

# 遺伝子組換えカイコから生産される タンパク質を利用した 製品の開発について

株式会社免疫生物研究所 研究開発部長 前田 雅弘

公開シンポジウム  
「カイコ産業の未来」  
遺伝子組換えカイコ実用化の現状と今後の課題  
平成23年2月3日(木)  
群馬県庁ビジターセンター

にて発表した原稿を公開しております



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

## 発表要旨

1953年にDNAの二重らせん構造が発見されたことからはじまる遺伝子組換え技術の進歩は、その後1970年代から加速度的に発展した。その結果、近年では天然から抽出することが困難であり微量な、しかし、有用な生理活性を持つタンパク質を安定的に得ることができるようになってきた。現在では、これらのいわゆる遺伝子組換えタンパク質は、治療用、診断用医薬品、研究用試薬、化粧品原料、などの多方面にわたって利用されてきている。

これら遺伝子組換えタンパク質の生産における宿主としては、大腸菌、酵母などの微生物、水草・藻・米などの植物、動物や昆虫由来の培養細胞、マウス・ウシ・ニワトリなどの動物個体、さらにはタンパク質合成酵素のみからなる無細胞合成系などの種々の宿主・合成系が開発・利用されているが、それぞれ、長所・短所、併せ持っており、生産するタンパク質の特性や目的に合致した生産系が利用されている。

我々は、長年の開発から、トランスジェニック(TG)カイコの繭に目的のタンパク質を生産させる技術を開発してきており、本技術を利用した遺伝子組換えタンパク質の製品化に向けた段階にきている。本発表では、これらの現状に関して報告する。

TGカイコの繭による遺伝子組換えタンパク質の生産においては下記のような特徴が挙げられる。

1. カイコであるがゆえに、○飼育が容易、○小規模で安価な施設で大量な飼育が可能、○物理的・生物学的封じ込めが容易、○飼育に関する技術・知識の蓄積が豊富(養蚕の技術-日本特有)、
2. 繭にタンパク質を作らせるために、○発現量が高い、○精製が容易(夾雑タンパクが少ない。セリン・フィブリンの2種類のみ)、○ウイルスの混入、感染の可能性が低く安全、○動物由来タンパクが含まれない、
3. TGカイコなので、○一度樹立できてしまえば後はカイコを飼育して繭を作らせるだけである、○安定的に同じ品質のものを作れる。

我々としては、これらの長を生かして、特に抗体の生産に注力して開発を進めている。元来、抗体とは高等動物に固有に備わっている免疫機構の主役となるタンパク質であるが、この数十年間にわたる研究から、マウスやウサギなどの動物に免疫し目的とする抗原に対する特異的な抗体を取得することが可能になった。現在では、これらの抗体を用いて、各種生物学的研究におけるツールとしての研究用試薬、対外診断薬、治療用医薬品などに利用されている。

IBLは長年、この抗体を中心とした各種製品の開発・製品化・販売を行ってきた。その中で、抗体の生産に関する種々の問題点に直面することも多く、新しい抗体の生産技術を開発してきた。それら問題点を打開できる可能性を持つ技術として、TGカイコによる抗体・タンパク質生産技術は非常に期待できるものだと考えている。

これらの問題点の一つは、非特異反応、特にヒト血清検体中のHAMA(Human Anti Mouse Antibody)の問題がある。検体であるヒト血清中に存在するマウス抗体に対する非特異的反応性のために本来は測定結果が陰性の検体であるにもかかわらず陽性(疑陽性)に出てしまうことがある。これを抑える有効な技術の一つとしてはマウス抗体のヒト化、キメラ化、という方法がある。抗体産生細胞から抗体遺伝子をクローニングし遺伝子工学的手法によって非特異反応の原因であるマウス抗体部分をヒト型化してしまう方法である。このように加工した抗体遺伝子をTGカイコの繭で生産することを試みており、既に、この技術によって非特異反応が抑えられることを確認している。このような試みは上述した特徴に加えて、TGカイコでの抗体生産の大きなメリットになると考えられる。

現在までに作製したTGカイコによる抗体の生産量は、ヒト繭あたり約1-5mg程度になる。グラム単位の生産にも充分対応可能な生産量であり、安価な抗体の生産技術として非常に期待できると考える。

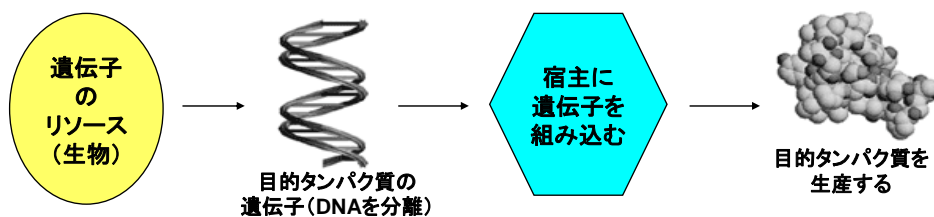
ただし、TGカイコによる遺伝子組換えタンパク質生産技術においては、未だ開発・検討しなければならない課題も残っている。その一つは、高い可能性を有しているが未だ本技術を用いたタンパク質の実用化が実現されておらず、そのための実績作りが必要な段階である。幸いなことに、我々の有する製品群には研究用試薬がありこの分野は製品化のための種々の法的制約が比較的低い品質に問題が無ければ自社製品として開発することが可能である。これらの実施可能な領域から実績を作りながら、治療用医薬品の生産、といった将来の大きな目標に向けて着実に研究・開発・製品化を進めていく計画である。

