

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420834

研究課題名(和文) トランスジェニックニワトリ卵を用いた経口免疫ワクチンによるアレルギー治療法の開発

研究課題名(英文) Egg-based oral immunotherapy using genetically manipulated chickens

## 研究代表者

河邊 佳典 (Kawabe, Yoshinori)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30448401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子導入ニワトリ卵を用いた経口免疫ワクチンによるアレルギー治療法の開発を目的として、以下の研究結果を得た。1. MHC-Crp-Fc含有卵白を用いた花粉症モデルマウスへ経口投与することで、モデルマウスの花粉症症状の軽減を示すことができた。また、治療スケジュールを確立することができた。2. TGF- $\beta$ 1遺伝子導入ニワトリにおいて、卵管特異的に目的タンパク質を発現させることができた。3. 経口アレルギー取り込み細胞誘導分子を作製できた。

研究成果の概要(英文)：Here, we attempted to develop egg-based oral immunotherapy using genetically manipulated (GM) chickens. By using egg white derived from GM hens producing human T-cell epitopes fused with MHC molecules (MHC-Crp-Fc), the number of sneezing and IgE level were significantly decreased in allergic mice fed with MHC-Crp-Fc-containing egg white. TGF- $\beta$ 1 could be produced in an oviduct-specific manner. Recombinant RANKL that can induce M cells was produced. Eggs derived from GM chickens may be served as edible pharmaceuticals for allergy immunotherapy.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：遺伝子導入ニワトリ アレルギーエピソード エピソードペプチド スギ花粉症 ワクチン卵 M細胞  
経口免疫ワクチン MHC

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会において、花粉症などのアレルギー疾患の患者数は増加の一途をたどっており、根治療法の確立が切望されている。アレルギー疾患の根治療法として、アレルギー由来の T 細胞抗原決定基 (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唱されている。アレルギー疾患におけるワクチンは、様々なアレルギーに対する過剰免疫応答を抑制し、免疫寛容を誘導する目的であるが、投与方法としては、全身免疫を活性化させる血中投与方法よりも生体にとって最大の免疫臓器である腸管の免疫系を活性化させ、免疫寛容を引き起こす経口投与方法に注目が集まっている。

申請者はこれまでに、トランスジェニック鳥類で数多くの組換えタンパク質を生産させることに成功してきた [Kawabe Y and Kamihira M, Cell Engineering 7:121-41 (2011)]。このような中、アレルギー疾患の中でも特に切望されるスギ花粉症を対象に、トランスジェニックニワトリが生産したスギ花粉アレルギーエピトープ含有卵を用いた、経口摂取によるアレルギー治療法の開発を行い、アレルギー症状の軽減に成功した [Kawabe Y et al., PLoS One 7:e48512]。スギ花粉アレルギーに対する主要ヒト T 細胞エピトープ (7crp) を、ニワトリ卵白成分であるリゾチームと融合させた融合タンパク質 (cLys-7crp) として卵中に生産させた後、花粉症モデルマウスにこの卵を経口投与したところ、くしゃみ回数、全 IgE および抗原特異的 IgE 量の減少および、炎症細胞の肺への浸潤度低下が見られた。これらの結果は、トランスジェニック鳥類が生産した機能性卵は経口アレルギーワクチン卵として効果が期待できると示唆された。スギ花粉アレルギーエピトープ含有卵白の場合、トランスジェニック植物 (イネ) [Takagi et al., Plant Biotechnol J 3:521 (2005)] と比較して 1000 分の 1 程度の含有量で花粉症状を緩和できたことから、卵白は消化されにくい (腸管まで届きやすい) とともに、高い抗原性のためアジュバンドとして働いた可能性も考えられる。一方、経口アレルギーは特殊分化した上皮細胞である M 細胞のみより取り込まれ、腸管免疫系の樹状細胞やリンパ球を活性化させることがわかっている。そのため、腸管免疫系を効果的に活性化させるために、ワクチン抗原の M 細胞への標的化研究がさかんに行われている [Weiner et al., Immunol Rev 241:241 (2011)]。近年、M 細胞に接着して感染するレオウイルス由来の接着タンパク質 sigma1 とモデルアレルギー (OVA) を融合させた OVA-sigma1 をあらかじめ経口投与させておくと、OVA の経口感作後腸管免疫と全身免疫双方の活性化がおき、抗原特異的 T 細胞の減少やアレルギー抑制性サイトカインの生産増加が観察された [Suzuki et al., Gastroenterology 135:917 (2008)]。また、

