

表 5 C リツキシマブの主な適用理由における有害事象の粗オッズ比

適用理由	Infusion reaction	心不全	穿孔
B 細胞性リンパ腫	0.15 (0.02-1.13)	n.d.	n.d.
びまん性大細胞型リンパ腫	0.45 (0.17-1.18)	n.d.	3.47 (1.55-7.79)
マントル細胞リンパ腫	n.d.	n.d.	1.09 (0.14-8.17)
リンパ腫	8.40 (4.02-17.6)	n.d.	2.87 (1.13-7.29)
移植拒絶反応	n.d.	n.d.	n.d.
筋外周辺帯 B 細胞リンパ腫	n.d.	n.d.	n.d.
非ホジキンリンパ腫	1.75 (0.77-3.98)	n.d.	0.20 (0.03-1.45)
濾胞中心リンパ腫	n.d.	n.d.	n.d.

表 5 D ベバシズマブの主な適用理由における有害事象の粗オッズ比

適用理由	心不全	穿孔
遠隔転移を伴う結腸癌	0.59 (0.28-1.25)	1.75 (1.44-2.13)
遠隔転移を伴う結腸直腸癌	n.d.	0.68 (0.15-3.00)
遠隔転移を伴う直腸癌	0.84 (0.36-1.97)	1.56 (1.23-1.99)
遠隔転移を伴う乳癌	8.71 (4.54-16.7)	0.71 (0.42-1.19)
遠隔転移を伴う肺腺癌	1.24 (0.49-3.13)	1.19 (0.86-1.63)
遠隔転移を伴う非小細胞肺癌	n.d.	2.06 (0.79-5.37)
再発結腸癌	0.69 (0.21-2.21)	0.86 (0.61-1.22)
再発直腸癌	0.71 (0.22-2.29)	1.32 (0.97-1.81)
再発乳癌	6.96 (0.87-55.9)	n.d.
再発肺腺癌	1.87 (0.45-7.85)	0.53 (0.24-1.17)
再発非小細胞肺癌	n.d.	n.d.
結腸癌	1.56 (0.78-3.13)	0.73 (0.54-0.97)
加齢黄斑変性	n.d.	n.d.
神経膠芽細胞腫	n.d.	0.29 (0.07-1.20)
直腸癌	n.d.	1.53 (0.96-2.44)
乳癌	7.75 (2.65-22.7)	0.26 (0.06-1.09)
肺の悪性新生物	n.d.	0.45 (0.11-1.94)
肺腺癌	0.53 (0.07-3.85)	0.35 (0.17-0.71)
非小細胞肺癌	n.d.	0.19 (0.08-0.48)

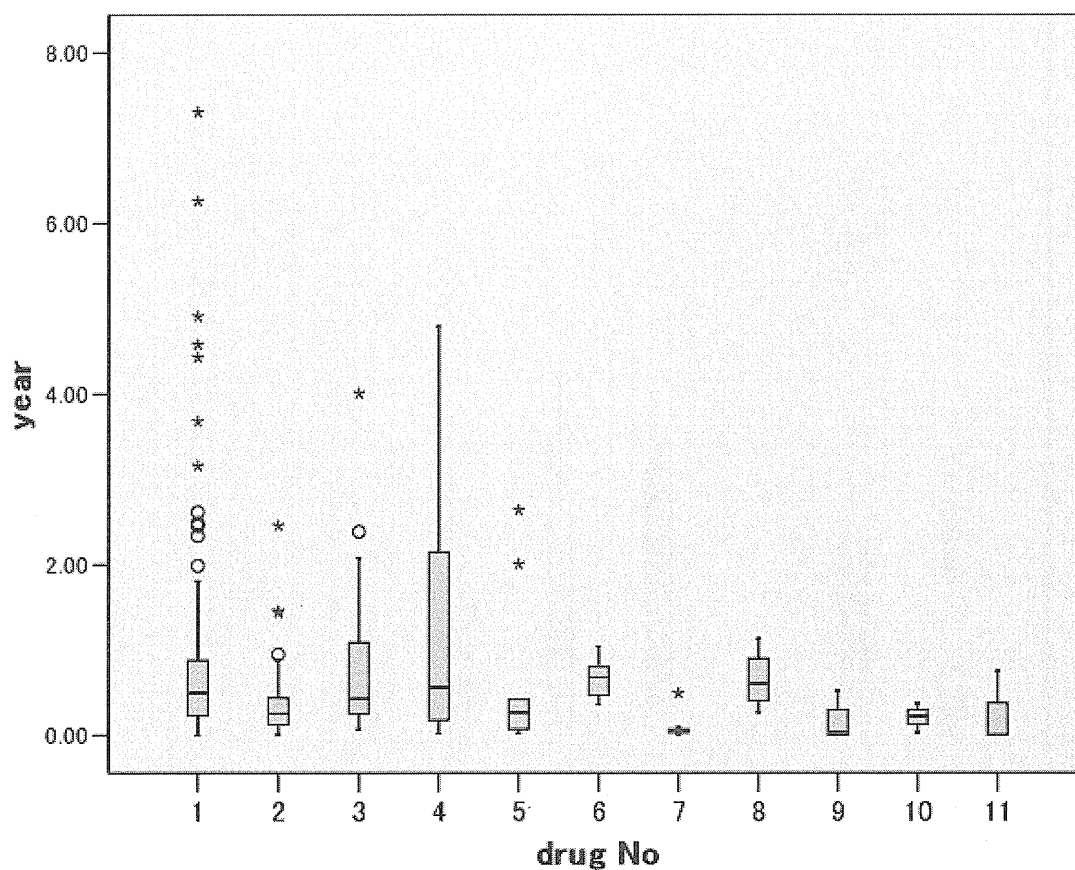


図3 各種バイオ医薬品による心不全発現時期の箱ひげ図（横軸は表6を参照）

表6 各種バイオ医薬品と心不全リスク因子の検討

医薬品一般名	症例数	女性 (95%CI)	60代以上	10代以下
1.トラスツズマブ	172	8.80 (2.73-28.3)	0.68 (0.47-0.96)	n.d.
2.ベバシズマブ	57	2.01 (1.17-3.45)	1.04 (0.59-1.84)	n.d.
3.トシリズマブ	38	0.95 (0.48-1.89)	2.71 (1.24-5.93)	0.32 (0.04-2.35)
4.エタネルセプト	34	1.06 (0.49-2.26)	2.70 (1.12-6.52)	n.d.
5.インフリキシマブ	10	0.27 (0.07-1.06)	1.66 (0.47-5.91)	n.d.
6.アダリムマブ	10	0.61 (0.18-2.11)	5.97 (0.76-47.3)	n.d.
7.ゲムツズマブオゾ ガマイシン	7	n.d.	n.d.	n.d.
8.アバタセプト	4	n.d.	n.d.	n.d.
9.リツキシマブ	4	n.d.	n.d.	n.d.
10.セツキシマブ	10	0.83 (0.21-3.23)	0.74 (0.19-2.89)	n.d.
11.バシリキシマブ	4	n.d.	n.d.	n.d.
ペルツズマブ	11	n.d.	1.08 (0.28-4.21)	n.d.

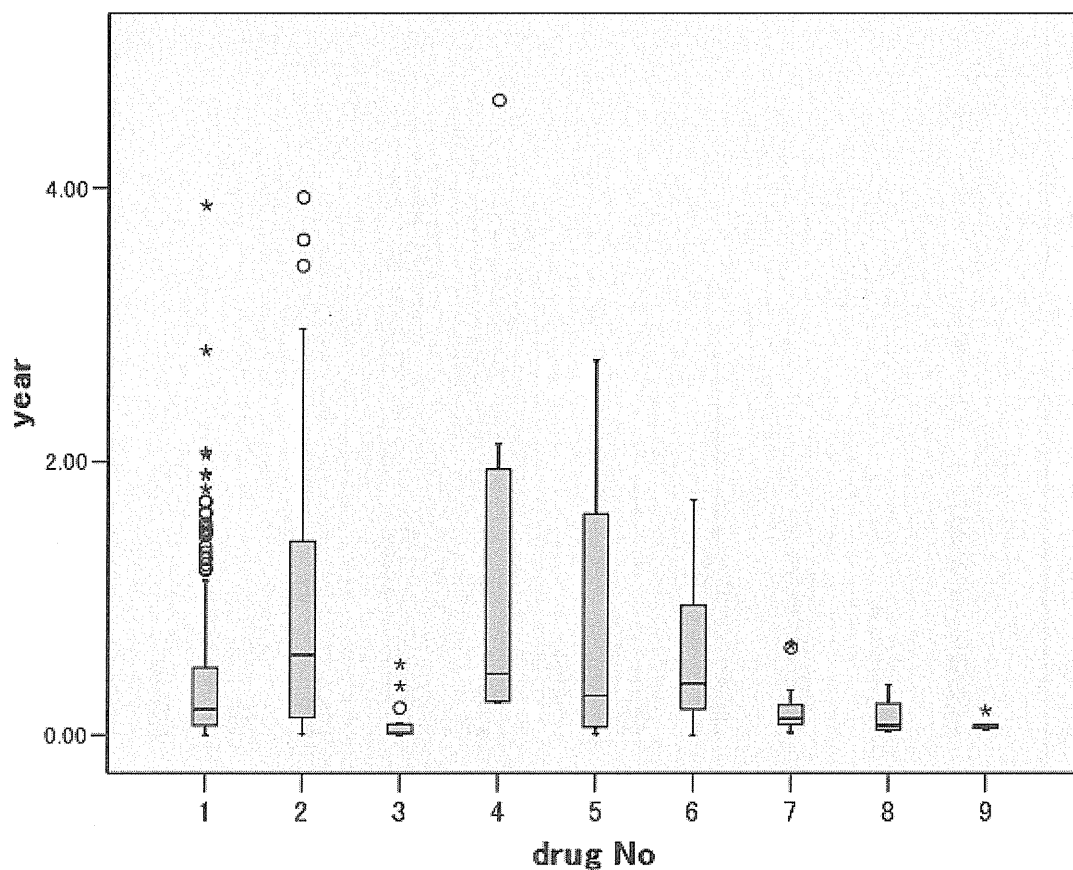


図4 各種バイオ医薬品による消化管穿孔発現時期の箱ひげ図（横軸は表7を参照）

表7 各種バイオ医薬品と穿孔リスク因子の検討

医薬品一般名	症例数	女性 (95%CI)	60代以上	10代以下
1.ベバシズマブ	593	0.93 (0.77-1.12)	1.01 (0.84-1.22)	n.d.
2.トシリズマブ	82	0.64 (0.41-1.004)	1.06 (0.68-1.66)	0.14 (0.02-1.04)
3.リツキシマブ	26	0.74 (0.32-1.68)	2.77 (1.03-7.42)	3.18 (0.73-14.0)
4.エタネルセプト	17	0.53 (0.19-1.48)	3.49 (0.79-15.5)	n.d.
5.インフリキシマブ	19	0.37 (0.15-0.95)	0.06 (0.01-0.46)	1.88 (0.25-14.3)
6.アダリムマブ	18	0.61 (0.18-2.11)	5.97 (0.76-47.3)	n.d.
7.セツキシマブ	20	1.30 (0.53-3.21)	1.28 (0.42-3.87)	n.d.
8.バシリキシマブ	4	n.d.	n.d.	n.d.
9.パニツムマブ	6	n.d.	n.d.	n.d.
トラスツズマブ	3	n.d.	n.d.	n.d.

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 トランスジェニック動物（カイコ）による先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための研究

研究分担者 瀬筒秀樹 独立行政法人農業生物研究所 遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット長

要旨 トランスジェニック（Tg）カイコ由来バイオ医薬品の品質確保のための要件として、糖鎖修飾やTgバンクについて検討するとともに、バイオ医薬品の新規生産基材としてのTgカイコの有用性を示すために、発現量や個体選抜法等について発現系の改良を行いながら様々な組換えタンパク質を生産し、本研究グループの研究者らと共同で特性解析を進めた。

研究協力者

立松謙一郎 独立行政法人農業生物研究所 主任研究員

A. 目的

わが国で開発された技術であるトランスジェニック（Tg）カイコによる組換えタンパク質生産系を利用したバイオ医薬品開発を実現するために、(1)Tgカイコ由来バイオ医薬品の品質確保に必要な要件を検討する。さらに、(2)バイオ医薬品の新規生産基材としてのTgカイコの有用性を示すために、発現系の改良（発現量、個体選抜法等）を行いながら、様々な組換えタンパク質を生産して、本研究グループ（基材グループ）の研究者らに提供して、特性解析を行うことを、本研究の目的とする。

B. 研究方法

Tgカイコ由来バイオ医薬品の品質確保のための要件の検討として、本年度は翻訳後修飾のひとつである糖鎖修飾や、Tgバンクの管理手法等

に関する検討を行った。

また、Tgカイコの有用性を示すために、発現系の検討および改良を行うため、発現量増、個体選別法等々の検討を行った。さらに、Tgカイコ由来組換えタンパク質の特性解析を行うために、様々な組換えタンパク質をTgカイコの絹糸腺で生産し、本研究グループの他の研究者らに提供を行った。各研究者からの特性解析に関する情報等のフィードバックを受けて、発現系の改良等に反映することとした。

<倫理面への配慮>

本研究はトランスジェニックカイコすなわち昆虫を利用するものであり、また、本研究で用いる遺伝子はデータベース上で公開されている配列を用いているため、人権擁護上の配慮を必要とせず、研究対象者に対する不利益や危険性は生じない。また、組換えタンパク質生産において、マウス等の哺乳動物を利用しないため、動物愛護上の問題も殆ど無い。以上の理由により、倫理上の問題は無いと判断される。

C. 結果と考察

C. 1. Tg カイコ由来バイオ医薬品の品質安全性確保に関する研究

C. 1. 1. 糖鎖構造

Tg カイコで生産した様々な組換えタンパク質の糖鎖構造解析が進みつつある。これまでに本研究において、Tg カイコで生産した抗体タンパク質の N 結合型糖鎖には、フコースが殆ど付かないことが確認され、高い ADCC 活性を持つことが示された。これにより、Tg カイコ由来抗体医薬品の優位性が期待される。さらに、本年度は、抗原性が懸念されるフコースは付加されないことが示唆された。今後は、他のタンパク質についても糖鎖構造の解析と知見の集積が必要である。

C. 1. 2. 糖鎖改変技術の開発

Tg 技術を用いた糖鎖改変技術の開発に関しては、現在様々な試みが進められている。例えば、Tg カイコ由来組換えタンパク質の糖鎖修飾をヒト型化する試みが進みつつある。バキュロウイルスベクターを用いたガラクトースおよびシアル酸転移酵素の発現と、シアル酸の外部投与等により、N 結合型糖鎖にシアル酸が付加されることが報告されている（菅沼ら、カイコタンパク質生産系を用いた N-結合型糖鎖へのシアル酸付加, 第 36 回日本分子生物学会, 2013)。今後は、Tg 技術によってもガラクトース・シアル酸付加等の糖鎖改変が可能となることが予想されるため、様々な糖鎖改変型の Tg カイコ由来バイオ医薬品の利用を念頭に置いて、品質安全性を確保していく必要がある。

C. 1. 3. Tg バンクの管理手法の検討

Tg バンクの管理手法の検討については、これまでに引き続き、卵巣凍結保存法および卵巣移植法の検証を行うとともに、今年度からは大型

液体窒素タンクを用いた Tg バンクの本格的な運用試験を開始した（図 1)。また、我々が九州大学で卵巣保存を依頼していた Tg カイコ系統に関して、卵巣移植による復帰試験を依頼したところ、系統の凍結保存からの再生（復帰）を問題なく行うことができ、卵巣の凍結保存による Tg バンクが汎用的であることが示された。

Tg バンクとして、精子の凍結保存は実績があり、既に確立された技術である（持田ら、蚕糸・昆虫バイオテック, 83:163-170, 2014)。しかしながら、精子（精液）の採取には、多くのオス個体数が必要であり、手間と時間を要するため、卵巣と同様に、精巣凍結保存と精巣移植によって系統復帰と自然交配が可能になることが望ましい。凍結した精巣移植に関しても、卵巣移植と同様にカイコで可能であることが示唆されたため、Tg バンクとして精巣の利用も検討しておく必要があると思われた。

C. 2. バイオ医薬品の生産基材としての Tg カイコの有用性の実証に関する研究

C. 2. 1. 発現系の改良

Tg カイコの有用性を示し、さらに向上させるためにも、発現系の改良が進められている。従来の発現系としては、GAL4/UAS 系や IE1/hr3 系を用いて、カイコの絹糸腺（シルクタンパク質の合成器官）において組換えタンパク質を発現させる系が利用されている。我々は、中部絹糸腺で GAL4 を発現する Ser1-GAL4 系統と、UAS の下流に目的遺伝子をつないだベクターを導入した UAS 系統を交配することにより、中部絹糸腺で目的の組換えタンパク質を発現させて、中部絹糸腺もしくは繭から目的タンパク質を抽出する方法が用いてきた（図 2)。

この発現系では GAL4 系統と UAS 系統の交配が必要となるが、GAL4 と UAS を一つのベクター

に組み込んだ GAL4/UAS 一体型ベクターの利用も可能であり、交配の手間が少なくなることが示されている。

さらに、各系統を、養蚕農家で一般的に飼育されているような実用品種と交配することにより、系統の飼育成績（頑健性、結繭率等）が向上するとともに、幼虫および絹糸腺が大型化し、1頭あたりの組換えタンパク質生産量が上昇することが示されている。また、組換えタンパク質生産時に、F1 交雑種を利用することにより、飼育成績やタンパク質生産量がさらに上がることも示されている。つまり、シルク用の繭生産のために活用されている育種技術・雑種強勢の利用が、Tg カイコを用いた組換えタンパク質生産にも有用である。

昨年度には、後部絹糸腺で GAL4 を発現する FibH-GAL4 系統による組換えタンパク質生産系が開発され、中部および後部絹糸腺の同時発現系では、従来の2倍の組換えタンパク質の発現が可能となった。この中部・後部絹糸腺同時発現系において、セリシン・フィブロイン遺伝子のトランスジェニック RNAi によるノックダウンを行いながら、組換えタンパク質を発現させると（図3）、内在性のセリシン・フィブロインタンパク質が減少し、目的タンパク質の抽出の際にセリシン・フィブロインのゲル化が少なくなり、抽出が容易になることがわかった。さらには、この系を用いる事により、組換えタンパク質の生産量が4～8倍に増えた例もあった。

本年度、カイコの全身で恒常的に強く遺伝子発現を誘導可能なプロモーターが論文報告されており（Tsubota et al., G3, 4:1347-1357, 2014）、バイオ医薬品生産系として現在は考慮していないが、カイコの全身で組換えタンパク質を発現させることも可能となっている（図4）。将来的には、バキュロウイルス生産系と同様に、

Tg カイコの全身でバイオ医薬品を生産するケースもあるかもしれない。

さらに本年度には、効率的な遺伝子ノックイン法もカイコで開発されたため（Nakade et al., Nature Comm. 5:5560, 2014）、セリシン・フィブロイン遺伝子のノックイン等により、組換えタンパク質の発現量の大幅な増加が期待されるとともに、糖鎖改変・制御技術が高度化されることも期待される。

今後は、遺伝子ノックインや GAL4/UAS 系以外による発現系や糖鎖改変等も念頭に置いて、品質安全性の確保を行う必要があるだろう。

C.2.2. 発現安定性の検証

従来の中部絹糸腺 GAL4/UAS 系における発現安定性の検証法についても検討を行った。Tg カイコで生産された、あるタンパク質 X について、同一飼育時の個体間や、異なる時期に飼育した場合の個体間で、組換えタンパク質遺伝子の mRNA 発現量とタンパク質発現量の差異がどのくらいかを検証する方法を検討したところ、ロット間差が少ないことが、本年度報告された。今後、同様の方法によって、他のタンパク質を生産した場合のロット間差の検証が可能であると思われる。

C.2.3. 個体選別法の検証

個体選別法としては、卵や幼虫の全身で恒常的に強く発現するプロモーターと蛍光タンパク質組み合わせた新たな組換えマーカーが本年度に開発され、（Tsubota et al., G3, 4:1347-1357, 2014）卵でも早期選抜可能な、有用な組換えマーカーであることが示された（図4）。

C.2.4. 組換えタンパク質の特性解析

Tg カイコ由来組換えタンパク質の特性解析のために、様々な組換えタンパク質を、Tg カイコの絹糸腺で生産し、本研究グループの研究者ら

に送付した。本年度は、ガンワクチンの候補となるガン抗原として期待される MAGE-A4 (Melanoma-associated antigen), p53, WT-1 (Wilms' tumor) の生産を試みた。MAGE-A4 を例にあげると、MAGE-A4 遺伝子および His タグを組み込んだ UAS ベクターを構築し (図 5), 中部絹糸腺 GAL4 系統と交配し (図 2), 絹糸腺を摘出してタンパク質の抽出を行ったところ、MAGE-A4 の発現が確認された (図 6)。同様に分泌型 p53 を発現させた場合、分泌型 p53 の生産が可能であることが示された (図 7)。ただし、ウェスタンブロットにおいて、いくつかの分子量が異なるシグナルが確認されたため、今後の詳細解析が必要である。さらに、WT-1 を発現する Tg カイコ の作出にも成功した。そのほか、リソソーム病新規治療薬となるヒトカテプシン A と、リソソーム病市販薬として既に販売されているが、Tg カイコ で生産することによりバイオシミラー・バイオベターとなることが期待される酵素 Y についても生産し、評価を行った。また、食欲抑制効果が報告されている摂食抑制ペプチドであるネスファチン (マウス Nucleobindin2, Nef1) の生産と評価を進めた。加えて、昨年度までの前プロジェクトで行っていたネコインターフェロンの生産と評価も、引き続き行った。コドン最適化の効果を検証するために、コドンを改変したインターフェロン遺伝子を UAS 下流に導入した Tg カイコ を作出し、中部絹糸腺 GAL4 系統と交配して、中部絹糸腺および繭で発現させて、タンパク質を抽出したところ、インターフェロンの発現が確認された (図 8)。昨年度までの結果を合わせると、系統数が少ないため結論を出すことはできないが、コドンの改変による大きな影響は見られなかった。

D. まとめ

Tg カイコ由来バイオ医薬品の品質安全性確保のために、Tg カイコにおける糖鎖修飾等の翻訳後修飾に関する情報を収集したところ、Tg カイコで生産した抗体タンパク質の N 結合型糖鎖には、抗原性が懸念されるフコースは付加されないことが示唆された。さらに、バキュロウイルス系による糖転移酵素の発現と、シアル酸の外部投与により N 結合型糖鎖にシアル酸が付加されることが示された。

Tg バンクの管理手法としては、卵巣凍結保存および復帰技術の開発が進んだ。我々は大型の液体窒素タンクでの保存を開始し、より実用的な凍結保存法の開発と実証を開始した。

Tg カイコ の有用性を実証するために、発現系改良や発現安定性の評価法の検討を行うとともに、ガン抗原の MAGE-A4・p53・WT-1, リソソーム病治療薬 (ヒトカテプシン A および酵素 Y), 食欲抑制効果のあるネスファチン, 動物治療薬となるネコインターフェロンについて、Tg カイコ で生産し、特性解析を共同で進めた。

E. 健康危機情報

ヒト感染性のウイルス・細菌等を保有することが報告されていないカイコを利用した研究であり、本分担研究課題では臨床試験等も行っていないため、健康危機等に関する問題は無いと判断される。

F. 研究発表等

論文発表等

- 1) 立松謙一郎：遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産, JATAFF ジャーナル, 2(7):31-37 (2014).
- 2) 瀬筒秀樹：カイコ の遺伝子組換え技術の展開, JATAFF ジャーナル, 2(7):24-30 (2014).

3) 瀬筒秀樹, 立松謙一郎: 医療用有用タンパク質の生産を目指した組換えカイコの作製と展開, 生化学, 86(5):553-560 (2014).

6) 石井明子, 原園景, 多田稔, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 川崎ナナ: カイコが創る次世代抗体医薬品 (2015. 3. 26, 神戸).

学会発表等

1) 瀬筒秀樹: 新しい昆虫産業を創る!—カイコにおける次世代ゲノム改変技術の開発と異分野融合—. H26 年度日本農学会シンポジウム「ここまで進んだ! 飛躍する農学」(2014. 10. 6, 東京).

2) 黒岩聡志, 小久保倫文, 元川揺子, 桑原伸夫, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. 第37回日本分子生物学会(2014. 11. 27 横浜).

3) Takeda S, Kuroiwa S, Kokubo M, Motokawa Y, Kuwabara N, Futahashi M, Suzuki T, Tatematsu KI, Sezutsu H, Chikamatsu K: Expression of the recombinant tumor antigen in transgenic silkworm. 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (2014. 12. 5, 群馬).

4) 瀬筒秀樹: “新蚕業” 創出に向けた基盤技術の開発と今後の展開方向. 第7回公開シンポジウム「カイコ産業の未来」(2015. 1. 16, 東京).

5) 立松謙一郎, 笠嶋めぐみ, 坪田拓也, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 小林功, 内野恵郎, 飯塚哲也, 米村真之, 高須陽子, 田村俊樹, 瀬筒秀樹: 医薬品の開発・生産を目指した遺伝子組換えカイコの作製と高度化. 医薬品の開発・生産を目指した遺伝子組換えカイコの作製と高度化 (2015. 3. 26, 神戸).

報道発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図1 大型液体窒素タンクを用いた Tg バンク

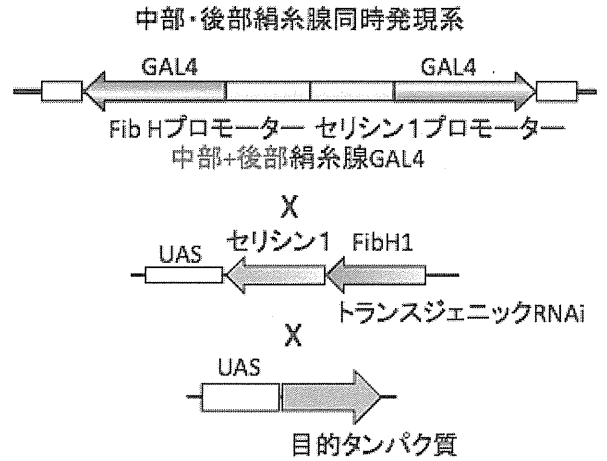


図3 中部・後部同時発現+フィブロイン・セリシンロックダウンによる発現系

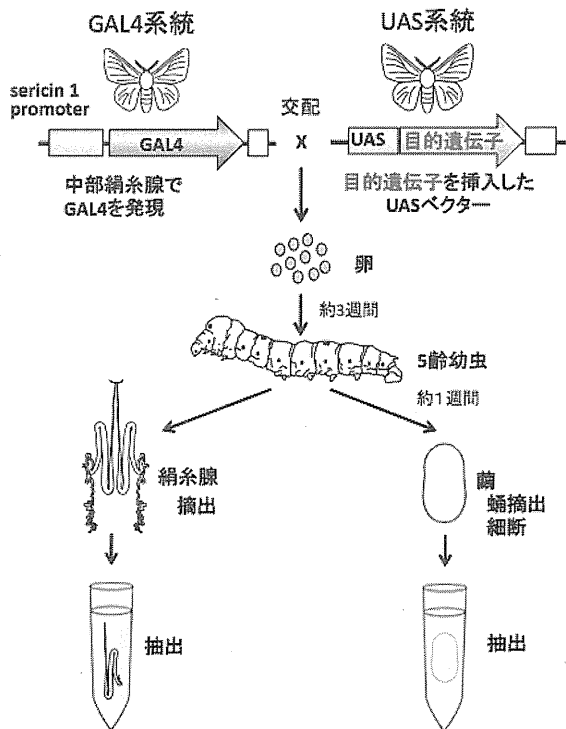


図2 Tg カイコによる組換えタンパク質発現系：中部絹糸腺 GAL4/UAS 系

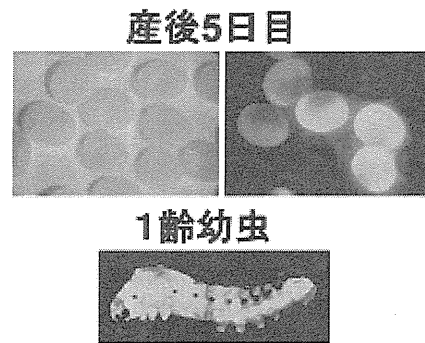


図4 卵で組換え体を早期選抜可能なマーカー (幼虫期での強い全身発現もみられる)

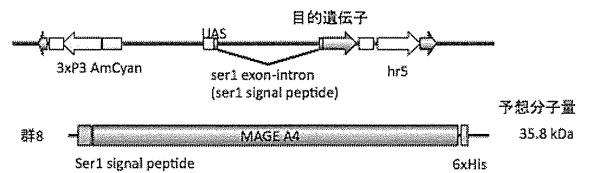


図5 ガン抗原 MAGE-A4 の発現ベクター (UAS ベクター)

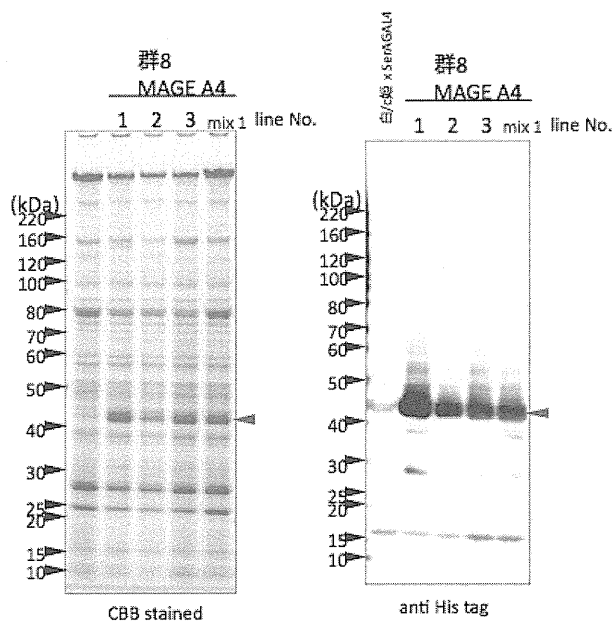


図6 ガン抗原 MAGE-A4 の発現確認

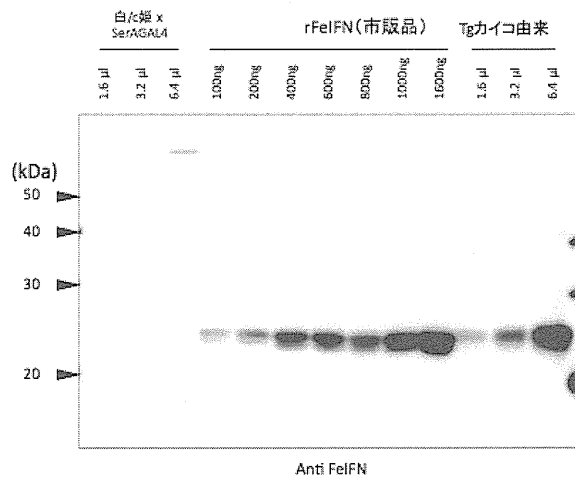


図8 コドンを改変したネコインターフェロンの発現確認

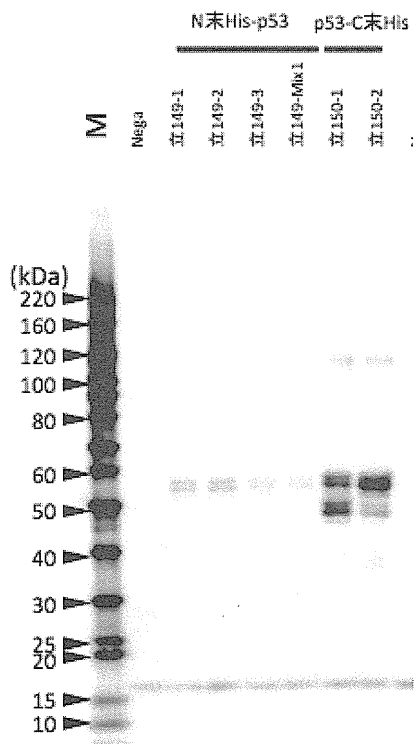


図7 分泌型 p53 の発現確認

研究要旨 リソソーム病に対する酵素補充治療用原薬の新規生産基材として組換えカイコ (Tg カイコ) の開発を目指し、ヒトカテプシン A (CTSA) 及び酵素 X 遺伝子を恒常発現する Tg カイコを作製し、中部絹糸腺で大量発現・精製した活性型 CTSA 及び酵素 X の分子特性を解析した。精製 CTSA は、*in vitro* でリソソーム性ノイラミニダーゼ 1 (NEU1) を活性できることを明らかにした。また有効性評価のために、CTSA 欠損症患者 iPS 細胞株からの神経系細胞の分化誘導法を構築するとともに、日本人に多い若年・成人型症例と極めて類似した症状を示す CTSA・NEU1 同時欠損モデルマウスの作製に成功した。

A. 研究目的

リソソーム病（遺伝性リソソーム酵素欠損症）の酵素補充治療薬として臨床応用されている、哺乳類細胞株由来組換えヒトリソソーム酵素製剤に対し、より安全・低コストで量産が可能な新規生産基材が必要とされている。分担者の伊藤は、ヒトリソソーム酵素原薬の生産基材として組換えカイコに着目し、これまでに（独）農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニットとの共同で、絹糸腺でヒトリソソーム酵素（CTSA 及び酵素 X）を恒常発現するトランスジェニック(Tg)カイコの作製と中部絹糸腺からの精製法を確立するとともに、国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部との共同で精製酵素の分子特性解析を実施してきた。

ヒト CTSA は、酸性 pH でカルボキシペプチダーゼ (CathA) 活性と、リソソーム内での複合体形成に基づく Neuraminidase-1 (NEU1) の活性化及びβ-Galactosidase (GLB1) のプロテアーゼ分解からの保護機能を併せもつリソソーム酵素である。ガラクトシアリドーシス (GS) は、中枢神経症状を伴う日本人種に多い CTSA 欠損症である。これまで我々は GS に対する新規脳内酵素補充療法の開発を目指し、CTSA-Tg カイコを作製し、中部絹糸腺から組換えヒト CTSA を精製し、その分子特性と修飾型 CTSA の GS 患者由来培養細胞に対する補充効果（有効性）を明らかにしてきた。またヒトリソソーム酵素の生産量向上を目的とした改良型 Tg カイコ系統の作製と発現量の評価、またヒトリソソーム酵素 X を中部絹糸腺で高発現する Tg カイコ (1mg 酵素/頭) の作製にも成功し、中部絹糸腺からの精製法も確立してきた。

本研究課題では、CTSA 及び酵素 X 欠損症患者

に対するバイオスーパー型酵素製剤の開発を目的とし、組換えカイコ由来の精製酵素の分子特性解析を行う。また有効性の新規評価システムとして、患者由来 iPS 細胞株からの神経細胞分化誘導系を構築するとともに、前臨床試験のための新規疾患モデルマウス系統を作製した。

B. 研究方法

1) CTSA 及びリソソーム酵素 X を恒常発現する一体型 *GAL4* 酵素遺伝子導入カイコの大量飼育・中部絹糸腺摘出及び組換えヒト酵素の精製（独）農業生物資源研究所・小林功氏が作製した、中部絹糸腺で特異的に働くセリシン 1 プロモーター下流に転写活性化因子 *GAL4* 遺伝子と、*GAL4* 認識配列 (UAS) の下流に CTSA または酵素 X 遺伝子を組み込んだ一体型 *GAL4* 酵素遺伝子の導入カイコ (CTSA 及び酵素 X-Tg カイコ) を、群馬県蚕糸技術センター・カルタヘナ法対応施設にて、大量飼育 (5 千~1 万頭) し、中部絹糸腺を摘出し凍結保存した。中部絹糸腺 (CTSA-Tg 1,000 頭, 酵素 X-Tg 100 頭分) の抽出液を作製し、中部絹糸腺抽出液中の不溶性沈殿を遠心分離により除去後、その上清から活性型 CTSA 及び酵素 X を、ConA 及び陽イオン交換 (SP) カラムを用いる 2 段階のクロマトグラフィーにより精製した。

