

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：37404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00891

研究課題名(和文) プレニル化フラボノイドの新規歯周病治療薬としての有効性評価

研究課題名(英文) Evaluation of the prenylated flavonoids as a novel anti-periodontitis agent

研究代表者

狩生 徹 (Kariu, Toru)

尚綱大学・生活科学部・教授

研究者番号：10412735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病菌のPorphyromonas gingivalis (ジンジバリス菌)は、増殖や細胞障害に重要な病原因子であるジンジパインと呼ばれる強力なシステインプロテアーゼを分泌する。これまでにプレニル化フラボノイドのEpimedokoreanin B等が、ジンジパイン活性やジンジバリス菌の増殖を抑制することを見出していた。本研究課題では、新たにジンジパインによる血清タンパク質分解に対するEpimedokoreanin Bの阻害活性を示した。さらに、ジンジパインの血管透過性亢進や血球凝集活性を阻害しうることも明らかとし、ジンジバリス菌増殖による歯周病を抑制する新規物質としての評価が出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジンジバリス菌制菌剤としてのジンジパイン活性阻害剤の探索・開発では、口腔内での安定性や口腔内皮細胞への毒性、呈味性(薬剤の苦味)、抗原性等が問題となり、実用化に至っていない。プレニル化フラボノイド類は安定性が高く、また安価であり、応用を考えた場合の保存性、価格、呈味性において有利である。また、プレニル化フラボノイドが長い食経験が有る植物性食品や生薬に存在する安定な成分であることは、製品化への有利な点である。本研究によって新規歯周病治療薬としてのプレニル化フラボノイドの有効性を確立することは、歯周病とその関連疾患への対策に極めて大きな貢献となる。

研究成果の概要(英文)：Gingipains are potent virulence cysteine proteases secreted by Porphyromonas gingivalis, a major pathogen of periodontitis. We previously reported that epimedokoreanin B inhibits the activities of gingipains. In this project, We showed the effect of epimedokoreanin B in the inhibition of host protein degradation, vascular permeability enhancement, and hemagglutination caused by gingipains, indicating the potential use of this prenylated flavonoid as a new agent to combat against periodontal pathogens.

研究分野：農芸化学

キーワード：歯周病 フラボノイド

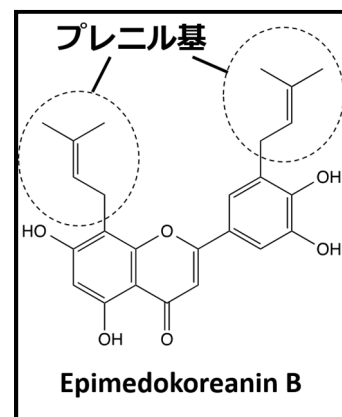
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉炎や歯周炎などの慢性疾患の総称であり、う蝕と並ぶ2大口腔内疾患の一つである。平成23年の歯科疾患実態調査では、45歳以上の約半数の人が罹患しており、ギネスブックにも『人類史上最も感染者数の多い感染症』との記載がある。さらに近年、歯周病が冠動脈性心疾患や脳梗塞、メタボリックシンドローム、誤嚥性肺炎、骨粗鬆症、早産・低体重児出産などの様々な全身性疾患を誘発することが明らかとなってきた。歯周病治療の基本方針は、通常はブラークの除去である。重度の歯槽膿漏の場合にはペニシリン系、セファム系抗菌薬が経口投与されるが、耐性菌の出現と副作用の問題点から、慎重な選択が必要とされる(参考：歯周病学会診療ガイドライン)。

歯周病の発症・進行に関わる主要な病原性細菌は、グラム陰性偏性嫌気性菌の *Porphyromonas gingivalis* (ジンジバリス菌) である。ジンジバリス菌は糖分解能を持たず、外界のタンパク質分解・アミノ酸取り込みによりエネルギーを獲得する。そのため、ジンジパインと呼ばれる強力なシステインプロテアーゼを菌体表面や菌体外に産生・分泌する。ジンジパインは、ジンジバリス菌増殖やバイオフィーム成熟に重要な因子である。さらにジンジパインは、補体系、血液凝固系、サイトカインなどの血漿タンパク質の分解や細胞傷害により全身疾患を誘発する病原因子でもある。そのため、ジンジパインインヒビターの解析は、ジンジバリス菌が引き起こす全身疾患への治療薬開発に重要な基礎知見と成り得る。

我々の研究グループでは、植物性食品に広く含まれるフラボノイド類の新規機能性解析を行っている。良く知られるカテキンやケルセチンの様なフラボノイドと共に、プレニル化フラボノイドのジンジバリス菌抑制活性を解析したところ、プレニル基を持たないフラボノイドに比べて制菌活性が増強される傾向が確認出来た。プレニル基とは炭素数5個からなる構造単位の総称で、一般的なフラボノイドに比べて量は少ないものの、植物はプレニル基のつく位置や長さ、また母核化合物の差異による様々なプレニル化フラボノイド群を含んでおり、疎水性上昇による細胞膜透過性の向上や、バイオフィームとの親和性向上が活性増強に寄与しているものと推察される。これまでに、プレニル化フラボノイドである Limonianin 及び Epimedokoreanin B(右図)等が、非競合的にジンジパインを阻害することを見出した。さらに、ジンジバリス菌培養液中にプレニル化フラボノイドを添加したところ、ジンジバリス菌の増殖とバイオフィーム形成を抑制することが出来た。



2. 研究の目的

ジンジバリス菌制菌剤としてのジンジパイン活性阻害剤の探索・開発は現在でも国内外の複数の研究グループが取り組んでいる。しかしながら、口腔内での安定性や口腔内皮細胞への毒性、呈味性(薬剤の苦味)、抗原性等が問題となる。一般的なシステインプロテアーゼ阻害剤である E-64 やロイペプチン等は、安定性が低く、酵素特異性が低いことなどから人体への応用は困難である。ジンジパイン阻害活性は、食品・生薬のエキスより多数見出されており、ニンニク、クランベリー、霊芝、ドクダミ、イチョウ等の抽出液で特許の申請が確認される。これらは活性成分が未同定であり、原材料の価格や抽出液独特の呈味成分や香気成分などが応用への支障となる。また、コメタンパク質分解物、緑茶カテキンでも阻害活性の報告が存在するが、それぞれペプチドである点や渋味が問題となるため、歯周病治療薬としての実用化に至っていない。

プレニル化フラボノイド類は安定性が高く、また安価なフラボノイドをリード化合物として数段階の操作で合成が可能であり、応用を考えた場合の保存性、価格、呈味性において有利である。我々が解析している Limonianin は柑橘類に含まれるプレニル化フラボノイドであり、Epimedokoreanin B は植物性生薬であるイカリソウ(第2類医薬品)より見出されており、原料として入手し易く、低額である。プレニル化フラボノイドが長い食経験がある植物性食品や生薬に存在する安定な成分であることは、製品化への有利な点である。

オーラルケア関連製品は、国内市場は堅調に拡大している一方で、通常の医薬品に比べ販売価格の安い歯磨き粉やマウスウォッシュ等へ医薬部外品メーカーが投資出来る開発費用は低く抑えられており、新規化合物の認可申請にメーカーは慎重である。その点において、安価で製造可能かつ認可を受けやすいプレニル化フラボノイドは、他社製品と機能性で差別化を図りたいオーラルケア製品メーカーのニーズに適している。以上のことから、本研究によって新規歯周病治療薬としてのプレニル化フラボノイドの有効性を確立することは、歯周病とその関連疾患への対策に極めて大きな貢献となる。

本研究グループにより、プレニル化フラボノイドの抗ジンジバリス菌抑制活性が明らかとなっていたが、歯周病が誘発する全身疾患への効果は確認出来ていなかった。口腔内でのジンジバリス菌の増殖やバイオフィーム形成を抑えるだけでなく、歯周病により引き起こされる全身疾患をも抑制することを確認できれば、プレニル化フラボノイドがこれまでの抗菌剤とは異なる、新規な作用を有する歯周病治療薬となりうる。フラボノイドの吸収と体内動態には不明な点が

多いが、動物実験の結果では血中濃度が数マイクロMのオーダーに達する例も報告されており、口腔内でのジンジバリス菌抑制のみならず、歯周病に誘発される全身疾患への応用も十分に期待できる。そこで本研究課題では、歯周病が誘発する全身疾患をプレニル化フラボノイドが抑制しうるかについて確認し、新規歯周病治療薬としての有効性評価を行った。

3. 研究の方法

(1) ジンジパイン解析に用いるジンジバリス菌培養上清の調製

Porphyromonas gingivalis (ジンジバリス菌) ATCC33277 株を、嫌気条件下でブレインハートインフュージョン培地を用いて培養し、遠心分離により培養上清を得た。硫酸アンモニウム沈殿によりタンパク質画分を濃縮し、リン酸バッファーを用いて透析することで、ジンジパイン等を含むジンジバリス菌菌体外プロテアーゼ画分(PCS)を得た。

(2) ジンジパインによる宿主タンパク質分解へのプレニル化フラボノイドの阻害活性

ヒト型コラーゲン、フィブリノーゲン、高分子キニノーゲン、プロスロンピン、および血液凝固第X因子、それぞれの宿主タンパク質について、PCSはin vitroで分解活性を示した。このアッセイ系に、プレニル化フラボノイドを添加し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量の変化を確認することで、阻害抑制を解析した。

(3) ジンジパインによる血管透過性亢進に対するプレニル化フラボノイドの抑制効果

ジンジパインは、プレカリクレインをカリクレインへと活性化することにより、高分子キニノーゲンから遊離されるブラジキニン量を増大させる。生理活性ペプチドであるブラジキニンは、疼痛や血管透過性亢進に関わり、歯周病では歯肉溝での浸出液漏出を誘発する。血管透過性亢進アッセイは、PCSと正常血漿混合液をインキュベーション後、モルモットへ皮内注射し、浸出液を定量することにより行った。この混合液にプレニル化フラボノイドを添加し、ジンジパインの血管透過性亢進における抑制効果を判定した。

(4) ジンジパインによる血管透過性亢進に対するプレニル化フラボノイドの抑制効果

ジンジバリス菌は、赤血球を溶解しヘムを蓄積するが、ジンジパインはそのC末端部分に赤血球凝集ドメインを有することが知られている。ラウンドボトム96穴プレート中で、精製したヒツジ赤血球とPCSを混合後、室温放置すると、ジンジパインによる赤血球凝集が確認できる、このアッセイ系に段階希釈したプレニル化フラボノイドを添加し、その赤血球凝集阻害能を解析した。

4. 研究成果

PCSによるヒト型コラーゲン、フィブリノーゲン、高分子キニノーゲン、プロスロンピン、および血液凝固第X因子分解について、それぞれプレニル化フラボノイドが濃度依存的に分解を抑制しうる事が分かった。また、PCSと終濃度50 μM、250 μMとなるよう添加したプレニル化フラボノイドは、モルモット皮内の血管透過性をコントロール(DMSO)と比較して有意に阻害した。さらに、96穴プレートを用いたジンジパインの赤血球凝集アッセイに4 μM~125 μMに段階希釈したプレニル化フラボノイドを添加したところ、16 μM以上のプレニル化フラボノイド添加により、PCSの赤血球凝集を阻害出来ることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Toru Kariu, Tsuyoshi Ikeda, Keisuke Nakashima, Jan Potempa, Takahisa Imamura | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 A Natural Anti-Periodontitis Agent, Epimedokoreanin B, Inhibits Virulence Activities of Gingipains From Porphyromonas gingivalis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem | 6. 最初と最後の頁 1382-1384 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1597615 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 狩生徹 |
| 2. 発表標題 食に関する産学連携と地域貢献事例紹介 |
| 3. 学会等名 くまもと産業復興支援プロジェクトフォーラム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 狩生徹 |
| 2. 発表標題 食に関する産学官コラボレーション事例の紹介 |
| 3. 学会等名 FoodStyle2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 狩生徹 |
| 2. 発表標題 食に関する産学連携と地域貢献事例紹介 |
| 3. 学会等名 くまもと産業復興プロジェクトフォーラム2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 狩生徹 |
| 2. 発表標題 プレニル化フラボノイドの歯周病菌増殖抑制活性 |
| 3. 学会等名 くまもと産業復興支援プロジェクトフォーラム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 狩生徹 |
| 2. 発表標題 熊本県産農産品に含まれるポリフェノール類の抗菌性に着目した新規機能性食品の開発 |
| 3. 学会等名 シンポジウム『熊本の未来を考える』 |
| 4. 発表年 2019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 | 今村 隆寿 (Imamura Takahisa) (20176499) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401) | |