

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18502

研究課題名（和文）長期徐放型LDDS製剤としての抗菌ペプチド含有ナノメディシンの機能評価

研究課題名（英文）Analysis the effect of antimicrobial peptide-containing liponocapsules as the local drug delivery systems for periodontitis

研究代表者

佐藤 圭祐 (Sato, Keisuke)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80828905

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）：歯周病に対する既存のLDDS療法は、薬剤耐性菌の蔓延拡大や社会的ニーズの変化を受けて改善の必要に直面している。本研究はコメ由来抗菌ペプチド含有バイオナノカプセルを開発し、既存の抗菌薬に代わる長期徐放型LDDS製剤としての機能を評価することを目的とする。蛍光物質内包リポナノカプセルを用いて徐放勾配の評価を行ったところ、細菌の増殖やバイオフィルムの成熟に応じてカプセルの崩壊が誘導される環境応答性が示唆された。また、機能性ペプチドの機能強化について検討したところ、歯肉バリア機能に与える影響は少ないことが示唆された。今後はカプセルの安定性および環境応答性の向上のための調整が必要となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の問題や社会的ニーズの変化を受けて、より長期にわたり薬物が局所に停留し徐放性が維持されかつ狭域スペクトルで安全性が高い、新規の歯周病治療用LDDS製剤の開発が必要とされている。本研究は歯周病治療に有効な付加価値を有する狭域スペクトル抗菌ペプチドに対して、リポナノカプセルをナノキャリアとして使用することで、長期徐放型LDDS製剤を目指すところに学術的新規性を有する。また、本研究により歯周病治療に有効な新規ナノメディシンとしての臨床応用が可能となれば、高齢化や薬剤耐性菌の蔓延拡大といった現代社会が抱える問題解決の一助となることから、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The existing Local Drug Delivery System for periodontal disease necessary to improve because of the spread of Antimicrobial resistance and change of social needs by the aging society. This study is aiming for develop the bionanocapsule include the antibacterial peptide and assess the function as the LDDS preparation.

The degradation rate of the fluorescent substance internal liponocapsules were measured, suggesting the environmentally responsive degradation of the capsules, induced by the growth of the bacteria and the maturation of the biofilm. And it was suggested that antibacterial peptide have small effect for the gingival barrier function.

Further studies are needed that improve the capsules to take the stability and environment response.

研究分野：歯周病学

キーワード：ナノメディシン リポナノカプセル 抗菌ペプチド 歯周病 LDDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症である歯周病に対する補助的薬物療法としてのテトラサイクリン系抗菌薬を用いた既存の LDDS 療法は、薬剤耐性菌の蔓延拡大や高齢社会における社会的ニーズの変化を受けて改善の必要に直面している。すなわち、より長期にわたり薬物が局所に停留し徐放性が維持され、かつ狭域スペクトルで安全性が高い、新規の LDDS 製剤の開発が必要とされている。

これら現代の社会的ニーズ、歯周治療上の問題点に対応するため、我々の研究班では、既存の抗菌薬の機能を代替、補完しうる抗菌ペプチドに着目してきた。一般に抗菌ペプチドは低毒性、低耐性菌誘導といった安全面の特性に優れる (Zaslloff M et al. Nature. 2002)。中でも、コメアミラーゼ由来の 18 残基のアミノ酸配列からなる AmyI-1-18 ペプチドが、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対する抗菌活性を示し (Taniguchi M et al. Biopolymers. 2015)、バイオフィーム形成を抑制することを報告してきた (Matsugishi A et al. Arch Oral Biol. 2021)。また、AmyI-1-18 ペプチドが抗菌活性だけでなく抗炎症作用を有し、歯周病モデルマウスにおいて歯周組織破壊抑制効果を示すことを明らかとしており (Aoki-Nonaka Y et al. J Periodontol. 2018)、歯周治療に有効な付加価値を有する狭域スペクトル抗菌ペプチドとしての応用が期待される。

さらに、本研究においては、AmyI-1-18 ペプチドに LDDS に期待される徐放性と停留性を付与するため、リポナノカプセルの薬物ナノキャリアとしての応用を検討する。本研究で用いるリポナノカプセルは、生体適合性に優れるリン脂質二重膜から構成されるリボソームをテンプレートに、Layer-by-Layer によりバイオポリマーを相互積層化させており、ポリマー吸着により脂質膜の運動性を制御することで徐放性コントロールが可能となり、高い物質保持能を有する (Fujimoto K et al. Langmuir. 2009)。また、ポリマーチューニングによる歯根表面への付着能の獲得も想定されることから、AmyI-1-18 ペプチドのナノキャリアとして応用することで、その効果の強さと時間と場所を調整できる理想的な LDDS ナノメディシンを作製することが可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究は AmyI-1-18 ペプチドとリポナノカプセルからなるバイオナノカプセルについて、歯周治療における LDDS 製剤としての機能を評価し、臨床応用にむけた基礎的データを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リポナノカプセルの徐放勾配の評価

蛍光物質内包カプセルを用いて、歯周病原細菌との共培養条件下におけるリポナノカプセルの崩壊速度の評価とその条件の探索を行う。

(2) 機能性ペプチドの機能強化

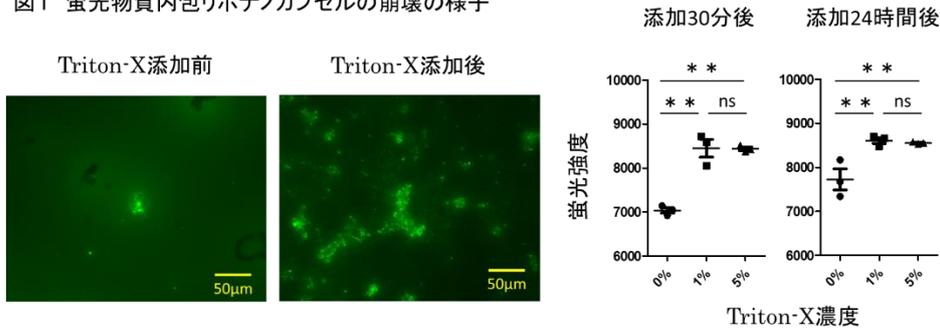
カプセルに内包する AmyI-1-18 ペプチドについて、抗菌活性・抗炎症作用に加わる歯周治療有効な新たな付加価値を見出すことを目的として、歯肉バリア機能に与える影響を *In vitro* にて検討する。

4. 研究成果

(1) ナノカプセルの徐放勾配の評価

歯周病原細菌との共培養条件下におけるリポナノカプセルの崩壊速度を評価するため、蛍光物質内包カプセルを用いて、徐放持続時間とその条件の探索を行った。蛍光物質内包カプセルの製作にあたり、位相差顕微鏡下でのカプセルの可視化およびマイクロプレートリーダーでの蛍光物質の測定のため、カプセルのサイズならびに内包蛍光物質の種類と量について調整が必要であった。結果として、顕微鏡下でカプセルの形状および界面活性剤 (Triton-X) 添加によるカプセルの崩壊を確認した。また、マイクロプレートリーダーにて蛍光物質の溶出を検出することでコントロールとしての条件設定を行った (図 1)。

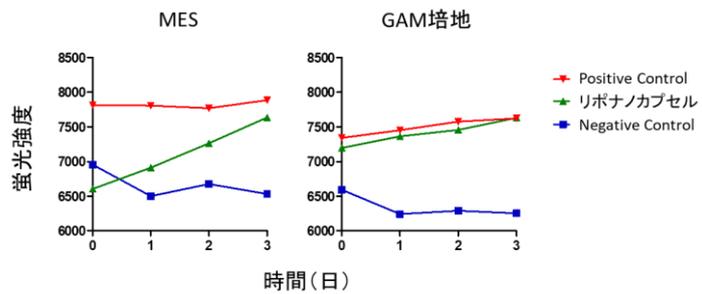
図1 蛍光物質内包リポナノカプセルの崩壊の様子



P. gingivalis とカプセルの共培養を行うと、カプセルが数時間以内の早期に崩壊する結果となった。そこで、カプセルの保存に使用している MES、菌周病原細菌の培養に使用する GAM 培地を用いてカプセルの崩壊速度とその条件を検討した。その結果、4℃と 37℃での温度条件の違いがカプセルの崩壊速度に与える影響は少ないが、MES と比較して GAM 培地においてカプセルの崩壊が早まることが示された (図 2)。

これらの結果から、カプセルの崩壊には培地の組成が大きく影響することが示唆された。さらに、細菌由来の脂質や菌の増殖による pH の変化などの条件がカプセルの崩壊を促進する可能性が示唆された。すなわち、菌の成熟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、細菌培養条件下においては崩壊が非常に早期に生じるため、現在カプセルの安定性および環境応答性の向上についての調整を行っている。

図2 リポナノカプセルの崩壊速度の検証

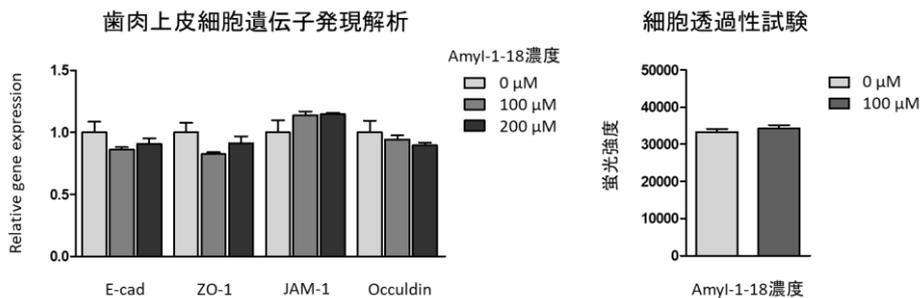


(2) 機能性ペプチドの機能強化

カプセルに内包する AmyI-1-18 ペプチドについて、歯肉バリア機能に与える影響を検討とすることを目的とし歯肉上皮細胞の遺伝子発現解析・細胞透過性試験を行った。

その結果、AmyI-1-18 ペプチドの添加による歯肉上皮細胞のバリア関連遺伝子発現に変動は認められなかった。また、細胞透過性試験においても AmyI-1-18 ペプチド添加により歯肉上皮細胞の透過性に変動は認められなかった (図 3)。

図3 AmyI-1-18ペプチドが歯肉バリア機能に与える影響の解析



以上の結果から、AmyI-1-18 ペプチドが歯肉バリア機能に与える影響は少ない可能性が示唆された。しかし、コメ由来抗菌ペプチドの創傷治癒促進作用についてはこれまでに報告があることから (Taniguchi M et al. J Biosci Bioeng. 2019)、歯周病の予防的な効果よりは治療後の治癒促進に影響する可能性が考えられる。

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 Sato Keisuke, Yamazaki Kyoko, Kato Tamotsu, Nakanishi Yumiko, Tsuzuno Takahiro, Yokoji-Takeuchi Mai, Yamada-Hara Miki, Miura Nobuaki, Okuda Shujiro, Ohno Hiroshi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Obesity-Related Gut Microbiota Aggravates Alveolar Bone Destruction in Experimental Periodontitis through Elevation of Uric Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00771-21	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 Yamazaki Kyoko, Kato Tamotsu, Tsuboi Yuuri, Miyauchi Eiji, Suda Wataru, Sato Keisuke, Nakajima Mayuka, Yokoji-Takeuchi Mai, Yamada-Hara Miki, Tsuzuno Takahiro, Matsugishi Aoi, Takahashi Naoki, Tabeta Koichi, Miura Nobuaki, Okuda Shujiro, Kikuchi Jun, Ohno Hiroshi, Yamazaki Kazuhisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Oral Pathobiont-Induced Changes in Gut Microbiota Aggravate the Pathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.766170	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎恭子、佐藤圭祐、都野隆博、山崎和久
2. 発表標題 Germ-free環境における歯周病原細菌群と口腔共生細菌群経口投与が全身に与える影響の比較
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～2021年

1. 発表者名 山崎恭子、佐藤圭祐、都野隆博、山崎和久
2. 発表標題 Germ-free環境における歯周病原細菌群と口腔共生細菌群経口投与による全身への影響の解析
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～2021年

1. 発表者名 山崎恭子、中島麻由佳、竹内麻衣、原実生、都野隆博、松岸葵、松川由実、佐藤圭祐、高橋直紀、多部田康一、山崎和久
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis経口投与は腸内細菌の変化を介してNAFLD病態に影響を与える
3. 学会等名 令和2年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山崎恭子、中島麻由佳、竹内麻衣、原実生、都野隆博、松岸葵、松川由実、佐藤圭祐、高橋直紀、多部田康一、坪井裕理、菊池淳、加藤完、大野博司、山崎和久
2. 発表標題 腸内細菌叢の変動を介した歯周病のNAFLDへの影響
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------