

《特別企画》

歯周病の分子標的治療実現への 機能ゲノム科学的研究



日本大学松戸歯学部 特任教授

安 孫 子 宜 光

●抄 録●

未来の口腔医療の開発にはカスタムメイド的な分子標的治療が必要で有用である。本稿では、機能ゲノム科学技術と歯周病に対するカスタムメイド診断と分子標的治療の戦略の現状を紹介する。歯周ポケット試料中のmRNAをRNAポリメラーゼのプロモーター領域を付与したランダムDNAプライマーを用いて蛍光標識して増幅し、病原因子遺伝子群のDNAマイクロアレイにハイブリダイズし、病原因子の発現をモニターして標的分子を決定する。治療法としては、決定標的分子を中和できるモノクローナル抗体の量産を試みた。まず、ハイブリドーマを作製し、抗体の可変部位 (ScFv) 遺伝子をクローニングして *Bacillus brevis* 宿主系を利用して量産した。また、ヒト抗体遺伝子のトランスジェニックマウス (Xenomice, TransChromo) を利用して安全性が高いヒト型抗体を作製した。さらに、雌鶏に標的分子を免疫して中和IgYを量産した。これらの抗体は、標的分子の病原性を中和することができた。粘膜免疫による歯周病ワクチンやゲノム創薬応用による新薬の開発を試みた。分子量4万の外膜タンパクは凝集、赤血球凝集、ヘミン結合活性をもつ病原因子である。組換えタンパクを量産、精製して結晶化し3次元構造を決定することに成功した。今後、ゲノム創薬のスクリーニング、開発が期待される。

キーワード：機能ゲノム科学、分子標的治療、歯周病、受動免疫、粘膜免疫

I. はじめに

歯科医療のさらなる発展には生命科学的なアプローチを応用した歯科医療体系の構築が必要であり、その実践が急務であるといわれている。近年、分子標的医療やカスタムメイド医療の重要性・必要性が認識され、医科領域では多大な進展をとげ既に臨床応用されている。AIDSでも、その発症メカニズムの研究からウイルス粒子形成に不可欠なプロテアーゼが解明され、阻害剤の分子標的治療によって致死率が大幅に減少している。

ゲノム情報を基盤とする機能ゲノム科学、バイオインフォマティクス研究が台頭し、あらゆる疾患の分

子標的医療の実現に向けての戦略が期待されている。近い将来、患者個人のゲノム情報からヒトの生死に関わる遺伝子疾患の多型、変異を解析して成長段階に応じてオーダーメイド的に、栄養指導、生活習慣指導、化学療法、遺伝子治療などを実施することで、ほとんどのヒトが天寿をまっとうできるであろうといわれている。しかし、歯科領域では、分子標的医療が立ち遅れていると言わざるを得ない。本稿では、歯周病を例に機能ゲノム科学技術を応用した病原因子発現の診断、治療標的分子の同定、受動免疫療法、粘膜ワクチン、ゲノム創薬などの研究の現状について紹介し、医学の基本である『診断から治療へ』の実現について考察する。

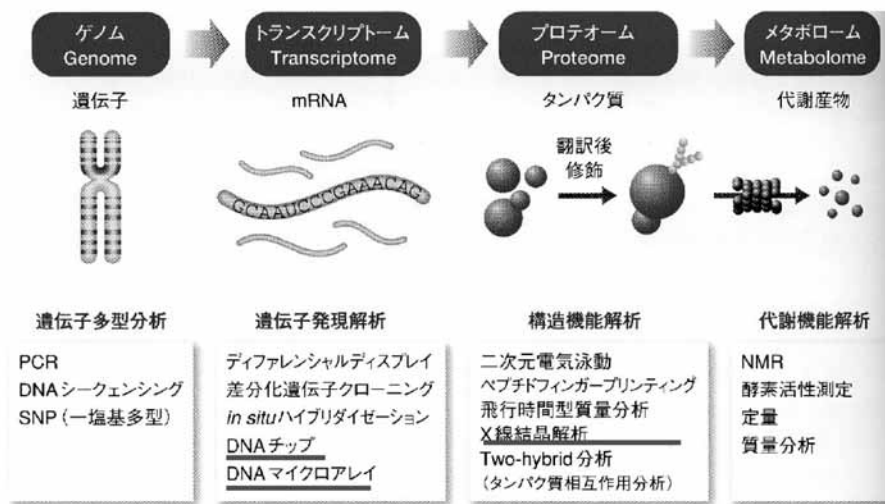


図1 機能ゲノム科学の全体像
Fig. 1 (Outlook of functional genomics)

II. 機能ゲノム科学とバイオインフォマティクス

DNAは塩基ATGC 4文字の暗号からなる配列で、AUGCのmRNA 塩基配列に転写されて3文字の組み合わせで一種類のアミノ酸を規定することでタンパク質を合成する。従って、遺伝子のDNA塩基配列を解読することによってどのような構造や機能をもつタンパク質であるかを理解することができる。30億塩基からなる情報を全て解読するヒトゲノム計画が終了し、データベースが公開されている。

遺伝子情報はDNAからmRNAへの転写そしてタンパク質合成へと流れていく。設計図である遺伝子情報を総括するゲノムgenomeに加えて、mRNAレベルの情報を総括するトランスクリプトームtranscriptome、遺伝子産物すなわちタンパク質の情報を総括するプロテオームproteome、機能タンパク質の代謝における情報を総括するメタロボロームmetabolome、を統括して研究する機能ゲノム科学が進展している。そして、これら情報データベースを統括、相互利用する学問体系をバイオインフォマティクス (bio-informatics ; 生物情報科学) とよぶ¹⁾。(図1)

III. 歯周病の治療標的分子発見の戦略

主要歯周病原菌*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) は線毛A遺伝子 (*fimA*) 多型によりI-V型に分類されている。歯周炎患者では70%がII型であり、健常者でも

*Pg*が分離されるが、その80%はI型であるという²⁾。歯周病に起因すると思われる心筋梗塞の病巣もII型が多いと報告されている。*P.g* II型のゲノム計画は、新規歯周病治療に必須であり、今後、歯周治療の新展開を生み出すと期待される。これまで*Pg*のゲノム計画はI, IV型が終了し、公開されている。我々は、II型のゲノム計画を実施した³⁾。その結果、I, II, IV型 *fimA*株共通の遺伝子は約1500遺伝子で、約200遺伝子は、IV型と相同性が低いか存在しない遺伝子であった。従って、この200遺伝子群が病原性発揮に重要であると考えられる。I, II, IV型の発現タンパク質分子について、プロテオーム解析を行って、発現タンパク質スポットを比較することで標的分子の同定を進めている。

IV. 分子標的治療を可能にする遺伝子診断

分子標的治療の実現には、当然ながら感染病巣で発現している病原因子を同定することが必要である。感染細菌の病原性は菌株によって多様であり、同一株でも生息環境によって病原因子の発現が異なる。したがって、感染菌株の病原因子の発現解析が必要となる。しかし、タンパクレベルでモニターすることは不可能であるが、細菌ではRNAへの転写とタンパク質への翻訳は共役している、mRNAレベルとタンパク質の発現は共役していることから類似していると言われている。そこで、歯周ポケット臨床試料から効

率良くRNAを抽出し、mRNAを増幅し、病原因子遺伝子マイクロアレイにより疾病活動度を評価することで治療標的分子を同定することが可能と考えられる。その実現には極微量の菌周ポケット細菌試料からmRNAを回収してPCR法で増幅し、多数の病原因子のカスタムメイドDNAアレイを用いる必要がある。当教室では、菌周ポケットに存在する程度の微量菌体から特殊なRNA増幅法によって、マイクロアレイで多数の病原因子発現をモニターすることに成功している。

V. 分子標的治療の戦略

標的分子が決定できた後は、当然ながら実現可能な治療の開発である。ここでは受動免疫療法、粘膜面器ワクチン、ゲノム創薬について紹介する。

1) 受動免疫療法

一般に細菌感染症においては、原因菌の標的分子が決定されれば、能動免疫によるワクチン療法が治療法として効果的で重要な選択肢となる。しかし、法定伝染病に入らない菌周病に対しての実用化は困難で為されていない。一方、抗血清や精製抗体を用いて、病原体の病原性を中和する受動免疫療法は、菌周ポケットに投与する抗体が体内血流に移行する可能性は低く、安全性が高いと考えられる。実際、菌周炎患者に対してスケーリング、ルートプレーニング、抗菌物質投与を行い*P.g*を菌周局所から駆除した後、*P.g*に対するマウスモノクローナル抗体の菌周ポケット内投与で半年以上にわたって再感染が抑制できたとする報告もされている。

受動免疫療法の実用化において抗体の量産は、重要な課題である。IgG抗体のH鎖、L鎖にはそれぞれ可変部位 (Fv) と不変部位 (Fc) が存在する。Fvは抗原との結合部位であり、病原因子の機能を中和する。Fcはオプソニン作用、補体系の活性、細胞性免疫応答の誘導に働く。まず標的因子をマウスに免疫して抗体産生細胞を回収してミエローマ癌細胞と細胞融合させてハイブリドーマを作製する。中和活性が高いクローンから抗体遺伝子のmRNAを分離し、逆転写酵素によりcDNA (mRNAの塩基配列に相補的なDNA) を合成する。このcDNAから H鎖とL鎖の可変

部位 (Fv) の遺伝子領域をPCR法で増幅し、リンカーペプチド遺伝子を連結させて大腸菌で発現させて抗体可変部位のみからなるScFv (single chain variable fragment) 抗体が作製できる。しかし、宿主の大腸菌は抗体タンパクを菌内に蓄積、凝集させて生存を図るので量産ができない。当教室では、枯草菌を応用することで量産を実現させた⁴⁾。そして、*P.g*のバイオフィルム形成因子や細胞定着因子の機能を抑制できるScFv抗体を作製・量産させることに成功している^{5, 6)}。ScFv抗体は病原因子を中和することができることから予防には有用であるがFc部分をもたないことから、補体系活性化やオプソニン作用によって殺菌作用は期待できない。そこで、次に治療用としてヒト型全抗体の作成に着手した。これまでに、(1)免疫不全のSCIDマウスへのヒトB細胞の移植と分子Eptein-Barr Virus (EBV) 感染による不死化⁷⁾、(2)ヒトIgG抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウス⁸⁾、(3)ヒト全抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Transchromo mouse)⁹⁾ を応用してヒト型抗体の生産に成功している。そして、実際にラットの感染実験系で骨吸収の抑制を観察し、有効性を確認している¹⁰⁾。(図2)

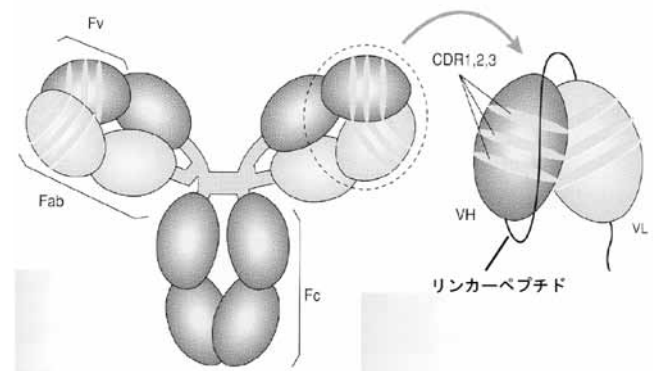


図2 ScFv (single chain variable fragment) 抗体の作製法

IgG抗体のH、L鎖遺伝子をリンカーペプチド遺伝子と融合させて枯草菌で発現させる病原因子を中和できる遺伝子組換え抗体を量産できる。

Fig. 2 Production of ScFv (single chain variable fragment)

(Mass production of genetic engineered antibodies that can neutralize the virulent factor by gene fusion of H and L chains of IgG gene and linker peptide gene expressed in *Bacillus* host.)

2) 粘膜ワクチン

細菌感染症に対する予防法はなんといっても能動ワクチン療法が効果的で安価で望ましい。しかし、歯科領域におけるヒト能動的ワクチンは実用化されていない。歯周病に関して動物実験では成功して、ワクチンは効果的であるが副作用によって死の転帰を取ることがあるのでヒトを対象となると実現していない。近年、粘膜免疫の研究が進展し、経口・経鼻接種によって粘膜と全身系に免疫応答、抗体産生を誘導することが可能で、口腔では唾液分泌型IgA、血清IgGの抗体産生が期待できる、且つ安全性が高い。しかし、欠点としては免疫応答が低くアジュバントを用いる必要がある。そこで、Pgの外膜タンパク質(40k-OMP)とアジュバント効果が高く副作用が低い改変コレラトキシンとともにマウスに経鼻ワクチン接種を行い長期間の抗体産生に成功している。¹¹⁾ (図3)

乳酸菌はヨーグルトの製造に使われるが、乳酸菌の外膜タンパク質とPg40k-OMPを遺伝子融合させて発現させてワクチンの運搬体として利用して粘膜免疫を誘導することに成功した¹²⁾。将来、ヨーグルトとして飲食できる歯周病ワクチンが実現できよう。(図4)

マルトース結合タンパクは組換えタンパクの精製に

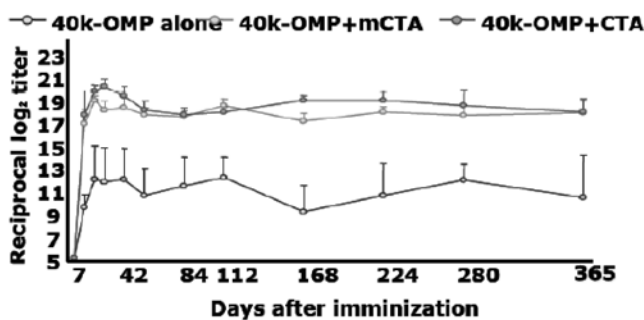


図3 変異コレラトキシンアジュバントを用いた粘膜ワクチン

mCT, 変異コレラトキシン; CTA, コレラトキシン. 抗体は1年間に及んで産生され、変異コレラトキシンは従来のCTAと同等の効果が得られた。

Fig. 3 Mucosal immunization using mutated cholera toxin adjuvant

(mCT, mutated cholera toxin adjuvant; CTA, cholera toxin adjuvant. Antibodies production was produced over 1 year, and similar effectiveness of mCT adjuvant with CTA was observed.)

有用なことから、この遺伝子と目的遺伝子を融合させた組換えタンパクの作製が開発されてマルトースカラムを用いて迅速に高度に精製することができる。最近、マルトース結合タンパクにアジュバント効果があることが発見された。われわれは歯周病の有用な標的分子であるPg HagAとマルトース結合タンパク融合体を量産させて粘膜ワクチンとしてマウスに免疫して予防効果があることを実証している¹³⁾。マルトース結合タンパクに副作用は認められていないことからワクチン療法の実用化に貢献でききよう。

3) ゲノム創薬

医科領域では機能ゲノム科学研究の情報をもとに新薬の開発、すなわちゲノム創薬が飛躍的に発展している。しかし、歯周病の標的分子に対する創薬研究は立ち遅れており、歯周病ゲノム創薬研究は実現していない。我々は、Pgの外膜タンパク質として遺伝子クローニングした分子が、共凝集因子、赤血球凝集因子、ヘミン結合分子、などマルチ機能タンパクであることを見いだした。そして、遺伝子組換えタンパクを高度に精製して結晶化に成功し、3次元構造の決定に成功、立体構造を明らかにした。今後、ドッキング解析によ

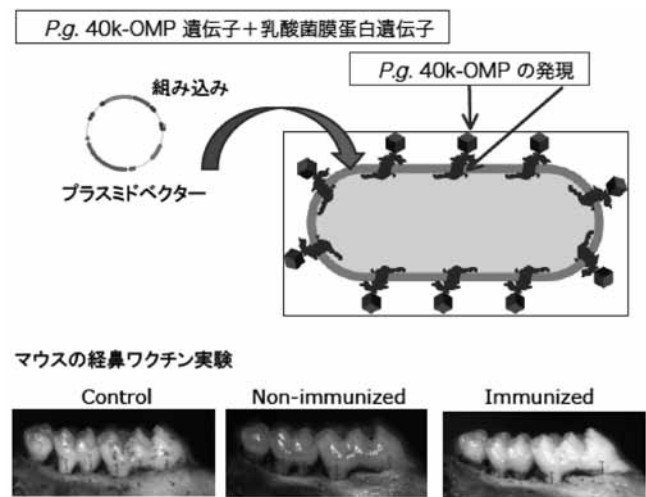


図4 乳酸菌を応用した粘膜ワクチン
上、乳酸菌ワクチンの概略; 下、マウスのPg感染実験でワクチンによる歯槽骨吸収が軽減された。

Fig. 4 Mucosal immunized vaccination using Lactobacillus

(upper, outlook of Lactobacillus vaccination; lower, alveolar bone resorption caused Pg infection was reduced by the vaccination.)

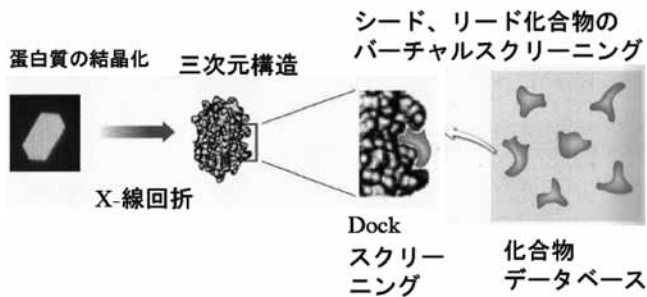


図5 ゲノム創薬の概観

3次元構造が決定した標的分子の機能ポケットに化合物をバーチャルスクリーニングを行い、新薬合成に役立てる。

Fig. 5 Outlook of drug discovery by functional genomics.

(The functional domain of 3D structure of molecular target can be utilized to the discovery of new drug by virtual screening.)

るバーチャルスクリーニングによってリード化合物の発見を行い、歯周病のゲノム創薬の実現が期待される。

(図5)

VI. おわりに

一般歯科医師の日常診療の多くは齲蝕と歯周病に費やされている。もし、この2大歯科疾患から労力が解放されれば、歯科医師はさらに広い分野の高度な生命科学的新規医療を展開できる。どの業界でも優れた人材なしでは発展しない。現在の社会経済環境で、明日の優秀な担い手を歯科界に数多く確保できるでしょうか？今の青年達に歯科界は、こんなに魅力的だと示すことができるでしょうか？将来、口腔組織を利用した再生学、咀嚼・咬合と脳高次機能、唾液腺を応用した遺伝子治療など歯科・口腔医師が実践すべき新規医療を開発し、実践できる専門家を育成せねばならない。

参考文献

- 1) 安孫子宜光：バイオインフォマティクス Section 3、歯歯系学生のビジュアルゲノム科学入門、日本医事新報社、52-70, 2007.
- 2) Amano, A., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Akiyama, S., Morisaki, L., Hamada, S. (2000) : Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. *J Dent Res*, 79 : 1664-1668, 3, 2.
- 3) Watanabe T, Maruyama F, Nozawa T, Aoki A,

- Okano S, Shibata Y, Oshima K, Kurokawa K, Hattori M, Nakagawa I, Abiko Y. : Complete genome sequence of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* TDC60, which causes periodontal disease. *J. Bacteriol.*, 193(16) : 4259-4260, 2011.
- 4) Shiroza T, Shinozaki-Kuwahara N, Hayakawa M, Shibata Y, Hashizume T, Fukushima K, Udaka S, Abiko Y. : Production of a single-chain variable fraction capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochim Biophys Acta.*, 1626 (1-3) : 57-64, 2003.
- 5) Shiroza T, Shibata Y, Hayakawa M, Shinozaki N, Fukushima K, Udaka S, Abiko Y : Construction of a chimeric shuttle plasmid via a heterodimer system: secretion of an scFv protein from *Bacillus brevis* cells capable of inhibiting hemagglutination. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 65(2) : 389-95, 2001.
- 6) Shibata Y, Kurihara K, Takiguchi H, Abiko Y : Construction of a functional single-chain variable fragment antibody against hemagglutinin from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.*, ; 66(5) : 2207-2212, 1998.
- 7) Abiko Y, Ogura N, Matsuda U, Yanagi K, Takiguchi H : A human monoclonal antibody which inhibits the coaggregation activity of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.*, 65(9) : 3966-2969, 1997.
- 8) Shibata Y, Hosogi Y, Hayakawa M, Hori N, Kamada M, Abiko Y : Construction of novel human monoclonal antibodies neutralizing *Porphyromonas gingivalis* hemagglutination activity using transgenic mice expressing human Ig loci. *Vaccine.*, 23 (29) : 3850-3856, 2005.
- 9) Takauchi A, Kobayashi T, Tahara T, Nakazawa K, Hayakawa M, Shibata Y, Ishida I, Abiko Y, Yoshie H : The trans-chromosomal mouse-derived human monoclonal antibody promotes phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis* by neutrophils. *J Periodontol.*, 76(5) : 680-685, 2005.
- 10) Hamada N, Watanabe K, Tahara T, Nakazawa K, Ishida I, Shibata Y, Kobayashi T, Yoshie H, Abiko Y, Umemoto T : The r40-kDa outer membrane protein human monoclonal antibody protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss in rats. *J Periodontol.*, 78(5) : 933-9, 2007.
- 11) Du Y, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yuzawa S, Abiko Y, Yamamoto M. : Nasal immunization with a fusion protein consisting of the hemagglutinin A antigenic region and the maltose-binding protein elicits CD11c (+) CD8 (+) dendritic cells for induced long-term protective immunity. *Infect Immun.*, 79(2) : 895-904, 2011.
- 12) Tanaka H, Hashizume T, Abiko Y, Sewaki T, Nozaki C, Kurita-Ochiai T, Makimura M, Yamamoto M : Immunogenicity and Protective Efficacy of Heat-Killed Recombinant *Lactobacillus casei* Expressing Outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* In *J Oral-Med Sci.*, 10 : 255-260, 2012.
- 13) Yuzawa S, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Kobayashi

R, Abiko Y, Yamamoto M : Sublingual vaccination with fusion protein consisting of the functional domain of hemagglutinin A of Porphyromonas gingivalis and

Escherichia coli maltose-binding protein elicits protective immunity in the oral cavity. FEMS Immunol Med Microbiol, 64(2) : 265-272, 2012.

Study on the Molecular Targeted Therapy of Periodontal Diseases by Functional Genomics

Professor Emeritus, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, D.D.S, Ph.D.

Yoshimitsu ABIKO

To develop the future oral therapy, the custom-made molecular targeted therapy is necessary and vital. Here, the functional genomic technology, strategies of custom-made diagnosis and molecular-targeted therapy against periodontal diseases are introduced. The DNA diagnosis of molecular targets, DNA random DNA primers coupled RNA polymerase promoter gene was constructed and amplified mRNA of pathogens in periodontal pocket, amplified fluorescence labeled mRNA was hybridized with virulence factor genes DNA microarray and monitored therapeutic target gene expressions. For the therapy, hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies (MAbs) to inhibit the molecular targets were established and the single-chain variable fragment (ScFv) genes in the hybridoma was then cloned and functionally expressed in *Bacillus brevis* hosts. Human monoclonal antibodies were also constructed using transgenic mice, (Xenomice or TransChromo mice) carrying human immunoglobulin gene loci. IgYs were also prepared from the egg yolk of immunized hens. ScFv, human monoclonal antibodies, and IgY, those are capable of neutralizing virulence factor activities. We also challenged active vaccination using mucosal immunity and IT derived drug discovery, The 40-kDa outer membrane gene which expressed aggregation, hemagglutinin, and hemin binding factors. The recombinant protein was produced and highly purified, crystallized, and succeeded to identify a 3-D structure, the 3D structural information will be useful to virtual screening of new drug.

Key words : Functional genomics, Molecular targeted therapy, Periodontal diseases,
Passive immunization, Mucosal immunization