

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09930

研究課題名(和文) 必須タンパク質の阻害薬を利用した歯周病細菌特異的抗菌薬の開発

研究課題名(英文) Development of antibiotics specific for periodontopathogens using inhibitors of a metabolic protein

研究代表者

吉田 康夫 (Yoshida, Yasuo)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：10315096

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)：創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BIND)および東洋大学食環境科学部の支援のもと、歯周病原細菌の増殖に必須な酵素に着目し、その酵素阻害化合物の探索を2種類のライブラリー(企業ライブラリーとフッ化物ライブラリー)を用いて、候補化合物を得た。複数の酵素阻害化合物に対して、歯周病原細菌および口腔レンサ球菌に対する成育抑制効果を検討した。また、精製酵素を用いて生化学的検討を行った結果、企業ライブラリーから候補化合物として適する一つの候補化合物が得られた。また、フッ化物ライブラリーより複数の低分子候補化合物が得られた。これらの結果は、歯周病原細菌特異的薬物の開発に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科内科という言葉が使用されて久しい。歯の切削と充填、拔牙や補綴などを行わない内科的治療は理想的であるが、検査法の確立と治療薬の開発とが不可欠である。一般開業医院においてもリアルタイムPCR法を用いた歯周病細菌の検査法が可能になり、診断法は開発されてきたが、歯周病細菌に特異的に作用する抗菌薬は皆無である。本研究では、歯周病原細菌を不活化する薬物を開発し、歯周病の新規予防法や治療法を提起する。

研究成果の概要(英文)：With the support of the drug discovery and other advanced technology support platform (BIND) and the Faculty of Food and Environmental Sciences, Toyo University, we focused on the enzymes essential for the growth of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, and investigated two types of enzyme-inhibiting compounds. A library (company and fluoride libraries) was used to obtain candidate compounds. The inhibitory effect on the growth of *P. gingivalis* and oral streptococcus *Streptococcus gordonii* was examined for multiple enzyme inhibitory compounds. In addition, as a result of biochemical studies using the purified enzyme, one candidate compound suitable as a candidate compound was obtained from a corporate library. In addition, several low-molecular-weight candidate compounds were obtained from the fluoride library. We believe that these results will greatly contribute to the development of periodontal pathogen-specific drugs.

研究分野：歯科

キーワード：歯周病 歯科 抗菌薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の歯科疾患実態調査によると、50 歳以上の半数以上が歯周疾患に罹患しており、歯周病は既に国民的な疾患と言っても言い過ぎではない。現在の歯周疾患の原因療法に基づいた主な予防法は、プラークコントロールを中心とした機械的な細菌の除去であり、旧態依然としたままである。また、口腔内細菌を排除する薬物として洗口薬や抗菌薬の有効性は示されているが、それらの使用によっては、全体の菌数は一時的に減少しても、菌種の割合は変化しない。つまり、時間が経過すれば元通りの細菌叢が形成されるので、継続的に使用しない限り、歯周疾患の治療や予防に寄与しない。

2. 研究の目的

近年、随分歯科内科という言葉が使用されきた。歯の切削と充填、抜歯や補綴などを行わない内科的治療のことである。それを実現するために、検査法の確立と治療薬の開発とが不可欠である。一般開業医院においてもリアルタイム PCR 法を用いた歯周病細菌の検査法が可能になり、診断法は開発されてきたが、歯周病に特化した治療薬(抗菌薬)は皆無である。本研究では、臨床応用を前提にして、*P. gingivalis* の必須タンパク質を不活化する薬物を開発し、歯周病の新規予防法や治療法を提起する。

3. 研究の方法

(1) 歯周病細菌 *P. gingivalis* の PgAck の酵素反応を不活化する化合物のスクリーニング

製薬企業提供の化合物ライブラリーの利用

申請者らは、2019 年に PgAck の酵素学的解析や構造学的解析とともに、ATP 産生に関わる *P. gingivalis* における必須タンパク質であることを報告した。ごく最近、この酵素活性阻害する化合物を検出するために、PgAck による ATP 産生をヘイケボタル由来のルシフェラーゼを用いて高感度に検出する実験系を、96 穴マイクロプレートを用いて確立した。このスクリーニング方法にて、製薬企業が提供した約 65,000 種類の化合物ライブラリーを使用し、PgAck の阻害化合物の探索を行った(図 1)。

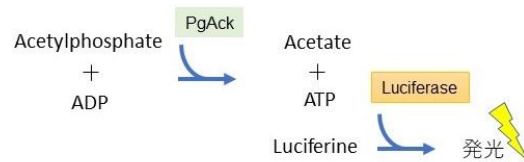


図1. PgAckの阻害化合物のスクリーニング法

フッ化物ライブラリーの利用

別の化合物ライブラリーとしてフッ化物ライブラリーを利用する。農研機構高度解析センター生体分子解析チームの協力のもとで進めた。製薬企業提供のライブラリーと比較して化合物数自体は少ない(約 1,300)が、結合したフッ化物と PgAck の結合を ^{19}F NMR にて検出する実験系が既に確立されており、効率よく研究が進められた。

(2) 候補試薬の臨床応用への検討

従来の研究から、約 65600 種類の化合物のスクリーニングによって、数十～数百種類の候補化合物が得られることが予測される。そのうち臨床応用に適するものの選定を、以下の手法で検討した。

P. gingivalis に対する抗菌効果の検討

精製 PgAck の阻害薬としてスクリーニングされた化合物が、実際に菌体内に取り込まれ *P. gingivalis* に対して抗菌効果を示すかを、96 穴プレートを用いて細菌の増殖曲線から検討した(MIC: 最小発育阻止濃度の算出)。

他の口腔細菌に対する効果の検討

抗菌薬としての効果が、*P. gingivalis* 以外の他の常在性細菌などにも作用すると、*P. gingivalis* に対して特異的な効果が得られず、従来の消毒薬や抗菌薬と効果に変化がない。そこで、

Streptococcus oralis などの常在性のレンサ球菌等には効果がないことを、96 穴プレートを用い、細菌の増殖曲線から検討した。歯周病関連細菌においては、逆に抗菌効果を表すことが望ましい。そこで、Red Complex である *Tannerella forsythia* などについての抗菌効果も検討した。

候補化合物による構造展開

候補化合物を構造展開し、様々な官能基による酵素阻害の状況を把握し、より酵素阻害薬物として適切で、臨床応用可能なものを探索した。

4. 研究成果

BINDS の協力のもと、約 65,000 種類の化合物ライブラリーから、PgAck の阻害化合物の探索を行い、本来の活性が 90% 以上阻害されたものが 134 個、80~90% 阻害されたものが 94 個同定された。これらについて、実験系に含まれるルシフェラーゼに対する阻害効果を検討したところ、212 個がルシフェラーゼ活性を阻害することが明らかとなり、それらを除外して、22 の候補化合物が選出された。その後、それらの化合物について、4 種類の濃度を変えて濃度依存的に酵素阻害効果があるかどうかを検討したところ、9 つの化合物において、有望な結果が得られた。さらに、それらの化合物の歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* と口腔レンサ球菌 *Streptococcus gordonii* に対する成育抑制効果を検討したところ、歯周病細菌にのみ特異的な化合物 1 種類見いだされ、本研究の目的に叶う候補化合物として有望と思われた (図 2, 3)。

図2. 候補化合物によるPgAckおよびluciferaseに対する阻害率

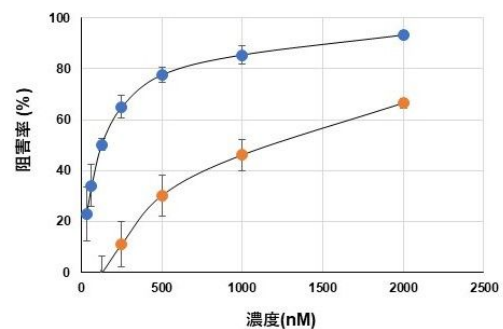
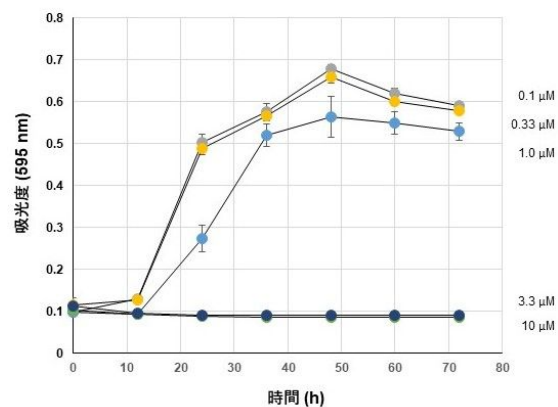


図3. 候補化合物による *P. gingivalis* の成長曲線



その後、その化合物の構造展開を行う目的で 30 種類の化合物を化学合成し、酵素活性測定試験および細菌増殖抑制試験を行い、新規化合物の評価を行った。現在、酵素特異性に関する官能基を特定した。今後さらに酵素阻害を強く起こす新規化合物の作製を試みるために、重要な所見を得ることができた。

一方、より低分子化合物から構成されるフッ化物ライブラリーからも、候補化合物が 6 種類が特定され、同様に酵素活性測定試験および細菌増殖抑制試験を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Okumura, Y. Konishi, M. Narukawa, Y. Sugiura, S. Yoshimoto, Y. Arai, S. Sato, Y. Yoshida, S. Tsuji, K. Uemura, M. Wakita, T. Matsudaira, T. Matsumoto, S. Kawamoto, A. Takahashi, Y. Itatani, H. Miki, M. Takamatsu, K. Obama, K. Takeuchi, M. Suematsu, N. Ohtani, Y. Fukunaga, M. Ueno, Y. Sakai, S. Nagayama and E. Hara	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumorigenesis via butyrate secretion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat. Comm.	6. 最初と最後の頁 5674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25965-x	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 M. Hirose, Y. Yoshida, K. Horii, Y. Hasegawa and Y. Shibuya	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontopathogenic bacteria: Evaluation of Rose Bengal and riboflavin as photosensitizers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Japanese J. Oral Infec. Dis.	6. 最初と最後の頁 69-77
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Y.	4. 巻 2210
2. 論文標題 Analysis of the butyrate-producing pathway in Porphyromonas gingivalis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In: Nagano K, Hasegawa Y (eds). Periodontal Pathogens: Methods in Molecular Biology.	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0939-2_16	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 -
1. 著者名 Hirose Marina, Yoshida Yasuo, Horii Kouichiro, Hasegawa Yoshiaki, Shibuya Yasuyuki	4. 巻 122
2. 論文標題 Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy with Rose Bengal and blue light against cariogenic bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105024 ~ 105024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.105024	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬満里奈, 吉田康夫, 堀井幸一郎, 長谷川義明, 渋谷恭之
2. 発表標題 う蝕原性細菌に対するRose Bengalと青色光を用いた 抗菌光線療法の効能
3. 学会等名 日本バイオフィルム学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬 満理奈、吉田 康夫、福島 麻子、高島 裕之、水谷 友美、宮本 大模、長谷川 義明、渋谷 恭之
2. 発表標題 口腔内細菌に対するRose Bengalと青色LEDを用いたa-PDTの効能
3. 学会等名 口腔ケア学会
4. 発表年 2021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	加藤 悦子 (Kato Etsuko) (00355752)	東洋大学・食環境科学部・教授 (32663)	

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