タンパク工学を利用した 新薬の開発

伊藤 菁哉

Seiga Itoh, 協和発酵工業(株)東京研究所

1. はじめに

1970年代に登場し、その後も急速に発展している遺伝子工学を含むニューバイオテクノロジーは、医薬、化学、食品、農水畜産など多くの分野から注目され、そのすそ野を拡大しつつある。これらの中でも医薬分野ではこの技術の適用が最も早く、これまでに着実な成果を収め、医療現場に新しい治療法を提供している。

ヒト由来のタンパク質(ソマトスタチン)が大腸菌で生産¹⁾されてから約13年経過した現時点において、タンパク性医薬品開発の現状を要約し、今後の方向について私見をのべたい。

2. タンパク性医薬品開発の現状

遺伝子工学的生産手法が確立された後、最初のターゲットとなったのは、ヒトインシュリン、ヒト成長ホルモン(hGH)、インターフェロン(IFN)などである。これらはヒトまたは家畜の組織や細胞から抽出・精製され、それぞれ、糖尿病、小人症、ある種のガンの治療薬として有効であることが知られていた。

1982年、米国において、組換えタンパク医薬品の第1号としてヒトインシュリンが発売されて以来、わが国においても、表1に示したように、6種類の組換えタンパク質が医薬品として発売され、その他にも、表1(b)に示したように12種類以上の組換えタンパク質が臨床応用中である。これらの中で最近、特に注目されているのが、エリスロポイエチン(EPO)と顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)である。EPOは腎臓により生産される分子量3.5万(166アミノ酸)の糖タンパク質で前駆細胞に作用して赤血球への分化・増殖を促進する造血因子である。1985年にクローン化され²⁾、動物細胞系で生産され、慢性腎不全、貧血、手術後の自己輸血などにおいて有効である。

一方、G-CSFはマクロファージなどにより生産され、幹細胞から顆粒球への分化・増殖を促進する造血因子であるが、これについては後で詳述する。

表1に示したものの以外にも多くの生理活性タンパク質が遺伝子組換え法により量産されている。例えば、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7などのサイトカイン、プロテインC、トロンボモジュリンなどの抗血液凝固因子、ヒト血清アルブミン、アポリポプロテインE、肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子(FGF)なども、前臨床試験が進行中である。

3. 医薬品のタンパク工学的改変

前節にのべたように、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、血液成分、酵素など多くの有用なタンパク質が量産され、臨床応用が盛んに試みられる一方、このような高分子タンパク質の活性・構造相関を明らかにし、ひいてはそのタンパク質の活性や安定性などの諸性質を改善する試みもなされており、それらの中から代表的と思われるものを、表2に要約した。

これまでに行われたタンパク工学的手法による性質の改善例をみると、①比活性の増大、②物理的安定性の改善(熱安定性など)、③血中安定性の増大、④プロテアーゼ抵抗性の獲得、⑤副作用の軽減、⑥生産性や精製効率の改善、などがあげられる。

これらのタンパク質誘導体のうち、表2の*印は実際に臨床応用中であり、IL-2(Ser¹²⁵)についてはタ

伊藤菁哉 協和発酵工業(株)東京研究所(194 町田市旭町3-6-6) 研究管理室長、理博
1967年東大理学部生物化学科卒、1969年大学院理学系修士課程修了、1969年協和発酵入社、1978年～1980年ウィスコンシン大留学、専門は遺伝子工学、分子生物学。
＜趣味＞囲碁、園芸

表 1 日本で発売された組み換えタンパク性医薬品
(a)と臨床応用が進行中のタンパク性医薬品(b)

