

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791624
 研究課題名（和文） *P. gingivalis* 感染予防のための安全・有効な経口、経鼻ワクチンの開発
 研究課題名（英文） Development of safety and effective oral and nasal vaccines against *P. gingivalis* infection
 研究代表者
 橋爪 智美 (HASHIZUME TOMOMI)
 日本大学・松戸歯学部・助手
 研究者番号：50419785

研究成果の概要：歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の主要病原因子である外膜タンパク 40k-OMP と、アジュバントである無毒化コレラ毒素 A サブユニットと大腸菌易熱性毒素 B サブユニットのキメラ分子(mCTA/LTB)をマウスに共投与すると長期間効果的な抗原特異的免疫応答の誘導保持、歯槽骨吸収の抑制を示した。従って 40k-OMP + mCTA/LTB 投与は歯周病予防ワクチンとして有効であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	420,000	2,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*, 40k-OMP, 歯周病予防, コレラ毒素

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病原性細菌の感染予防のためのワクチン開発の研究は 1990 年代より *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などを用いて行われてきた。しかし、ヒトへの応用が可能なアジュバントや他の抗原デリバリーシステムの開発が進んでいないこと、注射を用いた免疫接種法による副作用のリスクなどのため研究が進んでいないのが現状である。近年、開発が飛躍的に進歩している経口や経鼻といった経粘膜投与型ワクチンは粘膜面と全身系の両方に抗原特異的免疫応答を誘導することが可能である。研究者らの研究室でも、粘膜免疫を応用して歯周

病に対する経鼻免疫法 (Vaccine 22:250-256, 2003)、経皮免疫法 (Vaccine 23:2513-2521, 2005) を確立している。

(2) 臨床応用を考える上で、効果的な免疫応答を誘導するための安全で有効なアジュバントが必要不可欠である。これに関して、国内外で毒性の原因となる酵素活性を取り除いた無毒化変異型コレラ毒素や無毒化変異型大腸菌易熱性毒素が作製され、粘膜ワクチンのアジュバントとしての研究が進められている。研究者らの研究室では国内外の研究機関と共同で、酵素活性中心のアミノ酸置換により 2 つの変異型コレラ毒素を作製し、それらの毒素が毒性はないがアジュバント効

果を維持していることを示した(J. Exp. Med. 185:1203-1210,1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:6110- 6115,2004)

2. 研究の目的

本研究は臨床応用を視野に入れた安全かつ有効な歯周病予防ワクチンの開発を目指す。*P. gingivalis* の感染を防止するために *P. gingivalis* の主要な病原因子の一つであり、強い抗原性を有する 40-kDa の外膜タンパク (40k-OMP) を抗原とし、アジュバントとして無毒化コレラ毒素 A サブユニットと大腸菌易熱性毒素 B サブユニットのキメラ分子 (mCTA/LTB) を用いて安全で有効な経鼻、経口投与型歯周病ワクチンの開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 経鼻免疫による抗原特異的免疫応答測定

BALB/c マウスに 40k-OMP と mCTA/LTB の混合液を経鼻免疫した。適切な抗原およびアジュバント投与量、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した。40k-OMP 免疫マウスから唾液、血清を採取し、40k-OMP 特異的ならびに CT 特異的 IgG、IgA 抗体価の経時的変化を ELISA 法で測定した。さらに、免疫マウスの脾臓、唾液線および鼻腔粘膜組織からリンパ球を分離し、40k-OMP 特異的ならびに CT 特異的 IgG、IgA 抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて測定した。

(2) ワクチン投与により口腔内への 40k-OMP 特異的抗体応答の誘導が確立した後、*P. gingivalis* に対する感染予防効果の測定

ワクチン投与したマウスより得られた 40k-OMP 特異的抗体で前処理した *P. gingivalis* の菌体を *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) と混合し、*P. gingivalis* の共凝集活性に対する阻害効果を測定した。同様に 40k-OMP 特異的抗体をマウスの赤血球と混合し、*P. gingivalis* の赤血球凝集活性に対する阻害効果を測定した。

P. gingivalis を口腔内に感染させることにより、歯槽骨に吸収が生じるマウスモデルを用いて、セメント - エナメル境と歯槽骨との距離を測定することで歯槽骨吸収に対する経鼻ワクチンの抑制効果について解析を加えた。

(3) 経鼻免疫による免疫応答誘導機序の解析

ワクチン投与したマウスの脾臓、頸部リンパ節のリンパ球から、磁気細胞分離法を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し、フィーダー細胞、40k-OMP と共に 37 °C、5%CO₂ 条件下で 96

時間培養し、[³H]チミジンの取り込みによる細胞増殖活性を測定した。さらに 5 日間培養後、培養上清を採取し、サイトカイン (IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10) 産生を ELISA 法にて解析した。また、ナイーブマウスの脾臓からリンパ球を分離して、野生型 CT (nCT)、mCTA/LTB と培養した後、抗 CD3 抗体で刺激し IL-12 レセプターの発現を FACS を用いて解析した。

40k-OMP 単独、40k-OMP + nCT、40k-OMP + mCTA/LTB 経鼻免疫後の全 IgE 量と 40k-OMP 特異的 IgE 量を ELISA 法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 40k-OMP と mCTA/LTB の経鼻免疫は長期に渡り 40k-OMP 特異的全身系および粘膜系免疫応答を誘導した。

BALB/c マウスに 40k-OMP 単独、40k-OMP + nCT あるいは 40k-OMP + mCTA/LTB を経鼻免疫したところ、血清中に 40k-OMP 特異的 IgG 抗体が誘導された。3 群とも免疫 21 日目で抗体価のピークを迎え、その後 1 年という長期に渡りピーク値が維持された。しかし 40k-OMP 単独投与ではアジュバントを用いた系に比べ有意に低い値を示した (図 1)。nCT と mCTA/LTB をアジュバントとして投与した群は、両群ともほぼ同レベルの 40k-OMP 特異的全身系 IgG 抗体免疫応答を誘導した。40k-OMP 特異的血清中 IgA 抗体応答誘導は 40k-OMP 単独投与群ではほとんど検出できなかった。一方、アジュバントを用いた 40k-OMP + nCT 投与群、40k-OMP + mCTA/LTB 投与群では免疫 21 日目に両群ともほぼ同レベルで抗体価の最高値に達し、その後はゆるやかに減少したが、1 年間維持された (図 1)。

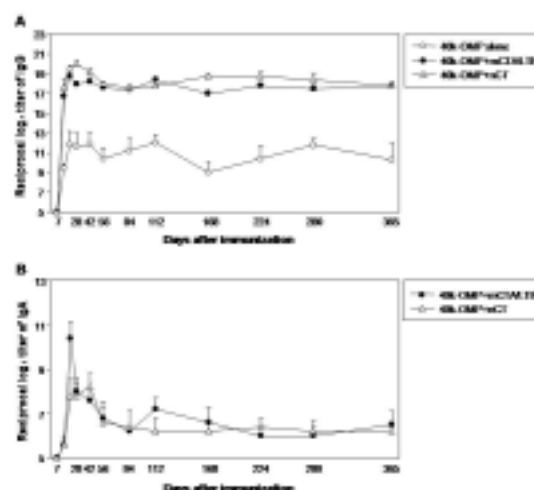


図 1 A: 40k-OMP 特異的血清中 IgG 抗体価
B: 40k-OMP 特異的血清中 IgA 抗体価

また、唾液中の 40k-OMP 特異的 IgA 抗体価を調べたところ、血清中 IgA 同様 40k-OMP 単

単投与群では誘導応答を認めなかった。40k-OMP + mCTA/LTB 投与群、40k-OMP + nCT 投与群は免疫 21 日目～28 日目にピーク値を示しその後減少したが 1 年間抗体価は維持された。40k-OMP + nCT 投与群は 40k-OMP + mCTA/LTB 投与群に比べやや高い傾向を示した(図 2)。

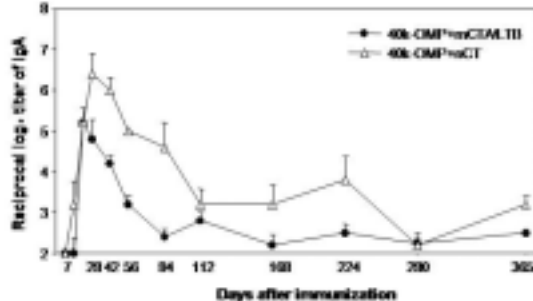


図 2 40k-OMP 特異的唾液中 IgA 抗体価

以上の結果は抗原特異的抗体産生細胞数の分析によって裏付けされた。40k-OMP + nCT あるいは mCTA/LTB 共投与群の脾臓、顎下腺、頸部リンパ節中の 40k-OMP 特異的 IgG、IgA 産生細胞数は 40k-OMP 単独投与群に比較して顕著に増加した。以上の結果から、無毒化変異型アジュバントを用いた系では全身系免疫並びに粘膜免疫において野生型コレラをアジュバントとして用いた系と同等の抗体応答が誘導されることが示唆された。また、40k-OMP + mCTA/LTB の投与は経鼻ワクチンとして有効であるということを示している。

(2)40k-OMP + mCTA/LTB 経鼻ワクチンは *P. gingivalis* 感染に対して予防効果を示す。

40k-OMP + mCTA/LTB の経鼻免疫が全身系と粘膜系に抗原特異的抗体応答を誘導することが判明したので、誘導された抗体が *P. gingivalis* の病原因子である共凝集活性と赤血球凝集活性を阻害するかどうか検討した。40k-OMP + mCTA/LTB をワクチン投与したマウスの血清中から 40k-OMP 特異的 IgG 抗体を精製し、*P. gingivalis* と前培養の後、*S. gordonii* と共培養したところ、40k-OMP 特異的 IgG 抗体は濃度依存的に *P. gingivalis* の共凝集活性を阻害した(図 3)。

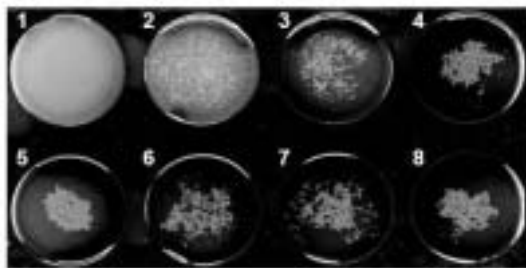


図 3 共凝集活性阻害実験 1: *S.g.*, 2: *P.g.* + *S.g.* + 150 µg/ml IgG(40k-OMP+mCTA/LTB 免疫マウス由来), 3: *P.g.* + *S.g.* + 100 µg/ml

IgG(40k-OMP+mCTA/LTB 免疫マウス由来), 4: *P.g.* + *S.g.* + 50 µg/ml IgG(40k-OMP +mCTA/LTB 免疫マウス由来), 5: *P.g.* + *S.g.*, 6: *P.g.* + *S.g.* + 150 µg/ml IgG(40k-OMP 免疫マウス由来), 7: *P.g.* + *S.g.* + 100 µg/ml IgG(40k-OMP 免疫マウス由来), 8: *P.g.* + *S.g.* + 50 µg/ml IgG(40k-OMP 免疫マウス由来)

さらに、赤血球とあらかじめ 40k-OMP 特異的 IgG 抗体と前培養した *P. gingivalis* を混合したところ、赤血球凝集活性も IgG 抗体の濃度依存的に阻害された。一方、ワクチン投与していないマウスから得られた血清中 IgG は、*P. gingivalis* の赤血球凝集活性を阻害しなかった(図 4)。

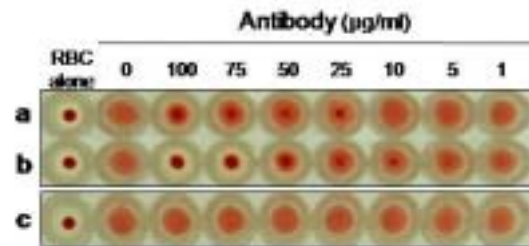


図 4 赤血球凝集阻害実験 レーン a: 赤血球(RBC) + 40k-OMP 免疫マウス由来 IgG と前培養した *P.g.*, b: RBC + 40k-OMP+mCTA/LTB 免疫マウス由来 IgG と前培養した *P.g.*, c: RBC + ナイブマウス由来 IgG と前培養した *P.g.*

P. gingivalis の口腔感染による歯槽骨吸収に対する 40k-OMP + mCTA/LTB 経鼻免疫の効果を検討した。その結果、ワクチン投与していない *P. gingivalis* 感染群に比較して、40k-OMP + mCTA/LTB 投与群は顕著に *P. gingivalis* による歯槽骨吸収を抑制した(図 5)。

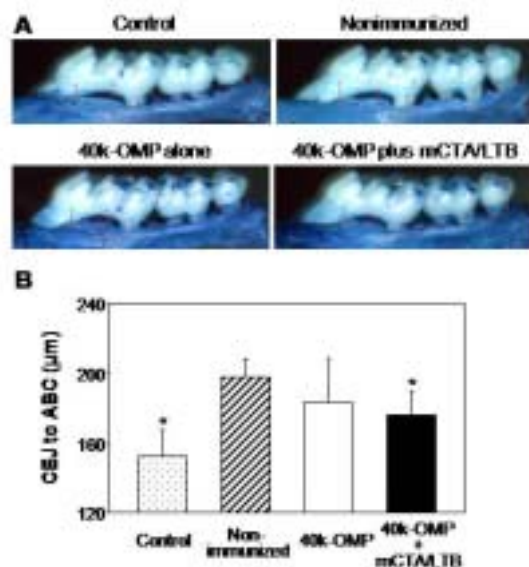


図 5 セメント-エナメル境(CEJ)と歯槽骨頂(ABC)との距離 免疫 1 週間後

さらに、40k-OMP + mCTA/LTB のワクチン投与 1 年後においても歯槽骨吸収が著しく抑えられた(図 6)。これらの結果は 40k-OMP + mCTA/LTB の経鼻免疫は *P. gingivalis* の口腔感染に対して長期間効果的な防御を果たすということを示している(図 6)。

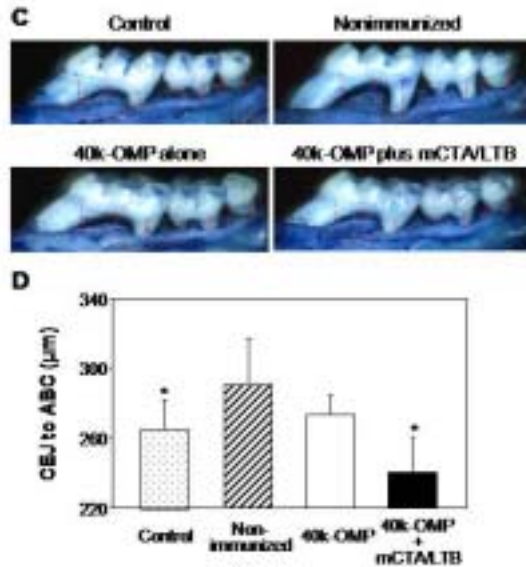


図 6 セメント-エナメル境(CEJ)と歯槽骨頂(ABC)との距離 免疫 1 年後

(3)40k-OMP + mCTA/LTB 経鼻免疫は Th1 型、Th2 型をバランスよく誘導する。

40k-OMP + mCTA/LTB の経鼻免疫がワクチンとして有効であるということが示唆されたので、免疫応答誘導のメカニズムの解析を行った。40k-OMP 単独、40k-OMP + nCT、40k-OMP + mCTA/LTB を経鼻免疫したマウスの脾臓と頸部リンパ節から、CD4 陽性 T 細胞を分離し、*in vitro* において 40k-OMP で再刺激し抗原特異的 T 細胞増殖活性を検討した。その結果、40k-OMP 単独投与群に比較しアジュバントを共投与した群の方が T 細胞増殖活性は高かった。(図 7)。

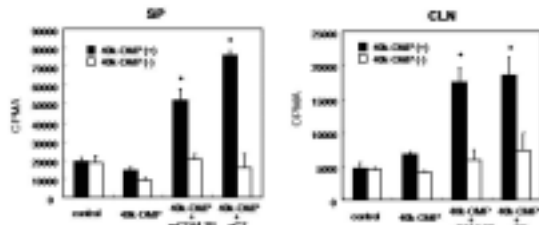


図 7 40k-OMP 単独、40k-OMP+nCT あるいは 40k-OMP+mCTA/LTB 免疫後の T 細胞増殖活性実験

サイトカインの産生パターンを解析すると、40k-OMP + nCT 投与群は高 IL-4、IL-5、IL-10 産生、低 IFN- γ 産生の Th2 型を示した。一方、40k-OMP + mCTA/LTB 投与群は Th2 型サ

イトカインである IL-4 の産生は誘導されるが、40k-OMP + nCT 投与群に比較し低い値を示し、IL-5、IL-6、IL-10 の産生と共に Th1 型サイトカインである IFN- γ は顕著に増加した(図 8, 9)。

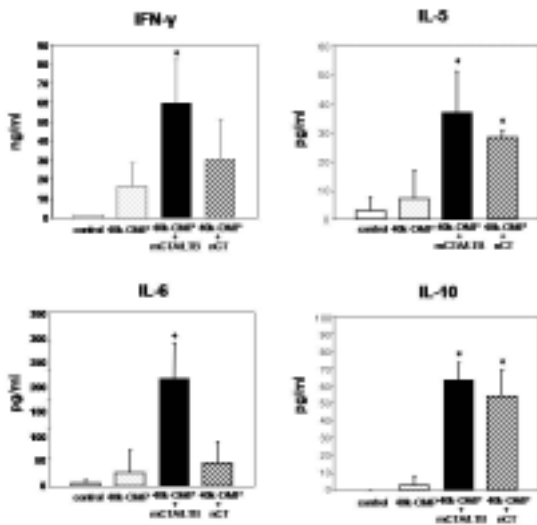


図 8 40k-OMP 単独、40k-OMP+nCT あるいは 40k-OMP+mCTA/LTB 免疫後のサイトカイン産生レベル

さらに、40k-OMP + nCT、40k-OMP + mCTA/LTB 投与群の全 IgE と 40k-OMP 特異的 IgE 量を比較検討した。その結果、全 IgE 量、抗原特異的 IgE 量共に 40k-OMP + nCT 投与群に比較して 40k-OMP + mCTA/LTB 投与群で顕著に低くなった(図 9)。

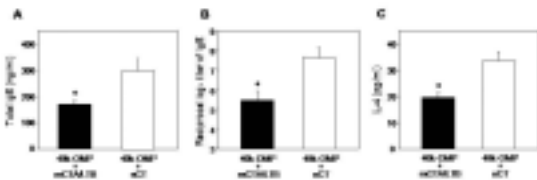


図 9 40k-OMP+nCT あるいは 40k-OMP+mCTA/LTB 免疫後の全 IgE 抗体量(A)、40k-OMP 特異的 IgE 抗体価(B)、IL-4 産生レベル(C)

これらの結果はアジュバントとして用いた nCT と mCTA/LTB で免疫応答誘導のメカニズムに違いがあることを示唆している。従って、nCT と mCTA/LTB の Th サイトカインの誘導機序を解析した。IL-12 レセプターの発現は Th1 型反応を誘導するという事実から、抗 CD3 抗体で刺激した T 細胞と nCT、mCTA/LTB を共培養したときの IL-12R β の発現状況を FACS 解析した。その結果、nCT 投与に比較し mCTA/LTB 投与群で IL-12R β の発現が高くなった(図 10)。

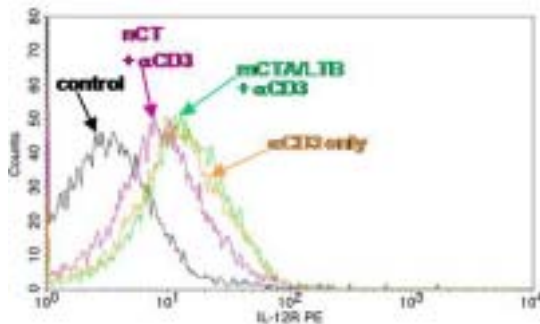


図 10 抗 CD3 抗体刺激に対する IL-12R β 発現解析 ナイーブ脾臓のリンパ球と nCT あるいは mCTA/LTB を培養し IL-12R β の発現状況を FACS で解析

これらの結果から、40k-OMP + mCTA/LTB 投与群は Th1 型および Th2 型をバランスよく誘導することで、IgE 産生を抑制しているということが示唆された。

以上、本研究をまとめると、40k-OMP + mCTA/LTB の経鼻免疫は全身免疫及び粘膜免疫を効果的に長期にわたって誘導し、さらに、40k-OMP + nCT 経鼻免疫に比べ IgE 産生量が低いことが示された。よって 40k-OMP + mCTA/LTB の経鼻投与は *P. gingivalis* の口腔感染に対して有効なワクチン候補であることが示唆された。

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 2 件)

Fumiki Momoi, Tomomi Hashizume, et al., Nasal Vaccination with the 40-Kilodalton outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* and a Nontoxic Chimeric Enterotoxin Adjuvant Induces Long-Term Protective Immunity with Reduced Levels of Immunoglobulin E Antibodies, *Infect. Immun.*, 76, 2777-2784, 2008, 査読有

Fumiki Momoi, Tomomi Hashizume, et al., Nasal Vaccination with outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* and Nontoxic Chimeric Enterotoxin Adjuvant Induces Both T Helper 1 and T Helper 2 Responses, *Int. J. Oral-Med. Sci.*, 7:145-153, 2009, 査読有

[学会発表](計 4 件)

桃井文藝, 橋爪智美, その他, Nasal Vaccination with the 40-KDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and a nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces long-term protective immunity with reduced levels of IgE, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 3 日, 京都

桃井文藝, 橋爪智美, その他, 無毒化キメラ分子アジュバントと *P. gingivalis* 外膜タンパクの経鼻ワクチンによる免疫応答の誘導 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 25 日, 東京

Fumiki Momoi, Tomomi Hashizume, et al., Nasal immunization with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* plus nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant elicit protective immunity against *P. gingivalis* infection, 13th International Congress of Immunology, 2007 年 8 月 23 日, リオデジャネイロ

Fumiki Momoi, Tomomi Hashizume, et al., A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant for oral immunity to outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis*, 13th International Congress of Mucosal Immunology, 2007 年 7 月 11 日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋爪智美 (HASHIZUME TOMOMI)
日本大学・松戸歯学部・助手
研究者番号: 50419785