

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659203

研究課題名(和文) 常温備蓄型経口インフルエンザワクチンの開発基盤研究

研究課題名(英文) New attempt of cold-chain free oral influenza vaccine development

研究代表者

幸 義和 (YUKI, Yoshikazu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60345030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コメにワクチン抗原を発現するシステムは常温長期保存が出来、したがって備蓄型経口ワクチンが開発可能である。インフルエンザウイルスのHA-1抗原に粘膜免疫モジュレーターであるコレラ毒素B鎖(CTB)を結合したワクチンを米に発現させたコメ型インフルエンザワクチンを作成した。作成したワクチンをマウスで皮下または経口免疫で全身系と粘膜面での免疫誘導効果を検討した。皮下免疫ではCTB及びHA特異的IgG抗体が誘導できた。しかし経口免疫ではCTB特異的全身系及び粘膜系抗体は誘導できたが、HA特異的抗体は誘導できなかった。今後、HA抗原での全身系免疫のあとで、コメ型ワクチンを経口免疫する方法も検討する。

研究成果の概要(英文)：By using a T-DNA vector driven by a prolamins promoter and an overexpression vaccine cassette with RNAi, we have established MucoRice-CTB-HA1 intended as a cold-chain free oral influenza vaccine. To investigate the immunogenicity of MucoRice-CTB-HA1, we subcutaneously or orally immunized mice. Although subcutaneous immunization induced CTB- and HA-specific IgG immune responses, oral immunization induced CTB-specific IgG and mucosal IgA immune responses but not HA-specific one. We now consider to improve the immunization system by using subcutaneous followed by oral immunization to induce systemic and mucosal HA-specific Ab immune responses.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

現行の日本の季節型・新型インフルエンザワクチンは注射型で、毎年その型に合わせてワクチンを製造し、未使用分は廃棄される。一方で最近、日本でも交差免疫が期待できる粘膜免疫が誘導できる経鼻インフルエンザワクチンの開発が進んでいる。しかし、経鼻免疫は有効性の報告はあるが、経鼻投与インフルエンザワクチンの安全性に関しては未知数であり、且つ長期保存することはできないため、季節性のインフルエンザや新型インフルエンザのパンデミックにおいては、事前に流行株を予測することが不可能であることから、株を特定してワクチン製造までに半年は必要とされることから抜本的解決法が模索されている。そこで、この問題に対して、所属研究室で私たちが開発したコメ型技術でインフルエンザに対する経口コメ型ワクチンの開発の基盤研究を実施する。このコメ型ワクチンは冷蔵が不要で常温3年の長期保存が出来、多価ワクチンを発現出来、コメ胚乳細胞の蛋白貯蔵体に蓄積することで胃腸での消化酵素耐性を付加出来、M細胞を含む粘膜誘導組織から有効に取り込まれ、ワクチン特異的血清 IgG 抗体のみならず、粘膜面での抗原特異的分泌型 IgA を誘導できる等、ユニークな特性を持っている<sup>(1)-(4)</sup>。したがって、この特性を使ってワクチン抗原を色々な型のインフルエンザに対応させた備蓄型経口ワクチンの製造が可能となるかもしれないと考えている。

## 2. 研究の目的

ワクチン抗原には中和抗体の主要な標的である HA 抗原を用いる。これに対する抗体を誘導すれ

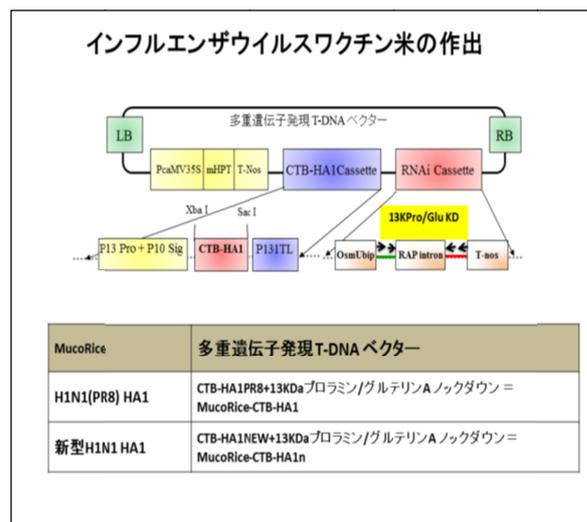
ば、感染防御が成立することがわかっている。ただし、HA 亜型の異なるウイルスには効かない。これに関して、粘膜免疫で抗体を誘導すれば、亜型の異なるウイルスに対してでも、ある程度感染防御を示す可能性が示されている<sup>(5)</sup>。そこで、HA 抗原の中和エピトープの大半を含む HA-1 を使用し、インフルエンザ株間での交差免疫が期待できる粘膜免疫を誘導させるためにそのモジュレーターであるコレラ毒素 B 鎖に各 HA 亜型抗原を結合したワクチンを米に発現させたものを用いることで、粘膜免疫を誘導出来、且つすべて HA 亜型に対応したワクチンを発現するワクチン米を作出のいままでにない常温備蓄型経口インフルエンザワクチンの開発が可能になると考えられる。ここでは代表的な HA 亜型抗原であるマウス順化ヒトインフルエンザウイルス H1N1A/PR/8<sup>(6)</sup>の HA と最近世界各地でパンデミックを起こした H1N1 A/California/4/2009 新型インフルエンザ<sup>(7)</sup>の HA をもちいて、コメ型インフルエンザワクチン発現米 MucoRice-CTB-HA1 を作出し、コメ粉末のマウス経口免疫での粘膜免疫誘導効果を確認する。

## 3. 研究の方法

### 1) CTB-HA1 発現ベクターの構築と CTB-HA1 発現米の作出

経口インフルエンザワクチン MucoRice-CTB-HA1 を作出するに当たり、ワクチン抗原をコメに高発現するために、種子特異的プロモーターである 13K プロラミンプロモーターを用いるワクチンカセットをワクチン米の T-DNA ベクターの CTB-HA1 ワクチンカセットとして組み込み、さらに、米の蛋白であるプロラミンまたはグルテリ

ンをノックダウンさせる RNAi カセットを同時に組み込み、米の胚乳蛋白質を抑制発現させ、その発現エネルギーと余地を導入ワクチンの高発



現、高蓄積に用いる<sup>(8)</sup>。作出は、ワクチン遺伝子は、データベースから得られた PR8 及び California/4/2009 HA1 遺伝子情報をもとに一部をコメコドンに最適化したものを CTB 遺伝子の C 末端にリンカー (GPGP) を挟んで接続し、すべて DNA 合成を外注で行いワクチン遺伝子部分とし、これをプロラミンプロモーターおよびその制御下にあるプロラミンシナルペプチドとつなぐため XbaI と SacI 間で pBSK にサブクローニングした。その後、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター制御下にあるハイグロマイシン耐性遺伝子を持つバイナリーベクター内の HindIII と SacI 間にライゲートし、最終的に T-DNA ベクターを構築した。これらの T-DNA ベクターをエレクトロポレーション法でアグロバクテリウムに導入し、あらかじめ完熟種子から誘導しておいたイネ種子由来カルスにそれぞれの目的遺伝子を含むアグロバクテリウムを感染させた。その後、ハイグロマイシン耐性を用

いて再分化、選択され形質転換体から遺伝子導入イネ (P0) を作出して、完熟種子 (P1) を取得した。その後、P1 から P2、を作出してホモ化した種子を取った。P1、P2、P3 の蛋白発現は、PR8 または新型インフルエンザ HA 兎抗体及び CTB 抗体を用いたウエスタンブロット確認する。なお本実験は所属研究室内に設置する遺伝子組換え米を作出できる人工照射下で栽培可能なグロースチャンバー内で栽培する。

## 2) CTB-HA1 発現米免疫応答の評価

BALB/c 6 週齢メスを用いて、CTB-HA1n(新型インフルエンザ HA1)発現米、CTB-HA1 (PR8 インフルエンザ HA1) または野生米(日本晴)粉末 10mg をそれぞれ 2 週間おきに 2 回皮下注射した。同様にそれぞれ 3 種のコメ粉末 200mg を 2 週間間隔で 5 回免疫した。最終免疫後、2 週間後に血清及び糞便を採取し、それぞれ血清 CTB 特異的、HA1 (PR8) 特異的 IgG 及び IgA 並びに糞便 CTB 特異的、HA1 (PR8) 特異的 IgA を酵素免疫測定法 (ELISA) で測定した。

## 4. 研究成果

### 1) CTB-HA1 発現米の作出

多重遺伝子発現 T-DNA ベクターを用いて、イネ種子に特異的に CTB-HA1 (PR8 株) 遺伝子、または CTB-HA1 (新型 H1N1 株) をアグロバクターを用いてイネゲノムに導入し、ハイグロマイシン耐性を利用して、導入カルスを選択、第 1 (P1) 第 2 (P2) 世代で、高発現株をそれぞれ 3 株選択した。最終的に選択したそれぞれ 3 種の P3 種子の CTB および HA1 (PR8) の発現をウエスタンブロットを図 1 に示す。SDS-PAGE 上での CTB-HA1 (PR8 株) の CTB と HA1 の発現位置は一致しており、分子量は凡

そ 50Kda、発現量は凡そ 15 $\mu$ g/seed であった。新  
型 H1N1 の HA1 は PR8 抗体と交差しなかったが、  
CTB でのウエスタンからの分子量は凡そ 50Kda で、  
それから類推した発現量は凡そ 20 $\mu$ g/seed であ  
った。

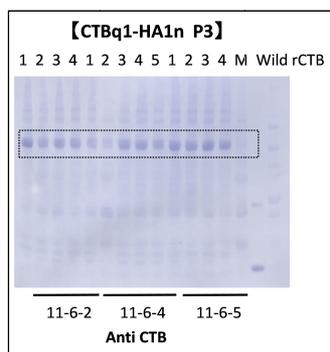
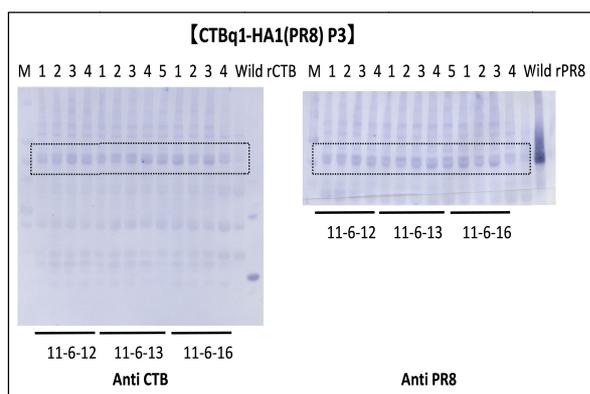


図 1. コメ型 CTB-HA1 ワクチンの発現確認

2) CTB-HA1 発現米による抗原特異的免疫誘導  
CTB-HA1PR8 (HA 米) 発現米を皮下免疫すること  
で、血清中 CTB 特異的 IgG 及び HA (PR8) 特異  
的 IgG を誘導することができ、CTB-HA1 の抗原性  
を証明することができた (図 2)。さらに  
CTB-HA1PR8 (HA 米) 発現米の経口免疫では CTB  
特異的血清 IgG・IgA のほか糞便特異的 IgA も誘  
導できたが、HA(PR8)特異的血清 IgG 及び糞便 IgA  
は誘導できなかった。PR8-HA 抗原は新型 HA 抗体  
とは交差しないので、この結果では新型 HA の抗  
原性は分からないが、CTB-HA1PR8 (HA 米) と同

様に、皮下免疫での抗原性はあるが、経口免疫  
での抗原ではないかもしれない。今後は、HA ワ  
クチン皮下免疫した後、経口で CTB-HA1PR8 (HA  
米) を追加免疫することで、経口 CTB-HA1PR8 米  
の応用を考えていきたい。

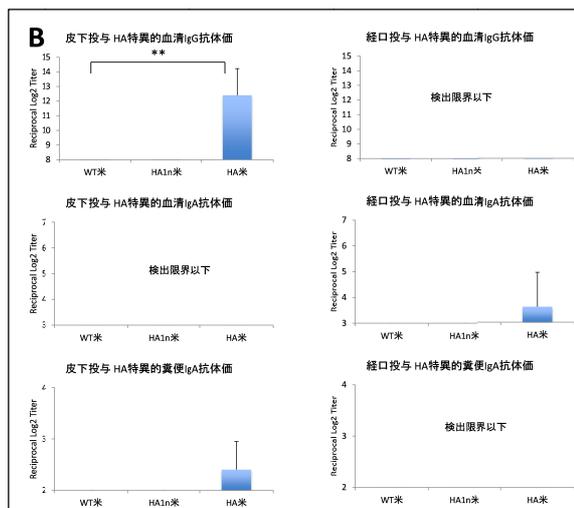
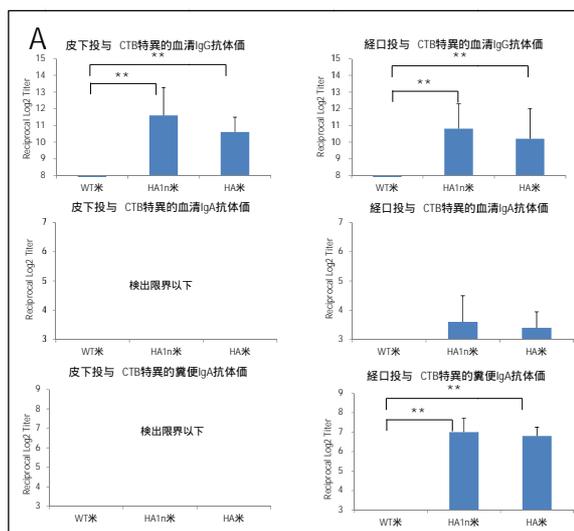


図 2. コメ型 CTB-HA1 ワクチンによる CTB または  
HA 特異的免疫応答 A) CTB 特異的免疫応答 B)  
HA 特異的免疫応答

WT(野生米) vs ワクチン米, \*\*p < 0.01

#### 引用文献

(1) Nochi, T., et. al. Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA. 104:10986-10991(2007)

- (2) Yuki, Y. et. al. *Vaccine*. 27: 5982-5988 (2009)
- (3) Nochi, T. et. al. *J. Immunol.*183: 6538-6544(2009)
- (4) Tokuhara D., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 8794-8799 (2010)
- (5) Asahi Y. et al. *J. Med. Virol.* 74:328-355 (2004)
- (6) Song JH. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 1644-1649 (2008)
- (7) Itoh Y., *Nature* 460:102-1025 (2009).
- (8) Kuroda M et. al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:2348-2351(2010)

## 5. 主な発表論文等

### (1) 雑誌論文(計10件)

- 1) Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa et.al. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* 30: 4160- 4166 (2012)
- 2) Y. Yuki, M.Mejima, S.Kurokawa et.al. 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.* 11: 799-808 (2013)
- 3) D. Tokuhara, B. Álvarez, M. Mejima, et.al.& Y.Yuki. Rice-based orally administered antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* 123: 3829-3838 (2013).
- 4) S. Kurokawa, R. Nakamura, M. Mejima et.al. & Y. Yuki. Mucorice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens. *J. Proteome Res.*12:3372-3382 (2013)
- 5) S. Kurokawa, M. Kuroda, M. Mejima et.al & Y. Yuki. Change in localization of cholera toxin B-subunit expressed in rice upon RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to down-regulation of the rice allergen protein RAG2. *Plant Cell Reports* 33:75-87 (2014)
- 6) M. Abe, Y. Yuki, S. Kurokawa, M. Mejima, et.al. A rice-based soluble form of a murine TNF-specific llama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen induced arthritis in mice. *J. Biotechnol.* 175: 45-52 (2014)
- 7) T. Azegami, Y. Yuki, H. Kiyono. Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases. *Int. Immunol* 26:517-526 (2014)
- 8) M. Mejima, K. Kashima, M. Kuroda et.al & Y. Yuki Development of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 120: 35-48 (2015)
- 9) K. Kashima, M. Mejima, S. Kurokawa, et.al. Y. Yuki. Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera

toxin B-subunit vaccine lines with wild-type lines. *BMC Genomics* 16:48 (2015)

10) T. Azegami, H. Itoh, H. Kiyono, Y. Yuki. A Novel Transgenic Rice-based Vaccine. *Arch. Immunol. Ther. Ex.* 63: 87-99 (2015)

(2). 学会発表(計 10 件)

1) N. Takeyama, et.al. & Y. Yuki. 日本ワクチン学会 東京 (2012)

2) EJ. Park, S. Joo, S.& , Y. Yuki 日本ワクチン学会 東京 (2012)

3) K. Kashima, H. Hiroiwa, Y. Yuki et.al. 日本ワクチン学会 東京 (2012)

4) Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa et.al. 15th International congress of immunology, Milan, Italy (2013)

5) Michiyo Abe, Y. Yuki, et.al. 15th International congress of immunology, Milan, Italy (2013)

6) EJ Park, Y. Yuki, H. Kiyono 日本免疫学会 千葉 (2013)

7) Y. Yuki, Mio Mejima, K. Kashima et.al. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)

8) K. Kashima, M. Mejima, et.al. & Y. Yuki. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)

9) 鹿島光司、目島未央、黒田昌治、幸 義和 日本農芸化学会 東京(2014)

10) 目島未央、鹿島光司、黒田昌治、幸 義和 日本農芸化学会 東京(2014).

(3) 図書 (1 件)

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)

(4) 産業財産権 (出願 1 件)

幸 義和, 鹿島光司, 清野 宏: 外来性 DNA のゲノムへの導入位置の決定法 特願 2014-123977 (平成 26 年 6 月 17 日)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸 義和(YUKI Yoshikazu)  
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

(3) 連帯研究者

なし

(4) 研究協力者

福山 賀子 (FUKUYAMA Yoshiko)

目島 未央 (MEJIMA Mio)

黒河志保 (KUROKAWA Shiho)

鈴木 裕二 (SUZUKI Yuji)