

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23066

研究課題名(和文) 舌下ワクチン投与による粘膜免疫システム活性化機序の解明

研究課題名(英文) To clarify the mechanism of mucosal immune system activation by sublingual immunization.

研究代表者

Chang Emily (張うえか) (CHANG, Emily)

日本大学・松戸歯学部・専修医

研究者番号：50875309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯周炎の発症抑制や軽減することを目的に舌下ワクチンの開発を目標とした。代表的な歯周病原性細菌であるPorphyromonas gingivalis が産生する熱ショックタンパクGroELを抗原とし、粘膜アジュバントにはCpG-ODNを用いた。舌下投与により、血清および唾液中にGroEL特異的抗体が誘導され、歯肉炎や歯槽骨の吸収を抑制することを示した。また、唾液腺に成熟型樹状細胞が誘導され、2型ヘルパーT細胞の誘導を認めた。以上より、GroEL-CpGODNの舌下投与は歯周病予防に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経粘膜ワクチンは抗原が誘導組織を介して取り込まれ、所属リンパ組織で抗原特異的抗体産生細胞が活性化される。特異的抗体産生細胞は全身循環により粘膜局所や血液中に抗原特異的抗体を産生し2段階の生体防御システムが作り出される。これまでに胃内や鼻腔内投与により効率的に抗原特異的抗体が産生されることが報告されてきた。しかし、高濃度の抗原を必要としたり、中枢神経に障害を誘発する危険性などが指摘されたことから、舌下投与が注目されている。本研究では舌下投与による抗原特異的免疫応答システムの解明により歯周炎や歯周炎関連疾患の発症予防、軽減効果を検証することは我が国における国民の健康増進に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lifestyle-related diseases are chronic inflammatory diseases, and periodontal disease is considered a risk factor. Therefore, the goal of this study was to develop a sublingual vaccine to inhibit or reduce the risk of periodontitis. Heat shock protein (HSP) GroEL produced by Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*), a typical periodontopathogenic bacterium, was used as an antigen and unmethylated oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) was used as the mucosal adjuvant. Sublingual immunization (SLI) induced GroEL-specific antibodies in serum and saliva and suppressed gingivitis and alveolar bone resorption. In addition, mature dendritic cells were increased in salivary glands, and type 2 helper T (Th2) cells were induced. These results indicate that sublingual administration of GroEL-CpGODN is effective in preventing periodontal disease.

研究分野：外科系歯学

キーワード：舌下ワクチン GroEL HSP60

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国は、人口の4人に1人は65歳以上となり今後も高齢化率は増加すると予測される。加齢変化に関連して、生活習慣に関連する様々な疾患の増加が懸念されている。近年、生活習慣病を悪化させるリスクファクターとして歯周病が注目されている。歯周病原性細菌が産生する病原因子による慢性炎症は、口腔内局所のみならず全身の各臓器に炎症を惹起させて生活習慣病のリスクファクターになることが示唆されている。

歯周病の軽減・発症予防としてワクチン療法が検討されている。中でも舌下投与は、薬剤の腸肝循環を介し初回通過効果を経ることなく目的の効果が期待できる。また、粘膜免疫システムを活用することで、粘膜局所と全身への抗原特異抗体が誘導され、感染性微生物の侵入に対して二重の防御効果が期待できる。これらを踏まえ、歯周炎を予防・軽減することで口腔局所のみならず全身疾患の発症抑制・軽減に期待できる新たな舌下ワクチン療法が求められている。

2. 研究の目的

慢性化した歯周炎は全身疾患のリスクファクターの一つであり、早期に予防・軽減することが求められている。また、加齢に伴う免疫機能の低下は症状の重篤化させることが予測される。

歯周炎を惹起させる Keystone である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は、病原因子を有しており歯周組織のみならず、血行性に全身循環することで全身の各臓器に病態形成させると考えられる。そこで、Pg が産生する熱ショックタンパク (Heat shock protein, HSP) である GroEL に対する特異抗体を誘導し、HSP による炎症応答を抑制・軽減させることで歯周炎を抑制し、歯周炎関連全身疾患の発症を抑制・軽減させることを目的とした。しかしながら、舌下投与による抗原特異的抗体の産生機序は不明な点が多い。そこで、本研究計画では GroEL に対する特異抗体の産生機序の解明と、歯周炎の発症抑制に対する効果を改名した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

7週齢のメス、BALB/c を三協ラボサービスから購入した。順化後、対照群、歯周炎群、舌下ワクチン投与群の3群に無作為に振分けた。実験期間中は餌と水は自由摂取とした。本実験の開始にあたり日本大学松戸歯学部実験動物管理使用指針 (AP16-MD007-1) に従った

(2) 抗原とアジュバント

P. gingivalis GroEL を含むリコンビナントプラスミド (pRSET B-HSP60) は山崎先生 (新潟大学) から好意により提供されたものを使用した。アジュバントは CpG-ODN (5' - TCCATGACGTTCTGACGTT-3') は Sigma-Aldrich から購入した。

(3) 歯周病原性細菌

マウスに実験的に歯周炎を惹起させるために *Porphyromonas gingivalis* 381 株を用いた

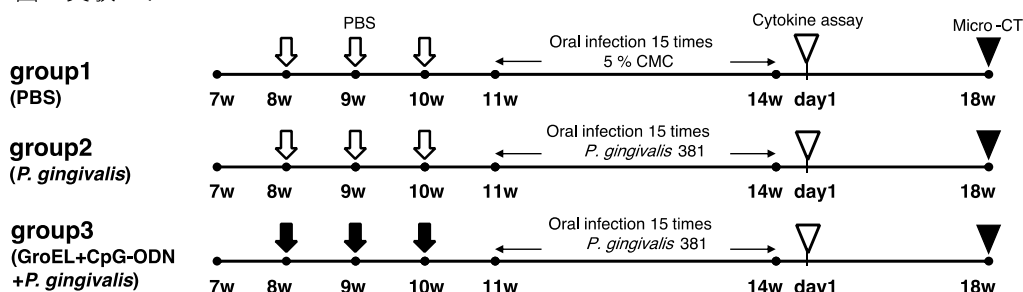
(4) 舌下投与とサンプル採取

Gorup1 (PBS): PBS 溶液を1週間に1回、3週間舌下投与し、5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液をピペットを用いて口腔内に投与した。

Gorup2 (*P. gingivalis*) 群: PBS 溶液を1週間に1回、3週間舌下投与し、5%CMC に懸濁した *P. gingivalis* をピペットを用いて1日1回、口腔内接種を行った。

Group3 (GroEL+CpG-ODN+*P. gingivalis*): rGroEL (3ug) と CpG-ODN (25ug) を1週間に1回、3週間舌下投与し、5%CMC に懸濁した *P. gingivalis* をピペットを用いて1日1回、ピペットを用いて口腔内接種を行った (図1)。

図1 実験スケジュール



実験開始から4週後に血清および唾液を採取した。また、脾臓、顎下腺および舌下腺を採取して単核細胞を単離した。他方、実験開始から7週後、または11週後に安楽死させたマウスから上下顎骨を摘出して、歯槽骨の吸収程度を観察した。また、剥離した歯肉組織から炎症性サイトカインや破骨細胞活性化因子について評価した。

(5) GroEL 特異的抗体の検出

血清および唾液中の抗 GroEL 抗体価は ELISA 法を用いて計測した。

(6) GroEL 特異的交代産生細胞の検出

脾臓、顎下腺・舌下腺から単核細胞を単離し、ELISPOT 法を用いて計測した。

(7) 歯槽骨吸収の評価

安楽死させたマウスから歯肉組織を除去して3%過酸化水素水にて浸漬後、1%メチレンブルー溶液で染色した。実体顕微鏡を用いてセメントエナメル接合部(Cement-Enamel Junction, CEJ)から歯槽骨稜(Alveolar Bone Crest, ABC)までの距離を頬舌側の計14ヶ所を計測した。得られた測定値は各マウスの平均値とした。マウスの上顎骨は μ CT 装置(リガク、東京)を用いて3次元像を再構築した。

(8) 炎症性サイトカイン、破骨細胞活性化因子の評価

安楽死させたマウスから採取した歯肉組織から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を精製し、cDNA を作製した。cDNA を用いて炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6), HSP60, 破骨細胞か成果関連因子(RANKL, OPG)について遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(9) GroEL 特異的 CD4+T cell 活性化試験

実験開始から4週後に安楽死させたマウスから脾臓および顎下腺を摘出し、抗 CD4 抗体と stAv-ironBeads を用いて CD4+T cell を単離した。その後、RNeasy Mini kit を用いて total RNA を精製し、cDNA を作製してリアルタイム PCR 法を用いて IFN γ , IL-4 について遺伝子発現を検討した。他方、単離した脾臓 CD4+Tcell, 唾液線 CD4+Tcell は rGroEL の再刺激による培養終了後、BrdU ELISA 法にて T cell 細胞活性化を測定した。

(10) 樹状細胞の検討

実験開始から4週間後に安楽死させたマウスの脾臓と唾液腺から単核細胞を単離した。蛍光標識抗体を用いて樹状細胞のサブクラスや成熟度をフローサイトメトリー法により測定した。

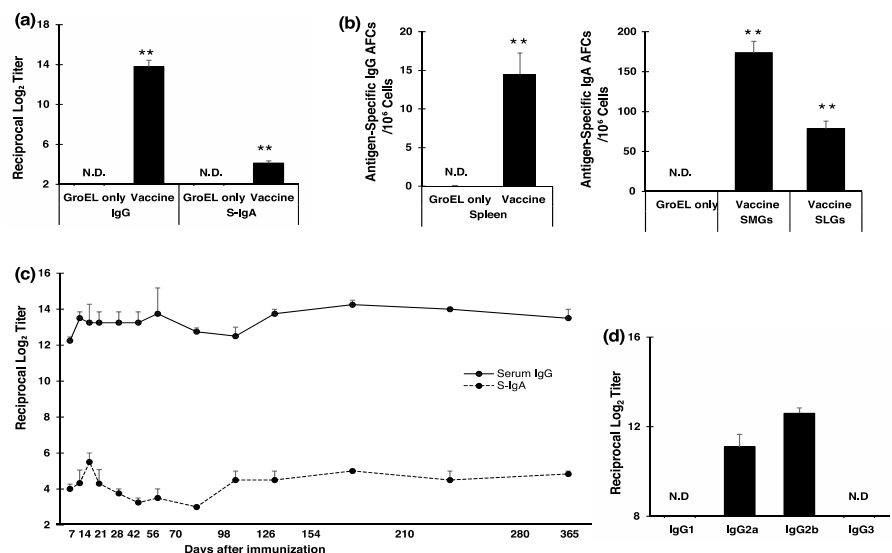
4. 研究の成果

(1) GroEL 特異抗体の検出

GroEL と CpG-ODN に舌下投与による GroEL 特異抗体の産生誘導を検討した。実験開始から4週間後に、血清 GroEL 特異的 IgG 抗体と唾液 GroEL 特異的 IgA 抗体が顕著に誘導された(図2a)。さらに、脾臓および唾液腺で GroEL 抗体産生細胞が ELISPOT 法により同様に認められた(図2b)。他

方、rGroEL 単独投与では検出されなかった。また、血清 GroEL 特異的 IgG/IgG2a および IgG2b が優位であった(図2d)。興味深いことに血清 GroEL 特異的 IgG 抗体と唾液 GroEL 特異的 IgA 抗体は約1年間、有意に高い価を維持していた(図2c)。

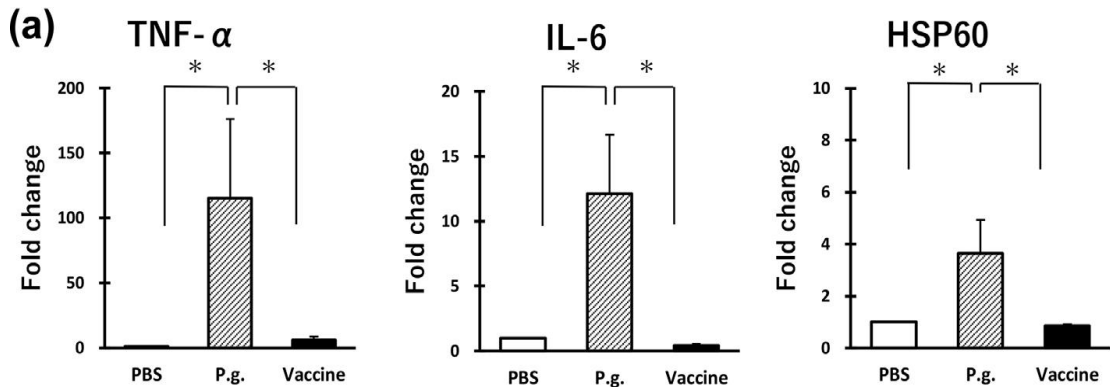
図2 GroEL特異的的血清IgGと唾液IgA抗体産生応答



(2) GroEL 舌下投与による歯肉炎症の軽減

P. gingivalis の口腔内接種による歯肉炎症程度を検討した。*P. gingivalis* の最終接種から 1 日後に、安楽死させたマウスから歯肉を摘出して精製した total RNA から cDNA を作製した。リアルタイム PCR 法にて検討したところ、TNF- α 、IL-6、HSP60 mRNA の発現が舌下投与群では顕著に減少した (図 3)。

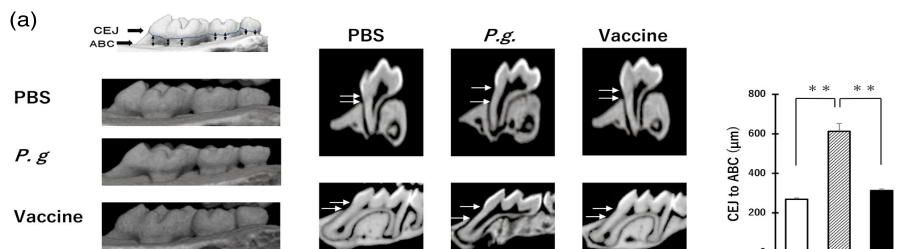
図 3 歯肉組織中の炎症性サイトカインおよび炎症関連因子の発現



(3) GroEL 舌下投与による歯槽骨吸収の抑制

GroEL+CpGODN の舌下投与により血清、唾液中に抗原特異抗体が長期に渡って維持されたことから、誘導された抗体が歯周炎に効果を示すか検討した。*P. gingivalis* の最終接種から 30 日後に安楽死させたマウスから上下顎骨を採取して CEJ-ABC 間を測定したところ、舌下投与群では歯槽骨吸収や、RANKL/OPG 比が有意に抑制されていた (図 4 a, b)。このことから、GroEL+CpGODN の舌下投与は歯周炎の抑制に効果的であることが示された。

図 4 GroEL舌下投与による歯槽骨吸収の抑制



(4) GroEL 特異的 CD4⁺ T cell アッセイ

舌下投与により全身ならびに局所の GroEL 特異的抗体産生応答が示された。そこで、抗原特異的抗体産生に参与する CD4⁺ T 細胞を検討した。最終舌下投与から 7 日後に安楽死させたマウスから脾臓と唾液腺を採取し、抗 CD4 抗体と stAv-ironBeads を用いて CD4⁺ T cell を単離した。抗原特異的 T 細胞活性を評価するために採取した CD4⁺ T cell を rGroEL 刺激下で 5 日間培養したところ、細胞増殖応答が有意に増加した (図 5 a)。また、脾臓 CD4⁺ T cell では IFN- γ と IL-4 mRNA の発現が有意に増加していた (図 5 b)。

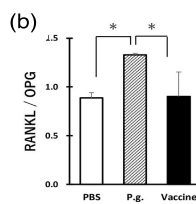
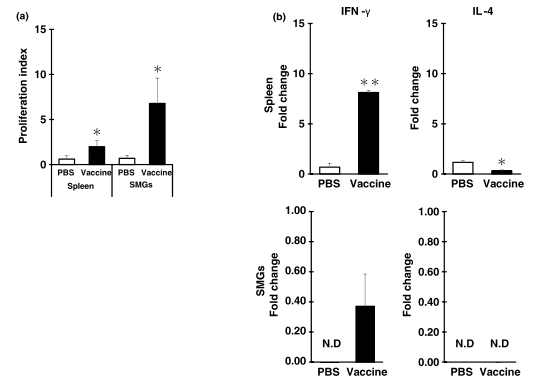


図 5 GroEL舌下投与によるGroEL特異的CD4⁺T細胞の活性化



(5) 舌下投与による樹状細胞の検討

次に、代表的な抗原提示細胞である樹状細胞の動態について検討した。舌下投与から7日後に安楽死させたマウスから脾臓と唾液腺を採取した。蛍光標識抗体を用いて樹状細胞のサブクラスや成熟度についてフローサイトメトリー法により検討した。脾臓中のCD11c⁺樹状細胞は減少していたが、唾液腺では有意に増加していた。さらに、CD40、CD80、CD86、MHC-IIの発現が増加していた。また、サブクラス解析を行なったところ、CD11b⁺およびCD8α⁺樹状細胞が有意に増加していた(表1)。

表1 GroEL投与による成熟型樹状細胞の比率

Tissue		Number of lymphocytes (×10 ⁴)	Number of DCs (×10 ⁴)			
			DCs	CD40 ^b	CD80 ^b	CD86 ^b
Spleen	PBS	388 (±8.6)	225 (±10.4)*	179 (±7.2)	29.3 (±10.1)	188 (±8.8)
	Vaccine	350 (±17.0)*	151 (±0.09)**	124 (±4.9)**	7.47 (±0.9)*	124 (±4.7)**
SMGs	PBS	2.03 (±0.08)	0.10 (±0.005)	0.07 (±0.004)	0.10 (0.006)	0.04 (±0.001)
	Vaccine	4.30 (±0.3)*	0.23 (0.02)*	0.13 (±0.01)*	0.28 (±0.02)*	0.09 (±0.008)*
Tissue		Numbers of DCs (×10 ⁴)		Numbers of cDC (×10 ⁴)		
		pDC (B220 ⁺) ^c	pDC (B220 ⁻) ^c	CD11b ^c	CD8α ^c	
Spleen	PBS	162 (±2.6)	215 (±3.1)	103 (±3.8)	16.6 (±3.4)	
	Vaccine	124 (±10.3)*	227 (±19.4)	89 (±3.6)*	11.4 (±1.9)	
SMGs	PBS	0.09 (±0.01)	1.92 (±0.08)	1.06 (±0.1)	0.00	
	Vaccine	0.88 (±0.07)**	3.38 (±0.2)**	2.24 (±0.2)**	0.03 (±0.002)**	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chang Emily, Kobayashi Ryoki, Fujihashi Kohtarō, 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件）

1. 発表者名 Emily Chang, Ryoki Kobayashi, Tomoko Kurita-Ochiai
2. 発表標題 Nasal Vaccination with GroEL plus CpG ODN Inhibits P. gingivalis-induced Inflammation and Alveolar Bone Loss
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------