

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09850

研究課題名（和文）歯周病の発症を制御する抗原特異的免疫応答機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of antigen-specific immune responses in periodontitis

研究代表者

永尾 潤一（Nagao, Jun-ichi）

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：30509047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病の病態形成には歯周病原細菌に対するTh17細胞による宿主の免疫応答が関与することが明らかになっている。しかしながら、免疫応答に関与する歯周病原細菌由来の抗原は不明であり、また責任Th17細胞のT細胞受容体は特定されていない。本研究ではTh17細胞を誘導する歯周病原細菌由来の抗原を探査し、候補となる抗原をペプチドレベルまで絞り込んだ。また、歯周病感染マウスモデルを用いて、所属リンパ節における責任Th17細胞のT細胞受容体を解析し、候補となるT細胞受容体を特定することができた。以上のように歯周病原細菌に対する抗原特異的な免疫応答機構に関する新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の歯周病の治療・予防は、口腔内の歯垢や歯石の除去を主体としたのもであった。本研究で得られた歯周病原細菌に対する抗原特異的な免疫応答機構に関する知見は、歯周病の責任Th17細胞を特異的に制御する新たな免疫療法の開発に繋がると期待される。例えば、特定した歯周病特異的抗原を応用したワクチン開発、および責任Th17細胞のT細胞受容体を標的とした治療法が可能になる。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis, a leading cause of tooth loss, is strongly associated with periodontal bacteria. The pathogenesis of periodontitis has been reported to be mediated by host immune responses, especially IL-17A-producing helper T cells such as Th17 cells. However, the regulatory mechanism in which an immune response is induced via Th17 cells by periodontal bacteria remains unclear. The antigen derived from periodontal bacteria and the T cell receptor of the responsible Th17 cells have not yet been identified. In this study, we used the mice model of periodontitis to search for antigens derived from periodontal bacteria that induce Th17 cells and the T cell receptors of the responsible Th17 cells. We have gained new insights into the antigen-specific immune response against periodontal bacteria.

研究分野：病態系口腔科学

キーワード：歯周病 歯周病原細菌 Th17細胞 抗原 T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔内に常在する歯周病原細菌による感染症で、歯の喪失の最も大きな原因となる。歯周病の病態形成にはサイトカイン IL-17A 産生を特徴とする Th17 細胞による宿主の免疫応答が関与し、病態を増悪化させることが分かっている^{1,2)}。申請者はこれまでに、歯周病の病態形成の制御機構を解明する中で、歯周病の悪化には腸と口腔の免疫ネットワークが関与することを見出している³⁾。腸管で歯周病原細菌に対する Th17 細胞が誘導され、歯周病原細菌による口腔感染により Th17 細胞が口腔に遊走することで歯周病の病態を形成する。しかしながら歯周病の病態形成に関与する Th17 細胞の制御機構は不明な点が多い。歯周病原細菌由来の抗原は樹状細胞などの抗原提示細胞の MHC classII 分子に提示され、歯周病の責任 Th17 細胞の分化を誘導すると考えられる。しかしながら、歯周病原細菌由来の抗原は不明であり、また責任 Th17 細胞の T 細胞受容体は特定されていない (図 1)。

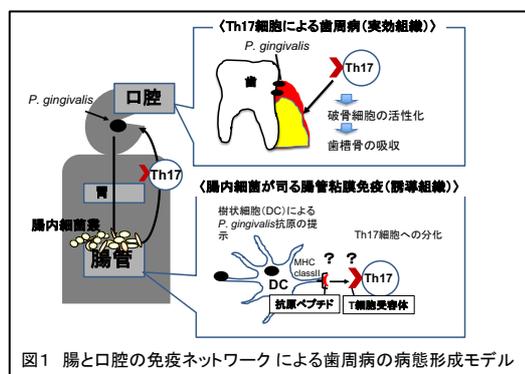


図1 腸と口腔の免疫ネットワークによる歯周病の病態形成モデル

2. 研究の目的

申請者は、歯周病の病態は、歯周病原細菌に特異的に応答する Th17 細胞により形成されることを見出している。本研究では、歯周病の病態形成に関わる責任 Th17 細胞に着目し、誘導に関わる歯周病原細菌由来の抗原と責任 Th17 細胞の T 細胞受容体を特定することで、歯周病の病態形成の免疫制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、歯周病の責任 Th17 細胞を誘導する歯周病原細菌抗原の特定と責任 Th17 細胞の T 細胞受容体の特定を試みた。

