

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861751

研究課題名(和文)熱ショックタンパクによる免疫寛容が歯周病から派生する動脈硬化に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)The influence of immune tolerance by heat shock protein on arteriosclerosis derived from periodontal disease.

研究代表者

濱野 美緒(萩原美緒)(HAMANO, Mio)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：60724820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性病原体の熱ショックタンパク質(HSP60)に対する免疫反応がアテローム性動脈硬化症を促進させる可能性が報告されている。本研究ではアテローム性動脈硬化症の予防のために舌下投与におけるPorphyromonas gingivalis(P.g.)のHSP60(rGroEL)による免疫寛容の可能性を検証した。結果、rGroELの舌下免疫は顎下リンパ節においてIL-10またはIFN- $\gamma$ 産生Foxp3陽性T細胞およびIL-10産生Foxp3陰性T細胞を有意に誘導したことから、これらのTreg細胞がP.g.で誘発される炎症を制御することによりアテローム性動脈硬化症の進行を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune responses to heat-shock protein 60 (HSP60) contribute to the progression of atherosclerosis, whereas immunization with HSP60 may induce atheroprotective responses. We assessed the capacity of an atheroprotective vaccine that targeted a recombinant HSP60 from P. g. (rGroEL) to induce a protective mucosal immune response. Apolipoprotein E-deficient spontaneously hyperlipidemic mice received sublingual delivery of rGroEL prior to P. g. injection. Sublingual immunization with rGroEL induced significant rGroEL-specific serum IgG responses. Furthermore, sublingual immunization with rGroEL significantly reduced atherosclerosis lesion formation in the aortic sinus. These findings suggest that sublingual immunization with rGroEL is associated with the increase of IFN- $\gamma$  + or IL-10+ Foxp3+ cells in SMG and a systemic humoral response, which could be an effective strategy for the prevention of naturally occurring or P. g.-accelerated atherosclerosis.

研究分野：免疫学

キーワード：熱ショックたんぱく質 アテローム性動脈硬化症 歯周病原菌

### 1. 研究開始当初の背景

近年の生化学及び臨床研究の実験的根拠から、動脈硬化は全身エリテマトーデスや抗リン脂質抗体症候群などで見られる「自己抗体」介在性の動脈硬化メカニズムから生じる自己免疫病態であるという考えが支持されつつある。HSP、酸化 LDL, β2GlycoproteinI (β2GPI), カルジオリピン, HDL 等が動脈硬化に関わる自己抗原と見なされている。一方、各種感染症の主要抗原が HSP であることが多くの症例で報告されている。*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 等の歯周病原細菌はヒト HSP60 ファミリーと極めて相溶性の高い HSP (GroEL) を産生し、細菌感染症、自己免疫疾患、アテローム動脈硬化症においては患者血清中に抗 HSP 抗体と共に抗 GroEL 抗体が誘導されている。更に歯周炎患者の歯肉溝液や血液中には菌体成分の他に歯周病原菌と相溶性を有する HSP60 に対する自己抗体が増加している。従って、歯周炎組織においても、侵入した細菌が有する GroEL と、宿主の HSP60 のアミノ酸配列が類似していることにより、細菌抗原に対する免疫応答が、宿主の抗原に交差反応し、組織破壊を起こす可能性が十分に考えられる。しかし、歯周疾患で誘導される自己抗体が実際に動脈硬化や歯周病を進展させるという直接のデータは報告されていない。申請者はこれまでに高脂肪食を負荷した BALB/C マウスを用い、*P.g.* が保有する HSP (GroEL) と動脈硬化の関連性について検討してきた。その結果、リコンビナント GroEL のマウスへの皮下注射は抗 GroEL 抗体価の著しい増加と血管壁での HSP60、CD40 及び LOX-1 の発現増強を認めた。更に、得られた抗 GroEL 抗体価はヒト HSP60 と交差反応を示し、HSP60 での吸収実験により抗 GroEL 抗体価は減弱した。一方、自然発症 ApoE 欠損高脂血症 (SHL) マウスへの GroEL を用いての経口及び経鼻免疫は、*P.g.* で促進される動脈硬化の進展を顕著に抑制した。これらの結果は、*P.g.* で促進される動脈硬化の進展メカニズムに HSP60 が深く関わっていること、更に感染で誘導される歯周病及び動脈硬化の進展予防に免疫寛容を利用した経粘膜免疫が有効である可能性を示唆している

### 2. 研究の目的

本研究は歯周病原性細菌感染により進展する歯周病や動脈硬化の発症に、歯周病原菌と相溶性を有する熱ショックタンパク質 (HSP) に対する自己抗体が T 細胞制御を介してどのように関わっているかを検証する。更に細菌が産生する熱ショックタンパク質 (GroEL) を用いての舌下免疫寛容の導入により、感染で誘導される歯周病並びに動脈硬化の進展予防の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

歯周病原菌感染により進展する動脈硬化

の発症における

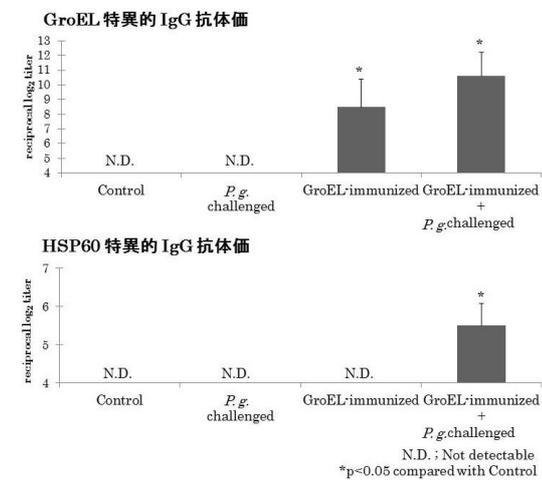
(1) 体液性免疫の影響-ApoE 欠損マウスにおける血液、組織中の HSP 発現及び抗 HSP 抗体や抗 GroEL 抗体の検出並びに関連物質の検出。

(2) 細胞性免疫の影響-ApoE 欠損マウスにおける血液、組織中の T 細胞サブセット及び関連サイトカインの解析を調べることにより、慢性炎症性疾患の病態機序を明らかにする。更に GroEL を用いての舌下免疫寛容における<I>体液性免疫の影響並びに<II>細胞性免疫の影響を調べることにより、動脈硬化進展制御の可能性を探る。

### 4. 研究成果

(1) GroEL を用いた舌下免疫でのマウスの血清中の GroEL 特異的 IgG 抗体価もしくは HSP60 特異的 IgG 抗体価の測定

舌下免疫のみを行った群において IgG 抗体価の有意な上昇を認めた。また舌下免疫と *P.g.* 感染を行った群では免疫のみを行った群に比べさらなる IgG 抗体価の有意な上昇をみとめた。



### (2) 動脈硬化の進展度の測定

マウスの大動脈弁周囲血管において PBS のみ投与した群では血管壁の肥厚は認められなかったが *P.g.* 感染群では多くの脂質沈着や血管壁の肥厚を認めた。GroEL を舌下免疫したのちに *P.g.* 感染させた群では *P.g.* 感染のみの群より脂質沈着は減少していた。

### (3) 血清中の炎症性因子の測定

CRP, MCP-1, ox-LDL の値はともに PBS 投与のみの群に対して *P.g.* 感染群が有意に発現量の上昇をみとめた。GroEL を舌下免疫したのちに *P.g.* 感染をさせた群では *P.g.* 感染だけを行った群に比べ有意な減少が認められた。

の進行を制御できる有用なワクチンとなる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Hagiwara, T. Kurita-Ochiai,  
R. Kobayashi, T. Hashizume-Takizawa,  
K. Yamazaki, and M. Yamamoto  
Sublingual Vaccine with GroEL  
Attenuates Atherosclerosis  
J Dent Res, 査読有,  
93(4),2014,382-387  
DOI: 10.1177/0022034514523784

〔学会発表〕(計 2 件)

KOBAYASHI Ryoki, HAGIWARA Mio,  
OCHIAI Tomoko  
Influence of strain difference on change  
of gut microflora and gut immune system  
induced by periodontal pathogen  
第 45 回日本免疫学会総会・学術集会、  
2016.12.5、沖縄コンベンションセンター  
ラグナガーデンホテル、沖縄、宜野湾市  
萩原美緒、落合智子、小宮正道  
Adjuvant-free sublingual vaccine using  
GroEL attenuates *Porphyromonas*  
*gingivalis* -induced atherosclerosis  
第 69 回日本口腔科学会総会・学術集会、  
2015.5.14、大阪国際会議場、大阪、  
大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

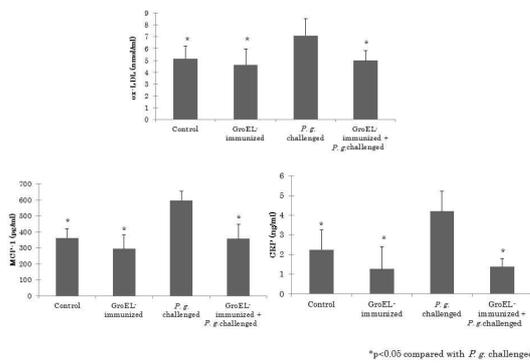
取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

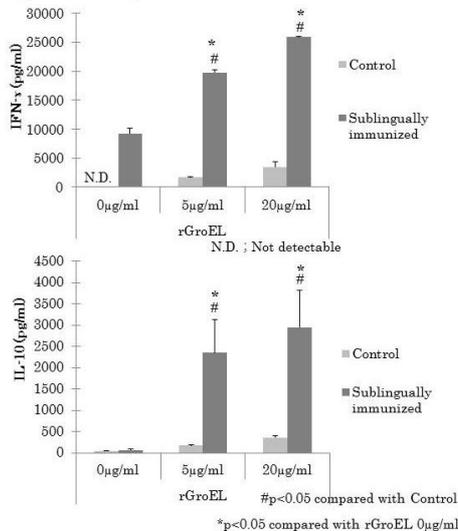
炎症性因子の測定



(4) 舌下免疫を行ったマウスの脾臓細胞でのサイトカイン産生量測定

IFN- $\gamma$  と IL-10 とともにコントロール群に比べ舌下免疫を行った群にて有意な産生をみとめた。一方、TGF- $\beta$  は GroEL 刺激の有無にかかわらずまったく産生されなかった。

Sublingual delivery of rGroEL induces IFN- $\gamma$  and IL-10



(5) マウスの顎下腺の FACS 解析

舌下免疫した群では Foxp3 陽性の Treg 細胞において IFN- $\gamma$ 、IL-10 共に有意な発現量の増加をみとめた。一方、Foxp3 陰性の T 細胞では舌下免疫した群とコントロール群において IFN- $\gamma$  の発現に有意差は認めなかったが IL-10 では舌下免疫群でわずかな発現量の増加が認められた。

以上の結果から ApoE マウスへの P.g. の経静脈投与は GroEL 抗体価を増加することなく動脈硬化の進展を促進した。このことから、GroEL 抗体価の増加と疾患の増悪との関連性は認められなかった。さらに GroEL での粘膜免疫は GroEL 抗体価並びに制御性 T 細胞の増加と共に P.g. 感染による疾患の増悪を抑制したことから HSP60 による炎症の増強が疾患の進行に関与していることが示唆された。また GroEL を用いての粘膜免疫は歯周病原性細菌感染による炎症や動脈硬化

(1)研究代表者

濱野 美緒 (HAMANO, Mio)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：60724820

(4)研究協力者

落合 智子 (OCHIAI, Tomoko)

小林 良喜 (KOBAYASHI, Ryoki)