

**研究者：小渕健二郎**（所属：大阪歯科大学大学院 歯学研究科）

## **研究題目：老齢マウスにおけるダブル DNA 経鼻アジュバントによる歯周病菌由来抗原に対する免疫応答の検討**

### **目的：**

私たちはこれまで、自然免疫を賦活化する CpG オリゴデオキシヌクレオチド（CpG ODN）と、造血幹細胞を活性化し抗原提示細胞である樹状細胞などの増殖に重要な役割を有するサイトカイン Flt3 ligand（FL）を発現する DNA プラスミド（pFL）を併用することによる、鼻腔投与型（経鼻）ダブル DNA アジュバント（DA）の粘膜部および全身系における免疫応答性の検討を行ってきた。すなわち、ニワトリ血漿アルブミン抗原（OVA）や肺炎球菌表層タンパク（PspA）抗原を用い行ってきたが、若齢マウスにおいては、粘膜部および全身系の抗原特異的免疫応答が半年以上維持され、また免疫応答が減弱した老齢マウスにおいても、若齢マウスと差のない抗原特異的免疫応答が誘導されることなどを報告してきた。また、若・老齢マウスの粘膜関連リンパ組織における CD11c 陽性樹状細胞数が、抗原のみの投与マウスと比較して有意に増加していること、また、その樹状細胞が活性化されていることを明らかにしてきた。

本研究では、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* 線毛のサブユニット分子 FimA のリコンビナントタンパク（rFimA）を抗原とし、老齢マウスに上記 DA とともに経鼻投与した時の唾液腺における免疫応答性を分泌型 IgA 抗体産生に焦点を絞り、若齢マウスとの比較検討を行った。

### **対象および方法：**

8 週齢（若齢）および 48 週齢（老齢）BALB/c マウス（♀）を用い、実験群には rFimA 抗原 10  $\mu$ g と DNA アジュバント pFL50  $\mu$ g と CpG ODN10  $\mu$ g を、各週齢マウスの対照群には rFimA 抗原 10  $\mu$ g のみを各群毎週 1 回計 3 回経鼻投与した。最終免疫から 7 日目の唾液を採取し、唾液中の抗原特異的 IgA 抗体価を ELISA 法により測定を行った。さらに最終免疫から 7 日目における顎下唾液腺（SMGs）、舌下唾液腺（SLGs）、顎下リンパ節（PGLNs）中の抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数を ELISPOT 法により計測した。また、フローサイトメトリー法により最終免疫から 7 日目における各部からの CD11c 陽性樹状細胞のポピュレーション解析を行った。なお統計解析は GraphPad Prism version7 を用い、Mann-Whitney U test にて検定を行い、 $p < 0.05$  の有意差を示した。

### **結果：**

最終免疫 7 日目における唾液中抗原特異的 IgA 抗体価を ELISA 法により測定した。8 週齢（若齢）および 48 週齢（老齢）マウスにおいて、ダブル DNA アジュバントと抗原を同時投与した実験群マウス（DA+rFimA）の唾液中抗原特異的 IgA 抗体価は、対照群マウス（rFimA alone）と比較して、有意な増加が認められた（図 1）。また、48 週齢マウスの唾液抗原特異的 IgA 抗体価は、8 週齢マウスと比較して有意な差は認められず、8 週齢マウスと同程度の抗体価

であることが示された (図1)。

さらに、最終免疫7日目における顎下唾液腺 (SMGs)、舌下唾液腺 (SLGs)、顎下リンパ節 (PGLNs) の抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数を ELISPOT 法により計測した。8 週齢および 48 週齢マウスにおいて、ダブル DNA アジュバントと抗原を同時投与した実験群マウス (DA + rFimA) の抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数の増加が対照群 (rFimA alone) と比較して有意に認められた (図2)。また、SMGs、SLGs、PGLNs それぞれにおける 48 週齢マウスの抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数は、8 週齢マウスと比較して有意な差は認められず、8 週齢マウスと同程度の細胞数であることが認められた (図2)。

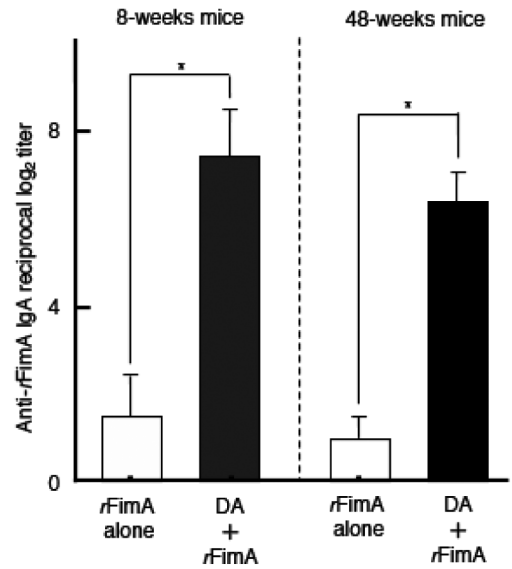


図1 最終免疫7日目における8週齢および48週齢マウスの唾液中抗原特異的IgA抗体価

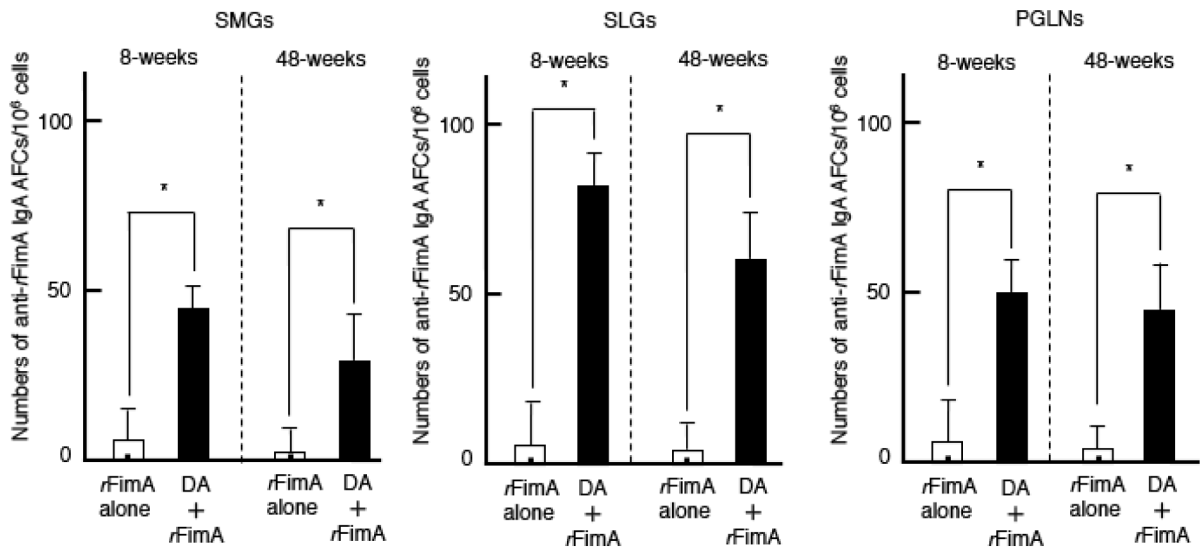


図2 最終免疫7日目における8週齢および48週齢マウスの顎下唾液腺 (SMGs)、舌下唾液腺 (SLGs)、顎下リンパ節 (PGLNs) 中抗原特異的IgA抗体産生細胞数

次に、最終免疫から7日目におけるSMGs、SLGs、PGLNsからの抗原提示細胞のひとつであるCD11c陽性樹状細胞のポピュレーション解析を行った。8週齢および48週齢マウスのSLGs、PGLNsにおいて、DAを含まないrFimA抗原のみを投与した対照群と比較した場合、有意なCD11c陽性樹状細胞数の増加が認められた (表) が、SMGsでは、有意な差は認められなかった (表)。

以上のことから、本ダブルDNAアジュバント (DA) とrFimA抗原の8週齢および48週齢マウスへの経鼻同時投与は、唾液中の抗原特異的IgA抗体およびSMGs、SLGs、それら唾液腺を包囲するように存在するPGLNsにおける抗原特異的抗体産生細胞数を有意に誘導するとともに、SLGs、PGLNにおける樹状細胞数を有意に増加させることが認められた。

表 最終免疫7日目における8週齢および48週齢マウスの唾液腺関連リンパ組織に存在するCD11c陽性樹状細胞のポピュレーション

マウス	ダブル DNA アジュバント (DA)	全リンパ球中の割合 (%)		
		顎下唾液腺 (SMGs)	舌下唾液腺 (SLGs)	顎下リンパ節 (PGLNs)
8週齢	あり	2.6 ± 1.2	11.0 ± 3.0 *	14.1 ± 3.7 *
	なし	1.9 ± 0.6	4.1 ± 1.2	2.6 ± 0.5
48週齢	あり	2.5 ± 1.0	9.5 ± 1.8 *	11.5 ± 3.9 *
	なし	1.4 ± 0.5	2.5 ± 0.8	1.7 ± 0.4

\*  $p < 0.05$

## 考 察：

pFLとCpG ODNからなる本ダブルDNAアジュバントは、若齢マウスにおいて唾液抗原特異的IgA抗体の有意に誘導することを示したが、加齢により免疫機能が低下している老齢マウスにも同様な誘導効果を有することが認められた。また、その唾液抗原特異的IgA抗体の誘導には、舌下唾液腺および顎下リンパ節における抗原提示細胞である樹状細胞の増加が関与している可能性が示唆された。本ダブルDNAアジュバントを用いた経鼻ワクチンは、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の付着因子である線毛タンパク抗原に対する唾液IgA抗体を誘導することから、口腔内における歯面上への *Porphyromonas gingivalis* の初期付着を抑制する可能性があり、若年者だけでなく高齢者にも使用可能な *Porphyromonas gingivalis* 初・再感染予防のための1つのツールになるものと考えられた。

## 成果発表：

### 学術雑誌；

- 1) Kobuchi K., Kataoka K., Taguchi Y., Miyake T., Umeda M. Nasal double adjuvant induces salivary FimA-specific secretory IgA antibodies in young and aging mice for blocking *Porphyromonas gingivalis* binding to a salivary protein. 2019 Submitted.
- 2) 片岡宏介、國友栄治、小淵健二郎、上根昌子、土居貴士、三宅達郎 2018ヒノキチオール唾液分泌型IgA抗体産生に与える影響、日本口腔衛生学会雑誌 68 (3) 137-144.
- 3) 片岡宏介、小淵健二郎、田口洋一郎、上根昌子、土居貴士、神光一郎、梅田誠、三宅達郎 2018ヒノキチール経鼻投与による抗原特異的IgA抗体産生への影響 歯科医学 81 (1): 16-23.

### 学会発表；

- 1) 小淵健二郎、片岡宏介、田口洋一郎、三宅達郎、梅田誠 Nasal double adjuvant induces salivary FimA-specific secretory IgA antibodies in young and aging mice for blocking *Porphyromonas gingivalis* binding to a salivary protein. 第62回秋季日本歯周病学会学術大会 2019年10月25、26日 小倉 口頭発表予定
- 2) 小淵健二郎、片岡宏介、田口洋一郎、三宅達郎、梅田誠 Flt3 ligand 発現DNAプラスミドとCpGオリゴデオキシヌクレオチド経鼻投与による上・下気道部における歯周病菌由来抗原

特異的免疫賦活化メカニズムの解明 第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会 平成 30 年 10 月 26、27 日 大阪 口頭発表

- 3) Kobuchi K., Kataoka K., Taguchi Y., Doi T., Umeda M., Miyake T. Nasal Double-DNA Adjuvant Enhances Mucosal Immunity to *Porphyromonas gingivalis* FimA. 96<sup>th</sup> General session and exhibition of the IADR July 25-28<sup>th</sup>, 2018 London, England ポスター発表
- 4) 小淵健二郎、片岡宏介、上根昌子、土居貴士、神浩一郎、三宅達郎 樹状細胞誘導型経鼻 DNA アジュバントによる鼻腔・呼吸器での歯周病菌由来抗原特異的免疫応答性 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 平成 30 年 5 月 18-20 日 札幌 口頭発表
- 5) 片岡宏介、小淵健二郎、土居貴士、神光一郎、上根昌子、加納慶太、三宅達郎 口腔内歯周病菌結合阻害能を有するヒト唾液タンパク由来ペプチドの至適温度の検討 第 67 回日本口腔衛生学会・総会 平成 30 年 5 月 18-20 日 札幌 ポスター発表