

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2023
課題番号：20K09941
研究課題名(和文) バイオナノカプセルを用いた高齢者オーラルケアの基礎研究

研究課題名(英文) Basic Research on Oral Care for the Elderly

研究代表者

廣島 佑香 (HIROSHIMA, Yuka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師

研究者番号：60545143

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)：抗菌ペプチドは幅広い抗菌作用を持ち、宿主に対して毒性が低く、耐性菌を生じにくいなどの特徴がある。抗菌ペプチドを用いた口腔ケアは低侵襲な方法であり、有用で安全なシステムの構築が期待できると考える。抗菌ペプチドLCN2, BD-2, SLPI について、無細胞蛋白質合成システムを用いて人工的に蛋白合成を行った。合成した抗菌ペプチドは、*Porphyromonas gingivalis* (Pg)のヒト口腔上皮細胞への付着を有意に抑制した。また、*P. g*の増殖も軽度に減少させ、合成抗菌ペプチドによるPgへの抗菌作用が認められた。合成された抗菌ペプチドは、歯周病の感染予防に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無細胞蛋白質合成(CFPS)システムは、生物学的に高度な技術として注目されている。しかし、抗菌ペプチドの合成はほとんど報告がない。我々は、簡便なCFPS法であるPUREシステムを用いて、抗菌ペプチド(LCN2, BD-2, SLPI)を合成し、効率的な生理活性を示すのに十分な量の抗菌ペプチドを合成することができた。機械的・化学的な口腔ケア方法ではなく、抗菌ペプチドを用いた生物学的・生化学的な口腔ケア方法は、高齢者にも難しくなく、副作用もないことから、今後有用な口腔ケア方法として期待される。人工的に合成した抗菌ペプチドが歯周病に対する口腔ケアに寄与する可能性を示したことは社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial peptides have a wide range of antimicrobial activities, low toxicity to the host, and are unlikely to produce resistant bacteria. Oral care using antimicrobial peptides is a minimally invasive method and is expected to be a useful and safe system. Antimicrobial peptides, including lipocalon 2 (LCN2), α -defensin 2 (BD-2), and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) were synthesized artificially using a cell-free protein synthesis system. The synthesized antimicrobial peptides significantly inhibited *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) adhesion to human oral epithelial cells. The growth of *P. g* was also mildly reduced, indicating antimicrobial activity of the synthesized antimicrobial peptides against *P. g*. It was suggested that the synthesized antimicrobial peptides may be useful in the prevention of periodontal infection.

研究分野：歯周病学

キーワード：抗菌ペプチド 歯周病 歯周病原細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

健康寿命を延ばす取り組みの一つとして、高齢者の口腔衛生環境を整えることは歯周病ばかりでなく他の口腔感染症の予防にとっても重要である。研究代表者は口腔内に多数発現する抗菌ペプチドに注目し、その機能や役割について研究している。抗菌ペプチドは幅広い抗菌作用を持ち、宿主に対して毒性が低く、耐性菌を生じにくいなどの特徴がある。また、感染防御において重要な役割を果たしている。抗菌ペプチドを用いたオーラルケアは低侵襲な方法であり、有用で安全なシステムの構築が期待できると考えた。

近年、様々な Drug delivery system (DDS) が研究・開発されている。DDS 技術は癌治療、再生医療などへの実用化が期待され、理想的な DDS キャリアは様々な疾患への治療に貢献できると考えられている。DDS キャリアの一つに、リポソーム法とウイルス法をハイブリッドしたバイオナノカプセル法 (Bio-nano capsule: BNC) がある (Somiya M and Kuroda S. Adv Drug Deliv Rev 2015)。BNC は B 型肝炎ウイルスの外殻を酵母で製造したもので、脂質二重膜上に B 型肝炎ウイルスの表面抗原が存在し、直径約 100 nm の中空粒子を形成したものである。既存の DDS で応用されるリポソーム、高分子ミセルおよびウイルスベクターなどと比較して、表面抗原蛋白の修飾による標的特異性の付与、キャリアの生産性、細胞への封入物の導入効率が高いことが特徴である。BNC に封入するためには、まずリポソームへの封入が必須となる。しかしながら、抗菌ペプチドがリポソームに封入できるのか、抗菌ペプチドを封入したリポソームが抗菌性を発揮するのかについては知見がほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、無細胞蛋白合成系で抗菌ペプチドを人工的に合成し、これをリポソーム内に封入することにより抗菌性を示すかどうかを検討する。また、人工的に合成した抗菌ペプチドが *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に対する抗菌活性やヒト口腔上皮細胞への付着を抑制するかなどを検討し、歯周病に対するオーラルケアに寄与する可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) リポソームの調製と口腔上皮細胞への送達

リポソームは、リン脂質組成として 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3 phosphocholine (DOPC: 80-100 mol%), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine (DOPE: 0-20 mol%) や rhodamine-DOPE (Rhod-DOPE: 0-10 mol%) 及び 3-sn-phosphatidylcholine from Egg Yolk (Egg-PC) を用いて、また stearyl octa-arginine (STR-R8: 0.1 mM) を配合したリン脂質成分を調製し、自発的転移法により調製した。調製したリポソームをヒト口腔上皮細胞 (TR146) 培養系に添加し、3 時間培養後、蛍光強度測定を行った。また、蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。

(2) Lipocalin 2 (LCN2)

LCN2 の遺伝子から AT rich な鋳型 DNA を PCR で作製した。無細胞蛋白質合成キット (PURE システム) を用いてタンパク質を人工合成し、Western blotting (WB) および ELISA 法により合成量を検討した。また、蛍光色素ラベルした Pg (ATCC33277 株) を LCN2 で 12 時間処理したヒト口腔上皮細胞 (TR146) 培養系に添加し、2 時間後に洗浄し、プレートリーダーにて付着した Pg の蛍光強度を測定した。

(3) β -defensin 2 (BD-2)

BD-2 の遺伝子配列を基に PCR にて調製した塩基配列および配列を至適化した DNA を鋳型として無細胞蛋白質合成キット (PURE システム) を用いて BD-2 を合成し、WB や ELISA で確認した。合成 BD-2 により前処理し、蛍光色素ラベルした Pg (ATCC33277 株) を、ヒト口腔上皮細胞 (TR146) と培養し、Pg の細胞への付着レベルを蛍光強度で評価した。また、合成 BD-2 をリポソーム封入し、細胞と培養後、送達レベルを WB や ELISA で検討した。

(4) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)

SLPI タンパク質の合成は無細胞タンパク質合成キット (PURE システム) を用い、本来の遺伝子配列及び改良した塩基配列の鋳型 DNA を用いて SLPI 合成量を調べ、S-S 結合促進因子等の添加の影響を検討した。合成した SLPI による Pg の口腔上皮細胞への付着及び Pg の増殖への影響について検討した。また、ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) に対する IL-6 産生に及ぼす影響についても検討した。

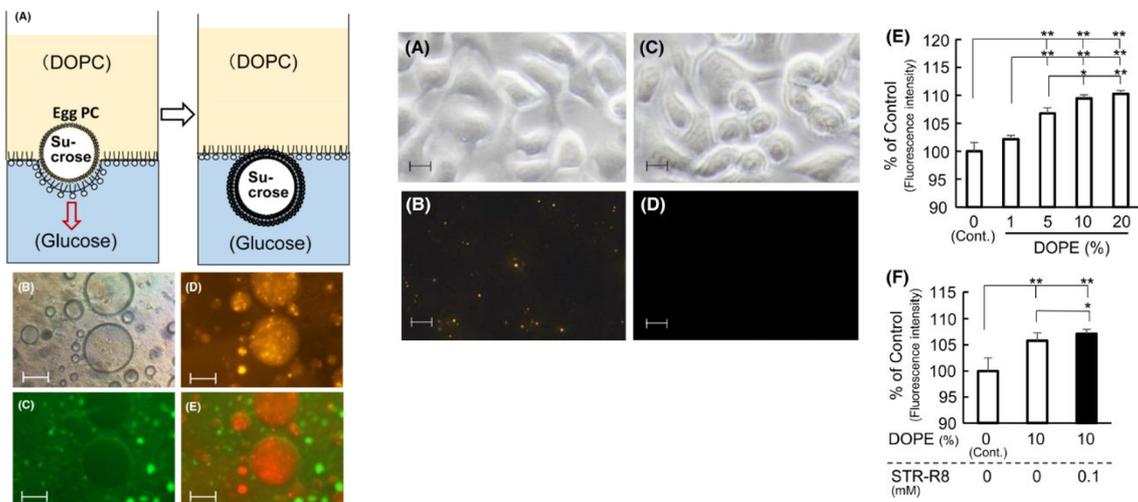
4. 研究成果

(1) リポソームの調製口腔上皮細胞への送達

DOPC と Egg-PC により直径 14~170 nm の脂質二重層のリポソームが調製された。リン脂質成分として 6 mol% 以上の DOPE を添加した場合、リポソームの口腔上皮細胞への接着を示す蛍光強度は有意に増加した。5-10 mol% の Rhod-DOPE を添加した培養系では、リポソームの接着を示す複数の蛍光シグナルが観察された。また、10 mol% DOPE 組成に STR-R8 を加えると、非配合と比較して有意に蛍光強度の増加が認められた。これらの結果から、リポソームを構成するリン脂質の組成成分は、リポソームの口腔上皮細胞へ接着や送達に影響を与えることが示唆され

た (図 1)

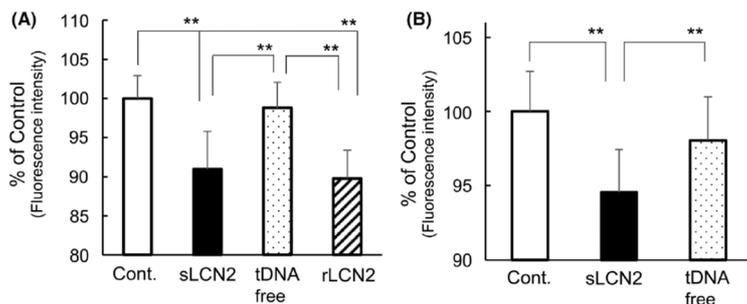
【 図 1 】



(2) Lipocalin 2 (LCN2)

アミノ酸配列は変更せず、遺伝子配列が AT rich になるようなコドンを選択して鋳型 DNA を再設計することで、合成した LCN2 はオリジナルの配列で合成した LCN2 と比較して約 500 倍の合成量になった。また、合成 LCN2 はリコンビナント LCN2 (rLCN2) と同様に TR146 細胞への Pg の付着を抑制した (図 2A)。合成 LCN2 をリポソーム封入しても TR146 細胞への Pg の付着を抑制した (図 2B)。合成された抗菌ペプチド LCN2 は、感染予防効果を有し、新たなオーラルケア法の開発に繋がる可能性がある。

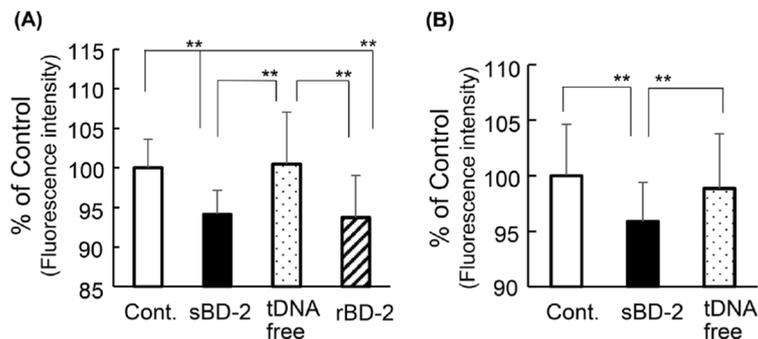
【 図 2 】



(3) β -defensin 2 (BD-2)

タンパク合成系に適した配列の鋳型 DNA を用いた場合、BD-2 の合成量が著しく増加した。合成 BD-2 は、Pg の口腔上皮細胞への付着を有意に抑制し、リコンビナント BD-2 (rBD-2) と同レベルの抑制を示した (図 3)。リポソームに封入した合成 BD-2 を上皮細胞と培養した場合、BD-2 が上皮細胞に有効に到達されることが WB と ELISA により確認された。これらの結果から、合成 BD-2 が口腔内の感染予防に役立つ可能性が示唆された。

【 図 3 】

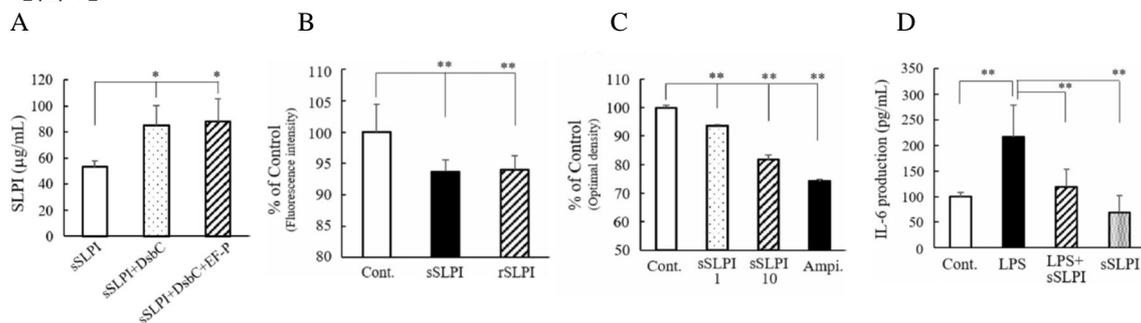


(4) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)

SLPI の鋳型 DNA を蛋白合成システムに至適化した AT rich な塩基配列とした場合、SLPI の合成量が著しく増加した。また、S-S 結合促進因子の添加により、さらに合成量の増加がみられた (図

4A)。合成 SLPI は、Pg の口腔上皮細胞への付着を有意に抑制し (図 4B) Pg の増殖も軽度に減少させ (図 4C) 合成 SLPI による Pg への抗菌作用が認められた。さらに HPLF による IL-6 産生を抑制した (図 4D)。これらの結果から、PURE システムを用いて人工合成した SLPI は、抗菌・抗炎症作用を通じて歯周病予防に役立つ可能性が示唆された。

【 図 4 】



< 結論と考察 >

本研究では、PURE システムを用いて主要な抗菌ペプチドである LCN2、BD-2 や SLPI タンパク質を合成し、組換えタンパク質と同様の抗菌活性および抗炎症活性を示した。機械的・化学的な口腔ケア方法ではなく、抗菌ペプチドを用いた生物学的・生化学的な口腔ケア方法は、高齢者にも難しくなく、副作用もないことから、今後有用な口腔ケア方法として期待される。本研究で用いた PURE システムは比較的簡便な方法であり、効率的な生理活性を示すのに十分な量の抗菌ペプチドを合成することができた。合成された抗菌ペプチドは in vitro で抗菌活性と抗炎症活性を示したが、今後、in vivo でこれらの生理活性を示すかどうかを調べる必要がある。一般的に、抗菌ペプチドの抗菌作用は化学薬品の抗菌作用よりも弱く、*P. gingivalis* に対する抗菌作用も有意であったが、強くはなかった。しかしながら、ヒト口腔上皮細胞への *P. gingivalis* の接着を阻害することを報告した。作用やメカニズムが異なる AMP を混合した方がより強い抗菌活性を示す可能性もある。このように、LCN2、BD-2 や SLPI などの人工的に合成された抗菌ペプチドは、今後、歯周病や感染症などのオーラルケアに貢献する可能性がある。

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 Kido Jun ichi, Hiroshima Yuka, Kido Rie, Yoshida Kaya, Inagaki Yuji, Naruishi Koji, Kajimoto Kazuaki, Kataoka Masatoshi, Shinohara Yasuo, Yumoto Hiromichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Lipocalin 2, synthesized using a cell free protein synthesis system and encapsulated into liposomes, inhibits the adhesion of Porphyromonas gingivalis to human oral epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 262 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.13088	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 Hiroshima Yuka, Kido Jun-ichi, Kido Rie, Yoshida Kaya, Bando Mika, Kajimoto Kazuaki, Yumoto Hiromichi, Shinohara Yasuo	4. 巻 111
2. 論文標題 -defensin 2 synthesized by a cell-free protein synthesis system and encapsulated in liposomes inhibits adhesion of Porphyromonas gingivalis to oral epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 830 ~ 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-023-00789-x	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 Uemura Yuta, Hiroshima Yuka, Tada Ayano, Murakami Keiji, Yoshida Kaya, Inagaki Yuji, Kuwahara Tomomi, Murakami Akikazu, Fujii Hideki, Yumoto Hiromichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Stimulate Gingival Epithelial Cells to Induce Pro-Inflammatory Cytokines via the MAPK and STING Pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2643 ~ 2643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10102643	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 Hiroshima Yuka, Kido Rie, Kido Jun-ichi, Bando Mika, Yoshida Kaya, Murakami Akikazu, Shinohara Yasuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of secretory leukocyte protease inhibitor using cell-free protein synthesis system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-024-00910-8	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木戸 淳一, 廣島 佑香, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 人工合成した α -defensin 2によるPorphyromonas gingivalisの付着抑制およびリポソーム封入と口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 四国歯学会第60回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸 淳一, 廣島 佑香, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 人工合成した α -defensin 2によるPorphyromonas gingivalisの付着抑制およびリポソーム封入と口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸 淳一, 廣島 佑香, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 リポソームに封入したリポカリン2の口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣島 佑香, 木戸 理恵, 木戸 淳一, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 人工合成したLopocalin 2はPorphyromonas gingivalisの口腔上皮細胞への付着を抑制する
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣島 佑香, 木戸 淳一, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 オーラルケアへの応用に関連するリボソームのデリバリー法の検討
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸 淳一, 廣島 佑香, 木戸 理恵, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 無細胞蛋白質合成系を用いた抗菌ペプチドの合成とリボソーム封入
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会(第152回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸 理恵, 廣島 佑香, 木戸 淳一, 吉田 賀弥, 生田 貴久, 湯本 浩通
2. 発表標題 人工合成したSecretory leukocyte protease inhibitorの抗菌活性とリボソーム封入
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023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	木戸 淳一 (KIDO Jun-ichi) (10195315)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	

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	村上 圭史 (MURAKAMI Keiji) (10335804)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・准教授 (16101)	
研究 分 担 者	藤猪 英樹 (FUJII Hideki) (50356250)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授 (16101)	

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