

植物を使った医療用タンパク質生産の挑戦

藤山 和仁

2012年5月1日、植物を宿主として生産した組換えグルコセレブロシダーゼが、I型ゴーシェ病の治療剤として米国Food and Drug Administration (FDA) の認可を受けた¹⁾。植物による医療用タンパク質生産にとって、画期的なことである。1986年ヒト成長ホルモンがタバコなどで生産を試みられてから²⁾、26年要した。

2005年本誌で特集「植物による外来タンパク質生産」を企画し、植物をバイオリクターとした組換えタンパク質の生産技術の動向について概説した³⁾。その後この7年間で、国内外で実用化に向かって大きく進み、最近の進展は著しい。

本稿では、植物を使った医療用タンパク質生産に関する現状と問題点などを紹介する。

植物生産医療タンパク質の現状

1986年未分化のタバコ組織における組換えヒト成長ホルモンの生産が試みられた²⁾。しかし、転写産物は検出できたものの、組換えタンパク質は確認できなかった。その後、1989年タバコ植物体の葉で組換え抗体の生産が成功した⁴⁾。よって、この事例が、医療タンパク質の植物による生産第一号である。以降、さまざまな医療関連の外来タンパク質が植物で生産されてきた。植物による医療用タンパク質のターゲットとして、ワクチン、抗体、酵素などが挙げられる。

植物生産医療タンパク質の現状での開発段階と臨床試験について、Yusibovら⁵⁾やObembeら⁶⁾の総説を参照されたい。

また、植物における抗体生産についてはMuynckの総説⁷⁾があり、生産量、H鎖・L鎖遺伝子の配置を含む発現系、プロテアーゼ分解の影響などが詳細に述べられている。虫歯菌*Streptococcus mutans*に対する分泌性抗体IgAは、世界で最初に臨床的に試験された^{5,8)}。第II相臨床試験で安全性と効能が示され、EUにライセンスしている。キューバのバイオテクノロジー社CIGBは、当局の規制の下、タバコで抗B型肝炎ウイルス抗原(HBsAg)に対するsingle chain Fv (scFv)を生産し、組換えB型肝炎ワクチンの精製プロセスに運用している⁵⁾。

2002年には、ProdiGene社が試薬メーカーのSigma社と提携し、トウモロコシで生産した組換えウシ・トリプシンをTrypZeanとして販売した。その後、動物由来成分のウシ・アプロチニン(タバコ)、ヒト・ラクトフェリン(イネ)、ヒト・リゾチーム(イネ)などが続き、

表1. 植物で生産される市販組換えタンパク質

生産物	由来	植物宿主
トリプシン	ウシ	トウモロコシ
アビジン	卵白	トウモロコシ
ラクトフェリン	ヒト	イネ
リゾチーム	ヒト	イネ
アプロチニン	ウシ	タバコ
コラーゲン*1	ヒト	タバコ
骨形成タンパク質7*2	ヒト	タバコ
組織因子プロテイナーゼ インヒビターII*3	ヒト	タバコ
活性型アクチビン	ヒト	タバコ

*1 Bornstein and Traub Type I

*2 Bone Morphogenetic Protein 7

*3 Tissue Factor Proteinase Inhibitor-II (TFPI-2)

現在表1のような組換えタンパク質が試薬などとして入手できる。

嚢胞性線維症(cystic fibrosis)治療用のリパーゼも、治療薬として認可を受けておらず、研究用試薬として市販されているようであるが、筆者が調べたところでは見いだせなかった⁵⁾。フェーズII臨床試験暫定結果はよかったようである。

そして、ニンジン培養細胞で生産した組換えグルコセレブロシダーゼである。

Dow AgroSciences社は、タバコ培養細胞を用いてニワトリニューカッスル病ワクチンを開発し、2006年US Department of Agriculture's Center for Veterinary Biologicsより動物ワクチンとして承認を得た⁵⁾。植物由来のワクチンとして、第一号である。しかし、Dow社としては、実用化する予定がないようである。

