

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463125

研究課題名(和文) 唾液中の活性酸素とプロテオーム解析による歯周病バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Research on biomarkers for periodontitis by measuring reactive oxygen species and proteomics of saliva

研究代表者

小松 知子 (Komatsu, Tomoko)

神奈川県立歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：20234875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：若年、成人健常者およびダウン症候群者、要介護高齢者の歯周病について唾液成分の活性酸素消去能とプロテオームの解析により各々検討した。すなわち、歯周治療および口腔の清拭による口腔状態の変化と唾液中の活性酸素消去能との関連性について検討した。さらに、唾液中の抗酸化タンパク質であるヒスタチン5濃度の変化、唾液プロテオーム解析を行い、口腔および全身に関する臨床データを統括することで、歯周病ひいては生体制御における唾液タンパク質成分の酸化ストレス機構の関与が研究成果として確認された。

研究成果の概要(英文)： We investigated periodontitis among young, normal healthy individual, young and adult individuals with Down syndorm, and elderly with long-time care were analyzed by scavenging activity of reactive oxygen species (ROS) and proteome on saliva, respectively. Thus, we examined the relationship between alteration of oral status and ROS scavenging activity by supportive periodontal therapy and oral cleansing. Combined with oral and general clinical data measured by proteome and change of histatin concentration, which was antioxidant protein, on saliva, we concluded that oxidative stress would contribute to periodontitis and defensive salivary protein individuals with Down syndorm, and elderly with long-time care.

研究分野：障害者歯科

キーワード：活性酸素 唾液プロテオーム ヒスタチン Down 症候群 要介護高齢者 歯周病

1. 研究開始当初の背景

平均寿命の延伸に伴い、健康寿命との差が拡大すれば、医療費や介護給付費の多くを消費することになる。そのような状況のなか健康寿命の延長、生活の質(QOL)の維持、向上を目的とした予防医学、アンチエイジング医学の確立は急務である。生活習慣病の1つである歯周病は単に口腔内の病気ではなく、全身に様々な悪影響を及ぼす重大な原因疾患であると認識されている。また歯周病の原因として唾液分泌の低下があげられる。唾液は様々な生理活性物質を含んでおり、歯周病のみならず糖尿病、脳卒中などの生活習慣病の発症・進行との関連性も指摘されている。これら生活習慣病の主たる原因の1つに活性酸素(ROS)があげられることは周知されている。近年、プロテオミクス、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクスにより、タンパク質や遺伝子を総体として捉えて、新たな視点から健全な生理的状态と病的状態を比較することが可能となってきた。これは、疾病の早期診断、予防につながるバイオマーカーの追求にも有用であると考えられる。一方で、唾液のプロテオームの変化と抗酸化作用が歯周病に及ぼす影響や相互関係については断片的な研究が中心で、十分なエビデンスが得られていない。

2. 研究の目的

若年、高齢の健常者およびダウン症候群患者における唾液成分のROS産生とプロテオームの変化という視点から歯周病を捉えることで、唾液におけるROS産生に携わっているタンパク質の正体を網羅的に捉えることができる。さらに、口腔および全身に関する臨床データを統括することで、歯周病ひいては生体制御における唾液タンパク質成分の酸化ストレス機構を包括的に解明することにつながる。さらに、歯周病の早期診断、予防に役立つ新たなバイオマーカーを追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周治療による歯周病の状態変化と唾液中の活性酸素消去能との関連性について

ダウン症候群者を対象として全身状態、併存疾患を把握した後に歯周基本治療後、口腔内診査、口腔機能状態、歯周ポケットの深さ(PD)を測定した。その後の治療効果の評価として、PD、位相差顕微鏡を用いたポケット内の細菌の状態、Real time PCR法による歯周ポケット内の歯周病原菌の同定および定量を行い、それらの変化を観察し、評価した。

