

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659477

研究課題名（和文）新規分子標的治療法による歯周病菌の増殖抑制とその抗菌周病薬としての可能性の追求

研究課題名（英文）Pursuit of multiplication control of the periodontosis bacillus by a new molecule target cure, and the possibility as the anti-periodontosis medicine

研究代表者

星野 倫範 (HOSHINO TOMONORI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：00359960

研究成果の概要（和文）：

歯周疾患の原因菌に対し、アンチセンス法を応用した研究はまだない。そこで本研究では RNase の影響を受けない人工核酸である PNA を用い、歯周疾患の原因菌に対して有効かどうかを検討した。歯周疾患の一つである歯周炎の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* にアンチセンス PNA を作用させたところ、その強いペプチダーゼ活性によって膜透過誘導タンパクあるいは PNA 本体が分解されてしまったため、期待されたアンチセンス効果は得られなかった。一方、齲蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* に対してアンチセンス PNA を作用させたところ、標的とした *gtfB* 遺伝子の発現が抑制される傾向が認められたものの有意差がなかった。今後はアンチセンス PNA の取り込み効率的にする膜透過誘導タンパクの探索や標的遺伝子の発現抑制を効率にする配列を検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

There has been no report that antisense method is applied to causative bacteria of the periodontal disease. In this study, we investigated whether antisense method was available for those causative bacteria by using PNA that was the artificial nucleic acid and was not affected by RNase. Antisense PNA was reacted with *Porphyromonas gingivalis* that was causative organism of the periodontitis that was one of the periodontal diseases. As a result, we did not obtain the expected antisense effect because the strong peptidase activity of *P. gingivalis* hydrolyzed the membrane transport guidance protein or the main body of PNA constructed of peptide bonds. On the other hand, antisense PNA against *Streptococcus mutans* that was carious causative bacteria tended to suppress the targeted *gtfB* gene expression although the significant difference was not shown. In our future study, it is necessary to investigate the peptide sequence that facilitate for PNA to penetrate bacterial membrane and the antisense PNA sequence that inhibit the targeted gene expression efficiently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	0	1,300,000
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*、*Streptococcus mutans*、分子標的治療、PNA

1. 研究開始当初の背景

これまで歯周炎や齲蝕といった歯周疾患の予防に関する研究はワクチンなどの応用が考えられてきた。しかし、口腔領域は粘膜免疫により分泌型のIgAを誘導しなければならないという特殊性からこれまで実現していない。そこで本研究では発想を変え、病原因子の発現を分子レベルで抑制すれば、これらの疾患の原因菌の定着・増殖を抑制できると考え、本研究ではペプチド核酸(PNA)を用いたアンチセンス法の応用を行った。

2. 研究の目的

歯周炎や齲蝕などの歯周疾患の主たる原因は細菌であり、これらの原因となる細菌の病原因子やこれに対する宿主の免疫応答についての研究はこれまでに盛んに行われてきた。しかし、歯周炎や齲蝕は口腔の歯周組織に局限したもので通常の全身感染症と同じように体液性免疫での治癒過程をたどらないため、ワクチンを行うには粘膜免疫によって宿主の免疫応答を引き起し、分泌型のIgAを誘導しなければならないという特殊性から、実際のワクチンの応用が困難である。そのため、歯周炎の治療薬として実際に臨床応用されているのは、サイトカイン療法やエムドゲインなどの宿主の組織再生に関わるものが主流であり、齲蝕に関してはフッ素等の様に宿主の歯質の強化を図り、予防を行うとともに従来からの保存修復がその治療法となる。したがってワクチンのように抗菌作用、抗定着作用を及ぼすものは臨床応用されているものはまだ開発されていない。そこで本研究では歯周炎の原因菌といわれている *P. gingivalis* や齲蝕の原因菌である *S. mutans* に抗菌作用、抗定着作用を及ぼす方法として、

ワクチンのような宿主の免疫応答に依存した方法ではなく、アンチセンス法に基づく分子標的治療法により、これらの菌種の増殖や定着の抑制を図ることを目的として行った。また、アンチセンス法はRNA干渉法が現在主流であるが、細菌ではその旺盛なRNase活性が原因で、対象となる細菌種の細胞内に標的となる遺伝子に対するアンチセンスRNAを到達させることが非常に困難であると考えられる。そこで本研究では骨格部分がペプチド鎖で構成される peptide nucleic acids (PNA) を用いてアンチセンス分子を構築し、これが標的遺伝子に対して有効に発現抑制などの効果を示すかどうかということを主とし、さらにこれらの分子が対象となる細菌種にうまく取り込まれるかどうかを検討することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) PNAの作成

本研究におけるアンチセンスPNAの設計の要点は、① PNAを細菌の細胞内に効率的に導入できるような膜透過型ペプチドの選択、② 標的細菌の増殖、あるいは標的遺伝子の発現を効率的に抑制出来るような遺伝子のアンチセンス領域の選択、③ 標的細菌細胞内への取り込みを確認するための蛍光標識の付与、の以上3点である。①に関しては、Goodら (Nat Biotechnol. 2001) のPNAを *Escherichia coli* 細胞内に導入した報告で、(KFF)₃- (リジン-フェニルアラニン-フェニルアラニンの三回の繰り返し構造) のペプチド配列が有効であることを報告していることから、これを最有力候補として採用した。

②に関しては、PNAの作成は18塩基までしかできないという技術上の制約を前提とし、

*P. gingivalis*に対しては、23S rRNA ドメイン II を、*S. mutans*に対しては *gtfB* 遺伝子を標的遺伝子として、RNAi に準じて開始コドンの 75 塩基以上下流の AA を検索し、これ以下の配列をターゲットとして PNA を合成した。③に関しては、取り込み効率の確認のためにアンチセンス PNA に蛍光標識を行う。付加する蛍光標識としては、合成メーカーの指定により FAM を採用した。

(2) PNA の取り込み

蛍光標識を付加したアンチセンス PNA の取り込みは、コンフォーカル顕微鏡によって行う。実験の概要としては、液体培地に培養した菌体に一定濃度の蛍光標識アンチセンス PNA を添加し、一定時間取り込ませる。PNA の取り込み条件は、Eckert ら (Antimicrob Agents CH, 2006) の方法に準じた。取り込み反応後、リン酸緩衝生理食塩水等で菌体を洗浄し、取り込まれなかったアンチセンス PNA を除去する。洗浄菌体をコンフォーカル顕微鏡で観察することにより、アンチセンス PNA の取り込みを検討する。

(3) PNA による増殖、対象遺伝子の発現抑制

アンチセンス PNA による *P. gingivalis* の増殖抑制は、各濃度のアンチセンス PNA を添加したときの単位時間あたりの培養液の濁度 (OD_{600}) を測定することにより、評価することにした。

一方、アンチセンス PNA による *S. mutans gtfB* 遺伝子の発現抑制は菌液の濁度 (OD_{600}) が 0.5 のものに最終濃度で $25\mu\text{M}$ となるようなアンチセンス PNA を 1 時間反応させ、アンチセンス PNA を添加しなかった場合の *gtfB* 遺伝子の発現量を 100% として relative real time RT-PCR を行うことにより評価を行った。*gtfB* 遺伝子の real time RT-PCR は Fujiwara ら (J Dent Res, 2002) の方法に従って行った。

(4) アンチセンス PNA の標的としての *S. mutans gtfB* 遺伝子の有効性の検討

これまで *S. mutans* に対するワクチンの標的としては、*gtfB* 遺伝子でコードされる Glucosyltransferase B (GTFB) が標的とされてきたがこれまで実際に GTFB の酵素活性を抑制できるワクチンの報告はない。そのため、アンチセンス PNA による GTFB の抑制が *S. mutans* の定着抑制に繋がるかどうか検討する必要がある。そこで本研究ではアデノウイルスを用いた GTFB に対するワクチンを作成し、これが実際に活性抑制を示すかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* 細胞のアンチセンス PNA の取り込みと増殖抑制について

P. gingivalis 細胞にアンチセンス PNA を反応させたところ、その細胞内にアンチセンス PNA が取り込まれ、細胞が蛍光標識の FAM により緑色に発色する様子は殆ど観察されなかった。当初は膜透過型ペプチドに原因があると考えたが、*P. gingivalis* には他の細菌よりもかなり強いペプチターゼ活性を有することを連携研究者などから示唆された。この点につき、検証したところ少なくとも膜透過型ペプチドの部分は分解されている可能性が示唆され、PNA の本体もペプチド結合で構成されていることから、この部分も分解等の影響を受けている可能性が示唆された。アンチセンス PNA が分解してしまうということを前提に *P. gingivalis* の増殖に対する影響を調べたが、有意に増殖抑制を示す様な結果は得られなかった。今後、*P. gingivalis* に対してアンチセンス PNA を応用する際には、その強いペプチターゼ活性に配慮する必要があることが示唆された。

(2) *S. mutans* 細胞へのアンチセンス PNA の取り込みと *gtfB* 遺伝子の発現抑制について

S. mutans 細胞にアンチセンス PNA を反応させたところ、図 1 に示す様にアンチセンス PNA が取り込まれている像が確認された。

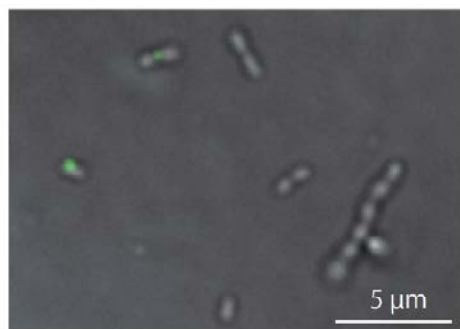


図 1. *S. mutans* における PNA の取り込み
PNA の取り込まれた *S. mutans* 細胞は蛍光色素の FAM により緑色に発色する。

この結果をもとにアンチセンス PNA の添加による *S. mutans gtfB* 遺伝子の発現を観察したところ、図 2 に示す様に有意な差は認められなかったものの、*gtfB* 遺伝子の発現を抑制する様な傾向が認められた。

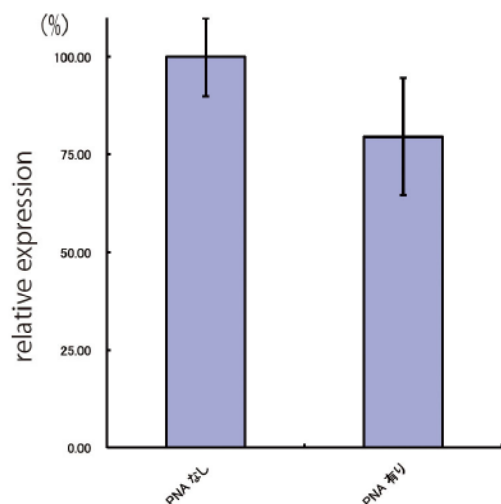


図 2. アンチセンス PNA による *S. mutans gtfB* 遺伝子の発現抑制

これよりアンチセンス PNA は *S. mutans gtfB* 遺伝子の発現を抑制できる可能性が示唆されたが、図 1、2 から示される通り、細

胞内への取り込み効率や活性抑制効果はまだまだ低い。今後はレンサ球菌におけるコンピテンススティミュレイティングペプチドなどの膜透過性ペプチドの応用により細胞内への取り込み効率上げたり、アンチセンス部分の設計の検討により効果的な発現抑制を図ったりすることを予定している。

(3) アンチセンス PNA の標的としての *S. mutans gtfB* 遺伝子の有効性について

gtfB 遺伝子の 5' 領域をコードする部位をアデノウイルスベクターに組換えた GTFB に対する DNA ワクチンを作成し、これをマウスに接種することにより得られた抗血清を免疫科学的な実験に供試することで GTFB の活性抑制が *S. mutans* の定着抑制に繋がることを検討した。まず誘導された抗血清が *S. mutans* GTFB と特異的に反応するかどうかをウエスタンブロット分析で検討した (図 3)。

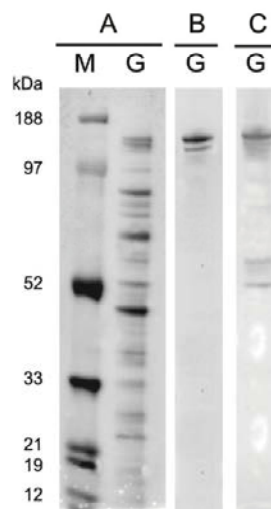


図 3. GTFB に対する DNA ワクチンにより誘導された抗体と GTFB の反応性

A: GTFB の SDS-PAGE

B: 抗 CA-GTF 抗体によるウエスタンブロット

C: DNA ワクチンにより誘導された抗体によるウエスタンブロット

その結果、誘導された抗血清は GTFB と特異的に反応することが明らかとなった。次にこの結果を受け、本抗血清による GTFB の活性

抑制試験を行った(図 4)。その結果、本抗血清は GTFB、GTFC に反応するウサギ抗 CA-GTF 抗血清と同等のグルカン合成活性抑制能を有することが明らかとなった。

以上の結果から、*S. mutans* GTFB を抑制することは *S. mutans* の歯面定着に關与するグルカンの合成を抑制することに繋がることから、アンチセンス PNA の標的としても有効であることが示唆された。

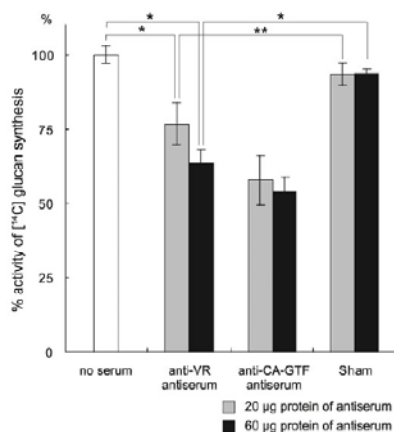


図 4. GTFB に対する DNA ワクチンにより誘導された抗体による GTFB の活性抑制
anti-VR: DNA ワクチンにより誘導された抗体
anti CA-GTF: GTFB、GTFC に対する抗体
Sham: PBS (コントロール)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tomonori Hoshino, Yoshio Kondo, Kan Saito, Yutaka Terao, Nobuo Okahashi, Shigetada Kawabata, and Taku Fujiwara, Novel Epitopic Region of Glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*, *Clinical and Vaccine Immunology*, 査読有, 18 (9), 2012, 1552-1561, doi:10.1128/CVI.05041-11
- ② Mamoru Kawaguchi, *Tomonori Hosohino, Takashi Ooshima, Taku Fujiwara,

Establishment of *Streptococcus mutans* in infants induces decrease in the proportion of salivary α -haemolytic bacteria,

International Journal of Paediatric Dentistry, 査読有, 22 (2), 2012, 139-145, DOI:

10.1111/j.1365-263X.2011.01183.x,

*corresponding author

[学会発表] (計 3 件)

- ① 星野倫範, 齋藤 幹, 藤原 卓, *Streptococcus mutans* グルコシルトランスフェラーゼの新規エピトープとこれにより誘導された抗血清による活性抑制効果について, 第 47 回日本小児歯科学会大会, 大阪, 2009. 5. 14
 - ② Tomonori Hoshino, Kan Saito, Taku Fujiwara, Novel Epitopic region of Glucosyltransferase-B from *Streptococcus mutans* MT8148, the 88th IADR General Session & Exhibition, Barcelona (Spain), 2010.7.14-7.17
 - ③ Tomonori Hoshino, Shigetada Kawabata, Taku Fujiwara, Horizontal Transmission of Glucosyltransferase Genes in *Streptococcus mutans*, 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎, 2010.3.27-3.29
- [図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
星野 倫範 (HOSHINO TOMONORI)
長崎大学・病院・講師
研究者番号: 00359960
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし