

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	松岸 葵
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第483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	Rice peptide with amino acid substitution inhibits biofilm formation by <i>Porphyromonas gingivalis</i> and <i>Fusobacterium nucleatum</i> (コメ由来ペプチドのアミノ酸置換体は <i>Porphyromonas gingivalis</i> と <i>Fusobacterium nucleatum</i> のバイオフィーム形成を阻害する)
論文審査委員	主査 教授 多部田 康一 副査 教授 山崎 和久 副査 教授 寺尾 豊

博士論文の要旨

学位申請者松岸 葵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。

【背景および目的】歯周病の予防・治療において、抗微生物薬による口腔細菌のコントロールは、有効なアプローチのひとつとされている。しかし、バイオフィームを形成した細菌には薬剤が浸透しにくく、抗微生物薬に対して強い抵抗性を示す。代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* においても、浮遊状態で抗菌作用を示すミノサイクリンやメトロニダゾールが、バイオフィームを形成した *P. gingivalis* に対しては効果を有しない。また年々増加する薬剤耐性菌は、世界規模の深刻な問題であるが、口腔由来のバイオフィームが薬剤耐性遺伝子の水平伝播を引き起こすことが知られており、アモキシシリンやメトロニダゾールに耐性を示す *Fusobacterium nucleatum* の存在が報告されている。従って、抗微生物薬の使用削減に加えて、既存の抗微生物薬に代わるバイオフィーム制御法の開発が喫緊の課題である。この課題への対応策として注目されている抗菌ペプチドは、一般に耐性菌を誘導しにくく、アミノ酸置換による抗菌機能の強化が可能である。コメの α -アミラーゼ由来の AmyI-1-18 ペプチドと、そのアミノ酸置換体である G12R ペプチドは、浮遊状態の *P. gingivalis* に対して抗菌活性を示すことが報告されている。そこで本申請論文では、AmyI-1-18 および同ペプチドのアミノ酸置換体 G12R が、歯周病原細菌のバイオフィームに及ぼす影響について解析した。

【材料と方法】*P. gingivalis* FDC381 株および *F. nucleatum* ATCC25586 株 (各 10^8 CFU/ml) それぞれの培養液に、AmyI-1-18 および G12R (AmyI-1-18 の 12 番目グリシン残基のアルギニン置換体) ペプチドを添加し、48 時間または 72 時間後のバイオフィーム形成阻害作用をクリスタルバイオレット染色にて評価した。また、バイオフィームの除去作用については、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* それぞれを 24 時間または 48 時間培養し形成した成熟バイオフィームに、ペプチドを添加後 24 時間のバイオフィーム除去量をクリスタルバイオレット染色にて評価した。続いて、各ペプチドの最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) を測定した。また、propidium iodide (PI) 染色、および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、各ペプチドによる膜傷害性を検討した。最後に、2 菌種を混合したバイオフィームの形成阻害作用、およびバイオフィーム除去作用を評価した。

【結果】AmyI-1-18、G12R は *P. gingivalis* および *F. nucleatum* のバイオフィーム形成を阻害した。特に、AmyI-1-18 と比較して G12R はいずれの菌種に対しても、より低濃度でバイオフィーム形成を阻害した。一方、いずれのペプチドも成熟バイオフィームに対しては除去作用を示さなかった。MIC と MBC の比較により、G12R はいずれの細菌に対しても、AmyI-1-18 と比較して強い抗菌活性を有し、特に *F. nucleatum* に対してより強く殺菌的に作用することが示された。また PI

染色の結果から、AmyI-1-18と比較してG12Rはより強い膜傷害能を有することが示された。加えてTEMによる細菌の形態観察を行った所、細菌の膜が破壊されている像がAmyI-1-18投与群と比較して、G12R投与群において有意に多く観察された。以上より、G12Rは*P. gingivalis*および*F. nucleatum*の膜を破壊し、殺菌的に作用することが示された。さらにG12Rは2菌種の混合バイオフィーム形成を強く阻害していたが、いずれのペプチドも混合バイオフィームを除去する作用を認めなかった。

【考察】G12Rは*P. gingivalis*および*F. nucleatum*の混合バイオフィームを阻害した。これはG12Rが*F. nucleatum*に強い殺菌作用を示したため、凝集能が高い*F. nucleatum*を標的としたバイオフィーム形成阻害は歯周病予防に効果的であると考えられる。AmyI-1-18は、*P. gingivalis*には静菌的に作用したが、*F. nucleatum*に対しては強い膜傷害能と殺菌的作用を示した。*F. nucleatum*の外膜構成成分は*P. gingivalis*と比較して強く陰性に荷電しているため、カチオン性ペプチドであるAmyI-1-18がより強く作用したことが示唆される。またG12Rは*P. gingivalis*および*F. nucleatum*の2菌種に対し強い殺菌作用を示した。アルギニン置換によって増強されたG12Rの強いカチオン性により、膜との静電的相互作用が生じ、膜傷害能が強化されたことが示唆された。加えて、G12Rの α ヘリックス含量が高いことも、強い抗菌活性を示す要因の一つであると考えられる。

【結論】AmyI-1-18およびG12Rペプチドは、歯周病原細菌のバイオフィーム形成を阻害し、G12Rは膜傷害能の強化により、強い殺菌作用を示すことが明らかとなった。また本論文の結果から、コメペプチドとアミノ酸置換体を用いた、歯周病原細菌に対する新規のバイオフィーム制御法の可能性が示された。

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は、歯周治療において、超音波スケーリングなどによる機械的なバイオフィームの除去に加えて、抗菌薬の使用は有効な手段のひとつである。しかし、現在世界的に広がっている薬剤耐性菌の問題から、抗菌薬の使用削減が喫緊の課題となっている。抗菌ペプチドは、低毒性、低耐性菌誘導などの面で優れ、さらにはアミノ酸置換による抗菌活性の強化が可能であることが報告されている (Kim J B, et al., J Peptide Res, 2001.)。コメ由来ペプチド AmyI-1-18 は先行研究にて、*Porphyromonas. gingivalis* をはじめとした口腔内細菌に対し抗菌活性を示し、歯周炎マウスモデルにて抗炎症作用と歯槽骨吸収抑制作用を認めた (Taniguchi M et al., Biopolymers, 2015. Aoki-Nonaka Y et al., J Periodontol, 2019.)。また、G12R は AmyI-1-18 の N 末端から 12 番目のグリシンをアルギニンに置換した配列を有するペプチドであり、カチオン性が強化され、*P. gingivalis* に対する抗菌活性を認めた (Taniguchi M et al., J Biosci Bioeng, 2016.)。しかし、実際の歯周炎の病態として細菌はバイオフィームを形成して存在し、バイオフィームに対する AmyI-1-18, G12R の作用は未だ明らかではない。歯周病原細菌に対する、コメ由来ペプチドとそのアミノ酸置換体のバイオフィームに対する抑制作用を明らかにし、既存の抗菌薬の代替となる、新たな歯周治療医薬開発の基礎となるデータを得ることに意義がある。

研究方法と論旨の展開についての試問をおこなった。

P. gingivalis FDC381 株および *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 株を使用した理由について以下回答を得た。*P. gingivalis* は代表的な歯周病原細菌であり、*F. nucleatum* はバイオフィーム形成過程の初期定着細菌と後期定着細菌を繋ぐ作用を持つとされる (Noiri Y, et al., J Dent Res, 2004. Kolenbrander P E & London J, et al., J Bacteriol, 1993.)。従って、上記 2 菌種のバイオフィームに対する抑制作用を明らかにすることで、*in vitro* における歯周病に対するコメ由来ペプチドの作用を確認できると考えた。細菌株については、予備実験にて *P. gingivalis*, *F. nucleatum* とともに複数の細菌株のバイオフィーム量を確認しバイオフィームを十分に得ることができたため、これらの細菌株を選択した。

バイオフィーム形成阻害作用及び除去作用の実験系の選択における妥当性について以下の通りである。先行研究にて、細菌のバイオフィーム量をクリスタルバイオレット染色法によって評価できることが示されていたため、本研究でもその手法を用いた (Onozasa S, et al., BMC Oral

Health, 2015. Zhang Y et al., Microb Pathog, 2017)。予備実験において、洗浄過程では除去されず、かつほぼ上限量に値するバイオフィルム量を得ることができる培養条件について検討した。その結果、*P. gingivalis* FDC381 株は 24 時間、*F. nucleatum* ATCC25586 株は 48 時間培養が適切であること、どちらも 1×10^8 CFU/mL の菌数によってバイオフィルムを得られることを確認し、本実験の方法として用いた。尚、参考文献においても、上記培養時間にてバイオフィルム形成が可能であることが示されている (*P. gingivalis*: Zhang Y, et al., Microb Pathog, 2017. *F. nucleatum*: Onozawa S, et al., BMC Oral Health, 2015.)。バイオフィルム除去作用を検討するため、*P. gingivalis* は 24 時間、*F. nucleatum* は 48 時間培養した後にペプチドを添加し、それぞれ追加で 24 時間培養した (*P. gingivalis* : 計 48 時間、*F. nucleatum* : 計 72 時間)。バイオフィルム形成阻害作用については、細菌の培養液にペプチドを添加し、除去作用と同じ時間で培養を行った (*P. gingivalis* : 計 48 時間、*F. nucleatum* : 計 72 時間)。

各実験の統計手法を選択した理由と妥当性については以下の通りである。Fig1.2.5 (バイオフィルム残存量) に対する統計解析は、One-way ANOVA を選択した。未刺激群を含めて 3, 4 つの刺激濃度におけるバイオフィルム残存量における有意差を確認するため、パラメトリック多群検定 One-way ANOVA によって各群の平均値が全て等しいかどうかを検定した。さらに、どの群の間で平均値が異なるかどうかを検定するため、パラメトリック多重比較である Tukey Test を行った。また得られた結果の誤差を SEM (標準誤差: Standard Error) で表している。今回再現性の確認のため最低でも 2 回実験を繰り返している。2 回の実験結果の平均値がどの程度分散するかを確認し、実験の再現性について検討することができるため、SEM を計算し記載した。Fig3 (PI 染色によって膜が傷害された細菌の割合)、Fig4 (膜破壊が認められる細菌の割合) についても、未刺激群、AmyI-1-18 刺激群、G12R 刺激群を含めて 3 つの群間での有意差を確認するため、上記と同様の統計手法を選択した。

各ペプチドの形成阻害作用及び除去作用の違いについて、その機序についての考察及びその根拠、背景となる知見については以下の通りである。本研究結果から、AmyI-1-18 と G12R ペプチドは *P. gingivalis*, *F. nucleatum* のバイオフィルムの形成を阻害した。G12R ペプチドはどちらの細菌に対してもより低い濃度で作用し、特に *F. nucleatum* のバイオフィルム形成を強く阻害した。しかし、どちらのペプチドにおいても除去作用は認めなかった。バイオフィルム形成阻害作用において、AmyI-1-18 と比較して G12R ペプチドがより強く作用したのは、G12R ペプチドの殺菌的抗菌活性によるものと考えられる。G12R ペプチドはアルギニン置換を行うことで、カチオン性が +1、 α -helix 含有率が 5.6% に変化し、膜傷害作用が強化され、殺菌的抗菌活性を認めた (Taniguchi M, et al., J Biosci Bioeng, 2016.)。従って、アミノ酸置換により膜傷害作用が強化されたことが、AmyI-1-18 と G12R ペプチドの間において、結果に違いを認めた原因であると考えられる。AmyI-1-18 と G12R ペプチドにおいて、バイオフィルム除去作用を認めなかった理由は、ペプチドが陰性に荷電したバイオフィルム表面の細菌にのみ作用し、バイオフィルム深層の細菌まで作用しなかった可能性が考えられる。

本研究で使用した AmyI-1-18 の G12R アナログについて、アミノ酸置換の特徴ならびに選出した理由は以下のとおりである。G12R ペプチドは AmyI-1-18 の N 末端から 12 番目のグリシンをアルギニンに置換した配列を有し、カチオン性が強化されている。先行研究において報告された複数のアミノ酸置換体について、予備実験として *P. gingivalis* のバイオフィルム抑制効果を検討し、その中からバイオフィルム形成に有効に作用するペプチドを本実験の対象として選出した。

モデルバイオフィルムとして、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* の 24 時間または 48 時間培養を選択した妥当性については以下の通りである。予備実験において、成熟したバイオフィルムのモデルとして、洗浄では除去されず、かつほぼ上限量に値するバイオフィルム量を得ることができる培養条件として設定した。

G12R ペプチドのアミノ酸組成および立体構造に基づき、*P. gingivalis* へ静菌作用し、*F. nucleatum* へ膜傷害と殺菌作用を発揮した理由の考察については以下の通りである。AmyI-1-18 が各菌に対して異なる抗菌活性を示した理由として、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* の菌体表面に存在する LPS の陰性荷電が異なることが考えられる。G12R ペプチドが AmyI-1-18 と比較して強い殺菌的作用を示した理由としては、アルギニン置換によりカチオン性と α -helix 含有率が増加し、

膜傷害作用が強まったためと考えられる。

400 μM にて、G12R ペプチドは AmyI-1-18 と比して有意に細胞傷害性が観察されていることの考察は以下の通りである。G12R ペプチドはアルギニン置換によって、AmyI-1-18 と比較して、カチオン性が +1, α -helix 含有率が 5.6%, 疎水性が -0.23 高まる。通常、細菌表面は負に、宿主細胞表面は正に帯電するため、カチオン性ペプチドは細胞為害性の少ない抗菌作用を示すが、 α -helix 含有量が増加し、両親媒性バランスが疎水性に変化することによって、細胞の脂質二重層または膜タンパクとの相互作用が生じ、細胞為害性が観察されたと考えられる。

G12R ペプチドの継続使用による *P. gingivalis* および *F. nucleatum* の耐性菌出現の可能性についての考察は以下の通りである。Magainin や LL-37 などのカチオン性抗菌ペプチドは膜傷害によって殺菌的抗菌活性を示すことが報告されており、このような膜傷害性抗菌ペプチドに対しては、耐性菌発生の原因となる遺伝子の組み換えが起こりにくいことが明らかとなっている。従って、細菌の代謝経路に影響を与えて抗菌活性を発揮するような既存の抗菌薬と比較して、G12R ペプチドも上記ペプチドと同様に、継続使用によっても耐性菌が発生しにくいと考える。

ペプチドにおける置換アミノ酸の部位と選択理由は以下の通りである。先行研究において、コメ由来ペプチド AmyI-1-18 のアミノ酸置換体が有する *P. gingivalis* に対する抗菌活性が検討されている (Taniguchi M et al., J Biosci Bioeng, 2016.)。ペプチドの抗菌活性を強化するため、カチオン性アミノ酸 (アルギニン)、疎水性のアミノ酸 (ロイシン) のアミノ酸置換体が検討されており、本研究ではカチオン性アミノ酸によって置換されたペプチドにのみ着目した。上記文献において、カチオン性アミノ酸であるアルギニンによって置換されたペプチドの抗菌活性について、G12R ペプチドの他に 2 種類 (I11R, D15R) が検討されている。これらのカチオン性のペプチドの中では、G12R ペプチドが最も弱い細胞為害性と抗菌活性を持つことが明らかとなった。以上より、アルギニン置換部位が異なると、ペプチド全体のカチオン性だけでなく、疎水性や α -helix 含有率で表現される両親媒性となり、細胞為害性が強くなる可能性が示された。従って、用いるアミノ酸の選択だけではなく、置換部位についても検討を行う必要があると考えられる。

検討したペプチドで最も臨床応用に適したものとその理由については以下の通りである。G12R ペプチドはそのカチオン性により AmyI-1-18 と比較して強い膜傷害作用と殺菌的抗菌活性を示す。また膜傷害作用が強い抗菌ペプチドは、細菌の代謝経路に影響を与えることにより作用する抗菌薬と比較して、耐性菌を生じにくいということが報告されている。従って、抗菌活性が強く、耐性菌発生のリスクが低い G12R ペプチドは、より臨床応用に適していると考えられる。

実験に用いた人工バイオフィルムの利点・欠点については以下の通りである。本研究で用いたバイオフィルムモデルは *P. gingivalis* と *F. nucleatum* を用いている。*P. gingivalis* は代表的な歯周病原細菌であり、*F. nucleatum* はバイオフィルム形成過程において、初期定着細菌と後期定着細菌を繋ぐ作用を持つ (Noiri Y, et al., J Dent Res, 2004. Kolenbrander P E & London J, et al., J Bacteriol, 1993.)。利点は、*in vitro* における、歯周病に対するペプチドの抗菌活性の検討が可能になることである。欠点として、本来実際の口腔内で形成されるバイオフィルムは、う蝕細菌や口腔内常在細菌など、さらに多くの細菌により構成されている。代表的なう蝕細菌である *S. mitis* は粘着性の多糖体であるグルカンを産生し、より強固なバイオフィルムを形成する。従って、今後実際の歯周病の病態に対するペプチドの作用を明らかにするにはさらに複数の細菌種を追加して検討する必要があると考えられる。

臨床に応用するために、さらにどのような検討が必要かについて以下の回答を得た。ペプチドが歯周ポケット内により長く滞留し有効濃度を維持する必要がある。例として、ペリオクリン®はマイクロカプセル型軟膏を採用することで、徐放性・滞留性を実現している。同様に、ペプチドも剤型についての検討が必要である。適応症と投与方法については、機械的にバイオフィルムを除去した後に投与することが望ましい。G12R ペプチドはその殺菌的抗菌活性によりバイオフィルム形成阻害作用を示し、成熟バイオフィルムの除去作用を認めなかったため、スクレーピング・ルートプレーニング後に投与し、処置後のバイオフィルム形成を阻害する目的で投与することが良いと考えられる。

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。歯周治療において抗菌薬の使用は有効だが、薬剤耐性菌の問題からその使用削減が喫緊の課題である。抗菌ペプチドは、低毒性、低耐性菌誘導などの面で優れ、さらにはアミノ酸置換による抗菌活性の強化が可能である。本研究の学術的意義は、歯周病原細菌に対する、コメ由来ペプチドとそのアミノ酸置換体のバイオフィルムに対する抑制作用を明らかにし、既存の抗菌薬に代わる新たな歯周治療医薬開発の基礎となるデータを得たことにある。

新規性・創造性及び学術的発展性や応用価値については以下の通りである。新規性は、コメ由来ペプチドの歯周病原細菌に対するバイオフィルム抑制作用、ならびにペプチドのアミノ酸置換による抗菌活性の特異的な変化を明らかにしたことにある。創造性は、抗菌ペプチドを用いた個別治療法開発の可能性にある。一般的にカチオン性の高い抗菌ペプチドは、細菌の代謝経路に影響を与えて抗菌活性を発揮する抗菌薬と比較して、耐性菌を生じる可能性が低いとされている。従って、耐性菌を生じにくい、既存の抗菌薬の代替となる医薬の開発につながれば、社会に対し大きく貢献することが可能となる。本研究の発展性として、患者の病態や口腔細菌叢に応じた医薬開発が可能となり、かつ細菌特異的なアミノ酸配列を得ることで、狭域スペクトル抗菌物質の開発にも繋がり、薬剤耐性菌の問題を解決できると考えている。

論文構成・文法・語法の適切性については適切に執筆されている。

以上