

ふりがな氏名	みよし しんすけ 三好 伸典
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 994 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Exploration of reference genes for the development of a diagnostic kit on vascular aging in human saliva （血管老化診断キット開発におけるヒト唾液中参照遺伝子の探索）
学位論文掲載誌	Dental Materials Journal 第 43 巻 第 号 令和 6 年 月
論文調査委員	主査 高橋 一也 教授 副査 柏木 宏介 教授 副査 本田 義知 教授

論文内容要旨

これまでに、血管老化に関する唾液中バイオマーカーの探索を目指して RT-qPCR を用いた分析を行ってきた。その際に用いる参照遺伝子は、血管老化と関連する因子によって発現が変化せず、なおかつ十分な発現をしていることが求められる。しかしながら、血管老化に関連する要因と唾液内参照遺伝子の発現を評価した論文は乏しい。本研究では、唾液を試料とした際の RT-qPCR において、血管老化と関連のある年齢、BMI、上腕-足首脈波伝播速度（baPWV）、血圧を変動因子として最も適した参照遺伝子を確立することを目的とした。被験者は大阪歯科大学附属病院職員 10 名（男 7 名、女 3 名、平均年齢 41.20 ± 13.67 ）とした。血圧脈波検査を行い、baPWV、足関節上腕血圧比、上腕収縮期血圧、上腕拡張期血圧、心拍数を計測した。唾液を採取し、定法に則り RNA 抽出、cDNA 合成、RT-qPCR を行った。参照遺伝子候補として ACTB、18S rRNA、B2M、GAPDH を用いた。RT-qPCR にて各遺伝子の発現を確認し、血管老化変動因子との関連性を検討した。発現量の比較には Ct (Threshold Cycle) 値を用いた。また、遺伝子発現解析アルゴリズムを用いて最適な参照遺伝子を評価した。参照遺伝子候補の中で最も発現量が高いのは 18S rRNA であった。血管老化変動因子を用いて被験者を分類し、遺伝子発現量での比較を行った結果、統計学的に有意な差は認められなかった。アルゴリズムを用いて示された最適な参照遺伝子候補は ACTB であった。

18S rRNA は ACTB より発現量が高く、有意差がみられた。また、ACTB は一部の被験者で、Ct 値が 35 以上と発現が微量であったことに対し、18S rRNA はすべての参加者において Ct 値は十分な発現量を示す 30 未満であった。発現量に差がみられた原因として、リボソーム RNA である 18S rRNA の細胞内の存在量が約 80% であることに対し、メッセンジャー RNA である ACTB の存在量は約 5% であるため、発現

量に有意差がみられたと考えられる。参照遺伝子の条件として、被験者の状態や標的組織に左右されず安定して発現することが望ましいとされている。以上より、ACTB はアルゴリズムにおいては最も安定していると示されたが、18S rRNA は発現量が高く、被験者間においても発現量が安定していたため、18S rRNA が参照遺伝子として推奨されると考えられる。今研究で候補とした参照遺伝子の発現量は血管老化変動因子の影響を受けず、血管老化患者に対して RT-qPCR を行う際に有用な候補参照遺伝子として ACTB、18S rRNA が挙げられた。18S rRNA は発現量が高く、安定していたため ACTB より、参照遺伝子として推奨されると考えられる。今後の展望として、発見した参照遺伝子を用いて血管老化に関連する唾液中バイオマーカーの探索を進める予定である。

論文審査結果要旨

PCR 検査を行う際に、標的遺伝子発現量を補正するために参照遺伝子が必要とされる。

参照遺伝子は、組織や細胞間で発現が安定している必要があり代謝や細胞機能維持に用いられる遺伝子を選択される。しかし、参照遺伝子の発現は標的組織や実験条件によって変動することが先行研究によって知られている。そのため、多くの参照遺伝子の発現検証が先行研究にて行われてきたが唾液中参照遺伝子の発現と血管老化変動因子による影響を評価した研究はこれまでにない。

本研究は、唾液を試料とした際の RT-qPCR において、血管老化と関連のある血圧、BMI、性別、上腕-足首脈波伝播速度 (baPWV)、年齢を変動因子として、最も適した参照遺伝子の確立を目的とした。

大阪歯科大学附属病院職員 10 名 (男性 7 名、女性 3 名平均年齢 41.2 ± 13.67) を対象とし、検査技師による血管老化変動因子 (血圧、BMI、性差、baPWV、年齢) の測定を行った。対象から安静時唾液の採取を行い、通法に従い RT-qPCR を行い候補参照遺伝子である ACTB、18S rRNA、B2M、GAPDH の発現量の比較、血管老化変動因子を用いた遺伝子発現の比較、参照遺伝子安定性解析アルゴリズムを用いた参照遺伝子の評価を行った。

今研究結果では、参照遺伝子の発現に血管老化変動因子の影響はみられなかった。候補参照遺伝子の中で最も発現が高かったものは 18S rRNA、アルゴリズムを用いた遺伝子発現解析結果において ACTB が最適な参照遺伝子であると示された。18S rRNA、ACTB について比較すると 18S rRNA は ACTB よりも発現量が高く、安定しているため唾液を試料とした際の RT-qPCR において適した参照遺伝子となりうることを示唆された。

以上の内容から、本論文は唾液中参照遺伝子の発現と血管老化変動因子による影響において新知見を得た点において、博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。