

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0338

研究課題名（和文）高付加価値型歯周炎ワクチン DNAオリガミとイミダゾキノリンによるIgA誘導（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Vaccines against periodontitis using DNA ORIGAMI and imidazoquinolines(Fostering Joint International Research)

研究代表者

多部田 康一（TABETA, KOICHI）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20401763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：唾液中の免疫グロブリン（分泌型IgA抗体）は歯周病などの口腔感染症の予防に役割を果たす。この分泌型IgAを効果的に誘導することは歯周病の予防・治療における一つのアプローチである。本研究においては、ENUマウスミュータジェネシスと呼ばれるマウス遺伝子変異体の遺伝子機能の違いを検出する研究手法により分泌型IgAの産生を制御する遺伝子の検索を行った。その結果、唾液中分泌型IgA量に影響を与える遺伝子変異（Yummy）を検出した。Yummyミューテーションを持つ責任遺伝子のノックアウトマウスが作成された。今後の遺伝子機能解析が予定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の高い罹患率を減少させるアプローチの一つとしてワクチン開発があり、口腔内において効果的に病原菌に対する分泌型IgAを産生することが求められる。本研究では2011年『ノーベル医学生理学賞』を受賞し、世界的な高水準の研究室、研究機関を運営する、Dr. Beutler研究室との共同研究により、最先端のENUミュータジェネシスの手法を応用し、新たに分泌型IgA産生を制御する遺伝子を同定した。この分子をターゲットとした、感染症予防や歯周病医薬およびワクチンの開発の可能性が将来的に期待される。

研究成果の概要（英文）：Salivary immunoglobulin (secretory IgA antibodies) plays a role in preventing oral infections such as periodontal disease. To induce secretory IgA into saliva is the effective approach in the prevention and treatment of periodontal disease. Investigation of seeking the genes that control the production of secretory IgA was conducted in this study, using ENU mouse mutagenesis that can detect functional mutation in mouse genome. As a result, the mutation named "Yummy" was isolated in the screen of the amount of the secretory IgA in mouse saliva. Genome-edited mice with yummy mutation was created and further study of the gene function of it is to be conducted in the future.

研究分野：歯周病学

キーワード：IgA ワクチン 唾液 ミュータジェネシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

唾液中の分泌型 **IgA** 抗体は歯周病などの口腔感染症の予防に役割を果たす。超高齢社会を迎えた日本、また公衆衛生環境が未整備である発展途上諸国における感染症対策として、**IgA** 応答を主体とした粘膜免疫の増強は効果的なアプローチの一つである。本研究の基になる研究課題(基盤研究 **B**、高付加価値型歯周炎ワクチン—**DNA** オリガミとイミダゾキノリンによる **IgA** 誘導—; **H27-29**)においてはワクチン開発において重要なアジュバントとして、新たなナノ加工技術を用いた **DNA** オリガミ体、およびイミダゾキノリン誘導体を応用することにより、効果的な唾液中の免疫グロブリン(分泌型 **IgA** 抗体)の産生誘導を目指した。また、この分泌型 **IgA** を効果的に誘導することが、アジュバントの作用によらず、歯周病の予防・治療において効果が期待されるものであり、分泌型 **IgA** 産生を制御する遺伝子群についての情報が望まれるが、その情報は限られていた。

テキサス大学サウスメディカルセンター **Dr. Beutler** 研究室は世界でも数少ない大規模な **ENU**(エチルニトロソウレア)マウスミュータジェネシスプロジェクトを実施するラボであり、特に感染免疫に遺伝学的アプローチを応用することで、数多くの感染免疫に関連する重要な発見・知見を報告してきている(2011年ノーベル医学・生理学賞)。**ENU** マウスミュータジェネシスはマウス遺伝子変異体の遺伝子機能の違いを検出する研究手法である(**UT Southwestern Medical Center Mutagenetix**; <https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/>)。本研究内容は、国際共同研究として **ENU** マウスミュータジェネシスを応用することで、唾液中 **IgA** 産生に関連する新規の遺伝子情報を得ることを目指し、研究課題を発展させる内容である。

## 2. 研究の目的

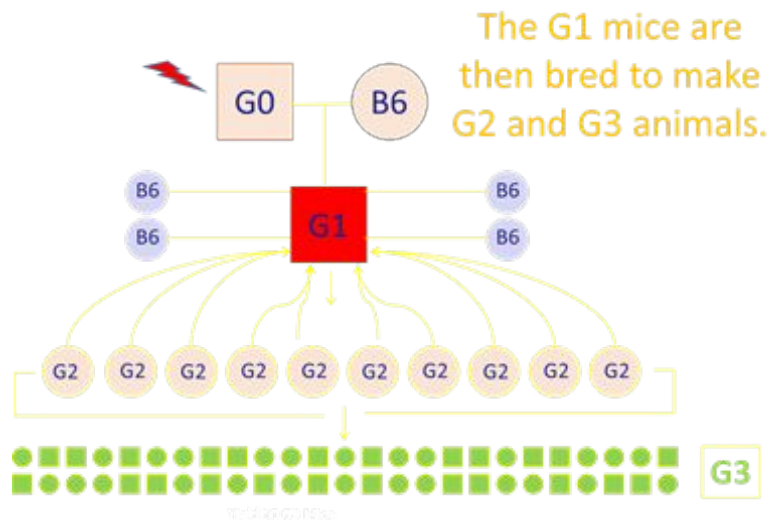
本研究課題においては、既知の情報に依存せず、**ENU** マウスミュータジェネシスの研究手法により唾液中の分泌型 **IgA** の産生を制御する遺伝子を同定することである。これらに関連して、国際共同研究加速基金の課題として、世界トップレベルの **ENU** マウスミュータジェネシス技術を習得するとともに、継続的な人的交流の足掛かりを築くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究課題の研究方法は、マウスにアルキル化剤である **ENU** を投与し、ランダムに遺伝子変異を起こした個体群について、**IgA** 産生の個体差をスクリーニングにより検出し、その原因となった遺伝子変異をさかのぼって同定するものである。**ENU** ミュータジェネシスの利点として、解析結果は *in vivo* でのフェノタイプが保証されているため結果がそのまま重要な知見となる。さらにノックアウトマウスでは胎生致死となり解析不能な分子も同定できる可能性がある。

申請時計画として、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の口腔感染及び **DNA** オリガミ体・イミダゾキノリン誘導体の口腔投与によりマウス遺伝子変異体群における唾液・血清中 **IgA** 産生の高産生及び低産生の特徴・形質を示す個体の検出を行い、ポジショナルクローニングにより変異遺伝子(責任遺伝子)の同定・解析を行うこととしていた。しかしながら、限られた渡航期間において、動物実験倫理申請における制約、渡航先で推進されているミュータジェネシスプロジェクトの進行上の制約を考慮しながら効率的なプロジェクト進行が求められた。そこで非刺激下(口腔感染なし) **ENU** マウスにおける **IgA** 産生量を指標とした検討を行った。一方、問題点としてフェノタイプを持つミュータントマウスの検出率が低い可能性が挙げられる。

具体的なミュータジエネシスのスキームは以下である。**C57BL6/J** マウスにアルキル化剤である **ENU** を投与し、ランダムに遺伝子変異を起こした **G0** 世代マウスに **Wild-type** マウスを交配後の **G1** 世代とし、**G1** 世代と **G2** 世代を戻し交配することにより **G3** 世代を得た。



**G3** 世代を用いて優勢，劣勢形質の **IgA** 産生に関連する表現型の検出を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) **ENU** マウスにおける唾液中 **IgA** 産生量,血清中 **IgA** のスクリーニング

**G0** マウスに由来する **143** ペディグリー 計 **5,050** 頭の **G3** マウスについて解析を行った。**G3** マウスにおける **Saturation analysis** による推測値として，同一遺伝子中に 2 回の遺伝子変異を得た可能性は，ホモ接合子について **5.19%**,ヘテロ接合子で **7.09%**と推測された。

Hit times	HOMO					HET				
	Pedigrees	G3 mice	Genes	Alleles	Saturation(%)	Pedigree	G3 mice	Genes	Alleles	Saturation(%)
>=0	143	5056	2039	2378	8.16	143	5056	2039	2378	8.16
>=1	141	3681	1471	1668	5.89	143	4981	1911	2210	7.65
>=2	138	3650	1296	1493	5.19	142	4980	1770	2069	7.09
>=3	134	3568	1092	1286	4.37	141	4977	1702	2001	6.81

**G0** マウスに由来する **452** ペディグリー 計 **13328** 頭の **F3** マウスについて解析を行った。**G3** マウスにおける **Saturation analysis** による推測値として，同一遺伝子中に 2 回の遺伝子変異を得た可能性は，ホモ接合子について **17.34%**,ヘテロ接合子で **26.00%**と推測された。

Hit times	HOMO					HET				
	Pedigrees	G3 mice	Genes	Alleles	Saturation(%)	Pedigree	G3 mice	Genes	Alleles	Saturation(%)
>=0	452	13328	6756	9888	27.05	452	13328	6756	9888	27.05
>=1	446	10382	5245	7012	21.00	451	13155	6648	9671	26.62
>=2	440	10311	4331	6098	17.34	451	13155	6494	9517	26.00
>=3	439	10137	3511	5248	14.06	450	13154	6406	9424	25.65

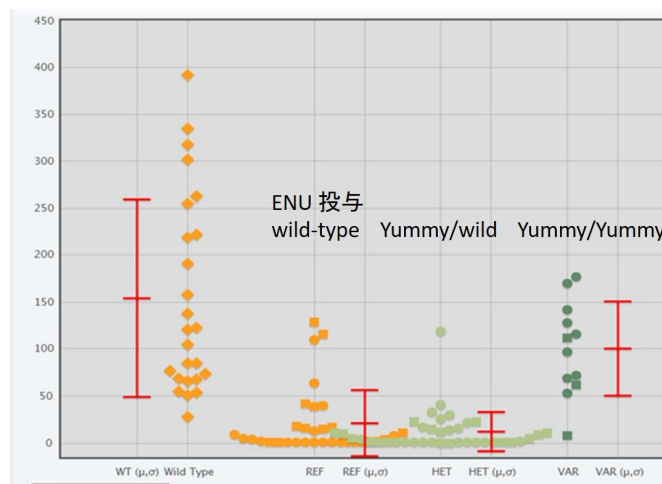
当初ポジショナルクローニングにより変異遺伝子（責任遺伝子）の同定・解析を行う予定であったが，全個体のエクソームシーケンス解析とマシンラーニングを導入した **Mutagenetix program** を用いたことにより，予定以上の効率的スクリーニングが達成された。

## (2) スクリーン陽性マウスの選定

スクリーニングによる陽性マウスの選定は、遺伝子型による分泌型産生量の平均値、計測データの CV 値、遺伝子機能へのダメージ予測(PolyPhen 2 Score)を考慮して、過去に Beutler 研究室で同定された同定遺伝子についてのデータ学習により構築されたアルゴリズムを用いたマシンラーニングシステムを用いて決定を行い、血清中 IgA 量に関連する 102 の候補遺伝子群、唾液中 IgA 産生に関連する 39 の遺伝子群が抽出された。ただし、本研究手法においては、効率的な原因遺伝子探索のために進化途中にあるマシンラーニングを応用するため、擬陽性として検出される遺伝子の存在が予測される。今回の渡航期間においては、唾液中分泌型 IgA 産生について優先的に解析対象を選定してプロジェクトを進行することとした。

39 の候補遺伝子より最も遺伝子型と IgA 産生亢進の形質に高い関連の見られた遺伝子、また既知の報告にない遺伝子として *Yummy* ミューテーションを解析対象として選定した。

唾液中分泌型 IgA 量(遺伝子型による相対比較)



候補遺伝子に誘導された ENU ミューテーション (*Yummy*) は、74 番目のアミノ酸残基がグルタミンからグリシンに転換されるミスセンスミューテーションであり **aldehyde dehydrogenase** ドメインをもつ ALDH サブファミリータンパク質として同定された。



## (3) Crispr-Cas9 システムを用いたゲノムエディティング

*Yummy* について、Crispr-Cas9 システムを用いたゲノムエディティングの手法を用いて、*Yummy* ミューテーションを持つ責任遺伝子の KO マウスの作成を行った。今後、新潟大学においてその遺伝子機能についての解析が行われる。

唾液中の SIgA に着目し、ENU ミュータジェネシスを応用して本遺伝子が新規に同定された。感染症予防や歯周病医薬およびワクチンの開発に向けて、新たな標的分子治療のターゲットとなる可能性が期待される。

## 5. 研究組織

国際共同研究者 **Bruce Beutler (UT Southwestern Medical Center, テキサス州, 米国)**