

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792515

研究課題名（和文）ホスホリルコリンに対する粘膜免疫応答と動脈硬化との関連性

研究課題名（英文）Relationship between Mucosal Immune Response to Phosphorylcholine and atherosclerosis

研究代表者

後藤 優樹（GOTO MASAKI）

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：30507455

研究成果の概要（和文）：経鼻免疫法による分泌液中への抗体産生を調べたところ、PC-KLHで免役されたマウスの血清および粘膜分泌液中の抗体価はLPSを同時投与することにより上昇した。LPSはCTの代わりに粘膜アジュバントとして使用可能であることを明らかにした。また、疫学的調査より、血中IgM抗PC抗体は動脈硬化リスクの低下と関連しているが、同リスクを分析するにあたり、歯周疾患の有無を考慮する必要があることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Antibody levels in sera and mucosal secretions following the nasal vaccination with PC-KLH were facilitated by coadministration of LPS. LPS can be used as a mucosal adjuvant as an alternative to CT. From an epidemiological survey, antibody levels of the human anti-PC IgM in plasma associated with the risk for the atherosclerosis but the periodontal condition must be considered in analysis of the atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：粘膜免疫、ホスホリルコリン、動脈硬化、口腔常在菌

## 1. 研究開始当初の背景

（1）2000年にアテローム性動脈硬化モデル動物において、アテローム形成を抑制する抗体が同定され、その認識構造がホスホリルコリン（PC）であることが発見されて以来（Shaw et al, *J. Clin. Invest.* 2000）、PCに対する免疫応答が、動脈硬化とこれに続発する虚血性の脳・心疾患の予防の観点から注目を集めている。その機序として、酸化されたLDL（低密度リポタンパク）に発現するPCエпитープを抗PC抗体が覆い隠すことによって、マクロファージの病巣への集積を抑制し、アテロームの形成を阻止することが提案されている。動脈硬化モデルマウスへのPC含有抗原の能動免疫や抗PC抗体の受動免疫により、動脈硬化が抑制できることが示されている（Brinder et al, *Nat. Imm.* 2003）。またPC

は、脳卒中や虚血性心疾患のリスクファクターとして注目され、歯周病や肥満状態で血中濃度が上昇することが報告されるCRP（肺炎球菌C多糖反応性タンパク質）のリガンドとしても知られる。このようにPCは、今注目を集める歯周病とメタボリックシンドローム、虚血性脳・心疾患の関連を解明する鍵となる存在であると考えられる。

（2）PCはハプテンとして、trinitrophenol（TNP）などと共に基礎免疫生物学の研究に古くから頻用されており、全身免疫系の応答については知見が集積されているが、粘膜免疫系のPCに対する反応性は詳しくは調べられていない。粘膜免疫系はPC以外の抗原に対しても全身免疫系とは多くの異なる挙動を示す。例えばTNP-LPSを全身性に投与するとB2B細胞からIgMクラスの抗TNP抗体が

T細胞非依存性に産生され、Igクラススイッチはほとんど誘導されないのに、TNP-LPSをコレラ毒素(CT)と同時に経鼻投与すると、粘膜組織のB1B細胞にIgクラススイッチが誘導され、IgAクラスの抗TNP抗体産生が誘導される(Kataoka et al, *J. Immunol.* 2007)。全身免疫系についての動物実験の結果によると、PCに対する免疫応答はTNPに対する応答よりも複雑であるので、粘膜免疫応答においてもPCに対する応答は、他の抗原とは異なる独特の挙動を示す可能性が考えられる。そして口腔常在菌のPCに対する粘膜免疫系の反応が、脳血管疾患および虚血性心疾患のリスク要因に重要な影響をおよぼしている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、粘膜を介して宿主に接触するPC含有抗原に対して、粘膜免疫系と全身免疫系が示す挙動を明らかにすることである。

(1)細菌性の抗原物質はその構成が複雑であり、宿主応答を科学的に解析するためには、モデル抗原物質を活用して実験系の単純化を図る必要がある。そこで、口腔常在菌の存在状態を模した種々の形態のPCを含む抗原を種々のアジュバント物質とともに、種々の感作経路で投与し、それぞれが宿主の全身性免疫応答と粘膜免疫応答にどのような変化を与えるのか、応答に関わるリンパ球亜群の影響等を動物実験を通じて明らかにする。

(2)ヒトの血中抗体ならびに唾液中の分泌型IgA抗体における抗PC抗体レベルと口腔細菌叢におけるPC陽性細菌の存在や歯周疾患被患との関連性を調べる断面的疫学的調査を行い、この結果と前述の動物実験の結果と照合することによって、ヒトの体内においては口腔細菌と免疫系との間にどのような様式の相互作用が起きているのかを推測することが可能となる。これらを通じて、動脈硬化症とその続発症である虚血性脳・心疾患の発症リスクや、肺炎など細菌感染症に対する抵抗性への宿主口腔環境の影響を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

(1)大腸菌等の腸内に常在する大量のグラム陰性菌が保有するリポ多糖(LPS)は粘膜免疫応答の質に影響を与えていると考えられるため、口腔内に生息するPC抗原陽性細菌の粘膜感作を想定し、抗原決定基(ハプテン:TNPやPC)とLPS、CTなどのアジュバント性物質が別の分子から供給される感作形態を設定し、C57BL6マウスを感作した時に誘導される、全身性と粘膜系の免疫現象を調べた。細菌そのものを用いる代わりにモデル抗原物質を用いて実験系を単純化するこ

とで、宿主免疫応答のより詳細な解析が可能となる。測定項目としては、表中の物質を経鼻投与した5~7日後の、血清、唾液、糞便中、鼻腔洗浄液におけるIgA、IgG、IgMの各クラスの抗ハプテン抗体のレベルを測定した。あるいは1週間おきに3回、繰り返し経鼻投与を行い、4週間後までの抗体レベルを経時的に測定した。以上により、抗PC免疫応答の誘導におよぼす抗原物質の性状とアジュバントの影響を明らかにした。

(2)ヒトの血清および唾液中の抗体についてはIgG、IgMおよびIgAの3アイソタイプを独立して測定する間接ELISA系を確立した。そして、長崎県五島市で実施された特定健康診査において、動脈硬化検診と歯科健診に同意した40歳以上の住民、397名(男性136名、女性261名、平均年齢67.1歳)から採取した血漿と唾液をELISA測定に用いた。動脈硬化検査については足関節上腕血圧比(ABI)、心臓足首血管指数(CAVI)および頸動脈内中膜複合体厚(IMT)を測定した。動脈硬化リスクと血中および唾液中のアイソタイプ別抗PC抗体との関連性を検討した。

## 4. 研究成果

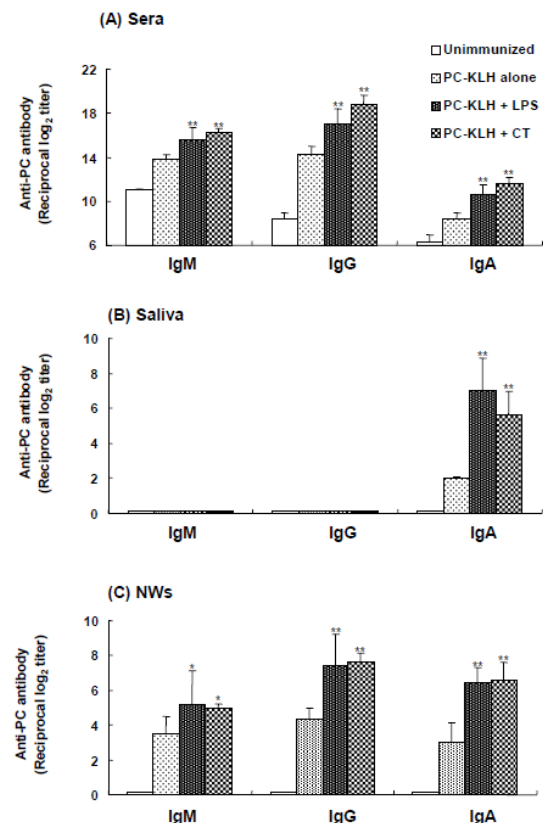


Fig. 1 Systemic and mucosal anti-PC antibody response induced by nasal immunization with PC-KLH plus LPS.

(1) 経鼻免疫法により、LPSとPC-KLHあるいはCTとPC-KLHの同時投与で免疫されたマウスの全身および粘膜抗体反応を調べたところ、血清および鼻腔洗浄液中(NWs)のIgM、IgGおよびIgA抗PC抗体は、PC-KLH単独投与系と比較して高くなった(Fig. 1AおよびFig. 1C)。唾液中においてはIgA抗PC抗体のみ上昇を示し、IgMおよびIgGは検出できなかった(Fig. 1B)。抗体価は14日で最大値に達し、さらなる免疫によって抗体価は上昇しなかった。血清および粘膜分泌物においてLPSとPC-KLHによって引き起こされる抗体反応はCTとPC-KLHによりも僅かに低いが、概ね匹敵した。LPSの経鼻免疫はCTと同様に抗原PC-KLHを同時投与することによって全身および粘膜免疫反応を引き起こすことが明らかとなった。

(2) (1)の結果を確かめるため、経鼻免疫後の粘膜免疫反応に関連する各組織中の特異的な抗体を産生する細胞(AFCs)数を見積もったところ、LPSとPC-KLHで免疫されたマウスのリンパ器官における抗PC IgM、IgGおよびIgA AFCsの数はPC-KLHを単独で投与した場合と比較して多くなった(Fig. 2)。さらにLPSとPC-KLHで免疫されたマウスの顎下腺(SMGs)および鼻腔(NPs)の抗PC IgA AFCsはPC-KLHを単独で投与した場合と比較して増加した(Fig. 3)。IgMおよびIgGを産生するAFCsはSMGsおよびNPsの両方で検出できなかった。以上の結果より、全身および粘膜免疫反応を引き出す粘膜アジュバントとしてのLPSの有効性を初めて明らかにすることができた。

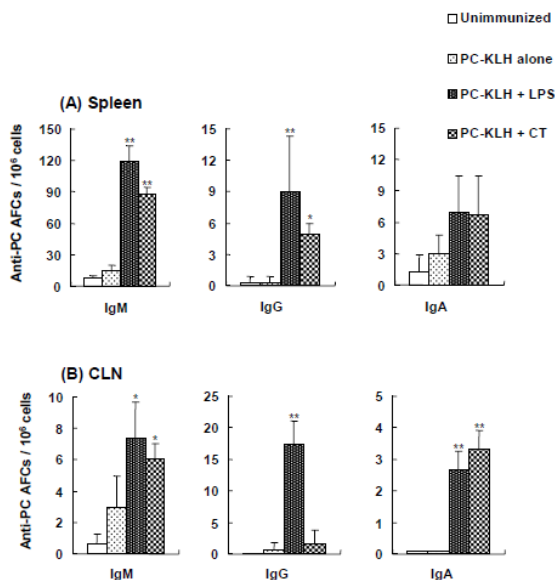


Fig. 2 The numbers of anti-PC AFCs in lymphoid tissues.

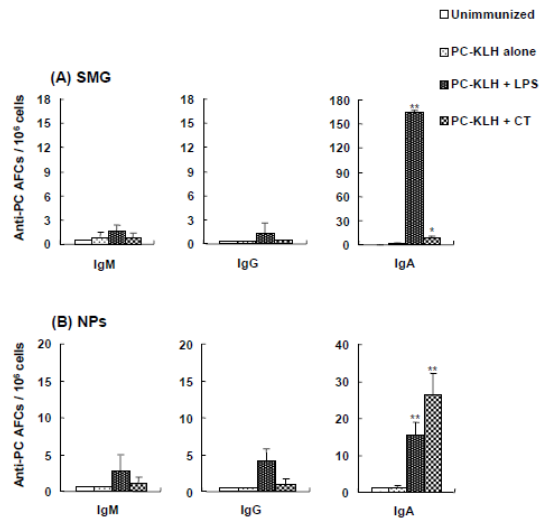


Fig. 3 The numbers of anti-PC AFCs in mucosal tissues.

(3) LPSの粘膜アジュバントとしての潜在性を確かめるために異なるハプテンモデル TNP-KLHを用いたところ、LPSとTNP-KLHを同時に免疫したマウスの血清中およびNWs中の抗TNP IgGおよびIgAはTNP-KLH単独投与系と比較して高い値を示した。抗TNP IgM抗体反応は免疫化前から高かったため、値が上昇することはなかった。LPSとTNP-KLHによる経鼻免疫は唾液中の抗TNP IgA抗体反応を引き起こしたが、抗TNP IgMおよびIgGは検出されなかった。また、TNP-KLHを単独で投与されたマウスでは抗TNP IgA抗体の産生は認められなかった。これらの結果よりPC-KLHとTNP-KLHは同様の免疫効果を示すことが示された。従って、LPSは粘膜アジュバントとして効率的に全身および粘膜免疫反応を促進させることが明らかとなった。

(4) LPSはB細胞を強力に多クローン性に活性化する物質である。そのため、LPSの経鼻免疫が非特異的抗体反応を引き起こすか調査する必要があり、PCおよびTNPの両方が免疫されたマウスの抗PCおよび抗TNP抗体反応を調べた。CTあるいはLPS存在下、血清(Fig. 4A)、唾液(Fig. 5A)そして鼻腔洗浄液(Fig. 6A)中の抗PC抗体価はPC免疫化マウスで増加し、TNP免疫化マウスでは増加しなかった。また、TNP免疫化マウスの血清(Fig. 4B)、唾液(Fig. 5B)そしてNWs(Fig. 6B)中の抗TNP抗体価も上昇を示した。しかしながら、PC-KLHを単独投与されたマウスの唾液およびNWs中の抗TNP抗体反応は非特異的であることが示唆された。特にCTとPC-KLHを経鼻投与された場合のNWs中の抗TNP IgAは著しく上昇した(Fig. 5B)。CTとは対照的にLPSは無関係な抗TNP抗体反応を促進しないことも判明した。従って、LPSはCTよりも特異的に粘膜免疫反応を誘起することが明らか

となった。

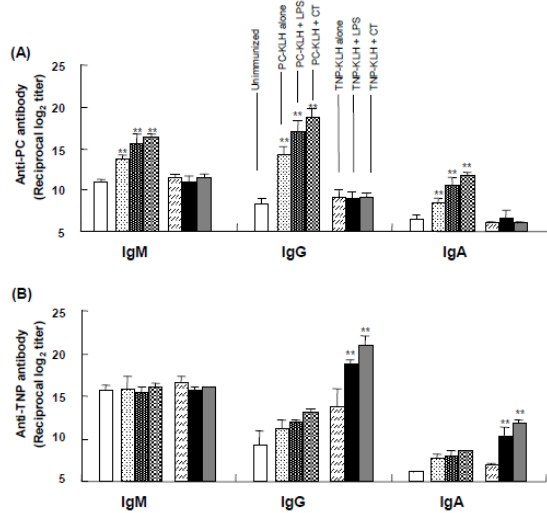


Fig. 4 Anti-PC (A) and anti-TNP (B) antibody response in sera of mice immunized with PC-KLH or TNP-KLH in the presence of LPS as a mucosal adjuvant.

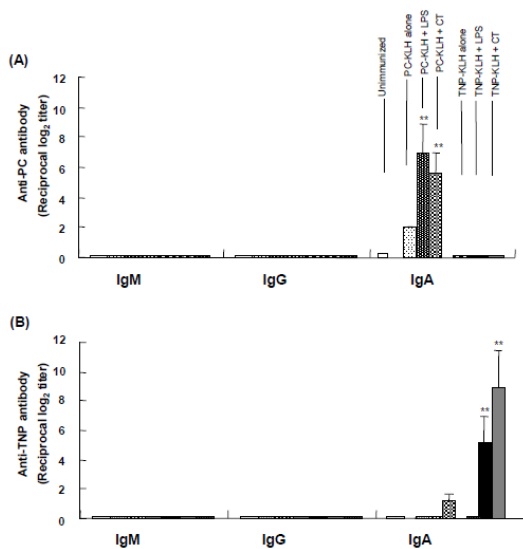


Fig. 5 Anti-PC (A) and anti-TNP (B) antibody response in saliva of mice immunized with PC-KLH or TNP-KLH in the presence of LPS as a mucosal adjuvant.

(5) 経鼻アジュバントLPSとCTの同時投与が抗体反応へおよぼす影響を調査したところ、PC-KLHをLPSおよびCTとともに経鼻免疫したマウスでは血清およびNWs中で抗PC IgM、IgGそしてIgA抗体反応が見られた。LPSとCTを同時投与した場合の抗体価はLPSとPC-KLH

あるいはCTとPC-KLHを投与した場合と同程度の値を示した。唾液中抗PC IgA抗体反応の上昇は、PC-KLHとLPSあるいはCTとともに免疫したときと同様にLPSとCTを同時投与した時にも見られた。これらの結果より、全身および粘膜免疫反応の抗体価を見積もる際にLPSとCTの同時投与はCTおよびLPSを単独投与した場合と比較して有利ではないと言える。さらに投与するLPSの量を2 μgから50 μgの範囲で変化させてもマウスの抗体反応に違いは認められなかった。LPSの投与量は10 μgが最適であると考えられる。

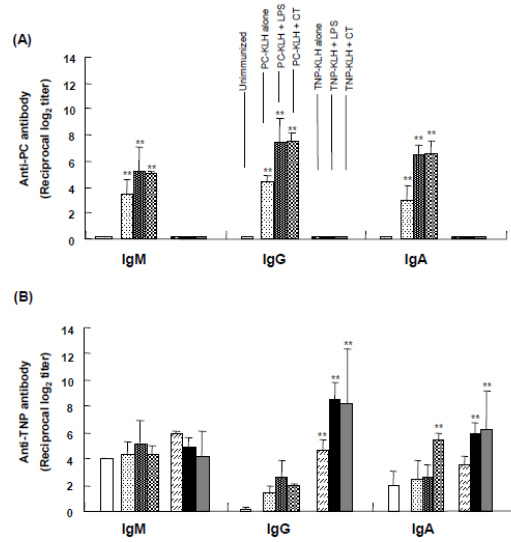


Fig. 6 Anti-PC (A) and anti-TNP (B) antibody response in nasal cavity secretions of mice immunized with PC-KLH or TNP-KLH in the presence of LPS as a mucosal adjuvant.

(6) ヒトの血中のIgM抗PC抗体価の上昇がCAVIを基準とした動脈硬化リスクの低下と関連することが示された (Table 1)。また、対象者のうち歯周組織検査を行った349名について、4mm以上の歯周ポケットを1歯以上有するかどうかを基準として歯周疾患群(174名)、歯周健常群(175名)とし、同様にCAVIに基づく動脈硬化リスクと抗PC抗体価との関連性を検索したところ、歯周健常群では、血中IgM抗PC抗体価が動脈硬化リスクの低下と有意に関連することが示唆された。歯周疾患群でも、統計学的に有意ではないが血中IgM抗PC抗体価の上昇が動脈硬化リスクの低下と関連する傾向が、さらに唾液中IgA抗PC抗体価の上昇が動脈硬化リスクの上昇と関連する傾向にあることが示唆された。血中IgM抗PC抗体は動脈硬化リスクの低下と関連しているが、血中および唾液中の抗PC抗体の動脈硬化リスクへの影響を分析するにあたり、

歯周疾患の有無という背景因子を考慮する必要がありと考えられる。

Table 1 Relationship between anti-PC antibody and risk for atherosclerosis.

Total subjects (n=397)			
Independent variables	p value	Odds ratio	95% CI
Saliva anti-PC IgA	0.092	1.188	0.972 – 1.452
Plasma anti-PC IgM	0.029	0.799	0.653 – 0.977
Non-periodontitis group (n=175)			
Independent variables	p value	Odds ratio	95% CI
Plasma anti-PC IgM	0.031	0.693	0.496 – 0.968
Periodontitis group (n=174)			
Independent variables	p value	Odds ratio	95% CI
saliva anti-PC IgA	0.066	1.316	0.982 – 1.764
Plasma anti-PC IgM	0.071	0.754	0.555 – 1.025

#### 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)

- ① T. Baatarjav, K. Kataoka, R.S. Gilbert, Y. Terao, M. Fukui, M. Goto, S. Kawabata, M. Yamamoto, K. Fujihashi, H.-O Ito  
Mucosal Immune Features to Phosphorylcholine by Nasal Flt3 Ligand cDNA-based Vaccination, Vaccine, 査読有り, Vol. 29, 2011, pp. 5747-5757, DOI:10.1016/j.vaccine.2011.05.097.
- ② M. Goto, A. Wilk, K. Kataoka, S. Chodankar, N. Tamai, M. Fukui, J. Kohlbrecher, H. Ito, H. Matsuki  
Study on the Subgel-Phase Formation Using an Asymmetric Phospholipid Bilayer Membrane by High-Pressure Fluorometry Langmuir, 査読あり, Vol. 28, 2012, pp. 12191-12198, DOI: 10.1021/la3020173.

[学会発表] (計5件)

- ① M. Fukui  
Relationship between atherosclerosis and anti-phosphorylcholine antibodies in saliva and plasma  
10th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry  
September 14, 2012  
Mongolian Government Palace, Conference hall (Mongolia)
- ② 福井誠

動脈硬化リスク評価のための唾液・血液中の抗ホスホリルコリン抗体の測定  
第5回日本口腔検査学会総会・学術大会  
2012年8月25日  
日本大学(東京都)

- ③ 福井誠  
ヒト唾液中および血中の抗ホスホリルコリン抗体と動脈硬化リスクとの関連性—第二報—  
第61回日本口腔衛生学会・総会  
2012年5月25日  
神奈川歯科大学(神奈川県)
- ④ 福井誠  
ヒト唾液中および血中の抗ホスホリルコリン抗体と動脈硬化リスクとの関連性:五島研究  
第60回日本口腔衛生学会  
2011年10月9日  
日本大学松戸歯学部(千葉県)
- ⑤ サプタ・ムルヤトノ  
経鼻粘膜アジュバント CpG ODN はマクロファージのTLR9発現と歯周病原細菌抗原特異的Th1免疫応答を誘導する  
第60回日本口腔衛生学会  
2011年10月9日  
日本大学松戸歯学部(千葉県)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
後藤優樹 (GOTO MASAKI)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教  
研究者番号: 30507455

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: