の検査は歯科医師による目視や検査用プローブによる歯周ポケット深さの測定、出血の有無の確認など歯周病により起こる症状の検査にとどまっている。しかし、これらの検査法は歯科医師の経験に頼る割合が大きく、経験の乏しい歯科医師では歯周病を見落とすことさえるという。そこで、歯周病の新しい検査手法の開発が求められている。ハイベップ研究所の“PepTenChip®”と名付けられている、ペプチドマイクロアレイ技術を応用し、擬似的歯周病唾液検体を検査し、得られたデータを統計処理することによって歯周病で唾液中に滲出してくるタンパク質を検出、診断する手法を開発した。この手法では、検査にあたって唾液検体の前処理の必要が無いため、迅速な検査が可能であり、さらに使用する検体量もごく微量（10 μL 程度）という利点がある。PepTenChip® の根幹となる技術は、過去 10 年以上かけて開発した 4 つの基盤技術からなる。一つ目はマイクロアレイの基板素材であるアモルファスカーボンである。アモルファスカーボンは炭素を 1200°C の高温無酸素中で焼成して作られ、すべてが炭素でできているため自家蛍光がほとんどなく、また非特異的な吸着も少ないというマイクロアレイに必要な基板の条件を完全に満たした素材である。2 目目はマイクロアレイ基板上に固定化する、捕捉分子（ペプチドプローブ）である。タンパク質ヘリックス、シート、ループといった様々な立体構造をとるが、ハイベップ研究所ではこれら構造をとるペプチド数千種のライブラリーを化学合成し、保有している。これらのペプチドは全て蛍光基で標識されており、即座にペプチドマイクロアレイ製作に用いることができる (Fig. 1)。3 目目の技術はペプチドを基板上に固定化するアレイ化技術である。マイクロアレイでは多数のプローブを基板の一部に高密度にアレイ化する必要があるが、高密度であるがゆえに隣のプローブと干渉してしまったりする問題があった。ハイベップ研究所ではスポッティングピンと基板の表面化学を最適化することで高密度にペプチドをアレイ化することを可能とした (Fig. 2)。図 2a は、いわゆるスライドガラスサイズの基板である。4 目目の技術は、作製したペプチドマイクロアレイと検体との相互作用で得られる蛍光強度変化を捉える検出装置である。本装置は非常にコンパクトに設計されており、片手での持ち運びが可能である。内部には高感度、高調音なセンサーと基板表面に均一に励起光を照射する励起光源ユニットが組み込まれており、詳細な画像データの取得が可能である。

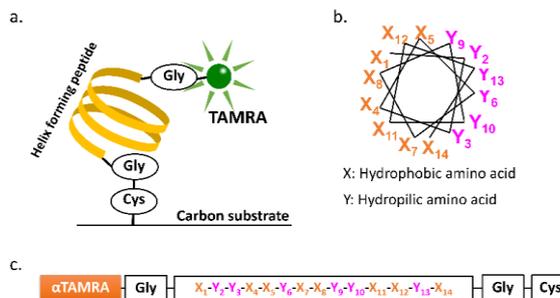
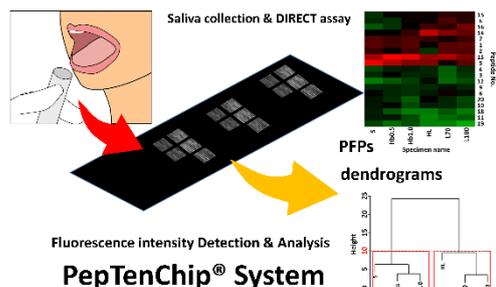


Fig. 1 蛍光標識構造ペプチドのデザイン (a) 基板上に固定化したペプチドの模式図 (b) ペプチドにヘリックス構造をとらせるためのデザイン (c) 蛍光標識ペプチドの模式図

