

カイコによる医薬品生産の実現へ向けて

➤ 動物用医薬品の開発

- ・(有)生物資源研究所(所長:根路銘国昭先生)と共同で、インフルエンザワクチンを開発
- ・日本全薬工業(株)と共同で動物用医薬品を開発

➤ ヒト用医薬品の開発

- ・TGカイコの優位性を確認

コスト優位性: 培養細胞系より低コスト

糖鎖構造の優位性:

昆虫型よりヒト型に近い糖鎖構造 (GlcNAcの付加、 α -1,3フコース無し)

α -1,6フコース無し(高ADCC活性抗体生産の可能性)

- ・候補タンパク質の選定

抗体医薬(高効率生産、結合活性の確認)

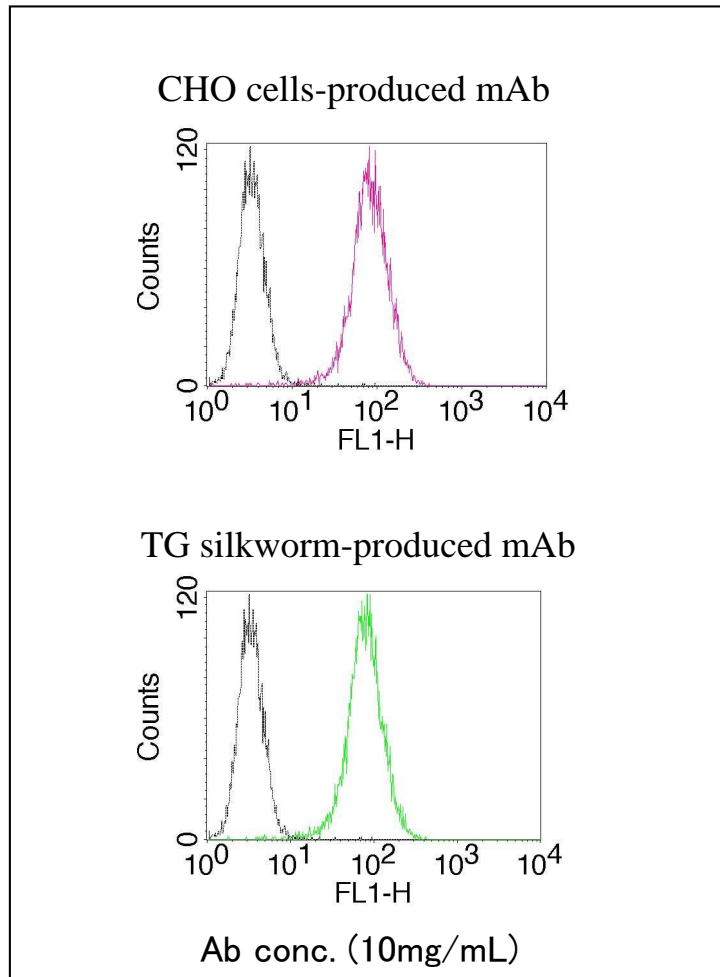
フィブリノゲン(高効率生産、凝固活性の確認)

インフルエンザワクチン(高効率生産、免疫応答能の確認)

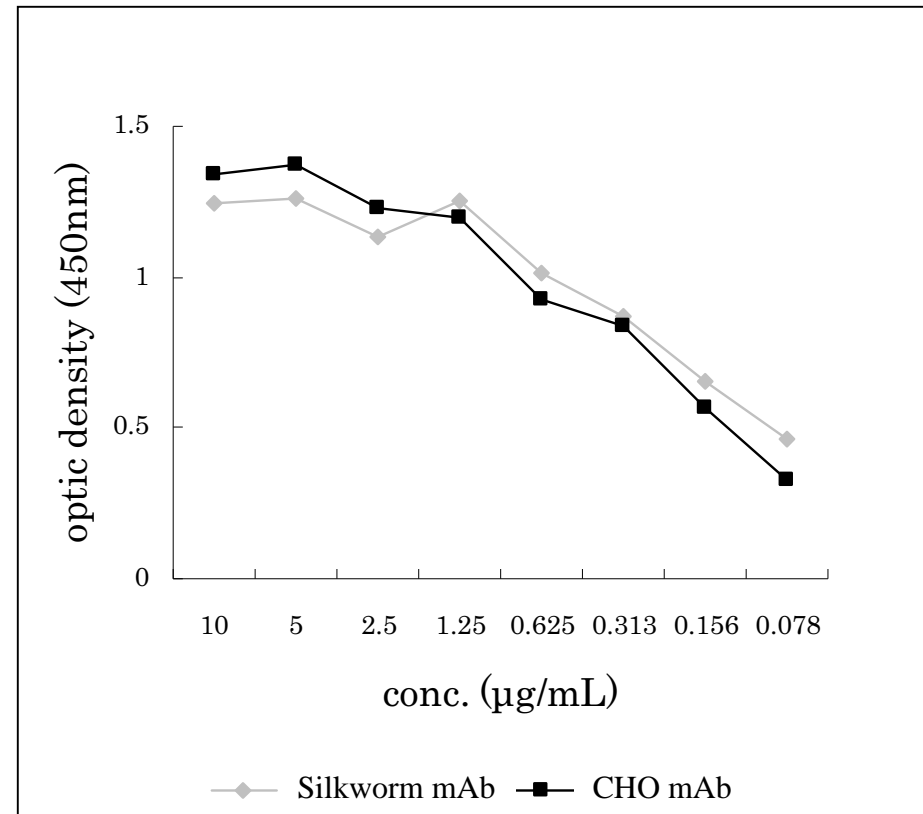


遺伝子組換えカイコで生産したヒト化抗体の評価

FACSによる評価



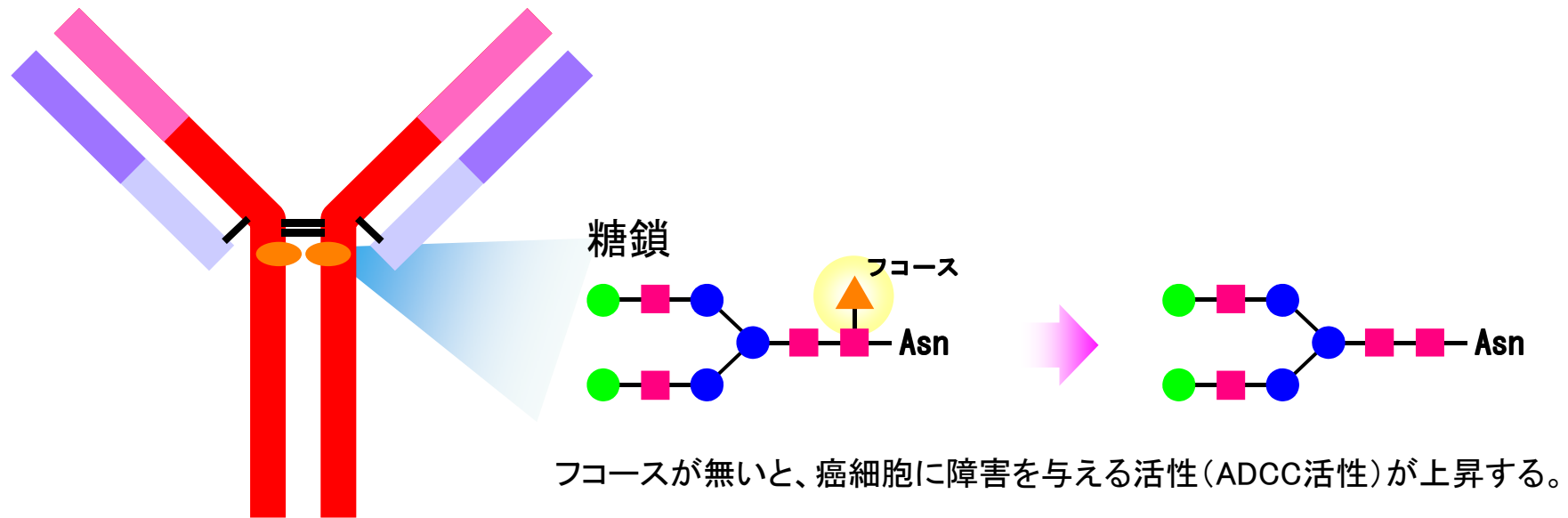
Cell ELISAによる評価



カイコで生産したヒト化抗体は、CHO細胞で生産したものと同等の活性を示した。

抗体医薬生産系としての可能性・優位性

- ・低コストでの生産が可能
- ・抗ADCC活性抗体の生産が可能

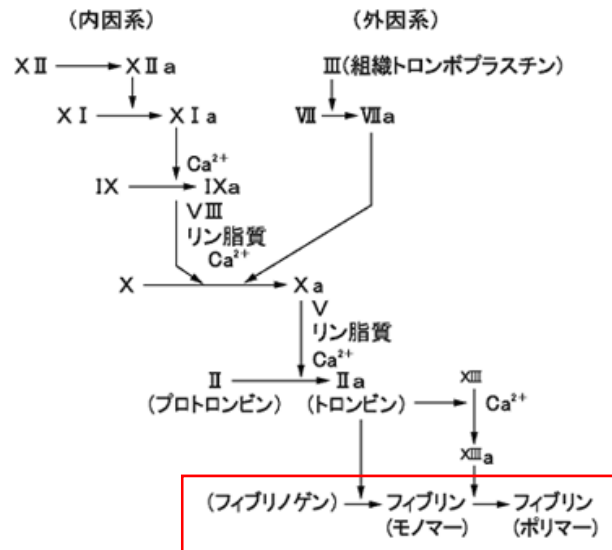


組換えカイコで生産した抗体の糖鎖には、最初から**フコースが存在しない**。

