

令和 2 年 4 月 11 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19757

研究課題名(和文) アミラーゼに替わるマイクロRNAによる本質的な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 substantial stress using microRNA instead of amylase

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) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAを指標にしたストレスの診断法を探った。交感神経を促進したマウス唾液腺のマイクロRNAは変化しなかった。デキサメタゾン投与によるストレス疲弊期状態マウスの唾液腺ではmiR-29bが増加し、let-7cが減少した。マウス及びヒト分泌唾液のマイクロRNAを分析したが、個体差が大きく傾向を掴めなかった。代替実験としてデキサメタゾン投与マウスの血清中のマイクロRNAを分析すると、miR-16及びmiR-451aが増加したが唾液腺組織との相関は認められなかった。以上より、let-7cに対するmiR-29bの比率はストレス疲弊期の指標となる。さらにアミラーゼと異なり交感神経の促進と区別できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスに起因する自殺者が激増している。この社会現象を防ぐためには本質的なストレス度を診断する方法が必須である。現在、唾液アミラーゼがストレスマーカーとして用いられている。これは交感神経が亢進することに基づく。自殺を導く危険なストレス状態とは「緊張で一過性に交感神経が促進した状態」ではなく「長期の苦悩に耐えた結果、視床下部を介した抗ストレスホルモンが分泌された生理的に窮極状態」と考える。本研究ではアミラーゼに替わるマイクロRNAを用いることで「窮極的なストレス状態」を判断し、早期に休養を指示することで、企業の損失、企業からストレスを認められないことで発生する自殺者の予防に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：A diagnostic method for stress using microRNA as a biomarker was investigated. The microRNAs in mouse salivary glands stimulated sympathetic nerve were not altered. MiR-29b increased and let-7c decreased in salivary glands of mice under the stress exhaustion phase state made by dexamethasone administration. MicroRNAs in saliva from mouse and human were analyzed, but we could not detect findings due to the large individual differences. Analysis of microRNAs in the serum of mice treated with dexamethasone as an alternative experiment showed an increase in miR-16 and miR-451a, but no correlation with results of salivary glands. In conclusion, the ratio of miR-29b to let-7c is an indicator of the stress exhaustion phase state. Furthermore, unlike amylase, it can be distinguished from sympathetic promotion.

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 糖質コルチコイド 交感神経

1. 研究開始当初の背景

1) マイクロ RNA とは

・マイクロ RNA は蛋白質をコードしていない 22 塩基程度のノンコーディング RNA の一種である。口腔領域では 2014 年に国立がん研究センターが中心となり、マイクロ RNA による口腔癌や舌癌の診断法 (Kosaka N et al., Cancer Sci., 101, 2087-2092, 2010) を企業と連携して開発推進するプロジェクトが立ち上げられた。当時、マイクロ RNA を用いた診断の応用は癌の早期診断が中心であった。

2) 唾液アミラーゼによるストレス診断

・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た。これはストレス時に交感神経が亢進すること、および唾液への蛋白質 (含むアミラーゼ) 分泌は交感神経によって促進されることに基づく考えだった。

3) 常識とされてきたアミラーゼをストレスマーカーとする疑問点

・快を感じる好みの味覚刺激でもアミラーゼは唾液中枢によって促進された交感神経を介して分泌促進される。「交感神経の亢進がストレス状態」という現況の考え方は定義し直す必要があると考えた。
・味覚刺激や一過性の緊張によって「交感神経が亢進」した場合と、長期間の精神的苦痛が続く視床下部の応答から誘導された抗ストレスホルモンによって身体がストレスに抵抗するために糖を補い始めた窮極の状態」を区別しなければならないと考えた。これら 2 者を区別するためにそれぞれに特徴的なマイクロ RNA パターンを見出し、「一過性の交感神経亢進」か「本質的なストレスの窮極状態」かを診断することが (特に、アミラーゼではできなかった) これまでとは異なる新しい発想で、重要な意義があると考えた。

