

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	田村 光
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第479号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Peptides from rice endosperm protein restrain periodontal bone loss in mouse model of periodontitis (コメ胚乳タンパク質由来ペプチドは、歯周炎モデルマウスにおける歯槽骨吸収を抑制する)
論文審査委員	主査 教授 多部田 康一 副査 教授 寺尾 豊 副査 教授 前田 健康

### 博士論文の要旨

学位申請者田村 光氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は以下の通りである。

歯周炎は、歯周病原細菌の感染による炎症と骨吸収を特徴とする疾患であり、歯を喪失する原因の一つである。歯周病原細菌は、免疫細胞を歯周組織へ過度に集積させ、炎症性サイトカインや骨吸収関連因子の産生を促進させることで炎症反応および破骨細胞を活性化し、骨吸収を誘導する。したがって、歯周炎治療においては感染微生物の除去に加え、炎症と破骨細胞による骨吸収の制御が必要となる。現行の歯周病治療では、スケーリングや抗菌薬による病原微生物の除去は行われているものの、炎症および骨吸収の制御法は確立されていない。そこで、炎症および骨吸収を制御可能な薬剤の探索が必要である。

申請者は歯周病治療に繋がる新たな薬剤の候補として、コメ由来ペプチドに着目した。新潟は日本一の作付面積を誇る米所であり、米菓等の米産業も盛んであるため、産学連携への発展が見込める。また先行研究において、コメ由来ペプチドが歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示すと報告されているが、歯周炎病態形成に重要な炎症と骨吸収に与える影響は未解明であった。そこで本申請論文では、炎症ならびに骨吸収を制御し歯周病治療に応用可能なコメ由来ペプチドの同定ならびに作用メカニズムの検索を試みた。

まずコメ胚乳タンパク質由来ペプチド (REP) を酵素にて分解し、等電点の差を利用して 20 に分画した (サンプル番号 REP1~20)。続いて骨吸収抑制能を持つ候補ペプチド選定のため、破骨細胞分化誘導因子 receptor activator of NF- $\kappa$  B ligand (RANKL) と REP1~20 を添加した培地にてマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を培養し、分化した破骨細胞の数を算定した。その結果から、破骨細胞分化を抑制する可能性のある REP9 および REP11、さらに対照として破骨細胞分化に影響を認めない REP15 を選出した。続いて、コメ由来ペプチドの *in vivo* における炎症ならびに歯槽骨吸収に対する効果を解析するため、歯牙結紮歯周病モデルマウスを使用した (Tamura, H., *et al*, *Methods Mol Biol.*, 参考論文 1)。本モデルでは、歯牙の結紮により実験的に歯周炎を誘導できる。結紮期間中に種々の物質を投与し、その後回収した上顎骨や歯肉の組織学的ならびに分子生物学的解析を行うことで、炎症や骨吸収に対する投与物質の効果判定が可能となる。本実験では、歯周炎を誘導した日から 1 日 1 回、計 6 日間 6 回にわたり、コメ由来ペプチドを歯肉に接種した。歯槽骨の吸収量を測定した結果、歯肉への REP9, REP11 接種群では、REP15 および PBS 接種群 (対照群) と比較し、結紮部の歯槽骨吸収量は有意に少なかった。また、上顎骨における TRAP 陽性の多核細胞を破骨細胞として算定した結果、破骨細胞数は REP9 および REP11 接種群において有意に低値であった。さらに結紮部の口蓋歯肉を回収し、炎症と骨吸収に関連する遺伝子の転写活性を Real-time quantitative PCR (qPCR) 法にて解析した。その結果、

REP9 および REP11 接種群においては、炎症性サイトカイン (*Il6*, *Il1β*, *Nlrp3*, および *Tnf*) の転写活性が対照群に比較し有意に小さく、REP9 接種群は破骨細胞分化関連遺伝子 (*Nfatc1* および *RANK*) の転写活性も有意に低かった。

次に、コメ由来ペプチドの細胞レベルにおける炎症および破骨細胞分化に対する影響を解析した。コメ由来ペプチド存在下で前培養した RAW264.7 細胞に *P. g* 2561 株由来リポ多糖 (LPS) を添加し 4 時間培養後、炎症性サイトカインの転写活性を qPCR 法にて定量した。その結果、REP9 および REP11 添加群では、炎症性サイトカイン *Il6* の転写活性は対照群と比較し有意に低かった。次に、RANKL とコメ由来ペプチドを添加した培地にて RAW264.7 細胞を 24 時間培養すると、REP9 添加群において破骨細胞分化関連因子 (*Nfatc1* および *RANK*) の転写活性は有意に小さかった。以上より、REP9 ならびに REP11 は炎症および破骨細胞分化関連遺伝子の転写活性を低下させ、歯周組織における炎症と破骨細胞分化を抑制することにより、歯槽骨吸収量を減少させる可能性が示唆された (Tamura, H., *et al.*, Arch Oral Biol, 主論文)。

これらは研究論文の出版やメディアへの発表 (新潟日報 2019 年 1 月 10 日等) を通じて、身近なコメ由来のペプチドが歯周病治療へ繋がる可能性として広く社会に発信された。

### 審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性についての試問を行った。

本研究着想の経緯及び先行研究との関連について、コメを含む多くの食品由来ペプチド (牛乳、緑茶、ローヤルゼリー、魚) が抗菌作用を示すという報告がある。また、共同研究者である新潟大学工学部谷口正之教授の研究結果において、コメタンパク質由来のペプチドが歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* 等の口腔内細菌に対して抗菌作用を示すということが明らかとなった。さらに、コメ由来タンパク質もしくはその加水分解物は ACE-1 等の酵素阻害活性や、抗酸化作用等の宿主に対する作用も報告され、糖尿病や高血圧に対して有効である可能性が示唆されている。しかしながら、コメ由来ペプチドが歯周炎病態形成に重要な炎症と骨吸収に与える影響は未解明であり、また一部のコメ由来ペプチドは LPS 中和能を持つという報告もあったことから、コメ由来ペプチドフラクション分画の中に炎症性骨吸収を抑制し、新規歯周炎治療薬の開発へと繋がる物質があると考えた。

研究方法と論旨の展開についての試問を行った。

本研究において用いた歯周病モデル動物の特性と妥当性については、以下の回答を得た。Balb/c マウスの歯牙結紮による歯周病モデルを用いてコメ由来ペプチドの炎症および骨吸収に与える作用を解析した。近交系実験動物用マウスのうち、Balb/c マウス、C57BL/6 マウスの 2 種類が歯周病モデルに頻用されている。それぞれのマウスの特徴のうち、本研究に特に影響する事項として免疫反応の違いが挙げられる。

2 系統のマウスを比較すると Balb/c マウスは Th2 型の免疫反応が高く、C57BL/6 マウスにおいては Th1 型の免疫応答が高い。2 系統のマウスの炎症性骨吸収による歯槽骨の変化量の違いを比較検討した研究によると、*P. gingivalis* 感染により、C57BL/6J と比較して、BALB/c においてより顕著な歯槽骨吸収が起きると報告されている。この結果は、BALB/c は Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) により反応する傾向があり、骨吸収がより進行するが、一方 C57BL/6 は Th1 サイトカイン (インターフェロン  $\gamma$ , IL-2) が反応性に多く産生され、骨吸収から保護的に働くために吸収量に差があると考察されている。本研究においては、*P. gingivalis* 感染ではなく歯牙結紮により歯槽骨吸収を引き起こしている。しかしながら、炎症性骨吸収が起きた際の免疫応答は両モデル間で類似していると推察されるため、上記報告と同様に歯牙結紮モデルでも BALB/c においてより顕著な歯槽骨吸収が起きると考えられる。したがって、コメ由来ペプチドの歯槽骨吸収抑制作用を解析することを目的とした本研究においては、より歯槽骨吸収量の多い Balb/c マウスを用いることは妥当であると考えられる。

破骨細胞抑制を指標にした、ペプチドフラクションのスクリーニングを行った理由については、以下の回答を得た。本研究では、コメ由来ペプチドフラクション分画のうち炎症性骨吸収に対して抑制的に働く物質の探索を目的とした。炎症性骨吸収において特に重要な働きをする細胞が破骨細胞であり、炎症状況下では特に前駆細胞からの分化が進み、骨吸収の促進関わる。また、

コメ由来ペプチドにおいてこれまでに報告されていたLPS中和能は主にペプチドのカチオン性の高さに関わる。すなわち抗菌作用を示すペプチドとLPS中和能を持つペプチドの特性は類似していると考えられる。本研究ではLPS中和能だけでなく、より新規性の高い宿主に直接作用し、抗炎症および破骨細胞分化抑制効果を示すペプチドの発見も目標とした。したがって、破骨細胞分化の抑制を指標としたペプチドフラクションのスクリーニング実験を行った。実際に、谷口正之教授の研究室での解析結果によると、等電点のpHが高いフラクション(No.16~20等)が抗菌作用およびLPS中和能を強く示すと報告されているが、破骨細胞分化抑制作用は等電点のpHが低いフラクション(No.1~4)もしくはpHが中間くらい(No.8~11)のフラクションにおいて強く認められた。

コメ胚乳タンパク質由来ペプチドに着目して解析を行った理由と妥当性については以下の回答を得た。初めにスクリーニング実験として、コメ胚乳およびコメぬかタンパク質由来ペプチド、さらに大豆、納豆、ローヤルゼリーの各タンパク質由来ペプチドをそれぞれRAW264.7細胞へ添加し、分化に対する影響を検索した。その結果、コメ胚乳タンパク質由来ペプチド添加群において破骨細胞分化を抑制する作用を認めた。また先行研究において、コメ由来ペプチドが歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示すと報告されているが、歯周炎病態形成に重要な炎症と骨吸収に与える影響は未解明であった。以上の事から、コメ胚乳タンパク質由来ペプチドへ着目し、炎症ならびに骨吸収に対する作用を解析した。

マウス実験において、添加したコメ胚乳タンパク質由来ペプチドの接種量の適切性については以下の回答を得た。本研究においては、マウス体重比2.0 mg/Kgのペプチドを投与した。マウスに対してペプチドを接種する他の研究と比較してもおおよそ同じ接種量となっており、適切であると考えられる。また、マウスRAW264.7細胞にマウス1匹への接種量と同量のコメ胚乳タンパク質由来ペプチドを添加し、MTT assayを行った結果、細胞傷害性は認められなかった。

細胞実験のリアルタイムPCR実験において、*Il6*, *Il1β*, *Nlrp3*, *Tnf*, *Nfatc1* および *RANK* を解析対象に選択した理由については以下の回答を得た。コメ胚乳タンパク質由来ペプチドは、抗炎症作用としてLPS—TLR—NF-κBのシグナル経路を阻害するという仮説から、その経路の下流に位置する炎症性サイトカインである *Il6*, *Il1β*, *Tnf* ならびに *IL-1β* の成熟化に関与する *Nlrp3* を解析対象として選択した。また、マウス歯牙結紮モデルにおける組織学的な解析結果から、REP9、REP11添加群においてPBS群と比較して破骨細胞数が低値であるという結果が得られた。したがって、REP9、REP11は破骨細胞分化を抑制する可能性があると考え、細胞実験において破骨細胞分化に必須であるRANK-RANKLシグナルのレセプターである *RANK* ならびに破骨細胞分化のマスター転写因子である *NFATc1* を解析対象とした。

破骨細胞の分化と機能を調節する因子については以下の回答を得た。破骨細胞の分化と機能調節には多くの分子に関わる。破骨細胞の分化を開始する重要なRANK-RANKLシグナルからTRAF6を介して転写因子NF-κBおよびAPIが活性化することによって、マスター転写因子である *NFATc1* は活性化し、破骨細胞分化が開始される。また破骨細胞分化にはその骨格形成のためにM-CSFの刺激も必須である。また破骨細胞の機能を調節する因子として、酸の産生にはII型の炭酸脱水素酵素、酸の分泌には液胞型Vacuolar typeプロトンATPase関与していると報告されている。骨基質タンパクの分解には様々なプロテアーゼが関与しているが、中でもシステインプロテアーゼであるカテプシンKは最も重要な骨基質分解に関わるプロテアーゼである。

ペプチドがどのような経路で歯槽骨、歯骨細胞前駆細胞に作用するについての考察について以下の回答を得た。本研究では、歯周炎モデルマウスの口蓋歯肉にペプチドを局所投与した。具体的には、マウス上顎骨の口蓋部前方からハミルトンシリンジを刺入し、針を口蓋骨と口蓋粘膜上皮の間を進め、第二臼歯部口蓋側歯肉まで到達した時点でペプチドを注入した。一部ペプチドは吸収もしくは混入し体内血流循環へと入り代謝を受けると考えられるが、投与ペプチドのうち大部分は局所に滞留し、直接的に歯槽骨や破骨細胞前駆細胞へと作用すると考えられる。また、破骨前駆細胞への直接の作用だけでなく、*in vivo* および *in vitro* の実験結果からマクロファージ等免疫細胞に対する抗炎症作用によって *Il-6* や *TNF* の発現が低下したことにより、間接的に歯槽骨吸収ならびに破骨細胞分化を抑制する作用を示したと考察できる。

