

## 論文審査の結果の要旨

氏名：竹内 高士

専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Oral immunization with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein and CpG

oligodeoxynucleotides attenuates *P. gingivalis*- accelerated atherosclerosis and inflammation

(*Porphyromonas gingivalis* 外膜タンパクおよび CpG オリゴ核酸を用いての経口免疫は  
*P. gingivalis* で促進される動脈硬化と炎症を抑制する)

審査委員：(主査) 教授 小方 頼昌  
(副査) 教授 落合 智子  
教授 坂巻 達夫  
教授 平塚 浩一

心筋梗塞や脳梗塞を代表とする動脈硬化性疾患による死亡は、日本人の死亡原因の上位を占めている。動脈硬化の危険因子として、年齢、性差、高血圧、高コレステロール血症、肥満、糖尿病、喫煙などがあげられている。歯周病もまた動脈硬化のリスクを増加させていることが疫学調査や動物実験により報告されており、これまでの研究では、歯周炎が内皮機能障害、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞のリスク上昇と関連していることが報告されている。さらに、動脈硬化病巣からは *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原菌が検出されている。また、アポリポタンパク質 E 欠損マウスや自然発症高脂血症 (Apo<sup>sh1</sup>) マウスに *P. gingivalis* を感染することにより動脈硬化の進展が認められている。

*P. gingivalis* の分子量 40-kDa の外膜タンパク質 (40k-OMP) は、*P. gingivalis* の他菌種との共凝集や歯肉上皮細胞への付着能、赤血球凝集能、プロテアーゼ活性能などに関与し、*P. gingivalis* による歯周病の発症および進展に深く関わる重要なタンパク質と考えられている。

以前の研究では、アジュバントとしてのコレラ毒素 (CT) を用いた 40k-OMP の経口や経鼻投与が、*P. gingivalis* 感染に対し防御効果を示した。さらに、感染前に Apo<sup>sh1</sup> マウスを 40k-OMP + CT で経鼻免疫した場合、大動脈洞のアテローム硬化性プラーク蓄積が有意に減少した。これらの研究は、40k-OMP が *P. gingivalis* 感染の予防のための有効なワクチン抗原 (Ag) であり得ることを示している。CT は粘膜免疫応答を誘導するための強力なアジュバントであるが、その毒性による副作用発現が臨床応用を妨げている。従って、粘膜ワクチン開発のためには安全かつ有効なアジュバントの利用が急務である。合成核酸 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) は、B 細胞および樹状細胞によって発現される Toll 様受容体-9 と相互作用し、1 型 T ヘルパー (Th1) 細胞および炎症誘発性サイトカイン応答を誘導する。多くの免疫研究では、高レベルの IgG2a 抗体および IL-12 や IFN- $\gamma$  などの Th1 サイトカインによって示されるように、様々な抗原とアジュバントとしての CpG ODN を用いた動物の非経口免疫が Th1 型応答を誘導することが報告されている。さらに、CpG ODN は、経鼻投与または経口投与の場合に強力なアジュバントであることが示されている。以前の研究においては、40k-OMP と CpG ODN のマウスへの経口投与が、Th1 型および Th2 型免疫応答を誘導することを示した。本研究では、Apo<sup>sh1</sup> マウスを用いて、40k-OMP と CpG ODN の経口投与が *P. gingivalis* 接種により促進されるアテローム性動脈硬化症を抑制できるか否かを検討した。

その結果、

1. いずれのマウスにおいても、感染または死亡の臨床徴候は認められなかった。*P. gingivalis* 接種マウスと PBS 接種マウスの体重に有意差はなかった。各動物の心臓、腎臓、脾臓、肝臓、および小腸は、正常な組織学的構造を示した。
2. Apo<sup>sh1</sup> マウスへの 40k-OMP + CpG ODN による経口免疫は、非免疫群と比較して有意な 40k-OMP 特異的血清 IgG 応答を生じた。

3. Apoe<sup>sh1</sup>マウスは総コレステロール、LDL および HDL レベルが高値であったが、*P. gingivalis*による曝露または 40k-OMP + CpG ODN による経口免疫は、これらの分子のレベルに影響を及ぼさなかった。
4. 40k-OMP + CpG ODN を用いた経口免疫は、*P. gingivalis*感染群のアテローム性動脈硬化プラーク蓄積を有意に減少させた。
5. 40k-OMP + CpG ODN を用いた経口免疫は、*P. gingivalis*感染で上昇した血清高感度 CRP 濃度、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、MCP1、M-CSF、P-Selectin、RANTES 濃度、および大動脈における HSP60、TLR4、VCAM-1、CCL21、MMP2 発現を有意に減少した。

以上の結果から、40k-OMP とアジュバント CpG ODN の経口投与は、*P. gingivalis*感染により上昇する CRP やサイトカイン、ケモカインレベルを著しく低下させ、その結果、動脈硬化の進展を抑制する可能性が示唆された。

これらの結果は、CpG ODN の経口免疫での安全性を実証すると共に、40k-OMP と CpG ODN による経口免疫が効果的であり、*P. gingivalis*で促進されるアテローム性動脈硬化症を予防するための安全なワクチンとして使用できる可能性を示唆している。

本研究は、*P. gingivalis*感染により増悪されるアテローム性動脈硬化症への 40k-OMP と CpG ODN を用いた予防ワクチンの可能性を示したものであり、今後のワクチン開発の一助となるものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成30年3月22日