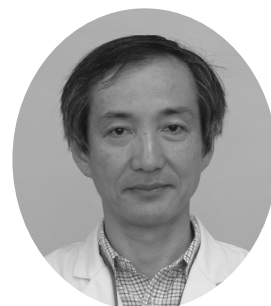


組換え動物サイトカイン 生産技術の確立

免疫研究部 上席研究官

犬丸 茂樹

INUMARU, Shigeki



はじめに

私が動物のサイトカインの生産を手掛けるようになったのは、1991年11月から半年間、OECDのfellowshipを得て英国のInstitute for Animal Health Pirbright Laboratoryの高松博士のもとに渡ることになり、共同研究を開始した時からである。その後、1994年からは「生物情報」プロジェクトに、そして1997年からは横溝免疫研究部長(当時上席研究官)らが立ち上げた「組換えサイトカインによる家畜疾病防除技術の開発」(組換えサイトカインプロジェクト)に参画することになった。当時すでに欧米のグループがヒツジ、ウシ、ブタのサイトカイン遺伝子のクローニングと発現を手掛けていたが、その多くが大腸菌の発現系を採用したもので生産量や活性において満足できるレベルにはなく、その種類も限られていて我々日本の研究者達が自由に入手できる状態ではなかった。ヒトのサイトカインはかなりの種類がすでに市販されていたがやはり大部分が大腸菌で生産した組換え体で、高価である上に種特異性の問題が無視できないので、家畜を対象とした免疫・サイトカイン研究にはどうしても自前で動物のサイトカインを生産する必要があった。しかもサイトカインプロジェクトが「家畜疾病防除技術の開発」を標榜しているからにはウシやブタへの投与実験が想定されるので多量のサイトカインが必要になる事は想像に難くない。まして将来のサイトカイン製剤開発を念頭に置けばエンドトキシン等が混入していないサイトカインの大量生産技術の開発が必要であることは自明であった。そこで組換えサイトカインプロジェクトを計画するにあたっては組換えタンパク質生産に実績のある企業の参加を得

て、動物実験に用いるサイトカインの生産に適すると考えられるバキュロウイルスおよびパチルス・プレビス遺伝子発現系による動物サイトカインの生産に取り組む事とした。

バキュロウイルスを用いた生産

バキュロウイルス遺伝子発現系は、節足動物に特有なバキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルスが感染細胞内において多角体と呼ばれる核内封入体を大量に生産する性質を利用したタンパク質の生産系で、昆虫培養細胞を宿主とするAutographa californica(鱗翅目ヤガ科の蛾)核多角体病ウイルス遺伝子発現系(バキュロウイルス/昆虫細胞系)および虫体を宿主とする発現に適したカイコ多角体病ウイルス遺伝子発現系(バキュロウイルス/カイコ系)が汎用されている。

<バキュロウイルス/昆虫細胞系>

バキュロウイルス/昆虫細胞系は著者をはじめ組換えサイトカインプロジェクトに参加する動物衛生研究所の國保主任研究官、北里大学の竹原助教授らが採用し、ブタのGM-CSF、IL-1 β 、IL-2、IL-12、ウシのGM-CSF、M-CSF β 、IFN- γ 、IFN- τ 、IL-12、ニワトリのIFN- γ 、IL-18を培養上清中に濃度数十から数百 μ g/mlに蓄積する生産系を確立した。これによってプロジェクト内外の研究者に組換えサイトカインが供給され、動物への投与実験が実施可能になっただけでなく、動物サイトカインの活性単位を国際的に統一するための標準品の作製や、IL-12のようなヘテロダイマー型分子を確実に生産する技術の確立など少なからぬ波及効果があった。プロジェクト後期が



らは昆虫細胞の大量培養の経験を持つ和研薬株式会社に参加し、バイオリアクターを用いた大量培養について種ウイルスの生産方法から培養装置や接種方法等まで培養系全般にわたって検討を加え、静置培養による生産と同程度の純度と濃度の組換えサイトカインを含有する培養上清を 6L 規模で連続生産できるシステムを構築した。

<バキュロウイルス／カイコ系>

バキュロウイルス／カイコ系によるサイトカインの生産は、この発現系に関して経験と技術的蓄積が最も豊富な片倉工業株式会社が担当し、ブタ IL-18、ウシ GM-CSF、IFN- γ 、IFN- τ の生産と精製を行った。この発現系で体液中に蓄積したサイトカインの濃度はバキュロウイルス／昆虫細胞系で培養細胞上清中に蓄積した場合の 10 倍に達するが不純物が多いのが欠点である。しかし、片倉工業では前処理後、主にキレートカラムクロマトグラフィーを利用することによって、上記サイトカインの効率的精製法を確立した。

バチルス・プレビス系を用いた生産

バチルス・プレビス遺伝子発現系（バチルス・プレビス系）の特徴として、1) バチルス・プレビスがグラム陽性菌であるためリポ多糖類を産生しない、2) 発現産物を菌体外に分泌・蓄積するため比較的の不純物が少ないことがあげられる。この発現系によるサイトカイン生産は、EGF の大量生産で実績のあるヒゲタ醤油株式会社が担当した。15 種類のサイトカインの発現を試み、シグナル配列の改変や菌株の検討などを行って生産効率の向上を図ることによりブタの GM-CSF、IL-1 β 、IL-2、TNF- α 、ウシの GM-CSF、IL-1 β 、IL-2、

IL-8、TNF- α を約 200 μ g/ml という濃度で生産することが可能になり、それらの精製法も確立した。バチルス・プレビス発現系を用いる場合、100 μ g/ml 以上の効率で発現できるタンパク質は経験的に全体の 2 割程度にすぎないが、サイトカインに関しては 6 割に達し、この発現系がサイトカイン生産に適していることがわかった。

組換えサイトカイン生産に関連した特許

組換えサイトカインプロジェクトの成果として、バキュロウイルス／カイコ系やバチルス・プレビス系等を用いたサイトカイン生産、精製技術に関する特許を 6 件、生産したサイトカインを利用して開発したサイトカインの測定法とモノクローン抗体に関する特許を 2 件出願し、バキュロウイルス／昆虫細胞系を用いた生産技術についても出願を予定している。

組換えサイトカインの供給

これまで示してきたとおり組換えサイトカインプロジェクトを通してブタの GM-CSF、IL-1 β 、IL-2、IL-12、IL-18、TNF- α 、ウシの GM-CSF、M-CSF β 、IFN- γ 、IFN- τ 、IL-1 β 、IL-8、IL-12、TNF- α 、ニワトリの IFN- γ 、IL-18 の生産法と精製法が確立された（表 1）。これによりバキュロウイルス／昆虫細胞系で数十から数百 mg 単位、バキュロウイルス／カイコ系で数十から数百 mg 単位、バチルス・プレビス系で数十 mg から数 g 単位の各種サイトカインを生産し、供給してきた。その合計は約 6g になる。これは単純にサイトカインの市販価格あるいは組換えタンパク質の委託生産費に換算すれば数十億円から数百億円



分に相当する。組換え動物サイトカイン生産技術の確立なくしては動物実験等大量にサイトカインを必要とする研究はなし得ないことがわかる。最近はずたのサイトカインが市販されるようになったが、動物のサイトカインは未だに自前で生産しなければ入手できないものがほとんどであること、これらのサイトカインを用いて各種の抗体が作製されたこと、さらに、ここに示した生産システムは他のサイトカインや関連物質の大量生産にも応用できることを考えるとこの組換え動物サイトカイン生産技術に関する成果は組換えサイトカインプロジェクトのみならず、我が国の、更には世界の動物免疫学研究に対して大きく寄与するものであるといっても過言ではなからう。

表1 組換えサイトカインプロジェクトにおいて生産法を確立したサイトカイン

	ウシ	ブタ	ニワトリ
IL-1 b	Bb	Ac: Bb	
IL-2	Bb	Ac: Bb	
IL-8	Bb		
IL-12	Ac	Ac	
IL-18		Bm	Ac
IFN- γ	Ac: Bm		Ac
IFN- τ	Ac: Bm		
GM-CSF	Ac: Bm: Bb	Ac: Bb	
M-CSF b	Ac		
TNF- α	Bb	Bb	

Ac: バキュロウイルス／昆虫細胞系
 Bm: バキュロウイルス／カイコ系
 Bb: パチルス・プレビス系

今後の課題

動物サイトカインの大量生産にめどがたったことに

より、サイトカインを用いた動物疾病防除技術の開発に関する研究の進展が期待されるが、今後取り組まなければならない課題も残されている。たとえば、バキュロウイルス／昆虫細胞系ではさらに高効率な大量培養装置の開発や培地および培養条件等の検討によるコストパフォーマンスの改善が必要である。またバキュロウイルス／カイコ系では効率の良いウイルス接種、飼育および体液回収装置の開発が必要である。パチルス・プレビス系では原核生物であるために糖鎖等の翻訳後修飾が行われなことがどの様に影響するかを検討する必要がある。

一方、多くのサイトカインが糖タンパク質であることから糖鎖の機能についての解析を進め、哺乳類型糖鎖など機能的に優れた糖鎖の合成系を組換えサイトカインの生産系に導入する事も必要だと考えられる。また、体内安定性に影響を与える因子やアレルギー反応、発熱等の副作用に影響する因子の解析を進め、安定性や安全性に優れたサイトカイン分子をデザインし、あるいはリポソーム等により物理的、化学的に組換えサイトカイン分子を修飾する技術を開発していくことも必要になると考えられる。

おわりに

6年間の組換えサイトカインプロジェクトが終了した。この間にサイトカインとその関連物質の生産技術は大きく進歩し、動物サイトカインを用いた次世代予防・治療薬開発をめざした研究を行う下地ができた。この領域の研究はまだ始まったばかりという状況だが、今後の進展を大いに期待しつつ、残されている問題点の解決にも努めねばならない。