

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592476

研究課題名（和文） 唾液分泌障害患者の唾液を用いた生活習慣病関連遺伝子の解析

研究課題名（英文） Genetic analysis of xerostomia associated with lifestyle-related diseases.

研究代表者

梁 洪淵（RYO KOUFUCHI）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10298268

研究成果の概要(和文): ドライマウスリスク評価となる遺伝子マーカーを選定するために、ドライマウス群122名、健常者群116名の唾液サンプルを用いてロジスティック回帰分析を行った結果、6SNPsに有意差が認められた。ステップワイズ法によるリスク評価モデルでは、Hmox1遺伝子とCD36酸化遺伝子がマーカーとして選出され、この2の組み合わせはドライマウスのリスク評価モデルとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The objective of this study was to examine the assessment of genetic risk for dry mouth. The study population comprised 238 unrelated Japanese individuals (122 xerostomia; 116 healthy) who either outpatient clinic of Tsurumi University School of Dental Medicine. They all had the typical symptoms of dry mouth. Multivariable logistic regression analysis was significantly detected 6SNPs. A stepwise forward selection procedure has demonstrated that Hmox1 and CD36 genotypes significantly affected with the prevalence of dry mouth. Determination of the combined genotype for these genes may contribute to primary, personalized prevention of this condition.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：ドライマウス、口腔乾燥症、唾液、遺伝子、生活習慣病

### 1. 研究開始当初の背景

唾液分泌量の低下により生じる口腔乾燥症（ドライマウス）は唾液腺機能不全による著しい乾燥症状を呈し、齲蝕や歯周病のみならず誤嚥性肺炎、上部消化管障害などの臨床症状を示す疾患であり、その病因の詳細な成立機序は不明である。

研究代表者が担当する鶴見大学歯学部附属病院ドライマウス専門外来では現在までに受診した 3600 人の統計学的な解析が行わ

れ、シェーグレン症候群（SS）などの自己免疫疾患による唾液腺破壊からドライマウスを訴える患者は全てのドライマウス患者の 1 割にも満たなく、その大半は SS 以外の病因により唾液分泌量の低下や質の異常を来し発症することが明らかとなってきた。加えて、このデータ解析からドライマウス発症の病的背景として、高血圧や動脈硬化、糖尿病等の生活習慣病に起因している症例が大多数を占めていることが統計学的に推察され

ている。  
このことより、本研究ではドライマウスの大半を占める非 SS ドライマウスと生活習慣病の関連を明らかにすることを目的に、ドライマウス患者の唾液に含まれる細胞成分から抽出した DNA を用いて、生活習慣病に関連する遺伝子群を網羅的に解析し統計学的に検討を行う。

ドライマウスの要因の一つと想定される生活習慣病は Common Disease (ありふれた疾患) といわれ、多因子疾患であることが知られている。脂質代謝異常、高血糖、高血圧等のうち 2 つ以上組み合わせたり、さらに内臓脂肪型肥満を併発するとメタボリックシンドローム (内臓脂肪症候群) が成立する。これらの疾患は、環境要因と遺伝的素因が複雑に相互作用することにより発症すると考えられているが、特にメタボリックシンドロームは平成 16 年の国民健康・栄養調査によると 40~74 歳の男性の 2 人に 1 人、女性の 5 人に 1 人はメタボリックシンドロームが強く疑われるか予備群と推定されている。生活習慣病のなかで最も罹患率が高い高血圧は、国民の 4 人に 1 人、3500 万人が罹患しており、高血圧による循環器障害により分泌量が低下するとの知見も得られている。さらに、その対処として約 800 万人が服用している降圧薬や利尿薬の副作用として唾液分泌障害を促し乾燥感をさらに増悪化させている。世界で約 2 億人、日本では約 700 万人が罹患しているといわれている糖尿病は、血液の浸透圧の上昇、唾液腺組織の脂肪細胞変性、腺房細胞の萎縮、ムスカリン受容体の感受性の低下、唾液腺間質の血管内皮細胞の変化により唾液分泌量の低下を生じることが示唆されており、本症の原因の一つとして従来より指摘されている。特に、2 型糖尿病は複数の遺伝子群と生活習慣などの環境要因により発症する多因子性疾患 (multifactorial disease) とされ、本症はドライマウスを引き起こす危険性が高くなると容易に推測され、唾液分泌障害の程度に差を生じることや、遺伝的素因により規定されているとの可能性も多数報告されている。

一方、2003 年に終了したヒトゲノムプロジェクトの成果を基盤として個々の遺伝子の各組織における機能や相互作用の解明、疾患との関連性における解析は進んでおり、生活習慣病関連遺伝子に関しても主要な SNPs (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) の同定は積極的に行われている。

血液や口腔粘膜を試料とした遺伝子解析は、アルツハイマー病や糖尿病等の罹患危険性を把握するために広く普及し、近年では非観血的に唾液からの DNA 抽出・精製により生活習慣病の発症リスクについて複数の SNPs を判定することが可能となってきた。SNPs の

網羅的解析は、生活習慣病のような多くの人が罹患する疾患の感受性遺伝子を探索するには非常に有効であり、高血圧や動脈硬化、糖尿病等に対していくつかの感受性遺伝子が特定されることは疾患の病態解明への鍵となる。その成果として、糖尿病患者において長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型 (Mt5178A) を有する患者は、生活習慣病に罹患しやすい遺伝子型 (Mt5178C) を有する患者よりも、動脈硬化の進展が 9 年遅いことが報告され、動脈硬化の進展にミトコンドリア遺伝子型とそれに基づくミトコンドリア機能の相違が影響を及ぼすことが推測されている。このように、同定された遺伝子の機能解析や、他の因子との相互作用についての研究は盛んに進められ、ドライマウスの発症と生活習慣病関連遺伝子の相関を検索し、特定した遺伝子の機能を解析することは、ドライマウスの発症機序が明確化されるだけでなく、本症の診断や対処法の確立に役立つと思われる。

本研究に使用する PCR-Luminex 法では、対象とする生活習慣病の発症者ならびに非発症者に関して現在まで得られた日本人 5000 例の検討結果により遺伝的素因の可能性を評価しており、生活習慣病関連遺伝子や長寿の解析と関連深いミトコンドリア SNPs の報告では、日本人 1300 人を対象として解析した結果「9-Na」のハプログループに属する女性はメタボリック症候群や 2 型糖尿病に罹患しにくく、一方、ハプログループ「F」は 1.5 倍罹患しやすいことが報告されている。さらに、肥満や動脈硬化、糖尿病に関連するミトコンドリア SNPs (Lancet. 351:185-186.1998) や、心筋梗塞、高血圧等の核ゲノム SNPs (N Engl J Med. 347:1916-1923.2002) も解明していることから、ドライマウスに関連する生活習慣病関連遺伝子を探索するために必要不可欠な方法であり、この方法を用いて日本国内で約 800 万人と推定され、まさに現代病ともいえるドライマウス患者の生活習慣病関連遺伝子における遺伝的素因について解析することは、ドライマウスの発症機構の解明の一助となり、臨床に大きく貢献できると確信している。

## 2. 研究の目的

研究代表者はドライマウスを主徴とする自己免疫疾患の一つである SS の成因として酸化ストレスの関与を報告し (Pathobiology. 73:252-260.2006)、これまで唾液分泌障害の研究に従事してきた。本研究ではドライマウスとその要因の一つと考えられる生活習慣病の関与を明らかにする目的より、インフォームドコンセントが得られ、既に冷凍保存された唾液や外来受診者の唾液から抽出された DNA を用いて SNPs によ

る網羅的解析により、ドライマウスの発症に起因する生活習慣病の疾病感受性遺伝子を探索し、ドライマウスの発症との相互作用について統計学的に検討する。

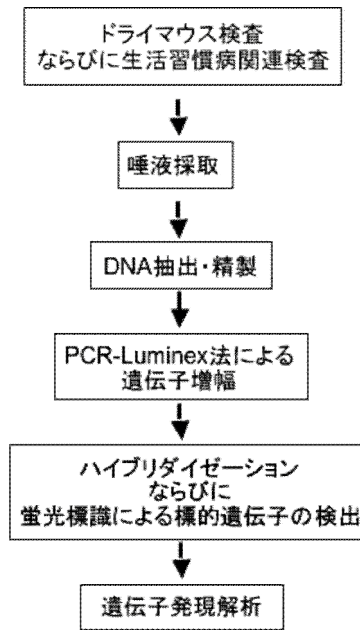
唾液腺組織破壊を伴わない、いわゆる非SSドライマウスは口腔の乾燥感により著しくQOLが低下するだけでなく、誤嚥性肺炎や上部消化管障害等全身の疾患へとつながることが知られているが、そのメカニズムは未だ明らかとされていなく、本研究により非SSドライマウスの発症と生活習慣関連遺伝子の関連が明らかとなれば、ドライマウスの大半を占める非SSドライマウス発症機構の解明ひいては予防への対策につながることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 平成20年度

初年度は既に凍結保存されている唾液を選別し、SSと確定診断された確実例の唾液20例、SSと同程度の唾液分泌低下を認めるもののSSと診断されなかった20例、唾液分泌量が正常な20例を用いて、DNAの抽出法、multiple-PCRでの検出系の確認、オッズ比等の統計学的解析を含めた予備実験を行う。非SSの唾液を選別する際に問診事項を確認し、陽性対照として生活習慣病に罹患している明らかな有病者試料を用いて、対照疾患や健康者との相違を明確に出来るような実験デザインを組み以下の検討を行った。

生活習慣病関連遺伝子検出：前述した3群に分けた唾液100μLから抽出・精製したヒトゲノムDNAを用いて糖尿病や肥満、メタボリックに関連するタンパク質の構造を決定する部分については遺伝子解析Luminex法を用いて50SNPs(100プローブ、50遺伝子増幅)の同時測定系にて122SNPsを測定する。さらにGCの含有量に依存せず、同時に50遺伝子を均等に増幅可能なmultiplex-PCR法を組み合わせることにより生活習慣病に関連するSNPsとドライマウスの関連性を明らかにする。



解析の流れ(平成20、21年度)

#### 平成21年度

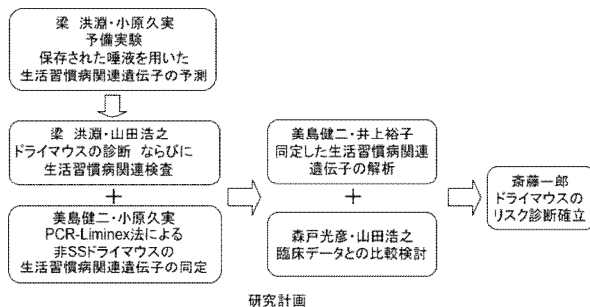
前年度に検出法、解析法を検証した結果より、本学附属病院ドライマウス専門外来を受診するドライマウス患者50名に対し生活習慣病の検査を施行する。すなわち、メタボリックシンドローム診断基準の際に測定する血圧、血糖値や肥満度が算出できるBMIを把握し、疾患特異的遺伝子の評価と比較検討、その結果を統計学的に解析する。

#### 平成22年度

前年度までの予備実験ならびに小規模の対象者を検査・診断・評価し、平成22年度からは引き続き計画を遂行し、より多くの対象者を検査・診断し、加えて数多くの症例における解析をすることによりドライマウスと関連のある生活習慣病関連遺伝子の代表として糖尿病、メタボリックシンドローム、肥満の既知のSNPsの解析を検討することでドライマウスの発症リスクを予知しドライマウスの原因を標的分子として疾患易罹患性のリスク判定が可能となることを検討する。

### 4. 研究成果

口腔乾燥症(ドライマウス)の大半を占める非シェーグレン症候群であるドライマウス(非SS)と生活習慣病の関連を明らかにすることを目的に、非SS患者の唾液に含まれる細胞成分から抽出したDNAを用いて、生活習慣病に関連する遺伝子群を網羅的に解析し統計学的検討を行った。平成20~21年度は解析に用いた遺伝子マーカーは日本人7000名を



対象として診断基準に基づいて診断した疾患罹患群、非罹患群に分類し、既知のSNPs（メタボリックシンドローム:158SNPs、肥満:147SNPs、糖尿病:148SNPs）のうち、より強く相関のみられたSNPs（メタボリックシンドローム:16SNPs、肥満:10SNPs、糖尿病:16SNPs）を統計解析にて選定した。試料は鶴見大学歯学部附属病院ドライマウス外来を受診した101名（ドライマウス群51名、健常者群50名）の凍結保存唾液とした。検査対象となったSNPsのリスク程度とドライマウスの発症を統計解析した結果、各疾患とドライマウスに有意な差は認められなかった。平成21年度はSNPsと唾液分泌量との関係を検討した。その結果、刺激時唾液分泌量が多いほど肥満関連遺伝子に相関がみられる傾向が示唆された。さらに、ドライマウス群と健常者群に分類し、クロス集計を用いて遺伝子マーカーを検索した結果、1つのSNPs（SREBF1:sterol regulatory element binding transcription factor 1）の3G2Gあるいは2G2Gの遺伝子に有意な差が認められた。加えて、ドライマウスのリスク評価モデルをロジスティック回帰分析方法にて構築したところ、2つのSNPsはリスクマーカー、3つのSNPsが抑制マーカーとして作用していることが明らかとなった。年齢・性別が対象SNPsに影響を与えるか否かを比較検討したところ、年齢は6SNPs、性別においては2SNPsに関連が認められた。このことより、平成21年度は年齢と性別で調整し再度ドライマウスのリスク評価をステップワイズ法とロジスティック回帰解析を行った結果、抑制マーカーとしてsyntasin1A、リスクマーカーはapolipoproteinEが明らかとなった。平成22年度は、更に厳密な年齢による影響を排除するために対象者を増加してドライマウス群47名、健常者群80名を対象に215SNPsについて統計解析を行った結果、ドライマウスのリスクを評価する遺伝子マーカーとしHmox1遺伝子とPTGDS遺伝子はリスク作用として挙げられ、3アドレナリン受容体遺伝子は抑制的に作用し、いずれも3～5倍程度のオッズ比をもつことが明らかとなった。このことから、これら3つのSNPsを用いることにより69%の高い確率で、ドライマウスのリスクを評価できることが確認された。

つぎに、症例を増やしてドライマウスのリスク評価となる遺伝子マーカーの選定を解析するために、ドライマウス群122名、健常者群

116名の唾液サンプルを用いて115SNPsを対象にロジスティック回帰解析を行った結果、18SNPsにその傾向が、6SNPsに有意差が認められた。リスク評価モデルのためにステップワイズ法で選定した結果、Hmox1遺伝子と酸化LDL受容体であるCD36遺伝子がマーカーとして選出された。前者はストレス応答に関与し、後者は酸化LDL受容体の一種としてメタボリックシンドロームに関連していることが報告されている。2つの遺伝子を組み合わせたリスク評価モデルは57.56%の確立で成立することが明らかとなり、今回の研究により、この2の組み合わせはドライマウスのリスク評価モデルとなる可能性が示唆された。

## 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4件)

Koufuchi Ryo et al. Effects of Coenzyme Q10 on Salivary Secretion, Clinical Biochemistry, 査読有, in press

Takashi Yamada, Koufuchi Ryo et.al. Evaluation of Therapeutic Effects of Astaxanthin on Impairments in Salivary Secretion, J.Clin.Biochem. Nutr., 査読有, Vol47, 2010, 130-137

Koufuchi Ryo et al. Correlation between mercury concentrations in hair and dental amalgam fillings, ANTI-AGING MEDICINE, 査読有, Vol6, 2010, 107

梁 洪淵、山田浩之、中川洋一、小原久実、井上裕子、美島健二、斎藤一郎 シェーグレン症候群における酸化ストレスを介した腺組織障害機序の解析、消化器と免疫、査読有、No.44、2008、32-37

〔学会発表〕(計2件)

梁 洪淵、唾液分泌障害と生活習慣病関連遺伝子の関連性  
第10回日本抗加齢医学会総会、2010年6月12日、京都 国立京都国際会館

梁 洪淵、還元型 Coenzyme Q10 の唾液分泌に対する効果の検討  
第9回日本抗加齢医学会総会 2009年5月29日、東京 ホテル日航東京

〔図書〕(計3件)

梁 洪淵 (分担執筆)、新興医学出版社、抗加齢医療 その最前線の実際、2010、143-146

梁 洪淵他、これからはじめる認知症高齢者の口腔ケア、2008、69

梁 洪淵、斎藤一郎他、メディカルレビュー社、改訂2版 アンチエイジング

〔その他〕

梁 洪淵、齋藤一郎、ドライマウス・アンチエイジング外来の現状について、2011、FFIジャーナル・食品・食品添加物研究誌、216

梁 洪淵、齋藤一郎、特集：口腔と機能性食品 13 ドライマウスの機能性食品による予防と改善、フジメディカル出版、2010、Funktional Food、12

梁 洪淵、エイジングサイエンス 第16回唾液を検体としたキャピラリー電気泳動-質量分析装置による癌診断・肥満と Toll-like Receptor 5 欠損マウスの腸内細菌の関係、2010、アンチ・エイジング医学・日本抗加齢医学会雑誌、6

梁 洪淵、エイジングサイエンス第14回脳トレの効果についての検証/アディポネクチンとアディポネクチン受容体は Ca と AMPK/SIRT1 により PGC-1 とミトコンドリアを抑制する、2010、アンチ・エイジング医学・日本抗加齢医学会雑誌、6

梁 洪淵、エイジングサイエンス 第12回低用量のレスベラトロールは部分的にカロリー制限を模倣し、老化を遅延させる、2010、アンチ・エイジング医学・日本抗加齢医学会雑誌、6

梁 洪淵、齋藤一郎、アンチエイジングの進歩 各種疾患のアンチエイジング療法 口腔の老化、2010、大道学館出版部、臨床と研究、87

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-最終回 唾液でアンチエイジング、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.12

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-11 有害金属の問題、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.11

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-10 恐るべきホルモンの力、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.10

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-9 運動でミトコンドリアを増やす、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.9

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-8 抗酸化物質という食べ物、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.8

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方

口からはじめるアンチエイジング-4 ドライマウスの対処法、2009、クインテッセンス

出版株式会社、nico Vol.4

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-3 唾液の効用で若々しく、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.3

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-2 よく噛むことが若さを保つ、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.2

梁 洪淵、齋藤一郎、年をとらない年のとり方 口からはじめるアンチエイジング-1 生活習慣病と歯周病の密接な関係 年をとらない年のとり方、2009、クインテッセンス出版株式会社、nico Vol.1

梁 洪淵、齋藤一郎、アンチエイジングクリニック訪問 鶴見大学歯学部附属病院アンチエイジング外来、2008、メディカルレビュー社、ANTI-AGING MEDICINE Vol.1 No.4-6

梁 洪淵、齋藤一郎、歯科領域における有害金属の全身ならびに口腔への影響、2008、メディカルレビュー社、ANTI-AGING MEDICINE Vol.1 No.4-6

梁 洪淵、齋藤一郎、特集 口からみたカルシウム代謝とアンチエイジング、2008、医師薬ジャーナル社、CLINICAL CALCIUM、Vol.18 No.7

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梁 洪淵 (RYO KOUFUCHI)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号：10298268

### (2) 研究分担者

齋藤 一郎 (SAITO ICHIRO)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：60147634  
森戸 光彦 (MORITO MITSUHIKO)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：30089429  
美島 健二 (MISHIMA KENJI)  
鶴見大学・歯学部・准教授  
研究者番号：50275343  
井上 裕子 (INOUE HIROKO)  
鶴見大学・歯学部・講師  
研究者番号：50367306  
山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)  
鶴見大学・歯学部・講師  
研究者番号：90267542