

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09907

研究課題名(和文) 歯周病菌と免疫抑制型受容体の相互作用を標的とした新規歯周病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel periodontal disease treatment targeting the interaction between periodontal bacteria and immunosuppressive receptors.

研究代表者

三宅 靖延 (Miyake, Yasunobu)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：10392143

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)：ジンジパインの阻害が、歯周病菌に対する新規治療戦略となる可能性を見出し、ジンジパイン阻害剤の網羅的な探索を行い、ペプチド系阻害剤2種類と低分子阻害剤1種類を見出した。これらのジンジパイン阻害剤は、ヒト末梢血単球による歯周病菌に対する免疫応答を増強してIL-8やTNFの産生を亢進させた。さらに、ジンジパイン阻害剤は、マウスを用いた歯周病菌の全身播種モデルにおいて、抹消血、脾臓、肺における好中球と単球の浸潤を促進し、TNFやIL-6の発現を亢進させ、各組織での歯周病菌のクリアランス速度を早めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病菌はジンジパインを介して宿主免疫応答を抑制しており、ジンジパイン阻害剤は、その免疫抑制を解除することで、宿主免疫応答を増強できることが明らかとなった。これにより、ジンジパイン阻害剤が、歯周病菌に対する新規治療薬として有望である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Finding that inhibition of gingipain may be a novel therapeutic strategy against periodontal disease bacteria, we conducted a comprehensive search for gingipain inhibitors and found two peptide-based inhibitors and one small molecule inhibitor. These gingipain inhibitors enhanced the immune response to periodontal disease bacteria by human peripheral blood monocytes and increased the production of IL-8 and TNF. In addition, these gingipain inhibitors promoted neutrophil and monocyte infiltration in the peripheral blood, spleen, and lungs, enhanced TNF and IL-6 expression, and accelerated the clearance rate of periodontal bacteria in each tissue in a systemic infection model of mice.

研究分野：感染免疫学

キーワード：歯周病菌 免疫回避 治療標的

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周病菌の感染により引き起こされる炎症性疾患であり、日本人の半数以上が罹患している。歯肉炎や歯槽膿漏、歯の脱落といった口腔内トラブルだけでなく、近年では歯周病菌が炎症部位から血流を介して全身に拡散し、心筋梗塞や糖尿病などの他臓器疾患を増悪させることが報告されており、臨床的重要性は益々高まっている。歯周病に対しては、抗菌剤による除菌が主な治療戦略であり一定の効果を上げている。しかしながら、近年抗菌剤の乱用による耐性菌の出現が社会問題化しており、抗菌剤に頼らない新たな治療法の開発が切望されている。申請者は、病原体認識の最前線であるマクロファージや樹状細胞などの免疫細胞に発現するレクチン受容体の“Siglec5”が、歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) を認識することを見出している。Siglec5 は免疫細胞の活性化を抑制する、いわゆる“免疫チェックポイント分子”であり「歯周病菌と Siglec5 の相互作用による免疫回避機構」の存在が明らかとなった。Siglec5 を欠損した細胞では、歯周病菌に対する免疫応答が強まることから、「歯周病菌と Siglec5 の相互作用による免疫回避機構」を遮断することが新たな治療戦略となる可能性が示唆された。Siglec5 と歯周病菌の相互作用には、歯周病菌が産生するタンパク質分解酵素ジンジパインが Siglec5 を切断することが“鍵”であることを見出している。ジンジパイン欠損した歯周病菌は、Siglec5 を切断できないため、Siglec5 と相互作用できず、宿主免疫応答が増強することから、ジンジパインが分子標的として有効であることが判明した。

2. 研究の目的

ジンジパイン阻害剤を化合物ライブラリーから探索し、それを用いて歯周病菌に対する治療効果を *in vitro* および *in vivo* で評価することで、「歯周病菌と Siglec5 の相互作用による免疫回避機構」を標的とした新規治療戦略の有効性を示す。

3. 研究の方法

ジンジパイン阻害剤の探索 (1st. screening)

タンパク質分解酵素ジンジパインのリコンビナントタンパク質を大腸菌で作成しており、発色基質 D-FPK-pNA にて酵素活性を確認済みである。ここに種々の化合物ライブラリーを加えて、酵素活性を阻害するものを探索する。

歯周病菌による Siglec5 切断の評価 (2nd. screening)

Siglec5 を発現させた細胞株を作成しており、歯周病菌と培養することで Siglec5 が切断されて細胞表面発現が減少することを、フローサイトメトリーにて確認済みである。ここにジンジパイン阻害剤を加えて、Siglec5 の切断を阻害するかを検討する。

ジンジパイン阻害剤の治療効果の検討 (*in vitro*)

上記探索で見出したジンジパイン阻害剤を、歯周病菌とヒト単球の共培養系に添加し、免疫応答が強化されるかを検討する。

ジンジパイン阻害剤の治療効果の検討 (*in vivo*)

