

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09669

研究課題名(和文) 唾液バイオマーカーを用いた口腔乾燥症の新規の確定診断法

研究課題名(英文) A new method for diagnosis of oral dryness using salivary biomarker

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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唾液バイオマーカーを決定し、薬物性の口腔乾燥症の確定診断を行うことである。Ca拮抗薬服用の口腔乾燥症患者における唾液タンパク質を網羅的に解析した結果、Ca拮抗薬服用の口腔乾燥症患者において健常高齢者と比較して特徴的に増加している唾液タンパク質が検出され、Ca拮抗薬服用者の口腔乾燥症を診断するための唾液バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔乾燥を生じる薬物は約800種類あり、Ca拮抗薬、抗コリン薬や抗不安薬などがあげられる。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。唾液バイオマーカーの開発により、低侵襲的な唾液採取をすることで、これまで行うことが出来なかった口腔乾燥症の確定診断が出来るようになる。本研究の結果、Ca拮抗薬服用による口腔乾燥症を診断するための唾液バイオマーカーとして有用である唾液タンパク質が検出された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the salivary biomarker on oral dryness patients caused by calcium blocker and to diagnosis oral dryness caused by medicine. The protein ingredient in saliva on oral dryness patients caused by calcium blocker was analyzed comprehensively. The results of the analysis showed that there were some salivary proteins increasing on oral dryness patients caused by calcium blocker compared to that on healthy elderly. It was suggested that the detected salivary proteins could be one of the salivary biomarkers on oral dryness patients caused by calcium blocker.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：唾液バイオマーカー 薬物性口腔乾燥症 Ca拮抗薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者の多くが複数の薬物を服用している現在、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) 唾液中に含まれるエキソソームには、タンパク質やDNAだけでなく、RNAも安定して含まれており (ValadiHet al., NatCell Biol, 2007.), 唾液は血液のように多くの生体情報を有していることが明らかになってきた。唾液は全身の体液や唾液腺を反映することから、唾液中には口腔乾燥症患者に特徴的なバイオマーカーが存在し、そのマーカーを発見することが、口腔乾燥症の確定診断に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、Ca拮抗薬による口腔乾燥症の唾液バイオマーカーを解明することにより、薬物性の口腔乾燥症を唾液検査により確定診断することである。

(2) 高血圧症の治療薬であるCa拮抗薬服用者に口腔乾燥症を呈する人が非常に多いため、Ca拮抗薬服用者の唾液中のタンパク質とRNAを分析し、その特徴を明らかにする。Ca拮抗薬による口腔乾燥症に特有の唾液バイオマーカーを決定し、唾液バイオマーカーによる薬物性の口腔乾燥症の確定診断を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 被験者は、日本歯科大学新潟病院口のかわき治療外来に来院したCa拮抗薬による口腔乾燥症患者および日本歯科大学新潟病院に来院した健常高齢者とした。さらに、日本歯科大学新潟病院口のかわき治療外来に来院したシェーグレン症候群患者も研究対象者とした。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)。

(2) Ca拮抗薬服用の口腔乾燥症患者(2名)および内服薬のない健常高齢者(1名)およびシェーグレン症候群患者(1名)の安静時唾液を遠心分離し、上清を用いて唾液タンパク質の網羅的な比較定量解析法であるiTRAQプロテオーム解析(Hall SC, J Proteome Res, 2017.)を委託にて行った。

(3) iTRAQプロテオーム解析により、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特徴的に増加および減少するタンパク質を抽出した。その後、Ca拮抗薬を服用している口腔乾燥症患者と健常高齢者の唾液を用いて、Western blottingを行い、タンパク質成分の検出を行った。

(4) Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者におけるRNAの特徴を調べるべく、Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者(1名)およびシェーグレン症候群患者(1名)の安静時唾液サンプルを用いてRNA(miRNAを含む)抽出を行い、mRNA発現解析を委託にて行った。

4. 研究成果

(1) iTRAQプロテオーム解析の結果を分析し、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の相対定量比を求めた結果、相対定量比が有意に増加および減少する唾液タンパク質が認められた。

(2) Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者において著明に増加していた唾液タンパク質には、Calmodulin-like protein 3, Cytokeratin 13, Glutathione S-transferase Pなどがあり、著明に減少していた唾液タンパク質にはLysozyme Cなどが認められた(表1)。

表1 Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者で増加するタンパク質

Protein	Function	Ratio*
Calmodulin-like protein 3	ミオシン10のL鎖	26.5
Acyl-CoA-binding protein	アシルCoAの細胞内キャリア	23.8
Fatty acid-binding protein, epidermal	脂肪酸結合	13.7
Cytokeratin 13	構造分子活動	12.2
Apolipoprotein A-I	コレステロールの逆転送	10.9
Glutathione S-transferase P	薬物結合	5.9
Lysozyme C	抗菌酵素	0.1

(3) シェーグレン症候群患者においても、健常高齢者を基準として相対定量比を求めた結果、相対定量比が有意に変化する唾液タンパク質が認められた(表2)。シェーグレン症候群患者の唾液において、Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者で増加する唾液タンパク質と共通して増加していた唾液タンパク質には、Fatty acid-binding protein epidermal および Apolipoprotein A-I などがあった。

表2 シェーグレン症候群患者で増加するタンパク質

Protein	Function	Ratio*
Fatty acid-binding protein, epidermal	脂肪酸結合	7.4
Apolipoprotein A-I	コレステロールの逆転送	4.2
Glutathione S-transferase P	薬物結合	4.0
Alpha-2-macroglobulin	アンチプロテアーゼ	3.6
Complement C3	アンチプロテアーゼ	3.2

(4) Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者で著明に増加していた唾液タンパク質である Calmodulin-like protein 3 および Glutathione S-transferase P について、Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者および健常高齢者それぞれ6名の Western blotting 結果を図1に示す。

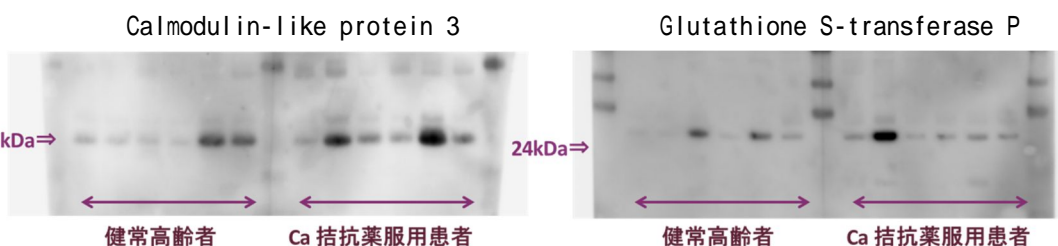


図1 Western blotting 結果

(5) Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者において著明に変化していた唾液タンパク質について、Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者と健常高齢者の唾液を用いて、Western blotting を行った。内在性コントロールである β -Actin に対するタンパク質の検出率を求め、対応のない t 検定を用いて Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者と健常高齢者の唾液タンパク質の検出量を比較分析した結果、Calmodulin-like protein 3 の検出率が Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者において有意に増加していた($p < 0.05$) (図2)。

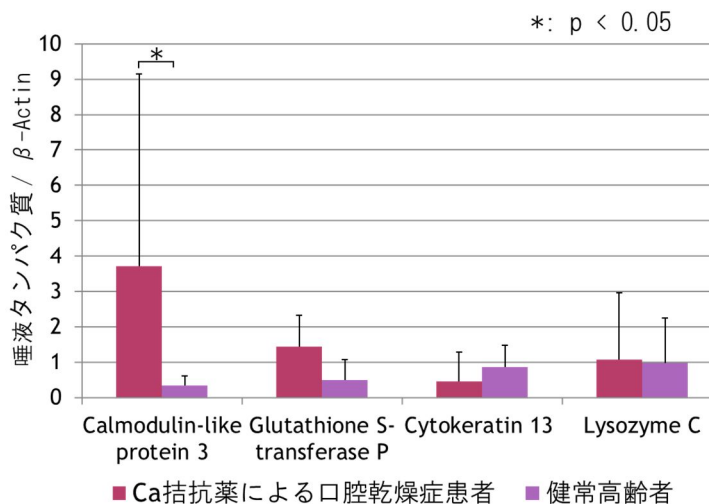


図2 唾液タンパク質の検出量

(6) 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である Calmodulin-like protein 3 が有意に増加しており、Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者の唾液バイオマーカーとなり得ることが示唆された。

(7) 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安静時唾液サンプルを用いて、RNA (miRNA を含む) 抽出を行い、mRNA 発現解析を委託にて行ったが、現在、mRNA 発現解析の結果を分析している。唾液タンパク質の iTRAQ プロテオーム解析の結果、抽出された Ca拮抗薬服用の口腔乾燥症患者において特徴的に変化する唾液タンパク質との比較検討を行い、Ca拮抗薬服用者の口腔乾燥症を確実に診断するための唾液バイオマーカーを確定していく。

<引用文献>

Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 654-659.

Hall SC, Hassis ME, Williams KE, et al. 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28件（うち査読付論文 28件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Mizuhashi Fumi, Morita Takao, Toya Shuji, Sato Ritsuko, Watarai Yuko, Koide Kaoru	4. 巻 5
2. 論文標題 Protein Ingredient in Saliva on Oral Dryness Patients Caused by Calcium Blocker	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geriatrics	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/geriatrics5040070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 水橋 史、戸谷収二、森田貴雄、小出 馨	4. 巻 25
2. 論文標題 口腔乾燥症状を呈するカルシウム拮抗薬服用者の唾液量および唾液タンパク質の分析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本全身咬合学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計32件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水橋 史、小出 馨、森田貴雄、戸谷収二、近藤敦子、浅沼直樹、佐藤利英、渡曾侑子、栗田 武、小林 博、内田剛也
2. 発表標題 口腔乾燥を伴う義歯装着患者の唾液タンパク質の変化
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水橋 史、小出 馨、森田貴雄、戸谷収二、近藤敦子、浅沼直樹、佐藤利英、渡曾侑子、栗田 武、小林 博
2. 発表標題 Ca拮抗薬による口腔乾燥症患者の唾液バイオマーカーの検討
3. 学会等名 令和2年度公益社団法人日本補綴歯科学会関越支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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、渡曾侑子、栗田 武、小林 博、内田剛也
2. 発表標題 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唾液タンパク質の分析
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水橋 史、戸谷収二、森田貴雄、小出 馨
2. 発表標題 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唾液タンパク質の分析
3. 学会等名 令和元年度日本歯科大学歯学会大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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、渡曾侑子、栗田 武、小林 博、内田剛也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第127回学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梨田 智子 (Nashida Tomoko) (10133464)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・非常勤講師 (32667)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森田 貴雄 (Morita Takao) (20326549)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	戸谷 収二 (Toya Shuji) (20287791)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関