

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861753

研究課題名(和文) 糖尿病ならびに歯周病の病態改善を目的とした新規ペプチド医薬品の開発

研究課題名(英文) Development of new peptide agent for improvements in diabetes mellitus and periodontal disease symptoms

研究代表者

高橋 真理子 (TAKAHASHI, Mariko)

東京医科歯科大学・歯学部・技術職員

研究者番号：90334440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は歯周病の病態との関連性も深く、歯周病治療における注意すべき疾患の一つである。そこで両者に関連している炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子(TNF- α)の制御が糖尿病および歯周病の病態改善に効果を示すと仮説をたて、新規ペプチド医薬品候補の探索を計画した。ペプチド医薬品の候補としてTNF- α 阻害作用を持つWP9QYペプチド(W9)を用い、糖尿病および炎症性骨吸収モデルマウスに及ぼす効果を検討した。W9の糖尿病の明らかな病態改善効果は認められなかったが、糖尿病患者が歯周病などによる炎症性骨吸収を合併した場合における増悪阻止を標的としたペプチド医薬品としての可能性はあると思われる。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus (DM) is involved in periodontal disease. In the periodontal disease treatment, dentists need careful attention whether patient is associated with DM or not. We focused TNF- α which is one of the inflammatory cytokines and is known to be involved in both DM and periodontal disease. We made a hypothesis that the inhibition of TNF- α could lead to the improvements of both diseases. In order to clarify whether the reduction of the TNF- α action could be a therapeutic regimen for treating both diseases, we attempted to administer the TNF- α antagonist peptide W9 to animal disease-model of DM and periodontitis. In results, W9 did not reduce the DM symptoms, but it reduced inflammation and bone resorption. These results suggest that W9 could be a potential therapeutic drug candidate to prevent exacerbation of a disease symptom in the case of DM patients in combination with inflammatory bone diseases such as periodontitis.

研究分野：硬組織薬理

キーワード：糖尿病 血糖値 骨吸収 ペプチド創薬 TNF- α アンタゴニスト

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の1つである糖尿病は、我が国において40歳以上では10人に1人が糖尿病であるといわれている。しかも治療に至ってはいないが高血糖を有する患者予備群も多く存在し、今後さらに糖尿病患者が増加することが危惧されている。

さらに、糖尿病は歯周病の病態との関連性も深く、歯周病治療においても注意すべき疾患の1つとなってきた。これまでに、血糖コントロールが不良な糖尿病患者では歯周病が増悪しやすく、さらに重度の歯周病患者では血糖コントロールが不良となるなど病態と血糖コントロールが悪のスパイラルに入ることが報告されている。高血糖が持続すると免疫能力低下、終末糖化産物(AGEs: advanced glycation end products)の蓄積、腫瘍壊死因子(TNF-)などの炎症性サイトカインの増加などを引き起こし、これらが歯周病の病態悪化に関与していると考えられている。

超高齢化社会を迎えている今日において、歯周病などによる歯の喪失がADL/QOL(activity of daily living/quality of life)に及ぼす影響はとて大きく、全身の健康維持を考慮する上でも口腔機能の維持は重要な役割を持っている。

近年、糖代謝と骨代謝の関係性が明らかになりつつあるが、糖尿病に伴う様々な骨代謝異常の機序についてはいまだ解明されていない点が多い。相互に関連する病態メカニズムを解明することができれば、予防・診断および治療への応用に向けた第一歩を踏み出すことができると考えられる。

我々の研究グループは、炎症性サイトカインの1つであるTNF-とその受容体の結合部位に類似したアミノ酸配列をもつW9ペプチド(W9ペプチド)に着目し、様々な疾患モデル動物を用いてその効果の検討を行ってきた。W9ペプチドは破骨細胞形成および骨吸収を阻害し、歯周病原菌投与マウスにおいて引き起こされる骨吸収を抑制することを認めた(Suzuki et al., J Periodont Res, 41(2), 81-91, 2006)。

また、関節炎発症マウスにおいて、骨吸収抑制作用だけでなく炎症反応抑制作用も併せ持つことが示された。さらに、破骨細胞におけるRANKLシグナルも阻害することを認めた(Aoki et al., JCI, 116(6), 1525-34, 2006)。

W9ペプチドのような小分子のペプチド医薬品は体内で分解されやすいなどの欠点を持つが、抗体医薬品などの生物学的製剤に比べて低コストで作製できる。さらに、抗体が作れない標的に対しても応用が可能であるなど利点が多い。

