

ふりがな氏名	こやなぎ かよ 小柳 圭代
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 959 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Human salivary protein-derived peptides specific-salivary SIgA antibodies enhanced by nasal double DNA adjuvant in mice play an essential role in preventing <i>Porphyromonas gingivalis</i> colonization: an <i>in-vitro</i> study (経鼻ダブル DNA アジュバントにより誘導されたヒト唾液タンパク特異的 SIgA 抗体は <i>Porphyromonas gingivalis</i> の付着抑制に必要である)
学位論文掲載誌	BMC Oral Health 第 巻 第 号 令和 5 年 月
論文調査委員	主査 三宅 達郎 教授 副査 沖永 敏則 教授 副査 本田 義知 教授

論文内容要旨

歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 線毛は歯面上ペリクルを構成するヒト唾液タンパク (HSP), スタセリンおよび高プロリンタンパク質と特異的かつ強固に結合すること, またその HSP 上の最小結合部位に相当するアミノ酸配列が明らかにされ, そのアミノ酸配列を含むペプチド stat23, prp21 は実験的歯面モデルへの Pg 菌付着を有意に抑制することが報告されている。

本研究では, TLR9 のリガンド CpG オリゴデオキシリボ核酸 1826 (CpG ODN) と樹状細胞の増殖および活性化能を有するサイトカイン Flt3 Ligand の発現プラスミド (pFL) からなるダブル DNA アジュバント (dDA) と stat23, prp21 を抗原としてマウスに経鼻同時投与した時の唾液抗原特異的分泌型 IgA (SIgA) 抗体誘導を検証し, さらに実験的歯面モデルに対する唾液抗原特異的 SIgA による Pg 菌付着の影響について検討を行った。

実験群には dDA と抗原として stat23 と prp21 を, 対照群には stat23 と prp21 の抗原のみを, C57BL/6N マウス (6 週齢, メス) に 1 週間に一度, 合計 4 回経鼻投与を行った。最終投与 7 日目のマウス唾液を回収し抗原特異的 SIgA 抗体価を ELISA 法にて, 鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT), 顎下リンパ節 (PGLNs), 鼻腔粘膜固有層 (NPs) および三大唾液腺における抗原特異的 IgA 抗体産生細胞数を ELISPOT 法により測定した。さらに, フローサイトメトリー法により同部における樹状細胞のポピュレーション解析を行った。さらに, ELISA 法にて NALT, PGLNs, NPs におけるサイトカイン産生量を測定した。次に,

回収したマウス唾液から IgM 抗体と IgG 抗体を取り除いた (SIgA リッチ) 唾液を用い、実験的歯面モデルに対する Pg 菌付着実験を行った。

実験群では対照群と比較して、唾液抗原特異的 IgA 抗体価および NALT, PGLNs, NPs, 各唾液腺における IgA 抗体産生細胞数の有意な増加が認められた。また、dDA により、NALT, PGLNs, NPs における樹状細胞の有意な増加が認められ、Th1 および Th2 型サイトカインをバランスよく産生していることが認められた。実験的歯面モデルへの Pg 菌付着抑制実験では、実験群マウス SIgA リッチ唾液による Pg 菌の有意な付着抑制が認められた。さらに、dDA と抗原として stat23 と prp21 を経鼻投与した IgA ノックアウト (IgA KO) マウスの唾液では、実験的歯面モデルへの Pg 菌付着抑制は認められなかった。以上のことから、dDA により誘導された唾液抗原特異的 SIgA 抗体は実験的歯面モデルへの Pg 菌付着阻害に必要であることが示唆された。

論文審査結果要旨

本研究は、TLR9 のリガンド CpG オリゴデオキシリボ核酸 1826 (CpG ODN) と樹状細胞の増殖および活性化能を有するサイトカイン Flt3 Ligand の発現プラスミド (pFL) からなるダブル DNA アジュバント (dDA) と stat23, prp21 を抗原としてマウスに経鼻同時投与した時の唾液抗原特異的分泌型 IgA (SIgA) 抗体誘導を検証し、さらに実験的歯面モデルに対する唾液抗原特異的 SIgA による *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 菌付着の影響について検討したものである。

その結果、stat23, prp21 の抗原に dDA を加えてマウスに経鼻投与した群 (実験群) は、stat23, prp21 の抗原のみを投与した群 (対照群) に比べて、唾液抗原特異的 IgA 抗体価および鼻咽腔関連リンパ組織、顎下リンパ節、鼻腔粘膜固有層などにおける IgA 抗体産生細胞数が有意に増加することを示した。また、実験的歯面モデルへの Pg 菌付着抑制実験では、実験群マウス SIgA リッチ唾液によって、Pg 菌の付着が抑制されることを明らかにした。

以上のように、dDA により誘導された唾液抗原特異的 SIgA 抗体が実験的歯面モデルへの Pg 菌付着阻害に必要であることを証明したのをはじめ、受動免疫による歯周病ワクチンの開発に多くの知見をもたらしたことから、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。