粘膜上皮細胞に存在する M 細胞の分化誘導を促すタンパク質として RANKL (receptor activator for NF-kappaB ligand) が同定され、細胞外ドメイン部分をマウスへ経口投与すると、通常は M 細胞の存在しない絨毛の上皮細胞層で M 細胞の異所性分化誘導が報告された [Knoop et al., J Immunol 183:5738 (2009)]。これらの結果は、M 細胞標的化できる sigma1 とアレルギーエピトープを融合させた融合タンパク質と、M 細胞分化誘導因子 RANKL を共発現させた含有卵白を経口摂取すれば、スギ花粉アレルギーが腸管へ積極的に取り込まれるため、腸管免疫系の活性化による経口免疫寛容をより効果的に誘導できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入ニワトリ卵を用いた経口免疫ワクチンによるアレルギー治療法の開発を目的として、これまで行っているスギ花粉症をアレルギー治療のターゲットとして、研究を実施した。具体的には、1) スギ花粉アレルギーエピトープを、MHC 分子 alpha 鎖および beta 鎖内に遺伝子工学的に組み入れ、さらに抗体の Fc 領域と融合させた分子改変 (MHC-Crp/Fc)、2) 免疫抑制性サイトカイン TGFbeta による経口免疫寛容誘導、3) 経口アレルギー取り込み細胞である M 細胞の効率的な分化誘導などを行うことで、腸管免疫系への活性化作用をさらに高めた経口免疫寛容誘導可能なワクチン卵によるアレルギー治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3. 1. MHC-Crp-Fc 遺伝子導入ニワトリ由来卵白の花粉尘治療実験

遺伝子導入ニワトリが産卵した卵白を回収し、花粉症モデルマウスへの卵白の経口投与による花粉症治療実験を行った。花粉症モデルマウスは、スギ花粉抗原抽出物をアジュバンドとともに一週間おきに 3 回マウスの皮下に投与することで作製した。治療前の基準として、作製した花粉症モデルマウスへ同抽出物を経鼻曝露し、この直後のマウスを 5 分間撮影し、その間のくしゃみ回数を測定した。また、血清を採取し、IgE 抗体の測定を ELISA 法により行った。この後、3 週間の卵白の経口投与から 5 日間の花粉抗原抽出物の経鼻投与までを治療 1 タームとし、2 タームまで治療実験を行った (図 1)。使用したエピトープ含有卵白は、当研究室で開発したニワトリ卵白リゾチーム-7 連結エピトープ (L7) 含有卵白、M1F および M2F 含有卵白であり、1 回の経口投与では 1 匹当たり 0.2 mL の卵白を投与した。それぞれの治療タームごとに、マウスのくしゃみ回数の測定および ELISA 法による血清中の IgE 抗体の測定を行った。なお、

コントロールとして、通常のニワトリ（非遺伝子導入）の卵白をマウスへ経口投与した。治療後、各群のマウスを数個体ずつ解剖し、肺組織を回収した。肺組織における炎症細胞の浸潤度を HE 染色により評価した。炎症の程度は、Wei らの論文 [Wei et al., J Immunol 172:7053 (2004).] を基に、気管支壁の肥厚から 4 段階のスコアで測定した。

3.2. TGFbeta 遺伝子導入ニワトリの解析  
これまでに、卵管特異的発現システムを有するレトロウイルスベクターを用いて、TGF-beta1 遺伝子導入ニワトリを作製していた。目的遺伝子のニワトリゲノムへの導入は、各組織から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法で解析した。性成熟した遺伝子導入ニワトリが産卵した卵の卵白および各組織における TGFbeta1 の発現は、抗 TGF-beta1 抗体によるウエスタンブロット法で解析した。

### 3.3. M 細胞分化誘導因子 RANKL の作製

RANKL 遺伝子は、オープンバイオサイエンスより得られたプラスミドから、PCR より増幅した。その後、サブクローニング用ベクター (pBlue) へ組換えした後、大腸菌発現ベクター (pET28a) へ乗換えた。作製したプラスミドは種々の制限酵素による切断を行うことで評価した。作製したプラスミドは、組換えタンパク質発現用大腸菌 Rosetta 株へ形質転換した。遺伝子組換え大腸菌 (Rosetta/RANKL) を培養後、適切な濁度において、発現誘導剤 IPTG を添加することで、発現誘導を行った。生産させた大腸菌を超音波破碎機により破碎した後、可溶性画分を遠心分離にて調製した。RANKL の精製は、ニッケルキレートカラム (His トラップカラム) を用いた。生産させた RANKL の発現解析を SDS-PAGE と CBB 染色ならびウエスタンブロット法により行った。

## 4. 研究成果

### 4.1. MHC-Crp 遺伝子導入ニワトリ由来卵白のスギ花粉症治療効果

これまでに、MHC の alpha 鎖および beta 鎖の間にアレルゲンエピトープを遺伝子工学的に融合させた融合タンパク質 (MHC-Crp-Fc) を遺伝子導入ニワトリの卵白中に生産させることができていた。また、同ニワトリ由来のエピトープ含有卵白の効能を、マウスにあらかじめ (予防的に) 卵白を経口投与したのち、スギ花粉アレルゲンを皮下と経鼻暴露した場合、くしゃみ回数の低減が認められていた。

遺伝子導入ニワトリが産卵した卵白を、スギ花粉アレルゲン投与によりあらかじめ花粉症にしたモデルマウスへ経口投与することで、効能の評価を行った。花粉抗原をモデ

ルマウスの鼻に曝露し、その直後 5 分間のくしゃみ回数を測定したところ、L7、M1F、M2F 含有卵白を投与したマウス群 (以下、L7 群、M1F 群、M2F 群) で、治療 1 ターン後で大きく減少し、治療 2 ターン後まで症状を抑制、減少できていることが確認できた (図 2)。

各ターンのスギ花粉抗原の経鼻曝露後、全個体より血清を採取し、全 IgE (Total IgE) の測定を ELISA 法により行った。その結果、M1F および M2F 群では一部増加している個体も見受けられるものの、エピトープ含有卵を投与した治療群では Total IgE が減少し、IgE 生産が抑制されていることがわかった (図 3)。くしゃみ回数が優位に減少していた個体を選抜してスギ花粉主要アレルゲン特異的 IgE (Specific IgE) の測定を ELISA 法により行った。M2F 群において一部例外が見られたが、治療群では概ね減少していることが確認できた。くしゃみ回数の減少と相関性があることから、Specific IgE 抗体の生産が抑えられたことで花粉症症状の改善ができたと考えられる。

治療終了後、Specific IgE の測定に用いたのと同じマウスを解剖し、肺組織における炎症細胞の浸潤度を観察した。治療群では、通常卵白を投与した群に比べて、炎症細胞の浸潤による気管支壁の肥厚が改善されていた。また、気管支壁の肥厚を基準として作成された 4 段階のスコアに基づいて、炎症の程度を評価した。治療群のマウスでは炎症のスコアは未処理マウスと同程度まで抑えられ、肺炎症の低減を確認することができた (図 4)。

本結果から、エピトープの種類は、Cry j1 由来のものでも Cry j2 由来のものでも同様の効果があった。また、M1F、M2F 群においても L7 群と同程度まで減少していることから、L7 含有卵白と同程度の症状抑制効果が期待できると考えられる。これまでスギ花粉症患者での主要エピトープペプチド 7 つを人工的に連結させた融合タンパク質 (cLys-7crp) の場合と比較して、エピトープを限定させても花粉症症状を軽減できることがわかった。また、経口投与は、1 日 1 回 0.2 mL を週 5 回計 3 週間行っても、症状の軽減が認められた。これらのことから、モデルマウス個体への経口摂取において、投与回数、量、期間を変更することで、より効果的に確実に腸管免疫寛容を誘導する治療スケジュールを確立することができた。

### 4.2. TGF-beta 遺伝子導入ニワトリの発現解析

すでに作製済みのアレルギー抑制性サイトカインとして働く TGF-beta1 遺伝子が組込まれた遺伝子導入ニワトリの解析を行った。遺伝子導入ニワトリは卵管特異的に目的タンパク質を生産できる発現ユニットとした。遺伝子導入ニワトリの各組織より抽出したゲノム DNA を、PCR 解析したところ、目的遺

伝子は各組織に導入されていた。ウエスタンブロット法で評価したところ、遺伝子導入ニワトリ由来卵白サンプルにおいて、潜在型の分子量サイズでバンドを検出することができたことから、TGF- $\beta$ 1 が生産されていることがわかった。さらにその発現は期待したとおり、卵管特異的であった。また、効果的な免疫寛容誘導を期待して作製されたアレルギー抑制性サイトカイン(TGF- $\beta$ 1)含有卵における潜在型 TGF- $\beta$ 1 の発現定量および投与量の検討を行った。大腸菌に生産させ、精製した潜在型 TGF- $\beta$ 1 を用いて、卵白中の潜在型 TGF- $\beta$ 1 の発現量を見積もったところ、母乳中に含まれる潜在型 TGF- $\beta$ 1 濃度よりもはるかに高く、免疫寛容誘導の効果が十分に期待できる濃度であった。

#### 4.3. 腸管免疫系活性化のための M 細胞分化誘導因子の作製

腸管免疫系への活性化作用を誘導するために、M 細胞分化促進タンパク質を発現させた。M 細胞分化誘導因子として報告されている ANKL の細胞外ドメイン領域を得るために、PCR にて増幅させた。増幅断片を pBlue へ組入れ、pBlue/RANKL を作製した。種々の制限酵素で切断したところ、目的の分子量サイズにバンドを確認できた(図 2)。シーケンス解析を行い、目的遺伝子であることがわかった。その後、pET28a ベクターへの乗換えを行った。同様に複数の制限酵素による切断を行い、目的の発現ベクターを作製することができた。そこで、これを大腸菌株 Rosetta に形質転換し、Rosetta/RANKL を樹立した。

次に、Rosetta/RANKL を培養後、IPTG を添加することで、組換えタンパク質を生産させた。超音波破碎で得られた可溶性画分を、His トラップカラムに通し、イミダゾール含有溶出液にて溶出した。その後、PBS で透析し、濃縮の操作を加えた後、RANKL タンパク質を SDS-PAGE にかけた。CBB 染色したところ、目的の分子量サイズでのみバンドが検出されたことから、精製できていることがわかった。ウエスタンブロット法で抗 His 抗体を用いて発現解析したところ、同じ目的分子量でバンドを確認することができた。

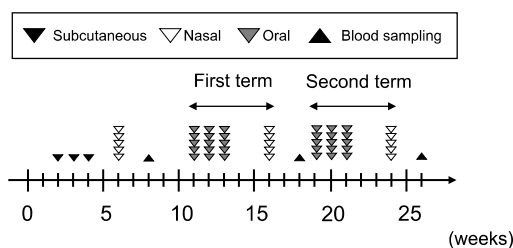


図 1 治療スケジュール

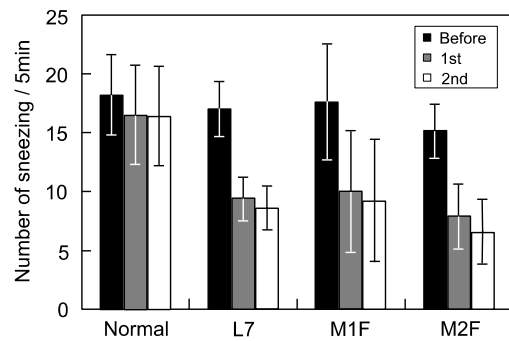


図 2. 各マウス群のくしゃみ回数

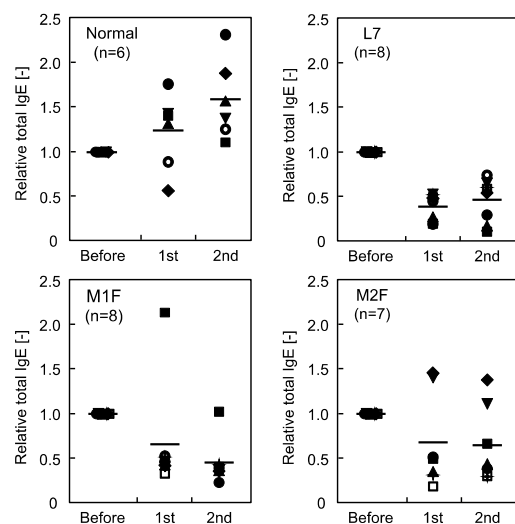


図 3. 各マウス群における血清中の全 IgE 量

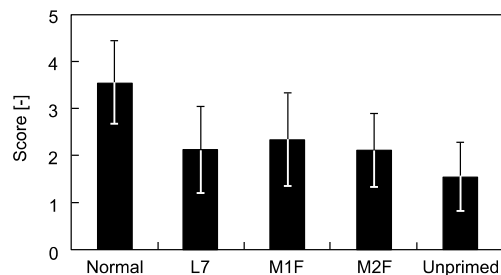


図 4.肺炎症スコア

#### 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)

[学会発表](計10件)

大坪 嵩征、小畑 玲奈、河邊 佳典、井藤 彰、上平 正道

遺伝子導入ニワトリ卵を用いた経口免疫ワクチンによるアレルギー治療法の開発

第 53 回化学関連支部合同九州大会

CE-1-008

2016年(平成28年)7月2日  
北九州国際会議場(北九州市)

小畑 玲奈、河邊 佳典、井藤 彰、  
上平 正道  
遺伝子導入ニワトリによるアレルギー治療のための TGF-beta1 の生産  
第67回日本生物工学会大会  
3P-238

2015年(平成27年)10月28日  
城山観光ホテル(鹿児島市)

小畑 玲奈、河邊 佳典、奥園 健太、井藤 彰、  
上平 正道  
遺伝子導入ニワトリが生産した MHC-アレルギーエピトープ含有卵による経口免疫治療  
化学工学会 第80年会  
XA131

2015年(平成27年)3月19日  
芝浦工業大学(東京都)

Yoshinori Kawabe, Yuuki Hayashida,  
Kensaku Numata, Kenta Okuzono, Reina  
Obata, Akira Ito, Masamichi Kamihira  
Egg-based oral immunotherapy with  
genetically manipulated chickens producing  
T-cell epitopes against Japanese cedar  
pollinosis  
YABEC2014  
OC-7

2014年(平成26年)11月7日  
国立中正大学(台湾嘉義県)

小畑 玲奈、奥園 健太、河邊 佳典、  
井藤 彰、上平 正道  
遺伝子導入ニワトリ由来 MHC-アレルギー  
エピトープ含有卵によるスギ花粉症治療  
評価  
化学工学会第46回秋季大会  
ZA1P38

2014年(平成26年)9月17日  
九州大学(福岡市)

小畑 玲奈、河邊 佳典、井藤 彰、  
上平 正道  
アレルギー治療を目的とした遺伝子導入  
ニワトリによる TGF-β1 の生産  
第51回化学関連支部合同九州大会  
CE-2-042

2014年(平成26年)6月28日  
北九州国際会議場(北九州市)

河邊 佳典、小畑 玲奈、矢野 敬二郎、松  
田 直樹、山田 紀子、井藤 彰、上平 正道

卵管特異的に TGF-beta を発現する遺伝子  
導入ニワトリの作製  
化学工学会 第79年会  
C302

2014年(平成26年)3月20日  
岐阜大学(岐阜市)

河邊 佳典  
医薬品タンパク質生産技術の開発  
2012年度日本動物細胞工学会奨励賞・技  
術賞受賞講演並びに第31回動物細胞工学  
シンポジウム

2014年(平成26年)2月10日  
キャンパス・イノベーションセンター  
(CIC)国際会議室(東京都)

河邊 佳典、奥園 健太、矢野 敬二郎、林  
田 悠希、沼田 健作、原田 翔太、林田 義  
文、井藤 彰、上平 正道  
アレルギーエピトープを生産する遺伝子  
導入ニワトリ卵によるスギ花粉症の経口  
免疫治療に関する研究  
第36回日本分子生物学会  
1P-0985

2013年(平成25年)12月3日  
神戸ポートアイランド(神戸市)

矢野 敬二郎、黒原 健志、原田 翔太、  
河邊 佳典、井藤 彰、上平 正道  
遺伝子導入ニワトリにおける卵管特異的  
導入遺伝子発現  
第50回化学関連支部合同九州大会  
1\_8.062

2013年(平成25年)7月6日  
北九州国際会議場(北九州市)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003157/index.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
河邊 佳典(KAWABE, Yoshinori)  
九州大学 大学院工学研究院 化学工学  
部門 助教  
研究者番号: 30448401

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし