

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17296

研究課題名(和文) GroEL発現乳酸菌を用いた経粘膜ワクチンデリバリー製剤の開発

研究課題名(英文) Development of transmucosal vaccine delivery formulation using GroEL-expressing lactic acid bacteria

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：経粘膜ワクチンは、全身系免疫および粘膜系免疫を共に誘導できる簡便かつ低侵襲的なワクチンである。GroELおよびCpG ODNを使用したワクチンは、P.gingivalis感染による歯周病を抑制するのに効果的であり、舌下投与も粘膜および全身の抗原特異的抗体応答の誘導に効果的である。本研究では舌下と経鼻のワクチンを比較した。結果、経鼻でのGroEL特異的抗体価が高いのは、NALTの存在によると考えられる。舌下の場合にはNALTのような粘膜関連リンパ組織はないため、アジュバントとして高用量のCpG ODNが必要だった。アジュバントと抗原を同時に適用すると、抗原特異的な免疫応答を効果的に誘導できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現存のワクチンは注射型が主流であり、注射の副作用による刺入部位の痛みやアナフィラキシーの可能性がある。しかし、経鼻・舌下投与の経粘膜ワクチンは、経口摂取された抗原分子や経口ワクチンが受ける腸肝循環および肝臓代謝の初回通過効果、ならびに胃での摂取された分子の即時破壊を回避できる。したがって、経鼻・舌下経路を介したワクチン接種は、注射の悪影響を回避し、粘膜系免疫を誘発するためのより良い選択と考える。

研究成果の概要(英文)：The oral cavity is dominated by both mucosal and systemic immune systems, due to the presence of immunoglobulin (Ig)A antibodies (Abs) in saliva and IgG Abs in gingival crevicular fluid. Transmucosally administered vaccines allowing the development of both systemic and local immune responses are thus optimal for preventing oral infections. As the basic experiment, optimal concentrations of GroEL as antigen (Ag) and synthetic oligonucleotides containing unmethylated CpG dinucleotide (CpG ODN) as a mucosal adjuvant for sublingual immunization were examined in mice. GroEL-specific immune responses were observed in sublingual immunization with a combination of GroEL plus cholera toxin or GroEL plus CpG ODN. These results suggest that the sublingual administration of GroEL plus CpG ODN is effective for inducing mucosal and systemic Ag-specific Ab responses.

研究分野：経粘膜ワクチン

キーワード：GroEL CpG ODN HSP60 P.gingivalis sublingual immunization

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病をワクチンで予防する為の試みが数多くの動物実験で行われている。しかしながら、歯周病の発症には歯肉溝において口腔バイオフィルムを形成する複数の細菌が関わっており、単一菌を用いた動物実験では効果が疑問視される。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. gingivalis*) や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 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。GroEL に対する抗体価は健常者と比較して歯周炎患者で著しく高く、歯周治療により血中の GroEL 抗体価レベルを有意に減少することができる。さらに、GroEL に対する唾液 IgA 抗体価と歯周病の重症度には正の相関が認められている。近年 *P. gingivalis* GroEL が歯周組織の歯骨細胞を活性化し、骨吸収を促進することが報告されている。これらの知見は、GroEL が歯周病予防の為の有用な免疫源であると同時に病態形成にも深く関与していることを示唆している。粘膜投与型ワクチンは投与法の簡便さ、安全性はもとより、歯肉溝中の IgG や唾液中への IgA 抗体応答誘導能に優れている。申請者らは口腔への免疫応答誘導を目的として粘膜免疫を応用した経粘膜投与型ワクチン開発を行っている。これまで *P. gingivalis* の口腔感染予防の為の経口ワクチンや経鼻ワクチンの開発を行い、*P. gingivalis* の主要な病原因子の 1 つである分子量 40k-Da の外膜タンパク (40k-OMP) の経鼻免疫により *P. gingivalis* 感染による歯槽骨吸収を抑制することを報告した。しかしながら、ワクチンの経口免疫は消化管の酸や酵素で分解される為、大量の抗原を必要とする難点があり、また腸管免疫を惹起するには優れているが、口腔や気道の免疫には経鼻免疫や舌下免疫の方が効果が高い。舌下免疫はアレルギーの領域ですでに花粉症に対する治療として臨床応用されていることから、適切な粘膜免疫アジュバントを用いての低容量ワクチンの舌下投与は、歯周病予防に有望であると考えられる。申請者は、*P. gingivalis* のリコンビナント GroEL と粘膜アジュバントであるコレラトキシンの混合物を舌下免疫することにより、血清中に抗原特異的 IgG 抗体、唾液中に抗原特異的 SIgA 抗体の産生を認めたと粘膜アジュバントとして動物実験に使用されるコレラトキシンや大腸菌易熱毒素は毒性が高く人への臨床応用には使用できない。申請者は既に *P. gingivalis* リコンビナント GroEL を用いて免疫寛容実験を行い、抗原としての有用性を認めている。効果的な粘膜免疫応答を誘導するには、適切な粘膜アジュバントの同時投与が必要である。粘膜アジュバント CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) は、B 細胞や樹状細胞などの抗原提示細胞によって発現される Toll 様受容体 9 (TLR9) と相互作用し、1 型ヘルパー T (Th1) 細胞および炎症性サイトカイン応答を誘導する。以前の研究において、経口投与または経皮投与した場合に強力なアジュバントであることが示されている。経粘膜ワクチン開発のためには安全かつ有効なアジュバントは必要不可欠である。これらの学術的背景及び研究結果から、マウスにおける GroEL 抗原および粘膜アジュバント CpG ODN による経鼻・舌下免疫の有効性を評価した。さらに、経鼻免疫による *P. gingivalis* 感染の炎症抑制および歯周病骨吸収に対する抑制効果を検討した。