そこで、これらの特質をもつ小分子ペプチドであるW9ペプチドをTNF制御に応用することができれば、より効果的で安全性の高い新規医薬品の開発が可能となるのではない

かと考えた。

2. 研究の目的

糖尿病に伴う骨代謝異常のメカニズムはまだ明らかにされていないため、高血糖状態などがもたらす機能障害機序を解明し、薬物治療の可能性を追求することは意義がある。そして、歯周病と糖尿病は相互に関連しており、W9ペプチドによるTNF制御が可能になれば歯周病治療をはじめとした口腔機能の維持や食生活を含めた生活習慣の改善につながり、血糖コントロールの維持に結び付くと考えた。

本研究では、これまでの成果を踏まえ、W9ペプチドのTNF-阻害作用を応用することができれば、糖尿病や歯周病の病態改善に結び付くと仮説をたてた。この仮説を証明するため、糖尿病および炎症性骨吸収モデルマウスに及ぼすW9ペプチドの効果を検討する研究計画を立案した。本研究は、糖尿病ならびに歯周病におけるW9ペプチドの新規ペプチド医薬品としての可能性を探求することを目的とした。

本研究によりTNF-受容体拮抗薬W9ペプチドの効果が明らかになれば、糖尿病による慢性炎症を基盤病態とする各種疾患の発症を予防できる可能性があり、新規ペプチド医薬品の候補として価値があると考えた。さらに、糖尿病や歯周病あるいは慢性心臓疾患や関節リウマチなど骨脆弱性が疑われる血清TNF-値が高い疾患治療にも貢献する可能性があると考えられた。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルマウスの再現

報告されている論文(Nakamura et al., Biol. Pharm. Bull., 29(6), 1167-74, 2006)を参考にし、6週齢C57BL/6Jマウスにストレプトゾトシン(100 mg/kg)およびニコチンアミド(240 mg/kg)を腹腔内に2回投与し、糖尿病発症を誘発した。

(2) 炎症性骨吸収モデルマウスの作製

マウス頭蓋骨に細菌毒素であるLipopolysaccharide(LPS)を単回投与し(8 mg/kg)炎症性骨吸収を誘発した。対照としてPBS(Vehicle)の単回投与を行った。

(3) W9ペプチドの投与

浸透圧ミニポンプを用いてW9ペプチドの持続的投与を行った(4 mg/kg/day)。ミニポンプはマウスの背部皮下に埋入した。投与期間は糖尿病発症誘発開始時から安楽死処置までとした。

(4) 血糖値・体重の測定

経時的に血糖値および体重を測定し、各病態およびW9ペプチド投与による影響を比較検討した。

(5) 糖負荷試験・インシュリン負荷試験

糖尿病誘発処置から7週間後に糖負荷試験およびインシュリン負荷試験を行い、各

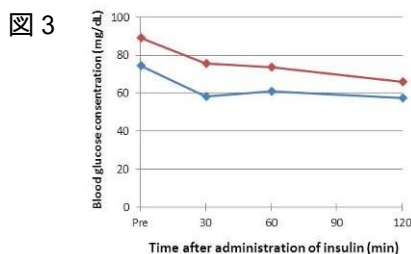
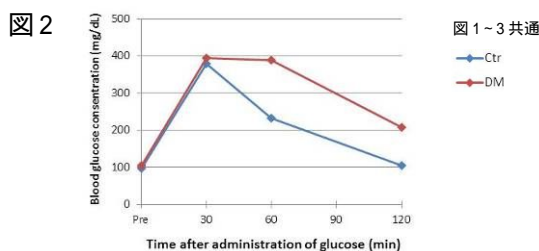
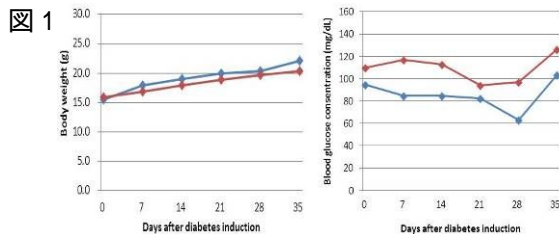
病態および W9 ペプチド投与による影響を比較検討した。

(6)骨吸収窩の表現型の解析

LPS または PBS 投与 5 日後に安楽死処置を行い、グルタールアルデヒド-ホルムアルデヒド混合液による固定を行った後、頭蓋骨を摘出した。軟 X 線装置を用いて頭蓋骨における骨吸収窩形成の状態を観察した。

4. 研究成果

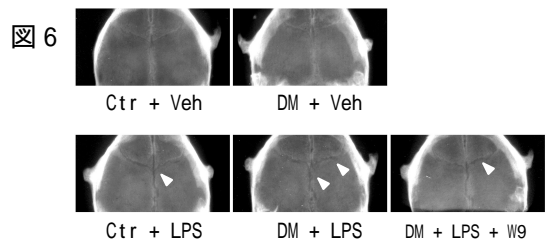
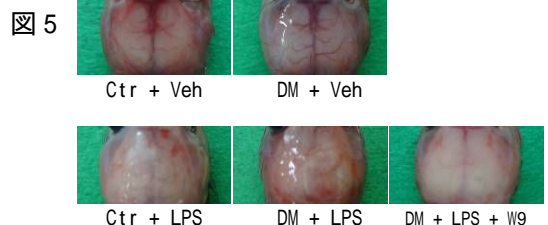
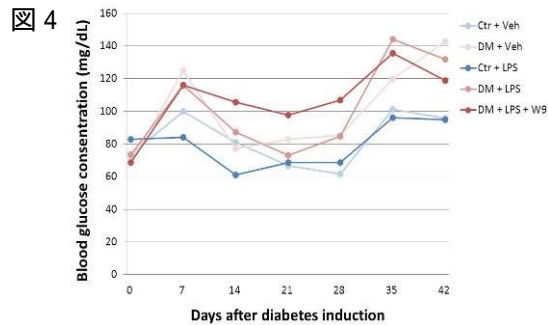
まず、C57BL/6J マウスにストレプトゾトシンおよびニコチンアミドを投与し、2 型糖尿病発症誘発の再現を試みた。投薬したマウスは、コントロールマウスと比べて体重に有意な差を生じなかったが、空腹時血糖値は高値を示した(図 1)。また、誘発処置開始から 7 週間後に糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行ったところ、糖負荷後のインスリン分泌能検査ではコントロールマウスと比べて高血糖を呈し耐糖能低下が観察されたが(図 2)インスリン負荷試験によりインスリン受容体の感受性の低下は観察されなかった(図 3)。これらの結果は、日本人をはじめとするアジア人が発症する非肥満型の 2 型糖尿病に近い病態を再現していることが示唆された。



次に、W9 ペプチドの経時的投与を行いながら 2 型糖尿病誘発を行い、経時的な血糖値測定、糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。さらに、このモデルマウスの頭蓋骨に LPS を投与し、炎症性骨吸収の誘発も行った。

非肥満型 2 型糖尿病の発症において症状にばらつきを生じることがあり、薬液の安定性や術者の手技によって発症頻度が左右されやすいと推測される。一定して発症を誘発するためには、施術におけるさらなる工夫と手技の向上が必要であると思われた。

W9 ペプチドが各病態にもたらす効果を検討したところ、W9 ペプチドによる血糖コントロールを認めるまでには至らなかったが、糖尿病モデルマウスにおける LPS による炎症が W9 ペプチドによって抑制されている傾向が観察された(図 4, 5, 6)。



本研究において、W9 ペプチドによる非肥満型 2 型糖尿病の病態改善効果を確認することはできなかったが、投与量や投与方法などのさらなる条件検討を行えば、糖尿病患者が歯周病などによる炎症性骨吸収を合併した場合における増悪阻止を標的とした新規ペプチド医薬品としての可能性は示唆されたと思われる。今後さらに詳細に解析を進めて基礎的情報基盤を得ることができれば、慢性炎症を基盤病態とした疾患の発症を予防することにも繋がり、さらに慢性心臓疾患や関節リウマチなど骨脆弱性が疑われる血清 TNF- α 値が高い疾患への治療にも貢献できると思われる。

本研究を行うにあたりご指導助言を頂きました東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科青木准教授、田村助教、大谷名誉教授に深謝いたします。

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)

Genki Kato, Yasuhiro Shimizu, Yuki Arai, Natsuki Suzuki, Yasutaka Sugamori, Miki Maeda, Mariko Takahashi, Yukihiko Tamura, Noriyuki Wakabayashi, Ramachandran Murali, Takashi Ono, Keiichi Ohya, Setsuko Mise-Omata, Kazuhiro Aoki: The inhibitory effects of a RANKL-binding peptide on articular and periarticular bone loss in a murine model of collagen-induced arthritis: a bone histomorphometric study. Arthritis Res. Ther. 2015; 17 (1): 251. DOI: 10.1186/s13075-015-0753-8、査読あり

〔学会発表〕(計2件)

1. 青木和広、菅森泰隆、加藤玄樹、上原智己、新井祐貴、Md.Zahirul Haq Bhuyan、Neil Alles、Masud Khan、高橋真理子、田村幸彦、若林則幸、大谷啓一. RANKL 結合ペプチドの骨吸収抑制作用と骨形成促進作用. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 25 日 福岡 福岡国際会議場
2. 加藤玄樹、清水康広、菅森泰隆、高橋真理子、田村幸彦、小野卓史、大谷啓一、青木和広. マウス関節リウマチモデルにおける RANK 様ペプチドの作用. 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日 仙台 東北大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/hpha/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 真理子 (TAKAHASHI MARIKO)
東京医科歯科大学・歯学部・技術職員
研究者番号：90334440

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし