

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24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760753

研究課題名（和文） トランスジェニック鳥類作製技術を用いた TGF β 含有卵によるアレルギー治療法の開発

研究課題名（英文） Development of oral immunotherapy for allergies using TGF-beta-containing egg white derived from transgenic avian

研究代表者

河邊 佳典（KAWABE YOSHINORI）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：30448401

研究成果の概要（和文）：本研究では、スギ花粉アレルゲンエピトープならびにアレルギー抑制性サイトカイン TGF- β を遺伝子導入ニワトリに生産させ、目的タンパク質含有卵白を用いた経口摂取によるアレルギー治療法の開発を目指し、以下の結果を得た。1. cLys-7crp 含有卵白を用いた経口摂取では、花粉症モデルマウスにおける花粉症症状の軽減を、くしゃみ回数、血清中 IgE 量ならびに炎症細胞の肺への浸潤度を評価することで、証明した。2. MHC-Crp を遺伝子導入ニワトリで生産させ、マウスでの効能評価を行った。3. TGF- β 遺伝子導入ニワトリを、卵管特異的発現システムを用いることで作製することができた。

研究成果の概要（英文）：Here, we attempted to generate genetically manipulated chickens producing human T-cell epitopes derived from Japanese cedar pollen and anti-allergic cytokine, TGF- β in order to develop a treatment for pollen allergy by inducing oral tolerance. The number of sneezing and the allergen-specific IgE level were significantly decreased in allergic mice fed with T-cell epitope-containing egg white. GM chickens harboring TGF- β gene were generated using oviduct-specific expression system. GM chicken model will extend the usage of therapeutic proteins in eggs, which may serve as edible pharmaceuticals for allergy immunotherapy based on oral tolerance.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能 バイオプロセス

キーワード：遺伝子導入ニワトリ、アレルギー治療、スギ花粉症、腸管免疫寛容、アレルギー抑制性サイトカイン、エピトープペプチド、経口ワクチン

1. 研究開始当初の背景

花粉症をはじめとするアレルギー症状に悩む患者は、国民の約3割となっており、その患者数は年々増加の一途をたどっている。現在アレルギー疾患に対する治療法は、抗ヒスタミン剤などの投与による対処療法が主であるため、ほとんどの場合再発を余儀なくされており、根本的な治療法の開発が切望されている。アレルギーの根本的治療法としては、

アレルゲン由来のT細胞エピトープペプチドを用いた減感作療法に基づくペプチド免疫療法が提案されている。減感作療法では、血中投与による全身免疫を活性化させる方法と、経口・舌下投与による腸管粘膜系を活性化させ免疫寛容を引き起こす方法があげられる。その中で、簡便で注射による苦痛がなく、副作用の危険性も低い経口投与方法が注目されている。

我々はこれまでに、遺伝子導入法としてレトロウイルスベクターを用いてトランスジェニック鳥類を作製する技術開発を行ってきた。組換え抗体やヒトエリスロポイエチン等、様々な組換えタンパク質を遺伝子導入鳥類の血清中や卵中に生産させることに成功している。このような中で、スギ花粉症治療のためにスギ花粉アレルゲンT細胞エピトープペプチドを、生産する遺伝子導入ニワトリの作製を行っていた。これまでの検討結果から、このニワトリの卵中に目的タンパク質を生産していることを確認していた。そこで、マウスへスギ花粉抽出物の皮下投与を繰り返した結果、スギ花粉症モデルマウスを作製することができ、モデルマウスにエピトープペプチド含有卵を経口投与したところ、花粉症緩和への一定の効果が得られることがわかった。

一方で、最近、経口免疫寛容の成立に、免疫抑制性サイトカインTGF- β とそれによって分化誘導されるCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞が重要であることが報告された (von Boehmer et al., *J Exp Med* 204:1737-9 [2007])。これは、アレルゲンの一部が腸管粘膜に存在している樹状細胞に取り込まれた後、TGF- β の作用を介して制御性T細胞の分化を誘導し、免疫反応の抑制が起きたためと考えられる。また、母乳中アレルゲンとTGF- β を同時に摂取することにより、制御性T細胞が誘導され、経口免疫寛容が誘導されることがわかってきた (Verhasselt et al., *Nat Med* 14:170-80 [2008])。マウス実験系において、TGF- β を経口摂取した場合、血中のTGF- β 濃度が上昇後、腸管細胞におけるSmadが活性化されることで、アレルゲン特異的IgEレベルが減少し、T細胞の再活性化が減少することも報告された (Ando et al., *J Allergy Clin Immunol* 120:916-23 [2007])。これらの結果は、アレルゲンとTGF- β の経口投与を組み合わせることで、腸管免疫系が活性化され、アレルギーの発症が抑制できることを示しており、乳幼児や成人の摂取する飲食物にTGF- β を加えることで、アレルギーが予防できることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これまで開発が進んでいた遺伝子導入ニワトリが産卵したエピトープペプチド含有卵白を、スギ花粉アレルギーモデルマウスに投与した際での、マウスの詳細な解析を行うとともに、免疫抑制性サイトカインTGF- β を卵中に大量生産させ、アレルゲンエピトープペプチド含有卵と同時に経口摂取することで、腸管免疫系への作用を増強させ、効果的に経口免疫寛容誘導できるアレルギー治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