(1) 歯周病の責任 Th17 細胞を誘導する歯周病原細菌抗原の特定

①歯周病原細菌抗原の探索

本研究では、歯周病原細菌の中で最も病原性が高く、全ゲノムシーケンスが判明している *Porphyromonas gingivalis* W83 株を用いた。*P. gingivalis* 由来の抗原は Th17 細胞への分化を指標に絞り込んだ。*In vitro* において、*P. gingivalis* 由来の抗原を提示させた骨髄由来樹状細胞と末梢リンパ節から精製した CD4⁺ T 細胞を共培養後に、Th17 細胞への分化をフローサイトメーターにより評価した。末梢リンパ節由来の CD4⁺ T 細胞は、*P. gingivalis* の腸管投与により感作させたマウスから調製した。

P. gingivalis の抗原は、以下のように調製した。培養した *P. gingivalis* 菌体をガラスビーズにより破碎し、遠心分離などにより細胞質、細胞膜、外膜、ベシクルなどの細胞成分に分画した。Th17 細胞の分化が確認された細胞成分は、逆相 HPLC と二次元電気泳動により分画し、プロテオミクス解析により候補となる抗原タンパク質を同定した。同定したタンパク質は、大腸菌発現系を用いて His-tag 融合タンパク質として大量発現させて精製した。Th17 の分化が確認されたタンパク質は、さらにマウス MHC classII への結合予測アルゴリズム (IEDB Analysis Resource) によりペプチドレベルに絞り込んだ。抗原ペプチドは化学合成により調製し、*in vitro* における MHC classII に対する結合試験および Th17 細胞の分化により評価した。

②歯周病原細菌抗原による歯周病の病態の評価

申請者はこれまでに、*P. gingivalis* 口腔感染の前に *P. gingivalis* の腸管投与により粘膜免疫を活性化することで歯周病の病態が悪化する歯周病感染マウスモデルを構築している³⁾。そこで、*P. gingivalis* の口腔感染の前に粘膜免疫を *P. gingivalis* 抗原で活性化するために、*P. gingivalis* 由来の抗原を鼻腔粘膜から投与することで、粘膜免疫を誘導できるか検討した。抗原ペプチド感作後、*P. gingivalis* の口腔感染による歯周病の病態を評価する。歯周病の病態は、上顎臼歯部頰側のセメントエナメル境と歯槽骨頂の距離を Image J により測定することで歯槽骨吸収レベルを評価した。

(2) 歯周病の責任 Th17 細胞の T 細胞受容体の解析

①責任 Th17 細胞の T 細胞受容体レパートリー解析

本研究では、IL-17A-GFP レポーターマウスを用い、GFP 発現を指標にして Th17 細胞をモニターした。歯周病感染マウスモデルを用いて、歯周病が悪化する条件下における所属リンパ節の CD4⁺ T 細胞を単離し、*in vitro* において骨髄由来樹状細胞と Th17 細胞の誘導能がある外膜ベシ

クルで再刺激することで *P. gingivalis* に応答する責任 Th17 細胞を増殖させた。増殖した *P. gingivalis* 応答性の責任 Th17 細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより T 細胞受容体の α 鎖と β 鎖の遺伝子のシーケンスを解析した。次世代シーケンサーによる解析は、東北大学加齢医学研究所の小笠原康悦博士から協力を得て進めた。さらに、特定した T 細胞受容体の α 鎖と β 鎖の遺伝子を GFP 発現で評価できるレポーターベクターに組み込んで T 細胞の細胞株に発現させた。

