

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593164

研究課題名(和文) 唾液中の老化及び歯周病マーカーの探索と実用化

研究課題名(英文) Search and Practical Use for Salivary Markers that Reflects the Severeness of Periodontal Diseases and Aging Markers

研究代表者

田中 庄二 (TANAKA, SHOJI)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：60105616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液中の老化・歯周病マーカーをメタボローム解析にて探索した。小児では代謝産物の濃度が薄く、高齢者では高かった。歯周病の進行でピュウールベイト、ブタノエート、グリシンが上昇した。歯周病の進行と加齢でアミノ酸ではグリシンが最も高く、アスパラギン酸、リシンも上昇した。アミノ酸以外ではコリン、オルニチン、カドベリンなどが上昇した。Gly-Pro比は成人($R = 0.8328$)、小児($R = 0.9451$)；($P < 0.0001$)で一定値を示し、Gly-Proは他のネットワークに含まれず単独で存在し、独立した動態を示した。Gly/Pro比は口腔内または唾液腺状態を反映する指標になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using metabolomics analysis technique, we investigated possible changes in salivary metabolites including glycine from normal volunteers and patients with different stages of periodontal diseases. In the heavy periodontal disease patients, pyruvate, butanoate and glycine were elevated. Among amino acids, glycine showed the highest level whereas aspartic acid and lysine increased with the progression of periodontal diseases and aging. Among not-amino acid metabolites, the following compounds were elevated: choline, polyamine (ornithine, cadaverine, putrescine), and piperidine. Glycine/proline ratio was constant in both child ($R = 0.9451$, $P < 0.0001$) and adults ($R = 0.8328$, $P < 0.0001$). Glycine and proline showed different patterns from other metabolites in correlation network with $R > 0.8$. Proline/glycine ratio thus can be a marker that reflects the oral and salivary gland state.

研究分野：社会系歯学

キーワード：唾液 歯周病 老化 メタボローム解析 小児 健常者 歯周病患者 キット化

1. 研究開始当初の背景

申請者田中は、加齢に伴う唾液アミノ酸組成の変動について調査した。その結果、老化に伴い、また、性差に関係なく、唾液中のグリシンおよびリシン濃度が最大、571 μM , 154 μM まで上昇すること、そして、グリシンとリシン濃度との間に有意な相関関係があることを見出した (Tanaka et al. *In Vivo* 24: 853-856, 2010)。研究分担者杉本は、口腔癌患者の唾液をメタボローム解析を用いてマーカー探索を行ったところ、膵臓癌患者唾液中に高濃度のグルタミン酸を認め、コリン、ポリアミン、アミノ酸などは健常者と歯周病患者では癌患者に比べて濃度は低かったことを見出した (Sugimoto et al. *Metabolomics* 6: 78-95: 2010.)。さらに、我々は、アミノ酸分析とメタボローム解析の間に有意な相関関係があることを確認した (Sugimoto et al. *Metabolomics*, 8(4), 624-633, 2012)。杉本は、少量の唾液中(10 μL 程度)の低分子を極めて高感度に測定できるメタボローム測定技術を開発した (Sugimoto et al. *Metabolomics*, 6(1):78-95, 2010)。本技術は、キャピラリー電気泳動と時間飛行型質量分析装置を組み合わせ (CE-TOFMS)、イオン性の物質を網羅的・高感度に一斉測定することにより、生体内の微細な代謝変動を定量的に把握することを可能にした。このメタボローム解析は、唾液を基に歯周病のように生活習慣に大きく依存する診断マーカーの探索さらに老化マーカーの探索にも適応が可能であると考えられることから本研究の発想を得て実施した。

2. 研究の目的

唾液は、種々の疾患の診断マーカーを提供する貴重な材料である。我々は、これまでに、唾液アミノ酸濃度の日内変動、加齢に伴うアミノ酸組成の変動、口腔癌に特異的なマーカーの探索などについて報告してきた。しかし、歯周病及び老化マーカーは重複する可能性

があり、それぞれに特異的であるか否かは不明であった。そこで、各年齢層の被験者における唾液成分を、メタボローム解析により網羅的に定量する。次に、各年齢層の歯周病の進行度別 (軽度、中等度、重度) に整理し、歯周病及び老化に特異的なマーカーを探索する。最終的に、これらの診断マーカーの検査キットを作製し、診断への実用化を図る。

3. 研究の方法

- 1) 被験者：健常者と歯周疾患患者 (軽度、中等度、重度) とのグループ分けをする。全身疾患・服用薬の有無などを調べ、糖尿病、心血管系疾患などを罹患しているかを調査する口腔内診査では、肉眼的観察、レントゲン撮影さらに臨床パラメーターとして probing depth (PD)、Bleeding on probing (BOP)などを測定し、歯周疾患患者を分類する。
- 2) 唾液の採取：被験者に十分なインフォームドコンセントを行い、各被験者から全唾液を学内倫理委員会のガイドライン (承認番号：A0842、A1113)に従って採取する。
- 3) 唾液における代謝産物の定量：各被験者より全唾液を採取し、遠心によりフィルター濾過し、高分子を除去後、メタボローム解析に供する。
- 4) 統計学的解析：データ解析は、慶應大学にて開発した MasterHands を用いて、ピークの検出や代謝物の同定を行い、病態 (疾患程度) の異なるグループ間統計解析は、JMP (SAS 社) や GraphPad Prism (GraphPad Software 社) を用いて行なう。

4. 研究成果

- 1) 24年度では、メタボローム解析を用いた老化および歯周病マーカーの検索について検討した。すなわち、健常者 (11人) と歯周病患者の進行度 (57人、軽度、中等度、重度の3段階に分類) 及び歯周病と加齢に伴い変動する唾液中の代謝産物をメタボローム解析により網羅的に測定を行

った。

その結果、1)グリシン濃度は加齢とともに上昇した。2)グリシン濃度は、健常者、軽度、中等度歯周病患者の順に増加し、重度歯周病患者で若干減少した。

3)ブチル酸、カダベリン、ピペルジン濃度は、健常者と比較し、軽度、中等度、重度の順に増加した。これらの結果は、ブチル酸は、従来から言われているように、歯周病マーカーとして使用できることを支持する。今回、新に、カダベリン、ピペルジンも歯周病マーカーになり得ることが示唆された。これに対して、グリシンは、歯周病マーカーよりも老化マーカーになり得る可能性を示唆していることがわかった。

2.さらに、歯周病患者における唾液と歯肉溝滲出液中の代謝プロファイルについて検討した。1)唾液的採取 学内倫理委員会の承認を得て(承認番号：A1113)、被験者に十分なインフォームドコンセントを行い、ガイドラインに従って全唾液を採取した。2)歯肉溝及び歯周ポケット内滲出液採取法：各被験者の歯肉溝及び歯周ポケット内底部にギルソンの2 μ lの滅菌チップを挿入し、マイクロピペットで吸引採取した。ただちに、エッペンドルフチューブ内に移し、一定希釈後9,100 \times g, 4 で遠心した。実験まで-80保存した。3)代謝産物の定量：上記のようにして調製された試料をメタボローム解析に供した。4)統計学的解析：測定データ解析は、慶應大学にて開発したMasterHandsを用いて、ピークの検出や代謝物の同定を行った。ヒートマップ上でのデータの可視化とクラスタリングは、Mev TM4(1)を用いた。病態(疾患程度)の異なるグループ間統計解析は、JMP(SAS社)とGraphPad Prism(GraphPad Software社)を用いて行った。

その結果、1)歯周病患者の唾液を比較すると、(1)多くの解糖系代謝産物が歯周病の進行とともに上昇した。(2)アミノ酸では、バ

リン、ロイシン濃度が上昇した。セリン濃度は軽度患者でのみ高かった。(3)アセチル化した物質が多く上昇した。2)炎症部と健常部の歯肉溝滲出液のアミノ酸のパターンは、歯周病の中等度と重度で大きく変化した。3)唾液中で歯周病の進行とともに変化した物質と、炎症部・健常部の歯肉溝滲出液において必ずしも関連しなかった。

4)このGCFのアミノ酸プロファイルの変動が、唾液中代謝プロファイルの変動に直接反映されないが、限定的に影響している可能性が示唆された。

3.同一患者のテンプレート装着前後の唾液を採取し、メタボローム解析を用いて、代謝物の変動を調べた。その結果、テンプレート治療後は、アミノ酸の中ではグリシンだけが有意に上昇し、他の物質はわずかに低下、あるいはほとんど変化しなかった。このようにグリシンのみが特異的な動きをしており、全代謝物とグリシンのバランスが治療前後で変動していることが示唆された。

2)25年度では、唾液中グリシンとプロリンは年齢と歯周病に非依存的に一定の比率を示すか否かをメタボローム解析にて検討した。

1.被験者：被験者を、健常者(8名)と歯周疾患患者(軽度14名、中等度15名、重度14名)にグループ分けをした。2.唾液的採取：学内倫理委員会の承認を得て(承認番号：A1113)、被験者に十分なインフォームドコンセントを行い、ガイドラインに従って全唾液を採取した。

3.代謝産物の定量：上記のようにして調製された試料をメタボローム解析に供した。内部標準物質と混合し、キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)(慶應大・先端生命科学研究)を用いてイオン性代謝物の一斉定量を行った。4.統計学的解析：測定データ解析は、慶應大学にて開発したMasterHandsを用いて、ピークの検出や代

代謝物の同定を行った。ヒートマップ上でのデータの可視化とクラスタリングは、MevTM4を用いた。病態（疾患程度）の異なるグループ間統計解析は、JMP(SAS社)と GraphPad Prism(GraphPad Software社)を用いて行った。

その結果、1)計 144 物質の定量を行い、加齢においては 40 歳を境目に有意に濃度の高くなる代謝物が多く存在し、歯周病とともに酸化ストレス関係の物質の上昇を確認した。2)31 の代謝産物と 6 種類のアミノ酸が、歯周病の進行と共に増加した。乳酸と糖分解の最終産物が歯周病の進行と共に上昇した。3)相関値 $R^2 > 0.8$ のネットワークで、21 の代謝産物と 2 つの代謝産物の 2 つのセットの集団が示された。Aspartic acid、Glutamic acid などの 13 種類のアミノ酸が相関を示した。Glycine は、Proline と同様に Ornithine、Putrescine、N-Acetylputrescine、Lysine と相関を示し($R^2 > 0.7$)、一方 Proline は Glycine とのみ相関を示した。4)全代謝物でお互いに相関をとると、多くのアミノ酸が $R^2 > 0.7$ で高い相関を示し、加齢に伴い唾液中の Pro と Gly の濃度比は、被験者によらず一定値 (0.63:1)を示した。これは、年齢や歯周病にも関係なく一定で、特に高齢者では高血圧やうつ病、また、それに伴う治療薬の影響もなく一定であることが分かった。Hyp は、Pro の 100 分の 1 の濃度であった。Asp と Glu の間にも、高い相関が得られた。Pro/Gly 比は、口腔内または唾液腺の状態を反映する指標になる可能性があることが示唆された。歯周病及び老化マーカーは、重複する可能性があり、それぞれのマーカーが特異的であるか否かは不明でありさらに検討したい。

3)26 年度では、様々な年齢と異なる歯周病の進行度を有する患者唾液の網羅的なメタボローム解析を実施した。その結果、プロリン(Pro)とグリシン(Gly)比が一定の比率 (0.63:1)を保ちながら、老化の進行とともに増加することが判明し、加齢に伴いコラーゲ

ン代謝が変動する可能性を報告した。しかしながら、小児における唾液のメタボローム解析のは少ない。そこで、成人検者を対照として用いて、小児における全体的な代謝物および Pro/Gly 比について検討した。

1.小児および成人の唾液メタボローム解析：[特に、プロリン/グリシン比の変動に注目して]について検討を行った。

その結果、1)小児と成人及び高齢者のどちらかの郡で 30%以上の症例で検出できた物質のプロファイル(2郡で有意差があったもの、 $P < 0.05$ (Student's t-test))では、小児患者では全体的に均一なプロファイルになっており、成人及び高齢者では濃度が高く、比較的分散したプロファイルになっている。

2)小児及び成人の Pro/Gly 比は、それぞれ、 $\text{Pro/Gly} = 0.71$ ($[\text{Pro}] = 0.7126 \times [\text{Gly}] - 12.14$, $P < 0.0001$, $R = 0.9451$ ($P < 0.0001$), 0.79 $[\text{Pro}] = 0.7868 \times [\text{Gly}] - 33.64$ ($P < 0.0001$), $R = 0.8328$, $P < 0.0001$)で一定値を示した。

3)全代謝物質で $R > 0.8$ 以上をつないだ相関ネットワークを示す。Gly-Pro は、やはり他のネットワークに含まれず、単独で存在しているので、他と独立した動きになっていると考えられた。Pro/Gly 比は、口腔内または唾液腺状態を反映する指標に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 3 件)

1) Tanaka S, Taga H, Maehara K, Kaneshima A, Machino M, Onuma H, Kaneko M, Sakagami H, Sugimoto M, Soga T and Tomita M: Pilot study of changes in salivary metabolic profiles induced by template therapy. In Vivo Nov-Dec:26(6): 1015-1020, 2012.

2) 坂上宏、田中庄二、杉本昌弘：老化マーカーとしての唾液中グリシンおよびプロ

リンの動態、検査診断学への展望 臨床検査指針：測定とデータ判読のポイントー第62回日本医学検査学会記念誌、pp696-699, 南江堂, 2013.

- 3) Sakagami H, Sugimoto M, Tanaka S, Onuma H, Ota S, Kaneko M, Soga T and Tomita M: Metabolomic profiling of sodium fluoride-induced cytotoxicity in an oral squamous cell carcinoma cell line. Metabolomics, 10:270-279, 2014.

〔学会発表〕(計4件)

- 1) 田中庄二. メタボローム解析を用いた老化および歯周病マーカーの検索.
第25回日本口腔診断学会・第22回日本口腔内科学会、シンポジウム、東京、2012年9月21日.
- 2) 田中庄二、秋田紗世子、町野守、坂上 宏、杉本昌弘、曾我朋義、富田勝.
歯周病患者における唾液と歯肉滲出液中の代謝プロファイル.
第54回歯科基礎医学会学術大会総会.
福島・2012年9月16日.
- 3) 田中庄二、秋田 紗世子、片山 直、坂上 宏、杉本昌弘.
唾液中グリシンとプロリンは年齢と歯周病に非依存的に一定の比率を示す.
第55回歯科基礎医学会学術大会総会.
岡山・2013年9月22日.
- 4) 田中庄二、秋田 紗世子、谷口 潔、片山 直、荻原 孝、小口寛子、渡部 茂、坂上 宏、杉本昌弘.
小児および成人の唾液メタボローム解析：特に、グリシン/プロリン比の変動に注目して.
第56回歯科基礎医学会学術大会総会. 福岡・2014年10月26,27日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 庄二 (TANAKA, Shoji)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号：60105616

(2) 研究分担者

杉本 昌弘 (SUGIMOTO, Masahiro)
慶應義塾大学・先端生命科学研究所・准教授
研究者番号：30458963

(3) 連携研究者

()

研究者番号：