

2014年2月14日

日経アジア感染症会議

Renewal of Our Commitment to Fight against Communicable Disease

A-1 危機感染症に対する沖縄の行動計画

# 世界初、カイコ繭を用いた パンデミックインフルエンザワクチンの開発



株式会社免疫生物研究所  
遺伝子組換えカイコ事業部  
富田 正浩

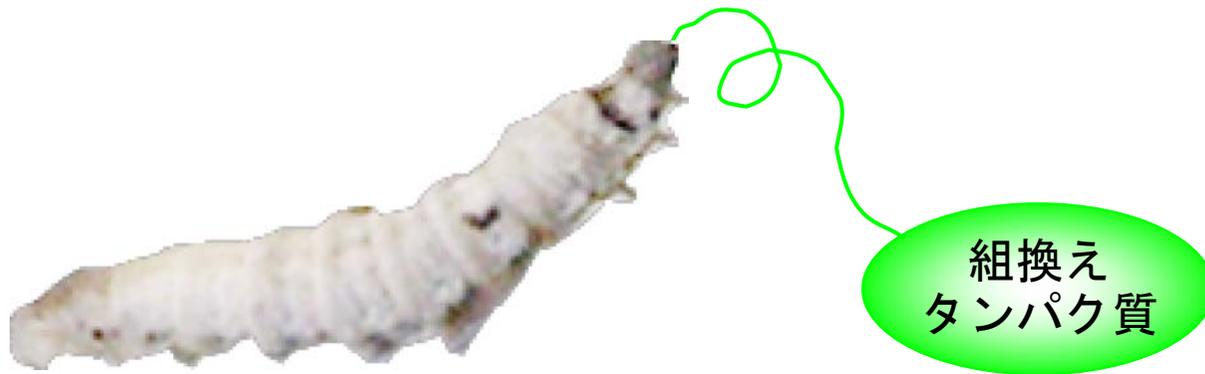


# トランスジェニック(TG)カイコを用いた 組換えタンパク質生産系

- 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。



# TGカイコによる組換えタンパク質生産システム



絹糸断面の電顕写真

絹繊維は、フィブロイン繊維とセリシン層より構成される

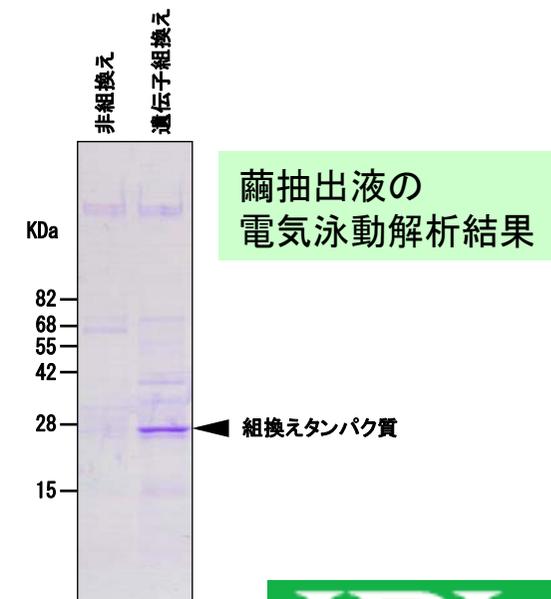


組換えタンパク質は、親水性のセリシン層に局在するため、  
容易に抽出が可能。

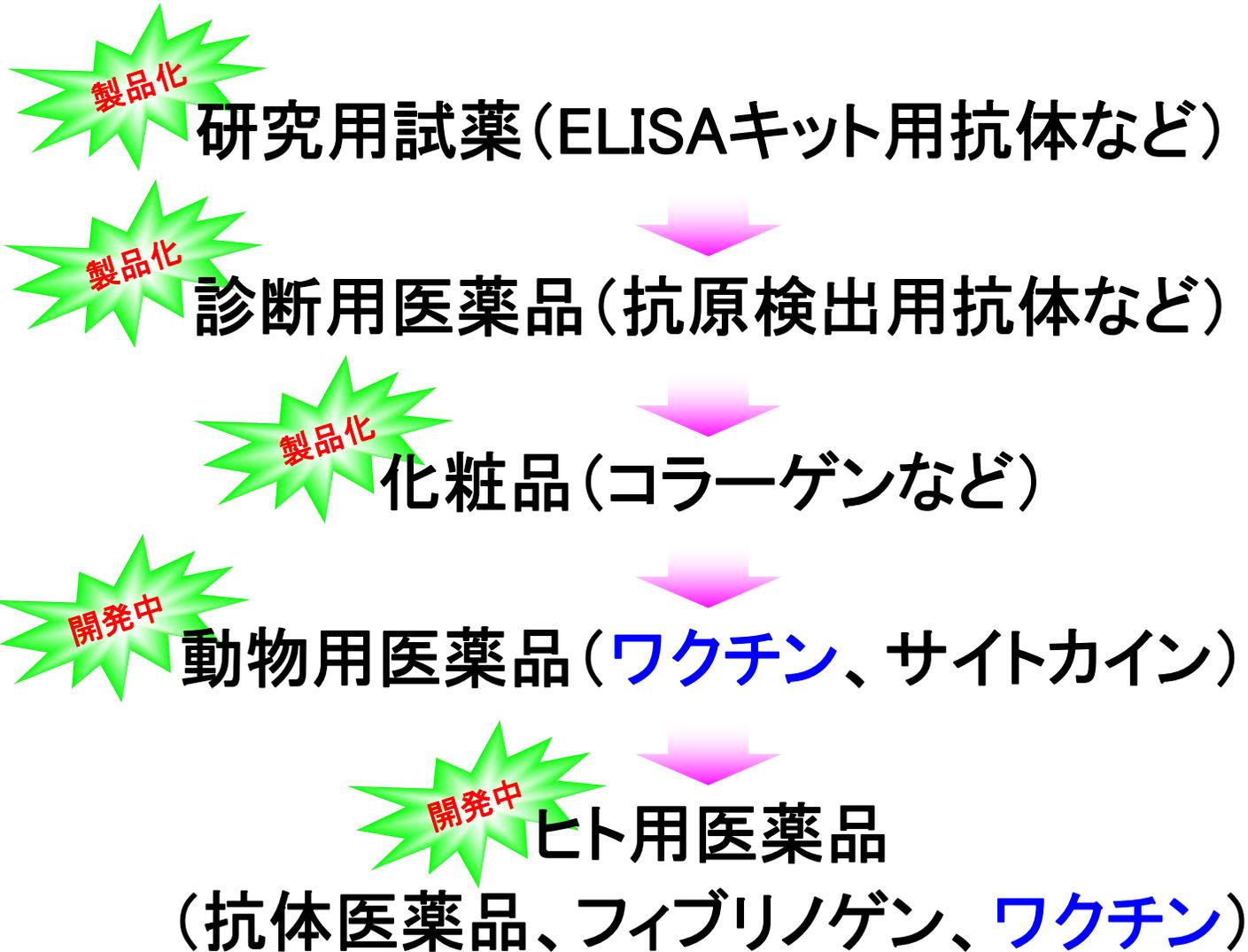
セリシンやフィブロイン等の絹タンパク質は難溶性。

組換えタンパク質を高純度で繭から抽出することができる。

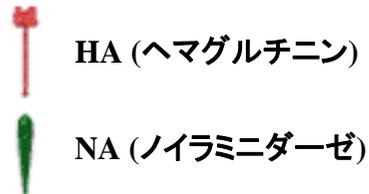
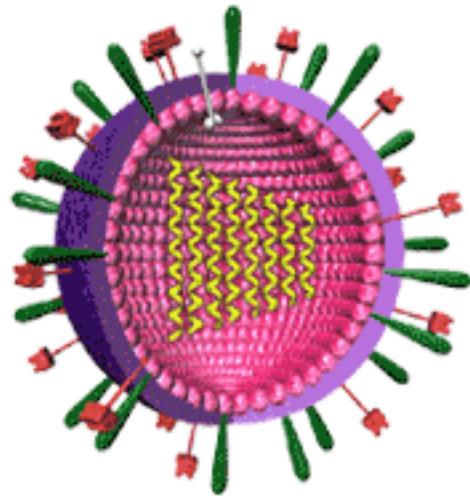
抽出後の精製操作が極めて容易。