4) 唾液採取条件による信頼性の問題点を解決する新しい原理や斬新な方法論の提案

・これまで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きた。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状況であった。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て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。疾病の度合いを評価できない状態であった。

5) 申請者の課題開始当時の状況、背景

・前にも記したように、マイクロ RNA は遺伝子産物の発現を調節する 22 塩基程度の一本鎖のノンコーディング RNA である。申請者はマイクロ RNA が唾液腺の機能調節に関与していること (Kinji Kurihara, et al: 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), 唾液腺に 39 種類のマイクロ RNA が存在すること (栗原: 日本唾液腺学会 2014 年), リアルタイム PCR によってマイクロ RNA を定量的に測定する方法を確立し、マウス唾液腺のマイクロ RNA パターンには性差があることや性ホルモンで変動すること (栗原: 歯科基礎医学会 2016 年) を報告してきた。

6) 課題開始当時、研究の着想に至った経緯と意義

・3) で記したアミラーゼをストレスマーカーとして用いる疑問点や 4) で記した唾液採取条件による信頼性の問題を解決するために、マイクロ RNA をストレスマーカーにする新しい方法論を提案しようとした。「内部標準」に対する「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新しい方法論であった。
・また、僅かな量で同時に複数を測定する事、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。
・マイクロ RNA はエキソソームという 40~100nm の膜小胞 (Biol Pharm Bull 36, 66-75, 2013) に収容されているため RNase による分解から免れ、安定に保存される。よって、一般家庭で採取した唾液でストレス診断が可能になり、広い社会貢献ができると考えた。

2. 研究の目的

・近年、学校や企業でストレスに起因する自殺者が激増している。この悪い社会現象を防ぐためにはストレス度を数値化する診断方法が必須と考える。現在、唾液アミラーゼがストレス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亢進すること、および唾液への蛋白質 (含むアミラーゼ) 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疑問が残る。「自殺を導く危険なストレス状態」とは「緊張で一過性に交感神経が促進した状

態」ではなく、「長期間の苦悩に耐えた結果、視床下部を介した抗ストレスホルモンによって身体がストレスに抵抗するための糖を補う生理的な応答を起こしている窮極の状態」と考える。

- ・また、唾液は採取簡便なバイオマーカーとして期待される反面、分泌状態による内容変動が激しく、唾液の分泌量、分泌物の濃度と絶対量に相関性がなく、評価に疑問が残る。
- ・本研究ではこれらの疑問を改善するためにアミラーゼに替わる唾液マイクロ RNA を用いたストレス診断法を提案し、その診断方法の確立を探ることにある。
- ・これまでの申請者の成果を応用し、唾液分泌状況や味覚刺激の影響を受けないマイクロ RNA を見出し、これを内部標準として、視床下部からの抗ストレスホルモンが増加した時にのみ変動するマイクロ RNA を見出し、「一過性の交感神経亢進」と「窮極的なストレス状態」を区別できるマイクロ RNA を用いた（アミラーゼに替わる）本質的なストレス診断法を探ることである。

3. 研究の方法

[遂行するための研究環境および技術的状況]

- ・マウス唾液腺に発現しているマイクロ RNA のクローニングを完了し、莫大な数のマイクロ RNA のうち、調べるマイクロ RNA 種は 39 種類に絞込みができていた（栗原：日本唾液腺学会 2014 年）。リアルタイム PCR によるマイクロ RNA の定量法も確立していた（栗原：日本生理学会 2015 年）（栗原：歯科基礎医学会 2016 年）。以下の研究計画を遂行するための大学内研究設備および技術的な準備も整っていた。

[30 年度の計画、マウスを用いた動物実験を計画、栗原担当]

1) 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

[目的] 唾液分泌は自律神経によって協調的な二重支配を受け、交感神経によってアミラーゼを含む蛋白質が分泌される（基礎歯科生理学, 医歯薬出版）。一過性に交感神経が亢進した時のマイクロ RNA パターンを検討した。

[方法] 交感神経を一過性に刺激し、唾液を採取し、39 種のマイクロ RNA パターンを測定した。

2) 長期間の交感神経刺激によるマウスの分泌唾液、唾液腺中のマイクロ RNA パターンを検討

[目的] 長期間のストレス時には交感神経が長期間亢進し続けることも事実である。10 日間のアドレナリンの長期投与によるマイクロ RNA のパターンの変化を検討した。

[方法] 生体でのアドレナリンの半減期は 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) 内にアドレナリンを注入し、マウス体内に埋め込み 5mg/kg/day で 10 日間連続投与し、39 種類のマイクロ RNA パターンを測定した。

3) 副腎皮質ホルモンレベルを上昇させたストレスマウスの唾液、唾液腺マイクロ RNA パターンを検討

[目的] ストレスに対する視床下部の作用で糖質コルチコイドが上昇し、身体の蛋白質分解による血糖が上昇している本質的なストレス状態のマイクロ RNA パターンを探った。

[方法] 糖質コルチコイド（デキサメタゾン, 10mg/kg）を 1 日おきに 2 週間投与 (Maruyama et al: Endocrinology, 1993, 133, 1051-1060) し、39 種のマイクロ RNA を測定した。

4) 男性ホルモンおよび内因性ホルモンの影響を考慮した糖質コルチコイド投与による唾液、唾液腺マイクロ RNA 発現パターンの検討: 3) の研究に不具合が生じた場合の解決法としても検討

[目的] 唾液腺に対し糖質コルチコイドはアンドロゲンの受容体を介して作用 (Maruyama et al: J Endocrinol, 106, 329-35, 1985) している可能性があるため、睾丸摘除を行い、糖質コルチコイドの作用を検討した。性ホルモンおよび副腎皮質ホルモンのバックグラウンドを排除した本質的なストレスによるマイクロ RNA の促進または枯渇がより鮮明に見出せることを期待した。

[方法] 睾丸を摘除し、これらに 3) 同様デキサメタゾンを投与し、39 種のマイクロ RNA 発現パターンを測定比較した。

[31 年度の計画：臨床的なストレス診断が可能かヒト唾液で検証、栗原担当]

5) 動物実験の総括

- ・前項目 1) ~ 4) の結果を分析し、交感神経の影響を受けない内部標準マイクロ RNA および抗ストレスホルモンで特異的に変動するマイクロ RNA を分析、考察して見出した。

6) ヒト唾液での検証

[目的] 30年度の1)-4)を総括した5)で見出した内部標準および抗ストレスホルモンで特異的に変動するマイクロRNAに着目し、ストレスの臨床的な診断が可能かヒト唾液で検証した。
[方法] 以下の被験者 定常時および 試験期間中の学生 慢性的にストレスを訴える患者様でストレス度を評価した(一部断念)。

4. 研究成果

(1) 一過性の交感神経刺激によるマウス分泌唾液への影響

- ・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パターンを測定した。動物から唾液を採取する際、腹腔投与による麻酔から動物愛護の観点で、麻酔のみならず苦痛を和らげる鎮痛効果を持つイソフルランによる吸入麻酔への改善が強いられた。吸入麻酔を行うマウスピースをしたまま唾液を採取できるマウスピースの工作を行い実験に取り組みることになった。
- ・ピロカルピンで分泌刺激をして唾液中のマイクロRNAを測定したが、データの分散が大きかった。同一個体マウスから複数回唾液を採取した場合、分散はなかったことから、分散の原因は測定誤差ではなく実験動物の個体差によるものと考えられた。多大な時間を費やしたが、残念ながら個体差をなくす手段を見いだせなかった。
- ・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。一過性の緊張時の交感神経亢進による分泌抑制傾向が示唆されたが、統計処理による有意差を持つ確証となる結論は得られなかった。
- ・分泌唾液のマイクロRNAの測定結果は非常に個体差が大きかった。内部標準のマイクロRNAとしてハウスキーピングに高濃度存在する 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、改善ができなかった。
- ・当初の計画にはなかったが、唾液の代替的実験として血漿中のマイクロRNAの測定を急遽試みた。分泌唾液に比べると分散は少なかったが、次の(2)の項目で説明する唾液腺組織の測定結果と比較すると分散が大きかった。また、唾液、血漿、唾液腺組織間のマイクロRNA発現パターンに相関性は認められなかった。
- ・よって、当初計画で回避策として記していた唾液腺組織を用いた実験を中心に以後遂行することにした。

(2) 長期交感神経亢進による影響

- ・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長期亢進させ、交感神経亢進のみによるストレスの状態(=本質的なストレスではなく緊張状態)を検討した。アドレナリンの生体での半減期は3分程度である。しかし、動物にアドレナ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った。長期間交感神経を亢進させるために皮下にポンプ(マイクロ浸透圧ポンプ(Alzet、Model 1002))を埋め込み、アドレナリンを10日間連続投与し唾液腺組織のマイクロRNAパターンを測定した。
- ・アドレナリンは皮膚内臓の血管収縮作用があるので、最初にアルゼットポンプの埋め込む場所の検討を行った。腹腔または皮下に埋め込み、それぞれの場合の血中アドレナリン濃度を測定した。血漿アドレナリン濃度の測定は臨床検査機関に依頼した。その結果、皮下にアルゼットポンプを埋め込むことで効率良くアドレナリン投与できた。
- ・唾液腺組織ではアドレナリン長期投与による影響は認められなかった。よって、唾液腺組織の場合、交感神経単独の亢進、言い換えるとストレス疲弊期のような生理的苦悩を伴わないような緊張では、マイクロRNAパターンは影響されないと考えられた。

(3) 抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)レベルを上昇させたストレス疲弊期状態マウスの唾液腺マイクロRNAパターンを検討

- ・視床下部が慢性ストレスを認識すると、抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)が分泌されることはよく知られている。「自殺を導く危険なストレス状態」とは「緊張で一過性に交感神経が促進した状態」ではなく、「長期間の苦悩に耐えた結果、視床下部を介した抗ストレスホルモンの分泌によって身体を異化してまでも、ストレスに耐えるために糖を補う生理的な応答を起こしている窮極な状態」と考える。
- ・抗ストレスホルモン(糖質コルチコイド)であるデキサメタゾンを正常な雄マウスに投与すると、唾液腺組織の miR-29b-3p が顕著に増加し、let-7c-3p が顕著に減少した。
- ・当初の予定にはなかったが、デキサメタゾンを投与したマウスの血漿中のマイクロRNAを測定した。miR-16-5p および miR-451a が顕著に増加した。デキサメタゾンによる唾液腺のマイクロRNAの変化は血漿中のマイクロRNAは異なるパターン変化を示し、両者に相関性は認められなかった。
- ・これまでの結果から、視床下部が慢性ストレスの疲弊を認識すると、唾液腺組織の(miR-29b-3p)/(let-7c-3p)比が増加する。この(miR-29b-3p)/(let-7c-3p)比の増加現象をストレス診断に応用できる可能性が示唆された。

(4) 性ホルモンおよび内因性ホルモンの影響を考慮した糖質コルチコイド投与による唾液腺マイクロRNA発現パターンの検討

- ・糖質コルチコイドは唾液腺のアンドロゲンの受容体を介して作用する報告もある。男性ホルモンによって糖質コルチコイドの作用が潜在化されてしまう心配があった。このような研究の不具合が生じた場合の解決法としても検討を考えていた。
- ・健常マウスへのデキサメタゾン投与に比べ、睪丸摘除を行ったマウスへのデキサメタゾン投与は(miR-29b-3p)/(let-7c-3p)比をより顕著に増加させた。これらの結果は、男性更年期障害(PADAM)のようにアンドロゲンが枯渇した場合、糖質コルチコイドの作用が感作されることも示唆される。
- ・一方、睪丸摘除マウスへの男性ホルモンであるジヒドロテストステロンの単独投与は唾液腺のmiR-21-5pおよびmiR-141-3pを増加させたが、miR-29b-3pおよびlet-7c-3pには影響しなかった。
- ・これらの結果は(miR-29b-3p)/(let-7c-3p)比の増加がストレス診断に応用できる可能性から確証へと示唆した。

(5) 動物実験の総括

- ・交感神経のみを長期間亢進させた場合、唾液腺マイクロRNAは変化しなかった。
- ・糖質コルチコイドを投与すると、有意にmiR-29b-3pの増加、let-7c-3pの減少が認められた。睪丸摘除マウスへの糖質コルチコイド投与はさらに著しい効果を示した。
- ・睪丸摘除マウスにアンドロゲンを投与すると、唾液腺のmiR-21-5pおよびmiR-141-3pを増加させたが、miR-29b-3pおよびlet-7c-3pへの影響はなかった。
- ・以上より(miR-29b-3p)/(let-7c-3p)比の増加は視床下部を介するストレスの選択的なバイオマーカーとして応用できる可能性が示唆された。

(6) ヒト唾液での検証

- ・(5)の動物実験の総括に記した4種のマイクロRNA: miR-29b-3p, let-7c-3p, miR-21-5pおよびmiR-141-3pに着目し、ヒト唾液の変動を分析しようとした。
- ・ヒト唾液を取り扱うために本学の倫理委員会から「ヒト唾液マイクロRNAによってストレス度合いを評価する研究(承認番号A1818)」の承認を得た。定常時および試験期間中の学生 慢性的にストレスを訴える患者様でストレス度を評価する予定だったが、慢性的にストレスを訴える患者様については本学倫理委員会で精神的な侵襲性があるという理由で条件付き承認となったので実行を断念した。
- ・通常の生活時のストレスのない状態および進級にかかわる定期試験期間中の学生の唾液試料を採取しマイクロRNAの発現パターンを検討したが、分散が非常に大きかった。研究成果(1)の動物実験の場合と同様に個人差と考えられる。残念だが、傾向は掴めなかった。
- ・研究成果とは異なるが、本学倫理委員会へ申請書を2月に提出し、審査結果を知らされたのが4か月後であった。改編再提出後も回答を得るまでさらに2か月を要する状態であった。本学倫理委員会の体制の改善を求めたい。

【研究成果結論】

- ・アドレナリンを連続投与し、交感神経のみを長期間亢進させた場合、唾液腺のマイクロRNAは変化しなかった。
- ・抗ストレスホルモンの糖質コルチコイドを投与すると、miR-29b-3pが増加し、let-7c-3pが減少した。
- ・睪丸摘除マウスに男性ホルモンを投与すると、唾液腺のmiR-21-5pおよびmiR-141-3pが増加したが、miR-29b-3pおよびlet-7c-3pは変化しなかった。
- ・以上より、交感神経単独の亢進ではマイクロRNAパターンは変化しない。miR-21a-5pおよびmiR-141-3pの発現パターンの変化は男性ホルモンの影響を受けるが、let-7c-3pおよびmiR-29b-3pは影響を受けない。したがって、(miR-29b-3p)/(let-7c-3p)比の増加は自殺等を導く究極的なストレス状態を判断する選択的なバイオマーカーとなる。さらに、アミラーゼと異なり交感神経の亢進と区別できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kinji Kurihara
2. 発表標題 MicroRNAs in mouse salivary glands as a putative Bio-Marker of stress-dependent diseases
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress 2019 (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原琴二
2. 発表標題 マウス唾液腺のマイクロRNAをバイオマーカーとして用いた視床下部が慢性ストレスに対応するための抗ストレスホルモン誘導時のストレス疲弊期の診断
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----