

平成30年6月15日現在

機関番号：43107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11063

研究課題名(和文)唾液エクソソーム分泌に関わるタンパク質分子群の解析

研究課題名(英文)Analysis of proteins in salivary exosomes

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、新しい細胞間情報伝達システムとしてエクソソームが注目されている。唾液中にもエクソソームが存在しており、内包されているmiRNAが癌の診断に応用されようとしている。唾液は非侵襲的に得られる検体として、多方面で実用化しようとする動きがあるが、外部環境の影響を受けやすく個人差が大きいため診断材料としてほとんど使用されることがない。また、他の体液に比べ、粘性などの物理化学的特性から安定的にエクソソームを抽出することが容易ではない。本研究では、唾液エクソソームの抽出法を確立し、そこに含まれるタンパク質の基礎的データを収集して、唾液エクソソームの働きや意義を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are gaining attention as new intercellular communication systems. Exosomes are present in the saliva; miRNA in the exosomes are used in cancer diagnosis. Although saliva collection is noninvasive, its practical application as a diagnostic material is limited. Furthermore, it is more difficult to extract exosomes with stable physicochemical properties from saliva than from other body fluids. To study the salivary exosomes, we extracted and evaluated salivary exosome proteins from subjects of two age groups. The climacteric exosomes contained major salivary proteins, including immunoglobulins or amylase, whereas the adolescent exosomes contained keratins, ribosomal proteins, ATP synthase, etc. These results suggest that several proteins could be identified in the fundamental salivary exosome.

研究分野：口腔生化学

キーワード：唾液タンパク質 エクソソーム 分泌 網羅的解析 機能 青年期 中年期

## 1. 研究開始当初の背景

1980 年以降、多くの細胞からエクソソームと呼ばれる細胞小胞顆粒が分泌されていることが明らかになった。近年ではいろいろな疾患のマーカーとして注目されている microRNA(miRNA)、mRNA および熱ショックタンパク質などを含んでいるとの多くの報告がなされている。最近では血液中の miRNA を調べることで一度に複数のがん検診ができるとニュースで話題になった。もちろん、唾液中にもエクソソームが分泌されており、その中に含まれている miRNA を調べることでより病気の診断に役立てようと盛んに研究され実用化されようとしている。唾液は血液と違い患者に苦痛を与えることなく採取することが容易であり、病理検査のためには有用な検体である。また、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、それに対する影響の研究は盛んに行われている。しかしながら、これらはエクソソームが細胞外に放出された後の研究であり、それ以前の細胞内から放出されるまでの分泌機構はよくわかっていない。一般的には、エクソソームの分泌過程として、エンドサイトーシスにより形成されたエンドソームで内側に出芽するように膜小胞(ILV)が形成され、この膜小胞を多く含む後期エンドソームおよび多胞性エンドソーム(MVB)が細胞膜と融合して細胞外へ多数の膜小胞すなわちエクソソームが分泌されるといわれている。しかしながら、唾液腺からのエクソソーム放出メカニズム、エクソソーム自体のタンパク質構成、および機能に関する研究は数少なかった。

## 2. 研究の目的

当初は、ラット耳下腺を使用してエクソソームの分泌メカニズムを追求しようとしたものであったが、使用予定の動物飼育・実験施設の改装時期と重なり、ラットからの耳下腺採取が困難となった。そこでラット耳下腺を使用しないアプローチに切り替えた。まず、微量なタンパク質でもウエスタンブロット法により検出できるかを検討することにした。さらに、ヒト唾液および唾液中のエクソソームのタンパク質を明らかにすることにより基礎データを取得し、タンパク質の構成からエクソソームの分泌メカニズムを考察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液採取

