

医療に役立つ経口ワクチン米の開発について

高岩 文雄（農業生物資源研究所）・清野 宏（東京大学医科学研究所）

近年、新型インフルエンザ、エイズ、ノロウイルス、結核、コレラなどの新興再興感染症の顕在化や、花粉症をはじめとするアレルギー患者の増加が危惧されている。こうした感染症やアレルギー疾患では、原因となる病原体やアレルゲンなどの抗原が口や鼻などを入り口として呼吸器・消化器粘膜組織から侵入し、病気を誘発する。こうした疾病に対しては、一般に病原体の一部を利用したサブユニットワクチンを用いて、注射によって投与し、予防や治療が行われている。しかし、注射を通じた投与では全身系における防御免疫や感作を誘導できても、病原体や抗原の入り口である粘膜を通じた防御はできず、特に感染症の場合には、感染阻止という予防の効果は低いと予想されている。呼吸器や消化器の粘膜には、柔軟かつ巧みに誘導制御されている粘膜免疫機構の存在が明らかとなり、吸入・経口抗原に対して有用性と有害性を識別して、積極的免疫応答と寛容を駆使して第一線のバリアとして働いている。この粘膜免疫を作動させる為には、抗原を経鼻・経口など経粘膜投与することが重要である。こうした状況から、粘膜免疫のみならず全身免疫を誘導可能な粘膜免疫機構を利用できる経口ワクチンが注目されている。しかし、ワクチンを口から投与する場合、粘膜免疫を誘導制御する免疫担当細胞が集積している腸管関連リンパ組織（GALT）に到達する前に、胃内における強酸下の環境やペプシン等の消化酵素により分解を受けて、抗原特異的免疫反応を的確且つ有効に誘導することはできないことが多い。従って、一般に経口型のワクチンとする場合、特にサブユニットタイプや精製抗原投与の場合には極めて大量なワクチンを必要とする可能性など課題が多く、実用化されているものは極めて少ない。

1990年代から植物分野では、分子農業として、植物でワクチンを産生して、精製することなくそのままの形で投与する食べるワクチン（edible vaccine）が新しい経口ワクチンとして注目されてきた。その利点は、植物細胞に特異的に存在する細胞壁が胃液に対する防御壁として機能して分解を免れ、腸管に存在する GALT に代表される各種粘膜関連リンパ組織（MALT）に運ぶことができ抗原特異的免疫応答の誘導が可能なこと、抽出・精製することなく安価に生産できる点にある。しかし、一般に植物の核ゲノムにワクチン遺伝子を導入した組換え作物においては、目的タンパク質の蓄積レベルは抽出タンパク質の 1% 以下のレベルがほとんどで、高度に葉や塊茎等の植物組織に蓄積させることができず、有効性が期待できるものは少ない。また葉や塊茎で発現させた場合、発現レベルが生理的条件下で変化することから、発現レベルの変化をいかに抑えるかが実用化を進める上で問題となってきた。そこで我々は、実用的な経口ワクチンを開発するために、イネ種子胚乳で高度に発現している遺伝子のプロモーターを単離して、ワクチン遺伝子をイネの種子に特異的に

発現させる系を開発してきた。さらに、発現させた目的遺伝子産物を高度かつ安定的に蓄積させるために、種子に特異的に存在するタンパク質顆粒への輸送集積や、種子発現に適して導入遺伝子のコドンの最適化通じて進めてきた。このようにして作出された種子に蓄積させたワクチン抗原は、室温下での長期保存性が他のどのような植物組織より優れている。特に発展途上国で必要とされる感染症のワクチンの場合、コールドチェーン（冷蔵保存）や注射器フリーのワクチンとしてその利点は大きい。また、他の植物組織に存在しない貯蔵タンパク質の蓄積されているタンパク質顆粒を利用することで、より安定的かつ高度に蓄積が可能になり、また消化酵素に対する耐性も付与される。特にイネ種子に見られる小胞体由来のタンパク質顆粒に蓄積させた場合、また消化酵素に耐性に優れており、ワクチンを蓄積・搬送する自然の経口デリバリーとして優れている。実際、ワクチンを含む小胞体由来のタンパク質顆粒が腸管関連リンパ組織の抗原の取り込み細胞である M 細胞からとりこまれていることが観察されている。また抗原タンパク質そのものより、小胞体由来のタンパク質顆粒に蓄積させることで極めて低濃度で免疫反応を誘導できることが示されている。

このようなコメの有する穀類としての特徴に着目した医学・農学融合型研究により、コメ型経口ワクチン **MucoRice** の研究開発が進んできた。ワクチンが医薬製剤である事を背景として、当初の植物を使った「食べるワクチン」という概念から、経口医薬製剤としての「経口ワクチン」としての応用化が進んでいる。開発途上国において継続的な問題となっているコレラ菌による下痢患者は世界で 5 百万人が罹患し 20 万人が毎年死亡している。コレラ菌による重篤な下痢症は同病原体が産生するコレラ毒素 (CT) により引き起こされ、それに対する中和抗体を的確に誘導する事で下痢発症を抑制する事が出来る。そこで、同毒素の宿主細胞への侵入タンパク質であり且つ毒性のない B サブユニット (CTB) をワクチン抗原として、コメの彫造タンパク質発現・集積システムを利用して発現させたコメ型ワクチン (**MucoRice-CTB**) は、常温で 3 年間以上、発現量及び免疫誘導能とも安定で、且つ消化酵素であるペプシンに対して耐性を示した。つまり、**MucoRice-CTB** を経口ワクチンとして実験用小動物に投与すると、同毒素に対する中和効果を有している抗原特異的分泌型 **IgA** 抗体と **IgG** 抗体が、腸管粘液中と血清中に各々誘導された。実際に、**MucoRice-CTB** 経口投与群では、コレラ菌やコレラ毒素を暴露しても、まったく下痢症状を誘発せず、一方、通常米投与群または非免疫群では、重篤な下痢症状が確認された。さらに、ヒトに近い霊長類を使った実験においても、経口ワクチンとしての **MucoRice-CTB** の有用性が確認されている。これらの結果は **MucoRice** が注射筒・注射針そして、冷却保存 (Cold-chain) が不要なワクチンであることを示しており、今後の実用化が期待される。**MucoRice** システムは、コレラワクチンとしての有用性の他、コレラ毒素と類似の細菌性毒素である大腸菌易熱性毒素により発症する旅行者下痢症への応用も期待できる。大腸菌易熱性毒素による下痢症及び旅行者下痢症患者の場合は世界で年間約 1 億人が罹患しており 5 歳以下の子供

20 万人が死亡している。さらに、我が国も含めて問題となる重篤な腸管感染疾患としてのノロウイルスワクチンなどへの応用性も期待される。

コメ型ワクチンの理論と技術は感染症対策の経口ワクチンだけではなく、アレルギーをはじめとする各種免疫疾患に対してもその応用性が期待されている。例えば、我が国において国民病とも言われる花粉症への応用である。米の貯蔵タンパク質にスギ花粉症のアレルゲン *Cyr jI* および *II* のうち $CD4^+$ T 細胞の各種エピートープペプチドを発現させたスギ花粉アレルゲンペプチド発現米をスギ花粉症モデルマウスに事前に長期間経口投与した結果、抗原特異的 Th2 細胞による IL-4 などの Th2 型サイトカインの産生抑制、IgE 産生応答抑制、ならびにヒスタミン分泌抑制を誘導することができ、結果的にアレルギー応答を抑制できることが明らかとなった。これも、粘膜免疫機構の有している経口免疫寛容というシステムをターゲットとした新規経口抗原デリバリー法としてのコメ発現系の有用性を示している。まさしく、免疫学と農学が融合する事によって、「食べる米」という既成概念から新しいワクチン生産、貯蔵、投与体としての「医薬米」という概念のもとに、国民の健康を守る為へのコメの有用という新時代が動こうとしている。しかし、一方で、精製せずに常温で安定な医薬米としてのシステムを確立するには、その品質を医薬グレードにできる技術開発と管理法そしてその評価と審査法の確立も必要である。

参考文献

(1) 原著

1. Takagi, H. Hiroi, T. Hirose S., et al., Rice seed ER-derived protein body as an Efficient delivery vehicle for oral tolerogenic peptides. *Peptides* (in press)
2. Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., et al., Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8794-8799. (2010)
3. Nochi, T., Yuki, Y., Katakai Y., et al., A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J. Immunol.* 183: 6538-6544. (2009)
4. Yuki, Y., Tokuhara, D., Nochi, T. et al., Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralizing immunity. *Vaccine* 27: 5982-5988. (2009)
5. Nochi, T., Takagi, H. Yuki, Y. et al., Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain-and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 10986-10991. (2007)
6. Takagi, H. Hiroi, T., Yang, L., et al., A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17525-17530. (2005)

(2) 総説

1. Yuki, Y & Kiyono, H., Mucosal vaccines: Novel advances in technology and delivery. *Expert. Rev. Vaccine* 8: 1083-1097. (2009)
2. Fujihashi, K. & Kiyono, H., Mucosal immunosenescence: new developments and

- vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol.* 30: 334-343. (2009)
3. Takahashi, I., Nochi, T., Yuki, Y. & Kiyono, H., New horizon of mucosal immunity and vaccins. *Curr. Opin. Immunol.* 21:352-358. (2009)
 4. Mestecky, J., Nguyen, H., Czerkinsky, C. & Kiyono, H., Oral immunization: an update. *Curr.Opin Gastroenterol.* 24: 713-719. (2008)
 5. Kunisawa, J., Nochi, T., & Kiyono, H., Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol.* 29: 505-513. (2008)
 6. Yuki, Y. Nochi, T. & Kiyono, H., Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an over view. *Tuberculosis Suppl.*1.S35-44. (2007)
- (3) 本
1. Yuki. Y., Takaiwa, F & Kiyono, H., Transgenic rice as a new vaccine vehicle for control of allergy. R. Pawankar, S. Holgate & L.J. Rosenwasser, eds. *Allergy Frontiers: From Epigenetics to Future Perspectives Vol 6*; 149-166., Tokyo Japan, Springer (2009)