

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03856

研究課題名(和文) 舌下ワクチンによる老化粘膜免疫回復：歯周病と動脈硬化の予防と治療

研究課題名(英文) Rejuvenation of mucosal immunosenescence by the sublingual vaccine: The prevention and treatment for periodontal disease and arteriosclerosis

研究代表者

藤橋 浩太郎 (Fujihashi, Kohtarō)

千葉大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：50820354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜ダブルシグナルシステム(CpG ODN/Flt3リガンドDNAプラスミド)を用いた高齢者のための舌下ワクチンの開発を目的とし、歯周病菌であるPorphyromonas gingivalisの表面抗原(OMP40)とともに舌下免疫を行ったところ、OMP40特異的、唾液中SIgA、血清中IgG抗体を誘導できることが明らかとなった。同様に高齢マウスに舌下ワクチン投与することにより、抗原特異的抗体価の上昇が認められた。舌下ワクチンを投与したマウスを用いてP. gingivalisによる感染実験を実施したところ、舌下ワクチン投与群は、非投与群に比べて骨吸収が抑制されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要原因菌の1つであるP. gingivalis口腔感染症としての歯周病は、動脈硬化、リウマチ、誤嚥性肺炎、糖尿病など様々な全身系疾患の引き金となると報告されており、加齢による口腔感染症に対する免疫力の低下は高齢者に重篤な健康被害を引き起こす。そこで、高齢者の口腔内局所とそれに関連する全身系の両方の疾患を予防・治療する有効な対策の開発が求められている。経口・経鼻免疫に代表される粘膜免疫法は粘膜局所と全身系に二段構えのバリアを構築することができ、歯周病と全身疾患の予防に有効と考えられ、高齢者の生活質を向上に貢献し、健全な健康長寿社会を構築・維持することはできる。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent periodontal disease and its-associated diseases including arteriosclerosis and aspiration pneumonia for the elderly, we aimed to develop a sublingual vaccine using outer membrane protein from Porphyromonas gingivalis as a vaccine antigen. Mice have sublingually immunized with OMP40 plus CpG ODN and plasmid Flt3 ligand plasmid as a mucosal adjuvant. The vaccinated mice showed increased levels of OMP-specific salivary IgA and serum IgG antibody responses. Similarly, when aged mice (>18 month-old) were given the sublingual vaccine, these mice showed elevated levels of OMP-specific antibody responses in serum and saliva. Importantly, when mice given a sublingual vaccine were infected with P. gingivalis, reduced levels of periodontal bone loss were observed. These results indicate that the OMP40-based sublingual vaccine is a potent strategy for the prevention of periodontal disease-associated systemic diseases.

研究分野：粘膜免疫・粘膜ワクチン

キーワード：舌下ワクチン 歯周病 老化 抗原特異的IgA サイトカイン 歯槽骨吸収

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において全身系のみならず口腔の健康を保つことが、高齢者の生活資質を向上させ延いては健全な健康長寿社会を構築・維持する要となる。主要原因菌の1つである *P.gingivalis* 口腔感染症としての歯周病は、動脈硬化、リウマチ、誤嚥性肺炎、糖尿病など様々な全身系疾患の引き金となると報告されており、加齢による口腔感染症に対する免疫力(ワクチン応答性も含む)の低下は高齢者に重篤な健康被害を引き起こす。そこで、高齢者の口腔内局所とそれに関連する全身系の両方の疾患を予防・治療する有効な対策の開発が求められている。経口・経鼻免疫に代表される粘膜免疫法は粘膜局所と全身系に二段構えのバリアを構築することができ、歯周病と全身疾患の予防に有効と考えられるが、老化に伴う粘膜免疫機構への影響については情報が少なく高齢者でも同様な粘膜免疫のコンセプトを応用できるか不明である。近年、マウスの実験系において加齢による腸管における免疫機構の破綻が全身系のそれよりも早期(ヒトでは40-55年齢に相当)に起きることが明らかになった。一方、呼吸器粘膜免疫系への加齢による影響は緩やかに進むが、ヒト、>60-70年齢に相当する老齢マウスにおいてその破綻が明らかになった。そこで、老齢マウスの免疫力回復のため、抗原提示細胞である樹状細胞(DC)群を標的にした粘膜ダブルシグナルシステム[CpG ODN/Flt3リガンドcDNA プラスミド(pFL)]が開発され、インフルエンザウイルスや肺炎球菌の感染防御に有効な抗原特異的分泌型IgA(SIgA)および血清中IgG応答を誘導できることが明らかになった。粘膜ダブルシグナルシステムを応用し、歯周病とそれに伴う動脈硬化の予防・治療に向け、その効果を老齢マウスモデルにて検証することは急務であるが、このような試みは未だになされていない。さらに粘膜面と全身系に誘導される抗原特異的分泌型IgAと血清中IgGの2つの異なる疾患における役割についても不明である。また、粘膜ダブルシグナルシステムが老化免疫の回復を誘導する作用機序に関してもその細胞・分子レベルの詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

高齢者における歯周病罹患率の増加は、それに起因する動脈硬化の発症も増加させ、健康長寿社会の構築を妨げる要因となる。そこで、歯周病の予防による動脈硬化のリスクマネジメントのみならず、すでに発症している歯周病の軽減と動脈硬化の治療を目的とした、粘膜ダブルシグナルシステム(CpG ODN/pFL)を用いた高齢者のための舌下ワクチンの開発を第一目標とする。粘膜ワクチンは抗原特異的粘膜SIgA抗体に加え、血清IgG抗体も誘導する。そこで、歯周病及び動脈硬化の予防と治療におけるOMP40特異的、唾液中SIgA、歯肉溝浸出液中IgG、血清中IgG、IgA抗体の役割を解明することを第2の目標とする。

## 3. 研究の方法

ダブルシグナルシステム(CpG ODN 20 µg/ pFL 100 µg)とOMP40(10 µg)からなる舌下ワクチンを18ヶ月齢以上(老齢)と8-12週齢(若齢)のC57BL/6マウス(雌)に1週おき4回投与する。ダブルシグナルシステムの舌下投与量と回数は予備実験で決定済み。抗原のみ、ダブルシグナルシステムのみ投与群をコントロールとする。最終免疫より1、2週間後に唾液、血清を採取しOMP40特異的IgA、IgG抗体価をELISAにて決定する。顎下腺リンパ節、脾臓を採取しCD4<sup>+</sup>T細胞によるTh1、Th2、Th17サイトカイン産生をFACS、ELISA、

qRT-PCR 法にて解析する。老齢・若齢マウス群に舌下ワクチンを投与し、最終免疫より1週間後に *P. gingivalis* (ATCC33277)による口腔内感染・骨吸収プロトコルを開始し、歯周組織の炎症・歯槽骨吸収を測定する(1)。

#### 4. 研究成果

- (1) 新型コロナウイルス感染症の拡大の影響により、昨年 4 月に緊急事態宣言が発出された。これにより、新型コロナウイルス関連の研究以外は著しく制限され、本研究の開始に影響を与え、9月までの研究進捗が著しく遅れた。徐々に研究制限が解除されていく過程で、ダブルシグナルシステムと OMP40 からなる舌下ワクチンの免疫を開始した。当初計画していた抗原量(10  $\mu$ g/マウス)では十分な OMP40 特異的免疫応答を誘導することができず、抗原量を 30  $\mu$ g/マウスに増量し C57BL/6 マウス(雌)に1週おき4回投与した。最終免疫より1、2週間後に唾液、血清を採取し OMP40 特異的 IgA,IgG 抗体価を ELISA にて決定した。その結果、ワクチン投与群ではコントロール群に比べ唾液中 SIgA、血清中 IgG 抗体が上昇していることが明らかになった。これらの結果はダブルシグナルシステムが粘膜アジュバントとして機能し、歯周病菌に対する特異抗体を誘導することを示唆している。同様に *P. gingivalis* の fimA 表面抗原とダブルシグナルシステムを用いた経鼻ワクチンを投与することによって fimA 特異的抗体が誘導できることを報告した。さらに、上気道粘膜に誘導された抗原特異的 IgA 抗体が、*P. gingivalis* の感染防御に必須であることを IgA KO マウスを用いて実証した(図1)。これらの結果は、歯周病粘膜ワクチンによって、口腔内のみならず上気道粘膜面にも抗原特異的免疫応答が誘導でき、誤嚥性肺炎の予防にも効果があることが示唆された。(2)。

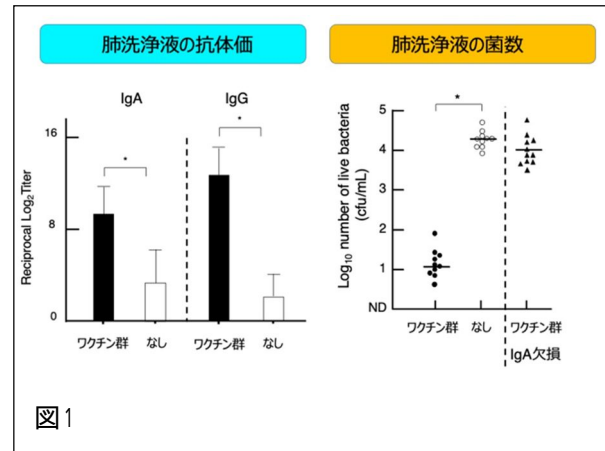
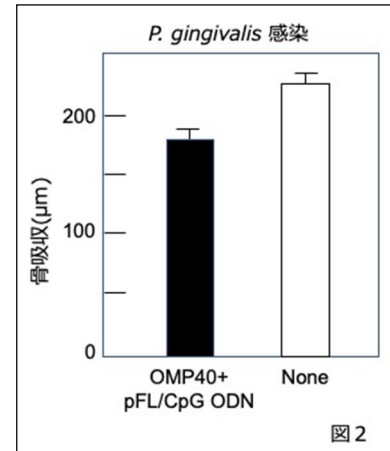


図1

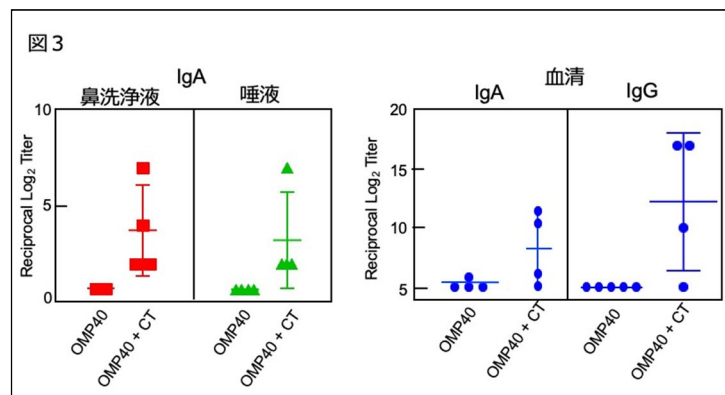
- (2) IgAKO マウスを用いた感染実験のため、IgA 抗体欠損による骨吸収への影響を非感染 IgAKO マウスで検証した。IgAKO マウスでは、口腔内細菌叢の変化により、ワイルドタイプコントロールマウスに比べ骨吸収が進行していることが明らかになった(3)。新型コロナウイルス感染症の拡大の影響により、pFL の精製に必要なギガキットの入手が困難となり、必要十分な pFL が得られず本研究の進捗に影響を与えた。抗原(30  $\mu$ g/マウス)とダブルシグナルシステム(CpG ODN 20  $\mu$ g/ pFL 250  $\mu$ g)からなる舌下ワクチンを C57BL/6 マウス(雌)に1週おき4回投与した。最終免疫より1、2週間後に唾液、血清を採取し OMP40 特異的 IgA,IgG 抗体価が上昇していることを ELISA にて確認した。そこで、最終免疫から2週間後に *P. gingivalis*381 株( $10^9$  CFU)を 14 日間連続で口腔内投与し、投与終了から3週間後に骨吸収

の変化を測定した。舌下ワクチン投与群は、非投与群に比べて骨吸収が抑制されていることが明らかになった(図2)。これらの結果はダブルシグナルシステムが粘膜アジュバントとして機能し、歯周病菌に対する特異抗体が歯周病の予防に参与していることが明らかになった。動脈硬化予防の先行実験としてダブルシグナルシステムを用いた経鼻ワクチンを投与することによって誘導された IgM および IgA 抗体が動脈硬化の予防に重要な役割を果たしていることを報告した(4)。



(3) 次に、舌下ワクチンの有効性を老齢マウスで検証した。ダブルシ

グナルシステムに必要な pFL 不足を補うため、コレラ毒素(CT)をアジュバントとして舌下ワクチンの有効性を検証した。18 ヶ月齢の老齢マウスに OMP40 を抗原とした舌下ワクチンを投与したところ、OMP40 特異的、唾液中 SIgA、血清中 IgG、IgA 抗体の上昇が認められた(図3)。CT を経鼻ワクチンアジュバントとして用いた老齢マウスの実験ではそのアジュバント効果が認められなかった(5)、我々の結果は、CT の舌下アジュバント効果を示しており、高齢者のワクチンを考慮した時に、舌下投与経路が経鼻等用法より有効であることが示唆された。舌下ワクチン最終免疫より、1週間後に頸部リンパ節(Cervical lymph nodes, CLNs)と脾臓(Spleen, SP)より細胞を分離し、CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 を細胞内サイトカイン染色法を用いて FACS で解析した。CLNs において舌下ワクチン投与群では、非投与群に比べて IFN- $\gamma$ 、IL-4 を産生する CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合が増加傾向にあることが明らかになったが、SP では同様な結果は認められなかった。さらに、IL-17 を産生する CD4<sup>+</sup> T 細胞の割合は CLN、SP にて顕著な上昇が認められた。



#### 引用文献

1. Kobayashi, R., et al. 2011. J. Dent. Res. 90: 653-658.
2. Kataoka, K., et al. 2021. Front. Immunol. Feb 25;12:634923. doi: 10.3389/fimmu.2021.634923, PMID: 33717178
3. Chang, E., et al. 2021. Inflamm. Res. 2021. Jan;70(1):151-158. doi: 10.1007/s00011-020-01418-x. PMID: 33165644
4. Yoshimatsu, H. et al. 2022. Vaccine, 40:1116-1127. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.01.027.

PMID: 35086743

5. Fukuiwa, T., et al., 2008. *Vaccine*, 26:4849-4859. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.091.

PMID: 18625280

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Yoshimatsu Hideki, Kataoka Kosuke, Fujihashi Kohtaro, Miyake Tatsuro, Ono Yoshiaki	4. 巻 40
2. 論文標題 A nasal double DNA adjuvant system induces atheroprotective IgM antibodies via dendritic cell-B-1a B cell interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 1116 ~ 1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2022.01.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Usami K, Niimi K, Matsuo A, Suyama Y, Sakai , Sato S, Fujihashi K, Kiyono H, Uchino S, Furukawa M, Islam J, Ito K, Moriya T, Kusumoto Y, Tomura M, Hovey RC, Sugawara J, Yoneyama H, Kitazawa H, Watanabe Ki, Aso H, Nochi T	4. 巻 36
2. 論文標題 The gut microbiota induces Peyer 's-patch-dependent secretion of maternal IgA into milk	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109655 ~ 109655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kiyono Hiroshi, Yuki Yoshikazu, Nakahashi-Ouchida Rika, Fujihashi Kohtaro	4. 巻 33
2. 論文標題 Mucosal vaccines: wisdom from now and then	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 767 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab056	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chang Emily, Kobayashi Ryoki, Fujihashi Kohtaro, Komiya Masamichi, Kurita-Ochiai Tomoko	4. 巻 70
2. 論文標題 Impaired salivary SIgA antibodies elicit oral dysbiosis and subsequent induction of alveolar bone loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 151 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00011-020-01418-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasou Ai, Yuki Yoshikazu, Honma Ayaka, Sugiura Kotomi, Kashima Koji, Kozuka-Hata Hiroko, Nojima Masanori, Oyama Masaaki, Kurokawa Shiho, Maruyama Shinichi, Kuroda Masaharu, Tanoue Shinjiro, Takamatsu Narushi, Fujihashi Kohtarō, Goto Eiji, Kiyono Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative whole-genome and proteomics analyses of the next seed bank and the original master seed bank of MucorRice-CTB 51A line, a rice-based oral cholera vaccine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-020-07355-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kataoka Kosuke, Kawabata Shigetada, Koyanagi Kayo, Hashimoto Yoshiya, Miyake Tatsuro, Fujihashi Kohtarō	4. 巻 12
2. 論文標題 Respiratory FimA-Specific Secretory IgA Antibodies Upregulated by DC-Targeting Nasal Double DNA Adjuvant Are Essential for Elimination of Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 634923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.634923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasou Ai, Yuki Yoshikazu, Kurokawa Shiho, Sato Shintaro, Goda Yuki, Uchida Masao, Matsumoto Naomi, Sagara Hiroshi, Watanabe Yuji, Kuroda Masaharu, Sakon Naomi, Sugiura Kotomi, Nakahashi-Ouchida Rika, Ushijima Hiroshi, Fujihashi Kohtarō, Kiyono Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of Antibody-Fragment-Producing Rice for Neutralization of Human Norovirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 639953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.639953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida Rika, Mori Hiromi, Yuki Yoshikazu, Umemoto Shingo, Hirano Takashi, Uchida Yohei, Machita Tomonori, Yamanoue Tomoyuki, Sawada Shin-ichi, Suzuki Masashi, Fujihashi Kohtarō, Akiyoshi Kazunari, Kurono Yuichi, Kiyono Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Induction of Mucosal IgA-Mediated Protective Immunity Against Nontypeable Haemophilus influenzae Infection by a Cationic Nanogel-Based P6 Nasal Vaccine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.819859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida Rika, Fujihashi Kohtarō, Kurashima Yosuke, Yuki Yoshikazu, Kiyono Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Nasal vaccines: solutions for respiratory infectious diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 124 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmed.2022.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koyanagi Kayo, Kataoka Kosuke, Yoshimatsu Hideki, Fujihashi Kohtarō, Miyake Tatsuro	4. 巻 23
2. 論文標題 Human salivary protein-derived peptides specific-salivary SIgA antibodies enhanced by nasal double DNA adjuvant in mice play an essential role in preventing Porphyromonas gingivalis colonization: an in-vitro study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-023-02821-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshimatsu, H., Kataoka, K., Fujihashi, K., Miyake, T., and Yoshikai, O.
2. 発表標題 A nasal double DNA adjuvant system induces atheroprotective IgM antibodies via dendritic cell-B-1a B cell interactions.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片岡 宏介  (Kataoka Kosuke)  (50283792)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学域)・教授   (16101)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中橋 理佳  (Nakahashi-Ouchida Rika)  (80391887)	千葉大学・医学部附属病院・特任准教授    (12501)	
研究分担者	落合 智子 (栗田智子)  (Ochiai-Kurita Tomoko)  (20130594)	日本大学・松戸歯学部・教授    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関