

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15785

研究課題名(和文) コメ由来プロテアーゼ阻害剤を用いた誤嚥性肺炎重症化制御法の検索

研究課題名(英文) Investigation for aspiration pneumonia severity control method using rice-derived protease inhibitors

研究代表者

寺尾 豊 (YUTAKA, Terao)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50397717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：米由来ペプチドのヒト細胞への細菌感染時の抗炎症作用などを評価するために、ペプチドで前処理したマウスマクロファージ由来RAW264.7細胞に細菌由来LPSを加え、炎症性サイトカインの転写活性をReal-time PCR解析した。また、関連因子の転写活性も測定した。次に、ペプチドの炎症制御効果を検証するため、RAW264.7細胞を用いたin vitroの系において、米由来ペプチドは、LPS誘導性炎症とRANKL添加による破骨細胞分化関連因子の転写活性の上昇をそれぞれ抑制した。本研究で選出した米ペプチドは、細菌感染による炎症などに対して生体防御効果を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the anti-inflammatory effect of bacterial infection of rice derived from rice, bacterial LPS was added to mouse macrophage-derived RAW 264.7 cells pretreated with peptide, and the transcriptional activity of inflammatory cytokines was measured by Real-time PCR And analyzed. Transcription activity of related factors was also measured. Next, in order to verify the inflammatory control effect of the peptide, in in vitro system using RAW 264.7 cells, the rice derived from the rice increased the transcription activity of osteoclast differentiation factor by LPS-induced inflammation and RANKL addition Respectively. It was suggested that the rice peptides selected in this study could have a defense effect against the inflammation caused by bacterial infection.

研究分野：歯学

キーワード：炎症制御

1. 研究開始当初の背景

「歯科領域 第三の感染症」とも称される誤嚥性肺炎は、耐性菌の増加と社会の高齢化に伴い、増加・難治化・重症化している。申請代表者は、過去一連の科研費課題研究から誤嚥性肺炎が重症化する機序として、細菌由来プロテアーゼがヒト好中球を傷害し、好中球内部からヒト由来プロテアーゼが放出され、肺組織に対して自己プロテアーゼが攻撃する、というモデルを明らかにしつつある。

本研究では、工学部教授の分担研究者が有するコメ関連のアプリケーションを用い、「コメ成分からプロテアーゼ阻害分子を選出・精製し、誤嚥性肺炎等の細菌感染症による炎症の重症化を制御する」ことを目指す。

またその際には、薬学博士の分担研究者が有する PC 上で各種阻害剤を三次元構造予測・改変するデジタル技術も併用し、医工薬連携の創薬イノベーション研究を試行する。

2. 研究の目的

本申請の工学部所属の分担研究者は、長年コメ由来の機能性分子の検索を推進し、コメ破砕液にプロテアーゼ阻害活性があることを見出している。そこで本研究では、代表者がこれまでの科研費課題による基礎的な研究で蓄積した仮説と手技に、工学部教授の分担研究者が有するコメ関連のアプリケーションを用い、医工薬連携の挑戦的な試みとして「コメ成分からプロテアーゼ阻害分子を選出・精製・改変し、好中球ならびに細菌プロテアーゼを不活化することで誤嚥性肺炎の重症化を制御する」分子の同定・作製を目指す。またその際には、薬学博士の分担研究者が得意とする、PC 上で各種化合物の効果を三次元構造から予測するプログラムも併用し、短期間かつ低コストでのデジタル創薬イノベーション手法にも挑戦する。最終的には、現在採択の科研費課題で構築したマウス肺炎感染モデルにおいて、同定・作製した分子の肺炎治療効果を検索する。

誤嚥性肺炎は重症化すると、患者の身体的負担に加え高額な医療費が生じる。そのため、予防と軽症段階での治療こそが重要と認識され、今年度からは厚生労働省指導により、誤嚥性肺炎予防のために手術後入院患者の医科から歯科への紹介が奨励され、且つ新たな医療保険点数の加算も認められるようになった。

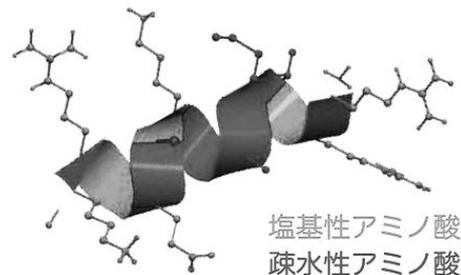
すなわち、誤嚥性肺炎の対策においては、歯科こそが期待を受けている。そして、その軽症化・治療補助する薬剤の開発は社会からの強い要望であり、成果の還元効果は高いといえる。さらに、薬剤の開発手法として、医工薬の手技融合により病態解析と創薬研究をシームレスに繋がれば、イノベーションが求められる昨今の研究者に大きな連携効果を及ぼすと推察される。プロテアーゼ阻害剤が肺炎重症化の制御に有効であると分子レベルから動物モデルまで一貫して証明できれば、臨床にも波及する学術的な新知見をもたらす。

3. 研究の方法

本申請は、二ヶ年での実施を計画する。研究初年度は、細菌プロテアーゼのコメ由来阻害分子を 2 種の実験系でスクリーニング・同定する。すなわち、カラムクロマトグラフィー操作による網羅的な分子量画分法、デジタル式の *in silico* ドッキングシミュレーション解析法、そして更なるバックアップとして、先行研究で見出した機能性コメ由来ペプチドに関し、別機能を指標とする再スクリーニング法も併用する。次いで、肺胞細胞を用いての *in vitro* 解析を先端機器 Luninex で進める。計画二年目は、コメ由来阻害分子をマウス肺炎球菌感染モデルに供し、炎症性サイトカイン遊離亢進や致死などに対する重症化抑制の効果を解析する。

4. 研究成果

本申請組織では計画に基づき、まず下図のようなコメ由来機能性ペプチドを数種類同定し構造予測を終えた。



$^1\text{RRLMAAKAESRK}^{12}$

続いて、本研究では、数種類の米由来ペプチドをスクリーニングした。ペプチドの抗炎症作用などの作用を検索するため、ペプチドで前処理したマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に細菌由来のリポ多糖 LPS を加え、炎症性サイトカインの転写活性を Real-time PCR で定量した。また、RANKL とペプチドを添加した培地にて RAW264.7 細胞を培養し、破骨細胞の分化マーカーの転写活性を計測した。次に、ペプチドの歯槽骨吸収に対する効果を測定するため、BALB/c マウスにおいてペプチドを1日1回、計6日間の接種を実施した。その1週間後に上顎骨を採取し、炎症による骨量の変化量を測定した。骨組織は脱灰後に凍結切片とし、TRAP 陽性の多核細胞を破骨細胞として算定した。

【結果と考察】RAW264.7 細胞を用いた系においては、米由来ペプチドは、細菌由来のリポ多糖 LPS 誘導性の炎症と RANKL 添加による破骨細胞分化マーカーの転写活性の増加をそれぞれ抑制した。BALB/c マウスの感染炎症モデル実験においては、米ペプチドの投与が炎症反応と歯槽骨吸収量を抑制し、さらに上顎骨切片での破骨細胞数を減少させた。

【結論】本研究で *in vitro* スクリーニングした米ペプチドは、*in vivo* モデルマウスで炎症などを抑制する効果を持つことが示唆された。

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 17 件) 全て査読有り

- (1) Domon H, Nagai K, Maekawa T, Oda M, Yonezawa D, Takeda W, Hiyoshi T, Tamura H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia. *Front Immunol*, in press.
- (2) Oda M, Kurosawa M, Yamamoto H, Domon H, Kimura T, Isono T, Maekawa T, Hayashi N, Yamada N, Furue Y, Kai D, Terao Y: Sulfated vizantin induces the formation of macrophage extracellular traps. *Microbiol Immunol*. in press.
- (3) Sakaue Y, Takenaka S, Ohsumi T, Domon H, Terao Y, Noiri Y.: The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: an *in vitro* study. *BMC Oral Health*, 18(1):52, 2018.
- (4) Sumitomo T, Mori Y, Nakamura Y, Honda-Ogawa M, Nakagawa S, Yamaguchi M, Matsue H, Terao Y, Nakata M, Kawabata S: Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins is involved in the pathogenesis of cutaneous infection. *Front Cell Infect Microbiol* 8:10, 2018.
- (5) Nagai K, Domon H, Maekawa T, Oda M, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, Arai Y, Yokoji M, Tabeta K, Habuka R, Saitoh A, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. *Cell Immunol*, 325: 14-22, 2018.
- (6) Kurosawa M, Oda M, Domon H, Isono T, Nakamura Y, Saitoh I, Hayasaki H, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes bacterial adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells without serum via PI3K/Akt signaling pathway. *Microb Infect*, 20: 9-18, 2018.
- (7) Oda M, Domon H, Kurosawa M, Isono T, Maekawa T, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y: *Streptococcus pyogenes* phospholipase A2 induces the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells and aorta of mice. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:300, 2017.
- (8) Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Oda M, Domon H, Iwase Y, Sawami T, Matsueda K, Terao Y, Ohshima H, Noguchi H, Hayasaki H: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. *Arch Oral Biol*, 81:110-120, 2017.
- (9) Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Oda M, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G: Differential expression and roles of secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and the wingless homolog Wnt5a in periodontitis. *J Dent Res*, May;96(5):571-577. doi: 10.1177/0022034516687248. Epub 2017 Jan 17.
- (10) Nagai K, Domon H, Oda M, Shirai T, Ohsumi T, Terao Y, Arai Y: Antimicrobial activity of ethylene-vinyl acetate containing bioactive filler against oral bacteria. *Dent Mater J*, 480:173-179, 2016.
- (11) Domon H, Oda M, Maekawa T, Nagai K, Takeda W, Terao Y: *Streptococcus pneumoniae* disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. *Sci Rep*, 6: 38013, 2016.
- (12) Takenaka S, Oda M, Domon H, Ohsumi T, Suzuki Y, Ohshima H, Yamamoto H, Terao Y, Noiri Y: Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture. *Biochem Biophys Res Commun*, 480: 173-179, 2016.
- (13) Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M: Membrane-binding mechanism of Clostridium perfringens alpha-toxin. *Toxins* 7(12), 5268-5275, 2015.
- (14) Yamamoto H, Oda M, Kanno M, Tamashiro S, Tamura I, Yoneda T, Yamasaki N, Domon H, Nakano M, Takahashi H, Terao Y, Kasai Y, Imagawa H: Chemical hybridization of Vizantin and Lipid A to generate a novel LPS antagonist. *Chem Pharm Bull* 64: 246-257, 2016.
- (15) Sakaue Y, Domon H, Oda M, Takenaka S, Kubo M, Fukuyama Y, Okiji T, Terao Y: Anti-biofilm and bactericidal effects of Magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* 60:10-16, 2016.
- (16) Kurosawa M, Oda M, Domon H, Saitoh I, Hayasaki H, Terao Y: *Streptococcus pyogenes* CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells. *Microb Infect* 18: 118-127, 2016.
- (17) Domon H, Uehara Y, Oda M, Seo H, Kubota N, Terao Y: Poor survival of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on inanimate objects in the public spaces. *MicrobiologyOpen* 5: 39-46, 2016.

(学会発表) (計 25 件)

- (1) Sumitomo T, Mori Y, Nakamura Y, Honda-Ogawa M, Yamaguchi M, Terao Y, Nakata M, Kawabata S.: Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins contributes to development of cutaneous infections. IUMS 2017, Singapore, Jul. 17-21, 2017.

- (2) Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Terao Y, Maeda T, Hajishengallis G: Differential Expression and Roles of Sfrp5 and Wnt5a in Periodontitis. 95th General Session & Exhibition of the IADR, San Francisco, CA, USA 2017.3.24, Abstracts & Program book: no2228, 2017.
- (3) 土門久哲, 寺尾 豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化カスケード 細菌由来病原因子と好中球由来防御因子のせめぎ合い, 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡国際会議場(福岡県博多市), 2018 年 3 月 28 日, 第 91 回日本細菌学会総会 プログラム集:28 頁, 2018.
- (4) 永井康介, 土門久哲, 前川知樹, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: Pneumococcal DNA-binding proteins released by autolysis induce inflammatory cytokine production. 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡国際会議場(福岡県博多市), 2018 年 3 月 27~28 日, 第 91 回日本細菌学会総会 プログラム集:49 頁, 2018.
- (5) 土門久哲, 國友栄治, 寺尾 豊: 口腔領域の病原細菌に対するヒノキチオールの抗菌作用解析, 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡国際会議場(福岡県博多市), 2018 年 3 月 27~28 日, 第 91 回日本細菌学会総会 プログラム集:58 頁, 2018.
- (6) 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: ヒト好中球を利用する肺炎球菌の感染メカニズム解析. 第 1 回 オーラルサイエンス研究会, ホテル飛鳥(新潟県長岡市), 2017 年 10 月 28 日.
- (7) 田村 光, 前川知樹, 米澤大輔, 土門久哲, 永井康介, 日吉 巧, 前田健康, 寺尾 豊: 食物由来ペプチドを用いた炎症と骨吸収制御機構の検索. 第 5 回五大学・口腔微生物研究会, 松本歯科大学(長野県松本市), 2017 年 9 月 19 日.
- (8) 日吉 巧, 土門久哲, 永井康介, 前川知樹, 米澤大輔, 田村 光, 吉田明弘, 寺尾 豊: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin および cytolethal distending toxin 組換え体の宿主細胞に対する作用解析. 第 5 回五大学・口腔微生物研究会, 松本歯科大学(長野県松本市), 2017 年 9 月 19 日.
- (9) 前川知樹, 小林泰浩, 土門久哲, 永井康介, 寺尾 豊, 前田健康: 抗炎症性分子 Del-1 は Wnt5a-Ror2 伝達経路を阻害し骨吸収を抑制する. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学(長野県松本市), 2017 年 9 月 16 日~18 日, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 プログラム・抄録集:286 頁, 2017.
- (10) 永井康介, 土門久哲, 前川知樹, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: 自己溶菌に伴い放出される肺炎球菌の菌体内病原因子の同定と分子解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学(長野県松本市), 2017 年 9 月 16 日~18 日, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 プログラム・抄録集:348 頁, 2017.
- (11) 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎の重症化に伴い誘導される宿主由来エラストーゼの病原性解析. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学(長野県松本市), 2017 年 9 月 16 日~18 日, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 プログラム・抄録集:510 頁, 2017.
- (12) 永井康介, 土門久哲, 前川知樹, 横地麻衣, 多部田康一, 寺尾 豊: 自己溶菌で漏出する肺炎球菌の菌体内病原因子の検索. 第 49 回レンサ球菌研究会, 新潟大学(新潟県新潟市), 2017 年 6 月 17~18 日.
- (13) 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: 肺炎球菌が誘導する宿主由来エラストーゼによる自然免疫抑制メカニズム. 第 49 回レンサ球菌研究会, 新潟大学(新潟県新潟市), 2017 年 6 月 17~18 日.
- (14) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 斎藤一誠, 早崎治明, 寺尾 豊: *Streptococcus pyogenes* の咽頭上皮細胞株への付着・侵入における CAMP factor と PI3K/Akt 経路との関係. 第 49 回レンサ球菌研究会, 新潟大学(新潟県新潟市), 2017 年 6 月 17~18 日.
- (15) 磯野俊仁, 小田真隆, 土門久哲, 前川知樹, 黒澤美絵, 寺尾 豊: *Streptococcus pyogenes* PLA2 による血管内皮細胞への単球付着メカニズム. 第 49 回レンサ球菌研究会, 新潟大学(新潟県新潟市), 2017 年 6 月 17~18 日.
- (16) 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 寺尾 豊: 肺炎球菌感染時における好中球エラストーゼの *in vitro* 機能解析. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台国際ホール(宮城県仙台市), 2017 年 3 月 20 日.
- (17) 土門久哲: 誤嚥性肺炎に対する新規感染制御法の開発に向けた多次元解析. 第 1 回 D³ 研究交流会, ときめいと(新潟県新潟市), 2017 年 1 月 24 日.
- (18) 土門久哲: 食品由来ペプチドを用いた誤嚥性肺炎感染制御法の検索. 第 1 回 U-go サロン, 新潟大学(新潟県新潟市), 2016 年 12 月 5 日.
- (19) 毛利泰士, 住友倫子, 松岡悠美, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾 豊, 中田匡宣, 川端重忠: *Streptococcus pyogenes* による皮膚病変の形成機構に関する解析. 第 69 回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会, 大阪市立大学(大阪府堺市), 2016 年 11 月 19 日.
- (20) 土門久哲, 小田真隆, 川端重忠, 寺尾 豊: 肺炎球菌性肺炎の重症化メカニズムの分子解析. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市), 2016 年 10 月 27 日.
- (21) 竹中彰治, 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 大墨竜也, 寺尾 豊, 野杵由一郎: 結核表層糖脂質誘導体の *Streptococcus mutans* バイオフィルム形成に与える影響. 日本歯科保存学会 2016 年度秋期学術大会, 松本歯科大学(長野県塩尻市), 2016 年 10 月 27 日.
- (22) 黒澤美絵, 小田真隆, 土門久哲, 齊藤一誠, 早崎治明, 寺尾 豊: A 群レンサ球菌の

PI3K/Akt 活性化因子を介した咽頭上皮細胞株への付着・侵入メカニズムの解析. 第 58 回歯科基礎医学会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 8 月 25 日.

(23) 前川知樹, 前田健康, 寺尾 豊: *Porphyromonas gingivalis* は補体 C5a と TLR を利用して免疫系から回避する. 第 58 回歯科基礎医学会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2016 年 8 月 25 日.

(24) 寺尾 豊, 土門久哲: *Streptococcus pneumoniae* の肺組織障害におけるカスケード機構の解析. 第 48 回レンサ球菌研究会, 長崎大学(長崎県長崎市), 2016 年 7 月 9 日.

(25) 土門久哲, 小田真隆, 寺尾 豊: 肺炎球菌の自己融解に起点を発する肺傷害のカスケード機構, 第 55 回新潟化学療法研究会, ANA クラウンプラザホテル(新潟県新潟市), 2016 年 7 月 2 日.

[図書](計 5 件)

(1) 寺尾 豊: 微生物学, 歯科衛生士書き込み式学習ノート 専門基礎科目編 人体の構造と機能/歯・口腔の構造と機能/疾病の成り立ち及び回復過程の促進, 医歯薬出版, 東京, 2018. 294

(2) 川端重忠, 小松澤 均, 大原直也, 寺尾 豊, 浜田茂幸: 口腔微生物学・免疫学 第 4 版第 3 刷改訂版, 医歯薬出版, 東京, 2018. 303

(3) 寺尾 豊, シリーズバイオセーフティ(これから微生物学系研究室を立ち上げる 3 つのポイント), BMSA ジャーナル, NPO 法人 BMSA 研究会出版部 28(3), 99-103, 2016.

(4) 寺尾 豊, 黒澤美絵, 劇症型溶血性レンサ球菌感染症(人食いバクテリア), 感染・炎症・免疫, 医学の門社, 7 月号, 76-78, 2016.

(5) Takenaka S, Oda M, Domon H, Wakamatsu R, Ohsumi T, Terao Y, Noiri Y: Adverse Influences of Antimicrobial Strategy against Mature Oral Biofilm. Microbial Biofilms - Importance and Applications (Dharumadurai Dhanasekaran, Nooruddin Thajuddin), Chapter 18, InTech, 2016.

[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

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

受賞

(1) 寺尾 豊: 内閣官房/文部科学省/厚生労働省/農林水産省, 第 1 回 AMR 対策普及啓発活動表彰

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 50397717

(2) 研究分担者

小田 真隆 (ODA, Masataka)
新潟大学・医歯学系・准教授
(平成 28 年 10 月より京都薬科大学・薬学部・教授)
研究者番号: 00412403

(3) 研究分担者

土門 久哲 (DOMON, Hisanori)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 00594350

(4) 研究分担者

前川 知樹 (MAEKAWA, Tomoki)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 50625168

(5) 研究分担者

谷口 正之 (TANIGUCHI, Masayuki)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号: 00163634

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し