

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17036

研究課題名（和文）免疫学的アプローチによるう蝕予防法の新戦略

研究課題名（英文）A novel immunological approach to prevent dental caries

研究代表者

有田 健一（Arita, Ken-ichi）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：90780205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫学的アプローチによりう蝕に対する効果的な新しい予防法の開発へ向けた研究基盤を確立することを目的とした。特に、う蝕原性菌であるStreptococcus mutansに対する免疫応答の誘導組織としての腸管免疫系に着目し、う蝕の病態形成の場である口腔との関連性を解析した。In vivo およびin vitroの解析からStreptococcus mutansの腸管感作により、う蝕が予防できるメカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、う蝕の効率的な予防法の開発を目的として、宿主が本来持っているS. mutansに対する抗原特異的な分泌型IgA抗体の産生をT細胞依存的な免疫応答に着目した解析から、臨床応用への道を切り開くものである。特に乳幼児期のう蝕予防について、乳歯のう蝕と永久歯のう蝕には強い関連が認められることから、社会的な関心は高い。成果はう蝕予防に対する次世代ワクチン開発に繋がり、展開性も高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Streptococcus mutans has been associated with the dental caries. To establish the novel immunological approach to prevent dental caries, we focused on the gut immunity that induces immunological response against streptococcus mutans, and analysed the relation with oral cavity. And then, we have elucidated the mechanism by which intestinal sensitization of streptococcus mutans can prevent dental caries.

研究分野：免疫学

キーワード：腸管免疫 疾患モデルマウス ワクチン IgA Tfh クラススイッチ Streptococcus パイエル板

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔内 2 大感染症の一つであるう蝕(虫歯)は、う蝕原性菌が原因となり発症する。う蝕を防ぐ方法として、口腔清掃やフッ素の塗布などによる予防法が定着してきたが、う蝕原性菌に対する生体内の免疫力に注目してう蝕を予防する方法の開発は進んでいない。

う蝕原性菌に対する生体内の防御機構として、リゾチーム、ラクトフェリン、分泌型 IgA 抗体 (sIgA) といった唾液中の成分が、う蝕原性菌の歯面への付着を防ぎ、う蝕予防の一端を担っている。効率的にう蝕を予防するためには、宿主における唾液中の抗原特異的な分泌型 IgA 抗体 (sIgA) の産生を増やし、う蝕原性菌の歯面への付着を防ぐことが最も有効であると考えられる。

近年、腸管免疫系システムに対する理解が著しく進んだことで、免疫応答の重要な「場」が小腸をはじめとする腸管であることが明らかになり、特定の腸内細菌が免疫応答を制御していることが明らかになってきた⁽¹⁾。このことは、う蝕原性菌の場合も経消化管的に小腸に到達し、M 細胞を介して腸管組織内の粘膜免疫の誘導組織であるパイエル板に取り込まれていることは例外でないと考えられる。その後、う蝕原性菌は樹状細胞に取り込まれ、抗原刺激された T 細胞依存的に CD40L/CD40 シグナルを B 細胞が受けることで IgA のクラススイッチが誘導されることが想定される⁽²⁾。近年、特定の細菌を標的とする抗原特異的な分泌型 IgA 抗体産生において、小腸パイエル板に多く存在するクラススイッチのマスターレギュレーターである濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{fh} 細胞) が重要な役割を担っていることも明らかになってきた⁽³⁾。よって、う蝕原性菌においても、生体にて経消化管的に小腸に到達し腸管組織内のパイエル板に取り込まれ、T_{fh} 細胞の応答を介した IgA へのクラススイッチが生じていることが考えられる。

これまでに申請者は、マウスを用いた解析から、う蝕原性菌に対する免疫応答として、腸管組織において濾胞性ヘルパー T 細胞 (T_{fh} 細胞) への分化及び B 細胞の活性化と IgA へのクラススイッチが起こっていることを明らかにしてきた。よって腸管におけるう蝕原性菌への免疫応答に着目し、T_{fh} 細胞依存的な B 細胞のクラススイッチおよび免疫細胞の遊走に焦点を当て、う蝕の病態を解明することによって、効果的なう蝕に対する新しい予防法の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、新しいう蝕の効率的な予防法を開発を目的として、宿主が本来持っているう蝕原性菌に対する抗原特異的な分泌型 IgA 抗体の産生を T_{fh} 細胞依存的な免疫応答ならびに、免疫細胞の遊走に着目した解析から行い、より効果的なう蝕予防法を目指し、う蝕

原性菌に対する T_{fh} 細胞依存的な分泌型 IgA 抗体を誘導するう蝕原性菌由来 T 細胞抗原を特定し、臨床応用への道を切り開くことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) う蝕原性菌 (*Streptococcus mutans*) 特異的 T_{fh} 細胞の分化と B 細胞の IgA へのクラススイッチの検証を行った。In vitro でマウス骨髄から Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) を用いて樹状細胞に分化させ、*Streptococcus mutans* 抗原を抗原提示させたのち、マウス由来のヘルパー T 細胞及び B 細胞を用いて反応させ、T_{fh} への分化を CD4、PD-1、CXCR-5 を指標に flow cytometry を用いて評価した。また、胚中心の形成および IgA へのクラススイッチを B220、GL-7、FAS、CD138、IgA などを指標に flow cytometry 及び ELISA を用いて評価した。さらにこの検証を *Streptococcus mutans* 腸管感作マウスおよび非感作マウスを用いて比較した。さらに、クラススイッチを引き起こす *Streptococcus mutans* 由来の成分の特定を目的として、全ゲノムが判明している *Streptococcus mutans* を抗原として分画し、細胞壁、細胞膜、細胞質といった各種菌体成分にした。これらの成分を上記の方法を用いて、IgA へのクラススイッチを flow cytometry 及び ELISA を用いて評価した。
- (2) 口腔と腸管における免疫細胞の遊走を解析した。光照射で色が変わる遺伝子改変マウスを用いて腸管由来 B 細胞の遊走を CD45、B220、IgA、CD138 などを指標に Flowcytometry にて評価した。また、この検証を *Streptococcus mutans* 腸管感作マウスおよび非感作マウス、及び *Streptococcus mutans* 口腔感作マウスおよび非感作マウスを用いて比較した。さらに、口腔に遊走した B 細胞の抗原特異性の評価を *Streptococcus mutans* あるいは *Streptococcus mutans* 由来タンパク質をプレートコートし、ELISA にて *Streptococcus mutans* 特異的 IgA を検出した。
- (3) う蝕の病態モデルを用いた腸管免疫ワクチンの評価を行った。マウスにスクロース水とスクロース含有のエサを与え、*Streptococcus mutans* の口腔感染により、う蝕が生じるう蝕モデルマウスの評価系にて、う蝕に対する腸管免疫ワクチンとしての *Streptococcus mutans* の腸管感作の効果も *Streptococcus mutans* 腸管感作マウスおよび非感作マウスを用いて評価した。さらに、唾液及び血清中の *Streptococcus mutans* 特異的な抗体の評価を ELISA にて評価した。

4 . 研究成果

- (1) *Streptococcus mutans*特異的Tfh細胞の分化とB細胞のIgAへのクラススイッチを *in vitro* で検証した。*Streptococcus mutans* 腸管感作マウスおよび非感作マウスを用いて比較した結果、*Streptococcus mutans* の腸管感作によりTfhに分化している細胞の割合 (CD4⁺PD-1⁺CXCR5⁺)、胚中心を形成しているB細胞の割合、IgAのクラススイッチが生じているB細胞の割合が有意に増加することを見出した。また、クラススイッチを引き起こす*Streptococcus mutans* 由来の成分の特定を目的として、全ゲノムが判明している*Streptococcus mutans*を抗原として分画し、細胞壁、細胞膜、細胞質といった各種菌体成分を用いて同様の方法で評価し、IgAへのクラススイッチが亢進する菌体成分の分画があることを見出した。
- (2) 口腔と腸管における免疫細胞の遊走を評価した。光照射で色が変わる遺伝子改変マウスを用いて腸管由来B細胞の遊走をCD45、B220、IgA、CD138などを指標にflow cytometryを用いて解析した。*Streptococcus mutans* 腸管感作マウスおよび非感作マウスを用いて比較した結果、*Streptococcus mutans* の腸管感作により、口腔における腸管由来のB細胞の割合が有意に増加することが明らかになった。
- (3) う蝕の病態モデルを用いた腸管免疫ワクチンの評価を目的として、*Streptococcus mutans* の口腔感染により、う蝕が生じるう蝕モデルマウスの評価系にて、う蝕に対する腸管免疫ワクチンとしての*Streptococcus mutans* の腸管感作の効果を評価した。その結果、*Streptococcus mutans* の腸管感作により有意にう蝕を予防できることを見出した。

以上の結果より、*Streptococcus mutans* の腸管感作によりう蝕を予防できる可能性とそのメカニズムの一端が *in vivo* および *in vitro* の結果から明らかになった。さらに、効率的にう蝕を予防するために、*Streptococcus mutans* 特異的なIgA抗体を産生させるため、IgAへのクラススイッチを引き起こす*Streptococcus mutans* 由来の抗原分画を絞り込んだ。今後、特定した抗原分画からIgAへのクラススイッチを誘導するタンパク質を同定することでさらなる効率的なう蝕予防法の確立につながるだろう。これらの知見は、う蝕の新しい予防法・治療法の開発につながると思われる。

<引用文献>

- (1) *Cell*. 140:845-58, 2010
- (2) *Nat. Rev. Immunol.* 12:821-832, 2012
- (3) *Cell Host Microbe*. 17: 144-146, 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasumatsu Kanae, Nagao Jun-ichi, Arita-Morioka Ken-ichi, Narita Yuka, Tasaki Sonoko, Toyoda Keita, Ito Shoko, Kido Hirofumi, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Bacterial-induced maternal interleukin 17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 250 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0156	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 -
1. 著者名 Ikezaki Shojiro, Cho Tamaki, Nagao Jun-ichi, Tasaki Sonoko, Yamaguchi Masashi, Arita-Morioka Ken-ichi, Yasumatsu Kanae, Chibana Hiroji, Ikebe Tetsuro, Tanaka Yoshihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Mild Heat Stress Affects on the Cell Wall Structure in Candida albicans Biofilm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3314/mmj.19-00001	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 -
1. 著者名 Arita-Morioka Ken-ichi, Yamanaka Kunitoshi, Mizunoe Yoshimitsu, Tanaka Yoshihiko, Ogura Teru, Sugimoto Shinya	4. 巻 8
2. 論文標題 Inhibitory effects of Myricetin derivatives on curli-dependent biofilm formation in Escherichia coli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26748-z	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 Sugimoto Shinya, Arita-Morioka Ken-ichi, Terao Akari, Yamanaka Kunitoshi, Ogura Teru, Mizunoe Yoshimitsu	4. 巻 1
2. 論文標題 Multitasking of Hsp70 chaperone in the biogenesis of bacterial functional amyloids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0056-0	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26件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有田(森岡) 健一、永尾潤一、成田由香、根来(安松)香奈江、田崎園子、田中芳彦
2. 発表標題 バイオフィルムに着目したう蝕予防法の開発に向けた新しいアプローチ
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永尾潤一、成田由香、有田(森岡) 健一、根来(安松) 香奈江、田崎園子、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌の抗原性に着目した歯周病の病態形成機構の解明
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池本梨央南、中村麻衣、永尾潤一、有田(森岡) 健一、田中芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌に対する増殖阻害活性を示すヒト口腔内常在細菌のスクリーニングと解析
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田崎園子、有田(森岡) 健一、永尾潤一、成田由香、根来(安松) 香奈江、小島寛、田中芳彦
2. 発表標題 Th17細胞応答を介した免疫応答による口腔カンジダ症の病態制御機構の解明
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根来(安松)香奈江、永尾潤一、有田(森岡)健一、成田由香、田崎園子、城戸寛史、田中芳彦
2. 発表標題 細菌感染による母体のIL-17Aが仔の脳神経発達メカニズムに与える影響について
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会 (鹿児島)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、田崎園子、根来(安松)香奈江、田中 芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態形成に關与するT 細胞抗原の探索
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会 (鹿児島)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有田(森岡)健一、永尾 潤一、成田 由香、安松香奈江、田崎 園子、長 環、田中 芳彦
2. 発表標題 バイオフィルム形成阻害に着目した新しい蝕予防法の開発
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安松香奈江、永尾 潤一、有田(森岡)健一、成田 由香、長 環、城戸 寛史、田中 芳彦
2. 発表標題 母体の病原性細菌感染が仔の行動異常に与える影響について
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田崎 園子, 長 環, 永尾 潤一, 有田(森岡)健一, 成田 由香, 安松香奈江, 小島 寛, 田中 芳彦
