

口腔感染症を制御する免疫抗原決定基の探索と新世代ワクチン開発への応用

田中芳彦

福岡歯科大学 機能生物化学講座 感染生物学分野

【研究の背景】

歯周病は国民の多くが罹患しており、口腔内細菌感染によって引き起こされる疾患であり、歯を失う最も大きな原因となっています。歯周病の発症や進行は特定の病原微生物によって引き起こされ、免疫応答が深く関与していると考えられています。例えば、ヘルパーT細胞を欠損したマウスでは歯周病感染に抵抗性であり、その病態にはT細胞による免疫応答が関わっています。また、歯周病患者の口腔内局所にインターロイキン-17(IL-17)産生を特徴とするヘルパーT細胞Th17が多く存在することが指摘され、実際、IL-17欠損マウスでは歯周病感染に抵抗性であることが明らかにされています。このように近年、Th17を介した免疫応答と歯周病の関係が脚光を浴びつつあるものの、その詳細な病態のメカニズムはほとんど明らかにされておらず、歯周病原細菌に特異的な免疫応答に関する治療法の開発は全く進んでいません。

【目 的】

本研究は、病原微生物の免疫原性部位の網羅的な探索をもとにして、歯周病を制御する免疫抗原決定基を探索し、歯周病原細菌を選択的にターゲットとする新世代ワクチン開発へ向けた分子基盤を確立することを目的としています。

【方 法】

1) ヘルパーT細胞の分化を司る歯周病原細菌コンポーネントの同定

全ゲノムが判明している歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を抗原として、マウス骨髄から分化した樹状細胞に抗原提示させて、IL-17-GFP レポーターマウス由来のヘルパーT細胞を対象にTh17への分化能をFlowcytometryにて評価します。

2) 網羅的解析による歯周病原細菌の免疫抗原決定基の同定

候補となった分画成分を、逆相 HPLC、SDS-PAGE 分離、プロテオミクスミックスの手法により順次解析し、得られた情報をもとにオーバーラッピングペプチドを作成し、免疫抗原決定基を同定します。

3) 歯周病原細菌のT細胞免疫抗原決定基による新世代ワクチンの開発

T細胞免疫抗原決定基のペプチドを用いたワクチン開発を展開します。免疫賦活剤(アジュバント)とともに vivo に投与して歯周病発症モデルを用いて検証します。Th17へのバランスシフトを解除するペプチドを同定することで、強力なワクチン開発を目指します。

【結 果】

歯周病の原因細菌の中で *P. gingivalis* は Red Complex に分類される強力な歯周病原細菌であり、なかでも最も病原性が高く、全ゲノムシークエンスが判明している細菌株を対象として解析を進めました。ヘルパーT細胞、なかでもTh17への分化能を、IL-17の産生を指標としてFlowcytometryを用いて蛋白レベルで評価しました。具体的には、骨髄細胞由来樹状細胞(BM-mDC)あるいはT細胞を除去したマウス脾細胞を抗原提示細胞とし、抗原として *P. gingivalis* の全菌体抽出液を用いて、野生型マウスから単離したナイーブT細胞をin vitroで分化誘導させて検証しました。その結果、*P. gingivalis* の全菌体抽出

液に IL-17 を産生する Th17 への分化能があることを確認しました。そこで、可溶性画分と不溶性画分、さらに内膜画分、外膜画分や分泌成分といった各種分画成分に分離したものを併せて評価しました。これらの解析により主要な抗原部位を絞り込むことに成功し、特定の画分に Th17 への分化能があることを見出しました。

続いて、候補となった分画成分を逆相高速液体クロマトグラフィー(逆相 HPLC)によって分離しました。複数のピークが検出されましたが、それらを含む全ての画分を同様の手法により評価したところ、一部の画分に高い Th17 への分化能があることを見出しました。プロテオミクスの手法によりこの画分の解析を進めており、コントロールサンプルと比較して検出頻度の高い抗原を候補として絞り込むことに成功しています。このように本研究は研究計画に従って順調に進行しております。

【考 察】

今回の解析から、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の菌体の中に Th17 への分化能をもつコンポーネントが存在することが示されました。今後は、候補として得られた抗原の検証を行うとともに、得られた画分を対象として、さらに2次元ゲル電気泳動による電気泳動分離、プロテオミクスの手法により精度を上げた解析を進めます。そして、得られた情報をもとに抗原部位のオーバーラッピングペプチドを作成し、免疫原性部位を同定する計画です。以上のようにして得られた *P. gingivalis* の T 細胞エピトープの情報を足がかりとして、歯周病の診断と治療を目指した新技術の開発を進めていく予定です。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で解析している網羅的なアプローチによるヘルパーT 細胞の分化を司る歯周病原細菌コンポーネントの研究報告はこれまでになく、T 細胞免疫抗原決定基のペプチドが同定された暁には、歯周病原細菌を選択的にターゲットとする新世代ワクチン開発へと発展させる予定にしております。このようにして基礎研究から臨床応用へと展開するための一貫した研究の基盤を確立できると考えています。