

# The fifth international conference on “Plant-based vaccines, antibodies & biologics” の報告

藤内直道

東京大学 大学院農学生命科学研究科

## Report on The fifth international conference on “Plant-based vaccines, antibodies & biologics”

Naomichi FUJUCHI

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

### 1. はじめに

“Plant-based vaccines, antibodies & biologics” の目的は、植物を用いて生産されたワクチン・抗体・酵素などの医薬用タンパク質の性質またはその生産手法についての情報交換および議論である。これらの医薬用タンパク質は従来、鶏卵や遺伝子組換え動物細胞などを用いて生産されてきたが、近年植物がこれらに代わろうとしている。基本的に植物は遺伝情報さえ与えられれば他の生物が生産するものと同様のタンパク質を生産可能であるため、独立栄養で安価である植物の中に医薬用タンパク質を蓄積することで発展途上国などにおいて安価に使用できる「食べるワクチン」を生産可能であると 1990 年代には期待されていた。しかし医薬品として認可されるには多くの障壁があり、この「食べるワクチン」のコンセプトから離れる方向に進んできている。それでも既存の方法で生産された医薬用タンパク質に代わる、または既存のものとは異なる価値を持ちうることから、植物利用型医薬用タンパク質 (PMP) に関する研究はさかんに行われている。

PMP 生産には、つねに既存の生産方法との比較が伴う。動物細胞培養などの既存の生産方法では規格などの法令が整っているため、植物を用いて生産することによほどのメリットがないと大手製薬会社の参入は期待できない。よく比較される項目としては、

(1) 精製前の生体重あたりのタンパク質含量および精製回収率などを考慮した生産コスト、(2) 生産拡大の容易さ、(3) タンパク質生産にかかる期間、(4) 動物細胞とは異なる糖鎖修飾の影響、などがあり、さらに生産工程の安定性および堅牢性の評価として米国 Food and Drug Administration (FDA) が定めたものに準拠する (5) Good Manufacturing Practice (GMP)、および (6) 臨床試験に通りやすいかがある。PMP 生産におけるこれらの項目は、発現法またはベクターの種類 (遺伝子組換え法/一過性遺伝子発現法)、発現対象 (植物個体/植物培養細胞)、宿主植物種、目的タンパク質の種類、投与対象、および投与経路によって異なるため、既存の方法と比較してどちらが良いということは一概には言えないが、動物細胞培養法・昆虫細胞培養法・酵母培養法などとの比較が既往の文献 (Doran, 2006; Fischer and Emans, 2000; Houdebine, 2009; Larsen, 2011; Ma et al., 2003; Schillberg et al., 2003) に断片的にまとめられている。例として筆者の研究対象である閉鎖環境で栽培した *Nicotiana benthamiana* の植物個体を用いたウイルスベクターによるインフルエンザワクチンの一過性遺伝子発現の場合だと、バイオリアクタが必要なく生産コストは安く、また生産拡大も容易であり、ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現であるため生産期間は短いという利点を持つ。また同様の生産方法で GMP に則った生産施設もいくつか存在しており (D'Aoust et al., 2010; McCormick, 2011; Pogue et al., 2010)、そこで生産されて注射投与用に精製された PMP は臨床試験の最中である。一過性遺伝子発現法はインフルエンザウイルスのパンデミックが発生したときに素早くワクチンを生産できる方法とさ

<http://www.agrmet.jp/sk/2014/D-2.pdf>

2014 年 3 月 12 日 掲載

Copyright 2014, The Society of Agricultural Meteorology of Japan

れており (Preis, 2012), 既存の生産方法では不可能な医薬品生産を行えるという点で大きな価値を持っており, 最近ではこれらの生産施設を保有するベンチャー企業が大手製薬会社を買収されるという例も出てきている。

しかしながら既存の生産方法と比べて圧倒的に試験例が少ないということで, GMP および臨床試験をパスすることには多大な苦勞が伴うようである。またとくに植物個体を用いた PMP 生産ではタンパク質収量がバッチ間で大きく異なる (Miele, 1997; Paul and Ma, 2011) という欠点もある。これらの問題を解決するために, 安価なバイオリアクタを用いた植物細胞培養法ですでに市場に出回っている医薬用タンパク質を安価に生産するといった動き, または家畜などのヒト以外の動物を対象としたタンパク質製剤を生産する動きが最近では見られる。PMP が社会に受け入れられ発展していくためには, このようにバイオシミラーと呼ばれる PMP の成功例を増やすことが不可欠である。

だがこのようなバイオリアクタを用いた植物細胞培養法は, 植物を利用することの利点を犠牲にしている。植物を利用することの最大の利点は, 植物個体を露地で栽培したときの低コストおよび生産拡張性にある。これらの利点を最大限に活かすためには, 植物個体を用いた PMP 生産でのタンパク質収量を高い値のまま安定させることが必要であり, それはバイオマス収量およびバイオマスあたりの目的タンパク質含量の増大および制御によって達成される。つまり露地での栽培管理, そして遺伝子発現に環境が及ぼす影響 (Buyel and Fischer, 2012; Matsuda et al., 2012; Stevens et al., 2000) の把握が重要であり, 筆者らはこれらについての研究を行っている。将来にわたって PMP 生産が既存の生産方法にとって代わる有効な医薬品生産方法となるかどうかはこの数年にかかっており (Rybicki, 2009), 筆者は環境制御こそがブレークスルーになりうると考えている。

本報告では会議で報告された PMP の様々な生産システム, 性質, および問題点について, 農業工学の視点から重要であると思われることを報告する。

## 2. 会議報告

口頭発表のセッションは「ワクチン」, 「抗体」, 「その他の医薬品」, および「新技術/生産システム開発」の 4 つに大きく分けられていた。タンパク質の種類によって市場の状況が異なることを考慮に入れるとそのような分け方になるのかもしれないが, どちらかという生産工程の上流側に立っている筆者からしてみると発現法や発現対象で分けた方が分

かりやすいため, 以下では植物個体を用いた方法, 細胞培養法, その他, の順番に報告する。

University of Cape Town の Hitzeroth 博士らは, 組換えアグロバクテリウムを用いて *N. benthamiana* 個体に一過的に rotavirus の外殻タンパク質を生産させたとき, タンパク質の貯蔵ターゲットが原形質小胞体か葉緑体かで蓄積量の経時変化が異なると報告した。貯蔵ターゲットを原形質にした場合, 遺伝子導入後 7 日が経っても蓄積量が増加し続ける一方で, 小胞体および葉緑体にした場合, 3, 4 日目に蓄積量が最大となったということである。目的タンパク質の蓄積量の点では小胞体が適しているという報告が多数ある (Benchabane et al., 2008) が, ほとんど蓄積されなかったという報告 (Maclean et al., 2007) もあり, どこをターゲットにしたら良いかは発現方法, 宿主植物種, または目的タンパク質の種類によって異なると思われる。この研究結果は, 貯蔵ターゲットの比較を行うときにはある決まった遺伝子導入後日数での蓄積量を比べるのではなく経時変化を調べる必要があることを示唆している。

遺伝子組換えアルファルファを用いた牛ウイルス性下痢ワクチン生産および遺伝子組換え *N. tabacum* を用いた口蹄疫ワクチン生産を研究している National Agricultural Technology Institute of Argentina の Andres Wigdorovitz 博士らは葉齢や光強度がワクチン蓄積量に及ぼす影響について調べたと報告した。葉齢が異なると代謝活性も異なるため, タンパク質生産または分解速度が異なると考えられる。一過性遺伝子発現法でも葉位によって目的タンパク質蓄積量が異なるという報告 (Buyel and Fischer, 2012) がある。ひとつの植物個体内でも葉位によってタンパク質蓄積量が異なると, 少量をサンプリングしてバッチ全体のタンパク質含量を推定することが困難である。リアルタイムなタンパク質含量モニタリングができないということは, 植物個体を用いる PMP 生産方法は GMP の点で不利であるといえる。他方, 光強度が目的タンパク質生産に及ぼす影響については気温と絡めた研究が遺伝子組換え法および一過性遺伝子発現法にある (Elbers et al., 2001; Matsuda et al., 2012; Stevens et al., 2000)。これら環境要素が目的タンパク質蓄積量に及ぼす影響は中心的課題にはなっていないが, 量的な議論をする際には考慮に入れる必要がある。

産業総合技術研究所の松村健博士を中心とするグループもヒト以外の動物に投与する PMP を生産している。会議ではホクサン株式会社の田林紀子博士らが遺伝子組換えイチゴを用いたイヌ歯肉炎に対するインターフェロン生産について報告した。人工光型

植物栽培施設内で生産されたインターフェロンは平成 25 年 10 月に農林水産省より動物用医薬品製造販売承認を受けている。Medicago 社および Fraunhofer USA CMB 社も人工光型植物栽培施設内において一過性遺伝子発現法で *N. benthamiana* を用いて PMP を生産していることから、植物体周囲の環境を厳密に制御しなければ法令をパスすることが困難であることが分かる。

Medicago 社および Fraunhofer USA 社は一過性遺伝子発現法で *N. benthamiana* を用いてそれぞれインフルエンザウイルスに対する Virus like particle (VLP) ワクチンとサブユニットワクチンを GMP に則った施設で生産している北米の企業である (Fischer et al., 2012)。本会議では Fraunhofer USA 社の Konstantin Musiychuk 博士・Vidadi Yusibov 博士が、マラリア原虫の蚊の中での有性生殖を妨げるタンパク質、つまりマラリアワクチンを一過性遺伝子発現で *N. benthamiana* を用いて生産したと報告した。植物個体を用いた PMP は従来の方で生産されたものと比べて安価であり、大量に PMP を生産することが可能である一過性遺伝子発現は発展途上で流行している病原体に対するワクチン生産に適している。発展途上国での使用が想定されるその他の PMP としては、コレラ毒素 B サブユニットワクチン (Hamorsky et al., 2013) などがある。

植物個体でありながらも細胞培養の要素も取り入れて環境制御およびモニタリングを容易にしたユニークなシステムもある。Synthon Pharmaceuticals 社の Vincent Wingate 博士は無菌培養液で満たした透明なバッグ内で遺伝子組換え水草を栽培して非ホジキンリンパ腫に対する抗体を生産する SYNLEX というシステムについて報告した。このシステムはもともと Biorex Therapeutics 社のものであった (Everett et al., 2012) が、2012 年に大手製薬会社の Synthon Pharmaceuticals 社に買収された。このシステムで使われているほとんどの部品はディスポーザブルであり、コンタミネーションの確率が非常に低い。また細胞培養法と同様にバッチ内は均一であり、水草を含む培養液を少量採取するだけで容易にタンパク質蓄積量をモニタリングすることが可能である。さらに培養液組成・光強度・光質・温度などが目的タンパク質蓄積量に及ぼす影響を細かく調べているということである。このシステムのプロセスも GMP をパスしている。

他方、細胞培養法を採用しているグループにとし、Protalix Biotherapeutics の Yoseph Shaaltiel 博士は遺伝子組換えニンジン細胞を用いたゴーシェ病の治療酵素の生産について報告した。この PMP の面白い

ところは、植物特有の糖鎖修飾がかえって治療に有効である点である。ゴーシェ病に対する一般的な治療酵素である Cerezyme は動物細胞培養法で生産された目的タンパク質の糖鎖を一部切断して短くしたものである一方で、PMP の糖鎖はそのまま短い (Shaaltiel et al., 2007)。つまりこの PMP はバイオシミラーではなくバイオバターであるといえる。またこの PMP は Phase III 臨床試験をパスしており Cerezyme に代わる安価な治療酵素として処方されている。

糖鎖修飾については、植物特有の糖鎖構造が免疫原性を持っている、または人体に有害であるとの証拠はないという主張 (Fischer et al., 2012) もあるが、動物細胞内での糖鎖修飾に近づける研究が University of Natural Resources and Life Sciences の Andreas Loos 博士によって報告された。

ポスターセッションでは私を含め 54 の発表があった。私は "Effects of nitrate and sodium chloride concentrations of nutrient solution on accumulation of hemagglutinin in *Nicotiana benthamiana* in viral vector-mediated transient expression" という題目で、養液施用が目的タンパク質生産に及ぼす影響を発表した。しかし今回の会議の参加者たちは、量的な話だけだとあまり興味をそそられないようであった。彼らは GMP および臨床試験をどうパスするかに主眼を置いており、実際に販売にまで漕ぎつけられる技術かどうかを見ているようであった。目的タンパク質をただ生産するだけでなく、発現メカニズム、精製工程、および薬効についても調べて意見を述べる必要があるということを感じた。

### 3. おわりに

本会議には薬学または農芸化学出身の研究者が多く参加しており、議論の内容はこれまであまり触れたことのないものであり新鮮であった。また研究とビジネスとの距離が非常に近く、研究に対するモチベーションに変化が感じられたことは大きな収穫であった。次回第 6 回大会は 2015 年 6 月にスペインで開催予定である。

### 謝 辞

本会議への参加にあたり、JSPS 科研費 24658217 および日本農業気象学会国際会議出席渡航費補助の助成を受けた。心より御礼申し上げます。

### 引用文献

Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord,

- V., and Michaud, D., 2008: Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol. J.*, **6**, 633–48.
- Buyel, J.F., and Fischer, R., 2012: Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs. *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 2575–2588.
- D’Aoust, M.-A., Couture, M.M.-J., Charland, N., Trépanier, S., Landry, N., Ors, F., and Vézina, L.-P., 2010: The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.*, **8**, 607–619.
- Doran, P.M., 2006: Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol.*, **24**, 426–432.
- Elbers, I.J., Stoop, G.M., Bakker, H., Stevens, L.H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Jordi, W.J., Bosch, D., and Lommen, A., 2001: Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **126**, 1314–1322.
- Everett, K.M., Dickey, L., Parsons, J., Loranger, R., and Wingate, V., 2012: Development of a Plant-Made Pharmaceutical Production Platform. *Bioprocess Int.*, **10**, 16–26.
- Fischer, R., and Emans, N., 2000: Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.*, **9**, 279–299.
- Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R.M., and Drossard, J., 2012: GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol. Adv.*, **30**, 434–439.
- Hamorsky, K.T., Koukam, J.C., Bennett, L.J., Baldauf, K.J., Kajiura, H., Fujiyama, K., and Matoba, N., 2013: Rapid and scalable plant-based production of a cholera toxin B subunit variant to aid in mass vaccination against cholera outbreaks. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **7**, e2046.
- Houdebine, L.-M., 2009: Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **32**, 107–121.
- Larsen, J., 2011: Engineering high-level transient expression of heterologous proteins in plant cell suspensions and hairy roots. *Ph.D. thesis at Pennsylvania State Univ. Grad. Sch. Coll. Eng.*
- Ma, J.K., Drake, P.M., and Christou, P., 2003: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 794–805.
- Macleon, J., Koekemoer, M., Olivier, A. J., Stewart, D., Hitzeroth, I.I., Rademacher, T., Fischer, R., Williamson, A.-L., and Rybicki, E.P., 2007: Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1460–1469.
- Matsuda, R., Tahara, A., Matoba, N., and Fujiwara, K., 2012: Virus vector-mediated rapid protein production in *Nicotiana benthamiana*: effects of temperature and photosynthetic photon flux density on hemagglutinin accumulation. *Environ. Control Biol.*, **50**, 375–381.
- McCormick, A. A., 2011: Tobacco derived cancer vaccines for non-Hodgkin’s lymphoma: Perspectives and progress. *Hum. Vaccin.*, **7**, 305–312.
- Miele, L., 1997: Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends Biotechnol.*, **15**, 45–50.
- Paul, M., and Ma, J.K., 2011: Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **58**, 58–67.
- Pogue, G.P., Vojdani, F., Palmer, K.E., Hiatt, E., Hume, S., Phelps, J., Long, L., Bohorova, N., Kim, D., Pauly, M., Velasco, J., Whaley, K., Zeitlin, L., Garger, S.J., White, E., Bai, Y., Haydon, H., and Bratcher, B., 2010: Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnol. J.*, **8**, 638–654.
- Preis, J., 2012: Market incentives for pandemic influenza vaccines. *Ph.D. thesis at Massachusetts institute of technology.*
- Rybicki, E.P., 2009: Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov. Today*, **14**, 16–24.
- Schillberg, S., Fischer, R., and Emans, N., 2003: Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 433–445.
- Shaaltiel, Y., Bartfeld, D., Hashmueli, S., Baum, G., Brill-Almon, E., Galili, G., Dym, O., Boldin-Adamsky, S. A., Silman, I., Sussman, J.L., Futerman, A.H., and Aviezer, D., 2007: Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher’s disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol. J.*, **5**, 579–590.
- Stevens, L.H., Stoop, G.M., Elbers, I.J., Molthoff, J.W., Bakker, H. a, Lommen, a, Bosch, D., and Jordi, W., 2000: Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **124**, 173–182.