

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：43107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10174

研究課題名(和文) ドラッグデリバリーシステム開発に向けた唾液エクソソームタンパク質の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of salivary exosome proteins for drug delivery system development

研究代表者

今井 あかね (IMAI, Akane)

日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：60180080

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)：エクソソームは細胞間情報伝達システムとして注目されている。唾液中にもエクソソームが存在しており口腔内のみならず消化管の上皮細胞を通して全身に情報を伝達している。さらには個体間の情報伝達も可能である。そのエクソソームに内包されている物質がどのようにしてレシピエント細胞(受容細胞)へ取り込まれていくのか不明な点が多い。唾液エクソソームは人体から生成されるものであるため安全なものであり、新規ドラッグデリバリーシステムを構築するための候補となる。本研究ではその足がかりとするため健康人唾液エクソソームに着目して、細胞間物質輸送システムに関連したタンパク質と糖鎖を網羅的に解析してそのプロフィールを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液は患者に苦痛を与えることなく非侵襲的に採取することができ、病理検査において非常に有用な検体である。一方、唾液中には生体にとって有用なタンパク質が数多く含まれているが、唾液エクソソームのタンパク質・ペプチドに関する研究・基礎データは圧倒的に不足している。このデータに細胞間・臓器間・個体間の情報伝達システム研究の基礎研究者、診断薬開発者、製薬会社等、多くの人々が関心を寄せている。本研究は精度の高い唾液エクソソームタンパク質の網羅的解析を行い、内包されている有用タンパク質とデリバリーシステムに関連する接着・輸送・膜融合タンパク質を示して基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, exosomes have attracted attention as intercellular communication systems. There are also exosomes in human saliva, and it is transmitted information throughout the body not only in the oral cavity but also through the epithelial cells of the digestive tract. Furthermore, those are capable of transmitting information between individuals. There are many unclear points about how the substances encapsulated in the exosomes are taken into the recipient cells (receptor cells). Salivary exosomes are safe because they are produced by the human body, and are candidates for constructing a new drug delivery system. In this study, we focused on the salivary exosomes of healthy volunteers as a foothold, and comprehensively analyzed the proteins and sugar chains related to the intercellular substance transport system and profiled them.

研究分野：口腔生化学

キーワード：唾液 エクソソーム タンパク質 精製法 年齢差 ショットガン解析

## 1. 研究開始当初の背景

1980年代以降、多くの細胞から小胞顆粒（細胞外小胞）が分泌されていることが明らかになり、直径40~200 nmの小胞顆粒をエクソソームと呼ぶようになった。その後、RNA、DNA、タンパク質などを内包しており、それらを伝搬することにより細胞間のコミュニケーションツールとしての役割を果たしていることが明らかになってきた。近年ではエクソソームを介して胎盤、母乳、神経細胞、免疫細胞、がん細胞など様々な細胞間情報伝達が行われており、発生・加齢に伴う生命現象の根幹に関わる基礎的分野に大きな影響を与えている。

唾液は血液とは違い患者に苦痛を与えることなく非侵襲的に採取することができ、病理検査のためには非常に有用な検体である。唾液中にもエクソソームが含まれており、その中のmiRNA等の核酸を調べることにより複数のがんの診断に繋げようとする研究が欧米では盛んに行われていた。しかしながら、日本では唾液に関する研究者が限られており、生体にとって有用な成分が数多く含まれているにもかかわらず、研究が停滞していた。特に唾液エクソソームのタンパク質・ペプチドに関する研究・基礎データは圧倒的に不足していた。

## 2. 研究の目的

唾液は1日に1~1.5 Lが分泌され、その大半が飲み込まれていることから健常人のものはたいへん安全といえる。これまでの研究結果から、唾液エクソソームにはホルモン、サイトカインをはじめ、抗菌、免疫、潤滑・保湿など多くの有用成分が内包されている。動物が怪我をした部分を舐めたり、コミュニケーションのため互いに舐め合ったりする現象にさえ唾液エクソソームによる個体間の情報伝達が存在する可能性がある。最近では唾液腺から全身への臓器間ネットワークが話題になっており、これに唾液エクソソームが関わっていることを構成タンパク質成分とその機能面から解明・考察し、全世代に向けた安全で効率的なドラッグデリバリーシステム(DDS)開発に向けエクソソームの有用性を提案していくことが本研究の最終目的である。まず、本研究ではデータ収集のための足がかりとなる知見を得ることを目的として、以下の解析・検討を行った。

