

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11779

研究課題名(和文) 酵素活性阻害作用と抗菌性を発現する新規金属ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of new metal nanoparticles with inhibition of enzyme activity and antibacterial properties.

研究代表者

橋本 正則 (Hashimoto, Masanori)

大阪歯科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：00337164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子の細胞毒性の発現は、コア金属のイオン化による金属イオンの細胞への影響が主要な要因である。コア金属をイオン化傾向が低い金属にすることにより細胞毒性を大きく軽減できた。さらに、コア金属をポリマーで被覆することにより酵素と生物模倣機能が生じる。酵素との結合性を高め、活性の阻害作用を増加させるには、ナノ粒子の粒径を10 nm以下にしたシングル金属ナノ粒子が有効であることが分かった。シングル金属ナノ粒子は分散性が高く、酵素と反応しやすくなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人体に有害な酵素の活性を阻害できるなら新薬への応用の可能性が考えられる。そこで、本研究では、各種酵素活性を阻害する金属ナノ粒子を検索し、同時に抗菌性を有するナノ粒子をデザインする事を目的とする。金属ナノ粒子はコア金属の周囲にポリマーなどの粒子を被覆する構造を有し、そのため水などには凝集せず分散する性質を有する。基本的には、コア金属に毒性のないものを使用し、被覆膜に酵素との反応性が高い構造を設計すれば、実験目的が達成されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The main factor in the expression of cytotoxicity of nanoparticles is the effect of metal ions on cells by ionization of core metals. By changing the core metal to a metal with a low ionization tendency, cytotoxicity could be greatly reduced. In addition, coating the core metal with a polymer produces biomimetic functions for enzyme. It was indicated that single metal nanoparticles (a particle size of 10 nm or less) are effective for enhancing the binding property with an enzyme and increasing the inhibitory effect on their activity. Single metal nanoparticles are highly dispersible in water and easily react with enzymes.

研究分野：生体材料学

キーワード：金属ナノ粒子 酵素 生体安全性

1. 研究開始当初の背景

我々の過去の研究から、多くの金属ナノ粒子は比較的低濃度で、酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) 活性を阻害することが分かった。当時、世界的に見ても、類似の研究は数少ないものであった。さらに金属ナノ粒子の粒径が小さくなるほど、その効果は大きくなる。これはナノ材料の単位重量当たりの表面積が大きくなる、いわゆる“表面効果”に起因している。金属ナノ粒子が MMP の活性中心である金属イオン (Zn) と結合することにより、MMP 活性を阻害すると考えられている。その他、金属ナノ粒子と MMP の結合より MMP の mobility が変化することによる酵素活性の低下や MMP とナノ粒子の凝集により機能を発現する MMP の反応回数の減少などの原因が考えられる。また、コラーゲン基質などと結合することによりコラーゲン線維間の架橋剤として機能している可能性もある (コラーゲン線維網が強固になり、分解が困難になる、この反応も酵素活性阻害作用に含まれる)。さらにナノ粒子が分解される基質に結合することにより MMP の結合を阻害する影響 (拮抗阻害) も考えられる。しかし、MMP 以外の酵素との反応については明らかではない (世界的に見ても報告が皆無であった)。これらの事から、金属ナノ粒子は他の酵素の活性も阻害する可能性があると考えた。さらに、金属ナノ粒子の酵素活性阻害作用に加えて、生体安全性および抗菌性を同時に付与することにより新規機能性材料の開発に繋がると考えた。

2. 研究の目的

金属酵素の構造は、活性中心に触媒となるコアメタルがあり、周囲をポリマーやタンパク質で被覆されている。このナノ粒子外膜が特定物質の活性サイトに選択的に結合して活性を発現する。金属ナノ粒子はコアメタルの周囲をクエン酸やポリアクリル酸などで被覆されているが、その構造は酵素に類似する、“Biomimetics (生物模倣)” を有している。よって、金属ナノ粒子は生物学的環境において酵素およびその阻害剤としての機能を発現することができると考えられている。さらに、金属ナノ粒子は抗菌性を有するものが多いことから、抗菌剤としての臨床応用が期待されている。そこで本研究では *Streptococcus mutans* に対する酵素 (グルコシルトランスフェラーゼ) をターゲットにして、“酵素活性阻害作用と抗菌性を有する新規金属ナノ粒子の開発” を目的とする。

3. 研究の方法

「実験方法の概要」

各種金属ナノ粒子 (金、白金、銀および銅ナノ粒子) を作製および調整する。コアメタルの表面被覆材 (クエン酸、ポリアクリル酸など) を調整して、金属ナノ粒子の口腔内細菌 (*S. mutans*) および酵素 (GTF) への反応性を向上させる。また *S. mutans* を培養し、それらを培地 (寒天プレート) に金属ナノ粒子を所定濃度で一定期間曝露して、抗菌性の評価を生菌数測定により行う (CFU: Colony forming unit)。さらに、バイオフィーム形成量 (できれば不溶性グルカン形成量) をクリスタルバイオレット染色により定量的に評価する (Biofilm forming assay)。96 ウェルプレートにバクテリアと金属ナノ粒子を播種し、マイクロプレートリーダーを使用して定量評価する。さらに、*S. mutans* の GTF 活性を細菌内の mRNA (GTF マーカー) 量を RT-qPCR およ

び FACS で定量化して評価する。さらに、GTF 活性を定量化するアッセイキットを用いて金属ナノ粒子の GTF 活性の抑制効果を評価する。抗菌性を発現し GTF 活性および不溶性グルカン形成を有効に抑制する金属ナノ粒子構造（粒径）および組成（表面被覆材）の調整を行う。

【金属ナノ粒子の作製、調整およびキャラクタリゼーション】

・金属ナノ粒子（金、白金、銀）：コアメタルの粒径制御および表面被覆ポリマーの調整以下の実験機器を使用して、作製された金属ナノ粒子のキャラクタリゼーションを行う。

- ・透過型電子顕微鏡（TEM）/ 粒径および粒度分布
- ・動的光散乱法（DLS）/ 粒径および粒度分布
- ・紫外可視分光光度計（UV-Vis）/ 分散性、凝集性
- ・ゼータ電位測定装置（zeta-potential）/ 粒子表面電荷

【GTF 阻害性評価、抗菌性評価および形態観察】

（酵素活性阻害性評価）

- ・GTF 活性測定キット/ 金属ナノ粒子の GTF（POGLUT1）活性抑制効果の評価
- ・定量 PCR 装置（RT-qPCR）/ GTF 関連遺伝子（*gtf*-B,C,D）発現の解析
- ・フローサイトメーター（FACS）/ GTF 関連遺伝子（*gtf*-B,C,D）発現の解析

（*S. mutans* への抗菌性評価）

- ・スパイラルプレーター / 寒天培地への細菌の播種
- ・プレートリーダー / 生菌数測定（CFU）および Biofilm forming assay の定量化
- ・共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）/ Live & Dead 染色による形態観察
- ・走査型電子顕微鏡（SEM）/ 形態観察（細菌周囲の粒子局在の観察）
- ・透過型電子顕微鏡（TEM）/ 形態観察（細菌内の粒子局在の観察）

4 . 研究成果

最初に、金属ナノ粒子の抗菌性について寒天プレートを使用した CFU で評価した。図 1 にその結果を示す。生体安全性が高い金ナノ粒子を使用して実験を行ったが、抗菌性は低いことが明らかとなった。銀や、特に銅粒子などのコアメタル構成金属のイオン化傾向が比較的大きい金属を使用すると抗菌効果は増加するが、細胞毒性も高くなる。図 2 にバイオフィーム形成量の定量評価の結果を示す。銀ナノ粒子ではかなり効果的にバイオフィームの形成を阻害した。しかし、コアメタルを金にした場合は、バイオフィームの形成阻害作用は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。

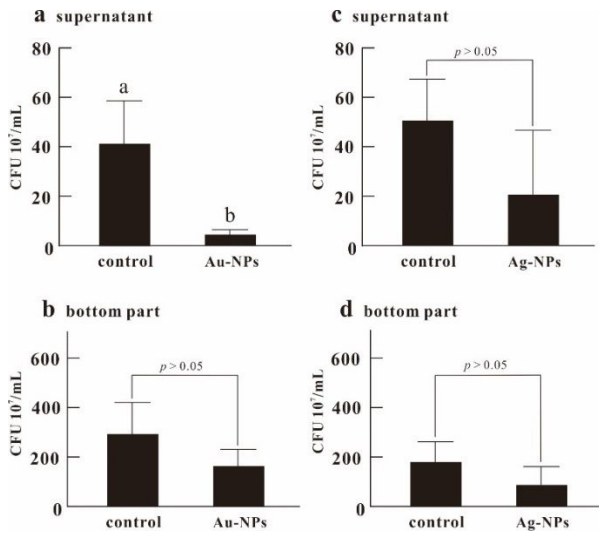


図1：抗菌性評価 (CFU)(Hashimoto *et al.*, Nano-biomedicine より)

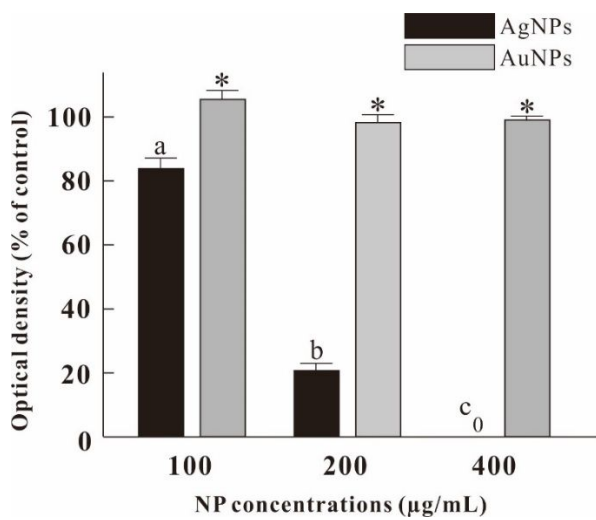


図2：バイオフィーム形成量の評価 (Biofilm forming assay)(Hashimoto *et al.*, Nano-biomedicine より)

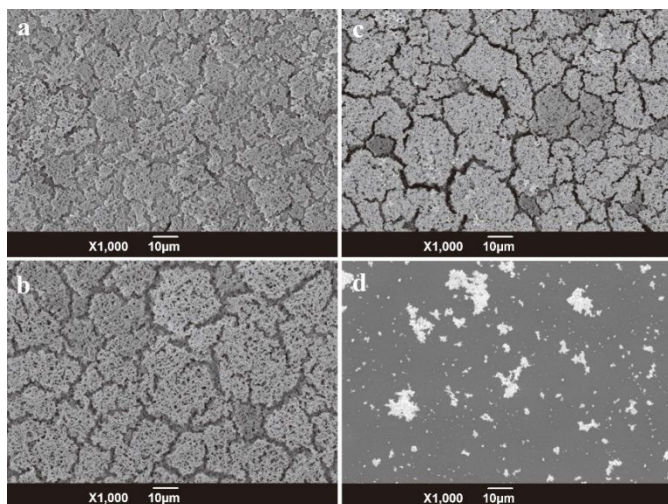


図3：バイオフィームのSEM像 (Hashimoto *et al.*, Nano-biomedicine より)

プレート上に均一なバイオフィームが形成されているが、阻害作用を受けた試料においては細菌がまばらに観察されるだけである。この多くは死菌であると考えられる。

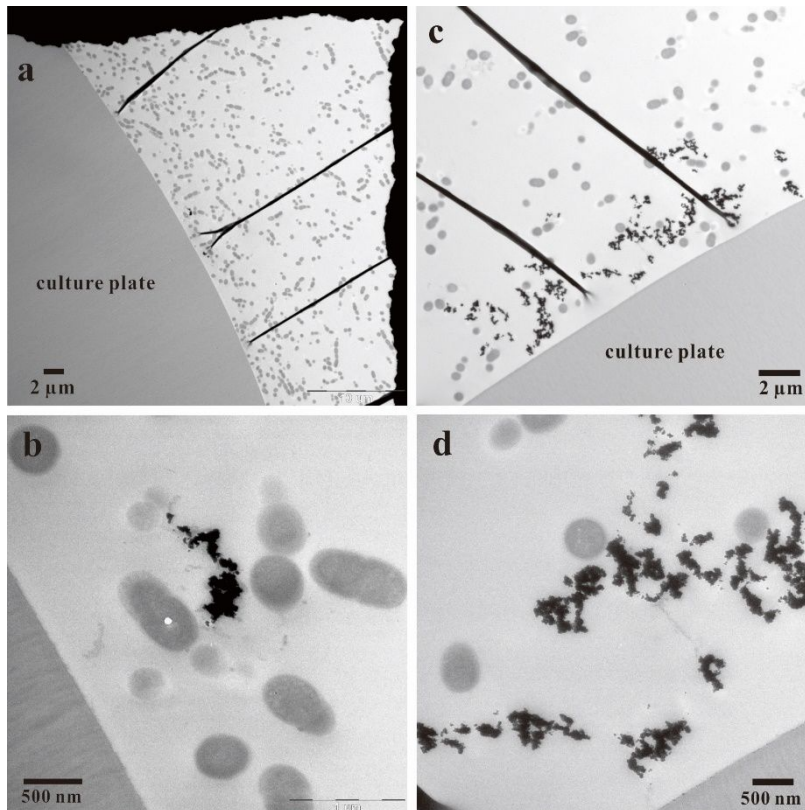


図4：細菌と金属ナノ粒子の相互作用（TEM像）（Hashimoto *et al.*, Nano-biomedicine より）
細菌周囲に観察される金属ナノ粒子は凝集している像が多い。全粒子に対して細菌に付着している粒子は少ない。

酵素活性阻害性評価については、GTF 活性測定キット/ 金属ナノ粒子の GTF(POGLUT1) 活性抑制効果の評価は、実験を行ったが、うまくデータ採集が出来なかった。原因を検討中である。定量 PCR 装置 (RT-qPCR) を使用して GTF 関連遺伝子 (*gtf-B,C,D*) 発現の解析については、進行中ではあるが、総合的な結果は得られていない。

まとめ

ここで示した実験結果では、生体安全性の高い金ナノ粒子は抗菌性およびバイオフィーム形成阻害作用が弱い。追加研究から、粒子径を小さくすることにより種々の効果を発現することが明らかとなった。粒子径を 10 nm 以下のシングルスケール（シングル「一桁」金属ナノ粒子）にした場合、上記と類似実験により抗菌性の発現とバイオフィームの形成阻害作用が確認された。サイズ径が小さいシングルナノ粒子では粒子の水や培養液中での分散性が高まり凝集体の形成が極めて少なくなる。それら粒子は細菌の菌体外の被膜と容易に付着する。その反応については TEM 観察により明らかとしている。この反応は、コアメタルや被覆材の種類を変えた場合でも同様に観察される。今後、付着した後の細菌の反応や変化について実験を行い、研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 9.Hashimoto M, Honda Y.	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Effect of nanoparticles on biofilm-growth disruption: silver and platinum nanoparticles with an identical capping agent.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nanobiomedicine	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11344/nano.10.61	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto M, Yanagiuchi H, Kitagawa H, Yamaguchi S, Honda Y, Imazato S.	4. 巻 9(2)
2. 論文標題 Effect of metal nanoparticles on biofilm formation of Streptococcus mutans.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nanobiomedicine	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto M, Yanagiuchi H, Kitagawa H, Honda Y.	4. 巻 9(2)
2. 論文標題 Inhibitory effect of platinum nanoparticles on biofilm formation of oral bacteria.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nanobiomedicine	6. 最初と最後の頁 77-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本正則、本田義知
2. 発表標題 金ナノ粒子の粒径と菌体付着および初期バイオフィルム形成阻害の関係
3. 学会等名 第73回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳内裕朝、北川晴朗、山口 哲、本田義知、今里 聡、橋本正則
2. 発表標題 金属ナノ粒子のバイオフィルム形成阻害
3. 学会等名 日本歯科理工学会・近畿・中四国支部地方会セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hashimoto M, Kitagawa H, Yamaguchi S, Honda Y, Imazato S.
2. 発表標題 Effect of metal nanoparticles on inhibition of biofilm formation.
3. 学会等名 65th Annual Meeting of Japanese Division Meeting 2017/JADR (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本正則、本田義知
2. 発表標題 銀ナノ粒子の粒径がバイオフィルム形成に与える影響
3. 学会等名 第71回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	佐々木 淳一 (Jun-ichi Sasaki) (50530490)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	北川 晴朗 (Haruaki Kitagawa) (50736246)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関