

花粉症減感作療法のためのアレルゲンエピトープ含有卵の開発

九州大学大学院工学研究院・教授 上平 正道

■ 緒 言

現在、日本国民の4人に一人は花粉症を患っているといわれ、効果的な治療法が開発が望まれている。主に行われている花粉症治療としては、抗ヒスタミン剤やステロイド剤を用いた対症療法である。これらは症状を一時的に抑えることはできても、根本的に治癒するものではない。一方で、花粉症の根治療法として減感作療法が行われている。これはアレルゲンそのものを微量ずつ、一定期間継続的に投与することにより、次第に身体がアレルゲンに慣れていく仕組み(免疫寛容)を利用するものである。最近では、より簡易で安全性が高く、かつ効果の期待できる治療法として、アレルゲン中のT細胞により認識されるペプチド配列部位(T細胞エピトープ)をアレルゲンの代わりに投与する減感作療法が注目されている。主要なスギ花粉アレルゲンとして、これまでにベクテートリアーゼ(Cry j 1)とポリメチルガラクトクロナーゼ(Cry j 2)が同定されており、Cry j 1より3つ、Cry j 2より4つの治療効果が期待できるT細胞エピトープが決定された¹⁾。さらにこれら7つのエピトープペプチドを連結させた、96アミノ酸残基からなる合成エピトープペプチド・7crpが開発されている²⁾。7crpはT細胞には認識される一方でスギ花粉アレルゲン特異的IgEには結合しないことから、副作用の無いペプチド免疫療法への応用が期待されている。現在、トランスジェニック米に7crpを発現させ、この米の食餌によるスギ花粉症の治療が試みられている。

本研究では、これまで我々が独自に開発してきた遺伝子導入ニワトリ作製技術^{3,4)}を応用して、スギ花粉アレルゲンエピトープペプチド含有タンパク質を生産する遺伝子導入ニワトリの作製を目的とした。スギ花粉アレルゲンエピトープペプチドとしては7crpを使用し、ニワトリ卵白由来リゾチームのC末端に7crpを付加した融合タンパク質としてニワトリの卵で生産させることを目指した。疎水性に富んだ7crpが親水性のあるリゾチームとの融合により粘膜内に取り込まれやすくなること、さらに、目的生産部位(卵白)で豊富に発現しているタンパク質との融合タンパク質として発現させることで卵白での発現量が高まることを期待して研究を行った。

■ 方 法

ニワトリへの遺伝子導入の手段として、目的遺伝子を宿主ゲノムに高効率に組み込むことができるレトロウイルスベクターを用いた。本研究では、ニワトリ卵白リゾチーム(cLys)と7crpを融合タンパク質(cLys-7crp)として生産するためのレトロウイルスベクター生産用プラスミドであるpQMSCV/ Δ A-cLys7crp-IRES-EGFP(図1)を作製して用いることとした。本ベクターの骨格であるMSCVは、マウス幹細胞ウイルスに由来するレトロウイルスベクターをベースとしており、cLys-7crp発現ユニットの下流に脳心筋炎ウイルス由来のIRES(Internal ribosome entry site)配列と緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を配置しているため、cLys-7crpとEGFPが共発現するようになっている。

レトロウイルスベクターの生産は、ウイルス生産のためのプラスミドをリポフェクション法により293FT細胞に一過性で遺伝子導入することで行った。培養液中に生産されたウイルス粒子を超遠心により濃縮することで調製した高力価ウイルス溶液を、ステージ13~16のニワトリ胚体心臓にマイクロインジェクター(Transjector 5246; Eppendorf)を用いて約2 μ l注入したのち、胚培養により孵化させた。

目的遺伝子がニワトリのゲノムに組み込まれているかは、血球や各組織から抽出したゲノムDNAを鋳型として、ベクター配列に特異的なプライマーを用いたPCR法によって行った。さらに導入遺伝子数の定量は、ゲノムDNAを鋳型としたリアルタイムPCR(LightCycler 1.5; Roche)によって行った。コピー数を決定する際には、ニワトリ1細胞あたりのゲノムの重さを2.6pg/cellとして計算した。

cLys-7crpの遺伝子導入ニワトリでの発現の検出は、抗7crp抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。遺伝子導入ニワトリより採取した血清、血球、卵黄、卵白をウェスタンブロット法により解析した。また、孵化後に死亡したニワトリを解剖し、主要な組織(心臓、筋肉、肝臓、脳、脾臓、腎臓、肺)についても解析を行った。SDS-PAGEにより分離・展開したタンパク質をPVDF膜に転写後、1次抗体としてマウス抗7crp血清を使用し、室温で1時間反応させ、TBS-Tで5分×3回洗

浄したのち、2次抗体としてPOD標識されたヤギ抗マウスIgG抗体(Santa Cruz Biotechnology)と室温で1時間反応させた。その後、市販の検出キット(ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare)を用いてcLys-7crpの発現を確認した。

■ 結果

(1)レトロウイルスベクターの生産

レトロウイルスベクター生産用プラスミド pQMSCV/ Δ A-cLys7crp-IRES-EGFP は、特定の細胞で自己複製能をもち、さらに5'LTRのプロモーターをCMV/MSV融合プロモーターに置換しているため、一過性発現による高力価レトロウイルスベクターを生産することが可能となっている。このプラスミドと *gag/pol* 遺伝子発現プラスミドおよび外皮タンパク質 VSV-G 発現プラスミドを、293FT細胞株にコトランスフェクションすることによりウイルスベクターを生産させた。生産させたウイルス溶液を超遠心により濃縮を行ったところ 2.6×10^9 IU/ml の力価が得られた。

ウイルスベクターを用いてNIH3T3細胞に遺伝子導入を行い、EGFP発現をもとに細胞のクローニングを行い、各クローンにおけるcLys-7crp発現の検出を行った。培養上清でcLys-7crpの生産は確認できなかったものの、細胞ライゼートでは適切な分子量で生産されていることが確認できた。

(2)cLys-7crp タンパク質を生産する遺伝子導入ニワトリの作製

発生中のニワトリ胚にcLys-7crp融合タンパク質生産のための濃縮レトロウイルスベクター溶液 (8.3×10^7 IU/ml ~ 2.6×10^9 IU/ml) を注入した。胚へのインジェクションは、導入遺伝子発現が最大化される発生ステージ15前後^{4,5)}で行い、計4回の遺伝子導入実験を行い孵化させた(表1)。遺伝子導入処理胚の孵化率の平均は31% (20 ~ 44%)であった。

(3)遺伝子導入ニワトリのゲノム解析

遺伝子導入個体より得られた血球細胞よりゲノムを抽出後、ゲノムPCRを行い、アガロース電気泳動による確認を行った。その結果、すべての遺伝子導入個体においてウイルスベクター由来の Ψ^+ 配列の増幅が確認でき(図2)、目的遺伝子を発現させるための遺伝子がニワトリゲノム内に組み込まれていることが分かった。

(4)遺伝子導入ニワトリの血球細胞内導入遺伝子数測定

血球細胞内での導入遺伝子数を測定するために、血球細胞から抽出したゲノムをリアルタイムPCR法により解析した(図3)。ウイルス力価の比較的高かった遺伝子導入実験2回目、4回目の遺伝子導入個体の導入遺伝子数が概して高く、そのほとんどで細胞あたりの導入遺伝子数が0.5以上となった。個体差はあるものの、高いウイルス力価であるほど高い遺伝子導入効率を得られた。

(5)遺伝子導入ニワトリにおけるレポーター遺伝子EGFPの発現確認

遺伝子導入ニワトリに青色LEDライトをあててベクターに組み込んだレポータータンパク質EGFPの発現を観察したところ、眼球、皮膚、嘴で緑色蛍光が確認できた(図4)。また、血球細胞を蛍光顕微鏡下で観察したところEGFPの発現がみられたので、FACSにより蛍光細胞割合を解析したところ、導入ウイルス力価の高かった個体で多くのEGFP発現細胞が確認でき、リアルタイムPCRによるコピー数の解析結果と強い相関がみとめられた(図5)。

(6)遺伝子導入ニワトリにおけるcLys-7crp融合タンパク質の発現確認

孵化後に死亡した遺伝子導入ニワトリを解剖後、主要な組織(心臓、筋肉、肝臓、脳、脾臓、腎臓、肺)を採取し、各組織についてウエスタンブロット法によるcLys-7crp融合タンパク質の発現解析を行ったところ、心臓において比較的強い発現が確認できた(図6)。さらに、卵白の解析では、遺伝子導入率の高かった個体(206、436など)で目的の分子量サイズのバンドを検出することができた(図7)。一方で、遺伝子導入ニワトリより採取した血清、血球細胞、卵黄についても、ウエスタンブロット法による解析を行ったが、いずれの個体でも目的分子量のバンドは検出されなかった。