4. 研究成果

(1) 歯周病の責任 Th17 細胞を誘導する歯周病原細菌抗原の特定

P. gingivalis を対象として Th17 細胞を誘導する抗原を探索した。その結果、細菌成分として外膜ベシクルを特定した(図2)。さらに Th17 細胞への分化を指標に逆相 HPLC と二次元電気泳動により分画し、プロテオミクス解析により候補となるタンパク質を特定することができた。候補タンパク質は大腸菌発現系により発現させ、精製タンパク質を調製した。Th17 細胞への分化誘導により評価した結果、数種類の候補タンパク質を絞り込むことができた。Th17 細胞の誘導能が認められたタンパク質の中でプロテオミクス解析でもスコアが高かったタンパク質に関して、配列情報を基に、マウス MHC classII への結合予測アルゴリズムによりペプチドレベルまで絞り込むことができた。

絞り込んだ外膜ベシクルや抗原ペプチドが歯周病の病態形成に及ぼす影響を歯周病感染マウスモデルで検証した。菌体成分や抗原ペプチドの鼻腔投与による抗原感作後に、*P. gingivalis* を口腔感染させ、歯周病の病態を評価した。その結果、外膜ベシクルおよび抗原ペプチドの事前投与により、歯周病の病態が悪化することを見出した(図3)。

(2) 歯周病の責任 Th17 細胞の T 細胞受容体の解析

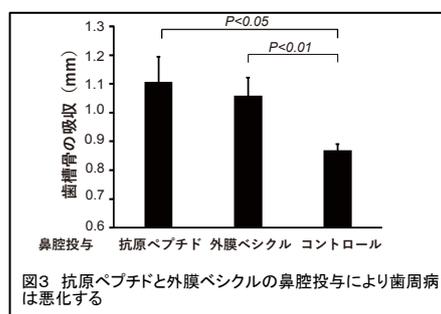
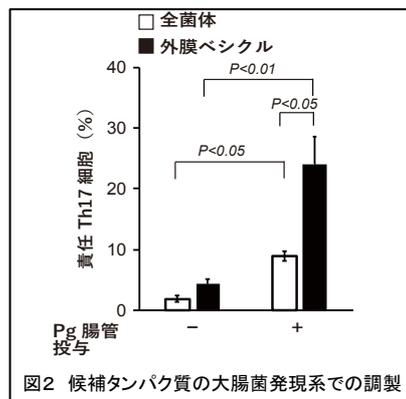
歯周病感染マウスモデルを用いて、所属リンパ節である頸部リンパ節における *P. gingivalis* に応答する責任 Th17 細胞の T 細胞受容体のレパートリーを解析し、病態が悪化する条件において高頻度で検出される T 細胞受容体の α 鎖と β 鎖の遺伝子を得ることができた。特定した T 細胞受容体の遺伝子を T 細胞の細胞株に発現させ、GFP 発現を指標に *P. gingivalis* 抗原への応答を評価する系の構築に着手することができた。

今後、構築した系を用いて、特定した T 細胞受容体に応答する抗原ペプチドを評価することが可能になる。さらに、特定した T 細胞受容体のトランスジェニックマウスを作製することができれば、*P. gingivalis* 抗原に特異的に応答する歯周病疾患モデルを構築することが可能になる。

以上のように歯周病原細菌に対する抗原特異的な免疫応答機構に関する新たな知見を得ることができた。本研究で得られた成果は、歯周病の責任Th17細胞を特異的に制御する新たな免疫療法の開発に繋がると期待される。例えば、特定した歯周病特異的抗原を応用したワクチン開発、および責任Th17細胞のT細胞受容体を標的とした抗体による治療法が可能になる。

引用文献

1) *Sci. Transl. Med.* 10: eaat0797, 2018; 2) *Nat. Commun.* 9:701, 2018; 3) *Cell Rep.* 40:111314, 2022.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagao J, Kishikawa S, Tanaka H, Toyonaga K, Narita Y, Negoro-Yasumatsu K, Tasaki S, Arita-Morioka K, Nakayama J, Tanaka Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Pathobiont-responsive Th17 cells in gut-mouth axis provoke inflammatory oral disease and are modulated by intestinal microbiome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 111314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111314.	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 Miyazawa R, Nagao J, Arita-Morioka KI, Matsumoto M, Morimoto J, Yoshida M, Oya T, Tsuneyama K, Yoshida H, Tanaka Y, Matsumoto M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dispensable Role of Aire in CD11c+ Conventional Dendritic Cells for Antigen Presentation and Shaping the Transcriptome.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Immunohorizons	6. 最初と最後の頁 140-158.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2200103.	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 Shin M, Matsushima A, Nagao J, Tanaka Y, Harada H, Okabe K, Bartlett JD.	4. 巻 13
2. 論文標題 Mobility gene expression differences among wild-type, Mmp20 null and Mmp20 over-expresser mice plus visualization of 3D mouse ameloblast directional movement.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-44627-0.	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18件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagao J, Kishikawa S, Toyonaga K, Kaji E, Negoro-Yasumatsu K, Tasaki S, Tanaka Y
2. 発表標題 Development of periodontitis mediated by T-cell immune response against periodontal bacteria
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaji E, Toyonaga K, Tasaki S, Nagao J, Kishikawa S, Ikeda M, Tanaka Y
2. 発表標題 Investigation of Th17-cell mediated immune response against the pathogenic fungus <i>Candida albicans</i>
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toyonaga K, Kaji E, Nagao J, Tasaki S, Kishikawa S, Negoro-Yasumatsu K, Tanaka Y
2. 発表標題 Analysis of immune responses in a murine oral candidiasis model
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kishikawa S, Nagao J, Toyonaga K, Kaji E, Negoro-Yasumatsu K, Tasaki S, Tanaka Y
2. 発表標題 Immunological analysis of periodontal disease-induced cognitive disorders in mice
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永尾潤一、岸川咲吏、豊永憲司、加地英美、根来（安松）香奈江、田崎園子、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態形成を制御する宿主免疫システムの解明
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊永憲司、永尾潤一、水上昂、田崎園子、岸川咲吏、加地英美、根来香奈江、田中芳彦
2. 発表標題 Candida albicans口腔感染によって誘導される免疫応答の解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸川咲吏、永尾潤一、豊永憲司、加地英美、根来香奈江、田崎園子、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌感染モデルマウスを用いた神経免疫学的分析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加地英美、豊永憲司、田崎園子、永尾潤一、岸川咲吏、池田水子、田中芳彦
2. 発表標題 口腔カンジダ症の病態を制御する病原真菌カンジダ由来の抗原の探索
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村麻衣、岸川咲吏、永尾潤一、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態における酪酸菌の持つ効果の解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田宗一郎、永尾潤一、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌の増殖を阻害するヒト口腔常在細菌の探索と解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永尾潤一、根来（安松）香奈江、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態を形成する免疫制御機構の解明
3. 学会等名 第65回日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根来（安松）香奈江、永尾潤一、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 母体免疫活性化による精神疾患発症モデルマウスの解析
3. 学会等名 第65回日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagao J, Tanaka Y
2. 発表標題 Gut-mouth immune axis in periodontitis
3. 学会等名 Kickoff meeting of Core-to-Core program “Establishment of Gut Microbiome Research Core linking Asian Foods and Health”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永尾潤一、岸川咲吏、豊永憲司、根来（安松）香奈江、田崎園子、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病発症を制御する免疫制御機構の解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸川咲吏、永尾潤一、豊永憲司、根来（安松）香奈江、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌感染によるマウスの行動変化の免疫学的解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊永憲司、永尾潤一、岸川咲吏、田中芳彦
2. 発表標題 口腔内細菌脂質成分の自然免疫活性化能の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永尾潤一、根来（安松）香奈江、田中芳彦
2. 発表標題 宿主免疫応答による歯周病の病態形成機構の解明
3. 学会等名 第64回秋季歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagao Jun-ichi, Kishikawa Sari, Toyonaga Kenji, Negoro-Yasumatsu Kanae, Tasaki Sonoko, Tanaka Yoshihiko
2. 発表標題 Th17-cell mediated immune response in the development of periodontitis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術大会
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	岸川 咲史 (Kishikawa Sari) (50781358)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	

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