

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10426

研究課題名（和文）オーラルフローラを調節する新日和見感染予防薬の検索 唾液中の蛋白質に着目して

研究課題名（英文）Search for new preventive medicine by regulating oral flora to treat opportunistic infections - Focus on proteins in saliva

研究代表者

福井 佳代子（真柄佳代子）（FUKUI-Magara, Kayoko）

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：10181611

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）：オーラルフローラを調節することで、カンジダ菌増殖を抑制し健康寿命を延伸することを目的とし、唾液中タンパク質等の抗真菌作用を調査した。唾液中タンパク質であるシスタチンS、ラクtofフェリン、ムチンを培地上で調査し、カンジダ菌への抗真菌作用が認められた。また、健康人の唾液を調査した結果、シスタチンSとパペイン阻害に相関関係が認められた。パペイン阻害とタンパク質濃度の相関関係も認められ、タンパク質濃度が上昇すればパペイン阻害も上昇する。詳細に唾液タンパク質を調べていくことで各々のタンパク質が唾液検査の指標や薬となり、オーダーメイドの歯科保健指導や高齢者の口腔衛生状態の改善につながる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔カンジダ症は、口腔内感染症の中ではう蝕・歯周病に次いで3番目に多い疾患である。高齢者は、口腔内カンジダ菌の誤嚥などにより、肺炎や全身カンジダ症を引き起こす場合がある。今回の研究で、唾液中タンパク質であるシスタチンS、ラクtofフェリン、ムチンのカンジダ菌への抗真菌作用が明らかとなった。唾液中タンパク質の抗真菌作用でカンジダ菌を抑制し、死亡要因第4位の肺炎を予防することは、健康寿命の延伸に大きく貢献すると考えられる。一方、抗菌薬の乱用などによる薬剤耐性が現在問題となっている。今回の研究で唾液中タンパク質の抗真菌作用が認められ、既存薬とは系列の異なる新薬開発が可能となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to reduce Candida growth and extend healthy life expectancy by regulating the oral flora. The antifungal activity of some salivary proteins was investigated. Among the salivary proteins examined, cystatin S, lactoferrin, and mucin revealed antifungal effects on Candida using a microbroth dilution method.

Examination of salivary proteins focusing on the inhibition of proteolytic enzyme activity in healthy individuals revealed the positive correlations between papain inhibition activity and cystatin S expression, and between papain inhibition activity and salivary protein concentration. The detailed studies on salivary proteins may lead to the discovery of specific proteins that are useful as indices for saliva testing or as antibiotic or antifungal compounds. Furthermore, the results may provide individualized dental health guidance and an improved oral hygiene in the elderly.

研究分野：薬理学

キーワード：Candida シスタチン システインプロテアーゼインヒビター 薬剤耐性 CDR1 ラクtofフェリン オーラルフローラ ムチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において健康寿命の延伸は重要な課題である。高齢者のほとんどが基礎疾患があり、また口腔衛生状態が不良なため、日和見感染菌であるカンジダ菌が増殖しやすくなり、誤嚥性肺炎を引き起こす。口腔内のカンジダ菌保菌率は高齢者では 64%との報告もあり、この保菌率は非常に高く、カンジダ症感染を引き起こす前に予防する必要がある。今回着目した唾液中タンパク質シスタチン S は、cysteine protease inhibitor 活性を持ち、*Porphyromonas gingivalis* など、歯周病原細菌に抗菌作用がある。しかし抗真菌作用については明らかにされていない。

2. 研究の目的

カンジダ菌による深在性真菌症が発症すると、細菌感染に比較して真菌感染に使用できる薬の種類や数は限られており、その治療が非常に困難となる。そこで、本研究で唾液中タンパク質の働きが明らかになれば、これらの病原性真菌に起因する日和見感染症の発症予防と治療薬の新たな開発へと発展が望める。唾液中タンパク質シスタチン S は歯周病細菌に抗菌活性があると言われるが、抗真菌活性については不明なので明らかにする。

本研究の目的は、カンジダ菌に抗菌力を示す唾液中タンパク質を見出し、関連物質の抗真菌作用を確認し、口腔カンジダ症予防薬として、新たに臨床応用することである。また、近年薬剤耐性が問題となり注視されている。抗真菌薬の耐性を解除する薬物を探索する。

3. 研究の方法

(1)唾液中タンパク質と *Candida* 保菌との関連性(ELISA)

唾液中のタンパク質(ラクトフェリン、ヒスタチン、ディフェンシン、IgA など)濃度は、ELISA キットを用いた吸光度測定により算定し、カンジダ保菌との関連性を調べた。また、唾液中シスタチン S の cysteine protease inhibitor 活性を Barret らに準じてパパイン阻害率から測定し、カンジダ保菌との関連性を調べた。

(2)*C.al* 増殖抑制とタンパク質の関与(微量液体希釈法)

Candida albicans 40009 (標準株)は前培養し、peptone + yeast extract + glucose 液体培地(PYG)を用いてタンパク質関連物質を混合し、微量液体希釈法により抗真菌効果を評価・検討した。シスタチン S の類似物質についても同様に調査した。

(3)薬剤耐性解除作用の探索

薬剤排出に関連する主要な 7 個のトランスポーター遺伝子を欠損したパン酵母(親株)と親株の染色体に *C. albicans* の ATP - Binding Cassette Transporter 遺伝子 *Cdr1* を組み込み高発現させた耐性株を用いて、フルコナゾール(FLCZ)耐性に対する耐性解除作用を調べるため、微量液体希釈法において培養後、吸光度を測定した。唾液中タンパク質の薬剤耐性解除作用を確認した。

(4)健常人の唾液を採取し、電気泳動後、銀染色を行った。また、抗シスタチン S 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。シスタチン S、パパイン阻害活性、唾液タンパク質濃度等を測定し、相関関係などを統計学的に検討した。

4. 研究成果

(1)若年健常者の約 25%の人にカンジダ保菌を検出した。さらに同保菌群と無保菌群で唾液中の様々なタンパク質濃度を調査した結果、唾液中タンパク質シスタチン S がカンジダ保菌群で有意に低いことを確認し、シスタチン S とカンジダ保菌の関連性が明らかになった。

(2)唾液中タンパク質であるシスタチン S、ラクトフェリン、ムチンを各々 *Candida albicans* 40009 培地上で調査した結果、濃度依存的にカンジダ菌への抗真菌作用が認められた。(図 1-3)

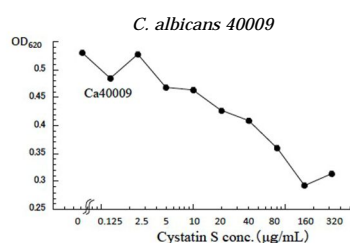


図 1. シスタチン S の抗真菌作用

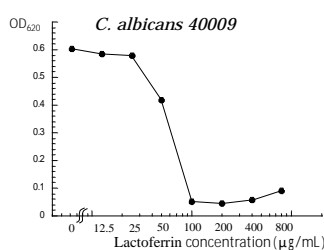


図 2. ラクトフェリンの抗真菌作用

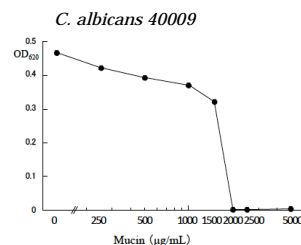


図 3. ムチンの抗真菌作用

シスタチン S は非常に高価なため、類似物質である卵白シスタチン、シスタチン C、ロイペプシンなどを調べたが、同様の抗真菌作用は認められなかった。

これらの実験結果から、シスタチン S の抗真菌作用を示す動物実験用の量が高額となるため購入できないことや、SPF の動物施設での新型コロナ感染を危惧することから動物実験は行わなかった。

(3)シスタチン S 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と FLCZ 併用では、親株の成長抑制曲線を左下にシフトし、FLCZ 単独よりも抑制効果を示した。(図 4)しかし、耐性株においては抑制効果を示さなかった。(図 5)シスタチン S の薬剤(FLCZ)耐性解除作用は認められず、作用機序は薬剤耐性排出ポンプ Cdr1p に関与しない抗真菌作用を示すことが分かった。

ムチンの薬剤(FLCZ)耐性解除作用は認められず、作用機序は薬剤耐性排出ポンプ Cdr1p に関与しない抗真菌作用を示すことが分かった。(図 6.7)

ラクトフェリン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と FLCZ 併用で、耐性株の成長抑制曲線を左下にシフトし、FLCZ 単独よりも抑制効果を示した。(図 9)一方、親株では左側へのわずかなシフトが検出された。(図 8)また、ラクトフェリン 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 併用では、FLCZ 濃度に関係なく親株と耐性株の両方を強く阻害した。ラクトフェリンに薬剤(FLCZ)耐性解除作用が認められ、薬剤耐性排出ポンプへの関与が示された。

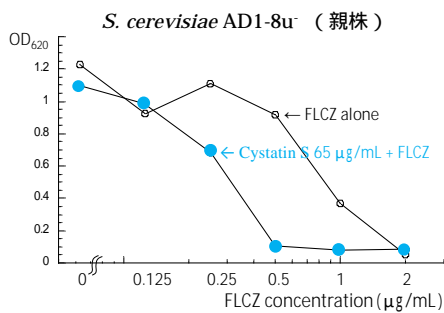


図 4. 親株でのシスタチン S の FLCZ 耐性抑制

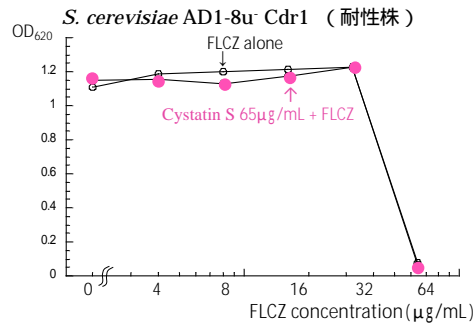


図 5. 耐性株でのシスタチン S の FLCZ 耐性抑制

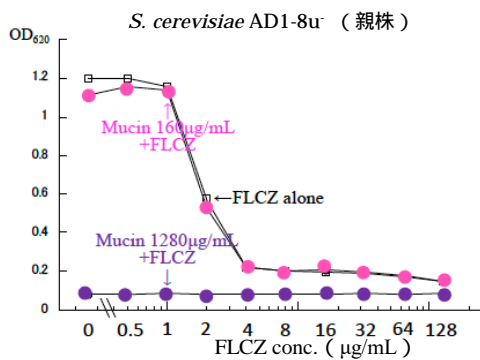


図 6. 親株でのムチンの FLCZ 耐性抑制

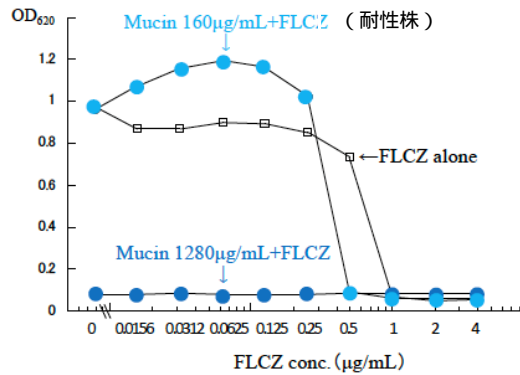


図 7. 耐性株でのムチンの FLCZ 耐性抑制

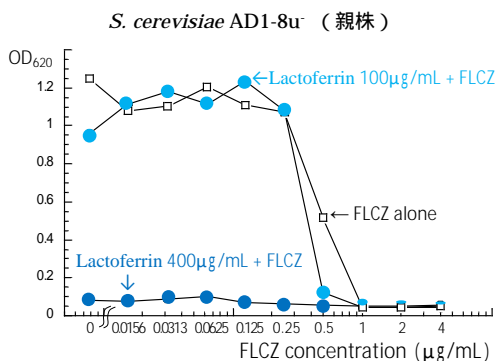


図 8. 親株でのラクトフェリンの FLCZ 耐性抑制

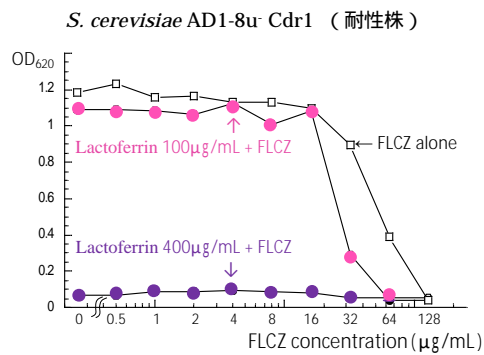


図 9. 耐性株でのラクトフェリンの FLCZ 耐性抑制

(4)健常人の唾液を電気泳動し銀染色した結果、それぞれの唾液タンパク質の個人による相違を確認できた(図 10)。ウエスタンブロッティングにおいてシスタチン S のバンドの太さや濃さは個々に違いがみられた(図 11)。

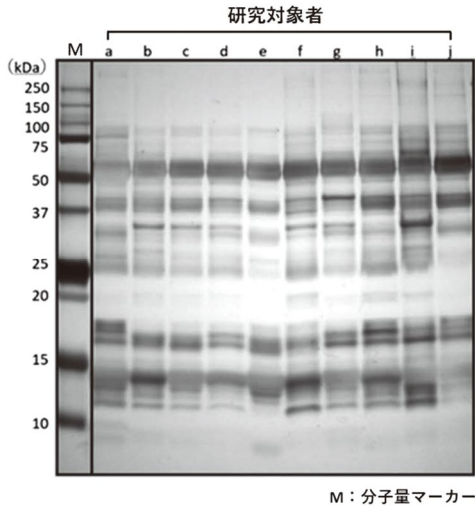


図 10. 唾液タンパク質の銀染色

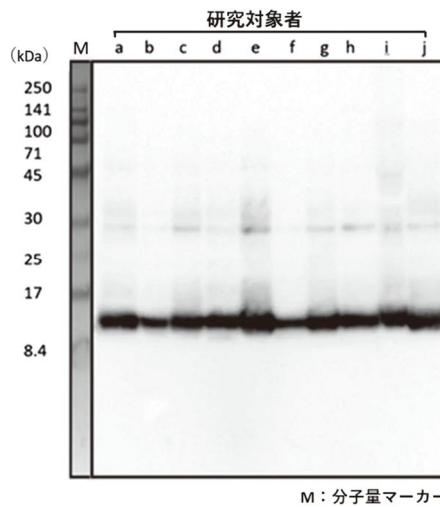


図 11. シスタチン S のウエスタンブロットイン

シスタチン S とパパイン阻害に相関関係が認められ、パパイン阻害剤の主な対象がシスタチン S であることを示唆した (図 12)。パパイン阻害とタンパク質濃度の相関関係も認められ、タンパク質濃度が上昇すればパパイン阻害も上昇する (図 13)。

詳細に唾液タンパク質を調べていくことで各々のタンパク質が唾液検査の指標や薬となり、オーダーメイドの歯科保健指導や高齢者の口腔衛生状態の改善につながる可能性が示された¹⁾。

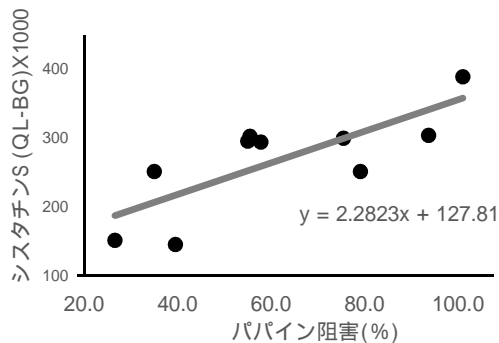


図 12. シスタチン S とパパイン阻害

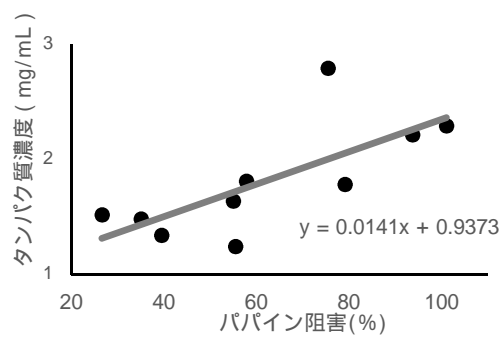


図 13. パパイン阻害とタンパク質濃度

これらの結果より、既存の薬とは系列の異なる唾液中タンパク質、シスタチン S、ラクトフェリン、ムチンなどでカンジダ菌などの口腔内細菌を予防すれば、そこから波及する誤嚥性肺炎などの発症を抑え、寿命の延伸に貢献できると考えられる。

< 引用文献 >

相模結里恵, 福井佳代子, 今井あかね: 口腔内保護作用と唾液タンパク質およびシスタチン S との相関性について 唾液検査としての可能性, 日本口腔保健学雑誌, 11(1): 23-31, 2021

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 2件）

1. 著者名 Fukui K, Nakamura K, Kuwashima H, Majima T	4. 巻 107
2. 論文標題 White-to-opaque switching is involved in the phospholipase B production of <i>Candida dubliniensis</i> on Price's egg yolk agar.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 174 - 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-018-0382-1	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 相模 結里恵、福井 佳代子、今井 あかね	4. 巻 11
2. 論文標題 口腔内保護作用と唾液タンパク質およびシスタチンSとの相関性について - 唾液検査としての可能性 -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔保健学雑誌	6. 最初と最後の頁 23 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32303/jnohs.11.1_23	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福井佳代子, 原 基, 二宮一智, 桑島治博, 今井あかね, 仲村健二郎
2. 発表標題 唾液中タンパク質の働きーラクトフェリン, シスタチン S の抗真菌作用に着目してー
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二宮一智, 片桐浩樹, 原 基, 福井佳代子, 桑島治博, 羽下-辻村麻衣子, 中原賢, 仲村健二郎
2. 発表標題 口腔粘膜炎を併発した口腔カンジダ症モデルマウスにおける真菌血症の予防法に関する研究
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井佳代子, 原 基, 二宮一智, 桑島治博, 馬島敏郎, 仲村健二郎
2. 発表標題 Candida albicansのフルコナゾール薬剤耐性解除薬の探索
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井佳代子, 仲村健二郎, 桑島治博, 原基, 馬島敏郎
2. 発表標題 Candida albicansのフルコナゾール耐性に影響を及ぼす薬物の検索
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲村健二郎, 福井佳代子, 桑島治博, 原基, 馬島敏郎
2. 発表標題 Candida dubliniensisのPrice培地におけるphospholipase B産生に及ぼすペプトンの効果.
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukui K, Hara H, Kuwashima H, Imai A, Nakamura K
2. 発表標題 Exploration of effective inhibitors for drug efflux pump Cdr1p to avert fluconazole resistance in Candida albicans.
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

1. 発表者名 Fukui K, Nakamura K, Hara H, Ninomiya K, Kuwashima H, Imai A
2. 発表標題 Antifungal and drug resistance reverser effects of saliva protein
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井佳代子, 仲村健二郎, 原 基, 二宮一智, 桑島治博, 馬島敏郎, 田中 彰
2. 発表標題 ヒノキチオール含有口腔ケア用ジェル(ヒノール)の抗真菌作用 フルコナゾールと比較してー
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井佳代子, 相模結里恵, 今井あかね
2. 発表標題 刺激全唾液におけるシステインプロテアーゼ阻害活性とシスタチンS発現について
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本歯科大学 新潟生命歯学部
www.ngt.ndu.ac.jp

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	仲村 健二郎 (NAKAMURA Kenjiro) (00227894)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	桑島 治博 (KUWASHIMA Haruhiro) (80139310)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授 (32667)	
研究分担者	今井 あかね (IMAI Akane) (60180080)	日本歯科大学新潟短期大学・その他部局等・教授 (43107)	

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