これらの検査と同時に飲食、歯磨きを唾液採取2時間前より禁止し、安静時唾液を5分間サリキッズ管[®]付属のコットンロールを用いて採取した。

採取した唾液は、分泌量を定量後、唾液の抗酸化能を測定した。抗酸化能の測定には、フリーラジカルを特異的に直接検出することが可能な唯一の方法である電子スピン共鳴(ESR)法により *in vitro* X-band ESR装置を用いた。唾液中のROSであるスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル(HO^{\cdot})の消去能について、ESR法を用いて測定した。 $O_2^{\cdot-}$ は二酸化チタン/UV系、 HO^{\cdot} は Fe^{2+}/H_2O_2 系および H_2O_2/UV 系により測定し、歯周治療との関連性を検討した。使用したスピントラップ剤はCYPMPO(5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide)である。

二酸化チタン/UV系における $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能は、PBS 120 μ lに TiO_2 (0.3wt%)、CYPMPO^{*}(5mM)、 H_2O_2 (3.0%)、唾液サンプルをそれぞれ20 μ lずつ添加し、フローインジェクション ESR装置(日本電子)によりCYPMPO-OOH spin adductを測定した。

Fe/ H_2O_2 系における HO^{\cdot} の消去能については、PBS 120 μ lに $FeSO_4$ (5 μ M)、 H_2O_2 (5 μ M)を20 μ lずつ添加し、 HO^{\cdot} を発生させ、その後唾液サンプル、CYPMPO(1mM)をそれぞれ20 μ lずつ添加し、セル内に挿入し、1分間放置

後、フローインジェクション ESR 装置で CYPMPO-OH spin adduct を測定した。

H₂O₂/UV 系における HO[•]に対する唾液中の消去能は、PBS 140 μl に H₂O₂、CYPMPO、唾液サンプルをそれぞれ 20 μl 添加、二酸化チタン/UV 系と同様にインジェクションバルブから注入し、UV (365nm、100mW/cm²) を 10 秒間照射し、フローインジェクション ESR 装置にて、CYPMPO-OH spin adduct を測定した。サンプルの測定は各系とも 4 回行い、その平均値を求めた。

(2) 唾液中の抗酸化タンパク質濃度

安静時の全唾液における総タンパク質量に対するヒスタチン 5 含有量の検討にターゲットを絞り行なった。唾液中の抗酸化、抗菌作用を示す生理活性物質であるヒスタチン 5 の含有量を ELISA により定量し、Down 症候群児・者と健常児・者と比較検討した。

(3) 唾液プロテオーム解析

唾液タンパク質のプロテオーム解析は Down 症候群児・者と健常児・者の唾液サンプルより各群でタンパク質を抽出し、濃縮した。その後 Bradford 法にてタンパク質濃度を定量した。各群の同濃度のタンパク質を蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベリングした。2-DIGE により、Decyder DIA ソフトを用いてスポットの検出を行った。さらに nanoLC-ESI-MS/MS によるショットガン解析により、タンパク質を同定、定量した。その後、NCBI nr、Swiss-Prot を用いてバイオインフォマテック分析を慎重に行った。

(4) 要介護高齢者の口腔清拭による口腔の状態変化と唾液中の活性酸素消去能との関連性について

洗口のできない要介護高齢者では、日常の口腔ケアが困難なことも多く、正しい口腔ケアが行われないと誤嚥性肺炎への罹患し、全身機能の低下にもつながる。そこで、歯周治療だけでなく、口腔ケアについても検討した。追加した研究として、要介護高齢者を対象と

して全身状態、併存疾患を把握した後に口腔内診査を行い、口腔内の歯周病、口腔衛生状態、義歯の使用の有無などを把握した。その後、清拭による口腔ケアの効果を評価した。PD、プラーク指数、Real time PCR 法による歯周ポケット内の歯周病原菌の同定および定量を行い、それらの経時変化を評価した。(1)における方法と同様に採取した安静時唾液は、分泌量を定量後、ESR 法により唾液の抗酸化能を測定した。

