

平成 30 年 5 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：2016～2017

課題番号：16K15192

研究課題名(和文) アミラーゼに替わる唾液マイクロRNAを用いたストレスを数値化する診断法を探る

研究課題名(英文) Diagnosis of stress using the microRNA instead of amylase in saliva

研究代表者

栗原 琴二 (Kurihara, Kinji)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：10170086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：唾液アミラーゼはストレスマーカーとして用いられているが、味覚刺激でも分泌され、マーカーとして疑問が残る。これを解決するために、唾液腺や唾液のマイクロRNAをマーカーにした診断法を探った。視床下部がストレスを認識した時に増加する抗ストレスホルモンをマウスに投与し、本質的なストレス状態を再現すると、唾液腺のマイクロRNA(miR-141, 21a, 29b)が増加した。これらは交感神経の一過性の緊張では変化しなかった。よってバイオプシー等の組織採取が可能な場合、本質的なストレスのマーカーと成り得る。一方、唾液によるストレス判断はマウス、ヒトの結果において非常に分散が大きく、判断に困難を感じた。

研究成果の概要(英文)：Saliva amylase is used as a stress marker, however it is secreted by various taste stimulations without stress, therefore we have a doubt in amylase as a stress marker. I investigated a new diagnostic method using the microRNA of salivary gland and saliva as a stress marker exchange from amylase. It is known that antistress hormone increased when a hypothalamus recognized stress. When mice were administrated to make essential condition of stress, microRNA (miR-141, 21a, 29b) of the salivary gland increased. These three microRNA did not change for the transient strain of the sympathetic nerve by epinephrine administration. Thus, these microRNAs become a marker of the essential stress when the organization collection such as biopsies is possible. On the other hand, it was very difficult to make a diagnosis of stress using the microRNA of saliva of the mouse and Homo sapiens, because of big standard deviation.

研究分野：口腔生理学

キーワード：マイクロRNA ストレス 唾液腺 唾液

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究の学術的な背景

・海外では、マイクロ RNA が遺伝子産物の発現を調節することを応用<sup>1)</sup>し、前立腺癌治療等<sup>2)</sup>が進められていた。  
・日本では、2014年、国立がん研究センターがマイクロ RNA による癌や認知症の診断法を開発するために、企業と連携する機構を立ち上げた。国内外ともに癌に対する治療、診断が中心であった。  
・筆者の申請は表現化することが難しいストレス度を唾液のマイクロ RNA を用いて数値化して診断する方法を探るものであった。現在も、患者が訴えても認めてもらえないストレスに起因する自殺者が激増している。悪い社会現象を防ぐためにもストレス度を数値化する方法が必須であった。

### (2) 研究成果を踏まえ着想に至った経緯

・唾液中に含まれる アミラーゼやムチン等の蛋白質は交感神経を介して標的蛋白質がリン化され、開口分泌される。  
・また、アミラーゼは快を感じる味覚刺激や摂食刺激でも交感神経を介して分泌が促進される。  
・一方、ストレス時には交感神経を介して副腎髄質からカテコールアミンが分泌される<sup>3)</sup>。  
・さらに、ストレス時には視床下部を介して副腎皮質から抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)が分泌される<sup>3)</sup>。  
・筆者は「唾液中に存在する性ホルモン依存性のマイクロ RNA」の研究<sup>4)</sup>に取り組んでおり、マイクロ RNA のリアルタイム PCR による定量法を確立し<sup>5)</sup>、性ホルモンによるマイクロ RNA 発現の変化<sup>6)</sup>を明らかにした。  
・また、唾液腺では抗ストレスホルモンの糖質コルチコイドが EGF 等の生理活性因子の合成を促進することも報告されている<sup>7)</sup>。  
・以上から、味覚や分泌条件によって影響されるアミラーゼに替わり、本質的なストレスに依存した抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)の分泌状態を唾液マイクロ RNA の変動パターンで評価し、ストレス度を数値化できないかと考えた。

### (3) 研究期間内に何をどこまで明らかにしたかったか

[28年度]

・抗ストレスホルモンを生合成する臓器摘出および糖質コルチコイド投与によって、疑似ストレス状態のマウスを作成し、特徴的な唾液腺マイクロ RNA 発現パターン、唾液マイクロ RNA の発現パターンを分析したかった。  
・アミラーゼ分泌に関与する交感神経刺激した後のマイクロ RNA 発現パターンを見出

し、抗ストレスホルモンによるマイクロ RNA パターンとの違いを検討したかった。

[29年度]

・ヒト唾液の採取法を確立し、臨床応用するために静穏な状態、本質的なストレス状態のヒト唾液を採取し、マイクロ RNA の発現パターンを調べ、臨床的に診断が可能か検討したかった。

### (4) 学術的な特色

・簡単に採取できる唾液中のマイクロ RNA を用いてストレス度を数値化して診断できる方法を開発すると同時に、未知の唾液腺や唾液中のマイクロ RNA の機能を特定し、データベースに登録できる点にあった。  
・快な味覚刺激でも起こる交感神経興奮によるアミラーゼ分泌をストレスのマーカーとすることに不可解な点があった。また、もう一方の視床下部を介した抗ストレス作用のトリガーについては、まだ不明である。唾液のマイクロ RNA をマーカーにし、抗ストレスホルモンの分泌のトリガー機構を探れることも学術的に重要と考えた。

### (5) 予想される結果と意義、可能性

・結果と意義：快の味覚刺激、一過性の緊張による交感神経亢進と視床下部を介して抗ストレスホルモンが増加した3者では異なるマイクロ RNA パターンが得られると予想した。特に、視床下部からの抗ストレス作用を区別できること、そして、特異的に数値化できる可能性に大きな意義があると考えた。  
・可能性：簡単に採取できる唾液のマイクロ RNA によって、ストレス状態の定期的な検診が可能になり、ストレス度を数値化することで早期に疾病を発見し、早期に休養を指示することによって、深刻な社会問題でもある企業等のストレスによる自殺者の予防ができる可能性を考えた。

### (6) 本研究の斬新なアイデアやチャレンジ性

アミラーゼをストレスマーカーとする疑問点  
・アミラーゼは唾液中枢から交感神経を介して分泌される。快を感じる味覚刺激でも交感神経を介して分泌されるアミラーゼはストレスのマーカーとして疑問を感じた。  
・交感神経の亢進状態のみを物差しにしてストレス状態と考えるのは疑問であった。  
・以上を解決するために、アミラーゼに替わるストレスの指標として、抗ストレスホルモンに着眼するアイデアでチャレンジした。  
・ストレス時には、視床下部を介して副腎皮質から抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)が分泌される。また、唾液腺の生理活性因子は糖質コルチコイドによって調

節される<sup>7)</sup>。よって、アミラーゼに替わり、副腎皮質から分泌された抗ストレスホルモンによる唾液腺や唾液マイクロ RNA の変動パターンをマーカーにするアイデアで、味覚刺激の影響を受けない抗ストレスホルモン由来のストレス診断が可能かチャレンジした。

#### 唾液採取条件の問題点

- ・採取簡単な唾液が、なぜ、バイオマーカーに不向きだったかは、分泌速度によって唾液内容物の濃度が変動し、絶対量と濃度の相関を正しく反映できなかった為であった。以上を解決するために、エキソソーム内のマイクロ RNA を用いるアイデアでチャレンジした。
- ・マイクロ RNA はエキソソームという 40 ~ 100nm の膜小胞<sup>8)</sup>の内部に存在するため、RNA にもかかわらず非常に安定に保存されている。
- ・また、唾液採取条件の影響や個人差を無くすように、標的因子や物質の絶対値ではなく、内部標準マイクロ RNA に対する標的マイクロ RNA の割合で表現するアイデアでチャレンジした。

### (7) 新しい原理の発展や斬新な着想や方法論の提案を行う点

- ・ストレスのマーカーとして唾液中のクロモグラニン A やアミラーゼが測定されている。しかし、採取条件、分泌速度、排泄や再吸収の有無によって大きく変動し、バイオマーカーとして用いる事ができないのが現状である。低濃度でも唾液分泌量が多ければ目的物の絶対量は大きくなる。また、目的物の絶対量が少なくとも唾液分泌量が少なければ、唾液中濃度は高く表現されてしまう。疾病の度合いを濃度で評価するのか、絶対量で評価するのか、評価の基準を決定できない状態である。これら条件の変動による影響を解決するために、リアルタイム PCR 法を用いて「内部標準に対する標的マイクロ RNA の相対的な割合で診断する」新しい原理、方法論を提案した。
- ・マウス顎下腺のマイクロ RNA のクローニングを行うと 4 2 種発現していた<sup>5)</sup>。これらのマイクロ RNA のうちハウスキーピングに存在し、しかも変動しないものを見出し、これらの無変動の内部標準に対し、アミラーゼを分泌させる味覚刺激で変動せず、交感神経刺激でも変動せず、唯一抗ストレスホルモンにのみ顕著に変動するマイクロ RNA をストレスマーカーにする方法論を提案した。
- ・また、僅かな量で同時に複数を測定すること、内部標準マイクロ RNA に対する標的マイクロ RNA の割合で診断することはリアルタイム PCR の最も得意とするところでもあり、この方法に着想した点でもあった。

### (8) 本研究が成功した場合に卓越した成果が期待できる点

- ・エキソソームは 40 ~ 100 nm の膜小胞<sup>8)</sup>で、ここに収容された RNA は RNase による分解から免れるため、マイクロ RNA は安定に保存される。よって、一般家庭で簡単に唾液採取するだけでストレス診断をできるようになる期待がもてた。
- ・抗ストレスホルモンで変動とするマイクロ RNA を見いだせれば、専用唾液チップ、PCR システムをキット化し、アミラーゼのように味覚刺激を受けない純粋なストレス診断ができると期待した。
- ・近年、年間 3 万人弱の人が自殺している。本人はストレスで自殺寸前まで追い込まれていても、明確な判断基準がないことから、職場や社会では疾患と認められないためである。本研究が成功すれば、簡便な唾液採取によってストレス度を数値化することが可能と考えた。本研究は深刻な社会問題でもある自殺者による企業の損失防止、企業からストレスを認められない自殺者の予防を期待した。

## 2. 研究の目的

- ・唾液は採取が簡単なバイオマーカーとして期待される反面、採取条件による内容変動が激しく信頼度に欠ける。
- ・唾液アミラーゼはストレスのマーカーとして用いられている。これはストレス時に交感神経が促進すること、唾液への蛋白質（含アミラーゼ）分泌は交感神経によって促進されることに基づく。しかし、アミラーゼは快を感じる味覚や摂食によっても分泌され、ストレスマーカーとして不可解であった。
- ・また、交感神経は一過性の緊張によっても亢進する。しかし、自殺に人を向かわせるような本質的なストレス状態とは長期に悩みに耐え、抗ストレスホルモン（糖質コルチコイド）の作用によって身体的な部分を削ってまでも血糖値を上げ、究極の状態でも闘争しようと生理的に身体が応答した状態であり、一過性の緊張とは全く異なると考えた。
- ・視床下部が本質的なストレスを認識し、増加する抗ストレスホルモンの分泌が増加した状態を知ること、これを数値化する確実な手段を見出すことを目的とした。
- ・この申請目的の手段として選択したのがマイクロ RNA である。マイクロ RNA は遺伝子産物の発現を調節する 22 塩基程度の一本鎖 RNA で、唾液腺から唾液に分泌される。
- ・視床下部がストレスを認識した時に増加する抗ストレスホルモン（糖質コルチコイド）によって変動する唾液のマイクロ RNA のパターンをバイオマーカーにし、味覚刺激や唾液分泌条件の影響を受けないストレスの診断法を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### [2016年度計画]

##### (1) 副腎皮質ホルモンレベルを変動させた疑似ストレスマウスの唾液腺マイクロRNAパターンを検討

正常な動物の基本的なマイクロRNAパターンを確認すること、変動しない最適な内部標準マイクロRNAを探ること、糖質コルチコイドによって変動するマイクロRNAパターンを以下の方法で検討した。正常、副腎および睾丸摘除、副腎および睾丸摘除動物への糖質コルチコイド投与した3群のマウスを作製した。既にクローニングで唾液腺に発現を確認している42種のマイクロRNA<sup>5)6)</sup>をリアルタイムPCR法で測定し、マイクロRNA発現パターンを測定した。

アンドロゲン受容体を介した唾液腺マイクロRNA発現パターンを検討するために、雌雄差・睾丸摘除したマウスにテストステロンを投与し、マイクロRNA発現パターンをリアルタイムPCR法で測定した。

##### (2) 交感神経刺激によるマウスの唾液腺マイクロRNAパターンを検討

エピネフリンの生体での半減期は3分程度であるので、投与に工夫が必要であった。浸透圧性に収縮するカプセル(Alzet Pump 1002)内にエピネフリンを注入し、マウス背部皮下に埋め込み、2週間連続投与した。顎下腺および耳下腺のマイクロRNA発現パターンをリアルタイムPCR法で測定した。

##### (3) 一過性の交感神経刺激によるマウスの分泌唾液中のマイクロRNAパターンを検討

動物を麻酔後、交感神経を刺激するためにイソプロテレノールを腹腔投与し、2分後に水分分泌を誘導するためのピロカルピン投与を行い、5分間唾液を採取した。唾液からマイクロRNAを単離しリアルタイムPCR法で42種のマイクロRNAのパターンを測定した。

#### [2017年度計画]

##### (1) ヒト唾液によるストレス診断

・ヒト唾液の採取法を確立し、ストレスで特異的に変動するマイクロRNAと変動しない内部標準のマイクロRNA比を用いて、ヒト唾液でストレスの臨床的な診断が可能かどうかを検証した。

・被験者に唾液を容器に単純に吐き出していただき、マウスの場合と同様に唾液からマイクロRNAを単離し、リアルタイムPCR法でマイクロRNAパターンを測定した。試料は通常生活時および試験期間中の学生から提供を受けた。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗ストレスホルモンによる影響

・副腎皮質ホルモンレベルを変動させた疑似ストレスマウスの顎下腺組織のマイクロ

RNAパターンを検討した。睾丸および副腎を摘除したマウスに糖質コルチコイドのデキサメタゾン投与すると、miR-141-3p, miR-21a-5p, miR-29b-3pが増加した。前者2種マイクロRNAは雌雄差を調べた実験結果から雄に顕著に存在したことやテストステロンを投与すると増加したことから、テストステロン依存性が示唆された。よってアンドロゲンの受容体を介して糖質コルチコイドが作用している可能性が考えられた。

・一方、デキサメタゾンによってlet-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5pは顕著に減少した。これらのマイクロRNAに対する内因性の副腎皮質ホルモンの影響を調べるために副腎摘除の影響を調べたが全く有意差はなかった。よって、これら6種のマイクロRNAはストレス時のような過剰の副腎皮質ホルモンによって変動すると考えられた。

#### (2) 交感神経による影響

・申請当初の予定にはなかったが、抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)を変化させずに交感神経のみを2週間亢進させるアイデアを得、交感神経亢進によるストレスの状態を検討することができた。エピネフリンの生体での半減期は3分程度である。しかし、動物にエピネフリンを数分おきに長期間皮下注射または筋注射することは困難である。長期間交感神経を亢進させるために皮下にポンプ(アルゼットポンプ)を埋め込み、エピネフリンを2週間連続投与する実験系を急遽取り入れることにした。2週間エピネフリンを連続投与すると、耳下腺のmiR-141-3pが増加した。顎下腺ではエピネフリンの影響は認められなかった。よって、顎下腺に比べ耳下腺はストレスによる交感神経亢進の影響を受けやすいこと、(1)の結果を踏まえ、miR-21a-5pとmiR-29b-3pは交感神経の影響を受けずに抗ストレスホルモンに依存して唾液腺内に誘導されると考えられた。

#### (3) 一過性の交感神経刺激によるマウスの分泌唾液中への影響

・ピロカルピンで分泌刺激をして得た全分泌唾液中のマイクロRNAパターンを比較した結果、顎下腺組織に高い割合で含まれていたmiR-143-3pは分泌されなかった。さらに顎下腺組織内に顕著に発現していたmiR-141-3p, miR-21a-5pは唾液中に高い割合で分泌されるが、顎下腺内量との相関は認められなかった。以上のことから、分泌唾液中のマイクロRNA量は腺組織内の合成量と分泌機構に必ずしも相関しないと考えられた。

・分泌刺激をする前にイソプロテレノールによって交感神経を刺激して得た唾液ではmiR-21a-5pが減少傾向を示した。よって、一過性の緊張時の交感神経亢進による分泌

抑制が示唆された。

・しかし、分泌唾液の場合、非常に個体差が大きかった。内部標準のマイクロ RNA としてハウスキープに高濃度存在する miR-148a-3p を選択し、これに対する相対的な割合で各種マイクロ RNA の増減を比較することでデータの分散を抑制することがこの申請の目的でもあったが、顕著な改善ができなかった。唾液採取過程で大きな個体差がある可能性があり、唾液採取の時点での改善が必須と感じた。

#### (4) ヒト唾液へのストレスの影響

・最終年度、ヒト唾液を取り扱うために本学の倫理委員会から「研究課題：唾液マイクロ RNA によってストレス度合いを評価する研究 (承認番号 A1617)」の承認を得た。倫理委員会の承認にあたり、提供試料は学内の 18~65 歳の健常者に限られた。

・マウスの予備実験で得たりアルタイム PCR によるマイクロ RNA の測定方法によって、ヒトとマウスの種による塩基配列を修正するのみで、ヒト唾液中のマイクロ RNA を測定できた。

・本課題では 30 名の学生から同意を得、対照としてストレスのない通常の生活時の唾液、および、後日改めてストレスを受けている定期試験期間の唾液を採取し、マイクロ RNA の発現変動を比較した。

・最初に、通常の生活時のストレスのない状態での唾液マイクロ RNA の測定を試みた。miR-148a-3p を内部標準にしてマイクロ RNA の発現パターンを検討したが、発現量の個人差が非常に大きかった。

・通常の生活時の唾液提供を受けた際のアンケートで「現在ストレスがない」に対し「現在ストレスがある」と自己申告した被験者では miR-21-5p および miR-27b-3p の発現量に増加傾向はみられたが、非常に分散が大きく有意差は出なかった。

・定期試験期間に採取した唾液マイクロ RNA を全体的に増加傾向がみられた。特に、miR-141-3p, miR-16-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p に増加傾向がみられたが、すべての被験者に一貫性がないこと、分散が大きいためから明らかな有意差かどうか判断が難しかった。

#### (5) 研究期間全体を通じて

・マウスに糖質コルチコイドを投与し本質的なストレス状態を再現すると、顎下腺組織の miR-141-3p, miR-21a-5p, miR-29b-3p が増加した。また、皮下ポンプでエピネフリンを連続投与 (交感神経による一過性の緊張を想定) した場合、顎下腺マイクロ RNA は変化しなかった。この結果はバイオプシー等の組織採取が可能な場合、miR-141-3p, miR-21a-5p, miR-29b-3p は抗ストレスホルモンに由来する本質的なストレスマーカーとなる可能性が示唆された。

・一方、唾液中のマイクロ RNA に関して、顎下腺内のマイクロ RNA と唾液中のマイクロ RNA パターンは必ずしも相関しない。唾液によるストレス判断は前年度のマウス唾液のマイクロ RNA の結果および最終年度のヒト唾液の結果から、内部標準を用いても非常に分散が大きく、ストレスの判断に困難を感じた。

#### 引用文献

1. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, Cell, 136, 2009, 215-233
2. Liu C1, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D, Tang DG: The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44, Nat Med, 17, 2011, 211-5
3. 森本俊文, 山田好秋, ニノ宮裕三, 岩田幸一 (編): ストレスとホルモン, 基礎歯科生理学 第 6 版, 医歯薬出版, 2014, 137
4. Kinji Kurihara, Nobuo Nakanishi, Akito Tomomura: Interference of kallikrein 1b26 (klk1b26) translation by microRNA specifically expressed in female mouse submandibular glands: an additional mechanism for sexual dimorphism of klk1b26 protein in the glands, Biol Sex Differ, 13, 2011, 2
5. 栗原琴二, 村本和世: 唾液マイクロ RNA のバイオマーカーとしての可能性, 第 59 回日本唾液腺学会, 東京, 2014 年 12 月
6. 栗原琴二, 村本和世: 唾液腺の分泌機構に依存したマイクロ RNA パターンによるバイオマーカーとしての唾液の可能性 第 92 回日本生理学大会 神戸 2015 年 3 月
7. Maruyama S, Sato S: Binding of glucocorticoid to the androgen receptor of mouse submandibular glands, J Endocrinol, 106, 329-35, 1985
8. Yuko Ogawa, Yoshitaka Taketomi, Makoto Murakami, Masafumi Tsujimoto, Ryohei Yanoshita: Small RNA Transcriptomes of Two Types of

Exosomes in Human Whole Saliva  
Determined by Next Generation  
Sequencing, Biol Pharm Bull 36, 2013,  
66-75

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

栗原琴二, 村本和世, 唾液腺マイクロRNAの発現調節: 更年期後のストレスのバイオマーカーとしての可能性, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月26日「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)」

〔図書〕(計1件)

(監修)吉原俊雄,(編集協力)芝紀代子/長尾俊孝/村上政隆/横山繁生(執筆協力)栗原琴二 他9名, 金原出版, 徹底レクチャー唾液・唾液腺, 2016, 208(執筆協力73-113)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 琴二 (Kurihara, Kinji)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10170086