各ペプチド分画の破骨細胞形成抑制作用メカニズムの考察と、それを明らかにするにはどのよ

うな検討が行われるべきかの問いについて、以下の回答を得た。ペプチド分画9 (REP9) とペプチド分画11 (REP11) では破骨細胞形成抑制において共通するメカニズムと一部異なるメカニズムがあると推測される。推測されるメカニズムは大きく分類すると3つに分けられる。1つ目はLPS中和作用, 2つ目はTLR—NF-κBシグナル経路や炎症性サイトカインを阻害する作用, 3つ目はRANKL-Blimp1-Bcl6-osteoclastic geneシグナル経路のいずれかを阻害する作用である。1つ目のLPS中和作用は, REP9およびREP11両分画とも持つ可能性がある。それを明らかとするには, 対照群にポリミキシンBを設定し, LAL試薬を用いたリムルス試験の実施や, Biacoreを用いたペプチド分画とLPSの結合能力測定を行うことが考えられる。2つ目のTLR—NF-κBシグナル経路や炎症性サイトカインを阻害する作用もREP9およびREP11両分画とも持つ可能性がある。実験結果から推測するとこの作用はREP9と比較してREP11がより強く持っている可能性が高い。これらを明らかとするには, 下記に示す解析方法が考えられる。ペプチドとTLR4との結合能力をBiacoreで測定する他, ペプチドの抗体を作製しフローサイトメトリーで結合しているかを解析することで, ペプチドがLPSに対して競合阻害をしているかを検証できると考えられる。またその下流にて作用しているかを解析する場合は, TLR—NF-κBシグナル経路のうちMyd88依存的経路に抑制作用を検討するには, REP9, REP11とともにTLR3以外のTLR作動薬 (TLR2であればPam3CSK4等)を添加した上で, NF-κB自体の発現量を解析する方法(qPCR, WB), NF-κBを免疫染色し核内への移行を確認する方法, 炎症性サイトカイン発現量を解析する方法(qPCR, WB)等が考えられる。Myd88非依存的経路に対する抑制作用を検証するにはMyd88ノックアウトマウスを用いて, 上記と同様な実験等を行うことで解析できると考える。TLR—NF-κBシグナル経路のさらに下流で発現した炎症性サイトカインを抑制している可能性を検証するためには, REP9, REP11とともに炎症性サイトカイン (IL-1やTNF等)を添加し, 上記同様にNF-κBや炎症性サイトカイン発現量を解析する方法が考えられる。3つ目のRANKL-Blimp1-Bcl6-NFATc1シグナル経路においては, REP9が抑制作用を持つ可能性が高い。REP9はin vivoおよびin vitroの実験において, Bcl6の遺伝子発現を有意に上昇させていた。Bcl6はNFATc1の転写制御領域上に直接結合することによって, NFATc1を抑制することが報告されている。Bcl6はRANKL刺激により発現が減少するが, RANKL+REP9添加群においてBcl6の発現は上昇していた。その機構をさらに解明するには, REP9のRANKLやANKとの結合による競合阻害作用を検証することや, Bcl6の発現を抑制するBlimp1のREP9による活性化作用を検討する必要がある。

学術的意義に関わる試問を行った。

学術的意義については以下の通りである。歯周病の治療においては感染微生物の除去に加え、炎症と骨吸収の制御が重要となる。しかしながら、現行の歯周病治療では炎症および骨吸収の制御法は確立されていない。本研究において見出した、2種のコメ胚乳タンパク質由来ペプチド分画は抗炎症作用を有し、マウス歯周病モデルの骨吸収を抑制することが明らかとなった。細胞レベルでの生体への傷害作用も認められなかったことから、将来的には上記ペプチド分画を歯周ポケット内へ注入する軟膏へ配合する等によって、歯周病に対する新規抗炎症治療薬として臨床応用へ繋がる可能性がある。

新規性・創造性については以下の通りである。様々なペプチドが歯周病治療への応用を目指し研究されているが、食品由来かつ遺伝子やアミノ酸に改変を加えず、抽出したままのペプチドが抗炎症作用を示し、歯槽骨吸収を抑制するという知見は新規性が高い。また、新潟は日本一の作付面積を誇る米所であり、米菓等の米産業も盛んであるため、産学連携への発展が見込まれる。具体的には、米産業等の廃棄物から抽出を行うことで、低コストで安全性の高い創薬を実行できる可能性があり、臨床応用への期待値が高い。本研究は将来的に地域の特性を生かせるものであり、創造性が高い。

本研究結果の学術的発展性や応用価値については以下の通りである。歯周病の治療においては感染微生物の除去に加え、炎症と骨吸収の制御が重要となる。しかしながら、現行の歯周病治療では炎症および骨吸収の制御法は確立されていない。本研究において見出した、2種のコメ由来ペプチド分画は抗炎症作用を有し、マウス歯周病モデルの骨吸収を抑制することが明らかとなった。細胞レベルでの生体への傷害作用も認められず、将来的には上記ペプチド分画を歯周ポケッ

ト内へ注入する軟膏へ配合する等によって、歯周病に対する新規抗炎症治療薬として臨床応用へ繋がる可能性がある。現時点の位置づけとしては詳細な作用機序は未解明であり、マウスレベルでの作用を認めた段階であるため、臨床応用へ向けてはさらなる解析が必要である。

論文構成・文法・語法において適切に執筆されている。

以上