

II型コラーゲンペプチドを含有するGMライスの開発研究 ～経口免疫寛容によるリウマチ性関節炎の予防と治療を目指して～

名古屋大学大学院

生命農学研究科応用分子生命科学専攻

日野真吾

1. 緒言

リウマチ性関節炎とは、遺伝的な背景及び病原菌、ストレス、ホルモンバランスなどの環境因子を原因とする自己免疫疾患であり、滑膜増殖、破骨細胞活性化などによる関節の慢性的な炎症の慢性化とそれに伴う関節の破壊が起こる。患者数は日本全国で70～100万人と推定され、男女比は1対4と女性に多い疾病である。早ければ20歳代で発症し、30～50歳代が発症のピークで高齢化に伴い増加傾向にあると言われている。発病原因は明らかにされていないが、いくつかの因子の関与が

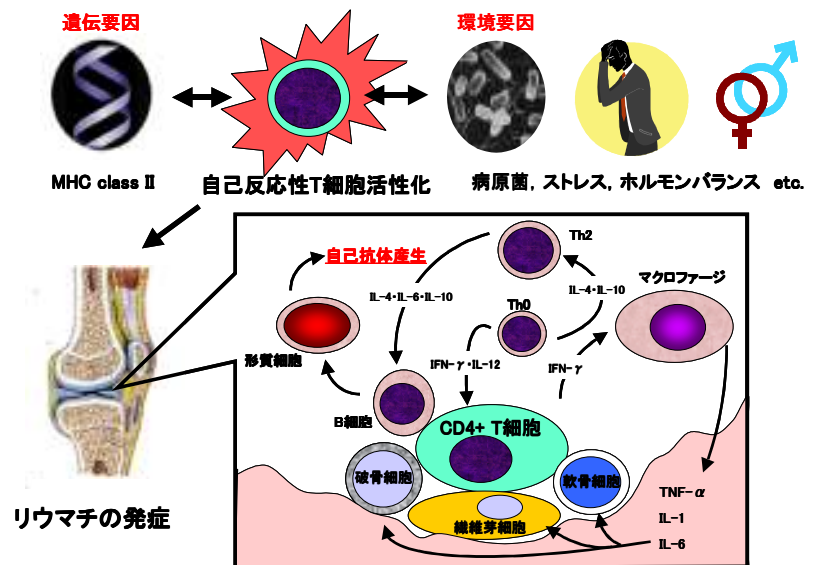


図1. リウマチ性関節炎の発症機構

示唆されている。例えば、HLA-DR1 と-DR4 など特定のタイプのヒト主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) の関与 (Todd *et al.*, 1988) や性ホルモンバランスの関与 (Cutolo *et al.*, 2002) が報告されている。また、患者血清中には、IgG のFc領域に対する自己抗体 (リウマトイド因子) や、DNA に対する抗体が検出されることが知られている (山本, 1994)。さらに、患者血清中には自身の関節軟骨に存在する **II型コラーゲン** に対する自己抗体が検出され、自己免疫性炎症反応の原因のひとつであると考えられている (Cremer *et al.*, 1998) (図1)。

リウマチ性関節炎の治療法として、薬剤療法と手術療法があるが、複数の因子により発症する自己免疫疾患であるため、根本的治療法は無いのが現状である。薬剤療法として、免疫調整剤や免疫抑制剤を用いて、自己免疫性の関節炎を抑制し、関節の変形及び破壊を防ぐ方法がある。この場合には、効果の発現までに数ヶ月を必要とし、また、皮膚、腎、肺、造血器への副作用があるため、定期的な検査と専門医の指導に基づく適切な処方が必要である。

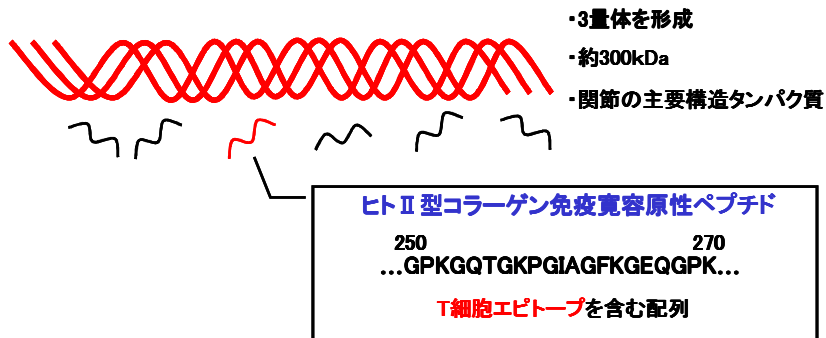
近年、抗原由来のT細胞エピトープを含むペプチドを注射や経鼻、経口ルートにより投与することによって、免疫寛容が成立することが報告されている。免疫寛容とは、特定の抗原に対して免疫応答が抑制される現象で、その機構としては、T細胞応答の抑制・不応答や、T細胞自身がアポトーシスにより死滅することが示唆されている。腸管は摂取された食物を介して、常に外来抗原に曝されており、最大の免疫組織であるということもできる。経口ルートで侵入する抗原に対して特異抗体を産生し、異物を排除するシステムを持っており、この抗体による異物排除の機構には腸上皮細胞やリンパ球が関与する。その一方で、腸管では食物抗原などに対する不要な反応を抑えるために経口免疫寛容といわれるシステムも持つ。つまり **経口的に摂取した抗原に対**

してはそれらに特異的に免疫抑制反応が誘導されるのである。

この経口免疫寛容を利用して、ニワトリの II 型コラーゲンやヒト II 型コラーゲンの T 細胞エピトープを含むペプチド（免疫寛容原性ペプチド）を経口投与することにより、リウマチ性関節炎の予防・治療効果が期待できるという報告がある

(Trentham D.E. *et al*, 1997, Khare S.D *et al* 1995) (図 2)。そこで、リウマチ性関節炎の原因のひとつとして知られている II 型コラーゲンの免疫寛容原性ペプチドを日常的に食べることが可能なイネ種子の中に組換え DNA 技術を用いて蓄積させることができれば、経口免疫寛容現象を利用した、

“食べることでリウマチ性関節炎の予防・治療効果を期待できるコラーゲンペプチド GM ライス”を開発できるという発想の下に、II 型コラーゲン免疫寛容原性ペプチドを種子に集積する形質転換イネの開発に着手した。



◆ 関節リウマチ患者へのニワトリ II 型コラーゲンの経口投与による症状の緩和 (Trentham D.E. *et al*, 1997)

◆ 関節炎発症マウスへのヒト II 型コラーゲン免疫寛容原性ペプチドの経口投与による症状の予防・治療効果 (Khare S.D. *et al*, 1995)

図 2. ヒト II 型コラーゲンと免疫寛容原性ペプチド

2. 開発の特徴

- ① イネの胚乳特異的プロモーターを用いて、4 つの免疫寛容原性ペプチドを連結したポリペプチドをコードする遺伝子を登熟期イネ種子で高発現させ、胚乳中に蓄積させた。通常、ペプチドは胚乳内に集積しにくいことが知られており、集積を高めるため、主要な貯蔵タンパクであるグルテリンとの融合タンパク質として発現させた。
- ② 経口摂取した場合に、消化管内でこれらの融合タンパク質から効率的に免疫寛容原性ペプチドが切り出されるよう、グルテリン及び各ペプチド間に腸管の消化酵素であるキモトリプシンによって切断されるアミノ酸（チロシン）を導入した。
- ③ 免疫寛容原性ペプチドを高発現させるため、4 連続ペプチドの人工遺伝子の配列には、イネの貯蔵タンパク質で高頻度に使用されるコドンを用いて作成した。
- ④ 消費者の安全性に対する懸念に配慮して、選抜マーカー遺伝子である抗生物質耐性遺伝子を含まない形質転換イネを選抜した。

3. 材料と方法

1) コラーゲンペプチド発現用ベクターの構築

ヒト II 型コラーゲンペプチドのアミノ酸配列をもとに、イネで最も使用頻度の高いコドンを用いた塩基配列を決定した。この配列を基に、制限酵素認識配列、及び消化酵素によって認識されるアミノ酸（チロシン）をコードするコドンが付加したもの

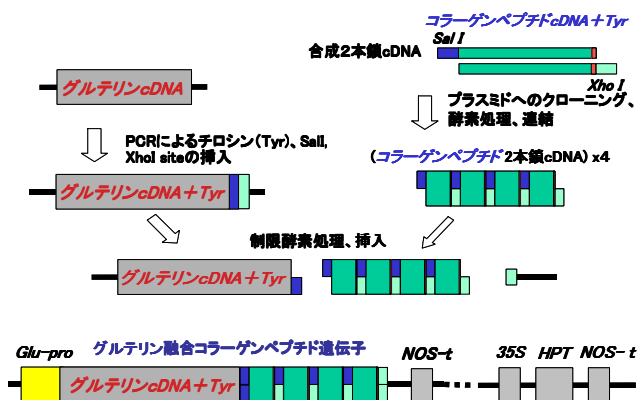


図 3. コラーゲンペプチド発現用遺伝子コンストラクトの構築

を1つの単位として、これを4つ連結したDNA断片を作成した。この4×II型コラーゲンペプチドをコードしたDNA断片を、グルテリンcDNAと連結した後、アグロバクテリウム法でのコトランスフォーメーション用ベクター(pSB26)のプロモーター直下に挿入し、グルテリン融合タンパク質として登熟期種子特異的に発現させるベクターを構築した(図3)。