スギ花粉症のエピトープペプチドの発現形態として、ニワトリリゾチームとの融合タンパク質としたcLys-7crp遺伝子導入ニワトリ、ならびに主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の α 鎖および β 鎖へ結合させたMHC-Crp遺伝子導入ニワトリは、これまでに報告した方法で作製した (Kamihira et al., *J Virol* 79:10864-74 [2005])。これらの遺伝子は、ニワトリの全身で発現するニワトリ β -アクチンプロモーターの制御下で発現可能なユニットとして組込まれている。遺伝子導入ニワトリでの目的遺伝子の導入の有無は、PCR法で、目的遺伝子の発現は、RT-PCR法、ELISA法またはウエスタンブロット法で解析した。

cLys-7crpを生産する遺伝子導入ニワトリ(#L7406)が産卵した卵白を用いて、スギ花粉症の予防および治療効果を評価した。マウスへ経口ゾンドを用いてL7含有卵白を2~4週間投与した。次に、皮下へスギ花粉抗原抽出物を投与し感作させた後、5日間連続で同抽出物を経鼻投与した。花粉症症状の評価としては、経鼻投与後のくしゃみおよびくしゃみに伴う動作回数を測定することで行った。なお、コントロール群としては、野生型ニワトリ卵白を食餌させた。一方、治療実験としては、まずマウスへスギ花粉抗原抽出物を皮下投与した後、同抽出物を鼻腔投与することで花粉症モデルマウスを作製した。モデルマウス作製は、くしゃみ回数測定およびELISA法による血中のアレルゲン特異的IgE量により評価した。モデルマウスに対して、cLys-7crp含有卵白をマウスへ投与した後、同抽出物を経鼻投与した。この投与を繰り返しながら、各経鼻投与後のくしゃみ回数を同様に測定した。また、得られたマウス血清中の全IgE量および抗原(Cryj1)特異的IgE量をELISA法により測定した。肺における炎症度を評価するために、薄切切片を作製後、HE染色ならびにPAS染色を行った。

MHC-Crp遺伝子導入ニワトリ由来の卵白を用いた効能評価実験(予防ならびに治療実験)においても、cLys-7crp含有卵白とほぼ同様に行った。

一方、TGF- β は、マウス胚性繊維芽細胞(MEF)よりRT-PCR法により遺伝子を取得した。同遺伝子は、当研究室で開発された卵管特異的遺伝子発現システム(第64回日本生物工学会[2012]等で発表)を用いることで、遺伝子導入ニワトリを作出した。

4. 研究成果

4.1. cLys-7crp含有卵白を経口投与した花粉症モデルマウスでの解析

はじめに、cLys-7crp含有卵白および野生型卵

白をマウスに経口投与した。スギ花粉症抽出物を皮下投与することで感作した後、経鼻投与したところ、cLys-7crp 含有卵を投与した群において、くしゃみ回数の減少が認められた。この結果から、cLys-7crp 含有卵をあらかじめ経口摂取することで、スギ花粉症の予防ができることがわかった。

次に、花粉症モデルマウスを用いた治療効果の評価を行った。通常のニワトリが産卵した卵白を経口投与したコントロールマウス群では、くしゃみ回数に変化が観察されなかった。一方で、あらかじめ花粉症症状にさせたモデルマウスへ、遺伝子導入ニワトリ由来の cLys-7crp 含有卵白を経口投与したマウス群では、経口投与を行う前と比較してくしゃみ回数の減少がみられた。そのため、「経口投与と花粉抗原の経鼻暴露」のタームをさらに繰り返し評価したところ、くしゃみ回数の有意な減少がみられ、マウス個体によっては、平常時のくしゃみ回数まで減少したのもみられた。

そこで、経口投与したマウスより採血した血清中の全 IgE 量ならびにアレルギー (Cry j 1) 特異的 IgE 量を測定した。通常の卵白を投与したマウス群では、卵白経口投与回数を増やしたときも、花粉症モデルマウス作製時のレベルと変化がみられなかった。一方、cLys-7crp 含有卵白を投与したマウス群では、治療タームをふやすにつれて、有意に減少した個体が評価したマウス 7 匹中 5 匹においてみられた。中でも有意に減少した 3 匹においてアレルギー特異的 IgE 量を測定したところ、未刺激のマウスと同程度となっていることがわかった (図 1)。

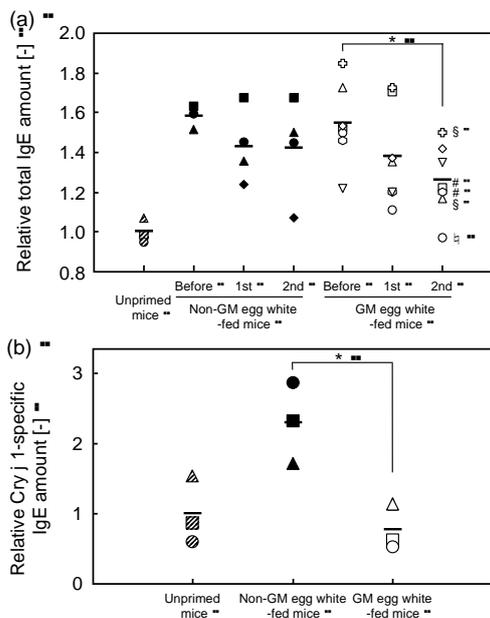


図 1. cLys-7crp 含有卵白経口投与による全 IgE 量 (a)および抗原特異的 IgE 量 (b)

最後に、肺における炎症細胞の浸潤度を評価したところ、くしゃみ回数ならびに IgE 量と相関して、cLys-7crp 含有卵白投与群では、炎症度の軽減がみられた。これらのことから、cLys-7crp 含有卵白を経口投与することで免疫寛容が誘導され、スギ花粉アレルギーに対する減感作が起きたと考えられる。

4.2. MHC-Crp 遺伝子導入ニワトリの解析および同ニワトリ由来卵白の効能評価

これまでで作製していた遺伝子導入ニワトリにおける目的遺伝子導入ならびに発現解析を行った。

各ニワトリ個体の血液細胞よりゲノム DNA を抽出し、ゲノム PCR を行ったところ、すべての個体から導入遺伝子が検出できた。性成熟後産卵を開始したメンドリから卵を回収し、卵中での目的タンパク質の発現を ELISA 法により測定したところ、卵白中で 0.25-0.89 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で生産していることがわかった (図 2)。また飼育期間中安定して発現できていることも確認できた。また、ウェスタンブロット法での解析結果から、還元・非還元条件どちらにおいても適切な分子量でバンドを検出することができた。

次に、含有卵白の効能をマウスを用いて評価した。マウスにあらかじめ (予防的に) 卵白を投与しておいた後、花粉アレルギーを皮下ならびに経鼻暴露した場合には、MHC-Crp 含有卵白を投与したマウス群において、くしゃみ回数の抑制が観察された。また、すでに花粉症状となったモデルマウスへ経口食餌させた場合でも、くしゃみ回数を軽減させることができた (図 3)。

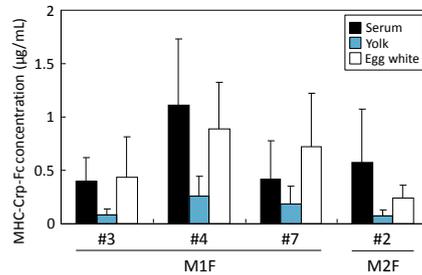


図 2. 遺伝子導入ニワトリによる目的タンパク質の生産性

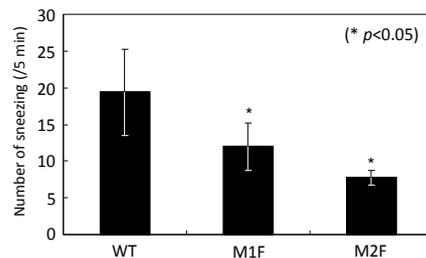


図 3. マウスのくしゃみ回数測定結果

4.3. TGF-β遺伝子導入ニワトリの作製

マウス TGF-β遺伝子を、MEF から RT-PCR 法により取得し、遺伝子配列解析を行い目的の配列であることを確認した。次に、TGF-β 遺伝子を、ニワトリの全身で発現するβ-アクチンプロモーターで発現制御させるユニットとして、レトロウイルスベクター生産用プラスミドに組み入れた。ウイルス生産用細胞 (293FT) にウイルス構成タンパク質をコードするプラスミドとともに一過性で遺伝子導入することで、レトロウイルスベクターを生産させた。超遠心で濃縮後、適切な発現ステージのニワトリ胚へウイルス溶液を微量注入し、胚培養後人工孵化させた。しかし、平均孵化率は約 5% であり、孵化した個体においても、その後死亡が確認された。これは、TGF-β を全身で発現させることで、ニワトリの生理に影響がでたものと考えた。そこで、卵白タンパク質を生産する組織である卵管特異的に TGF-β を発現する遺伝子導入ニワトリの作製を試みた。我々は、主要卵白タンパク質の最小プロモーター領域を Tet システムと組み合わせ、転写活性化タンパク質 (tTA) のポジティブフィードバックを働かせることで、卵管特異的に目的タンパク質を高発現させるための合成プロモーターシステムを開発している。卵管特異的 TGF-β 発現レトロウイルスベクターを作製し、ニワトリ胚体に注入したところ、孵化率が約 6 倍上昇し、ニワトリ個体を取得することができた (表 1)。孵化した個体のゲノムを解析することによって、導入遺伝子の存在を確認した。

表 1 TGF-β遺伝子導入ニワトリのふ化率

	実験回数	ウイルス力価	導入数	ふ化数
全身型	1	3.6×10 ⁹	18	0
	2	1.8×10 ⁹	20	2
卵管特異型	1	0.6×10 ⁹	17	4
	2	2.3×10 ⁹	30	11

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. Kawabe Y, Hayashida Y, Numata K, Harada S, Hayashida Y, Ito A, Kamihira M (2012) Oral immunotherapy for pollen allergy using T-cell epitope-containing egg white derived from genetically manipulated chickens. PLoS ONE 7: e48512 doi: 10.1371/journal.pone.0048512

[学会発表] (計 9 件)

1. 原田 翔太, 林田 悠希, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道 遺伝子導入ニワトリによるスキ・花粉症治療薬含有卵白の生産 第 48 回化学関連支部合同九州大会 2011 年 7 月 9 日、北九州 (北九州国際会議場) 6_8.068
2. 河邊 佳典, 林田 悠希, 原田 翔太, 井藤 彰, 上平 正道 遺伝子導入ニワトリ由来エピトープペプチド含有卵を用いたスギ花粉症治療の評価 日本動物細胞工学会 2011 年度大会 2011 年 7 月 22 日~23 日、東京 (東京大学) P011
3. 原田 翔太, 林田 悠希, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道 エピトープペプチド含有卵白の経口投与によるスギ花粉症治療への応用 第 63 回日本生物工学会 2011 年 9 月 26 日~28 日、東京 (東京農工大学) 1Gp20
4. 林田 悠希, 原田 翔太, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道 スギ花粉アレルゲン T 細胞エピトープ含有卵白の経口投与による花粉症治療に関する研究 第 18 回日本生物工学会九州支部福岡大会 2011 年 12 月 10 日、福岡 (九州大学) B-21
5. 河邊 佳典, 林田 悠希, 原田 翔太, 井藤 彰, 上平 正道 遺伝子導入ニワトリが生産したエピトープペプチド含有卵白によるスギ花粉症治療 第 77 回化学工学会 2012 年 3 月 14 日~17 日、東京 (工学院大学) A121
6. 奥園 健太, 林田 悠希, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉アレルゲンエピトープ融合タンパク質の生産 第 49 回化学関連支部合同九州大会 2012 年 6 月 30 日、北九州国際会議場 4_8.018
7. 河邊 佳典, 林田 悠希, 沼田 健作, 原田 翔太, 林田 義文, 井藤 彰, 上平 正道 遺伝子導入ニワトリによるエピトープ含有タンパク質生産とスギ花粉症治療への応用 生物学若手研究者の集い 夏のセミナー 2012 2012 年 6 月 30 日~7 月 1 日、宮城県岩沼市 P-6
8. 河邊 佳典, 奥園 健太, 林田 悠希, 井藤 彰, 上平 正道 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉アレルゲンエピトープ含有 MHC タンパク質の生産 化学工学会 第 78 年会 2013 年 3 月 17 日~3 月 19 日 (3 月 19 日) 大阪大学 K309

9. 上平 正道, 河邊 佳典, 林田 悠希, 沼田 健作, 原田 翔太, 井藤 彰 遺伝子導入ニワトリが生産したエビトープ含有卵白の経口摂取による花粉症治療 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 24 日～3 月 28 日 (3 月 26 日) 東北大学 3A11a05

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河邊 佳典 (KAWABE YOSHINORI)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：30448401

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし