

スが生成する可能性はある), プラーク精製などを通した組換えウイルスのスクリーニング, 精製を必ずしも必要としない, といった長所を有しており, アデノウイルスベクターの作製は格段に簡略化された。すでに, 本システムは市販化されており, アデノウイルスベクター作製法の主流となりつつある(本系はスタンフォード大学 Dr. Mark A. Kayのもとで開発されたものである)。

#### 4. アデノウイルスベクターの品質・安全性上の課題と次世代ベクターの開発

アデノウイルスベクターの品質・安全性上の課題に関しては, ウイルスベクターに共通の事項(第2部 第1章 概論参照)に加え, 特に本ベクターにおける懸念事項となっている増殖性ウイルス(replication competent adenovirus ; RCA)に関する問題, およびベクター投与により生ずる免疫反応の問題に関して, 現状と対策法について解説する。

##### 4.1 増殖性ウイルス(RCA)

アデノウイルスベクターは増殖に必須のE1領域を欠損しているため, 通常の細胞中では増殖できないが, ベクター製造過程にパッケージング細胞である293細胞の染色体に組み込まれているE1遺伝子とベクターのゲノムが相同組換えを起こすために, 現在の技術ではある確率でRCAが出現することは避けられない。すなわち, 293細胞にはアデノウイルス5型の1-4344 bpのDNAが組み込まれていると考えられており<sup>10)</sup>, E1領域を欠損したアデノウイルスベクター(342-3523 bpを欠損しているものが多い)とは, E1領域の前後で相同な遺伝子配列(1-341 bpおよび3524-4344 bp)を持つため, RCAが出現する(図4A)。したがって, 野生型ウイルスの出現のためには複数回の相同組換えを必要とするレトロウイルスベク

ターや, 相同組換えによる野生型ウイルスの出現は起こり得ないアデノ随伴ウイルスベクターに比べ, アデノウイルスベクターにおける野生型ウイルスの混入確率は高いといえる。

現在の米国FDA(Food and Drug Administration)が推奨しているRCA混入に関する許容値は,  $3 \times 10^{10}$  particle titerあたり RCA1 infectious tite 未満となっている。なお, ATCC(American Type Culture Collection)より Adenovirus Reference Material(標準品)が入手可能であり, アデノウイルスベクターの粒子数(物理化学的タイター: particle titer)および感染力価(生物学的タイター: infectious titer)のスタンダードとして, また実験(施設)間での相互比較の参照基準として, 本標準品を用いてタイター測定を行うことが推奨されている。

RCAを含んだベクターが患者に投与された場合の危険性に関しては, 成人の60-70%以上はアデノウイルスに対する抗体を持っていること, 本来病原性は低く軽い風邪を引き起こすウイルスであること, ワクチンとしてアデノウイルスが投与された際に大きな副作用はみられなかったことなどから, 正常な骨髄機能・肝機能・腎機能などを保ち, 重篤な併発疾患がない患者であれば, 重度の問題を引き起こす可能性は低いと考えられる。したがって, 推奨値以下のRCAの混入しかみられないベクターストックを用いて, 適切な患者の選択およびベクター投与後の患者の健康状態の厳重な検査を通して臨床試験を進めていけば, RCAの問題は容認されるものと考えられる。

RCAの検出に用いる試験方法としては, E1領域を欠損したアデノウイルスベクターを増幅しない通常の細胞(ヒト肺癌細胞株A549など)にベクターストックを感染させ, CPE(cytopathic effect; 細胞中でウイルスが増殖する結果, 細胞が死滅する現象)の出現を観察するのが通常である。すなわち, RCAが混入していれば, 通常の細胞においてもCPEが起こることになる。定量的PCRを

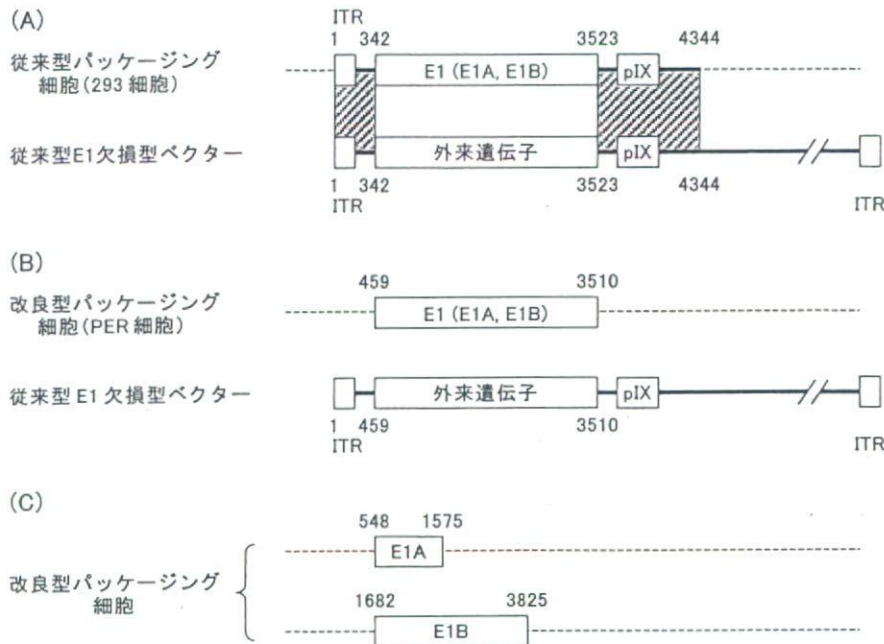


図4 増殖性アデノウイルス(RCA)の出現と改良型システム

- (A) 従来型のパッケージング細胞である293細胞は、E1遺伝子を含むアデノウイルスの1-4344 bpのゲノムを有しており、E1欠損型アデノウイルスベクターは通常342-3523 bpの遺伝子を欠損している。すなわち、アデノウイルスベクターにおける外来遺伝子発現単位を含む前後の配列(1-341 bp; 3524-4344 bp)は293細胞中のE1遺伝子と相同な配列を含むため、それらの領域で相同組換えを起こしRCAが出現する。
- (B) 改良型のパッケージング細胞であるPER細胞(human embryonic retinoblast 由来)はアデノウイルスの459-3510 bpのゲノムを有しており、対応するE1欠損型アデノウイルスベクターは459-3510 bpの遺伝子を欠損している。この細胞とベクターとの組み合わせでは相同な遺伝子配列は含まないためRCAは理論上出現しない。
- (C) E1A遺伝子とE1B遺伝子を、異なる遺伝子発現単位として異なる染色体部位に組み込んだパッケージング細胞は、E1欠損型アデノウイルスベクターのE1欠損領域の両端部位との相同配列を同時にたないためRCAは出現しない。

アデノウイルスゲノムを太線で、細胞由来ゲノムDNAを点線で、相同な遺伝子配列領域を斜線で示した。pIXはE1Bの下流に存在するヘキソンに付随したタンパク質(pIX)をコードした遺伝子であることを示す。数字で示したのはアデノウイルスのゲノム番号を示す。ITR(inverted terminal repeat)はゲノム両端に存在する逆向き反復配列でウイルスゲノムの複製開始に必要であり、複製の起点となる。

用いたRCAの高感度検出法も開発されている<sup>11)</sup>。

一方、ベクターゲノムとパッケージング細胞に組み込まれているE1遺伝子との相同な遺伝子配列を完全になくすことにより、RCAが理論上起こり得ないシステムも開発されている<sup>12, 13)</sup>(図4B)。すなわち、Fallauxらの開発したシステムでは<sup>12)</sup>、アデノウイルスゲノムのE1遺伝子の459-3510 bpの配列を組み込んだパッケージング細胞

(PER細胞)と、ウイルスゲノムの459-3510 bpの遺伝子配列を欠損したベクターからなっており、理論上相同組換えは起こり得ない(非同相組換えにより低頻度ながらRCAが出現することが報告されている<sup>13)</sup>)。最近では、E1A発現カセットとE1B発現カセットを別々のベクターに搭載させて作成したパッケージング細胞が報告されており(すなわち、E1A遺伝子とE1B遺伝子が異なる



染色体部位に挿入されている), この細胞を用いた場合は, PER 細胞を用いた場合に RCA が検出された条件においても, RCA の出現は全く起こらないことが示されている(図 4C)<sup>13)</sup>。

また, 後述する第 2 世代, 第 3 世代のアデノウイルスベクター(これまで述べてきた E1 欠損型ベクターは第 1 世代ベクターと呼ばれている)では, 一部あるいは全てのウイルス遺伝子を欠損していることから, RCA の出現頻度は極めて低いと考えられる。今後の遺伝子治療臨床試験では, これらのパッケージング細胞, ベクターシステムが用いられることが予想される。

#### 4.2 アデノウイルスベクター投与に伴う免疫反応と次世代ベクターの開発

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合におこる免疫反応としては, 大別するとベクター投与直後に生ずる自然免疫, ウイルスタンパク質に対する液性免疫, さらにはベクター感染細胞に対する細胞性免疫に分けられる。

ウイルスやバクテリア等から生体を守る第一防御システムとして, 生体は自然免疫系を活性化させるが, アデノウイルスベクターを投与した場合にも, インターロイキン-6(IL-6)や IL-12 をはじめとする炎症性サイトカインの産生が起こる<sup>14)</sup>。1999 年に米国ペンシルバニア大学で起きたアデノウイルスベクター投与に伴う死亡事故は, 自然免疫系の過剰な活性化が原因と考えられており, ベクター投与後の自然免疫の活性化を抑制できるベクターや方法論の開発が重要な研究課題となっている。現在のところ, アデノウイルスベクター投与後の自然免疫活性化のメカニズム(細胞側因子やウイルス側因子など)は全く不明であり, これらの解明は安全な遺伝子治療の実現に向けて大きな課題である。なお, 後述するトリプル改変アデノウイルスベクターは, メカニズムは不明であるが, 自然免疫の活性化が起こりにくいことが判

明している。

液性免疫に関しては, ベクター投与後生ずるペントンやヘキソンに対する抗体が, 2 回目以降のベクターの効果を阻害することが問題となっている。この問題に関しては, 抗原的に異なった血清型のベクターを作製することや(後述), 主要な抗原部位であるヘキシソンの一部を改変することで克服しようとするアプローチなどが報告されている<sup>15), 16)</sup>。

一方, ベクター感染細胞において産生された少量のウイルスタンパク質に対する細胞性免疫の問題解決に向けては, 様々な研究が活発に行われている。当初, 初期遺伝子の E1 領域を欠損した第 1 世代のアデノウイルスベクターは, 通常の細胞ではウイルスタンパク質の産生は起こらないものと考えられていた。しかし, 宿主由来の E1 様タンパク質の働きや, 非特異的な転写などによりウイルスタンパク質の産生が少量ながら起こり, これが炎症を引き起こしたり, ベクター感染細胞が細胞傷害性 T 細胞の標的となることによって除去され, 結果的に感染したアデノウイルスベクター上の目的遺伝子の発現が一過性にとどまる原因となっていることが明らかとなった<sup>17)-19)</sup>。そこで, 細胞性免疫反応を伴うことのない抗原性の低いベクターを開発する目的で, E1(あるいは E1/E3)領域に加え, E2A や E4 領域も欠損させてウイルスタンパク質の産生を起こりにくくした第 2 世代のベクター<sup>20)</sup>(図 1C, D), さらには, 全てのウイルス遺伝子を欠損させた第 3 世代のベクター(gutted ベクターあるいは後述のようにヘルパーウイルスを利用してベクターを作製することから helper-dependent ベクターと呼ばれることが多い)が開発されている<sup>21)</sup>(図 5)。ここでは将来的には主流となることが期待されている gutted ベクターについて簡単に解説する。

また, 標的細胞への感染能・親和性を高めたベクターは, より低投与量で効率のよい外来遺伝子の発現が期待でき, かつ標的細胞以外の組織・細

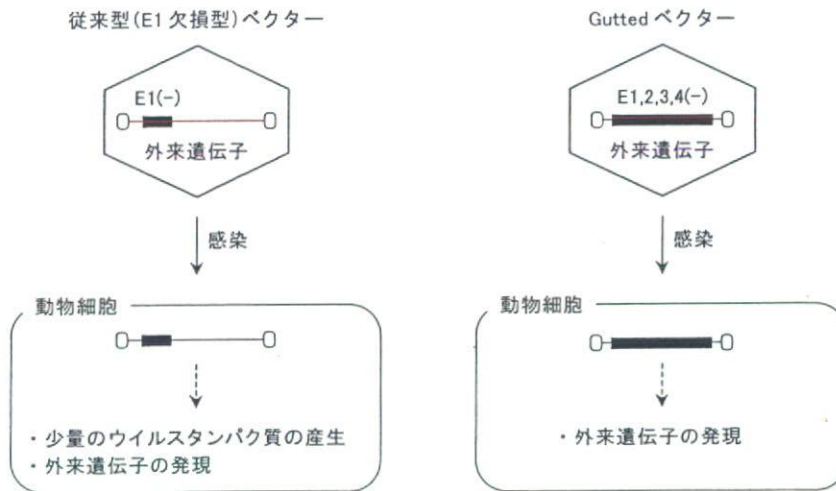


図5 第1世代(E1欠損型)ベクターと第3世代(gutted)ベクターの比較

E1欠損型ベクターを動物細胞に感染させると、外来遺伝子の発現だけでなく、少量ではあるがウイルスタンパク質も産生される。産生されたウイルスタンパク質は、動物個体では免疫反応のターゲットとなる。一方、guttedベクターにおいては、ウイルス遺伝子を完全に欠損しているため、ウイルスタンパク質の産生は全く起こらず、外来遺伝子の産生のみが起こる。

胞へのベクターの移行性は抑えられることから、免疫反応の副作用を抑制できると考えられる。このような機能を備えたベクターとして、ベクター表面タンパク質(カプシドタンパク質)を改変させることにより、標的細胞親和性を制御することが可能なカプシド改変アデノウイルスベクター<sup>22)-30)</sup>や他の血清型由来のアデノウイルスベクター<sup>31), 32)</sup>について紹介する。

なお、免疫抑制剤などの薬剤を用いることによって、自然免疫や液性免疫、細胞性免疫を抑制することも可能であるが、ここでは省略させていただきます。

#### (1) Gutted アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターによる免疫反応を最小限に抑えるため、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域(左端約0.4 kb, 右端約0.2 kb)以外の全てのウイルス遺伝子を欠損させたguttedベクターが開発されている(図5)。このベ

クターは同時に、最大約36 kbまでの外来遺伝子を挿入できるという長所も合わせ持つことになる。

guttedベクターの作製法としては種々のものが報告されているが、現在最も広く用いられているのは、すべてのウイルスタンパク質の供給をヘルパーウイルス(通常E1欠損型ベクター)に依存して外来遺伝子だけを搭載したguttedベクターを増殖させ、目的のベクターウイルスとヘルパーウイルスを塩化セシウムの密度勾配遠心で物理化学的に分離するというものである<sup>21)</sup>。

guttedベクターを用いた動物実験では、肝臓、筋肉、脳、肺など種々の組織を標的としたもので効果が報告されており、標的組織での大幅な炎症の抑制や長期にわたる外来遺伝子の発現がみられており、高い安全性・有効性を示すことが明らかになっている<sup>21)</sup>。アデノウイルスベクターにより細胞に導入された遺伝子は、染色体に組み込まれずエピゾームとして核内に存在するが、細胞分裂しない分化した組織をターゲットとした場合に



は、マウスの一生涯(約2.5年)にわたって目的遺伝子の発現と治療効果が認められる場合があることも報告されている<sup>33)</sup>。ヘルパーウイルスを用いる gutted ベクター系では、高力価のベクターを得るためには調製したベクターをヘルパーウイルスと共に何度も(通常5-6回以上)293細胞に感染させる必要があるなど手間がかかることが欠点であるが、これらの問題点が解決されれば、gutted ベクターはアデノウイルスをベースとした将来の遺伝子治療用ベクターの主流になると考えられる。

## (2) カプシド改変アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは多くの組織・細胞への遺伝子導入が可能であるが、ベクターの感染域に組織特異性がなく、全身投与した場合多くの組織・細胞に非特異的に移行すること、逆に、アデノウイルス受容体(CAR)の発現がない細胞(気道上皮細胞、平滑筋細胞、T細胞、マクロファージ、造血幹細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、一部の癌細胞など)には効率よく遺伝子導入できないことが明らかとなっている。そのため、標的組織局所にベクターを投与しても、組織から漏れ出たベクターが他臓器に移行して免疫反応を助長したり、CARの発現がない(あるいは弱い)組織をターゲットとした場合には、高濃度のベクターを投与する必要があるため、細胞・組織障害、免疫反応という副作用をもたらすことになる。感染域を制御できるベクターの開発は、このような問題点を克服でき、最終的にはベクターの静脈内投与によっても選択的な標的細胞移行性を示すターゲティングベクターの開発につながるため、重要な研究課題となっている。

アデノウイルスの感染は、ファイバーが細胞表面上のCARに結合するのが第1ステップであるため<sup>1)</sup>、ファイバーを修飾することにより、ベクターの感染域を変えることが可能になる<sup>22)-30)</sup>。著者らは、ファイバー分子への外来ペプチドの挿

入に最適な部位(HIループやC末端)をコードしたゲノムDNA上に、ユニークな制限酵素部位を挿入し、1ステップの *in vitro* ライゲーションで挿入したい任意のペプチド配列に相当する合成オリゴDNAをファイバー遺伝子領域に導入し、簡単にファイバー改変アデノウイルスベクターが作製できるシステムを開発している<sup>24)、26)</sup>。例えば、インテグリン( $\alpha_v$ )やヘパラン硫酸との親和性を有するRGD配列やポリリジン配列(それぞれ)をファイバーに組み込んだベクターは、CARを発現していない細胞に対してもインテグリンやヘパラン硫酸経路で効率よく遺伝子導入できることが明らかとなっている(図6)。目的とする組織に特異的な(あるいは親和性のある)ペプチドをファイバーに組み込んだファイバー改変アデノウイルスベクターは、標的細胞特異性を高めたり、遺伝子導入効率を改善しベクター投与量を下げることが可能となり、最小限の副作用で最大の効果を上げることが期待できる。例えば、マウスに移植したCAR陰性の固形癌にRGD配列を付与したアデノウイルスベクターを腫瘍内に投与した場合は、従来のアデノウイルスベクターを用いた場合に比べ、腫瘍での遺伝子発現が約40倍に上昇し、逆に腫瘍から漏れ出たベクターが肝臓に移行しておこる肝臓での遺伝子発現が約1/8に減少しており<sup>25)</sup>、有効性の上昇と副作用の軽減が期待できる。

ファイバー改変アデノウイルスベクターによる感染域の制御法としては、ファイバー部分を、CAR以外の分子を認識することが知られている sub-group B(例えば3, 11, 35型アデノウイルスなど)に属するアデノウイルス由来のファイバーに置換したベクターも開発されている<sup>28)-30)</sup>(図6)。11, 35型アデノウイルスのファイバーを有したベクターの場合、CD46を介した効率のよい遺伝子導入が可能になる(3型アデノウイルスの受容体は不明であるがCAR以外を認識する)。

一方、nativeのアデノウイルスの感染ルートを回避させることで、ターゲティング能を有したベ

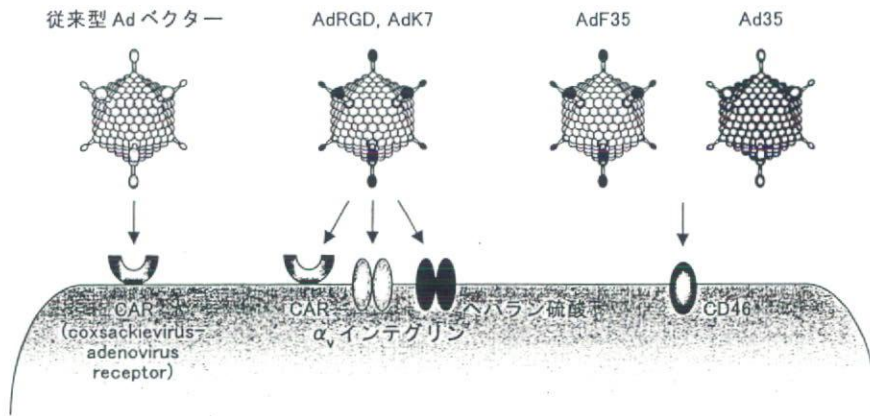


図6 改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

野生型のファイバーを持った従来型の5型アデノウイルスベクターは細胞表面上の受容体であるCARを認識して感染するが、RGD配列やポリリジン(K7:リジンが7つ続く)配列をファイバーに有したファイバー改変ベクター(AdRGD, AdK7)はCARだけでなく $\alpha_v$ インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。また、ファイバー部分をsub-group Bの35型アデノウイルスのファイバーに置換したベクター(AdF35)や、全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクター(Ad35)は、CD46を認識して感染する。3型あるいは11型アデノウイルス由来のファイバーを有したベクターも開発されている(3型アデノウイルスの受容体は不明であり、11型アデノウイルスの受容体はCD46である(他の分子も認識しうる事が想定されている))。

クターの開発研究も進んでいる。アデノウイルスは前述のようにファイバーとCARとの結合が感染に重要な役割を果たすが、低親和性であるが

ファイバーの根本に存在するペントンベースのRGDモチーフが $\alpha_v$ インテグリンと結合することによって起こる感染ルートや、ファイバーのシャフト部分のKKTK(Lys-Lys-Thr-Lys)からなるヘパリン結合ドメインがヘパラン硫酸と結合することによって起こる感染ルートが存在する。これらの感染経路を遮断して、ターゲット細胞特異的に結合するリガンドをカプシドタンパク質に付与すれば、ターゲティング能を持ったアデノウイルスベクターが開発できる<sup>27)</sup>(図7)。ファイバーノブのABループやFGループに変異を導入すればCARと結合できないベクターが作製でき、ペントンベースのRGDモチーフを欠損させれば $\alpha_v$ インテグリンと結合できないベクターが作製できる。また、ファイバーのシャフト部分の

KKTKモチーフに変異を加えたり、KKTKモチーフを含まない他の血清型のファイバーシャフト領域(例えば35型アデノウイルス由来のものなど)に置換することでヘパラン硫酸と結合できないベクターが作製できる。アデノウイルスベクターをマウスに全身投与した場合には、95%以上のベクターは肝臓へ移行し、遺伝子を発現するが、著者らはCAR、 $\alpha_v$ インテグリン、ヘパラン硫酸との3領域との結合を同時に欠損させたトリプル改変アデノウイルスベクターが、肝臓への遺伝子導入効率を1万倍以上減少させ、他の臓器での遺伝子発現もほとんど示さなくなることを明らかにし、積極的に特定の臓器に移行しないベクターの開発に成功している<sup>34), 35)</sup>。本ベクターのファイバーノブのHIループやC末端コード領域には、任意の外来ペプチドコード遺伝子が容易に挿入できるように、制限酵素ユニーク部位が付与されており、リガンドを自在にベクター表面に表現できるよう



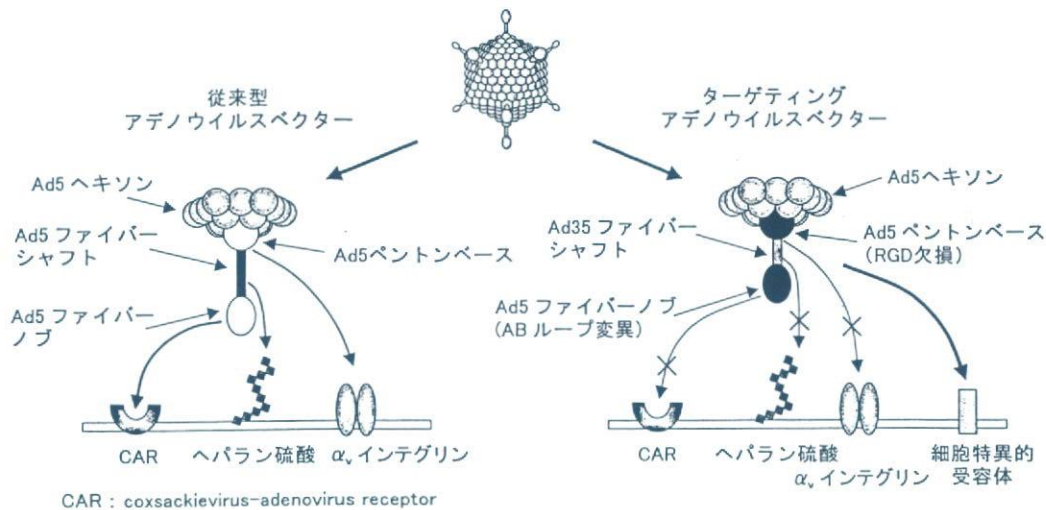


図7 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためには、①ファイバーノブとCARとの結合を介した感染ルートを回避し、②低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフが $\alpha_5$ インテグリンと直接結合することによって起こる感染ルートを回避し、③ファイバーシャフト領域がヘパラン硫酸に作用することによって起こる感染ルートも回避し、④細胞特異的受容体を介してのみ感染するベクターを開発する必要がある。細胞特異的受容体を認識するリガンドは、ファイバーやヘキソン(アデノウイルスの主要カプシドタンパク質)、protein IX(ヘキソンとヘキソンの間に存在するタンパク質)などに付与できる。

になっている。本システムが、ターゲティング能を持ったアデノウイルスベクター開発のための基盤になると期待される。なお、本トリプル改変アデノウイルスベクターは、全身投与した直後におこるIL-6産生が、従来のアデノウイルスベクターの場合とは異なり、ほとんど生じず、自然免疫活性化能が低いことも判明している<sup>35)</sup>(IL-12産生量は従来のベクターと同等レベルであり、サイトカイン・ケモカインの種類により産生抑制が認められるものがある)。

### (3) 他の血清型由来のアデノウイルスベクター

従来のアデノウイルスベクターはsub-group Cに属するヒトアデノウイルス5型(あるいは2型)を基盤として作製されている。しかしながら、5型アデノウイルスに対する抗体を保持しているヒトの割合は高く(日本人の場合、強陽性のヒトの

割合は58%)<sup>36)</sup>、既存抗体により遺伝子導入活性が減弱する可能性がある問題点や、遺伝子導入時のCAR依存性の問題点を克服できるベクターとして、抗体保持率が低く(日本人の場合、強陽性のヒトの割合は2%)<sup>36)</sup>、CD46を認識して感染できるsub-group Bに属するアデノウイルスベクター(11型や35型)が著者らのグループなどから報告されている<sup>31), 32), 37)</sup>(図7)。CD46はヒト細胞ではほとんどの組織・細胞で発現していること、特に癌細胞では発現上昇が認められることから、局所へベクターを投与するプロトコールにおいては有力なベクターになりうると考えられる。また、sub-group Bに属するアデノウイルスベクターは、従来の5型ベクターとは異なり、造血幹細胞を含む細胞分画のCD34陽性細胞へも効率よく遺伝子導入できることから<sup>31), 32), 37)</sup>、細胞増殖・分化制御を目的とした造血幹細胞遺伝子治療においても

有効であろう。ヒト以外のアデノウイルスを利用したものでは、チンパンジー、イヌ、ヒツジ、トリ、ウシ、マウス由来アデノウイルスベクターが報告されている。

最終的には、これら様々な血清型のベクターやカプシド改変ベクターを、目的組織特異的なプロモーターで外来遺伝子を発現させる転写レベルでの標的化技術や gutted ベクターと組み合わせることで、標的組織や疾病に応じて、高い安全性・有効性を示すベクターの開発が可能になるであろう。

## おわりに

遺伝子治療臨床試験、動物実験などから問題点が指摘されてきたアデノウイルスベクターであるが、種々の次世代型ベクターや新規パッケージング細胞など高い安全性・有効性を確保したシステムが開発されている。今後、これらの改良型システムが遺伝子治療臨床試験で用いられ、遺伝子治療の成功に寄与することが期待される。

## 参考文献

- 1) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L. and Finberg R. W.: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275: 1320-1323, 1997.
- 2) Wickham T. J., Mathias P., Cheres D. A. and Nemerow G. R.: Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73: 309-319, 1993.
- 3) Greber U. F., Willetts M., Webster P. and Helenius A.: Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75: 477-486, 1993.
- 4) Leopold P. L., Ferris B., Grinberg I., Worgall S., Hackett N. R. and Crystal R. G.: Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum. Gene Ther.*, 9: 367-378, 1998.
- 5) Bett A. J., Haddara W., Prevec L. and Graham F. L.: An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8802-8806, 1994.
- 6) Mizuguchi H. and Kay M. A.: A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, 10: 2013-2017, 1999.
- 7) Miyake S., Makimura M., Kanegae Y., Harada S., Sato Y., Takamori K., Tokuda C. and Saito I.: Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1320-1324, 1996.
- 8) Mizuguchi H. and Kay M. A.: Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum. Gene Ther.*, 9: 2577-2583, 1998.
- 9) Mizuguchi H., Hayakawa T., and Kay M. A.: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, 52: 165-176, 2001.
- 10) Louis N., Eveleigh C. and Graham F. L.: Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233: 423-429, 1997.
- 11) Ishii-Watabe A., Uchida E., Iwata A., Nagata R., Satoh K., Fan K., Murata M., Mizuguchi H., Kawasaki N., Kawanishi T., Yamaguchi T., Hayakawa T.: Detection of replication-competent adenoviruses spiked into recombinant adenovirus vector products by infectivity PCR. *Mol. Ther.*, 8: 1009-1016, 2003.
- 12) Fallaux F. J., Bout A., van der Velde I., van den Wollenberg D. J., Hehir K. M., Keegan J., Auger C., Cramer S. J., van Ormondt H., van der Eb A. J., Valerio D. and Hoeben R. C.: New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.*, 9: 1909-1917, 1998.
- 13) Farson D., Tao L., Ko D., Li Q., Brignetti D., Segawa K., Mittelstaedt D., Harding T., Yu D.C., Li



- Y. : Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol. Ther.*, 14 : 305-311, 2006.
- 14) Muruve D. A. : The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 15 : 1157-1166, 2004.
  - 15) Roy S., Shirley P. S., McClelland A. and Kaleko M. : Circumvention of immunity to the adenovirus major coat protein hexon. *J. Virol.*, 72 : 6875-6879, 1998.
  - 16) Roberts D. M., Nanda A., Havenga M. J., Abbink P., Lynch D. M., Ewald B. A., Liu J., Thorner A. R., Swanson P. E., Gorgone D. A., Lifton M. A., Lemckert A. A., Holterman L., Chen B., Dilraj A., Carville A., Mansfield K. G., Goudsmit J., Barouch D. H. : Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature*, 441 : 239-243, 2006.
  - 17) Yang Y., Nunes F. A., Berencsi K., Furth E. E., Gonczol E. and Wilson J. M. : Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 : 4407-4411, 1994.
  - 18) Yang Y., Ertl H. C. and Wilson J. M. : MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*, 1 : 433-442, 1994.
  - 19) Yang Y., Xiang Z., Ertl H. C. and Wilson J. M. : Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 7257-7261, 1995.
  - 20) Wang Q. and Finer M. H. : Second-generation adenovirus vectors. *Nat. Med.*, 2 : 714-716, 1996.
  - 21) Palmer D. J. and Ng P. : Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, 16 : 1-16, 2005.
  - 22) Wickham T. J., Roelvink P. W., Brough D. E. and Kovsdi I. : Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat. Biotech.*, 14 : 1570-1573, 1996.
  - 23) Dmitriev I., Krasnykh V., Miller C. R., Wang M., Kashentseva E., Mikheeva G., Belousova N. and Curiel D. T. : An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.*, 72 : 9706-9713, 1998.
  - 24) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M. A. and Hayakawa T. : A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.*, 8 : 730-735, 2001.
  - 25) Mizuguchi H., and Hayakawa T. : Enhanced antitumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther.*, 9 : 236-242, 2002.
  - 26) Koizumi N., Mizuguchi H., Utoguchi N., Watanabe Y. and Hayakawa T. : Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J. Gene Med.*, 5 : 267-276, 2003.
  - 27) Mizuguchi H. and Hayakawa T. : Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 15 : 1022-1033, 2004.
  - 28) Krasnykh V. N., Mikheeva G. V., Douglas J. T. and Curiel D. T. : Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J. Virol.*, 70 : 6839-6846, 1996.
  - 29) Shayakhmetov D. M., Papayannopoulou T., Stamatoyannopoulos G. and Lieber A. : Efficient gene transfer into human CD34(+) cells by a retargeted adenovirus vector. *J. Virol.*, 74 : 2567-2583, 2000.
  - 30) Mizuguchi H. and Hayakawa T. : Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes. *Gene*, 285 : 69-77, 2002.
  - 31) Sakurai F., Mizuguchi H. and Hayakawa T. : Efficient gene transfer into human CD34+ cells by an

- adenovirus type 35 vector. *Gene Ther.*, 10 : 1041-1048, 2003.
- 32) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. and Mizuguchi H. : Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther.*, 12 : 1424-1433, 2005.
- 33) Kim I. H., Jozkowicz A., Piedra P. A., Oka K. and Chan L. : Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 13282-13287, 2001.
- 34) Koizumi N., Mizuguchi H., Sakurai F., Yamaguchi T., Watanabe Y. and Hayakawa T. : Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J. Virol.*, 77 : 13062-13072, 2003.
- 35) Koizumi N., Kawabata K., Sakurai F., Watanabe Y., Hayakawa T. and Mizuguchi H. : Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate binding reduce *in vivo* tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.*, 17 : 264-279, 2006.
- 36) Seshidhar R. P., Ganesh S., Limbach M. P., Brann T., Pinkstaff A., Kaloss M., Kaleko M. and Connelly S. : Development of adenovirus serotype 35 as a gene transfer vector. *Virology*, 311 : 384-393, 2003.
- 37) Stone D., Ni S., Li Z. Y., Gaggar A., DiPaolo N., Feng Q., Sandig V. and Lieber A. : Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector. *J. Virol.*, 79 : 5090-5104, 2005.

(水口裕之／早川堯夫)



## 第3節 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保

### はじめに

近年、組換えタンパク質性医薬品の製造方法をめぐって、安全性のさらなる向上と製造コスト削減を求める動きが強くなり、これらの要件を満足しうる方法として組換え植物を用いたタンパク質生産が注目されている。組換え植物を用いたタンパク質生産では、血清等の動物由来原料を用いる際の安全性上の重要課題である動物ウイルス等のヒト感染性物質混入に関する対策を軽減することができる<sup>1)</sup>とされている。また、高価な培地成分、特殊な動物細胞培養設備、微生物汚染制御のための環境、動物成分由来タンパク質等の除去に必要な高度な精製工程等に代わり、比較的安価な植物栽培による生産、より簡便な精製等が可能なケースもあるため、製造コストを大幅に削減することができる<sup>2)</sup>ともいわれている。さらに、可食植物に抗原タンパク質を発現させた“食べるワクチン”のように、植物ならではの特色を活かした医薬品生産への応用も考えられている。海外では組換え植物を用いて製造されたタンパク質の中に、すでに臨床試験の段階にまで開発が進んだものがあり、医薬品としての実用化も遠くないと予想される。しかし、これまでにヒトの医薬品として承認された実績がないため、製造されたタンパク質の品質・安全性の確保が今後の課題である。本節では、組換え植物を用いたタンパク質生産技術、医薬品開発への応用、製造されたタンパク質の品質・安全性確保に関して、現状と今後の課題を概説する。

### 1. 組換え植物を用いたタンパク質生産技術

#### 1.1 組換え植物を用いたタンパク質生産の特色

組換え植物を用いたタンパク質生産の大きな特色は、下流工程でヒトあるいは動物由来原料を使用しなければ製品へのヒト感染性物質混入のリスクが比較的低いこと、また、微生物や動物細胞を用いる方法と比較して生産コストが低いことである<sup>1)</sup>。現在、組換えタンパク質性医薬品、特に糖タンパク質製造の主流となっている培養動物細胞を用いたタンパク質発現系では、生産培養時にウシ血清などの動物由来原料が用いられることがある。原料の厳密な選択・チェックや無血清培地の使用など感染性物質に係わる安全性上の懸念への対応策は十分講じられているが、動物由来原料を生産細胞段階から排除した組換えタンパク質製造方法の開発は新たな選択肢を提供することになる。一方で、技術の高度化によって動物細胞由来の組換えタンパク質の製造コストが高騰し、特に抗体医薬品のように大量の投与が行われる医薬品では将来的にコスト高が普及の阻害要因になることが懸念されている。植物を用いたタンパク質生産系では、栽培に要するコストが動物細胞培養と比較して低いため、製造コストの大幅な削減が可能であり、組換え植物の栽培によるタンパク質の生産コストは、生産量にもよるが、微生物の1/10～1/50、動物細胞の1/1000程度とされている<sup>2)</sup>。また、栽培による生産の場合は、培養法に比べて

設備投資が少なくすむという。

植物を生産宿主とする特色を活かし、可食植物に組換えタンパク質を発現させた経口ワクチンでは、精製工程が不要あるいは非常に簡略化できる可能性もあり、精製に要するコストも削減することができることとされている。また、ワクチン生産に特別な製造施設を必要とせず、注射による投与が不要であり、さらに、植物の種子は輸送が簡便で長期保存にも適しているため、途上国での利用にも適していると考えられている。

これらに対して、植物生産系の限界点あるいは克服すべき課題としては、生産できる目的タンパク質の種類、翻訳後修飾や高次構造形成が宿主植物に依存せざるを得ないこと、収率・収量問題、製造方法の一定性の維持・保証問題、品質の一定性保証問題、目的タンパク質の生物学的挙動や不純物などの問題も含めてヒトに対する安全性が確立されていないこと、発現タンパク質の安定性、種子の混在問題、組換え植物の環境への影響が懸念されること、さらに、精製しない場合にいかに医薬品としての品質管理、投与量等の管理を行うか、患者のコンプライアンスをいかに確保するかなどが挙げられる。

## 1.2 組換え植物を用いたタンパク質生産の歴史

植物への遺伝子導入の基盤が確立されたのは1980年代であるが、植物を用いて組換えヒトタンパク質を生産した最初の例は、1986年に組換えタバコに発現させた成長ホルモン(ノパリン合成酵素との融合タンパク質として)である<sup>3)</sup>。ヒトタンパク質と同じ配列を持つタンパク質としての第一号は、1990年に組換えタバコと組換えジャガイモでつくられた血清アルブミンで、シグナルペプチドを植物タンパク質由来のものに置換することにより、タンパク質の細胞外分泌と正しいN末端プロセッシングに成功したことが報告さ

れている<sup>4)</sup>。また、1989年には、組換えタバコを用いたマウスIgGの発現が報告された<sup>5)</sup>。IgGの発現系では、H鎖あるいはL鎖の遺伝子を導入した組換えタバコを別々に作製し、その交配によってH鎖とL鎖を発現する組換えタバコを作製することに成功している。これにより、H鎖とL鎖の会合、S-S結合形成など、抗体分子の成熟に必要なシステムが植物にも存在することが明らかとなり、組換え植物が抗体の生産に応用可能であることが示された。組換えタバコで発現されたIgGは、ハイブリドーマ由来のIgGと同等の抗原結合活性を持っていたと報告されている。さらに、1995年には、抗体分子の中でも、2分子のIgAとJ鎖およびsecretory componentからなる複雑な分泌型IgAの構造を持つ分子についても、遺伝子組換えと交配の組み合わせにより組換えタバコで生産が可能なが示された<sup>6)</sup>。これらの他、現在までに、エリスロポエチン、インターフェロン $\alpha$ 、インターロイキン類などのヒトタンパク質や、各種の抗体関連分子、ワクチン用の抗原を発現させた例が多数報告されている<sup>7), 8)</sup>(表1)。

## 1.3 組換え植物を用いたタンパク質生産技術の概要

組換え植物を用いたタンパク質生産の一般的な工程は、導入遺伝子の構築、宿主植物への遺伝子導入、導入遺伝子を安定発現する株の樹立、得られた組換え植物の栽培、収穫、目的タンパク質の精製などから成る。このように安定発現系を用いて組換えタンパク質を生産する方法が一般的であるが、ウイルスベクターを用いて植物組織に一過性にタンパク質を発現させる方法も用いられている。

### (1) 宿主植物の選択

タンパク質発現に用いられる植物と、それぞれの長所、短所を表2に示した<sup>9)</sup>。宿主植物の特性により、目的タンパク質の安定性、収穫後の精製



表1 植物で発現された実績のあるタンパク質の例

タンパク質	宿主植物
<b>酵素関連</b>	
アデノシンデアミナーゼ	トウモロコシ
グルタミン酸デカルボキシラーゼ	タバコ
グルコセレブロンダーゼ	タバコ
リゾチーム	イネ
腓リパーゼ	タバコ, トウモロコシ
分泌型アルカリホスファターゼ	タバコ
アプロチニン	タバコ, トマト
<b>血液関連</b>	
第VIII因子(Aドメイン)	タバコ
プロテインC	タバコ
ヘモグロビン	タバコ
血清アルブミン	タバコ, ジャガイモ
<b>ホルモン・サイトカイン</b>	
成長ホルモン	タバコ
上皮細胞増殖因子	タバコ
インスリン様増殖因子-1	タバコ, イネ
エリスロポエチン	タバコ細胞
インターロイキン2	ジャガイモ
インターロイキン4	タバコ
インターロイキン10	タバコ
インターロイキン12	タバコ
インターロイキン18	タバコ
インターフェロン $\alpha$	イネ, カブ, ウキクサ
<b>その他のヒトタンパク質</b>	
内因子	シロイヌナズナ
ラクトフェリン	ジャガイモ, コメ, タバコ
コラーゲン	タバコ
<b>ペプチド</b>	
エンケファリン	シロイヌナズナ, ナタネ
グルカゴン様ペプチド-1	イネ
<b>抗体</b>	
IgG	タバコ, ダイズ, シロイヌナズナ, アルファルファ
IgM	タバコ
sIgA/G	タバコ
Fab	タバコ, シロイヌナズナ
scFv	タバコ
Diabody	タバコ
<b>ワクチン</b>	
B型肝炎ウイルス表面抗原	タバコ, ジャガイモ, レタス, ルビン
狂犬病ウイルス糖タンパク質	トマト, ホウレンソウ, タバコ
大腸菌易熱性腸管毒素Bサブユニット	タバコ, ジャガイモ, トウモロコシ
ノーウォークウイルス カプシド	ジャガイモ, タバコ
コレラ毒素Bサブユニット	タバコ, ジャガイモ, トウモロコシ
糖尿病自己抗原	タバコ, ジャガイモ

Expert Opin. Emerg. Drugs, 10:185, 2005., Nat. Rev. Genet., 4:794, 2003. をもとに作成

表2 タンパク質の発現に用いられる植物の特徴

植物種	長 所	短 所
モデル植物 シロイヌナズナ	遺伝子操作が容易 各種変異体の利用が可能	大量生産には適さない
単純植物 コケ, 緑藻, ウキクサ	培地中へのタンパク質分泌が可能 クローン性の増殖 封じ込めが可能 規制への対応を考えやすい	生産規模の拡張性が低い
葉作物 タバコ	高収量 遺伝子導入/発現系が確立されている 迅速なスケールアップが可能	収穫物中のタンパク質の安定性が低い アルカロイドを含む
アルファルファ, クローバー	高収量 動物用ワクチン生産に有用 クローン性の増殖	収穫物中のタンパク質の安定性が低い シュウ酸を含む
レタス	可食性 ヒト用ワクチン生産に有用	収穫物中のタンパク質の安定性が低い
穀類 トウモロコシ, イネ	高収量 保存中もタンパク質が安定 遺伝子操作が容易	
コムギ, オオムギ	保存中もタンパク質が安定	低収量 遺伝子操作が困難
マメ類 ダイズ	大量生産が可能	発現量が低い 遺伝子操作が困難
エンドウマメ, キマメ	タンパク質含量が高い	発現量が低い 遺伝子操作が困難
果実, 野菜 ジャガイモ, ニンジン	可食性 保存組織中でタンパク質が安定	
トマト	可食性 温室への封じ込め可能	栽培コストが高い 収穫後冷蔵が必要
油脂作物 アブラナ	オイルボディーへの発現(精製が容易)	

Curr. Opin. Plant Biol., 7: 152, 2004. をもとに作成

工程, 混入する可能性のある不純物等が異なるため, 植物の特性が組換えタンパク質の収量や最終製品の品質にも影響する。初期には, 遺伝子導入法が確立されていること, 生産規模拡大が容易であることなどから, タバコがよく用いられた。タバコはニコチンなどのアルカロイドを多量に含む

ために, 精製の際にその除去が必要になることが欠点である。ニコチン含量の低いタバコも利用されるが, 最近は葉作物の中ではレタス, アルファルファ等が使われる例が多くなっている。一般に, 葉に発現されたタンパク質は安定性が低く, 収穫後すぐに加工しなければならない。これに対して,



穀類の種子に発現されたタンパク質は分解がおこりにくく、室温で長期間安定である。穀類としては、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ等が生産宿主として検討されている。ワクチンの生産用には、ワクチンを使用する地域で栽培することを考え、様々な条件下で栽培できるよう、ジャガイモ、トマト、バナナ、ニンジン、レタス、トウモロコシ、アルファルファ、クローバーなどが用いられている。アブラナなどの種子にあるオイルボディからはタンパク質が容易に精製できるため、油脂作物の種子にタンパク質を発現させる試みも行われている。

最近、最も大きな進展がみられたのは、ウキクサ *Lemna*、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*、ヒメツリガネゴケ *Physcomitrella patens* 等の単純な植物を用いたタンパク質発現系である。これらの植物では、遺伝子導入、繁殖、封じ込めが容易であることに加えて、より重要なこととして、組換えタンパク質が培地中に分泌されるためにその精製が容易であるという利点がある。特に、ウキクサについては、米国 Biolex 社により GMP 対応の組換えタンパク質製造施設が作られ、製造されたインターフェロン  $\alpha$  の臨床試験も行われている。また、コケは高頻度で遺伝子の相同組換えができる唯一の植物であることが知られており、ドイツの Greenovation 社が開発している組換えタンパク質生産システムでは、植物に特有の糖鎖である  $\beta$ 1-2 xylose,  $\alpha$ 1-3 fucose を付加する酵素の遺伝子をノックアウトし、シアル酸合成に関わる遺伝子が挿入されたコケが用いられている<sup>10)</sup>。これらの生産システムは、圃場栽培と比較して生産規模拡大の自由度は低い、栽培の環境、すなわち、製造条件をコントロールしやすいという点で、品質の一定性確保が求められる医薬品の製造においては有利であると思われる。

## (2) 遺伝子導入法

植物への遺伝子導入法として最もよく用いられ

ているのは、土壌細菌アグロバクテリウム *Agrobacterium tumefaciens* を利用する方法である。*A. tumefaciens* は植物にクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成させる植物病原菌で、染色体外に約 200 kb の Ti プラスミドを有しており、このプラスミド上にある T-DNA を植物の染色体に挿入する性質を持つ。T-DNA には腫瘍形成に必要な植物ホルモン(オーキシンとサイトカイニン)やアグロバクテリウムのエネルギー源となる特殊なアミノ酸類 opines を合成する酵素の遺伝子がコードされているが、T-DNA 領域に目的タンパク質の遺伝子を挿入することで、植物への遺伝子導入に用いることができる。以前は、アグロバクテリウム法はイネ、コムギ、トウモロコシなどの単子葉植物には適用が難しいとされていたが、改良が進められ、現在では、単子葉植物にも用いられるようになっている。この他、DNA をコートした金属微粒子を細胞内に打ち込むパーティクルガン法などが利用されることもある。

タバコなど一部の植物では、葉緑体ゲノムに遺伝子を導入し、タンパク質を生産する方法が開発されている。通常、1つの細胞には約 100 個の葉緑体があり、葉緑体には遺伝子が約 100 コピーあるため、核内の染色体に遺伝子を導入する場合と比較して、導入遺伝子のコピー数が格段に多くなり、目的タンパク質の高発現が期待できる。ヒト成長ホルモン遺伝子を葉緑体ゲノムに導入して発現させた例では、全可溶性タンパク質の 7% もの発現量が得られたと報告されている<sup>11)</sup>。葉緑体ゲノムは母系遺伝するため、葉緑体への遺伝子導入では導入された遺伝子が花粉に含まれず、花粉の飛散による組換え体の拡散が生じないという封じ込め上の利点もある。ただし、葉緑体ではタンパク質への糖鎖付加がおこらないため、糖タンパク質の生産に用いることはできない。

植物ウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、導入遺伝子がゲノムに挿入されないためにタンパク質発現は一過性となるが、遺伝子導入後すみや

かにタンパク質が発現される、ベクターバックボーンを用意しておけば任意の目的タンパク質をコードする遺伝子を簡便に組み込めオーガメイト治療に利用できる、などの利点がある。本法を一般的に適用する場合、導入遺伝子を安定発現する組換え植物株を樹立してタンパク質を発現させる方法に比肩するには、ベクターや宿主の一定性を確保するための特性解析やバンク化による品質管理、一定の組換え植物が再現性よく作製されるというバリデーションおよび組換え体レベルあるいは製品レベルでのロット毎の厳密な品質管理が必須である。しかし、後述するように本法の利用は特殊なワクチン製造に限られているようである。特殊なケースでは、一般的品質管理の厳密性がある程度緩和しても、便益が上回るならばウイルスベクターを活用するという選択はあるかもしれない。タバコモザイクウイルスベクターがよく用いられる。

### (3) タンパク質発現の制御

(発現量・発現時期・発現部位・細胞内局在)

組換え植物によるタンパク質生産では、収量増加が課題の1つとなっているが<sup>12)</sup>、収量増加のためには、発現量の増加と、細胞内局在の選択による安定性の向上、精製効率のよい発現部位の選択などが重要であり、その制御には、導入遺伝子のプロモーター配列やシグナル配列が関わっている。タバコ、ジャガイモ、トマトなどの双子葉植物では強力な恒常発現型のプロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaMV 35S) が用いられることが多い<sup>8), 13)</sup>。穀類では CaMV 35S の活性が弱いため、トウモロコシのユビキチン-1 プロモーター (ubi-1) が好まれる<sup>8), 13)</sup>。最近では発現制御型のプロモーターが選択される例も増えてきている<sup>9)</sup>。例をあげると、機械的損傷による誘導発現が可能な peroxidase 遺伝子プロモーターでは、収穫後に機械的損傷を与えることによりタンパク質を発現させることができ、誘導さ

れるタンパク質の発現量は CaMV プロモーターの 30 倍と報告されている<sup>14)</sup>。また、種子特異的な arc5-1 プロモーターでは、目的タンパク質が種の全可溶性タンパクの 36% を占めるという高発現量が得られている<sup>15)</sup>。タバコの葉の出液 (guttation fluid) や根の浸出物 (exudate) 中にタンパク質を分泌させることができる組織特異的なプロモーターも報告されている<sup>16), 17)</sup>。

目的タンパク質の細胞内局在によって、タンパク質の高次構造形成、翻訳後修飾や安定性が異なり、収量にも影響するが、目的タンパク質ごとに適した局在が異なるため、個別の検討が必要である。抗体では、シグナルペプチドと小胞体滞留シグナル H/KDEL を用いて小胞体に局在させると、細胞質や細胞間隙 (アポプラスト) に局在させた場合よりタンパク質の蓄積量が多いと報告されている<sup>18)</sup>。植物に対して毒性のあるタンパク質を発現させる場合は局在の制御が特に重要であり、例えば、アビジンはタバコの細胞質に発現すると毒性が生じるが、液胞に発現させると問題がない。

### (4) 精製法

精製法により、タンパク質の収量、純度、混入する不純物等が変動するため、組換えタンパク質の品質を考える上で精製法は非常に重要であるが、宿主植物と目的タンパク質によって適した方法は異なる。植物体外にタンパク質を分泌させる場合は抽出工程が不要になるため、精製の点では最も有利であると考えられるが、培地中に分泌されたタンパク質は不安定な場合がある。細胞内に発現したタンパク質を精製するためには、細胞の破碎やタンパク質の抽出工程が必要となるが、植物体を破碎すると細胞に含まれるフェノール類などが放出されてしまうため、最終製品への混入に注意が必要である。タンパク質精製が容易な種子のオイルボディにタンパク質を発現させる方法では、オレオシンとの融合タンパクとして組換えタンパク質を発現させ、トロンピンや Factor Xa などの



プロテアーゼによりオレオシンを除去する方法が開発されている<sup>19)</sup>。

(5) 今後の課題

組換え植物によるヒトタンパク質生産系の実用化に向けて改善が必要な主な技術的課題は、収量の増加、精製法の確立、品質の一定性確保、であるとされている<sup>12)</sup>。タンパク質の発現量は、栽培面積あたりの生産量の他、精製工程等にも影響するが、一般に、従来の方法で植物に発現させたヒトタンパク質では発現量が低く、全可溶性タンパク質に対する組換えタンパク質の割合が0.01%程度である例が多い<sup>20)</sup>。例えば、核染色体への遺伝子導入により組換えタバコに発現された

血清アルブミンの全可溶性タンパク質に対する割合は0.02%であったが、血清アルブミンの全世界での年間使用量にあたる約550 tを30,000 ha(全米の耕地面積の1/1000以下)の栽培で生産するためには、発現量を全可溶性タンパク質あたり1%、すなわち、50倍に上昇させる必要がある<sup>21)</sup>。

2. 医薬品開発への応用

組換え植物で生産されたタンパク質のうち、臨床試験が行われている例を表3に挙げた<sup>8), 13)</sup>。組換えタバコで生産された抗 *Streptococcus mutans* 抗体 CaroRx<sup>TM</sup> がう蝕(虫歯)を対象に<sup>22)</sup>、組換え

表3 組換え植物を用いて生産されたタンパク質医薬品の臨床試験

組換えタンパク質	適応症	生産方法	収穫後	臨床試験	投与方法	備考
抗 <i>S.mutans</i> 抗体 (分泌型IgA/G: CaroRx)	虫歯	組換えタバコ	精製	Phase II	口腔内	糖タンパク質
胃リパーゼ(Merispace)	嚢胞性線維症、 肺炎	組換えトウモロコシ	精製	Phase II	経口	糖タンパク質
ヒト内因子	ビタミンB <sub>12</sub> 欠損症	組換えシロイヌナズナ	精製	Phase II	経口	糖タンパク質
インターフェロンα (BLX-833)	Locteronの 有効成分	組換えウキクサ	精製	Phase I	(筋肉内)*	対照薬: イントロン®
インターフェロンα (徐放性製剤Locteron)	C型肝炎	組換えウキクサ	精製	Phase I	(皮下)*	対照薬: ベグイントロン®
ラクトフェリン	ドライアイ	組換えトウモロコシ	精製	Phase I	点眼	糖タンパク質
大腸菌易熱性腸管 毒素B鎖ワクチン	下痢	組換えトウモロコシ	未精製	Phase I	経口	
大腸菌易熱性腸管 毒素B鎖ワクチン	下痢	組換えジャガイモ	未精製	Phase I	経口	
HBV表面抗原ワクチン	B型肝炎	組換えジャガイモ	未精製	Phase I	経口	
HBV表面抗原ワクチン	B型肝炎	組換えレタス	未精製	Phase I	経口	
ノーウォークウイルス カプシドワクチン	ノーウォークウイルス 感染	組換えジャガイモ	未精製	Phase I	経口	
scFv(ワクチン)	非ホジキンリンパ腫	タバコ(一過性発現)	精製	Phase I	皮下	
狂犬病ウイルスワクチン	狂犬病	ホウレンソウ (一過性発現)	未精製	Phase I	経口	

EMBO Rep., 6:593, 2005., Expert Opin. Emerg Drugs, 10:185, 2005.をもとに作成

\*投与方法が明らかでないため、対照薬の投与方法を記載した。

トウモロコシで生産された胃リパーゼ Merispase<sup>®</sup>が嚢胞性線維症を対象に<sup>23)</sup>、ヒト内因子 intrinsic factor がビタミン B<sub>12</sub> 欠損症を対象に<sup>24)</sup>、フェーズ II に進んでいる。

## 2.1 CaroRx<sup>™</sup>

抗 *S. mutans* 抗体 CaroRx<sup>™</sup> は、米国の Plant Biotechnology 社が開発しているもので、抗原結合部位が IgG 由来であるが、その他の部分は分泌型 IgA の構造を持つ分泌型 IgA/G キメラ分子であり、H 鎖が IgG 由来の C<sub>γ</sub>1, C<sub>γ</sub>2 と IgA 由来の C<sub>α</sub>2, C<sub>α</sub>3 からなる IgA/G キメラ 2 分子と J 鎖および secretory component から構成される<sup>6)</sup>。遺伝子組換えと交配により作製された組換えタバコを用いて生産され、破碎と凍結融解による葉の抽出物から Protein G カラムクロマトグラフィーを含む工程により精製される。CaroRx<sup>™</sup> は、う蝕関連菌 *S. mutans* の表面にある接着タンパク質に結合するため、*S. mutans* の歯への接着を防ぐ働きを持つ。用法としては、クロルヘキシジンによる口腔内の殺菌を行った後、2~3 週間の間に CaroRx<sup>™</sup> を口腔内に数回適用する<sup>22)</sup>。これにより、6 ヶ月から 1 年の間、口腔内での *S. mutans* 繁殖を防ぐことができる。分泌型 IgA/G と IgG の比較では、分泌型 IgA/G の方が口腔内への滞留性が高く、抗原への結合も強いとされている<sup>25), 26)</sup>。CaroRx<sup>™</sup> を構成する IgG, IgA および J 鎖の遺伝子はマウス由来、secretory component の遺伝子はウサギ由来であり、ヒト化抗体ではない。

## 2.2 Merispase<sup>®</sup>

胃リパーゼ Merispase<sup>®</sup> は、フランスの Meristem Therapeutics 社が開発している<sup>23)</sup>。イヌ胃リパーゼ遺伝子をアグロバクテリウム法で導入した組換えトウモロコシで発現され、実の乾燥粉末から、抽出、精製工程を経て製造される。膵外分泌不全

によりリパーゼが欠乏するために食物中の脂質を分解することができず、栄養状態が悪くなる嚢胞性線維症の治療に経口投与製剤として用いられる。嚢胞性線維症の患者は、膵臓の酵素を慢性的に補う必要があるため、現在はブタ膵臓から抽出した製剤を投与されている。しかし、患者の消化管の酸性度が健常人に比べて高く、ブタ由来の酵素が分解あるいは失活してしまうために効力が十分でなく、1 日 20 錠もの高用量を服用する必要がある。また、治療を行っても、通常のレベルにまで脂肪を吸収できる患者は全体の 3 分の 1 程度である。Merispase<sup>®</sup> は酸性条件への耐性が高く、胃を通過した後も高い酵素活性を維持しているため、より有効な医薬品となることが期待される。一般に動物由来原料から抽出した製剤では、人獣共通感染症などの防止に関して配慮する必要があるが、組換え植物で生産された Merispase<sup>®</sup> ではブタ膵臓由来の製剤で必要とされている感染性物質に関する対策も軽減できると考えられる。組換えタンパク質はトウモロコシの穀粒のみに発現され、他の部位での発現はない。また、組換え体は雄性不稔である。

## 2.3 内因子 intrinsic factor

内因子は生体内では胃から分泌されるタンパク質で、ビタミン B<sub>12</sub> 結合活性を持ち、腸管からのビタミン B<sub>12</sub> の吸収に必須である。デンマークの Cobento 社が開発しているヒト内因子は、アグロバクテリウム法で作製された組換えシロイヌナズナから、凍結融解と破碎による抽出とビタミン B<sub>12</sub> アフィニティークロマトグラフィーを含む精製工程を経て製造される<sup>24), 27)</sup>。植物は、動物や微生物と異なりビタミン B<sub>12</sub> を持たないため、ブタ由来の内因子製剤に混入することが知られているハプトコリンのような他のビタミン B<sub>12</sub> 結合タンパク質を持たず、ビタミン B<sub>12</sub> 結合タンパク質の生産宿主として適している。胃切除等により



胃で内因子が産生されない患者では、ビタミンB<sub>12</sub>が吸収されず貧血などの症状がおこるため、ビタミンB<sub>12</sub>を注射により補充する必要がある。また、経口摂取されるビタミン剤の中にはブタ由来の内因子を添加しているものがあるが、動物由来タンパク質には安全性の面などでそれ相応の対策が必要である。本薬は、錠剤として、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏の患者に経口投与される。生産されている内因子はヒト内因子と同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質で、ビタミンB<sub>12</sub>との結合特性、および、内因子-ビタミンB<sub>12</sub>複合体の受容体である cubilin との結合特性は、ヒトの胃に存在する内因子と同等であると報告されている<sup>27)</sup>。

## 2.4 インターフェロンα

組換えウキクサで生産された米国 Biolex 社のインターフェロンα (BLX-833)の臨床試験では、対照薬としてすでに上市されているインターフェロンα製剤であるイントロンとの比較が行われ、薬効の指標となるネオプテリン濃度の上昇や副作用プロファイルが両者で同等であったとされている<sup>28)</sup>。また、BLX-833は生分解性ポリマーを用いた徐放性製剤 Lacteron™としても開発が進められており、この場合は、対照薬としてポリエチレングリコール修飾インターフェロンα製剤であるペグイントロンが用いられている<sup>29)</sup>。生分解性ポリマーの性質を反映した特徴であるが、Lacteron™ではインターフェロンあるいはPEG化インターフェロンにみられる投与後の血中濃度の急激な上昇がなく、副作用を回避できる可能性がある他、血中濃度の持続性が高く、ペグイントロンでは週1回の投与が必要であるのに対して、2週間に1回の投与でよいとされている。ウキクサによるタンパク質生産は、GMP対応の製造施設で行うことができるので、環境への影響(封じ込め)や、製造条件の一定性確保の点でも優れていると思われる。

## 2.5 ラクトフェリン

ラクトフェリンは生体では涙液や乳汁などに含まれる分子量約8万の糖タンパク質で、角結膜での涙液層の安定化作用や抗菌作用等を持つことが知られている。組換えトウモロコシで生産されるラクトフェリンは、当初、眼へ局所投与するドライアイの治療薬として開発されたが、消化管感染症に適応拡大されている<sup>30)</sup>。

ヒトラクトフェリンには、N結合型糖鎖が付加される部位が3カ所(Asn<sup>138</sup>, Asn<sup>479</sup>, Asn<sup>624</sup>)存在し、このうち、Asn<sup>138</sup>およびAsn<sup>479</sup>の2カ所が主要な糖鎖付加部位であるとされている<sup>31)</sup>。トウモロコシに発現された組換えヒトラクトフェリンでは、Asn<sup>138</sup>およびAsn<sup>479</sup>の2カ所にN結合型糖鎖が付加されていること、Asn<sup>624</sup>には糖鎖が検出されていないことが報告されており、糖鎖付加部位については、ヒト由来のラクトフェリンと同様であると考えられる<sup>32)</sup>。ただし、付加されている糖鎖の構造には、β1-2 xylose, α1-3 fucoseを含むなど、ヒト由来ラクトフェリンとの相違が認められている<sup>32)</sup>。

## 2.6 経口ワクチン

経口ワクチンとして、組換えトウモロコシあるいはジャガイモで生産された大腸菌の易熱性エンテロトキシンB鎖<sup>33)</sup>・<sup>34)</sup>、組換えジャガイモあるいはレタスで生産されたB型肝炎ウイルス表面抗原<sup>35)</sup>・<sup>36)</sup>、組換えジャガイモで生産されたノーウオークウイルスカプシドタンパク質<sup>37)</sup>の臨床試験が行われている。

組換えトウモロコシ、ジャガイモ、レタスなどの可食植物に発現されたワクチン抗原は、精製されずに植物体のまま経口摂取される。組換えジャガイモを用いたワクチンの臨床試験では、苦味や吐気の原因となる植物アルカロイドであるソラニンを除くために投与直前に皮を剥き、一口大に

切ったものを生で経口摂取させている。組換えトウモロコシでは脱脂した胚芽を粉にしたものを、組換えレタスでは生の葉を、経口摂取させている。いずれの臨床試験でも、ワクチン抗原に対する抗体の産生が認められており、抗体産生が誘導された被験者の割合は62~95%となっている<sup>33)-37)</sup>。

経口ワクチンは腸管の粘膜免疫組織による免疫応答を期待するものであるが、粘膜免疫を誘導するためには、抗原を腸管上皮層で取り込み、パイエル板内に存在する免疫担当細胞に輸送する役割をしているM細胞に経口摂取された抗原が認識されなければならない。しかし、M細胞は、細菌やウイルスのように一定の構造を持つものを認識するため、可溶性のタンパク質は免疫原となりにくい。植物に発現され、経口投与で免疫応答の誘導が認められたワクチンでは、発現されたタンパク質がM細胞に認識されやすいような高次構造を持っていたものと考えられる<sup>38)</sup>。大腸菌の易熱性エンテロトキシンBサブユニットの場合は、ガングリオシドGM1に結合するため、腸管上皮細胞に結合することができ、強い免疫原性を持つことが知られている。また、ジャガイモのようにプロテアーゼ阻害物質を多く含む植物組織は、アジュバントとして作用している可能性がある<sup>39)</sup>。

## 2.7 一過性発現系の利用

ウイルスベクターを用いて一過性にタンパク質を発現させる方法で生産されたタンパク質にも臨床試験が行われているものがある。タバコで発現される非ホジキンリンパ腫のワクチンは、患者のリンパ腫が産生しているイムノグロブリンの抗原結合部位の遺伝子から1本鎖抗体scFv遺伝子を構築し、タバコに発現させることにより、ワクチンをオーダーメイドで生産しようとするものである<sup>40), 41)</sup>。タバコへの遺伝子導入には、改変型のタバコモザイクウイルスが用いられている。発現されたタンパク質は精製され、皮下投与される。狂

犬病ウイルスワクチンでは、アルファルファモザイクウイルスのコートタンパク質との融合タンパク質として狂犬病ウイルスのGおよびNタンパク質を発現させられるタバコモザイクウイルスとアルファルファモザイクウイルスのハイブリッドベクターが用いられており、傷をつけたハウレンソウの葉にベクターをコードするRNAを接種し、12~14日間栽培後、ベクターの構成成分として目的タンパク質が発現された生の葉を経口摂取させている<sup>42)</sup>。

## 2.8 ヒトの医薬品以外

ヒトの医薬品以外では、組換え植物で生産されたアプロチニン、トリプシン、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、アビジンが研究および産業用に商品化されている。動物用ワクチンでは、タバコの培養細胞を用いて製造されたニワトリニューカッスル病に対するワクチンが2006年1月に初めて米国で承認された。

## 3. 組換え植物を用いて生産されたタンパク質の品質・安全性確保

### 3.1 組換え植物を利用したタンパク質性医薬品製造に関するガイドライン

我が国には組換え植物を用いて製造されたタンパク質性医薬品に特化したガイドラインはないが、医薬品に求められる品質・有効性・安全性に関する製品レベルの基本的留意事項としては、製造方法が異なっても変わることはないため、動物細胞や微生物を用いて製造されたタンパク質性医薬品に対する各種の規制関連文書が参考になると思われる<sup>43)</sup>。一方、米国食品医薬品局FDAおよび欧州医薬品庁EMAからは、組換え植物を用いて生産されたタンパク質性医薬品に関するガイドラインの草案が公表されている。