

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17276

研究課題名（和文）『口腔マイクロバイオームの健全化』を目指した『次代歯周病予防薬』の開発

研究課題名（英文）Development of "Next generation preventive drug for periodontal disease" aiming at "Health of oral microbiome"

研究代表者

土門 ひと美 (Domon, Hitomi)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60747145

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）：歯周病関連菌のタンパク質・ジペプチド代謝を特異的に阻害する物質を検索し、その阻害メカニズムを解明しようと検討した。

Pg ATCC33277TとPg JCM8525において、低濃度のフッ化物でも有意な増殖の抑制がみられ、ほぼ増殖が停止した。さらに、メタボローム解析では、低濃度のフッ化物によりPg ATCC33277Tのいくつかの最終代謝産物は増加がみられ、いくつかの中間代謝産物では減少がみられた。これらの結果から、フッ化物により阻害される代謝ステップとその責任酵素を特定することが可能となりそうである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品添加物や医薬部外品として認可されている物質からPorphyromonas gingivalisの代謝阻害を介して増殖を抑制する物質としてフッ化物の可能性が得られた。その阻害メカニズムを解明し、歯周病関連菌選択性抗菌剤の提案を行うことは、口腔マイクロバイオームの健全化を念頭にしたこれからの歯周病予防に不可欠であると思われる。さらに、歯周病関連菌の選択的抑制に有効な薬剤を選択することができれば、『次代の歯周病予防薬』を開発できるのでないかと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We searched for substances that specifically inhibit the metabolism of proteins and dipeptides in periodontal disease-related bacteria, and investigated the mechanism of the inhibition.

In Pg ATCC33277T and Pg JCM8525, significant suppression of growth was observed even at low concentrations of fluoride, and growth was almost stopped. In addition, metabolome analysis showed an increase in some end products of Pg ATCC33277T and decrease in some intermediate metabolites due to low concentrations of fluoride. From these results, it seems possible to identify the metabolic steps inhibited by fluoride and their responsible enzymes.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周病関連菌 フッ化物 増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、日本人の歯の喪失をもたらす主要な原因疾患の一つである。成人期の20歳代から（妊婦を含む）組織の脆弱期が開始し、壮年期の40歳代から歯周病による抜歯が多くなる[H28年歯科疾患実態調査(厚労省)；永久歯の抜歯原因調査報告書(財団法人 8020 推進財団)]。すなわち、仕事や子育てで多忙な30代に歯周病を効果的に予防することが、生涯にわたる健康を維持するうえで必須である。そのためには、現状のプラークコントロールに加え、選択性・特異性の高い歯周病予防薬剤の開発が必要である。

本研究グループによって、歯周病関連菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) や *Prevotella intermedia* や *Fusobacterium nucleatum* は、タンパク質やジペプチドを代謝してエネルギーを得ることが明らかにされた[Takahashi, 2015]。さらに、*Pg* はタンパク質を菌体細胞膜外のタンパク分解酵素 (Kgp, Rgp 等) で分解し、次いで細胞膜上にあるペプチダーゼ (DPP4, DPP5, DPP7, DPP11 等) でジペプチドに分解し、最終的に菌体内に吸収・代謝することが示されている[Nemoto et al, 2016]。

一方、さまざまな薬剤がタンパク分解酵素阻害剤として知られるようになった。フッ素[Kato et al., 2014; Mei et al., 2012]、鉄、亜鉛、銀等の金属イオン[Toledano et al, 2012; Kato et al, 2010]、さらには、アボカド、大豆、緑茶ポリフェノール等の天然物質[Chaussain-Miller et al, 2006]が挙げられる。しかし、これらのタンパク質分解酵素阻害剤は、ヒト由来のマトリックス金属プロテアーゼ (MMP) やカテプシンを阻害することが報告されているのみであり、歯周病関連菌のタンパク質分解酵素やペプチダーゼを阻害するかどうかは不明である。さらに、阻害剤の安全性を担保するために、阻害メカニズムを明らかにすることが必要である。

以上のことから、上記の食品添加物や医薬部外品として認可されている物質から歯周病関連菌のタンパク質・ジペプチド代謝を特異的に阻害する物質を検索し、その阻害メカニズムを解明し、歯周病関連菌選択性抗菌剤の提案を行うことは、口腔マイクロバイオームの健全化を念頭にしたこれからの歯周病予防に不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究は、薬剤による殺菌や増殖抑制が主体であり、歯周病関連菌選択性は低かった。しかし、本研究では、『歯周病関連菌はタンパク質・ジペプチドを代謝してエネルギーを得る』という事実に着目し、エネルギー代謝抑制による歯周病関連菌の選択的抑制を目指しており、学術的独自性は極めて高い。

さらに本研究では、その生化学的メカニズムについて、酵素活性測定法に加え、最先端のメタボローム解析によって解明するという学術的創造性を持つ。メタボローム解析装置は、歯学系における本邦初の機器として既に東北大学大学院歯学研究科に導入され、実働している。本手法によって、薬剤の曝露の有無における歯周病原菌のタンパク質・ジペプチド代謝の代謝中間体と最終代謝産物の網羅的定量分析が可能となり、阻害される代謝ステップとその責任酵素をオープンエンドで特定することが可能である。推定された責任酵素が実際に阻害されるかどうかについては、酵素活性測定法を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) 薬剤による歯周病関連菌の増殖抑制効果の検討

歯周病関連菌の薬剤による代謝阻害効果の有無を、薬剤を共存させて培養した際の『増殖抑制効果』の有無により検討した。細菌としては、*Pg* ATCC33277 と *Pg* JCM8525 を選定した。増殖抑制の検討の結果、本研究目的に合致した薬剤としてフッ化物(KF)が選択された。以降、KF を使用することとした。上記2種の *Pg* を嫌気条件下にて 37°Cにて各種濃度 KF 含有の液体培地にて培養し、24 時間・48 時間後の培地の懸濁度(分光光度計)と pH (pH メーター)を測定した。

(2) メタボローム解析により阻害メカニズムを解明

(1)の薬剤による歯周病関連菌の増殖抑制を検討した方法で24時間培養した培地を回収・洗菌し、遠心にて上清と細菌に分離した後 -20°Cで保存した。メタボローム解析により KF 添加による中間代謝産物(細菌を CE-TOFMS にて解析)、最終代謝産物(上清を HPLC にて解析)の変動を検討した。

(3) 酵素活性測定法による阻害メカニズムを解明

実験には *Pg* の標準株(ATCC33277)を使用した。

- ① 基質を菌体へ取り込む際の酵素活性に対する抑制があるかどうかを、トリプシン様タンパク質分解酵素(gingipain)およびジペプチジルペプチダーゼ(DDP)に対する KF による酵素の活性抑制効果を検討した。嫌気条件下、37°Cにて培養し、対数増殖期に回収・洗菌後の細菌を4°C及び -20°Cで保存した。4°Cで保存した細菌は gingipain 活性測定に使用した。一方、-20°Cで保存したペレットは超音波粉碎し、抽出した酵素を用いて DDP 活性測定に用いた。それぞれの酵素活性は特異的蛍光酵素基質を用いて分光蛍光光度計で測定した。
- ② (2)の結果から抑制されると想定された菌体内代謝反応に関わる中間代謝産物を基質とし、KF 共存下で酵素活性を検討した。嫌気条件下、37°Cにて培養し、対数増殖期に回収・洗菌後の -20°Cで保存した細菌を使用し、超音波粉碎により菌体から抽出した酵素を用いて、KF による酵素活性の変化を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 薬剤による歯周病関連菌の増殖抑制効果について

Pg ATCC33277^Tでは低濃度の KF で有意な増殖の抑制がみられ、ほぼ増殖が停止した。*Pg* JCM8525でも同様であった。この結果より低濃度 KF による歯周病関連菌の増殖抑制効果がみられることが分かった。

(2) メタボローム解析による阻害メカニズムの検討

Pg ATCC33277^Tの中間代謝産物には KF の添加で増減が見られた。これらの結果から、代謝が抑制される酵素が予測可能となり、さらに代謝の流れの変化が検討可能となった。

(3) 酵素活性測定法による阻害メカニズムの検討

Gingipain および DDP のどちらの酵素も KF による活性抑制がみられなかった。また、メタボローム解析の結果から代謝が KF によって抑制されると予測された中間代謝産物を基質とし代謝活性を測定したところ、一部の基質の代謝で KF による酵素活性の抑制がみられた。

(4) KFによる *Pg* の代謝阻害を介した増殖抑制効果と歯周病予防薬への展望

以上の研究から KF によって *Pg* の代謝が特異的に阻害され、その結果、*Pg* の増殖を抑制することが明らかになった。これまで齶蝕予防を目的に使用されていた KF を応用し、歯周病予防に使用できる可能性が示された。

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 Wicaksono Dimas Prasetianto, Washio Jumpei, Abiko Yuki, Domon Hitomi, Takahashi Nobuhiro	4. 巻 86
2. 論文標題 Nitrite Production from Nitrate and Its Link with Lactate Metabolism in Oral Veillonella spp.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01255-20	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土門ひと美 鷲尾純平 安彦友希 川嶋順子 高橋信博
2. 発表標題 フッ化物による歯周病関連菌Porphyromonas gingivalisの増殖・代謝の抑制効果
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------