(a)			
タンパク性医薬品	発売年 (日本)	生産宿主	適応症
1.インシュリン	1986	大腸菌	糖尿病
2.成長ホルモン	1986	大腸菌・動物細胞	小人症
3.α-インターフェロン	1988	大腸菌	ガン・B型肝炎
4.B型肝炎ワクチン	1988	酵母	B型肝炎
5.ティシュー・プラスミノゲン、アクティベーター(tPA)	1990 (見込)	動物細胞	心筋梗塞
6.エリスロポイエチン(EPO)	1990 (見込)	動物細胞	慢性腎不全
(b)			
タンパク性医薬品	生産宿主	適応症	
1.顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)	大腸菌・動物細胞	{ 抗ガン剤の副作用軽減 骨髄移植	
2.顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GH-CSF)	大腸菌・動物細胞	〃	
3.マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)		〃	
4.インターフェロン-γ(IFN-γ)	大腸菌	ガン(腎ガン)	
5.インターロイキン-1(IL-1)	大腸菌	ガン	
6.インターロイキン-2(IL-2)	大腸菌	ガン(腎ガン)	
7.腫瘍壊死因子(TNF)	大腸菌	ガン	
8.上皮細胞増殖因子(EGF)	大腸菌	角膜の創傷治療	
9.スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)	大腸菌	心臓手術後の再循環障害	
10.血液凝固第8因子(F-VIII)	動物細胞	血友病	
11.インシュリン様成長因子-I(IGF-I)	大腸菌	ラロン型小人症	
12.ヒト利尿ペプチド(hANP)	大腸菌	うっ血性心不全	

表 2 主なタンパク性医薬品誘導体とその特徴

タンパク質誘導体	変異体造成の要点	特 徴
1. IFN-β*	Cys ¹⁷ →Ser 置換体	高比活性, 保存安定性の向上(-70°C)
2. IFN-α	多数の置換変異体	高比活性
3. IFN-γ	多数の変異体, N末, C末欠失体	高比活性
4. IL-2*	Cys ¹²⁵ →Ser 置換体	高比活性
5. TNF	N末, C末欠失体	高比活性
6. LT	N末欠失体(Δ1-4, Δ1-7)	高比活性
7. GM-CSF	糖鎖付加部位の置換(Asn ²⁷ and/or Asn ³⁷)	血中安定性の減少
8. G-CSF*	N末1, 3, 4, 5, 17位を置換	高比活性, 熱安定性増大
9. EPO	多数の置換変異体(例 Asn ²⁴ →Gln)	高比活性
10. IL-1	Arg ⁴ →Gly 置換体	比活性は同等, 副作用(発熱性)は大幅減少
11. IL-3	ペプチド合成で(1-16)欠失体	活性は 1/3 に
12. tPA*	EGF ドメイン欠失, 糖鎖の削除など ΔFE3X	血中安定性の向上
13. ProUK*	トロンビン切断部位(Arg-Phe)の置換(Phe ¹⁵⁷ →他の aa)	トロンビン抵抗性の獲得
14. Factor VIII*	欠失による小分子化	生産性の向上
15. Motilin	Met ¹³ →Leu	精製法の改善(CNBrによる切断)
16. キメラ	γ-IFN と LT のキメラ	<i>in vitro</i> 抗ガン活性の上昇

* は臨床応用中(IL-2誘導体は1989年より発売)

ンパク質誘導体医薬品の第1号として, 1989年欧州にて発売された。タンパク質誘導体については抗原性の問題が心配されるが, 今のところ大きな問題にはなっていないようである。

次にタンパク工学的改変例として, 筆者らの試みたG-CSFについてのべる。

4. G-CSF 誘導体の開発

4-1. G-CSF cDNA のクローン化と発現

血液中には, 赤血球, リンパ球, 血小板, 顆粒球など, 形態も機能も異なる多種類の細胞が存在し, 生体防御, 恒常性の維持に重要な働きを担っている。多能性幹細胞から各種成熟細胞への分化・増殖過程には多くのタンパク質因子が関与しているが, コロニー刺激因子(colony-stimulating factor: CSF)は, 特定の造血細胞に直接作用して分化・増殖を促進し, *in vitro* でコロニー形成活性をもつ物質の総称である。これらの中には顆粒球への分化・増殖因子であるG-CSF以外に, M-CSF, GM-CSF, Multi-CSF(=IL-3)が知られているが, 本稿では省略する。

G-CSF cDNA のクローン化は, ガン細胞より取得した mRNA を用い, 長田ら³⁾, Souza ら⁴⁾により独立に行われた。筆者らが, リボポリサッカライドで刺激したヒトマクロファージ(約4×10⁸細胞)よりクローン化したものは, 一部の塩基配列が異なるものの, 既報の配列と同一であった(174アミノ酸)。

G-CSF には O 結合型糖鎖の結合(Thr¹³³)⁵⁾が知られているが, N 結合型糖鎖付加部位(Asn-X-Thr/Ser)はないので, 大腸菌での生産を試みた。すなわち, トリプトファンプロモーターの下流に G-CSF cDNA をつなぎこんだ発現ベクターを作製し, 大腸菌 K12 株に導入し, 24時間培養した。この操作によりヒト G-CSF は菌体内に顆粒状に量産され, 全菌体タンパク質の10%以上の蓄積を認めた⁵⁾。

このように顆粒状に生産された G-CSF は顆粒を精製した後, 可溶化(6M グアニジン塩酸), 再生操作だけで純度90%以上の標品が得られ, さらにクロマトクラフィーなどの操作で, 高純度標品を得ることができた。G-CSF の生物活性は, *in vitro* では, マウス骨髄細胞を軟寒天プレートにまき, 生ずるコロニー数で測定できるが, 大腸菌より精製した G-CSF 標品の

図 1 G-CSF の模式図(a)と誘導体造成の要約(b)

比活性は天然型 G-CSF の比活性 (約 1×10^8 U・mg⁻¹ protein) とほぼ同等であることが確認されている。

4-2. G-CSF 誘導体の造成と性質

G-CSF は, *in vitro*, *in vivo* における白血球増多効果が明確であり, 臨床成績も非常によく, 有望なサイトカインである. *in vitro* のみでなく, *in vivo* の活性も短期間に明確に測定できる. G-CSF は活性-構造相関を明らかにする対象としても好適と考えられる. 図 1(a) は G-CSF の構造を模式的に示し, 誘導体造成に利用した主な制限酵素部位の対応する位置を示したものである. これらの部位を利用し, ヒト G-CSF より, 欠失, 置換, 挿入など 60 以上の変異体を造成し, それらを要約して図 1(b) に示した. その結果, 多くの変異体が失活するなかで, *N* 末端側については, 3, 4, 6, 7, 11 アミノ酸の欠失体は活性を保持し, 18 アミノ酸欠失体では活性を失なうという結果を得た. 以上の結果およびヘモポイエチン類の *N* 末

端側には Ala-Pro-X-Arg-Ser という共通配列が存在するというを考慮に入れて, さらに *N* 末端側の 1~6 番目のアミノ酸をカセット変異法により種々変えることを試みた.

図 2 に示したように, この時点までに *N* 末端側 7 番目に対応する位置に *Xho* I 部位をもつ発現ベクター pCfBA8 が造成されていたので, *Ban* III と *Xho* I の間に多数の合成 DNA 混合物をリンカーとして挿入することにより多数の *N* 末端側変異体を得た. 個々の形質転換株から G-CSF 変異体を高純度に精製し, 前述のマウス骨髓細胞を用いたコロニーアッセイによりインタクト G-CSF に対して, 2~3 倍の比活性を有する数種類の変異体を見いだした⁹⁾. これらのうち, *N* 末端側に Ala¹-Pro²-Thr³-Tyr⁴-Arg⁵……Ser¹⁷ な

図 2 カセット変異法に用いたプラスミド pCfBA8 と *Ban* III-*Xho* I 間の配列

図 3 タンパク性医薬品：総合技術の進歩と今後の方向

る配列を有する変異体 (KW2228 と命名) は、ヒト骨髓細胞を用いた *in vitro* コロニーアッセイでも比活性が高く、マウスを用いた *in vivo* テストの結果においても、 $0.5 \mu\text{g} \sim 2.5 \mu\text{g}$ /マウスの範囲で、インタクト G-CSF より有意に高い効果を示すことが明らかになった。また、共同研究者の手によって、マイトマイシン、5FU などの抗ガン剤投与後および放射線照射後の白血球の減少を回復させること、放射線照射マウスに対する骨髓移植の際にも KW2228 は有効であることが認められた。さらに、カニクイザルにおいても顕著な白血球増多作用が認められ、副作用も全く問題にならないことが確認されている。

5. おわりに

以上、遺伝子組換え技術を用いて研究開発が進行中のタンパク性医薬品とその誘導体について概説し、かつわれわれが行った G-CSF 誘導体の開発を実例として紹介した。G-CSF 誘導体 (KW2228) は①高比活性、②ヒト好中球に対する高親和性、③熱安定性が高い、などの特徴を有し、現在臨床試験 (フェーズ III) が進行中であり、これはタンパク質誘導体としてはわが国で初めての臨床試験である。

本稿で述べたタンパク性医薬品は、大量に供給されてからまだ日が浅く、投与法、生体内での安定化、他剤との併用など使用法に関する問題も多く残されており、今後のドラッグ・デリバリー・システム (DDS) や周辺技術の進歩が待たれる。

タンパク性医薬品のもう一つの方向は、遺伝子工学、結晶構造解析、レセプター研究などの進歩と相まって生理活性タンパク質の活性を代替する低分子ペプチドまたは低分子化合物の創出であろう (図 3)。サ

イトカインのレセプターについては、M-CSF, IL-1, IL-6, EPO, IFN- γ , IL-2, G-CSF などについてすでに cDNA がクローン化されており、IFN (α , β , γ), IL-2, TNF などの結晶化も報告されている。G-CSF の誘導体 (KW2228) は物性的に安定なためか、インタクト G-CSF より結晶化しやすく、共同研究者の平山、長原らにより、構造解析に十分な結晶が得られ、現在構造解析が進行中である (写真参照)。

このように遺伝子工学を筆頭とするニューバイオテクノロジーは、数多くのバイオ医薬品を医療の現場に送り続けているが、今後は、ヒトゲノム解析計画に代表されるように、国際的協力のもとに、遺伝子レベルの解析が進み、それと相まった基礎研究により、ガン、成人病、難病など多くの疾病の原因が明らかにされ、それに基づく、新しいバイオ医薬品および低分子合成医薬品の創出が可能になるものと思われる。

文 献

- 1) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H. Heynecker, F. Boliver, H.W. Boyer: *Science*, **198**, 1056 (1977)
- 2) K. Jacob, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S.D. Neil, R. J. Kaufman, A. Mufson, S. Seehra, S.S. Jones, R. Hewick, E.F. Fritsh, M. Kawakita, T. Shimizu, T. Miyake: *Nature*, **313**, 806 (1985)
- 3) S. Nagata, M. Tsuchiya, S. Asano, Y. Kaziro, T. Yamazaki, O. Yamamoto, Y. Hirata, N. Kubota, M. Oheda, H. Nomura, M. Ono: *Nature*, **319**, 415 (1986)
- 4) L.M. Souza, T.C. Boone, J. Gabrilove, H. Lai, Ph. K. M. Zsebo, D.C. Murdock, V.R. Chazin, J. Bruszewski, H. Lu, K.K. Chen, J. Barendt, E. Platzer, M.A.S. Moore, R. Mertelsmann, K. Welte: *Science*, **232**, 61 (1986)
- 5) Y. Komatsu, T. Matsumoto, T. Kuga, T. Nishi, S. Sekine, A. Saito, M. Okabe, M. Morimoto, S. Itoh, T. Okabe, F. Takaku: *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1179 (1987)
- 6) T. Kuga, Y. Komatsu, M. Yamazaki, S. Sekine, H. Miyaji, T. Nishi, M. Sato, Y. Yokoo, M. Asano, M. Okabe, M. Morimoto, S. Itoh: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**: 103 (1989)

写真 (508 頁) = G-CSF 誘導体 (KW2228) の結晶

蒸気拡散法で得たプリズム状結晶 ($0.5 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}$) で、X 線結晶解析に適した G-CSF 結晶が得られたのはこれが初めて。