

乳酸菌発現系を利用した粘膜ワクチンへの応用展開

瀬脇智満

Generation of Mucosal Vaccine Utilizing *Lactobacillus* Display System

Tomomitsu SEWAKI

GENOLAC BL Corporation, 301 Saito Bio Incubator, 7-7-15 Saito Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received June 17, 2009)

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of Gram-positive, and generally recognized as safe bacteria. LAB have been used as the starter for the fermentation food (*i.e.*, cheese, yoghurt and kimuchi *etc.*). On the other hand, several studies of LAB as delivery vehicles have focused on the generation of mucosal vaccine. We have developed novel surface display system based on PgsA gene, which isolated from *Bacillus subtilis* chungkookjang. We introduce the *Lactobacillus* surface display system by using the PgsA anchor protein and its application. HPV oncogene, E7, is a reliable target protein since E7 is expressed in the CIN lesion. Although many studies have demonstrated these vaccines elicit systemic immune responses to HPV E6/E7, few studies have shown mucosal immune responses. There is no therapeutic vaccine utilizing oral administration and there is no clinical trial which addresses cervical mucosal cellular immune responses to the vaccine. Our recent progress is production of a mucosal vaccine to treat cervical intraepithelial neoplasia (CIN) that has potential of cervical cancer. The vaccine is expected to help the vast number of women suffering from high grade CIN. Lac-E7 is a candidate for new therapeutic vaccine for cervical intraepithelial neoplasia.

Key words—*Lactobacillus*; surface display technology; mucosal vaccine; human papillomavirus

1. 免疫抗原運搬体としての乳酸菌の役割

乳酸菌は、*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Leuconostoc* 属などに代表されるグラム陽性細菌群であり、ヒトを始め各種動物の口腔・腸管・粘膜に存在する微生物の1つである。また乳酸菌は、古来よりヨーグルトやチーズなどの乳製品、ぬか漬けやキムチなどの漬物、清酒など酒類の製造に寄与し、産業上でも重要な微生物と言える。このように長期間にわたりヒトに摂取されてきた乳酸菌はヒトに対する安全性が高いことを示している。¹⁾

乳酸菌に関する研究は、ヒトや動物の健康増進における乳酸菌の有効性を明らかにしつつある。^{2,3)} すなわち乳酸菌は、それ自体が保健効果を示す有用微生物である。従来から、乳酸菌は整腸剤としての医薬品用途に使用されているほか、特定保健用食品・

機能性食品へも応用展開されている。⁴⁾

このように乳酸菌自体の機能性に着目した研究が進む一方で、遺伝子組換え技術の進展は、目的タンパク質を蓄積するような組換え乳酸菌の作出を可能にしている。⁵⁾ ヒトに対する安全性が高いこと、経口摂取が可能なこと、遺伝子組換えにより有用タンパク質を生産及び蓄積できることから、乳酸菌を有用タンパク質の運搬体として扱う医薬品開発の発想が生まれてきた。この一例として抗原を粘膜面へと運搬する乳酸菌、すなわち乳酸菌ワクチンが挙げられる。⁶⁻⁸⁾

動物体内に存在する口腔・鼻腔及び腸管などの粘膜は、動物体内と体外異物・病原微生物との接触面である。これら腸管・鼻腔を始めとする粘膜組織は粘膜関連リンパ組織 (Mucosa-Associated Lymphoreticular Tissue, MALT) と呼ばれるリンパ組織を持っており、粘膜免疫系を支えている。^{9,10)} その中でも腸管に存在するリンパ組織は、腸管関連リンパ組織 (Gut-Associated Lymphoid tissue, GALT) と呼ばれている。GALT はパイエル板 (Peyer's patch), 粘膜固有層 (Lamina propria mucosae),

株式会社ジェノラック BL (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-15 彩都バイオインキュベータ 301)

e-mail: t-sewaki@genolac-bl.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S05 で発表したものを中心に記述したものである。

粘膜固有層リンパ球 (lamina propria lymphocytes), 腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL), 腸管上皮細胞 (Intestinal epithelial cell), クリプトパッチ (Cryptopatch) 等で構成される。パイエル板はドーム状の組織として特徴的に観察され, その腸管腔側を覆う上皮層は外界の異物を積極的に取り込む M 細胞 (Microfold cell) を持つ。M 細胞は腸管内から異物を取り込んだのち, 基底膜側で接触する免疫担当細胞, 例えば樹状細胞 (Dendritic cell), B 細胞 (B cell), T 細胞 (T cell) などに抗原を受け渡し, その後生体の免疫応答が誘導される。すなわち M 細胞は, 腸管における異物の門戸として機能している。

