

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04660

研究課題名(和文) 実用植物が作る志賀毒素特異的分泌型 IgA 植物抗体の毒素中和作用と安全性の研究

研究課題名(英文) Studies on the efficacy of toxin neutralization and safety of Shiga toxin-specific secretory IgA type plantibody produced by practical plants

研究代表者

今井 康之 (Imai, Yasuyuki)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：80160034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌や赤痢菌が産生する志賀毒素(Stx1)を中和する組換え型の分泌型IgA抗体(SIgA)を産生するトランスジェニック植物を、モデル植物シロイヌナズナおよび実用植物リーフレタスで作製した。Stx1の侵入機構として大腸上皮の傷害が考えられる。ヒト大腸細胞株を用いた評価系を確立し、植物由来IgA抗体の毒素中和活性を証明した。また小胞体保留シグナルの付加によってSIgAの一構成成分である分泌片(SC)の発現が増加した。植物に生産させたSCをマウスに投与すると、静脈内投与ではSCに対する抗体ができたが、経口投与では抗体ができず、植物由来生物製剤の経口投与での安全性の根拠が示された。

研究成果の概要(英文)：Transgenic plants that produce secretory immunoglobulin A (SIgA) specific to Shiga toxin 1 (Stx1) were developed using a model plant (*Arabidopsis thaliana*) and a vegetable (*Lactuca sativa*). Considering the initial entry of Stx1 can occur through cytotoxicity to colon epithelial cells, we established an assay using a human colon cell line, Caco-2. Plant-made IgA neutralized the toxicity of Stx1 against Caco-2 cells. Production of secretory component (SC), a component of SIgA, was increased in the transgenic plants by the addition of an endoplasmic reticulum retention signal to SC. When plant-made SC was administered to mice, anti-SC antibodies were induced by intravenous administration while no such antibodies were made by oral administration. This result provides evidence as to the safety of oral application of plant-made biologics.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：抗体医薬 植物発現系 粘膜免疫 免疫グロブリンA 微生物

1. 研究開始当初の背景

近年、治療薬として利用が増加している抗体医薬であるが、動物細胞培養による生産はコストが高く、薬価の高さに結びついている。そのため、植物などを用いた抗体生産技術の開発が試みられている。世界的にも、生産規模の拡張や縮小が容易な植物による抗体の生産技術が活発に研究されている現状がある。さらに、バイオシミラーとしても植物生産医薬品が使われる方向にあり、その有効性および安全性を担保する研究が、薬学研究として重要性が増している。抗体のクラスの中でも、免疫グロブリン(Ig) Aは消化管などの粘膜表面で分泌型 IgA (SIgA)として働く。可食性抗体として SIgA を植物で生産し、高次機能性食品や経口投与を目的とした抗体医薬の生産・利用につなげるための研究が必要とされている。十分なバイオマスを獲得する観点からは、レタスなどの実用植物での発現をめざすべきである。

腸管出血性大腸菌や赤痢菌が産生する細胞毒素である志賀毒素(Stx1)に対して中和活性のある 2 量体 IgA を植物で発現させることに成功してきた。経口投与に適した SIgA を植物で作製し、腸管からの Stx1 の侵入の抑制に役立ち、一方で植物抗体の経口投与による安全性の根拠を示すことを目標とした。

2. 研究の目的

Stx1 の結合サブユニット(Stx1B)に特異的な SIgA を組換え型としてシロイヌナズナおよび実用植物のレタスに発現させる。SIgA は 2 量体 IgA (dIgA)と分泌片(SC)から構成されるので、分泌片を効率よく発現させる目的で小胞体ソーティングを試みる。生産方法の改良により、毒素中和活性の評価のために十分な量の SIgA 植物抗体を準備できるようにする。一方、腸管からの侵入の阻害を評価するため、ヒト大腸培養細胞株を用いて、Stx1 曝露による細胞傷害を評価する実験系を確立する。Stx1 の細胞傷害に対する植物抗体の中和活性を評価する。さらに、糖鎖修飾の多い SC を植物抗体のモデルとして用いて、マウスに経口投与あるいは静脈内投与した場合、植物抗体に対する免疫応答が経口投与では起こらないことを示し、経口投与による植物抗体利用の安全性を明らかにする。

3. 研究の方法

Stx1B 特異的可変部を持つマウス IgA 遺伝子(H鎖とL鎖)およびJ鎖とSCを、2組のlight-harvesting complex II (LHCB)のプロモーターとターミネーターの間に挿入し、SIgAを構成する4つのポリペプチド鎖を同時に発現するカセットを作製した。アグロバクテリウム法にてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)およびリーフレタス(*Lactuca sativa*)のトランスジェニック植物を作製した。葉を用いて各ポリペプチド鎖遺伝子の植物体への組み込み(PCR)、

mRNAへの転写(RT-PCR)を確認し、タンパク質の発現をSDS-PAGE/western blottingとELISAを用いて評価した。植物抗体の抗原結合性は、Stx1Bを固相化したELISAによって測定した。検出抗体には、抗マウスα鎖(H鎖)、抗マウスβ鎖(L鎖)、抗マウスpoly-Ig受容体(SC)を用いた。SCの高効率発現のため、SCのC末端に小胞体保留シグナルのKDEL配列を付加したコンストラクトを作製し、SC-KDELを単独発現するシロイヌナズナを作製した。植物体でのSIgAの局在は、金コロイド標識抗体による免疫電子顕微鏡観察で調べた。

毒素活性の評価は、Stx1ホロトキシンを用いたStx高感受性Vero細胞、および酪酸で分化させたヒト大腸上皮細胞株Caco-2細胞を用い、WST-8法によって生存割合を算定した。また、Stx1に曝露した細胞のDNA断片化をアガロース電気泳動で評価し、アポトーシスの指標とした。

SC-KDEL単独発現シロイヌナズナからは、SC-KDELを硫酸アンモニウム沈澱およびイオン交換クロマトグラフィーにて部分精製した。部分精製したSC標品をマウスに経口投与あるいは静脈内投与し、植物に生産させたSCに対する抗体が産生されるかどうかをELISAおよびwestern blottingによって評価した。さらに、部分精製したSC-KDELと2量体IgAの試験管内での再構築、およびSC-KDEL発現植物と2量体IgA発現植物との交配によって植物体内でSIgAを作製させた。

4. 研究成果

(1) Stx1B 特異的な分泌型 IgA を一括発現するトランスジェニック植物の作製

Stx1B 特異的な組換え型 SIgA を構成する 4 種類のポリペプチド(H鎖、L鎖、J鎖、SC)を一括で発現できるコンストラクトを作製し、シロイヌナズナにアグロバクテリウム法で遺伝子導入してトランスジェニック植物を作製した。IgA 発現量の高い個体の自家受粉によってホモ接合体を得た。ロゼッタ葉の抽出物を用いて、ELISA を用いて Stx1B に結合する SIgA の存在を見出した。一方、非還元条件の SDS-PAGE と western blotting により、高分子量の SIgA の組み立てを確認した。さらに、二重標識金コロイド免疫電子顕微鏡法によって IgA の H 鎖と SC が葉の内部に存在する protein body 様構造に局在することを示した。

一方、リーフレタスの場合、同じコンストラクトをレタス子葉にアグロバクテリウム法で遺伝子導入し、試験管内で植物体に再分化させた後、改良土に移植した。葉の抽出物を用いた ELISA によって、Stx1B に結合する SIgA の発現を検出できた。

(2) ヒト大腸がん細胞株 Caco-2 を用いた Stx1 による毒性評価系の確立と植物抗体による毒素中和活性

動物実験で Stx1 による毒性を中和する活性を評価する一方で、ヒトの侵入門戸である大腸上皮細胞に対する傷害を SIgA が中和できるかを、ヒト大腸上皮細胞を用いて直接評価する実験系が重要である。Stx1 の毒性は従来、高感受性細胞であるアフリカミドリザルの腎臓上皮細胞 Vero 細胞や、ヒトパーキットリンパ腫細胞の Ramos が用いられることが多かった。そこで、ヒト大腸上皮細胞の Caco-2 を用いた評価系の確立を試みた。Caco-2 に酪酸を作用させて分化させると、Stx1 に対する感受性が上昇した。SIgA を一括発現するトランスジェニックシロイヌナズナの葉から部分精製したタンパク質画分を用いて、Stx1 の曝露による Caco-2 の細胞死を抑制するかどうかを評価した。野生型シロイヌナズナ由来のサンプルや、抗原特異性の違う IgA では全く抑制されないのに対して、トランスジェニック植物由来のサンプルでは IgA 濃度依存的に Caco-2 の細胞死を抑制した。また、DNA 断片化の測定から、SIgA 発現植物のサンプルが Caco-2 のアポトーシスを抑制することが示された。

(3) 小胞体保留シグナル KDEL を付加した分泌片(SC-KDEL)単独発現トランスジェニック植物の作製

レタスでの SIgA 発現レベルの解析から、バイオマスが大きくても、発現タンパク質濃度が低いことが判明した。原因の一つと考えられるのは、SC のタンパク質発現量が十分ではないことである。そこで、より効率的な発現をめざして、小胞体保留シグナルとなるペプチド配列を SC の C 末端側に付加したコンストラクトを作製して、SC-KDEL を単独発現するトランスジェニックシロイヌナズナを作製した。これにより、SC の発現量の顕著な改善が認められた。KDEL 配列の存在は小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を抑制する効果があるとされている。実際 SC と比較して SC-KDEL では植物特有の糖鎖修飾が低下していることが判明した。

(4) SC-KDEL と 2 量体 IgA を用いた SIgA の試験管内構築およびトランスジェニック植物の交配による SIgA の発現

SC-KDEL と 2 量体 IgA から、試験管内で SIgA を構築できることを示した。また、Stx1B 特異的 2 量体 IgA 発現シロイヌナズナと SC-KDEL 発現シロイヌナズナとの交配により、Stx1B に結合する SIgA が植物体内で作られることが示された。SIgA を一括で発現するシロイヌナズナと比べ、交配によって得られた植物において、SIgA の発現量が高かった。

(5) SC-KDEL を活用した植物で生産した biologics の経口投与における安全性評価

植物で生産した biologics の経口投与における安全性評価の一環として、部分精製した SC-KDEL をマウスに投与し、SC に対する抗体産生を評価した。BALB/c マウスに一週間間隔で SC-KDEL を経口あるいは静脈内から 4 回投与した。最終投与の一週間後、血清サンプルを回収して SC-KDEL に対する IgG 抗体産生を ELISA で評価した。SC-KDEL を静脈内投与したマウス血清中に、SC-KDEL に結合するマウス IgG 抗体が検出された。一方、経口投与したマウス血清中には、SC-KDEL に結合するマウス IgG 抗体が検出されなかった。さらに、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した SC-KDEL を還元条件下で SDS-PAGE にて電気泳動し、マウス血清中の SC-KDEL に結合する IgG があるかどうかを western blotting により評価した。ELISA の結果と同じく、静脈内投与では SC-KDEL に結合する IgG 抗体が検出されたが、経口投与では全く検出されなかった。このことから、植物で生産した biologics の一例として SC-KDEL を用いた実験を行い、経口投与によってはアレルギーの原因となりうる抗体産生が起きないことが示された。一方、静脈内投与ではペプチド部分がマウス由来の同種タンパク質ではあっても、恐らく植物型糖鎖修飾を原因として、投与したタンパク質に対する抗体産生が起きることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Katsuhiko Nakanishi, Shota Morikane, Shiori Ichikawa, Kohta Kurohane, Yasuo Niwa, Yoshihiro Akimoto, Sachie Matsubara, Hayato Kawakami, Hirokazu Kobayashi, and Yasuyuki Imai: Protection of human colon cells from Shiga toxin by plant-based recombinant secretory IgA. *Sci. Rep.* 7, 45843 (2017)
査読有
DOI: 10.1038/srep45843

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 菊地祐希、松田弥奈美、森兼捷太、中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 植物由来組換え型分泌片を活用した抗原特異的分泌型 IgA の構築と消化酵素抵抗性の付与 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 27 日、金沢市
- (2) 中西勝宏、黒羽子孝太、今井康之: 1 型線毛に結合する IgA 型イムノアドヘシンの作製 日本薬学会第 138 年会 2018 年 3 月 26 日、金沢市

- (3) Katsuhiro Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Production of secretory hybrid-IgG/IgA in plant expression system. 第46回日本免疫学会学術集会 2017年12月14日、仙台市
- (4) 梶原優佳、森兼捷太、中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 植物で作製した小胞体保留シグナル付加分泌片の糖鎖解析 日本薬学会第137年会 2017年3月27日、仙台市
- (5) 松田弥奈美、森兼捷太、中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 植物で作製した分泌片を活用した分泌型IgAの消化酵素抵抗性に関する研究 日本薬学会第137年会 2017年3月27日、仙台市
- (6) 中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 分泌型ハイブリッドIgA植物抗体によるペロ毒素のヒト腸管上皮細胞に対する細胞毒性の中和効果の検討 日本薬学会第137年会 2017年3月27日、仙台市
- (7) Katsuhiro Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, Yasuyuki Imai: Establishment of secretory hybrid IgA with binding to Shiga toxin 1 binding subunit in lettuce. 第21回静岡健康・長寿学術フォーラム 2016年11月25日、静岡市
- (8) 森兼捷太、細川奈緒、中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 小胞体保留シグナルを利用した分泌型IgAの植物での生産性向上 日本薬学会第136年会 2016年3月27日 横浜市
- (9) 中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、松原幸枝、秋元義弘、川上速人、小林裕和、今井康之: ペロ毒素に対する分泌型ハイブリッドIgAの植物での産生と細胞内局在の解析 日本薬学会第136年会 2016年3月29日、横浜市
- (10) Nao Hosokawa, Katsuhiro Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Production of secretory component-KDEL in *Arabidopsis thaliana*. 第44回日本免疫学会 2015年11月20日、札幌市
- (11) Katsuhiro Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Intrarectal administration of Shiga toxin 1 injures mouse colonic epithelial cells. 第44回日本免疫学会 2015年11月20日、札幌市
- (12) 杉野嵩朋、中西勝宏、鶴田昌吾、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 機能解析を目指した植物発現 hybrid IgA 抗体の精製 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015年11月1日 名古屋市
- (13) Katsuhiro Nakanishi, Kohta Kurohane, Sachie Matsubara, Yoshihiro Akimoto, Hayato Kawakami, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, Yasuyuki Imai: Hybrid IgA expressed in *Arabidopsis* is localized in the protein body-like structure in the leaves. 植物電子顕微鏡ワークショップ 2015 2015年9月25日 横浜市

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bisei/>

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bisei/English/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 康之 (IMAI Yasuyuki)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号: 80160034

(2) 研究分担者

黒羽子 孝太 (KUROHANE Kohta)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号: 90333525

(3) 連携研究者

小林 裕和 (Kobayashi Hirokazu)

静岡県立大学大学院 食品栄養環境科学研究院・教授

研究者番号: 80170348

丹羽 康夫 (Niwa Yasuo)

静岡県立大学大学院 食品栄養環境科学研究院・助教

研究者番号: 00222191

(4) 研究協力者

中西 勝宏 (NAKANISHI Katsuhiro)

秋元 義弘 (AKIMOTO Yoshihiro)

川上 速人 (KAWAKAMI Hayato)

松原 幸枝 (MATSUBARA Sachie)