

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15792

研究課題名(和文)新しいう蝕予防法の開発へ向けた免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Immunoregulation with the view of the development of a novel vaccine for the prevention of dental caries.

研究代表者

田中 芳彦 (Tanaka, Yoshihiko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00398083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕(むし歯)は口腔に常在するう蝕原性菌によって引き起こされる感染症です。う蝕の予防は、う蝕原性菌が歯面へ付着することを予防することに他なりません。唾液中には抗体が含まれており、う蝕原性菌を標的とする抗体を増やすことができれば、う蝕を予防することができます。本研究では、う蝕を予防するワクチン開発を目指して、T細胞に焦点をあてて基礎的なデータを蓄積しました。今後は、う蝕予防の新世代ワクチン開発へと研究が展開していくことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Dental caries are infectious diseases caused by particular pathogenetic bacteria resident in the oral cavity. Prevention of dental caries is nothing less than preventing these bacteria from adhering to tooth surfaces. Antibodies are contained in saliva and caries can be prevented by them if it can increase the amount of antibodies targeting these bacteria. In this study, we focused on T cells and explored the epitopes of pathogenetic bacteria, aiming at the development of vaccines to prevent dental caries. Thus, this research is expected to develop into the development of a new-generation vaccine for dental caries prevention.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：歯学 免疫学 微生物学 細菌 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

う蝕は *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に代表されるう蝕原性菌によって引き起こされる感染症で、細菌が食物の糖質から産生する酸によって歯質が脱灰される(歯が溶解され破壊される)疾患です。う蝕の予防は、う蝕原性菌が歯面へ付着することを予防することに他なりません。宿主の防御因子は唾液であり、唾液中にはリゾチーム、ラクトフェリン、分泌型 IgA 抗体 (sIgA) といった成分が含まれています。この中で分泌型 IgA 抗体は、B 細胞から分化した形質細胞によって産生され、腸管粘膜免疫で重要な役割を果たしています。通常、これらの分泌型 IgA 抗体は一般的な病原細菌感染からの保護を担当していて、T 細胞の免疫応答が関与しない T 細胞非依存的な抗体産生により供給されています。一方、ヘルパー T 細胞依存性である抗原特異的な分泌型 IgA 抗体が、特定の病原微生物を標的とする粘膜免疫応答では重要な役割を担っています (*Nat. Rev. Immunol.* 12: 821-832, 2012)。免疫学的アプローチによる適確なう蝕予防を展開するには、T 細胞依存性な免疫応答に関する研究が必要であると考えられます。しかしながら、う蝕原性菌の全菌体ワクチンには心筋との交差反応性があることから禁忌とされ、抗体エピトープを念頭においた成分ワクチンの開発へと移行していった背景があり、これまでのう蝕原性菌に対する免疫学的研究において、T 細胞依存性な免疫応答に焦点をおいた研究は認められません。

近年の目覚ましい腸管粘膜免疫系システムの理解により、小腸をはじめとする腸管が免疫応答の重要な「場」であることが明らかになってきました。このことは、口腔内のう蝕原性菌が経消化管的に小腸に到達するため、う蝕原性菌に対する免疫応答に関しても例外ではないと考えられます。腸管内の病原微生物は、腸管上皮の M 細胞を介して粘膜免疫の誘導組織であるパイエル板へ輸送されて樹状細胞 (DC) に取込まれます。抗原特異的 IgM 型 B 細胞の活性化とその IgA へのクラススイッチは抗原刺激された T 細胞依存性に CD40L/CD40 シグナルを受けることで誘導されます (*Nat. Rev. Immunol.* 8: 421-434, 2008)。その後、抗原特異的 IgA 抗体を産生する形質細胞は唾液腺などの実効組織へ遊走しなくてはなりません。唾液腺に到達した形質細胞は抗原特異的な分泌型 IgA 抗体を産生し、腺組織のポリ Ig レセプターを介したトランスサイトーシスによって唾液中に分泌型 IgA 抗体が分泌され、う蝕原性菌の表層蛋白抗原に作用することで歯面への付着が阻害され、う蝕の予防が成立することが期待されます。この一連の流れで、う蝕原性菌に対する T 細胞依存性な免疫応答、ならびに形質細胞の分化と唾液腺への遊走のメカニズムが明らかになっていません。

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は「細胞

内分子スイッチ」として機能し、GDP を結合した不活性型から GTP を結合した活性型に変換されると、種々のエフェクター分子と会合し、細胞の分化・遊走など様々な細胞機能を制御します。その上流で機能し、不活性型から活性型への変換を担う分子を総称してグアニンヌクレオチド交換因子 GEF と呼び、1) Vav に代表される DH-PH ドメインを有した古典的 GEF、2) DOCK2 などの DHR2 ドメインを有する GEF、3) 研究代表者が同定した SLAT に代表される PH-DH 様ドメインを有した新種の GEF、という異なる分子メカニズムで機能すると考えられている 3 種類のサブファミリーの GEF が同定されています。研究代表者は、これら 3 種類全てのタイプの GEF を幅広く対象として機能解析することで、世界をリードしてきました (*Nat. Rev. Immunol.* 9: 630-644, 2009)。

このように局所での感染が原因でおこる疾患と考えられてきたう蝕を、腸管を主体とする全身における免疫細胞の分化と遊走が疾患を制御するという視点で理解し、これまでの既成概念にとられない新しい発想で本研究を展開しました。

2. 研究の目的

本研究は、病原微生物と宿主免疫応答の両側面からのアプローチによって、IgA 抗体の産生を誘導するう蝕原性菌の T 細胞抗原エピトープを同定するとともに、分泌型 IgA 抗体を産生する形質細胞の分化・遊走の制御機構を解明することで、う蝕原性菌を選択的にターゲットとする新しい予防法の開発へ向けた分子基盤の確立を目的としています。

乳歯のう蝕と永久歯のう蝕には強い関連が認められ、乳幼児期のう蝕予防についての社会的な関心が高まっています。う蝕は特定の病原微生物が原因で発症する口腔内感染症ですが、病原微生物に対する宿主の免疫力を改善する予防法の開発は未だに進んでおりません。特に、甘味食品の摂取頻度が高く、歯口清掃が未熟な乳幼児期のう蝕予防においては、ブイレクスルーをもたらず可能性が残されています。本研究は、う蝕原性菌に対する分泌型 IgA 抗体を T 細胞依存性な免疫応答の視点から解析し、臨床応用への道を切り拓くものです。このように新しい視点からの免疫学的アプローチによるう蝕に対する疾病予防の新世代ワクチン開発に向けた研究を進めることは、社会的な要請が高いテーマであり、成功した場合に卓越した成果が期待されます。

3. 研究の方法

本研究では、う蝕の発症と進行について、局所のみならず全身における免疫細胞の分化と遊走に焦点をおき、う蝕原性菌に対する T 細胞依存性な免疫応答の抗原を明らかにすることで、う蝕の新しい予防法の分子基盤を確立することを目的として研究を進めまし

た。

(1) 抗原特異的分泌型 IgA 抗体の産生を誘導するう蝕原性菌の T 細胞抗原エピトープの同定するために、抗原としてう蝕原性菌の中でも最も頻度の高い *S. mutans* を用いて、細菌定着因子 PAc (Protein Antigen c) などの細菌表面蛋白抗原に限定することなく、全菌体抽出液ならびに可溶性画分と不溶性画分、さらに細胞膜画分、細胞壁画分、菌体外分泌画分といった各種分画成分に分離しました。

(2) インターロイキン 5 (IL-5) は B 細胞を IgA ヘクラススイッチさせることが知られています。上記(1)で得られた各種分画を抗原として、マウスのヘルパー T 細胞を抗原提示細胞で刺激した後、IL-5 産生 Th 細胞への分化誘導能について細胞内サイトカイン染色により IL-5 を指標にフローサイトメトリーで解析しました。

(3) 濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) には B 細胞をクラススイッチさせる高い能力があることが知られています。各種分画を抗原として、マウスのヘルパー T 細胞を抗原提示細胞で刺激した後、Tfh 細胞への誘導能を CD4、PD-1、ICOS を指標にフローサイトメトリーにて評価しました。

(4) *S. mutans* 菌体をマウスへ胃ゾンデにて投与して感作する実験系を構築しました。このマウスを用いて、上記(3)と同様の評価系により各種分画を抗原として、Tfh 細胞への誘導能を解析しました。

(5) *S. mutans* 菌体感作マウスの脾臓、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板といった各種二次リンパ組織を対象に、Tfh 細胞への分化と B 細胞の IgA 抗体へのクラススイッチについて解析しました。

(6) 未感作マウスを対象に、T 細胞存在下で樹状細胞に各種分画成分を抗原提示させて、B 細胞の IgA 抗体へのクラススイッチを評価しました。

(7) 分泌型 IgA 抗体を産生する形質細胞の分化と唾液腺への遊走のメカニズムを解明するために、*S. mutans* 菌体をマウスへ胃ゾンデにて投与する実験系を用いて、唾液腺における IgA 抗体産生 B 細胞を解析しました。

4. 研究成果

う蝕原性菌の中でも最も頻度の高い *S. mutans* を対象に解析を行いました。ブレインハートインフージョン培養液、トリプチックソイブロス培養液といった各種細菌用培養液にて *S. mutans* の培養条件の検討を行いました。これらの培養液で培養された *S. mutans* を用いて、ビーズ破碎を行うなどして菌体を

破壊した後、遠心分離操作を行うことで、全菌体抽出液ならびに可溶性画分と不溶性画分、さらに細胞膜画分、細胞壁画分、菌体外分泌画分といった各種分画成分に分離しました。得られた分画は SDS-PAGE を行った後に CBB 染色をすることで、それぞれの分画に特徴的なタンパク質が分離されていることを確認しました。

IL-5 は B 細胞を IgA ヘクラススイッチさせることが知られています。マウス T 細胞を分離し、抗原として得られた *S. mutans* の分画成分ならびに抗原提示細胞で刺激した後、T 細胞の表面分子の発現と IL-5 産生を指標として細胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリーにて分画成分を解析しました。未感作マウスの T 細胞ではこれらの分画成分では IL-5 産生能が高くないことが明らかになりました。

Tfh 細胞は B 細胞をクラススイッチさせる高い能力があることが知られています。CD4、PD-1、ICOS を指標に Tfh 細胞への誘導能をフローサイトメトリーで解析しました。Tfh 細胞への分化誘導能が高い *S. mutans* の分画成分が存在することが明らかになりました。

マウスに胃ゾンデにて *S. mutans* を投与する感作マウスの実験系を構築しました。このマウスから分離した T 細胞を用いて、上記と同様の実験を行いました。この分画成分は感作マウスでは Tfh 細胞への分化がさらに高い結果が得られました。

感作マウスの脾臓、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板といった各種二次リンパ組織から分離されたヘルパー T 細胞を対象に、CD4、PD-1、ICOS を指標に Tfh 細胞への誘導能を解析したところ、生体内で Tfh 細胞への分化が亢進している組織を特定しました。同様に、B 細胞の IgA 抗体へのクラススイッチについても亢進していることを確認しました。

次に、未感作マウスを対象に、特定された免疫組織の細胞を用いて、T 細胞存在下で樹状細胞に各種菌体分画成分を抗原提示させると、Tfh 細胞への誘導能の高い分画成分において B 細胞の IgA 抗体へのクラススイッチが亢進することを見出しました。

得られた *S. mutans* の分画成分に抗原特異的分泌型 IgA 抗体の産生を誘導するう蝕原性菌の T 細胞抗原エピトープが含まれている可能性が示唆されました。今後は T 細胞抗原エピトープをさらに絞り込み、免疫賦活剤とともに vivo に投与してマウスう蝕発症モデルを用いて検証していく予定です。

一方、分泌型 IgA 抗体を産生する形質細胞の分化と唾液腺への遊走のメカニズムを解明するために、*S. mutans* 菌体をマウスへ胃ゾンデにて投与する実験系を用いて、唾液腺における IgA 抗体産生 B 細胞を解析したところ、菌体を投与することで IgA 抗体へのクラススイッチをした B 細胞が増加することを見出しました。

このようにう蝕原性菌に特異的な分泌型IgA抗体を誘導するために、T細胞依存的な免疫応答によるう蝕原性菌ワクチンを開発するための分子基盤を構築しました。既知の細菌定着因子抗原と組み合わせるなどして、う蝕に対するより強力な疾病予防の新世代ワクチン開発へと研究が展開していくことが期待されます。

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 5 件)

Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Ikezaki, S., Narita, Y., Arita-Morioka, K., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Kojima, H. and Tanaka, Y. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. *FEMS Yeast Res.* 18(3): foy018, 2018 [査読有] doi: 10.1093/femsyr/foy018.

Yamazaki, S., Tanaka, Y., Araki, H., Kohda, A., Sanematsu, F., Arasaki, T., Duan, X., Miura, F., Katagiri, T., Shindo, R., Nakano, H., Ito, T., Fukui, Y., Endo, S., and Sumimoto, H. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci. Rep.* 7: 17402, 14 pages, 2017. [査読有] doi: 10.1038/s41598-017-17597-3.

Hashimoto, M., Nagao, J., Ikezaki, S., Tasaki, S., Arita-Morioka, K., Narita, Y., Cho, T., Yuasa, K., Altman, A. and Tanaka, Y. Identification of a novel alternatively spliced form of inflammatory regulator SWAP-70-like adapter of T cells. *Int. J. Inflamm.* Article ID 1324735, 10 pages, 2017. [査読有] doi: 10.1155/2017/1324735.

Yamamura, K., Uruno, T., Shiraishi, A., Tanaka, Y., Ushijima, M., Nakahara, T., Watanabe, M., Kido-Nakahara, M., Tsuge, I., Furue, M. and Fukui, Y. The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to skin inflammation via IL31 induction. *Nature Commun.* 8: 13946, 13 pages, 2017. [査読有] doi: 10.1038/ncomms13946.

Nagao, J., Cho, T., Mitarai, M., Iohara, K., Hayama, K., Abe, S. and Tanaka, Y. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of a salmon protamine peptide and its derived cyclic peptide against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 17(1): fow099, 2017. [査読有] doi: DOI: 10.1093/femsyr/fow099.

[学会発表](計 20 件)

Ikezaki, S., Nagao, J., Hashimoto, M., Tasaki, S., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Narita, Y., Arita-Morioka, K., Cho, T., Tanaka, Y. A novel alternative splicing of T-cell signaling molecule modulates TCR-mediated responses in Th2 cells. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Sendai, 2017年12月12-14日、2017.

有田(森岡)健一、永尾潤一、成田由香、田崎園子、池崎晶二郎、安松香奈江、長環、田中芳彦. Myricetin 類縁体を用いたバイオフィルム感染症の制御法の開発. 第59回歯科基礎医学会学術大会、松本、9月16-18日、2017.

池本梨央南、豊屋有希、永尾潤一、成田由香、有田(森岡)健一、安松香奈江、田崎園子、池崎晶二郎、長環、田中芳彦. う蝕ならびに歯周病を抑制する口腔内細菌の探索. 第59回歯科基礎医学会学術大会、松本、9月16-18日、2017.

池崎晶二郎、永尾潤一、橋本麻利江、田崎園子、安松香奈江、成田由香、有田(森岡)健一、長環、池邊哲郎、田中芳彦. 「ヘルパーT細胞に発現する新規免疫シグナル分子の同定と機能解析. 第59回歯科基礎医学会学術大会、松本、9月16-18日、2017.

安松香奈江、大多和昌人、成田由香、長環、加倉加恵、山本勝己、田中芳彦、城戸寛史. インプラント周囲炎治療に関する基礎的研究. 第34回日本口腔インプラント学会・九州支部学会大会、熊本、1月21-22日、2017.

大多和昌人、成田由香、安松香奈江、長環、加倉加恵、山本勝己、田中芳彦、城戸寛史. インプラント表面の除染方法に関する基礎的研究 - インプラント表面汚染モデルの作成 -. 第34回日本口腔インプラント学会・九州支部学会大会、熊本、1月21-22日、2017.

Hashimoto, M., Nagao, J., Ikezaki, S., Tasaki, S., Narita, Y., Arita (Morioka), K., Yasumatsu, K., Cho, T., Yuasa, K., Tanaka, Y. Role of a novel immune signaling molecule in Th2-type response. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Okinawa, 2017年12月5-7日、2016.

Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Narita, Y., Hashimoto, M., Ikezaki, S., Yasumatsu, K., Arita (Morioka), K., Kojima, H., Tanaka, Y. Investigation of the mechanism of T cell response in oral candidiasis. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Okinawa, 2017年12月5-7日、2016.

橋本麻利江、永尾潤一、田崎園子、池崎

晶二郎、成田由香、長環、有田(森岡)健一、湯浅賢治、田中芳彦. アレルギー疾患に関わる新しいシグナル分子の解析. 第23回日本歯科医学会総会、福岡、10月21-23日、2016.

田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御する免疫制御機構の解明. 第23回日本歯科医学会総会、福岡、10月21-23日、2016.

大多和昌人、城戸寛史、田中芳彦、長環、成田由香. インプラント体除染方法に関する *in vitro* 研究～歯周病原菌細菌を用いて～. 第23回日本歯科医学会総会、福岡、10月21-23日、2016.

池崎晶二郎、長環、田崎園子、橋本麻利江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、田中芳彦. Mild heat stress 条件下における *Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答. 第60回日本医真菌学会学術集会、東京、10月1-2日、2016.

田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. *Candida albicans* に対するT細胞応答を誘導する表層抗原探索. 第60回日本医真菌学会学術集会、東京、10月1-2日、2016.

有田(森岡)健一、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、田崎園子、池崎晶二郎、長環、田中芳彦. 分子シャペロン DnaK をターゲットにした低分子化合物を用いた新しいバイオフィルム阻害法の開発. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.

橋本麻利江、永尾潤一、田崎園子、池崎晶二郎、成田由香、有田(森岡)健一、長環、湯浅賢治、田中芳彦. アレルギーに関連した新しいT細胞シグナル分子の機能解析. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.

田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. 口腔カンジダ症を制御するT細胞応答の誘導. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.

池崎晶二郎、長環、田崎園子、橋本麻利江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、池邊哲郎、田中芳彦. *Candida albicans* のバイオフィルム形成における mild heat stress の影響. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.

永尾潤一、成田由香、田崎園子、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、長環、田中芳彦. 病原微生物による歯周病の免疫学的解析. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.
成田由香、永尾潤一、田崎園子、有田(森

岡)健一、橋本麻利江、池崎晶二郎、長環、田中芳彦. 歯周病をひきおこす病原微生物の菌体成分の同定. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.

長環、田崎園子、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、田中芳彦. *Candida albicans* 由来 CD4⁺ T細胞分化誘導画分の解析. 第58回歯科基礎医学会学術大会、札幌、8月24-26日、2016.

〔図書〕(計 2 件)

田中芳彦(分担執筆). CHAPTER 5 基礎免疫学. 石原和幸、今井健一、小川和彦、落合邦康、落合智子、葛城啓彰、上西秀則、清浦有祐、小西清司、田中芳彦、中澤太、浜田信城、前田伸子 編集. 口腔微生物学 - 感染と免疫 - 第6版. 東京. 学建書院. 215-263. 2018.

田中芳彦(分担執筆). 第2章 免疫学 V 細胞性免疫. 川端重忠、小松澤均、大原直也、寺尾豊、浜田茂幸 編集. 口腔微生物学・免疫学 第4版. 東京. 医歯薬出版. 96-102. 2016.

〔その他〕

ホームページ等

研究者HP: http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/10_2_1.html

所属研究機関研究分野HP: <http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/kouza.html#kansen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 芳彦 (TANAKA YOSHIHIKO)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号: 00398083

2) 研究分担者

長環 (CHO TAMAKI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号: 90131870

永尾潤一 (NAGAO JUN-ICHI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号: 30509047

成田 由香 (NARITA YUKA)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号: 50758050

(3) 連携研究者

なし