日本歯科大学新潟短期大学研究倫理審査委員会の審査・承認(NDUC-55 および NDUC-70)のもとで青年期および中年期の女性の 10 分

間安静時全唾液を吐唾法により採取した。

### (2) エクソソーム抽出

唾液採取後、直ちにエクソソームの抽出を～の方法により行った。

超遠心分離法によりエクソソーム調製を行った。すなわち、全唾液採取後直ちに、室温にて 2,000×g、10 分間遠心分離を行い、上清を分取して等量のプロテアーゼインヒビターを含む PBS を加えて、さらに 4℃にて 15,000×g、20 分間遠心分離を行い上清を得た。次に、4℃、100,000×g、70 分間、超遠心分離を行い沈殿物をエクソソーム画分として、PBS に懸濁して -20℃にて使用時まで保存した。

ホスファチジルセリン(PS)に結合するタンパク質と磁気ビーズにを利用した新規アフィニティー法によるキットを用いた。全唾液採取後直ちに 30 分間の 10,000×g 遠心分離後上清を用いた。MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (和光純薬工業)を用いて、取扱説明書通りに操作を行った。

サイズ除外によるクロマトグラフィー法を用いたキットを使用した。全唾液採取後直ちに、qEV エクソソーム抽出キット(メイワフォーシス)を用いて、取扱説明書通りに操作を行った。

ポリマーを用いたエクソソーム抽出を行った。すなわち、全唾液採取後直ちに、3,000×g、15 分間、遠心分離を行った後、上清に ExoQuick-TC (SBI 社)を 2 倍量添加後、取扱説明書通りに操作を行った。

抽出試薬 Total Exosome Isolation (from other body fluids) (Invitrogen 社)を用いてエクソソームを調製した。すなわち、全唾液採取後直ちに、2,000×g、10 分間、遠心分離を行った後、上清に抽出試薬を 1/2 量添加後、取扱説明書通りに操作を行った。

### (3) ウエスタンブロットティング

微量サンプルからの微量タンパク質の検出を検討した(雑誌論文)。また、調整したエクソソーム確認のため、抗 CD63、抗 CD9、抗 CD81、抗 Alix 抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。検出には、雑誌論文の方法に従い行った。

### (4) タンパク質測定

総タンパク質量には protein assay kit (Bio-Rad 社)を用いて取扱説明書通り行った。測定値を元の唾液量に換算して比較した。また、SDS ポリアクリルアミド電気泳動後、銀染色を行い、各バンドの濃淡により量の判定を行った。

### (5) エクソソーム粒径測定

粒径の分布・撮影を Nanosight により行った。粒子の測定を 3 回行い、エクソソーム粒子の平均粒径を算出した。

### (6) LC-MS/MS によるタンパク質解析

唾液エクソソームの全タンパク質・ペプチドの MS 分析を Waters NanoAcquity HPLC system interfaced to a ThermoFisher Q Exactive を用いた SBI 社の受託サービスを利用して行った。データの解析は Scaffold Proteome Software により行った。

#### 4. 研究成果

本研究の実施期間に動物飼育・実験施設の改築時期と重なり、当初の実験計画通りの研究を進めることができなかったが、その分、動物を使わない多くの緻密な実験ができ、たくさんの成果を挙げることができた。

(1) 耳下腺からのアミラーゼ分泌に対する Rab33A の関与

ラットの耳下腺腺房細胞より刺激を受けた場合、アミラーゼが分泌されてくるが、この分泌機構に低分子量 GTPase である Rab33A が関わっていることを明らかにした(雑誌論文)。エクソソーム中にもアミラーゼが含まれており、エクソソーム分泌にも Rab33A が関与する可能性を見出した。

(2) 微量試料を用いたウエスタンブロッティングによるタンパク質検出

微量サンプルからの微量タンパク質の検出法を検討するため、魚の鱗から年輪を示すエナメルタンパク様タンパク質を抽出してウエスタンブロッティングを行った。特定タンパク質の検出に成功した(雑誌論文)。

(3) 耳下腺からの分泌における Rab27 の関与

本研究代表者および分担者は耳下腺腺房細胞からの開口分泌に Rab27 が関わっていることを明らかにしてきた。そのことを踏まえ、唾液中のエクソソーム放出にも Rab27 の関与を提唱した(雑誌論文)。

(4) アロマセラピーによるリラックス時の唾液の成分

エクソソームがどのような時に放出されてくるのかを探るため、研究対象者がアロマセラピーを施術された時の唾液を採取してクロモグラニン A の検出を行った(雑誌論文)。残念ながら、エクソソームの LC-MS/MS 解析においてクロモグラニンは検出できず、エクソソーム分泌機構に関与しない可能性が示されたが、今後の研究を進展させるための新たな切り口を見出すことができた。

(5) 唾液エクソソームに含まれる生理活性ペプチド

唾液中に創傷治癒力、抗うつおよび鎮痛作用を有する生理活性ペプチド存在していることを明らかにした。そのペプチドはプロリンリッチタンパク質群のファミリーの一員であることを明らかにした(雑誌論文)。また、そのペプチドが唾液エクソソームに内在する可能性を見出した(雑誌論文)。このことは、動物が傷をなめて早期に回復させようとする行動や個体間のグルーミングなどのコミュニケーションに唾液エクソソームが関わっていることを示唆している。

(6) 年齢差による唾液エクソソームの形状および組成の違い

唾液は他の体液に比べその物理化学的特性から安定的にエクソソームを抽出することが容易ではない。そのため抽出法の検討をした。その結果、唾液はその特性からカラムを用いた方法は適さず、超遠心分離法および抽出試薬を用いる方法が適していることが明らかとなった。また、倫理審査委員会承認を受けて、中年期(Adult)および青年期(Young)女性より唾液提供を受け、エクソソームを調製して、エクソソームに含まれるタンパク質の基礎的データを収集した。例として、2つの年齢層の女性の唾液エクソソームの粒径を比較検討すると、若い時の方が粒径が小さいことが明らかとなった(図1)。

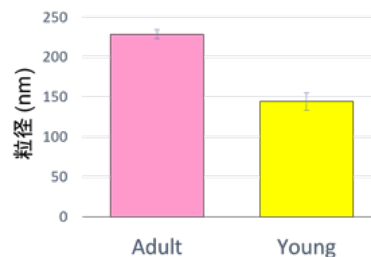


図1. 中年期(Adult)と青年期(Young)における唾液エクソソームの大きさ(粒径)の違い

(7) 唾液エクソソームに含まれる膜輸送関連タンパク質

LC-MS/MS による唾液エクソソームに含まれるタンパク質・ペプチドの網羅的解析を行った結果の一部を図2に示した。本研究の一番の目的である分泌機構に関与しているタンパク質・ペプチド群を明らかにしようとする目的において、それらが含まれている可能性を見出した。図2における生物学的調節、細胞内加工、局在性の確立を機能とするタンパク質群は中年期・青年期を問わず多く含まれおり、分泌機構に関与するものではないかと考えられた。今後のエクソソーム研究の発展が大いに期待される結果となった。

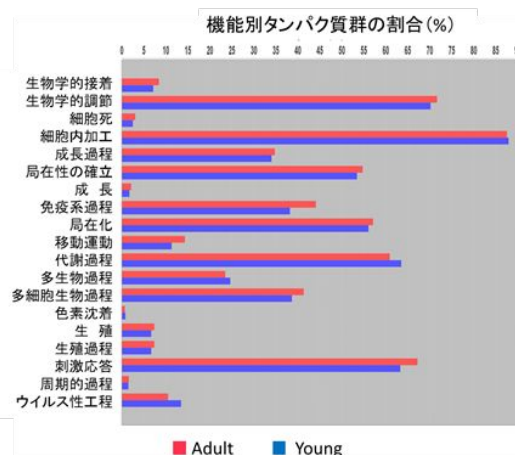


図2. 中年期(Adult)と青年期(Young)における唾液エクソソーム含有機能別タンパク質の比較

## 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)

Saitoh E, Segata T, Imai A, Isemura S, Kato T, Ochiai A, The PBII gene of the human salivary proline-rich protein P-B produces another protein, Q504X8, with an opiorphin homolog, QRGPR, *Arch Oral Biol*, 査読有、88 巻、2018、10-18

DOI:10.1016/j.archoralbio.2018.01.006.

Saitoh E, Taniguchi M, Ochiai A, Kato T, Imai A, Isemura S, Bioactive peptides hidden in human salivary proteins. *J Oral Biosci*, 査読有、59 巻、2017、71-79  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2016.11.005>

Imai A, Tsujimura M, The small GTPase, Rab27, and its effectors and regulators participate in granule exocytosis by parotid acinar cells, *J Oral Biosci*, 査読有、59 巻、2017、12-16

<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2016.10.003>

筒井紀子、五十嵐香織、福井佳代子、桑島治博、今井あかね、クロモジ精油のストレス緩和効果(第1報) 歯科診療時のストレス緩和効果にむけて、日本歯科衛生学会雑誌、査読有、11 巻、2017、73-83

Sasagawa I, Oka S, Mikami M, Yokosuka H, Ishiyama M, Imai A, Shimokawa H, Uchida T, Immunohistochemical and Western Blotting Analyses of Ganoine in the Ganoid Scales of *Lepisosteus oculatus*: an Actinopterygian Fish. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 査読有、326 巻、2016、193-209

DOI : 10.1002/jez.b.22676.

Matsuda K, Suwa N, Kikuchi H, Sekimoto T, Imai A, An Analysis of the Periodontopathic Bacteria Involved in Extrinsic Discoloration of Teeth, *J Dent Sci Ther* (ISSN 2398-6700)、査読有、1 巻 2 号、2016、1-4

<https://doi.org/10.24218/jdst.2016.06>

Imai A, Tsujimura M, Yoshie S, Fukuda M, The small GTPase Rab33A participates in regulation of amylase release from parotid acinar cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、461 巻、2015、469-474

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.022.

[学会発表](計 26 件)

今井あかね、煤賀美緒、辻村麻衣子、齋藤英一、青年期と中年期における唾液のエクソソームに含有されるタンパク質の比較、第 91 回日本生化学会大会、2018 年

今井あかね、辻村麻衣子、齋藤英一、唾液エクソソーム含有タンパク質の網羅的解析、第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018 年

Imai A, Okabe M, Oka S, Tsubura S, Effects of fucoidan on pathogens in oral cavity, IADR 2018 IADR/PER General Session & Exhibition (国際学会) ロンドン、2018 年

煤賀美緒、今井あかね、辻村麻衣子、様々な可能性を秘めたエクソソーム、第 49 回歯科衛生研究会、2018 年

岡部未来、岡 俊哉、螺良修一、今井あかね、口腔内病原菌に対するフコイダンの抗菌効果について、第 48 回歯科衛生研究会、2018 年

成田美穂、筒井紀子、今井あかね、真正ラベンダー精油とその成分によってヒトの生理的反応・気分・香りの嗜好性に違いはあるか、第 48 回歯科衛生研究会、2018 年

筒井紀子、今井あかね、アロマで心とカラダを健康に〜クロモジ精油を科学する〜、第 48 回歯科衛生研究会、2018 年  
岡部未来、岡 俊哉、今井あかね、海藻含有多糖体による口腔内環境維持への可能性、米及び加工食品の新市場創出に向けたマッキングフォーラム in にいがた、2017 年

福井佳代子、今井あかね、桑島治博、仲村健二郎、健康人における口腔内 *Candida* 属保菌と唾液抗菌成分との関連性、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年

石山巴喜夫、三上正人、今井あかね、鯨類における *amelogenin* 遺伝子の塩基配列の多様性、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年

齋藤英一、今井あかね、加藤哲男、落合秋人、谷口正之、オピオルフィン(エンケファリナーゼインヒビター)を内在する唾液高プロリンタンパク質の研究、第 22 回日本病態プロテアーゼ学会、2017 年

福井佳代子、桑島治博、仲村健二郎、煤賀美緒、佐藤治美、佐藤律子、菊地ひとみ、土田智子、今井あかね、歯学部学生における唾液分泌と口腔内 *Candida* 属保菌との関連性、第 47 回歯科衛生研究会、2017 年

齋藤英一、今井あかね、加藤哲男、落合秋人、谷口正之、ヒト唾液タンパク質に秘められている健康機能ペプチドの研究、新市場創出を目指した技術シーズブ

- レゼンテーション、2017年  
 福井佳代子、今井あかね、桑島治博、仲村健二郎、健康成人における唾液分泌と口腔内 *Candida* 属保菌状態との関連性、第 61 回日本唾液腺学会、2016 年  
 齋藤英一、瀬賀拓哉、今井あかね、加藤哲男、落合秋人、谷口正之、抗うつ・鎮痛ペプチド(オピオルフィン)を内在するヒト唾液タンパクの研究、地域連携フードサイエンスセンター (FSC) シーズプレゼン交流会、2016 年  
菊地椎捺、三上正人、元井志保、今井あかね、葛城啓彰、ホルダー付きデンタルフロスの保管状態による *Porphyromonas gingivalis* の生存状況について、第 53 回日本細菌学会中部支部総会、2016 年  
 五十嵐香織、筒井紀子、福井佳代子、桑島治博、今井あかね、歯科治療時のストレス緩和に向けたアロマ効果の検討～ラベンダーおよびクロモジ精油の効果～、第 44 回歯科衛生研究会、2016 年  
 諏方菜都希、松田貴絵、今井あかね：歯の外因性色素沈着に関わる歯周病原菌の解析、第 44 回歯科衛生研究会、2016 年  
 瀬賀拓哉、今井あかね、伊勢村知子、加藤哲男、落合秋人、谷口正之、齋藤英一、ヒト全唾液中における高プロリントタンパク質 P-B (SMR3B) バリエーション(Q504X8) の同定、第 89 回日本生化学会大会、2016 年  
 福井佳代子、今井あかね、桑島治博、仲村健二郎、若年層健常人における口腔内 *Candida* 属真菌の分離状況と薬剤感受性 第 2 報、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年  
 21 瀬賀拓哉、今井あかね、加藤哲男、齋藤英一、ヒト全唾液における Basic proline rich lacrimal protein (BPLP) の動態解析、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年  
 22 今井あかね、松田貴絵、歯の着色に影響を及ぼす歯周病原細菌について、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年  
 23 福井佳代子、今井あかね、桑島治博、佐藤律子、佐藤治美、煤賀美緒、仲村健二郎、健常人における口腔内酵母真菌の分離状況と薬剤感受性 第 2 報、平成 28 年度日本歯科大学歯学会大会、2016 年  
 24 筒井紀子、大森みさき、今井あかね、土田智子、煤賀美緒、三富純子、宮崎晶子、佐藤治美、元井志保、菊地ひとみ、両角祐子、大天繁、佐野晃、口腔乾燥に対する半球状ラバー付き歯ブラシの有用性、日本口臭学会第 7 回学術大会、2016 年  
 25 Sasagawa I, Oka S, Mikami M, Yokosuka H、Imai A、Ishiyama M、Immunohistochemical and Western blot analyses of ganoine in the ganoid scales of gars, *Lepisosteus oculatus*,

bony fish、13th International Symposium on Biomaterialization (BIOMIN XIII) (国際学会)、2015 年  
 26 今井あかね、辻村麻衣子、吉江紀夫、ラット耳下腺腺房細胞の開口分泌に対する低分子量 G タンパク質 Rab33A の関わり、第 43 回歯科衛生研究会、2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 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・教授

研究者番号：60180080

### (2) 研究分担者

辻村麻衣子 (TSUJIMURA Maiko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：60535219

横須賀宏之 (YOKOSUKA Hiroyuki)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：30267231

松田 貴絵 (MATSUDA Kie)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：10633646