

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08076

研究課題名（和文）唾液PRPsの加齢に伴う心腎血管病の新規バイオマーカー・治療標的としての意義

研究課題名（英文）Elucidation of significance of saliva PRPs as a potential biomarker and therapeutic target for aging-associated cardiovascular and renal diseases

研究代表者

樋口 智子（Higuchi, Satoko）

信州大学・医学部附属病院・助教（診療）

研究者番号：40795556

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）：本申請研究では、研究分担者の佐藤らが最近、FGF23依存性に唾液中に分泌されリン蓄積抑制に働くという新規機能を同定した耳下腺特異的タンパクであるproline-rich proteins (PRPs)の唾液中及び血液中濃度を信州大学医学部附属病院循環器内科に入院した1000例の心血管病患者から前向きに収集した唾液及び血液サンプルにて測定し、PRPsの心腎血管病予後予測新規バイオマーカーおよび新規心腎血管病予防・治療薬としての意義を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)超高齢社会の到来に伴い、心腎血管疾患の有病率の上昇とそれによる死亡者数は増加しており、心腎血管病発症リスクを早期に発見し、病態の顕在化、重症化を早い段階で予防することが求められている。唾液中または血中ヒトPRB1（hPRB1）が、血中FGF23濃度とは独立した、簡便かつ非侵襲的な心腎血管病の早期病態把握や予後予測に有用なバイオマーカーである可能性が示されれば、心腎血管病リスクの早期発見につながり、学術的及び社会的意義は大きい。また同時に、PRPsによる体内リン蓄積抑制機序を利用した新規の心腎血管病治療薬開発の可能性も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Sato, a co-investigator of the study, recently identified a novel function of proline-specific proteins (PRPs), which are secreted in saliva in a FGF23-dependent manner and suppress phosphorus accumulation. In this study we measured the concentrations of PRPs in the blood and the saliva prospectively collected from 1000 patients with cardiovascular diseases admitted to the Department of Cardiovascular Medicine, Shinshu University Hospital, and then analyzed the significance of PRPs as a novel biomarker for the prognosis in patients with cardiovascular renal diseases and as a possible preventive or therapeutic target for cardiovascular renal diseases.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心血管病 バイオマーカー 慢性腎臓病 心腎関連

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来に伴い、心腎血管疾患の有病率の上昇とそれによる死亡者数は増加しており、心腎血管病発症リスクを早期に発見し、病態の顕在化、重症化を早い段階で予防することが求められている。特に高齢者の心腎血管疾患リスク群では、腎障害の進行とともに動脈硬化性疾患や心不全を合併することが多く、また逆にこれら心血管病の進展に伴う腎機能障害の発症及び重症化も多くみられ、こうした「心腎連関」に対する早期発見・介入の必要性が望まれている。そのためには、心腎連関における心・腎・血管それぞれの臓器機能低下の相互依存的な悪循環の形成にかかわるメカニズムを明らかにすることによる、新規バイオマーカーの開発及び治療標的の同定が望まれる。

心腎連関における諸臓器機能低下の悪循環形成に介在する主要な要素の一つはリン過剰状態とそれに伴う FGF23 活性化である。わが国においても食習慣の欧米化や加工食品の摂取量増加に伴うリン摂取量の増加と腎障害との関連性が近年指摘されており、高リン状態では血管石灰化が誘導され、心血管系疾患リスクが上昇するなど、体内リン過剰蓄積と循環器疾患との関連が近年注目されている。また、生体のリン恒常性を主に制御する骨由来ホルモン FGF23 は、血液リン濃度が上昇する前段階から早期に血中で上昇し、Klotho-FGF 受容体を介してリンの排泄増加に働く。しかし一方で、その過剰作用は腎障害進展、血管石灰化、心左室肥大、諸臓器線維化を誘導し、心腎血管病の発症、進展に関わることが報告されており、早期腎障害で高リン血症に先行して臓器石灰化、障害が進行する原因の一つとして FGF23 の関与が指摘されている。このようなリン過剰状態によるリン-FGF23-Klotho 経路の恒常性破綻が高齢化に伴う心腎血管病の進展に関わることは、Klotho や FGF23 の遺伝子欠損マウスが老化に伴う心腎血管病に類似する表現型を呈することからも明らかである。しかしリン代謝異常とそれに伴う FGF23-Klotho 経路活性化とその心腎血管病発症・進展に関わる詳細な分子機構は明らかではなく、また治療面でも FGF23 への介入はその二面的作用から困難である。そのため本経路の詳細な解析による、体内高リン状態を早期に反映する新規バイオマーカーの同定、および心血管系疾患リスクを低下させる治療アプローチの開発が必要である。

### 2. 研究の目的

最近、本申請研究における研究分担者である佐藤らのグループは、片腎摘出/高リン食負荷により誘導される CKD マウスモデルにおいて、耳下腺特異的な分泌タンパクである Proline-rich proteins (PRPs: Prb1, Prh1, Prp2, Prpmp5) の発現上昇を見出した(図1)。

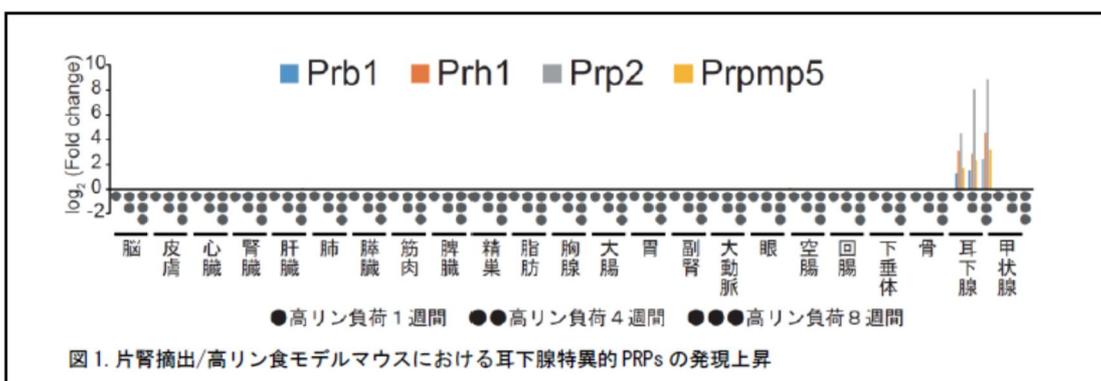
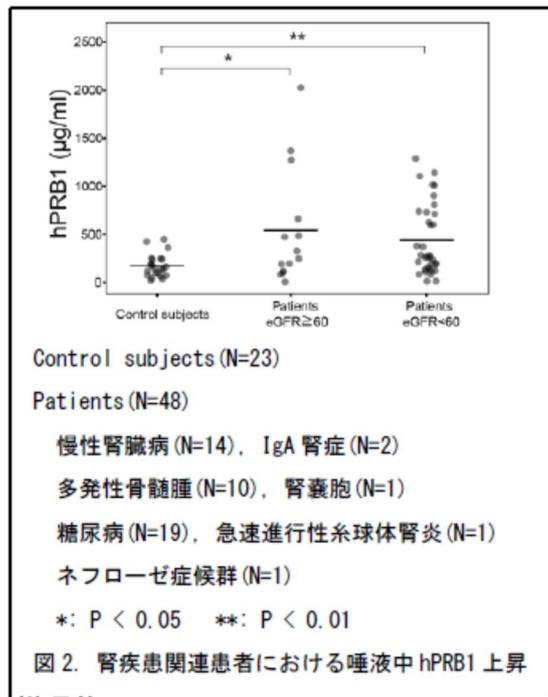


図1. 片腎摘出/高リン食モデルマウスにおける耳下腺特異的PRPsの発現上昇

PRPs 発現および分泌は FGF23 依存的であり、両者は高リン負荷早期から連動して発現していることを発見した。またヒト Prb1 (hPrb1) の測定法も開発し、比較的少数例ではあるものの、

腎疾患を有する患者群で、健常者に比較して有意に唾液中の hPRB1 の濃度が上昇している事を見出しつつある(図2)。さらに、これら PRPs 遺伝子機能を欠損したノックアウトマウスでは、



高リン負荷にてより顕著な血中リン濃度の上昇が認められ、かつ、腎臓の炎症及び線維化マーカーの発現上昇の増悪が認められた。これらの結果から、唾液 PRPs は血管石灰化・腎障害マーカーである血液中 FGF23 濃度と連動して発現・分泌が亢進し、簡便かつ非侵襲的に心腎血管病発症を早期に予期しうるバイオマーカーとして有用である可能性があると同時に、PRPs による体内リン蓄積抑制機序を利用した新規の心腎血管病治療薬開発の可能性が示唆された。しかし hPRB1 のヒトにおける心腎血管病の発症・進展における意義はまだまだ明らかとはいえない。一方でこれまでに研究分担者である栗田らは、塩尻市および安曇野市国保特定健診に歯科検診および歯科保健指導を導入し、簡易な生活習慣病リ

