

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670063

研究課題名(和文)植物に作らせた可食性IgA抗体による腸管粘膜表面での生体防御免疫の研究

研究課題名(英文)Mucosal surface defense by edible IgA produced by plants

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

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)：近年、抗体医薬の普及が進んだが、生産コストに課題があり、IgGクラスの抗体に限られるのが現状である。粘膜表面での受動免疫を実現できる可食性IgA抗体医薬は未開発である。分泌型IgAは2量体IgAと分泌片で構成され、動物体内では異なる細胞由来のポリペプチドから構築されている。そこで、植物を用いて分泌型IgAをワンステップで作製することを試みた。具体的には、志賀毒素特異的な分泌型IgAをモデル植物および実用植物に作らせ、毒素中和活性を証明した。志賀毒素の消化管からの侵入機構の解明につなげるため、志賀毒素の大腸上皮細胞に対する傷害活性をin vivoにおいて高感度で検出する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Although therapeutic antibodies are widely used, a high production cost and the limitation to IgG class antibodies remain a challenge. Therapeutic antibodies based on edible IgA that are involved in the defense on mucosal surface remain undeveloped. Secretory IgA consists of dimeric IgA and secretory component, each of which is produced by different type of cells. Then we tried to produce secretory IgA in plants through a one step gene expression. Thus, secretory IgA specific for Shiga toxin was produced by a model plant and a practical plant, and then the toxin neutralization activity in the plant extract was demonstrated. To address a question on the mechanism of the initial entry of Shiga toxin from the gut, a highly sensitive method was developed to detect colon epithelial cell injury in vivo.

研究分野：免疫学

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 生体防御免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、多くのモノクローナル抗体が抗体医薬として研究開発され、主としてがん、炎症性疾患の治療薬として用いられている。これらは、動物培養細胞を用いて製造されているが、高い生産コストと、生産規模調整の困難さに課題がある。さらに、抗体のクラスはほとんどが免疫グロブリン G (IgG) であり、全身投与が想定されている。

ところで、IgA クラスの抗体は、粘膜表面に分泌されるほか、母乳などにも分泌され、粘膜表面からの病原体侵入を防いでいると考えられている。しかし、経口受動免疫を想定した IgA クラスの抗体医薬の研究はほとんど行なわれていない。一方、抗体医薬の生産コストを低下させる方策の一つとして、植物に発現させた抗体 (plantibody) の利用が代替法として有望である。さらに経口投与を考慮すると、たとえば抗原特異性のある分泌型 IgA を含んだ母乳型高次機能性食品も有力と考えられる。

研究代表者は、腸管出血性大腸菌 O157:H7 が産生する志賀毒素 (ペロ毒素) の糖鎖結合サブユニット (Stx1B) に対するモノクローナル抗体を作製し、組換え型 IgA の構築に成功してきた (Y. Imai et al., *J. Immunol. Methods*, **302**, 125, 2005; Y. Tobisawa et al., *Scand. J. Immunol.*, **76**, 574, 2011)。IgA は、抗原に結合する H 鎖と L 鎖のほか、J 鎖から構成された 2 量体が基本であるが、動物細胞のみならず、モデル植物シロイヌナズナおよび実用植物リーフレタスに抗体遺伝子を発現させて、Stx1B 特異的な 2 量体 IgA の産生に成功してきた。実際には、毒素中和活性のある IgG モノクローナル抗体の変部と、IgA モノクローナル抗体 H 鎖の定常部を活用している。さらに、poly-Ig 受容体 cDNA を入手し、動物細胞を用いて分泌片 (poly-Ig 受容体の細胞外ドメイン) の発現にも成功している。分泌型 IgA について言えば、2 量体 IgA と分泌片を別々の動物細胞を用いて作製し、試験管内で再構築することは可能である。しかし、動物細胞では、抗体の 3 種類のポリペプチドと分泌片を同時に一つの細胞に発現させ、分泌型 IgA とすることはできない。

2. 研究の目的

食べられる抗体医薬または高次機能性食品をめざし、植物を用いて 4 種類のポリペプチドをシロイヌナズナおよびリーフレタスに発現させ、Stx1B 特異的分泌型 IgA を作製する。以前の研究では、J 鎖の発現には植物ウイルス由来のプロモーターを用いていたが、これを削除してすべて植物由来のプロモーターを用いて発現させ、社会的受容性のある可食性抗体の実現に近づける。さらに志賀毒素の侵入が、経口投与した植物抗体によって粘膜表面で阻止されうるかどうかを評価するため、*in vivo* の実験系を構築する。

3. 研究の方法

(1) 抗体遺伝子の植物での発現のためのバイナリーベクターの構築: Stx1B 特異的組換え型 IgA 抗体の H 鎖、L 鎖、J 鎖の cDNA はすでに作製してある (挑戦的萌芽研究 2011~2012: 課題番号 23659067)。分泌片の cDNA は、poly-Ig 受容体の細胞外ドメインとして、PCR 法によって準備した。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のクロロフィル結合タンパク質 ab のプロモーターおよびターミネーターを利用して、IgA の H 鎖、L 鎖、J 鎖、分泌片を同時に発現するようにバイナリーベクター-pBCH1 に組み込んだ。

(2) シロイヌナズナおよびレタスでの抗体の発現: バイナリーベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) に導入して形質転換体を得た。シロイヌナズナには花序浸し法で遺伝子導入し、ハイグロマイシンにて組換え体を選抜した。リーフレタス (*Lactuca sativa*) では、アグロバクテリウム形質転換体を子葉に感染させ、カルス培養を行いカナマイシンで組換え体を選抜した。カルスからシュート形成と発根を経て、植物体に育成した。

植物体の生育は、物理的封じ込めレベル P1P の温室にて実施した。

(3) 抗体の発現の確認: 植物ゲノムへの抗体遺伝子の組み込みを PCR 法、mRNA への転写を RT-PCR 法、タンパク質産生をイムノブロット法および ELISA で確認した。抗原特異的な分泌型 IgA の産生は、固相化した Stx1B に植物の葉の抽出液を反応させ、抗 IgA H 鎖 (α 鎖)、抗 poly-Ig 受容体抗体を用いて検出した。

(4) 植物体内での抗体の発現部位の特定: 植物の部位ごとに組織切片を作製して、免疫組織化学的手法で抗体の発現を観察した。さらに、超薄切片を用いた電子顕微鏡観察および金コロイド標識抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により、植物細胞内での抗体の発現を評価した。

(5) 毒素中和活性の測定: Stx1 に感受性の高い Vero 細胞を用いて、Stx1 に暴露することによる細胞生存率の低下を評価した。組換え植物の抽出物で前処理することで、細胞生存率の低下を防げるかどうかを調べた。

(6) Stx1 による大腸上皮傷害を評価する *in vivo* 実験系の構築: マウス肛門より Stx1 溶液を注入し、一定時間後に大腸を採取した。組織切片を作製し、H&E 染色、TUNEL 法による断片化した核内 DNA の染色、活性型カスパーゼ-3 に対する抗体染色を実施した。

(7) 経口投与した Stx1B 特異的 IgA 抗体の消化管内動態の測定: すでに作製してある

Stx1B 特異的 2 量体 IgA モノクローナル抗体 G2G7 (Y. Imai et al., *J. Immunol. Methods*, **302**, 125, 2005) をマウスに経口投与し、経時的に糞を採取した。糞抽出液中の Stx1B 特異的抗体を ELISA で検出した。

4. 研究成果

(1) 植物での分泌型 IgA の発現

経口投与できる分泌型 IgA を抗体医薬あるいは高次機能性食品として利用できるように、4 種類のポリペプチド鎖からなる分泌型 IgA を植物にワンステップで発現させ、可食性植物抗体 (edible plantibody) の作製を目指した。抗体遺伝子の発現には、社会的受容性を高めるため、ウイルス由来ではなく植物由来のプロモーターを利用した。シロイヌナズナでは、ゲノム DNA への遺伝子導入の確認、ELISA、イムノプロット法、植物組織の免疫組織化学的染色による分泌型 IgA タンパク質の発現と組み立てを確認した。レタスでは、ゲノム DNA への遺伝子導入の確認、ELISA による分泌型 IgA タンパク質の発現を確認した。シロイヌナズナおよびレタスの両方について、葉の抽出物中に固相化 Stx1B に結合する抗原特異的な分泌型 IgA が含まれていることを、抗 IgA H 鎖、抗 poly-Ig 受容体抗体を用いて明らかにした。

(2) 植物体内での IgA 抗体発現部位の検出

トランスジェニック植物での分泌型 IgA の安定発現のためには、抗体タンパク質を植物内で安定的に集積させることが重要である。シロイヌナズナの葉の超薄切片を用いた観察から、トランスジェニック植物において特異的に細胞質内のプロテインボディーを見出した。金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法によって、プロテインボディー内に IgA の H 鎖および分泌片の存在を明らかにした。

(3) 分泌型 IgA 植物抗体による毒素中和活性の証明

分泌型 IgA を発現させたシロイヌナズナの葉の抽出液を作製し、植物抗体の材料とした。Stx1 を植物抗体で前処理すると、Vero 細胞に対する Stx1 の細胞毒性が中和された。以上より、Stx1 に対して中和活性を有する分泌型 IgA 植物抗体の作製が確認できた。

(4) 大腸上皮細胞の Stx1 による傷害の *in vivo* での検出

Stx1 が最初に体内に侵入する機構については、現在でも未解明である。研究代表者は、マウス大腸を用いて Stx1 の標的となる糖脂質が下部大腸に偏在し、上部大腸にはないこと (Y. Imai et al., *Infect. Immun.*, **71**, 985, 2003) 下部大腸から単離した腸上皮細胞が Stx1 に感受性であり、上部大腸由来の細胞は抵抗性があることを示して来た (M. Kashiwamura et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1614, 2009) Stx1 の侵入部位での傷害をマウスで直接評価する

実験系を構築するため、マウス肛門から Stx1 を注入し、大腸組織の変化を観察した。組織切片の H&E 染色では、組織傷害の程度は比較的軽微であった。TUNEL 法による上皮細胞のアポトーシスの検出では、PBS を注入した群と比較して、Stx1 群でアポトーシスを起こした大腸上皮細胞数の増加が認められた。より高感度の検出法として、活性型 caspase-3 の免疫組織染色によって、Stx1 によるアポトーシス誘導の初期過程を観測できた。これにより、*in vivo* で毒素中和活性を評価する一つの手段が得られた。

(5) 経口投与した IgA モノクローナル抗体の消化管内動態

経口投与した植物抗体が、大腸に届くのかどうかを評価するための予備実験として、Stx1B 特異的マウスモノクローナル抗体 G2G7 (2 量体 IgA) を経口投与して、糞中から抗原結合活性のある IgA を ELISA で検出した。その結果、固相化 Stx1B に結合する IgA が糞抽出物中に見出された。

(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

植物を用いたワクチン、抗体医薬、生物医薬品の製造に関する研究は、世界的に活発化している。世界的広がりを見せる危険な病原体に対する抗体医薬生産の一つの手段としても注目されている。例えば、エボラウイルスに対する IgG 抗体遺伝子をタバコ的一种 *Nicotiana benthamiana* に一過性発現させた ZMapp は、未承認薬ながらアフリカで患者に投与されている。しかし、経口投与を想定した IgA の植物抗体については、まだ研究実施例が少ない。我々の本研究成果論文の一つ (K. Nakanishi et al., *PLoS ONE*, **8**, e80712, 2013) は、植物バイオテクノロジー分野のトップジャーナルに引用されており (L.B. Westerhof et al., *Plant Biotechnol J.*, **12**, 1333, 2014) 世界的に認知されつつある。今後、分泌型植物抗体の毒素中和活性を生体内で証明し、可食性抗体としての有効性・安全性を明らかにすることを目標としている。

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 5 件)

- (1) Kentaro Shoji, Tadanobu Takahashi, Kohta Kurohane, Koki Iwata, Takeshi Matsuoka, Shogo Tsuruta, Takatomo Sugino, Masaki Miyake, Takashi Suzuki, and Yasuyuki Imai: Recombinant IgA specific for influenza A virus hemagglutinin: production, functional analysis and formation of secretory IgA. *Viral Immunol.*, **28**, 170–178 (2015) 査読有 doi: 10.1089/vim.2014.0098

- (2) Kohta Kurohane, Kyoko Nagano, Katsuhiko Nakanishi, Koki Iwata, Masaki Miyake, and Yasuyuki Imai: Shiga toxin-induced apoptosis is more efficiently inhibited by dimeric recombinant hybrid-IgG/IgA immunoglobulins than by the parental IgG monoclonal antibodies. *Virulence*, **5**, 819–824 (2014) 査読有
DOI: 10.4161/21505594.2014.973804
- (3) Koki Iwata, Kohta Kurohane, Katsuhiko Nakanishi, Masaki Miyake, and Yasuyuki Imai: Stable expression and characterization of monomeric and dimeric recombinant hybrid-IgG/IgA immunoglobulins specific for Shiga toxin. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1510–1515 (2014) 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b14-00323
- (4) 中西勝宏、黒羽子孝太、今井康之: Plantibody の臨床応用 . 臨床免疫・アレルギー科 **62**, 192–197 (2014) 査読無
- (5) Katsuhiko Nakanishi, Sanshiro Narimatsu, Shiori Ichikawa, Yuki Tobisawa, Kohta Kurohane, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi and Yasuyuki Imai: Production of hybrid-IgG/IgA plantibodies with neutralizing activity against Shiga toxin 1. *PLoS ONE*, **8**, e80712 (2013) 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0080712

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 松岡毅、黒羽子孝太、今井康之: *In vitro* formation of a secretory hybrid IgA specific for influenza A virus hemmagglutinin. 第 43 回日本免疫学会 2014 年 12 月 10 日、京都市
- (2) 鶴田昌吾、中西勝宏、黒羽子孝太、今井康之: Separation and characterization of intact dimeric form of Shiga toxin 1-specific hybrid-IgA plantibodies expressed in *Arabidopsis thaliana*. 第 43 回日本免疫学会 2014 年 12 月 10 日、京都市
- (3) Katsuhiko Nakanishi, Shogo Tsuruta, Kohta Kurohane, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, Yasuyuki Imai: Comparison of the hybrid IgA expressed in plant and mammalian cell systems. Sixth Annual Protein & Antibody engineering Summit. 2014 年 11 月 6 日, Lisbon (Portugal)
- (4) Takeshi Matsuoka, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Development of Shiga toxin-specific hybrid IgA-tag: focus on the purification process. Sixth Annual Protein & Antibody engineering Summit. 2014 年 11 月 6 日, Lisbon (Portugal)
- (5) Shogo Tsuruta, Katsuhiko Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Purification of dimeric hybrid-IgA expressed in plants and mammalian cells using thiophilic adsorption chromatography. The 2nd International Conference on Pharma and Food. 2014 年

11 月 6 日, 静岡市

- (6) Kohta Kurohane, Katsuhiko Nakanishi, Yasuyuki Imai: Development of neutralizing hybrid-IgG/IgA specific for Shiga toxin. 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences. 2014 年 11 月 5 日、静岡市
- (7) 松岡毅、黒羽子孝太、今井康之: 静脈内投与により胆汁中に分泌された Shiga toxin 特異的 hybrid IgA の毒素中和活性と分泌経路の解析. 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 30 日、熊本市
- (8) 中西勝宏、黒羽子孝太、今井康之: Production of secretory hybrid-IgA specific for Shiga toxin 1 in lettuce. 第 42 回日本免疫学会 2013 年 12 月 12 日、千葉市
- (9) 荒木 瞳、中西勝宏、鶴田昌吾、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之: 植物で作製した分泌片の糖鎖解析. 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 2013 2013 年 11 月 10 日、鈴鹿市
- (10) 今井康之、中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和: ペロ毒素に対する IgA 植物抗体をめざして . 第 25 回微生物シンポジウム～ヒトの健康と微生物～ 2013 年 9 月 7 日、静岡市
- (11) Katsuhiko Nakanishi, Kohta Kurohane, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, Yasuyuki Imai: Production of dimeric hybrid-IgA specific for Shiga toxin 1 in *Arabidopsis thaliana*. Plant-based Vaccines, Antibodies & Biologics, 2013 年 6 月 5–7 日, Verona (Italy)

〔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・講師
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