

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32703

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659820

研究課題名(和文) 頭痛患者の唾液を用いたメタボローム解析による新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic method by metabolome analysis using the saliva of patients with headache

研究代表者

槻木 恵一 (Tsukinoki, Keiichi)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00298233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々は18-20歳を対象として全唾液を用いてメタボローム解析し、頭痛の初期における代謝産物を同定した。次に、頭痛の初期段階と進行期の違いと頭痛の年齢層を広げた症例での評価試験を行った。同時に年齢による濃度増加なども確認して、このマーカーの診断能力(感度・特異度)を評価した。

さらに、従来の頭痛の臨床的な分類以外のサブタイプがないかをクラスタリング解析などを用いて調べ、実際に同定された頭痛マーカーを使用した。今後は、これらのマーカータンパク質を用いて、臨床応用可能なキット開発などに進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)： We performed metabolome analysis using the whole saliva as the target 18-20 years old, were identified metabolites in the initial headache. Next, we performed an evaluation test in cases spread the age of headache and differences in advanced stage and the initial stage of the headache. We also check the concentration such as age-related increase at the same time, were evaluated (sensitivity and specificity) diagnostic capability of this marker.

In addition, we examined using clustering analysis whether there are any other subtypes of clinical classification of headache. Then, we used headache markers identified in practice.

In the future, we plan to using the marker proteins of these, to proceed and clinically applicable development kit.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：唾液 頭痛 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

唾液検査は従来から歯科検査の1つとして発展してきた。さらに、近年は歯科と全身との関連が注目され、唾液検査も単なる歯科検査だけでなく、全身状態や疾患の診断に利用することが試みだされた。特にUCLAのDr. Wangのグループは唾液をLC-MSによる網羅的解析を行い、悪性腫瘍の新規マーカーの研究で成果を挙げている。一方、国内では慶応義塾大学先端生命科学研究所の杉本(分担研究者)・曾我・富田らのグループは、唾液を網羅的にメタボローム解析し口腔癌、乳癌、膵臓癌の診断に有用な低分子(代謝物)やペプチドを同定した。このように唾液成分の網羅的解析は、癌の診断マーカーの探索だけでなく、様々な疾患の新規マーカーの同定に極めて有用であることは疑いないが、悪性腫瘍以外で有力な研究は国内外ともほとんど無い。

また、痛みは自律神経に強く影響し、その結果として唾液腺の唾液分泌に影響しており、痛みを伴う疾患と唾液成分変化との関連は密接であることから、「痛み」は唾液診断の応用に有望な領域であると考えてきた。すなわち頭痛において唾液成分に影響を与え特徴的な変化を示す可能性は充分考えられる。また、咬合を主訴に来院した患者に頭痛を伴う症例があり、スプリント装着で痛みが軽減すると同時に、唾液分泌量が変化する症例があることを経験してきた。そこで、頭痛患者の唾液を網羅的にメタボローム解析し、頭痛診断への新規マーカーの探索と同時に咬合性頭痛の特徴を検討する研究が必要である。

2. 研究の目的

唾液は生体内の変化を反映する液体である。また、唾液を分泌する唾液腺は自律神経支配の強い臓器で「痛み」にも影響を受けることから、「痛み」で最も患者数の多い頭痛と唾液検査に焦点をあてることは、意義のある研究であると考えた。さらに頭痛は問診が中心に診断されており客観的マーカーはないのが現状である。そこで、世界に先駆けて頭痛患者の唾液を最先端のメタボローム解析を行い、代謝プロファイルを取得し、頭痛の診断マーカーを探索する。さらに、咬合性頭痛は充分その存在が認知されていないことから、頭痛のメタボローム解析の結果を基に、咬合性頭痛を代謝の視点から比較検討し、咬合性頭痛の特徴を世界で初めて科学的に明らかにする。

3. 研究の方法

本研究計画は4段階に分けて推進する。

(1): スクリーニング用のマーカーを探索する。
頭痛マーカーの探索をメタボローム解析により行う。

(2): 初期段階と進行期の違い、年齢層を広

げた症例での評価試験を行う。

スクリーニングだけでなく重症度と関連するマーカーを探索する。

(3): 汎用性の試験、早期診断以外の用途への応用の可能性を探索する。

マーカーの診断能力の評価と、治療効果予測などの様々な応用利用を検討する。

(4): 咬合性頭痛の特性の検討を行う。

頭痛症例のプロファイルと咬合性頭痛のプロファイルを比較し特徴を決定する。

<唾液採取>

頭痛は10代からの発症してくることが多く、頭痛発症に伴う初期の生体変化を網羅的解析により一定の傾向が明らかにできれば早期診断、予防、さらに困難といわれてきた発症予測につながる可能性がある。そこで、本研究では、18-20歳を対象(450例程度)として頭痛を持つものと持たないものを振り分けた後、全唾液を用いてメタボローム解析し、頭痛の初期における代謝産物を同定する。さらに、横浜クリニック頭痛外来を受診する重症の頭痛患者(100例程度) 神奈川歯科大学附属病院歯科矯正科を受診する咬合性頭痛患者(50例程度)についても唾液採取を開始する。唾液採取は基本的に午前中に行い、全唾液をサリベットにて回収し、遠心分離後、解析まで-80度に保存する。

(1)として、スクリーニング用のマーカーを探索する。

年齢の影響を排除できるよう若年層(18-21歳)の唾液で頭痛の有無を見分けることができるマーカーを探索する。これらの唾液のメタボローム解析を実施し、頭痛マーカーの探索を行う。マーカー探索時、判別分析など全代謝物の傾向で分離を行うだけでなく、将来的により電気泳動チップなどの簡易測定でも同様の検査ができるよう少数の物質だけで精度よく分離できるマーカーの組み合わせを探す。

(2)として、初期段階と進行期の違い、年齢層を広げた症例での評価試験を行う。

(1)で見つけたマーカーが、初期段階と進行段階の間で、共通点や違いがあるかを評価する。例えば進行度に合わせて濃度の増加が見られれば、単にスクリーニングだけでなく、頭痛の進行度を客観的に評価するマーカーとなる。同時に加齢による濃度増加なども確認して、このマーカーの診断能力(感度・特異度)を評価する。ここでは更に、症例を追加して唾液採取を実施する。

(3)として、汎用性の試験、早期診断以外の用途への応用の可能性を探索する。

汎用性の試験と、治療効果の評価や予測の応用の可能性を探る。

上記第2段階までの症例とは全く別の症例データ(歯周病・口腔癌等を含む)を解析し、これまでに見つけたマーカーの評価試験(感度・特異度の評価)を行う。また、これまで

の試験で比較を行ってこなかった、環境要因の影響を調べる。例えば、頭痛の引き金となる要因として、妊娠・月経・アルコール・ストレス・利尿剤の服用などがあるが、このような症状で頭痛が発症した時と収まった後の唾液の比較などを行い、マーカー及び数理モデルの厳密な評価を行う。

同一人物から治療前後の唾液を比較し、治療効果の改善を客観的に評価するサロゲートマーカーとしての利用が可能かどうかの試験を行う。

と同様に、治療前後の唾液の比較から、投与する薬剤や治療の予測可能なマーカーがないかを解析する。また、従来の片頭痛の臨床的な分類以外のサブタイプがないかをクラスタリング解析などを用いて調べ、治療効果等との相関関係を調べる。

(4)として、咬合性頭痛の特性の検討を行う。

咬合性頭痛患者の唾液をメタボローム解析する。また、咬合性頭痛ではスプリントによる頭痛の軽減が認められる症例があり、スプリント療法後の唾液も解析する。これらのメタボローム解析結果と(3)までに決定された真性頭痛患者のプロファイルと比較検討し、咬合性頭痛が、頭痛という病変においてどのような位置にあるか決定し、咬合性頭痛の特徴を明らかにする。

4. 研究成果

18-20歳を対象として全唾液を用いてメタボローム解析し、頭痛の初期における代謝産物を同定した。まず研究計画(1)として年齢の影響を排除できるように若年層(18-21歳)の唾液で頭痛の有無を見分けることができるマーカーを探索した。ここでは合計約200症例以上の唾液採取を実施した。これらの唾液のメタボローム解析を実施し、頭痛マーカーの探索を行った。その結果、25種類のマーカータンパク質の候補を得ることができた。

(2)として、初期段階と進行期の違い、年齢層を広げた症例での評価試験を行った。(1)で同定されたマーカーが、初期段階と進行段階の間で、共通点や違いがあるかの評価を行い、例えば進行度に合わせて濃度の増加が認められれば、単にスクリーニングだけでなく、頭痛の進行度を客観的に評価するマーカーとなる。同時に加齢による濃度増加なども確認して、このマーカーの診断能力(感度・特異度)を評価した。その結果、13種類の頭痛マーカーの候補を得ることができた。

(3)として、汎用性の試験、早期診断以外の用途への応用の可能性の探索を行った。汎用性の試験と、治療効果の評価や予測の応用の可能性の検討を行った。(2)までの症例とは全く別の症例(歯周病・口腔癌等を含む)を解析した。また、同一人物から治療前後の唾液を比較し、治療効果の改善を客観的に評

価するサロゲートマーカーとしての利用が可能かどうかの試験を行った。さらに、治療前後の唾液の比較から、投与する薬剤や治療の予測可能なマーカーがないかを解析した結果、8種類のマーカー候補を得ることができた。また、従来の片頭痛の臨床的な分類以外のサブタイプがないかをクラスタリング解析などを用いて調べ、治療効果等との相関関係を調べたところ頭痛マーカーを使用した結果有意な正の相関を得ることができた。今後は、これらのマーカータンパク質を用いて、臨床応用可能なキット開発などに進めていく予定である。

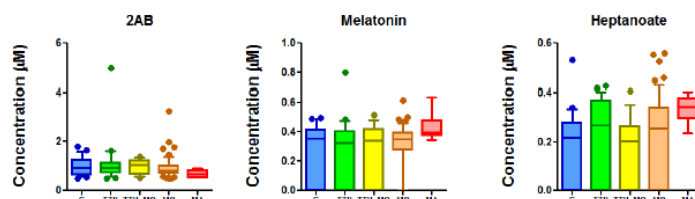


図 健康者(C)、緊張型頭痛(TTH)、MO(前兆のない片頭痛)、MA(前兆のある片頭痛)、(TTH_MO)TTHとMOを両方伴う症例で統計的有意差(p<0.05)のあった代謝物質

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3件)

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

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20件)

猿田樹理、槻木恵一 他、不正咬合と頭痛との関連、第55回歯科基礎医学学会学術大会・総会、9.21-22 2013、岡山

Saruta Juri, Tsukinoki Keiichi 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

Takeuchi Mifumi, Tsukinoki Keiichi
他、Relationship between migraine and
malocclusion、3rd European Headache and
Migraine Trust International Congress、
9.20-23, 2012、London, United Kingdom

〔図書〕(計 2 件)

榎木 恵一, 神部 芳則 他、学建書院、
がん患者さんの口腔ケアをはじめましょう、
第1版、2013、1-93

賀来 亨, 榎木 恵一 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

榎木 恵一 (TSUKINOKI Keiichi)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00298233

(2) 研究分担者

杉本 昌弘 (SUGIMOTO Masahiro)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30458963