

## 「粘膜ワクチン開発への挑戦」

東京大学医科学研究所炎症免疫学分野教授 清野宏

本日は、日本発ということで、赤と白でタイトルのスライドを作って、その心意気を表現してみました。日の丸を入れたほうがいいかなと思ったのですが、それではあまりにやりすぎかと思いましたので、白と赤の背景スライドでその気持ちを表しました。粘膜ワクチンという視点から、どうやって日本初のワクチン開発に貢献できるかということで話をしてみたいと思います。時間の関係もありますので、あまり細かいデータの話はしないで、現在、我々が粘膜免疫機構を解析してきた結果、基盤にどのような戦略を考えているか、そしてそれを示唆する最近の一部のデータをご紹介しますながら話をしてみたいと思います。

先ほど、山西先生からもお話がありましたけれども、現在、いろいろなワクチンが日本を含め世界中で投与されているわけです。その現場で抱える課題をまず最初に考えてみました。そうしますと、ほとんどのワクチンというのは、現在は注射型のワクチンで投与されています。そして、その注射型のワクチンを使うことにより、先ほど審良先生からも紹介がありましたけれども、自然免疫系、獲得免疫系というものが活性化され、身体の中にきちんとした免疫応答が誘導できるという事実があるわけです。ですから、感染源が身体の中に侵入してから、我々の免疫系がそれを非自己として認識し、排除するという対応が確立していることになります。

一方でワクチンを受ける側ということになりますと、どうしても注射型のワクチンというのは痛いということがあります。それから、ほとんどの新興・再興感染症というのは、粘膜を介して病原微生物が感染するわけですが、注射型ワクチンではそこにはほとんど免疫応答が誘導できていない、無防備な状態にあることになります。

さらに、もう少し現実的な問題を考えてみますと、現在のワクチンというのは皆さんご存じのように、冷蔵保存をしなければいけない。製造から、それを現地まで持って行って、そして現地で投与するまで保存する、つまりコールドチェーンが必須なわけです。しかしながら、このコールドチェーンにかかるコストは莫大でして、一部試算によると 400 億円から 500 億円がコールドチェーンというところにお金がかかっている。それは、1つのワクチンを開発するのに匹敵するようなお金の量ということになります。

注射型のワクチンということを考えてときには、注射針、注射器がどうしても医療用廃棄物ということで、環境という点からも大きな問題になってまいります。さらに、その注射器、注射針を使い回すことで二次感染も考えていかなければなりません。

そうしますと、必然的に注射型のワクチンから、違った形での投与、なおかつ保存しやすいワクチンの開発が重要だということが WHO、NIH、それからビルゲイツ財団等でも強く指摘されているわけです。

そういう視点を考えたときに、粘膜免疫システムを使った経口ワクチンとか、経鼻ワクチンというものが非常に魅力的になってまいります。

このコンセプトと申しますのは、注射型のワクチンでは、なかなか粘膜面に抗原に特異的な免疫応答を誘導することができません。しかしながら、呼吸器系を使いまして、鼻咽頭関連リンパ組織、消化器系ですと、腸管に散在する腸管関連リンパ組織、例えばパイエル板が粘膜免疫システムを使った免疫誘導の要となります。これらの組織には、先ほど審良先生から紹介がありましたけれども、いろいろな樹状細胞が存在するというので、抗原に特異的な免疫応答を最初に引き起こす場として存在しています。

そこに、的確にワクチン抗原を投与することにより、注射免疫で獲得していた全身系の免疫と、注射免疫では獲得できなかった粘膜系にも免疫応答が誘導できる。つまり、2段構えの免疫応答が誘導できるのではないかと。なおかつ、注射器、注射針が必要なくなることになってまいります。その要ということでもよく解析されているのが、腸管に散在する腸管関連リンパ組織、その代表的なものがパイエル板ということになります。

これは、実際にヒトのパイエル板ですけれども、このように隆々としたドーム状の形をしたリンパ節状の組織が我々の腸管の粘膜に散在しているということがわかってきました。そこには B 細胞、その周囲には T 細胞、そして管腔側に面している部分には、非常にたくさんの樹状細胞が存在していることもわかってまいりました。つまり、自然免疫、獲得免疫を誘導できる場であるということになります。

さらに、このパイエル板の管腔側を覆っているこのドーム状、屋根の形をしている上皮細胞層を眺めてみますと、こちらに緑色で示している M 細胞と呼ばれる、非常にユニークな抗原の取込みを専門とする細胞が存在していることがわかってまいりました。

一方で、病原微生物が侵入する場ともなるわけです。そうしますと、1つはこの M 細胞を解析する、もしくは M 細胞に特異的な分子を探索するというので、M 細胞標的型の粘膜ワクチン開発ということが視野に入ってまいります。

実際に粘膜から抗原を投与することによって、本当に免疫応答が誘導できるのかということになると、例えば、ヒトにより近いサルを使った実験で、**p55gag** 抗原と、例えば、粘膜アジュバントとしてよく知られておりますコレラトキシンを混合し、サルに経口ワクチンということで数回投与いたします。

そうしますと、こちらにお示ししてありますように、2 回投与後あたりから血

清中に p55gag、この場合はピンク色でお示ししてありますけれども、ワクチン抗原に対して、きちんと抗原に特異的な IgG 抗体が誘導されてきます。さらに粘膜面を眺めてみますと、例えば、肛門の洗浄液とか、膣の洗浄液に、IgA を中心として、きちんと抗原に特異的な免疫応答が誘導できる。つまり、粘膜からワクチン抗原を投与することにより、我々の生体が持っている粘膜系、全身系両方に免疫応答が誘導できるのだ、ということがわかってきたわけです。

そのような事実を基にして、ワクチン開発ということを考えてときにはどのような課題があるかということになってまいります。こちらにお示ししてあるのが、現在我々が考えている大きな粘膜ワクチンを、実際に具現化していくときに、これから我々が克服しなければならない点であろうと考えています。まず、最初の課題として、いかに効果的に粘膜面にワクチン抗原を送達するか。特に、抗原取り込みの場である M 細胞に的確に送達できるかということが1つの大きなポイントになります。

それから、粘膜アジュバントと呼ばれているような、粘膜免疫を介して、免疫応答を活性化させるような分子・物質の開発。そして、経口ワクチンということを考えてときには、当然消化管という消化酵素も含めて、蛋白にとっては非常に劣悪な環境にあるわけですから、そこでいかに安定性を付与するかということになります。

このようなことを克服し、我々は、粘膜アジュバント付与型の M 細胞標的粘膜ワクチンというものを目指していきたいということになってまいります。

そこで、現在我々が1つ取り組んでおりますのが、農学系の先生方のご協力を得ながら植物を使ったワクチンの生産と、それを使ったデリバリーということになります。皆さんご存じのように、植物を使って、医薬用の蛋白を産生させることについては、既に10年以上前から、いろいろな研究がなされているわけです。例えば、ワクチンの領域では、米国のカーティス・アンセンさんのグループを中心として、例えばバナナ、タバコそしてジャガイモにワクチン抗原を発現させこれをワクチンの原材料として、又ワクチンとして経口投与することが試みられてきました。

確かに、そのようなコンセプト技術は確立したのですが、現在の時点では、あくまでも我々の研究室でのファンタジーということで、そこからどうやって実現化に持っていくのだ、ということが大きなハードルになっているわけです。

最初のほうに話をしましたけれども、これからのワクチンということを考えてときに、常温で長期間保存できるという課題を考えると、我々は穀類が非常に魅力的ではないかと考えました。米国では、既にトウモロコシを使ったワクチンの発現系というのはかなり研究が進んでいるわけです。日本が誇るコメを

そのワクチン生産の場、そしてナチュラルな抗原デリバリーに使えないか、ということをお我々は考えたわけです。

コメに関しては、既に皆さんご存じのように、遺伝子の全長が解明されていますし、またコメに異種抗原を発現させるという遺伝子発現システムも確立されている、このような科学的なバックグラウンドがありましたので、それを使ってワクチン開発につなげていこうということで、我々はここ数年研究を展開してまいりました。

コメ型ワクチンということをお考えたときに、先ほど常温でいかに長期間保存するかが重要だという話をしましたが、皆さんご存じのようにコメの場合には常温で保存しておくことができます。なおかつ、そのコメの中にある蛋白は、常温で長期保存されていても全く変性しないという事実があります。

それから、コメが持っているユニークな蛋白貯蔵体システムは、ある意味では腸管での酵素に耐性を持っているようなものもあることがわかってまいりましたので、このコメの特徴を使って、コメで作らせたワクチンを原材料として、そして経口ワクチンというようなものに持っていけないか、ということをお考えているわけです。

