

PRESS RELEASE

**有効で安全・安心な粘膜ワクチンの実用化による社会貢献を目指して：
飲むコメ型経口ワクチンを開発**

MucoRice-CTB19A 株、省エネ型 LED での閉鎖系水耕栽培技術で作製された新しいマーカーフリー遺伝子組換えコメを使った経口コメ型コレラワクチン

MucoRice-CTB line 19A, a new marker-free transgenic rice-based cholera vaccine produced in an LED-based hydroponic system

コメが新しいワクチンの生産・貯蔵・デリバリーシステムになります。省エネ型 LED で良好に発育する遺伝子組換えイネを使った経口コメ型ワクチン MucoRice (ムコライス) -CTB 19A はコメの胚乳細胞にワクチン抗原を発現させることで、常温で安定な蛋白生産・保存ができる技術として確立し、感染症に対するワクチン生産と経口投与方法として応用し、常温安定備蓄型経口ワクチンの開発を可能にしました。

本研究成果は、2024 年 3 月 15 日に科学誌「Frontiers in Plant Science」に掲載されました。

【概要】

これまでに、アグロバクテリウムを用いて形質転換によるヒト用選択マーカーフリーコメ型経口コレラワクチン(MucoRice-CTB)51A 株を確立し、日本と米国で二重盲検、プラセボ対照、ランダム化比較試験にて第 I 相試験を実施しました。MucoRice-CTB 51A は、健康な日米の被験者へ安全性と忍容性及び毒素中和効果を有する CTB 特異的血清抗体誘導を確認しました。米国では用量漸増試験 (6-18g) を計画していたが、MucoRice-CTB 51A 安定供給の課題が浮かび上がり、同試験は 6 g に限定されました。

その課題克服の為に、安定生産・供給と栽培省エネ化を目指して MucoRice-CTB 栽培最適化と LED 照明を使った閉鎖系水耕栽培技術の研究開発を進め確立しました。初代 MucoRice-CTB 51A 株は LED 赤色光不耐性で、生育不全も認められた為、新たに LED で良好に発育し、安定供給が確認出来た MucoRice-CTB 19A を選抜しました。以前に確立したマーカーフリーラインを再検討し、MucoRice-CTB 19A 株を選抜しました。19A 株のサザンブロット解析では、CTB 遺伝子の単一コピーが確認されました。全ゲノムの塩基配列を解読し、1 番染色体の遺伝子間領域における CTB 遺伝子挿入が確認されました。MucoRice-CTB 19A 株の種子バンクを作製・構築し、LED 照明による水耕栽培設備を設置し、省エネ化と臨床試験での使用にための生産能力向上が可能になりました。MucoRice-CTB 19A のショットガン MS/MS プロテオミクス解析では、 α -アミラーゼ/トリプシン阻害剤様タンパク質(主要な米アレルギー)のレベルが低く、51A 株のデータと一致していました。また、

MucoRice-CTB 19A は、マウスにおいて高い経口免疫誘導を有し、コレラ毒素チャレンジに対する防御効果を実証しました。これらの結果は、MucoRice-CTB 19A が、コレラ菌チャレンジ試験を含むヒトにおける第 I 相および第 II 相臨床試験に適した有望な経口コレラワクチン候補であることが示唆されました。

【研究成果】

1. MucoRice-CTB 19A 株の選定

試験条件下での繁殖力が高いこと、株当たりの種子数が高いこと、導入遺伝子が単一コピーであることから、安定した生産系統である 19A 株を新規の MucoRice-CTB 系統として選定しました。

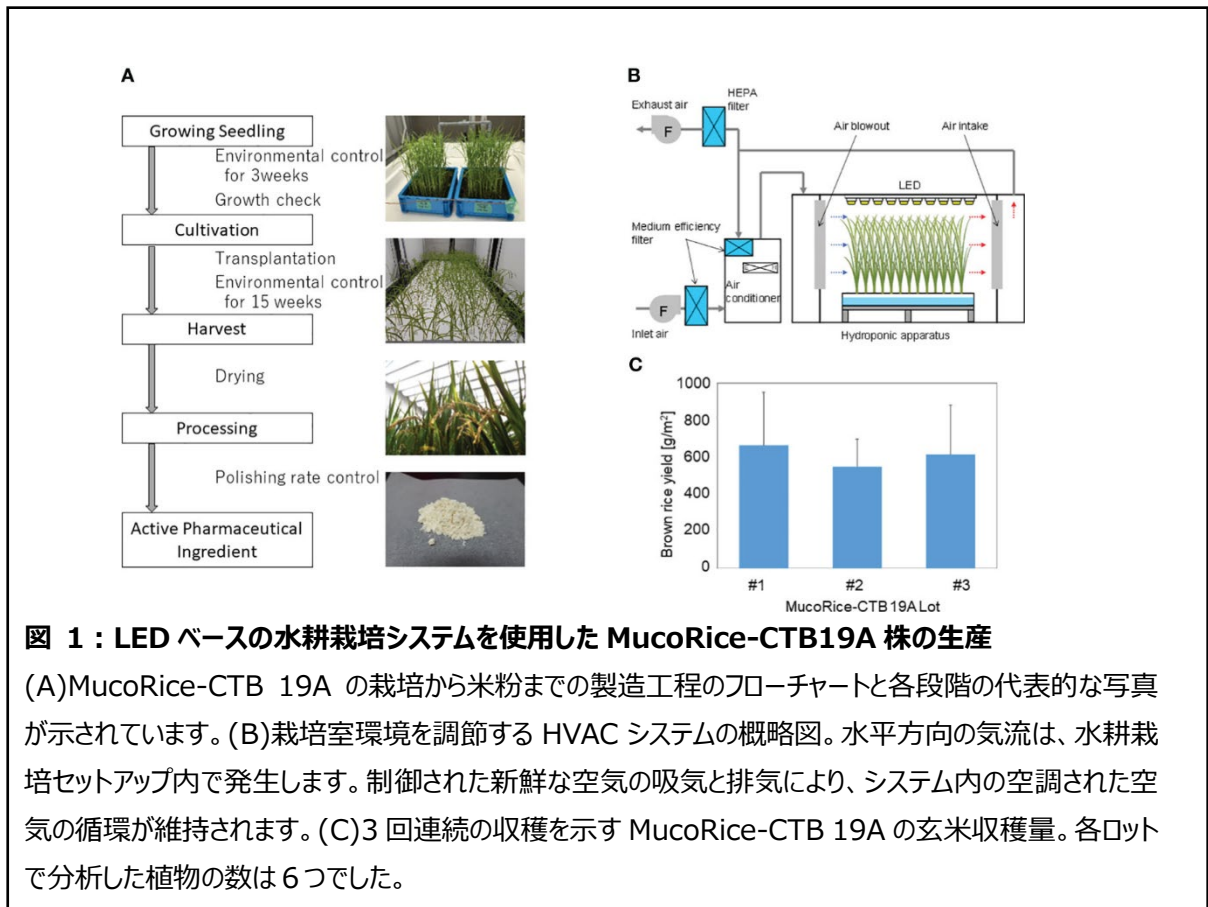


図 1 : LED ベースの水耕栽培システムを使用した MucoRice-CTB19A 株の生産

(A) MucoRice-CTB 19A の栽培から米粉までの製造工程のフローチャートと各段階の代表的な写真が示されています。(B) 栽培室環境を調節する HVAC システムの概略図。水平方向の気流は、水耕栽培セットアップ内で発生します。制御された新鮮な空気の吸気と排気により、システム内の空調された空気の循環が維持されます。(C) 3 回連続の収穫を示す MucoRice-CTB 19A の玄米収穫量。各ロットで分析した植物の数は 6 つでした。

2. LED ベースの水耕栽培システムにおける MucoRice-CTB19A 株の生産

生産の安定性を評価するため、種子バンクを用いて 3 回連続の栽培実験を行いました。発芽率と移植前の生育評価の結果、種子の生存率と苗生育環境の均一性が実証されました。分析に用いた米粉または医薬品有効成分は、図 1A に示すプロセスフローチャートに従って得られました。3 回の栽培ラウンドの玄米収穫量は、それぞれの各ロットで無作為に抽出された 6 つの植物に基づいて計算されました。収量は 588.5g/m² 以上でした(図 1C)。

3. 免疫蛍光法で分析した CTB および貯蔵タンパク質の位置

MucoRice-CTB 19A 株では、CTB シグナルはサブアリュールン層に最も多く存在し（糊粉層の内側に隣接する数層の細胞（subaleurone））、アリュールン層には存在しませんでした。CTB シグナルの強度は、タンパク質顆粒が減少し、デンプン粒が優勢になるにつれて、種子の内部に向かって減少しました。CTB は細胞壁、細胞質、タンパク質体(PB)-I および-II で顕著でした（図 2）。PB-I(13 kDa プロラミン抗体で染色)および PB-II(グルテリン A 抗体で染色)の数とサイズは、RNAi によるこれらの貯蔵タンパク質のダウンレギュレーションから予想されるように、WT よりも MucoRice-CTB の方が減少しているように見えました(図 2)。

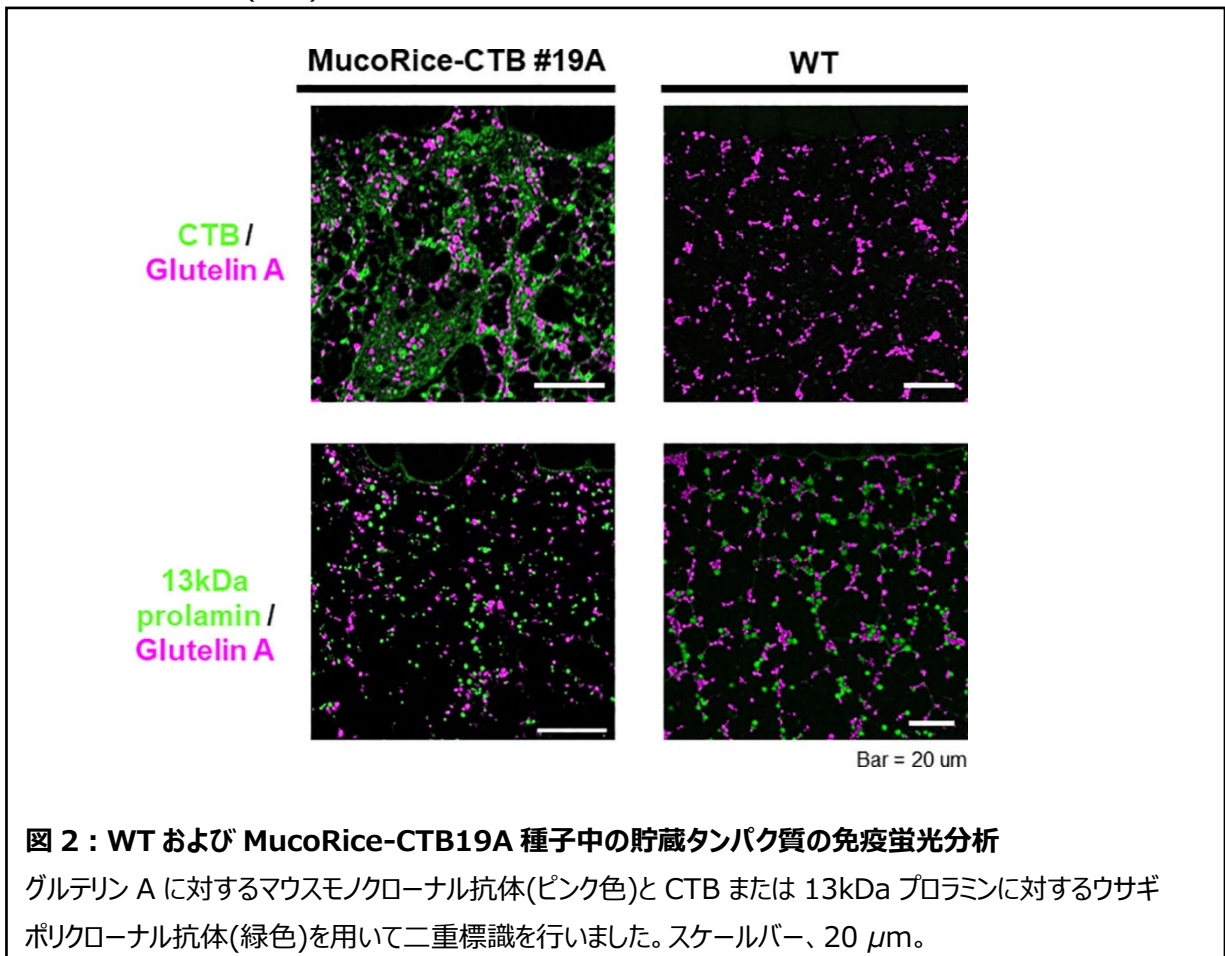


図 2 : WT および MucoRice-CTB19A 種子中の貯蔵タンパク質の免疫蛍光分析

グルテリン A に対するマウスモノクローナル抗体(ピンク色)と CTB または 13kDa プロラミンに対するウサギポリクローナル抗体(緑色)を用いて二重標識を行いました。スケールバー、20 μm。

4. MucoRice-CTB 19A 株のショットガン MS/MS プロテオミクス

本研究では、1 M 塩で可溶化したタンパク質のショットガン MS/MS 分析により、アレルゲンタンパクの確認をしました。MucoRice-CTB 19A では α-アミラーゼ/トリプシン阻害剤様タンパク質ファミリーのレベルが低下していることが示され(表 1)、MucoRice-CTB 19A が低アレルゲン米であることが示唆されました。

Accession number	Description	Allergen name	Theoretical MW (kDa)/pI	Expression ratio MucoRice-CTB/ WT
Q75GX9.1	63 kDa globulin-like protein	63kDa globulin	63.4/8.13	0.825
XP_015628337.1	cupincin	52kDa globulin	52.1/7.25	1.078
BAB71741.1	glyoxalase I	Glyoxalase I	32.5 / 5.67	0.446
AAA72362.1	unnamed protein product	19kDa globulin	19.8 / 6.96	0.991
ACA50505.1	seed allergenic protein RAG2	RAG2	17.8 / 8.03	0.114
XP_015646664.1	seed allergenic protein RAG2-like		17.3 / 8.34	0.133
Q01881.2	Seed allergenic protein RA5	RA5	17.3 / 8.03	0.719
XP_015645223.1	alpha-amylase/trypsin inhibitor RA16	RA16	17.0 / 8.03	0.383

表 1 : MucoRice-CTB 19A で発現するアレルゲン性タンパク質。

5. MucoRice-CTB 19A 株による経口免疫による CT 誘発性下痢に対する防御免疫の誘導

MucoRice-CTB 19A 株は経口免疫原性が高く、防御免疫を誘導できることを示しています (図 3)。MucoRice-CTB 19A 株の米粉をマウスに経口免疫したところ、抗原特異的な全身性抗体および粘膜抗体の免疫応答による防御免疫が誘導されることを確認しました(図 3)。

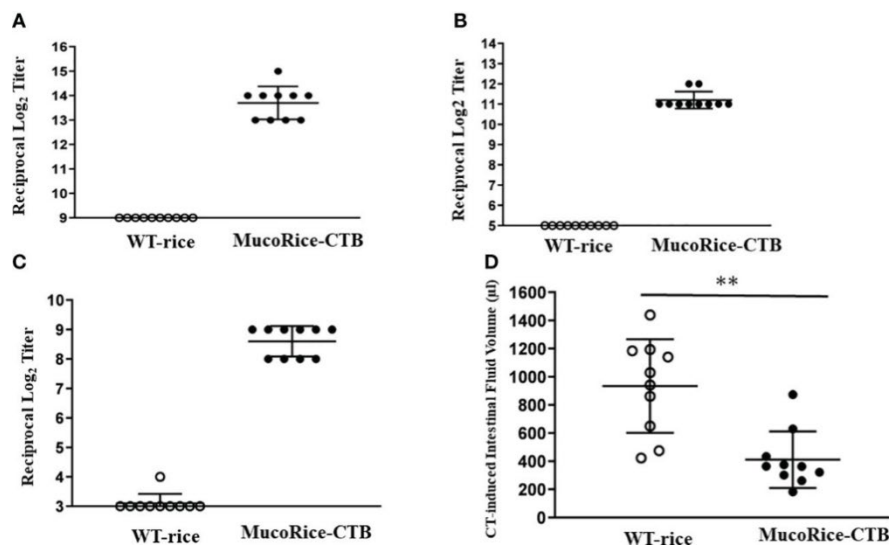


図 3 : MucoRice-CTB 19A 株による経口免疫によって誘導される抗体反応と防御免疫

(A-C)マウスに、PBS に懸濁した MucoRice-CTB 19A 株または WT 米粉で 2 週間間隔で 5 回免疫した。CTB 特異的血清 IgG(A)、血清 IgA(B)、および糞便 IgA(C)応答は、MucoRice-CTB 19A 株で免疫されたマウスで誘導されましたが、WT コメでは誘導されませんでした。(D)MucoRice-CTB 株 19A で経口免疫されたマウスは、WT コメを投与されたマウスよりも腸内水分量が有意に低かった。**P < 0.001。

【まとめ】

今後、第 I 相、第 II 相、第 III 相試験へと臨床開発を進めていくことにより、「ムコライス」(MucoRice-CTB) 経口ワクチンの製品化を実現したいと考えています。発展途上国におけるコレラ毒素 (CT) による下痢症のみならず毒素原性大腸菌由来易熱性毒素 (LT) や志賀毒素が原因の旅行者下痢症の予防に役立つと考えられ、冷蔵保存及びコールドチェーン不要の世界的規模の安価なワクチンを供給できる可能性があります。対象者を拡大して実施される臨床試験および製品化に向け、LED など最新の光源システムを応用し低コストかつ大量安定供給ができる「ムコライス」(MucoRice-CTB) 栽培システムを確立し、千葉大学大学院園芸学研究科で植物工場に関する研究を行っている後藤英司教授をはじめとする植物系・工学系研究者や、イネ遺伝子改変・発現を専門とした農学系研究者そして空調・設備・機器企業の朝日工業社などの異分野融合研究を継続的に取り組んでいます。

発表詳細は下記の URL からご覧ください。

【掲載誌名】

Frontiers in Plant Science

【論文タイトル】

MucoRice-CTB line 19A, a new marker-free transgenic rice-based cholera vaccine produced in an LED-based hydroponic system

【著者】

Yoshikazu Yuki^{1,2,3*}, Shiho Kurokawa^{1,3}, Kotomi Sugiura^{1,3}, Koji Kashima⁴, Shinichi Maruyama⁴, Tomoyuki Yamanoue^{1,3}, Ayaka Honma¹, Mio Mejima¹, Natsumi Takeyama^{1,5}, Masaharu Kuroda⁶, Hiroko Kozuka-Hata⁷, Masaaki Oyama⁷, Takehiro Masumura⁸, Rika Nakahashi-Ouchida^{1,3,9}, Kohtaro Fujihashi^{1,3,9,10}, Takashi Hiraizumi⁴, Eiji Goto¹¹ and Hiroshi Kiyono^{1,2,3,7,12,13} (* Corresponding author)

【著者 (日本語表記)】

幸 義和^{1,2,3*}, 黒河志保^{1,3}, 杉浦琴美^{1,3}, 鹿島光司⁴, 丸山真一⁴, 山野上朋之^{1,3}, 本間綾香¹, 目島未央¹, 竹山夏実^{1,5}, 黒田昌治⁶, 秦裕子⁷, 尾山大明⁷, 増村威宏⁸, 中橋 (大内田) 理佳^{1,3,9}, 藤橋浩太郎^{1,3,9,10}, 平泉尚⁴, 後藤英司¹¹ and 清野宏^{1,2,3,7,12,13}
(* Corresponding author)

【著者所属】

1. 東京大学医科学研究所 東京大学特任教授部門 粘膜免疫学部門
2. 株式会社 HanaVax Inc. R&D 部門
3. 千葉大学医学部附属病院 ヒト粘膜ワクチン学部門
4. 朝日工業社 技術研究所
5. 日生研株式会社
6. 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 作物ゲノム編集研究領域 ゲノム編集技術グループ
7. 東京大学医科学研究所附属疾患プロテオミクスラボラトリー
8. 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 遺伝子工学研究室
9. 千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点
10. Department of Pediatric Dentistry, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
11. 千葉大学 大学院園芸学研究院植物生命科学講座
12. 千葉大学グローバルプロミネント研究基幹 粘膜免疫・アレルギー治療学 千葉大学未来医療教育研究機構
13. 千葉大学-UC San Diego 国際研究拠点 粘膜免疫治療学・ワクチン開発研究センター (Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine: cMAV) (CU-UCSD cMAV)

【DOI】10.3389/fpls.2024.1342662

【URL】<https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2024.1342662/full>

【本リリースに関するお問い合わせ先】

千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点 (cSIMVa) URA 大江