

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	HNIN YU LWIN
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第546号
学位授与の日付	令和5年9月20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	Soybean peptide inhibits the biofilm of periodontopathic bacteria via bactericidal activity (大豆ペプチドは殺菌的作用により歯周病原細菌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 野杵 由一郎 副査 教授 寺尾 豊

博士論文の要旨

学位申請者 HNIN YU LWIN 氏より提出のあった主論文の要旨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、抗菌薬は口腔細菌をコントロールする有効な治療法の一つである。しかし近年、薬剤耐性菌が増加していることから、既存抗菌薬の使用の制限と、それ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。本研究では、大豆由来ペプチドである BCBS-11 に着目し、BCBS-11 が歯周病原性細菌由来のバイオフィームに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

Porphyromonas gingivalis FDC 381 株、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株、*Streptococcus mitis* ATCC 903 株のそれぞれの培養液 (1×10^7 CFU/mL) に、大豆ペプチド BCBS-11 (RIRLLQRFNKR) を添加した。*P. gingivalis* は5日間、*F. nucleatum* および *S. mitis* は2日間培養し、最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) を測定した。また、ペプチドの抗菌メカニズムを明らかにするため、propidium iodide (PI) 染色および 3, 3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (DiSC₃-(5)) assay を用いて、細菌に対する膜傷害性および脱分極活性を検討した。次に、バイオフィーム形成阻害能を明らかにするため、細菌培養液 (2×10^8 CFU/mL) に BCBS-11 を添加し、48時間 (*P. gingivalis*, *S. mitis*) または 72時間 (*F. nucleatum*) 培養後のバイオフィーム量をクリスタルバイオレット染色にて評価した。また、成熟バイオフィームに対する除去作用については、細菌を24時間 (*P. gingivalis*, *S. mitis*) または 48時間 (*F. nucleatum*) 培養して成熟バイオフィームを作成した後に BCBS-11 を添加し、24時間後のバイオフィーム残量を評価した。さらに、2菌種 (*P. gingivalis* と *F. nucleatum*)、または3菌種 (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. mitis*) からなる複合バイオフィームに対する形成阻害作用についても検討した。

【結果】

MIC、MBCの結果より、BCBS-11 が *P. gingivalis* および *F. nucleatum* に対して殺菌的抗菌活性を示すことが明らかになった。一方、*S. mitis* に対して BCBS-11 は抗菌活性を示さなかった。PI 染色と DiSC₃-(5) assay の結果から、BCBS-11 は *P. gingivalis* および *F. nucleatum* の菌膜の脱分極を誘導し、その結果、細菌の膜を破壊して抗菌的に作用することが示された。次に、BCBS-11 のバイオフィームに対する作用について検討した。BCBS-11 は *P. gingivalis* と *F. nucleatum* それぞれのバイオフィーム形成を有意に阻害した。また BCBS-11 は *F. nucleatum* の成熟バイオフィームを完全に除去することはできなかったが、その量を有意に減少させた。加えて、BCBS-11 は *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の2菌種からなる複合バイオフィーム形成を有意に阻害したが、*P.*

gingivalis、*F. nucleatum*、*S. mitis* の3菌種からなる複合バイオフィルム形成は阻害しなかった。

【考察】

本研究の結果から、大豆由来ペプチド BCBS-11 が、歯周病原細菌である *P. gingivalis* および *F. nucleatum* に対して膜の脱分極と破壊によって殺菌的抗菌活性を示すことが明らかになった。この抗菌活性は、BCBS-11 が強いカチオン性と両親媒性を示し、さらに α -ヘリックスと β -シートを含む構造的特徴を有することによると考えられる。一般に膜を標的とした抗菌ペプチドの活性は、細菌膜の構造と脂質組成に影響される。*P. gingivalis* や *F. nucleatum* などのグラム陰性菌の外膜を構成するリポ多糖が、カチオン性ペプチドである BCBS-11 の静電的相互作用の標的となると推測される。一方、*S. mitis* をはじめとしたグラム陽性菌は厚いペプチドグリカン層を有し、強く陰性に荷電したタイコ酸が細胞壁表面に存在しているため、BCBS-11 が膜に作用できなかったと考えられる。

BCBS-11 が、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* それぞれのバイオフィルム形成を有意に阻害することが示された。しかし、成熟バイオフィルムの完全な除去は困難であった。一般的に強いカチオン性を持つ抗菌ペプチドは静電気力によってバイオフィルムの表面に付着する。BCBS-11 も強いカチオン性を示すため、バイオフィルム表面に付着し、深部への浸透が困難であったと考えられる。また、複数菌種を用いたバイオフィルムに対する阻害作用の検討においては、BCBS-11 は *P. gingivalis* および *F. nucleatum* の2菌種複合バイオフィルム形成を阻害したが、*S. mitis* を加えた3菌種複合バイオフィルム形成は阻害しなかった。このことは口腔内の多様な細菌からなるバイオフィルム形成を抑制するには、グラム陰性菌の阻害だけではなく、バイオフィルムの初期コロニー形成に関わるグラム陽性菌の制御も必要であることを示唆する。一方で、BCBS-11 の限定された狭い抗菌スペクトルは、常在菌に対する影響が少ない点と薬剤耐性菌の発生リスクの点において有利な特性と考えられる。BCBS-11 の細菌特異性と歯周病の病態に及ぼす影響についての検討が今後さらに必要である。

以上の結果から、歯周病の予防・治療におけるバイオフィルム制御に、大豆由来ペプチド BCBS-11 を応用できる可能性が示された。

【結論】

BCBS-11 は歯周病原細菌 *P. gingivalis* および *F. nucleatum* の膜を破壊することで殺菌的に作用し、これらの菌からなるバイオフィルム形成を阻害する。

審査結果の要旨

研究テーマの背景とテーマの妥当性については以下のとおりである。歯周病は、歯周組織の破壊とその後の歯の喪失を引き起こすバイオフィルム感染症である (Caton et al., 2018)。抗微生物薬は、バイオフィルムと戦うために、慣例的な機械的除去と併用して使用される (Socransky & Haffajee, 2002)。抗微生物薬に対する抵抗性は、世界的な健康問題として増加している (Willyard, 2017)。したがって、既存の抗生物質の使用を制限し、歯周病原性細菌に特異的なバイオフィルムを制御する代替方法を開発することが、効果的な歯周病治療を達成するために急務である。大豆由来のペプチド、BCBS-11 の浮遊性 *P. gingivalis* に対する抗菌活性が報告されるが (Taniguchi et al., 2017)、その抗バイオフィルム能については明らかになっていない。そこで、BCBS-11 の歯周病原性細菌に対する抗菌メカニズムと抗バイオフィルム効果を明らかにするという本研究の着想に至っている。

本研究の新規性、学術的意義と妥当性は以下のとおりである。大豆ペプチド BCBS-11 が膜に作用する抗菌ペプチドであり、主に細菌の代謝を標的とする既存の抗生物質よりも耐性菌を発生させる可能性が低いことが考えられる。さらに BCBS-11 は、CHX と比較して、歯周病原細菌に対する特異的な抗菌活性を有することが示された。BCBS-11 は、CHX と比較して、常在菌の一つである *S. mitis* に対しては抑制効果や殺菌活性を示さない。したがって、この特異性は大豆ペプチドの利点の一つと考えられる。さらに、BCBS-11 は、ヒト口腔上皮細胞に対する細胞毒性が低い。大豆ペプチドを用いたバイオフィルムの制御は、抗生物質の代替あるいは補助として、将来的に歯周病の予防に役立つ可能性がある。以上の事項に新規性を認める。

研究方法の妥当性は以下のとおりである。*S. mitis* ATCC 903、*P. gingivalis* FDC 381、および *F.*

nucleatum ATCC 25586 の株を使用した理由として、*S. mitis* ATCC 903 は、グラム陽性、好気性かつ通性嫌気性の微生物であり、バイオフィーム形成の研究に使用されるモデルとなる (Iwabuchi et al., 2021, Senpuku et al., 2019)。*S. mitis* は正常なフローラに存在し、これが平衡状態にあると健康効果をもたらすが、不均衡な状態、つまり細菌叢のバランスが崩れると、病原性細菌の成長を優位にする。この研究では、BCBS-11 の特異性を評価するために、BCBS-11 の歯周病原細菌に対する阻害作用と、正常フローラに対する阻害作用を検討した。*P. gingivalis* FDC 381 は、グラム陰性嫌気性桿菌であり、血液寒天上では黒色のコロニーを形成し、その増殖にはヘミンを必要とする。この株は歯周病の主要な病原体の一つであり、強いバイオフィーム形成能力を持つことから使用した (Kuboniwa et al., 2009)。*F. nucleatum* ATCC 25586 は、グラム陰性の嫌気性細菌であり、バイオフィーム形成の初期から中期にかけて重要な役割を果たすとされる (Kolenbrander et al., 2002)。この種は、初期のバイオフィーム形成に働く *S. mitis* と後期の *P. gingivalis* の間のブリッジングスピシーズとして存在する。したがって、*F. nucleatum* ATCC 25586 の使用は、バイオフィームの形成と成熟における種間相互作用を評価するために重要と考えられる。本研究ではこれらの特定の株を選択し、バイオフィーム形成能力、抗菌ペプチド耐性、および歯周病の病態に対する関与度を評価した。生きた細菌も PI で染色される可能性があるなかで PI 染色を用いて大豆ペプチドの抗菌活性を測定したことについては、MBCs の測定において寒天培地を使用してペプチド処理が細菌に対して殺菌作用を持つことを確認していることから、本実験系における抗菌活性の評価方法としては妥当であると考えられる。

考察の合理性については以下のとおりである。BCBS-11 はグラム陰性菌である *P. gingivalis* と *F. nucleatum* に対して強い抗菌活性を示したが、*S. mitis* に対しては抗菌活性を示さなかった。このことについて 2 菌種および 3 菌種の混合バイオフィームの結果を比較すると、*S. mitis* に対する抗菌活性が弱いため、BCBS-11 が 3 菌種混合バイオフィームの形成を阻害できなかったと考えられる。さらに、バイオフィーム中の細胞外多糖 (EPS) は、主に *S. mitis* のグリコシルトランスフェラーゼによって合成されるグルカンで構成されている。グルカンは、細菌同士、宿主細胞、無生物表面への細菌の付着を仲介するだけでなく、抗菌剤のバイオフィーム内細菌へのアクセスを防ぐ (Mah & O'Toole, 2001; Yadav et al., 2020)。また、細菌が産生する EPS は、抗菌ペプチドのバイオフィーム破壊効果に対しても耐性を示す。例えば陽イオン性の抗菌ペプチドのバイオフィーム活性は、陽イオン性、陰イオン性いずれの性質の EPS によっても阻害されることが報告されている (Batoni et al., 2016; Batoni et al., 2021)。また、EPS に作用する主要なペプチドは疎水性であるが (Batoni et al., 2016)、BCBS-11 のような疎水性の低い性質を持つペプチドが、EPS に作用するという報告は見当たらなかった。BCBS-11 がバイオフィーム阻害作用として、抗菌活性以外に EPS に対してどのような効果を持つかは不明であり、今後の研究の対象となる。したがって、グラム陽性菌を含む幅広い抗菌活性を示してバイオフィームをコントロールすることが望まれる際には、BCBS-11 を使用する利点は低い。本研究結果は、バイオフィーム形成を阻害するために初期の定着菌をコントロールする必要があることを示している。しかし、BCBS-11 の応用は病原細菌 *P. gingivalis* および *F. nucleatum* にのみ抗菌活性を示し、非病原細菌 *S. mitis* に対しては効果がないことから、ある種の解毒作用を目的とした新しいバイオフィームコントロール方法となりうる。口腔内ではすべての細菌を根絶することは不可能であり、既存の抗菌薬の使用により細菌叢が大きく変化することによる影響は明確でない。BCBS-11 のような狭域スペクトルの抗菌物質であるペプチドが病原性を有するグラム陰性細菌を選択的に抑制することが、歯周病の病的状態をどのようにコントロールするか、細菌叢にどのような影響を及ぼすのか、さらなる研究が必要である。タイプ I 系統の *P. gingivalis* を用いた本研究結果を踏まえ、異なる株に対する BCBS-11 の効果についての考察として、線毛 *fimA* のジェノタイプは、核酸配列の違いに応じて I から V および Ib の 6 つのグループに分類され、*P. gingivalis* の病原性と関連するとされる (Nakagawa et al., 2002)。先行研究では、アジスロマイシン、オフロキサシン、エリスロマイシンに対する MIC は、*P. gingivalis* の菌株間で類似していた (タイプ I の 381 株、タイプ II の HW24D1 株、タイプ III の 6/26 株、およびタイプ IV の W83 株)。しかし、抗菌ペプチドを用いた MIC の計測では株間で大きな違いを示した (Maezono et al., 2011)。細菌の膜成分は、特定の種または株に対する抗菌ペプチドの活性に直接影響を与える可能性があると考えられる (Malanovic &

Lohner., 2016; Lei et al., 2021)。したがって、BCBS-11の異なる細菌株への効果は、今後検証する必要がある。BCBS-11の抗菌、抗バイオフィルムメカニズムに関する考察については以下のとおりである。BCBS-11の抗菌メカニズムについては、BCBS-11の陽イオン性が膜の電位変化を誘導し、膜傷害性を示すことが明らかになった。BCBS-11がグラム陰性菌により効果を発揮した理由は、グラム陽性菌とグラム陰性菌では、膜の構造や厚さが異なるためと考えられる。一般に、膜標的抗菌ペプチドの抗菌活性は、細菌膜の構造と脂質組成に影響を受けることが報告されている。グラム陰性菌の外膜は、抗菌ペプチドによる静電的相互作用の標的となるリポ多糖を含む (Schmidtchen et al., 2014 ; Torres et al., 2018 ; Ulmschneider et al., 2014 ; Yin et al., 2012)。一方、グラム陽性菌は、厚いペプチドグリカン層を含む細胞壁を持ち、細胞壁表面には強い負電荷を帯びたテイコ酸が存在する。したがって、類似した構造を持つ他のグラム陰性菌に対しても、BCBS-11が抗菌活性とバイオフィルム阻害作用を示す可能性がある。また、BCBS-11と同様の性質を有する他のペプチドも、グラム陰性菌に対して同様に抗菌的作用を示す可能性がある。しかし、抗菌性を有するペプチドについてこれまでに多くの報告があるが、それらの性質は長さ、電荷、疎水性など多岐にわたり、その抗菌メカニズムもカーペット型、トロイダル孔型、バレルステープ型など様々である (Jarva et al., 2018; Shai et al., 2002)。したがって、それらの細菌特異性についてもまた多様であることが想定される。

本研究の今後の発展性については以下のとおりである。一般的にペプチドは化学的に不安定であり、消化酵素によって分解されうる (Yao et al., 2018)。熱処理されたBCBS-11はその抗菌活性を保持したが、ペプチドが唾液中のpHや酵素など、さまざまな要因によって分解される可能性があるため、投与方法に関するさらなる検討が必要である。また、ペプチド合成は高価であるため、大豆製品の加工過程で生じる産業廃棄物などを応用する可能性を検討する必要がある。本研究においては、口腔内の多様な細菌叢を模した実験モデルとして、複数種の細菌からなる複合バイオフィルムを用いた検討を行った。しかし、臨床的バイオフィルムは実験的バイオフィルムとは細菌叢の多様性や構成という点で異なるため、本研究で得られた結果が実際に臨床的に影響を及ぼすかどうかは現時点では不明である。また、本研究の結果としてBCBS-11が有効性を示した菌種が限られているため、臨床的にはごく限定された効果しか示さない可能性もある。したがって、ヒトの歯肉縁下バイオフィルムにBCBS-11ペプチドを応用するためには、このペプチドのような狭域スペクトルの抗菌性物質が実際にどのように病的状態を制御するのか、また臨床的細菌叢にどのような影響を与えるのかを調べるための更なる研究が必要である。

以上