### 2. 研究の目的

歯周病は複数の細菌が作用することで生じる混合感染症である。本研究は、歯周病原細菌が共通に保有する HSP(GroEL)を免疫原として、マウスにおける GroEL 抗原および粘膜アジュバント CpG ODN による経鼻・舌下免疫の有効性を評価した。さらに、経鼻免疫による *P. gingivalis* 感染の炎症抑制および歯周病骨吸収に対する抑制効果および免疫担当細胞の動向を検証する。

### 3. 研究の方法

歯周病原細菌が共通に保有する HSP(GroEL)を免疫原として、マウスにおける GroEL 抗原および粘膜アジュバント CpG ODN による経鼻・舌下免疫の有効性を検討。

#### (1) 経鼻ワクチン GroEL および CpG ODN による粘膜免疫応答

BALB/c マウスに GroEL を既存の粘膜免疫アジュバント (CpG ODN) と共に経鼻免疫を行う。適切な抗原投与量、投与回数はこれまでの実験結果を参考にし、予備実験を行って決定する。マウスの脾臓、唾液腺、及び頸部リンパ節よりリンパ球を分離し、GroEL 特異的 IgG 抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて測定。口腔感染による歯槽骨吸収の度合いを測定するために、マウスを安楽死することなく CT 撮影が可能な小動物用のマイクロ CT (を用いて、歯槽骨の骨密度並びに歯槽骨吸収について経時的に解析する。

#### (2) 舌下ワクチン抗原 GroEL および粘膜アジュバント CpG ODN の最適濃度の検討

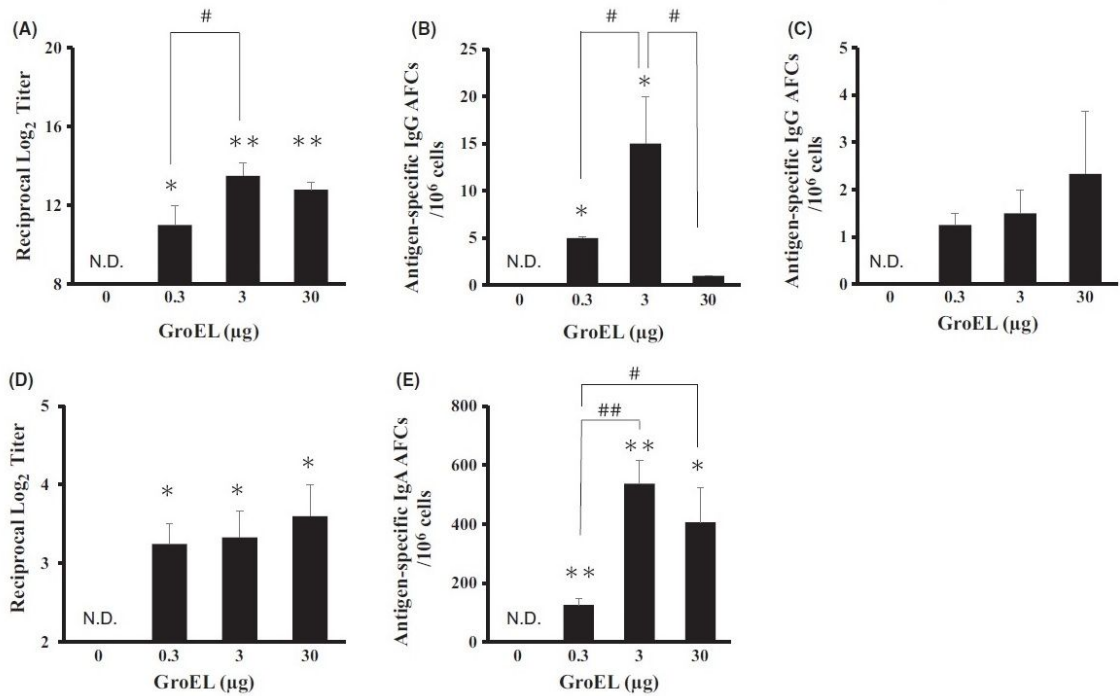
粘膜アジュバントであるコレラ毒素にて抗原 GroEL の最適濃度を決定し、続いて粘膜アジュバント CpG ODN の最適濃度を決定する。GroEL 特異的免疫応答は、GroEL とコレラ毒素または GroEL と CpG ODN の組み合わせによる舌下免疫で観察する。

### 4. 研究成果

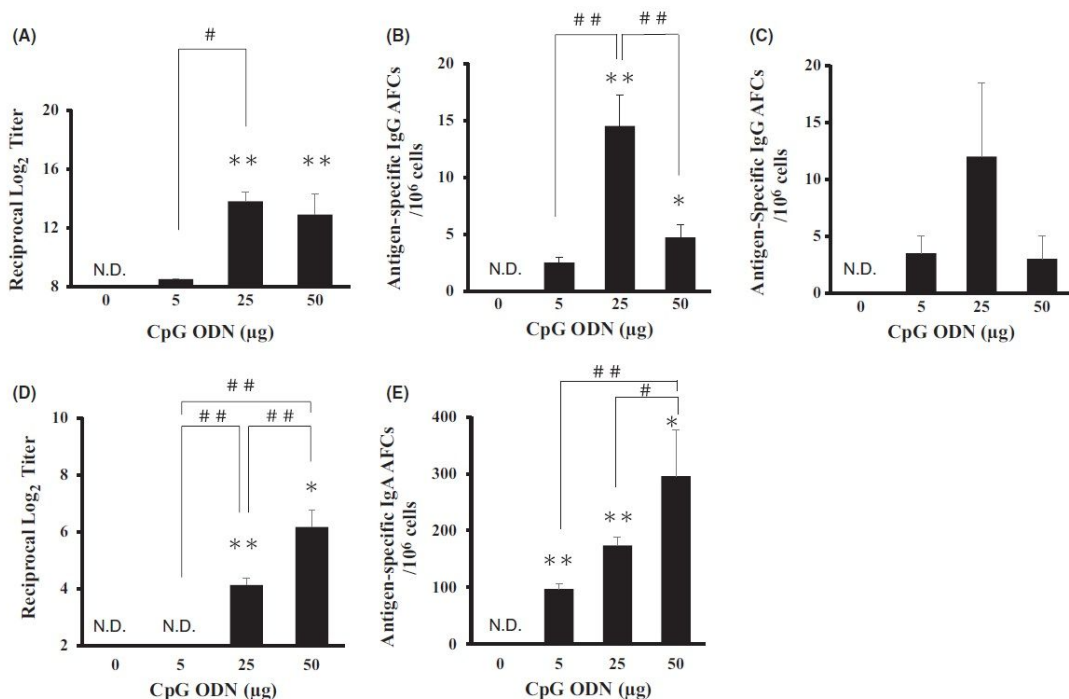
#### (1) 経鼻ワクチン GroEL および CpG ODN による粘膜免疫応答

GroEL (3 $\mu$ g) および CpG ODN (10 $\mu$ g) を組み合わせた経鼻ワクチンは最終投与から 1 週間後に、GroEL 特異的 IgG、IgA、および分泌型免疫グロブリン A (S-IgA) 抗体を

誘導した。重要なことに、*P. gingivalis* をマウスに経口感染させた時、マイクロコンピューター断層撮影 (micro-CT) データにより、経鼻ワクチン免疫群は非免疫群と比較して歯槽骨吸収を有意に抑制した。さらに、*P. gingivalis* 感染によって増加した炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-6 および HSP60 の mRNA レベルはワクチン投与により有意に減少を示した。



(2) 舌下ワクチン抗原 GroEL および粘膜アジュバント CpG ODN の最適濃度の検討  
GroEL 特異的免疫応答は、GroEL とコレラ毒素または GroEL と CpG ODN の組み合わせによる舌下免疫で観察された。舌下免疫における抗原およびアジュバントとしての GroEL および CpG ODN の最適濃度は、マウスあたりそれぞれ 3μg および 25μg であった。



以上の結果より、GroEL および CpG ODN を使用した経鼻ワクチンは、*P. gingivalis* 感染による歯周病を抑制できる効率的で無駄のない経粘膜ワクチンであり、GroEL および CpG ODN の舌下投与も粘膜および全身の抗原特異的抗体応答の誘導に効果的であると結論付けた。舌下免疫と比較して経鼻免疫における GroEL 特異的抗体価がわずかに高いのは、NALT の存在によるものと考えられる。また、舌下免疫の場合は NALT のような粘膜関連リンパ組織は存在しないため、アジュバントとして高用量の CpG ODN が必要であった。適切な量の粘膜アジュバントを使用することにより、本研究で示すように、少量の抗原でもより高いレベルの血清 GroEL 特異的 IgG 抗体を誘導することを可能にした。したがって、アジュバントと抗原を同時に適用すると、抗原特異的な免疫応答を効率的に誘導できる。

本研究は、GroEL を使用した経粘膜ワクチンは、歯周病を予防するための効果的で安全なワクチンの候補として期待される。

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<br>Chang Emily, Kobayashi Ryoki, Hagiwara Mio, Komiya Masamichi, Kurita Ochiai Tomoko                                     | 4. 巻<br>16            |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of suitable antigens and adjuvant concentration for sublingual immunization to prevent periodontal disease | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Oral Science International   | 6. 最初と最後の頁<br>80 ~ 86 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/osi2.1018   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Emily Chang, Ryoki Kobayashi, Mio Hagiwara, Kohtaro Fujihashi, Masamichi Komiya, Tomoko Kurita-Ochiai  |
| 2. 発表標題<br>Impaired salivary SIgA antibodies elicit oral dysbiosis and subsequent induction of alveolar bone loss |
| 3. 学会等名<br>The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>張うえか, 小林良喜, 濱野美緒, 落合智子, 小宮正道    |
| 2. 発表標題<br>抗GroEL特異抗体誘導舌下ワクチンによる歯周病抑制効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第71回NPO法人 日本口腔科学会学術集会           |
| 4. 発表年<br>2017年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>張うえか, 濱野美緒, 小宮正道                |
| 2. 発表標題<br>舌下ワクチンによる抗GroEL特異抗体の長期間持続に関する検討 |
| 3. 学会等名<br>第62回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会         |
| 4. 発表年<br>2017年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Emily Chang, Ryoki Kobayashi, Mio Hagiwara, Kohtaro Fujihashi, Masamichi Komiya, Tomoko Kurita-Ochiai |
| 2. 発表標題<br>Salivary SIgA regulates oral dysbiosis subsequent bone resorption                                     |
| 3. 学会等名<br>97th general session&exhibition of the IADR, 2019.6.21,Vancouver                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|--|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 落合 智子<br><br>(OCHIAI Tomoko)<br><br>(20130594)   |                       |    |
| 研究協力者 | 張 うえか<br><br>(CHANG Emily)                       |                       |    |
| 研究協力者 | 小林 良喜<br><br>(KOBAYASHI Ryoki)<br><br>(10609085) |                       |    |