2) カテプシン A 及び他のリソソーム酵素活性の測定

CTSA・及び酵素 X-Tg カイコの中部絹糸腺抽出液は 50mM MES buffer/0.15M NaCl (pH6.0) を用いて調製した。CTSA がもつ CathA 活性は人工基質 Z-Phe-Leu を用い pH5.6 で測定した。またリソソーム酵素である NEU1、GLB1 及び対照

酵素としての β -Hexosaminidase (Hex) 活性は各々の人工蛍光基質 4-メチルウンベリフェリル (4MU) 誘導体を用いて、各々pH4.5 で測定した。

3) ヒトリソソーム酵素タンパクの発現と翻訳後修飾の解析

中部絹糸腺で発現した CTSA 及び酵素 X タンパクの分子種は、抗ヒト成熟型 CTSA 32kDa 及び 20kDa サブユニットを認識するヤギ抗体または抗酵素 X ウサギ抗体を一次抗体として用いるイムノブロットングにより解析した。なお二次抗体としては、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヤギまたはウサギ IgG 抗体を、酵素タンパク検出には Perkin/Elmer 社の化学発光キットと画像解析装置 (LAS-4000 miniEPUV) を用いた。

各酵素への糖鎖付加修飾は、Tg カイコ中部絹糸腺抽出液及び SP カラム精製画分、対照としての酵素 X 遺伝子導入チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞由来上清に対するレクチンブロットングにより解析した。一次反応は、Biotin 標識した各レクチン Concanavalin A (ConA)、*Aleuria aurantia* lectin (AAL)、*Maackia amurensis* lectin (MAM)、*Sambucus sieboldiana* lectin (SSA) を用い、4°C で一晩行なった。二次反応には HRP 標識抗-biotin 抗体を用い、室温で1時間保温・洗浄後、上記の化学発光法と LAS-4000 miniEPUV を用いてバンドを検出した。

4) 精製成熟型 CTSA による *in vitro* での NEU1 活性化アッセイ

ヒト NEU1 遺伝子を HEK293FT 細胞株に過剰発現させた際に細胞内に形成される NEU1 結晶を単離し、その溶液にカイコ由来精製成熟型 CTSA を加え、一定時間後に 4MU 基質を用い、NEU1 活性を測定した。

5) GS 患者由来 iPS 細胞株の成熟神経細胞への分化誘導

センダイウイルスベクターを用いて 4 種の Yamanaka 因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* 及び *c-MYC*) を GS 患者由来培養皮膚線維芽細胞内に導入し、幹細胞マーカーである *NANOG* や内因性の *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* 及び *c-MYC* 及び、Alkaline phosphatase や SSEA4 を発現する GS 患者由来 iPS 細胞を浮遊培養して胚様体を形成させ、さらに単分散した細胞集団を神経系分化誘導因子存在下で接着培養を行い、成熟神経細胞への分化誘導を行った (京都大 iPS 細胞研・井上治久教授らの方法)。また神経系細胞マーカーである、Nestin, PSA-N-CAM, β -Tubulin-III, MAP2, Neurofilament-L, A2B5 または GFAP 等に対する抗体を用いる免疫蛍光染色により誘導された細

胞タイプを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究ではリソソーム酵素欠損症患者由来の培養皮膚線維芽細胞株を用いて患者由来 iPS 細胞株を樹立する。可能な症例については担当医療機関において患者または家族に対してインフォームドコンセントを行い、皮膚由来細胞および派生する iPS 細胞の研究目的・使用に関して同意書を得ている。また既に徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部及び病院小倫理委員会の承認を得ている。

また本研究ではクローン化された遺伝子をリソソーム酵素欠損症患者由来の培養皮膚線維芽細胞株に導入する実験を行うが、徳島大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得ている。さらに動物実験動については、徳島大学動物実験委員会の承認を得て、徳島大学動物実験規則に従って行った。

C. 研究結果

1) CTSA 欠損症 (GS) 患者 iPS 細胞株からの大脳皮質神経系細胞の分化誘導

これまでに Yamanaka 因子を含むセンダイウイルスベクターを用いて樹立した CTSA 欠損症 (GS) 患者由来 iPS 細胞株に対し、大脳皮質神経系細胞の分化誘導 (56 日間) を行ったところ、健常者 iPS 細胞株を同様に、神経幹及び神経前駆細胞マーカーの Nestin 及び PSA-N-CAM が陽性、また成熟神経細胞マーカーの β -Tubulin-III, MAP2 及び Neurofilament-L が陽性の神経細胞に富む神経系細胞を誘導できた (図1)。また一部の細胞はグリア前駆細胞及びアストロサイトマーカーである A2B5 及び GFAP が陽性であった。

また GS 由来神経系細胞の一部は、末端 α 2,3 シアル酸認識モノクローナル抗体との反応性を示し、末端シアル酸含有糖鎖の蓄積が示唆された (データ示さず)。

2) スプライシング異常誘導型 *Ctsa* 変異導入マウスの作製 (外部委託) と病態解析

日本人 GS 症例で高頻度に認められる単塩基置換に基づくエキソン7のスキッピングを惹起するスプライシング異常誘導型のコンディショナルノックインマウスを外部委託し、今年度は全身 Cre 発現マウスとの交配に基き、変異を両方の対立遺伝子にもつ null ホモ接合体を獲得した。

null ホモマウスは生直後より低成長を示し、5 週齢頃には顔貌の異常 (額が突出し、丸みを帯びる) が観察された (図2)。また 13 週令以降では visual cliff を認識して、特徴的なミオローヌス (しゃっくりに似た痙攣) や情動行動の低下を示すと

もに、四肢末端における浮腫、タンパク尿、椎体彎曲など、若年・成人型 GS 患者と極めて類似した臨床症状を示すことが明らかになった (図3)。

4) 精製成熟型 CTSA による *in vitro* での NEU1 活性化

ヒト NEU1 遺伝子を HEK293FT 細胞株に過剰発現させた際に細胞内に形成される NEU1 結晶を単離し、その溶液にカイコ由来精製成熟型 CTSA を混合したところ、NEU1 活性を有意に増大させることに成功した (図4)。カイコ由来ヒト CTSA が NEU1 に対する保護機能 (賦活機能) を有していることを初めて示した。

D. 考察

現在リソソーム病の酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy, ERT) で臨床応用されている、哺乳類培養細胞 (CHO 株など) で製造される酵素製剤には、1) 高コスト (患者 1 人当たり年間約 3,000 万円程度の医療費が必要)、2) 製造時に細胞株への増殖抑制性ウイルス感染やヒトへの感染性病原体の汚染、3) 静脈内投与の中樞神経症状に対する無効性、4) 酵素欠損症患者への酵素製剤の反復継続投与に基づく免疫原性や中和抗体誘導等の問題がある。そこで組換えヒトリソソーム酵素を、より低コストで安全に安定供給するための新規生産基材が求められている。

2000 年に (独) 農業生物資源研究所・田村俊樹博士らにより開発された *piggyBac* ベクターによる組換えカイコの作製技術が確立し、現在までにカイコの絹糸腺 (後部では絹糸成分で線維性タンパクのフィブロイン、中部では可溶性のセリシンを高効率で生産) で特異的に目的遺伝子を恒常発現させ、カイコ一頭当たり 1 mg 以上のタンパクの生産が可能になり、また繭や絹糸腺抽出液からの精製も容易であることが示されている。一方、明治時代以来、我が国の養蚕業で確立されたカイコの大量飼育技術を基盤に、群馬県ではカルタヘナ法に対応した組換えカイコの大量飼育施設が発足し、また複数の試薬製造業者が自社で作製した組換えカイコを用いて抗体などの医療用タンパクを製造し、疾患の診断薬や検査用キットを実用化・販売している。哺乳類細胞株の大量培養に比べ、組換えカイコの飼育には大規模な設備は必要とせず、多品目に対し容易に生産規模を選択できる点、またヒトへの感染性病原体等も報告されておらず、安全性も高い。さらに近年、農業生物資源研究所・瀬筒秀樹博士らは、精巣や卵巣の凍結保存に基づくカイコ系統のバンク化技術を開発しつつあり、今後、組換えカイコを、日本発の動物やヒトバイオ医薬品の新規生産基材として実用化

できるプラットフォームが構築されつつある。

昨年度までに、筆者らは、農業生物資源研究所・瀬筒・小林博士らと共同で、一頭当たり 0.1mg の CTSA を中部絹糸腺で発現する Tg カイコを作製し、1,000 頭の中部絹糸腺から活性型 CTSA (約 14mg) の精製法を確立した。またカイコ由来成分や精製用 ConA カラム由来成分も検出限界以下であり、製造過程で宿主由来成分 (HCP) の混入やアレルギーやアナフィラキシーなどの副作用の原因となる不純物混入の可能性は低いと考えられた。

また今年度までに、一頭当たり 1.3 mg の酵素 X を生産する Tg カイコの作製に成功し、2 段階クロマトグラフィーにより、100 頭分の中部絹糸腺から 26% 程度の回収率で 13mg の活性型酵素 X を精製する方法を確立した。従って患者 1 人の治療に必要な年間 1 g の精製酵素は、約 5 千頭の Tg カイコから賄えることになり、哺乳類培養細胞株を用いる場合に比べ、低コスト (1/5~1/10 を想定) で原薬精製が可能になると見込める。また群馬県では最大 60 万頭の組換えカイコ飼育施設が整備されつつあり、リソソーム病のような個々の希少疾患を対象としたオーダーメイド治療薬の原薬を低コストで安定供給できる新規生産基材として組換えカイコの有用性・産業利用性が期待される。

カイコを基材として絹糸腺で組換え糖タンパクを生産する場合の翻訳後修飾について、これまでに CTSA-Tg カイコ中部絹糸腺から精製した成熟型 CTSA は、哺乳類細胞内と同様に前駆体タンパクのプロセッシングが起こり活性化されていること、また成熟型二量体の X 線結晶構造を解明し、予想される成熟型ヒト CTSA タンパクの一次構造が保持されていることを明らかにしている。また糖鎖修飾に関しては、成熟型 CTSA を構成する二つのサブユニット (30-kDa と 20-kDa) に各々一箇所ずつ存在する N 型糖鎖付加部位に N 型糖鎖が付加され、哺乳類細胞と共通した、高マンノース型またはハイブリッド型糖鎖の部分構造を有していた。またコアフコース (昆虫では Fuc α 1,3 GlcNAc、ヒトでは Fuc α 1,6 GlcNAc-タイプ) 残基は、中部絹糸腺で発現した CTSA にはいずれも付加されておらず、異種糖鎖抗原性は低いと期待される。また今年度精製したカイコ絹糸腺由来酵素 X に付加される N 型糖鎖構造に関しても、ConA、及び AAL を用いたレクチンプロットング解析から、フコース残基を含まない高マンノース型糖鎖が付加されていることが示唆された。

一方、リソソーム病の ERT では、組換え酵素に付加される糖鎖構造と標的細胞表面における糖鎖レセプターとの結合が標的細胞への組換えリソソーム酵素の取り込みを規定する要因である。 β -

グルコセレブロシダーゼ (GBA) 欠損症であるゴーシェ病に対し、CHO 細胞由来の組換え酵素製剤 (セレザイム, Genzyme 社) が臨床応用されているが、その標的細胞は、末梢臓器に存在するマクロファージであり、その細胞表面には糖鎖非還元末端のマンノース残基を認識するマンノースレセプター (MR) がデリバリー標的である。

CTSA-及び酵素 X-Tg カイコの中中部絹糸腺から精製酵素は、付加糖鎖の非還元末端に露出したマンノース残基を含む。従って単球系細胞や樹状細胞などの細胞表面に発現している MR と結合後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、リソソームまで輸送され、治療効果を示すことが期待される。

しかしファブリー病 (α -ガラクトシダーゼ欠損症) を含む、他のリソソーム病の ERT では、多くの組織表面で発現しているカチオン非依存性マンノース-6-リン酸レセプター (CI-M6PR) がデリバリー標的として利用されている。また GS 患者で障害が現れる中枢神経系を構成する神経細胞表面にも CI-M6PR が発現していることが知られている。一方、カイコ絹糸腺で生産されるヒト CTSA には末端 M6P 含有糖鎖は付加されず、そのままでは補充効果を期待できない。現在、カイコ中部絹糸腺由来 CTSA を GS 治療用原薬として利用するために、人工的に M6P 含有糖鎖を付加する新技術を開発中である。

今年度は、酸性カルボキシペプチダーゼ活性を示すカイコ由来精製成熟型 CTSA が、*in vitro* で不活性型組換えヒト NEU1 と会合し、活性化させる保護機能を有していることを新たに明らかにし、治療効果の基盤となる分子特性を保持していることを示した。

またカイコ由来精製 CTSA の GS の神経系細胞に対する有効性や安全性の評価系として、GS 患者由来 iPS 細胞から大脳皮質ニューロンを分化誘導する方法により、神経幹細胞、神経前駆細胞及び成熟神経細胞への分化誘導条件を確立し、一部の神経細胞内に末端シアル酸含有糖鎖の蓄積を確認し、GS 患者の神経系病態モデルとなることが示唆された。

さらに日本人 CTSA 欠損 (GS) 症例で高頻度に認められる単塩基置換に基づくエキソン7のスキッピングを惹起するスプライシング異常誘導型のコンディショナルノックインマウスを作製した。全身 Cre 発現マウスとの交配により得られた null ホモマウスは、生直後より低成長を示し、5 週齢頃には顔貌の異常、13 週令以降ではミオローヌスや情動行動異常、四肢末端における浮腫、タンパク尿、椎体彎曲など、若年・成人型 GS 患者と極

めて類似した臨床症状を示すことが明らかになり、前臨床試験用の GS モデルマウスとしての有用性が示された。

今後は、カイコ絹糸腺由来精製 CTSA を GS モデルマウスの尾静脈投与し、末梢臓器での酵素活性回復等を指標に有効性を評価する。新規に開発している、末端 M6P 含有糖鎖を付加する技術のカイコ絹糸腺由来 CTSA に適用し、GS 患者 iPS 細胞由来神経細胞や GS モデルマウスへの投与効果を検討していく予定である。

E. 結論

リソソーム病の新規酵素補充療法用の、組換えヒトリソソーム酵素原薬の新規生産基材として組換えカイコの開発を進めた。今年度は、GAL4/酵素遺伝子一体型 Tg カイコの中中部絹糸腺から精製した CTSA 及び酵素 X の低糖鎖抗原性を示唆するとともに、活性型 CTSA が *in vitro* で NEU1 を活性化することを明らかにした。また CTSA 欠損症患者 iPS 細胞株からの神経細胞の分化誘導系を構築するとともに、若年・成人型 GS 症例と極めて類似した症状を示す CTSA・NEU1 同時欠損モデルマウスの作製に成功し、今後カイコ由来 CTSA の有効性評価に応用可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gallat FX, Matsugaki N, Coussens NP, Yagi KJ, Boudes M, Higashi T, Tsuji D, Tatano Y, Suzuki M, Mizohata E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Park J, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nango E, Itoh K, Coulbaly F, Tobe S, Ramaswamy S, Stay B, Iwata S, Chavas LM. *In vivo* crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 17, 369-370 (2014)

2. 学会発表

1. Kohji Itoh, Daisuke Tsuji, Mariko Ikuo, Keisuke Kitakaze, So-ichirou Nishioka, Izumi Imataki, Saeka Yamaguchi, Yasunori Chiba, Hitoshi Sakuraba, Isao Kobayashi, Hideki Sezutsu and Hiroaki Machii : Establishment of patient-derived iPS cells with neurodegenerative lysosomal storage diseases and application for evaluating lysosomal enzyme replacement effects on differentiated neural cells. The IUBMB 10th International Symposium on Cell Surface Macromolecules, India, Kolkata, Jan.22. 2014.

2. 西岡 宗一郎, 小林 功, 辻 大輔, 原園 景, 久保 勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒 秀樹, 町井 博明, 石井 明子, 川崎 ナナ, 伊藤 孝司: トランスジェニックカイコ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性解析と化学酵素法に基づく人工糖鎖修飾 第55回日本生化学会 中国・四国支部例会 2014年6月6日 愛媛県 (愛媛大学城北キャンパス)

3. 西岡 宗一郎, 小林 功, 辻 大輔, 原園 景, 久保 勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒 秀樹, 町井 博明, 石井 明子, 川崎 ナナ, 伊藤 孝司: 組み換えカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシンAの分子特性とエンドグリコシダーゼによる糖鎖改変. 第33回日本糖質学会年会 2014年8月10日 愛知県 (名古屋大学豊田講堂)

4. 西岡 宗一郎, 小林 功, 辻 大輔, 原園 景, 久保 勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻 大輔, 瀬筒 秀樹, 町井 博明, 石井 明子, 川崎 ナナ, 伊藤 孝司: トランスジェニックカイコ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性解析とグリコシターゼによる糖鎖修飾 2014年10月18日 京都府 (国立京都国際会館)

5. 西岡 宗一郎, 小林 功, 辻 大輔, 原園 景, 久保 勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻 大

輔, 瀬筒 秀樹, 町井 博明, 石井 明子, 川崎 ナナ, 伊藤 孝司: 組換えカイコ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性とグリコシターゼによる *in vitro* 糖鎖修飾. 第5回グリコバイオロジクス研究会 2014年11月1日 兵庫県 (臨床研究情報センター)

6. 伊藤 孝司, 西岡 宗一郎, 小林 功, 久保 勇樹, 原園 景, 石井 明子, 川崎 ナナ, 瀬筒 秀樹: 組換えカイコを用いるネオグリコバイオロジクスの創製. 日本薬学会第135年会 2015年3月26日 兵庫県神戸市 (神戸学院大学)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

成熟神経細胞に富む細胞集団の獲得

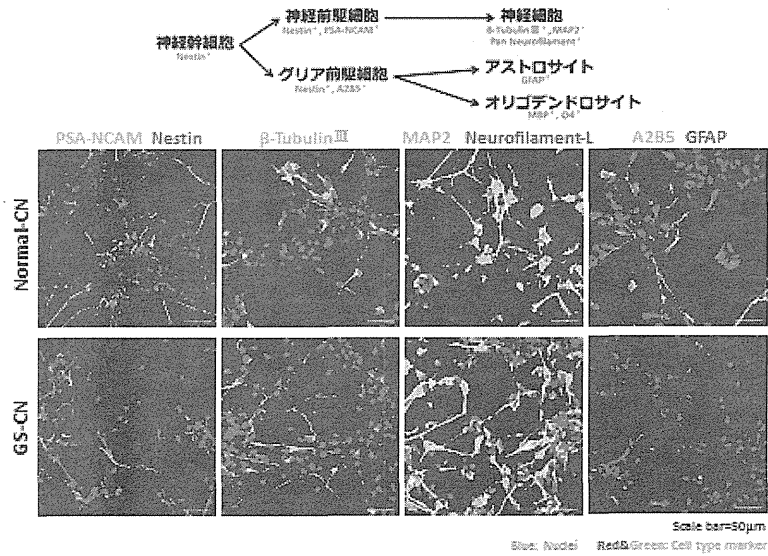


図1 CTSA 欠損症患者 iPS 細胞からの大脳皮質神経系細胞の分化誘導

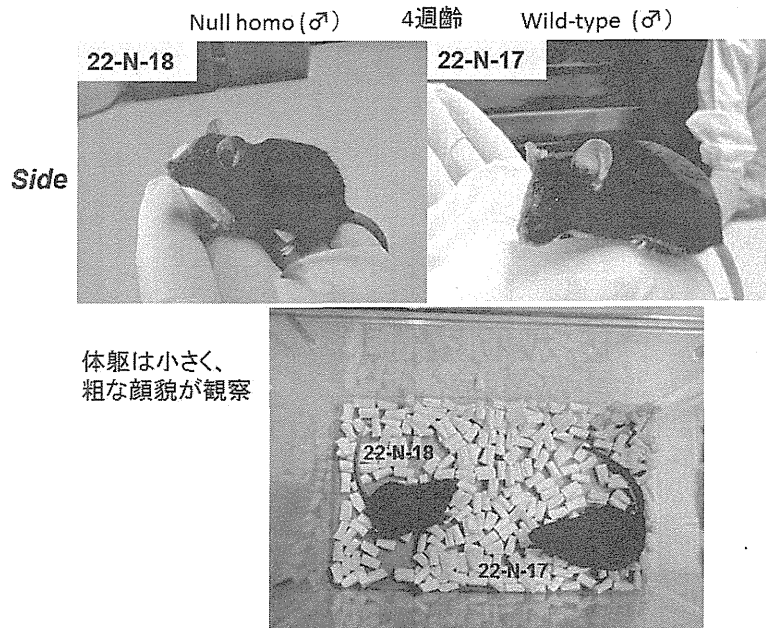


図2 スプライシング異常誘導型 null homo マウスの GS 類似表現型

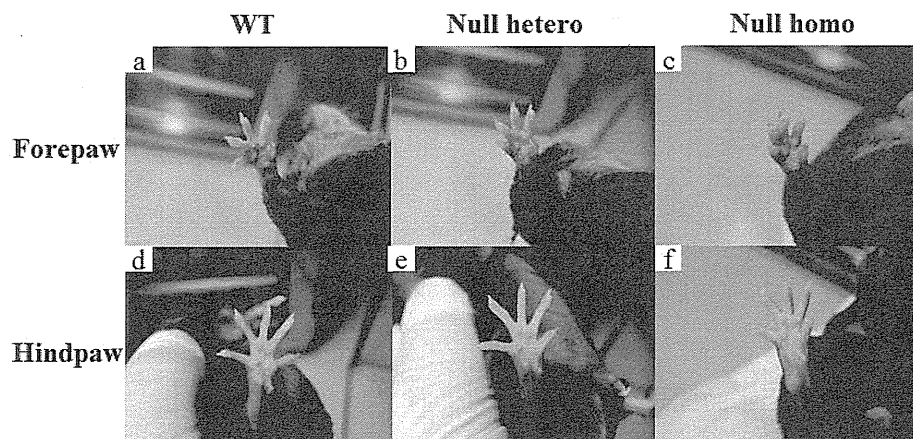


図3 GS null homo マウスにおける四肢末端の浮腫の発症(腎不全に基づく)

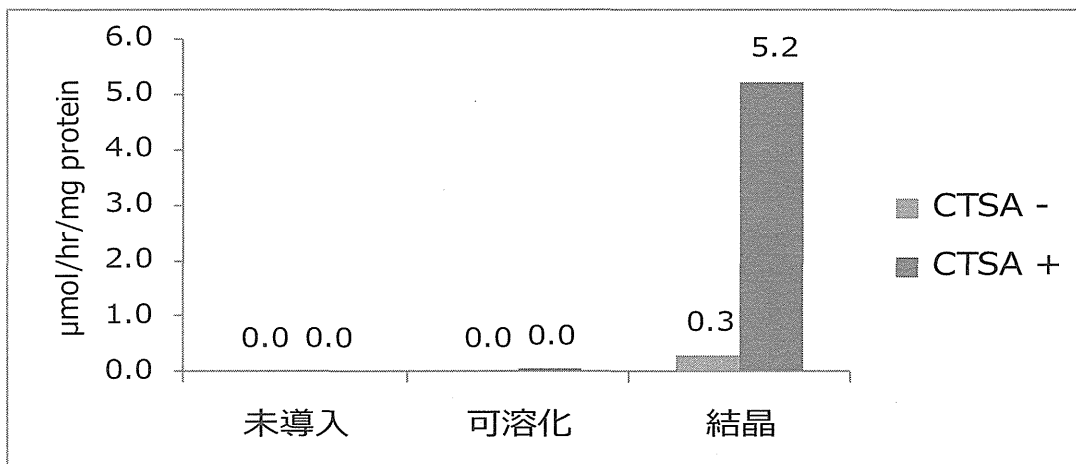


図4 CTSA T_g カイコ絹糸腺由来精製成熟型 CTSA による *in vitro* でのヒト NEU1 の活性化

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書
医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

分担課題名 トランスジェニックカイコを用いたバイオ医薬品の生産

研究分担者 武田茂樹 所属 群馬大学大学院理工学研究府

研究要旨 トランスジェニックカイコを用いてバイオ医薬品に利用できる有用タンパク質を大量生産する発現・精製系を確立することを目指した。将来的なバイオ医薬品の供給源としてのトランスジェニックカイコの優位性を評価した。カイコで発現させるタンパク質として、食欲抑制効果が報告されているネスファチンとガンワクチンとして期待できるガン抗原ガン抗原である MAGE-A4, p53, WT-1 を用いた。

A. 研究目的

カイコは生糸を生産する昆虫であり、1頭のカイコが2gほどの繭を作る。有用タンパク質の生産方法としては、大腸菌や酵母などの微生物を用いる方法だけでなく、動物細胞を培養する方法も近年では産業的に用いられることが多くなってきているが、これらの方法と比較しても生産量としてはカイコが作る生糸の量はタンパク質の発現系として注目に値する。本研究では、近年トランスジェニックカイコの作出が可能になり、トランスジェニックカイコを用いてバイオ医薬品に利用できる有用タンパク質を大量生産することが原理的に可能になったことを踏まえて、トランスジェニックカイコによる有用タンパク質の生産と精製を行う。その結果から、将来的なバイオ医薬品の供給源として、トランスジェニックカイコの優位性を評価する。

B. 研究方法

トランスジェニックカイコを用いて発現させるバイオ医薬品のモデルとなるタンパク質として、本研究では食欲抑制効果が報告されているネスファチンとガン抗原である MAGE-A4, p53, WT-1 を用いた。

ネスファチンは2006年に群馬大学医学部の森昌朋教授らのグループが発見した脳視床下部などで働く生理活性タンパク質であり、生理作用としては主に食欲抑制効果が知られている。その効果の強さからメタボリック症候群など肥満を伴う病気の治療に役立つとされている。特に、動物実験では食欲抑制ホルモンとして知られるレプチンが働かない肥満のラットでも食欲を抑える効果があることが判明していることから、ヒトにおいてもレプチン抵抗性を持つ患者に対して有用である食欲抑制ホルモンとして可能性が期待されている。

しかしながら、これまで微生物や動物培養細胞を用いた大量発現系の構築では高い活性をもつ組み換え体ネスファチンは得られておらず、活性測定の標準物質としては化学合成されたものが使われてきた。ただし、構成アミノ酸残基が多いことから、活性を示すネスファチンを化学合成することは容易ではない。そこで本研究ではトランスジェニックカイコを用いて、高活性のネスファチンを発現・精製するための検討を行うこととした。昨年度はトランスジェニックカイコの絹糸腺から活性型ネスファチンとその前駆体の NUCB2 を精製した。しかし、実験室で飼育する小型の実験用カイコでも繭であれば0.5gほどの繭を作るのに対して、絹糸腺は0.18g程度にすぎない。そこで、繭からネスファチンを精製できればより多くの試料が調製可能である可能性があり、今年度は組換え体ネスファチンの精製を繭を用いて試みた。

