

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 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791881

研究課題名（和文） 抗真菌化合物カスポファンギンの多機能性を利用した新規義歯床用材料の開発

研究課題名（英文） Development a novel acrylic resin material by applying multiple function of caspofungin

研究代表者

綿本 隆生 (Watamoto Takao)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60420444

研究成果の概要（和文）：

義歯床用材料の表面粗さとカンジダアルビカンスの抗真菌剤抵抗性の関連性の検討を行った。その結果、材料の表面が滑らかになるほど抗真菌剤抵抗性が減少すること、材料の表面性状に応じて発現が変化する遺伝子があるという興味深い知見を得た。さらに、抗真菌剤（カスポファンギン）同様に抗真菌作用を有する新たな小分子化合物の探索を行った。その結果、明らかな抗真菌性を有する数個の新たな小分子化合物を発見することができ、その中にヒトの細胞に対しても低毒性であるものも発見することができた。よって本研究結果は新規義歯床用材料の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

At first, the relationship between surface roughness of acrylic resin and antifungal drug susceptibility of *Candida albicans* was investigated. Antifungal drug susceptibility of *C. albicans* became higher as surface roughness of acrylic resin became smoother and some genes were changed their expression level by the surface roughness of acrylic resin. Furthermore, novel small molecule compounds, which had antifungal activity same as caspofungin, were investigated. Several new small molecule compounds which had strong antifungal effect were discovered, especially one of them was not toxic against human cells. The results of present study are considered to contribute the development the novel antifungal acrylic resin material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：有床義歯補綴学・微生物学

1. 研究開始当初の背景

カンジダは口腔および膣内に常在し、日和見感染や院内感染の原因菌となる。特に AIDS

患者、化学療法を受けているガン患者、重度糖尿病患者や臓器移植を受けた患者など免疫能力の低下した患者では、カンジダ症は死

亡に至る深刻な問題となっている。また近年、カンジダ院内感染による死亡率も増加傾向にあり、それに伴う治療費も莫大な額に上っている。カンジダの特徴的な病原性の一つとして基底表面への接着およびバイオフィームと呼ばれる集団の形成がある。

このバイオフィームは義歯やカテーテルなどの医療用人工装置に感染し、高い薬剤抵抗性を示すため、薬剤治療を困難にする原因の一つとなっている。特に、高齢社会にある現在、義歯装着者の増加に伴い、カンジダ症を有する人口増加が懸念され、その対応が急務である。しかしながら、既存の義歯床用材料は抗真菌作用に乏しいのが現状である。

そこで我々は抗真菌剤抵抗性の原因を探索するため、カンジダ研究の世界的第一人者である香港大学 Samaranayake 教授と共同研究を行い、菌糸形成を伴うバイオフィームの多重構造およびバイオフィーム形成時に特異的に発現する遺伝子と薬剤抵抗性の関連を解明してきた。その結果、菌糸形成は薬剤抵抗性の絶対的な決定因子ではないこと

(Watanabe T et al. *Int J Antimicrob Agents*. 2009) や、バイオフィーム形成時に発現するいくつかの遺伝子、中でも PIL1 が重要な遺伝子であること (Seneviratne CJ et al. *Proteomics*. 2008) を明らかにした。さらに我々は抗真菌剤カスポファンギンが PIL1 と結合し、その発現を抑制することを発見している。したがって、義歯床にカスポファンギンを組み込むことで、カンジダ細胞表面の PIL1 に作用させることにより、バイオフィームの形成が抑制できれば、義歯性口内炎さらにはそれに起因するカンジダ症の発症を防ぐ新規材料になると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は PIL1 の細胞増殖、細胞接着やバイオフィーム形成に与える影響などの未だ解明されていない基礎的な機能を解明し、さらに PIL1 に結合し、その発現を抑制する抗真菌性化合物であるカスポファンギンをレジンモノマーと結合させ、多機能な抗真菌作用を有する新規義歯床用材料を開発し、その効果を検討することである。そのため計画している具体的な研究項目は以下のものである。

(1) PIL1 過剰発現および発現抑制が細胞に与える影響の検討

(2) PIL1 変異株と正常株の抗真菌剤感受性の比較

(3) カスポファンギン含有抗真菌性レジンモノマーの開発

(4) 新規義歯床用材料の開発および抗真菌効果の分析

3. 研究の方法

(1) カンジダ野生株における PIL1 の機能分析

薬剤耐性関連遺伝子 PIL1 の細胞内での機能は未だ不明な点が多く存在する。本研究仮説の分子生物学的な根拠を裏付けるためにも PIL1 の機能を分析することが必要である。そこで *C. albicans* SC5314 を用い、以下に示す実験を行う予定である

①PIL1 発現抑制株の作製

従来、遺伝子発現抑制に用いられている URA blaster 法を用い、PIL1 遺伝子の発現の抑制

②PIL1 過剰発現株の作製

ウイルスベクターを用い PIL1 遺伝子を細胞内に導入

③細胞動態の分析

細胞増殖能、細胞接着能およびバイオフィーム形成能を正常株と変異株間で比較を行う

④薬剤感受性に与える影響の分析

4 種類の抗真菌剤 (アゾール系, キャンディン系, ポリエン系, フルシトシン) を用いて薬剤感受性試験を行う。浮遊状態、接着後、バイオフィーム形成後それぞれの状態で試験を行い、正常株と変異株との比較を行う

(2) 抗真菌性を有する義歯床用材料の開発
レジン床にカスポファンギンを結合させた抗真菌性を有する新規義歯床用材料を開発し、その抗真菌作用および物性を検討する。物性は ISO-1567 に準じた試験を行い、抗真菌性は *C. albicans* SC5314 に対する作用を評価する。

①抗真菌性を有する新規義歯床用材料の開発

メタクリル酸メチルにカスポファンギン結合させ、抗真菌性モノマーを作製する。これを用い、アクリリックレジンを作製する。使用する床用レジン是一般に市販されているものを応用する。

②新規義歯床用材料の物性の検討

ISO-1567 床用レジン曲げ試験による曲げ強さとたわみ量の測定を行い、従来の義歯床用材料との比較、検討を行う。

③レジン床の抗真菌性の評価

レジン床に対するカンジダ真菌の接着能力の分析を行う。レジン床上にカンジダ真菌を播種し、その 90 分後、走査型電子顕微鏡を用いレジン床に接着している細胞の観察を行い、細胞数を測定する。さらに抗真菌性の評価としてレジン床のバイオフィーム形成抑制能の分析を行う。レジン床上にカンジダ真菌を播種し、24 および 48 時間培養しバイオフィームの形成を行う。その後、レジン床を走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、バイオフィームの立体構造を分析する。またバイオフィームを形成している細胞の代謝活性や細胞数の測定を行う。以上を従来の義歯床用材料と比較し、新規義歯床用材料のカンジダ真菌に対する

接着およびバイオフィーム形成抑制能の検討を行う。

4. 研究成果

始めに、義歯床用材料の表面性状に着目し、その表面粗さとカンジダアルビカンスの抗真菌剤抵抗性の関連性の検討を行った。表面粗さは義歯研磨面と同等のもの、義歯調整に使用する切削器具を用いて切削したものと同等のものおよびその中間のものを用いた。その結果、表面性状が滑らかになるほど抗真菌剤抵抗性が減少する、すなわち滑沢な表面に付着したカンジダアルビカンスには抗真菌剤が効きやすくなるという興味深い知見を得た(表1)。したがってカンジダアルビカンスが材料表面に付着する際に起こる変化が、抗真菌剤耐性と関わりがある可能性が示唆された。さらに、抗真菌剤抵抗性に関与すると考えられている遺伝子の発現の変化を比較した。その結果、バイオフィームが形成されるレジン表面の性状が変化することにより、発現が変化する遺伝子を見出すことができた。前述の知見とあわせることにより、この知見はバイオフィームの抗真菌剤抵抗性の機序解明につながる可能性が示唆された。

表1 抗真菌剤感受性テスト

	MIC (μ g/ml)			
	浮遊培養		板状試料	バイオフィーム培養
	10^6 cells/ml	10^7 cells/ml		
Amphotericin B	0.23	3.75	#150 #280 #2000	15 15 3.75
Fluconazole	0.13	16	#150 #280 #2000	>64 >64 >64

次に抗真菌剤(カスポファンギン)同様に抗真菌作用を有する新たな小分子化合物を探索するため、1280個からなる小分子化合物ライブラリーを用い、カンジダアルビカンスに対する抗真菌性のスクリーニング検査を行った。その結果、明らかな抗真菌性を有する数個の新たな小分子化合物を発見することができた(表2)。

表2 検出された小分子化合物

Detected antifungal small-molecule compounds (35)	
Fungicidal compounds (9)	Strong effect (5)
Chelerythrine chloride Dequalinium chloride hydrate Indatraline hydrochloride Palmitoyl-DL-carnitine chloride	Bay 11-7082, Bay 11-7085 Ellipticine, CV-3988 Sanguinarine chloride hydrate

さらにそれらの小分子化合物を用い、カンジダアルビカンスのバイオフィームに対する効果の検討およびヒト歯肉線維芽細胞の細胞増殖に与える影響の検討を行った。その結果、5個の小分子化合物がバイオフィームに対して効果を有することが明らかとなった(表3)。さらにそのうち1個の小分子化

合物はヒト歯肉線維芽細胞に対しても、その細胞増殖に影響を与えることが少なく低毒性であった。このことは新たな抗真菌剤の開発につながる可能性を示唆するものであった。最後に、本研究を通じ研究計画の最終目的である抗真菌性を有する義歯床用材料の開発に向けて重要な結果を得ることができた。

表3 小分子化合物のバイオフィームに対する効果

	Antifungal susceptibility of planktonic and biofilm modes			
	MIC (μ M)			
	planktonic		adhesion phase	24 h biofilm
10^6 cells/ml	10^7 cells/ml			
Bay 11-7082	<1	7.9	125	1000
Bay 11-7085	<1	7.9	125	500
Ellipticine	<1	3.9	32	63
Sanguinarine	<1	2.0	125	250
CV-3988	<1	7.9	63	250
Amphotericin B	<1	2.0	16	63

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1件)

① Watamoto T, Samaranayake LP, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. J Med Microbiol. 査読有. 60. 2011. 1241-1247. 10.1099/jmm.0.030692-0

[学会発表] (計6件)

① 綿本隆生, 江草 宏, 矢谷博文. 歯科医療器具洗浄における二酸化塩素の応用. 平成23年度(社)日本補綴歯科学会関西支部学術大会2012年2月5日(神戸)

② Watamoto T, Egusa H, Yatani H. Discovery of novel antifungal small molecules in *Candida albicans*. 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry2011年10月9日(広島)

③ 綿本隆生, 伊村沙織, 佐々木淳一, 江草 宏, 矢谷博文. 義歯床用レジンの表面性状が *Candida albicans* の抗真菌剤感受性に影響を与える. 日本補綴歯科学会 第120回記念学術大会(広島)2011年5月21日

④ 綿本隆生, C. J. Seneviratne, 江草 宏, 伊村沙織, L. P. Samaranayake, 矢谷博文. *Candida albicans* における薬剤耐性関連遺伝子の発現様式. 大阪大学歯学会 第111回歯学会例会2010年11月11日(大阪)

⑤ T. Watamoto, C. J. Seneviratne, H. Egusa, H. Yatani and L. P. Samaranayake. Antifungal resistance gene expressions in various lifestyles of *Candida albicans*. International association of dental research 2010年7月13日(Spain)

⑥ 綿本隆生, C. J. Seneviratne, 江草 宏,

L. P. Samaranayake, 矢谷博文. *Candida albicans* における薬剤耐性関連遺伝子の発現様式. 日本補綴歯科学会 第119回学術大会. 2010年6月12日(東京)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿本 隆生 (Watamoto Takao)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号: 60420444