

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792157

研究課題名(和文)唾液を用いたメタボリックシンドローム特異的蛋白質の網羅的探索とヒトへの応用

研究課題名(英文) Human applications and the comprehensive search of the metabolic syndrome specific proteins using saliva

研究代表者

猿田 樹理 (Saruta, Juri)

神奈川県立大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30454151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、高脂血症・糖尿病・高血圧のメタボリックシンドロームのモデルラットの作成を行った。これらのモデルラットにおいて唾液の成分を計測し、マーカーとなる物質を検討した。また、高脂血症モデルラットの唾液を採取し、唾液プロテオーム解析を行った。その結果、高脂血症ラットの唾液には、コントロール群のラットと比較して、両方で2倍以上発現に差のあった蛋白質は25種類あり、また、新規の蛋白質の発現が8種類あることが明らかになった。

これら上記のラットの結果で同定された蛋白質のうちでヒトでの解析に応用可能な蛋白質を決定し、ヒトへの応用に向けた研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：We conducted the creation of rats model of metabolic syndrome of hypertension, hyperlipidemia and diabetes. We investigated the marker substances by measuring the components of the saliva in these model rats. In addition, we collected saliva of hyperlipidemia model rat, and then performed saliva proteome analysis. As a result, the saliva of hyperlipidemia rats, as compared with rats in the control group, there were 25 kinds of protein that had differences in expression 2-fold or more in both. In addition, we found that there were eight types of expression of novel proteins from these results. To determine the applicable protein analysis of human among the proteins identified in the results of these rats was promoted research for the application of human.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：唾液 メタボローム解析 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

現代社会では、不適切な食生活・運動不足・ストレス過剰などの理由により肥満や生活習慣病（糖尿病など）の増加により厚生労働省の調べでは、約 2000 万人がメタボリックシンドロームであり社会問題化している。特に近年ではその予備軍に対して効果的な予防法や簡便な診断法の開発は、これ以上メタボリックシンドロームを増やさないためにも緊急の課題となっている。

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満を共通の要因として糖尿病、高脂血症、高血圧が引き起こされる状態で、それぞれが重複した場合は心疾患・脳血管疾患を発症する危険が増大すると定義されている。

現在一般的に行われているメタボリックシンドロームの診断法としては、ヘソレベル CT 検査、一般生化学検査、ブドウ糖負荷試験、血圧測定検査などがある。しかし、メタボリックシンドロームの診断において唾液検査からのアプローチがないのが現状である。

2008 年に大唾液腺分泌唾液中の蛋白質 1116 種が同定され、唾液プロテオームのリストが報告された。世界の研究者達は、このリストにより、様々な疾患などの検査・診断をしようとする唾液検査法の開発が進展していくと期待した。しかし、近年、このリストにない物質の報告や疾患時のプロファイルでないことから、今後は疾患単位での解析が必要となっている。特に、メタボリックシンドロームに応答して唾液中に特異的発現を示す蛋白質の網羅的探索と、その応用によるメタボリックシンドローム特異的な唾液由来マーカーによる簡易検出系を検討した研究を行う。

2. 研究の目的

近年、栄養バランスの偏った食事や不規則な食生活・肥満の増加という背景から心疾患・脳血管疾患を発症する危険性が増大している。また、メタボリックシンドロームと呼ばれる多数の危険因子を有している肥満者は、約 2000 万人該当し社会全体の問題として無視することができない。そこで本研究では、メタボリックシンドロームモデルラットの唾液を採取してプロテオーム解析を行い、歯科領域で採取が容易な唾液を用いてメタボリックシンドロームと唾液との関連を明確にする。また、メタボリックシンドローム特異的な唾液由来マーカー蛋白質の簡易検出系の開発も行うことで、血液に代わる検査検体として唾液から全身の病態を把握し、歯科臨床の立場からメタボリックシンドロームの予防に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病・高脂血症・高血圧モデルラットを用いて唾液メタボリックシンドロームマーカー探索のために、唾液のプロテオーム解析によるメタボリックシンドローム特異的な唾液由来蛋白質の同定を行う。健康なラット

とメタボリックシンドローム群のラットの唾液の発現量に差がある蛋白質を同定・解析することにより、唾液の質的解析をする。また、疾患特異性を検討するために他の成人病が発現するモデルラットも検討する。

(2) 動物実験の結果で同定された蛋白質のうちヒトでの解析に応用可能な蛋白質を決定し、ヒトへの応用に向けた研究を進める。本学附属横浜クリニックにある内科外来では様々な重症度の糖尿病・高血圧・高脂血症患者が来院しており、様々な重症度の糖尿病・高血圧・高脂血症患者の唾液・血液を採取することにより、目的とする蛋白質をウエスタンブロットで検討する。

これらの患者で得られたメタボリックシンドローム特異的な唾液由来蛋白質のどれと関連があるか、あるいは無いかを検討しメタボリックシンドローム特異性をウエスタンブロットで検討する。高血圧・糖尿病・高脂血症による重症度に特異性の高い蛋白質を決定する。

(3) メタボリックシンドローム特異的なヒト唾液由来蛋白質の簡易検出系のプレート開発への着手を行う。メタボリックシンドローム特異的なヒト唾液由来蛋白質として同定した蛋白質に対する抗体を、ニトロセルロースメンブレンにスポットする系を作製するため、抗体の動物種の検討や抗体価による検出感度を検討する。市販の抗体が使用可能であればそれを応用するが、それが不可能な場合は抗体作製の準備をする。

4. 研究成果

ラットに特殊飼料を食べさせることにより、3 種類のメタボリックシンドロームのモデルラット（高脂血症・糖尿病・高血圧のそれぞれ 3 種類のラット）の作成をした。これらのモデルラットにおいて唾液の成分を計測し、マーカーとなる物質を検討した。また、高脂血症モデルラットの唾液を採取し、唾液プロテオーム解析を行った。その結果、高脂血症ラットの唾液には、コントロール群のラットと比較して、両者で 2 倍以上発現に差のあった蛋白質は 25 種類あり、また、新規の蛋白質の発現が 8 種類あることが明らかになった。

これらラットの結果で同定された蛋白質のうちヒトでの解析に応用可能な蛋白質を決定し、ヒトへの応用に向けた研究を進めた。

本学附属横浜クリニックにある内科外来では様々な重症度の糖尿病・高血圧・高脂血症患者が来院しており、様々な重症度の糖尿病・高血圧・高脂血症患者の唾液・血液を採取することにより、動物実験で同定された目的とする蛋白質をウエスタンブロットで検討した。同定された蛋白質の臨床応用が可能かどうか、特異度や鋭敏度の確認を行った。

これらの患者で得られたメタボリックシンドローム特異的な唾液由来蛋白質のどれと関連があるか、あるいは無いかを検討しメタボリックシンドローム特異性をウエスタンブロットで検討を行った結果、高血圧・糖尿病・高脂血症による重症度に特異性の高い蛋白質を4種類同定することができた。

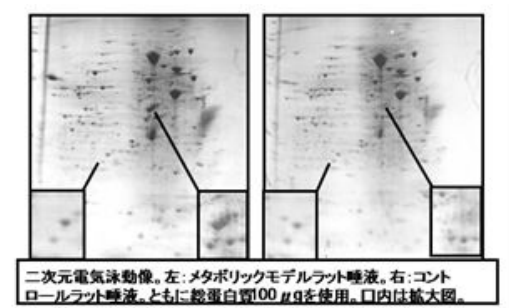


図 コントロールラットとメタボリックシンドロームモデルラットの唾液プロテオーム解析を行い、蛋白質の濃度の違いを比較・検討した。

特にメタボリックシンドロームに特異度や鋭敏度のある蛋白質や新規の蛋白質をヒトでの臨床応用を目的として簡易検出系のプレート開発への着手を現在行っている。

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 14 件)

Kawashima Rie, Shimizu Tomoko, To Masahiro, Saruta Juri, Jinbu Yoshinori, Kusama Mikio, Tsukinoki Keiichi, Effects of stress on mouse α -defensin-3 expression in the upper digestive mucosa, *Yonsei Med J*, 査読有, Vol.55, No.2, 2014, 387-394
DOI: 10.3349/ymj.2014.55.2.387.

猿田 樹理、ストレス関連唾液腺蛋白 BDNFのストレス誘発性疾患抑制における予防医学的研究 唾液腺の新しい機能の創出をめざして、*神奈川歯学*, 査読有, 48巻, 1号, 2013, 43-47

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cn0kanas/2013/004004/007&name=0043-0047j&UserID=119.245.226.1>

Sugimoto Masahiro, Saruta Juri, Matsuki Chisa, To Masahiro, Onuma Hiromi, Kaneko Miku, Soga Tomoyoshi, Tomita Masaru, Tsukinoki Keiichi, Physiological and environmental parameters associated with

mass spectrometry-based salivary metabolomic profiles, *Metabolomics*, 査読有, Vol.9, No.2, 2013, 454-463
DOI: 10.1007/s11306-012-0464-y

To Masahiro, Kamata Yohei, Saruta Juri, Shimizu Tomoko, Sato Takenori, Kondo Yusuke, Hayashi Takashi, Hamada Nobushiro, Tsukinoki Keiichi, Induction of α -defensin expression by *Porphyromonas gingivalis*-infected human gingival graft transplanted in nu/nu mouse subdermis, *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol.46, No.1, 2013, 25-34
DOI: doi:10.1267/ahc.12033

Kondo Yusuke, To Masahiro, Saruta Juri, Hayashi Takashi, Sugiyama Hiroki, Tsukinoki Keiichi, Role of TrkB expression in rat adrenal gland during acute immobilization stress, *J Neurochem*, 査読有, Vol.124, No.2, 2013, 224-232
DOI: 10.1111/jnc.12030

Saruta Juri, Iida Michitaro, Kondo Yusuke, To Masahiro, Hayashi Takashi, Hori Mayumi, Sato Sadao, Tsukinoki Keiichi, Chronic Stress Induces Neurotrophin-3 (NT-3) in the Rat Submandibular Gland, *Yonsei Med J*, 査読有, Vol.53, No.6, 2012, 1085-1092
DOI: 10.3349/ymj.2012.53.6.1085

Goto Fumiyuki, Saruta Juri, Kanzaki Sho, To Masahiro, Tsutsumi Tomoko, Tsukinoki Keiichi, Ogawa Kaoru, Various levels of plasma brain-derived neurotrophic factor in patients with tinnitus, *Neurosci Lett*, 査読有, Vol.510, No.2, 2012, 73-77
DOI: 10.1016/j.neulet.2012.01.001

Saruta Juri, Fujino Kazuhiro, To Masahiro, Tsukinoki Keiichi, Expression and localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in human submandibular gland, *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol.45, No.4, 2012, 211-218
DOI: 10.1267/ahc.12005

Tsukinoki Keiichi, Saruta Juri, Histochemistry of the salivary glands: Role of stress-related brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat submandibular gland, *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, Vol.45, No.5, 2012, 261-267
DOI: 10.1267/ahc.12017

Nagasawa Takahiro, Saruta Juri, Kondo Yusuke, To Masahiro, Kamata Yohei, Hori Mayumi, Yoshino Fumihiko, Maetani Takashi, Lee Masaichi Chang-il, Tsukinoki Keiichi, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration suppresses stress-related lesions, *The Bulletin of Kanagawa Dental*

College、査読有、Vol.39、No.2、2011、79-82
Shiiki Naoto, Tokuyama Satoru, Sato Chikatoshi, Kondo Yusuke, Saruta Juri, Mori Yusuke, Shiiki Kazuo, Miyoshi Yoshiko, Tsukinoki Keiichi、Association between saliva PSA and serum PSA in conditions with prostate adenocarcinoma、Biomarkers、査読有、Vol.16、No.6、2011、498-503
DOI: 10.3109/1354750X.2011.598566

鎌田要平、東雅啓、猿田樹理、佐藤武則、近藤裕介、浜田信城、槻木恵一、ヒト歯周炎歯肉 *in vivo*再現モデルを用いた IL-1 発現についての解析、神奈川歯学、査読有、46 巻、2 号、2011、139-149

Otsuka Takero, Saruta Juri, Ono Yumie, Sasaguri Kenichi, Sato Sato、Effects of orthodontic reconstruction on brain activity in dysfunction patient: a case report、International Journal of Stomatology and Occlusion Medicine、査読有、Vol.4、No.2、2011、76-81
DOI: 10.1007/s12548-011-0012-9

Tsukinoki Keiichi, Saruta Juri, Yamano Seiichi, Tomita Masaru、The salivary gland and systemic health: Towards the creation of salivary gland and health medicine、J Oral Biosci、査読有、Vol.53、No.4、2011、330-337
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/S1349-0079(11)80026-5

〔学会発表〕(計 40 件)

猿田樹理、若手歯科医からの未来へのメッセージ シンポジウム、不正咬合と片頭痛の関連性について、第 22 回日本 MEAW 研究会、11.3 2013、岡山

猿田樹理 他、不正咬合と頭痛との関連、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、9.21-22 2013、岡山

Saruta Juri 他、Acute Immobilization Stress Induces BDNF in the Rat Salivary Glands、International Association for Dental Research, 91st General Session、03.20-24、2013、Seattle, WA, USA

猿田樹理、宿題報告 : ストレス関連唾液腺蛋白 BDNF のストレス誘発性疾患抑制における予防医学的研究 唾液腺の新しい機能の創出をめざして、神奈川歯科大学学術大会・第 47 回総会、12.1 2012、神奈川

猿田樹理、BDNF のバイオマーカーとしての応用、BIO tech 2012 国際バイオテクノロジー展 / 技術会議 アカデミックフォーラム、4.25-27 2012、東京

Saruta Juri 他、Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression、Neuroscience 2011、11.11-17、2011、Washington DC, USA

猿田樹理 他、メタボリックシンドロームモデルラットにおける唾液 BDNF の変化と

唾液の質についての検討、第 53 回日本歯科基礎医学会総会・学術集会、10.1-2 2011、岐阜

〔図書〕(計 1 件)

賀来 亨、槻木 恵一、猿田 樹理 他、学建書院、スタンダード口腔病態病理学、第 2 版、2013、1-293

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

神奈川歯科大学 顎顔面診断科学講座 病理学分野 唾液腺健康医学研究所

<http://kdcnet.science-server.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猿田 樹理 (SARUTA Juri)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号 : 30454151