

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09910

研究課題名(和文) 唾液中の可溶性分子を用いたシェーグレン症候群の病因解析と新たな診断方法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis and development of a new diagnostic method of Sjogren's syndrome using soluble molecules in saliva

研究代表者

田中 昭彦(TANAKA, AKIHIKO)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：70615799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)は腺組織の破壊により涙液や唾液の産生低下を来す自己免疫疾患である。SSの診断は血液検査のみでは診断精度が低く、複数の検査を組み合わせ確定診断としているが生検などの侵襲的な検査が含まれている。生検は診断能は高いが、繰り返し定期的に行うことが難しいため高感度のバイオマーカーを用いた非侵襲的かつ簡便な検査法の確立が課題と考えた。そこで、検体として唾液に着目して本研究を行った。結果、唾液中から新たなバイオマーカーを同定し、SS患者と健常者間での有意差を認めた。唾液の採取は非侵襲的で繰り返し簡便に可能であり、新たな検査対象として十分に有用であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群(SS)の新たな検査方法として、唾液量が減少していても簡便に繰り返し採取可能なうがい液から抽出したエクソソーム由来のmiRNAに着目。12のmiRNAを候補とし2つのmiRNAの発現率に、対照群と比べてSS群で有意な増加を認めた。その2つのmiRNAを組み合わせた回帰式で、診断のための「インデックス」を算出(ロジスティック回帰分析により)、ROC曲線にて求めたカットオフ値(0.43)を指標にしたところ、感度：91.7%、特異度：83.3%、陽性的中率：84.6%、陰性的中率：90.9%と、高い診断力を有し、抗SS-A/B抗体等と比較しても同等の診断能があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune disease that causes decreased production of tear fluid and saliva due to destruction of glandular tissue. Although biopsy is highly diagnostic, it is difficult to perform it repeatedly and regularly, so we considered the establishment of a noninvasive and simple test method using a highly sensitive biomarker. Therefore, we conducted this study focusing on saliva as a specimen. As a result, we identified a new biomarker in saliva and found significant differences between SS patients and healthy subjects. Saliva collection is noninvasive, repeatable, and easy, and we believe it is sufficiently useful as a new test target.

研究分野：口腔外科、免疫

キーワード：シェーグレン症候群 リキッドバイオプシー エクソソーム miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害を受けるドライマウスやドライアイを主症状とする臓器特異的自己免疫疾患である。導管上皮へのリンパ球浸潤を特徴とし、病態進展とともに高グロブリン血症や悪性リンパ腫などの腺外症状が出現することがあるため、リンパ増殖性病変とも称されるが、病因・病態についてはまだ不明な点が多い疾患である。

このように SS は多彩な病態を呈するため、治療方針の決定には適切な診断が必要である。SS の診断には、国内では厚生省改訂診断基準 (1999 年)と米国リウマチ学会分類基準(2012 年)が汎用されている。しかし、その検査項目の中には実施可能な施設が限られている唾液腺造影検査や侵襲性が高い口唇腺生検といった検査が含まれており、経時的かつ繰り返し実施可能な検査は、唾液分泌量測定と血液検査のみであるが、その 2 つの検査だけでは SS の病態を追跡していくのは困難とされている。かといって侵襲的な検査を繰り返し行うのは患者の負担となってしまうため、新たな検査法やバイオマーカーの同定が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、簡便かつ非侵襲的であり、繰り返し採取が行える検査として、罹患臓器が唾液腺であること、唾液腺内で産生されるサイトカインをはじめとする可溶性分子は唾液中に含まれることに着目し、唾液を検体とした SS の新たな診断方法および病態進展を検出できる経時的なモニタリングシステムを確立することである。

3. 研究の方法

先行研究では、唾液中のサイトカインの解析にはサイトメトリックビーズアレイを用いたフローサイトメトリー法を、唾液中ストレス関連物質である分泌型 IgA (SIgA) およびクロモグラニン A の解析には、酵素標識免疫吸着法 (ELISA) を用いて、唾液腺内で発現した分子を唾液中でも検出可能であった (Ohoyama K, et al. Oral Dis 2015)。

また、新たなバイオマーカーの候補として microRNA (以下 miRNA)、エクソソームに着目した。miRNA は、18~25 塩基の RNA 分子で、遺伝子の発現調節等を行い、生物の発生、細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、代謝などに関与する。多くの体液中に存在し、悪性腫瘍や自己免疫疾患など種々の疾患のバイオマーカーとして有用性が広く知られている。当研究室でも、これまでに口腔癌症例の血液から異常発現している miRNA を複数個同定し、口腔癌の新規診断法や予後予測法を開発し報告してきた。

一方、エクソソームは細胞から分泌される直径 50-150 nm の顆粒状の細胞外小胞で、microRNA は、エクソソーム中に包埋されたかたちで細胞より分泌され、体液中を循環することが明らかとなっている。SS では、唾液腺導管上皮細胞の障害やアポトーシスにて、壊れた細胞からエクソソームが唾液中・口腔内に漏出していると考えた。

また、検体としては SS 患者は唾液量が減少しており、唾液を検体としての研究では検体採取が困難な症例が多かった。そこで、今回はうがい液を検体として研究を計画した。うがい液は、一定量の液体で口腔内をすすぐことで、分泌されている少量の唾液や剥離した口腔細胞、エクソソーム等を採取することができ、診断に有用であると考えた。ドライマウス症状があり唾液が少ないシェーグレン症候群患者でも、うがい液なら専門的な技術も不要で簡便に検体の採取が可能である。

対象

(患者群)

シェーグレン症候群患者 (SS) 24 名

(コントロール群)

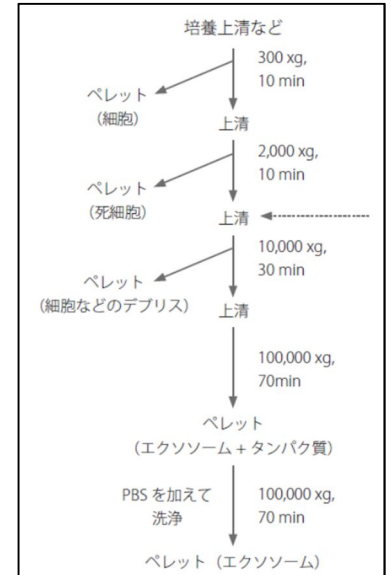
健常者ボランティア (HC) 24 名

- 2019 年から 2020 年に鹿児島大学病院口腔顎顔面センター口腔外科を受診したシェーグレン症候群患者と健常者が対象となった。
- 健常者の選択基準：口腔乾燥症状や口腔粘膜疾患がなく、全身的に悪性疾患、炎症性疾患および自己免疫疾患を有さないこと。

方法

- 1) 「うがい液採取」注射用水 10ml を使用し、1 分間の含嗽後に容器に吐出させ採取。採取後のサンプルは-80 で保管。超遠心法でエクソソームペレットを作製（右図）。
- 2) ナノトラッキング法およびウェスタンブロッティングを用いたうがい液中のエクソソームの確認
- 3) エクソソーム由来 miRNA のマイクロアレイ解析によるバイオマーカー候補の絞り込み
- 4) バイオマーカー候補 miRNA を標的としたリアルタイム PCR による発現解析(Ct 法)
- 5) 統計解析による評価および予測モデル(index)の構築

*鹿兒島大学医学総合研究科臨床研究倫理審査委員会の承認を得た(受付番号: 疫 180340)。



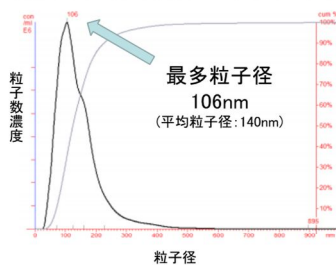
4. 研究成果

参加者はすべて女性で、年齢の中央値は SS 群が 63.8 歳（範囲 35-86 歳）、コントロール群が 63.5 歳（範囲 41-84 歳）。2 群間の年齢、喫煙の比率に統計的に有意な差はなく、SS 群の病期期間の平均は 88 カ月（範囲 13-204 カ月）、抗 SS-A/B 抗体の陽性率はそれぞれ 75%と 42%で、サクソテストによる唾液量の平均は 1.96g(範囲 0.2-6.1g)。治療介入されている患者が多く、投与薬剤は、塩酸セビメリンや塩酸ピロカルピンなどの M3R 阻害薬は 15 例(62.5%)でみられ、副腎皮質ステロイドは 3 例(12.5%)。

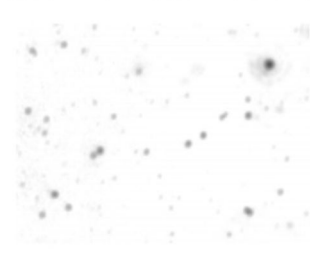
ナノトラッキング法およびウェスタンブロッティングを用いたうがい液中のエクソソームの確認

うがい液から超遠心法にて抽出したペレットは、最多粒子径 106nm、平均粒子径は 145nm。エクソソームマーカーである CD9 および CD63 をウェスタンブロッティングで検出を確認。

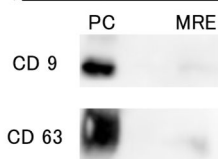
(a) 粒子径の分布図(ナノトラッキング法)



(b) 粒子のcapture図(ナノトラッキング法)



(c) マーカータンパクの確認(WB)



うがい液から作製したペレットには、**エクソソーム**と思われる微小胞が含まれていることが確認できた。

PC: Positive Control
MRE: うがい液中エクソソーム

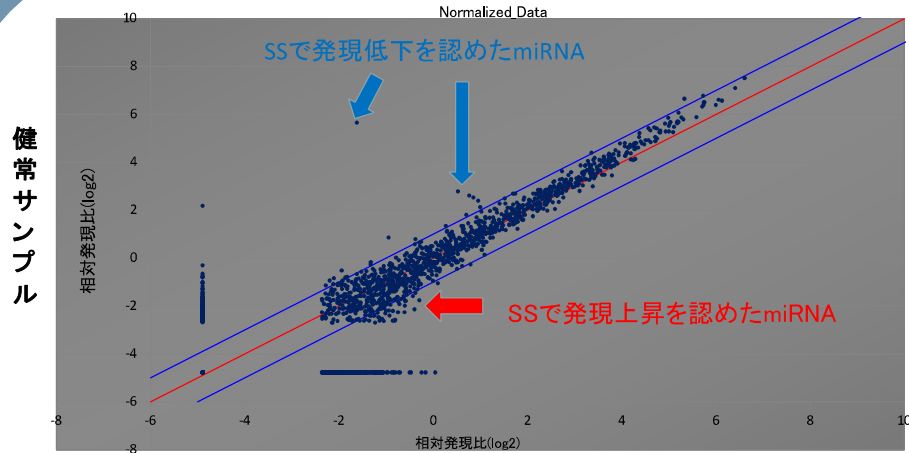
エクソソーム由来 miRNA のマイクロアレイ解析によるバイオマーカー候補の絞り込み

続いて、バイオマーカー候補を絞り込むため、マイクロアレイ解析を行った。

SS 群、HC それぞれ 10 検体のエクソソームペレット 150 μ L を混合し、プールサンプルを作製、その 2 つのプールサンプルのマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現データをこの 2 群間で直接比較し、散布図を作成。2633 種類のマイクロ RNA のうち、SS 群で 2 倍以上の発現増加もしくは 1/2 以下で発現低下している miRNA を抽出した。