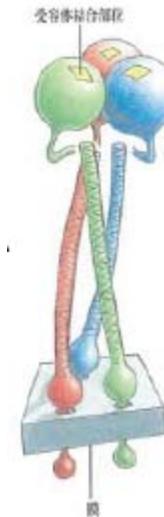
# TGカイコによるタンパク質生産の実用化構想



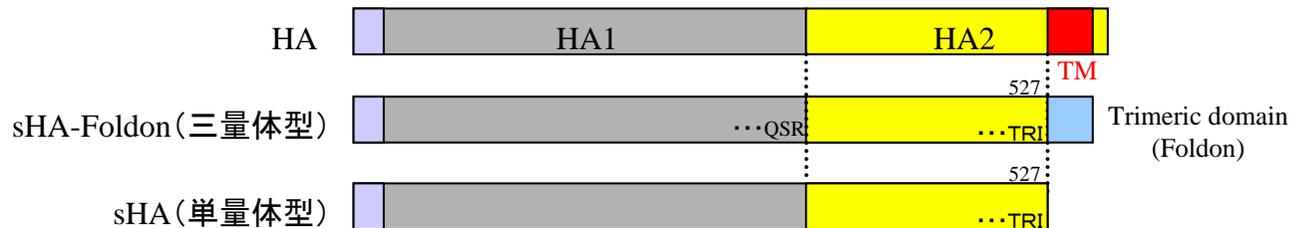
# TGカイコで生産するヘマグルチニン(HA)遺伝子のデザイン



インフルエンザウイルスの構造

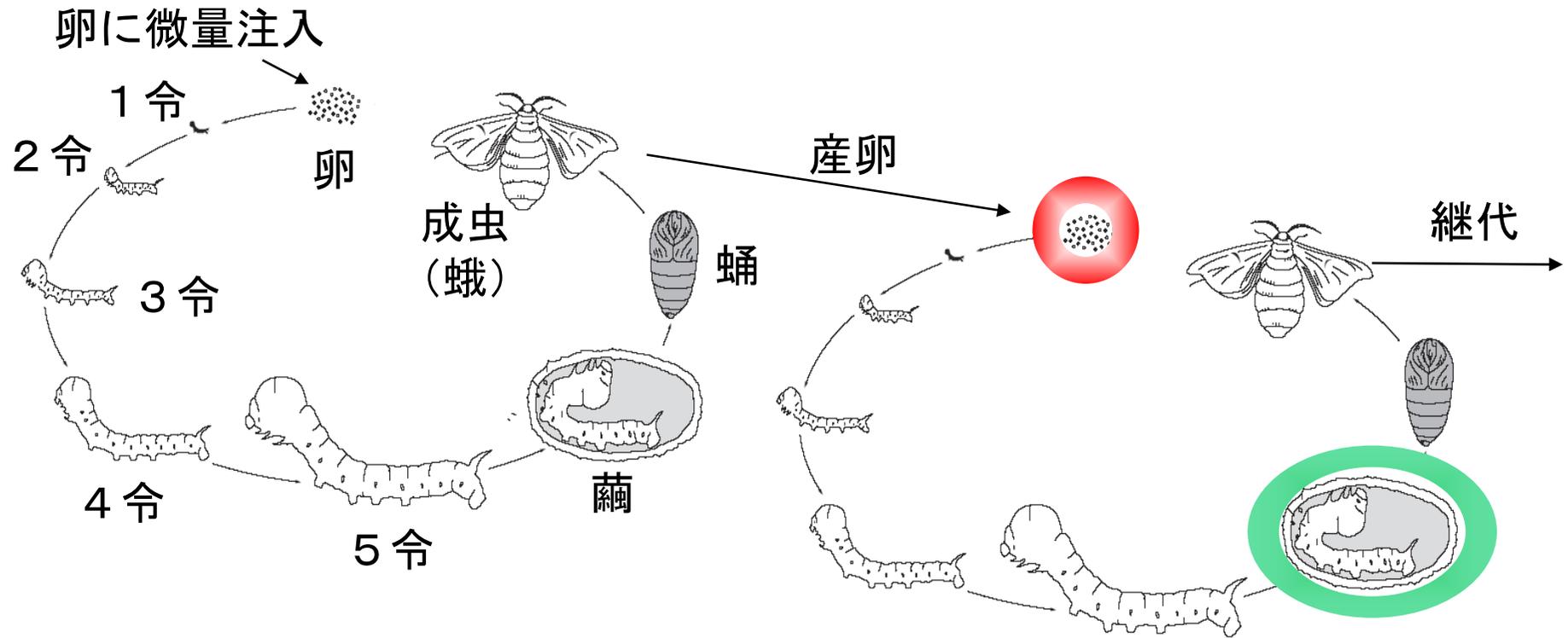