スクリーニング手法として、唾液を用いた臨床検査に注目し、多項目・短時間唾液検査システムの開発研究を行ってきた。そこで本申請研究では、研究代表者である樋口と研究分担者の桑原が同じく研究分担者である佐藤および栗田と連携し、塩尻市および安曇野市国保特定健診時に収集した唾液サンプル(2017、2018年度分で計約5000サンプル)及び今後5年間の特定健診において同様に収集する唾液サンプル(年間約3000名)におけるhPRB1濃度を測定し、特定健診データおよびそれに紐づけされた医科レセプトデータ、また加えて来年度以降新たに測定する血中Ca、P、FGF23、NT-proBNP濃度、尿中L-FAB濃度など心腎血管病関連およびCa-P代謝関連バイオマーカーも併せて、横断的かつ縦断的に、各種統計学的手法およびAIを用いた機械学習も駆使して解析することにより、hPRB1の心腎血管病発症・進展における意義とそのバイオマーカーとしての可能性について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究代表者である樋口と研究分担者の桑原が同じく研究分担者である佐藤および栗田と連携し、塩尻市および安曇野市国保特定健診時に収集した唾液サンプル(2017、2018年度分で計約5000サンプル)及び今後5年間の特定健診において同様に収集する唾液サンプル(年間約3000名)におけるhPRB1濃度を測定し、特定健診データおよびそれに紐づけされた医科レセプトデータ、また加えて来年度以降新たに測定する血中Ca、P、FGF23、NT-proBNP濃度、尿中L-FAB濃度など心腎血管病関連およびCa-P代謝関連バイオマーカーも併せて、横断的かつ縦断的に、各種統計学的手法およびAIを用いた機械学習も駆使して解析することにより、hPRB1の心腎血管病発症・進展における意義とそのバイオマーカーとしての可能性について明らかにすることが研究当初に計画した研究方法であった。その後、特定健診時に収集し保存された唾液サンプルの一部を用いてhPRB1の測定を予備的に行ったところ、特定健診時に収集した唾液サンプルの保存条件の問題から、hPRB1測定値が場合によっては不正確となることが判明した。また研究期間中に血液にもhPRB1が存在し、測定可能であることも明らかとなった。そのため当初の予定を変更し、信

州大学医学部附属病院循環器内科に入院する様々な循環器疾患患者の唾液と血液サンプルを網羅的に前向きに収集し、カルテデータを用いて、上記の解析方法を用いて循環器疾患と唾液中および血液中 hPRB1 の関連を解析するプロトコールに変更し、信州大学医学部倫理委員会に新たに研究計画を提出し、承認を受け、令和4年度より新たな研究計画の下で患者登録を開始した。

#### 4. 研究成果

信州大学附属病院循環器内科に入院した心血管病患者連続症例において 2022 年より 2003 年度後半にかけて唾液および血液サンプルを前向きかつ網羅的に収集し、動脈硬化性心血管病(表1では虚血と表記)、不整脈、心不全患者など循環器疾患患者約 1000 名分の唾液及び血液サンプルを得た(表1、収集検体 719 名時の中間解析時の患者背景)。これらサンプルを用いて

#### hPRB1(唾液/血液検体)中間解析 n=719

登録期間	2022/05/26 ~ 2023/03/31
年齢	73 [61, 79]
75歳以上	43%
性別 (女性)	32%
入院主目的 (虚血/弁膜症/不整脈/心不全)	36%/10%/37%/17%
心不全入院歴	16%
高血圧症	53%
糖尿病	25%
脂質異常症	51%
心房細動	37%
慢性腎臓病	29%
COPD (自己申告)	4.0%
喫煙なし/過去喫煙/現在喫煙	44%/47%/9%

表1、信州大学循環器内科hPRB1 中間解析症例の患者背景

唾液中及び血中 hPRB1 濃度を測定した。現在、唾液中及び血中 hPRB1 濃度のデータと、血中 Ca、P、FGF23、NT-proBNP 濃度、尿中 L-FAB 濃度など心腎血管病関連および Ca-P 代謝関連バイオマーカーや各心血管疾患に関連した臨床パラメーターを含めた各種臨床データと臨床転帰を、横断

的かつ縦断的に、各種統計学的手法および AI を用いた機械学習も駆使した解析を行っている。これらの解析により、hPRB1 の心腎連関がかかわる心血管病の病態・重症度把握および予後予測におけるバイオマーカーとしての意義、さらには治療標的としての可能性が明らかになることが期待される。

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 1件）

1. 著者名 Itagaki T, Motoki H, Otagiri K, Machida K, Takeuchi T, Kanai M, Kimura K, Higuchi S, Minamisawa M, Kitabayashi H, Kuwahara K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Inflammation-based assessment for the risk stratification of mortality in patients with heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 14989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94525-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tabata H, Okada A, Kobayashi H, Shoin W, Okano T, Yoshie K, Higuchi S, Yagishita D, Shoda M, Kuwahara K,
2. 発表標題 Usefulness of the Controlled-Rotation Dilator Sheath Evolution for Extraction of Old Calcified Leads .
3. 学会等名 第67回日本不整脈心電学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部循環器内科学教室 <a href="https://shinshu-junkanki.jp/">https://shinshu-junkanki.jp/</a>
--

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	栗田 浩  (Kurita Hiroshi)  (10273103)	信州大学・学術研究院医学系・教授    (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	桑原 宏一郎  (Kuwahara Koichiro)  (30402887)	信州大学・学術研究院医学系・教授    (13601)	
研究分担者	佐藤 匠徳  (Sato Narutoku)  (60548759)	株式会社国際電気通信基礎技術研究所・佐藤匠徳特別研究所・所長    (94301)	

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