

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 口腔感染症への臨床応用を目的とした抗菌ペプチドの 定量系の確立

国立感染症研究所口腔科学部

江藤亜紀子

### 要旨

唾液中の種々の抗菌ペプチドは生体防御に重要な役割を果たしている。本研究では主にディフェンシンファミリーに着目し、唾液中の抗菌ペプチド分子の定量系の確立を試みた。その成果は、口腔感染症細菌や多薬剤耐性細菌への対策に有用であると考えられる。

### 1. 研究目的

本研究は、口腔感染症、特に齲蝕への臨床応用を目的として、唾液中の抗菌ペプチドの定量系を確立する。齲蝕と歯周病は歯の喪失をもたらす2大疾患であり、その予防は長寿社会においてはますます重要になると思われる。自分の歯を多数、より良い状態で残すことは、栄養摂取状態の向上と、質の高い生活のために必須であり、厚生労働省は80歳時に自分の歯を20本残すこと(8020)を努力目標に設置している。齲蝕はミュータンスレンサ球菌による口腔感染症であり、罹患せずに済む疾患であるにもかかわらず、決定的な齲蝕予防法は未だ確立されず、成人の齲蝕有病者率はほぼ100%である。本研究の成果はほぼ全ての人に還元され、また、医療費の削減にもつながるという点で社会的意義が高いものである。

抗菌ペプチドは自然免疫の重要な担い手であると同時に、臨床応用の可能性が注目されている分子である。唾液中にディフェンシン、キャセディシジン、ヒスタチンなどの抗菌ペプチドが発現しているが、発現調節の詳細や唾液中の濃度などについては不明な点が多い。本研究は、唾液中の抗菌ペプチドの中でも特にディフェンシンファミリーに着目し、その定量系を確立する。本研究によって確立された系を用いることにより、唾液中のディフェンシンの含有量を特異的かつ簡便に定量することが可能になる。その結果は、抗菌ペプチドの臨床応用に必須の知見を供すると考えられる。

### 2. 研究方法

#### 1) ペプチド合成

ディフェンシン、ヒスタチンの抗菌ペプチド、及び抗原とするその部分ペプチドは、マルチペプチドシンセサイザーを用いて F-moc 法により合成した。合成したペプチドは脱保護後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。

## 2) 抗菌ペプチドの活性の測定

精製した抗菌ペプチドの活性は、齶蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* などの口腔レンサ球菌に対する抗菌活性を Radial diffusion assay によって測定した。方法は Lehrer らの方法 (1991) に従った。

## 3) 抗原の作製、及び、免疫

抗原用のペプチドは精製後、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) を MBS 法により結合させた。ポリクローナル抗体の作製には、ウサギを用い、アジュバントと共に抗原ペプチドを免疫した。

## 4) 抗血清の調製と抗体の精製

ポリクローナル抗体はウサギを 2—3 ヶ月免疫後、採血を行った。抗血清の一部は抗原ペプチドを固定化したカラムでアフィニティー精製を行った。

## 5) 倫理面への配慮

動物を用いる実験は国立感染症研究所のガイドライン研究所の規定に従って行われた。

## 3. 研究成果

唾液中にディフェンシンファミリー、ヒスタチンファミリー、キャセディシディンなどの抗菌ペプチドが発現している。ディフェンシンファミリーは、構造の違いからさらにアルファディフェンシンとベータディフェンシンとに分類される。ヒトでは現在までにアルファディフェンシンが 6 分子 (HNP-1,-6)、ベータディフェンシンが 3 分子 (HBD-1, -3) 報告されており、これらのうち、少なくとも HNP-1,-3、HBD-1,-3 が唾液中に発現している (図 1)。口腔癌の患者で唾液中のディフェンシン量を測定した報告があるものの、特異性高くこれらの分子を認識し、かつ簡便に定量する系は確立されていない。そのためこれらの各分子の唾液中での濃度やその変化、あるいは機能の違いなどは不明である。

まず、ベータディフェンシン 2 (HBD-2) の全長のペプチド、アルファディフェンシン-1 (HNP-1)、ベータディフェンシン-1 (HBD-1)、HBD-2 の部分ペプチドを数種、合成した。HBD-2 は脱保護、精製の後、14 種の口腔レンサ球菌に対して抗菌活性を測定した。HBD-2 は合成できたものの、収率、活性ともに低かった。これは主に分子量の大きさが問題であると考えられ、合成方法を検討中である。

抗原ペプチドの配列は、各ファミリーの分子間のアミノ酸配列を比較し、各々に対して特異的な抗体を誘導するように決定した。本研究では、最終的に各分子に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、ELISA 法により簡便に唾液中の濃度を定量できる系を確立するが、各分子に対する特異抗体を誘導しうる抗原ペプチドを特定するため、まずウサギを用いポリクローナル抗体の作製、抗血清の調製、抗体の精製を行った。抗血清、及び精製抗体の性質は、ウェスタンブロット法などにより現在、解析中である。

#### 4. 考察

抗菌ペプチドは、それ自身が強い抗菌活性を有する自然免疫の重要な担い手である。口腔は外界に接し、呼吸、飲食とともに病原菌を含む多くの微生物が侵入するため、多種の抗菌ペプチドが発現し、生体防御の役割を果たしていると考えられる。これらのペプチドは違うファミリーに属するペプチド同士が協調して働いているとの報告もあり、この点を明らかにするためにも、各分子の定量化と発現調節の解析が必要と思われる。さらに、最近、抗菌ペプチド分子が獲得免疫へのメディエーターとして働いていると報告された。口腔や上気道領域の粘膜免疫と唾液中の抗菌ペプチドとの関連に興味もたれる。

抗菌ペプチドは生体物質であるので安全性が極めて高いと考えられ、臨床応用への期待が高い。低分子であることは大きな利点であるが、化学合成では収率がかなり低くなるので、酵母などを用いた発現系で産生させる方法も検討する必要がある。さらに、細菌の薬剤耐性の原因となりにくいという報告がでており、多薬剤耐性細菌への対応としても抗菌ペプチドへの機能に期待がかかる。

#### 5. まとめ

ディフェンシンをはじめとする抗菌ペプチドは臨床応用の期待の高い分子であり、口腔領域においてもその詳細な機能を明らかにするため、特異的で簡便な定量系の確立が重要である。

#### 6. 研究発表

投稿論文を準備中である。

	10	20	30	40	50	60
HNP-1	MRTLAILAAI	LLVALQAQAE	PLQARAD...	....EVAAAP	EQIAADIPEV	VVSLAWDESL
HBD-1	MRTSYLLLFT	LCLLLSEMAS	..GGNFLTGL	GHRSDHYNCV	SSGGQCLYSA	CPIFTKIQGT
HBD-2	MRVLYLLFSF	LFIFLMPLPG	VFGGIGDPVT	CLKSGAI.CH	PVF..CPRRY	.....KQIGT
	70	80	90	100	110	
HNP-1	APKHPGSRKN	MACYCRIPAC	IAGERRYGTC	IYQGRWLW AFC	C.....	
HBD-1	CYRGKAKCCK	.....	.....	.....	.....	
HBD-2	CGLPGTKCCK	KP.....	.....	.....	.....	

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社