ヘマグルチニン(HA)の構造



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

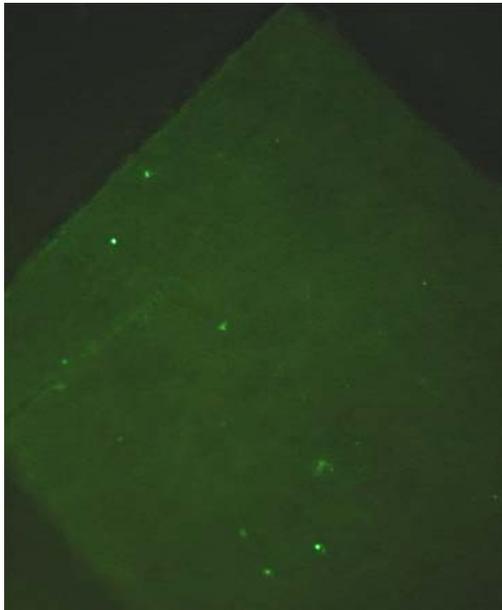
# TGカイコの作出



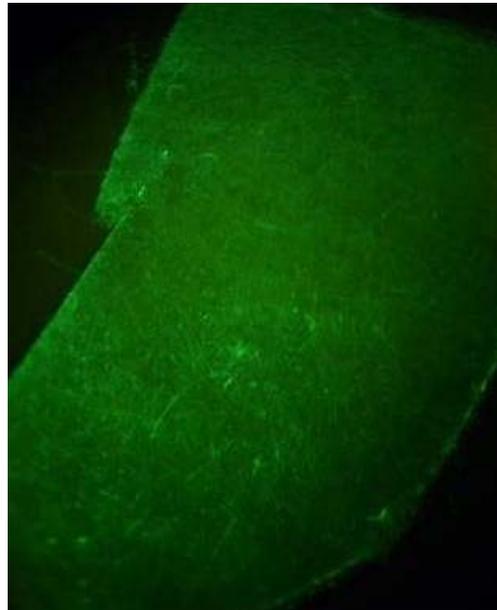
1世代：約45日

トランスジェニックカイコ第1世代 (G1)

# H1N1抗体によるTGカイコ繭の蛍光抗体染色



コントロール

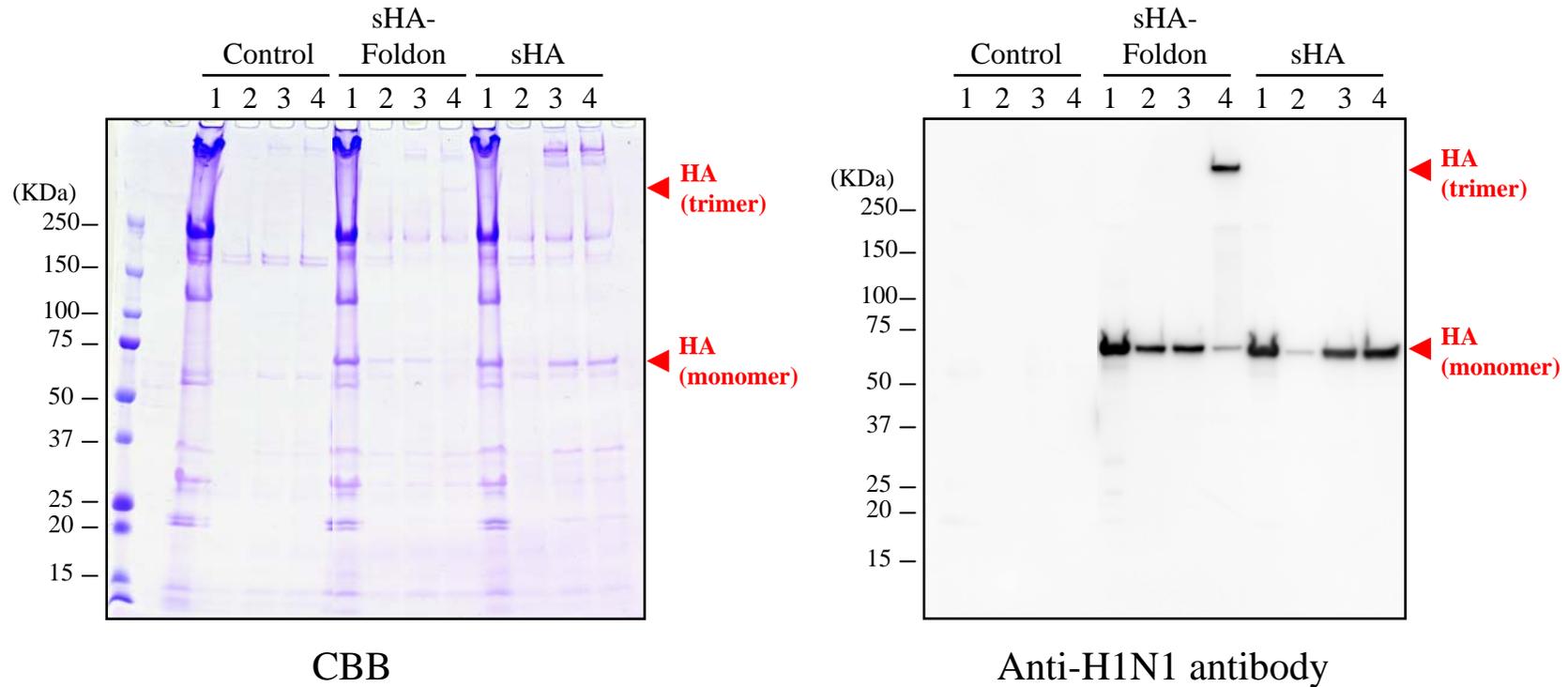


sHA-foldon



sHA

# TGカイコ繭の電気泳動およびウエスタンブロット解析

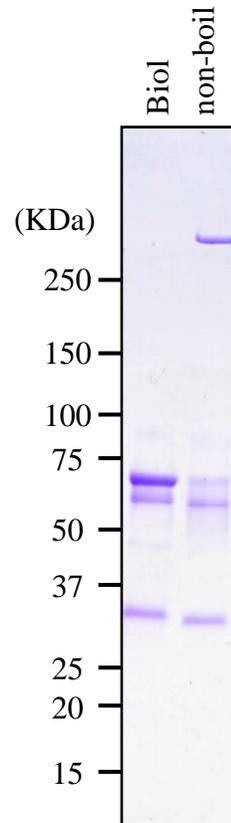


- 1: Total extraction (8M urea, 50mM Tris(8.0), 2% 2-ME)
- 2: PBS (final 0.5M NaCl)
- 3: 0.1% Triton X-100 in PBS (final 0.5M NaCl)
- 4: 0.1% Triton X-100 in PBS (final 0.5M NaCl) Non-boiled

