

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200073

研究課題名（和文）コメ貯蔵蛋白オルガネラを用いる常温保存可能経口蛋白医薬の開発基礎研究

研究課題名（英文）Development of cold-chain free oral protein-based drug

研究代表者 幸 義和 (Yoshikazu Yuki)

東京大学 医科学研究所 助教

研究者番号：60345030

研究成果の概要（和文）：

経口蛋白医薬として IL-10 発現米及びロタウイルス抗体発現米の作出に成功し、特にロタウイルス抗体発現米は常温安定でコメに大量に可溶化できる状態で発現され、マウスを用いた感染防御実験で、当初予定していた経口で蛋白医薬の効果を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel system for the production of protein drug such as IL-10 and rotavirus-specific llama heavy-chain antibody (VHH) using rice-based expression system (MucoRice). Orally administered MucoRice-VHH markedly decreased the viral load in immunocompetent as well as immunodeficient mice. MucoRice-ARP1 retained in vitro neutralizing activity after long-term storage at RT and boiling. High-yield, water-soluble and purification-free MucoRice-VHH thus forms the basis for orally administered therapy against rotavirus infections.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 8,400,000 | 2,520,000 | 10,920,000 |
| 2010 年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2011 年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 23,800,000 | 7,140,000 | 30,940,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：オルガネラ工学、ドラッグデリバリー、経口蛋白医薬

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の経口デリバリーの研究は、海外のグループを含めて、サイトカイン・抗体及びワクチンを発現・分泌する乳酸菌や結核菌等の組換え細菌を用いた研究が進んでいる。例えば、ヒト IL-10 はクローン病に効果があると考えられているが、注射による全身系デリバリーでは器官特異的送達は不十分で頻発に腸管外注射をするか浣腸で投与し

なければならないので、IL-10 の臨床利用は限られていた。乳酸菌に IL-10 を発現・分泌させることで、この組換え乳酸菌の経口投与による治癒効果がマウスでの臨床研究においても認められた。同様に抗体の経口投与は不安定性から臨床応用は限られていたが、最近、発見されたラマ VHH 抗体は従来の二本鎖抗体より安定で、その可変領域のみからなる超小型抗体はナノ抗体と

呼ばれ、同様に乳酸菌にロタウイルスに対するナノ抗体を発現・分泌させた組換え乳酸菌の経口投与で感染防御効果が認められている。しかし乳酸菌といえ生きている細菌に抗原やサイトカインをデリバリーさせる方法は医薬品としての安全性、安定性の点で多くの問題があると考えられる。

2. 研究の目的

コメのオルガネラ工学的手法を用いて作出されたコメ粉末の経口投与での腸管上皮細胞や粘膜固有層への到達度合い、ロタウイルス下痢症や腸炎モデルでの薬理効果・作用機作を検証することで、画期的な常温安定な経口蛋白医薬デリバリーの開発を試みる。

3. 研究の方法

蛋白貯蔵体オルガネラに蓄積されているプロラミン（及びグルテリン）の発現を、RNAiを組み込んだ T-DNA ベクターで抑制し、その余地とエネルギーを同時に導入する蛋白医薬の発現蓄積に使い、特異的に 1 型蛋白貯蔵体の外側に発現させる。そこで今回、多重遺伝子発現バイナリーベクターを用いて、(1) 導入蛋白カセットに 1 型蛋白貯蔵体に存在する 13K プロラミンプロモーター (10K プロラミンシグナル配列) を用いる新規ベクターを構築して、1 型蛋白貯蔵体に特異的に発現させ、同時に (2) ユビキチンプロモーターと 13k プロラミンシグナル配列及びまたはグルテリン A の cDNA 配列に対するトリガー等からなる RNAi カセットをバイナリーベクターに組み込み、13K プロラミンやグルテリン A を特異的に抑制させる。こうして確立された発現ベクターを用いて、プロモーターの特性から外来のヒト IL-10 やナノ抗体をイネ種子の 1 型蛋白貯蔵体オルガネラ表層に特異的に高蓄積させる。

4. 研究成果

イネ種子を用いたバイオ医薬品の生産システムは、蛋白の常温保存性に優れるため冷蔵保存に要するコストを削減することができる。そこで我々は、まず抗炎症性サイトカインであるヒト IL-10 (hIL-10) を発現するイネ種子の作出を試み、その実用性を検証した。その結果、イネ種子に 17kDa の組み換え蛋白を発現させることに成功した。次に、hIL-10 発現米から hIL-10 を抽出し生理活性を評価したところ、米由来 hIL-10 は、*in vitro* で LPS 刺激によるヒト単球由来マクロファージからの炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-6) 産生を顕著に抑制し、さらに、LPS のマウス腹腔内投与による血中 TNF- α 上昇を有意に抑制し、生存率を顕著に改善させた。

次に、我々は本システムを用いて、ロタウイルスの VHH ナノ抗体の発現に試み、コメ粉末重量の 0.85% にも達する大量のナノ抗体を PBS で可溶化できる状態で発現する

ことに成功した。経口で投与されたナノ抗体米 PBS 抽に減少させた。さらにナノ抗体発現米は 1 年以上常温で安定で有り、95℃ の煮沸処理後もロタウイルスのマウスでの感染防御効果を維持できた。

以上、経口蛋白医薬として IL10 発現米及びロタウイルス抗体発現米の作出に成功し、特にロタウイルス抗体発現米はコメに大量に可溶化できる状態で発現され、マウスを用いた感染防御実験で、当初予定していた経口で蛋白医薬の効果を示すことができた。

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 10 件)

以下のすべて査読有り

1. T. Obata, Y. Goto, J. Kunisawa, S. Sato, M. Sakamoto, H. Setoyama, T. Matsuki, K. Nonaka, N. Shibata, M. Gohda, Y. Kagiya, T. Nochi, Y. Yuki, Y. Fukuyama, A. Mukai, S. Shinzaki, K. Fujihashi, C. Sasakawa, H. Iijima, M. Goto, Y. Umesaki, Y. Benno, H. Kiyono. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 7419-7424 (2010)

2. D. Tokuhara, Y. Yuki, T. Nochi, T. Kodama, M. Mejima, S. Kurokawa, Y. Takahashi, M. Nanno, U. Nakanishi, F. Takaiwa, T. Honda, H. Kiyono. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 8794-8799 (2010). Equal Contribution

3. T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, IG. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. Nat. Materials. 9:572-578 (2010). Equal Contribution

4. Y. Yuki, T. Nochi, N. Harada, Y. Katakai, H. Shibata, M. Mejima, T. Kohda, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, F. Ono, S. Kozaki, K. Terao, H. Tsukada, H. Kiyono. In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in non-human

primates. J. Immunol. 185: 5436-5443(2010) Co-corresponding author

5. K. Terahara, T. Nochi, M. Yoshida, Y. Takahashi, Y. Goto, H. Hatai, S. Kurokawa, M-H. Jang, M-N. Kweon, SE. Domino, T. Hiroi, Y. Yuki, Y. Tsunetsugu-Yokota, K. Kobayashi, H. Kiyono. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. , Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 822-828 (2011)

6. Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, IG. Kong, M. Kuroda, Y. Takahashi, T. Nochi, D. Tokuhara, T. Kohda, S. Kozaki, H. Kiyono. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. Vaccine 30: 4160- 4166 (2012) Corresponding author

7. S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa and H. Kiyono. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer' s patch M cells. Mucosal Immunol. 2012 Dec 5.

8. IG. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by Pneumococcus. Infect. & Immun. 2013 Mar 4. Co-corresponding author

9. Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, Y. Takahashi, D. Tokuhara, T. Nochi, Y. Katakai, M. Kuroda, N. Takeyama, K. Kashima, M. Abe, Y. Chen, U. Nakanishi, T. Masumura, Y. Takeuchi, H. Kozuka-Hata, H. Shibata, M. Oyama, K. Tanaka, H. Kiyono Induction of Toxin-specific Neutralizing Immunity by Molecularly Uniform Rice-based Oral Cholera Toxin B Subunit Vaccine without Plant-associated Sugar Modification. Plant Biotechnol. J. 2013 Mar Corresponding author.

10. Y. Fukiyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M.

Yamamoto, RS Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, JR McGhee, K. Figihashi. Potential roles of CCR5+CCR6+ dendric cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adovirus for mucosal IgA responses. PloS One 2013 , 8:e60453

[学会発表] (計 21 件)

1. 幸 義和、野地智法、徳原大介、清野 宏
コレラ毒素 B サブユニット (CTB) 発現
米はカニクイザルへの経口投与により血清中に CT 特異的 IgG 抗体を誘導するが、自然抗体として腸管に存在する CT 特異的 SIgA 抗体の免疫応答には影響を与えない。日本ワクチン学会、札幌 (2009)

2. 徳原大介、幸 義和、野地智法、清野 宏
コレラ毒素 B サブユニット発現コメ型
経口ワクチンによるコレラ菌および毒素原性大腸菌に対する下痢予防効果の検証。日本ワクチン学会、札幌 (2009)

3. Y. Yuki, A Novel Nanogel-based Delivery System for Adjuvant-free Intranasal Vaccines 2nd World Congress of Vaccine. 1 1. Beijing, China (2010)

4. Y. Yuki, T. Nochi, Y. Katakai, H. Shibata, D. Tokuhara, M. Mejima, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Hatai, A. Chubachi, U. Nakanishi, K. Terao, H. Kiyono. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence natural intestinal immunity. Baltimore, USA (2010)

5. T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, N. Kataoka, IG. Kong, A. Sato, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Nanogel antigen delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. Baltimore, USA (2010)

6. D. Tokuhara, Y. Yuki, T. Nochi, T. Kodama, M. Mejima, S. Kurokawa, Y. Takahashi, M. Nanno, F. Takaiwa, T. Honda, H. Kiyono 6. Secretory IgA responses induced by rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine are solely responsible for antibody-mediated long-standing cross-protection against Vibrio cholerae- and enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrhea. Baltimore, USA (2010)

7. Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, N. Kataoka, IG. Kong, A. Sato, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Exploit of Novel Delivery System with Nanogel for Development of Adjuvant-Free Nasal Vaccine. International conference of Immunology, Kobe. Japan (2010)

8. Y. Yuki: Exploit of Nanogel-based Delivery System for Adjuvant-free Intranasal Vaccines. 8th Annual Vaccines: All Things Considered Conference, Washington, DC USA (2010) 招待講演

9. 幸 義和、徳原大介、野地 智法、児玉年央、目島未央、黒河志保、高橋裕子、南野昌信、本田 武司、清野 宏 米型コレラ毒素B鎖ワクチンは分泌型 I g Aを誘導することでコレラ菌による下痢を長期間防御する。日本細菌学会 横浜(2010)

10. 幸 義和、野地智法、秋吉一成、清野宏：アジュバント不要ナノゲル型経鼻ワクチンの開発。日本ワクチン学会 東京 (2010)

11. Y. Yuki, T. Nochi, N. Harada, Y. Katakai, H. Shibata, M. Mejima, T. Kohda, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, F. Ono, S. kazaki, K. Terao, H. Tsukada, H. Kiyono: In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine. 3rd World Congress of Vaccine. Beijing, China (2011).

12. N. Takayama, D. Tokuhara, T. Nochi, K. Oroku, S. Nagai, A. Chubachi, K. Tuchiya, Y. Yuki & H. Kiyono: Rice-based oral vaccine of cholera toxin B subunit for the protection of enterotoxigenic Escherichia coli infection in pigs. 3rd World Congress of Vaccine. Beijing, China (2011).

13. Y. Yuki, T. Nochi, N. Harada, Y. Katakai, M. Mejima, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Shibata, T. Kohda, S. Kozaki, H. Tsukada, & H. Kiyono : In vivo molecular imaging for a nasal botulism vaccine in mice and nonhuman primates. The American Association of Immunologists (AAI) San Francisco, USA (2011)

14. D. Tokuhara, B. Gonzalez, M. Mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, M. Kuroda, M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Nochi,

F. Aladin, H. Marcotte, L. Frenken, M. Iturriza, H. Kiyono, L. Hammarstrom, & Y. Yuki : Passive oral rice-based antibody prophylaxis and therapy against rotavirus infection. The American Association of Immunologists (AAI) San Francisco, USA (2011)

15. IG. Kong, Y. Yuki, A. Sato-Kimura, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, D. Tokuhara, K. Okada, S. Sato, D. Briles, K. Akiyoshi & H. Kiyono: Nanogel based adjuvant-free Pneumococcal nasal vaccine induces protective immunity against Pneumococcus. International congress of Mucosal Immunology (ICMI) Paris, France (2011)

16. N. Takeyama, D. Tokuhara, K. Oroku, M. Mijima, S. Kurokawa, Y. Takahashi, M. Kuroda, T. Hiroiwa, YG, Chen, A. Chubachi, T. Nochi, T. Masumura, K. Tanaka, T. Kodama, S. Nagai, T. Nunoya, H. Kiyono & Y. Yuki. Oral rice-based vaccine induced active and passive immunity against E. coli-mediated diarrhea in pigs. International congress of Mucosal Immunology (ICMI) Paris, France (2011)

17. Y. Yuki, M. Mejima, M. Kuroda, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, IG kong, Y. Takahashi, YG, Chen, T. Nochi, D. Tokuhara, T. Kohda, S. Kozaki & H. Kiyono. An efficient rice-based expression system producing nasally immunogenic non-toxic subunit fragment of Clostridium Botulinum type-A neurotoxin. International congress of Mucosal Immunology (ICMI) Paris, France (2011)

18. GS. Pontes, T. Nochi, H. Nakamura-Adachi, Y. Kurashima, J. Kunisawa, Y. Yuki & H. Kiyono: Indispensableness of vaccine-delivery to Peyer's patch and villous M cells for the induction of antigen-specific immune response. International congress of Mucosal Immunology (ICMI) Paris, France (2011)

19. Y. Yuki, T. Nochi, N. Harada, Y. Katakai, H. Tsukada, & H. Kiyono. In vivo molecular imaging for a nasal botulism vaccine in mice and nonhuman primates. Vaccine and ISV Annual Global Congress, Seattle, USA (2011)

20. Y. Yuki, D. Tokuhara, B. A. Gonzalez, H. Marcotte, L. Frenken, M. Iturriza, H. Kiyono, L. Hammarstrom. Rice-based oral antibody prophylaxis and therapy against rotavirus infection 日本免疫学会 千葉 (2011)

21. 幸 義和、清野 宏：経鼻ワクチンの安全性：マウスおよびサルに経鼻投与されたワクチンのリアルタイム分子イメージング。日本ワクチン学会 東京 (2011)

〔図書〕(計 2件)

幸 義和：ワクチンのDDS技術の開発動向—経鼻投与技術動向— 「ワクチンの市場動向と開発・製造実務集」(技術情報協会) 334-347(2012)

幸 義和：ワクチンのDDS技術の開発動向—経口投与技術動向— 「ワクチンの市場動向と開発・製造実務集」(技術情報協会) 338-360(2012)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：ナノ抗体を発現するトランスジェニックイネ

発明者：幸 義和、徳原大介、清野 宏

権利者：東京大学TLO

種類：特許

番号：特願 2010-162630

出願年月日：2010/7/20

国内外の別：日本

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者：幸 義和(Yoshikazu Yuki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60345030

(2)研究分担者：なし

研究者番号：

(3)連携研究者：なし

研究者番号：