

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792339

研究課題名(和文) 歯周病の新規予防物質としてのウナギガレクチンの有効性評価

研究課題名(英文) Efficacy estimation of eel lectin as a new agent to prevent periodontal disease

研究代表者

高山 沙織 (TAKAYAMA, SAORI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00550013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎は歯周病原細菌が引き起こす感染性疾患である。その予防や治療に有効な物質として、これまでにウナギ体表に存在するガレクチンAJL-1が歯周病原細菌に対し、一定の効果があることを報告してきた。

本研究では同じウナギ体表に存在するレクチンAJL-2に注目し、歯周病原細菌の内毒素が誘導する炎症性サイトカイン産生と、バイオフィーム形成に対するAJL-2の影響について調査した。

その結果、AJL-2は炎症性サイトカインの誘導を抑制したが、AJL-1と同等のバイオフィーム形成抑制はみられなかった。タンパク質構造の違いなどから、作用機序の相違を検討し、今後の新たな歯周病予防物質の開発に応用する。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is infectious disease induced by periodontal pathogens. Many natural antibacterial substances have been reported as useful agents in the prevention and treatment of periodontal disease. We have reported that galectin AJL-1 found in skin mucus of eel possessed some useful abilities against periodontal pathogen.

AJL-2 is a lectin, also found in skin mucus of eel, and we focused it in this study. We investigated the inhibitory effects of AJL-2 on the endotoxin-mediated inflammatory cytokine-inducing activities of periodontopathic bacteria, and on the biofilm formation by those pathogens.

Then, AJL-2 inhibited inducing of the cytokine, but it showed no inhibitory effect on the biofilm formation as well as AJL-1. Further investigations about the difference of mechanism between these two substances are required to develop a new agent for more effective periodontal therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：ウナギレクチン 歯周病原細菌 内毒素 炎症性サイトカイン バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患の発症と進行には *Porphyromonas gingivalis*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* をはじめとする gram 陰性桿菌群が重要な役割を果たしている。そのため、歯周病の予防には歯周病原細菌により形成され、歯面へ強固に付着しているバイオフィルムの形成阻止が必須である。現在、歯周疾患治療において感染のコントロールには抗生剤が用いられているが、バイオフィルムを形成している細菌は感受性が低下しており (Takahashi N, et al. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 59-65.)、さらにその副作用の点からも薬物によるその除去には未だ課題があり、バイオフィルムをコントロールできる生体に影響が少ない物質の開発が必要とされている。

近年、バイオフィルムの予防を目的とした抗菌活性をもつ天然物質が、従来の薬物よりも更に安全な代替物として注目されており (Takarada K, et al. Oral Microbiol Immunol 2004; 19: 61-4.)、このような物質は、耐性を引き起こしにくい新たな抗菌性物質として報告されてきた (Zasloff M. Nature 2002; 415: 389-95.)。そこで我々はそれらの一つであるウナギレクチンに注目した。

魚類体表にみられる機能性タンパク質レクチンには、抗菌活性をもつものがあることが知られており、ウナギ体表上皮粘液中に存在するガレクチンも、感染防御の役割を担うことが示されている (Tasumi S, et al. Dev Comp Immunol 2004; 28: 325-35.)。これまでの研究代表者らの研究では、ウナギガレクチンの一つである AJL-1 が歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* のバイオフィルム形成に対し、抑制効果をもつことを明らかにした (Takayama et al, Int J Antimicrob Agents 2009; 34: 355-359.)。この AJL-1 に、抗菌活性は認められなかったことから、バイオフィルム抑制効果は本菌の付着を抑制することに起因するものであると考えられた。

この AJL-1 と同様にウナギの体表上皮粘液中に存在するレクチンが AJL-2 であり、*E. coli* を凝集させるといわれてきた。AJL-2 も *A. actinomycetemcomitans* やその他の歯周病原細菌に対し、バイオフィルムの形成抑制を示す可能性が高く、歯周疾患予防の新たな手段として期待された。

2. 研究の目的

代表的な歯周病原菌 *A. actinomycetemcomitans* などを用い、日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) 体表上皮より分離精製したウナギレクチン AJL-2 とともに培養することにより、バイオフィルム形成量に与える影響を明らかにすること、これにより AJL-2 の歯周病原菌に対するスペクトラムを明らかにすることを目的とした。

さらに菌の ATP の測定、CFU の測定、共焦点顕微鏡観察により、バイオフィルム形成が

変化するメカニズムを明らかにし、歯磨剤や洗口剤への応用などに使用可能な新規の天然由来歯周病予防物質としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

