

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09913

研究課題名（和文）ジペプチジルペプチダーゼを標的とした新規歯周病医薬開発

研究課題名（英文）Development of a novel drug of periodontitis targeting dipeptidyl peptidase

研究代表者

野中 由香莉（Yukari, Nonaka）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：40710520

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）：本研究において、歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisの生育に重要なジペプチジルペプチダーゼ（DPP）を標的としたDPP阻害剤を開発した（特願2022-110510）。DPP阻害剤はP. gingivalisに対して強い抗菌活性を示し、バイオフィルム形成を阻害した。歯周炎モデルマウスにおいて、DPP阻害剤の投与により歯槽骨吸収は有意に抑制された。新たに開発したDPP阻害剤が、P. gingivalis特異的な抗菌活性により歯周病を抑制する治療薬とな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

歯周病は世界で最も罹患率の高い細菌感染症であるが、原因となる細菌を特異的に除去または静菌する治療薬は未開発であったことから、本研究の成果は既存の歯周病学に新たな知見をもたらす。また、多剤耐性菌による死亡者数の増加に対する対応として、本研究の成果である歯周病原細菌に特異的な抗菌薬の開発は、既存抗菌薬の代替としてその使用削減と有効使用期間の延長につなが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）：In this study, we developed DPP inhibitors targeting dipeptidyl peptidase (DPP), which is important for the growth of the periodontopathogenic bacterium Porphyromonas gingivalis (JPN 2022-110510). DPP inhibitors showed strong antibacterial activity against P. gingivalis and inhibited biofilm formation. In a mouse model of periodontitis, alveolar bone resorption was significantly suppressed by DPP inhibitor administration. Our results suggest that the newly developed DPP inhibitor may be a therapeutic agent that inhibits periodontal disease through its P. gingivalis-specific antibacterial activity.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 ジペプチジルペプチダーゼ Porphyromonas gingivalis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

背景 1. 歯周治療の課題；

歯周病は世界で最も罹患率の高い細菌感染症であり、その治療アプローチとして検査に基づく抗菌療法が望まれるが、現在、細菌検査結果は予防・治療に十分に活用されておらず、その有用性は低い。これには検査に基づく特異的な抗菌療法を有さないこと、つまり、原因となる細菌を特異的に除去または静菌する狭域スペクトル薬剤が未開発であることが背景にあげられる。このため、*Porphyromonas gingivalis* は Keystone 細菌として代表的な歯周病原細菌とされるが、特異的に制することにより、歯周病の治癒・病状安定に至るかを検討するすべもなく、歯周病の発症・進行に關与する機序さえ未だ明確ではない。

背景 2. 薬剤耐性 (AMR: Antimicrobial Resistance) の課題；

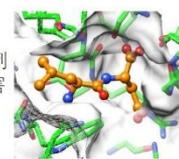
新規薬剤開発数が激減するなか多剤耐性菌による死亡者は年々増加し、2050年には1000万人に達するとされる。AMR 増加への対応は喫緊の課題であり、現在進行する政策「AMR 対策アクションプラン 2016年(国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議)」は既存抗菌薬の使用削減に加えて、新規狭域スペクトル抗菌薬の開発を強く求めている。歯科医療においてもその責任を負い、歯周治療においても既存抗菌療法の代替薬剤として新規狭域スペクトル薬剤の開発が急務と考える。

背景 3. ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 阻害剤の開発；

代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* は糖非発酵性グラム陰性細菌であり、アミノ酸を栄養源とすることを特徴とする。DPP は細菌のペリプラズムに局在し、オリゴペプチドをジペプチドへと分解するエキソペプチダーゼであり、DPP を欠損した細菌株ではアミノ酸の代謝ができず、菌の増殖が抑制されることが報告されている。すなわち、*P. gingivalis* DPP に対して選択的に結合する阻害剤は、*P. gingivalis* 特異的に菌の生育を抑制する抗菌薬となる可能性があり、共同研究者である田中らは *P. gingivalis* DPP の立体構造をもとに、in silico スクリーニングによる DPP 阻害剤の設計・開発を行ってきた(図1, Sakamoto Y, Sci Rep. 2019, 基盤研究(B)田中 19H02876)。本課題では、DPP 阻害剤を用いて、既存抗菌薬に代替する新しい作用機序であるアミノ酸代謝阻害作用を有し、代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* を特異的に抑制する歯周病医薬開発を目指す(図2)。

図1 in silicoスクリーニングによる阻害剤設計

右) *P. gingivalis* DPP11の立体構造に基づいた設計シミュレーションの例
→活性部位を特異的に阻害



共同研究者：
北里大学 田中信忠先生
神戸学院大学 日高興士先生
若手医科大学 阪本泰光先生

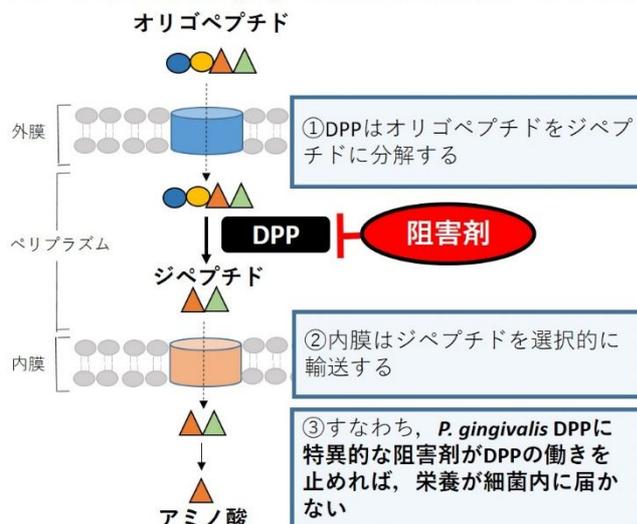
2. 研究の目的

本研究は DPP 阻害剤の歯周病抑制の効果とメカニズムを *in vitro* および *in vivo* の両面から明らかとし、候補となる化合物群の中から臨床応用に最適な阻害剤を決定することを目的とした、狭域スペクトル歯周病医薬の開発を目指す基盤研究である。

3. 研究の方法

本研究では候補となる複数の DPP 阻害剤について、*P. gingivalis* に対する抗菌活性の特異性を明らかにする

図2 DPP阻害剤は*P. gingivalis*特異的な抗菌薬となりうる



とともに、その細胞為害性について検討し、歯周病を効果的に抑制する狭域スペクトル抗菌薬として臨床応用に最適な化合物を選定する。さらに実験的歯周病モデルマウスにて歯周組織破壊抑制作用を明らかとし、DPP 阻害剤の臨床的有効性を検討する。

(1). DPP阻害剤の細菌特異的抗菌活性の評価

各 DPP 阻害剤の抗菌活性について、*P. gingivalis* に対する特異性を明らかにするため、口腔内常在菌である *Streptococcus mitis*、代表的な歯周病原細菌である *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* に対する最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) を微量液体希釈法および平板培養法において評価する。

(2). バイオフィーム抑制能の評価

口腔内において細菌はバイオフィームを形成するため、DPP 阻害剤によるバイオフィームの形成阻害および、成熟したバイオフィームに対する除去作用を Crystal violet 法にて評価する。

(3). 細胞為害性の評価

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 を用い、各阻害剤により 24 時間刺激した後、MTT アッセイにて細胞為害性を検討する。

(4). *in vivo*における歯周病抑制作用の評価

上顎第二臼歯に絹糸を結紮し *P. gingivalis* を経口感染させた歯周病モデルマウスにおいて、DPP 阻害剤の歯周病抑制作用を明らかにする。9 週齢の C57BL/6N マウスに、 10^9 CFU の *P. gingivalis* を 1 日 1 回投与する。飲水に混入した各 DPP 阻害剤を 7 日間投与し、歯槽骨吸収の進行抑制作用を評価する。比較対象として、アジスロマイシンを広域スペクトル抗菌薬として用い、*P. gingivalis* 特異的な DPP 阻害剤の有効性を検討する。歯周組織破壊についての評価項目として、顎骨サンプルにおける骨吸収度の測定を行う。

4 . 研究成果

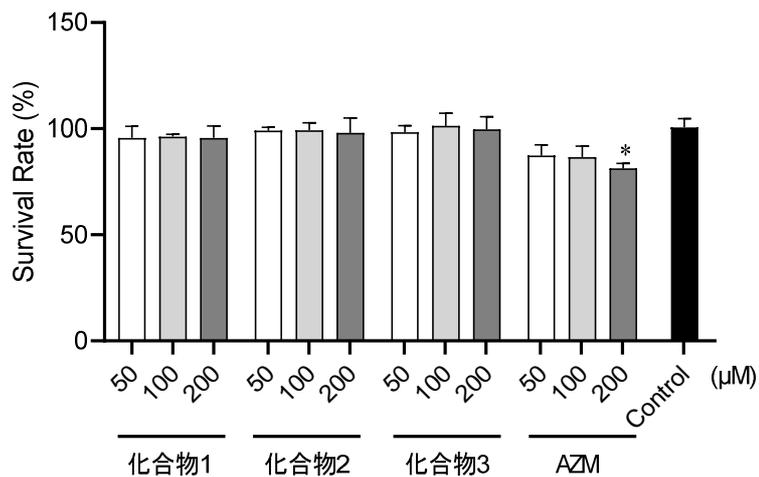
まず我々は、*P. gingivalis* の DPP 構造をもとに阻害剤の設計を行い、抗菌性ジペプチド化合物を開発した (特願 2022-110510)。

これらの阻害剤の歯周病原細菌に対する抗菌活性を最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) を指標として評価したところ、一部の DPP 阻害剤は *P. gingivalis* に対して強い抗菌活性を示す一方、*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. mitis* に対しては抗菌活性を示さず、*P. gingivalis* 特異的な抗菌活性が示された (下図)。

MIC (μM)	化合物 1	化合物 2	化合物 3	AZM
<i>P. gingivalis</i>	12.5	1.56	1.56	0.39
<i>F. nucleatum</i>	>200	>200	>200	0.39
<i>P. intermedia</i>	100	>200	>200	0.1
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	>200	>200	>200	0.39
<i>S. mitis</i>	>200	>200	>200	0.1

P. gingivalis バイオフィルムに対する形成阻害作用はクリスタルバイオレット染色にて評価した。DPP 阻害剤は *P. gingivalis* バイオフィルム形成を阻害した。成熟バイオフィルムに対する除去作用は示さなかった。

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 を 10^5 cells/well にて 96 穴プレートに播種し、DMSO に溶解し最終濃度が 50- 200 μ M となるように調製した各化合物を添加した。コントロールには化合物を含まない DMSO を 0.2% 加え、この細胞生存率を 100% とした。各阻害剤により 24 時間刺激した後、MTT アッセイにて細胞為害性を検討したところ、DPP 阻害剤は 200 μ M においても細胞為害性を示さなかった（下図）。



次に、ここまでの実験結果から選択した阻害剤を用いて、歯周病モデルマウスにおける歯周病抑制効果について検討を行った。その結果、DPP 阻害剤の投与により歯槽骨吸収は有意に抑制された。また、口腔内における *P. gingivalis* 量が DPP 阻害剤投与によって有意に減少することが示された。以上の結果から、DPP 阻害剤が *P. gingivalis* 特異的な抗菌活性により歯周病を抑制することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minato Y, Aoki-Nonaka Y, Hiyoshi T, Matsugishi A, Hnin Yu Lwin, Ando D, Warita Y, Tabeta K
2. 発表標題 Allyl isothiocyanate inhibits alveolar bone loss in experimental periodontitis.
3. 学会等名 The 102nd International Association for Dental Research General Session. (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 湊裕佳子, 野中由香莉, 日吉 巧, 松岸 葵, Hnin Yu Lwin, 多部田康一
2. 発表標題 歯周病原細菌LPS由来炎症応答に対するアリルイソチオシアネートの抑制作用
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湊裕佳子, 野中由香莉, 日吉 巧, 松岸 葵, Hnin Yu Lwin, 安藤大樹, 割田悠子, 多部田康一
2. 発表標題 アリルイソチオシアネートは歯周炎マウスモデルにおいて歯槽骨吸収を抑制する
3. 学会等名 第159回日本歯科保存学会2023年度秋季学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湊裕佳子, 野中由香莉, 日高興士, 阪本泰光, 松岸葵, 日吉巧, Hnin Yu Lwin, 安藤大樹, 割田悠子, 多部田康一
2. 発表標題 ジペプチジルペプチダーゼ阻害薬による歯周病抑制効果の検討
3. 学会等名 第67回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hnin Yu Lwin, 野中由香莉, 松岸 葵, 日吉 巧, 湊裕佳子, 多部田康一
2. 発表標題 Ferulic acid inhibits the biofilm formation of Porphyromonas gingivalis
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hnin Yu Lwin, 野中由香莉, 松岸 葵, 日吉 巧, 湊裕佳子, 多部田康一
2. 発表標題 フェルラ酸の歯周病原細菌に対する抗菌活性の検討
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会2022年度春季学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗菌性ジペプチド化合物	発明者 日高興士, 野中由香莉, 多部田康一, 阪本泰光, 關谷瑞樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-110510	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	日高 興士 (Hidaka Koushi) (30445960)	神戸大学・保健学研究科・保健学研究員 (14501)	
研究分担者	田中 信忠 (Tanaka Nobutada) (00286866)	北里大学・薬学部・教授 (32607)	

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	多部田 康一 (Tabeta Koichi) (20401763)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

	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	阪本 泰光 (Sakamoto Yasumitsu)	岩手医科大学 (31201)	
研究協力者	六本木 沙織 (Roppongi Saori)	岩手医科大学 (31201)	
研究協力者	關谷 瑞樹 (Sekiya Mizuki)	岩手医科大学 (31201)	
研究協力者	中村 彰宏 (Nakamura Akihiro)	長岡技術科学大学 (13102)	

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