組換えsHAおよびsHA-foldonの発現が確認できた。

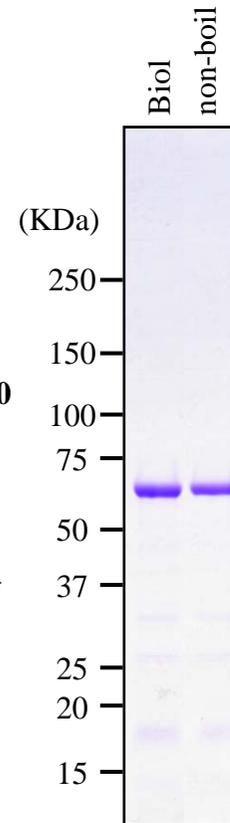
# 組換えHAの精製

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

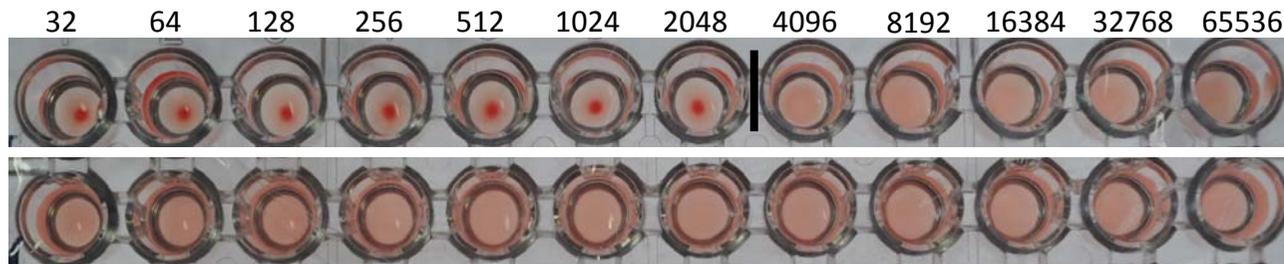


sHA

# 組換えHAの免疫応答能

30  $\mu$ 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



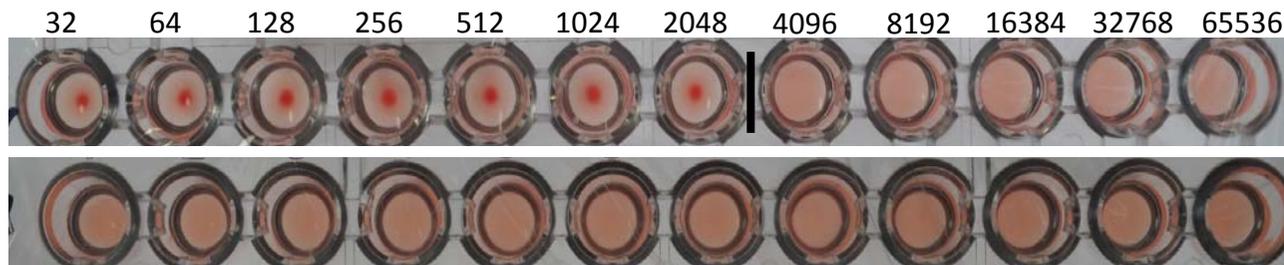
H1N1 (A/okinawa/248/2009)

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。

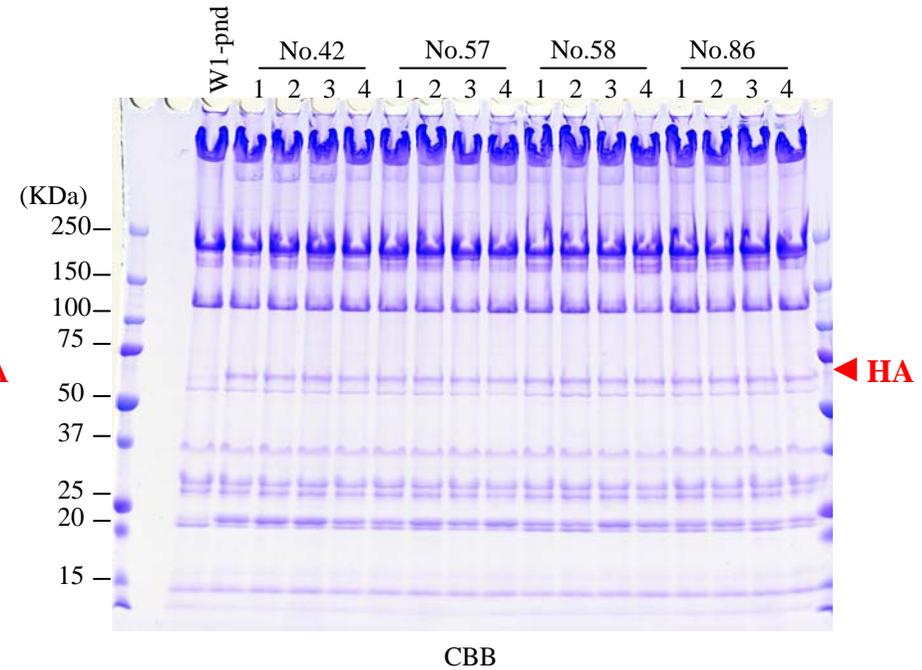
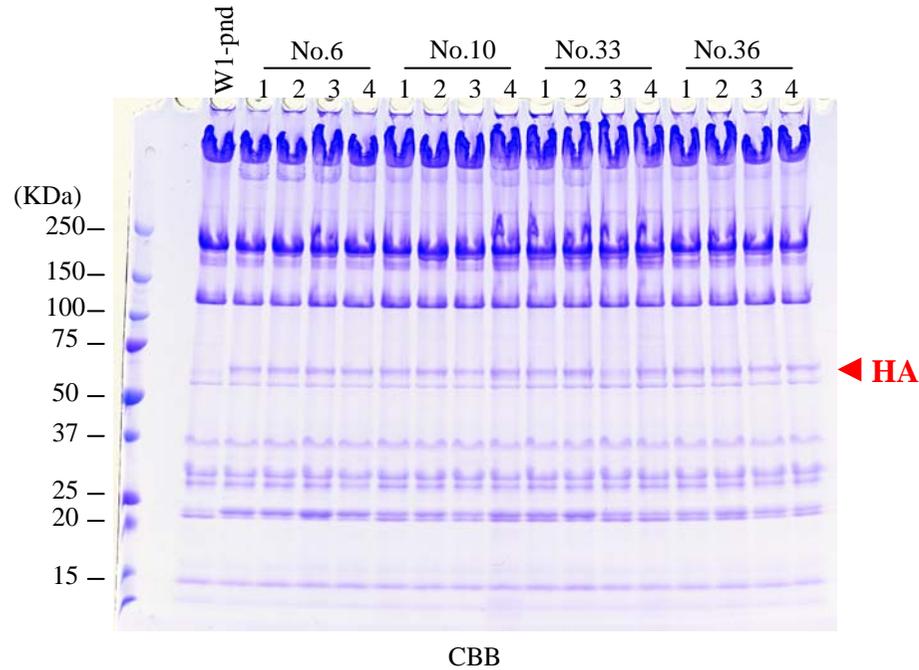
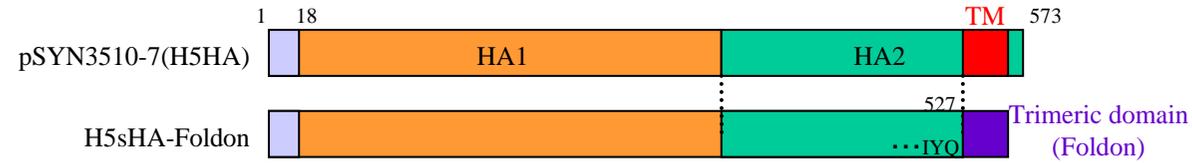
# まとめ

1. TGカイコにおいて、単量体HA (sHA)と三量体HA (sHA-foldon)の発現に成功した。
2. 組換えsHAおよびsHA-foldonを繭から抽出し、精製することができた。
3. 組換えsHAおよびsHA-foldonをマウスに接種した結果、高い免疫応答が認められた。sHAおよびsHA-foldonに対する抗体価は同等であった。



カイコで生産した組換えHAは、ワクチンとして開発できる可能性がある。

# H5N1ヘマグルチニンの発現



H5N1のHAについても発現可能であることを確認した。



菌に含まれる組換えタンパク質は、長期間安定に保存可能。  
菌の状態でワクチン原料を備蓄することが可能。