

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10204

研究課題名（和文）ジンジパインを分子標的としたダウン症候群の退行現象に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic approach targeting gingipain for regression phenomenon in Down syndrome

研究代表者

中川 弘（NAKAGAWA, Hiroshi）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70192218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究期間では、Porphyromonas gingivalisの増殖を抑制する植物性フラボノイドを探索する目的で、酵素アッセイキットを用いてジンジパイン関連酵素の抑制効果を検討した。また、Down症候群患者の唾液中の主要な歯周病原菌のスクリーニングを、PCR-インバーダー法を用いて行い、歯周病原菌の検出状況とDS患者の歯周組織の炎症状態との関連について調査した。その結果、酵素の抑制効果はスダチチンが最も高いことが分かった。また、歯周病菌のスクリーニング検査では、Tannerella forsythesisとPrevotella intermediaの検出量が高炎症群で有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ダウン症候群（DS）の退行現象と歯周病菌の産生するジンジパインとの関連を解明し、ジンジパインの阻害剤を投与することにより、退行現象の発症を抑制できるかどうかを調査する目的で行う。DSの平均寿命の向上により、DSの健康問題は従来の小児科領域から成人期領域に及んできている。しかし、生活習慣病対策のためのヘルスプロモーションについて、DS独自のプログラムは未だ構築できておらず、特に近年顕著化している退行現象に対する取り組みや治療法に関する研究は不十分である。本研究は、その退行現象に着目し、その発症の抑制の手段として歯周病菌の産生するジンジパインを標的としている所に学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：During this research period, we investigated the inhibitory effect of Jinjipain-related enzymes using an enzyme assay kit to explore plant flavonoids that suppress the growth of Porphyromonas gingivalis. We also screened the major periodontal pathogens in the saliva of Down syndrome patients using PCR invader method and investigated the relationship between the detection status of periodontal pathogens and the inflammation state of periodontal tissues in DS patients. As a result, it was found that Sudachitin had the highest inhibitory effect on enzymes. In addition, the detection levels of Tannerella forsythesis and Prevotella intermedia were significantly higher in the high inflammation group in the screening test for periodontal bacteria.

研究分野：障害者歯科学

キーワード：Down症候群 退行現象 歯周病 ジンジパイン DPP4 DPP7 スダチチン

1. 研究開始当初の背景

(1) ダウン症候群 (DS) の退行現象とアルツハイマー病 (AD)

近年、DS の出生頻度は増加傾向にあり、2006 年には 1.77/1000 出生である。また、DS の平均寿命は小児医療の進歩により約 50 歳まで延長しているという報告がある。その様な状況において、20 歳から 30 歳代にかけて、知的能力や活動水準の低下が出現し、生活適応水準が急激に低下する AD 様の病態 (退行現象) を示す DS が数多く報告されるようになった。AD 患者の脳内にはアミロイド β ($A\beta$) の沈着が認められ、そのことが AD 発症の発端となると考えられている。 $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloidprecursor protein; APP) から産生される。産生された $A\beta$ はネプリライシン (neprilysin) と呼ばれる酵素によって分解され、産生と分解の間で均衡を保たれている。しかし、この均衡が産生側に傾くと $A\beta$ が沈着し、AD 発症の引き金になる。 $A\beta$ の前駆体である APP をコードする遺伝子は 21 番染色体に存在する。DS 患者は 21 番染色体が 3 本になっていることから、健常者と比較して $A\beta$ が 1.5 倍発現する。これが DS 患者が退行現象を呈する原因として考えられている。

(2) 歯周病とジンジパイン

グラム陰性偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は歯周病の発症・進行において最重要視されており、菌体表面および菌体外に強力なプロテアーゼを産生する。なかでも gingipain (ジンジパイン) は本菌の産生する主要なプロテアーゼであり、生体タンパク質の分解を引き起こし、宿主細胞に障害を与え、歯周病に関連する種々の病態を生み出すと考えられている。ジンジパインは本菌の病原性の大部分を占めており、ジンジパインを阻害すれば、本菌の病原性を消失できると考えられている。

(3) アルツハイマー病 (AD) と歯周病

近年になって歯周病と AD に関する疫学的な調査が行われるようになり、健常者と比較して AD 患者では歯周病細菌に対する抗体価が有意に増加していることが確認された。また、AD 患者の脳内から、Pg やジンジパインが検出され、そのジンジパインによってミクログリアが活性化し、脳炎症を引き起こすことが分かっている。この脳の炎症により $A\beta$ が産生・蓄積され、AD 患者の認知機能障害が引き起こされることが報告されている。DS 患者は、退行現象を示し始める 20 歳前後から 30 歳代にかけて、歯周病の早期重症化をきたすことが分かっている。このことから、AD 患者がジンジパインによって症状が悪化するのと同様に、DS の退行現象もジンジパインによって引き起こされているのではないかと考え、本研究を考案した。

2. 研究の目的

本研究は、DS の退行現象と歯周病菌の産生するジンジパイン関連酵素との関連を解明し、ジンジパイン関連酵素の阻害剤を投与することにより、退行現象の発症を抑制できるかどうかを調査する目的で行う。

本研究期間では in vitro 実験と in vivo 実験を並行して行っていく。in vitro 実験では、Pg の増殖を抑制する物質を探索する目的で、いくつかの植物性フラボノイドを選択し、酵素アッセイキットを用いてジンジパイン関連酵素の抑制効果を検討する。一方 in vivo 実験では、Down 症候群患者の唾液中の主要な歯周病原菌のスクリーニングを、PCR-インベーター法を用いて行い、歯周病原菌の検出状況と DS 患者の歯周組織の炎症状態との関連について調査した。

3. 研究の方法

(1) 実験 1 : *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の増殖を抑制する物質の探索

慢性歯周炎の病原体である Pg は、栄養性アミノ酸のみをエネルギー源とする非糖化性微生物である。本菌は、タンパク質性栄養素を主にジペプチドとして取り込むと考えられており、ポリペプチドからジペプチドを生成するエキソペプチダーゼが生存と増殖に重要である。Pg は、ジンジパイン関連酵素である DPP4、DPP7 などのジペプチジルペプチダーゼ (DPPs) を介して、ポリペプチドの N 末端からジペプチドを生産している。また、DPP4 と DPP7 は、それぞれ 2 型糖尿病や凝固異常などの歯周病と全身疾患に直接関係することが最近の研究で明らかにされている。したがって、DPP4 と DPP7 の活性を抑制することができれば、歯周病および関連する全身疾患の予防・治療に繋げることができる。

そこで、本実験では DPP4 と DPP7 の活性を抑制する物質として、以下の 3 種類の植物性フラボノイドに着目し、検討を行った。

- PURESIRTMAX® (3, 5, 7, 3', 4'-Pentamethoxyflavone)

- 黒ウコンに含まれるフラボノイド

- サーチュイン遺伝子 (SIRT1) を活性化させる

- Narirutin

- 柑橘類に含まれるフラボノイド

- 抗炎症作用がある

・Sudachitin

スダチの果皮に含まれるフラボノイド
糖尿病の歯周病重症化の抑制効果がある

① DPP4 の阻害効果

DPP4 Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical 社) のプロトコールに則って行った。蛍光測定用マイクロプレートの各ウェルに dimethyl sulfoxide で溶解した各フラボノイドと DPP 4 を加えて混和したのち、マイクロプレートリーダー (TECAN 社) を用いて励起波長 355nm で蛍光波長 460nm の蛍光強度を測定した。

② DPP 7 の阻害効果

Fluorogenic DPP7 Assay Kit (Bioscience 社) のプロトコールに則って行った。蛍光測定用マイクロプレートの各ウェルに dimethyl sulfoxide で溶解した各フラボノイドと DPP7 を加えて混和したのち、マイクロプレートリーダーを用いて励起波長 355nm で蛍光波長 460nm の蛍光強度を測定した。

(2) 実験 2 : Down 症候群の歯周病原菌の解明

Down 症候群 (DS) の 90%以上が歯周疾患に罹患し、早期に重篤化することが知られている。その要因として、歯周病原菌の早期侵入・定着・増殖がある。DS 患者を対象とした歯周病原菌を調査した研究では、多くの菌が候補に挙げられているが、未だ原因菌は確定されていない。そこで、今回、DS 患者の唾液中の主要な歯周病原菌のスクリーニングを、PCR-インベーター法を用いて行い、歯周病原菌の検出状況と DS 患者の歯周組織の炎症状態との関連について調査した。(徳島大学病院倫理審査委員会：承認番号 3580-1)

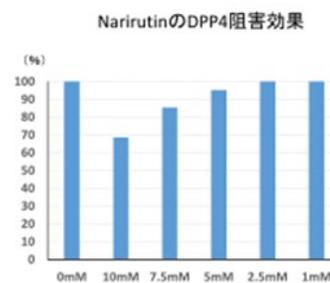
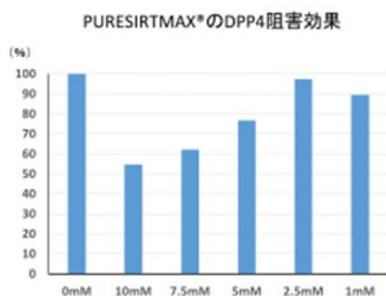
【対象および方法】

大学病院および口腔保健センターで口腔管理を行っている DS 患者 18 名を対象とした。BML 社から提供された唾液採取用キットを用いて唾液を採取し、歯周病原菌のスクリーニング検査を依頼した。スクリーニングを行う菌は、Porphyromonas gingivalis (Pg)、Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)、Prevotella intermedia (Pi)、Treponema denticola (Td)、Tannerella forsythesis (Tf)、Fusobacterium nucleatum (Fn)とした。また、歯周組織の炎症状態を調べるため、残存歯の歯周ポケットの深さ (6 点法)、その際の出血の有無 (Bleeding on probing : BOP) および動揺度 (Miller 分類) を測定した。また、その値から歯周ポケット上皮面積 (PESA) と歯周ポケット炎症面積 (PISA) を算出した。PESA と PISA の値より、歯周組織の炎症状態が高い群 (高炎症群) と低い群 (低炎症群) に分類し、両群間での歯周病原菌の検出量の差を Mann-Whitney U test を用いて有意差検定を行った。

4. 研究成果

(1) 実験 1 : Porphyromons gingivalis (Pg) の増殖を抑制する物質の探索

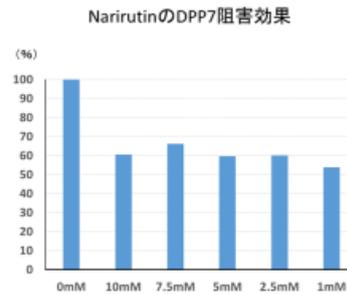
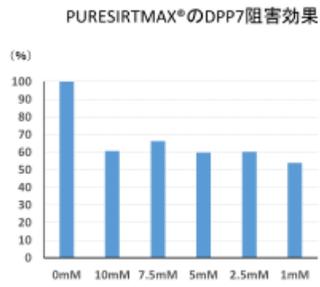
① DPP4 の阻害効果



DPP4の酵素活性をPURESIRTMAXは55%、Narirutinは68%、Sudachitinは18%に抑制した。

②

DPP7 の抑制効果



DPP7の酵素活性をPURESIRTMAXは54%、Narirutinは54%、Sudachitinは15%に抑制した。

(2) 実験 2 : Down 症候群の歯周病原菌の解明

両群で、Aa 以外の Pg、Td、Tf、Pi および Fn が検出された。そのうち、Tf と Pi の検出量は、高炎症群で有意に高かった。Tf は歯周組織破壊の激しい部位で高率に検出されるといわれていることから、DS 患者の歯周病の重篤化に関与している可能性が示唆された。Pi は歯面への付着能力が高く、歯周病の原因となるバイオフィルムの形成に関与する菌であるため、バイオフィルムの形成量が多い高炎症群に有意に認められたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川弘、上田公子、北村尚正、赤澤友基、山川允仁、前尾慶、幸平若奈、鈴木結加里、兼松めぐみ、石川英子、岡本悦子、森重代、横井久美子、森本みどり、岩崎智恵
2. 発表標題 Down症候群患者における歯周炎評価指標(PISA)と歯周病原菌叢の関連
3. 学会等名 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩本 勉 (IWAMOTO Tutomu) (90346916)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	上田 公子 (山口公子) (UEDA Kimiko) (40335807)	徳島大学・病院・助教 (16101)	
研究分担者	北村 尚正 (KITAMURA Takamasa) (50614020)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	二宮 雅美 (NINOMIYA Masami) (10291494)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------