

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05052

研究課題名(和文) 高付加価値型歯周炎ワクチン DNAオリガミとイミダゾキノリンによるIgA誘導

研究課題名(英文) Vaccines against periodontitis using DNA ORIGAMI and imidazoquinolines

研究代表者

多部田 康一 (KOICHI, TABETA)

新潟大学・医歯学系・研究准教授

研究者番号：20401763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：感染症である歯周炎におけるワクチンの有効性は示唆されているが、実際に応用可能なワクチンの開発にはこれまで至っていない。本研究において、粘膜免疫における分泌型IgA産生誘導を焦点に歯周炎ワクチン開発の可能性を検証した。その結果、核酸抗原様化合物であるイミダゾキノリン誘導体を介してケモカイン産生および濾胞性T細胞活性化が誘導され、分泌型IgA産生が促進された。これらのことから、核酸抗原をアジュバンドとした歯周炎ワクチン開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although the efficacy of vaccines against an infectious disease, periodontitis, has been suggested, it has not been applied in clinical practices. In this study, we examined the possibility of development of a vaccine to prevent/treat periodontitis focusing on induction of secretory IgA production via modulation of mucosal immunity. We found that, chemokine production and follicular T cell activation were induced by imidazoquinoline derivatives which are nucleic acid antigen-like compounds, and secretory IgA production was promoted. These findings suggested the possibility of developing a periodontitis vaccine using nucleic acid antigen as an adjuvant.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 ワクチン IgA PCSK9 核酸抗原

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は主要な歯の喪失原因であることに加え、動脈硬化症などの全身疾患リスクとなることが報告されており、日本国民におけるその高い罹患率の改善が必要とされる。宿主(患者)が疾患抵抗性を獲得することは持続的な歯周炎罹患予防と再発抑制に大きなアドバンテージがあり、それを実現する方法の一つとしてワクチネーションが挙げられる。感染症である歯周炎におけるその有効性が古くから示唆されているが、実際に応用可能なワクチンの開発にはこれまで至っていない。特に、歯周炎患者において歯周病原細菌に対する IgG 抗体価は上昇しているが、IgA 抗体価の上昇は認められない(Plombas M et al, J Periodontol. 2002)。このことから粘膜免疫における IgA 誘導を焦点に歯周炎の発症予防、再発抑制を目指すコンセプトは公衆衛生学的にも臨床現場においてもその合理性は極めて高いと考える。さらに、すでに日本が直面する超高齢社会における誤嚥性肺炎への対策は今後、経済発展を経た国々で爆発的増加をもって直面する課題であり、唾液中の分泌型 IgA を効果的に誘導し、免疫機能を獲得することの波及効果は大きい。

申請者はこれまで細菌感染、ウイルス感染における核酸抗原認識が獲得免疫の誘導に重要であり、I 型インターフェロン産生を介したアジュバント作用について報告している(Nature 2003, Science 2006, PNAS 2004)。これらの検討で作製した核酸抗原不応答性マウス 3d (Nature Immunology 2006)を用いた予備検討において、細菌感染においては血清中 IgA 産生が抑制されることを確認している。さらに、Toll like receptor 7 (TLR7)を介して獲得免疫を効率的に誘導する核酸抗原様化合物であるイミダゾキノリン誘導體(R848)を野生型マウスに経口投与したことで IgA 抗体産生が誘導されることから、核酸抗原を介したシグナル伝達が IgA 抗体産生誘導に効果的であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

核酸抗原認識を介した IgA 高産生アジュバントによる新世代高付加価値型歯周炎ワクチン開発の可能性を検討する。また、歯周炎続発性全身疾患(動脈硬化性疾患)に対するそれらの抑制効果を検証する。

## 3. 研究の方法

歯周病原細菌に対して効果的に IgA 産生を誘導する新しいアジュバントを用いた核酸医薬の作用を、動物モデルと細胞モデルで検証するものであり、以下の計画を立案した。

(1)イミダゾキノリン誘導體(核酸抗原様化

合物)をアジュバントとした IgA 誘導効果の検証

(2)作製したワクチンの歯周炎予防と核酸医薬としての歯周炎抑制効果の検討

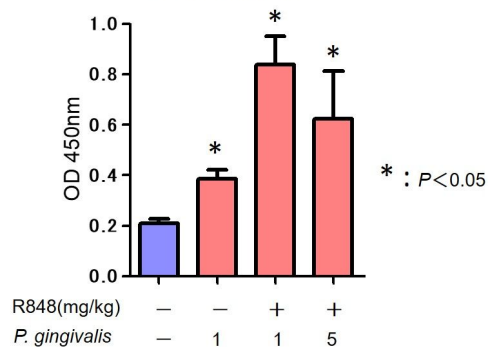
(3)DNA オリガミ体とイミダゾキノリン誘導體による IgA 産生誘導メカニズムについて *in vivo* および *in vitro* での解析

(4)ワクチネーション・核酸抗原アジュバントの応用による動脈硬化症に対する抑制効果の検討

## 4. 研究成果

まず、実験系の確立とコンパウンドの至適濃度を検証する目的で、C57BL/6(野生型)マウスを用い、イミダゾキノリン誘導體(R848)をアジュバントとして、不活化抗原 *P. gingivalis* W83 を用いたワクチネーションによる血清中の IgA 誘導能を評価した。Day0、Day7、Day14 の3回の抗原・アジュバント投与後 Day21 に血液、唾液、糞便の外分泌液検体を採取し、IgA レベルを ELISA 法にて評価を行った。その結果、イミダゾキノリンの投与により抗原特異的 IgA の産生が誘導されることを確認した(図1)。また、IgA 産生レベルはイミダゾキノリン 1 mg/kg が最も高く、それを至適濃度とした。さらに、顎下腺中 IgA 産生が 1mg/kg、糞便中 IgA は 5mg/kg のイミダゾキノリン濃度で誘導されることから、イミダゾキノリンがより効果的に唾液線からの IgA 産生を誘導することが明らかになった。

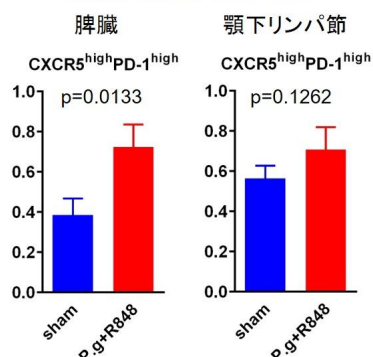
(図1) R848と *P. gingivalis* の経口投与による特異的血清 IgA の産生



次に、唾液線と小腸における抗体産生に関与すると考えられる各種遺伝子発現の解析を行ったところ、CCL5、CCL8 といったケモカインの発現プロファイルに大きな変化が認められた。また、獲得免疫による抗体産生に関わることが報告されている濾胞性 T 細胞のプロファイルをフローサイトメトリーにて解析を行ったところ、イミダゾキノリン経口投与によって、各主要免疫組織における濾胞性 T 細胞数の増加が確認された(図2)。これらの結果より、イミダゾキノリンが CCL5、CCL8 といったケモカイン産生誘導

と濾胞性 T 細胞の活性化を行う結果、抗体産生が促進されることが示唆された。

(図2) R848と*P. gingivalis* の経口投与による濾胞性T細胞プロファイル



その後、本プロジェクトを更に発展させる目的で、テキサス大学サウスメディカルセンターBruce Beutler 研究室との国際共同研究が開始された。ENU ミュータジェエネシスの手法を用いて、血清 IgA 高産生マウス (Hygia, Luna) 低産生マウス (Tuberose) 唾液中分泌型 IgA 高産生マウス (Yummy) をスクリーニングにおいて発見した。フェノタイプ解析と原因遺伝子の同定、CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウトマウスの作製を行った。その結果、分泌型 IgA 高産生マウス (Yummy) については新規の責任遺伝子を確認した。

また、歯周炎ワクチンと動脈硬化性疾患の関連に着目する中で、動脈硬化関連分子で LDL レセプター分解酵素として炎症と脂質代謝変動を制御する分子 PCSK9 の産生誘導に、イミダゾキノリンを含む核酸抗原が作用することを新しい知見として得た。これについては核酸抗原をアジュバンドとして用いた際の作用・副作用としての観点に加えて、感染において LDL コレステロールが変動する機構は未だ明らかでないことから詳細な検討を要すると考えられた。そのため、当初の計画に関連する中で計画修正を行い、PCSK9 分子を軸にした分子機構の発展的解析を行った。核酸抗原不応答マウスを用いて歯周病細菌感染による PCSK9 産生誘導能を検討した結果、核酸抗原が TRIF 分子に非依存的に PCSK9 産生を誘導し、その下流で TNF- $\alpha$  は PCSK9 を直接誘導せずに LDL レセプターの発現に影響を与えるという知見を得た。さらに、ヒト試料の解析では、PCSK9 の血中濃度と歯周炎罹患の関連を確認し、血中 PCSK9 のバイオロジカルマーカーとしての有用性を報告した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

- (1) Tabeta K, Hosojima M, Nakajima M, Miyauchi S, Miyazawa H, Takahashi

N, Matsuda Y, Sugita N, Komatsu Y, Sato K, Ishikawa T, Akiishi K, Yamazaki K, Kato K, Saito A, Yoshie H. Increased serum PCSK9, a potential biomarker to screen for periodontitis, and decreased total bilirubin associated with probing depth in a Japanese community survey. J Periodontol Res. 2018 Jun;53(3):446-456. doi: 10.1111/jre.12533. 査読有り.

- (2) Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. Nagai K, Domon H, Maekawa T, Oda M, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, Arai Y, Yokoji M, Tabeta K, Habuka R, Saitoh A, Yamaguchi M, Kawabata S, Terao Y. Cell Immunol. 2018 Mar;325:14-22. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.006. 査読有り.
- (3) Sakaue Y, Takenaka S, Ohsumi T, Domon H, Terao Y, Noiri Y. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: an in vitro study. BMC Oral Health. 2018 Mar 27;18(1):52. doi: 10.1186/s12903-018-0517-3. 査読有り.
- (4) Tabeta K, Du X, Arimatsu K, Yokoji M, Takahashi N, Amizuka N, Hasegawa T, Crozat K, Maekawa T, Miyauchi S, Matsuda Y, Ida T, Kaku M, Hoebe K, Ohno K, Yoshie H, Yamazaki K, Moresco EMY, Beutler B: An ENU-induced splice site mutation of mouse Colla1 causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue. Sci Rep. 2017 Sep 15;7(1):11717. doi: 10.1038/s41598-017-10343-9. 査読有り.
- (5) Kido J, Murakami S, Kitamura M, Yanagita M, Tabeta K, Yamazaki K, Yoshie H, Watanabe H, Izumi Y, Suda R, Yamamoto M, Shiba H, Kurihara H, Fujita T, Mizuno M, Mishima A, Kawahara N, Hashimoto K, Naruishi K, Nagata T: Useful immunochromatographic assay of calprotectin in gingival crevicular fluid for diagnosis of diseased sites in patients with periodontal diseases. J Periodontol. 2017 Sep 6:1-19. doi: 10.1902/jop.2017.170206. 査読有り.
- (6) Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda

- Y, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, Kondo N, Endo N, Yamamoto R, Noiri Y, Ohno H, Yamazaki K. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Sci Rep*. 2017 Jul 31;7(1):6955. doi: 10.1038/s41598-017-07196-7. 査読有り.
- (7) Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, de Jong PR, Bertin S, Tabeta K, Yamazaki K. Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. *Sci Rep*. 2016 Jul 8;6:29294. doi: 10.1038/srep29294. 査読あり.
- (8) Nakajima T, Okui T, Ito H, Nakajima M, Honda T, Shimada Y, Tabeta K, Akazawa K, Yamazaki K. Microbiological and Clinical Effects of Sitafloxacin and Azithromycin in Periodontitis Patients Receiving Supportive Periodontal Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan 4;60(3):1779-87. doi: 10.1128/AAC.02575-15. 査読有り.
- (9) Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, Furuichi Y, Fujii T, Mori M, Kunimatsu K, Shimauchi H, Ogata Y, Yamamoto M, Nakagawa T, Sato S, Ito K, Ogasawara T, Izumi Y, Gomi K, Yamazaki K, Yoshie H, Fukuda M, Noguchi T, Takashiba S, Kurihara H, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Sakagami R, Hara Y, Noguchi K, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Ohmae M, Koizumi H, Watanuki M, Murakami S: Randomized placebo-controlled and controlled non-inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in intrabony defects. *J Bone Miner Res*. 2016 Apr;31(4):806-14. doi: 10.1002/jbmr.2738. 査読有り.
- (10) de Jong PR, Taniguchi K, Harris AR, Bertin S, Takahashi N, Duong J, Campos AD, Powis G, Corr M, Karin M, Raz E: ERK5 signalling rescues intestinal epithelial turnover and tumour cell proliferation upon ERK1/2 abrogation. *Nat Commun*. 2016 May 17;7:11551. doi: 10.1038/ncomms11551. 査読あり.
- (11) Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Matsuda Y, Sato K, Takahashi N, Nakajima T, Yamazaki K. Brazilian propolis mitigates impaired glucose and lipid metabolism in experimental periodontitis in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Aug 30;16(1):329. doi: 10.1186/s12906-016-1305-8. 査読あり.
- (12) Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodontal Res*. 2016 Oct;51(5):639-46. doi: 10.1111/jre.12344. 査読あり.
- (13) Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, Ohno H, Yamazaki K. Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. *PLoS One*. 2015 Jul 28;10(7):e0134234. doi: 10.1371/journal.pone.0134234. 査読あり.
- 〔学会発表〕(計25件)
- (1) Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yokoji M, Sulijaya B, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K: Beneficial role of a microbial metabolite on gingival epithelial barrier. The 65th Annual Meeting of the JADR, Tokyo, November 18, 2017.
- (2) 佐藤圭祐, 高橋直紀, 中島麻由佳, 松田由実, 山田実生, 横地麻衣, 中島貴子, 山崎和久: Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析. 第147回日本歯科保存学会秋季学術大会, 盛岡, 2017年10月27日, プログラムおよび講演抄録集: 56頁, 2017.
- (3) 野中由香莉, 多部田康一, 横地麻衣, 松田由実, 山崎和久, 吉江弘正: 米由来抗菌ペプチドの歯周炎モデルマウスにおける抗炎症作用の検討. 第60回春季日

本歯周病学会学術大会, 福岡, 2017年5月12-13日, 日本歯周病学会会誌 第59巻春季特別号: 28頁, 2017.

- (4) Yamazaki K, Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Yamazaki K, Nakajima T, Ohno H: Periodontopathic bacteria increases the severity of collagen-induced arthritis by affecting gut microbiota. PgMelbourne2017, Melbourne, May 15, 2017.
- (5) Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Tabeta K, Yamazaki K, Maeda T: Neuronal TRPV1 activation inhibits alveolar bone resorption via neuropeptide release. 95th General Session & Exhibition of the IADR, San Francisco, CA, 2017. 3. 22-25. Abstracts & Program book: no2229, 2017.
- (6) Takahashi N: Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by suppressing osteoclastogenesis via CGRP. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Koh Samui, Thailand, 2017. 2. 11-13, Abstracts & Program book: 40, 2017.
- (7) 高橋直紀, 松田由美, 佐藤圭祐, 多部田康一, 前田健康, 山崎和久: 実験的歯周炎モデルマウスの歯槽骨吸収における TRPV1 チャネルタンパクの関与. 第23回日本歯科医学会総会, 福岡, 2016. 10. 21-23, 日歯医師会誌, 69(5): 487, 2016.
- (8) 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 多部田康一, 山崎和久, 前田健康: カプサイシン受容体 TRPV1 の活性化が歯槽骨吸収におよぼす影響. 第59回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2016. 10. 6-8, 日歯周誌 58 秋季特別: 124, 2016.
- (9) Sato K, Takahashi N, Nakajima M, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Ohno H, Yamazaki K: Periodontopathic bacteria increases the risk of rheumatoid arthritis by affecting gut immune system. International Congress of Immunology 2016, Melbourne, August 21-26, 2016.
- (10) 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 多部田康一, 吉江弘正, 山崎和久: TRPV1 受容体の活性化は神経ペプチド産生を介して歯槽骨吸収を抑制する. 第144回日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会, 栃木, 2016. 6. 9-10, プログラムおよび講演抄録集: 65, 2016.
- (11) 松田由実, 高橋直紀, 中島麻由佳, 佐藤圭祐, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: 結紮誘導歯周炎 モデルマウスにおける全身への影響とそのメカニズムの解析. 第49回新潟歯学会総会, 新潟, 2016年4月23日, プログラム・抄録集: 10頁, 2016.
- (12) 佐藤圭祐, 高橋直紀, 中島麻由佳, 松田由実, 山田実生, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久, Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析. 第59回春季日本歯周病学会学術大会, 鹿児島, 2016年5月20-21日, 日本歯周病学会会誌 第58巻 春季特別号: 116頁, 2016.
- (13) 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 多部田康一, 吉江弘正, 山崎和久: TRPV1 受容体の活性化は神経ペプチド産生を介して歯槽骨吸収を抑制する. 第144回日本歯科保存学会春季学術大会, 宇都宮, 2016年6月9-10日, 学術大会プログラムおよび講演抄録集: 65頁, 2016.
- (14) 松田由実, 皆川高嘉, 高橋直紀, 佐藤圭祐, 横地麻衣, 山田実生, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: 外傷性咬合により誘導される歯槽骨吸収に対する Resveratrol の影響. 第144回日本歯科保存学会春季学術大会, 宇都宮, 2016年6月9-10日, 学術大会プログラムおよび講演抄録集: 27頁, 2016.
- (15) 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 多部田康一, 山崎和久, 前田健康: カプサイシン受容体 TRPV1 の活性化が歯槽骨吸収におよぼす影響. 第59回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2016年10月7-8日, 日本歯周病学会会誌 第58巻秋季特別号: 124頁, 2016.
- (16) 野中由香利, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: コメ由来抗菌ペプチドの抗炎症作用と創傷治癒作用の解析. 第59回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2016年10月7-8日, 日本歯周病学会会誌 第58巻秋季特別号: 121頁, 2016.
- (17) 山田実生, 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: 口腔細菌脂質代謝に由来する機能性脂肪酸 HYA は歯肉上皮バリア機

能の低下を抑制する. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟, 2016 年 10 月 7-8 日, 日本歯周病学会会誌 第 58 巻秋季特別号: 112 頁, 2016.

- (18) 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 多部田康一, 前田健康, 山崎和久: 実験的歯周炎モデルマウスの歯槽骨吸収における TRPV1 チャネルタンパクの関与. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡, 2016 年 10 月 21-23 日, プログラム・抄録集: 127 頁, 2016.
- (19) 横地麻衣, 多部田康一, 宮沢春菜, 野中由香利, 高橋直紀, 松田由実, 佐藤圭祐, 山田美生, 伊藤晴江, 中島貴子, 山崎和久. 細菌抗原による PCSK9 産生の誘導機構. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 松本, 2016 年 10 月 27-28 日, 学術大会プログラムおよび講演抄録集: 145 頁, 2016.
- (20) 佐藤圭祐, 高橋直紀, 中島麻由佳, 松田由実, 山田実生, 横地麻衣, 多部田康一, 中島貴子, 山崎和久: Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析. 平成 28 年度新潟歯学会第 2 回例会, 新潟, 2016 年 11 月 5 日, プログラム・抄録集: 13 頁, 2016.
- (21) Sato K, Takahashi N, Matsuda Y, Yamazaki K: Effects of Prevotella intermedia administration on systemic inflammation in mice. 11th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Bali, Indonesia, October 8-9, 2015.
- (22) Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Yamada H, Tabeta K, Yamazaki K: Neuronal TRPV1 prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis mice model. 11<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Bali, Indonesia, October 8-9, 2015.
- (23) Takahashi N, Matsuda Y, Sato K, Tabeta K, Yamazaki K: Neuronal TRPV1 activation regulates alveolar bone resorption by osteoclasts via CGRP. 63rd Annual meeting of JADR, Fukuoka, October 30, 2015.
- (24) Matsuda Y, Minagawa T, Okui T, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K: Effect of Resveratrol on alveolar bone loss induced by the experimental occlusal trauma in mice: 63rd Annual

meeting of JADR, Fukuoka, October 30, 2015.

- (25) 中島麻由佳, 有松 圭, 高橋直紀, 皆川高嘉, 松田由実, 佐藤圭祐, 中島貴子, 多部田康一, 山崎和久: Porphyromonas gingivalis 経口単回投与によるマウス腸内細菌叢の変動. 第 48 回新潟歯学会総会, 新潟市, 2015 年 4 月 18 日, 新潟歯学会抄録 45 巻 第 1 号: 26 頁, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
多部田 康一 (TABETA, Koichi)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 20401763
- (2) 研究分担者  
寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 50397717
- 高橋 直紀 (TAKAHASHI, Naoki)  
新潟大学・医歯学総合研究科・特任講師  
研究者番号: 80722842
- (3) 連携研究者  
山崎 和久 (YAMAZAKI, Kazuhisa)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 00182478