

## 遺伝子組換えアルブミンの開発

(株)ミドリ十字

横 山 和 正

### はじめに

組換え DNA 技術は1970年代になって飛躍的な向上を見るが、その源は1973年の S. N.Cohen らの研究<sup>1)</sup>にさかのぼる。その後、1977年に Itakura らは<sup>2)</sup>組換え DNA 技術を利用して、生命体の再プログラムに初めて成功し、脳下垂体の成長ホルモンの分泌を阻害するソマトスタチンというホルモンを合成した。ここに組換え DNA 技術はタンパク質の生産のための技術としてほぼ確立され、医薬品の開発に利用されるようになった。さらに、現在では、外来の遺伝子や細胞を人為的に導入する遺伝子治療やトランスジェニック動物の作製へと進展している。

バイオテクノロジーの普及によって、生体内の成分を発現させることが可能になったが、医薬品として実用化されたものの大部分は、わが国の組換え医薬品の実用化第1号であるヒトンスリンのような微量成分である。これに対し、アルブミンは生体内での含有量が最も多い血漿成分であり、これを遺伝子組換え技術によって医薬品として開発するためには、大量発現・大量培養技術の確立と安全性の面からはきわめて高純度な製剤とする精製技術の確立が必須となる。

ここでは遺伝子操作による医薬品の開発、特に *Pichia pastoris* を宿主に高発現された組換えヒト血清アルブミン (rHSA) の実用化研究の一端を概説する。

### 遺伝子操作で作られた医薬品

欧米および日本で発売されている組換え DNA 技術応用医薬品を表1に示す。これらはホルモン、リンホカイン、ワクチン、血液細胞増殖分化因子、血液凝固線溶因子に分類されるものであり、い

れも1回当たりの投与量はマイクログラムか、多くてもミリグラム単位である。一方、アルブミンの場合はグラム単位で投与されることから、これまでの組換え医薬品に比べると1,000倍~100万倍多く投与されることになる。したがって、rHSA を医薬品として開発するためには、大量発現、大量培養技術の確立と安全性の面からはきわめて高純度な製剤とする精製技術の確立が必須となる。

### 遺伝子組換えアルブミン

#### 1. *Pichia pastoris* と組換え体

我々が rHSA の工業用生産株として使用している *P. pastoris* は、炭素源がメタノールのみから構成される培地においても増殖が可能で、すなわち、メタノール資化能を有する酵母である<sup>3)</sup>。*P. pastoris* は同等の比活性を持つ2個のアルコールオキシダーゼ遺伝子 (*AOX1*, *AOX2*) を持つが、その発現量は *AOX1* のほうが10倍以上多いことが知られている<sup>4,5)</sup>。組換え体作製のための発現ベクターは、ヒト肝臓組織細胞より mRNA を抽出し、HSA cDNA を合成・単離したのち、これを大腸菌ベクター pUC19 上で *P. pastoris* 由来の改良型アルコールオキシダーゼ2 (*mAOX2*) 遺伝子プロモーターと *AOX1* 遺伝子ターミネーターの間に挿入して調製したものである。組換え体はこれを宿主 *P. pastoris* GTS115 株<sup>6)</sup>の染色体上に挿入することによって作製したものである (図1)。

#### 2. 精製 rHSA

rHSA はきわめて高純度な薬剤であり、検出感度 1 ng/ml の酵母成分検出系において、rHSA の 25% 溶液中に宿主に由来する不純物は全く検出されないことを純度の指標の一つとしている。

構造・組成解析においては、全アミノ酸配列が天然のヒト血清アルブミン (pHSA) の配列に一致

表1 組換え DNA 技術応用医薬品

医薬品	発売時期		備考
	日本	欧米	
ヒトインシュリン	1986	1982	世界初の組換え医薬。糖尿病治療薬。
ヒト成長ホルモン	1986	1985	小人症治療薬 N末に Metがつく非天然型。わずかだがアレルギー症状を起こす。
ヒト長ホルモン (第2世代)	1988 1989	1987	天然と同じアミノ酸配列を持つ。
インターフェロン $\alpha$	1988	1986	抗癌剤, B及びC型肝炎治療薬
B型肝炎ワクチン	1988	1987	
t-PA	1991	1987	血栓溶解剤
エリスロポイエチン	1990	1988	貧血治療薬
インターロイキン2		1989	腎臓ガン治療薬
インターフェロン $\gamma$	1992		血管肉腫治療薬
	1990		腎臓ガン治療薬
	1992		菌状息肉腫治療薬
G-CSF		1989	慢性関節リウマチ治療薬
		1990	慢性肉芽腫治療薬
GM-CSF	1991	1991	顆粒球減少症治療薬
血液凝固第VIII因子	1993	1991	骨髄移植後のマクロファージ, 顆粒球増殖薬
インターフェロン $\beta$	1993	1992	血友病Aの治療薬
		1993	再発性多発性硬化症の治療薬

したことから、一次構造は pHSA と同一であることが確認されている。また、34番 Cys 残基はジスルフィド (S-S) 結合に関与せず遊離の状態で存在していること、rHSA のペプシン消化物のペプチドマップは pHSA のそれと同一であることから、17本の S-S 結合は正しく形成されているものと推定された。また、rHSA の生理的機能として色素、薬物および脂酸等との結合活性を測定し、rHSA は pHSA と同等の各種薬物結合活性を有することが確認されている。

### 3. 効力薬理

- 1) 麻酔イヌ大量出血モデルにおける循環不全に対する効果

平均動脈血圧 (MAP) を40mmHg に1時間維持することにより作製した大量出血モデル (心拍出量は約30%にまで減少) において、MAP の回復、心拍出量 (CO) の増加、心収縮機能の指標である LV max dp/dt/p の回復等、rHSA の血漿量維持効果に基づく有効性が認められた。

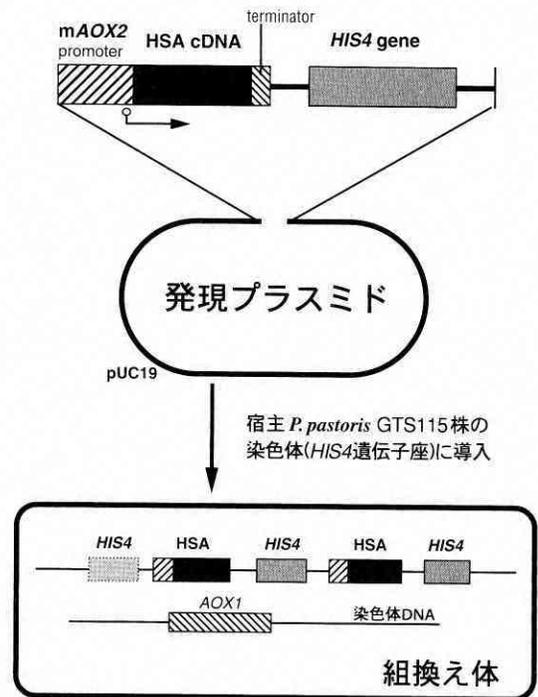


図1 組換え体の作製法

2) 大量出血モデルにおける臓器血流量の変化に対する効果

マイクロスフェア法を用いて各種臓器血流量に対する影響について検討した。30ml/kgの脱血により、MAPは50mmHgにまで低下し、COは著しく減少、ヘマトクリット値は有意に低下した。本モデルに rHSA および pHSA を 1 g/kgの用量で20分間持続的に静脈内投与すると、肺を除く各種臓器血流量はほぼ元の値もしくはそれ以上のレベルにまで回復し、rHSAは低下した臓器血流量を有効に回復させた。

3) ラット交換輸注による血漿量維持効果

ラットを用い交換輸注により Hct を10前後にまで希釈することにより、薬剤の血漿量維持効果を動物の生死により判定した。生理食塩液および電解質輸液を用いて交換輸注を行った場合、10例中9例の動物は10時間以内に死亡した。一方、5%の rHSA および pHSA による交換輸注を行った動物群においては、それぞれ10例中1～3例に死亡がみられたにすぎず、両アルブミン製剤の血漿量維持効果が認められた(図2)。

4. 薬物動態

イヌおよびラットの静脈内投与において、血漿中濃度推移は2相性の推移を示し、消失相(β相)の半減期はイヌでは6～7日、ラットではイヌに比べ消失が速やかであり、20時間程度であった。いずれの動物でも対照の pHSA の血漿中半減期と有意な差はなかった。

開発の現況

rHSAは2000年までに市場に登場できる予定であり、現在臨床第Ⅲ相試験を実施中である。臨床試験は1993年7月より第Ⅰ相試験を、1994年2月より出血性ショック領域と肝硬変領域を対象に第Ⅱ相試験を行い、安全性と有効性が確認されている。第Ⅲ相試験においては肝硬変での比較試験を中心に、ネフローゼ、熱傷等の疾患における安全性と有効性の評価を行う計画である。

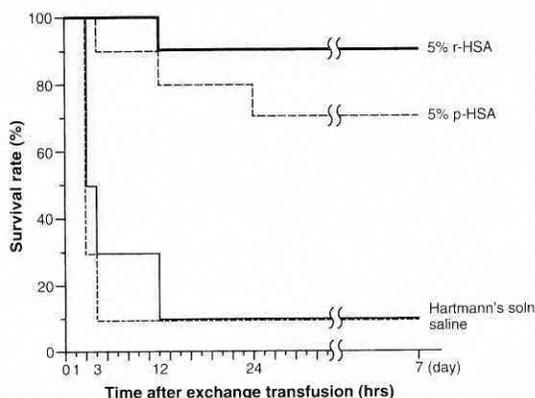


図2 交換輸注後の生存率

文 献

- 1) Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW et al : Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Pro Natl Acad Sci USA (1973) 70, 3240.
- 2) Itakura K, Hirose T, Crea R et al : Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science (1977) 198, 1056.
- 3) Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M : A yeast capable of utilizing methanol. Agric Biol Chem (1969) 33, 1519-1520.
- 4) Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ et al : Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast Pichia pastoris. Mol Cell Biol (1989) 9, 1316-1323.
- 5) Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ et al : Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast Pichia pastoris. Mol Cell Biol (1985) 5, 1111-1121.
- 6) Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY et al : Pichia pastoris as a host system for transformations. Mol Cell Biol (1985) 5, 3376-3385.