

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2008～2009
 課題番号： 20890123
 研究課題名(和文) 高齢者に有効な歯周病ワクチンの効能
 研究課題名(英文) Periodontitis vaccine effectiveness for elderly
 研究代表者 関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：70506344

研究成果の概要(和文)：高齢者に有効な歯周病ワクチンの効能をみることを目的とした。通常の経鼻粘膜ワクチン(CT)では1年齢マウスに対しては有効でも、2年齢マウスでは効果が得られなかった。しかしながら Flt3 ligand cDNA 及び CpG ODN を経鼻ワクチンとして使用すると抗原特異的な抗原抗体反応を誘導することができた。またその作用機序には NALT の樹状細胞が大きな役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this investigation was to determine the efficacy of periodontitis vaccine for elderly. Our previous studies showed that nasal immunization induced mucosal immune responses in aging mice (one-year old) but not in aged (two-year old) mice when cholera toxin (CT) was employed as a nasal adjuvant. However, NALT DC-targeting mucosal adjuvants such as plasmid Flt3 ligand (pFL) and CpG ODN successfully induced antigen (Ag)-specific S-IgA Ab responses in aged mice. NALT DCs played an important role in this functional mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,380,000	414,000	1,794,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,580,000	774,000	3,354,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：高齢者・歯周病・ワクチン・樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

粘膜アジュバントFlt3 ligand cDNA及び CpG ODNの有効性、またその抗体誘導の作用機序において樹状細胞が大きな役割を果た

していることが示唆されている。しかしながら加齢マウスにおいても同様の効果が得られるのか、また歯周病に対して有効な対抗手

段となりうるのかという知見はなかった。

2. 研究の目的

本研究では歯周病感染下で老化に伴う免疫応答や免疫担当細胞の変化を、全身系および粘膜系から解析した。また樹状細胞をターゲットにしたアジュバント、すなわち高齢者に有効な歯周病ワクチンを使用することで生体防御反応を誘導維持した。またその作用機序の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 加齢が生体に及ぼす影響を調べた。非特異的抗体の産生をELISA法で確認した。またコレラトキシン(CT)をアジュバント、OVAを抗原とし経鼻免疫を行い、抗原特異的抗体の分泌を比較した。さらに、IgAスイッチングに関与する遺伝子群の解析を行った。

(2) アポリポタンパク E ノックアウトマウスを用いて高脂肪食投与群と非投与群、*P. gingivalis*感染群と非感染群の計4群を比較し、血液中の炎症性サイトカイン濃度と動脈硬化形成の差を検討した。

(3) *F. nucleatum* 表層タンパク質 FomA を抗原、CT をアジュバントとして C57BL/6 に経鼻免疫を行った。粘膜外分泌液の抗体レベルをELISA法で測定した。また鼻腔粘膜、NALT、顎下腺における抗体作成細胞をELISPOT法で測定した。

(4) スタセリン被覆された *F. nucleatum* のバイオフィーム形成の阻害実験を行った。非免疫群、FomA 単独免疫群及びCT と FomA 免疫群の唾液や YQPVE ペプチドなどを用いた。*F. nucleatum* とそれら溶液を3時間インキュベーションした後、スタセリン被覆したプレ

ートに加えた。その後バイオフィーム形成の評価を行った。

(5) Flt3 ligand cDNA 及び CpG ODN をアジュバント、OVA を抗原とし経鼻免疫を行い、抗原特異的抗体の分泌を6-8週齢、1年齢、 ≥ 2 年齢のBALB/cを用いて比較した。

(6) 6-8週齢のBALB/cマウスの脾臓、パイエル板、NALTからDCsを分離しOVA(1mg/ml)存在下で培養した。培養時にFlt3 ligand及びCpG ODNを加えたものを実験群とし、RPMIを加えたものを対照群とした。24時間後培地からFlt3 ligand及びCpG ODNを除去し、D011.10の脾臓から分離したCD4⁺ T細胞を加え培養し、3日目に細胞増殖の検討を行った。さらに同実験を加齢マウスに対しても行った。

4. 研究成果

(1) 非特異的な抗体産生は老化マウス群($\geq 1y$)が若年成体マウス群(6-8w)と比較して多かった。一方、抗原特異的抗体誘導能は、老化マウス群は若年成体マウス群比較して著しく低かった。また老化マウス群はIgAスイッチングに関与する遺伝子発現の低下が認められた。

(2) 高脂肪食投与・*P. gingivalis* 感染群において最も強い炎症性サイトカインであるTNF α および IL6 の上昇が確認された。また同群において最も動脈硬化の傾向がみられた(図1)。

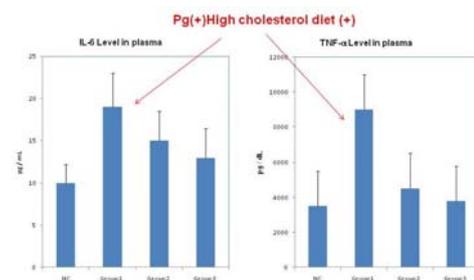


図1

(3) 鼻腔洗浄液・唾液中における、抗原特異的抗体価は CT を用いて免疫した群が、コントロール群と比較して優位に高かった。

また鼻腔粘膜、NALT、顎下腺における IgA および IgG 抗体作成細胞は有意に免疫群が多かった。

(4) CT・FomA 免疫群の唾液が著しくバイオフィルム形成を阻害した(図2)。

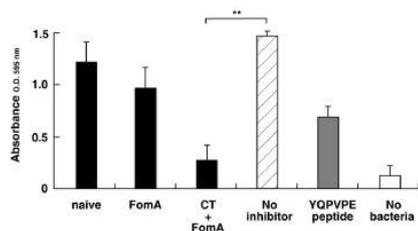


図2

(5) 老化マウス(≥1y)に対しても若年(6-8w)に匹敵する抗体価の上昇を認めることが出来た。

(6) 対照群と比較して実験群の DCs は著明な細胞増殖誘導能を示した。またその誘導能は免疫誘導組織であるパイエル板及び NALT において強い傾向を認めた。

加齢に伴いパイエル板及び脾臓 DCs はその能力が著しく減少したが、NALT 由来 DCs は減少傾向を示したものの高いレベルを維持した(図3)。

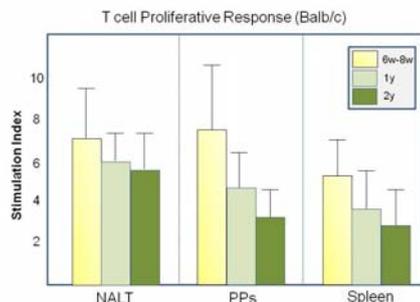


図3

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2件)

①Nakagaki, H. Sekine, S., Terao, Y., Toe, M., Tanaka, M., Ito, H. O., Kawabata, S., Shizukuishi, S., Fujihashi, K. and Kataoka, K., *Fusobacterium nucleatum* envelope protein FomA is immunogenic and binds to the salivary statherin-derived peptide. *Infection and Immunity*, 査読有, 78, 2010, 1185-1192

②Nishida, N., Tanaka, M., Sekine, S., Takeshita, T., Nakayama, K., Morimoto, K. and Shizukuishi, S. Association of ALDH2 genotypes with periodontitis progression. *Journal of Dental Research*, 査読有, 89, 2010, 138-142

[学会発表] (計10件)

①Sekine, S. Sasaki, M. Fukuyama, Y. Kobayashi, R. Asanuma, H. Kataoka, K. Gilbert, R. Shizukuishi, S. Fujihashi, K. Antigen Presenting Cell Function of NALT DCs Is Maintained in Aged Mice. 第39回日本免疫学会, 2009 Dec 2-4, Osaka

②Fukuyama, Y. Sekine, S. Kobayashi, R. Gilbert, R. Fujihashi, K. CCR5- and CCR6-Positive Dendritic Cells Play A Central Role In Adenovirus Expressing Flt3 Ligand Induced Mucosal S-IgA Ab Responses. 第39回日本免疫学会, 2009 Dec 2-4, Osaka

③関根伸一, 佐々木美香, 片岡宏介, 岩崎未央, 橋野恵衣, 東江正裕, 雫石聡 粘膜アジュバントとして用いた Flt3 ligand cDNA

及び CpG ODN の免疫誘導能解析. 58th 日本口腔衛生学会・総会, 2009 Oct 9-11, Gifu

④ Sekine, S. Tanaka, M. Iwasaki, M. Toe, M. Hashino, E. Kataoka, K. Fujihashi K. and Shizukuishi, S. High-cholesterol diet accelerates inflammatory cytokine production in apolipoprotein E-null mice infected with *Porphyromonas gingivalis*. 14th ICMI, 2009 July 5-9, Boston, USA

⑤ Zamri, N. Asanuma, H. Sekine, S. Kurata, T. Sata, T. Tamura, S. and Fujihashi, K. Nasal Influenza Vaccine Combined with CpG-ODN and pFL as Mucosal Adjuvant Induces Two Subsets of Dendritic Cells for Th1- and Th2-type Cytokine Responses. 14th ICMI, 2009 July 5-9, Boston, USA

⑥ Markham, J. Fukuyama, Y. Sekine, S. Gilbert, R. L and Fujihashi, K. Adenovirus-FLT3 Induces DC-Mediated CD4⁺ T Cell-Activation for Salivary S-IgA Responses. 87th IADR April 2nd 2009 Miami, USA

⑦ Sekine, S. Fukuyama, Y. Kataoka, K. Fujihashi, K. Kobayashi, R. Davydova, J. Yamamoto, M. McGhee, J. R. Shizukuishi, S. and Fujihashi, K. NALT CD11b⁺ dendritic cell migration and balanced Th1- and Th2- cytokine responses induce antigen-specific immunity. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 Dec. 1-3, Kyoto

⑧ Kataoka, K. Fujihashi, K. Sekine, S. Fukui, M. Kawabata S. McGhee, J. R. Ito H. and Fujihashi, K Mucosal DCs Activated by

Nasal Cholera Toxin Induce Innate B1-B Cells to Undergo IgA CSR. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 Dec. 1-3, Kyoto

⑨ 片岡宏介, 関根伸一, 福井誠, 金川裕子, Tselmeg Baartarjav, 伊藤寛夫 粘膜アジュバント・コレラ毒素の経鼻投与は唾液腺 B1-B 細胞の IgA クラススイッチングを誘導する, 粘膜アジュバント・コレラ毒素の経鼻投与は唾液腺 B1-B 細胞の IgA クラススイッチングを誘導する. 第 57 回日本口腔衛生学会・総会, 2008 Oct 3, Saitama

⑩ 片岡宏介, 関根伸一, 東江正裕, 田中宗雄, 福井誠, 伊藤寛夫, 雫石聡, 金属特異的結合唾液タンパク質の同定. 第 19 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会, 2008 Jun 22, Tokushima

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 70506344