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

## 遺伝子組換えタンパク質はどうやって作るか？

### 遺伝子組換えタンパク質生産技術

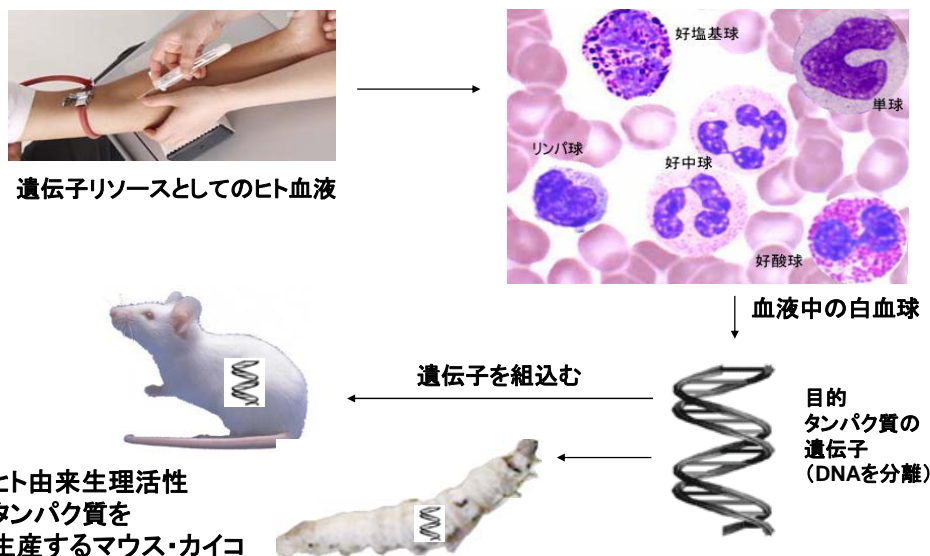
微量しか存在しないために  
天然物から抽出精製するのが困難な  
タンパク質を大量に作る技術



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

IBL

### 例えば！ ヒト白血球由来の生理活性タンパク質の 遺伝子組換えタンパク質を作るとすると！



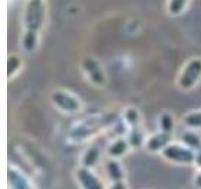
Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

IBL

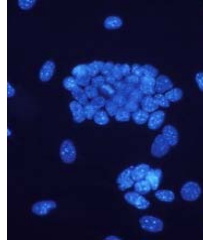
## 種々の遺伝子組換えタンパク質生産系



大腸菌



酵母菌



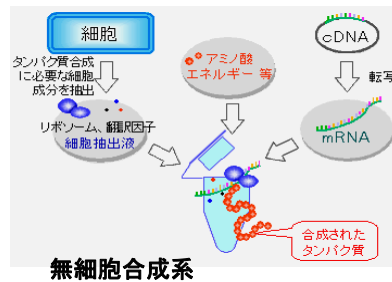
培養細胞



米などの植物



動物個体



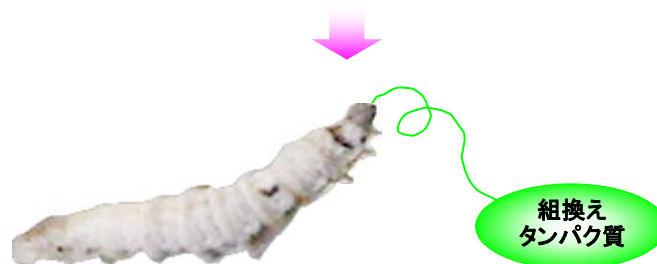
カイコ

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

IBL

## トランスジェニックカイコを用いた組換えタンパク質生産系

- カイコは重さ約0.3gの繭を作るが、この繭の97%は絹タンパク質である。
- カイコのもつ高い絹タンパク質合成能力を利用すれば、安価にかつ大量に組換えタンパク質を生産できる。



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

IBL

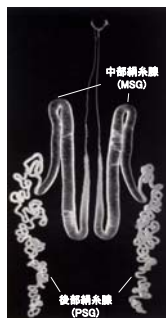
## セリシン層に組換えタンパク質を分泌→繭から抽出

### 中部絹糸腺

親水性のセリシンを合成。  
セリシン層に組換えタンパク質を分泌させると、絹繊維からタンパク質を容易に回収することが可能。



絹糸断面の電顕写真

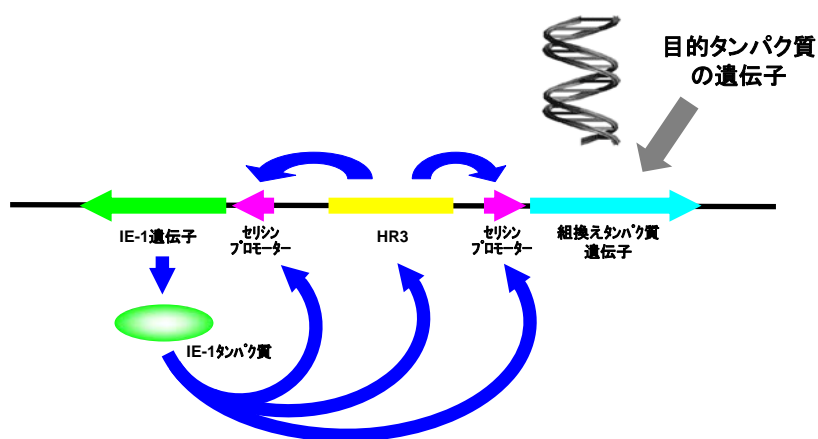


絹糸腺の構造

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd



## カイコに組み込む遺伝子の構造



BmNPV由来のHR3およびIE-1によるセリシンプロモーターの転写活性増強

HR3 : BmNPV由来エンハンサー  
IE-1 : BmNPV由来転写調節因子

平成21年2月に特許成立

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

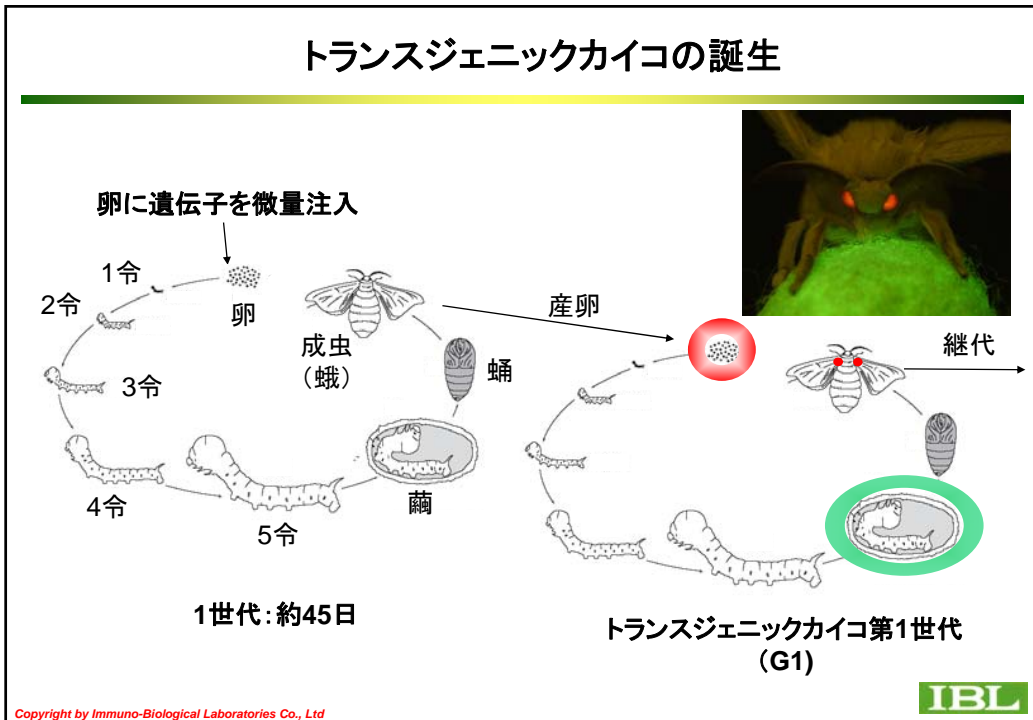


## カイコ卵へのベクターのマイクロインジェクション



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

## トランスジェニックカイコの誕生



### 蛍光を発する絹糸を吐くカイコ

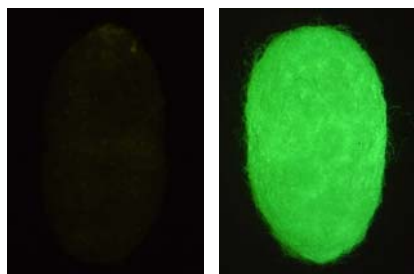


Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd



### 中部絹糸腺発現系によるEGFPの発現

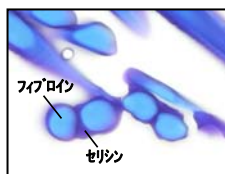
蛍光タンパク質を含む  
トランスジェニックカイコの繭



野生型

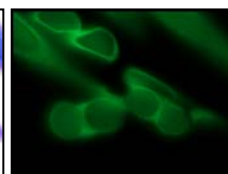
トランスジェニック

トランスジェニックカイコの  
繭糸の断面

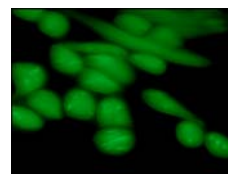


フィブロイン  
セリシン

Azure-B



EGFP

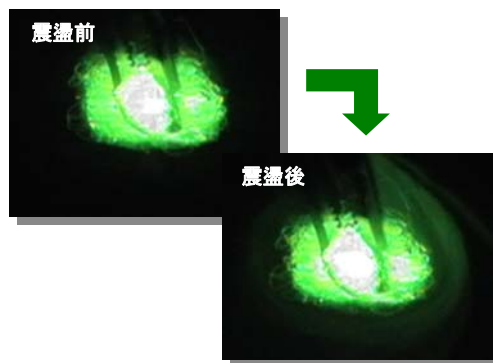


後部絹糸腺発現系

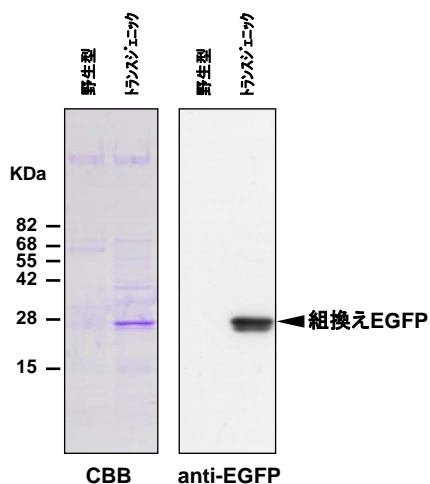
Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

## 中部絹糸腺発現系の利点

1. 抽出が容易
2. 純度が高い



蛍光タンパク質の抽出



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

IBL

## 生産に成功したタンパク質

ゼラチン(コラーゲン)

抗体(マウス、ヒト)

アルブミン

ホルモン(成長ホルモン、他)

サイトカイン

成長因子(bFGF、EGF、HGF、他)

酵素(リゾチーム、他)

その他

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

IBL

## TGカイコ抗体の製品化 抗体とは？

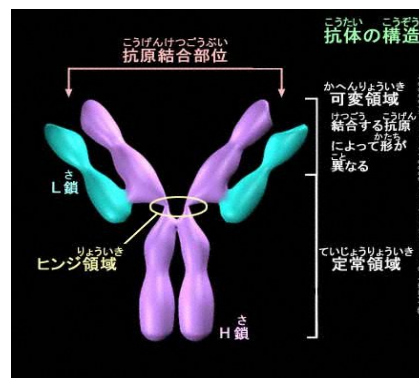
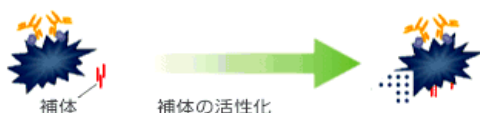


抗体とは体の中で作られるタンパク質で、体内に侵入した細菌やウイルス、毒素などに結合し、弱毒化・排除する働き、いわゆる免疫、を担っている。

### ●病原体の殺傷



### ●有害物質(毒素)の中和



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd



## 抗体の産業利用



- 様々な物質(抗原)を選択的に識別し、結合する性質  
→抗原(タンパク質や他の物質)の検出・分離・精製などの  
**研究用試薬、診断薬**として利用。

例) インフルエンザウイルス検査用キット

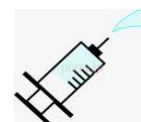


富士レビオ(株) エスプライン

- がん細胞を殺傷したり、病因になる物質を中和する能力  
→抗体自身を治療薬として用いる、いわゆる**抗体医薬品**の開発が盛んになってきている。

例) 乳がん、大腸がんなどの治療薬

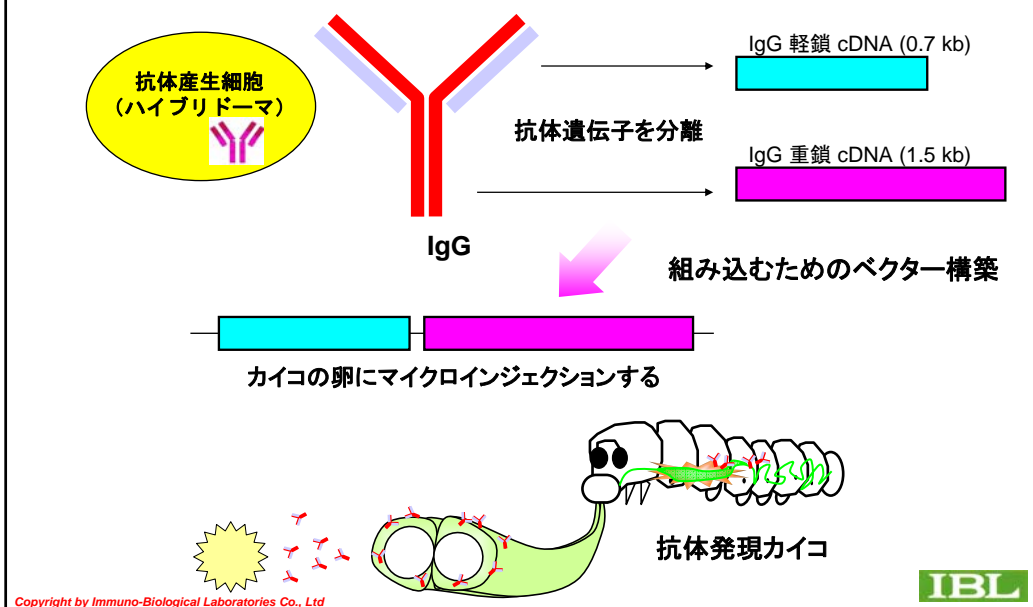
→抗体の産業利用としては最も**付加価値が高く**、**必要量も多い(kg単位で必要)**。



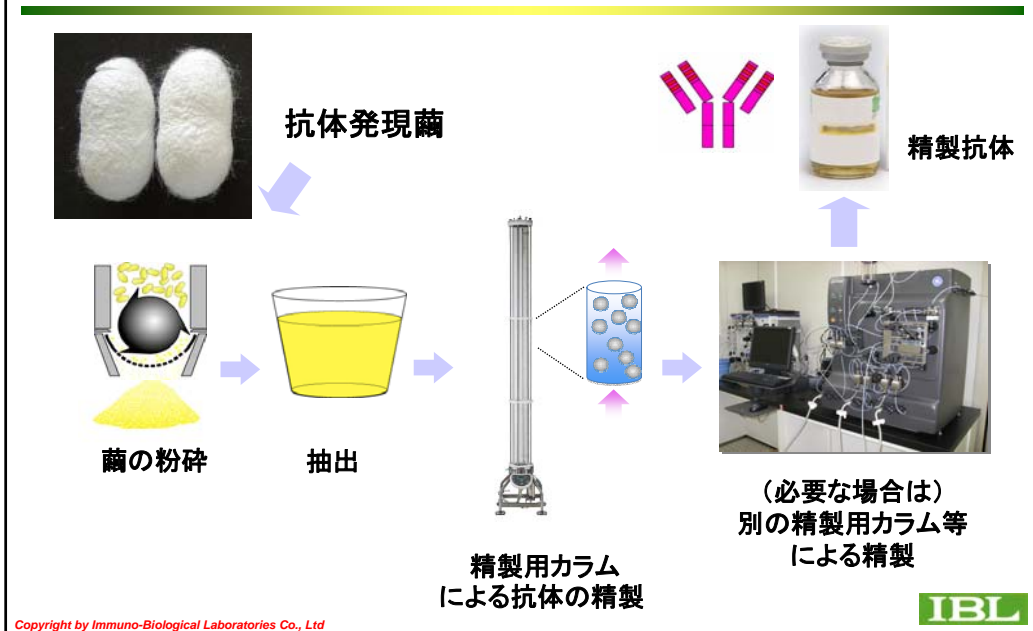
Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd



## カイコによる抗体(IgG)軽鎖、重鎖の発現



## TGカイコ繭からの抗体抽出・精製



## TGカイコ繭生産系の利点



### 研究用試薬・診断薬用抗体:

#### マウス腹水

- ・安価な生産が可能
- ・ロット間差大
- ・動物愛護の観点から問題あり



### 抗体医薬:CHO細胞培養タンク

- ・ロット間差小
- ・生産コストが高い

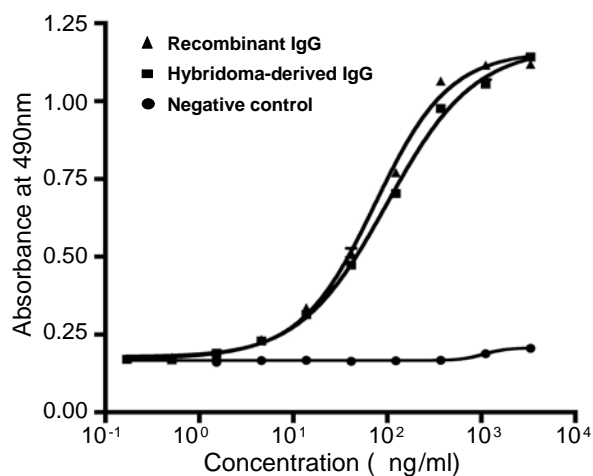
### トランジェニックカイコ

- ・安価な生産が可能
- ・ロット間差小
- ・動物愛護の問題無し
- ・カルタヘナ法の対象外
- ・遺伝子改変で加工が可能

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd



## TGカイコ繭で生産した組換えIgGの活性



Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

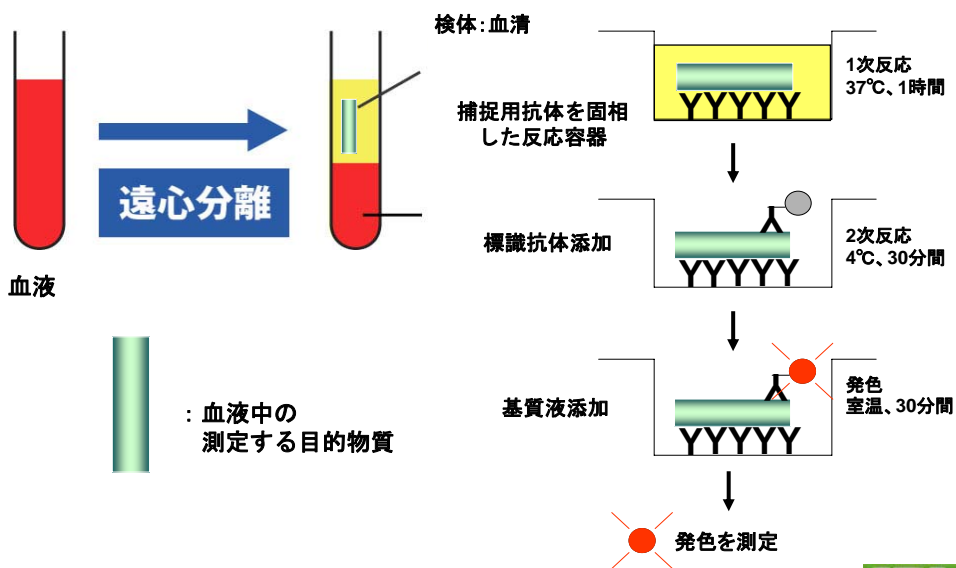


抗体の産業利用 研究用試薬として ELISA 測定キット-IBL



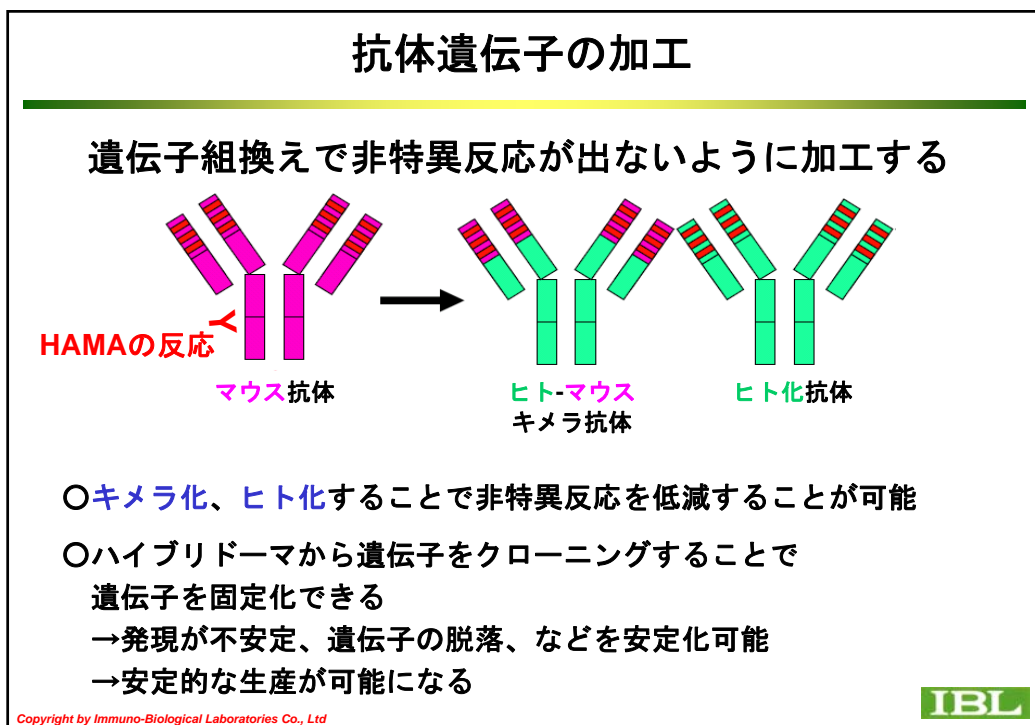
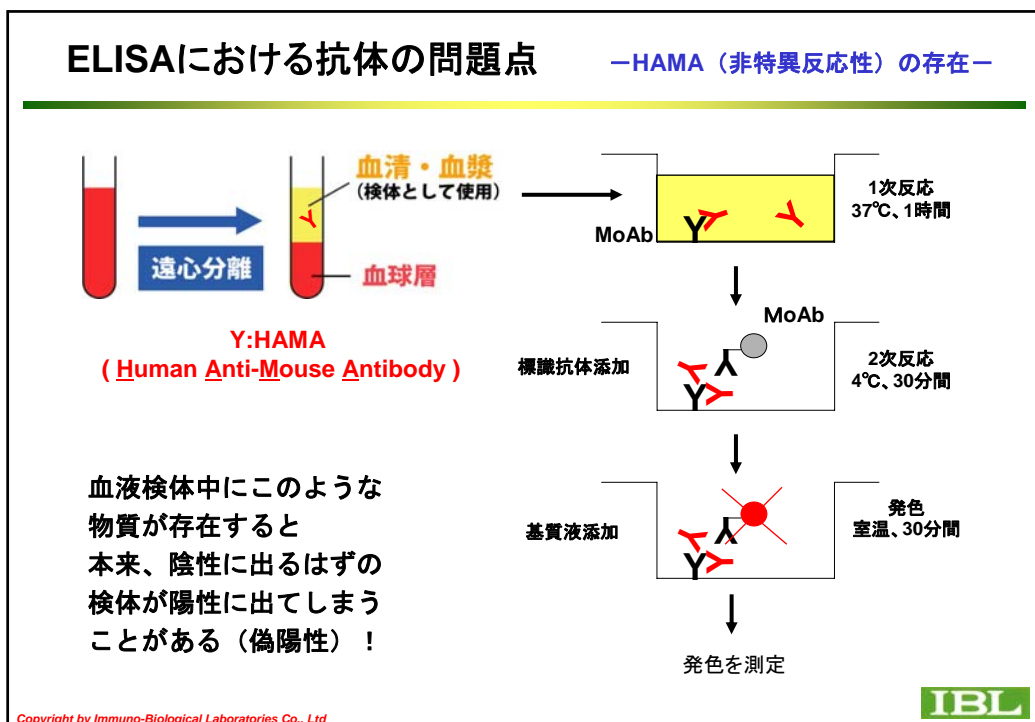
Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

