

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670897

研究課題名(和文) コラーゲン代謝物に着目した唾液老化マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of salivary aging marker that reflects the collagen metabolites

研究代表者

坂上 宏 (Sakagami, Hiroshi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50138484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い唾液中のグリシンとプロリンが一定の比率を維持して増加する原因を検討した。コラーゲン産生細胞であるヒト歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯髄細胞の無刺激状態、炎症惹起状態、細胞死誘導過程におけるグリシン、プロリンの産生速度、細胞内含量は、Gln、Gluの1/3ないし1/10程度であった。また、プロリンの含量は、グリシンの1/3程度であった。加齢に伴いコラーゲン関連ペプチドおよびヒドロキシプロリンの分解が更新する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The reason why salivary glycine and proline concentrations are increased during aging process, keeping the same ratio, was investigated. Three normal oral cells, such as human gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblast and pulp cells produced these amino acids at 3 to 10 times lower speed, and have one order lower intracellular concentration as compared with glutamine and glutamic acid, under normal inflammatory and cytotoxic conditions. The intracellular concentration of proline was one third that of glycine. This suggests the possible enhancement of degradation of collagen and hydroxyproline.

研究分野：薬理学

キーワード：メタボローム解析 グリシン プロリン 歯肉線維芽細胞 炎症 老化

1. 研究開始当初の背景

近年、キャピラリー電気泳動と飛行時間型質量分析装置を組み合わせた、イオン性の物質を網羅的・高感度に一斉分析するメタボローム解析技術が開発され、生体内の代謝変動を網羅的・定量的に把握できるようになった。この技術は、生活習慣病に大きく依存する診断マーカーの探索に絶大な威力を発揮しつつある。近年大規模な血中メタボローム解析により、脂質代謝物が老化に依存して変化することが明らかになった(Yu et al., Aging Cell, 2012)。一方血液だけでなく唾液メタボロームも様々な生活習慣や全身性疾患を反映すること(Sugimoto et al., Metabolomics, 2010, 2012)が明らかになりつつあるが、非侵襲的に採取可能な唾液メタボロームを使って口腔内や全身の老化を代謝能の観点から、定量的・客観的に評価する研究例はない。

申請者は、メタボローム解析により、加齢に伴い唾液中の Pro および Gly が歯周病細菌由来のブチル酸と同レベルまで上昇するが、ヒドロキシプロリン(Hyp)ははるかに低レベルであり、Pro と Gly の濃度比は、被験者によらず一定値 (0.63:1)を示すことを見出した。この値は、唾液プロリンリッチタンパク質とは異なり、コラーゲンにおける比率とほぼ一致したため、老化に伴うコラーゲン代謝の変調の可能性が生じ本着想を得た。

2. 研究の目的

歯周病、糖尿病、癌など数多くの疾患の特異的な診断マーカーの探索ツールとして、唾液のメタボローム解析が盛んに行われている。申請者は、メタボローム解析により、加齢に伴い全唾液中のプロリン(Pro)とグリシン(Gly)が増加し、しかもその比率が、コラーゲン中に存在する値とほぼ一致することを発見した。しかし、この現象がどのような原因で起こっているのか不明であった。すなわち、この全唾液で観察された結果が、全身の老化を反映するのか、それとも口腔環境の変化を反映するのか？また、コラーゲン産生細胞の老化過程において、Pro の水酸化に必要な抗酸化剤の細胞内含量や、プロコラーゲンの分解に関与するプロテアーゼの活性発現が変化するのか？などである。

また、もし、Gly、Pro が唾液老化マーカーに成りうる evidence が得られれば、非侵襲的な、患者に負担をかけない老化の進行度の測定のみならず、老化のメカニズムの解明や、サプリメントや健康食品などのアンチエイジング効果の客観的な評価に応用できるだろう。

今回は、コラーゲン産生細胞として使用されている口腔内正常細胞であるヒト歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯髄細胞の通常の状態、および炎症を惹起した状態、あるいは、細胞死の過程において、細胞内濃度がどのように変動するかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の樹立：明海大学歯学部倫理委員会規定に従い、抜去歯より、無菌的に歯肉、歯根膜、歯髄を採取し、20%FBS を含む α -MEM 培養液中で培養し、out-growth してくる細胞を初代培養細胞とした。その後、10%FBS を含む DMEM 培地で、毎週、1:4 スプリット比で継代を行い、途中 1 回培地交換を行った。試験管内総分裂回数は、40 前後であった。実験では、10-20 回分裂した細胞を用いた。

(2) HPLC：培養液中のアミノ酸は下記条件で分離・定量した。

Column: Microsorb MW 100-5 C18 (250mm \times 4.6mm I.D., Varian)

Mobile Phase: 50mM Sodium acetate buffer (pH5.0) (solvent A), Methanol (solvent B)

Gradient Method: Low press gradient, 0min (30% B), 0-10min (30% B), 10-45min (40% B)

45-75min (60% B), 75-80min (60% B)

80-81min (30% B), 81-90min (30% B)

Flow Rate: 0.9ml/min

Column Temperature: 40°C

Injection: 10ml

Detect: 335nm (Ex), 515nm (Em)

(3) メタボローム解析

先ず、細胞内代謝産物の変動のメタボローム解析に必要な条件設定(洗浄あるいはトリプシン処理による代謝産物の漏出の検討)を行った。細胞を洗浄する時、5%マンニトールを用いることが最も、細胞から低分子性代謝産物の漏出が少ないことが判明したので、マンニトールにより細胞を洗浄することにした。また、トリプシン処理は、細胞内代謝産物の量を有意に低下させることが判明した。トリプシンを用いて細胞を剥離回収することはメタボローム解析を行う場合は避けるべきであると思われた。

細胞(10-cm シャーレ)からの低分子性代謝物の抽出は、細胞を洗浄後、室温で、10 分間、内部標準物質である 25 μ M methionine sulfone, 2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid D-camphor-10-sulfonic acid を含むメタノール(1 ml)インキュベートすることにより行った。イオン性代謝物の一斉定量は、メタボローム解析(キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)は慶応大学最先端生命科学研究所に現有)により行った。MS の測定レンジの上限を 3000Da 程度に拡張し、ジペプチドおよびトリペプチドも全て定量した。

4. 研究成果

(1) HPLC 解析：コラーゲン産生細胞線におけるアミノ酸の産生：

コラーゲンを産生するヒト正常口腔細胞を用いて、無刺激時、および LPS あるいは IL-1 β で炎症を惹起した場合に、1 時間培養時間あたりのアミノ酸の産生及び消費がどの

ように変動するかを検討した。無刺激の細胞では、いずれも Gln、Glu の産生が最大であり、Gly はその 1/3 程度であり、Pro は 1/10 以下であった。次に、炎症性サイトカインである IL-1 β で処理すると、PGE₂、IL-6、IL-8、MCP-1 などの炎症性物質の産生が 2 桁増加した。この炎症を起こした細胞において、Glu、Gln の産生は顕著に増加したが、Gln の産生はその 1/3 程度であり、Pro の産生はごくわずかであった。5 mM 濃度以下の Gly および Pro は、細胞増殖及び IL-8 の産生に対してはほとんど影響を与えなかった。

加齢における Pro、Gly の唾液中濃度の上昇の原因として、口腔細胞から Pro、Gly が産生する可能性、および唾液 Pro・Gly が歯肉線維芽細胞の増殖と IL-8 産生に与える影響は低いと考えられる。原因として、コラーゲン代謝異常（分解能の亢進）の可能性が考えられる。

(2) メタボローム解析

(a) 無刺激細胞における動態

ヒト歯肉線維芽細胞(19 PDL)の細胞内 Gly 濃度(92 fmol/cell)は、Pro (28 fmol/cell)、Ile (25 fmol/cell)、Leu(30 fmol/cell)の約 3 倍であるが、Gln (170-425 fmol/cell)、Glu (140-378 fmol/cell)の約 1/3 であることが判明した。ヒト歯根膜線維芽細胞(15 PDL)、歯髓細胞 (17 PDL)も、これらアミノ酸の濃度を同程度含んでいた。一方、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2)における、これらアミノ酸の濃度は、細胞 1 個あたり、1/7-1/3 であった(13, 8, 9, 10, 51, 82 fmol/cell)。Gln は、線維芽細胞の含量は比較的多いが、Pro の含量は、それほど多くないことが明らかになった。

(b) 炎症過程での変動

次に、炎症を起こした歯肉線維芽細胞におけるアミノ酸の変動を検討した。IL-1 β および酸化チタンのナノ粒子で歯肉線維芽細胞を刺激すると、PGE₂ の産生、及び COX-2 タンパク質の発現が相乗的に増加し、炎症が惹起されたことが確認された。この炎症を起こした細胞では、オルニチン、S-アデノシルメチオニン、還元型 GSH が特に顕著に低下し、Gln 濃度が約 80%低下した(Biomaterials 75, 33-40, 2015)。炎症をクマザサ葉アルカリ抽出液で抑制すると、PGE₂ の産生、COX-2 タンパク質の発現が抑制され、上記アミノ酸の変動も元のレベルに回復する傾向を示した。以上の結果は、線維芽細胞から産生された Gln と Pro が、高齢者における唾液中の Gly・Pro 量の増大の直接の原因である可能性は低いと思われる。終末期の線維芽細胞の培養液中に排出・蓄積した Gly・Pro 量の定量、口腔内を殺菌した時の唾液中の Gln・Pro 濃度、唾液によるヒドロキシプロリンの分解の可能性について検討中である。

現在、唾液中の Gly、Pro が高齢者で増加す

る原因として、唾液中の細菌由来のコラーゲン文化酵素によるコラーゲンの可能性を調べるため、洗口液による殺菌消毒の効果を検討中である。また、コラーゲンの HyPro が Pro に分解しなければならないので、唾液がヒドロキシプロリンを Pro に分解する可能性について検討中である。

(c) 細胞死の過程における変動

フッ化ナトリウムをヒト口腔扁平上皮癌細胞に添加したところ、予想通り、解糖系のエノラーゼ反応の低下(3-phosphoglycerate, dihydroxyacetone phosphate, 2-phosphoglycerate は上昇するが、phosphoenolpyruvate は殆ど変動しないことから判断)が観察された。また、新たに、TCA サイクルの中間体が低下し、ATP の利用(AMP/ATP 比)が高まった。しかし、Gly Pro の変動は顕著ではなかった(Metabolomics 10, 270-279, 2014)。

ユージノール(2 mM)は歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯髓細胞に、非可逆的に日アポトーシス(カスパーゼの活性化、ヌクレオソーム単位の DNA の断片化を伴わない細胞死)を誘導した。その初期過程において、TCA サイクルの低下が著しく低下したが、解糖系代謝物、アミノ酸、ATP の利用の変動は軽微であった(投稿準備中)。

Gly と Pro は、他のアミノ酸は、独自の変動パターンを示すことを見い出しているが、その生物学的意義については、今後の検討課題である。

また、コラーゲンを切断する酵素が象牙質から報告されており、これらが唾液中の Gly、Pro の変動に影響を与えている可能性も検討すべきである。

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 7 件)

Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Kanda Y, Nakajima H and Sakagami H. Induction of prostaglandin E₂ production by TiO₂ nanoparticles in human gingival fibroblast. In Vivo 28: 217-222, 2014

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

坂上 宏、新井友理、久野貴史、久保英範、染川正多、高野頌子、津島浩憲、三次義人、秋田紗世子、健石雄、大越絵実加、田中庄二、松本勝、安井利一、伊藤一芳、牧純、渡邊康一、北嶋まどか、堀

内美咲、賈俊業、大泉浩史、大泉高明：
ササヘルズ配合歯磨剤の口腔環境改善効果：
口臭と舌細菌数の相関、New Food Industry 56(6): 27-35, 2014

Horie N, Hashimoto K, Hino S, Kato T, Shimoyama T, Kaneko T, Kusama K and Sakagami H: Anti-inflammatory Potential of Rikkosan based on IL-1 β network through macrophage to oral tissue cells. In Vivo 28: 563-570, 2014

Sakagami H: Biological activities and possible dental application of three major groups of polyphenols. J Pharmacol Sci 126: 92-106, 2014

坂上 宏、杉本昌弘：網羅的メタボローム解析を用いた口腔扁平上皮癌細胞死誘導における代謝動態の解析(Metabolomic Analysis of Changes in Metabolic Profiles during Cell Death Induction of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line)、口腔組織培養学会誌 23(2):9-17, 2014.

Garcia-Contreras R, Sugimoto M, Umemura N, Kaneko M, Hatakeyama Y, Soga T, Tomita M, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Nakajima H and Sakagami H: Alteration of metabolomic profiles by titanium dioxide nanoparticles in human gingivitis model. Biomaterials 57: 33-40, 2015.

〔学会発表〕(計7件)

坂上宏、田中庄二、片山直、杉本昌弘：フッ化ナトリウム暴露後の口腔内細胞における代謝変動、2013年9月、第55回歯科基礎医学会学術大会、岡山

齊藤嘉大、高 泰浩、村上幸生、田中庄二、片山直、坂上 宏、杉本昌弘：ユージノール暴露後の口腔内細胞における代謝変動、2013年9月、第55回歯科基礎医学会学術大会、岡山

坂上 宏、杉本昌弘：口腔扁平上皮癌細胞死誘導における代謝物変動の網羅的メタボローム解析、2013年11月、日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会、浦安、

坂上 宏、大越絵実加、加藤崇雄、下山哲夫、北嶋まどか、大泉浩史、大泉高明：クマザサ葉アルカリ抽出液による IL-1 β 刺激ヒト歯肉および歯根膜線維芽細胞の PGE₂ 産生の抑制、2014年3月、第87回日本薬理学会年会、仙台

坂上 宏、大越絵実加、加藤崇雄、下山哲夫、北嶋まどか、賈 俊業、大泉高明、杉本昌弘：クマ笹アルカリ抽出液のヒト歯肉線維芽細胞に対する抗炎症効果の解析、2014年10月、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡

坂上 宏、クマザサ葉アルカリ抽出液「ササヘルズ」：3つの特徴的な生物作用、口腔疾患への応用 配合歯磨剤の開発、

2014年10月、緑健会九州合同支部交流会 TKP博多駅前シティセンター
坂上 宏、梅村直己、中嶋 裕、杉本昌弘、Rene Garcia-Contreras、Rogelio J. Scougall-Vilchis、Rosalia Contreras-Bulnes 酸化チタンナノ粒子によるヒト歯肉線維芽細胞炎症への影響、2015年7月、第132回日本薬理学会関東部会、浦安

〔図書〕(計4件)

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 pp696-699, 2013, 南江堂 ISBN:978-4-524-26643-2

坂上 宏：リグニン配糖体の卓越した抗ウイルス活性と臨床への応用、バイオテクノロジーシリーズ 機能性配糖体の合成と応用—糖転移酵素を中心に—シーエムシー出版、159-169, 2013 ISBN:978-4-7813-0802-9

坂上 宏、第1編第1章、口腔ケアとアンチエイジング、pp1-10、第5章、抗ウイルス素材、1.クマザサ葉抽出液「ササヘルズ」配合歯磨剤 pp217-243 (オーラルヘルスケア機能性食品の開発と応用 - アンチエイジングを目指した口腔ケアを中心に - 監修：坂上 宏) シーエムシー出版、2013年12月3日 ISBN:978-4-7813-0926-2

Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Sugimoto M, Nakajima H and Sakagami H. Effect of titanium dioxide nanoparticle on proliferation, drug-sensitivity, inflammation and metabolomic profiling of human oral cells. Volume XI: NanoBioMaterials in Dentistry, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂上 宏 (HIROSHI SAKAGAMI)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50138484

(2) 研究分担者

杉本昌弘 (MASAHIRO SUGIMOTO)

慶應義塾大学・先端研・准教授

研究者番号：30458963

田中庄二 (SHOJI TANAKA)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：60105616