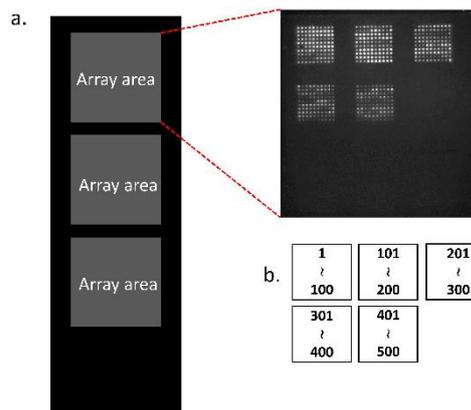


Fig. 2 本研究で作成したマイクロアレイ基盤のデザイン 図中の Array area の部分が特殊な表面処理技術によりアミノ化されている。

### 実験方法

**ペプチドマイクロアレイ** 構造を形成するように設計したペプチド (構造ペプチド)

をアモルファスカーボン製基板に多数固定化した“PepTenChip®”を用いた。HiPep 研究所では構造ペプチドを数千種類ライブラリーとして保有しており、本研究では  $\alpha$  ヘリックスを形成するペプチド 500 種類を用いてマイクロアレイを製作した。また、基板はアモルファスカーボンである。は炭素を焼成して作成されており、自家蛍光が少なく、ペプチドや検体が非特異的に吸着しないといった特徴を持ち、マイクロアレイに最良の素材である。

**検体** 本研究は歯科の臨床現場で利用することを最終的な目標としているため、検体には正常なヒトの唾液を使用した。また、歯周病に罹患している患者のモデル検体として、正常唾液にヘモグロビン(f-Hb)と乳酸脱水素酵素(LDH)とを混合した唾液検体を調製して使用した(Table 1)。f-Hb、LDH は共に歯周疾患によって唾液中に滲出するタンパク質であり、f-Hb は口腔内の出血マーカーとして、LDH は組織障害マーカーとして実際に歯科の臨床で用いられている。

Table 1 使用した検体のリスト

Sample name	Sample content
S	Saliva only
Hb0.5	Saliva + f-Hb 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Hb1.0	Saliva + f-Hb 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Hb10	Saliva + f-Hb 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Hb100	Saliva + f-Hb 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
L10	Saliva + LDH 10 mU/mL
L70	Saliva + LDH 70 mU/mL
L100	Saliva + LDH 100 mU/mL
L1000	Saliva + LDH 1000 mU/mL
HL	Saliva + f-Hb 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + LDH 100 mU/mL

f-Hb と LDH の濃度は歯科の領域において歯周疾患の陽性、陰性を判定する際に用いられる濃度を参考に決定した

**Assay** コントロールとしての PBS と各唾液検体を用いてアッセイを行った。各検体 10  $\mu\text{L}$  をマイクロアレイ上にアプライし、上にカバーガラス置いて 25°C で 30 分間インキュベートし、蛍光検出装置(PTC-FD11)で蛍光画像を取得した。取得した蛍光画像は画像解析ソフト Arraypro analyzer を用いて解析、数値化した。PBS を用いて得た蛍光強度を  $I_0$ 、唾液検体を用いて得た蛍光強度を  $I_1$  として、式を用いて蛍光強度変化を算出し、このデータを元に統計解析ソフト“R”を用いて多変量解析を行った。

**結果と考察**

本研究では、最初に 500 種類のペプチドが固定化されたペプチドマイクロアレイを用いてアッセイを行い、ここから蛍光強度変化の大きいペプチドを 20 種選抜した。これらのペプチドが示す蛍光強度変化値を元にヒートマップを製作した結果を Fig. 3 に示した。このヒートマップの結果を元にクラスター分析した結果、

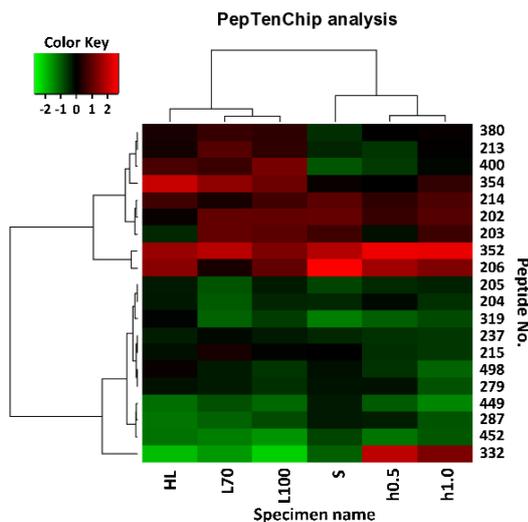


Fig. 3 蛍光強度変化を基に作成した Protein fingerprint (PF) PF で赤色で示された部分は蛍光強度が増加していることを示し、緑で示されている部分は蛍光強度が減少していることを示している。

