

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006 年～2008 年  
 課題番号：18591182  
 研究課題名（和文） 唾液のプロテオーム解析によるシェーグレン症候群の病因・病態に関わる蛋白質の同定  
 研究課題名（英文） Identification of proteins that participant in causes or progression of Sjögren's syndrome  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：富板 美奈子（TOMIITA MINAKO）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教  
 研究者番号：60344991

## 研究成果の概要：

若年シェーグレン症候群患者及び健康人の唾液中の蛋白の網羅的解析により、患者の唾液中に多く含まれるタンパク質の存在を複数確認した。また、その過程で、これまで設定されていなかった小児期の唾液分泌量の標準値を設定した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学

## 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は、従来小児には稀な疾患と言われてきたが、我々の15年以上にわたる臨床研究で、SSは小児にも発症し、患者の免疫学的背景や、唾液腺組織音破壊がアポトーシスによって起こっていることなどは、成人SSと同様であることが明らかとなった。それにもかかわらず、小児でSSが少ないとされてきた理由は、小児のSSが乾燥自覚症状を訴えることが少ない、いわゆるサブクリニカルSSが多いことによる。

これらサブクリニカルSSが成人のクリニカルSSと同一の疾患可動化についての結論

はまだ出されていない。しかし、我々の検討では、小児期に診断されたサブクリニカルSSは10年近い経過で約半数が徐々に外分泌腺機能が低下し、乾燥自覚症状を訴えるクリニカルSSへと移行していくことが明らかとなった。すなわち、サブクリニカルSSの少なくとも半数は成人のクリニカルSSの早期例と考えられる。

これら早期例の病態を詳細に解析し、経過を追って変化を捉えていくことは、SSの病因・病態の解明に必要な情報を与え、さらに治療・予防法の開発にも有用である。また、早期診断に必要な情報を得ることも可能と

なることが期待される。

## 2. 研究の目的

病態を明らかにするには、炎症局所である外分泌腺の組織からの情報を得ることが望ましいが、組織の生検は侵襲があるため、繰り返し行うことは困難であり、特に年少児の場合には、生検そのものが困難であることも少なくない。そこで、次に局所の情報を得る方法として、外分泌腺からの分泌物についての検討が有用と考えられる。唾液は年少児からも簡便に採取でき、また健康な小児からも得やすいという利点がある。

本研究では、

(1) 小児 SS 患者および健康人から採取した唾液を用いて、プロテオーム解析を行い、SS の病因・病態に関わる蛋白を同定することにより SS の診断および治療へ応用することを目的とした。

(2) 現在、SS の診断基準には「唾液分泌量の低下」という項目があり、成人における基準値が設定されているが発達段階にある小児の唾液分泌量の基準値が成人と同様であるかどうかは確認されていない。そこで、健康小児の唾液採取の際に、その年齢の唾液分泌量の基準値を設定することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液サンプルの処理方法

唾液は粘稠性があり、また、プロテアーゼを含んでいる。そこで、唾液サンプルの適正な処理方法につき、プロテアーゼインヒビターの有無、前処理方法としてアセトン沈殿、エタノール沈殿、TCA 沈殿、フィルター処理無処理のサンプルをアガロース二次元電気泳動法で評価した。

(2) プロテオーム解析にはいくつかの方法がある。そこで、患者および健康人の唾液を採取し、CIPHERGEN 社の proteinchip® システム、BRUKER DALTONICS 社の CLINPROT® システム (MALDI-TOF/TOF-MS およびサンプル調製ロボット)、アガロース二次元電気泳動法を行い、最も唾液サンプルを解析するのに適した方法を検討した。

(3) 1. 2 の結果より、アガロース二次元電気泳動法で、患者と健康人の唾液を比較し、患者で唾液中に多く存在する蛋白を同定した。

(4) 健康中学生に対して、唾液分泌量測定法として自然分泌量、ガムテスト、サクソントンテストを行った。各測定法の標準値と、各測定法の相関およびばらつきを検討し、最も測定に適した測定法を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 唾液のプロテオーム解析

#### 唾液サンプルの処理方法

唾液には、プロテアーゼが含まれているため、プロテアーゼインヒビターの添加の必要性について、tricine-PAGE で検討したところ、プロテアーゼインヒビターの有無はバンドの数に影響しなかった。また、サンプルの前処理方法として、アセトン沈殿、エタノール沈殿、TCA 沈殿、フィルター処理、無処理のサンプルをアガロース二次元電気泳動法で評価した、その結果、より多くの蛋白を同定するためには無処理がよいということが明らかとなった。