2. 発表標題 口腔カンジダ症を制御する Th17 細胞応答を誘導する T 細胞抗原探索
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永尾 潤一, 成田 由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 田崎 園子, 長 環, 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61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田 由香, 永尾 潤一, 有田(森岡)健一, 田崎 園子, 安松香奈江, 長 環, 田中 芳彦
2. 発表標題 歯周炎を誘発する T 細胞抗原エピトープの同定
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池本梨央南, 中村 麻衣, 永尾 潤一, 有田(森岡)健一, 田中 芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌の増殖を抑制する口腔内細菌の同定と抗菌因子の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梁 尚陽, 永尾 潤一, 成田 由香, 有田(森岡)健一, 安松香奈江, 田崎 園子, 長 環, 田中 芳彦
2. 発表標題 歯周病の病態形成におけるプロバイオティクスの機能
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Arita-Morioka, K., Narita, Y., Yasumatsu, K., Tanaka, Y.
2. 発表標題 Exploration of the major T-cell antigen in oral candidiasis
3. 学会等名 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagao, J., Narita, Y., Arita-Morioka, K., Yasumatsu, K., Tasaki, S., Cho, T., Tanaka, Y.
2. 発表標題 Investigation of pathological mechanism of periodontal disease via T-cell mediated immune response
3. 学会等名 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有田(森岡) 健一、永尾 潤一、成田 由香、池崎晶二郎、安松香奈江、豊田 馨大、田崎 園子、長 環、田中 芳彦
2. 発表標題 Myricetin 類縁体を用いた細胞外アミロイド線維依存的なバイオフィルム形成の制御法
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永尾 潤一、 成田 由香、 豊田 馨大、 有田(森岡) 健一、 安松香奈江、 池崎晶二郎、 田崎 園子、 田中 芳彦
2. 発表標題 歯周病発症に関わる T 細胞免疫応答の制御機構の解明
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長 環、 田崎 園子、 池崎晶二郎、 永尾 潤一、 成田 由香、 有田(森岡) 健一、 安松香奈江、 豊田 馨太、 田中 芳彦
2. 発表標題 Candida albicans 菌糸形細胞由来画分からの T 細胞エピトープ候補探索
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎 園子、 長 環、 永尾 潤一、 池崎晶二郎、 成田 由香、 有田(森岡) 健一、 安松香奈江、 豊田 馨大、 小島 寛、 田中 芳彦
2. 発表標題 Candida albicans 成分特異的 T 細胞の病態抑制効果の検討
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安松香奈江、 永尾 潤一、 豊田 馨太、 成田 由香、 有田 健一、 池崎晶二郎、 田崎 園子、 長 環、 城戸 寛史、 田中 芳彦
2. 発表標題 細菌感染がもたらす母体免疫活性化が胎児脳システムへ与える影響について
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池崎晶二郎、長 環、永尾 潤一、田崎 園子、安松香奈江、豊田 馨大、成田 由香、 有田(森岡) 健一、池邊 哲郎、田中 芳彦
2. 発表標題 Candida albicans のバイオフィルム形成における mild heat stress 応答機構の解明
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊田 馨大、成田 由香、永尾 潤一、有田(森岡) 健一、安松香奈江、池崎晶二郎、田崎 園子、長 環、城戸 寛史、田中 芳彦
2. 発表標題 歯周病原細菌に対する T 細胞応答に関与する抗原タンパク質の同定
3. 学会等名 第60 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田崎 園子、長 環、永尾 潤一、池崎 晶二郎、成田 由香、有田(森岡) 健一、安松 香奈江、豊田 馨大、小島 寛、田中 芳彦
2. 発表標題 Candida albicans構成タンパク質を特異的に認識する Th17 細胞による口腔カンジダ症抑制効果の検討
3. 学会等名 第62 回日本医真菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池崎 晶二郎、長 環、永尾 潤一、田崎 園子、安松 香奈江、豊田 馨大、成田 由香、 有田(森岡) 健一、池邊 哲郎、田中 芳彦
2. 発表標題 病原真菌 Candida albicans の mild heat stress 条件応答機構の解明
3. 学会等名 第62 回日本医真菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Narita, Y., Ikezaki, S., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Arita-Morioka, K., Kojima, H., Tanaka, Y.
2. 発表標題 Exploration of a novel T cell antigen of Candida albicans against oral candidiasis
3. 学会等名 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasumatsu, K., Nagao, J., Narita, Y., Arita-Morioka, K., Ikezaki, S., Tasaki, S., Toyoda, K., Cho, T., Kido, H., Tanaka, Y.
2. 発表標題 The influence of maternal inflammation by bacterial infection on fetal brain development.
3. 学会等名 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018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
---------	---------