(1) エクソソームを含む唾液中の有用成分について解析・検討した。

(2) 年齢差による唾液エクソソームの比較を行った。内包ペプチドおよびN-結合型糖鎖について解析を行った。

(3) 通常唾液エクソソーム調製法では、液体部分の唾液タンパク質が混入してしまうため、抽出・精製法を検討した。

(4) 健常人唾液エクソソームと舌がん培養細胞であるSAS細胞から分泌されるエクソソームタンパク質を比較検討した。

## 3. 研究の方法

(1) NCBIデータベースに蓄積されている鎮痛ペプチド（オピオルフィンQRGPRまたはオピオルフィンホモログQRGPR）はヒト高プロリンタンパク質ファミリーとして、P-B1（112残基）P-B（57残基）Q504X8（P-BのRNAスプライシングバリエーション；84残基）BPLP（227残基）に含まれている。当該タンパク質ファミリーの発現パターンを解明するため、P-B1、P-B、BPLP-RNA編集バリエーションの発現パターンを増強ケミルミネッセンス（ECL）-ウエスタンブロットティングにより解析した。すなわち、氷冷下で健常者の涙と唾液を採取し、凍結乾燥により10倍濃縮した耳下腺唾液ならびに顎舌下腺唾液および涙の原液を15% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）により分離し、銀染色ならびにECL-ウエスタンブロットティング法によって解析した。抗-SMR3A抗体（P-B1の63-112位ペプチド）、抗-SMR3B抗体（P-Bの7-57位ペプチド）、抗-Prol1抗体（BPLPの154-214位ペプチド）を一次抗体に用い、ECL-ウエスタンブロットティング解析を実施した。

さらに口腔内保護作用に着目してタンパク質分解酵素であるシステインプロテアーゼ（パパイン）の唾液における阻害活性（パパイン阻害）を測定し、その作用を有するシスタチンSの発現および唾液タンパク質濃度を調べ、関係性を検討した。刺激時全唾液（唾液）を採取し、各研究対象者の唾液タンパク質に関するモニタリングを行った。それぞれのパパイン阻害およびタンパク質濃度を測定し、さらにSDS-PAGEにて唾液タンパク質を分離し、抗シスタチンS血清を用いたウエスタンブロットティングによりシスタチンS発現量（シスタチンS）を測定した。

(2) 2つの年齢層のボランティア女性{19.9±0.20歳（Young）および56.7±1.17歳（Adult）の各9名}より唾液の提供を受け、体液用のエクソソーム調製試薬を用いてエクソソームを抽出した。抽出試料中のエクソソームは、電気泳動の後、銀染色およびエクソソームマーカー（CD9、CD63、CD81、Alix）抗体を用いたウエスタンブロットティング、さらには粒子解析を行って確認した。続いて、唾液量を基本として網羅的タンパク質解析を行い比較した。一方、得られたエクソソームペレットに1% Triton X-100、0.1% SDS、100 mM 重炭酸アンモニウムを添加して、20分間超音波破砕を行い、界面活性剤存在下でタンパク質の還元アルキル化およびトリプシン消化をして、PNGase Fによる酵素消化をして、N型糖鎖を遊離させた。この試料に100 pmolの内部

標準物質を加え、グライコプロット法を行いラベル化した糖鎖を回収した。これを質量分析に供して得られた結果を糖鎖解析サイトにより N-glycan の構造を推定した。また、タンパク質の網羅的解析の結果と合わせ唾液エクソソームに含有される N-結合型糖タンパク質を同定した。

(3) 健康成人女性より全唾液の提供を受け、唾液エクソソームの精製法を検討した。エクソソームは約 100 nm の粒子であるため、可溶性画分のタンパク質をどのように取り除き、粒子部分をより精製度の高いものにするのかは大きな問題である。精製方法を図 1 に示す。精製に Optiprep を用いたシヨ糖密度勾配超遠心法 (DGUC) および qEV ゲル濾過カラム法 (UC/qEV) により、さらに唾液エクソソームを精製した。まず、ペレットダウン超遠心法 (UC) により、採取全唾液に半分量の PBS を加え、3,000 g、15 分間遠心分離後の上清をさらに 15,000g、20 分間遠心分離した上清を 100,000 g、70 分間の超遠心分離を行った。その沈殿物を UC エクソソーム画分とした。それを 0.5 mL PBS に懸濁し、一方は Optiprep を用いたシヨ糖密度勾配超遠心法により精製し、もう一方は qEV ゲル濾過カラムに付し、フラクションコレクターを用いて分画してエクソソーム画分 (UC/qEV エクソソーム) を得た。全唾液・UC エクソソーム・UC/qEV エクソソーム を LC-MS/MS ショットガン解析して含有するタンパク質を調べた。また、エクソソームを確認するため、SDS-PAGE およびエクソソームマーカータンパク質のウエスタンブロット法を行った。

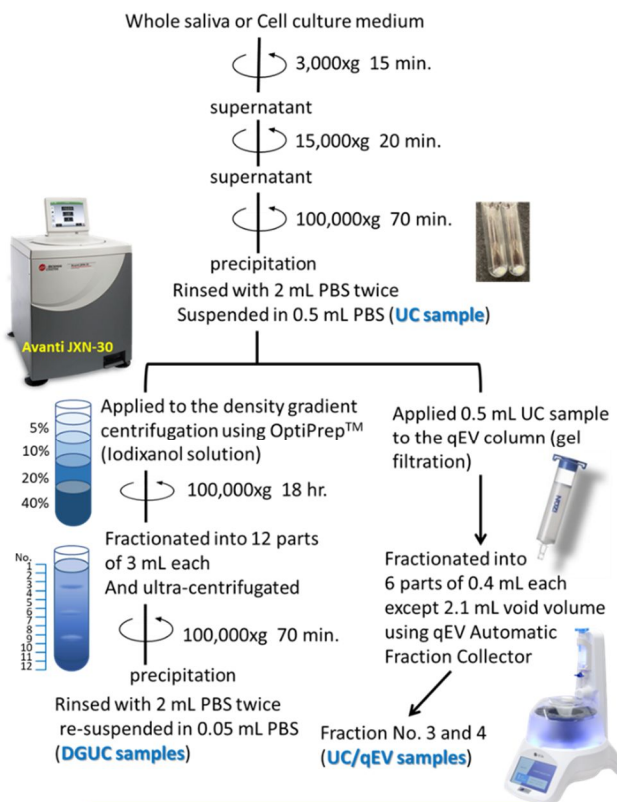


図1. エクソソーム精製法

(4) 舌がん培養細胞 (SAS 細胞) の培養上清より PDUC によりエクソソームを調製した。エクソソームマーカータンパク質によるウエスタンブロット法によりエクソソームを確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗-SMR3 抗体を用いた顎舌下腺唾液ならびに涙液のウエスタンブロット法解析において、分子量が 42kDa と 12kDa 付近に観察された。12kDa 付近のシグナルは P-B1 であり、42kDa 付近のものは非特異的なシグナルであると考えられた。この知見は P-B1 が唾液中に存在することを初めて示した結果であった。抗-SMR3B 抗体による顎舌下腺唾液と耳下腺唾液試料のウエスタンブロット法では分子量

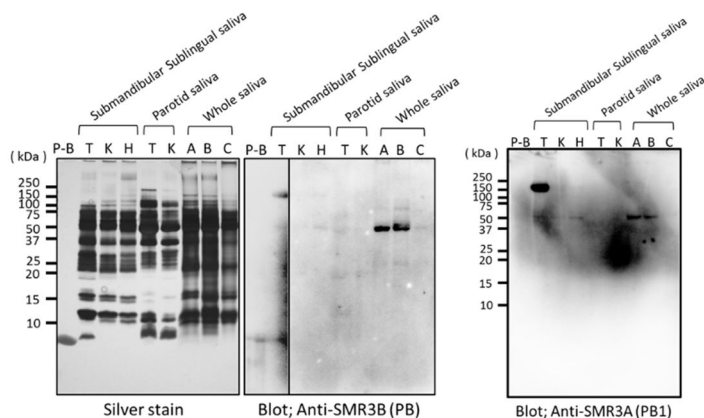


図2. 全唾液・耳下腺唾液・顎舌下腺唾液中の SMR3BおよびSMR3A

は、唾液エクソソームにおいて確認できなかった。

一方、唾液のパパイン阻害とタンパク質濃度を測定して相関性を検討した結果、有意な正の相関関係 (相関係数  $r=0.724$ ,  $p<0.05$ ) が認められた。シスタチン S とパパイン阻害の間でも有意な正の相関関係 ( $r=0.776$ ,  $p<0.01$ ) が認められた。しかし、タンパク質濃度とシスタチン Sの間では相関関係は認められたが ( $r=0.550$ ) 有意な関係性ではなかった (図 3)。その後の解析

は分子量 5.8kDa 付近であり、他のシグナルは非特異的なものであった (図 2)。抗-Prol1 抗体による顎舌下腺唾液、耳下腺唾液、涙液試料のウエスタンブロット法解析では、19.5kDa であった。この値は BPLP (24.9kDa) よりも小さいので、BPLP が涙や唾液中でプロテオリシスを受けると考えられた。MALDI-TOF-MS 解析の既報と総合すれば、P-B1、P-B、BPLP は共に顎舌下腺唾液、耳下腺唾液、涙液中に発現していると結論された。しかしながら、細胞外小胞 (エクソソーム) のデータベース検索の結果、これらペ

結果と合わせるとシスタチン S はエクソソーム内に存在するが、エクソソーム外の唾液中に多く存在している可能性が強まった。

(2)年齢差による唾液エクソソームの性状の比較を図4に示す。Adult エクソソームの方が総タンパク質量は多かったが、N-結合型糖鎖量では Young の方が約 1.5 倍多かった。質量分析マスペクトルでは 55 種類の N-glycan ピークを検出した。糖鎖構造の違いを考慮すると 177 種類と推定された。一方、Adult エクソソームのみにみられる糖鎖スペクトルは 9 種に対して Young では 16 種であった。また、唾液エクソソームに含まれる N 型糖タンパク質は現在のところイムノグロブリン、ラクトフェリン、ムチン、アミラーゼをはじめとする 76 種類以上と推測できた。さらに癌など疾病に関係している糖鎖が多数見られるなど、診断に役立つ可能性が見いだされた。

(3)ここまでの研究に使用した唾液エクソソームには多くの唾液特有のタンパク質が含まれていた。そこで可溶性画分に含まれる唾液タンパク質をできるだけ取り除き、エクソソーム本来の組成を明らかにすべきあると考えた。精製には UC エクソソームを Optiprep を用いたショ糖密度勾配超遠心法 (DGUC) および qEV ゲル濾過カラム法 (UC/qEV) により、さらに精製した。残念ながら、ショ糖密度勾配超遠心法では十分なエクソソームの収量が得られなかった。長時間を要して技術的にも難易度が高くルーチンワークには向いていないため、この方法を断念した。一方、UC 後の qEV ゲル濾過カラム法では、簡便に安定したエクソソームを調製することができた。タンパク質測定により、全唾液に比べて UC 法で約 64 倍、UC/qEV 法により 75 倍に精製度が上昇した。これによりエクソソーム外の唾液タンパク質をかなり除去できると考えられた。さらに、全唾液・UC エクソソーム・UC/qEV エクソソームの 3 つのサンプルを用いて各タンパク質の違いを LC-MS/MS ショットガン解析を行い、比較した。その結果、qEV 法によりすべてのエクソソームマーカータンパク質の相対量が格段に増した。また、主な唾液タンパク質では、ムチン群・カルボニックアンヒドラーゼ・一部の高プロリンタンパク質の含有量が増していた。さらにこれまで検出できなかった Rab タンパク質や S100 タンパク質などを確認することができた。これにより、ターゲット細胞にエクソソームが輸送体として何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

(4)舌がん培養細胞である SAS 細胞の培養上清からエクソソームを調製して唾液エクソソームに含まれるマーカータンパク質をウエスタンブロット法により比較した。タンパク質発現において相違を確認できたことより、臨床検査検体としての可能性が示唆された。

(1)~(4)までの研究結果より、不足していた全唾液および唾液エクソソームタンパク質の基礎的なデータを収集することができた。今まで唾液エクソソーム中に見いだすことのできなかつたタンパク質を確認することができた。今後は更なる解析を行い、唾液エクソソームが具体的に何の何のために輸送して、どのような影響を与えることができるのか、研究の発展に期待する。

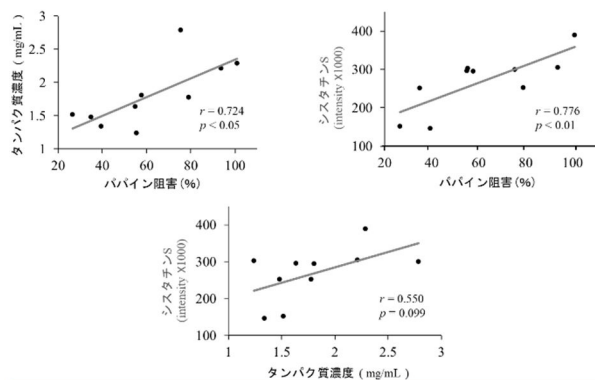


図3. 全唾液におけるバイン阻害、タンパク質濃度、シスタチンSの相関関係  
日本口腔保健学雑誌(2021) 11:23-31.

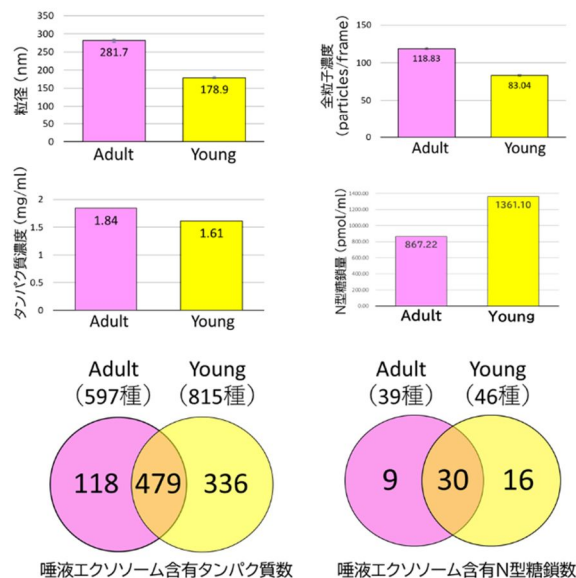


図4. 年齢差による唾液エクソソームの比較  
Odontology (2021) 109:82-102. 改変



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 相模 結里恵, 福井 佳代子, 今井あかね	4. 巻 11
2. 論文標題 口腔内保護作用と唾液タンパク質およびシスタチンSとの相関性について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔保健学雑誌	6. 最初と最後の頁 23 - 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32303/jnohs.11.1_23	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 Imai Akane, Oka Shunya, Susuga Mio, Tsutsui Noriko, Haga-Tsujimura Maiko, Saitoh Eiichi	4. 巻 109
2. 論文標題 Comprehensive analysis and comparison of proteins in salivary exosomes of climacteric and adolescent females	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-020-00538-4	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 -

1. 著者名 今井あかね	4. 巻 25
2. 論文標題 驚異の唾液タンパク質の働きと一人一人の違いについて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児歯科臨床	6. 最初と最後の頁 34-42
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 無
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 -

1. 著者名 時田 実河, 煤賀 美緒, 元井 志保, 佐藤 治美, 今井 あかね	4. 巻 12
2. 論文標題 若年女性の口腔内歯周病原菌叢の変化と歯冠色明度との関係性について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔保健学雑誌	6. 最初と最後の頁 16-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32303/jnohs.12.1_16	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17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 福井佳代子, 相模結里恵, 今井あかね
2. 発表標題 刺激全唾液におけるシステインプロテアーゼ阻害活性とシスタチンS発現について
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水島 康, 山内 海斗, 久保田 真敏, 今井あかね, 門脇 基二, 斎藤 英一
2. 発表標題 抗うつ・鎮痛ペプチドを潜めているヒト高プロリントタンパク質ファミリーの発現に関する研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井 佳代子, 仲村 健二郎, 原 基, 二宮 一智, 桑島 治博, 今井あかね,
2. 発表標題 唾液中タンパク質の抗真菌作用と薬剤耐性解除作用の検討
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡 俊哉, 今井あかね
2. 発表標題 臨床的効能を裏付ける硫酸化多糖類フコイダンの特性
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 時田実河, 煤賀美緒, 元井志保, 佐藤治美, 今井あかね
2. 発表標題 若年女性の歯冠色と歯周病原性菌保菌状況との関係性について
3. 学会等名 第53回歯科衛生研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井あかね, 辻村麻衣子, 岡 俊哉, 斎藤英一
2. 発表標題 唾液エクソソームにおけるN-結合型糖タンパク質の糖鎖解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井佳代子, 原 基, 二宮一智, 桑島治博, 今井あかね, 仲村健二郎
2. 発表標題 唾液タンパク質の働きーラクトフェリン, シスタチンSの抗真菌作用に着目して
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saitoh E, Ochiai A, Tanaka T, Taniguchi M, Kato T, Imai A, Isemura S.
2. 発表標題 Expression of proline-rich proteins, P-B1, P-B, and BPLP, the parent proteins of opiorphin family, in human saliva
3. 学会等名 SPLICING 2020, 3rd International Caparica Conference in Splicing (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizushima K, Higuchi S, Ochiai A, Tanaka T, Taniguchi M, Kato T, Imai A, Saitoh E.
2. 発表標題 A method to purify a higher yield of human salivary proline-rich protein P-B, a parent protein of opiorphin homolog
3. 学会等名 SPLICING 2020, 3rd International Caparica Conference in Splicing (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相模結里恵, 今井あかね
2. 発表標題 唾液によるパパイン活性阻害とシスタチンSペプチド発現の個別モニタリング
3. 学会等名 第52回歯科衛生研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井あかね, 竹澤 晴香, 岡 俊哉, 辻村 麻衣子
2. 発表標題 超遠心分離機およびゲル濾過カラムを用いた唾液エクソソーム精製と含有タンパク質の違いについて
3. 学会等名 第66回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井 あかね, 竹澤 晴香, 岡 俊哉, 辻村 麻衣子
2. 発表標題 唾液エクソソームの調製法と舌がん由来細胞株エクソソームとの比較
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 岡 俊哉, 螺良 修一, 今井 あかね
2. 発表標題 オーラルヘルスケアに役立つ海藻由来薬効成分フコイダンの特性
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤萌々子, 煤賀美緒, 今井あかね
2. 発表標題 舌ブラシ別の細菌除去量と効果的な洗い方に関する研究
3. 学会等名 第54回歯科衛生研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清野可那子, 宮崎晶子, 今井あかね
2. 発表標題 唾液分泌と成分に対する視覚および視聴覚刺激の影響について
3. 学会等名 第54回歯科衛生研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井あかね, 岡 俊哉, 煤賀美緒, 嵐 聖芽, 浅沼直樹
2. 発表標題 唾液エクソソーム精製と内包タンパク質について
3. 学会等名 第54回歯科衛生研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡 俊哉, 螺良修一, 今井あかね
2. 発表標題 オーラルヘルスケアに役立つフコイダンの特性
3. 学会等名 第54回歯科衛生研究会
4. 発表年 2023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	筒井 紀子 (Tsutsui Noriko) (00352782)	日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・講師 (43107)	2021年削除
研究分担者	煤賀 美緒 (Susuga Mio) (00723678)	日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・助教 (43107)	
研究分担者	辻村 麻衣子(羽下麻衣子) (Tsujiura Maiko) (60535219)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	岡 俊哉 (Oka Shunya) (90213909)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授 (32667)	
研究分担者	浅沼 直樹 (Asanuma Naoki) (90231886)	日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・教授 (43107)	

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
---------	---------