

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04418

研究課題名(和文)人工細胞を用いたオーラルケアシステムの基礎研究

研究課題名(英文)Basic study for oral care system using an artificial cell

研究代表者

木戸 淳一(KIDO, Jun-ichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：10195315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌ペプチドを用いた口腔感染症の生物学的な予防法の基盤構築を目指した。無細胞蛋白質合成系によりリポカリン2(LCN2)やベータ-ディフェンシン2(BD-2)等の抗菌ペプチドを合成し、その同定や定量を行った。ドラッグデリバリーシステムのキャリアとしてリポソームを調製し、口腔上皮細胞への取込み法を検討した。LCN2やBD-2を封入したリポソームを細胞培養系に加え、細胞への送達を確認した。合成したLCN2やBD-2、そのリポソーム封入体が*P. gingivalis*の細胞への付着を抑制した。この結果から、合成した抗菌ペプチドのリポソームによる細胞送達は、歯周病の予防に貢献する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯磨き等の口腔清掃が難しい高齢者の口腔衛生環境を整えることは歯周病ばかりでなく他の口腔内感染症の予防にとっても重要である。本研究では、生体が産生している抗菌ペプチドを無細胞蛋白質合成系で合成し、細胞膜成分と類似した脂質のリポソームに封入し、またリポソームの改良により口腔上皮細胞へ送達効率を高めたドラッグデリバリーシステムを研究した点に特徴がある。この研究により化学薬物ではなく、生体に負荷の少ない、歯周病の生物学的な予防法を提案した点に学術的な意義がある。これらの新たなオーラルケア法は、高齢者や要介護者の歯周病ばかりでなく、関連する全身疾患の予防にも貢献するという社会的な意義も考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims a basic construction for biological prevention of oral infectious diseases by antimicrobial peptides (AMPs). Lipocalin 2(LCN2) and beta-defensin 2(BD-2) were synthesized using cell-free protein synthesis system and these peptides were identified and determined. Liposomes were prepared as a carrier for drug delivery system, and its uptake into oral epithelial cells was investigated. The synthesized LCN2 and BD-2 were encapsulated into liposomes. A delivery of LCN2 and BD-2 to oral epithelial cells was confirmed when the peptides in liposomes were added to the cell culture. The synthesized LCN2 and BD-2, and these peptides encapsulated into liposomes inhibited an adhesion of *P. gingivalis* to oral epithelial cells. These results suggest the possibility that a delivery of the synthesized AMPs into liposomes to oral epithelial cells contributes to prevention of periodontal diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 オーラルケア 抗菌ペプチド 無細胞蛋白質合成 リポソーム ドラッグデリバリーシステム  
人工細胞

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

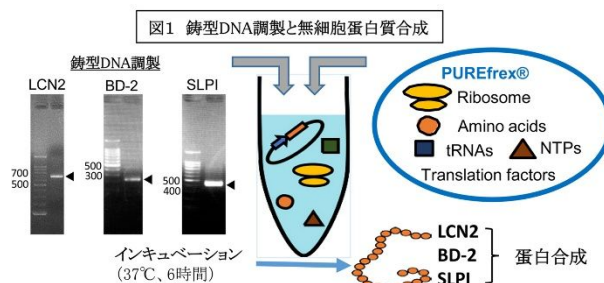
高齢者の増加に伴い口腔内感染症を予防することは、歯周病などの口腔疾患の発症を抑制するとともに、糖尿病などの全身疾患の病態改善にも寄与する。歯周病の治療はスケーリング等の機械的治療が主であるが、複数の疾患を持つ高齢者ではより積極的な予防処置や薬物を用いた治療が望まれる。また、高齢者では様々な薬物の服用例があるため、歯周病の予防・治療としてより低侵襲な方法が期待される。口腔上皮細胞等が産生する抗菌ペプチド(AMP)は薬物と異なり低刺激で、歯周病原細菌に対して静菌作用を示すものもあり歯周病予防への応用が考えられる。最近、無細胞での蛋白質合成により人工的に高純度の蛋白質を合成する研究が進められている。一方、癌治療等ではリポソームを用いた Drug delivery system (DDS)により標的組織への抗癌剤の送達が行われている。これらのことから無細胞合成した AMP をリポソーム封入し、口腔上皮組織に送達させ、歯周病原細菌への静菌性を介して歯周病予防を行う発想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、人工合成した AMPs をリポソーム送達するための基礎研究を行い、オーラルケアへの応用の基盤を構築することである。すなわち、無細胞蛋白質合成系を用いて合成した Lipocalin 2 (LCN2)、 $\beta$ -Defensin 2 (BD-2) や Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) をリン脂質 2 重層のリポソームに封入し、このリポソームの口腔上皮細胞への送達を高める方法を検討した。また、リポソーム封入した LCN2 と BD-2 による抗菌能を調べるため、AMPs による *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) の口腔上皮細胞への付着抑制効果について検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) AMPs の無細胞蛋白質合成：ヒト骨髄や胃由来 cDNA を鋳型、LCN2, BD-2 と SLPI の各 PCR プライマー及び T7 プロモーター配列とリポソーム結合部位を含むプライマー等を用いて PCR を行い蛋白質合成用の鋳型 DNA を調製した(図1)。3種のAMPsは、再構成型無細胞蛋白質合成キット (PUREfrex® 2.1) を用いて合成液を調製し、37℃、6時間インキュベーションにて合成した。合成した LCN2, BD-2 及び SLPI の蛋白はウェスタンブロット(WB)とELISAにて確認した。また、各AMPの鋳型DNA-N末端領域をATリッチのコドンに変更し (GeneFrontier 社より情報提供) 蛋白質合成量の増加を図った。



(2) 合成 LCN2 の質量分析：合成した LCN2 蛋白をポリアクリドアミドゲル電気泳動で分離し、分子量 23 kDa の LCN2 に相当するバンドのゲルを切除しトリプシン消化した後、質量分析装置 (Ultimate 3000 RSL Cnano system、Acclaim PepMap RSLC Nano Column) に供した。合成 LCN2 サンプルとリコンビナント LCN2 蛋白 (rLCN2) サンプルの質量分析結果は Mascot にて解析した。

(3) リポソーム調製：1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)や1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(DOPE)と3-sn-Phosphatidylcholine from Egg Yolk(Egg-PC)を用いて自発的転移法によりリン脂質 2 重層のリポソームを作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

(4) リポソームの細胞への取込み：Rhodamine-DOPE を含むリポソームを調製し、口腔上皮細胞 (TR146) 培養系に添加後、蛍光リポソームの細胞への取込みレベルを蛍光顕微鏡及び蛍光強度測定により評価した。また、取込みを高めるためにリポソーム成分に DOPE やオクタアルギニン (STR-R8) を加え、リポソームの細胞取込みへの影響を検討した。

(5) リポソーム封入 AMPs の細胞への送達：人工合成した LCN2 と BD-2 についてリポソームに封入し、口腔上皮細胞と培養後、細胞と培地画分中の LCN2 を WB と ELISA で同定及び定量した。

(6) 人工合成した AMPs による抗菌能の評価：合成した LCN2 と BD-2、及びリポソーム封入 AMPs で口腔上皮細胞や *P. g* 菌を前処理し、共培養後の蛍光強度測定により AMPs による細菌の細胞への付着抑制効果を検討することにより合成 LCN2 と BD-2 による抗菌能を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 合成 AMPs の同定と定量：PURE システムにより人工合成した LCN2, BD-2 及び SLPI を WB した結果、それぞれ 23, 5, 12 kDa の分子量で、リコンビナント蛋白質と同じサイズのバンドが認められ、鋳型 DNA フリーの合成蛋白サンプルでは、バンドは認められなかった(図2)。また、ATリッチコドンを含む鋳型 DNA を用いて合成した蛋白濃度は、sLCN2:220.5, sBD-2:206.2 及び sSLPI:104 各 $\mu\text{g/mL}$ であった(表1)。

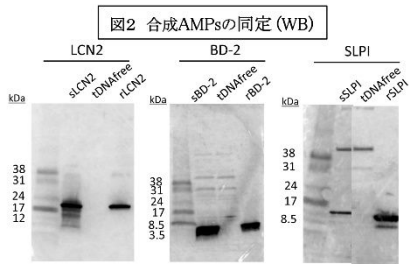


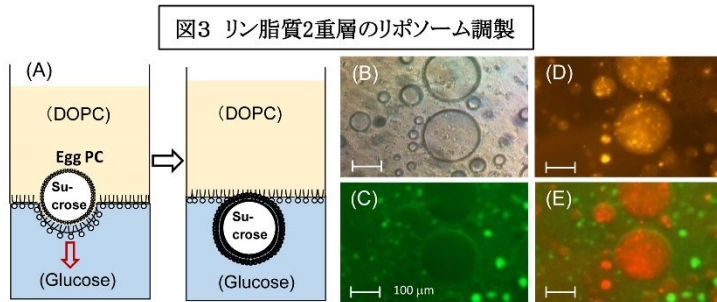
表1 合成AMPsの濃度 (ELISA)

AMPs	平均濃度(μg/mL)
sLCN2	220.5 ± 29.9 (n=8)
sBD-2	206.2 ± 35.5 (n=5)
sSLPI	104.0 ± 15.6 (n=6)

(sAMP: Synthesized AMP)

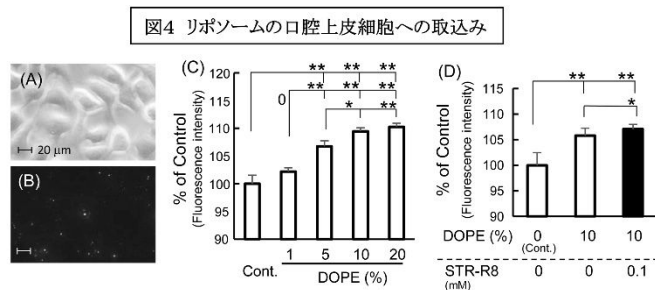
(2) 合成 LCN2 の質量分析解析: 合成した LCN2 を質量分析した結果、マススコットスコアが 1677、検出ペプチド数が 141 でデータベース上の LCN2 のアミノ酸配列のカバー率が 74.7%であった。rLCN2 サンプルではそれぞれ 5632, 1059 及び 82.3%であり、合成した LCN2 のアミノ酸配列は天然の LCN2 及びリコンビナント LCN2 蛋白の配列と類似していることが判明した。

(3) 調製リポソームの形態観察: リポソームの外層の脂質成分中に NBD-PE (緑) を、内層の脂質に Rhodamine-DHPE (赤) を添加し、自発的転移法によりリポソームを調製した結果、リポソームの直径が 1-180 μm の様々なサイズの複数のリポソームが作製された。また、蛍光顕微鏡観察によりリポソームの外層が緑色を、内層が赤色を呈した 2 重層のリポソームが認められた (図 3)。

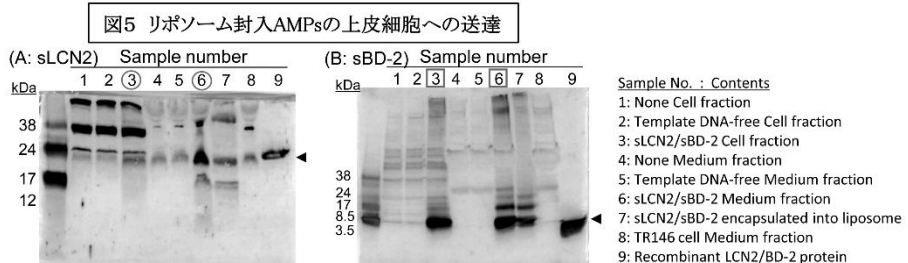


(4) リポソームの口腔上皮細胞への取込み: リポソームの外層脂質成分中に Rhodamine-DOPE を口腔上皮細胞培養系添加し、蛍光顕微鏡観察をすると、培養細胞中に発光したリポソームのドットが認められリポソームが口腔上皮細胞中に取り込まれていることが確認された (図 4 A と B)。

また、陽性の電荷をもつ DOPE を一定割合で外層脂質に添加した場合、陰性電荷を示す細胞膜に対してリポソームの取込み効率が増加し、1-20%で濃度依存性を示し、10%の DOPE で約 10%の取込み増加を示した (図 4 C)。また、cell-penetrating peptide の一種である stearylated octarginine (STR-R8)により、軽度ではあるがさらに有意な取込みの増加がみられた (図 4 D)。



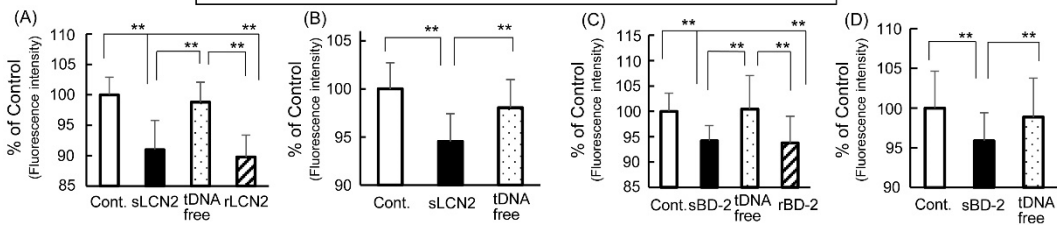
(5) リポソーム封入 LCN2 及び BD-2 の細胞への送達: リポソームに封入した LCN2 と BD-2 を口腔上皮細胞培養系に作用させた後、細胞画分と培地画分中の蛋白質を WB で分析した結果、両ペプチドともに、細胞画分と培地画分の両画分において鋳型 DNA フリーの蛋白サンプルと比較して合成 LCN2/BD-2 サンプルで強い免疫シグナルが認められた (図 5 A と B)。細胞画分中の LCN2 と BD-2 濃度を ELISA 測定した結果、LCN2 では合成 LCN2 サンプルで 15.9 ng/mL で、鋳型 DNA フリーの 8.4 ng/mL より有意に高い値を示した。また、BD-2 でも鋳型 DNA フリーサンプルで 0.27 ng/mL に対し、合成 BD-2 サンプルで 1.52 ng/mL であった。これらの結果から、合成した LCN2 や BD-2 は口腔上皮細胞に有効に送達されていることが確認された。



(6) 合成 AMPs による *P.g* 菌の口腔上皮細胞付着抑制: 人工合成した LCN2 及び BD-2、またリポソーム封入した 2 つのペプチドによる *P.g* 菌の口腔上皮細胞付着への抑制効果を検討した結果、合成 LCN2 (100 ng/mL) は、鋳型 DNA フリーの対象と比較して *P.g* 菌の細胞への付着を約 10% 低下させた (図 6 A)。この低下率は、リコンビナント LCN2 (rLCN2: 10 ng/mL) による抑制効果と

同等であった。リポソーム封入 LCN2 (300 ng/mL) では、約 5%の抑制効果が認められた(図 6 B)。また、合成 BD-2(100 ng/mL)では約 5%と rBD-2(25 ng/mL)と同等の細菌の細胞付着抑制効果を示し(図 6 C)、リポソーム封入 BD-2(300 ng/mL)では 5%弱ではあるが有意な抑制効果が認められた(図 6 D)。

図6 合成LCN2とBD-2による*P.g*菌の上皮細胞付着抑制効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohei Nonaka, Mika Bando, Eijiro Sakamoto, Yuji Inagaki, Koji Naruishi, Hiromichi Yumoto, Jun-ichi Kido	4. 巻 24
2. 論文標題 6-Shogaol inhibits advanced glycation end-products-induced IL-6 and ICAM-1 expression by regulating oxidative responses in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 E3705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24203705	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 -

1. 著者名 Rie Kido, Yuka Hiroshima, Jun-ichi Kido, Takahisa Ikuta, Eijiro Sakamoto, Yuji Inagaki, Koji Naruishi, Hiromichi Yumoto	4. 巻 55
2. 論文標題 Advanced glycation end-products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Periodontal Res	6. 最初と最後の頁 539-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木戸理恵, 廣島佑香, 生田貴久, 吉田賀弥, 稲垣裕司, 成石浩司, 尾崎和美, 木戸淳一, 湯本浩通
2. 発表標題 最終糖化産物はヒト口腔上皮細胞のリボカリン2発現を増加する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島佑香, 木戸淳一, 木戸理恵, 吉田賀弥, 稲垣裕司, 成石浩司, 湯本浩通
2. 発表標題 オーラルケアへの応用を目指した抗菌ペプチド合成とリボソーム封入
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島佑香、木戸淳一、木戸理恵、吉田賀弥、稲垣裕司、成石浩司、湯本浩通
2. 発表標題 オーラルケアへの応用に関連するリボソームのデリバリー法の検討
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸理恵、廣島佑香、生田貴久、稲垣裕司、板東美香、成石浩司、木戸淳一、湯本浩通
2. 発表標題 最終糖化産物による口腔上皮細胞のLipocalin 2発現誘導は好中球の遊走性とサイトカイン発現を調節する
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸淳一、廣島佑香、木戸理恵、稲垣裕司、成石浩司、湯本浩通
2. 発表標題 無細胞蛋白質合成系を用いた抗菌ペプチドの合成とリボソーム封入
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸淳一、廣島佑香、木戸理恵、吉田賀弥、稲垣裕司、成石浩司、湯本浩通
2. 発表標題 リボソームに封入したリポカリン2の口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣島佑香、木戸理恵、木戸淳一、稲垣裕司、成石浩司、湯本浩通
2. 発表標題 人工合成したLipocalin 2はPorphyromonas gingivalisの口腔上皮細胞への付着を抑制する
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸淳一、廣島佑香、木戸理恵、吉田賀弥、稲垣裕司、成石浩司、湯本浩通
2. 発表標題 人工合成したb-Defensin 2によるPorphyromonas gingivalisの付着抑制およびリボソーム封入と口腔上皮細胞への送達
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022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	廣島 佑香  (HIROSHIMA Yuka)  (60545143)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師   (16101)	
研究分担者	吉田 賀弥  (YOSHIDA Kaya)  (60363157)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授   (16101)	
研究分担者	篠原 康雄  (SHINOHARA Yasuo)  (60226157)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授   (16101)	



6. 研究組織（つづき）

	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	成石 浩司  (NARUIISHI Koji)  (00346446)	徳島大学・病院・講師    (16101)	
研究分担者	稲垣 裕司  (INAGAKI Yuji)  (50380019)	徳島大学・病院・講師    (16101)	

	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
研究協力者	木戸 理恵  (KIDO Rie)  (60876027)		
連携研究者	梶本 和明  (KAJIMOTO Kazuaki)  (10416216)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康医工学研究部門・主任研究員    (82626)	

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