

研究者：町田 達哉（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 予防歯科学分野）

研究題目：唾液中エクソソームに含まれる microRNA の加齢マーカーとしての有用性の検討

目的：

加齢は様々な疾患の危険因子であるが、加齢に伴う健康状態の変化には個人差があり、暦年齢を用いて加齢の程度を正確に評価することは難しい。従って、暦年齢以外の指標を用いて、個人ごとに加齢の程度を評価することが必要である。近年の研究から、唾液中のエクソソームに microRNA が内包され、バイオマーカーとしての応用が可能であることが分かってきた。また、microRNA の発現量が、ヒトの様々な生理状態に応じて変動することが明らかとなってきた。従って、唾液中の microRNA は加齢の程度を反映した指標となる可能性がある。しかし、唾液中の microRNA と加齢の程度との関連には不明な点が多い。そこで本研究では、若年者と高齢者における唾液エクソソーム中 microRNA の発現を比較し、加齢の程度を示すバイオマーカー（加齢マーカー）の特定とその有用性を検討することを目的とした。

対象および方法：

岡山大学歯学部学生、岡山大学大学院生（若年者群）および岡山大学病院予防歯科の受診患者（高齢者群）のうち、臨床的に全身症状の無い者を対象として募集した。その結果、若年者群 15 名（平均年齢 22.8 ± 2.6 歳）と高齢者群 13 名（平均年齢 67.1 ± 8.9 歳）が分析対象となった。吐出法を用いて安静時唾液を採取した。その後、口腔内診査を行い、Probing pocket depth (PPD), Clinical attachment level (CAL), Bleeding on probing (BOP), および O'Leary の Plaque Control Record (PCR) を評価した。唾液からは、Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてエクソソーム濃縮液を精製し、さらに Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Invitrogen) を用いて totalRNA を抽出した。若年者群と高齢者群の total RNA のプールサンプルを用いて、3D-Gene[®]（東レ、鎌倉）による microarray 解析を行った。Microarray 解析において若年者群と高齢者群との間で発現量比が 0.5 未満あるいは 2.0 を超え、かつ novel out degree (NOD) が 4 以上である microRNA を特定し、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応を用いて対象者毎に microRNA 発現量を測定した。miR-24-3p の発現量と関連する因子を重回帰分析で解析し、Receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて miR-24-3p の高齢者に対する判別力を分析した。

結果：

若年者群と高齢者群の 2 群比較において、性別、唾液流量、平均 PPD、平均 CAL、および BOP 割合の全てにおいて、有意な差はなかった。一方、高齢者群の現在歯数と PCR については、若年者群よりも有意に値が小さかった。Microarray 解析では、2555 種類の microRNA のうち 6 種類 (miR-24-3p, miR-371a-5p, miR-3175, miR-3162-5p, miR-671-5p および miR-

4667-5p) が、若年者群と高齢者群の2群間で発現量比が0.5未満あるいは2.0を超え、かつNODが4以上であった。また、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応では、miR-24-3pのみ2群間で発現量に有意差を認め、高齢者群の値は若年者群よりも大きかった (Figure 1)。

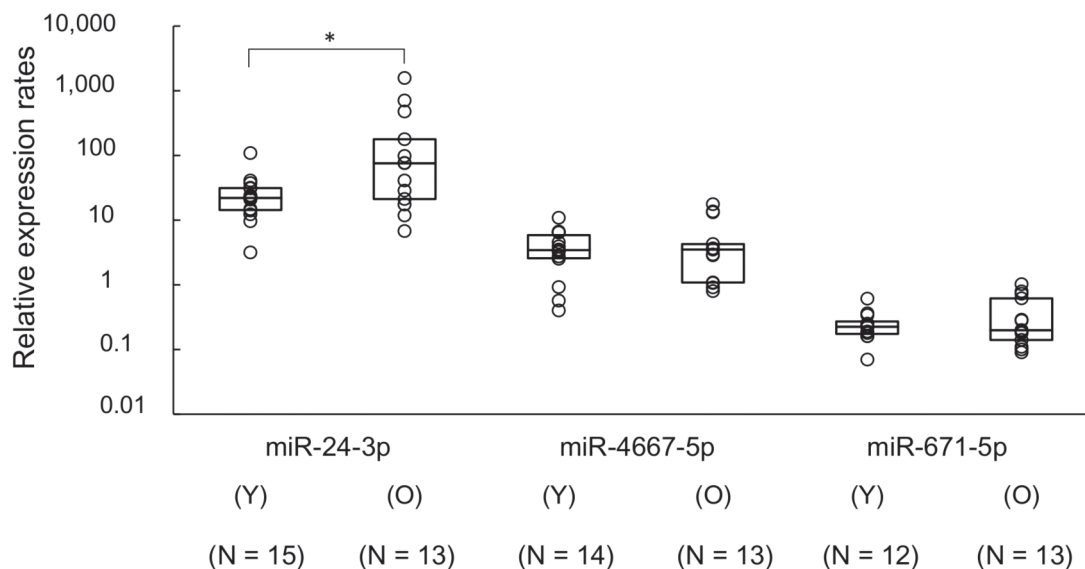


Figure 1. Comparison of relative expression rates of candidate miRNAs for aging biomarker between young and old groups. We performed TaqMan RT-qPCR to calculate the relative expression rates of three candidate miRNAs between young and old groups. We used miR-4739 as internal control miRNA. Circle plots represent relative expression rates of each sample. The horizontal lines within each box represent the 25, 50 and 75th percentiles. The P value was calculated by the Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test using REST 2009 software. * P value < 0.05. N : number of samples. Y : samples of young group. O : samples of old group.

また、重回帰分析の結果、高齢者群の miR-24-3p 発現量は、PPD と有意な正の相関を示し、唾液流量と有意な負の相関を示した。

これらの結果に基づき、miR-24-3p の高齢者に対する判別力を ROC 曲線を用いて検討した。対象集団を全体、唾液流量が中央値より少ない集団、PPD が中央値より深い集団として、3つの ROC 曲線を作成した。ROC 曲線下面積 (AUC) はそれぞれ、0.672, 0.959, 0.978 であった (Figure 2)。

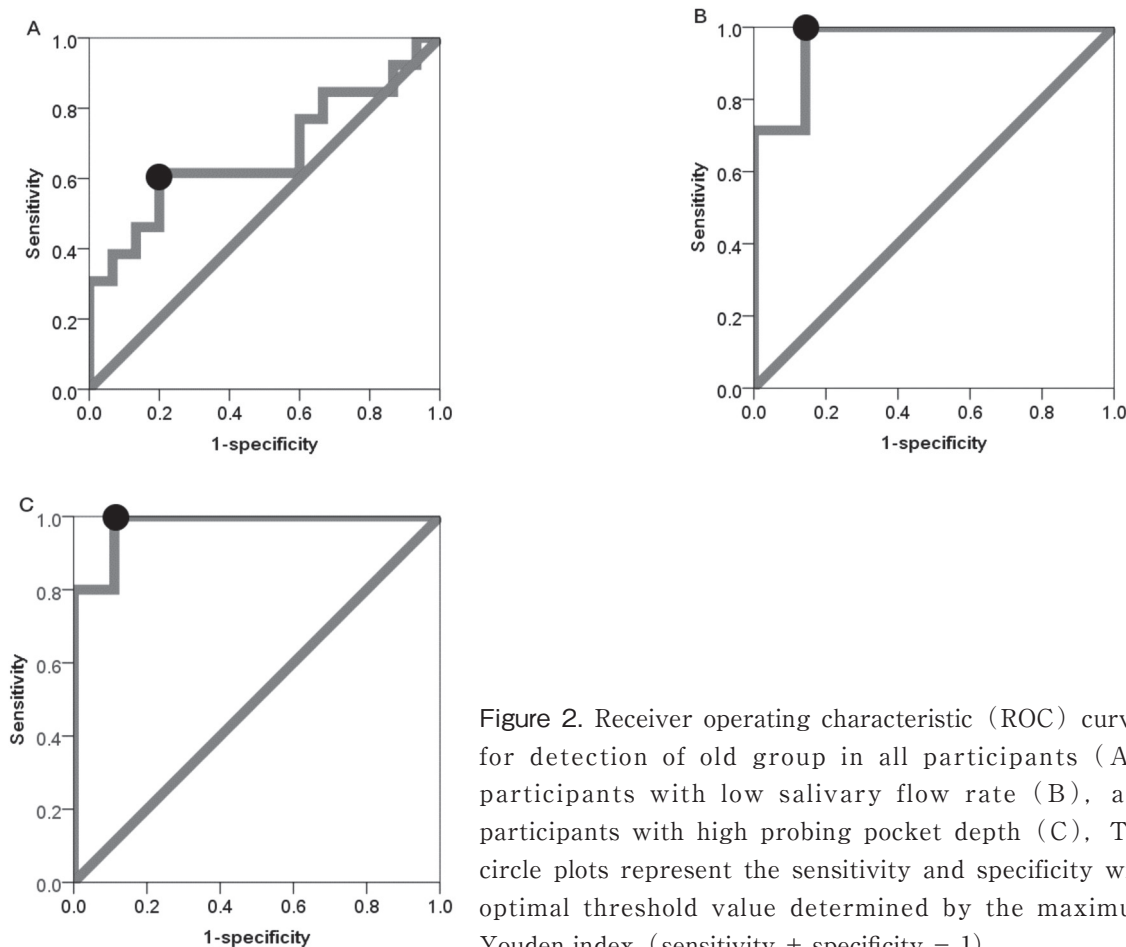


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curves for detection of old group in all participants (A, participants with low salivary flow rate (B), and participants with high probing pocket depth (C), The circle plots represent the sensitivity and specificity with optimal threshold value determined by the maximum Youden index (sensitivity + specificity - 1).

考 察：

本研究によって、唾液エクソソーム中 microRNA である miR-24-3p が、加齢マーカーとして有用であることが示唆された。また、ROC 曲線から、miR-24-3p の高齢者に対する判別力は、唾液流量の少ない集団および PPD の深い集団において高いことがわかった。すなわち、口腔内の状態を考慮することで miR-24-3p の高齢者に対する高い判別力が得られると考えられる。一般的に、加齢に伴って歯周状態は悪化し、唾液流量は減少する傾向にある。従って、同じ高齢者群においても、加齢の程度が大きい場合は、miR-24-3p の発現量が大きくなることが推測される。以上から、唾液エクソソーム中 miR-24-3p は、加齢の程度を個人ごとに評価するバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

本研究の限界として、外的妥当性が制限されていることが挙げられるため、様々な対象集団および年齢層において miR-24-3p の発現量を確認していくことが、今後望まれる。

成果発表：

学術雑誌

Machida T, Tomofuji T, Ekuni D, Maruyama T, Yoneda T, Kawabata Y, Mizuno H, Miyai H, Kunitomo M and Morita M. MicroRNAs in salivary exosome as potential biomarkers of aging. *Int J Mol Sci*, 16 : 21294-21309, 2015.

ポスター発表

町田達哉（*），友藤孝明，江國大輔，丸山貴之，米田俊樹，川端勇也，水野裕文，宮井久敬，國友宗義，森田学。「加齢マーカーとしての唾液エクソソーム中 microRNA の解析」，第 26 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会，山口，2015 年 9 月 27 日。

受賞

優秀ポスター賞，「加齢マーカーとしての唾液エクソソーム中 microRNA の解析」，第 26 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会，山口，2015 年 9 月 27 日受賞。