

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592784

研究課題名(和文) マウス担癌モデルを用いた唾液メタボローム解析基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of saliva metabolome analysis using mice experimental cancer model

研究代表者

柴田 達也 (Shibata, Tatsuya)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90323708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液は血液に由来する成分を含んでいるが、疾病の診断には限定的にしか用いられていない。代謝産物を網羅的に測定する手法(メタボローム解析)で唾液を解析し、疾病の診断に用いるためには血液と唾液の代謝産物プロファイルにどのような相違があるのか、さらに疾病の有無により代謝産物プロファイルがどのように変化するのかを明らかにする必要がある。本研究ではマウスの血液と唾液の代謝プロファイルを比較し、血液中で検出される多くの代謝産物が唾液中にも検出されることを見いだした。この結果を基にしてマウス担癌モデルを用いて疾病の有無により唾液の代謝プロファイルに差があるかどうかの解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Saliva contains components originating from blood but it is only applied to diagnosis in specific diseases. Metabolome analysis aims to comprehensively identify and quantify metabolites in bodily fluids. To diagnose diseases with the salivary metabolome analysis, it should be clear whether or not there is the metabolome profile difference between saliva and blood, and whether or not a disease affects the metabolome profile.

In this study, we compared the metabolome profiles of saliva and blood in mice and many metabolites were consistently detected in both saliva and blood, indicating that metabolites in blood transfer to saliva. Based on this result, we are analyzing the salivary metabolome profile in experimental mice cancer model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：メタボローム 唾液 腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

唾液は侵襲を加えずに採取できる体液であり、血液に由来する成分を含んでいることから体の生理的状態を反映すると考えられている。そのため様々な疾病の診断に利用できるのではないかと期待されているが、血液中に含まれている生体分子の濃度が唾液中では低いために検出に限界があり疾病の診断への応用は限定されていた。近年、体液中に現れるタンパク質や細胞の代謝産物を、質量分析装置を使って網羅的に解析する手法(メタボローム解析)が開発され、それを全身疾患の診断に応用する試みがなされている。癌患者と対照群患者の唾液の代謝プロファイルが異なるとの報告があるが、プロファイルの差の意義については不明な点が多い。ヒトサンプルで解析を行う限り疾病の発症前と発症後で正確に比較することは、血液と唾液の成分との比較を行うことは極めて難しく、ヒトを対象にして疾病と唾液成分との関連性の有無を調べるには限界がある。

### 2. 研究の目的

疾病の診断には血液が広く用いられているが、血液中に検出される代謝産物が唾液中にどの程度検出されるのか、また検出される代謝産物プロファイルにどの程度相違があるのかがわかっていない。そこで唾液の採取条件をコントロールしたマウスを用いて唾液と血液を採取してその代謝プロファイルと比較し、血液中にみられる代謝産物が唾液中でどの程度検出されるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

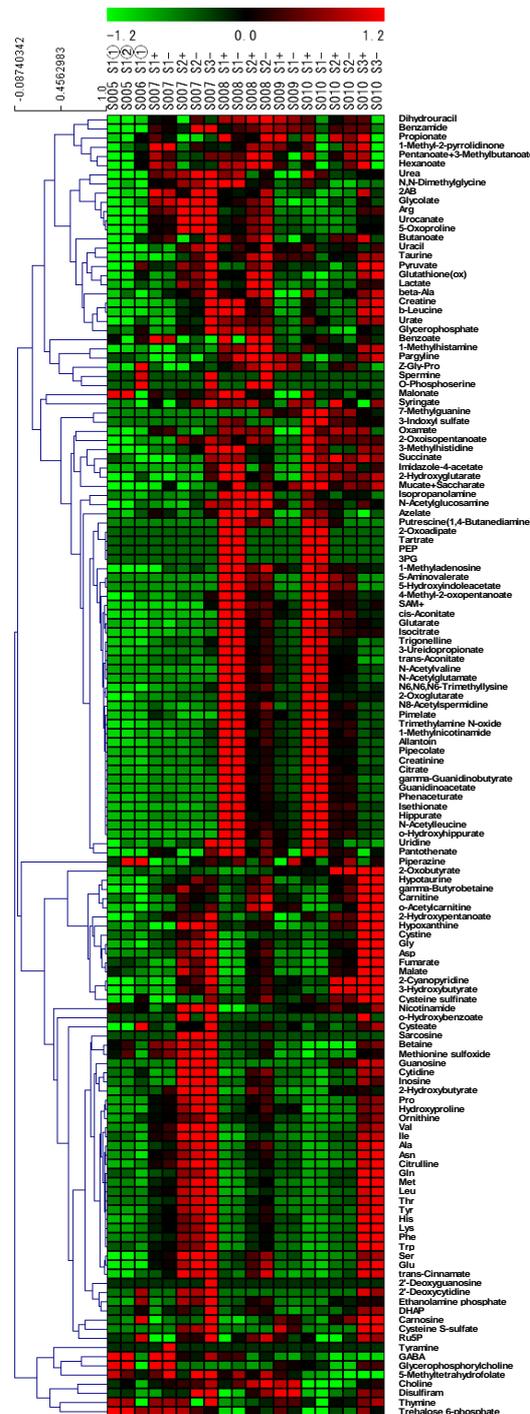
ペントバルビタール麻酔下で11週齢のメスのBALB/Cマウス4匹に唾液流出促進のためのピロカルピンを投与し、口腔内に流出してきた唾液を採取した。0.1mL - 0.15mL 採取したところで、以降の唾液も別に採取した。唾液の採取と同時に血液を採取し、屠殺後に両側の顎下腺と舌下腺を採取した。唾液は限外ろ過60分後に凍結保存した。血液は血清に分離して凍結保存し、顎下腺と舌下腺は採取後ただちに凍結保存した。これらの検体をキャピラリー電気泳動・質量分析装置(CE-MS)にかけ、イオン性物質を同定・定量した。

### 4. 研究成果

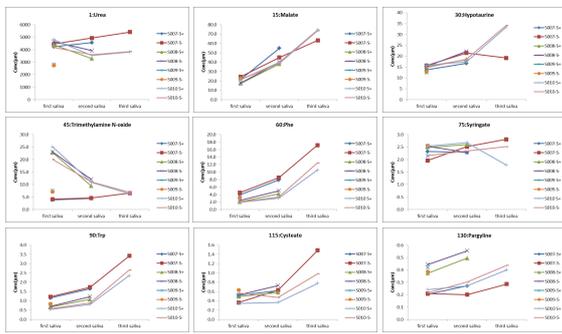
#### (1) 唾液中の代謝産物の経時的変化に関する検討

初めに安定した代謝産物プロファイルを得るための唾液の採取条件を検討した。ペントバルビタール麻酔下にピロカルピン投与した後に、唾液流出が始まったところで唾液採取を開始した。0.1mL - 0.15mL 採取したところで、チューブを交換し以降の唾液も別に採取した。質量分析を行い代謝産物の相対

濃度をZスコアに変換し、ヒートマップに表示したところ、アミノ酸は時間経過と共に濃度が上昇する傾向にあった(下図)。



代謝産物の濃度が最も高かった Urea から 15 順位ごとの代謝産物濃度の時間経過に伴う変動を下図に示す。唾液中の代謝産物はピロカルピン投与後の時間経過と共に増加するものと減少するものがあるが、変動幅はピロカルピン刺激後の後半に採取したもののほうが小さかった。これらの結果は唾液中の代謝産物の濃度は唾液流出開始後の時間経過と共に変動することを示しており、唾液を採取する時間は限定しないほうがよいと考えられる。



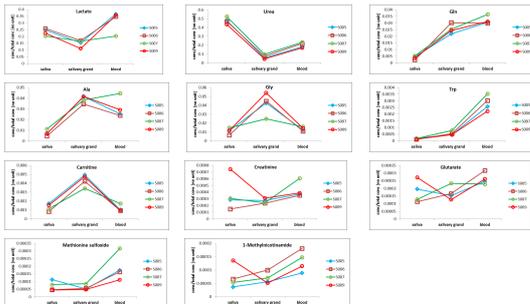
(2) 血液中および唾液腺にみられる代謝産物の経時的変化に関する検討

唾液と同時に採取した血液から得られた代謝産物の相対濃度をヒートマップに表したところ、唾液とは異なり時間経過と共に濃度が変動する代謝産物は少なかった。

唾液と血液の採取後に摘出した唾液腺から得られた代謝産物の相対濃度をヒートマップに表したところ、唾液や血液と比べて相対標準偏差は小さかったが、マウスごとに濃度の濃いクラスタが異なっていた。

(3) 唾液・唾液腺・血液における代謝産物の存在比率に関する検討

唾液・唾液腺・血液それぞれの代謝産物の総濃度に対する個々の代謝産物濃度の比を求めると個々のマウス間でほぼ一定値を示した(下図)。



これらの結果は、血液中の多くの代謝産物が唾液腺を介して唾液に移行し、唾液中でも検出できる可能性があることを示唆する。

(4) 今後の展望

BALB/c マウスに由来する乳癌細胞株 4T1.2 細胞を同系統のマウスに移植すると移植後約 1 週間で癌が形成されることを確認しており、癌を発症したマウスと健常マウスから唾液・唾液腺・血液・癌組織を採取し、そのメタボローム解析に着手している。癌細胞は正常細胞とは異なる代謝経路が亢進することが知られており、癌を発症したマウスの唾液の代謝産物プロファイルが健常マウスのものとどの程度異なるのかを解析する予定である。

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 15 件)

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada

S, Ideno H, Nakashima K, Amizuka N, Noda M, Nifuji A. Alendronate promotes bone

formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. J Endocrinol 2013; 219: 145-158. 査読有 DOI: 10.1530/JOE-13-0040.

Araki R., Uda M., Hoki Y., Sunayama M., Nakamura M., Ando S., Sugiura M., Ideno H., Shimada A, Nifuji A, Abe M., Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells, Nature, 2013;494, 100-4, 査読有 DOI: 10.1038/nature11807.

Nifuji A. Molecular mechanisms of skeletal tissue formation, The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 2013; 2, 1-8, 査読有 URL:

<http://www.jspfsm.umin.ne.jp/journal/>

Ideno H., Shimada A, Imaizumi K., Kimura H., Abe M., Nakashima K, Nifuji A, Predominant expression of H3K9

methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development, Gene Expression Patterns, 2013; Mar-Apr;13(3-4):84-90. 査読有 DOI: 10.1016/j.gep.2013.01.002.

Karasawa T., Saito T., Ueno .Y., Sugimoto M, Soga T., Metabolome analysis of erythrocytes from patients with chronic hepatitis C reveals the etiology of ribavirin-induced hemolysis, International Journal of Medical Sciences, 2013, 10, 1575-1577, 査読有 DOI: 10.7150/ijms.6436.

Saito T., Sugimoto M, Igarashi K., Saito K., Shao L., Katsumi T., Tomita K., Sato C., Aso R., Okumoto K., Nishise Y., Watanabe H., Tomita M., Ueno Y., Soga T., Dynamics of

serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: A metabolomics analysis, *Metabolism*, 2013, 10, 1577-86 査読有 DOI: 10.1016/j.metabol.2013.07.002.

Kawashima M., Iwamoto N., Kawaguchi-Sakita, N., Sugimoto M., Ueno T., Mikami Y., Terasawa K., Sato, T., Tanaka K., Shimizu K., Toi M., High-Resolution-Imaging Mass Spectrometry Reveals Detailed Spatial Distribution of Phosphatidylinositols in Human Breast Cancer, *Cancer Science*, 2013. 104, 1372-9, 査読有 DOI:

Tsuruoka M., Hara J., Hirayama A., Sugimoto M., Soga T., Shankle W.R., Tomita M., CE-MS-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients, *Electrophoresis*, 査読有 DOI: 10.1002/elps.201300019.

Koh T., Murakami Y., Machino M., Onuma H., Kaneko M., Sugimoto M., Soga T., Tomita M., Changes of Metabolic Profiles in an Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Induced by Eugenol, *In Vivo*, 2013, 27: 233-243, 査読有 URL: <http://iv.iarjournals.org/content/27/2/233.full.pdf+html>

Shimada A., Komatsu K., Nakashima K., Pöschl E., Nifuji A., Improved methods for detection of  $\beta$ -galactosidase (lacZ) activity in hard tissue, *Histochemistry and Cell Biology*, 2012; 137, 841-7, 査読有 DOI: 10.1007/s00418-012-0936-1

Tanaka S., Taga H., Maehara K., Kaneshima A., Machino M., Onuma H., Kaneko M., Sakagami H., Sugimoto M., Soga T., Tomita M., Pilot study of changes in salivary metabolic profiles induced by template therapy. *In Vivo*. 2012; 26(6): 1015-20, 査読有 URL:

<http://iv.iarjournals.org/content/26/6/1015.long>

Hirayama A., Nakashima E., Sugimoto M., Akiyama S., Sato W., Maruyama S., Matsuo S., Tomita M., Yuzawa Y., Soga T., Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012 404(10): 3101-9, 査読有 DOI: 10.1007/s00216-012-6412-x.

Kasukawa T., Sugimoto M., Hida A., Minami Y., Mori M., Honma S., Honma KI., Mishima K., Soga T., Ueda H.R. Human blood metabolite timetable indicates internal body time., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 109(37): 15036-41, 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1207768109.

Sugimoto M., Kawakami M., Robert M., Soga T., Tomita M., Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis, *Current Bioinformatics*, 2012, 7(1): 96-106, 査読有 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299976/>

Takada M., Sugimoto M., Ohno S., Kuroi K., Sato N., Bando H., Masuda N., Iwata H., Kondo M., Sasano H., Chow L.W.C., Inamoto T., Naito Y., Tomita M., and Toi M., Predictions of the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in patients with primary breast cancer using a data mining technique, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012, 134: 661-70, 査読有 DOI: 10.1007/s10549-012-2109-2.

[学会発表](計3件)

柴田達也, 杉本昌弘, 金子未来, 島田明美, 小松浩一郎, 出野尚, 中島和久, 富田勝, 二藤彰 代謝産物の血液から唾液への移行についての検討 第36回日本

分子生物学会年会、神戸、2013年12月3  
- 6日

Komatsu K, Shimada A, Ideno H,  
Shibata T, Nakashima K, Amizuka N,  
Noda M, Nifuji A. Endocytic  
incorporation of alendronate promotes  
bone formation. 2nd Joint Meeting of the  
International Bone and Mineral Society  
and the Japanese Society for Bone and  
Mineral Research, Kobe Japan,  
28May-1June 2013

小松浩一郎、島田明美、出野 尚、柴  
田達也、中島和久、二藤 彰 アレンドロ  
ネートの細胞内取込みによる骨形成の促  
進 第30回日本骨代謝学会学術集会、  
東京、2012年7月19-21日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 達也 (SHIBATA TATSUYA)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号 90323708

### (2) 研究分担者

島田 明美 (SHIMADA AKEMI)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号 00339813

中島 和久 (NAKASHIMA KAZUHISA)  
鶴見大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号 90252692

杉本 昌弘 (SUGIMOTO MASAHIRO)  
慶應義塾大学・政策メディア研究科・准教  
授  
研究者番号 30458963

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号 00240747