

十周年記念講演 総説

粘膜免疫学による One Health への貢献

清野 宏

東京大学医科学研究所
(感染・免疫部門 炎症免疫学分野／国際粘膜ワクチン開発研究センター)
〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

【要 約】

消化器、呼吸器、生殖器、泌尿器といった粘膜関連組織には、粘膜免疫系と呼ばれる、全身免疫系とは異なる、独自の免疫機構が発達している。インフルエンザ、肺炎球菌、HIV、コレラなどのヒトを脅かす感染症の多くは、この粘膜組織に病原体が感染することで引き起こされる。家畜の三大疾病である、乳房炎、肺炎、下痢も、全て粘膜組織での感染に伴う疾病である。粘膜免疫系に関する正しい理解と、それに基づいた、粘膜組織を標的としたワクチンや免疫療法の開発は、ヒトのみならず家畜の感染症を予防・治療する上で非常に重要である。その点からも、病気の理解と解明に基づく新規予防・治療法の開発に向けて、獣医学、畜産学、医学、農学、植物学、環境学、工学などの学問融合により **One Health** という視点から病気の理解と新規予防・治療法の開発に向けての新展開が始まっている。つまり、Fusion Science、学融合により、人畜共通感染症をはじめとする色々な病気に対して革新的な予知・予防・治療法開発に向けた研究プラットフォームを構築していく事が重要である。その一例として、Fusion Science が生み出した次世代型ワクチンとして期待されるコメ型経口ワクチン MucoRice システムについて紹介する。

キーワード: IgA、感染症、経口ワクチン、粘膜免疫、パイエル板

【はじめに】

ワクチンは、特定の病原体に対する抗体産生をはじめとした抗原特異的免疫応答を惹起する生物製剤を一般的に指す。感染症は世界の死因のうちでも大きな割合を占めており、いまだ多くの人命が感染症により失われている。また、獣医、家畜領域においても感染症は大きな問題である。ヒト、動物に問わず感染症に対する最も効率的な対抗手段の一つは、ワクチンであることは言うまでもない。

ワクチンにより防御すべき、生体の様々な部位に病態を引き起こす病原菌の感染経路として

は、大きくは2つに分けられる。1つ目は、病原体の直接的な体内への侵入、例えば、虫刺症等による物理的皮膚バリアの破壊による感染、そして2つ目は、呼吸、消化、性行為など生理的行為による粘膜表面を介した感染である。このように感染経路から感染症を考えると、病原体に対して、生体の体内と外界に直接暴露されている呼吸器・消化器・生殖器粘膜面の両方に効果的に抗原特異的防御免疫を誘導する事が重要になってくる。

注射型ワクチンは体内に確実に抗原特異的防御免疫を誘導出来るが、粘膜面には効果的に誘導出来ない。一方、消化管に代表される粘膜に存在する粘膜免疫システムを駆使した「粘膜ワクチン」は、効果的に体内と粘膜面両方に抗原特異的防御免疫を誘導する事が出来る。病原体

受理：2015年4月24日

の二つの侵入ルートを考慮すると、体内と粘膜面両方に抗原特異的防御免疫応答が誘導出来る「粘膜ワクチン」の有用性が見えてくる。

【経口ワクチンの特徴】

経口ワクチンは、従来のほとんどのワクチンの接種方法である皮下接種（注射）による方法と比べて、下記にあるように優れている点が多くつがある。特に発展途上国における感染症の深刻な流行を防ぐ意味において、これらの優位点は大きな意味を持つ。また、動物・家畜の感染症予防という点からもワクチンを経口的に投与出来る事は、簡便性という点からもその開発が期待される。

第一に経口での投与には注射筒および注射針を使用する必要がないことが挙げられる。注射型ワクチンは使い捨てタイプの注射筒および注射針を使用するが、その使用済み注射筒・針は、医療用廃棄物処理の問題が浮上してくる。また、発展途上国における注射器・針の再使用による2次感染リスクが増大する。経口ワクチンの場合には投与に特別な器具を用いることはなく、これらの問題は発生しない。

第二に、上述したように粘膜ワクチンの一つである経口ワクチンは、注射型ワクチンでは得られない、粘膜面での免疫が誘起されることが挙げられる。つまり、体内と粘膜面両方に防御免疫を誘導出来る効果的な免疫手法である。さらに、経口ワクチンは上述のように注射器を用いず、非侵襲性であるため、小児はもとより、動物・家畜への投与も比較的容易である。

【コメ型経口ワクチン MucoRice- の開発】

近年、農学・植物学における植物バイオテクノロジーの進歩により、様々な植物のゲノム中に外来遺伝子を導入し、有用なタンパク質生産体として利用する技術が開発されてきた。植物は工業的な生産スケールアップが容易であり、生産コストも低く抑えることが出来る。さらに、人工太陽光、人工風を駆使した完全閉鎖系植物工場開発に向けての工学分野の存在と研究の発展がある。植物の特性とそれを支える人工栽培工学を利用して、植物による医薬品生産という新たな試みが世界中で進んでいる。これまでバイオテクノロジーを活用した医薬品生産は、哺

乳類細胞、酵母もしくは大腸菌の培養系を駆使したりコンビナントタンパク質は人体に投与する点から、必ず抽出・精製工程を経て製造してきた。一方で、植物にタンパク質を作らせた場合、可食部に均一かつ安定的に発現すれば、そのまま精製しないで経口投与できるような医薬品として使用できる可能性がある。

このような視点を考慮しながら、当研究グループでは、「冷蔵保存・注射器・注射針不要なワクチン開発」に向けて、粘膜免疫学、農学・植物学、人工栽培工学の異分野融合により我が国が誇る「コメ」をワクチンの生産体・貯蔵体・投与体とする MucoRice システム開発を推進してきた。腸管感染症として開発途上国を中心として数百万人が今でも感染し、十数万人が死亡するコレラは、同菌が腸管内で産生するコレラ毒素（CT）により重篤な下痢症を引き起こされる。当研究グループは、コレラ菌が産生するコレラ毒素の一部で、無毒でかつ免疫原性が高いサブユニット抗原（コレラ毒素 B サブユニット；CTB）をイネの種子に発現させ、コメのまま投与することでCTBに対する免疫を誘起できる米型経口ワクチン、MucoRice-CTBを開発した（図1）。例えば、MucoRice-CTBを粉末状にして、マウスに経口投与することで、コレラ菌が産生するコレラ毒素に対する防御免疫を粘膜面と体内両方に獲得させることに成功した。さらに、ヒトと同じ霊長類であるサルに対する MucoRice-CTB の経口免疫により、防御免疫誘導効果が確認されている。

【MucoRice システムの 家畜用ワクチンとしての応用性】

MucoRice システムは、ワクチン抗原を発現しているコメ種子の粉末を原薬とすることで様々な応用性が考えられる。例えば、家畜用経口ワクチンとして、至適濃度の MucoRice 原薬を家畜用飼料に混ぜる事で、経口投与する可能性が考えられる。現在の畜産用ワクチンとして、豚や牛といった大動物に投与するワクチンの大部分は皮下あるいは筋肉内に抗原を注射する手法を採用している。しかしながらヒトと同様、ワクチン接種時の動物へのストレス緩和や、食肉として出荷する際に動物体内に注射針が残存する危険性を回避できることから、経口ワクチ

ンの畜産への応用は現実的であるといえる。当研究グループでは MucoRice による豚の経口ワクチン開発をも目指し、研究を進めている。哺乳期の豚はウイルス性および細菌性の下痢症に大変感受性が高く、これらの疾病に対して受動免疫により仔豚を発症から防御することが定法となっている。牛と同様、豚では胎盤を介した母子間の抗体授受が起きないため、乳汁中に防御抗体が分泌され、乳を摂取した仔豚の腸管で病原体や毒素の侵入を阻止できるよう働くワクチンが必要となる。

CTB と相同性の高い毒素である易熱性毒素 [Heat labile toxing (LT)] を産生する腸管毒素原性大腸菌症を対象疾病とし、妊娠中の母豚を給餌する際に MucoRice-CTB を混合し 2 週間隔で 4 回経口免疫した結果、LT の B サブユニット抗原と交差する抗体の乳汁中への分泌が確認された。抗体は IgG に加えて通常注射型抗体では産生されにくい IgA も分泌された。IgG は乳汁から新生豚の血中への移行し、また、IgA は出産後の追加経口免疫により常乳中に継続的に分泌されることが示された。コメ型経口ワクチン MucoRice の、畜産 / 伴侶動物への更なる展開が期待される。

【経口ワクチンへの期待と課題】

経口ワクチンは注射型ワクチンにはない様々な優位性があるが、世界では限られた数の経口ワクチン (例、ポリオウイルス、ロタウイルス、コレラ) しか上市されていない。この原因としては、非常に簡便で、疼痛、精神的不安が伴わない「経口 = 口から飲み込む」という接種方法に起因する課題 (例、腸管での消化・分解) や、個々ヒトの腸管における腸内フローラ多様性にとまなう免疫状態 (例、免疫応答力) の違いに起因する問題などが考えられる。

これらの課題を克服するには、コメ型ワクチンの様に、消化耐性を有し、的確に腸管免疫誘導組織 (例、パイエル板) に抗原を送達する新規粘膜デリバリー体の開発が重要となる。さらに、腸管粘膜は多種多様な抗原に暴露されており、特に生体にとって有益な抗原 (例、共生微生物、食物抗原) に対して過剰な反応をしない様に寛容状態 (例、経口免疫寛容) が構築されている。そこで、一過性に粘膜免疫機構を活性

化させ、効果的に経口投与されたワクチンに対して抗原特異的免疫応答を惹起する粘膜アジュバントの開発も重要になってくる。このような課題は、ヒト用経口ワクチンだけではなく、伴侶動物・家畜用ワクチンでも共通の課題であり、垣根を超えた共同研究体制の下に、ヒト、伴侶動物、家畜における腸内フローラ、粘膜免疫、上皮バリアなどの共通性、ユニーク性の基礎的検討をする中で、開発研究を推進していく事が益々重要となってくる。

【謝辞】

本原稿の準備に当たりご協力いただいた、当研究室 鹿島光司、竹山夏実、幸義和に感謝いたします。本研究内容の一部は、科学研究費補助金基盤研究 (S) 23229004、CREST「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」、「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」シーズ C により支援されており、この場を借りて感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F. and Kiyono H. 2007. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 10986-10991.
2. Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima, M., Terahara, K., Kim, DY., Fukuyama, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Kawaoka, Y., Igarashi, O. and Kiyono, H. 2007. A novel M-cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine induces effectively antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* **204**: 2789-2796.
3. Nochi, T., Yuki, Y., Katakai, Y., Shibata, H., Tokuhara, D., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nakanishi, U., Ono, F., Mimuro, H., Sasakawa, S., Takaiwa, F., Terao, K., and Kiyono, H. 2009. 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.
4. Yuki, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Yasuda, H., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Kataoka, N., Nakanishi, U., Hagiwara, Y.,

- Fujihashi, K., Takaiwa, F., and Kiyono, H. 2009. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralizing immunity. *Vaccine* **27**: 5982-5988.
5. Yuki, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Yasuda, H., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Kataoka, N., Nakanishi, U., Hagiwara, Y., Fujihashi, K., Takaiwa, F., and Kiyono, H. 2009. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralizing immunity. *Vaccine* **27**: 5982-5988.
 6. Yuki, Y., and Kiyono, H. 2009. Mucosal vaccines: Novel advances in technology and delivery. *Expert Rev Vaccines* **8**: 1083-1097.
 7. Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nanno, M., Nakanishi, U., Takaiwa, F., Honda, T., and Kiyono, H. 2010. 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.
 8. Yuki, Y., Mejima, M., Kuroda, M., Kurokawa, S., Kong, I-L., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Chen Y., Nochi, T., Tokuhara, D., Masumura T., Tanaka, K., Kohda, T., Kozai, S., and Kiyono, H. 2012. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based *Botulinum* neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* **30**:4160-4166.
 9. Tokuhara, D., Alvarez, B., Mejima, M., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Kurokawa, S., Kuroda, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nochi, T., Sagara, H., Aladin, F., Marcotte, H., Frenken, L., Iturriza-Gómara, Kiyono, H., Hammarstöm, L., and Yuki, Y. 2013. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* **123**:3829-3838.
 10. Kurokawa, S., Nakamura, R., Mejima, M., Kozuka-Hata, H., Kuroda, M., Takeyama, N., Oyama, M., Satoh, S., Kiyono, H., Masumura, T., Teshima, R., and Yuki, Y. 2013. MucoRice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of α -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens. *J. Proteome Res.* **12**:3372-3382.
 11. Yuki, Y., Mejima, M., Kurokawa, S., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Katakai, Y., Kuroda, M., Takeyama, N., Kashima, K., Abe, M., Chen, Y., Nakanishi, U., Masumura, T., Takeuchi, T., Kozuka-Hata, H., Shibata, H., Oyama, M., Tanaka, K., and Kiyono, H. 2013. Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification. *Plant Biotechnol. J.* **11**:799-808.
 12. Kurokawa, S., Kuroda, M., Mejima, M., Nakamura, R., Takahashi, Y., Sagara, H., Takeyama, N., Satoh, S., Kiyono, H., Teshima, R., Masumura, T., and Yuki, Y. 2014. RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds. *Plant Cell Rep.* **33**:75-87.
 13. Abe, M., Yuki, Y., Kurokawa, S., Mejima, M., Kuroda, M., Park, E.J., Scheller, J. Nakanishi, U. and Kiyono, H. 2014. A rice-based soluble form of a murine TNF -specific llama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen -induced arthritis in mice. *J. Biotechnol.* **10**:175:45-52.
 14. Azegami, T., Yuki, Y., and Kiyono, H. 2014. Challenge in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Int. Immunol.* **26**:517-528.
 15. Lamichhane, A., Azegami, T. and Kiyono, H. 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* **32** (49) :6711-6723.
 16. Azegami, T., Itoh, H., Kiyono, H. and Yuki, Y. 2015. Novel transgenic rice-based vaccines. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **63** (2) :87-99.
 17. Kashima, K., Mejima, M., Kurokawa, S., Kuroda, M., Kiyono, H. and Yuki, Y. 2015. Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera toxin B-subunit vaccine lines and wild-type lines. *BMC Genomics* **16** (1) :48.

Mucosal Immunology for One Health

Hiroshi Kiyono

Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology
International Research and Development Center for Mucosal Vaccines
The Institute of Medical Science, the University of Tokyo
(4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

[Abstract]

The aero-digestive, reproductive and lactation tissues are equipped with the mucosal immune system which provides the first line of surveillance and barrier functions for the host. Most of the pathogens including influenza, *Streptococcus pneumoniae*, cholera and HIV are invading the host via the mucosal surface. Further, mastitis, pneumonia and diarrhea, three major livestock diseases are also associated with mucosal and secretory system. For creating the next generation of prophylaxis and control tools for these common infectious diseases between livestock and human under the flag of “One Health”, one has to organizing the platform of fusion science among veterinary medicine, animal husbandry, medicine, agriculture science, engineering and environmental science. As an example of fusion science among mucosal immunology, plant biology and plant farm engineering resulted in the creation of rice-based vaccine system “MucoRice” as a new generation of oral vaccine for the prevention and control of infectious diseases for farm animal and human.

Key words: IgA, Infection Disease, Mucosal immune system, Oral vaccine, Peyer’s patches