

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861813

研究課題名(和文) TGF-bとナノDDS技術を応用した次世代の歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of the next-generation periodontal regenerative therapy applying TGF-b and nano-DDS technology

研究代表者

下江 正幸 (Shimoe, Masayuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60580264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究の第一段階として、炎症指向性リポソームがマウス実験的歯周炎モデルの歯周炎組織に集積することを明らかにした。次に、TGF- β 関連蛋白質のリポソームへの内包を検討した結果、TGF- β スーパーファミリーに属するGDF5に作用するHMGB1中和抗体に着目した。HMGB1は様々な炎症性疾患への関与が報告されており、HMGB1中和抗体はそれらの疾患に対する新規治療薬として期待されている。

研究の第二段階として、HMGB1中和抗体内包炎症指向性リポソームを作製した。そしてそれがHMGB1中和抗体の単体投与と比較して、有意に歯周炎の進行を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：At first, I clarified that the liposome for targeting inflammatory tissue accumulated at inflammatory periodontal tissue in mouse model of experimental periodontitis. Then, I examined connotation of TGF- β -related protein to the liposome and focused on HMGB1 neutralizing antibody which acted on GDF5, belonged to TGF- β superfamily. HMGB1 was reported the participation to various inflammatory diseases. And HMGB1 neutralizing antibody is expected as new therapeutic drug for those diseases.

As the second step of this study, I manufactured the liposome involving HMGB1 neutralizing antibody. And I clarified that the liposome significantly inhibited progression of periodontitis in comparison with the simple substance dosage of HMGB1 neutralizing antibody.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 HMGB1 炎症指向性リポソーム 抗炎症薬

1. 研究開始当初の背景

近年の歯周組織再生療法は、外科手術時に薬剤などを局所投与する方法が一般的である。しかしながら、この術式では再生を期待する部位に薬剤を一定期間停滞・作用させ続けることは難しく、安定した組織再生が得られないという欠点がある。また、歯周組織再生療法後の最も多い偶発症として、ターンオーバーの早い歯肉上皮細胞が歯根膜細胞などの間葉系細胞が増殖する前に歯根面に沿ってダウングロースし、再生の場を奪ってしまうことが挙げられる。したがって、上皮の増殖を制御できるような薬剤を、再生を期待する部位に集積・停滞させ、なおかつ徐放させることのできるシステムを構築することは、歯周組織再生療法を発展させるために非常に重要な研究課題である。

我々は Transforming growth factor- β (TGF- β) が、歯肉上皮の増殖と遊走を抑制し、歯肉接合上皮の歯面への接着を亢進し、さらに歯根膜の増殖・分化を促進するという、歯周組織再生にとって理想的なサイトカインである可能性を示して来た。

そこで、先に述べた課題を解決し、これまでの研究を発展させるために、ナノ drug delivery system (DDS) に着目した。ナノ DDS は、目標とする患部(臓器や組織細胞、病原体など)に、薬剤などを効果的かつ集中的に送り込み徐放させることが可能なバイオテクノロジーである。また、ナノ DDS に用いる膜の一つであるリポソームは、リン脂質を主体とする閉鎖小胞で、生体の構成成分の一つであるため抗原毒性が極めて低いことが知られている。

すなわち、TGF- β をリポソームに内包させることで、ナノ DDS として再生を期待する部位に集積・徐放させることができれば、既存の歯周組織再生療法の欠点を補うことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

TGF- とナノ DDS 技術を応用し、次世代の簡便な歯周組織再生療法の基盤を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

住吉ファーマインターナショナル株式会社の製品で、炎症指向性リポソームである GLYCOLIPO™ (K1 糖鎖結合リポソーム) に対する TGF- β の内包を受託し、TGF- β 内包 K1 糖鎖結合リポソームを製造する。次に、K1 糖鎖結合リポソームが、炎症を生じている歯周組織に集積することを、ラット歯周組織創傷治癒モデルを用いて確認する。その後、同モデルに対して TGF- β 内包 K1 糖鎖結合リポソームを尾静脈投与し、創傷治癒過程における歯周組織の CT 画像を撮影する。得られた画像から、歯槽骨などの再生量を統計学的な解析を行うことによって本法の有効性を明らかにする。

4. 研究成果

平成 26 年度は、K1 糖鎖結合リポソームが炎症を起こしている歯周組織へ集積することを分子イメージングによって検証した。当初の研究計画ではラット歯周組織創傷治癒モデルを用いて検証する計画であったが、より臨床における歯周病の病態に即した歯周組織の治癒(組織再生)を想定して、進行度の異なったマウス実験的歯周炎モデルに変更した。まず、マウスの上顎第二臼歯に歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌: 膿瘍形成株 W83) を染みこませた絹糸を結紮した重度歯周炎モデルマウスを作製した。さらに、上顎第二大臼歯へ絹糸のみを結紮した軽度歯周炎モデルマウスを作製した。それぞれのモデルマウスの作製から 2 週間後に、蛍光色素内包 K1 糖鎖結合リポソームを用いて炎症部位へのリポソームの集積を検証した。その結果、3 匹の異なったサンプル

において、炎症を生じた上顎左側第二大臼歯周囲組織にリポソームが数多く集積していることを、統計学的有意差をもって確認した。(図1)

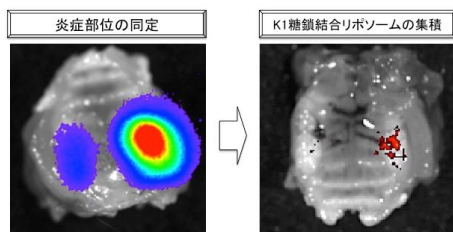


図1 K1糖鎖結合リポソームの歯周炎組織への集積

平成27年度は、K1糖鎖リポソームに内包するためのTGF-βに関わる様々な制御蛋白についての検討を重ねた。TGF-βは歯肉上皮において、細胞内の転写因子Smad2を介して増殖を制御(Tomikawa *et al*, *J Dent Res*, 2012)しており、*in vitro*の実験でSmad2を過剰発現させた歯肉上皮細胞では増殖抑制がおこることが分かっている(Shimoe *et al*, *J Periodontal Res*, 2014)。したがって、様々なSmad2制御シグナル系の中から、Smad2をユビキチン化する細胞内分子Smurf2に着目した。そして、マウス実験的歯周炎モデルにおける歯周組織切片の免疫染色によって、Smurf2の発現は歯周炎を有していない健常マウスの歯肉上皮特異的に増強し、歯周炎モデルマウスでは低下するという非常に興味深い知見が得られた(図2)。

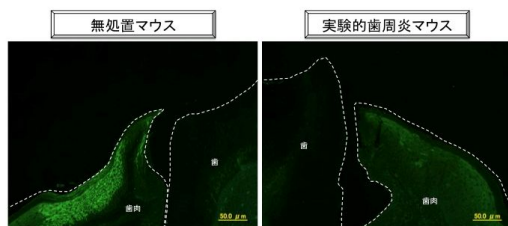


図2 Smurf2の歯肉上皮での発現

一方で、K1糖鎖リポソームに蛋白質を内包するためには、目的とする蛋白質が多量に必要であった。しかしながら、TGF-βとSmurf2のリコンビナント蛋白は非常に高価であり、K1糖鎖リポソームに内包するための研究計画の実施は困難であると判断した。そこでTGF-β関連蛋白に代わる内包物質を

検索した結果、岡山大学で様々な炎症性疾患に対する治療薬としての研究が行われているhigh mobility group box 1 (HMGB1)の中和抗体に着目した(Okuma *et al*, *Ann Neuroi*, 2012)。また、非常に興味深いことに、HMGB1中和抗体を投与したマウス抜歯窩における炎症・再生過程に発現する遺伝子群をcDNAマイクロアレイで調べた結果、growth differentiation factor 5 (GDF5)の発現量が3倍以上増加することが明らかになった。GDF5はTGF-βスーパーファミリーに属する遺伝子であり、Smadの発現を増加することが明らかになっている。以上の経緯から、本研究におけるK1糖鎖リポソーム内包物質をTGF-β関連蛋白からHMGB1中和抗体に変更した。

平成28年度は、HMGB1中和抗体内包K1糖鎖結合リポソームによる歯周炎症の制御と歯周組織の再生を目指した研究を行った。まず、HMGB1中和抗体単体での投与によってマウス実験的歯周炎モデルの歯周炎の進行が抑制されることを示した(図3)。

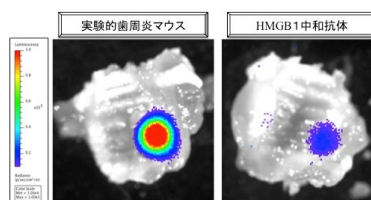


図3 HMGB1中和抗体の歯周炎抑制効果

そして、作製したHMGB1中和抗体内包K1糖鎖結合リポソームが、HMGB1中和抗体単体と比較して、より効果的に歯周炎症を制御することが可能であるかを検討した。その結果、HMGB1中和抗体内包K1糖鎖リポソームは、同濃度のHMGB1中和抗体の単体投与と比較して、より効果的に抗炎症効果を発揮することを発見した(図4: 特許に関連してデータ未開)。

今後は、HMGB1中和抗体を投与した歯周炎組織におけるTGF-β、Smad2、HMGB1の発現量を検討し、歯周炎症・再生のメカニ

ズムの解明を進めつつ, KI 糖鎖結合型リポソーム技術を応用した次世代の歯周組織再生療法の基盤の確立を目指す。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 5 件)

井手口英隆, 山本直史, 下江正幸, 本郷昌一, 青柳浩明, 吉原千暁, 河村麻里, 高柴正悟, 骨吸収抑制剤としてのビスフォスフォネート製剤が歯周炎組織へ及ぼす影響, 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 5 月, 千葉県 幕張市.

吉原千暁, 山城圭介, 山本直史, 下江正幸, 本郷昌一, 高知信介, 井手口英隆, 河村麻理, 青柳浩明, 前田博史, 高柴正悟, 実験的歯周炎モデルマウスにおける抗 HMGB1 抗体の歯周炎抑制効果, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 5 月, 鹿児島県 鹿児島市.

井手口英隆, 山本直史, 山城圭介, 下江正幸, 本郷昌一, 吉原千暁, 青柳浩明, 吉原千暁, 河村麻里, 高柴正悟, Effects of Zoledronic Acid in Periodontitis by Molecular Imaging, 94th International Association for Dental Research, 2016 年 6 月, 韓国 ソウル.

吉原千暁, 山城圭介, 山本直史, 井手口英隆, 青柳浩明, 下江正幸, 本郷昌一, 河村麻里, 劉克約, 西堀正洋, 高柴正悟, Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates cytokine secretion and progression of periodontitis, 94th International Association for Dental Research 2016 年 6 月, 韓国 ソウル.

青柳浩明, 山城圭介, 吉原千暁, 井手口英隆, 山本直史, 河村麻理, 下江正幸, 本郷昌一, 劉克約, 西堀正洋, 高柴正悟, HMGB1 が抜歯窩組織における炎症と血管新生に及ぼす影響, 第 37 回炎症・再生医学会, 2016 年 6 月, 京都府 京都市.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

下江 正幸 (SHIMOE, Masayuki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 60580264

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし