

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06994

研究課題名(和文) ナノDDSを用いた抗炎症分子標的薬による歯周炎症の制御

研究課題名(英文) Control of periodontal inflammation by anti-inflammatory molecular targeting drug applied with nano drug delivery system

研究代表者

井手口 英隆 (Ideguchi, Hidetaka)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80779421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、全身の炎症性疾患において注目されているHMGB1が、歯周炎の遷延化にも関与していることを明らかにした。本研究では、生体への安全性を担保することができるナノDDSを応用して、抗HMGB1中和抗体の新規歯周炎治療薬としての応用を目指した基礎的研究を行った。まず初めに、抗HMGB1中和抗体が歯周炎の進行を抑制し、K1糖鎖(炎症部位指向性)結合リポソームが歯周炎組織へ集積することを確認した。そして、抗HMGB1抗体内包K1糖鎖結合リポソームを作製した。HMGB1中和抗体内包K1糖鎖リポソームが、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明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have suggested that HMGB1 is secreted in response to inflammatory stimuli caused by periodontal infection, which is crucial for the initiation of periodontitis. In this research, we performed basic research for control of periodontal inflammation by HMGB1 neutralizing antibody applied with nano drug delivery system. At first, we confirmed that HMGB1 neutralizing antibody suppress the progression of periodontitis and the liposome holding directivity to inflammatory tissue accumulated at inflammatory periodontal tissue. And I manufactured the liposome holding directivity to inflammatory tissue involving HMGB1 neutralizing antibody. And Finally, 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：歯周病学

キーワード：歯周病 分子標的薬 ドラッグデリバリーシステム HighMobilityGroupBox 1 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原細菌の感染によって口腔内の局所に生じる慢性炎症性疾患であり、炎症反応が特定の部位に長期間存在することによって歯周組織の破壊が進行する。これまでの歯周治療は感染源の除去を目的とした侵襲的、且つ場合によっては痛みを伴う外科的な処置が多かった。また、これまで研究が進んでいる歯周病治療薬の薬物動態は抗炎症・抗菌にのみ着目したものが多く、歯周病の複雑な病態を鑑みると、それ単体では歯周病治療薬として十分な効果を発揮するとは考えにくい。よって申請者は、簡易で効果的な新規歯周病治療法の確立を目指した。そして、歯周炎治療に対する新規の標的分子として High Mobility group Box 1 (HMGB1) に着目した。

HMGB1 は全ての有核細胞に存在する非ヒストン DNA 結合蛋白質であるが、炎症刺激時には核内から細胞質へ移動し、細胞外へ分泌されることが最近の研究で明らかとなった。分泌された HMGB1 は炎症性サイトカインとして機能し、様々な細胞に働きかけて炎症の遷延化に関与することから、近年大きな注目を浴びている。申請者は、歯周炎モデルマウスを用いて、歯周炎に罹患した歯周組織でも HMGB1 が細胞外に分泌されることを明らかにした。つまり、HMGB1 は全身の炎症性疾患だけでなく歯周炎の病態にも関与していることから、歯周炎治療の標的分子として期待される。

一方で、分子標的医療は標的分子の生理活性作用を抑制することに起因して、副作用や薬剤耐性など分子標的薬特有の有害事象が問題となっている。すなわち、常的に細菌感染に曝される特殊な環境である口腔においては、分子標的薬の応用はより慎重になる必要がある。

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、nano-drug delivery system (DDS) に着目した。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、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。

すなわち、抗 HMGB1 抗体を内包した炎症指向性を有するリポソームを作製して投与することにより、歯周炎に罹患した組織のみを特異的に治療することができる考えた。

2. 研究の目的

抗 HMGB1 抗体と DDS 技術を応用し、次世代の簡易で効果的な新規歯周病治療法を確立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、抗 HMGB1 抗体の内包を受託し、抗 HMGB1 抗体内包 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マウス歯周炎モデルマウスを用いて確認する。その後、同モデルに対して抗 HMGB1 抗体内包 K1 糖鎖結合リポソームを尾静脈投与し、歯周炎罹患部における歯周組織の解析を行い、歯周炎の進行抑制に対する効果を検討する。

4. 研究成果

平成 28 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。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と、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 (図 1)。

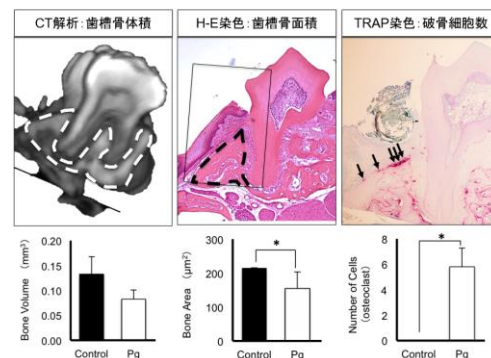


図1. 申請者が作製した歯周炎モデルマウス

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、リポソームの歯周炎組織への集積を検証した。その結果、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2）。

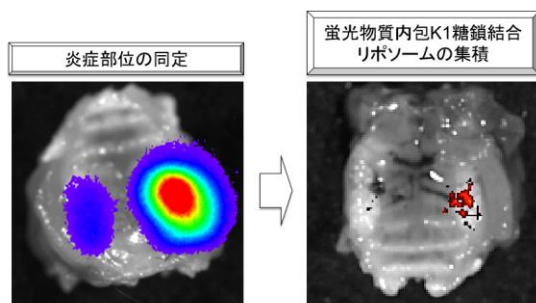


図2. 炎症部位への蛍光物質内包K1糖鎖結合リポソームの集積

その後、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確認した（発表論文②，③）。

平成29年度は、HMGB1 中和抗体内包 KI 糖鎖結合リポソームの作製を行った。そして、HMGB1 中和抗体内包 KI 糖鎖結合リポソームが、HMGB1 中和抗体単体での投与と比較して、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明らかにした（図3）。

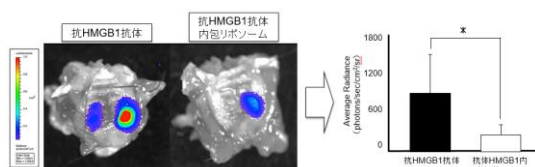


図3. 抗HMGB1抗体内包K1糖鎖結合リポソームの抗炎症効果

現在は、HMGB1 の歯周炎の進行における役割をより詳細に検討するために、マクロファージ特異的 HMGB1 ノックアウトマウスを作製している。今後は、HMGB1 中和抗体を応用して歯周炎・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 7 件）

- ① Ideguchi H, Yamashiro K, Yamamoto T, Shimoe M, Hongo S, Kochi S, Yoshihara-Hirata C, Aoyagi H, Kawamura M, Takashiba S. Molecular imaging assessment of periodontitis lesions in an experimental mouse model. Clin. Oral Investig., 2018. in press, 査読有
- ② 井手口英隆, 山城圭介, 下江正幸, 山本直史, 高柴正悟, PET (^{18}F -FDG) /CT 検査を用いた慢性歯周炎患者における歯周組織炎症の評価, 日本歯周病学会誌, 2018 年. in press, 査読有
- ③ Yoshihara-Hirata C, Yamashiro K, Yamamoto T, Aoyagi H, Ideguchi H, Kawamura M, Suzuki R, Ono M, Wake H, Nishibori M, Takashiba S. Anti-HMGB1 Neutralizing Antibody Attenuates Periodontal Inflammation and Bone Resorption in a Murine Periodontitis Model. Infect. Immun., 86(5), doi:10.1128/IAI.00111-18, 2018. 査読有
- ④ Aoyagi H, Yamashiro K, Hirata-Yoshihara C, Ideguchi H, Yamasaki M, Kawamura M, Yamamoto T, Kochi S, Wake H, Nishibori M, Takashiba S. HMGB1-induced inflammatory response promotes bone healing in murine tooth extraction socket. J. Cell Biochem., doi:10.1002/jcb.26710, 2018. 査読有
- ⑤ Yamamoto T, Ugawa Y, Kawamura M, Yamashiro K, Kochi S, Ideguchi H, Takashiba S. Modulation of microenvironment for controlling the fate of periodontal ligament cells: the role of Rho/ROCK signaling and cytoskeletal

dynamics. J Cell Commun Signal.,
12(1):369-378,
doi:10.1007/s12079-017-0425-3, 2018.

査読有

- ⑥ Kochi S, Yamashiro K, Hongo S, Yamamoto T, Ugawa Y, Shimoe M, Kawamura M, Hirata-Yoshihara C, Ideguchi H, Maeda H, Takashiba S. Aggregatibacter actinomycetemcomitans regulates the expression of integrins and reduces cell adhesion via integrin $\alpha 5$ in human gingival epithelial cells. Mol Cell Biochem., 436(1-2):39-48, doi:10.1007/s11010-017-3076-z, 2017. 査読有

- ⑦ Hongo S, Yamamoto T, Yamashiro K, Shimoe M, Tomikawa K, Ugawa Y, Kochi S, Ideguchi H, Maeda H, Takashiba S. Smad2 overexpression enhances adhesion of gingival epithelial cells. Arch. Oral Biol., 71:46-53, doi:10.1016/j.archoralbio.2016.06.025, 2016. 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 青柳浩明, 山城圭介, 井手口英隆, 平田千暁, 下江正幸, 河村麻理, 山本直史, 高柴正悟, HMGB1が歯槽骨治癒に及ぼす影響, 第58回秋季日本歯周病学会学術大会, 2017年9月11日, 静岡県 浜松市.
- ② 青柳浩明, 山城圭介, 井手口英隆, 平田千暁, 河村麻理, 山崎睦代, 山本直史, 和氣秀徳, 西堀正洋, 高柴正悟, 炎症性メディエーター-HMGB1が歯槽骨治癒における血管新生の遺伝子発現を促進する. 第38回炎症・再生医学会, 2017年7月18日, 大阪府, 大阪市.
- ③ 河村麻理, 山本直史, 山城圭介, 下江正幸, 吉原千暁, 井手口英隆, 青柳浩明, 大森一弘, 高柴正悟, Role of

Integrin Isoforms During Migration of Periodontal Ligament Cells, 95th International Association for Dental Research, 2017年3月24日, アメリカ サンフランシスコ.

- ④ 井手口英隆, 山城圭介, 山本直史, 下江正幸, 山本直史, 高柴正悟. 炎症マーカーを標識とした分子イメージングに寄る歯周組織の新規検査法の確立に向けた臨床的／基礎的研究. 第9回日本口腔検査学会学術大会. 2016年10月1日, 福島県, 郡山市, 優秀発表賞受賞.

〔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

井手口 英隆 (IDEGUCHI, Hidetaka)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80779421

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし