

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659067

研究課題名（和文）植物工場での抗体医薬生産に適したレタスによる分泌型 IgA 植物抗体の発現

研究課題名（英文）Expression of secretory immunoglobulin A in lettuce suitable for the production of therapeutic antibodies in plant factory.

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

研究成果の概要（和文）：近年、分子標的薬の一つとして抗体医薬が広く使われるようになってきたが、生産コストが課題である。そこで、生産コストが低く、環境への影響が少ない植物工場で栽培可能な葉野菜であるレタスでの抗体遺伝子の発現をめざした。腸管出血性大腸菌のベロ毒素に特異的な組換え型 IgA 抗体遺伝子を作製し、モデル植物のシロイヌナズナおよびレタスで発現した。植物抗体によるベロ毒素中和活性を、試験管内で明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Therapeutic antibodies are widely used as molecular-targeted drugs in these days. However, they have limitations due to the high cost and limited scalability of production. To aim at the lower cost production of antibodies, we tried to express antibody genes in lettuce, which can be cultivated in greenhouse that is useful to avoid environmental impact. We prepared cDNA of recombinant IgA specific for Shiga toxin 1 produced by Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. We constructed transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa* expressing Stx-1-specific IgA. The expression of IgA and its toxin neutralization activity were demonstrated *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：粘膜免疫、抗体医薬、免疫グロブリン A、植物発現系

1. 研究開始当初の背景

多くの病原体は粘膜表面から侵入する。粘膜表面からの病原体の侵入を阻止する役割を持つ免疫グロブリン A (IgA) を用いた受動免疫の研究は、ワクチンをもちいて IgA を誘導する研究と比べて盛んではない。近年、抗体医薬がバイオ医薬品としての地位を占めるに至ったが、IgA の抗体医薬の研究はほとんどなされていない。

ほとんどが IgG クラスである抗体医薬は、モノクローナル抗体の遺伝子をもとに培養

細胞を用いて工場生産されている。生産設備に対する高額な設備投資が必要であり、さらに急な要請にこたえて生産量を増加させることが困難である。また、動物細胞を用いるため、未知のウイルスの混入を製造工程において防ぎきれぬのかという現実的な課題も残されている。

研究代表者は、腸管出血性大腸菌 O157:H7 が産生するベロ毒素の糖鎖結合サブユニット (Stx1B) に対する IgA および IgG モノクローナル抗体を作製してきた (Imai Y., *et al.*, J.

Immunol. Methods **302**, 125–135, 2005; Tanikawa T., Imai Y., *et al.*, *Scand. J. Immunol.* **68**, 414–422)。また、それらの抗体の cDNA をクローニングし、動物細胞での発現に成功してきた。

2. 研究の目的

省エネルギーおよび環境に適応した抗体医薬あるいは機能性食品の生産方法への挑戦として、葉野菜を用いた IgA 抗体の生産をめざす。すでに得ているペロ毒素 B サブユニット (Stx1B) に対する組換え型抗体をモデル植物および葉野菜であるレタスで発現させ、生物活性を保った植物抗体の作製を目的とする。さらに組換え型抗体の特質を生かし、インフルエンザウイルス特異的な組換え型 IgA 抗体をあらたに作製し、動物細胞で発現させて生物活性を評価し、組換え型 IgA 作製戦略の汎用性を確かめることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗体遺伝子の取得と組換え型抗体遺伝子の作製：マウスハイブリドーマから mRNA を調製して 5'-RACE PCR 法で H 鎖、L 鎖および J 鎖 (IgA 産生ハイブリドーマ由来) の全長 cDNA を取得した。組換え型ハイブリッド H 鎖の作製は、組換え PCR 法によって実施した。動物細胞の COS-1 細胞および CHO 細胞で抗体遺伝子を発現し、培養上清中に分泌される抗体の活性を確認した。

(2) 抗体の性状解析：RT-PCR、サンドイッチ ELISA およびイムノブロットによって組換え型抗体の発現を確認した。

(3) 組換え型抗体の活性測定：ペロ毒 (Stx1) に対する抗体の結合は、糖鎖結合サブユニットの Stx1B を固相化し、ELISA によって抗体の結合を評価した。また、Gb₃ 糖鎖を有する細胞への標識 Stx1B の結合を抗体が阻止する活性を評価した。細胞毒性に対する評価は、ペロ細胞またはバーキットリンパ腫細胞に対する Stx1 の毒性を抗体が中和かどうかを評価した。さらに、ペロ毒素によるこれらの細胞に対するアポトーシスの誘導を調べた。インフルエンザウイルスに対する抗体の活性は、ウイルス粒子やウイルスヘマグルチニン (HA) への抗体の結合を ELISA にて、MDCK 細胞へのウイルス感染の阻害によって抗体のウイルス中和活性を評価した。

(4) 抗体遺伝子の植物での発現のためのベクターの構築：ハイブリッド IgA の H 鎖、L 鎖、J 鎖を複数のプロモーターの支配下で発現するように配置し、一つのバイナリーベクター pBCH1 に組み込んだ。

(5) モデル植物シロイヌナズナでの抗体遺伝子の発現：上記バイナリーベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) の GV3101 株に導入して形質転換体を得た。花序浸し法によってシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に遺伝子導入を行なった。種子を培地上で発芽させ、ハイグロマイシンで組換え体を選抜した。その後、植物体を培養土にて育成した。植物から葉を採取し、抽出した DNA を用いて抗体遺伝子の組み込みを PCR 法にて、抗体遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認した。抗体タンパク質の発現は、葉の抽出液を作製して、ELISA とイムノブロットにて確認した。

(6) レタスでの抗体遺伝子の発現：抗体遺伝子を保有した上記アグロバクテリウムの形質転換体をリーフレタス (*Lactuca sativa*) の子葉に感染させ、培地を用いてカルス培養を行い、カナマイシンで組換え体を選抜した。培地上でシュートの形成および発根を行なった後、培養土にて育成した。

植物体の生育は、物理的封じ込めレベル P1P の温室において実施した。

4. 研究成果

(1) ペロ毒素特異的ハイブリッド IgA 抗体遺伝子の取得と性状の確認

我々がすでに樹立したペロ毒素の糖鎖結合サブユニットである Stx1B に特異的なマウス IgA 抗体 (G2G7) および IgG 抗体 (D11C6) の H 鎖および L 鎖の cDNA をクローニングした。IgG 抗体 H 鎖の変異部を IgA 抗体の定常部に連結し、ハイブリッド IgA の H 鎖を作製した。また、J 鎖の cDNA を G2G7 より獲得した。ハイブリッド IgA の H 鎖、IgG 由来の L 鎖、J 鎖 cDNA をそれぞれ発現ベクターにサブクローニングして、COS-1 細胞にて一過性に発現させた。2 量体ハイブリッド IgA の産生を SDS-PAGE およびイムノブロットで確認し、Stx1B への結合活性を ELISA で確認した。さらに、2 量体ハイブリッド IgA は、Gb₃ 陽性のバーキットリンパ腫細胞 Ramos への Stx1B の結合を阻害した (Tobisawa *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, **76**, 574-584, 2011)。

(2) モデル植物における 2 量体ハイブリッド IgA の作製

ペロ毒素特異的ハイブリッド IgA の H 鎖、IgG 由来の L 鎖、および J 鎖の cDNA を一つのバイナリーベクターに組み込み、組換え型シロイヌナズナを作製した。葉を採取し、抗体の H 鎖、L 鎖、J 鎖の遺伝子がシロイヌナズナのゲノムへの組み込まれていることを PCR 法で確認した。また、抗体の mRNA の

転写を RT-PCR 法で確認した。葉を凍結し粉砕した後、タンパク質を含む抽出液を作製して、抽出液中に含まれる抗体タンパク質をサンドイッチ ELISA 法で検出した。マウスミエローマ由来の IgA である TEPC 15 を標準として、IgA 抗体濃度を測定した。また、SDS-PAGE およびイムノブロット法によって、2 量体 IgA の構築を認めた。さらに、固相化 Stx1B に葉の抽出液を反応させ、抗 IgA 抗体を用いた ELISA により植物由来の IgA が Stx1B に結合活性を保持していることを明らかにした。

(3) 植物抗体による中和活性

トランスジェニックシロイヌナズナの葉の抽出液は、Stx1 に感受性のある Vero 細胞に対して、ペロ毒素による細胞毒性を抑制した。対照として用いた、野生型シロイヌナズナの葉の抽出液や、抗原特異性が異なるマウス IgA の TEPC 15 には抑制活性がなかった。また、Vero 細胞および Ramos 細胞に対するペロ毒素によるアポトーシス誘導は、トランスジェニックシロイヌナズナの葉の抽出液によって抑えられた。

(4) リーフレタスにおけるハイブリッド IgA 抗体の発現と活性の検出

シロイヌナズナで植物抗体の発現に成功したものと同一のバイナリーベクターを、アグロバクテリウム法にてリーフレタスの子葉に導入した。形質転換体を選抜した後、植物体に育成した。レタスの葉から DNA を抽出し、PCR 法にて抗体の H 鎖、L 鎖、J 鎖のレタスゲノムへの組み込みを確認した。さらにサンドイッチ ELISA により、葉の抽出液中に IgA 抗体を検出できた。Stx1B を固相化した ELISA によって、抗体の結合活性を認めた。さらに、SDS-PAGE および抗 IgA を用いたイムノブロット法によって、IgA 抗体に対応するバンドを検出することができた。

(5) インフルエンザウイルス特異的組み換え型 IgA 抗体の作製

組換え型抗体の特質を生かし、応用としてインフルエンザウイルス特異的な組換え型 IgA 抗体の作製を行なった。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)に結合する IgG 抗体 (H3 特異性) を産生するマウスハイブリドーマ 2E10 (静岡県立大学薬学部生化学教室 鈴木隆教授より恵与) から H 鎖可変部および L 鎖の全長の cDNA を採取した。H 鎖の可変部は 2E10 の H 鎖可変部と、IgA ハイブリドーマである G2G7 の H 鎖定常部 cDNA とを組換え PCR 法にて連結し、ハイブリッド IgA の H 鎖とした。この H 鎖、2E10 由来の L 鎖、G2G7 由来の J 鎖を、発現ベクター pcDNA3.1 を用いて CHO 細胞に同時に

導入し、薬剤選択によって 2 量体 IgA を発現する細胞を選択し、限界希釈法によってクローニングした。培養上清から、2 量体ハイブリッド IgA をイムノブロットにより検出した。ELISA プレートに固定した A 型インフルエンザウイルス A/Memphis/1/71 (H3N2) に培養上清を反応させ、抗 IgA 抗体を用いて抗体の結合活性を検出した。さらに、インフルエンザウイルスと培養上清をあらかじめ反応させておくと、MDCK 細胞へのウイルス感染が抗体の濃度依存的に抑制された。また、抗体が HA に特異的であることは、HA を強制発現させた HEK293T 細胞に培養上清を反応させ、抗 IgA 抗体を用いて示した。

(6) 国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展開

植物による抗体医薬の生産は、生産コストを低下させる目的で注目されている。とくに、諸外国においては、「Plant-based vaccines, antibodies & biologics」という標題のシンポジウムが隔年で開催されており、多くの企業が製品化に向けて関心の高い領域となっている。

一方、遺伝子組換え植物の研究は、ここ 30 年来盛んに行なわれており、主に企業が主導してきた。しかし、製品化の段階で、消費者の支持獲得に高いハードルがあり、研究の出発時点に予想されたほどには、実用化に限界があるのが現状である。植物由来以外のタンパク質を発現して実用化する研究は、とくに社会的受容性のハードルが高い。実際、遺伝子組換え植物の主な応用は、除草剤に対する耐性、害虫に対する抵抗性、植物由来の成分含量を高めることに現時点ではほぼ限られている。社会的受容性を高めるためには、製品化をめざした企業研究にかぎるのではなく、中立的な大学等の研究機関の参画が重要であるとの指摘もなされている (*Nature* **497**, 5-6, 2013)。

基礎研究においても、植物抗体はモノクローナル抗体の効果を探索するうえで、有用なツールとなりうる。細胞培養と比較して製造コストが低いため、動物実験など抗体が比較的多量に必要な実験に利用価値がある。引き続きペロ毒素に対するハイブリッド IgA を進化させ、分泌型のハイブリッド IgA (H 鎖、L 鎖、J 鎖とともに分泌片が結合している) の作製をシロイヌナズナおよびレタスを用いて行なっている。分泌型植物抗体を動物に経口投与することで、その効果を生体内で判定することをめざす。

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) Yuki Tobisawa, Takashi Maruyama, Takashi Tanikawa, Katsuhiko Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Establishment of recombinant hybrid-IgG/IgA immunoglobulin specific for Shiga toxin. *Scand. J. Immunol.*, **76**, 574-584 (2011) 査読有
DOI:10.1111/j.1365-3083.2011.02617.x

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) 庄司健太郎、黒羽子孝太、今井康之 他：インフルエンザウイルスヘマグルチニン特異的分泌型 IgA 抗体の作製と解析 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13 日、福岡
- (2) 中西勝宏、黒羽子孝太、今井康之：Neutralization activity of hybrid-IgA plantibody against Shiga toxin 1. 第 41 回日本免疫学会 2012 年 12 月 7 日、神戸
- (3) 松岡毅、黒羽子孝太、今井康之：Development of Shiga toxin-specific Hybrid IgA applicable to *in vivo*. The 5th International Conference on Health and Longevity Sciences 2012 年 11 月 16 日、静岡
- (4) 今井康之：Production of Shiga toxin-specific recombinant immunoglobulin A in plants. The 1st International Conference on Pharma and Food 2012 年 11 月 15 日、静岡
- (5) 庄司健太郎、黒羽子孝太、今井康之 他：*In vitro* における効率的な抗インフルエンザウイルス分泌型 IgA 抗体の作製 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 15 日、大阪
- (6) 永野恭子、黒羽子孝太、今井康之 他：ペロ毒素に対する二量体 hybrid IgA 抗体によるアポトーシス抑制効果 第 58 回日本薬学会東海支部総会・大会 2012 年 7 月 7 日、静岡
- (7) 庄司健太郎、黒羽子孝太、今井康之 他：Inhibition of influenza A virus infection to MDCK cells by recombinant IgA specific to hemagglutinin. The 20th International Symposium on Macrophage Molecular and Cell Biology 2012 2012 年 6 月 15 日、東京
- (8) 庄司健太郎、黒羽子孝太、今井康之 他：インフルエンザウイルス HA 特異的組換え型 IgA 抗体による細胞への感染阻害効果 日本薬学会 132 年会 2012 年 3 月 30 日、札幌
- (9) 中西勝宏、丹羽康夫、小林裕和、黒羽子孝太、今井康之 他：植物を用いたペロ毒素に対するハイブリッド IgA 抗体の発現と性状解析 日本薬学会 132 年会

2012 年 3 月 30 日、札幌

- (10) 松岡毅、黒羽子孝太、今井康之：タグ標識 J 鎖を有するシガ毒素特異的 Hybrid IgA 抗体の発現と精製 日本薬学会 132 年会 2012 年 3 月 29 日、札幌
- (11) 市川史織、中西勝宏、丹羽康夫、小林裕和、黒羽子孝太、今井康之：IgA 由来 J 鎖の植物による発現 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 2011 2011 年 11 月 23 日、名古屋
- (12) 松岡毅、黒羽子孝太、今井康之：タグ標識 J 鎖を有する Hybrid IgA 抗体の発現 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 2011 2011 年 11 月 23 日、名古屋
- (13) 庄司健太郎、黒羽子孝太、今井康之 他：Influenza A 型ウイルス HA 特異的組み換え型 IgA 抗体の発現と解析 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 2011 2011 年 11 月 23 日、名古屋
- (14) 中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之：Assembly of dimeric IgA with secretory component expressed in plant system. The 19th International Symposium on Macrophage Molecular and Cell Biology 2011 2011 年 5 月 25 日、大阪

〔その他〕

ホームページ等

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

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・助教
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

(4) 連携研究者

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