ELISA 測定キットの原理

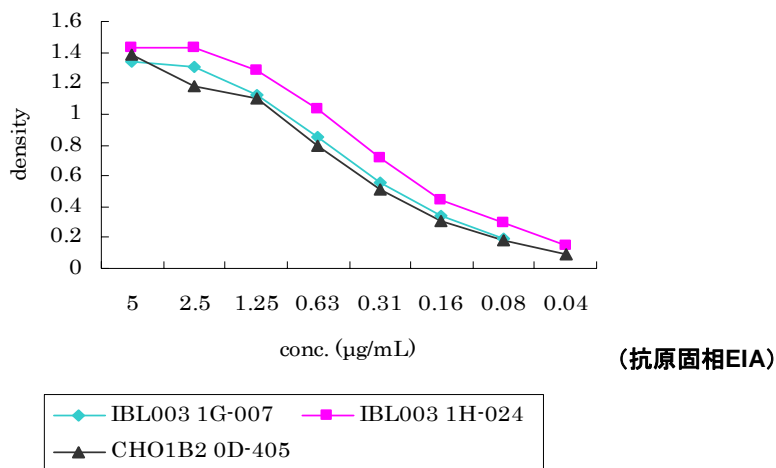


Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd





### 加工したキメラ化抗体をTGカイコで作製し元の抗体と比較



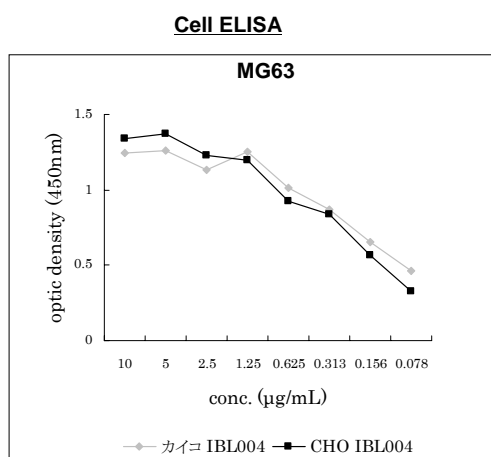
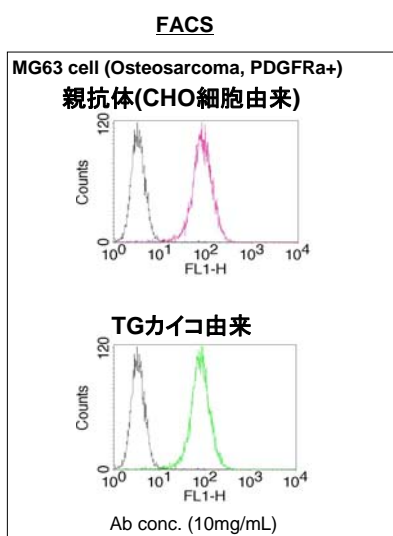
抗体濃度はHuman IgG ELISAを参照.

**TGカイコ抗体は、元のマウス抗体と同等な反応性を示した**

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd



### 加工したヒト化抗体をTGカイコで作製し元の抗体と比較



2<sup>nd</sup> Ab: Anti-human IgG-FITC (IBL, 17527, 1mg/mL)

2次抗体: Anti-human IgG-FITC (IBL, 17527, 25mg/mL)

**同等な反応性を示した**

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

抗体濃度はhuman IgG ELISAを参照

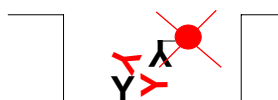


## 加工したTGカイコ抗体による非特異反応の低減化

Dilution	Human IgG		IBL003 マウス抗体		IBL003 キメラ抗体カイコ	
	HAMA Serum	Normal Serum	HAMA Serum	Normal Serum	HAMA Serum	Normal Serum
× 2	0.101	0.062	0.340	-0.005	0.012	-0.003
× 4	0.079	0.069	-0.005	-0.008	0.002	0.000
× 8	0.086	0.079	-0.006	0.000	0.012	0.005
× 16	0.096	0.102	-0.004	-0.006	0.014	0.016
× 32	0.125	0.121	-0.008	-0.005	0.008	0.003
× 64	0.115	0.110	-0.004	-0.004	0.006	0.006
× 128	0.143	0.115	0.495	-0.003	0.005	0.003
blank	0.129	0.122	0.007	0.003	0.006	0.000

Dilution	IBL004 マウス抗体		IBL004 ヒト化抗体カイコ	
	HAMA Serum	Normal Serum	HAMA Serum	Normal Serum
× 2	2.617	0.034	0.044	0.020
× 4	0.058	0.047	0.028	0.022
× 8	0.082	0.051	0.036	0.027
× 16	0.066	0.048	0.048	0.038
× 32	0.044	0.029	0.039	0.043
× 64	0.027	0.027	0.045	0.050
× 128	0.024	0.022	0.051	0.054
blank	0.023	0.023	0.064	0.055

各抗体を固相  
↓血清sampleを希釈し添加  
↓37°C 60min  
↓HRP-標識抗体を添加  
↓4°C 30min  
TMBにて発色



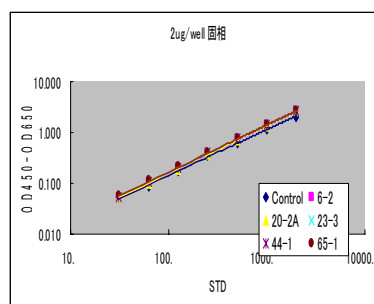
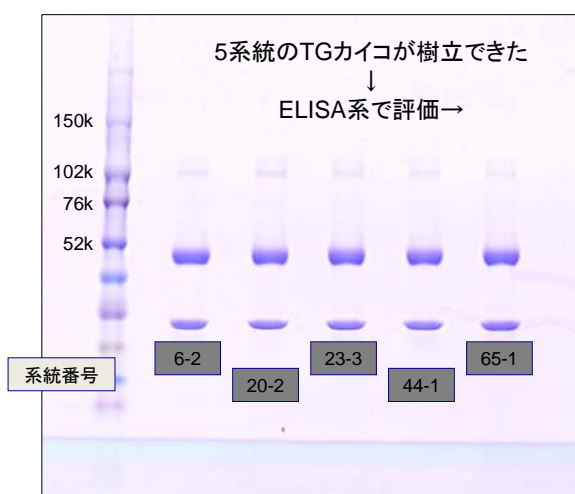
固相抗体をキメラ化、ヒト化することで  
HAMA血清の非特異反応を抑制できた。

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.

IBL

## TGカイコ生産菌の特徴

—低い系統間差、ロット間差—

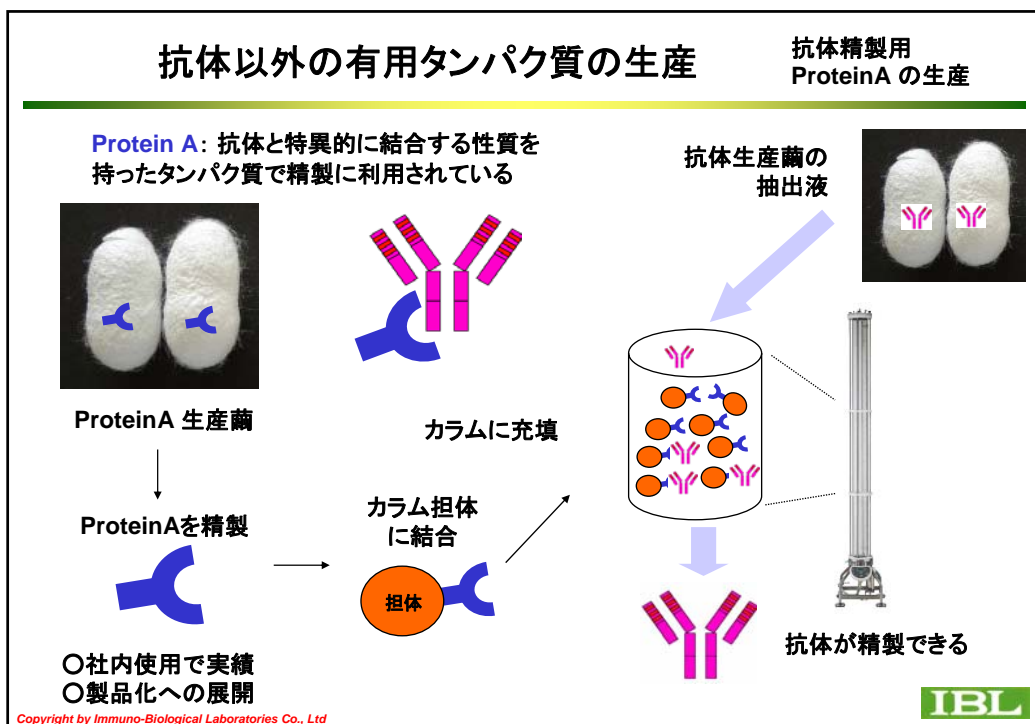


○系統間での差が認められない。

○バックグラウンドが低く、低濃度でもこれまでの抗体と同様に使用できる。

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.

IBL



### (株)免疫生物研究所 事業の構成

1. 研究用試薬関連事業	抗体関連試薬販売	
	その他の試薬販売	
	試薬関連受託サービス	
2. 実験動物関連事業	疾患モデル動物販売	
	疾患モデル動物関連受託サービス	
3. 医薬関連事業	医薬シーズライセンス	
	体外診断用医薬品販売	
4. その他事業	健康食品販売	

Copyright by Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd

