

[ Industrial Info. ]

タンパク質受託生産「ProCube®」

— 抗体医薬品の品質管理への貢献 —

Recombinant protein service “ProCube®”

— Contribution for the quality control of antibody drug —

長屋 英和

シスメックス株式会社 R&I 事業本部

細胞

2016年48巻4月号(通巻635号)

ニューサイエンス社

## タンパク質受託生産「ProCube®」

— 抗体医薬品の品質管理への貢献 —

Recombinant protein service “ProCube®”

— Contribution for the quality control of antibody drug —

シスメックス株式会社  
R&I 事業本部

長屋 英和

### 要 約

組換えタンパク質の発現系は様々あるが、カイコーバキュロウイルス発現系はより多くの特長を有する。カイコ個体がひとつの小型バイオリアクターとなり得るため、多種類のタンパク質を同時に発現させることや、生産スケールを柔軟に対応することが可能である。また、一般的に困難とされる膜タンパク質など複雑な構造をもつタンパク質の発現も可能とされる。本発現系を用いて、抗体医薬品の品質管理の生物活性試験などに用いられるタンパク質 (Fc $\gamma$  受容体 4 種と TNF $\alpha$ ) を開発した結果、非常に純度の高いタンパク質を取得することに成功したので紹介する。

### はじめに

組換えタンパク質を発現する手法には大腸菌、酵母など微生物を利用するもの、動物細胞や昆虫細胞など細胞系を用いるもの、個体 (動物、植物、昆虫ほか) そのものを用いるもの、また生物のタンパク質合成のためのパーツを利用した無細胞発現系など様々な手法が存在する。一般的に原核生物を用いたタンパク質生産では、翻訳後修飾が真核生物と異なることや分子量が巨大なタンパク質 (> 100kDa) には適さない場合が多い。一方、真核生物を用いた発現系では大きなタンパク質や糖鎖修飾など、より高機能の生産システムを有している。しかし、真核生物では、生産量が低い

### Key words

カイコ, バキュロウイルス, 抗体医薬品,  
品質管理, Fc 受容体, TNF $\alpha$

ことや操作性が煩雑、また生産期間に時間を要するなどいくつかの欠点もある。従って、どの発現手法を用いるかは生産させるタンパク質の目的や必要量などによって選択すべきである。

上記のとおり様々なタンパク質発現系がある中でカイコーバキュロウイルス発現系システム<sup>1)</sup>は、カイコ虫体を用いてタンパク質を発現させるユニークな系で、大腸菌や培養細胞では発現が困難とされる膜タンパク質やタンパク質複合体の発現を可能とする非常に有用なタンパク質発現系である。

本稿では、特に抗体医薬品の品質管理への貢献として、生物活性の定量的な試験である抗原結合性試験および Fc 受容体結合性試験用のタンパク質を開発したので紹介する。

### 1. カイコーバキュロウイルス発現系の特長

一般的にバキュロウイルス発現系は、分泌タンパク質の発現や、その機能に翻訳後修飾が必要なタンパク質の発現に適しており、タンパク質の可溶性も大腸菌発現系に比べて高いとされる。このバキュロウイルスの発現宿主としてカイコを用いた場合、カイコ個体はガス交換や栄養供給、老廃物除去が自動的に行われ、常に最適な細胞のコンディションが保たれる培養タンクと捉えることができる。カイコ生体内に感染したバキュロウイルスは、頭部と腹腔を除くあらゆる細胞に感染・増殖することで、虫体全体の組織でタンパク質を産生し、発現量はカイコ培養細胞や Sf 培養細胞を

Hidekazu Nagaya :  
Research & Industry Business Development, Sysmex Corporation  
〒 651-2241 神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 号

用いた場合と比較して、おおよそ10倍から100倍高くなる<sup>2)</sup>。

### 1) カイコ個体を用いたタンパク質発現

カイコ生体内には多様な組織に応じた多種の細胞が存在するため、単一の細胞株に由来する一般的な培養細胞を利用した発現系に比べて、タンパク質の発現成功率が高まる。また ProCube® サービスでは、独自に開発したシステインプロテアーゼ欠損ウイルス (CPdバキュロウイルス) 株<sup>3)</sup> を使用することによって目的タンパク質の分解が阻害され、野生株のウイルスを用いて発現させた場合と比較して、高品質かつ高収量で目的のタンパク質を得られる。

### 2) 多種類同時発現

カイコ1頭1頭がバイオリクターであり、カイコに異なるウイルスを感染させることで多種類のタンパク質を同時に生産することが可能である。例えば結晶構造解析や HTS に用いるタンパク質調製において、最適なコンストラクションを選択する場合など、ハイスループットでの発現条件検討に理想的な発現系である。

### 3) 柔軟な生産スケール調整

ProCube® サービスでは、感染させるカイコの数を増減するだけで、スペースや設備による影響を受けずに生産量を調整することができる。初めに1頭あたりの目的タンパク質の収量を見積もれば、ニーズに合わせた最適なスケールでのタンパク質生産が可能となる。他の発現系で必要とされる大量生産時の培養条件検討なども不要である。

### 4) 短期間でのタンパク質生産

カイコーバキュロウイルス発現系では、カイコ個体へ組換えウイルスを感染後6日間でタンパク質が生産できる。このことから新規タンパク質を生産する場合は、ベクター構築を含み最短4週間、スケールアップの場合は最短2週間で受託生産している。

## 2. 抗体医薬品の品質管理への貢献

### 1) 抗体医薬品の品質管理

抗体医薬品を含むバイオ医薬品の品質管理におい

て、製造ロットごとに規格および試験方法への適合性が試験されている<sup>4)</sup>。そのうち生物活性の定量的な試験として、抗原結合性試験や Fc 受容体結合性試験、細胞応答性試験などがあげられる。我々は、抗体医薬品の品質管理に用いられる抗原やタンパク質に着目し、安定的な供給を目指している。

### 2) Fc 受容体

抗体医薬品の Fc 受容体との結合活性は、品質管理に用いられるだけでなく、抗体依存的細胞傷害活性 (ADCC 活性) を増強させるための指標として抗体医薬品開発の際にも測定されている。そこで活性化型 Fc $\gamma$  受容体および抑制型 Fc $\gamma$  受容体の計4種 (FCGR2A, FCGR2B/2C, FCGR3A, FCGR3B) の細胞外ドメインをカイコーバキュロウイルス発現系にて作製した。各 Fc $\gamma$  受容体遺伝子をカイコーバキュロウイルスへ組換え、その組換えバキュロウイルスをカイコへ感染させ、カイコ体液にて各タンパク質を発現させた。組換えタンパク質が発現したカイコ体液から、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行った。いずれのタンパク質も予想分子量のサイズにて発現され、非常に高純度の Fc $\gamma$  受容体のタンパク質を取得することに成功した (図1, 図2)。

### 3) 炎症性サイトカイン TNF $\alpha$

関節リウマチやクローン病などに対する分子標的薬 (生物学的製剤) は炎症性サイトカインやその受容体を標的としている。代表的なものとして TNF 阻害薬 (抗 TNF $\alpha$  抗体) があり、その力価を測定することで、抗体医薬品としての品質管理がなされている。

TNF $\alpha$  遺伝子をカイコーバキュロウイルスへ組換え、その組換えバキュロウイルスをカイコへ感染させた。組換えタンパク質が発現したカイコ蛹をバッファーとともにホモジナイズし、遠心分離処理後に各種クロマトグラフィーを用いて精製を行った。その結果、図3, 4で示すとおり純度がほぼ100%となる TNF $\alpha$  タンパク質を得ることができた。

## おわりに

タンパク質の発現系には様々な手法があるが、それぞれにおいて長所、短所がある。その中でカイコーバ

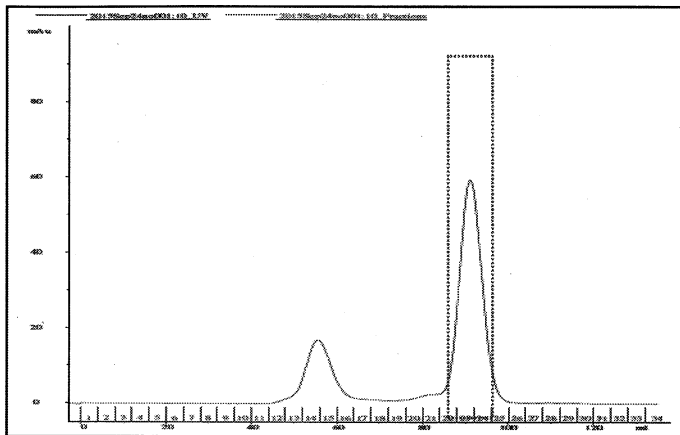


図1 カイコ体液にて発現させた FCGR2A タンパク質の GPC (ゲルろ過クロマトグラフィー) の測定結果

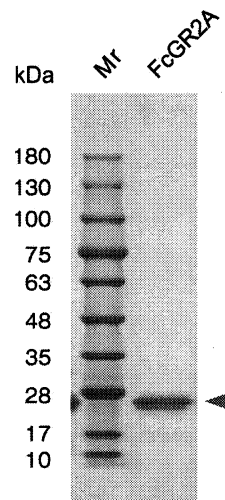


図2 精製 FCGR2A の電気泳動図

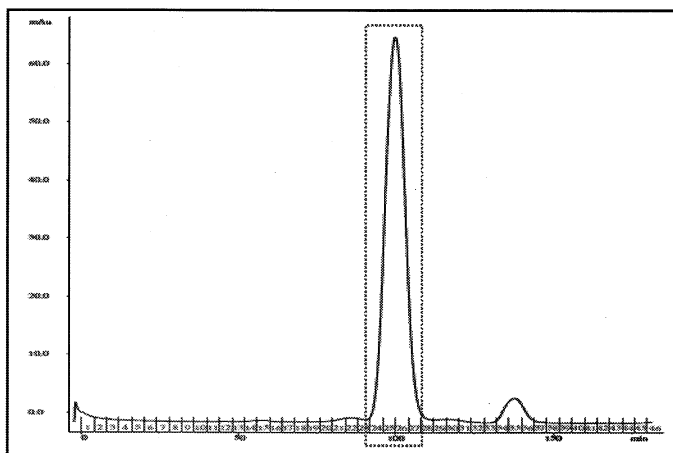


図3 カイコ蛹にて発現させた TNF $\alpha$  タンパク質の GPC (ゲルろ過クロマトグラフィー) の測定結果

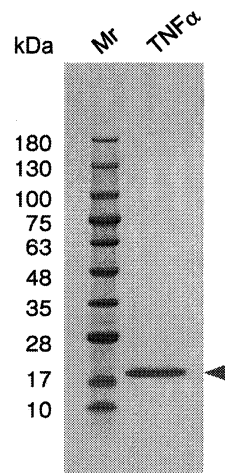


図4 精製 TNF $\alpha$  の電気泳動図

キユロウイルスを用いた発現系は、大腸菌などでは困難な膜タンパク質や複雑な構造を示すタンパク質も発現させることが可能である。現在、タンパク質の発現などに困窮されている研究者の方々に、ProCube® サービスが解決できるものと確信する。

一方、抗体医薬品は、世界の医薬品売上高ランキングでもランクインするものが増え、現在の医薬品市場の中でも大きな位置を占めている。今後ますます発展していく抗体医薬品に対し、それらの品質、安全性、有効性などを試験する方法のプラットフォーム技術や情報を提供し、ProCube® サービスが医療へ貢献できることを期待する。

## 文献

- 1) Maeda *et al.*, Production of human alpha-interferon in silkworm using baculovirus vector. *Nature*. 315(6020):592-4 (1985)
- 2) Hiyoshi *et al.*, Construction of a cysteine protease deficient *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus bacmid and its application to improve expression of a fusion protein. *J Virol Methods*. 144 (1-2) :91-7 (2007)
- 3) Suzuki *et al.*, Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. *J Gen Virol*. Dec;78 ( Pt 12) :3073-80 (1997)
- 4) 薬食審査発 1214 第 1 号平成 24 年 12 月 14 日 別添 抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス