

研究者：小柳 圭代（所属：大阪歯科大学 口腔衛生学講座）

研究題目：歯周病原菌の歯面初期付着阻害におけるヒト唾液タンパク由来ペプチド特異的 IgA 抗体の影響

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 DA の免疫賦活化メカニズム等の解析を行ない、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。

さらに私たちはこれまで、*Porphyromonas gingivalis*（Pg）線毛タンパク（FimA）が固相化した数種の唾液タンパクと特異結合することを見出し、そのヒト唾液タンパク分子上の結合部位相当のアミノ酸配列ペプチドが歯面への Pg 定着阻害能を有することも明らかとしてきた。

本研究では、FimA と特異結合するヒト唾液タンパク分子上の結合部位相当のアミノ酸配列ペプチドを抗原とし、CpG ODN と pFL からなる DA をマウスに経鼻同時投与することで、唾液中に誘導される抗原特異的 IgA 抗体による Pg 菌歯面初期付着阻害能を検証することを目的とした。

対象および方法：

- ① prp21 ペプチド抗原および stat23 ペプチド抗原とダブル DNA アジュバントのマウスへの経鼻同時投与による prp21 および stat23 特異的唾液 SIgA 抗体産生誘導の検証。

BALB/c（6-8 週齢マウス、♀）に、実験群には抗原として stat23 と prp21 を各 50 μ g、粘膜アジュバントとして pFL50 μ g と CpG ODN 10 μ g、対照群には stat23 と prp21 を各 50 μ g、週 1 回計 4 回経鼻投与を行なった。最終投与後 7 日目の唾液中の stat23 および prp21 特異的 IgA 抗体価を ELISA 法により測定した。また同時に顎下唾液腺における stat23 および prp21 特異的 IgA 抗体産生細胞数を ELISPOT 法により測定を行なった。

- ② prp21 および stat23 特異的 SIgA 抗体を含むマウス唾液によるヒト全唾液をハイドロキシアパタイトビーズ（sHAP）への Pg 菌体結合阻害能の評価。

ハイドロキシアパタイトビーズ 3 mg と一晩インキュベートすることでヒト全唾液被覆ハイドロキシアパタイトビーズ（sHAP）を作成し、ビーズ洗浄後、続いて実験群および対照群マウスから回収した prp21 特異的 SIgA 抗体を含む唾液（100 μ L）と 3 時間インキュベートを行なっ

た。ビーズを洗浄後、Pg (10⁸cells) と 3 時間混合し、パーコール液にて浮遊菌を除去後、sHAP に結合した Pg 生菌数を測定するためにアデノシン三リン酸 (ATP) 量の計測を行なった。

結果および考察：

- ① prp21 ペプチド抗原および stat23 ペプチド抗原とダブル DNA アジュバントのマウスへの経鼻同時投与による prp21 および stat23 特異的唾液 SIgA 抗体産生誘導の検証。

実験群の唾液中の prp21 および stat23 特異的 IgA 抗体価、顎下唾液腺における prp21 および stat21 特異的 IgA 抗体産生細胞数は、対照群と比較して有意な上昇が認められた (図 1)。

- ② prp21 および stat23 特異的 SIgA 抗体を含むマウス唾液によるヒト全唾液をハイドロキシアパタイトビーズ (sHAP) への Pg 菌体結合阻害能の評価。

対照群マウスの唾液と比較して、実験群マウスに唾液は sHAP に結合する *P. gingivalis* 生菌数の有意な減少が認められた (図 2)。

これまで歯周病予防ワクチンの候補として使用されている抗原は、病原体 (歯周病細菌) 由来の表面タンパク (線毛や 40kD-OMP など) や LPS といった外来性抗原であるが、本研究ではヒト唾液タンパク由来の内因性抗原ペプチド prp21 および stat23 を使用する点で安全性が高いと考えられる。また本研究成果は、唾液中の IgG や IgM 抗体の 20~50 倍以上の分泌量がある SIgA 抗体を応用するものであり、その SIgA 抗体を特異的に誘導する、無痛で体に優しい粘膜 (経鼻) ワクチンの開発につながると考える。さらに誘導された抗原特異的 SIgA 抗体は、細菌に結合するのではなく、唾液タンパク PRP やスタセリン上の細菌結合部位に結合し、つまり結合部位をマスキングし、*P. gingivalis* の初期付着・定着を阻害するという、これまでにない独創的な歯周病感染予防ワクチン開発になると考える。

本研究の成果は、ヒト唾液タンパク由来の prp21 抗原と stat23 抗原に対する特異的 SIgA 抗体を応用した、歯周病発症予防のための針不要の能動免疫型経鼻ワクチン開発につながることが予想される。また抗原として用いるペプチド prp21 および stat23 は、以前報告したように口腔内の浮遊 *P. gingivalis* の線毛に直接結合しペリクルへの初期付着を阻害することから、受動免疫型歯周病発症予防経口ワクチンとしても使用可能な基剤と考えられる。

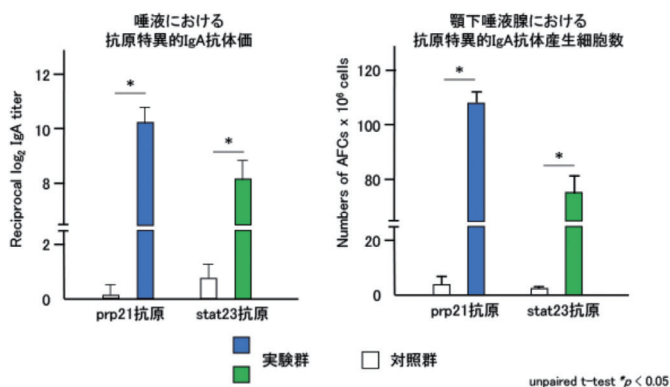


図 1 prp21 と stat23 をダブル DNA アジュバントと経鼻同時投与した時の prp21 および stat23 特異的免疫応答

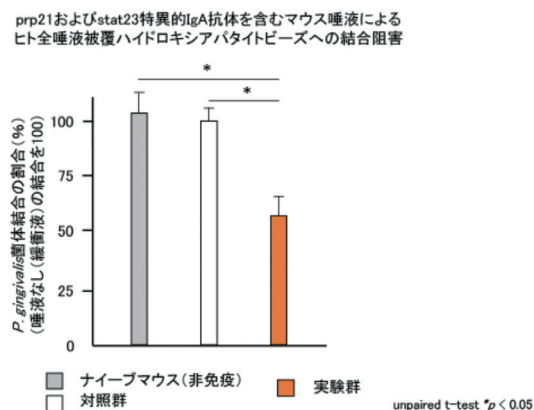


図 2 ヒト全唾液被覆ハイドロキシアパタイトビーズへの *P.gingivalis* 菌体結合

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

学術雑誌；

- 1) Koyanagi K., Kataoka K., Yoshimatsu H., Miyake T. 2022 Involvement of human salivary protein-derived peptides specific-salivary SIgA in *Porphyromonas gingivalis* colonization to whole saliva-coated hydroxyapatite beads. Submitting.
- 2) Kataoka K., Kawabata S., Koyanagi K., Hashimoto Y., Miyake T., Fujihashi T. 2021 Respiratory FimA-specific secretory IgA antibodies upregulated by DC-targeting nasal double DNA adjuvant are essential for elimination of *Porphyromonas gingivalis*. *Front Immunol* 12 : 634923.

学会発表；

- 1) Koyanagi K., Kataoka K., Yoshimatsu H., Miyake T. Involvement of human salivary protein-derived peptides specific-salivary SIgA in *Porphyromonas gingivalis* colonization to whole saliva-coated hydroxyapatite beads. American Academy of Periodontology 108th Annual Meeting October 17-30th 2022 Phoenix ポスター発表予定
- 2) Koyanagi K., Kataoka K., Yanagisawa S., Miyake T. Involvement of human salivary protein-derived peptides-specific SIgA in oral *P. gingivalis* colonization. 第 69 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) October 24-25th, 2021 Fukuoka (オンライン)
- 3) 李 前穎、片岡宏介、吉松英樹、小柳圭代、松井正格、北山貴也、ZheQi Huang、Si Jie Yang、坂本由紀子、河村佳穂里、土居貴士、小野圭昭、三宅達郎 希少糖 D- プシコースの *Candida albicans* 増殖への影響 第 32 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会 令和 3 年 10 月 3 日 京都 (オンライン)
- 4) 吉松英樹、片岡宏介、小柳圭代、李 前穎、河村佳穂里、土居貴士、小野圭昭、三宅達郎 DNA アジュバントとホスホリルコリン抗原の経鼻投与は脾臓・腹腔内樹状細胞-B1 細胞間相互作用を増強する 第 70 回日本口腔衛生学会・総会 令和 3 年 5 月 27、28、29 日 那覇 (オンライン)
- 5) 小柳圭代、片岡宏介、吉 英樹、李 前穎、河村佳穂里、土居貴士、三宅達郎 ヒト唾液タンパク由来抗原特異的分泌型 IgA 抗体による歯周病原菌の実験的歯面モデルへの結合抑制効果 第 70 回日本口腔衛生学会・総会 令和 3 年 5 月 27、28、29 日 那覇 (オンライン)
- 6) 土居貴士、河村佳穂里、片岡宏介、小柳圭代、松井正格、楊 世傑、李 前穎、黄 哲麒、北山貴也、加納慶太、福原隆久、三宅達郎 ICDAS による乳歯咬合面の初期う蝕活動性評価法の検討 第 70 回日本口腔衛生学会・総会 令和 3 年 5 月 27、28、29 日 那覇 (オンライン)