

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19273

研究課題名（和文）DPPは小児の根尖性歯周炎治療における指標となり得るか？

研究課題名（英文）Can dipeptidyl peptidase be an biomarker in the treatment of apical periodontitis?

研究代表者

西俣 はるか（Nishimata, Haruka）

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：10755755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、我々は黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）V8株のグルタミン酸特異的プロテアーゼ（GluV8）およびDPP11による二段階切断法を用い、P2-P2'位までのアミノ酸残基を結合したテトラペプチジル-4-methylcoumaryl-7-amide（MCA）を基質としてプライムサイド残基の影響について検討を行い、P1'位に疎水性アミノ酸を配置した基質へ特異的にペプチダーゼ活性が上昇する可能性について見出した。また、micro-CTを用いた解析で、乳歯分岐部への歯周炎感染経路を検討し、これを発表したため報告する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究における口腔サンプルを用いたDPP活性測定により、歯周病原性菌の存在の有無が予測されたことから、DPP活性測定は歯周病原性菌のバイオマーカーとして有用であることが示唆されている。我々の研究対象であるdpp遺伝子の一部は、ヒトにも存在することが既知であり、ペプチド分解によって惹起される疾患の制御に繋がる可能性を持つ。本研究結果は、歯周疾患だけでなくこれら全身疾患への疾患予防・治療法確立への将来的な寄与が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we used a two-step cleavage method with glutamate-specific protease (GluV8) and DPP11 from *Staphylococcus aureus* strain V8 to examine the effect of prime-side residues on the peptidation of tetra-peptidyl-4-methylcoumaryl-7-amide (MCA), a substrate with amino acid residues bound at the P2-P2' position. We found a potential elevation of exopeptidase activity of Glu-specific endopeptidase I/GluV8 mediated by hydrophobic P1'-position amino acid residue. We also investigated the infection pathway of furcal lesions of deciduous teeth by micro-CT analysis.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯周病原性菌 ジペプチジルペプチダーゼ DPP

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は歯周病原性菌のジペプチジルペプチダーゼ (DPP) を基点とし、その病原性に関与するペプチド分解系の全容解明およびその阻害経路確立を目指し、本研究を起案した。小児のう蝕は成人のそれと比較すると、急速かつ深部へ進行する穿通性う蝕であるのが特徴である。炎症は容易に歯髄や根尖部周囲組織へ波及し、この際、口腔内では歯肉の腫脹が観察されることが多い。炎症が波及し、急性症状を伴う感染根管内や根尖病巣部より分離されるのが、*P. endodontalis* である。糖非発酵性の偏性嫌気性菌で根尖性歯周炎の起炎菌とされる同菌は、同属の *P. gingivalis* のようなジンジパイン様活性を有さないが、ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) を持つ点で共通している。DPP については、本研究開始当初時点で既に我々などにより *Porphyromonas* 属の DPPs は同定されており、性状解析の結果からこれら DPP 群の活性特異性が異なることも判明していた。例えば、我々のグループが初めて見出した DPP11 は、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (Asp) とグルタミン酸 (Glu) に特異的な活性を持っており、図 1 に示すように、ペプチド鎖の一端から 2 番目にある Asp もしくは Glu の位置でアミド結合を切断することが既知であった (J Biol Chem. 2012)。また、同じ *Porphyromonas* 属においても *P. endodontalis* と *P. gingivalis* では DPP 群の活性差があることも報告しており (PLoS ONE. 2014)、DPP 群が歯周病原性菌の病原性に寄与している可能性があるかと仮定して本研究を開始した。

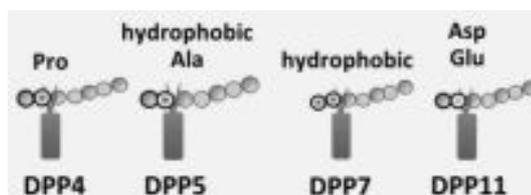


図 1 各 DPP 群のペプチド鎖切断位置

(2) 研究遂行にあたっては、歯周炎の病原性解明のため、先述した DPPs の活性測定といった生化学的アプローチの他、小児歯周炎で歯を抜歯することとなる大きな要因の一つである分岐部病変の観察といった硬組織の微細構造解析も、多面的なアプローチを行うため試みることとした。同観察は、報告例が多数あり我々も経験があった既存の組織学的手法ではなく、乳歯歯周炎に罹患した歯についての報告例が乏しく、我々にとっても新規手法であった micro-CT を用いる手法を、その被験歯を侵襲しないという利点に着目し実施することとした。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、歯周炎と DPP との関連を探索するために想起した。この歯周炎は、近年全身疾患との関連が指摘されている。そのメカニズムは解明途中であるが、炎症状態にある歯周組織からの病原菌や、病原因子の侵入に起因すると考えられる。本研究で細菌 DPP の解明が進めば、DPP を阻害し生体内での DPP 保有菌の生育を抑制することで、歯周疾患の予防や治療が行える可能性があるとして研究遂行に至った。実際、我々の歯学研究分野で重要な、歯周病原性細菌である *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* は、どれも DPP4 活性を有しており、これら細菌 DPP4 活性はヒト DPP4 阻害剤で阻害される。しかし、研究開始時点で *Porphyromonas* 属がオリゴペプチドを代謝する過程を、DPP 等の既知のペプチダーゼのみで説明することは困難であった。本研究開始前の我々の報告では、以前から知られていた P1 位アミノ酸残基への DPP 活性の基質特異性を考慮し、ジペプチジル MCA を用いていたが、DPP によるオリゴペプチド分解がより幅広く行われている可能性を探索する目的には、その他に C 末の P1' 位以降のアミノ酸残基による活性への影響を検討することが必要であると考え、本研究ではテトラペプチジル-4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) を基質とし、各 DPP の活性測定を行った。

(2) 乳歯の歯周炎では、歯根分岐部直下に病巣を認める症例が頻発する。歯周病原性菌の感染拡大を阻害する上で、その感染拡大について硬組織学解析を行うため本研究を想起した。従来から組織学的手法による副根管の観察は行われてきたが、同手法は試料を破壊し二次的な観察が行えるに留まる。我々は、三次元的に微細構造の観察が行える micro-CT にて歯周炎感染にて抜去適応となった乳歯に侵襲を加えることなく観察し、分岐部へのう蝕感染拡大を検討することを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 従来我々は、DPP が P1 位のアミノ酸残基に基質特異性を持つことを利用し、その基質として本研究で用いたテトラペプチジル MCA ではなく、ジペプチジル MCA を用いて各種 DPP の活性測定を行ってきた。具体的には以前の報告に挙げているように、DPP4 特異的な基質として GP-MCA、DPP5 には KA-MCA、DPP7 には ML-MCA や FM-MCA、そして DPP11 には LD-MCA を使用してきた。

しかし、先述したように P1 位の非疎水性かつ中性のアミノ酸 (Thr, His, Gly, Ser, Gln) や親水性アミノ酸 (Asn) に特異的な DPP は存在しないと研究開始時点では考えられており、*Porphyromonas* 属にてジペプチド分解能を有する既知の DPP 等だけでは、オリゴペプチドを分解するメカニズムは説明しきれなかった。そこで P1 位のアミノ酸残基を重視し設計したジペプチジル MCA にて基質特異性を計るのではなく、P1' 位のアミノ酸残基による活性への影響を検討するため、テトラペプチジル MCA を本研究では採用した。本研究では、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) V8 株のグルタミン酸特異的プロテアーゼ (GluV8) および DPP11 による二段階切断法を用い、P2-P2' 位までのアミノ酸残基を結合したテトラペプチジル MCA を基質としてプライムサイド残基の影響について検討を行った (Biochimie, 2024)。

(2) 研究者の所属する当大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て (許可番号 20032330), 本研究は実施した。分岐部病変を有し抜歯適応となった乳臼歯の抜歯にて当大学病院を訪れ、本研究の意図に同意された方 (被験者) より抜歯後貸与された供試歯を micro-CT (Bruker 社製 SkyScan1272) を用い、ピクセル分解能 10 μ L, 選択フィルタ Cu 0.11mm にて撮影。NRecon ソフトウェアにて画像再構成を行い、得られた三次元データから断面像の観察を行った。供試歯は、本研究の撮影に用いたのち、速やかに被験者へ返却した。

4. 研究成果

(1) 我々は黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) V8 株のグルタミン酸特異的プロテアーゼ (GluV8) および DPP11 による二段階切断法を用い、P2-P2' 位までのアミノ酸残基を結合したテトラペプチジル MCA を基質としてプライムサイド残基の影響について検討を行い、P1' 位に疎水性アミノ酸を配置した基質へ特異的にペプチダーゼ活性が上昇する可能性について見出した。また、P1' 位に非疎水性アミノ酸残基を有するテトラペプチジル MCA に対する分解能を検討したところ、DPP7 において緩徐な分解能を確認した。従来、似た基質特異性を持つと考えられていた DPP5 と DPP7 が、P1 位以外のアミノ酸残基には異なる基質特異性を有し、より効率的にオリゴペプチド分解を行っている可能性が示唆された。

(2) 供試歯の micro-CT 撮影三次元データから観察された副根管の縦断・横断面画像を図 3 に示す。本来の組織学的手法においては、切片作製により歯の切断面のみでの二次元所見しか得られなかったが、本研究で用いた micro-CT 撮影により X, Y, Z 軸方向からの断面像観察や画像データからの立体構造構築・解析が可能となった。供試歯では、髓床底部から分岐部までの歯質内に、副根管が存在しているものが確認された (図 4)。一方、髓床底部から分岐部まで貫通した副根管を有さなかった歯も存在した。髓床底部歯質そのもののう蝕が進行していると思われる画像所見も認められたことから、乳臼歯の歯周炎は、髓床底部への感染拡大後に歯質・あらゆる形態の副根管を経由して分岐部に至ることが示唆され、副根管の存在により髓床底部歯質内での感染の進行がより速やかに成るため、感染は根尖部歯周組織へ波及する以前に根分岐部まで進行することが考えられた。以上より本研究から、乳歯の微細構造解析への micro-CT の有用性が示された。

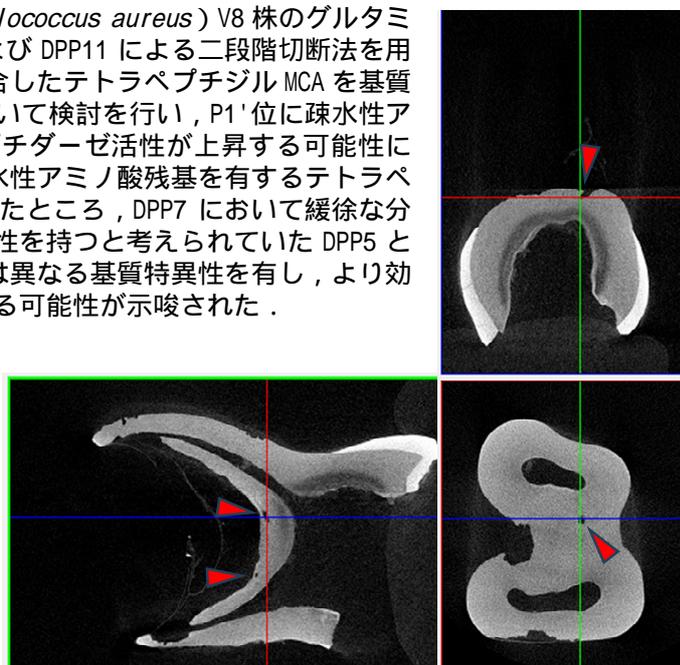


図 3 乳歯分岐部病変部の直交 3 断面画像。赤矢印は副根管を示す。

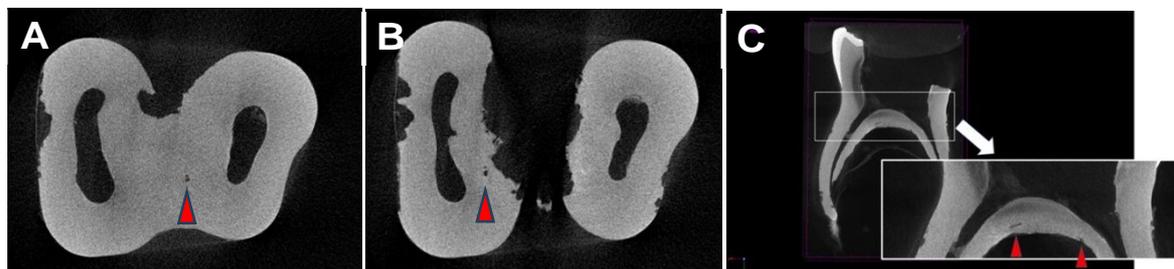


図 4 乳臼歯の分岐部断面画像。赤矢印は副根管を示す。A: 分岐部吸収面より歯冠側歯質の水平断。B: 分岐部吸収を認める歯質の水平断。C: 分岐部縦断面および同部位の拡大像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nemoto Takayuki K., Nishimata Haruka, Shirakura Kana, Ohara-Nemoto Yuko	4. 巻 220
2. 論文標題 Potential elevation of exopeptidase activity of Glu-specific endopeptidase I/GluV8 mediated by hydrophobic P1 -position amino acid residue	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2023.12.010	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 Nishimata Haruka, Kamasaki Yoko, Satoh Kyoko, Kinoshita Risako, Omori Keisuke, Hoshino Tomonori	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Suppression of Streptococcus mutans Biofilm Formation and Gene Expression by PRG Barrier Coat: A Molecular and Microscopic Study for Preventing Dental Caries	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oral Health & Preventive Dentistry	6. 最初と最後の頁 73-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3290/j.ohpd.b4928623	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 0件）

1. 発表者名 白倉佳奈, 西俣はるか, 伊藤李香, 木下莉沙子, 澤瀬萌々々, 川崎華子, 日高聖, 西口美由季, 田上直美
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisにおける非疎水性中性ペプチドを分解するペプチダーゼの同定
3. 学会等名 第62回日本小児歯科学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 木下莉沙子, 田上直美, 西口美由季, 日高 聖, 近藤好夫, 西俣はるか, 伊藤李香, 白倉佳奈, 藤原卓
2. 発表標題 晩期残存乳歯の生存率に関する研究
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下莉沙子, 西口美由季, 西俣はるか, 伊藤李香, 白倉佳奈, 近藤好夫, 藤原卓
2. 発表標題 乳歯分岐部病変のmicroCTを用いた分析
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西俣はるか, 藤原 卓
2. 発表標題 歯周病原性菌バイオマーカーとしてのジペプチジルペプチダーゼの有用性
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	根本 孝幸 (Nemoto Takayuki) (90164665)		
研究協力者	根本 優子 (Ohara-Nemoto Yuko) (10164667)		

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
---------	---------