

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15845

研究課題名（和文）コメ由来ペプチド素材を用いた口腔ケアアプリケーションと歯周病ペプチド医薬の開発

研究課題名（英文）Development of oral care application using rice-derived peptide material and peptide medicine for periodontal disease

研究代表者

多部田 康一（TABETA, Koichi）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20401763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、コメ アミラーゼ由来のAmy₁₋₁₈ペプチドに着目し、歯周病に対する抑制能とその作用機序を明らかにすることを目的とした。Amy₁₋₁₈ペプチドは、炎症性サイトカイン産生の抑制を介してマウス歯周炎モデルにおいて歯槽骨吸収を阻害した。さらに、Amy₁₋₁₈ペプチドは、マクロファージにおいてLPSおよびIL-1 β によって誘導される炎症性サイトカインを抑制した。Amy₁₋₁₈ペプチドは抗炎症性作用によって、歯周病を抑制することが明らかとなった。この研究の成果により、新規歯周病医薬開発の基礎となるデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、コメ由来Amy₁₋₁₈ペプチドが抗炎症作用を有すること、歯周病を抑制することが明らかとなり、歯周病に対抗する新規の治療薬開発につながる可能性を示すことができた。未だ40歳で80%の罹患率とされる歯周病の予防及び治療へと発展することで、国民のQOL向上に大きく貢献し得ると考えている。また、Amy₁₋₁₈ペプチドがもつLPS中和能や抗炎症作用により、菌血症やリウマチ、クローン病などの炎症性疾患の治療への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the suppressive ability of Amy₁₋₁₈ peptide and action mechanism against periodontal disease. Amy₁₋₁₈ peptide inhibited alveolar bone resorption in mouse periodontitis model via suppressing inflammatory cytokine production. Furthermore, Amy₁₋₁₈ peptide suppressed inflammatory cytokine induced by LPS and IL-1 β in macrophage. It was shown that Amy₁₋₁₈ peptide has anti-inflammatory property and suppresses periodontal disease. The results of this study using mice demonstrated the potency of Amy₁₋₁₈ as a novel peptide agent for application in periodontal therapy.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯周炎 ペプチド 抗炎症

1. 研究開始当初の背景

国民の健康増進のための総合政策である第2次健康日本21(平成24年7月10日厚生労働省告示430号)において、健康寿命の延伸を目指すための生活習慣病に関連する課題として歯の健康が挙げられている。う蝕、歯周病が歯の喪失の2大原因であるが、平成24年の12歳児のう蝕罹患歯は平均1.1本まで減少しており、いかに歯周病による歯の喪失を減らすかが焦点である。この政策の背景には、高齢者における咀嚼機能の維持とADL(Activities of day living:食事・更衣・排泄・入浴などの日常生活動作)レベルの関連や、歯周病罹患と誤嚥性肺炎発症との関連があり、健康寿命の延伸に歯科医療が貢献するためには、青年期から老年期の各ライフステージにおける歯周病対策、または口腔内の歯周病原細菌のコントロールがこれまで以上に重要と考える。

歯周病の原因除去に化学的ブランクコントロールは有効なアプローチの一つであるが、現在その機能はエッセンシャルオイルや化学物質を用いた抗菌作用・抗炎症作用に限定されている。本申請においては、口腔細菌のコントロールを行うための新たな付加価値型口腔ケアアプリケーションの開発を目指して、日本人の主食として身近でありふれた食品であるコメを原材料とした機能ペプチド素材について検索する。求める付加価値として、(1)従来の抗菌・抗炎症作用に加えて、細胞増殖促進作用や創傷治癒促進作用を機能として持つ、(2)食品としての可飲性をもち、高齢者口腔ケアに適する、(3)安全性が高く生涯にわたり歯周病予防、進行防止に応用できる、以上の機能を備えたペプチド素材の開発に挑戦する。さらに、アミノ酸置換による機能強化ペプチドを作製することにより、新しい歯周病ペプチド医薬の開発に発展的に挑戦する。

2. 研究の目的

歯周病に対抗するための新たな付加価値型口腔ケアアプリケーションの開発を目指して、日本人の主食として身近でありふれた食品であるコメを原材料とした機能ペプチド素材について検索した。予備実験の結果から、本研究においてはコメ由来 AmyI-1-18 ペプチドに着目し、その歯周病抑制能と作用機序について明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

コメ α -アミラーゼ由来 AmyI-1-18 ペプチドについて、マクロファージにおける抗炎症作用について機能評価を行うとともに、マウスを用いた実験的歯周炎モデルにて歯周炎抑制効果を検証した。

1) *In vivo*における歯周組織破壊の抑制作用の評価

AmyI-1-18 ペプチドの、歯周病モデルマウスにおける作用を明らかとするため、マウス C57BL/6N に AmyI-1-18 ペプチド 2.0mg/kg body weight を oral gavage 法により 1回/日、計 14 回投与した。ペプチド投与開始から 7 日目に上顎第二臼歯に絹糸を結紮し、計 7 日間、実験的歯周炎を誘導した。顎骨吸収は実体顕微鏡下でセメントエナメル境(CEJ)から歯槽骨頂(ABC)で囲まれる歯根面積を測定した。パラフィン包埋脱灰切片にて TRAP 染色を行い、歯周組織における破骨細胞数を測定した。歯肉組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現は、qPCR 法を用いて解析した。口腔内のエンドトキシン量および細菌量を評価した。

2) LPS に誘導されるサイトカイン産生抑制能の評価

マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を用いて、各 TLR リガンド刺激に対する IL-6 および TNF- α の産生量を ELISA 法にて解析した。

3) ペプチドの局在解析

マクロファージにおける抗炎症能のメカニズムを明らかとするため、共焦点顕微鏡を用いて蛍光標識したペプチドの局在を検証した。

4) IL-1 に誘導されるサイトカイン産生抑制能の評価

マウス腹腔マクロファージを用いて、IL-1 刺激に対する IL-6 産生量を ELISA 法にて解析した。また、インフラマソーム活性を評価した。

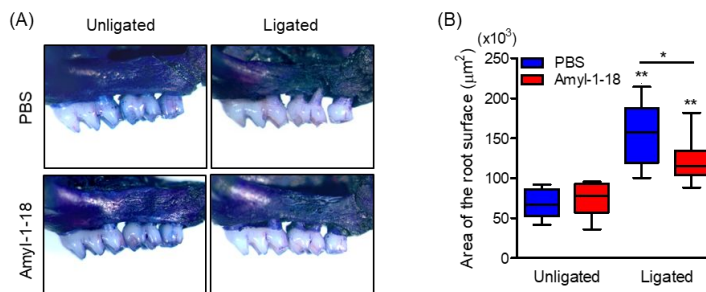
4. 研究成果

1) *In vivo*における歯周組織破壊の抑制作用の評価

歯周炎モデルマウスにおいて AmyI-1-18 ペプチドが顎骨吸収抑制作用を示すことが明らかとなった(図1)。また、歯周組織において、TRAP 染色で示される破骨細胞数が AmyI-1-18 ペプチド投与により有意に抑制されていることが示された。

歯肉組織において IL-6 遺伝子発現が有意に抑制されていたことから、歯肉局所における AmyI-1-18 ペプチドの抗炎症作用が示された。抗炎症メカニズムとして、我々はこれまでに AmyI-1-18 ペプチドが *in vitro* において *E. coli* 由来のエンドトキシンを中和することを報告していることから、口腔内におけるエンドトキシン量を測定したところ、AmyI-1-18 ペプチド群において有意にエンドトキシン量が減少していることが示された。AmyI-1-18 ペプチドのエンドトキシン中和能により、歯周組織の炎症が抑制されたと考えられる。一方、16SrRNA で評価した口腔内の細菌量はコントロール群とペプチド投与群間に差はなかった。以上より、歯周炎モデルマウスにおいて AmyI-1-18 ペプチドは歯周組織破壊を抑制し、そのメカニズムとしてペプチドの抗炎症作用が関与している可能性が示された。

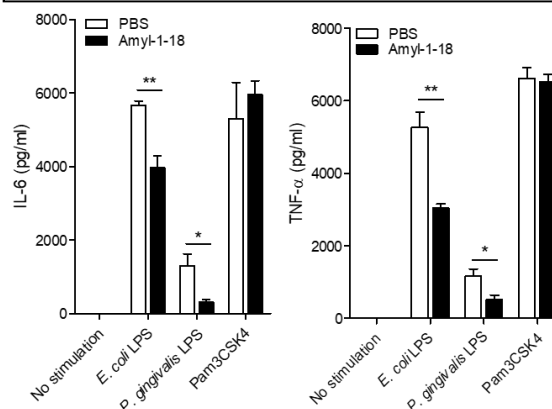
図 1 歯槽骨吸収が AmyI-1-18 ペプチドにより抑制された



2) LPS に誘導されるサイトカイン産生抑制能の評価

AmyI-1-18 ペプチドの抗炎症作用を明らかとするため、マクロファージにおける抗炎症作用について機能評価を行った。LPS 刺激によって誘導される炎症性サイトカイン産生を AmyI-1-18 ペプチドが抑制することが示された (図 2)。TLR2 のアゴニストである Pam3CSK4 刺激に対しては抑制作用を示さないことから、AmyI-1-18 ペプチドの LPS 中和能が抗炎症能に関与している可能性が示唆された。また、Western Blotting を用いた実験において NF- κ B シグナリング経路を AmyI-1-18 ペプチドが阻害していることが示された。

図 2 LPS に誘導される IL-6, TNF 産生が AmyI-1-18 ペプチドにより抑制された



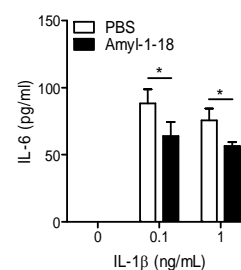
3) ペプチドの局在解析

AmyI-1-18 ペプチドの LPS に対する作用について、共焦点顕微鏡により観察したところ、LPS 刺激処理によって誘導されるマクロファージ表面への LPS の結合が、AmyI-1-18 ペプチドによる前処理によって阻害されることが示された。すなわち、AmyI-1-18 ペプチドは、LPS に直接結合することで、LPS が細胞表面の TLR に作用するのを阻害していることが示唆された。さらに、LPS 非存在下においては、この AmyI-1-18 ペプチドは細胞内に局在することが明らかとなったことから、AmyI-1-18 ペプチドの作用点として細胞外における LPS 中和のみならず、細胞内における機能も示唆された。

4) IL-1 に誘導されるサイトカイン産生抑制能の評価

さらに、AmyI-1-18 ペプチドの第二の抗炎症作用メカニズムとして、IL-1 によって誘導されるサイトカイン産生を抑制することも明らかとなった (図 3)。すなわち、マクロファージを IL-1 リコンビナントタンパクによって刺激すると産生される炎症性サイトカインである IL-6 が、AmyI-1-18 ペプチドによって産生が阻害されることが示された。このとき、インフラマソーム活性には AmyI-1-18 ペプチドは変化を及ぼさなかった。

図 3 IL-1 によるサイトカイン産生を阻害した



以上より、コメ由来の AmyI-1-18 ペプチドは、LPS および IL-1 によって誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制することによって抗炎症作用を示し、それにより歯周炎の進行を抑制することが明らかとなった。新規の歯周病治療薬開発につながる可能性が示唆されただけでなく、菌血症やリウマチ、クローン病などの炎症性疾患の治療への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Aoki-Nonaka Y, Tabeta K, Yokoji M, Matsugishi A, Matsuda A, Takahashi N, Sulijaya B, Domon H, Terao H, Taniguchi M, and Yamazaki K. 「The AmyI-1-18 peptide derived from rice inhibits alveolar bone resorption via suppression of inflammatory cytokine production induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β in mice」 『Journal of periodontology』, Apr 29. doi: 10.1002/JPER.18-0630. [Epub ahead of print] 2019

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 野中由香莉, 多部田康一, 横地麻衣, 松田由実, 山崎和久, 吉江弘正 「米由来抗菌ペプチドの歯周炎モデルマウスにおける抗炎症作用の検討」 第 60 回秋季日本歯周病学会学術大会, 福岡, 2018 年 5 月 12 日

(2) 野中由香莉, 横地麻衣, 多部田康一, 山崎和久 「コメ由来抗菌ペプチドの抗炎症作用と創傷治癒作用の解析」 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2019 年 10 月 7 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：谷口 正之

ローマ字氏名：TANIGUCHI, Masayuki

所属研究機関名：新潟大学

部局名：自然科学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：00163634

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。