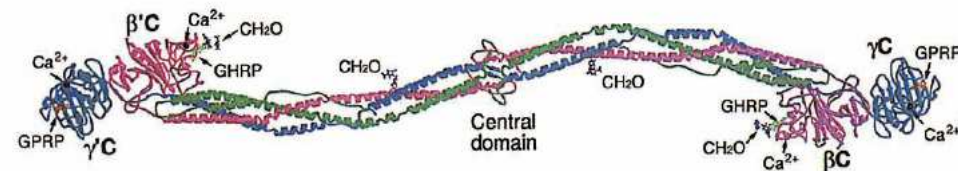
組換えカイコは、癌治療用抗体医薬品の生産系として有用である可能性がある。

フィブリノゲン

- ・血液凝固因子の一つであり、糊状に固まることで、直接的に止血にかかわる。
- ・A α 、B β および γ 鎖よりなる分子量340kの巨大なタンパク質である。
- ・先天性の低フィブリノゲン血漿の治療等に使用されている。
- ・ヒトの血液を原料として生産されており、かつてはウイルスの不活化処理が不十分であったことから、肝炎の感染源となる事故が多数発生した(現在では、ウイルスの不活化処理が行われている)。
- ・安全な組換えフィブリノゲンが求められているが、効率的な生産系が存在しない。



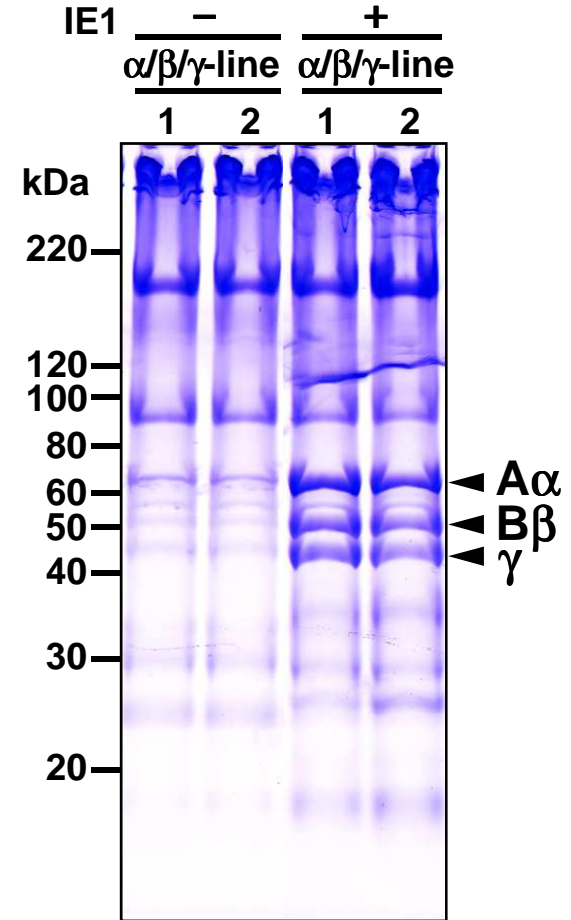
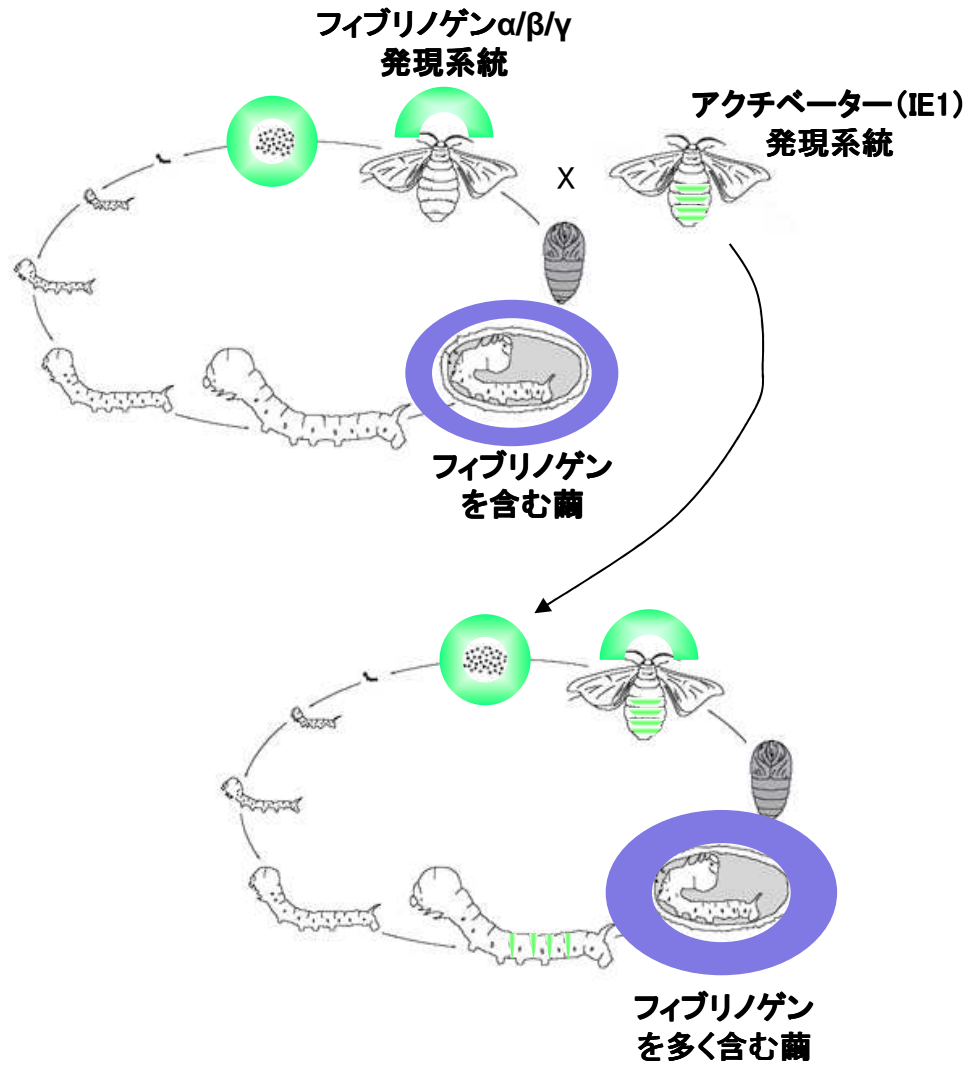
血液凝固カスケード



フィブリノゲンの分子構造



ヒトフィブリノゲン高発現カイコの作製



発現量: 約2mg/繭

組換えフィブリノゲンの凝固活性の確認

菌 ($\alpha/\beta/\gamma$ +IE1)



2M Urea, 0.1% TritonX-100, 50mM Tris-HCl
(pH7.5) にて組換えフィブリノゲンを抽出



限外ろ過にて濃縮



200mM NaCl および 500nM CaCl_2 を添加

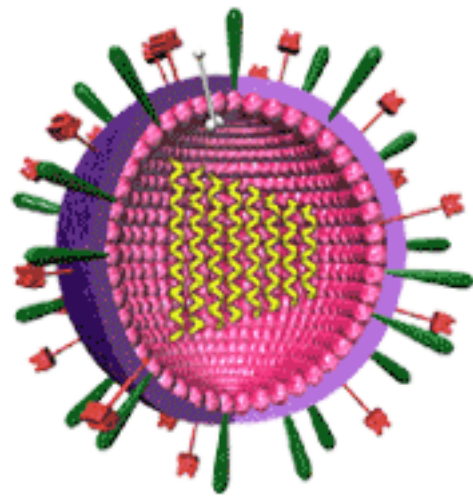


10 U/ml のトロンピンを加えて
37°C で 1 時間 インキュベート



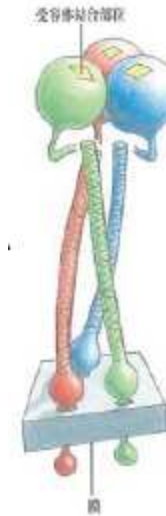
カイコで生産した組換えフィブリノゲンが凝固活性を有することを確認した。

インフルエンザワクチンの開発： 遺伝子組換えカイコによるヘマグルチニン(HA)の発現

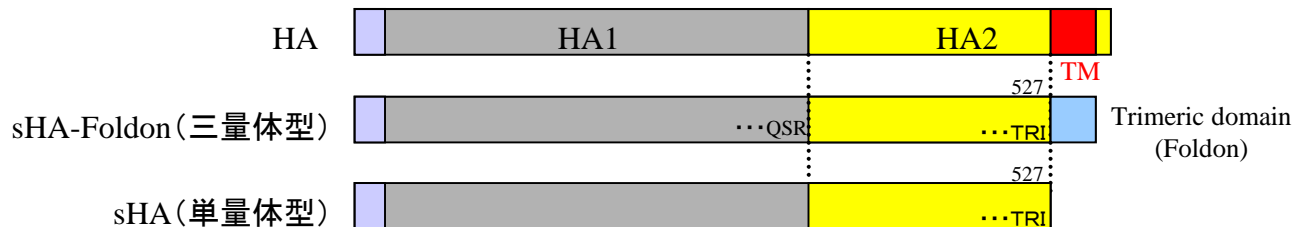


HA (ヘマグルチニン)
NA (ノイラミニダーゼ)

