

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670838

研究課題名(和文) 乳酸菌由来因子による歯周およびインプラント周囲炎症コントロール

研究課題名(英文) Control of periodontitis and peri-implantitis by Lactobacillus-derived factor

研究代表者

二川 浩樹 (Nikawa, Hiroki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：10228140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕罹患歴のない患者から単離した*Lactobacillus rhamnosus* K0由来因子であるKog1は、歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞において、歯周病原菌*Porphyromonas gingivalis*由来LPSが誘導する炎症性サイトカインおよびケモカインの発現を有意に抑制した。またKog1はLPSと強く結合しており、従来の抗菌ペプチドと同様に、LPSと結合することでLPSの炎症作用を不活化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kog1 is derived from *Lactobacillus rhamnosus* K0 isolated from a patient with no caries experience. Kog1 significantly inhibited the expression of inflammatory cytokines and chemokines induced by LPS of *Porphyromonas gingivalis* in gingival epithelial cells and fibroblasts. Kog1 highly bound to LPS. It is suggested that Kog1 binds and neutralizes LPS, resulted in the inhibitory effects as with known anti-microbial peptides.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント周囲炎 抗菌ペプチド プロバイオティクス 歯肉上皮細胞 歯肉線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

【乳酸菌由来因子による歯周およびインプラント周囲炎症コントロール】

歯周病は中年期以降の日本人の約8割が罹患し、全身の健康にも多くの影響を与えると考えられている炎症性疾患である。また、インプラント周囲炎は、近年多数報告されているインプラントに起因した新たな疾患であり、その病態は様々である。炎症を伴うインプラント周囲炎は歯槽骨の吸収を引き起こし、最終的にはインプラントの脱落にまでいたる可能性も懸念されている。

補綴治療の失敗の要因として、2次う蝕や歯周病、炎症を伴うインプラント周囲炎など、細菌感染を原因の1つとするものが挙げられる。特に、炎症を伴うインプラント周囲炎については、症例の増加報告から鑑みても補綴処置前後の歯周マネジメントはますます重要になると考えられる(図1)。

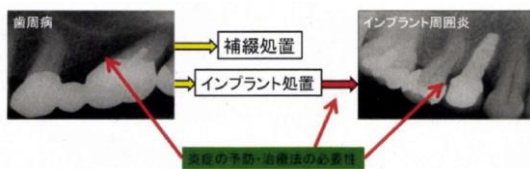


図1 歯周病とインプラント周囲炎

申請者はこれまでに、う蝕罹患歴のない患者から単離した *Lactobacillus rhamnosus* KO に由来する遺伝子を DNA microarray 法により網羅的に解析し、その中でペプチドに置換した場合に *Streptococcus* 属や *Candida* 属に高い抗菌性を示す遺伝子として、Kog1 を同定した。Kog1 は 48 アミノ酸からなる α ヘリクス構造をとり(図2)、一部の塩基性抗菌ペプチドと類似したシークエンスを有することから、LPS に対する不活化作用があることが予想された。

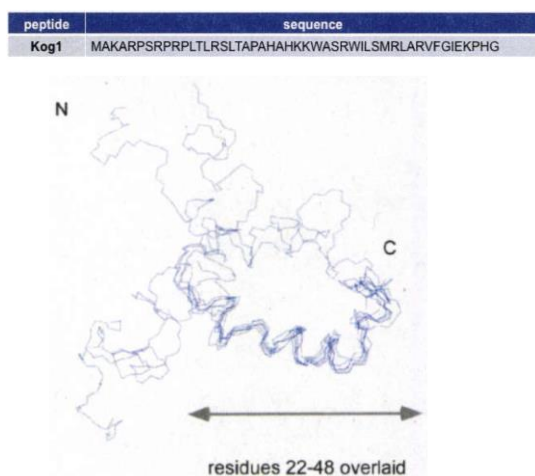


図2 Kog1 のアミノ酸配列と立体構造

2. 研究の目的

Lactobacillus rhamnosus KO 由来因子である Kog1 を用いて、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS に対する不活化作用および抗炎症作用を検討することで、より予知性の高く予後良好な補綴前処置法およびインプラント周囲炎に対する予防法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) ペプチド

図2に示すアミノ酸配列で Kog1 を合成し、研究に使用した。また、FITC ラベルした Kog1 (以下 Kog1-FITC) も作製した。

Kog1 のコントロールとして、唾液由来の抗菌ペプチドである Hst5 を使用した。

(2) LPS

LPS には、*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS を用いた。

(3) 細胞

培養細胞として、マウス由来歯肉上皮細胞様細胞 GE1、ヒト歯肉由来初代線維芽細胞 hGFB を使用し、それぞれ至適条件下で培養を行った。

なお、本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承諾を得た(ヒトゲノム・遺伝子解析研究許可番号: 第歯ヒ3号)。

(4) MTS アッセイ

96 ウェルプレートに 5.0×10^3 cells/well の GE1 または hGFB 細胞を播種し、コンフルエントに達するまで培養した。その後、Kog1 の濃度を変化させ添加し、さらに 24 時間培養後、MTS アッセイにて評価した。

(5) トランズウェルシステム

6 ウェルプレートのウェル内にカバーガラスを配置し、 1.5×10^5 cells/well の hGFB 細胞を播種後、培養した。同時に、トランズウェルに 1.5×10^5 cells/well の GE1 細胞を播種後、培養した。Millicell ERS-2 Volt-Ohm Meter and Accessories を用いて、GE1 細胞がコンフルエントに達したことを確認した。その後、トランズウェルに 3200 nM の Kog1 を添加し、両細胞の共培養を 3 時間行った後、カバーガラス上の hGFB 細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(6) real-time quantitative RT-PCR

24 ウェルプレートに 5.0×10^4 cells/well の GE1 または hGFB 細胞を播種し、コンフルエントに達するまで培養した。その後、10 μ g/ml の P.g LPS、および Kog1 の濃度

を変化させ添加し、GE1 細胞は 3 時間、hGFB 細胞は 6 時間の培養を行った。培養後、total RNA を抽出し、cDNA を合成後、real-time quantitative RT-PCR を行った。内在性コントロールに GAPDH または β -actin を使用し、 $\Delta\Delta Ct$ 法で相対発現量を算出した。

(7) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

24 ウェルプレートに 5.0×10^4 cells/well の hGFB 細胞を播種し培養した。培養 2 日目に FBS を枯渇させ、24 時間後に 10 $\mu\text{g/ml}$ の P.g LPS および、50 nM の Kog1 または 200、500 nM の Hst5 を添加してさらに 24 時間の培養を行った。培養後、上清を回収し、Quantikine ELISA を使用して、炎症性サイトカインである IL-6 およびケモカインである IL-8 のタンパク質の発現を検討した。

(8) Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array

6 ウェルプレートに 1.5×10^5 cells/well の hGFB 細胞を播種し培養した。培養 2 日目に FBS を枯渇させ、24 時間後に 10 $\mu\text{g/ml}$ の P.g LPS および 200 nM の Kog1 を添加し、さらに 30 分間培養した。その後、タンパク質を全量抽出し、Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array を用い MAPK シグナル経路のリン酸化を解析した。

(9) 表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance ; SPR)

SPR センサーチップとして、光学ガラスにクロムを 1 nm、次に金を 49 nm の厚さで小型真空蒸着装置にて真空蒸着した金基板を用いた。1 mM の 11-Mercaptoundecanoic acid をエタノールに溶かした溶液に金基板を 25°C で 24 時間浸漬し、最外層官能基がカルボキシ基である自己組織化単分子膜を金表面に形成した。383 mg の WSC と 58.5 mg の N-hydroxysuccinimide 水溶液に金基板を曝露し、ペプチド結合活性基を導入した後、Kog1 または Hst5 の水溶液を曝露することで、これらのペプチド固定化 SPR センサーチップを作製した。その後、これらのペプチド固定化表面と P.g LPS の吸着過程について、SPR を用いて SPR シグナルの角度変化量をリアルタイムで測定することで検討した。

4. 研究成果

(1) Kog1 が細胞活性に与える影響

MTS アッセイの結果より、GE1 細胞では 50~3200 nM、hGFB 細胞では 50~200 nM の濃度の Kog1 は、細胞活性に影響を与えなかった (データ示さず)。

このことから、GE1 すなわち歯肉上皮細胞は口腔内におけるバリアー機構の最前線であるが、高濃度の Kog1 を使用しても細胞傷害性を与えず、また hGFB すなわち歯肉線維芽細胞に対しても細胞傷害性を与えないことが示唆された。

(2) FITC ラベルした Kog1 の細胞内外における挙動

トランズウェルシステムを用いて GE1 細胞と hGFB 細胞を共培養し、Kog1-FITC を添加することで、Kog1-FITC が GE1 細胞を透過して hGFB 細胞まで到達するかを検討した。その結果、GE1 細胞がトランズウェル上でコンフルエントで存在していても、Kog1-FITC が hGFB 細胞の細胞質で観察された (図 3)。すなわち、Kog1-FITC は GE1 細胞を透過し hGFB 細胞まで到達することが示唆された。

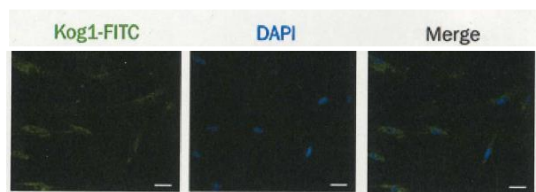


図 3 Kog1-FITC の細胞内外における挙動

(3) P.g LPS により誘導される炎症性サイトカインおよびケモカインの mRNA の発現に Kog1 が与える影響

real-time quantitative RT-PCR の結果、Kog1 および P.g LPS を hGFB 細胞に添加した場合、Kog1 は hGFB 細胞における P.g LPS により誘導された炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-8 および、ケモカイン CCL2、CCL20 mRNA の発現を濃度依存的に有意に抑制した (図 4, ANOVA * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs P.g LPS alone)。また、GE1 細胞においても、P.g LPS により誘導された CCL2 の mRNA の発現を濃度依存的に有意に抑制した (図 5, ANOVA * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, vs P.g LPS alone)。

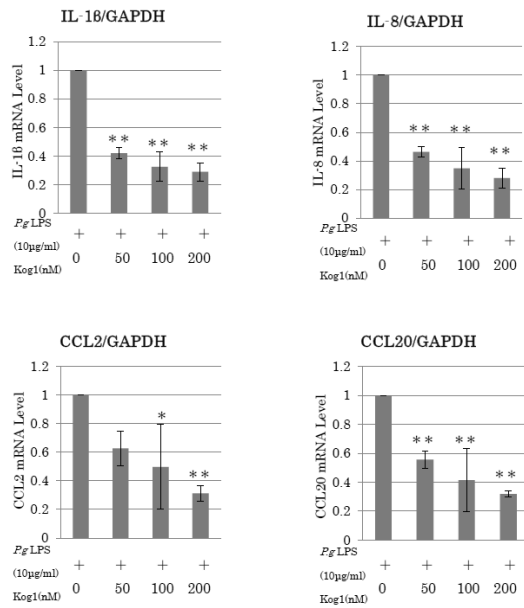


図4 hGFB細胞におけるP.g LPSにより誘導される炎症性サイトカインおよびケモカインのmRNAの発現にKog1が与える影響

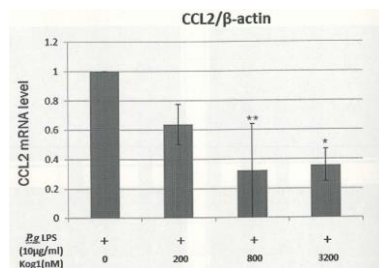


図5 GE1細胞におけるP.g LPSにより誘導される炎症性サイトカインおよびケモカインのmRNAの発現にKog1が与える影響

(4) Kog1がP.g LPS誘導性炎症性サイトカインおよびケモカインのタンパク質の発現に与える影響

hGFB細胞においてP.g LPSにより誘導された炎症性サイトカインのタンパク質の発現にKog1が与える影響について、ELISAを用いて評価した。その結果、Kog1は、P.g LPSにより誘導されたIL-6、IL-8のタンパク質の発現をともに抑制する傾向がみられたが、有意な差は認められなかった(図6)。

これらの結果から、Kog1は、P.g LPSが誘導する炎症性サイトカインやケモカインのmRNAおよびタンパク質の発現を抑制することが示唆された。

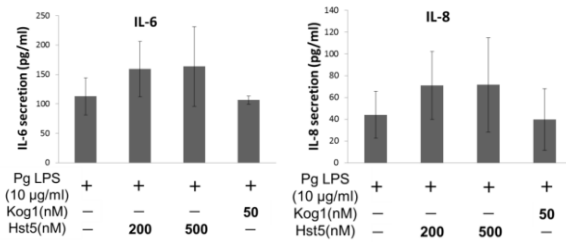


図6 Kog1がP.g LPS誘導性炎症性サイトカインおよびケモカインのタンパク質発現に与える影響

(5) Kog1がP.g LPSにより誘導される細胞内のシグナル伝達経路の活性に与える影響

P.g LPSにより誘導される炎症性サイトカインやケモカインの発現に対するKog1の抑制機序を調べるため、P.g LPSによって活性化することが知られているMAPKシグナル経路について、MAPK Arrayを用いて解析した。その結果、Kog1はP.g LPSにより誘導されたERK、JNK、p38、MKK3の活性化を抑制した(図7)。

このことから、Kog1の添加によりP.g LPSにより誘導されるMAPKおよびMAPKKの活性化を抑制し、結果として、炎症性サイトカインおよびケモカインであるIL-1β、IL-8、CCL2、CCL20の発現を抑制したと考えられた。

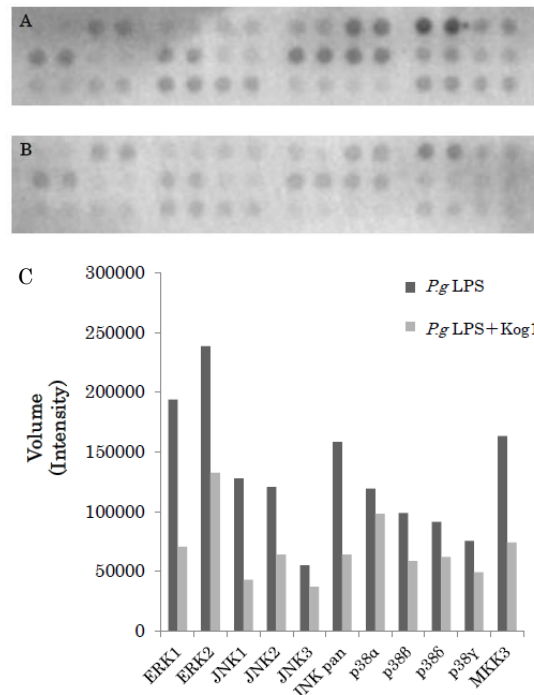


図7 Kog1がP.g LPSにより誘導される細胞内のシグナル伝達経路の活性に与える影響

A: P.g LPSのみ添加
B: P.g LPSとKog1を添加
C: A, BをImage-Labで定量化した結果

(6) ペプチド固定化表面への P.g LPS 吸着過程の測定

Kog1 が炎症性サイトカインおよびケモカインの mRNA およびタンパク質の発現を抑制する機序の一つとして、Hst を代表する抗菌ペプチドのように、LPS と結合することで LPS 受容体への運搬を阻害し、LPS の炎症作用を不活化している可能性が考えられた。

そこで、Kog1 および Hst5 の P.g LPS との結合能について、SPR を用いて評価した。ペプチドの固定化された金基板に 1 分から 11 分までの 10 分間 P.g LPS を曝露したところ、Kog1、Hst5 とともに SPR シグナルの増加が認められた (図 8)。また、P.g LPS 曝露時の SPR シグナルの角度変化量を測定することで P.g LPS の結合量を比較したところ、Hst5 に比較して Kog1 で角度変化量が増加、すなわち P.g LPS との結合量が増加した (図 9、T-test : **p<0.01)。

以上の結果より、Kog1 は Hst5 に比較して LPS との結合性が高いことが示唆され、すなわち Kog1 は LPS と結合することで LPS の作用を中和し、hGFB における LPS の炎症性サイトカインおよびケモカインの発現誘導を阻害する可能性が明らかとなった。

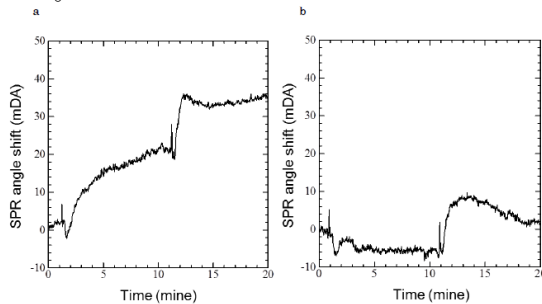


図 8 ペプチド固定化表面への P.g LPS 吸着過程
A: Kog1 を固定化後、P.g LPS を添加
B: Hst5 を固定化後、P.g LPS を添加

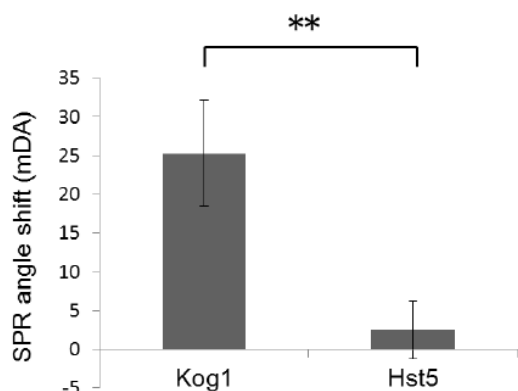


図 9 Kog1 および Hst5 の P.g LPS との結合量

以上の結果から、乳酸菌由来の抗菌ペプチドである Kog1 は、歯周組織内で P.g LPS

を不活化することで炎症性サイトカインやケモカインの発現を抑制し、このことから歯周炎やインプラント周囲炎に対する新しい予防法に応用できる可能性が示唆された。

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 18 件)

- 岡田千明, 口腔から分離した *Lactobacillus rhamnosus* 由来バクテリオシン Kog1 の立体構造と抗菌効果, 第 54 回広島県歯科医学会・第 99 回広島大学歯学会・日本歯科技工学会中国・四国支部第 10 回学術大会, 2015 年 11 月 8 日, 広島県歯科医師会館 (広島市)
- 梅本知佳, Kog1 による P.g LPS 誘導性炎症性サイトカインおよびケモカインの発現抑制機序の検討, 第 54 回広島県歯科医学会・第 99 回広島大学歯学会・日本歯科技工学会中国・四国支部第 10 回学術大会, 2015 年 11 月 8 日, 広島県歯科医師会館 (広島市)
- 二川浩樹, お口の健康への新しいアプローチ!, 平成 27 年度広島工学同窓会秋季大会 (招待講演), 2015 年 10 月 30 日, 広島県情報プラザ (広島市)
- 二川浩樹, 口腔の健康のためのバイオフィルムコントロール, 平成 27 年顎口腔顔面技工研究会特別講演 (招待講演), 2015 年 9 月 26 日, 広島大学 (広島市)
- 二川浩樹, お口の健康への新しいアプローチ!, 平成 27 年度公益社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会ランチョンセミナー (招待講演), 2015 年 9 月 5~6 日, くにびきメッセ (松江市)
- 岡田千明, *Lactobacillus rhamnosus* 由来抗菌ペプチド Kog1 の立体構造と抗菌効果, 平成 27 年度公益社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会, 2015 年 9 月 5~6 日, くにびきメッセ (松江市)
- 梅本知佳, Kog1 による P.g LPS 誘導性炎症性サイトカイン・ケモカインの発現抑制機序の検討, 平成 27 年度公益社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会, 2015 年 9 月 5~6 日, くにびきメッセ (松江市)
- 二川浩樹, お口の健康への新しいアプローチ!, 東北大学インターフェイス口腔健康科学学術フォーラム講座 (招待講演), 2015 年 9 月 1 日, 東北大学 (仙台市)
- 梅本知佳, 乳酸菌由来ペプチドがヒト歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカインおよびケモカインの発現に及ぼす影響, 日本組織培養学会第 88 回大会, 2015 年 5 月 26~27 日, 広島大学 (広島市)

10. 岡田千明, 口腔から分離した *Lactobacillus rhamnosus* 由来の塩基性抗菌ペプチド Kog1 の立体構造と抗菌効果, 第 53 回日本小児歯科学会大会, 2015 年 5 月 21~22 日, 広島国際会議場 (広島市)
11. 梅本知佳, *Lactobacillus rhamnosus* 由来抗菌ペプチド Kog1 の抗炎症作用, 第 53 回日本小児歯科学会大会, 2015 年 5 月 21~22 日, 広島国際会議場 (広島市)
12. 二川浩樹, お口の健康への新しいアプローチ!, 広島市歯科医師会市民公開講座 (招待講演), 2015 年 4 月 5 日, 広島国際会議場 (広島市)
13. Umemoto Chika, Anti-inflammatory effect of Kog1, a bacteriocin-like cationic peptide derived from *Lactobacillus rhamnosus*, The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 4-5 Jul 2014, Sapporo Education and Culture Hall (Sapporo)
14. Mimura Sumiyo, Antimicrobial activity and steric structure of Kog1, a bacteriocin-like cationic peptide derived from *Lactobacillus rhamnosus*, The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 4-5 Jul 2014, Sapporo Education and Culture Hall (Sapporo)
15. Umemoto Chika, Effect of Kog1 derived from *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of inflammatory cytokines and chemokines in human gingival fibroblasts, 47th The Hiroshima University Dental Society Conference, 21 Jun 2014, Hiroshima University (Hiroshima)
16. 二川浩樹, 固定化抗菌剤とプロバイオティクス, 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会シンポジウム (招待講演), 2014 年 6 月 19~20 日, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール (滋賀県)
17. Umemoto Chika, Anti-inflammatory effect of Kog1, a bacteriocin-like cationic peptide derived from *Lactobacillus rhamnosus*, 2014 4th Research Week-International Symposium of Oral Medicine, 19-25 May 2014, Taipei (Taiwan)
18. Nikawa Hiroki, A novel product for the general or oral health derived from biofilm study (招待講演), 2014 4th Research Week-International Symposium of Oral Medicine, 19-25 May 2014, Taipei (Taiwan)

[図書] (計 1 件)

1. 二川浩樹, メディア株式会社, 歯科口腔抗菌考 虫歯菌・歯周病菌・カンジダ菌の研究がもたらしたもの, 2015, 128

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二川 浩樹 (NIKAWA HIROKI)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
 (歯)・教授
 研究者番号: 10228140

(4) 研究協力者

峯 裕一 (MINE YUICHI)
 三村 純代 (MIMURA SUMIYO)
 梅本 知佳 (UMEMOTO CHIKA)
 真鍋 あい (MANABE AI)
 岡田 千明 (OKADA CHIAKI)