2) コラーゲンペプチド含有GMライス系統の作出と選抜

作成したベクターと薬剤耐性遺伝子であるハイグロマイシン耐性遺伝子を含むベクターとを相同組換え法を用いて融合し、アグロバクテリウムを形質転換後、コシヒカリカルスに感染させ、形質転換イネを作成した(コトランスフォーメーション)。作成した形質転換イネ再分化個体の幼苗をゲノムDNA-PCRに供し、遺伝子が導入された株のみを選抜し、生育させた。自殖第1世代の種子を半分に分割し、胚乳側をコラーゲンペプチド特異抗体を用いたウエスタンブロット解析に供し、一方、胚側は発芽させて幼苗をゲノムDNA-PCRにより解析した(図4)。



自殖第1世代種子(T1)の採取
健全な(倍数体等でない)稔実株で50粒以上の株

種子を半分(半粒)に分割
次世代植物(T1)を残せるだけでなく、PCR分析、ウエスタン分析を併用して選抜を効率化できる



図4. GMライス系統の選抜法概略

さらに、自殖第2世代の遺伝型分析も併用し、最終的に薬剤耐性遺伝子を持たず、且つ、ホモ接合型の目的遺伝子を持ちコラーゲンペプチドを多く発現・蓄積している系統を選抜した。

3) マウスへのコラーゲンペプチド含有GMライスの経口投与による関節炎抑制能の評価

DBA/1Jマウスは、ヒトのリウマチ性関節炎の動物モデルとして、またコラーゲン誘導関節炎を発症するマウスとして多くの研究で用いられている。DBA/1Jマウスに異種II型コラーゲンをアジュバンドであるFCA(Freund's complete adjuvant)と共に免疫することによって関節炎を誘発できることが示された(Courtenay *et al.*, 1980)。この報告以降、DBA/1Jは主要なコラーゲン誘導関節炎発症モデルマウスとして用いられるようになった。

本研究では、このマウス関節炎モデルを用いて、関節の腫脹(図5)などの炎症反応との正の相関がある、II型コラーゲンに対する血清抗体応答を指標とし、コラーゲンペプチド含有GMライスの関節炎抑制能の評価を行った。具体的には、

抗体産生抑制効果の評価

DBA/1マウスにコラーゲンペプチド含有GMライス及び陰性対照として通常米を2週間経口

- ・リウマチ性関節炎の動物実験モデルとして頻用
- ・異種II型コラーゲンで感作することにより関節炎を発症



正常



発症

- ◆コラーゲンに対する免疫性(コラーゲンに対する抗体価の上昇)
- ◆骨・軟骨の浸蝕(滑膜細胞活性化、軟骨の破壊)
- ◆抗体・補体の沈着

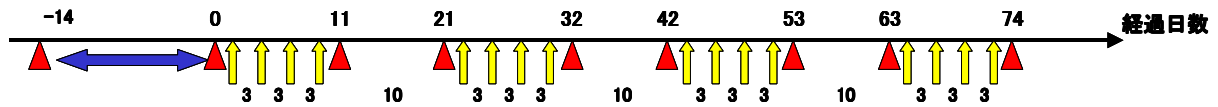
図5. コラーゲン誘導関節炎の特徴と病態

投与し、その後ウシⅡ型コラーゲンを腹腔内投与することにより感作した。定期的に採血を行い、ウシⅡ型コラーゲンに特異的な抗体価を測定し、2群間での抗体応答を比較した(図6-A)。

抗体応答の低減化の評価

既にⅡ型コラーゲンに対する自己免疫応答が成立したマウスへのコラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与の影響を調べた。ウシⅡ型コラーゲンを尾付け根に皮内投与することで免疫感作を行い自己抗体産生を誘導したマウスを、血清抗体価の平均値と偏差がほぼ同等になるように2群に分け、それぞれにコラーゲンペプチド含有 GM ライス及び通常米を精製飼料に混ぜて2週間経口投与した。その後、ウシⅡ型コラーゲンに特異的な抗体価の変動を追跡し、2群間で比較した(図6-B)。

抗体産生抑制効果の評価



抗体応答低減化の評価

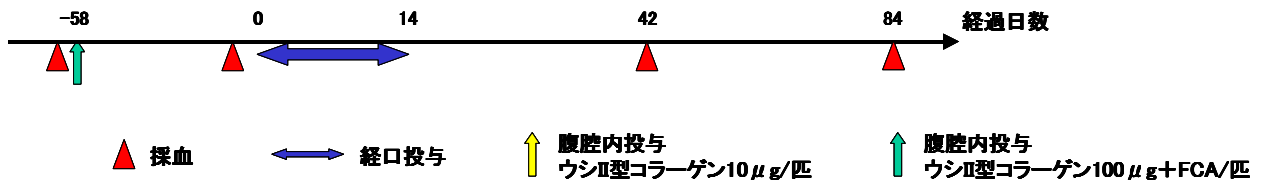


図6. マウスへの GM ライス経口投与および免疫スケジュール

4. 結果

1) コラーゲンペプチド含有 GM ライス系統の作出

コラーゲンペプチド発現用ベクターを保持する形質転換アグロバクテリウムをコシヒカリのカルスに感染させ、薬剤選択後、再分化させることにより 93 系統の組換えエイネ(T0)を得た。これらの T0 個体からゲノム DNA を抽出し、PCR 解析により、コラーゲンペプチド遺伝子が導入されなかったもの及び目的以外のサイズの DNA が挿入された系統を排除し、45 系統(T0)を選抜した。さらに、倍数体等ではない、正常な稔実系統 (50 粒以上稔実のあるもの) のみを選択し、目的遺伝子及び薬剤耐性遺伝子を共に持つ 33 系統(T0)が得られた。

これらの系統を自家受粉させて得られた種子(T1) 4 粒について、個々にタンパクを抽出し、

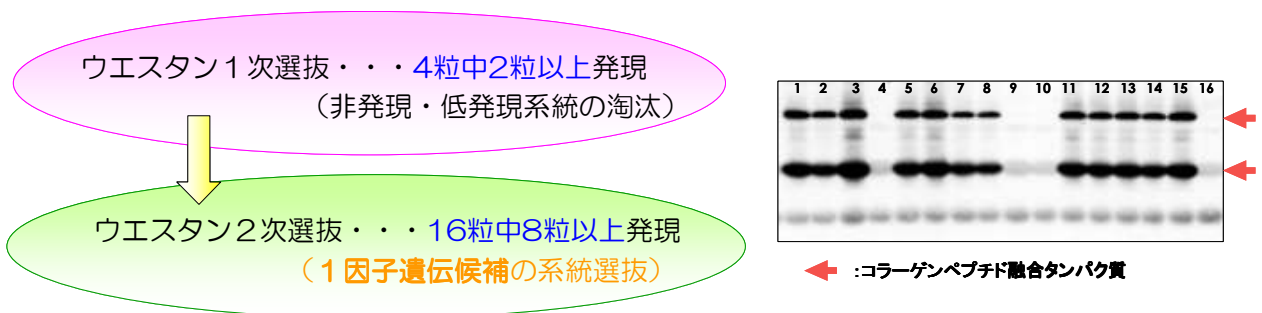


図7. 自殖第一世代(T1)種子のウエスタンブロット分析による T0 系統選抜

SDS-PAGE で分画後、抗コラーゲンペプチド特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により、グルテリン融合コラーゲンペプチドの非発現・低発現系統を淘汰した。選抜された系統について、さらに粒数を増やし、16粒中8粒以上についてペプチドの集積が認められた系統のみをコラーゲンペプチド含有 GM ライス系統として選抜した(図7)。

選抜した系統に稔実した種子(T1)を半分に分割し、胚を含む方を育種用に発芽させ、さらに、幼苗葉より抽出したゲノム DNA を用いて PCR 解析を行い、目的遺伝子のみを持ち、薬剤耐性遺伝子を持たない系統を選抜した。これらの系統については、胚乳側よりタンパクを抽出し、同様の方法でウエスタンブロット解析を行い、高発現自殖第1世代(T1)系統を得た(図8)。