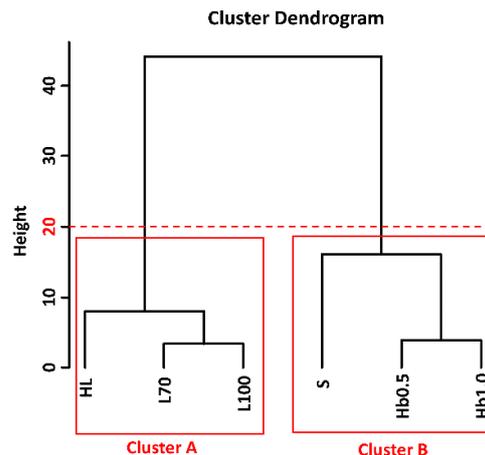


Fig. 4 PFP の結果をもとに作成した dendrogram height 20 で分割すると、2つのクラスターに分けられる。

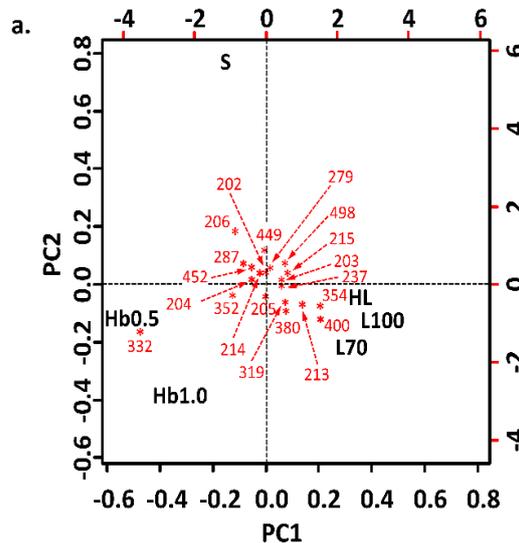


Fig. 5 主成分分析の結果 各ペプチドが分類された位置\*で示した。PC1 は配列中の Phe の数を、PC2 はペプチドの電荷を反映している。

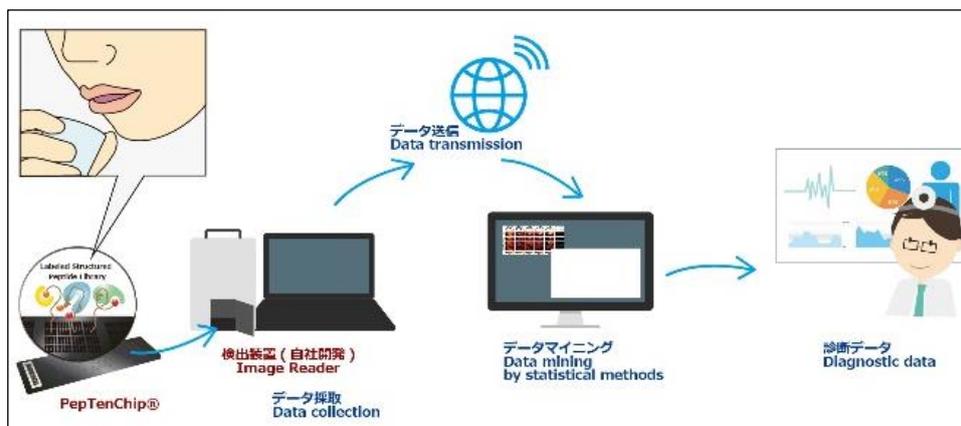
LDH を含む検体と f-Hb を含む検体がそれぞれ違うクラスターに分類されることを見出した(Fig. 3)。これは今回選抜した 20 種類のペプチドが検体中に含まれるタンパク質を見分けられることを示している。次に、この 20 種類のペプチドの分類に寄与している特性を解析するために主成分分析を行った(Fig. 4)。この図は、それぞれのペプチドの主成分負荷量(赤矢印)とそれぞれのペプチドプローブの主成分得点を同時に表示した biplot である。矢印が長いほど主成分分析に対する影響が大きいことを示している。第一、第二の各主成分がペプチド構造中の何を反映しているかを解析した。第一主成分得点と、ペプチドの各種特性を比較、検討した結果、第一主成分軸は配列中の Phe の数を反映した。また、同様にして第二主成分についても検討した結果、第二主成分軸は電荷を持ったアミノ酸の数を反映していると推定できた。f-Hb や LDH を含む検体は第一主成分軸に対して大きく分かれていることから、検体中に含まれる f-Hb と LDH の分類には、プローブとして使用しているペプチドの Phe が大きく影響していることが明らかとなった。また、正常検体(S)と疾患モデル検体は第二主成分軸に対して大きく分かれているため、検体の正常、異常の判別にはプローブとして用いているペプチドの電荷が大きく影響していることが明らかとなった。つまり、第一主成分軸からはその疾患の詳細な内容(出血があるのか、組織が障害されているのか等)が、第二主成分軸からは検体、つまり患者の正常、異常の大きな分類に有用であると考えられる。

