

令和 5 年 3 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659920

研究課題名（和文）歯周病治療のための新規ナノメディシンの設計と評価

研究課題名（英文）Design and Evaluation of Novel Nanomedicine for Periodontal Diseases

研究代表者

長崎 幸夫（Yukio, Nagasaki）

筑波大学・数理工学系・教授

研究者番号：90198309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病は慢性的な歯肉炎が継続することにより、歯を保持している歯槽骨を非可逆的に破壊するのみならず、免疫系細胞が活性化し、過剰に発生した活性酸素は全身疾患にも強く関与していることが明らかになりつつある。本研究では様々な疾患を引き起こす活性酸素に着目し、歯周ポケット内に注入すると同時にゲル化するナノ粒子を設計し、これに活性酸素消去能を封入することで、歯周病を治療する新しいナノ治療法を開発することを目標とした。本提案では材料設計とともに、その環境応答能の物理化学的評価、細胞毒性評価、in vitroにおけるゲル化と抗酸化能評価を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は慢性的な歯肉炎が継続することにより、歯を保持している歯槽骨を非可逆的に破壊するのみならず、免疫系細胞が活性化し、過剰に発生した活性酸素は全身疾患にも強く関与していることが明らかになりつつあり、侮ることの出来ない疾患である。本研究では歯周ポケットに流し込むとゲル化し、持続的に活性酸素種を消去するレドックスインジェクタブルゲルを作製し、ラット歯周病モデルで評価したところ、高い効果で抗歯周病効果を発揮することを確認した。これは2017年時点で400万人を超え、益々増加する歯周病患者への治療法として高い社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Reactive oxygen species (ROS) are considered to cause various disorders if they are produced in excess and become uncontrollable in the body. However, redox nanoparticle that effectively eliminates excess ROS has been developed and reported to be effective for the treatment of various systemic disorders. This particle is expected to be developed into drugs due to its high cost-performance, regional specificity, and few adverse effects. Therefore, to develop redox therapy for periodontitis, we designed novel Redox flower micelle, which disintegrates physiological conditions to form swollen gel (Redox Injectable Gel, RIG), allowing nitroxide radicals to act as a specific ROS scavenger, and evaluated inhibitory effects of RIG on *Porphyromonas gingivalis* (Pg)-induced bone loss in rat experimental periodontitis model. The results suggested the inhibitory effects of RIG on Pg-induced bone loss. It is promising as a therapeutic drug in the treatment on Pg-induced periodontitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病 ナノメディシン 活性酸素 レドックスインジェクタブルゲル

1. 研究開始当初の背景

歯周病は慢性的な歯肉炎が継続することにより、歯を保持している歯槽骨を非可逆的に破壊するのみならず、免疫系細胞が活性化し、過剰に発生した活性酸素は全身疾患にも強く関与していることが明らかになりつつある。歯周病治療には一般的に抗菌剤が使われるものの、数百種類にもおよび口内細菌すべてに作用するものが無いだけで無く、低分子抗菌剤は歯周ポケットから容易に流出してしまうため、効果が十分ではなかった。

2. 研究の目的

本研究では様々な疾患を引き起こす活性酸素に着目し、歯周ポケット内に注入すると同時にゲル化するナノ粒子を設計し、これに活性酸素消去能を封入し、歯周病治療効果を評価することを目的とした。具体的には材料設計および、その環境応答性の物理化学的評価、細胞毒性評価、in vitro におけるゲル化と抗酸化能評価を行い、さらには歯周炎モデルラットによる in vivo 評価を行い、効果を判断する。

3. 研究の方法

ROS を特異的に消去するニトロキシドラジカルを封入したレドックスインジェクタブルゲル (RIG; Redox+) を作製し、37°C でニトロキシドラジカルが放出するフラワーミセル状のレドックスインジェクタブルゲル (RIG) を新規作製した(図 1)。この手法により、液状の粒子が疾患細部まで浸透した後、温度変化によってゲル状化するため、体内に消化吸収されず疾患部位に一定時間停滞することが可能となった。我々の研究チームは、潰瘍性大腸炎や関節炎にてナノレドックス粒子の抗炎症効果を明らかにし、このポリマーが疾患部位に停滞することの重要性やその効用についても報告している。同様に本レドックスインジェクタブルゲルは、口腔内投与の際に生じる温度変化を利用し、液状からゲル化することにより、口腔内の疾患部位に操作性よく浸透した後停滞することが可能である。口腔内は、唾液の介在による流動性と pH による影響が懸念されるが、本レドックスインジェクタブルゲル (RIG) はこれらの課題を解決しうる。以下具体的方法を纏める。

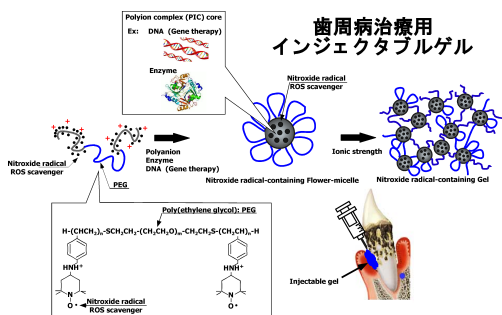


図 1. フラワーミセルの設計

i) イオンコンプレックス型フラワーミセルの設計：生体適合性の高い水溶性高分子ポリエチレングリコール (PEG) の両末端にポリカチオンを結合し、その側鎖にニトロキシドラジカルを導入した (ポリカチオンブロック共重合体)。

ii) フラワーミセルの物理化学評価：i) で合成した各種ポリカチオンブロックを用い、ポリアクリル酸等の各種ポリアニオンとの混合によりナノ粒子を形成せしめ、その粒径、分散安定性と粘性、イオン強度に対するゲル化速度を評価する。

iii) 歯周病モデルラットの作製：4 週齢 Sprague Dawley 雄性ラットの口腔内に *Porphyromonas gingivalis* (Pg) を 5 回感染させた。

iv) RIG 効果の確認：ニトロキシドラジカルを含有する粒子を Redox (+)、非含有粒子を Redox (-) とし、7 回 (Pg 投与後に 5 回、単独で 2 回) の経口投与を行った。実験群は、Control、Pg、Pg + Redox (-)、Pg + Redox (+) の計 4 群とし、Control と Pg 群は 5% カルボキシルメチルセルロース (Pg 群では Pg と含有させた) を投与した。

v) 評価：マイクロ CT 法、歯肉血流量、組織切片解析を行った。また、ラット破骨前駆細胞を用いた in vitro 試験評価も検討した。

4. 研究成果

上顎側部セメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの骨量状態を実体顕微鏡による観察及びマイクロ CT の 3D 画像により骨量解析を行ったところ、コントロール群と比較して、Pg 感染群において、有意な歯槽骨吸収が観察された (図 2)。一方 RIG 投与群では歯槽骨の吸収抑制が認められた ($P < 0.05$)。

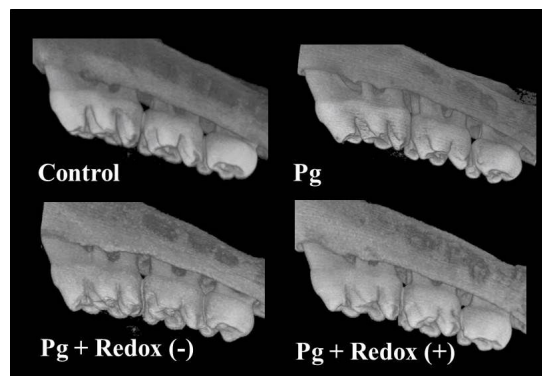


図 2. 上顎側部白歯部 (左側) における骨吸収像

血流量を測定したところ、コントロール群に対して、Pg 群では血液循環量の減少傾向が観察された。しかし、RIG 投与群では Pg 群と比較して歯肉血流量が増大し、有意差を認めた ($P < 0.05$)。

破骨細胞の TRAP 染色による組織学的観察

には、コントロール群に対し、Pg 群では破骨細胞数の増加が観察された。一方 RIG 投与群では破骨細胞数の減少が確認された。

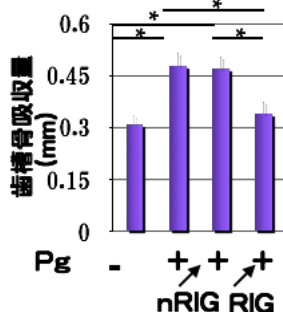


図 3. 破骨細胞数

様々な全身疾患モデルに対して効用を示すレドックス粒子を、口腔内に適応するようにレドックスインジェクタブルゲル (RIG) を新規作製し、骨吸収抑制効果について評価検討を行った。in vivo 実験より骨吸収モデルにおける RIG の骨吸収抑制効果が明らかとなり、in vitro 実験(結果割愛)により RIG の骨吸収抑制効果は破骨前駆細胞から破骨細胞の分化抑制によることが一要因として推察された。

本実験結果においてレドックスインジェクタブルゲル (RIG) が破骨細胞の分化抑制と骨吸収抑制効果を明らかとし、様々な口腔内疾患に対する効用及び創薬としての可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 28 件)

2013年

1. Min Ley Pua, Toru Yoshitomi, Pennapa Chonpathompikunlert, Aki Hirayama, Yukio Nagasaki, Redox-active Injectable Gel Using Thermo-responsive Nanoscale Polyion Complex Flower Micelle for Noninvasive Treatment of Local Inflammation, *Journal of Controlled Release*, Vol. 172, No. 3, 914-920(2013) (doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.009).
2. Yutaka Ikeda, Jinya Katamachi, Hiromichi Kawasaki, Yukio Nagasaki, Novel protein PEGylation chemistry via glutalaldehydefunctionalized PEG, *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 24, No.11, pp.1824-1827(2013) (doi: 10.1021/bc400169s)
3. Babita Shashni, Karun Sharma, Rumani Singh, Kishore R Sakharkar, Sarinder K. Dhillon, Yukio Nagasaki, and Meena K. Sakharkar, Coffee component Hydroxyl Hydro Quinone (HHQ) as a novel ligand for PPAR gamma and implications for breast cancer, *BMC (BioMedCentral) Genomics*, 14(Suppl 5):S6 (2013)
4. Toru Yoshitomi, Yuki Ozaki, Yukio Nagasaki, Redox Nanoparticle Therapeutics to Cancer -Increase in therapeutic effect of doxorubicin, suppressing its adverse effect-, *Journal of Controlled Release*, Vol. 172 No. 1, pp. 137-143 (doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.011)
5. Yutaka Ikeda, Daisuke Kubota, Yukio Nagasaki, Design of sugar-oligonucleotide conjugates installed gold nanoparticle for effective delivery to hepatic parenchymal cells, *Colloid and Polymer Science*, Vol. 291, pp. 2959-2964(2013) (doi 10.1007/s00396-013-3029-3).
6. Sha Sha, Long Binh Vong, Pennapa Chonpathompikunlert, Toru Yoshitomi, Hirofumi Matsui, Yukio Nagasaki, Suppression of NSAID-induced Small Intestinal Inflammation by Orally Administered Redox Nanoparticles, *Biomaterials*, 34, 8393-8400(2013) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.032).
7. Thangavel Lakshmi Priya, Makoto Fujimaki, Subash C.B. Gopinath, Koichi Awazu, Yukichi Horiguchi and Yukio Nagasaki, High-performance waveguide-mode biosensor for detection of Factor IX uses PEG-based blocking agents to suppress non-specific binding and improve sensitivity, *Analyst*, Vol.138, 2863-2870(2013) (doi:10.1039/C3AN00298E)
8. Yukichi Horiguchi, Seigo Miyachi and Yukio Nagasaki, High-Performance Surface Acoustic Wave Immunosensing System on PEG/Aptamer Hybridized Surface, *Langmuir*, Vol. 29, 7369-7376(2013) (DOI: 10.1021/la304548m)
9. Masao Kamimura, Tatsuhiko Furukawa, Shin-ichi Akiyama, and Yukio Nagasaki, Enhanced intracellular drug delivery of pH-sensitive doxorubicin/poly(ethylene glycol)-block-poly(4-vinylbenzylphosphonate) nanoparticles in multi-drug resistant human epidermoid KB carcinoma cells, *Biomaterials Science*, Vol. 1, No.4, 361-367(2013) (DOI:10.1039/C2BM00156J)^[SEP]
10. Yutaka Ikeda, Hiromichi Kawasaki, Satoshi Ichinohe, Yukio Nagasaki, Facile solid-phase synthesis of a highly stable poly(ethylene glycol)-oligonucleotide conjugate, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 529-535(2013) (DOI:10.1039/C2TB00031H)^[SEP]
11. Babita Shashni, Kishore R. Sakharkar, Yukio Nagasaki, Meena K. Sakharkar, The glycolytic enzymes PGK1 and PKM2 as novel transcriptional targets of PPAR gamma in breast cancer pathophysiology, *Journal of Drug Targeting*, Vol. 21, No. 2, Pages 161-174(2013) (DOI: 10.3109/1061186X.2012.736998)^[SEP]
12. Amran Mohamed Hossain, Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Novel Biocompatible Nanoreactor for Silica/Gold Hybrid

Nanoparticles Preparation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 102, 778-782(2013)(10.1016/j.colsurfb.2012.09.034). [SEP]

2012年

1. Long Binh Vong, Tsutomu Tomita, Toru Yoshitomi, Hirofumi Matsui, Yukio Nagasaki, An Orally Administered Redox Nanoparticle that Accumulates in the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice, *Gastroenterology*, Vol.143, No.4, 1027-1036(2012).(doi:10.1053/j.gastro.2012.06.043)
 2. Shunsuke Tomita, Yukio Nagasaki and Kentaro Shiraki, Different mechanisms of action of poly(ethylene glycol) and, arginine on thermal inactivation of lysozyme and, ribonuclease A, *Biotechnology & Bioengineering*, Vol.109, No.10, 2543-2552(2012) (doi: 10.1002/bit.24531)
 3. Pennapa Chonpathompikunlert, Ching-Hsiang Fan, Yuki Ozaki, Toru Yoshitomi, Chih-Kuang Yeh, Yukio Nagasaki, Redox Nanoparticle Treatment Protects Against Neurological Deficit in Focused Ultrasound-Induced Intracerebral Hemorrhage, *Nanomedicine*, Vol. 7, No. 7, Pages 1029-1043(2012)(doi: 10.2217/nnm.12.2)
 4. Xiaofei Yuan, Dolca Fabregat, Keitaro Yoshimoto and Yukio Nagasaki: Development of a high-performance immunolatex based on "soft landing" antibody immobilization mechanism, *Colloid and Surface B: Biointerface*, Vol. 99, 45-52(2012)(10.1016/j.colsurfb.2011.09.040)
 5. Shogo Sumitani, Yukio Nagasaki, Boron Neutron Capture Therapy Assisted by Boron-conjugated Nanoparticles, *Polymer Journal*, Vol.44, No.6, 522-530(2012)(doi:10.1038/pj.2012.30).
 6. Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, Design and preparation of a nanoprobe for imaging inflammation sites, *Biointerphase*, (2012) 7:7, DOI 10.1007/s13758-011-0007-5
 7. Masao Kamimura, Jong Oh Kim, Alexander V. Kabanov, Tatiana K. Bronich, and Yukio Nagasaki, Block Ionomer Complexes of PEG-block-poly(4-vinylbenzylphosphonate) and Cationic Surfactants as Highly Stable, pH Responsive Drug Delivery System, *Journal of Controlled Release*, Vol. 160, 486-494 (2012). (doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.027)
 8. Yutaka Ikeda, Tomoko Jomura, Umeko Horiuchi, Junko Saeki, Keitaro Yoshimoto, Takeshi Ikeya, Yukio Nagasaki, Long-term survival and functional maintenance of hepatocytes by using a microfabricated cell array, *Colloid and Surface, B, Biointerface*, 97, 97-100(2012). (doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.022)
 9. Takaaki Kurinomaru, Shunsuke Tomita, Shinpei Kudo, Sumon Ganguli, Yukio Nagasaki, Kentaro Shiraki, Improved Complementary Polymer Pair System: Switching for Enzyme Activity by PEGylated Polymers, *Langmuir*, Vol. 28, No.9, 4334-4338(2012) (doi: 10.1021/la2043312)
 10. Goshu Tamura, Yuya Shinohara, Atushi Tamura, Yusuke Sanada, Motoi Oishi, Isamu Akiba, Yukio Nagasaki, Kazuo Sakurai, and Yoshiyuki Amemiya: Dependence of Swelling Behavior of pH-responsive PEG-modified Nanogel on Cross-link Density, *Polymer Journal*, Vol.44, No.3, 240-244 (2012)(doi:10.1038/pj.2011.123).
 11. Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, PEGylation Technology in Nanomedicine, *Advances in Polymer Science*, 2012, Volume 247, Polymers in Nanomedicine, Pages 115-140(doi:10.1007/12_2011_154)
 12. Shogo Sumitani, Motoi Oishi, Tatsuya Yaguchi, Hiroki Murotani, Yukichi Horiguchi, Minoru Suzuki, Koji Ono, Hironobu Yanagie, Yukio Nagasaki, Pharmacokinetic Study and In Vivo Cancer Boron Neutron Capture Therapy Based on Core-Polymerized and Boron-Conjugated Micelles, *Biomaterials*, Volume 33, Issue 13, May 2012, Pages 3568-3577(DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.01.039)
 13. Toru Yoshitomi, Yu Yamaguchi, Akihiko Kikuchi, Yukio Nagasaki, Creation of a blood-compatible surface: a novel strategy for suppressing blood activation and coagulation using nitroxide radical-containing polymer with reactive oxygen species scavenging activity, *Acta Biomaterialia*, 8, 1323-1329(2012)
 14. 長崎幸夫、「生体適合性ポリエチレングリコール表面の構築」、*高分子*、61巻、2月号77-82ページ(2012)
 15. Xiaofei Yuan, Dolca Fabregat, Keitaro Yoshimoto and Yukio Nagasaki, High PEGylation Efficiency of Pentaethylenhexamine-end Poly(ethyleneglycol) (mPEG-N6) for Active-ester Surface, *Colloid and Surface B: Biointerface*, 92, 25-29 (2012) 'doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.11.013)
- Yukio Nagasaki, Nitroxide radicals and nanoparticles: A partnership for nanomedicine radical delivery, *Therapeutic Delivery*, 3(2) 1-15(2012)(doi: 10.4155/tde.11.153)

〔学会発表〕(計 233 件)

2013.2.3-5 Yukio Nagasaki, Oral Redox Polymer Therapeutics, 16th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery(Salt Lake City, Utah, U.S.A.) 他

〔図書〕(計 6 件)

1. Atsushi Tamura, Yukio Nagasaki, "Environmentally-Responsive Nanogels for

- siRNA Delivery", "Advanced Delivery and Therapeutic Applications of RNAi, Ed. by Kun Cheng, Ram, I. Mahato, Wiley(2013)
- Masao Kamimura, Yukio Nagasaki, "PEGylated Ceramic Nanophosphors for Near-infrared Fluorescence Bioimaging", eBook, "Hot topics in biomedical materials", Future Science, London, U.K.(2013)
 - 長崎幸夫、「大腸粘膜に対する経口型レドックスナノ粒子の集積と潰瘍性大腸炎治療効果の増強」、「非経口投与製剤の開発と応用—次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指して—」、山本 昌監修、シーエム-シー出版、2013年6月
 - 長崎幸夫、堀口諭吉、「ガドリニウムフラレンによる中性子捕捉療法」、2013ナノカーボン技術大全、Electric Journal編、2012年
 - 長崎幸夫、「ナノゲルによるピンポイント治療・診断システムへの展開」、先端バイオマテリアルハンドブック、秋吉 一成（京都大学）、石原 一彦（東京大学）、山岡 哲二（（独）国立循環器病研究センター研究所）監修、エヌ・ティー・エス、東京、2012年6月15日
 - Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, PEGylation Technology in Nanomedicine, Advances in Polymer Scienc 247, Polymer s in Nanomedicine, pp.115-140, 2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計 8 件）

- 名称：高分子化環状ニトロキシドラジカル化合物の経口投与用製剤
 発明者：長崎幸夫、長崎 幸夫、吉富 徹、尾崎 佑樹、シヨンプトンピクンラート、ペンナパー、島野 仁、松坂 賢
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：特願 2012-019975
 出願年月日：2012年2月1日
 国内外の別： 国内
- 名称：トリブロックコポリマー及びその使用
 発明者：長崎幸夫、プア ミンリー、シヨンプトンピクンラート ペンナパー、吉富 徹
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2013/051395
 出願年月日：2013年1月24日
 国内外の別： 国際
- 名称：高分子化環状ニトロキシドラジカル化合物とシリカの有機-無機ハイブリッド複合体
 発明者：池田 豊、吉富 徹、矢口達也、山

- 下真代、平山 暁、植田敦志、ホサイン あムラン、吉成友貴
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2013/ 52769
 出願年月日：2013年2月7日
 国内外の別： 国際
- 名称：ポリカチオン性トリブロックコポリマーとポリアニオン性ポリマーと生理活性ペプチドを含む組成物
 発明者：長崎幸夫、金子純也、吉富 徹
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2014/065344
 出願年月日：2014年6月26日
 国内外の別： 国際
 - 名称：ポリカチオン性トリブロックコポリマーとポリアニオン性ポリマーの組成物を含む癒着防止剤
 発明者：長崎幸夫、中川寛之
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2015/052146
 出願年月日：2015年1月27日
 国内外の別： 国際
 - 名称：ポリカチオン性トリブロックコポリマーとポリアニオン性ポリマーと生理活性ペプチドを含む組成物
 発明者：長崎幸夫、金子純也、吉富 徹、石井志郎
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2014/065344
 出願年月日：2015年2月27日
 国内外の別： 国際
 - 名称：ポリイオンコンプレックスを有効成分とするドライアイ処置用組成物
 発明者：長崎幸夫、中川寛之
 権利者：筑波大学
 種類：特許
 番号：特願 2016-016748
 出願年月日：2016年1月31日
 国内外の別： 国内
 - 名称：疼痛治療への応用を目指したポリイオンコンプレックス相互作用に基づく局所麻酔薬封入フラワー型高分子ミセルの設計
 発明者：長崎幸夫、水越雄太郎
 権利者：筑波大学
 種類：特許

番号：特願 2016-024201
出願年月日：2016年2月9日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/index.htm

6．研究組織
(1)研究代表者
長崎幸夫 (NAGASAKI YUKIO)
筑波大学・数理物質系・教授
研究者番号：90198309