

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22705

研究課題名(和文) Therapeutic biofilmによる歯周病・根面う蝕治療アプローチの転換

研究課題名(英文) Therapeutic biofilm as a new approach to the treatment of periodontal disease and root caries

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は『Therapeutic biofilmの作為的形成』により、歯周病および根面う蝕の発症・進行の制御に挑戦する課題である。ナノメディスンを初期バイオフィルムに同化させることで、Symbiosis環境(為害性の少ない細菌叢)を作るTherapeutic biofilmの概念を創生できるかについて探索を行った。初期定着菌であるS. mitisについて、リポナノカプセルを含有したバイオフィルム作製の条件が明らかとなり、Therapeutic biofilm創製の可能性が示された。またカプセルの分解速度の測定から、菌の増殖やバイオフィルムの成熟に応じて分解が誘導される環境応答性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病やう蝕の原因となる細菌プラークはバイオフィルムとして薬剤の浸透に抵抗性を持つため、治療は定期的リコールにおける機械的除去が主たる方法である。しかしその有効性には更なる改善の余地が大きい。本研究では、歯周・う蝕治療の基本概念である『バイオフィルムの徹底排除』から『Therapeutic biofilmの作為的形成』へと発想転換しその創製を検討したことから、高い学術的新規性を有する。本研究の成果は歯の機能的保存に有効な新規の歯周病・根面う蝕予防法の創出につながる。平均残存歯数の増加に伴い、次なる歯科学の課題は歯周病および根面う蝕への対応であることから、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study is a challenge to control the onset and progression of periodontal disease and root caries by "artificial formation of therapeutic biofilm". We explored the possibility of creating the concept of a therapeutic biofilm by assimilating nanomedicines into the initial biofilm to create a symbiosis environment (less harmful bacterial flora). The conditions for the production of S. mitis biofilm containing liponanocapsules were clarified, indicating the possibility of creating a therapeutic biofilm. The degradation rate of the capsules was measured, suggesting the environmentally responsive degradation of the capsules, induced by the growth of the bacteria and the maturation of the biofilm.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周治療学 バイオフィルム ナノカプセル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平均残存歯数の増加に伴い、次なる歯科学の課題として歯周病および根面う蝕への対応が歯科疾患実態調査結果にも明記されている。一方で、抗菌薬の使用制限が国策として決まり、既存の抗菌薬によるバイオフィーム形成阻止が実用化困難となりつつある。本研究では、歯周・う蝕治療の基本概念である『バイオフィームの徹底排除』から『Therapeutic biofilmの作為的形成』へと発想転換することにより、両疾病の発症・進行の制御に挑戦する。

歯周病やう蝕の原因となる細菌プラークはバイオフィームとして薬剤の浸透に抵抗性を持つため、治療においては定期的リコールにおける機械的除去が主たる方法である。しかしセルフケア困難な部位のバイオフィームの形成阻害は事実上不可能であり、リコール期間中にも歯周炎の急性発作と病状進行および根面う蝕の発症を示す患者が多いことから、スタンダード治療としての有効性には更なる改善の余地が大きい。

バイオフィームの形成過程において、初期には無害な口腔常在菌が付着するが、その後歯周病やう蝕の原因菌が定着し病原性を有していく (Costerton JW *et al.*, Science 1999)。つまり、病原菌の定着前に、作為的に Therapeutic biofilm (歯周病・う蝕抵抗性を示すバイオフィーム) 形成を行い、持続的な Symbiosis 環境 (為害性の少ない細菌叢) をコントロールすることで歯の機能的保存につながる歯周病・根面う蝕予防法の創出が可能と考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

ナノカプセルと抗原特異性の高い新規抗菌ペプチドと融合させたナノメディスンを作製し、これを初期バイオフィームに同化させることで、Symbiosis 環境 (為害性の少ない細菌叢) が作れるか、を明らかにすることが目的である。Therapeutic biofilm の概念を創生できるかについて探索を行った。

3. 研究の方法

本研究は2か年の計画について遂行した。詳細方法を以下に記す。

(1) *In vitro* における Therapeutic biofilm の創製および機能評価

共同研究者 藤本 (慶應義塾大学) が作製したリン酸化キトサン被覆ナノカプセルを初期バイオフィーム定着菌 (*Streptococcus mitis*) に作用させ、バイオフィームを作成し、機能の評価を行う。また、歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) に対する増殖抑制・バイオフィーム抑制作用を検討する。

(2) ナノカプセルの徐放勾配の評価

上述の細菌との共培養条件下におけるナノカプセルの分解速度を評価する。蛍光物質内包カプセルを用いて、バイオフィームの存在環境に応じた徐放持続時間とその条件の探索を行う。

(3) 抗菌ペプチドの機能強化

カプセル内に内包する抗菌ペプチドについてコメ由来機能ペプチド (萌芽, 多部田, 2016 / Taniguchi M *et al.*, Pept Sci 2015) を用いるが、さらに機能を強化するため、アミノ酸置換によるカチオン性・疎水性の変化による抗菌活性等の機能強化を検討する。

4. 研究成果

(1) *In vitro* における Therapeutic biofilm の創製および機能評価

Therapeutic biofilm 創製をめざし、最初にカプセル含有バイオフィームの作製条件を検討することとした。ペプチド未内包のカプセルを使用し、バイオフィーム形成に与える影響を検討し

た。初期バイオフィルム定着菌である *S. mitis* ATCC903 1×10^8 CFU/mL を 96well plate にてカプセルと共培養し、48 時間後のバイオフィルム量をクリスタルバイオレット染色にて評価した。続いて、歯周病原細菌 *P. gingivalis* FDC381, *F. nucleatum* ATCC25586 それぞれ 1×10^8 CFU/mL を 96well plate に播種しバイオフィルム形成にナノカプセルが与える影響を評価した。

上記の結果からは、低濃度のカプセル添加群においては、いずれの菌に対してもバイオフィルム形成阻害や菌の増殖抑制は示されなかった。しかし、*S. mitis* のバイオフィルム形成が非常に高濃度のナノカプセルの添加によって抑制されることが示された。また、*P. gingivalis* はナノカプセル 590×10^9 個/mL、*F. nucleatum* はナノカプセル 148×10^9 個/mL にて有意にバイオフィルム形成量が減少した。すなわち、ペプチドを内包しない条件であっても、高濃度のナノカプセル添加によって口腔内細菌のバイオフィルム形成は阻害されることが示された。このバイオフィルム形成阻害は、カプセルによるバイオフィルムの付着抑制、菌どうしの凝集阻害などにより生じた可能性が示唆された。

本実験から、初期定着菌である *S. mitis* について、カプセルを含有したバイオフィルム作製の条件が明らかとなり、Therapeutic biofilm 創製の可能性が示された。

(2) ナノカプセルの徐放勾配の評価

上述の細菌との共培養条件下におけるナノカプセルの分解速度を評価するため、蛍光物質内包カプセルを用いて、バイオフィルムの存在環境に応じた徐放持続時間とその条件の探索を行った。この蛍光物質内包カプセルの製作にあたり、プレートリーダーならびに顕微鏡下での蛍光物質の測定、可視化のため、カプセルのサイズ並びに蛍光物質の内包量について調整が必要であった。

P. gingivalis との共培養を行うと、数時間以内にカプセルの分解が進む結果となった。そこで、PBS, MES, HEPES, BHI, GAM などの各種培地を用いてカプセル分解速度とその条件を検討した。その結果、PBS と比較して GAM 培地においてはカプセルの分解速度が 37 で約 7 日早まることが示された。また、4 と 37 での分解速度を比較すると、同培地条件下においても 37 では分解が数日早まることが明らかとなった。これらの結果から、カプセルの分解には温度や培地の組成が大きく影響することが示唆された。さらに菌由来の脂質や菌の増殖による pH の変化などがカプセルの分解を促進する可能性が示唆された。

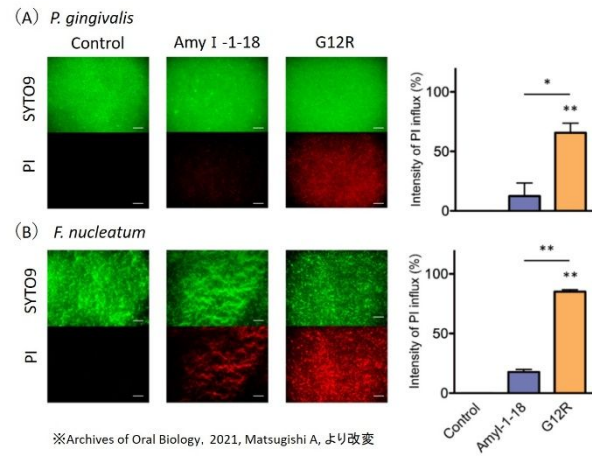
すなわち、菌の増殖やバイオフィルムの成熟に応じてカプセルの分解が誘導される環境応答性が上記カプセルの性質として期待できることが示された。しかしながら、菌との培養条件下においては分解が非常に早期に生じるため、現在、カプセルの安定性と歯面への接着性の向上ならびに環境応答性についてカプセルの調整を行っている。

(3) 抗菌ペプチドの機能強化

カプセル内に内包する抗菌ペプチドについて、コメ由来ペプチドの機能を強化するため、アミノ酸置換によるカチオン性・疎水性の変化による抗菌活性等の機能強化を検討した。

コメ由来の Amy -1-18 ペプチドおよびそのアミノ酸置換体について歯周病原細菌に対する抗菌活性を評価した。その結果、12 番目のアミノ酸をアルギニンに置換したペプチドにおいて、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* に対する抗菌活性の強化が示された。MIC および MBC を測定すると、Amy -1-18 ペプチドは *P. gingivalis* に対して静菌的に、*F. nucleatum* に対しては殺菌的に作用することが示された。一方、アミノ酸置換体はいずれの菌に対しても、Amy -1-18 ペプチドよりも強力な殺菌的作用を示した。また、propidium iodide 染色を用いて、各ペプチ

ドによる細胞膜傷害性を調べたところ、アミノ酸置換体投与群では、膜透過性の亢進が示された(右図)。コメ由来ペプチドのアミノ酸置換体は強いカチオン性を有する。アミノ酸置換により、静電的作用による歯周病原細菌に対する細胞膜傷害能が強化され、強い殺菌作用を示すことが示唆された。



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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsugishi Aoi, Aoki-Nonaka Yukari, Yokoji-Takeuchi Mai, Yamada-Hara Miki, Mikami Yoshikazu, Hayatsu Manabu, Terao Yutaka, Domon Hisanori, Taniguchi Masayuki, Takahashi Naoki, Yamazaki Kazuhisa, Tabeta Koichi	4. 巻 121
2. 論文標題 Rice peptide with amino acid substitution inhibits biofilm formation by <i>Porphyromonas gingivalis</i> and <i>Fusobacterium nucleatum</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104956 ~ 104956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.104956	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岸 葵, 野中由香莉, 竹内麻衣, 原 実生, 土門久哲, 寺尾 豊, 山崎和久, 多部田康一
2. 発表標題 コメ由来ペプチドのアミノ酸置換体による歯周病原細菌のバイオフィルム阻害作用の解析
3. 学会等名 令和2年度新潟歯学会第1回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岸 葵, 野中由香莉, 竹内麻衣, 原 実生, 早津 学, 三上剛和, 牛木辰男, 土門久哲, 山崎和久, 多部田康一
2. 発表標題 コメペプチドとそのアミノ酸置換体は <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> のバイオフィルム形成を阻害する
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

〔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	野中 由香莉 (Nonaka Yukari) (40710520)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	寺尾 豊 (Terao Yutaka) (50397717)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	藤本 啓二 (Fujimoto Keiji) (70229045)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授 (32612)	
研究分担者	高橋 直紀 (Takahashi Naoki) (80722842)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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