

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462830

研究課題名(和文) 唾液を用いた生体時刻測定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of physiological time measurement using saliva

研究代表者

大西 芳秋 (Onishi, Yoshiaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号：60233219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体リズムに基づく革新的歯科医療実現のために、非侵襲かつ簡便な生体時刻測定法の確立を目的に、遺伝子発現プロファイルを指標としてマーカータンパクのスクリーニングを行い、ARRB1を同定した。本タンパクは多様な唾液試料を用いた解析においても概日リズム発現パターンを示し、本生体時刻測定法の有用性が示唆された。また、採取した唾液試料の保存には、4M尿素を含む緩衝液が適していることを発見した。唾液試料を用いたウェスタンブロット解析時の内部標準タンパクとしてActinが適していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Establishment of physiological time measurement using saliva is required for the advanced dental care based on biological rhythms. Then, we have found ARRB1 as a candidate of the marker for physiological time measurement in saliva from the results of the gene expression profile. ARRB1 protein showed the circadian profile even using various saliva samples, suggesting a usefulness of this marker protein. We also found that the buffer containing 4 M Urea is adequate for saliva storage to prevent proteolysis and that the rhythm in saliva should be corrected using Actin as an internal control.

研究分野：機能系基礎歯科学

キーワード：唾液 転写 クロマチン 生物時計

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠、覚醒といった生物行動や内的生理現象(体温、ホルモン分泌、神経活動)は、概日リズムといわれる約24時間周期性を示す。この生体リズムは疾患と密接に関連しており、生体リズムの障害として睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非24時間睡眠症候群、躁うつ病などを発症し、また小児自閉症、精神分裂病、老年性痴呆症は生体リズムの異常を一症状としている。また患者の管理や治療に生体リズムの概念を応用する事(クロノセラピー; 時間治療)により、予後に改善が見られる等の報告がなされており、歯科医療現場においても重要性が指摘されている(The Circadian Clock in Oral Health and Diseases. (2013) J Dent Res., in press, Papagerakis S, et al.)。この24時間リズムを支配するマスター時計は、脳内視床下部の視交叉上核(SCN)に存在しており、末梢組織は、このマスター時計の支配下のもと組織固有の24時間リズムを刻んでいる(末梢時計)。これまでのところ中枢時計、末梢時計に係わらず基本的な分子メカニズムは、BMAL-CLOCK 複合体による Per ならびに Cry 遺伝子の転写活性化、さらにその転写産物 PER および CRY による Per、Cry 遺伝子の転写抑制を中心とするフィードバックループにより調節される事が報告されている(System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. (2005) Nat. Genet., 37, 187-192, H.R. Ueda, et al.)。生体試料による生体時刻決定法は血液を用いた方法(Measurement of internal body time by blood metabolomics. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 9890-9895, Y. Minami, et al.) や毛髪を用いた方法(Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 15643-15648, M. Akashi, et al.)が報告されている。血液を用いる方法は非侵襲的に測定試料採取することができず、また毛髪を用いる方法は1日のうち最低異なる3時刻で試料採取する必要がある、いずれの方法も普遍的な生体時刻決定法とはなっていない。

唾液は生体より非侵襲的に採取でき、血液中で24時間周期の変動が観察されるナトリウム、カリウム、リン酸塩といった電解質やコルチコステロイド等が、唾液中においても同様に観察される事が知られている。これは唾液が生物時計をモニターする上で有用な試料となりうる事を示唆している。事実、クッシング症候群の診断を唾液中コルチゾールのリズム変動を用いて行うことも試みられている(Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. (2008) Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab., 4, 344-350, T. Carroll et al.)。上記のように、唾液を生体試料とし

て用いる生体時刻測定法の可能性は示唆されているが、唾液には以下に示す問題点を考慮する必要がある。唾液はその分泌腺が単一でなく、分泌される唾液の組成も異なっており、しかも、食事等、様々な刺激により唾液組成は変化することが知られている。さらに、口腔内に混在する細菌によっても影響を受けると考えられる。唾液の分泌は原則として、

唾液腺細胞における合成による腺腔内への放出、血清由来の水分、電解質等の管腔内への輸送により起きる。時計遺伝子により制御される概日リズムは、原核生物からヒトにいたる高等動物まで普遍的に備わっている非常に強固なシステムであることより、唾液腺細胞の時計遺伝子(末梢時計)により直接発現調節されている遺伝子は環境変化に影響されることなく生体時刻に依存して合成されると考えられる。よってこの遺伝子発現変動を唾液を用いて測定することにより、環境変化に影響されることなく生体時刻を知ることができると考えられる。

申請者はこれまで、唾液腺細胞株 HSG 細胞が細胞生物学的に唾液腺細胞のモデルとして利用可能であること見出しており、HSG 細胞を用いて末梢時計機能について検討してきた。唾液腺細胞においては、時計遺伝子の中で最も中心となる Bmal1 遺伝子プロモーター領域は低メチル化状態の CpG アイランド中に存在しており、視交叉上核(SCN)や肝臓と異なり Bmal1 遺伝子の概日リズム転写調節に重要な正の転写調節因子 ROR $\alpha$ が発現しておらず、主に負の転写調節因子 Rev-erb $\alpha$ を中心に概日リズム転写調節が行われていることを見出した(HSG cells, a model in the submandibular clock. (2010) Bioscience Report., 31, 57-62, Y. Onishi)。これは唾液腺特異的概日リズム調節機構の存在を示唆しており、この概日リズム調節機構により調節されている遺伝子を利用した唾液による生体時刻決定の可能性を示唆している。そこで Bmal1 および Rev-erb を標的とする ChIP on chip 法により概日リズム機構により直接転写制御される遺伝子をクロマチンレベルで同定した。さらに、HSG 細胞において概日リズム発現する遺伝子を DNA マイクロアレイにより検討した。これらに共通する遺伝子が概日リズム機構により制御されている遺伝子であり、これら遺伝子の HSG 細胞における概日リズム発現量をリアルタイム RT-PCR により確認した。これら概日リズム転写を示す遺伝子のうち、ヒト唾液腺細胞において発現しておりかつ唾液中にその遺伝子産物(タンパク)が検出できる遺伝子の同定に成功した(生体リズムマーカー(特願 2013-095888)大西 芳秋)。唾液タンパク検出による臨床検査の重要性が指摘されており(Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. (2012) J Proteomics, 75, 4251-4258, E.

Lamy and M. Mau)、申請者が新たに見出した生体時刻測定マーカータンパクを唾液中において計測できるようにする意義は大きい。さらに既存の概日変動物質、メラトニンやグルココルチコイド等との違いを明らかにできれば、新規概日リズムマーカーとしての有用性が証明されると考えられる。

## 2. 研究の目的

生体時刻測定法において、毛髪を用いる方法は時計遺伝子転写そのものを測定するものであり、RNAを測定するため生体から試料調製までの取り扱いが簡単ではない。また、血液を用いる方法はメタボロミクスにより血液中に存在する概日変動する物質を選択したものであり、測定している物質と概日リズム調節機構の因果関係は科学的に証明されていない。唾液中の時計遺伝子発現量を測定する方法(特開 2011-193779)も提案されているが、RNA そのものは唾液腺細胞において分泌されるものではなく、対象物質の安定性や感度に問題がある。今回確立を試みている唾液を用いる生体時刻測定法は、時計遺伝子に直接制御されている遺伝子の変化を唾液中に分泌されたタンパクにより測定するものであり、上記の問題点を全て克服するものである。申請者は時計遺伝子がクロマチン構造を介して転写調節していることを見出したことから(Mol. Cell. Biol., (2008) 28, 3477-3488, Y. Onishi, et al.)、唾液腺細胞におけるクロマチンレベルにおけるマーカー遺伝子の選択は非常に独創的である。これにより、環境変化に影響されことなく生体時刻に依存して唾液腺細胞にて合成、分泌されるタンパクを唾液中に検出することによる、より正確な測定法が確立することが予想される。そこで本研究は、唾液を用いた新たな時刻測定方法実用化のための種々の条件を検討することを目的としている。1) これまでの研究で新たに見出した生体時刻測定マーカータンパクがヒト唾液中において定量的かつ再現性を持って検出できるよう唾液試料の保存方法を確定する。2) また、唾液は分泌量や組成が変動しやすいことが知られているため、これらを補正するための内部標準タンパクマーカーを選定する。確定した上記条件の下、ヒト全唾液を用いて新たに見出した生体時刻測定マーカータンパクの概日リズム発現をウェスタンブロットにて確認する。3) さらに、唾液を用いたメラトニンやグルココルチコイドによる概日リズム測定と比較検討し、特に、唾液試料の性差、個体差の影響について検討する。これにより、本生体時刻測定マーカーを用いた生体時刻測定における詳細な測定条件や利用方法が明らかになると考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1) 唾液試料の保存方法の確定

生体時刻測定に用いる唾液試料に関して、

全唾液と純唾液が想定される。耳下腺唾液はカービーカップを用いて容易に採取できるが、解析に用いる量を採取するには時間がかりすぎる。顎下腺や舌下腺は採取するために技術を要し、簡単に採取できない。さらに口蓋腺、口唇腺などの小唾液腺は分泌量も少なく、採取も非常に困難である。全唾液は、採取が容易で、確実に採取できるが、口腔内微生物や白血球、食品由来のタンパク等が含まれており、夾雑物を除くために遠心分離やフィルターによる過等の前処理が必要となる。再現性良く生体時刻を測定するためには、採取時間が長いものは不適であることより、全唾液を試料として用いることとする。

全唾液には多くのプロテアーゼが含まれており、特に口腔内に炎症疾患を持つ患者はペプチダーゼの活性が上昇している。このため唾液採取後、低温保存するプロトコールが示唆されている(Effects of the UK Biobank collection protocol on potential biomarkers in saliva. (2012) Int J Epidemiol., 41, 1786-1797, R. Pramanik et al.)。そこで今回新たに見出した生体時刻測定のためのマーカータンパクの保存温度に対する影響を検討するために、室温に経時的に放置した唾液と-20、-80 保存した唾液をウェスタンブロットにて解析する。この時、上記論文で指標として用いられた Actin と今回見出したマーカータンパクを比較解析することにより、タンパク安定性における保存温度の影響を知ることができる。また唾液タンパクの分解を防ぐには RNAProtect Saliva Reagent (Qiagen)の添加が有効であるとの報告もあり(Method development for proteome stabilization in human saliva. (2012) Anal Chim Acta, 722, 63-69, H. Xiao and D.T. Wong)、本試薬を添加した状態での上記保存条件の影響についても解析を行う。これらの実験より、生体時刻測定のために採取された唾液試料の保存条件が確定され、今後多様な唾液試料を解析する際にも、試料間での試料取り扱いに起因する誤差を最小限にすることができるようになる。

### 2) 唾液分泌量や組成を補正するための内部標準タンパクマーカーの選定

全唾液において体内時計による変動以外のタンパク変動要因を補正するための内部標準タンパクを選定する必要がある。このためには通常の実験でも用いられている Actin や Tubulin といった細胞骨格タンパクは、細胞分解産物由来であることが多く、炎症等により大きく変動することが推測される。このため唾液中に分泌される IgA, lysozyme, albumin(Circadian changes of the SIgA, lysozyme, albumin and copper content of saliva. (1980) Czech Med., 3, 249-254, J. Richter, et al.) や fibronectin (Salivary fibronectin in man: an immunoblotting, radioimmunoassay and

immunohistochemical study. (1991) Arch Oral Biol., 36, 265-272, J. Kanehisa, et al.)  
そして Mucin, Amylase (Identification of aquaporin-5 and lipid rafts in human resting saliva and their release into cevimeline-stimulated saliva. (2009) Biochim Biophys Acta, 1790, 49-56, Y. Pan, et al.)が解析されている。そこで同一人物で採取時間が異なる全唾液試料(例えば AM 8:00 と PM 8:00)2組に対して上記唾液タンパクをウェスタンブロットにより解析する。内部標準マーカートンパクとしては、個体間の発現量の差があったとしても採取時間によって変動が少ないタンパクが候補となる。そこで採取時間による発現変動が一番小さいタンパクを内部標準マーカートンパクとする。選定した内部標準マーカートンパクが性別や年齢に依存せず機能することも性別、年齢の異なる全唾液試料を測定することにより確認する。

### 3) 唾液を用いたメラトニンやグルココルチコイドによる概日リズム測定と比較検討

4 - 6 時間間隔で採取した全唾液を用いて、ウェスタンブロット解析を行い、内部標準マーカートンパクを用いて補正をした後、新たに見出した生体時刻測定のためのマーカートンパクの概日リズム発現を確認する。また性別、年齢の異なる全唾液を用いて同様に生体時刻測定マーカートンパクの概日リズムを確認し、Cosinor 法による fitting を行い、リズム周期、頂点位相、振幅をそれぞれの唾液試料に関して比較し、生体時刻測定における唾液試料の個体差について検討を行う。またこれまで唾液を用いた生体時刻測定の利用が報告されているメラトニン (Monitoring salivary melatonin concentrations in children with sleep disorders using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. (2013) Ther Drug Monit., 35, 388-395, S. A. Khan et al.)やコルチゾール (Circadian rhythm of salivary cortisol in infants with congenital heart disease. (2013) Endocrine, 43, 214-218, G. Capriolo et al.)との違いを検討するために、同一の全唾液試料を用いて、Cortisol, EIA Kit (Salimetrics) を用いてコルチゾールを Melatonin, ELISA Kit (Salimetrics) を用いてメラトニンを測定し、申請者の見出した生体時刻測定マーカートンパクの概日リズム変動におけるリズム周期、頂点位相、振幅について比較検討する

## 4. 研究成果

### 1) 唾液試料の保存方法の確定

全唾液には多くのプロテアーゼが含まれており、特に口腔内炎症疾患を持つ患者はペプチダーゼの活性が上昇している。このため唾液採取後、低温保存するプロトコールや唾

液タンパクの分解を防ぐ RNAprotect Saliva reagent (Qiagen) の添加が有効であるとの報告がある。そこで RNAprotect Saliva reagent 添加し保存、その後同唾液試料を用いてウェスタンブロット解析を試みたところ、保存試料そのままでは塩の析出が観察され使用できないことが判明した。

そこでタンパク変性材として 4M 尿素を含む緩衝液を用いて唾液試料を保存し、ウェスタンブロット解析したところ、37 °C で 24 時間放置しても生体時刻マーカートンパク、 $\alpha$ -アクチン共に継時的な分解は見られず、4M 尿素を含む緩衝液が唾液試料の保存に適していることが判明した。

これらの実験より、生体時刻測定のために採取された唾液試料の保存条件が確定され、今後多様な唾液試料を解析する際にも、試料間での試料取り扱いに起因する誤差を最小限にすることができるようになった。

### 2) 唾液分泌量や組成を補正するための内部標準タンパクマーカートの選定

全唾液を生体時刻決定に用いる場合において、体内時計による日内変動のみならず、個々の唾液腺の変動、食事やホルモン等の刺激、疾患、個体差により全唾液腺に含まれるタンパク組成は変動する。このため採取した全唾液において体内時計による変動以外のタンパク変動要因を補正する必要がある。そこで、このための内部標準マーカートンパクの同定を行った。同一人物で採取時間が異なる全唾液試料 (AM 8:00 と PM 8:00) 2組に対してタンパク変性材として 4M 尿素を含む緩衝液を用いて全唾液試料を保存し、IgA, Lysozyme, Albumin, Fibronectin, Mucin, Amylase をウェスタンブロット解析した。市販の抗体を用いて通常の実験方法 (Nucleic Acids Res. 2012 Oct;40(19):9482-92) にて検出を試みたところ、Fibronectin, Mucin はタンパクバンドを検出することができなかった。さらに唾液試料濃度や抗体濃度、ケミルミネッセンス増感剤等を用いても Fibronectin, Mucin は検出不可能であった。本来、内部標準タンパク質としては、個体間の発現量の差があったとしても採取時間によって変動が少ないタンパクが候補となる。そこで採取時間による発現変動が一番小さいタンパクであるばかりでなく、性別や年齢に依存せず機能することも重要である。本研究結果から Actin が上記条件を一番満足していることを発見した。

### 3) 唾液を用いたメラトニンやグルココルチコイドによる概日リズム測定と比較検討

4 時間間隔で採取した唾液試料を用いて解析したところ、ARRB1, メラトニン、グルココルチコイド、いずれも概日リズム周期を検出することができたが、位相、振幅は全く異なっていた。また、位相の異なる唾液試料を用いた実験においても、それぞれの位相のず

れは観察された。以上のことより、ARRB1のマーカ-としての有用性は裏付けられたが、メラトニンやグルココルチコイド等の既存のマーカ-との関連性は今後解明していく必要があると思われる。

#### 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)

[学会発表](計 11件)

時計遺伝子 BMAL1 のメチル化による転写制御 富田辰之介、栗田僚二、大西芳秋、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016/11/30

Shikonin shortens the circadian period: possible role of topoisomerases, Yin-Yang action. 大西芳秋、7th World Gene Convention-2016、上海(中国)、2016/11/03

Herbs for circadian rhythm.1 大西芳秋、IAN2016、Manesar(インド)、2016/10/21

Establishment of the peripheral clock system during eutherian embryogenesis: Critical role of Casein Kinase and Jmjd3. 西本正純、奥田晶彦、大西芳秋、BMB2015、神戸、2015/12/01  
シコニンによる培養細胞のコレステロール吸収の促進。小川昌克、河野泰広、山崎幸苗、宮崎歴、大西芳秋、BMB2015、神戸、2015/12/01

Shikonin shortens the circadian period: possible role of topoisomerases, Yin-Yang action. 小川昌克、河野泰広、山崎幸苗、大西芳秋、Indo-Japan Symposium-PIKNIK2015、デリー(インド)、2015/02/23

Inductions of Per2 and CKI expression are critical for establishment of circadian oscillation during eutherian embryogenesis. 西本正純、奥田晶彦、大西芳秋、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014/11/25

Shikonin shortens the circadian period: Possible involvement of Top2 inhibition. 小川昌克、河野泰広、山崎幸苗、大西芳秋、第 87 回日本生化学会、京都、2014/10/18

Regulation of adipocytokines by natural products in cultured mouse, rat and mammalian cells. 河野泰広、大西芳秋、山崎幸苗、第 2 回 BPPT AIST 合同シンポジウム、夕張、2014/09/11

Shikonin shortens the circadian period: Possible involvement of Top2 inhibition. 小川昌克、河野泰広、山崎幸苗、大西芳秋、第 2 回 BPPT AIST 合同シンポジウム、夕張、2014/09/11  
時計遺伝子プロモーター領域の DNA メ

チル化と概日リズム調節。佐藤涼一、杉原直樹、石塚洋一、松久保隆、大西芳秋、第 63 回日本口腔衛生学会・総会、熊本、2014/05/31

[産業財産権]

取得状況(計 4件)

名称: 生体リズムの制御剤

発明者: 大西芳秋、山崎幸苗、河野泰広、大石勝隆

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特 5777125

取得年月日: 平成 27 年 7 月 17 日

国内外の別: 国内

名称: 時計遺伝子の DNA メチル化による概日リズム制御機構のレポーターアッセイ系

発明者: 大西芳秋

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特 5716153

取得年月日: 平成 27 年 3 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: 生体リズムの制御剤

発明者: 大西芳秋、大石勝隆

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特 5697111

取得年月日: 平成 27 年 2 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 生体リズムの制御剤

発明者: 大西芳秋、山崎幸苗、河野泰広、大石勝隆

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特 5672600

取得年月日: 平成 27 年 1 月 9 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 芳秋 (ONISHI, Yoshiaki)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号: 60233219