歯周病菌の全身拡散モデルとして、歯周病菌の尾静脈投与を行い、ジンジパイン阻害剤により、免疫応答を強化されるか、その結果として菌のクリアランスが亢進するかを検討する。

4. 研究成果

ジンジパイン阻害剤の網羅的な探索により、ペプチド系阻害剤 2 種類と低分子阻害剤 1 種類が見出された。ペプチド系阻害剤は、ジンジパインに対する特異性が高いが、有効濃度が高かった。低分子阻害剤は、ジンジパイン以外の酵素に対する阻害活性が報告されていたが、有効濃度が低かった。

ペプチド系阻害剤、低分子阻害剤いずれも、歯周病菌による Siglec5 の切断を強く阻害した。有効濃度は、の結果と同様で、ペプチド系阻害剤は高く、低分子阻害剤の方が低かった。

ヒト単球細胞株の U937 細胞と、ヒト末梢血から精製した単球による検討を行った。どちらの細胞に対しても、ペプチド系阻害剤、低分子阻害剤いずれも、IL-8 と TNF α の産生を増加させた。Siglec5 を欠損させた U937 細胞では、増強効果が失われることから、ジンジパイン阻害剤の作用は Siglec5 を介していることが確認された。

低分子阻害剤は単回事前投与により、抹消血、脾臓、肺における好中球と単球の浸潤を促進し、TNF α や IL-6 の発現を亢進させた。それにより、各組織での歯周病菌のクリアランス速度が早まった。一方で、ペプチド系阻害剤では、そのような効果は認められなかった。これは

で見られた有効濃度の高さが原因と考えられた。

以上の結果より、ジンジパイン阻害剤は、歯周病菌による Siglec5 を介した免疫抑制機構を阻害することで、宿主免疫応答を強化することが明らかとなった。これにより、ジンジパイン阻害剤が、歯周病菌に対する新規治療薬として有望である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Akiko, Hara Megumi, Ashenagar Mohammad Said, Tokiya Mikiko, Sawada Takeshi, Iwasaka Chiharu, Furukawa Takuma, Kitagawa Kyoko, Miyake Yasunobu, Hirota Yoshio	4. 巻 10
2. 論文標題 Variant Allele of ALDH2, rs671, Associates with Attenuated Post-Vaccination Response in Anti-SARS-CoV-2 Spike Protein IgG: A Prospective Study in the Japanese General Population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines10071035	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 Kusagawa Eiichi, Okuda Chiharu, Yamaguchi Rikako, Nakano Kaori, Miyake Yasunobu, Kataoka Takao	4. 巻 23
2. 論文標題 Cucurbitacin B Down-Regulates TNF Receptor 1 Expression and Inhibits the TNF- α -Dependent Nuclear Factor κ B Signaling Pathway in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7130 ~ 7130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23137130	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 Tanaka Yumiko, Nakao Ayaka, Miyake Yasunobu, Higashi Yukina, Tanigaki Riho, Kataoka Takao	4. 巻 22
2. 論文標題 Small Molecule Inhibitors Targeting Nuclear Factor κ B Activation Markedly Reduce Expression of Interleukin-2, but Not Interferon- γ , Induced by Phorbol Esters and Calcium Ionophores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13098 ~ 13098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222313098	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 Vo Nghia Trong, Sasaki Saki, Miyake Yasunobu, Nguyen Nhan Trung, Dang Phu Hoang, Thi Nguyen Mai Thanh, Kataoka Takao	4. 巻 890
2. 論文標題 -Conidendrin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor- α in human lung adenocarcinoma A549 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173651 ~ 173651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Vo Nghia Trong, Sasaki Saki, Miyake Yasunobu, Nguyen Nhan Trung, Dang Phu Hoang, Thi Nguyen Mai Thanh, Kataoka Takao	4. 巻 890
2. 論文標題 -Conidindrin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor- in human lung adenocarcinoma A549?cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173651 ~ 173651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyake Yasunobu, Yamasaki Sho	4. 巻 1204
2. 論文標題 Immune Recognition of Pathogen-Derived Glycolipids Through Mincle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-1580-4_2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasunobu Miyake, Mariko Sakai, Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Identification of PILRA as a novel b-glucan receptor that bind to pathogenic fungus, Aspergillus fumigatus.
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2023 Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasunobu Miyake, Hiroki Yoshida
2. 発表標題 Identification of leukocyte immunoglobulin-like receptor A1 (LILRA1) as a specific receptor for Aspergillus fumigatus conidia.
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyake Y, Yoshida H
2. 発表標題 Identification of novel lipophilic ligands of siglec receptors that modulate innate immunity.
3. 学会等名 8th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅靖延
2. 発表標題 歯周病菌による免疫抑制型受容体を介した免疫回避
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020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

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