2633 種類のマイクロ RNA のうち、マイクロアレイで 2 倍以上もしくは 1/2 以下の発現をしていたものは 302 種類、その中より、発現比の大きさ、既存の報告、プライマーの入手可否等を参考に、発現低下候補が 4 種類(miR640、miR3124-5p、miR3200-5p、mir5100)、発現上昇候補が 8 種類(miR34a-5p、miR1290、miR512-3p、let7b-5p、miR3648、miR371b-5p、miR29b-2-5p、miR4787-5p)と合計 12 種類の miRNA をバイオマーカー候補として抽出した。

プールサンプル SS10検体vsHC10検体 の散布図



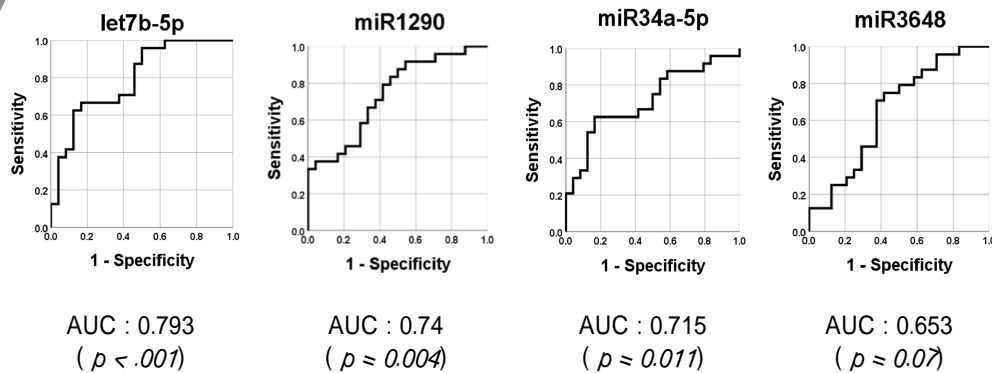
SSサンプル(シェーグレン症候群)

バイオマーカー候補 miRNA を標的としたリアルタイム PCR による発現解析(Ct 法)

上記 12miRNA を 2 群間で比較し、相対的発現量を比較したところ、発現上昇候補の 8 種類の miRNA のうち、4 つの miRNA で有意差を認めた(miR34a-5p、miR1290、let7b-5p、miR3648)。一方、発現低下候補であった miRNA は、1 つも有意差を認めなかった。(種類の miRNA(miR640、29b-2-5p および 371b-5p)は平均発現量が低く(CT 値 > 40)、安定した発現を得られなかったため、この後の解析から除外した。)

統計解析による評価および予測モデル(index)の構築

この 4 つの miRNA から ROC 曲線を作成し、AUC 値を計算して診断能を判定。let-7b-5p、miR-1290、miR-34a-5p の 3 種類の miRNA で有意差を認め、AUC も 0.7 以上の結果であった。



さらに、SS 群検出の AUC、感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、およびフィッシャーの直接確率検定の結果を下図に示す。カットオフ値を使用することにより、let-7b-5p、miR-1290、miR-34a-5p の 3 つの miRNA が SS と HC 群間の正確確率検定で統計的に有意差を認めた。これらの AUC は 0.7 以上であり、この miRNA が SS 群の検出に十分であることを示唆している。より正確に SS を検出するために、多変量解析を使用して組み合わせ分析を実行した。miR-1290

| microRNA | サンプル群 | t検定 | AUC (p値) | 感度(%) | 特異度(%) | 陽性的中率(%) | 陰性的中率(%) | 陽性例 | 陰性例 | フィッシャー検定 |
|-----------|---------|--------|----------------|-------|--------|----------|----------|-----|-----|----------|
| let7b-5p | SS | <0.001 | 0.793 (<0.001) | 62.5 | 83.3 | 78.9 | 69 | 15 | 9 | 0.003 |
| | Control | | | | | | | 4 | 20 | |
| miR1290 | SS | 0.003 | 0.74 (0.004) | 83.3 | 54.2 | 64.5 | 76.5 | 20 | 4 | 0.015 |
| | Control | | | | | | | 11 | 13 | |
| miR34a-5p | SS | 0.013 | 0.715 (0.011) | 62.5 | 83.3 | 78.9 | 69 | 15 | 9 | 0.003 |

$$\text{index} = 1 - 86.981 + (1.883 \times \text{let7b-5p}) + (0.916 \times \text{miR1290})$$

※let7b-5p, miR1290はΔΔCt法にて求めたサンプルの相対発現量を代入

と let7b-5p の 2 つの miRNA の組み合わせが特定され、ロジスティック回帰分析の回帰式より ss 診断のための miRNA インデックスを算出。インデックスは、リアルタイム PCR から求めた let7b-5p と miR1290 の相対発現量を代入し、算出をしてる。このインデックスを用いて ROC 曲線にて求めたカットオフ値 (0.43) を診断指標にしたところ、SS 群は陽性が 22 例、陰性が 2 例であった。HC 群は陽性が 4 例、陰性が 20 例となった。感度：91.7%、特異度：83.3%、陽性的中率 (PPV)：84.6%、陰性的中率 (NPV)：90.9% であり、このクロス集計も統計的有意差を認め、2 種類の miRNA を組み合わせることで、高精度な診断が可能であることが示唆できた。

以上の結果より、特定の miRNA を組み合わせてインデックスを作成し SS のバイオマーカーとして使用している報告や、うがい液からのエクソソームを使用した解析の報告はなく、さらに SS における非侵襲的な検査法は実用化されてなく、本研究で使用したうがい液は非侵襲的かつ簡便に行える新しい検査法であると考ええる。

検体にうがい液を用いることで、採取、検査が簡便になることは患者負担軽減もさることながら、容易に繰り返し検査できるという利点を有している。そのため、うがい液の経時的な採取にて、疾患の病勢や進行もモニタリングできるのではないかと考えている。

また、うがい液は、分泌されている少量の唾液や剥離した口腔細胞を採取することができると考えており、SS 以外の口腔疾患にも応用可能な検体ではないかと考える。うがい液を用いた検

| micro RNA | サンプル | Mann-Whitney U 検定 | AUC (p値) | 感度 (%) | 特異度 (%) | 陽性的中率 (%) | 陰性的中率 (%) | 陽性 | 陰性 | フィッシャー検定 |
|-----------|---------|-------------------|-------------------------|--------|---------|-----------|-----------|----|----|----------|
| index | SS | <.001 | <u>0.856</u> (<.001) | 91.7 | 83.3 | 84.6 | 90.9 | 22 | 2 | <.001 |
| | Control | | | | | | | 4 | 20 | |

査方法が汎用化されることで様々な疾患への応用が期待でき、簡便に検体の採取が可能という点から大学などの専門機関でなく町クリニックや健診機関などでも簡便に採取でき、輸送も可能な検体であると考えている。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamashiro Kouta, Hamada Tomofumi, Mori Kazuki, Nishi Keitaro, Nakamura Maya, Beppu Mahiro, Tanaka Akihiko, Hijioka Hiroshi, Kamikawa Yoshiaki, Sugiura Tsuyoshi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Exosome-Derived microRNAs from Mouthrinse Have the Potential to Be Novel Biomarkers for Sjogren Syndrome | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine | 6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1483 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm12091483 | 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0件

〔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 | 森山 雅文 (MORIYAMA MASAFUMI) (20452774) | 九州大学・歯学研究院・助教 (17102) | |
| 研究分担者 | 杉浦 剛 (SUGIURA TSUYOSHI) (40322292) | 鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701) | |

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 |
|---------|---------|