

大豆レクチンの結合性を利用した歯周病予防法の開発

廣瀬まゆみ^{1,2*}・村井稔幸³・森田潤司⁴・中川敦史¹・鈴木 守¹・川島博人⁵・西村公雄⁴

¹大阪大学蛋白質研究所超分子構造解析学研究系 ²京都大学大学院農学研究科

³大阪大学大学院医学系研究科 ⁴同志社女子大学生活科学部食物栄養科学科

⁵静岡県立大学薬学部

Soybean Lectin-Mediated Drug Delivery: A Novel Method to Prevent Periodontal Diseases

Mayumi HIROSE^{1,2}, Toshiyuki MURAI³, Junji MORITA⁴, Atsushi NAKAGAWA¹,
Mamoru SUZUKI¹, Hiroto KAWASHIMA⁵ and Kimio NISHIMURA⁴

¹Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871

²Graduate School of Agriculture Kyoto University, Kyoto 606-8502

³Osaka University Graduate School of Medicine, Suita 565-0871

⁴Department of Food Science and Nutrition Faculty of Human Life and Science, Doshisha
Women's College of Liberal Arts, Kyoto 602-0893

⁵School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526

ABSTRACT

Dental plaque is composed of hundreds of different bacterial species within an organized structure, and its accumulation on teeth is one of the causes of periodontal diseases. *Porphyromonas gingivalis* is a predominant periodontal pathogen that expresses a number of potential virulence factors involved in the pathogenesis of periodontitis. FimA, a *P. gingivalis* fimbriae protein, interacts with $\alpha 5 \beta 1$ integrin on gingival epithelial cells of the host, and promotes both bacterial adhesion and invasion to the targeted sites. To date, it is difficult to completely eradicate periodontitis, partly because the anti-bacterial drugs to this pathogen cannot stay for a long time in the mouth. In the present study, we developed a novel method that enables efficient stay of a drug carrier on the mucosal surface of gingival epithelial cells. We first coated a resin with the soybean lectin, which binds to O-linked glycans of mucins, to make the resin efficiently bind to the surface of gingival epithelial cells. We also coated the resin with a fibronectin or the RGD peptide, together with the soybean lectin, in order to use the resin to block $\alpha 5 \beta 1$ integrin-mediated adhesion of bacterial FimA protein to gingival cells. As a result, the resin bound to the surface of gingival epithelial cells and blocked the

¹〒565-0871 吹田市山田丘3-2

²〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

binding of FimA efficiently. The new method described here should be useful for the development of an effective oral preventive medicine for the plaque. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 149-152, 2009.

Key words : soybean lectin, periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, FimA, integrin

歯周病とは、歯の周りに形成されるバイオフィルムであるデンタルプラーク（歯垢）に棲息する歯周病菌が惹起する慢性炎症病変である¹⁻³⁾。歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis*（以下 *P. gingivalis*）は最も病原性の強い病原菌と考えられており、その線毛は本菌の様々な病原性の発揮に関与していると考えられている。共同研究者である大阪大学・歯学部・天野敦雄教授は線毛サブユニットFimAをコードする遺伝子（*fimA*）の塩基配列の相違性に基づき *fimA* を6つの遺伝子多型（I, Ib, II, III, IV, V型）に分類しII型 *fimA* 遺伝子を持つ *P. gingivalis* と歯周炎との臨床的相関を成人歯周病患者⁴⁾、知的障害者⁵⁾やダウン症⁶⁾および2型糖尿病を有する歯周病患者において明らかにしてきた⁵⁾。すなわち、歯周病患者においては優位に2型 *fimA* 遺伝子を持つ *P. gingivalis* を保菌し、歯周病を発症し歯周炎が進行することを明らかにした。

また、天野教授はII型 *fimA* 遺伝子を持つ *P. gingivalis* のII型FimA線毛たん白質が上皮細胞の $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介して接着し上皮細胞に進入し細胞障害を引き起こすことを明らかにした。II型 *fimA* 遺伝子の線毛を持つ *P. gingivalis* と $\alpha 5\beta 1$ インテグリンとの結合親和性はII型 *fimA* 遺伝子以外の線毛を持つ *P. gingivalis* に比べ極めて高いことも明らかとなった。

現在、一度口腔内に感染した *P. gingivalis* の除去は困難と考えられており、II型 *fimA* 遺伝子を持つ *P. gingivalis* に感染した場合、将来歯周病を発症すると考えられている。そして、歯周病は罹患率が極めて高いが、本菌に対する薬剤を口腔内に長時間滞留させることが出来ないため、根治の難しい疾患である。現在のところ、歯周病のプラークコントロールは、機械的・化学的方法の二種類がある。機械的方法は、歯ブラシによるプラークの除去であり、化学的方法は、酵素剤や抗菌剤を含んだ液体によるものである。現在、歯周病の最善の予防策は歯ブラシによるブラッシングを行い歯垢を取り除くことである。つまり、あくまでもブラッシングなどの機械的プラークコントロールが必要と考えられている。また、現在の臨床治療では、歯周病の進行をいかに遅くするかに力が注がれている。

本研究では、口腔内の獲得被膜がムチン型糖タンパク質を主成分にすることに着眼し、ブラッシング効果を高める新規の歯磨き粉への新規の添加剤を検討考案した。すなわち、大豆レクチンなどはムチン型糖鎖に結合する代表的なレクチンたん白質である。これをドラックデリバリー担体として用いることにより、歯周病の病巣獲得被膜への滞留性を高め薬剤の効果を持続させると共に、FimA IIとインテグリンとの結合阻害を促進することで、プラークコントロールに効果的な経口予防剤を作製する事を目的とした。

方 法

フローサイトメトリー

$\alpha 5\beta 1$ インテグリンを強制発現させたCHO細胞および歯肉細胞の細胞表面上に $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが発現していることを抗 $\beta 1$ インテグリン抗体を用いてフローサイトメーターにて確認した。また、FimA IIが細胞に結合することをフローサイトメーターにて確認した。

大豆レクチンビーズ但体の作成

セファロースビーズに大豆レクチンを共有結合させる。その後、RGD-ペプチドあるいはフィブロネクチンを大豆レクチンビーズに共有結合させた。以下大豆レクチンのみのビーズをSBAビーズ、大豆レクチンとRGD-ペプチドを結合させたビーズをRGD-SBAビーズ、大豆レクチンとフィブロネクチンを結合させたビーズをF-SBAビーズと呼ぶ。

結合阻害実験 1

6穴プレートに細胞を播種し、FimA II-GST（阪大・歯学研究科・天野敦雄教授より供与）あるいは、FimA II型線毛を持つ *P. gingivalis*（阪大・歯学研究科・天野敦雄教授より供与）を結合させ、ここにSBAビーズ、RGD-SBAビーズ、F-SBAビーズを共存させ、プレートを揺らした。96穴プレートを緩やかに洗浄し、細胞に結合しているFimA II-GSTは抗GST抗体にて検出した。FimA II型線毛を持つ *P. gingivalis* は抗FimA II抗体で検出した。

結合阻害実験2

FimA-Hisを6穴プレートに固定し、蛍光標識した各種細胞を結合させた。ここにSBAビーズ、RGD-SBAビーズ、F-SBAビーズを共存させ、プレートを揺らした。6穴プレートを緩やかに洗浄し、結合している細胞を蛍光プレートリーダーにて検出した。

サイトカイン産生の確認

6穴プレートに細胞を播種し、FimA II-GSTあるいは、FimAII型線毛を持つ*P. gingivalis*を結合させ、ここにSBAビーズ、RGD-SBAビーズ、F-SBAビーズを共存させ、プレートを揺らした。6穴プレートを緩やかに洗浄し、細胞をさらに培養後、TGF β の産生量を測定した。

結果と考察

RGD-SBAビーズ、F-SBAビーズはFimAIIたん白質と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン発現細胞との結合を有意に阻害した。一方、SBAビーズはFimAIIたん白質と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとの結合に影響を与えなかった。

また、同様にRGD-SBAビーズ、F-SBAビーズはFimAII型線毛を持つ*P. gingivalis*と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン発現細胞との結合を有意に阻害した。一方、SBAビーズは*P. gingivalis*と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとの結合に影響を与えなかった。

さらに、FimAIIたん白質あるいはFimAII型線毛を持つ*P. gingivalis*と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン発現細胞との結合を阻害するとTGF β の産生量が低下した。

以上のことより、RGD-SBAビーズ、F-SBAビーズは、SBAを介して歯肉細胞上に留まることができ、効果的にFimAと $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとの結合を阻害できると考えられた。また、*P. gingivalis*の受容体は他にも報告があるが、TGF β の産生量が低下したことから、今回効率的に結合阻害および以降の感染阻害ができたことが確認できた。これは、*P. gingivalis*の感染初期の接着にFimAII型線毛たん白質と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとの相互作用が重要であることを示している。一方、SBAビーズ自体が歯肉細胞のムコ多糖と相互作用することにより、他の受容体との接着も阻害しているのかもしれない。

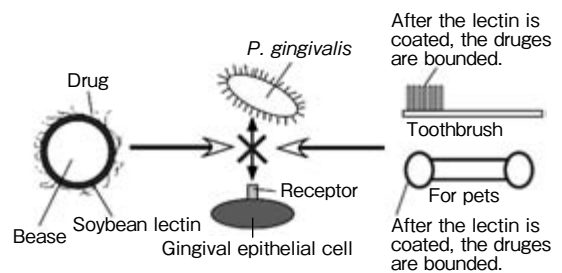


Fig. 1. Applications of soybean lectin-mediated drug delivery.

要 約

本研究において我々は、SBAビーズを用いたドラッグデリバリーのモデルとして歯周病菌*P. gingivalis*の受容体阻害を例に実験を行った。その結果、SBAビーズが口腔内でのドラッグデリバリー担体として効果的に働く可能性が示された。SBAビーズは歯周病菌などの口腔内疾病に対する化学的治療剤（酵素阻害剤や殺菌剤）のドラッグデリバリー担体として使用できる可能性がある (Fig. 1)。

近年、人の口腔内疾病のみならず、犬・猫などのペットの口腔内疾病も増加している。SBAビーズはペット用の口腔内ドラッグデリバリーとしても活躍できるかもしれない (Fig. 1)。

文 献

- 1) Socransky SS and Haffajee AD, (1994): Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 **5**, 7-25.
- 2) Socransky SS and Haffajee AD, (2005): Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 **38**, 135-87.
- 3) Slots J and Chen C (1999): The oral microbiota and human periodontal disease. In: Medical importance of the normal microflora., Ed: Tannock GW Kluwer Academic Publishers London.
- 4) Tamura K, Nakano K, Nomura R, Miyake S, Nakagawa I, Amano A and Ooshima T. (2005): Distribution of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in Japanese children and adolescents. *Journal of Periodontology* **76**, 674-679.
- 5) Amamo A, Nakagawa I, Okahashi N and Hamada N (2004): Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of periodont Reserch* **39**, 136-142.
- 6) Ojima M, Takeda M, Yoshioka H, Nomura M, Tanaka N, Kato T, Shizukushi S and Amano A (2005): Relationship of periodontal bacterium genotypic variation with periodontitis in type 2 diabetic patients. *Diabetes care* **28**, 433-434.