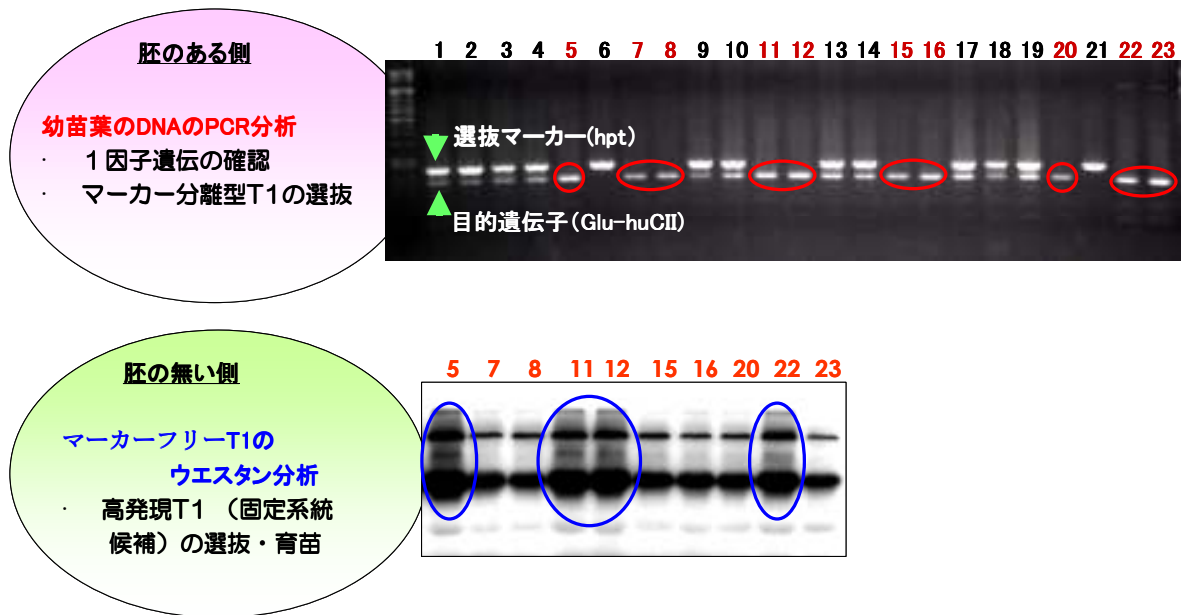


図8. 半粒分析による組換えイネの T1 系統選抜

これらの系統からさらに後代を作成し、それらの遺伝型及び表現型を解析して、**遺伝的に安定な、コラーゲンペプチド含有 GM ライス系統**を作出した。大腸菌で発現させた免疫寛容原性ペプチドを標準品とした免疫定量分析により、この GM ライスには、平均して1粒あたり約 1 μg のコラーゲンペプチドが含まれることが明らかとなった(図9)。

2) コラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与による自己抗体応答の誘発予防効果の評価

コラーゲンペプチド含有 GM ライス、及び、通常米を粉末にして精製飼料に添加して自由摂取させ、その後ウシII型コラーゲンを腹腔内に投与することによって感作した。その後の抗体応答を観察することにより、コラーゲンペプチド含有 GM ライス

の経口投与の有無がII型コラーゲン特異抗体の産生に及ぼす影響について解析した。コメ一粒の平均重量を 1.8 mg として 45 mg の粉末状 GM ライス、及び、陰性対照として通常米を 5 g の餌に配合した。経口投与は2週間行い、1匹あたり2週間で40gの餌を与えた。すなわち、1匹あたり 200 μg のコラーゲンペプチドを摂取させた。経口投与終了後、ウシII型コラーゲンで

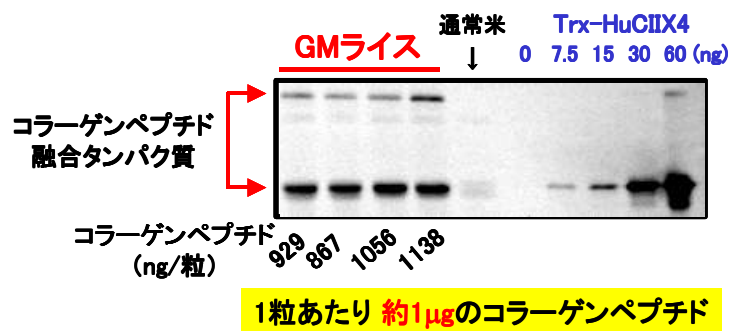


図9. コラーゲンペプチドの免疫定量分析

感作し、経時的に採血を行い、コラーゲン誘導関節炎の指標のひとつであるII型コラーゲンに対する抗体応答の推移をELISA法により計測した。

コラーゲンペプチド含有GMライス投与群では、対照群と比較してII型コラーゲンに対するIgG1抗体価が上昇してくるタイミングが明らかに遅く、その程度も弱いことが明らかとなった(図10-A, B)。また、抗II型コラーゲンIgG2a抗体の経時変化についても、IgG1と同様に抗体価の上昇の遅延が観察された(図10-D, E)。さらに、74日後には、コラーゲンペプチド含有GMライス投与群では通常米投与群と比べ統計的にも有意にII型コラーゲンに対するIgG2a抗体価の上昇が低く抑えられていることが明らかとなった(図10-F)。

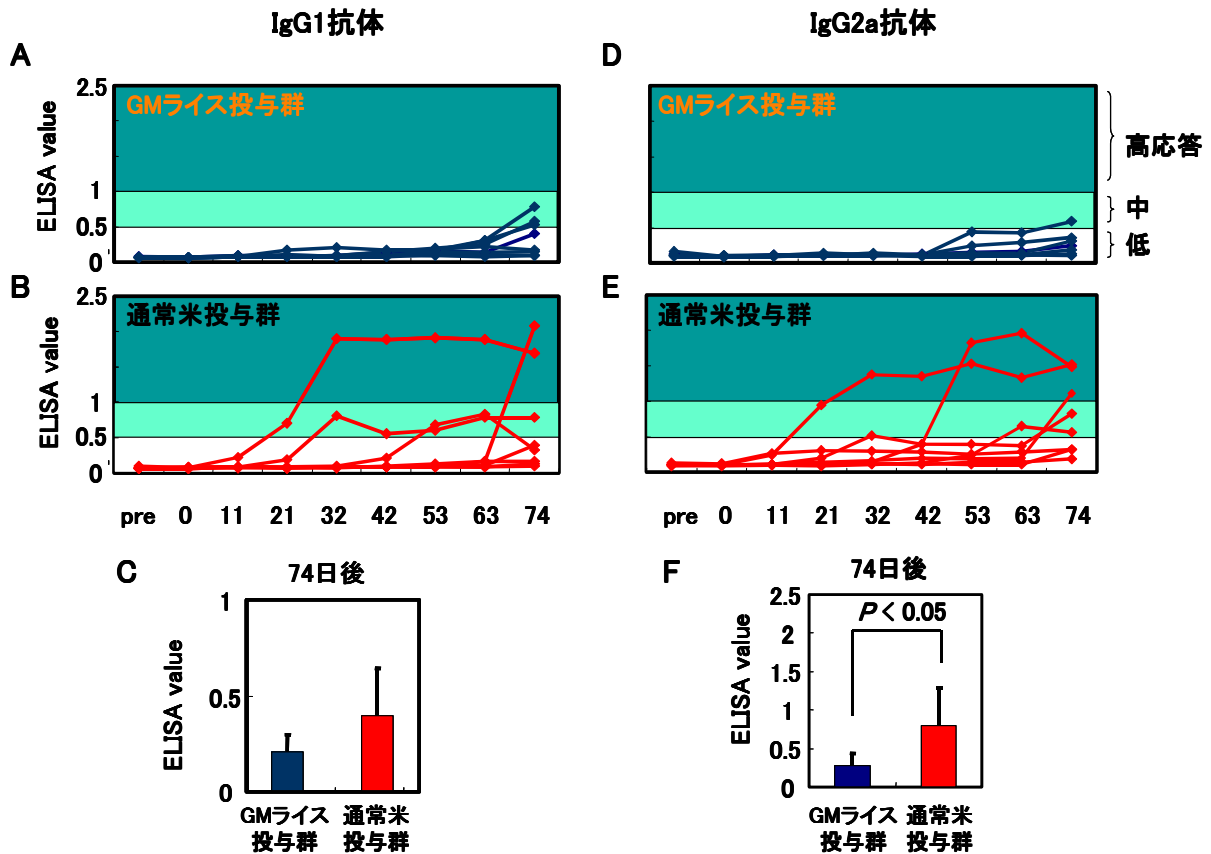


図 10. コラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与による抗体産生抑制作用

3) コラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与による自己抗体応答の低減化の評価

既に関節炎を発症している患者に対して、コラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与により症状を軽減できれば、治療への応用も期待できる。そこで、経口投与前にII型コラーゲンによる免疫感作を行い、抗体産生を誘導したマウスにコラーゲンペプチド含有 GM ライスを経口投与した場合の、抗体価の変動を解析して低減化を評価した。ウシII型コラーゲンをFCAと共にマウスの尾付け根に皮内投与し、その後の抗ウシII型コラーゲンIgG1抗体価の経時変化をELISA法により測定した。皮内投与の約2ヶ月後、ほぼすべての個体で抗体価の上昇がみられたため、抗体価の高い個体から交互にA及びB、2群に振り分け、抗体価の平均値と偏差がほぼ等しい2群(A, B群 10個体/群)を得た(図11)。一方の群には、コラーゲンペプチド

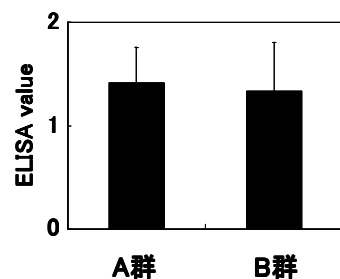


図 11. 経口投与前における2群間の抗II型コラーゲンIgG1抗体価

含有 GM ライス、もう一方の群には通常米を前項と同様の方法で 2 週間経口投与した。この 2 群では抗体応答の強度や個体間のばらつきが均等であるため 2 群間での差異が観察しやすいと考えられる。

抗ウシⅡ型コラーゲン特異的な IgG1 抗体及び IgG2a 抗体について、試験飼料投与開始日から 42 日後及び 84 日後における抗体価を経口投与前の抗体価に対する変化率(%)で表した(図 12)。42 日後においては、コラーゲンペプチド含有 GM ライス投与群と通常米投与群でほとんど差がなく、どちらの群も増減がみられた個体が少ないのに対して(図 12-A)、84 日後ではコラーゲンペプチド含有 GM ライス投与群では 10 個体全てにおいて IgG1 抗体価の低下が確認された(図 12-B)。IgG2a 抗体についても同様にして変化率を表した(図 12-C, D)。84 日後において、コラーゲンペプチド含有 GM ライス投与群で、IgG2a 抗体が上昇した 2 個体を除いては、全ての個体で抗体価の低下が観察された。このように、IgG2a 抗体についても IgG1 抗体と同様に低減化傾向が観察された。

以上のことから、コラーゲンペプチド含有 GM ライスは、経口投与することで既に誘導されているⅡ型コラーゲンに対する免疫応答も低減化することが示された。

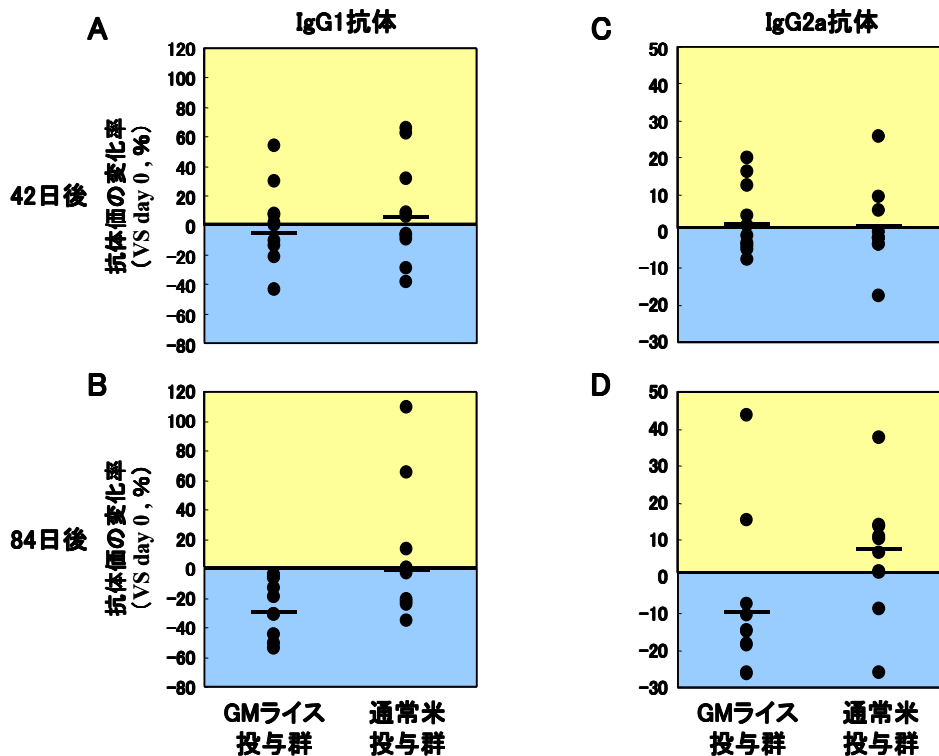


図 12. コラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与による抗体応答の低減化

5. 考察及び今後の展望

1) コラーゲンペプチド含有 GM ライス系統の作出

Ⅱ型コラーゲンの免疫寛容原性ペプチド配列 4 つを連結して作製した人工遺伝子を、イネの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンに結合させ、発現、蓄積させた GM ライス系統を得た。このように、本研究では、リウマチ性関節炎を標的とした免疫寛容原性ペプチド配列と他のタンパク質とを融合タンパク質として発現させることで、従来難しいとされていたペプチドの種子への蓄積に成功した。この方法論を用いることで、他の自己免疫疾患における免疫寛容原性ペプチドや生理活性ペプチドを容易に発現・集積することが可能になると考えられる。今回用いたタン

パク質発現系で得られたペプチドは GM ライス 1 粒あたり約 1 μg であったが、発現プロモーターや融合させるタンパク質の種類を検討することにより収量増加が見込め、食品としてだけではなくペプチド医薬の製造を行う植物工場としての応用も期待できる。また、常温で比較的長期にわたり安定的に保存が可能であるイネ種子という形状で目的の物質が得られることから、保管、及び、輸送コストの削減というメリットも期待できる。

2) コラーゲンペプチド含有 GM ライスの経口投与による自己抗体応答の予防・緩和効果

コラーゲンペプチド含有 GM ライス及び通常米を 2 週間経口投与し、その後ウシ II 型コラーゲンで感作した場合、コラーゲンペプチド含有 GM ライス投与群では、対照群と比較して抗ウシ II 型コラーゲン IgG1 及び IgG2a 抗体の産生応答が遅延し、かつ、IgG2a 抗体に関しては 74 日後において統計的に有意な抗体応答の抑制が観察された。これらの結果は、コラーゲンペプチド含有 GM ライスの摂取がリウマチ性関節炎において予防効果を示す可能性を示唆している。

また、コラーゲンペプチド含有 GM ライスを経口投与することで既に誘導されているウシ II 型コラーゲンに対する免疫応答についても低減する傾向が観察された。また、その作用は経口投与から 2 ヶ月以上が経過してから起こることが示唆された。このことから、既にリウマチ性関節炎を発症している患者に対して、長期にわたって経口投与するような臨床応用も期待できる。

本研究の結果から、精製した合成ペプチドと同様に、植物体に融合タンパク質として蓄積させた免疫寛容原性ペプチドをコメとして摂取しても、自己免疫性の抗体応答への抑制作用を示すことが明らかとなった。これまでに、自己免疫疾患を標的として、作物で発現させた免疫寛容原性ペプチドによる経口免疫寛容を目指す類似の研究は無いが、I 型糖尿病をはじめとする他の自己免疫疾患への適用も期待できる。

今後、ペプチド集積 GM ライスの投与量や投与期間を検討することにより更なる効果の増強も可能と考えられる。また、本研究では、経口投与後に効率的に消化管内でペプチドが消化酵素により切り出されるようにするため、ペプチド間及びタンパク・ペプチド間に消化酵素の認識配列を挿入したが、今後は、投与されたコメに含まれる融合タンパク質のうち、どの程度の割合でペプチドが切り出され、どのような形で免疫系に作用するのかを明らかにする必要がある。これらを明らかにすることにより、投与量及び投与期間の最適化へのフィードバックが可能であり、さらには、効果的な免疫寛容原性ペプチドを消化管内で遊離させるような人工ポリペプチドの設計にも繋がると考えられる。

本研究で得られた成果の一部は、筆者也発明者の 1 人となっている国内特許及び国際特許（米国とドイツ）として出願済みであり、この技術がバイオ関連企業によって活用され、近い将来に、関節炎や自己免疫疾患の予防と治療に用いる免疫寛容原性ペプチド含有米の商業的な生産が実現することを期待している。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻の松田幹教授、青木直人助手（現・三重大学・准教授）、灘野大太准教授、岡島哲也助教、及び、共同して研究を進めた橋爪不二夫さん（三重県科学技術振興センター）、掛橋美沙子さん（現・アストラゼネカ）にこころより感謝申し上げます。

また、グルテリン関連の遺伝子、および共形質転換用ベクターを分譲いただいた日本たばこ株式会社植物イノベーションセンターに感謝いたします。

7. 参考文献

Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. (1980) Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 283, 666-668

Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. (1998) The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med.* 76, 275-288.

Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Seriolo B, Sulli A. (2002) Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 1, 284-289.

Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. (1995) Oral administration of an immunodominant human collagen peptide modulates collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 155, 3653-3659.

Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, et al. (1988) A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240, 1003-1009

Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, Combitchi D, Lorenzo C, Sewell KL, Hafler DA, Weiner HL. (1993) Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 261, 1727-1730

山本一彦 (1994) 自己免疫疾患 羊土社