また、食事時間との関係では、食後 2-3 時間後が適していると考えられた。

#### 唾液サンプル処理に適したプロテオーム解析方法の検討

CIPHERGEN (現 BIO-RAD) 社の ProteinChip® システム (SELDI-TOF-MS) を用いての唾液のプロテオーム解析では、健康人とシェーグレン症候群患者では  $m/z$  (質量電荷比) 4000 台のタンパクにピーク強度の差が認められた。しかし、ProteinChip® システムでは、1) 一度に処理できるサンプル数が少ない、2) サンプルの処理が手動であり時間がかかる、3) コストが高い、4) 結果の再現性が低い、5) 低分子ペプチド領域の検出能力が低い、等の問題点があった。

以上の問題点を解決するため、BRUKER DALTONICS 社の CLINPROT® システム (MALDI-TOF/TOF-MS およびサンプル調製ロボット) を導入した。CLINPROT® システムは上記の点において ProteinChip® システムを凌ぐものであり、更には質量分析器としての性能が高くかつ  $m/z$  3000 以下のペプチドのアミノ酸配列をタンデム MS 解析により直接同定できるという利点を持つ。そこで、健康中学生と小児 SS 患者の唾液を用いて解析を行ったところ、ピーク強度に差のある蛋白が複数認められた。これらのアミノ酸配列をタンデム MS 解析したところ、一部は唾液に含まれる抗菌蛋白に由来するペプチドであった。しかし、患者グループ内、健康人グループ内でもピーク強度の個人差が大きく、結果の再現性に乏しいと考えられた。

そこで、で用いたアガロース二次元電気泳動法を検討方法として選択した。

#### プロテオーム解析による唾液サンプルの解析

年齢と性をマッチさせた原発性 SS 患者 5 名、健康人 5 名の唾液を採取し、遠心した沈殿と上清についてアガロース二次元電気泳動を行った。泳動後のゲルを CBB 染色、銀染色して spot を患者、健康人で比較したとこ

る、健康人に比し SS 患者の唾液中に多く認められる spot が沈殿から 4 つ、上清から 5 つ認められた。( 図 1, 2 )ゲルより spot を切り出してシーケンスし、web 上のデータベース ( uniprot ) でサーチした。沈殿の 4 つの spot は同一の蛋白由来、上清の spot の 3 は同定できなかったが、1, 2 と 4、5 はそれぞれ同じ蛋白由来のペプチドと考えられた。4, 5 については 2 つの候補蛋白があげられた。現在、この 3 つの蛋白について、同定・確認を進めている。

図 1 患者唾液 沈殿

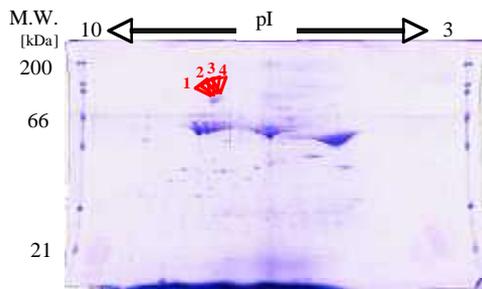
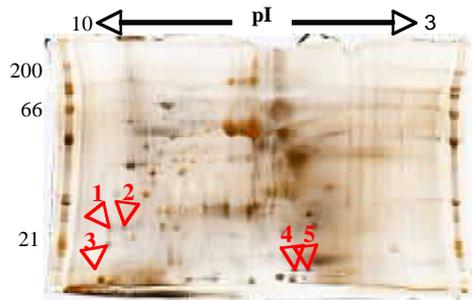


図 2 患者唾液 上清



以上から、発症早期と考えられる小児 SS 患者においても、唾液の質が健康人とは異なっていることが明らかとなった。蛋白同定後は、1) 蛋白を測定することによる早期診断システムの開発、2) その蛋白が唾液中に多く出現するメカニズムの解明から治療への応用、が課題となる。

( 2 ) 中学生の唾液分泌量標準値の設定

中学生ボランティア 131 名に対して、15 分間の自然唾液流出量測定、ガムテスト、サクソンテストを行った。アンケートより薬剤の内服や口内炎などの症状のある生徒を除外し、78 名を解析対象とした。解析の結果、これらの 3 つの検査結果は、学年・性別による有意差はなく、それぞれの検査の平均-1SD は自然分泌量 1.7ml/15 分、ガムテスト 13.9ml/10 分、サクソンテスト 2.4g/2 分であり、成人の基準値( 自然分泌量 1.5ml/15 分、

ガムテスト 10ml/10 分、サクソンテスト 2g/2 分以下を低下とする) と大きな相違はなかった。( 図 3・5 )

従って、中学生については唾液分泌量低下の基準値は成人の基準値と同様の設定でよいと考えられた。

また、最もばらつきが少なく、基準を下回る生徒が少なかった検査はサクソンテストであり、検査の第一選択と考えられた。

図 3 自然分泌量

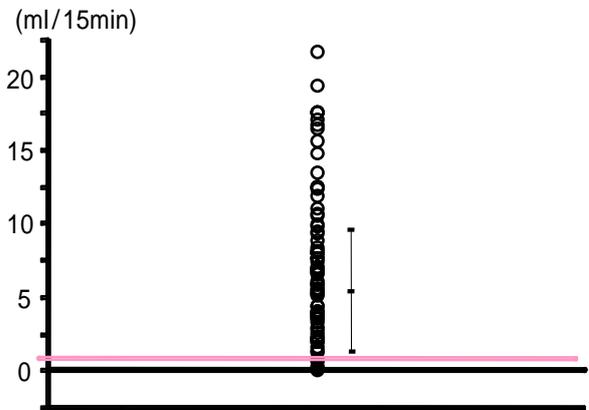


図 4 ガムテスト

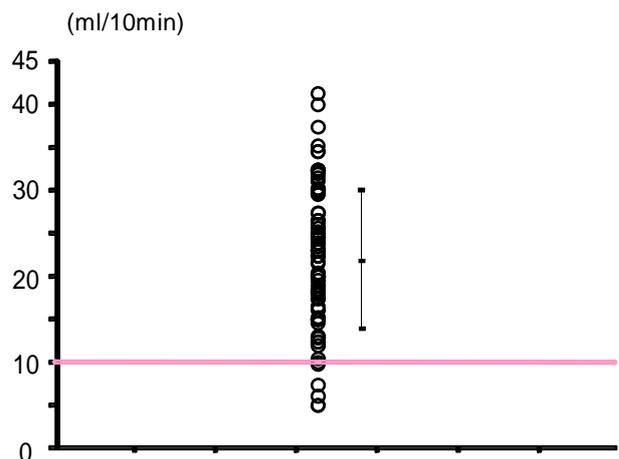
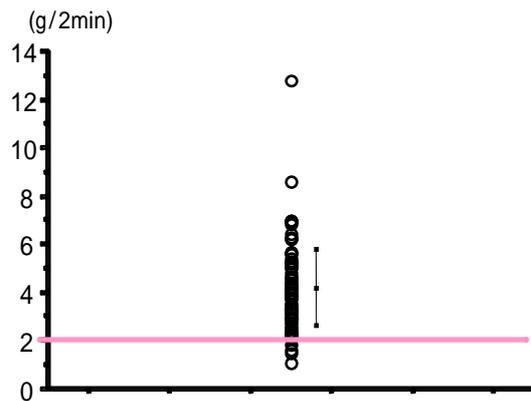


図5 サクソソテスト



本研究から、唾液分泌量の基準値の設定されていなかった小児年齢のうち、中学生基準値を設定することができた。また、これまでに小児でこれら3つの検査を比較検討した報告はなく、小児患者の診断を進める上で重要な情報である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 冨板美奈子、他。中学生の唾液分泌量の正常値の検討。第18回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2008年12月5日 札幌
2. 冨板美奈子、他。唾液のプロテオーム解析による若年 Sjögren 症候群患者の病態にかかわるタンパク質の同定。第52回日本リウマチ学会総会・学術集会 2008年4月23日 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

冨板 美奈子(TOMIITA MINAKO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60344991

(2)研究分担者

下条 直樹(SHIMOJO NAOKI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40221303

河野 陽一(KOHNO YOICHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60161882

根津 雅彦(NEZU MASAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90322461

(3)連携研究者

なし