植物生産ヒトワクチン

植物生産ワクチンを用いたヒト(ボランティア)に対する試験は、1997年に実施されている³⁾。ヒトワクチンに関する進展について述べる。

粘膜ワクチン・経口投与ワクチン 組換えB型肝炎ウイルスワクチンを含む生のジャガイモ(100g, 約850 µg HBsAgを含む)を、過去にワクチン接種経験のあるボランティアが3度摂取し、16人中10人の血清中

の抗体価が上昇した^{5,9)}。B型肝炎ウイルス（レタス）、狂犬病ウイルス（ホウレンソウ）、ノーウォークウイルス（ジャガイモ）、エンテロトキシン（ジャガイモ）、エンテロトキシン（トウモロコシ）の場合においても、摂取したボランティアの血清中に抗体生産が確認された⁵⁾。

注射可能ワクチン・抗体・治療タンパク質 Large Scale Biology (LSB)社は、タバコモザイクウイルスベクターをベースにした発現ベクターを開発し、非ホジキンリンパ腫治療用にscFvサブユニットワクチンを *Nicotiana benthamiana* で生産した。ボランティアに対してフェーズIの臨床試験を実施し、安全性と免疫原性を示した^{5,7,8)}。Medicago社（カナダ）は、H5N1インフルエンザHAタンパク質を *N. benthamiana* でウイルス様粒子（virus-like particle, VLP）として発現させることに成功した。ボランティアによるフェーズI試験では、抗体産生を誘導し、その抗体は他のH5N1トリインフルエンザと交差性を示した⁵⁾。2010年カナダ政府より認可を受けた200名超のボランティアに対するフェーズII試験結果は、副作用の大きな問題もなく、安全かつ良好な結果を示した⁹⁾。実用化に向けて、生産施設を建築中である（後述）。

植物生産に関する規制

植物生産に関するGMPガイドライン まず、植物による組換えタンパク質生産に関する要件については、当局であるFDA/USDAやEuropean Medicines Agency (EMA, 欧州医薬品庁)の指針に従う。基本的に指針は、既に認可されている宿主生産系(CHO細胞, 大腸菌など)を元にされている。しかし、宿主が植物の場合、マスターセルバンクの概念の適用の可否, それに代わるマスターシードバンクやワーキングシードバンクのシステム導入など、その特異性・特殊性を考慮しなければならない。詳しくは、山口¹⁰⁾、松村の解説¹¹⁾の解説がある。

当局に認可されたProtalix社のニンジン培養細胞生産組換えグルコセレブロシダーゼに関する臨床試験結果の一部について発表されており、どのような試験がなされたのか参考にされたい^{1,12,13)}。

植物生産GMP施設 Langer社によると¹⁴⁾、年間59億ドル (US\$ 5.9 billion) の新バイオディフェンスプラン戦略があり、感染症に対応して、新規で迅速な生産が可能なバイオプロセスプラットフォーム技術に資金を提供している。ワクチン生産では、US Health and Human Services (HHS) National Institute of Health (NIH)、中でも特にNational Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) が、対象となる技術開発分野を広げている。しかし、代替宿主としての植物を用いた生産システムに対する認知は低い。一方で、資金援助を受けて、植物によるインフルエンザワクチン開発が進められてい

表2. 植物によるGMP-compliant組換えタンパク質生産施設

企業	所在地
Kentucky BioProcessing, LLC (KBP)	Owensboro, KY
Sigma-Aldrich Fine Chemicals (SAFC)	St. Louis, MI
Bayer Innovation GmbH, Medicago Inc.	Quebec City, Canada
Biolex Therapeutical	Pittsboro, NC
Protalix	Carmiel, Israel
Texas Plant-Expressed Vaccine Consortium*1	Bryan, TX*2
産総研北海道センター	札幌
Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology	Aachen, Germany
Fraunhofer USA	Newark, DE

*1 G-Con LLC, Texas A&M University

*2 Texas A & M University 大学構内

表3. モノクローナル抗体生産におけるコストと時間の比較

生産システム	フェーズI試験のためのcGMP供給	
	所要時間	コスト
動物細胞 (CHO, N50, PER.C6)	18ヶ月	5-6百万ドル
<i>Nicotiana</i> *1による一過性発現*2	6-12ヶ月	0.5-0.8百万ドル

