

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861898

研究課題名(和文) ジルコニアインプラント周囲炎予防のための新規人工抗菌ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of novel artificial antimicrobial peptide for prevention of periimplantitis of zirconia implants

研究代表者

橋本 和彦 (Hashimoto, Kazuhiko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30464960

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)：抗菌ペプチドとして知られるHistatin 5のアミノ酸配列モチーフおよびLactoferricinのアミノ酸配列モチーフを用いて、申請者が同定したジルコニア結合ペプチドモチーフと合わせて2種類の機能性人工タンパク質を化学的に合成した。溶媒に溶解したこれら2種の機能性人工ペプチドをジルコニア円板上にコーティング後、歯周病原菌を円板上で37℃、嫌気培養条件下で2日間培養した。それぞれの生菌数を計測してところ、両者いずれも濃度依存性に生菌数が減少していた。この結果より、これら2種の新規機能性人工ペプチドはある程度の抗菌活性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Two functional artificial peptide were synthesized chemically by the fusion with Histatin 5 or Lactoferricin peptide motif, known as antimicrobial peptide, and Zirconia binding peptide motif. These peptides dissolved in solvents were coated on the surface of Zirconia disc, and then, *P. gingivalis*, well-known as periodontopathic bacterium, was incubated for two days at 37 °C under aerobic condition. Subsequently, the activity of these peptides was evaluated with determination of viable bacteria count. The viable bacteria count in these peptides were reduced gradually in a concentration dependent manner of peptide. From the result, it suggested that two novel functional artificial peptides have antimicrobial activity against a *P. gingivalis*.

研究分野：歯学

キーワード：ジルコニア 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

現在歯科臨床において流通しているインプラントは、高い生体親和性および生体適合性をもつチタン製のものが主流である。しかし、チタンは生体内で強固な不動態被膜を形成するために生体内で安定であるといわれているが、金属であるために条件によっては微量の金属イオン溶出がどうしても避けられない。また、歯科インプラントに限らず口腔内の金属歯冠修復物がしばしば金属アレルギーの原因になるとして歯科業界においても問題となっており、近年メタルフリーによる歯科医療の提供が提唱されつつある。そのような中、チタンに替わる新しいインプラント材料として注目を浴びているのが「ジルコニア」である。ジルコニアはセラミックスの一種で高い生体適合性を持ち、天然歯に似た色調をもつことから歯冠修復材として臨床応用されている。さらにアルミナなど従来のセラミックスと比較して耐磨耗性、圧縮強さ、曲げ強さなどの機械的特性に優れていることから、近年ではインプラント体として応用された報告もある。

インプラントを長期残存機能させる為の要因としてはオッセオインテグレーションの獲得とインプラント周囲炎の予防、の2つが考えられるが、オッセオインテグレーションを得るためのインプラント改良はある程度確立されており、インプラント周囲炎を克服することが課題と考えられる。チタンインプラント周囲炎が歯科インプラント成功を阻害する要因となることは既に周知の事実であり、その原因としては歯周病原菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) や *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) などの感染が関与しているといわれているが、ジルコニアインプラントにおいても同様のことがいえると考えられる。天然歯においては、歯冠周囲は付着上皮が直接歯と接触して緊密に封鎖されている(いわ

ば生物学的封鎖)のために、これらの細菌の歯周組織内への侵入が抑制されている。しかしながらインプラントではインプラント周囲歯肉の癒痕収縮による物理的封鎖がその役割を担っており、インプラントとその周囲上皮の封鎖性の弱さが指摘されている。そこで、ジルコニアインプラント周囲に抗菌活性をもつペプチドを保持させることができれば、インプラント周囲の細菌防御能の弱さが改善できると考えられる。申請者はすでにファージディスプレイ法を用いてジルコニアに対して結合能を有するペプチドのアミノ酸モチーフを同定することに成功しており、「ジルコニア結合ペプチドモチーフ」と「抗菌ペプチドモチーフ」をコンジュゲートさせたタンパク質を作製することにより、ジルコニアインプラント周囲における持続的な細菌防御能を獲得できるものという考えに至った。

よって今回申請者はジルコニア結合抗菌タンパク質によるインプラント周囲炎の持続的な予防・抑制を目指し、研究・開発を進めることとした。

2. 研究の目的

全体的な構想としては、本提案研究にて、新たな機能性人工タンパク質を創製し、ジルコニアインプラントの粘膜貫通部における細菌感染防御能を獲得することを目的とする。具体的な目的としては、「ジルコニア結合ペプチドモチーフ」と「抗菌ペプチドモチーフ」を用いてジルコニア結合能と抗菌活性を併せ持つ人工タンパク質を作製し、その抗菌活性の有無を評価することである。

3. 研究の方法

(1)ジルコニア円板の作製

イットリア安定化ジルコニア円柱を裁断して直径 13mm、厚さ 0.5mm の円板を作製した。続いて円板を#1200 サンドペーパーまで研磨し、研磨したのち、直径 3 μ m のダイヤモンドペーストおよび直径 0.06 μ m のコロイダルシ

リカを用いて研磨した。

(2) 機能性人工ペプチドのデザイン

機能性人工ペプチドには、申請者が同定したジルコニア結合ペプチドモチーフ (WYSSMSEDKRGW)、および抗菌ペプチドモチーフを用いた。抗菌ペプチドモチーフには、ヒト唾液中に含まれる histatin 5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY) や Lactoferricin (FQWQRNMRKVR) の配列を用いる。histatin5 は *Candida albicans* や *P. gingivalis* に、Lactoferricin は *P. gingivalis* に抗菌活性を示すことが報告されている。

(3) 機能性人工ペプチドの作製

デザインした機能性人工ペプチド(#1: ジルコニア結合-Histatin 5、#2: ジルコニア結合 - Lactoferricin) は Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) method にて合成し、高速液体クロマトグラフィ (high performance liquid chromatography; HPLC) にて >95% に精製することで作製した。

(4) 抗菌活性の評価

作製した機能性人工タンパク質を 20, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ になるように #1 では PBS に、#2 では DMSO に希釈してタンパク質溶液を作製した。続いてそれぞれの溶液中にジルコニア円板を 1 時間浸漬して円板表面をタンパク質でコーティングした。さらにこれらの円板上で *P. gingivalis* を 37、嫌気条件下で 2 日間培養した。その後、生菌の ATP 活性を吸光度測定器で検出することで生菌数を計測して対照群と実験群で生菌数を比較することで、それぞれのペプチドの抗菌活性の有無を評価した。

4. 研究成果

作製した機能性人工ペプチドのアミノ酸配列を示す。

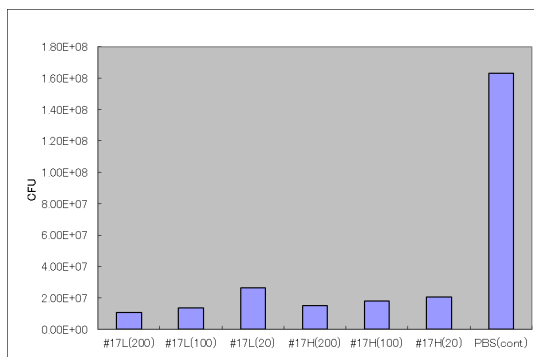
#1: WYSSMSEDKRGWDSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY

#2: WYSSMSEDKRGWFQWQRNMRKVR

これらの抗菌活性の評価を上述の方法で行

ったところ、#1、#2 いずれの機能性ペプチドにおいても生菌数が濃度依存性に減少してした(図 1)。

図 1



以上の結果からは、#1、#2 いずれの機能性人工ペプチドにおいても抗菌活性をある程度有することが示唆された。今後生体への応用を検討する場合には、今回の研究では行えなかったこれらのペプチドのジルコニアへの結合能の詳細な評価、さらに免疫原性の有無や脂溶性、水溶性などペプチドの特性の評価に加えて、*in vivo* における評価も行う必要があると考えられる。

引用文献

- Hultin et al., Clin Implant Dent Relat Res, 2:203-208, 2000
- Atsuta et al., Biomaterials, 26:6280-7, 2005
- Hashimoto et al., Dent Mater J., 2011
- Kato et al., Eur J Med Res, 29:528-532, 2004
- Shi et al., J Biol Chem., 275:30002-30008, 2000
- Carpino and Han, J Am Chem Soc, 92:5748-5749, 1970

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

橋本 和彦（HASHIMOTO Kazuhiko）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30464960