日本産ウナギ体表より分離したウナギレクチン AJL-2 の純度および濃度を確認した上で、本研究に用いた。

歯周病の発症や進行には、歯周病原細菌がもつ内毒素 (LPS) が深く関与しているといわれているが、研究代表者はこれまでに、ウナギガレクチン AJL-1 は、*A. actinomycetemcomitans* Y4 由来の LPS が誘導するヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞からの炎症性サイトカイン産生を抑制する能力をもつことを明らかにしてきた (Takayama et al, Int J Antimicrob Agents 2009; 34: 355-359.)。LPS は、gram 陰性細菌の外膜の構成成分であり、細菌の付着やバイオフィルム形成にも関与するともいわれている。AJL-1 と同じ、ウナギ体表粘液中に存在するレクチンである AJL-2 も、同様の抗内毒素活性をもつ可能性が高いことから、歯周病原細菌 LPS が誘導する、生体細胞からの炎症性サイトカイン産生に与える AJL-2 の影響を検証した。

また歯周病原細菌を、AJL-2 を添加した培地にて培養し、バイオフィルム形成量や細菌 ATP、CFU を測定し、その影響を検討した。

(1) ウナギレクチン AJL-2 の精製・調製

日本産ウナギ (*Anguilla japonica*) 体表上皮から、ゲル濾過とアフィニティクロマトグラフィーによって分離精製したウナギレクチン AJL-2 の純度を SDS-PAGE にて確認した。また、精製標品中の AJL-2 の濃度を、プロテインアッセイを用いて確認し、必要濃度に希釈し、以降の実験に用いた。

(2) 歯周病原細菌 LPS の炎症性サイトカイン誘導活性に対する AJL-2 の影響

培養細胞

ヒト正常大動脈内皮細胞 (HAEC) を、48 ウェルプレートにて、37 °C、5%CO₂ 条件下にてコンフルエントに達するまで培養し、実験に使用した。

内毒素 (LPS)

A. actinomycetemcomitans Y4 より Hot phenol 法にて抽出・精製した LPS を用いた。

炎症性サイトカイン産生量の測定

HAEC の培養液中に、AJL-2 (0.4 - 2.0 µg/ml) と LPS (8.0 ng/ml) を添加し、17 時間培養した。培養後、細胞上清中の炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-6 および IL-8 量を、市販 ELISA kit を用いて測定した。また、コントロールとして、培地に LPS のみを添加する群、および何も添加しない群を設定し、比較検討を行った。

さらに、HAEC の培養液に AJL-2 (2.0 µg/ml) と LPS (8.0 ng/ml) を添加するタイミングを

変えた全 4 群を設定し、同様に上清中の IL-6 量を測定した。すなわち、AJL-2 と LPS を同時に添加する群 (AJL+LPS 群) LPS を培地に添加後、1 時間培養した後に、AJL-2 を添加する群 (LPS AJL 群) AJL-2 を培地に添加後、1 時間培養後に、LPS を添加する群 (AJL LPS 群) AJL-2 と LPS をあらかじめ 1 時間混合させておいてから培地に添加する群 (AJL+LPS 群) の 4 群と、前述のコントロール 2 群を設定し、測定を行った。

(3)AJL-2 の歯周病原細菌バイオフィーム形成への影響と殺菌効果についての検討 共試菌株と培地

A. actinomycetemcomitans Y4, ATCC 29523, ATCC 29524 を 0.1% yeast-extract 含有 Tryptic soy broth にて嫌気条件下 (80% N₂, 10% H₂ and 10% CO₂) で培養し、実験に用いた。

バイオフィーム形成の測定

24 時間前培養した共試菌株菌液を 96 ウェルプレートに各ウェル 100μl ずつ植菌し、同時に、AJL-2 (15μg - 50μg/ml) を添加した。24 時間培養後、形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットにて染色、エタノールで溶出した染色液の吸光度を OD595nm にて測定し、バイオフィーム形成量とした。

浮遊菌量の測定

浮遊菌として、上記と同様に AJL-2 とともに 24 時間培養した共試菌株菌液の上清を用い、吸光度 (OD 595nm) を測定。浮遊菌量として定量化した。

浮遊菌の bioactivity の測定

上記、共試菌株菌液の上清を採取し、ATP-bioluminescence assay を市販 ATP 測定キットにて行い、得られた数値を浮遊菌の bioactivity とした。

4. 研究成果

(1)精製 AJL-2 の分析

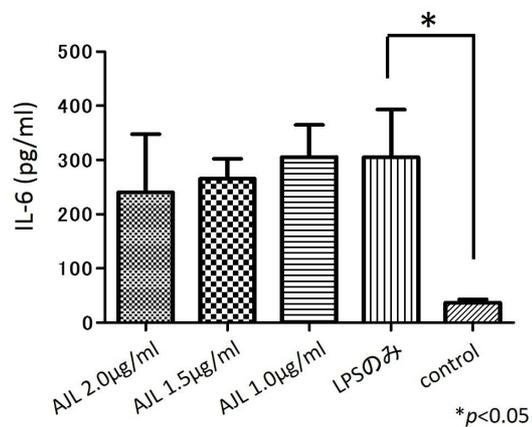
ゲル濾過とアフィニティークロマトグラフィによって分離精製された AJL-2 は、SDS-PAGE の結果、以前の報告 (Saito E. et al, 2005) と同様のバンド形成が認められ、不純物を疑うバンドの形成はみられなかった。そのことから、本精製 AJL-2 は純度の高い状態であると考えられ、以降の実験に用いた。

また、プロテインアッセイの結果より、精製標品の濃度は 100μg/ml とし、以降の実験ではそれを希釈して用いた。

(2) *A. actinomycetemcomitans* Y4 LPS の炎症性サイトカイン誘導活性に対する AJL-2 の影響

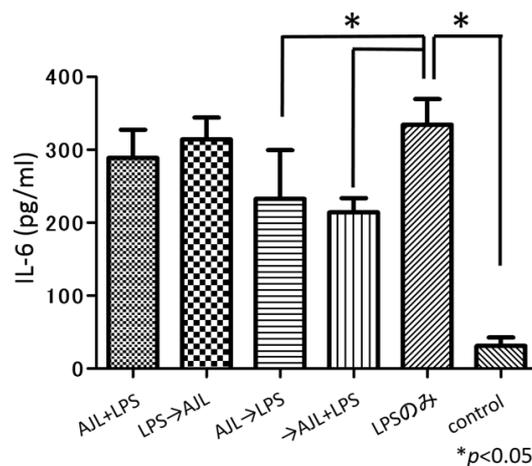
A. actinomycetemcomitans Y4 LPS により、HAEC からの産生が増加した IL-6 産生量は、同時に AJL-2 を細胞培地へ添加することにより、濃度依存的に抑制された (図 1)。

しかし、IL-8 の産生誘導においては、同様の抑制傾向は認められなかった。



(図 1)
各濃度の AJL-2 が LPS により誘導される IL-6 産生に及ぼす影響

さらに、AJL-2 の IL-6 産生抑制の機序を検討するため、培地に AJL-2 と LPS を添加するタイミングを変えた群を加えて、同様の実験を行ったところ、AJL-2 と LPS をあらかじめ 1 時間混合させておいてから培地に添加する群 (AJL+LPS 群) および、AJL-2 を培地に添加後、1 時間培養後に、LPS を添加する群 (AJL LPS 群) において、LPS のみ添加した群と比較して、IL-6 産生量が統計学的有意に抑制されていた。また、その他の AJL-2 添加群においても IL-6 産生が抑制される傾向がみられた (図 2)。

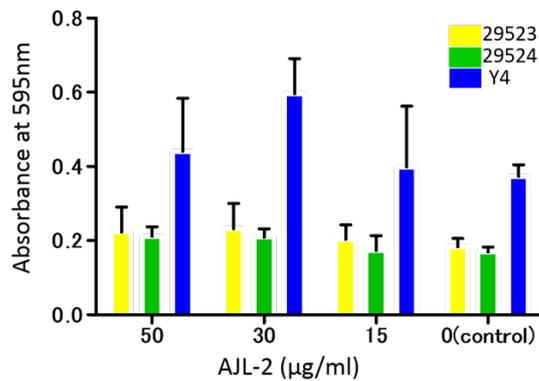


(図 2)
AJL-2 と LPS の各添加タイミングが IL-6 産生に及ぼす影響

(3) AJL-2 の *A. actinomycetemcomitans* バイオフィーム形成への影響と殺菌効果についての検討

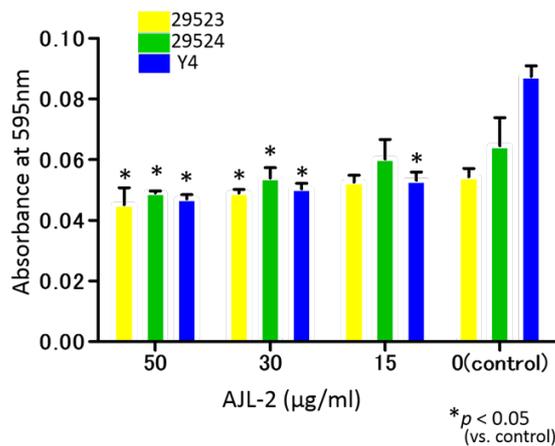
各 *A. actinomycetemcomitans* 菌株の培地に、各濃度の AJL-2 を添加して培養しても、バイオフィーム形成量に統計学的有意な変化は認められなかったが、共試した 3 菌株すべてで、AJL-2 添加群の方がコントロールと比較して

バイオフィーム形成量が多い傾向にあった (図3)

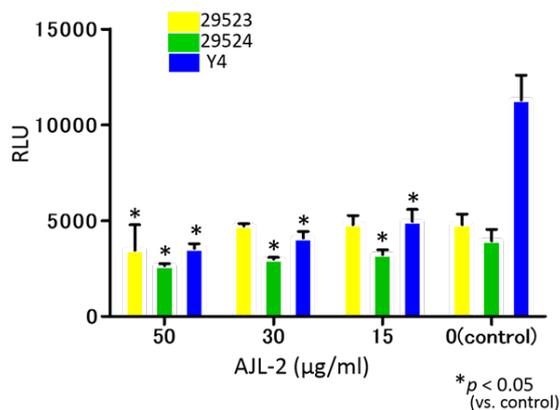


(図3) AJL-2 が *A. actinomycetemcomitans* バイオフィーム形成に及ぼす影響

浮遊菌量と浮遊菌 bioactivity においては、共試した 3 菌株すべてで、AJL-2 の濃度依存的に抑制がみられ、コントロール群と比較してその差は統計学的に有意であった(図4, 5)



(図4) AJL-2 が *A. actinomycetemcomitans* 浮遊菌量に及ぼす影響



(図5) AJL-2 が *A. actinomycetemcomitans* 浮遊菌 bioactivity に及ぼす影響

ウナギ体表粘液由来レクチン AJL-2 は、歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* Y4 由来 LPS による、ヒト正常大動脈内皮細胞からの炎症性サイトカイン IL-6 の誘導を、濃度依存的に抑制した。また、AJL-2 と LPS をあらかじめ混合しておいたものを細胞培地へ添加した群において最も IL-6 の誘導を抑えていたことから、AJL-2 が LPS へ何らかの作用をし、IL-6 の誘導を抑えたのではないかと考えられた。AJL-2 を細胞培地へ添加した群においても、後から添加された LPS へ AJL-2 が作用することで、LPS の細胞への作用を阻害した可能性が高い。これまでの研究で、ガレクチン 3 は細菌 LPS へ結合することが報告されてきている。AJL-2 も *A. actinomycetemcomitans* Y4 LPS へ結合することで、サイトカイン誘導を抑制した可能性がある。

AJL-2 は *A. actinomycetemcomitans* 3 菌株の浮遊菌量と浮遊菌 bioactivity を統計学的有意に抑制した。AJL-2 を培地へ添加することにより、浮遊菌の付着が促進し、浮遊菌が減少したとみられる。今回の研究では、バイオフィーム形成に対する AJL-2 の明らかな影響は認められなかったが、AJL-2 の添加によりバイオフィーム形成量が増加する傾向が認められたことから、浮遊菌のバイオフィーム形成を促進させる可能性がある。今後、AJL-2 の濃度を検討するなどして、さらなる AJL-2 のバイオフィーム形成への作用を調査する必要がある。また、AJL-2 の培地への添加により、各菌株の浮遊菌 bioactivity が濃度依存的に減少したが、これは浮遊菌量の減少によるものとみられ、AJL-2 に抗菌効果は認められないと考えられた。

今後は、ガレクチン AJL-1 との構造の違いと、歯周病原細菌に対する各作用を比較し、作用機序の検討と、他の歯周病原細菌に対する効果などを調査する。AJL-1 および AJL-2 ともに、食品由来の機能性タンパク質であり、歯周治療への応用に対する国民からの理解は得やすいと考えられる。その他の食品由来物質とともに、新規歯周治療材料の候補として、研究の発展が期待される。

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)

Sachiyo Tomita, Akiyo Komiya-Ito, Kentaro Imamura, Daichi Kita, Koki Ota, Saori Takayama, Asako Makino-Oi, Takashi Kinumatsu, Mikio Ota, Atsushi Saito,

Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis, *Microbial Pathogenesis*, 査読有, 61-62: 11-15, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

高山沙織, 今村健太郎, 喜田大智, 加藤哲男, 齋藤 淳, 米ペプチド CL の歯周病原細菌に対する抑制効果, 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 5 月 24 日, 岐阜市

高山沙織, 今村健太郎, 喜田大智, 加藤哲男, 齋藤 淳, 米ペプチド CL は *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS によるヒト大動脈内皮細胞からの IL-6 産生を抑制する, 第 296 回東京歯科大学学会(総会), 2013 年 10 月 19 日, 千代田区

高山沙織, 大久保信貴, 加藤哲男, 齋藤淳, 米ペプチド CL の歯周病原細菌内毒素活性に対する抑制効果, 第 138 回日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会, 2013 年 6 月 28 日, 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 沙織 (TAKAYAMA SAORI)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 00550013