*1 *Nicotiana benthamiana*

*2 magnICON (後述), Geneware システムによる発現の場合

る。植物大量生産系は、比較的低コストで、容易に建設でき、細胞培養システムより操作的に容易であるからである。最近の例では、Medicago社が、97,000-ft²の植物生産ワクチン製造施設 (Research Triangle, NC) を建設中で、一年間で1億2000万回接種可能なインフルエンザワクチンを生産でき、運転開始より18ヶ月で可能となり、細胞培養施設より10%のコスト削減となるとされている¹⁵⁾。比較として、Novartis社の例が示されている。Novartisは10億ドルを投資し、430,000-ft²のワクチン製造施設 (Holly Springs, NC) を建設し、1億5000万回接種可能なワクチンを4年掛けてフル稼働させる。

植物による組換えタンパク質生産で実稼働しているGMP-compliantあるいは同等の中規模から大規模施設が9箇所ある(表2)^{5,14-17)}。公表されている資料では、KBP社 (Kentucky BioProcessing, LLC) は1時間で3000 kgの植物を処理できる。また、SAFC社 (Sigma-Aldrich Fine Chemicals) は一週間当たり5000 kgの植物を処理し、精製組換えタンパク質を6.5 kgを生産できる⁵⁾。

また、組換えタンパク質の植物生産コストなどに関するWhaleyらの試算¹⁷⁾を表3に示す。

植物生産の技術的課題

解決すべき技術的問題として、大きく3点が考えられている^{5,6,16}。実生産を意識した生産性向上のための課題に関する“アップストリーム”での取組み、GMP規制に対応した生産物の精製に関する“ダウンストリーム”の問題、生産物（組換えタンパク質）の質的問題として懸念される“糖鎖”に焦点を絞った。

アップストリーム 他の宿主とは異なり、一般的に植物における組換えタンパク質の発現量は低いとされている。そのため、さまざまな効率的な発現技術が開発されている。現在、もっとも着目されているのが、一過的発現システムであるMagnICON技術である^{17,18}。Icon Genetics社はMagnICON技術を開発し、その後Bayer Innovation GmbH社のグループ企業となった⁵。植物による組換えタンパク質生産に関する要件とも密接に関連し、一過的発現システムが容認されるのか、あるいは定常的発現かつ種子での系統保存が可能なトランジェニック植物でなければならないのか、今後の当局の判断によると思われる。ニワトリニューカッスル病ワクチンは、組換えタバコ培養細胞を用いて生産系で2006年には承認を得ている（前出）。Protalix社の医療用酵素は組換えニンジン培養細胞で生産され、FDAより認可を受けている。

ダウンストリーム 植物における組換えタンパク質

生産コストの約80%は、ダウンストリームプロセスに由来する^{19,20}。環境的な安全性と質的な安全性が求められている。質的な安全に関しては、アルカロイドなどの植物由来低分子物質の最終生産物への混入などを考慮し、生産体である植物を選定し、精製プロセスの開発を行う。GMP規制に対応したプロセスが求められる^{10,11}。しかし、大腸菌や動物細胞を宿主として想定した規制であるため、植物が宿主の場合に、低分子物質や植物ウイルスなどの混入の評価をどのように対処していくか、解決すべき点がある。

糖鎖 組換えタンパク質は、用いた宿主に依存した翻訳後修飾、中でも糖鎖修飾を受ける。糖鎖は生物学的活性に重要な機能を持つだけでなく、ヒトと異なる構造はアレルギー性の観点より懸念されている。植物を用いて医療用タンパク質を生産するためには、ヒトと異なる植物型糖鎖修飾が懸念され、ヒト適応型への糖鎖改変技術の開発が求められている。植物には、ヒトに見られるβ1,4-ガラクトースやシアル酸残基がなく、またβ1,2-キシロース (Xyl) やα1,3-フコース (Fuc) 残基が存在する。ヒトではβ1,6-Fuc残基を持つ。我々は、ヒト由来のβ1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子をタバコ培養細胞で発現させてヒト型化糖鎖を構築することに成功した²¹。その後、オランダのグループがタバコ植物体でβ1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現させ、植物体の生長に

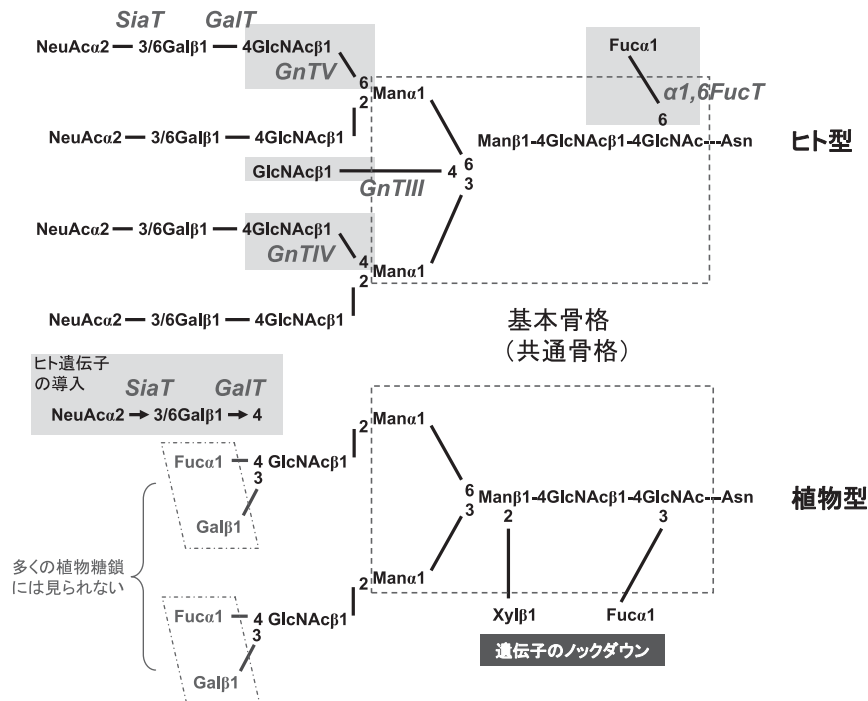


図1. 植物とヒトにおける糖鎖構造の違い。植物とヒトで共通な糖鎖構造を点線で囲んでいる。また、植物糖鎖の中で、存在比は少ないものの合成される糖鎖部分は一点鎖線で囲んだ。植物（細胞）に導入されたヒト由来の酵素（GalT, SiaT, GnTIII, GnTIV, GnTV, α1,6FucT）については、斜体字で示している。

大きな支障を起すことなく、糖鎖の改変に成功した²²⁾。現在までに、さまざまヒト由来の糖転移酵素遺伝子が導入され、植物の糖鎖修飾をヒト型化に改変する技術は完成しつつある^{23,24)}。しかし、ヒト型糖鎖構造の含量はまだ充分とは言えず、さらなる技術開発が必要である。エリスロポイエチンは、特定の糖鎖構造が生物学的活性に不可欠である。今後このような医療用タンパク質については、構造と含量というより、質的観点を考慮した改変技術が必要である。また、植物型糖鎖に関しては、 β 1,2-Xylや α 1,3-Fucの転移酵素遺伝子のノックアウトあるいは変異植物体が得られていない。植物遺伝子の部位特異的変異導入技術が確立していないため、遺伝子をRNAi技術などノックダウンした植物体が作製され、広く用いられている^{23,24)}。

一方では、最近の植物生産タンパク質の臨床試験では、植物糖鎖のアレルゲン性について興味深い結果が得られている。Tuséは、その総説⁸⁾で、詳細にLSB社のscFvサブユニットワクチンのヒトでの臨床試験の事例(前出)について解説し、植物糖鎖に言及している。試験結果からは、抗原のペプチド鎖部分に対する免疫応答性は認められた場合があったが、糖鎖部分に対するものはなかった。糖鎖に対する評価はこれからも引き続き検証していくべきであるが、全般的には安全性リスクは低いとしている。また、Protalix社の植物で生産した酵素のヒト臨床試験でも、植物型糖鎖が副作用などの大きな問題は認められなかった²⁵⁾。

植物生産医療タンパク質の今後

植物生産タンパク質は、安全性試験、コストや糖鎖修飾などの質的問題をクリアして、実用化第一号が登場した。Protalix社の医療用酵素がFDA/USDAの認可を受けた意義は大きい。実用化まで後一步のパイプラインがいくつかある¹⁾。現在、Protalix社はPfizer社とアライアンスを組んでいる。また、植物効率的発現システム(MagnICON技術)を開発したIcon Genetics社はBayer Innovation GmbH社と提携している。Medicago社は、2012年3月三菱田辺製薬(株)と研究協力契約を結び、ロタウイルスワクチンを始めとする新規「VLPワクチン」の開発・事業化を目指す⁹⁾。GMP-compliant生産施設を中心に、植物生産ベンチャーと大手製薬企業がアライアンスを形成し、発展していくことが予想される。

GMP-compliant組換えタンパク質生産施設は、アメリカが多い。我が国では、経済産業省のプロジェクト(2006–2010)で産総研北海道センターに「完全密閉型植物工場システム」が建設された(表2)。同施設を用いて、イチゴによる組換え動物治療タンパク質が生産され、

医薬原料として薬事法に基づく動物用医薬品製剤販売許可を受けるための準備を進めている状況である²⁶⁾。また、閉鎖型施設での植物による生産に関する環境諸条件や対象植物適応性などの基礎データも収集されている²⁷⁾。さらに、2013年1月完成を目指して「密閉型実証研究植物工場(グリーンケミカル研究所)」も建設途中で²⁸⁾、日本企業の投資を呼び込み、ますます我が国の植物タンパク質生産が加速していくものと期待している。

今後、医薬品として当局から認可を受け、マーケットに浸透していくまでに多くのハードルがあると想像できる。しかし、来し方を見、行く末を思うと、筆者は植物タンパク質生産の研究開発者に力強さを、そして未来に明るさを感じるのである。

文 献

- 1) Maxmen, A.: *Nature*, **485**, 160 (2012).
- 2) Barta, A. et al.: *Plant Mol. Biol.*, **6**, 347 (1986).
- 3) 藤山和仁ら: *生物工程*, **83**, 509 (2005).
- 4) Hiatt, A. et al.: *Nature*, **342**, 76 (1989).
- 5) Yusibov, V.: *Hum. Vaccine.*, **7**, 313 (2011).
- 6) Obembe, O. O. et al.: *Biotechnol. Adv.*, **29**, 210 (2011).
- 7) De Muynck, B. et al.: *Plant Biotechnol. J.*, **8**, 529 (2010).
- 8) Tusé D.: *Hum. Vaccine.*, **7**, 322 (2011).
- 9) <http://www.medicago.com/English/Home/default.aspx>
- 10) 山口照英: バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発, p.138, シーエムシー出版 (2012).
- 11) 松村 健: バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発, p.103, シーエムシー出版 (2012).
- 12) Hollak, C. E.: *Core Evid.*, **7**, 15 (2012).
- 13) Zimran, A. et al.: *Blood*, **118**, 5767 (2011).
- 14) Langer, E.: *BioProcess Int.*, **9**, 16 (2011).
- 15) Shepard, S.: *BioProcess Int.*, **9**, 8 (2011).
- 16) Fischer, R. et al.: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 434 (2012).
- 17) Whaley, K. J.: *Hum. Vaccine.*, **7**, 349 (2011).
- 18) Pogue, G. P. et al.: *Plant Biotechnol. J.*, **8**, 638 (2010).
- 19) Evangelista R. L.: *Biotechnol. Prog.*, **14**, 607 (1998).
- 20) Scotti, N.: *Expert Rev. Vaccines*, **9**, 925 (2010).
- 21) Palacpac, N. Q. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4692 (1999).
- 22) Bakker, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2899 (2001).
- 23) 三崎 亮, 藤山和仁: バイオ医薬品開発における糖鎖技術, p.121, シーエムシー出版 (2011).
- 24) 梶浦裕之ら: バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発, p.109, シーエムシー出版 (2012).
- 25) Zimran, A. et al.: *Blood*, **118**, 5767 (2011).
- 26) <http://www.hokuyobank.co.jp/report/2011/No185.pdf>
- 27) 安野理恵: バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発, p.131, シーエムシー出版 (2012).
- 28) <http://www.noastec.jp/>