

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20456

研究課題名(和文) 口腔乾燥症の確定診断に極めて有効な唾液マーカーの新開発

研究課題名(英文) New developmet of extremely effective salivaly marker for diagnosis of oral dryness

研究代表者

水橋 史(高橋史)(MIZUHASHI, Fumi)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：60386266

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)： 高血圧症の治療薬であるカルシウム拮抗薬服用者に口腔乾燥症を呈する症例が非常に多いことから、カルシウム拮抗薬による口腔乾燥症に特有のタンパク質とRNAの検索を行った。

カルシウム拮抗薬服用者は唾液量の減少とタンパク濃度の増加を認めた。カルシウム拮抗薬服用者と健常高齢者の唾液タンパク質の網羅的解析を行った結果、カルシウム拮抗薬服用者において特徴的に増加あるいは減少しているタンパク質があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Calcium antagonist are often used for the treatment of hypertension. There are many oral dryness patients who take the calcium antagonist. In this study, we investigated the specific protein and RNA to the oral dryness patients taking the calcium antagonist.

The results of this study was that the amount of salivary secretion decreased and the protein concentration increased in the oral dryness patients taking the calcium antagonist. The results of the global analysis of salivary protein in the oral dryness patients taking the calcium antagonist and healthy elderly subjects indicated that there are some specific proteins increasing or decreasing in the oral dryness patients taking the calcium antagonist.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔乾燥症 Ca拮抗薬 タンパク同定解析 RNA抽出 マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の多くが薬物を服用しており、薬物性の口腔乾燥症が増加している。Ca 拮抗薬は、高血圧症患者の7割が服用しており、副作用として口渇があることも知られているが、その機序は十分に判っていない。

(2) Ca 拮抗薬は歯肉肥厚を引き起こすことが知られているが、その発症機序についても、未だに一定の見解が得られていない。歯肉肥厚は歯肉構成細胞の増殖によって起こる。このことは、Ca 拮抗薬にはカルシウムチャンネル阻害だけでなく、なんらかの転写活性が存在することを示している。したがって、Ca 拮抗薬服用者の RNA に変化が生じている可能性が高く、特に歯肉や唾液腺がその標的になっている可能性が極めて高い。

(2) 近年、microRNA が転写を制御し、癌や免疫のマーカーと治療に使用され始めている (Li Y, Clin Cancer Res, 2004.)。唾液中の microRNA も、また全身と唾液腺の状態を反映するものと推測した。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、Ca 拮抗薬服用者の口腔乾燥症を確実に診断するためのマーカーを新開発することである。

(2) 日本人3人に1人は高血圧症であり、その治療薬である Ca 拮抗薬服用者に口腔乾燥症を呈する症例が非常に多いので、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症に特有のタンパク質と RNA の検索を行う。本研究では、侵襲の少ない唾液を検査液とし、唾液中のタンパク質と RNA を解析し、口腔乾燥症を呈する Ca 拮抗薬服用者の特徴を明らかにし、唾液中のマーカーとしてその応用を推進する。Ca 拮抗薬による口腔乾燥症の唾液マーカーを解明することにより、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症が唾液検査により確定診断され得るようになる。

### 3. 研究の方法

(1) 研究対象者は、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症患者、シェーグレン症候群患者および内服薬のない健常高齢者とした。本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 ECNG-H-155)。

研究方法は、10 分間の安静時唾液を吐唾法にて採取し、採取した唾液の遠心分離を行って、上清を用いてタンパク定量を行った。口腔乾燥症患者においては、サクソテストによる2分間の刺激唾液量の測定を行った。

(2) Ca 拮抗薬のみを服用している口腔乾燥症患者、シェーグレン症候群患者および健常高齢者各1名の安静時唾液を用いて iTRAQ 法 (Hall SC, J Proteome Res, 2017.) による唾液タンパク質成分の網羅的な比較

定量解析を委託にて行った。iTRAQ 法の結果、Ca 拮抗薬のみを服用している口腔乾燥症患者において抽出された標的遺伝子にコードされるタンパク質の抗体を購入し、他の研究対象者の唾液を被験体として、Western blotting によりタンパク質の検出を行った。

(3) Ca 拮抗薬のみを服用している口腔乾燥症患者、シェーグレン症候群患者および健常高齢者の唾液から RNA の抽出を行い、microRNA のマイクロアレイ解析を委託にて行った。

### 4. 研究成果

(1) 本研究では、はじめに Ca 拮抗薬による口腔乾燥症患者の唾液の特徴を明らかにするために、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症患者、シェーグレン症候群患者および健常高齢者の安静時唾液量、刺激唾液量、タンパク濃度を調べた。

安静時唾液量は、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症患者とシェーグレン症候群患者の安静時唾液量は、健常高齢者よりも有意に少なかった ( $p < 0.01$ ) (図1)。

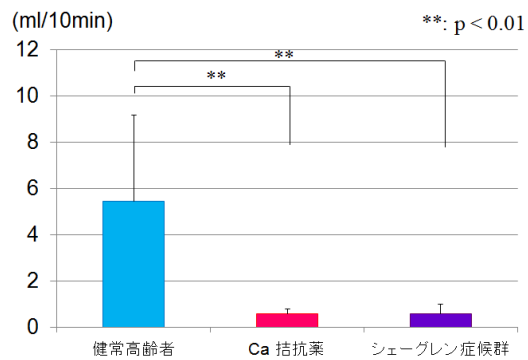


図1 安静時唾液量

刺激唾液量は、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症患者の方がシェーグレン症候群患者よりも有意に多かった ( $p < 0.01$ ) (図2)。

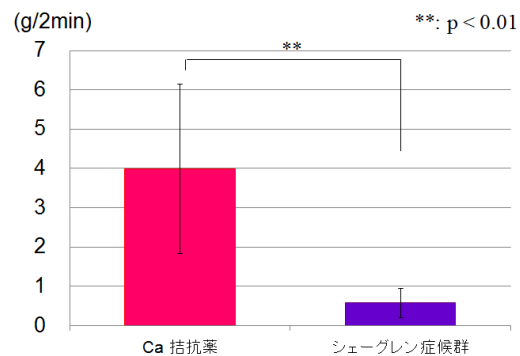


図2 刺激唾液量

タンパク濃度 ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ) は、Ca 拮抗薬による口腔乾燥症患者とシェーグレン症候群患者では健常高齢者よりも有意に小さかった ( $p < 0.01$ ) (図3)。

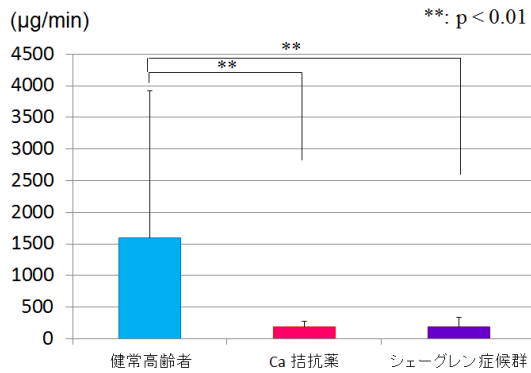


図3 タンパク濃度

本研究の結果, Ca拮抗薬服用者の刺激唾液量は, シェーグレン症候群患者よりも有意に多いが, 安静時唾液量には違いを認めず, シェーグレン症候群患者の耳下腺の状態は, Ca拮抗薬服用者と異なる可能性が示唆された。

(2) 本研究では, これまでに試みがされてこなかった, 唾液をサンプルとした iTRAQ法による唾液タンパク質成分の網羅的な比較定量解析を行った。解析方法は, Buffer置換, タンパク質濃度測定, In solution Digestionの後, iTRAQ標識(AB SCIEX iTRAQ Reagent-4Plex Kit)を行った。陽イオン交換カラムによる精製, 液体クロマトグラフィによる分離および質量分析装置にて解析の後, ProteinPilot v4.5にて解析を行った。

iTRAQプロテオーム解析の結果, 968種類の唾液タンパク質を同定した。同定した各タンパク質について, 健常高齢者を基準としたCa拮抗薬による口腔乾燥症患者およびシェーグレン症候群患者の相対定量比を求めた結果, Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者において健常高齢者と比較して, 相対定量比が有意に増加および減少するタンパク質が認められた。本研究の結果, Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者では, Caによって調整されるタンパク質などが特徴的に増加していることが示唆された。

そこで, Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者において, 特徴的に増加あるいは減少しているタンパク質の抗体を購入し, 他の研究対象者の唾液を被験体として, Western blottingによりタンパク質の検出を行っている。

(3) 本研究では, これまでに試みがされてこなかった, 唾液をサンプルとしたmicroRNAのマイクロアレイ解析を行った。microRNAのマイクロアレイ解析に先立ち, 唾液から高濃度でRNAを抽出する方法を検討した。また, 本研究では, 唾液をサンプルとしたmicroRNAのマイクロアレイ解析方法の検討から開始した。テストサンプルにおいて, 唾液からのRNA抽出方法を決定し,

その後のmicroRNAのマイクロアレイ解析を行えることを確認した。

そこで, Ca拮抗薬を服用している口腔乾燥症患者3検体と内服のない健常高齢者3検体, さらにシェーグレン症候群患者2検体について, RNAの抽出とmicroRNAのマイクロアレイを委託にて行った。

(4) 現在は, iTRAQプロテオーム解析の結果をもとに, Ca拮抗薬や歯肉増殖症と関連するタンパク質の抗体を購入し, Ca拮抗薬を服用している口腔乾燥症患者と内服のない健常高齢者の唾液を被験体としてWestern blottingによるタンパク質の検出確認を継続中である。

今後は, microRNAのマイクロアレイ解析結果の分析を進め, Ca拮抗薬を服用している口腔乾燥症患者のRNAの変化について明らかにしていく予定である。

#### <引用文献>

Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, Eisele D, Abemayor E, Elashoff D, Park NH, Wong DT. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. Clin Cancer Res. 2004; 15; 10(24): 8442-8450.

Hall SC, Hassis ME, Williams KE, Albertolle ME, Prakobphol A, Dykstra AB, Laurance M, Ona K, Niles RK, Prasad N, Gormley M, Shiboski C, Criswell LA, Witkowska HE, Fisher SJ. Alterations in the salivary proteome and N-glycome of Sjögren's syndrome patients. J Proteome Res. 2017; 16: 1693-1705.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Fumi Mizuhashi, Kaoru Koide, Shuji Toya, Tomoko Nashida. Oral dryness caused by calcium blocker -Comparison with saliva of healthy elderly persons and patients with Sjogren's syndrome-. Medical Research Archives, 査読有, 2017, 5(9): 1-12. <http://www.journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/1516/1262>.

[学会発表](計 4件)

水橋史, 小出馨, 梨田智子, 戸谷収二, 近藤敦子, 浅沼直樹, 佐藤利英, 渡會侑子, 栗田武, 小林博, 内田剛也. Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者の唾液タンパク質の分析 第2報. 日本補綴歯科学会, 2018.

Fumi Mizuhashi, Kaoru Koide, Shuji Toya, Tomoko Nashida. Analysis of protein ingredient in saliva of oral dryness

patients caused by calcium blocker. 歯科基礎医学会学術大会, 2017.

水橋 史, 小出 馨, 梨田智子, 戸谷収二, 近藤敦子, 浅沼直樹, 佐藤利英, 渡會侑子, 栗田 武. Ca拮抗薬による口腔乾燥症 健常高齢者とシェーグレン症候群患者の唾液との比較 . 日本補綴歯科学会, 2017.

Fumi Mizuhashi, Kaoru Koide, Shuji Toya, Tomoko Nashida. Saliva of oral dryness patients taking calcium blocker and patients with Sjögren's syndrome. 日本歯科大学歯学会ウインターミーティング, 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水橋 史(高橋 史) (MIZUHASHI, Fumi)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授  
研究者番号：60386266