インフルエンザウイルスの構造

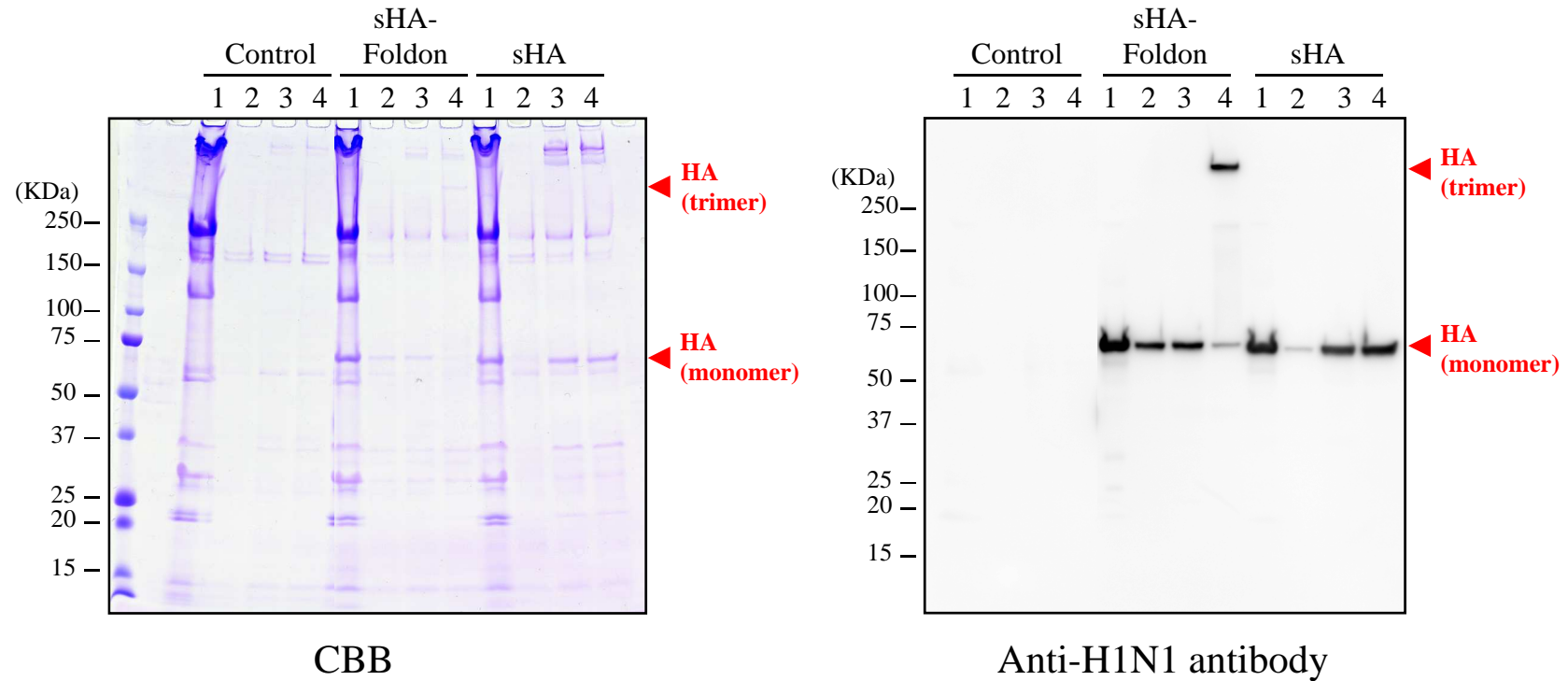


ヘマグルチニン(HA)の構造



カイコで発現するためのHA遺伝子の構造
(H1N1 (A/Okinawa/248/2009))

カイコ繭の電気泳動およびウエスタンブロット解析

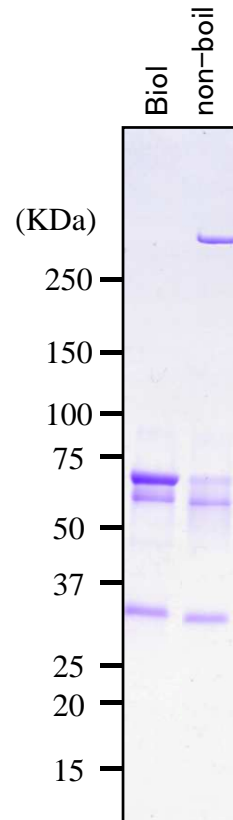


- 1: Total extraction (8M urea, 50mM Tris(8.0), 2% 2-ME)
- 2: PBS (final 0.5M NaCl)
- 3: 0.1% Triton X-100 in PBS (final 0.5M NaCl)
- 4: 0.1% Triton X-100 in PBS (final 0.5M NaCl) Non-boiled

組換えsHAおよびsHA-foldonの発現が確認できた。

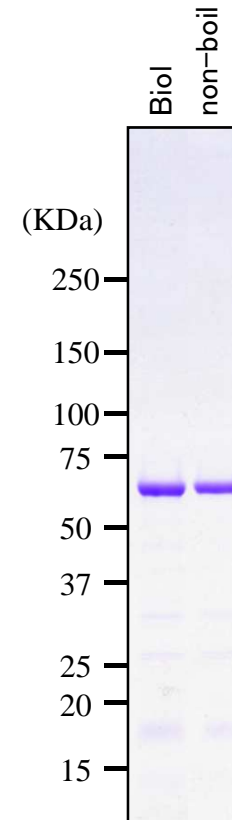
組換えHAの精製

Cocoons
↓
Extraction with 0.1% Triton X-100
in PBS (final 0.5M NaCl)
↓
Ammonium sulfate precipitation
↓
Cation exchange chromatography



sHA-foldon

Cocoons
↓
Extraction with 0.1% Triton X-100
in PBS (final 0.5M NaCl)
↓
Ammonium sulfate precipitation
↓
Anion exchange chromatography

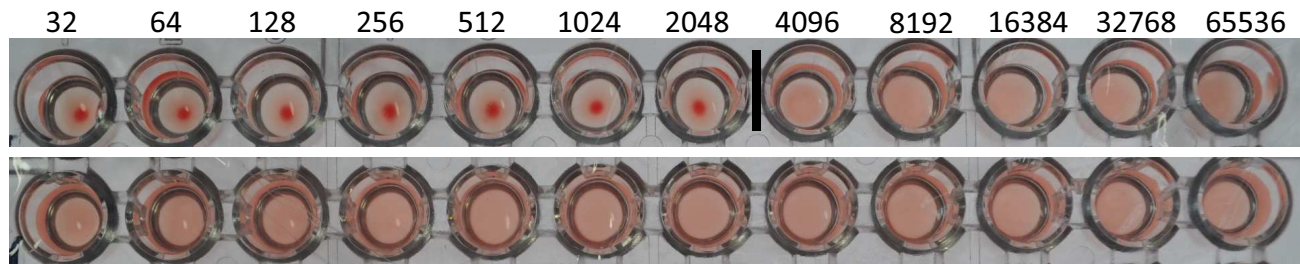


sHA

組換えHAの免疫応答能

30 μ gの精製sHA-foldonまたはsHAをddYマウスに免疫
↓
14日後および21日後に追加免疫
↓
28日後に採血し血清を分離
↓
赤血球凝集阻害アッセイ (HAI)によりHAに対する抗体価を定量

sHA-foldon



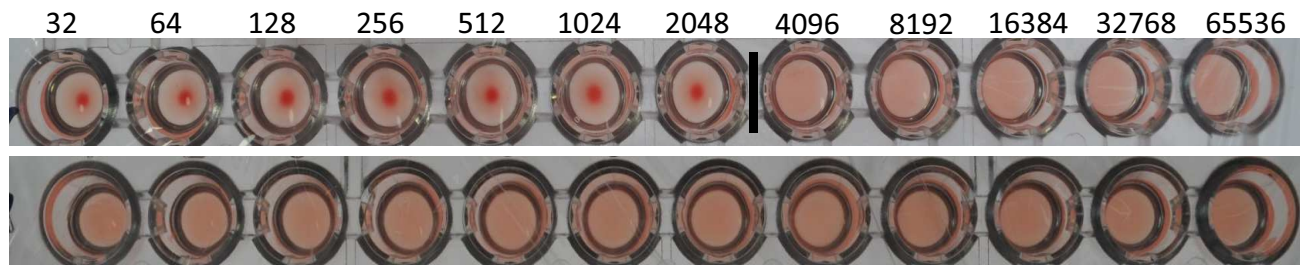
H1N1 (A/okinawa/248/2009)

HI titer: **2048**

H5N1 (A/duck/singapore-Q/F19/3/97)

HI titer: Negative

sHA



H1N1 (A/okinawa/248/2009)

HI titer: **2048**

H5N1 (A/duck/singapore-Q/F19/3/97)

HI titer: Negative

sHA-foldonおよびsHAを接種したマウスにおいて、高い免疫応答が認められた。