まとめ

本研究では、蛍光標識ペプチドマイクロアレイ(PepTenChip)と多変量解析法の組み合わせにより、体液検体中に含まれる多種化合物の組成から正常検体、異常検体の判別が可能であることを示した。PepTenChip は検体とプローブの1対1対応に依存しない検出法であり、マーカーとなる分子が分からない場合でも検体の分類が可能であるという利点がある。本研究は実際の体液のように様々な分子が混合した検体を用いた場合でもその分類が可能であることを示しており、臨床の現場において非常に有用な技術である。さらに、PepTenChip®で用いられているアモルファスカーボン基板は高い電気伝導性を持つため、MALDI-TOFMSのターゲットプレートとしてそのまま使用可能である。すなわち、マーカー分子が判明していない疾患に由来する検体をPepTenChip®を用いて検査し、大きな蛍光強度変化が見られたマイクロアレイをそのまま MALDI-TOFMS 分析に供することで、マイクロアレイ上に捕捉されている分子の詳細な構造の解析が可能である。これは、マーカーが未知の検体であっても PepTenChip®を用いて検査、分析することで新規マーカーの探索

が可能であることを示唆している。さらに、そのマーカー分子の情報から新薬の開発につなげるという潜在的な可能性も持っている技術である。本研究では、原因がまだはっきりしていない疾患として成人人口のほとんどが罹患している歯周病を選択した。当該疾患は原因がはっきりしていないためにその診断基準もあいまいであり、歯科医師の技量に依存しているのが現状であるが、本研究の成果により、診断に客観的な指標を与えられる可能性を示した。この研究の成果は他の様々な体液に拡張可能である。本研究ではマイクロアレイにヘリックス構造を形成する500種類のペプチドライブラリーを選択したが、HiPep 研究所はヘリックスに加えてシート、ループ、糖ペプチドといった様々な構造をとるペプチドライブラリーを数千種類保有している。これらのペプチドライブラリーを用いてマイクロアレイを作成し、種々の体液検体とアッセイし、蛍光強度変化の大きいペプチドを選抜することで各体液検体に特化したペプチドマイクロアレイを作製することが可能である。このようにして作られるペプチドマイクロアレイは、非侵襲な検査手法であるためclass-1 医療機器に分類される。企業や学校での健康診断項目の一つとしての応用が期待できる (Fig. 6)。

Fig. 6 本研究が想定している応用の流れ  
PepTenChip®システムで検体を検出し、そのデータはネットワーク経由で送信、データベースとの比較により迅速に診断結果を得ることができる。この診断結果は医療現場で治療の補助とすることができる。  
この図の著作権はハイペップ研究所が所有している。



参考論文

- Albander, J. M. *Health care dent.* 2004; 6: 42-55.
- Hirohata, N.; Aizawa, A.; Komine-Aizawa, S. *J Nihon Univ. Med Ass.* 2014; 73: 211-218.
- Markus, T. F.; Stoll, D.; Schrenck, M.; Traub, P. C.; Vöhringer, C. F.; Joos, T. O. *Drug Discovery Today*, 2002; 7: 815-822.
- de Wildt, R. M.; Mundy, C. R.; Gorick, B. D.; Tomlinson, I. M. *Nat. Biotechnol.*, 2000; 18: 989-994.
- Hornbeck, P. V. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2015; 110: 2.1.1 - 2.1.23.
- Takahashi, M.; Nokihara, K.; Mihara, H. *Chem Biol.* 2003; 10: 53-60.
- Nokihara, K.; Ohyama, T.; Usui, K.; Yonemura, K.; Takahashi, M.; Mihara, H. Epton R. ed. *Mayflower Scientific UK.* 2004; pp83-88.
- Nokihara, K.; Ohyama, T.; Usui, K.; Yonemura, K.; Tomizaki, K-Y.; Mihara, H. *Koubunshi Ronbunshu.* 2004; 61: 523-532.
- Usui, K.; Tomizaki, K-Y.; Ohyama, T.; Nokihara, K.; Mihara, H. *Mol. Biosyst.* 2006; 2: 113-121.
- Usui, K.; Tomizaki, K-Y.; Mihara, H. *Mol Biol.* 2009; 570: 273-284.
- Nokihara, K.; Hirata, H.; Takebayashi, Y.; Ohyama, T.; Kawasaki, T.; Miyazato, N.; Kodama, Y.; Ono, N.; Sogon, T.; Suzuki, K.; Miyajima, M.; Kawahira, N.; Oka, Y. *Peptide Science 2008*; Nomizu, M. ed. Japanese Peptide Society; 2009; pp95-98.
- Nomura, Y.; Tamaki, Y.; Eto, A.; Kakuta, E.; Ogino, D.; Nakamura, Y.; Takahashi, N.; Hino, F.; Korezawa, K.; Handa, N.; Shimizu, K. *J. Dent. Sci.* 2012; 7: 379-383.
- Nokihara, K.; Pipkorn, R.; Ohyama, T.; Hirata, A.; Miyajima, M.; Ono, N. *Peptide Science 2012*; Sugimura K. Ed. The Japanese Peptide Society; 2013: pp167-170.
- HiPep Laboratories, PepTenChip®. <http://hipep.jp/?p=781>; Accessed 14 March 2018.
- Martinsky, T.; Rechard, S. US patent 6.101.946 (15, August, 2000).
- Nokihara, K.; Ohyama, T.; Ono, N.; Kawakami, H.; Kawahira, N.; Kodama, Y.; Miyazato, N.; Suzuki, K.; Miyajima, M.; Sogon, T.; Hirata, A.; Kawasaki, T.; Takebayashi, Y.; Oka, Y. *Peptide Science 2007*; Aimoto, S.; Ono, S. eds. Japanese Peptide Society; 2008: pp106-108.
- Kasai, K.; Hirata, A.; Ohyama, T.; Nokihara, K.; Yokoyama, T.; Mohri, S. *FEBS Lett.* 2012; 586: 325-329.
- Tominaga, Y.; Hirata, A.; Nokihara, K. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015; 25: 611-615.
- Nokihara, K.; Hirata, A.; Ohyama, T.; Sogon, T.; Kawasaki, T.; Takebayashi, Y.; Oka, Y. *Peptide science 2009*; Okamoto K. ed. Japanese Peptide Society. 2010: pp337-340.
- Nokihara, K.; Tominaga, Y.; Ueta, G.; Hirata, A. *Peptide science 2013*; Nishiuchi, Y.; Teshima, T. eds. Japanese Peptide Society. 2014; pp389-392.

当該バイオ検出関連製品情報は以下のアドレスから入手可能です

CP02J	次世代バイオチップ PepTenChip®(日)	
CP03J	研究用アレイ蛍光検出装置(日)	
CT01J	PepTenChip®ガイド(日)	
CP02E	PepTenChip® a novel Bio-detection System-Eng	<a href="http://hipep.jp/eng/?p=781">http://hipep.jp/eng/?p=781</a>
CP03E	Rev-Detector(PTC-FD11, 12)-Eng	
CT01E	PepTenChip® Guide-Eng	