

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659912

研究課題名(和文)若年性歯周炎原因菌に対するアンチセンス法を用いた分子標的治療の開発

研究課題名(英文)Development of anti-leukotoxin expression reagent from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by using antisense peptide nucleic acids.

研究代表者

星野 倫範 (HOSHINO, Tomonori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：00359960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 侵襲性歯周炎の原因菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa菌) が産生する外毒素ロイコトキシンをコードする遺伝子 *lktA* の発現を PNA (peptide nucleic acids) を用いたアンチセンス法で抑制できるかを検討した。

膜透過型ペプチドとして (KFF)3- と *lktA* 遺伝子の開始コドンから 12 塩基目までのアンチセンス配列をもつ PNA を作製した。これを Aa 菌に作用させ、*lktA* 遺伝子の mRNA の発現量を測定し、 3×10^8 cfu の菌量に対しては 20 μ M のアンチセンス PNA を反応させた時最も *lktA* 遺伝子の発現を抑制することができた。

研究成果の概要(英文)： We investigated whether the mRNA expression of *lktA* gene from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, the causative bacteria of aggressive periodontitis, was suppressed by antisense peptide nucleic acids (PNA).

Antisense PNA, which has antisense sequence from initiation codon to 12th base of *lktA* gene, was composed and conjugated (KFF)3 as a cell penetrating peptides. 0 to 50 μ M of antisense PNA was reacted to 3×10^8 cfu of *A. actinomycetemcomitans* at 37 °C in 5% CO₂ for 1hrs and the mRNA expression of *lktA* gene was measured by real-time RT-PCR. As the result, 20 μ M of antisense PNA could most inhibit among the concentration.

研究分野：小児歯科学

キーワード：若年性歯周炎 *A. actinomycetemcomitans* アンチセンス PNA 膜透過型ペプチド 細菌叢解析

1. 研究開始当初の背景

Good ら^①は、特定配列のペプチドを PNA に付加すると大腸菌細胞内への導入が可能であること、さらに *lacZ* 遺伝子に対し、開始コドン (ATG) の A からはじめて 7~15 番目までのアンチセンス PNA (T からはじまる 7~15mer) を作製し、大腸菌の *lacZ* 遺伝子におけるアンチセンス効果について実験を行ったところ、9~12mer の長さのアンチセンス PNA で十分なアンチセンス効果が得られることを報告している。そこで本研究では、大腸菌と同じグラム陰性の細菌で侵襲性歯周炎の原因菌といわれる *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の病原因子であるロイコトキシン PNA を細胞に導入し、遺伝子の発現抑制をした報告はないことから、これを応用し、抗歯周病薬として有効かどうかを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、若年性歯周炎 (現分類：侵襲性歯周炎) の原因菌といわれる *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa 菌) が産生する外毒素、ロイコトキシンをコードする遺伝子 *lktA* の発現を PNA (peptide nucleic acids) を用いたアンチセンス法で抑制できるかどうかを検討し、侵襲性歯周炎に対する治療薬として応用できるかを検討することである。

(1) Aa 菌のロイコトキシン産生抑制による若年性歯周炎の予防について：若年性歯周炎の病巣部から多く回収される Aa 菌は、莢膜や鞭毛がなく、運動性もない通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、外毒素であるロイコトキシンを産生し、ヒトの多形核白血球や単球に対して細胞毒性を示す。このロイコトキシンの細胞毒性により、Aa 菌は生体の免疫防御機構から回避することから、若年性歯周炎の原因菌といわれている。このことから、Aa 菌のロイコトキシンを産生することを抑制することができれば、ヒトの多形核白血球や単球が生体の免疫防御機構として働き、若年性歯周炎の増悪を防ぐことができると考えられる。

(2) PNA を用いたアンチセンス法による遺伝子の細菌の発現抑制について：遺伝子 (センス) と相補的な構造を有するアンチセンス分子は、例えばガン細胞の増殖を遺伝子レベルで制御することが理論的に可能なこと (アンチセンス法) から、新しい分子標的治療法として期待されている。アンチセンス法による遺伝子発現抑制は RNA 干渉が特に有名であるが、細菌に応用したという報告は殆どない。その理由は RNase によりこの手法の本体である RNA が分解するという問題点があるからである。これに代わる方法として、PNA を用いたアンチセンス法がある。PNA は骨格部分がペプチド鎖で構成され DNA 様構造を有する人工化合物で、天然に分解酵素が存在しないことから細菌に対しても有効である

ことが報告されている。これまで申請者は齶蝕や歯周病の原因菌に対するワクチンの開発に関する研究を行ってきたが、粘膜免疫を介した宿主応答に依存的な方法では効果を上げるのは困難であると考えている。その点、PNA によるアンチセンス法は標的分子に直接的に作用するので、ワクチンよりも効果が得やすいのではないかと考えている。また、ドラッグデリバリーの問題に関しても、対象が歯周病であるので、病変が存在する歯周ポケットに例えば軟膏のようなペースト状の薬剤でアプライすることができるので、実際の臨床応用に関しても実現性が高いのではないかと考える。

(3) PNA を用いたアンチセンス法による Aa 菌のロイコトキシン産生抑制：若年性歯周炎の原因菌である Aa 菌に関し、その病原因子やこれに対する宿主の免疫応答についての研究はこれまでに盛んに行われてきた。しかし、いわゆる歯周病は口腔歯周組織に局限したもので通常の全身感染症と同じように体液性免疫での免疫応答をたどらず、粘膜免疫によって宿主の免疫応答を引き起こさなければならないので、ワクチンの開発が困難である。そのため、歯周病の治療薬として実際に臨床応用されているのは、サイトカイン療法やエムドゲインなどの宿主の組織再生に関わるものが主流で、Aa 菌の毒素産生抑制作用を示すものはまだ実現されていない。そこで本研究では Aa 菌に毒素産生抑制作用を示す方法として、ワクチンのような宿主の免疫応答に依存した方法ではなく、PNA によるアンチセンス法という新規の手法により Aa 菌の外毒素であるロイコトキシンの産生抑制を図ることとした。この PNA を用いたアンチセンス法を歯科の領域で試みたという報告はまだないことから斬新であり、いまだに開発されていない Aa 菌を標的とした新規の抗歯周病薬の創薬開発につながるという点ではこれまでとは異なる領域の新しい研究であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 本研究に先立ち、侵襲性歯周炎における Aa 菌の感染状況を把握するために、ロイコトキシンの強産生株と通常株の検出定量系を確立するとともに、メタゲノム解析による Aa 菌の感染状況の調査を健常児、脳性麻痺患児を対象に行うとともに、乳幼児の口腔細菌叢の調査も行った。

(2) Aa 菌の *lktA* 遺伝子発現の比較 Δ CT 法による半定量解析を行うためのリアルタイム RT-PCR 法を確立した。また、供試する Aa 菌として通常株の Y4 株、ロイコトキシン強産生株の JP2 株の *lktA* 遺伝子の発現量の差をこの手法で比較した。

(3) Aa 菌 *lktA* 遺伝子に対するアンチセンス PNA の設計として、膜透過型ペプチドとしては、ペネトラシン (RQIKIWFQNRRMKWK)-、ノナルギニン (RRRRRRRR)-、(KFF)₃-を、ア

ンチセンス配列としては *lktA* 遺伝子の開始コドンのアデニンから 12塩基目までの配列のアンチセンス配列を採用して設計、作製した。これらの各種膜透過型ペプチドが付与されたアンチセンス PNA (antisense-12-*lktA* PNA) を反応液中に 20 μM となるように添加し、 3×10^8 cfu の菌量の Aa 菌 (Y4 株、JP2 株) と 37°C、5%CO₂ 存在下で 1 時間反応させ、比較 ΔCt 法によるリアルタイム RT-PCR を行い、*lktA* 遺伝子の発現量が最も減少したものを PNA の取り込みが良いものとして選定した。

(4) 0、5、10、20、50 μM の濃度の (KFF)₃-antisense-12-*lktA* PNA を 3×10^8 cfu の菌量の Aa 菌 (Y4 株、JP2 株) と 37°C、5%CO₂ 存在下で 0.5、1 時間反応させ、比較 ΔCt 法によるリアルタイム RT-PCR を行い、*lktA* 遺伝子の発現量を比較した。

(5) Aa 菌において *lktA* 遺伝子は病原因子であるが、*Streptococcus mutans* では *gtf* 遺伝子とその病原遺伝子であり、口腔細菌叢における病原遺伝子の水平伝播を解析するために遺伝系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) 侵襲性歯周炎における Aa 菌の状況を把握するためにロイコトキシンの強産生株と通常株の検出定量系を確立し、Quantitative discrimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* highly leukotoxic JP2 clone from non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis. として公表を行った。また、メタゲノム解析による Aa 菌の感染状況の調査を健常児、脳性麻痺患児を対象に行ったところ、表 1-1、表 2-1 の結果を

表 1-1. メタゲノム解析による唾液中口腔細菌の平均検出率(健常児)

Genus	Ave.(%)
1 Streptococcus	55.13
2 Neisseria	11.32
3 Veillonella	4.52
4 Gemella	3.73
5 Rothia	3.70
6 Actinomyces	3.40
7 Abiotrophia	3.08
8 Granulicatella	2.86
9 Lautropia	1.87
10 Prevotella	1.84
11 Haemophilus	1.28
12 Leptotrichia	1.19
13 Fusobacterium	1.10
14 Corynebacterium	0.54
15 Terrahaemophilus	0.51
16 Orbacterium	0.49
17 Kingella	0.33
18 Campylobacter	0.30
19 Porphyromonas	0.27
20 Capnocytophaga	0.21
21 Megasphaera	0.17
22 Catonella	0.17
23 Atopobium	0.09
24 Streptobacillus	0.07
25 Selenomonas	0.07
26 Propionibacterium	0.06
27 Peptostreptococcus	0.06
28 Eubacterium	0.05
29 Aggregatibacter	0.05
30 Mogibacterium	0.04

表 1-2. メタゲノム解析による唾液中口腔細菌の平均検出率(CP 患者)

Genus	Ave.(%)
1 Streptococcus	34.89
2 Neisseria	12.21
3 Fusobacterium	7.10
4 Prevotella	7.00
5 Gemella	3.85
6 Veillonella	3.25
7 Porphyromonas	2.50
8 Abiotrophia	2.28
9 Actinomyces	2.26
10 Leptotrichia	2.01
11 Campylobacter	1.93
12 Haemophilus	1.91
13 Capnocytophaga	1.79
14 Lautropia	1.58
15 Selenomonas	1.48
16 Granulicatella	1.36
17 Rothia	1.22
18 Eikenella	0.52
19 Aggregatibacter	0.51
20 Bergeyella	0.45
21 Eubacterium	0.42
22 Terrahaemophilus	0.39
23 Streptobacillus	0.33
24 Moraxella	0.32
25 Corynebacterium	0.28
26 Peptostreptococcus	0.28
27 Catonella	0.21
28 Atopobium	0.19
29 Kingella	0.19
30 Megasphaera	0.18

得た。これにより Aa 菌の感染率は、健常児では 0.05%、脳性麻痺患者では 0.51%とあまり高くないが常在菌として存在しており、とくに口腔清掃状態があまり良好とは言えない脳性麻痺患者の方でやや多めに検出されることが示唆された。また、乳幼児の口腔細菌叢の調査から、Aa 菌は歯が萌出以降に定着すると考えられた。

(2) Y4 株、JP2 株の *lktA* 遺伝子の発現量の差を比較 ΔCt 法によるリアルタイム RT-PCR で調べたところ、表 2 の結果を得た。これにより、ロイコトキシシン強産生株である JP2 株は、通常株である Y4 株に比べて 4 倍の *lktA* 遺伝子の発現があることが分かった (表 2)。

表 2. Y4 株と JP2 株の *lktA* 遺伝子の発現の比較

Aa 菌 菌株	平均 Ct	平均 ΔCt (<i>lktA</i> -16S rRNA)	平均 ΔΔCt (ΔCt-ΔCt.0)	平均 <i>lktA_n</i> (Rel. to PNA ₀)
Y4	16.41±0.05	3.96±0.05	0.00±0.05	1.00±0.03
JP2	14.34±0.01	1.94±0.01	-2.02±0.01	4.06±0.02

* それぞれ 3×10^8 CFU の菌体から RNA を抽出した。

** Y4 株での発現を 1 としたときの JP2 株の *lktA* 遺伝子の発現量

(3) ペネトラシン (RQIKIWFQNRRMKWK)-、ノナルギニン (RRRRRRRRR)-、(KFF)₃- の 3 種の膜透過型ペプチドのうち、どの膜透過型ペプチドが効果的に Aa 菌に導入されるかをリアルタイム RT-PCR で Y4 株を用い、*lktA* 遺伝子の発現量で評価したところ、ペネトラシンやノナルギニンではほとんど変化が認められず、(KFF)₃-で唯一、*lktA* 遺伝子の発現量の低下は認められなかった。

(4) 0、5、10、20、50 μM の (KFF)₃-antisense-12-*lktA* PNA を Y4 株、JP2 株にそれぞれ作用させ、*lktA* 遺伝子の発現量を比較したところ、Y4 株、JP2 株ともに、20 μM のときに最も発現抑制され、Y4 株では、アンチセンス PNA の添加がないときを 1 とすると 0.13±0.01 まで抑制され、JP2 株では 0.71±0.01 まで抑制された (表 3-1、表 3-2)。その一方で、Y4 株、JP2 株ともに 20 μM よりも薄い濃度では若干の *lktA* 遺伝子の発現量の増加があり、50 μM では抑制が减弱した。このことから、菌量あたりの至適濃度に関しては検討する余地があると考えられた。

表 3-1. Y4 株に対する antisense-*lktA* PNA (12mer) による *lktA* 遺伝子の発現抑制

PNA の濃度 (μM)	平均 Ct	平均 ΔCt (<i>lktA</i> -16S rRNA)	平均 ΔΔCt (ΔCt-ΔCt.0)	平均 <i>lktA_n</i> (Rel. to PNA ₀)
0	16.41±0.05	3.96±0.05	0.00±0.05	1.00±0.03
5	16.38±0.05	3.93±0.05	-0.03±0.05	1.02±0.04
10	16.37±0.04	3.85±0.04	-0.11±0.04	1.08±0.03
20	21.73±0.18	6.95±0.18	2.987±0.18	0.13±0.01
50	16.84±0.14	4.20±0.14	0.249±0.14	0.85±0.01

* 3×10^8 CFU の Aa 菌の菌体にアンチセンス PNA を反応させた。

表 3-2. JP2 株に対する antisense-*lktA* PNA (12mer) による *lktA* 遺伝子の発現抑制

PNA の濃度 (μM)	平均 Ct	平均 ΔCt (<i>lktA</i> -16S rRNA)	平均 ΔΔCt (ΔCt-ΔCt.0)	平均 <i>lktA_n</i> (Rel. to PNA ₀)
0	14.34±0.01	1.93±0.00	0.00±0.00	1.00±0.01
5	14.46±0.02	1.90±0.02	-0.05±0.02	1.03±0.02
10	14.38±0.03	1.88±0.04	-0.06±0.03	1.05±0.02
20	15.22±0.04	2.44±0.18	0.50±0.04	0.71±0.01
50	14.837±0.07	2.14±0.14	0.20±0.07	0.87±0.01

* 3×10^8 CFU の Aa 菌の菌体にアンチセンス PNA を反応させた。

(5) *S. mutans* の *gtf* 遺伝子の水平伝播に関しては、Evolution of Cariogenic Character

in *Streptococcus mutans*: Horizontal Transmission of Glycosyl Hydrolase Family 70 Genes. として公表し、*lktA* 遺伝子も含めたこれらの口腔疾患に関与する細菌の病原遺伝子は口腔内で水平伝播する可能性があることを示唆した。

<引用文献>

- ① Good L, Awasthi SK, Dryselius R, Larsson O, Nielsen PE. Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nature Biotechnology*. 19(4): 360-364. 2001.
5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
- [雑誌論文] (計 5 件)
- ① 星野倫範, 口腔ケアでは細菌学的には何を標的とするべきか? -脳性麻痺患者の唾液中細菌叢の群集解析などで得られた知見から-. *日本口腔ケア学会誌*, 9(1): 5-11, 2015. 査読有
- ② Jensen A, Hoshino T, Kilian M, Taxonomy of the Anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2506-2519, 2013. 査読有
- ③ 星野倫範, *Streptococcus mutans* グルコシルトランスフェラーゼ B の抗原部位の解析と抗齶蝕ワクチン開発への展望. *小児歯科学雑誌*, 51(3): 317-325, 2013. 査読有
- ④ Yoshida A, Ennibi OK, Miyazaki H, Hoshino T, Hayashida H, Nishihara T, Quantitative discrimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* highly leukotoxic JP2 clone from non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis. *BMC Infectious Diseases*, 12 (1): 253, 2012. 査読有
- ⑤ Tomonori Hoshino, Taku Fujiwara, Shigetada Kawabata. Evolution of Cariogenic Character in *Streptococcus mutans*, Horizontal Transmission of Glycosyl Hydrolase Family 70 Genes. *Scientific Reports*, 2: 518 DOI: 10.1038/srep00518, 2012. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 星野倫範, 佐藤恭子, 藤原 卓, 口腔ケアにより何を变えなければならないか -群集解析による脳性麻痺群患者と健常者の口腔細菌叢の比較から-, 第 11 回日本口腔ケア学会総会学術大会, 2014 年 6 月 28-29 日, 旭川市民文化会館 (北海道・旭川市)
- ② 星野倫範, 佐藤恭子, 西俣はるか, 釜崎洋子, 西口美由季, 藤原 卓, メタゲノム解析による脳性麻痺患者と健常者の口腔細菌叢の比較, 第 30 回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 2013 年 10 月 11-13 日, 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ③ 西俣はるか, 齋藤 幹, 星野倫範, 日高聖, 佐藤恭子, 藤原 卓, 当科母親教室を受診した 8 か月児の口腔内細菌叢, 第 51 回日本小児歯科学会総会, 2013 年 5 月 23-24 日, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 倫範 (HOSHINO, Tomonori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・准教授

研究者番号: 00359960