これが、現在我々が使用しているシステムです。農業生物資源研究所の高岩先生、そして京都府立大学田中先生らのグループとの共同研究です。コメのプロテインボディに特異的なプラスミド、グルテン B1 プロモーター、この3'の下流側にワクチン抗原の遺伝子を導入するというのがベイスックなコンセプトです。

つまり、コメタンパク発現系を使ってワクチンを作るシステムを使うと、それを経口ワクチンとして応用し、粘膜系と全身系にきちんと免疫応答が誘導できることとなります。なおかつ、そのワクチン製剤を常温で、保存してもその免疫原性には変化がないということになってまいります。

そうしますと、新しい形での感染症の予防、またバイオテロということをお考えたときには、ワクチン米という形で備蓄しておくだけでもかなりの抑止力になるのではないかと我々は考えているわけです。

次に、このシステムをさらに効果的にするために、どのようにしたら M 細胞にもっと積極的に、的確にワクチン抗原を送達させることができるか、ということが1つの大きなポイントになってまいります。そこで我々のグループでは、この M 細胞について、生物学的な解析を加え、できれば M 細胞に特異的な膜抗原、もしくは膜分子を同定できないか、ということをお CREST の支援を得て研究してまいりました。

特に、その膜分子でもアピカル側に、管腔側側に特異的に発現しているようなものが見つからないか。それが見つければ、新しい形での M 細胞標的型の分

子設計ができるのではないかと、ということを考えてまいりました。

この研究は、私どもの研究室のポストドクの野地君らを中心に進めてきた研究の一部を紹介させていただきます。マウスの M 細胞を単離してまいりまして、それに対する特異的な抗体を作ろうではないかと、ということで研究を進めてまいりました。

そうしますと、こちらに NKM16-2-4 という抗体ですが、これはマウスのパイエル板のドームの屋根の部分形成している上皮細胞層の一部の細胞に特異的に反応することがわかりました。です。ここに、黄色く染まっている細胞が見えますが、これが我々の開発してきた NKM16-2-4 が反応している細胞ということになります。この細胞を眺めてみますと、M 細胞であることがわかってきました。

例えば、形態を見ていただくとわかると思うのですが、基底膜側にポケットを形成していて、そして、そこにリンパ球が入り込んでいる。そして、この NKM16-2-4 という抗体は、M 細胞の管腔側に非常に強く染まることわかってきました。

この特異性については、さらにこれはパイエル板組織全体を同抗体で染めているのですけれども、パイエル板のドームに放射状に散在する M 細胞を特異的に認識して、さらに私どもが2年ほど前に報告いたしました、絨毛の先端部にも M 細胞が発達してくるという事実があるわけですけれども、その M 細胞にもこの抗体は特異的に反応しています。

そういたしますと、この抗体ができたことにより、きちんとこの M 細胞を周囲の上皮細胞、それから胚細胞などから、識別できるということがわかってまいりました。

次に野地君らが考え研究を進めておりますが、この M 細胞に特異的な抗体に、ワクチン抗原を結合させた、M 細胞標的型経口ワクチンの分子設計とその有効性の検討ということになります。

さらに、先ほどお話しいたしましたコメ型ワクチンに M 細胞標的型コンセプトを導入した形態も考えられます。そこで、現在我々が取り組んでおりますのは、この抗体の遺伝子配列を解析し、そして単鎖型の抗体、としてコメ蛋白質貯蔵体に発現できるようなシステムを作り上げていき、M細胞標的型コメワクチンの開発を進めております。これをコメに導入する。

そうしますと、この分子量が大体1万 5,000 から2万ですから、それプラスワクチン抗原をコメに発現させるようなことができるシステムを確立していきたいということで現在研究を進めております。

そうしますと、最終的に私たちがイメージしているのは、**Molecular Farming** を使った新しいワクチンの生産です。それも植物ですから、閉鎖系できちんと

管理した上で、コメを使ってワクチン抗原を作る。そして、それを製剤として新しい形での経口ワクチンに結び付けていきたいと考えています。

しかしながら、それを達成するということになる、まだまだ非常にたくさん課題があります。いかに蛋白貯蔵体に、より効果的に、高発現、蓄積というシステムを確立していくか。さらに多種多様なワクチン抗原を発現できるかなど、きちんと同じようなことが言えるのか、経口ワクチンとしての普遍性をこれから確立していかなければいけない。

遺伝子導入米ということですから、これに対する理解、特にパブリックアクセプタンスというものもきちんと考えていかなければならない。そして、これを実用化するという事を考えると、レギュラトリー・サイエンスという部分が非常に重要になってくるのではないかと考えています。これを克服することになると、本日山西先生からもお話がありましたが、いかに大学、政府、産業、そして国民というものが連携してこれに向かっていくか、ということが必要ではないかと考えています。

本日はいろいろな話をいたしましたけれども、実際にこの研究に取り組んでいる私どもの共同研究者を紹介して終わりにしたいと思います。コメのワクチンということに関しては、私どもの研究室の幸、野地らが、目島、松村、中西らと一緒にやっている研究の一部を紹介させていただきました。また、共同研究者としては、筑波の農業生物資源研究所の高岩先生らのグループ、京都府立大学の田中先生らのグループ、そして産業界からは日本製紙、ロート製薬の協力を得て現在開発研究を進めております。

最後に、山西先生からのメッセージをさらに強調するという点から、我々は、もちろん大学、産業界、政府、さらに我々の考えているコメということを見ると、国民的なパブリックアクセプタンスもこれから考えていかなければいけないので、産官学プラス国民という形で連携を取り、日本発世界に貢献できるワクチンを、粘膜免疫という観点から推進していきたいと考えております。

(パワーポイント終了)

ご清聴ありがとうございました。

#### <質疑応答>

○堀井 清野先生、どうもありがとうございました。私は、食べるワクチンという話を聞く度に、こんな絵空事を考えるのはナンセンスではないかと思っていたのですが、本日の話を聞いていて、ラショナルリーゾニングが非常によくわかったような気がいたします。ありがとうございました。それでは、フロアからご質問がありましたらお願いいたします。

○質問者A 非常に面白い話で、コメを食べるところを非常に感動して

聞いていました。非常につまらない話なのですが、コメというのは基本的に炊きますよね。そうすると、その抗原はどういうことになるのでしょうか。

○清野 まず、私たちは炊くということは考えていないのです。これはワクチンですから、炊くような形で、みんながのべつまくなし食べることになっては困るので、あくまでも新しい医薬製剤を作る媒体と考えています。

○質問者A いままでにも、例えばトマトなどでやられていますが、あれと比べると産生量はどうなのでしょう。

○清野 産生量は、自分たちが実際に比べているわけではないのでなんとも言えないのですけれども、いわゆる論文で報告されている産生量ということで考えると、コメでの産生量は非常にいいです。

例えば、コメ1粒当たりで10~30 $\mu$ g ぐらい蛋白が作られますので、そういう意味では非常に効率がいいと我々は考えています。

○質問者A 私自身先生の話聞いたときにいちばん思ったのは、いわゆる生のコメということを見ると、ズーノーシスというか、いまだたら鳥インフルエンザの汚染地帯で野生の鳥が食べてくれて、そこでワクチン効果がある。それで、完全に精米した形では繁殖しませんから、そういうのが非常に夢があっていいのではないかと考えています。

○清野 それは、いま河岡先生の所とも共同で、なんとかHAの抗原をコメに発現できないかということも始めています。

○山西 コメに入れるのは非常に魅力的なのですが、CTBの話はされましたけれども、通常我々がワクチンをやっているというと、例えば3次元ということは構造を保つとか、等差をきちんとつけるとか、そういうのは非常にプロテクションに重要だと思うのです。コメで作った場合には、自然的な蛋白の構造というのはどのようになるのですか。

○清野 それは、我々が実際に自分たちで作ったもののストラクチャーを見ているというのではないのですけれども、インターフェロンをコメに発現させているシステムは確立しています。その場合にはストラクチャーまでは見ていませんけれども、バイオリジカルにはインターフェロンとしてのアクティビティを持っているという報告はありますので、そこは実験的にはきちんと検証しなければいけないのです。今後はきちんとストラクチャーを保ったものが発現しているか検証していかなければ行けません。と考えています。

○小林 2点お伺いします。1つはこのムコライスの安全性ということですが、例えばああいう抗原、本日はCTBというちょっと特殊な毒素ですが、発現させたわけですから、そうすると、CTBに対しても免疫応答するというのはわかっています。そうすると、ほかのコメの成分に変な免疫応答というか、普通はしてほしくないわけですから、そういう安全性に対するコンサーンズはいかがか

ということ。

もう1つは、データでドーズリスponsカーブがありましたが、 $75\mu\text{g}$ だけがピークで、ああいうドーズの問題、要するにこれはブーストをかけたらかえって落ちてしまうとか、その点をお伺いします。

○清野 ワクチン抗原を導入したことにより、コメの成分に対する免疫応答がどうかということですが、それは我々も重要視している部分があります。後々このようなコメにアジュバントを入れ込んで、そして免疫原性を上げることも考えていかなければいけないことになりますので、その点はきちんと検証していかなければいけないと思います。

CTB 米の場合には賛否両論あるのですけれども、CTB にもアジュバント効果があるということですので、コメに対する免疫応答が誘導できているかというのも一応調べています。分泌型の IgA ですか、要するに食べさせたというだけでは、コメ構成成分に対する抗体は全く誘導できていません。

しかしながら、CTB 米の粉末を直接全身投与することはできませんので、それを水溶性にして、例えばナイーブなマウスに全身系に入れてやるということをする、それは当然コメ構成成分に対して免疫応答が誘導されます。しかしながら、食べさせたということに関しては、それに対しての免疫応答は出ていないというデータは持っています。

2番目の、ドースレンジは、いまは  $75\mu\text{g}$ 、 $150\mu\text{g}$  ぐらいでピークに達していきます。先生がお考えになっているのは、いわゆる経口免疫寛容とか、そういうものが誘導されてこないかということになると思うのですが、それは、これからまだ検討しないといけない課題です。

○宮村 コレラトキシンのケースでご説明いただきましたが、実際に適切な動物を用いて、感染防御というようなことについての定量的なお仕事はあるのですか。

○清野 本日は時間がなくて話をしていないのですが、CTB 米を使ったときにはコレラトキシンに対する血清中の抗体ですか、分泌液中の抗体が誘導されていますので、トキシンに対する中和効果はあるかということに関しては予備試験のレベルですけれども検討しています。それに対しては、きちんと中和効果のある抗体が誘導できているという事実はあります。

先生がおっしゃったように、これからもっとリレバントなものにということで、現在我々が考えているのはバイオテロ対策用としてのワクチンです。ボツリヌス菌の HC 抗原をいまコメに発現させるというシステムを確立していますので、それを使って感染防御実験を、マウスからサルでもやっていく、ということで実験は進めています。

○堀井 ちょっと確認しておきたいのですけれども、山西先生、宮村先生の質

問のポイントは、コメという含水量の非常に少ないパーティクルの中で、実際に蛋白質が水溶液中と同じような状態で存在するかどうか、というところに皆さん関心があるかと思うのです。

○清野 それに関しては、私たちがコメに注目したというのはそこもあります。ご指摘いただいてありがとうございます。コメの蛋白貯蔵体は、先ほどお示しましたけれども、プロテインボディ I と II というのがあります。プロテインボディ II は、わりと疎水性に蛋白を貯めます。プロテインボディ I のほうは、わりと非疎水性に蛋白を貯めるという事実はあります。

それで、デリバリーということを考えたときには、いわゆる徐放性と遅延性という形での効果も期待できるのではないかということで、コメの抗原デリバリーとしての魅力というのを我々は考えています。

○堀井 トマトとはえらい違いだと思うのです。

○ミヨシ 北里研究所のミヨシです。ワクチンのデリバリーシステムの話で、M 細胞を標的にしていますが、腸管だと dendritic cell が手を伸ばして取り込むという型もあると思うのです。そこで限定することの利点と、もしくは欠点があれば教えていただきたいと思います。

○清野 我々は M 細胞に標的することは必要と考えていますが、それだけではないと思います。ご指摘のように樹状細胞を標的とすることも考えられます。確かに樹状細胞が手を出して抗原を取り込むというレポートはあるのですけれども、この上皮のところを精査していきますと、その頻度は非常に少ないのです。実際に樹状細胞から手を出しているというのは、ですから、そのカスケードがいかに有効に動いているかというのは、確かに事実としてはありますけれども、それがどのぐらい実際の免疫応答にコントリビューションしているか、というのはこれからの検証が必要だと思います。