ガンの免疫療法は、手術、抗ガン剤治療、放射線治療といった、ガンの三大療法と併用することで、副作用や体力低下などのデメリットを補いつつ相乗効果が期待できると考えられ、近年研究が盛んになっている。ガン抗原である MAGE-A4, p53, WT-1 などはガンワクチンの候補としてその部分ペプチドが研究されているが、MHC 拘束性を考えた場合、タンパク質全体の方がより多くの患者を治療対象とできる。ガンワクチンの供給のためにはガン抗原の大量調製が必要になるため、本研究ではトランスジェニックカイコを用いて抗原として用いることのできる MAGE-A4, p53, WT-1 を発現・精製するための検討を行うこととした。抗原として用いる場合には、タンパク質としての活性や立体構造が保たれている必要がないため、抽出や精製に通常のタンパク質精製よりは幅広い方法を用いることができる。昨年度はトランスジェニックカイコを用いて抗原として用いる

ことのできる MAGE-A4 を絹糸腺から精製し、ドナーの末梢血から調製した樹状細胞と T 細胞を用いて免疫系活性化能を検証した。今年度はネスファチンと同様にトランスジェニックカイコの繭から MAGE-A4 を精製することを検討した。さらに、免疫系活性化能の検証については、class I MHC の異なる 2 人のドナーから樹状細胞と T 細胞を調整し、さらに CD4⁺ の T 細胞と CD8⁺ の T 細胞を分離してから用いることにより、MAGE-A4 がどのような免疫系を活性化するかを検証した。さらに、多様な抗原を準備するために MAGE-A4 以外のガン抗原として p53 と WT-1 を発現するトランスジェニックカイコを作出し、飼育を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる組換え DNA 実験は群馬大学遺伝子組み換え実験安全管理委員会の認可、監視の下に行われる。委員会より倫理面・安全の確保面において講じるべき措置が指示されている。同様に本申請で行われた動物実験は群馬大学動物実験安全管理委員会の認可、監視の下に行われる。委員会より倫理面・安全の確保面において講じるべき措置が指示されている。

C. 研究結果

繭からのネスファチンの抽出を試みるために、昨年度作出した C 端にヒスチジンタグを融合した活性型ネスファチンを中部絹糸腺で発現するトランスジェニックカイコを飼育した。このカイコが作った繭をもちいて活性型ネスファチンの抽出を試みたが、通常の 20 mM リン酸緩衝液や 0.1% Triton-X 溶液などを用いてもほとんどネスファチンは抽出されなかった。ただし、80°C で 20 分温水抽出することで少量のネスファチンを得ることができ、9 M LiBr で繭を可溶化することでより抽出効率を高めることができた。この 9 M LiBr 条件下の抽出溶液からニッケルアフィニティーカラムをもちいて精製することにより、約 50 µg/頭の活性型ネスファチンを調製することができた。同時に飼育したトランスジェニックカイコの絹糸腺からは昨年度と同じ凍結融解を繰り返す方法で約 80 µg/頭の活性型ネスファチンを精製できたことから、繭からのネスファチンの精製には成功したものの、抽出、精製の過程にはより効率化が必要であった。現在、この試料を用いてネスファチンの食欲抑制効果を検証する動物実験を準備中である。

ガン抗原である MAGE-A4 についても、同様に昨年作出した C 端にヒスチジンタグを融合した MAGE-A4 を中部絹糸腺で発現するトランスジェニックカイコを用いて、繭からの MAGE-A4 の精

製を試みた。しかし、このトランスジェニックカイコはほとんど繭を作ることができず、5 令幼虫から蛹化する過程で死んでしまった (図 2)。繭を取ることができたのは、飼育した発現カイコのうちの約 2 割程度しかなかった (図 3)。このことから、発現させた MAGE-A4 は絹糸腺内から吐き出されて生糸に紡糸される過程で糸状態にならず、絹糸腺の中に吐き出されない液状絹が蓄積されて幼虫の体内を圧迫してしまっただと考えられる。少量ながら回収できた繭を用いて、80°C で 20 分温水抽出することで組換え体 MAGE-A4 を得ることができた。ただし、免疫系活性化能を検証するためには不十分な量であったため、検証実験には昨年度と同じ凍結融解を繰り返す方法で抽出し、精製した組換え体 MAGE-A4 を用いた。

免疫系活性化能の検証では、昨年度と同様に樹状細胞の培養液に抗原である組換え体 MAGE-A4 を添加し、その刺激に応じて増殖してくる T 細胞を選択的に培養することを繰り返し、その後 T 細胞が抗原刺激依存的に分泌するインターフェロン-γ を ELISA で定量した。昨年と異なり、T 細胞は CD4 結合抗体磁気ビーズを用いて CD4⁺ の T 細胞と CD8⁺ の T 細胞を分離してから用いて行った。今年度用いた末梢血のドナーは、一人は class I MHC が A2 であり、もう一人は A24 であった。また、Class II MHC は二人とも DP5 であった。検証の結果、CD8⁺ の樹状細胞をもちいて class I MHC に添加した MAGE-A4 が提示され T 細胞からのインターフェロン-γ 分泌が促進されたかどうかについては、MHC のサブタイプが A2 であっても (図 4) A24 であっても (図 5) MAGE-A4 の添加の効果は優位には確認できなかった。しかしながら、CD4⁺ の T 細胞をもちいて Class II MHC への MAGE-A4 の提示および T 細胞へのインターフェロン-γ 分泌促進の効果を見た場合は MAGE-A4 の添加の効果が確認できることがあった (図 6)。したがって、少なくとも Class II MHC を介した免疫系活性化能については、組み換え体 MAGE-A4 が発揮する可能性が示唆された。しかしながら、培養条件の差や末梢血からの樹状細胞や T 細胞の調製や培養のわずかな差によって MAGE-A4 の添加の効果が確認されないこともあり、さらに検討を重ねる必要がある。

他のガン抗原である p53 と WT-1 についても、昨年と同様に農業生物資源研究所と共同して C 端にヒスチジンタグを融合した p53 と WT-1 を中部絹糸腺で発現するトランスジェニックカイコを作出した。中部絹糸腺での発現をウエスタンブロットングで確認後、群馬大学で飼育を行った。これらのトランスジェニックカイコを用いて p53

(図7)とWT-1(図8)を発現させた後に繭をつくらせた結果、特に蛹化の際に死亡する個体が多くなるというMAGE-A4の発現の際のような問題は現在までに確認されておらず、今後、中部絹糸腺および繭からの抗原の精製に使用できると考えられた。

D. 考察

トランスジェニックカイコのタンパク質生産能力を最も生かす方法として、発現させた組換え体タンパク質を繭から抽出し精製することを試みた。活性型ネスファチンは9 M LiBrで繭を可溶化することで抽出、精製を行うことができたが、絹糸腺からの精製量よりも少なくなってしまった。ただし、これまでに組換え体抗体断片(Fab)や緑色蛍光タンパク質(GFP)は繭からの効率的な抽出、精製に成功した例が報告されており、溶解性の高いタンパク質であれば繭からの精製が十分可能だと考えられる。また、溶解性がやや低いタンパク質であっても、タンパク質の安定化剤であるアルギニンなどを添加することで抽出効率の効率化が期待でき、今後検討していく予定である。ガン抗原であるMAGE-A4では、MAGE-A4を発現するカイコのほとんどが繭を形成する前に死亡してしまい、繭からの抽出、精製にMAGE-A4は不向きであった。

精製されたMAGE-A4がclass I MHC A2およびA24を介した免疫系活性化能を発揮できなかった原因は、MAGE-A4の抗原性が低いというよりは、抗原特異的なT細胞を効率的に培養する条件などの実験条件の設定が不十分であった可能性が高い。実際、図4および図5にあるようにT細胞単独の場合よりも樹状細胞を加えた場合のほうがインターフェロン γ 分泌は多くなっており、抗原非特異的な免疫系活性化能は見られている。したがって、非抗原特異的なT細胞の増殖が起きていることが示唆され、この問題の解決あるいは抗原特異的なT細胞のクローニングなどによって、MAGE-A4の免疫系活性化能を最検討する必要がある。同様にClass II MHC DP5を介した免疫系活性化能についても、必ずしもインターフェロン γ 分泌促進の効果が有意でないこともあったため条件検討がまだ必要である。

p53やWT-1を発現するトランスジェニックカイコを得ることができたことから、将来的には抗原の違いによる免疫系活性化能の違いや複数の抗原を用いた際の効果向上の有無などについて検討することができるようになり、より効果の高いガンワクチンの生産とそのためトランスジェニックカイコの利用について検討することができる

と期待される。

E. 結論

活性型ネスファチンをトランスジェニックカイコの繭から精製し、食欲抑制効果の確認のための動物実験用試料を調製することができた。ガン抗原であるMAGE-A4を組換え体として精製し、免疫系活性化能を検証したところ、class II MHCを介したガンワクチンとして開発できる可能性が示唆された。さらに、他のガン抗原としてp53とWT-1を発現するトランスジェニックカイコを作出し、飼育を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
「トランスジェニックカイコで発現させたガン抗原の解析」工学フォーラム2014
平成26年10月26日
「トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析」分子生物学会
平成26年11月27日

「Expression of the recombinant tumor antigen in transgenic silkworm」1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineer
平成26年12月5日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし