

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861582

研究課題名(和文)唾液メタボローム解析によるNASH発症機序の解明と新しい診断基準の構築

研究課題名(英文) Construction of new diagnostic and elucidation of the NASH pathogenesis mechanism by saliva metabolome analysis

研究代表者

猿田 樹理 (Saruta, Juri)

神奈川県大学・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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、肥満・糖尿病・高脂血症・高血圧症のモデルラットを用い、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の作成を行い、これらのモデルラットの唾液を採取し、メタボローム解析から唾液の代謝産物の計測を行った。4種類の唾液の解析結果から、検出された486種類の代謝産物のうち、38物質にモデルラットとコントロールラットの間で有意差が認められた。

これらラットの結果で同定された代謝産物のうちでヒトでの解析に応用可能な物質を決定し、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 have conducted the creation of NASH using rat model of obesity, diabetes, hyperlipidemia and hypertension. The saliva of these model rats were collected, it was carried out the measurement of the metabolite of saliva from the metabolome analysis. From saliva analysis of four kinds model rat, among the detected 486 kinds of metabolites, significant differences between the model rats and control rats was observed 38 materials. It determined the applied substance to the analysis of human in the metabolites identified in the results of model rats, and proceeded research for the application to humans.

研究分野：病態科学

キーワード：唾液 メタボローム解析 NASH 生活習慣病 マーカー探索

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生活習慣病(肥満、糖尿病、高血圧症、高脂血症を含む)が増加しており、生活習慣病による肝障害が問題となっている。厚生労働省の調べでは、アルコールを摂取しない人に起こる脂肪肝を非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)と呼び、国内に約1000万人罹患し、さらに肝硬変、肝癌へと進行する可能性のある非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は国内に約100万人以上存在することが知られている。肝疾患は自覚症状や初期症状がほとんど無いために発見が遅れたり手遅れになることが多く、特に近年では、重篤な肝障害を引き起こす可能性があるNASHの予防法や簡便な診断法の開発は、これ以上肝硬変・肝癌を増やさないためにも緊急の課題となっている。

NASHの発症要因は、生活習慣病のインスリン抵抗性によって肝臓に脂肪が蓄積して脂肪肝になり、そこにストレス、脂質過酸化、サイトカインなどが加わることが考えられている。しかし、未だNASHの詳細な発症機序は解明されていない。また、NASHの診断法としては、非飲酒者、ウイルス性肝炎・自己免疫性肝炎以外、最終診断では肝生検が必須であることが知られている。しかし肝生検は確実な診断法ではあるが、患者への負担が大きく入院も必要となるために、全ての患者に適応できないのが現状である。そこでNASH特異的なマーカーと患者に負担をかけない診断法が必要となっている。

2. 研究の目的

近年、肥満やメタボリック症候群患者の増加に伴い、NAFLD患者や、その進行性病態であるNASH患者が増加し続けている。しかしながら、NASHの発症機序は、未だ解明されていないのが現状である。そこで本研究では、NASHの原因である肥満(内臓脂肪型)、糖尿病、高脂血症、高血圧症モデルラットの唾液を採取して代謝産物の観点からメタボローム解析を行い、歯科領域で採取が容易な唾液を用いてNASHの発症機序を解明する。さらに、動物実験で得た結果を応用し、NASH特異的な唾液由来マーカーの探索を実際のNASH患者の唾液を用いてメタボローム解析をすることで、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将来的にNASHの予防や診断の一助として貢献できるようにすることを目的とする。

3. 研究の方法

生活習慣病モデルラットに慢性拘束ストレスを負荷しNASHを発症させ、唾液をメタボローム解析で検討する。代謝プロファイルを同定することによりNASHの代謝マップを作成すした。以下に使用したラットを示す。

肥満(内臓脂肪型)モデル:SDラットに脂肪分60%カロリー比高脂肪飼料(HFD-60)を与える。

糖尿病モデル:SDラットに糖尿病モデル作成飼料(高フルクトース飼料・高シュクロース飼料)を与える。

高血圧症モデル:SHRラットに高血圧モデル作成飼料(食塩を多く含む)を与える。

高脂血症モデル:SDラットに動物性油脂を主とした高脂肪、高ショ糖、高カロリー、高コレステロールが含有されている飼料を与える。

*さらに慢性拘束ストレスは21日間行う。

代謝プロファイル同定方法

NASHを発症させた4種類のモデルラットとコントロールラットの唾液間で濃度変化が大きい代謝産物の探索を行った。CE-MSは、同じ物質を測定しても、測定ごとにピーク的位置が大きくズレ、複数のデータを比較することが難しいので、申請者は独自のアルゴリズムを用いてこのズレを高精度に補正し、多数の測定結果を容易に比較できるディファレンシャル解析を用いた。この解析を用いて、コントロールと4種類のモデルラットの唾液代謝産物で大きな違いのあった物質を全て検出した。また、複数の物質を同時に検出することで濃度変化のパターンからロジスティック回帰モデルを用いて4種類のモデルラットの唾液からNASHの代謝プロファイルを同定し、代謝マップを作成することでNASH発症機序の解明を行った。さらに唾液を詳細に検討するために、各モデルラットごとに同定された代謝産物をそれぞれELISA法およびwestern blot法で定量的に解析を行った。

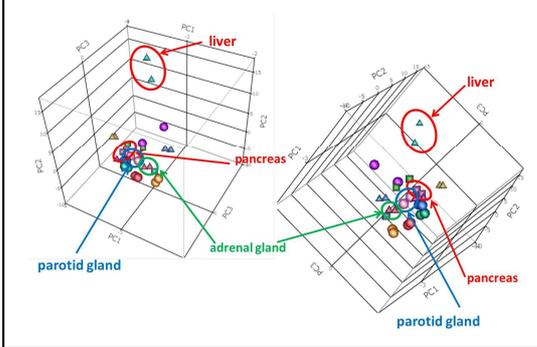
4. 研究成果

肥満モデル、糖尿病モデル、高血圧症モデル、高脂血症モデルラットに特殊飼料を食べさせ、さらに慢性拘束ストレスを負荷することによりNASHの作成を行った。これらのモデルラットにおいて唾液の代謝産物を網羅的に解析することで、マーカーとなる物質を検討した。4種類の唾液の解析結果から、検出された486種類の代謝産物のうち、38物質にモデルラットとコントロールラットの間で有意差が認められた。

主要な各臓器間での主成分分析の結果
コントロール群とNASHを発症した肥満モデルでの主要な臓器間での主成分分析の結果、コントロール群と比較してNASHを発症した肥満群の肝臓において顕著な差が認められた。

図1. 主成分分析の結果(肝臓、膵臓、副腎、耳下腺)

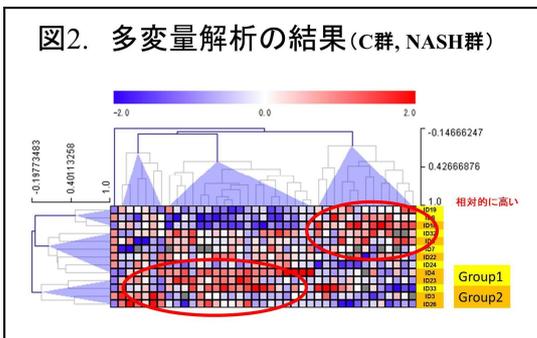
図1. 主成分分析の結果 (C群, NASH群)



コントロール群と肥満モデル群の唾液代謝物質間の多変量解析の結果

コントロール群と NASH を発症した肥満モデルでの唾液代謝産物間での多変量解析の結果、コントロール群と比較して NASH を発症した肥満群の唾液において顕著な差が認められた物質が多数認められた。特に脂肪酸、リゾリン脂質、リン脂質が顕著であった。

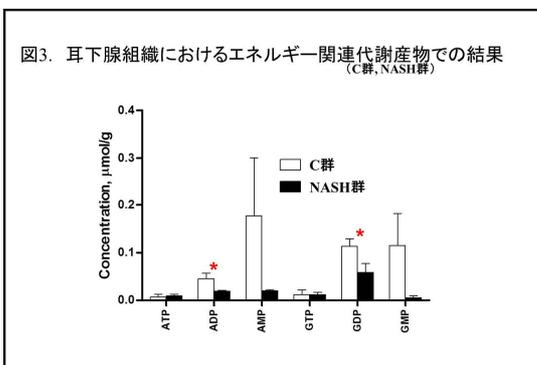
図 2. 多変量解析の結果 (赤：相対的に高い値)



耳下腺組織の代謝産物間での変動

コントロール群と NASH を発症した肥満モデルでの耳下腺組織での代謝産物間での解析結果より、エネルギー関連の代謝産物では、コントロール群と比較して NASH を発症した肥満群において ADP および GDP において有意差が認められた。

図 3. 耳下腺組織におけるエネルギー関連代謝産物での結果



現在、解析結果より得られた複数の物質を同時に見ることから濃度変化のパターンからロジスティック回帰モデルを用いて4種類のモデルラットの唾液から NASH の代謝プロファイルを同定し、代謝マップを作成することで NASH 発症機序の解明を行っている。さらに唾液を詳細に検討するために、各モデルラットごとに同定された代謝産物をそれぞれ ELISA 法および western blot 法で定量的に解析する。

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 9 件)

Mizuno Yuya, Hofer Alex, Suzuki Takefumi, Frajo-Apor Beatrice, Wartelsteiner Fabienne, Kemmler Georg, Saruta Juri, Tsukinoki Keiichi, Mimura Masaru, Fleischhacker W. Wolfgang, Uchida Hiroyuki, Clinical and biological correlates of resilience in patients with schizophrenia and bipolar disorder: A cross-sectional study, Schizophrenia Research, 査読有, 2016, in press. DOI: 10.1016/j.schres.2016.04.047.

Takeuchi Mifumi, Saruta Juri, Kato Momoko, Sugimoto Masahiro, Kamata Yohei, Shimizu Tomoko, To Masahiro, Kawata Toshitsugu, Igarashi Hisaka, Tsukinoki Keiichi, Features of occlusal state in female Japanese patients with migraine: A case-controlled study, The Journal of Craniomandibular & Sleep Practice, 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.1080/08869634.2015.1106808

Kato Momoko, Saruta Juri, Takeuchi Mifumi, Sugimoto Masahiro, Kamata Yohei, Shimizu Tomoko, To Masahiro, Fuchida Shinya, Igarashi Hisaka, Kawata Toshitsugu, Tsukinoki Keiichi, The Journal of Craniomandibular & Sleep Practice, 査読有, 2016, in press.

DOI: 10.1080/08869634.2016.1144335

Yoshida Kazunari, Suzuki Takefumi, Imasaka Yasushi, Kubo Ken-ichiro, Mizuno Yuya, Saruta Juri, Tsukinoki Keiichi, Mimura Masaru, Uchida Hiroyuki, Resilience in schizophrenia: a comparative study between a remote island and an urban area in Japan, Schizophrenia Research, 査読有, Vol.171, No.1-3, 2016, 92-96.

DOI: 10.1016/j.schres.2016.01.030.

Yamamoto Yuko, To Masahiro, Hayashi Takashi, Shimizu Tomoko, Kamata Yohei, Saruta Juri, Takahashi Toru, Tsukinoki Keiichi, Intake of indigestible carbohydrates influences immunoglobulin A

response and polymeric immunoglobulin receptor expression in the rat submandibular gland, British Journal of Nutrition, 査読有, Vol.113, No.12, 2015, 1895-1902.

DOI: 10.1017/S0007114515001403.

東雅啓、猿田樹理、近藤裕介、山本裕子、松木千紗、清水智子、鎌田要平、佐藤光栄、駒津栄雄、槻木恵一、唾液の多機能性に関する検討 - 全身管理における有用性と脳機能への効果 -、神奈川歯学、査読有、50 巻、2 号、2015、94-97。
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cn0kanas/2015/005005/004&name=0094-0097j&UserID=119.245.226.1>

Ikai Saeko, Suzuki Takefumi, Uchida Hiroyuki, Saruta Juri, Tsukinoki Keiichi, Fujii Yasuo, Mimura Masaru, Effects of weekly one-hour hatha yoga therapy on resilience and stress levels in patients with schizophrenia-spectrum disorders: an eight-week randomized controlled trial, J Altern Complement Med, 査読有, Vol.20, No.11, 2014, 823-830.

DOI: 10.1089/acm.2014.0205.

Matsuki Chisa, To Masahiro, Kondo Yusuke, Sugiyama Hiroki, Yamamoto Yuko, Shimizu Tomoko, Kamata Yohei, Saruta Juri, Tsukinoki Keiichi, Associations between brain-derived neurotrophic factor and estradiol in women's saliva, Neuroendocrinology Letters, 査読有, Vol. 35, No.3, 236-241.
http://www.nel.edu/archive_issues/o/35_3/35_3_Matsuki_236-241.pdf

Saruta Juri, To Masahiro, Hayashi Takashi, Kawashima Rie, Shimizu Tomoko, Kamata Yohei, Kato Momoko, Takeuchi Mifumi, Tsukinoki Keiichi, Relationship between brain-derived neurotrophic factor and stress in saliva and salivary glands, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, Vol.26, No.3, 379-389.

DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.12.013

〔学会発表〕(計 29 件)

Saruta Juri 他, Evaluation of malocclusion in Japanese women patients with migraine, 8th International Orthodontic Congress 2015, 9.27-30, 2015, London, United Kingdom

東雅啓, 猿田樹理 他, 唾液腺 BDNF 強制発現トランスジェニックマウスにおける神経生理学的変化とヒトの精神神経疾患の病態評価における唾液検査の応用, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 サテライトシンポジウム SS4 「第 29 回唾液腺談話会 唾液腺研究最前線 ~未来へと続く軌跡~」,

9.11, 2015, 新潟

猿田樹理 他, 片頭痛患者におけるスプリント治療の効果, 第 42 回日本頭痛学会総会, 11.14-15, 2014, 下関

Saruta Juri 他, Acute immobilization stress induces BDNF in the rat salivary glands, 10th European Symposium on Saliva, 5.14-17, 2014, Egmond aan Zee, The Netherlands

〔図書〕(計 1 件)

猿田樹理 他, 株式会社 シーエムシー出版、非侵襲的検体検査の最前線 - 唾液検査・呼吸検査を中心に - (バイオテクノロジーシリーズ)【第 編 唾液検査】第 1 章 唾液検査による診断的価値と市場、2015、23-29

〔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