粘膜免疫学の発展に伴い, 粘膜組織に発達する免疫システムを有効に活用する, 「粘膜ワクチン」が考えられてきた。粘膜ワクチンの利点としては, 1) 全身性免疫 (液性免疫) と細胞性免疫の両方を誘導できること, 2) 経口投与・経鼻投与であり投与ストレスが低いこと, 3) 注射器などの医療器具を必要とせず投与が簡便であること, 4) 従来の「注射型ワクチン」のような免疫抗原の高度な精製をかならずしも必要とせず製造コストを抑制できることが挙げられる (Fig. 1)。この粘膜ワクチン開発において, 乳酸菌は, ヒトに対する安全性の高さや遺伝子組換え可能な微生物であることなど, 理想的な抗原運搬体の 1 つとして注目されている。^{6-8,11)}

以下では, 乳酸菌を抗原運搬体とするための表層分子ディスプレイ技術と, 経口粘膜ワクチン開発への応用について, 筆者らの研究開発の具体例を交えながら説明する。

2. 翻訳融合による表層分子ディスプレイ

目的タンパク質を微生物の細胞表層に保持させるための戦略の 1 つとして, 細胞外皮に局在するタンパク質 (又はその一部) をアンカーとして用いた翻訳融合がある。^{12,13)} このアンカーは, 外来タンパク質を表層に提示させる足場として働き, アンカー・外来タンパク質翻訳融合体が細胞内膜を通過して外膜又は細胞壁に付着する機能を担う。表層分子ディスプレイ用アンカーとして採用できる細胞外皮局在タンパク質の例としては, 大腸菌 *Escherichia coli* 由来の PhoE,¹⁴⁾ FimH,¹⁵⁾ FliC,¹⁶⁾ OmpC,¹⁷⁾ 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 由来のプロテイン A,¹⁸⁾ 化膿レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* 由来の M6,¹⁹⁾ 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の α -

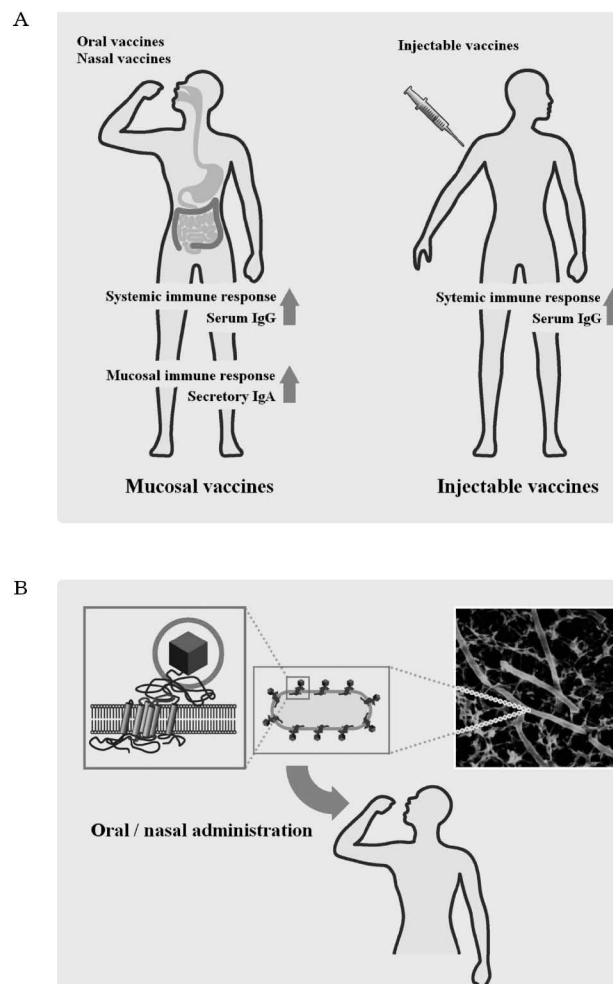


Fig. 1. Advantages of Mucosal Vaccines (A) and Microbial Cell-surface Display for Mucosal Vaccine Delivery (B)

アグルチニン及び Flo1²⁰⁾ などが知られている。

乳酸菌における翻訳融合型の表層分子ディスプレイは, 現在まで *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Staphylococcus* 属, *Streptococcus* 属乳酸菌において, 酵素や抗原タンパク質の提示が試みられてきた。²¹⁾ これらの試みで利用されたアンカーは, 細胞外皮との結合様式の違いをもとに, 次の 5 つに大きく分けることができる。

- 1) 細胞膜を貫通するアミノ酸領域を持つ TMS 型アンカー (例えば, 乳酸菌 *Lactococcus lactis* 由来のバクテリオシン分泌関連タンパク質 LcnD)。²²⁾
- 2) 細胞膜脂質と共有結合するリポタンパク質型アンカー (例えば, *Lactococcus lactis* 由来の推定 ABC トランスポータ結合タンパク質 Nlp1)。²³⁾
- 3) 細胞壁と保存アミノ酸配列 Lys-Pro-X-Thr-Gly を共有結合させる LPXTG 型細胞壁アンカー (例

例えば、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 由来プロテイン A,¹⁸⁾ 化膿レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* 由来の M6 タンパク質).¹⁹⁾

4) 細胞壁と特定アミノ酸配列 (44 残基) の 3 回繰り返し領域を非共有結合させる AcmA 型細胞壁アンカー (*Lactococcus lactis* 由来のペプチドグリカンヒドロラーゼ AcmA).²⁴⁾

5) 細胞外皮の最外である S 層 (surface-layer) に配置させる SLP 型アンカー (例えば, *Lactobacillus brevis* 由来の S-layer タンパク質 SlpA).²⁵⁾

このように翻訳融合を介した表面分子アンカリング技術に関する初期の研究は、目的タンパク質を細胞外皮へ局在させる手法の開発に注力していた。この技術に関する最近の研究は、ワクチンなどの医薬品開発への応用検討を目指した動物における免疫誘導を確認するものとなってきた。タイプ 1 型ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type1) 由来の Env タンパク質 V2-V4 ループと LPXTG 型細胞壁アンカーの翻訳融合体を蓄積する遺伝子組換え乳酸菌が開発され、その組換え乳酸菌とコレラトキシニアジュバントのマウスへの経口投与は粘膜免疫及び体液性免疫の反応を誘導できた。²⁶⁾ このような経口投与による免疫誘導の結果は、乳酸菌を抗原運搬体とする経口粘膜ワクチン開発における表層分子ディスプレイの有用性を示している。表層分子ディスプレイと抗原運搬乳酸菌を技術基盤とする経口粘膜ワクチン開発は、現在ヒト臨床応用へとその展開を期待されるようになっているが、実際に臨床試験へと進むまでには至っていない。

3. 納豆菌由来の表層分子ディスプレイアンカー PgsA

納豆菌に代表される *Bacillus* 属細菌は、納豆の粘り成分であるアミノ酸ポリマー：ポリガンマグルタミン酸を生産する。このポリガンマグルタミン酸の生産には PgsA, PgsB, PgsC から構成される酵素複合体が関与している。この酵素複合体は細胞表層に局在し、ポリガンマグルタミン酸の合成と分泌を担っている。この酵素複合体の構成要素である PgsA は、その C 末端へ α -アミラーゼを翻訳融合させたとき、 α -アミラーゼを細胞外へ発現・提示させることが分かった。²⁷⁾ この細胞表層タンパク質である PgsA の細胞表層でのトポロジーは現在のところ、N 末端側と C 末端側にある 2 つの疎水性アミノ酸

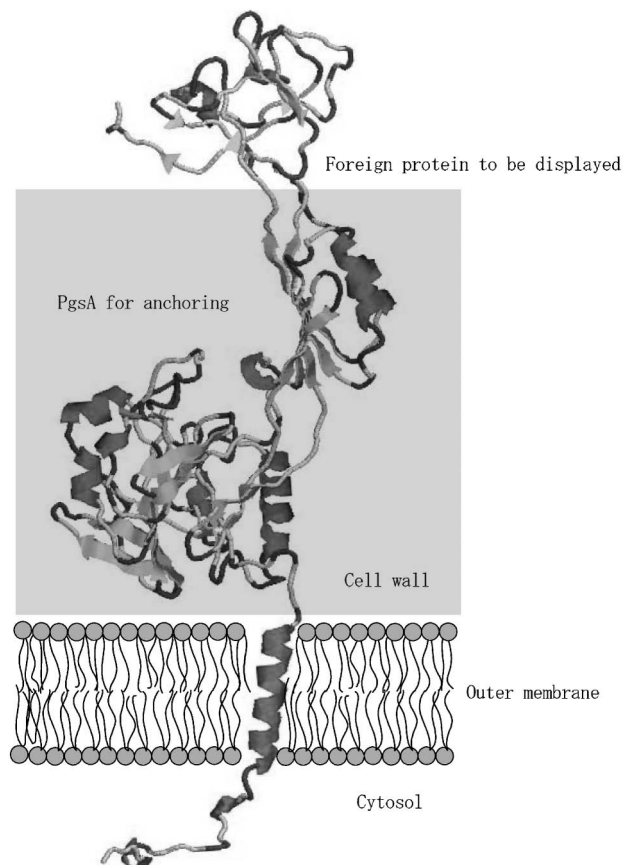


Fig. 2. PgsA Anchor-mediated Microbial Cell-surface Display

領域を細胞膜に貫通させ、その C 末端側を細胞の表層へ向けて突出させると考えられている (Fig. 2)。

この機能に注目して、PgsA を抗原タンパク質の細胞表層提示アンカーとして活用できるかどうかを検討した。²⁸⁾ PgsA の C 末端にブタ流行性下痢病ウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質など融合するように遺伝子組換えを実施した。この融合タンパク質を生産する遺伝子組換え乳酸菌の細胞壁画分のウェスタン解析の結果は、目的タンパク質が細胞表層に提示されていることを示した。この乳酸菌をマウスへ経口投与したとき、マウス血清中に抗原特異的な抗体価の上昇が観察された。すなわち PgsA は、抗原タンパク質の表層分子ディスプレイのためのアンカーとして利用可能であると評価された。また、PgsA はその起源生物が食用微生物であり、病原微生物でないことも PgsA アンカリングシステムの特徴の 1 つとして挙げられる。

4. PgsA アンカリングを利用した HPV 治療的ワクチンの開発

PgsA アンカーが乳酸菌による外来タンパク質の表層分子ディスプレイに有効であることが分かったため、筆者らは、この PgsA による表層分子ディスプレイをヒト用経口粘膜ワクチンの製剤開発への応用を目指している。具体的な開発事例とする乳酸菌製剤は、HPV 治療的ワクチン [HPV が原因となる子宮頸がんの前駆病変、子宮頸部上皮異形成 (cervical intraepithelial neoplasm, CIN) に対する治療薬] である。

子宮頸がんのほとんどがヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus, HPV) 感染が原因となっていることは明らかである。HPV 感染者の約 10% は CIN ステージに移行し、CIN のステージは CIN1 (軽度異形成)、CIN2 (中等度異形成) 及び CIN3 (高度異形成) に分けられる。また、ステージの進行に伴い、がん化に関係するタンパク質である E6 あるいは E7 の発現率及び発現量が次第に増加することで、子宮頸がんへと進展するとされている。²⁹⁾ 現在、海外大手製薬企業から予防的ワクチンが海外市場に上市され始めているが、HPV 持続感染のステージにある CIN 患者に対する治療薬は存在していない。このように CIN 患者は常に子宮頸がんへ進行するのではないかという不安を抱えたまま過ごしているという状況にあると言え、この状況はわが国に限られた話ではなく、欧米を含む医療先進国も同様である。本疾患に対する治療薬の開発については、海外で臨床開発が実施されてきたが、いまだ上市には至っておらず、世界的にも HPV 感染に対する治療的ワクチンの開発が望まれている。筆者らは、HPV 治療用ワクチンを開発するためには細胞性免疫 (Th1 型) を誘導することが重要であると考えている。そこで、経口投与が可能である点とともにその免疫誘導機能に着目し、粘膜面への抗原運搬体として乳酸菌の特性を活用した「HPV 治療的ワクチン」の開発を進めている。

その開発段階として、PgsA アンカーと HPV16 型由来 E7 タンパク質の融合体 (PgsA-HPV16E7, 推定分子量約 55 kDa) を発現する乳酸菌の構築及び乳酸菌製剤 (死菌) の GMP 製造に着手した。PgsA-HPV16E7 融合体の乳酸菌発現用プラスミドを構築し、*Lactobacillus casei* の形質転換細胞を作

製した。この細胞を培養・回収・加熱処理による死菌化・凍結乾燥の工程後、凍結乾燥粉末として原薬 (治験薬 GMP) を取得した。この原薬を顆粒化し、カプセル充填した後、治験薬グレードの乳酸菌製剤 (死菌) を製造した。前述の通り、本乳酸菌製剤は経口を第一の投与ルートと考えているため、消化管という環境下においても乳酸菌に発現した抗原を保護する必要があるが、原薬を直接投与した小動物の試験では、消化管へ抗原維持されたまま送達され、薬効として細胞性免疫を誘導することを確認している。

また、この乳酸菌カプセル製剤の医薬品開発を進める過程で、規格構築や薬剤の安定性試験を実施している。その中で製剤顆粒の総タンパク質抽出液と免疫沈降物のウェスタン解析を実施した結果、PgsA-HPV16E7 に相当する分子量を示す強いシグナルが観察された (Fig. 3)。すなわちこの乳酸菌製剤は、PgsA を基盤とする表層分子ディスプレイ

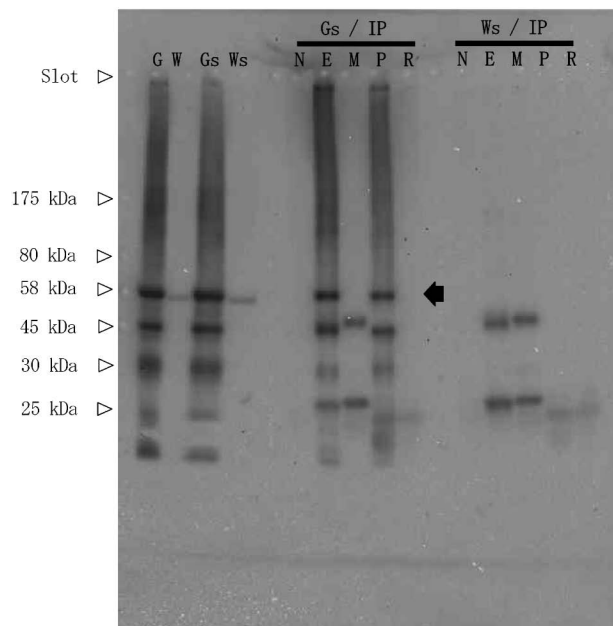


Fig. 3. Western Analysis on PgsA-anchored E7 Antigen of HPV Type16 in a Mucosal Vaccine of *Lactobacillus*

The western analysis was performed using an anti-E7 mouse IgG as the primary antibody. Samples are represented as follows: G, crude extracts of a mucosal vaccine granules of transgenic *Lactobacillus* accumulating PgsA-E7 fusion protein (approximately 55 kDa in size); W, lyophilized cells of the wildtype strain; Gs and Ws, centrifuged supernatants of G and W; Gs/IP and Ws/IP, immuno-precipitants from Gs and Ws. The immuno-precipitants were obtained in the absence (N) and the presence of antibodies of anti-E7 mouse IgG (E), non-specific mouse IgG (M), anti-PgsA rabbit IgG (P) and non-specific rabbit IgG (R). White arrowheads indicate protein sizes in kDa. As expected, the vaccine granule contained a 55-kDa protein able to bind to anti-E7 and anti-PgsA antibodies (a black arrow, lane P of Gs/IP).

アンカーと E7 抗原タンパク質の融合体を保持することが分かった。

このように表層分子ディスプレイを用いた本乳酸菌製剤の特徴としては、死菌化処理と抗原タンパク質の保持を両立させている点にある。目的タンパク質を大きく損なわず死菌化させた乳酸菌を GMP 製剤化したことは、一定の評価ができるだろう。また、これまでに実施した本乳酸菌製剤の非臨床試験 (GLP 非適合) では、原薬に起因する異常はいずれの試験においても認められていない。しかし、使用する抗原並びに組換え体自体の安全性においては十分な検討が必要であり、この点は今後の課題として GLP 試験を実施するなど医薬品開発における安全性データの取得を目指したい。

このように表層分子ディスプレイ乳酸菌を用いたヒト用の経口粘膜ワクチンの開発例として、研究開発を進めてきた、本乳酸菌製剤「HPV 治療的ワクチン」の臨床応用の進展が興味深く待たれる。

5. まとめ

ヒトに対する安全性が高いこと、経口摂取が可能なこと、遺伝子組換えにより有用タンパク質を生産蓄積できることから、乳酸菌を有用タンパク質の運搬体として扱う医薬品開発の発想が生まれてきた。そのような乳酸菌の医薬品開発の方向性の 1 つとして、粘膜面への抗原運搬体とする経口粘膜ワクチンがある。この粘膜ワクチンの開発において、翻訳融合を介した表層分子ディスプレイは、乳酸菌による抗原の提示手法として有用な方法の 1 つとなっている。表層分子ディスプレイと抗原運搬乳酸菌を技術基盤とする経口粘膜ワクチン開発は、現在まで、臨床使用に向けた製剤開発へと進展しており、その製剤の臨床での効果が期待される。

REFERENCES

- Adams M. R., *J. Biotechnol.*, **68**, 171–178 (1999).
- Fuller R., *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365–378 (1989).
- Hachimura S., *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **18**, 54–57 (2007).
- Yamamura H., Uchida S., “Probiotics and Biogenics,” eds. by Ito K., Igimi S., Sasaki T., Takano T., Hattori M., Morita H., NTS Inc., Tokyo, 2005, pp. 405–416. (in Japanese)
- Kullen M. J., Klaenhammer T. R., *Curr. Issues Mol. Biol.*, **2**, 41–50 (2000).
- Cheun H. I., Kawamoto K., Hiramatsu M., Tamaoki H., Shirahata T., Igimi S., Makino S. I., *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 1347–1453 (2004).
- Thole J. E., van Dalen P. J., Havenith C. E., Pouwels P. H., Seegers J. F., Tielen F. D., van der Zee M. D., Zegers N. D., Shaw M., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2**, 94–99 (2000).
- Medina E., Guzman C. A., *Vaccine*, **19**, 1573–1580 (2001).
- Wells J. M., Mercenier A., *Nature Rev. Microbiol.*, **6**, 349–362 (2008).
- Kunisawa J., Gohda M., Kiyono H., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 319–326 (2007).
- Igimi S., *Bio. Industry*, **22**, 38–45 (2005).
- Stahl S., Uhlen M., *Trends Biotechnol.*, **15**, 185–192 (1997).
- Georgiou G., Stathopoulos C., Daugherty P. S., Nayak A. R., Iverson B. L., Curtiss R. 3rd, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 29–34 (1997).
- Agterberg M., Adriaanse H., van Bruggen A., Karperien M., Tommassen J., *Gene*, **88**, 37–45 (1990).
- Pallesen L., Poulsen L. K., Christiansen G., Klemm P., *Microbiology*, **141**, 2839–2848 (1995).
- Lu Z., Murray K. S., Van Cleave V., LaVallie E. R., Stahl M. L., McCoy J. M., *Nat. Biotechnol.*, **13**, 366–372 (1995).
- Xu Z., Lee S. Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5142–5147 (1999).
- Steidler L., Remaut E., Fiers W., *J. Bacteriol.*, **175**, 7639–7643 (1993).
- Pozzi G., Contorni M., Oggioni M. R., Manganeli R., Tommasino M., Cavalieri F., Fischetti V. A., *Infect. Immun.*, **60**, 1902–1907 (1992).
- Shigechi H., Koh J., Fujita Y., Matsumoto T., Bito Y., Ueda M., Satoh E., Fukuda H., Kondo A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5037–5040 (2004).
- Leenhouts K., Buist G., Kok J., *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 367–376 (1999).
- Franke C. M., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Kok J., Venema G., Venema K., *J. Bacteriol.*, **178**, 1766–1769 (1996).
- Poquet I., Ehrlich S. D., Gruss A., *J. Bac-*

- teriol.*, **180**, 1904–1912 (1998).
- 24) Buist G., Kok J., Leenhouts K. J., Dabrowska M., Venema G., Haandrikman A. J., *J. Bacteriol.*, **177**, 1554–1563 (1995).
- 25) Avall-Jaaskelainen S., Kyla-Nikkila K., Kahala M., Miikkulainen-Lahti T., Palva A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5943–5951 (2002).
- 26) Xin K. Q., Hoshino Y., Toda Y., Igimi S., Kojima Y., Jounai N., Ohba K., Kushiro A., Kiwaki M., Hamajima K., Klinman D., Okuda K., *Blood*, **102**, 223–228 (2003).
- 27) Narita J., Okano K., Kitao T., Ishida S., Sewaki T., Sung M. H., Fukuda H., Kondo A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 269–275 (2006).
- 28) Sung M. H., Hong S. P., Lee J. S., Jung C. M., Kim C. J., Soda K., Ashiuchi M., Patent WO 03/014360 A1.
- 29) Kanda T., Kukimoto I., *Virus*, **56**(2), 219–230 (2006).