これらのデータを蓄積し、理論的背景を獲得しながら最終的に抗酸化能を有する唾液タンパク質成分の歯周病に対する活性酸素消去に関連するプロテオームを包括的、網羅的に捉えた。それら分析結果を臨床データと統括することにより、多面的に歯周病に関連する唾液抗酸化タンパク質を評価し検討を加えた。本研究は、神奈川歯科大学倫理委員会(257, 272, 399)の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 歯周治療による歯周病の状態変化と唾液中の活性酸素消去能との関連性について

歯周初期治療が終了し、本研究内容を説明した上で十分な同意が得られたダウン症候群患者 4 名 (平均年齢は 40.5 ± 3.3 歳) を対象に初回およびその約 1 ヶ月半後、さらにその約 3 ヶ月、6 ヶ月後に全顎スケーリング、専門的口腔ケアを行った。歯周病検査においては、PD、GI、動揺度に関して有意な改善がみられなかった。一方で、Real time PCR 法によって歯周ポケット内の *P. gingivalis*、*T. denticola*、*T. Forsythia* および *P. intermedia* の総菌数に対する割合は、いずれの症例においても、初回治療前と比較して 4 回目治療前の方が、すべての菌で減少した。唾液中の活性酸素消去能は、Fe²⁺/H₂O₂ 系および H₂O₂/UV 系による HO[•] 産生に対する消去能、二酸化チタン/UV 系による O₂^{•-} 産生に対する消去能のすべての系において、初回に比較して、4 回目で有意に低下した。

本療法を行うことで、歯周病原菌数の有意な減少がみられ、それに伴い唾液中の活性酸素消去能の低下したことから、生体の適応反応がみられたと考えられた。

(2) 唾液中の抗酸化タンパク質濃度

唾液中の総タンパク質濃度はダウン症候群、健常者ともに若年者に比較して中年者で高値を示した。また若年者ではダウン症候群児、健常児ともに濃度に有意差はなかったが、中年ではダウン症候群の方が、健常者に比較して濃度が高くなっていた。これらは、歯周病の進行に伴う歯周病原菌の増加により生じたタンパク分解酵素によってアミノ酸に分解された結果とも考えられる。ダウン症候群では歯周病が健常者より進行していることから、唾液分泌量が少ないにも関わらず、同年齢の健常者より有意に増加した。

唾液中の総タンパク質濃度に対する抗酸化、抗真菌作用を有するヒスタチン5の濃度比率は若年群ではダウン症候群患者群と健常者群で有意差はなかったが、成人群ではダウン症候群患者群で有意に減少した。ダウン症候群、健常者群ともに若年群に比較して成人群で有意に減少した。ダウン症候群では十分にヒスタチンが作用しない可能性が考えられた。

(3) 唾液プロテオーム解析

患者の唾液タンパク質を用いたプロテオミクスにより、歯周病の進行に関連すると考えられるタンパク質の発現の相違および機能について比較検討した。

MSによる解析結果から30のタンパク質のうち、健常者に比較してダウン症候群者で発現が有意に増加したタンパク質は23であり、タンパク分解酵素阻害物質や転移酵素、シグナル伝達、免疫応答、酸化還元酵素などに関連したタンパク質であった。一方、ダウン症候群者で発現が有意に減少したタンパク質は5であり、抗菌反応に関連したタンパク質の発現がみられた。

タンパク質は、生体における様々な反応や物質の細胞内外への出入り、情報伝達や分子認識、そして転写制御といった重要な役割を担っており、そのときどきの生体の状態変化を反映して臨機応変に変動する。健常者と比較して歯周病が進行していたダウン症候群で、細胞外マトリックスなどの歯周組織破壊の亢進に対して、タンパク分解阻害酵素の発現が増加していたと考えられた。免疫応答に関するタンパク質の発現が増加していたことから、炎症反応においても生体の適応反応がみられたと考えられた。一方で、アポトーシスを促進させるタンパク質や糖代謝を低下させるタンパク質の発現の増加や抗菌反応に関連するタンパク質の発現の減少がみられた。これらタンパク質の発現の相違がDSの歯周病の重症化に関連していると考えられた。今後は、コラーゲンのグリケーションとクロスリンクによる組織障害などについて、タンパク質の翻訳後修飾、特に糖鎖修飾の検討も行う必要があると考えられた。

この研究成果は第33回日本障害者歯科学会学術大会にて発表し、優秀発表賞を受賞した。

(4) 要介護高齢者の口腔清拭による口腔の状態変化と唾液中の活性酸素消去能との関連性について

要介護高齢者を対象に口腔清拭による口腔ケア方法の開始前後の臨床データと唾液中の抗酸化能のデータを蓄積した。口腔の清拭を行うことで、臨床所見として、全身的には37.5以上の発熱回数の減少がみられ、口腔所見としては、歯周病原菌数は減少傾向にあり、plaque indexの有意な改善がみられた。それら臨床所見の変化に伴い、唾液中の活性酸素消去能は、 $O_2^{\cdot-}$ と H_2O_2/UV 系における HO^{\cdot} 産生に対する消去能が有意に増加した。要介護高齢者では活性酸素を原因とした様々な疾患を伴っている。口腔清拭により低下していた唾液中の活性酸素消去能が高まり、全身の状態に影響を及ぼした可能性が考

えられた。この結果に関しては第 28 回日本老年歯科医学会学術大会にて報告する予定である。

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 8 件)

1. Kobayashi K, Maehata Y, Okada Y, Kusubata M, Hattori S, Tanaka K, Miyamoto C, Yoshino F, Yoshida A, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Komatsu T, Otsuka T, Takahashi SS, Lee MC, Medical-grade collagen peptide in injectables provides antioxidant protection, *Pharmaceutical Development and Technology*, 20, 219-226, 2015, 査読有
2. 小松知子, 李 昌一, 柿木保明、緒方克也、ダウン症候群の歯周病・カンジダ症の病態メカニズムの解明 唾液タンパク質の抗酸化能との関連性、*障害者歯科*, 36, 78-87, 2015, 査読有
3. 一瀬昭太, 小松知子, 岩崎克夫, 小野弓絵, 永村宗護, 吉野文彦, 吉田彩佳, 宮城 敦, 李 昌一、嚥下体操がヒト唾液抗酸化能に及ぼす影響、*障害者歯科*, 36, 616-624, 2015, 査読有
4. 植田郁子、高野知子、小松知子、熊田秀文、坂本貴史、石井裕美、岡部愛子、早野愛、森田鮎美、高瀬幸子、井田侑子、宮城敦、浜田信城、池田正一、施設入所中の40歳以上のダウン症候群の口腔内状況に関する調査、*障害者歯科*, 35, 633-639, 2014, 査読有
5. Lee MC, Velayutham M, Komatsu T, Hille R, Zweier JL: Measurement and characterization of superoxide generation from xanthine dehydrogenase: a redox-regulated pathway of radical generation in ischemic tissues,

Biochemistry, 53, 6615-6623, 2014, 査読有, doi: 10.1021/bi500582r

【総説】

1. 李 昌一、齊田牧子、小林 杏、大塚剛郎、小松知子、川又亮太、櫻井 孝、電子スピン共鳴 (ESR) 法による放射線被爆線量測定の現況、*神奈川歯科大学学会雑誌*, 50(特別号), 55-60, 2015, 査読無

【解説】

1. 小松知子、李 昌一、「災害時の歯科診療 災害時の摂食嚥下サポートと栄養管理について」新潟大学医学部災害医療教育センター、E-learning教材、2016、査読無
2. 小松知子、李 昌一、文献と臨床の橋わたし 酸化ストレスと歯周病(第3回)(完) ダウン症候群による歯周病と抗酸化能評価の可能性、*日本歯科評論*, 74, 41-143, 2014, 査読無

[学会発表](計 15 件)

[特別講演]

1. 小松知子: ストレス社会への歯科医療の取り組み 抗酸化歯科医療の現況と今後の臨床における展開ー嚥下体操は唾液中の抗酸化能を変化させるー第 19 回抗加齢歯科研究会、東京、2016.1.6.
2. 小松知子: ダウン症候群の歯周病・カンジダ症の病態メカニズムの解明 唾液タンパク質の抗酸化能との関連性 第 31 回日本障害者歯科学会、仙台、2014.11.15.
3. 小松知子: 歯周疾患への抗菌・抗酸化療法と口腔ケアの実践。第 6 回抗酸化歯科研究会学術講演会、横浜、2015.3.8.

[一般発表・国際学会]

1. Komatsu T et al, Evaluation of Antioxidant Properties of Salivary Proteins Using electron spin resonance-based techniques. SfrBM/SFRRI 2016, San Francisco, CA, USA, 2016. 11. 16-19.

[一般発表・国内学会]

1. 小松知子、他、要介護高齢者の口腔 *Candida* の保菌状態と全身状態との関

- 連性、平成 28 年度神奈川県地域歯科医療研修会、横浜、2017. 2.26.
2. 小松知子、他、要介護高齢者の全身状態と口腔 *Candida* 菌の保菌状態との関連性。第 51 回神奈川歯学歯科大学総会、横須賀、2016.12.3 .
 3. 小松知子、他、Down 症候群患者における唾液プロテオームと歯周病との関連。第 33 回日本障害者歯科学会学術大会、大宮、2016 . 9 . 30 ~ 10 . 2 .
 4. 小松知子、他、電子スピン共鳴法を用いた唾液タンパク質の抗酸化能評価 . 第 16 回 AOB 研究会、横浜、2016.6.24.
 5. 小松知子、他、要介護高齢者における口腔 *Candida* 菌の保菌状態と関連要因について。第 27 回日本老年歯科医学会学術大会、徳島、2016. 6.18 ~ 19 .
 6. 小松知子、他、活性酸素の特性を生かした歯周療法の効果-Down 症候群患者における検討-。第 16 回日本抗加齢医学会総会、横浜、2016.6.10 ~ 12.
 7. 小松知子、他、Down 症候群患者における抗菌・抗酸化作用を併用した歯周治療の効果。第 32 回日本障害者歯科学会、名古屋、2015.11.6-8.
 8. 小松知子、他、大規模災害時における口腔ケアに関わる酸化ストレス評価法の検討—電子スピン共鳴法による唾液抗酸化能の評価。第 20 回日本集団災害医学会総会・学術集会、立川、2015. 2. 26-28.
 9. 小松知子、他、Down 症候群患者の歯周病における抗菌・抗酸化併用療法の効果について。平成 26 年度神奈川県地域歯科医療研修会、横浜、2015. 2.22.
 10. 小松知子、他、Down 症候群患者の歯周病重症化と唾液中抗酸化能の関連性について。神奈川歯科大学学会総会、横須賀、2014.11.30.
 11. 李 昌一、小松知子、他、摂食・嚥下リハビリテーションにおける嚥下体操による唾液抗酸化能亢進の意義。第 31 回日本障害者歯科学会、仙台、2014.11.14-16.〔図書〕(計 3 件)
 1. 長田 豊、和泉雄一監・著、小松知子、p40-43、p91-93、p105-106、p107-110、p143-146、Periodontics for Special needs patients 障害者・有病者の歯周治療 . デンタルダイヤモンド社、2017
 2. 日本障害者歯科学会編、小松知子、p239-240、p269-270、スペシャルニーズデンティストリー障害者歯科、医歯薬出版、2017
 3. 坪田一男、斎藤一郎監修、小松知子、李 昌一、p106-112、ドライシンドロームの基礎と臨床、メディカルレビュー社、2016
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
- ホームページ等
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
- 小松 知子 (KOMATSU TOMOKO)
- 神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師
- 研究者番号 : 20234875
- (2)研究分担者
- 李 昌一 (LEE MASAICHI)
- 神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
- 研究者番号 : 60220795