■ 考察

本研究では、スギ花粉アレルゲンの7つのT細胞エpitepペプチドを連結させた7crpと卵白リゾチームを融合タンパク質として生産させるために、遺伝子導入のためのレトロウイルスベクター生

産用プラスミドを作製し、同プラスミドから高力価のレトロウイルスベクターを調製することができた。このレトロウイルスベクターをニワトリ胚に微量注入することで遺伝子導入を行い比較的高い孵化率でニワトリを孵化させることができ、また全ての個体で導入遺伝子配列を有していることがわかった。リゾチームとエピトープペプチドの融合タンパク質として設計した cLys-7crp が、発現されたときにどのような構造をとっているかについては不明であり、配列中のリゾチームが本来の活性を有しているのかについても不明であるが、遺伝子導入後の胚発生時や孵化後の様子から、cLys-7crp 融合タンパク質を発現させたことによる個体への影響はあまりないものと考えられる。細胞への導入遺伝子量や血球での EGFP 発現細胞の割合から高い遺伝子導入効率が見られているものと思われたが、cLys-7crp の発現は、血清や心臓以外の組織細胞ではほとんど発現されていないか、非常に低いレベルであった。卵白では高発現ではないものの確実に生産されていることが確認できた。以前の研究で、ヒトエリスロポエチンを生産する遺伝子導入ニワトリを作製しているが、血清での目的タンパク質生産レベルは卵白におけるそれよりも一桁程度低かった⁶⁾。今回、血清よりも卵白で目的タンパク質が生産されやすかったという点では、これと同様の傾向がみられた。疎水性部位が散在するエピトープペプチドを含有している cLys-7crp の場合、何らかの原因で細胞外への分泌が低下していると考えられ、そのため血清や組織細胞では低レベルになったのかもしれない。

今後、花粉症モデルマウスを用いて、卵白で生産された cLys-7crp が減感作療法に利用可能であるか検証していく予定である。

■ 要 約

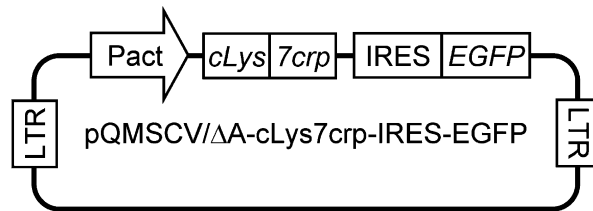
スギ花粉症の減感作療法の治療薬とするために、スギ花粉アレルゲンの7つのT細胞エピトープペプチドを連結させた7crpと卵白リゾチームを融合タンパク質として生産させるための遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミドを作製し、これから調製した高力価レトロウイルスベクターを用いたニワトリ胚への遺伝子導入によって、同タンパク質を卵白に生産する遺伝子導入ニワトリを作製することができた。

■ 文 献

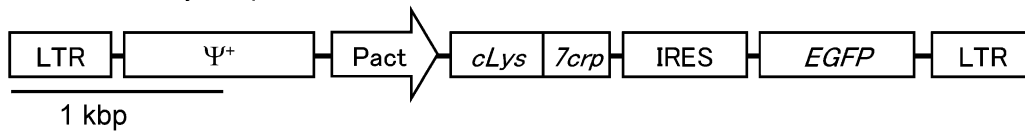
1. Saito, S., Hirahara, K., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Hino, K., Taniguchi, Y., Sakaguchi, M., Inouye, S., Shiraishi, A., 2000, Identification of T cell determinants in Cry j 1 and Cry j 2 of size suitable for peptide immunotherapy against Japanese cedar pollinosis, *Annu. Rep. Sankyo Res. Lab.*, 52, 49-58.
2. Hirahara, K., Tatsuta, T., Takatori, T., Ohtsuki, M., Kirinaka, H., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Taniguchi, Y., Saito, S., Sakaguchi, M., Inouye, S., Shiraishi, A., 2001, Preclinical evaluation of an immunotherapeutic peptide comprising 7 T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 94-100.
3. Kamihira, M., Nishijima, K., Iijima, S., 2004, Transgenic birds for the production of recombinant proteins, *Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol. 91)*, T. Kobayashi ed., pp.171-189, Springer-Verlag, Berlin.
4. Kamihira, M., Ono, K., Esaka, K., Nishijima, K., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K., Iijima, S., 2005, High-level expression of scFv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector, *J. Virol.*, 79, 10864-10874.
5. Kawabe, Y., Naka, T., Komatsu, H., Nishijima, K., Iijima, S., Kamihira, M., 2008, Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation, *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 598-601.
6. Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motonon, M., Watanabe, H., Yamashita, T., Nishijima, K., Kamihira, M., Iijima, S., 2008, Production of human erythropoietin by chimeric chickens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 834-839

表1 遺伝子導入に用いたウイルスカ価と遺伝子導入胚の孵化率

実験番号	ウイルスカ価 (IU/ml)	胚数		孵化率 (%)
		導入数	孵化数	
1 (1XX)	8.3×10^7	9	4	44.4
2 (2XX)	3.8×10^8	16	7	43.8
3 (3XX)	1.9×10^8	15	4	26.7
4 (4XX)	2.6×10^9	25	5	20.0
Total	-	65	20	30.8



[MSCV/ΔA-cLys7crp-IRES-EGFP]



LTR; long terminal repeat from mouse stem cell virus (MSCV), **Ψ⁺**; packaging signal sequence from MSCV, **Pact**; chicken β-actin promoter, **7crp**; major T cell epitopes of Japanese cedar pollen allergens, **IRES**; internal ribosome entry site, **EGFP**; enhanced green fluorescent protein

図1 レトロウイルスベクター生産用プラスミドの構成

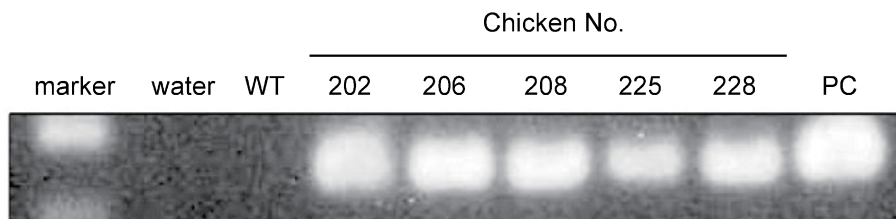


図2 遺伝子導入ニワトリのゲノム解析

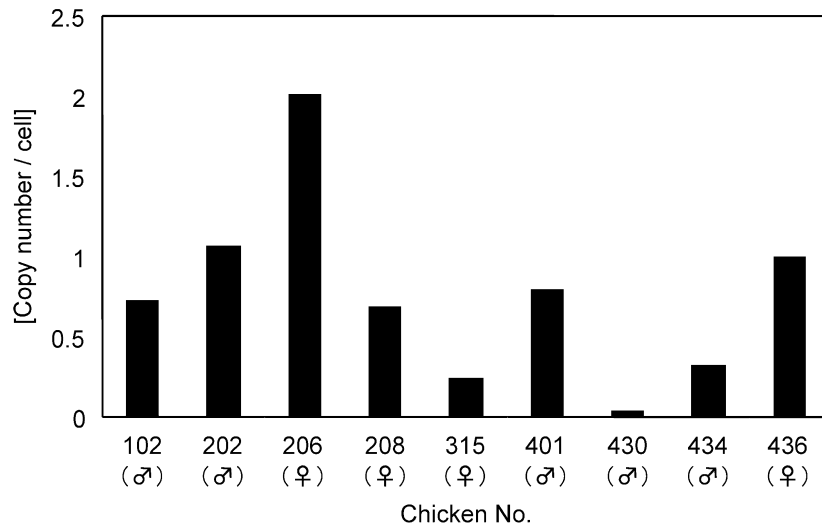


図3 血球細胞内の導入遺伝子コピー数解析

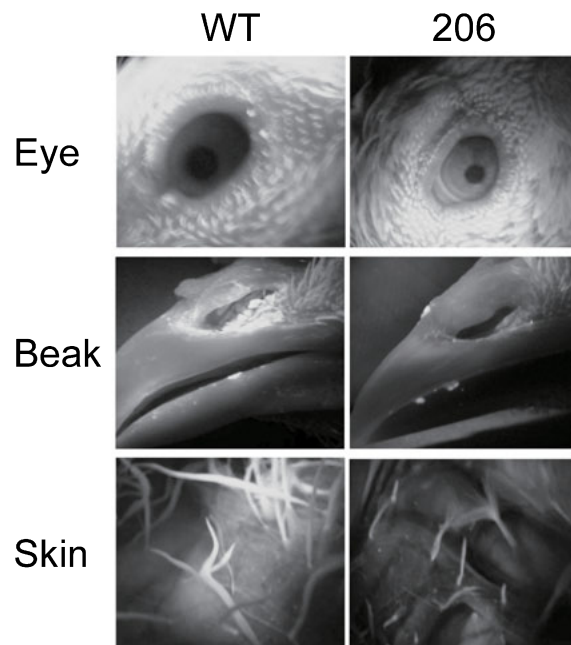


図4 遺伝子導入ニワトリのEGFP発現観察

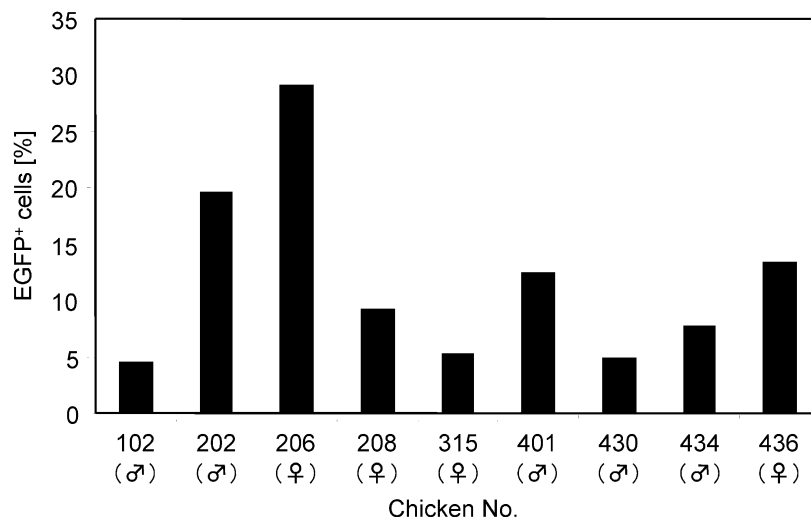


図5. 血球細胞におけるEGFP発現細胞の割合

Chicken No.101

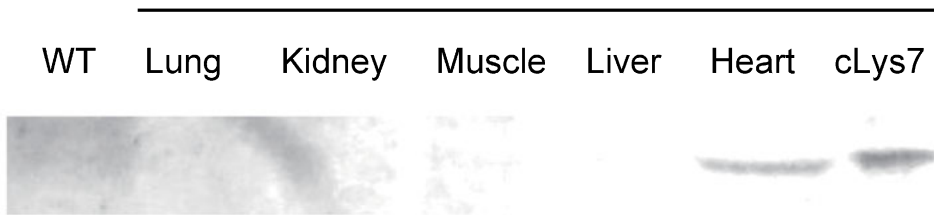


図6 遺伝子導入ニワトリ組織のウエスタンブロット分析

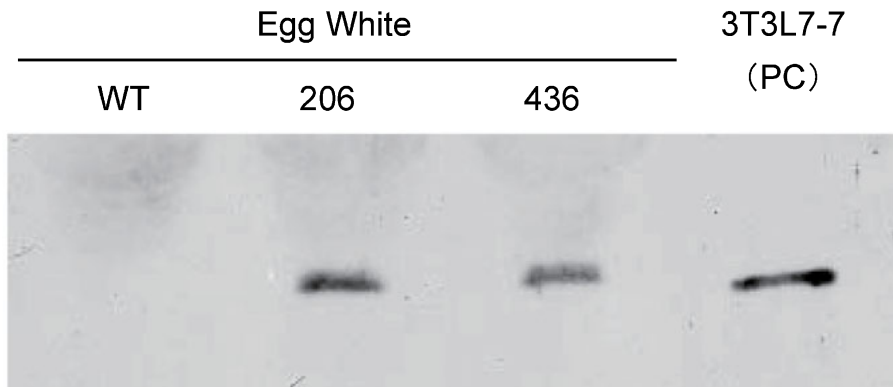


図7 卵白のウエスタンブロット分析