

令和元年6月11日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08093

研究課題名(和文) ゲノム編集ニワトリを用いたヒト抗体医薬大量生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of human therapeutic antibody production technologies using genome edited chicken

研究代表者

大石 勲 (Oishi, Isao)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：50314472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低コストのヒト抗体医薬生産法開発を目指し、鶏卵内にヒト抗体を発現する遺伝子改変ニワトリの開発を行った。ゲノム編集技術を用い、ニワトリ始原生殖細胞のオボアルブミン翻訳開始点にヒト抗体遺伝子をノックインした。この細胞をレシピエント胚に移植しG0生殖巣キメラニワトリを樹立した。この後代にIgGノックインニワトリを得た。ノックインニワトリ由来卵は卵白にヒトIgGタンパク質を含んでいた。更にその大部分は抗原認識能を有していたことから、本研究で開発した鶏卵バイオリアクターが低コストの抗体医薬生産法になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品はその高い有効性や低い副作用から近年大幅な市場拡大が続いている。また、今後も多くの製品の開発、上市も見込まれている。これらバイオ医薬品は遺伝子組換え培養動物細胞を用いて生産されているが、極めて高額な設備投資費や生産管理費に加え、細胞を用いることによって生じる多くの特許使用料などが原因となり、高額な薬価を余儀なくされている。今回の研究で行った組換えニワトリや鶏卵を用いた抗体医薬生産はこれら問題を回避し、低コストでの製品製造を可能にする技術につながると強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming to develop a cost-effective production method of therapeutic antibody, we tried to generate genetically modified chicken which will produce humanized therapeutic antibody in their laid eggs. We integrated human immunoglobulin gene at translation initiation site of ovalbumin gene in chicken primordial germ cells by genome editing. We established G0 germline chimera by transplantation of the knocked-in cells to recipient embryos. We obtained IgG gene knocked-in hens as progeny of the chimera chickens. Eggs from knocked-in hens contained human IgG protein in the egg white. Furthermore, the most of IgG recognized antigen suggesting that chicken egg bioreactor developed in this study is expected be a cost-effective production method of therapeutic antibody.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 ニワトリ 遺伝子組換え 組換えタンパク質 バイオプロセス

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品は今世紀世界で最も成功した医薬品であり、様々な製品が製造、販売されているとともに、これからも画期的な新薬上市が期待される。一方、バイオ医薬品は高い生産コストが大きな問題であり、健康社会の実現に向けてこの問題の解決が必要である。高い生産コストの主要因は培養動物細胞を用いるのに必要な培養プラント設備費や管理費、知財利用料にあり、培養細胞に依存しない安価なバイオ医薬品の生産技術が求められている。この問題の解決に向けて、培養細胞を使用しない遺伝子組換えによる動植物のバイオリアクター化(いわゆる生物工場)は魅力的な新技術である。国内外でイチゴ果実やタバコの葉、ヤギや牛、ウサギの乳汁、蚕の絹糸等に組換え抗体やバイオ医薬品を生産する技術が進められており、実際に医薬品として承認、上市されるものも出てきている。

鶏卵は古くから物価の優等生と呼ばれるほど低コストで生産が可能であり、多くのタンパク質を含んでいる。特に卵白はタンパク質と水分を主な構成要素とするため、卵白内に組換えタンパク質を発現することができればニワトリを優れた生物工場として利用可能であると考えられていた。実際、鶏卵バイオリアクターを目指した 20 種類近いの遺伝子組換えニワトリがこれまでに作製されている。しかし、ニワトリは受精直後の初期胚へのアクセスが困難であるため、これら組換えニワトリは放卵後の胚に対するウイルスベクター感染によって樹立された。ウイルスベクターを使用した場合、外来遺伝子の挿入部位はランダムなものになるため、遺伝子サイレンシングなど発現の低下が懸念される。また、適切に遺伝子が導入された細胞が配偶子分化するかはコントロールすることができないため、感染初代(G0)とそれ以降では発現効率が大きく低下することが予想される。さらに導入遺伝子サイズに制限があること、このため卵白内に特異的、安定的かつ効率よく発現させるプロモーターが開発されていないといった問題があった。これら問題により、これまでに開発された組換えニワトリの産む卵において外来遺伝子産物の発現は認められるものの、多くの場合発現量は限定的であり、卵 1 個あたり数 mg 以下のものがほとんどであった。また、例外的に高い発現量を示すニワトリも後代にその性質を受け継ぐことが出来ていない。

これら問題の解決のためには、ウイルスベクターに依存しない遺伝子組換えニワトリの樹立技術が必要であった。我々はこれまでに始原生殖細胞を用いて組換えニワトリを樹立する技術の研究を行ってきた。これにより、ウイルスベクター感染と異なり G0 世代とその後代で外来遺伝子導入状況が均質な状況を作れるとともに、ニワトリへの大型の外来遺伝子の導入が可能となった。更に、始原生殖細胞を用いることでゲノム編集のニワトリへの適用が可能になると考えられた。特に、鶏卵バイオリアクターに関してはオボアルブミンなど主要な卵白タンパク質の遺伝子座に外来遺伝子をノックインすることにより卵白内への外来遺伝子産物の効率的な生産が期待された。本研究を開始するにあたり、始原生殖細胞を用いた組換えニワトリの樹立に成功し、またオボアルブミン翻訳開始点にヒトインターフェロン $\gamma$ をノックインしたニワトリを樹立したが、鶏卵内への外来遺伝子発現や活性、継代に伴う発現量の変動などは不明であった。また、同様の遺伝子ノックインによってヒト抗体のような複合体分子の発現が可能か、その分子機能はどうかといった点についても未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、本研究は組換え鶏卵内にヒト抗体医薬を大量生産する技術の開発を目指す。当該研究期間内に、オボアルブミン遺伝子座へのヒト抗体医薬遺伝子ノックインニワトリを樹立し、これを用いて鶏卵内へのヒト抗体医薬生産と検証を目指す。また、すでに個体樹立に成功しているヒトインターフェロン $\gamma$ ノックインニワトリ由来の卵における組換えタンパク質生産や活性の検討を行い、ヒト抗体生産卵で得られた知見と比較することにより、鶏卵バイオリアクター技術の有効性や課題点を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 3-1. ヒト抗体発現系の構築とニワトリ始原生殖細胞への遺伝子ノックイン

ヒト抗体医薬モデルとしてアミノ酸配列が公開されている抗乳がん腫瘍ヒト抗体トラスツマブ(ハーセプチン)を発現するノックインベクターを構築し、雄ニワトリ 3 日胚の血液より樹立された始原生殖細胞株のオボアルブミン翻訳開始点に対し、CRISPR/Cas9 法により遺伝子ノックインを行った。ノックインベクターはオボアルブミン翻訳開始点 2.8kb 上流と 3.0kb 下流を相同組換え領域とし、その間に重鎖と軽鎖を 2A ペプチド配列で繋いだ抗体遺伝子と選択マーカー(ピューロマイシン)発現遺伝子を含んでいる(図 1)。始原生殖細胞に CRISPR/Cas9、ドナーベクターを遺伝子導入し薬剤選択によりノックイン細胞を選択、樹立した。樹立細胞のゲノムを回収し、ノックイン細胞が含まれることを PCR 法により確認した。

### 3-2. ヒト抗体ノックインニワトリの樹立

樹立した細胞をを培養し、ニワトリ 2.5 日胚(HH14)の血液中に移植した。レシピエント胚を孵化・性成熟させ、ノックイン後代を得るための生殖巣キメラニワトリ(G0)とした。性

成熟後野生型の雌ニワトリと交配し、後代の遺伝型を PCR で決定した。

### 3-3. ヒト抗体遺伝子ノックインニワトリ由来卵の解析

得られたノックインニワトリを性成熟させ、雌から卵を得た。割卵し、卵白におけるヒト抗体の発現を抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。また、ヒト免疫グロブリンに対する ELISA により卵白におけるヒト抗体の発現量について解析を試みた。加えて発現したヒト抗体の抗原認識能に関して抗原であるヒト Her2 を用いた ELISA により検討を行った。

### 3-4 ヒトインターフェロン ノックインニワトリ由来卵の解析

鶏卵内に発現させたヒト抗体と比較を行う目的で先行して作製したヒトインターフェロン ノックインニワトリ由来卵の解析を行った。卵の性状の解析やインターフェロンの発現について検討を行うとともに、レポーターアッセイにより発現タンパク質の活性の解析を行った。更に、活性を高める方法等についても研究を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. ヒト抗体発現系の構築とニワトリ始原生殖細胞への遺伝子ノックイン

オボアルブミンの遺伝子構造、ドナーコンストラクト、及びノックイン後の遺伝子構造の模式図を (図 1 150618) に示す。また、ノックインが適切に起こったか判別する PCR 用のプライマー (P1-P8) を示す。遺伝子導入後ピューロマイシンで選択した始原生殖細胞を増殖後、ゲノム DNA を回収し、ノックインの成否について 5' 領域および 3' 領域の PCR を行った。(図 2) に示すようにノックイン細胞が樹立始原生殖細胞の中に含まれることが明らかとなり、これをドナー細胞として生殖巣キメラニワトリの樹立を行った。

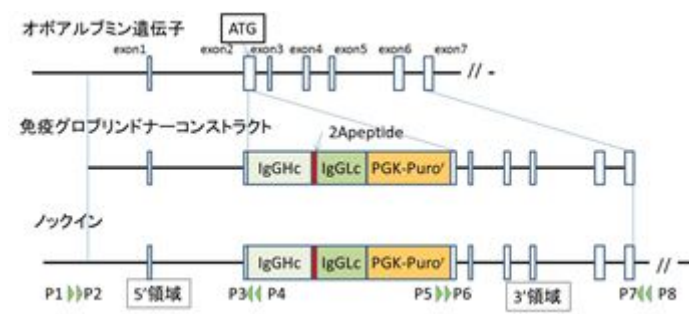


図 1. ヒト抗体遺伝子ノックインのデザイン  
オボアルブミン遺伝子 exon2 に存在する翻訳開始点にドナーコンストラクトを CRISPR/Cas9 法によりノックインする。ノックインの成否は 5' 領域 (P1-P4) 3' 領域 (P5-P8) を増幅するプライマーによる PCR で確認する。

### 4-2. ヒト抗体ノックインニワトリの樹立

樹立細胞を約 2000 個/embryo として初期胚血液中に顕微注射により導入した。ヒヨコを孵化、飼育し、これを G0 生殖巣キメラとして G1 後代を得た。G1 個体羽軸を用いた PCR により genotyping を行い、ノックイン個体を複数得た (図 3)。

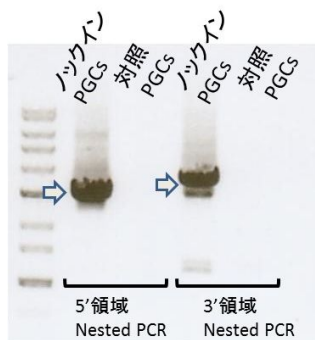


図 2. ニワトリ始原生殖細胞の genotyping  
5' 領域 (P1-P4 による nested PCR) 3' 領域 (P5-P8 による nested PCR) いずれにおいてもデザインどおりにドナーベクターがノックインされた細胞があると予想される。

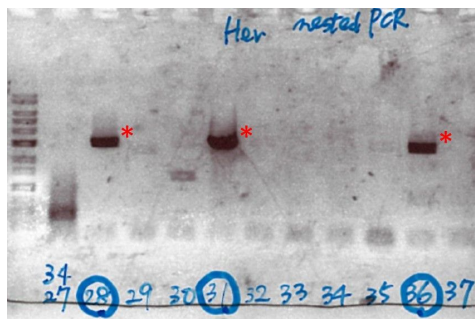


図 3. ノックインニワトリ (G1) の genotyping  
生殖巣キメラ (G0) の後代を得て、羽軸細胞由来ゲノムを P1-P4 により nested PCR 増幅した。複数 (写真中では \* 印の 3 羽) 個体で遺伝子ノックインが認められる。

### 4-3. ヒト抗体遺伝子ノックインニワトリ由来卵の解析

ヒト抗体ノックイン雌個体を性成熟させ、卵を得た。まれに卵白の一部白色の沈殿物を認める場合があるが、外見上は野生型の卵と大きな違いは認められない(図4)。卵白を SDS-PAGE 後抗ヒト抗体( )を用いて western blotting を行った。非還元状態で分子量 190KDa 程度の移動度にバンドが認められ、重鎖 2 軽鎖 2 からなる四量体の全抗体が得られていると考えられる(図5)。

次に卵白内ヒト抗体量について ELISA (Bethyl 社 human IgG quantitation kit)により解析を行なった。卵白における抗体濃度は 1mg/ml と見込まれ、鶏卵 1 個に含まれる抗体量は約 20mg 程度と考えられた。

最後に抗原認識能について抗原 Her2 を用いた ELISA(Matriks Biotek 社 Trastuzumab ELISA)により検討したところ、Trastuzumab 製品を対照とし卵白の抗体は 0.8-1.2mg/ml と見込まれ、得られた抗体の大部分が抗原認識能を有すると期待される。

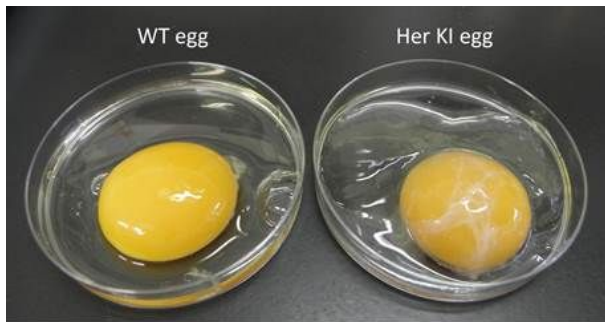


図4. ヒト抗体ノックインニワトリ由来卵野生型(左) ノックインニワトリ由来(右)の卵 ノックイン卵は卵黄周辺に若干白濁した部位を含む場合がある。

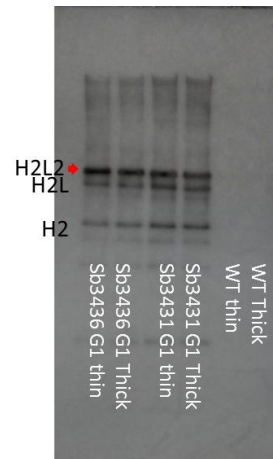


図5. ノックインニワトリ由来卵は4量体ヒト抗体を含む。野生型(右2レーン) ノックインニワトリ由来(左4レーン)の卵白の濃厚卵白(Thick) 水様性卵白(thin)を非還元条件下で SDS-PAGE 後抗ヒト IgG 抗体を用いて western blotting を行った。

#### 4-4 ヒトインターフェロン ノックインニワトリ由来卵の解析

ヒト抗体と同様にニワトリオボアルブミン翻訳開始点にヒトインターフェロン をノックインしたニワトリについて、鶏卵が得られたので解析し、抗体との比較を行った。割卵像は抗体ノックイン卵と大きく異なり、卵黄周辺の卵白は強く白濁していた(図6)。卵白白濁部とそれ以外に分けて SDS-PAGE 後、抗ヒト抗体を用いて western blotting を行った。卵白白濁部では精製品の組換えヒトインターフェロン と同じ移動度の 30KDa 付近の移動度に強いシグナルが認められ、ヒトインターフェロン が高発現していると考えられた(図7)。シグナルは2本見られ、下方は糖鎖修飾を受けていないコアタンパク質と予想される。卵白におけるインターフェロンの濃度を ELISA (社 human IgG quantitation kit)により解析したところ、1.9-3.5mg/ml であり、鶏卵 1 個に含まれる組換えインターフェロン タンパク質量は約 30-60mg 程度と考えられた。

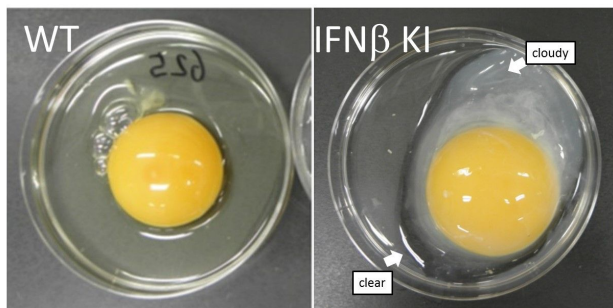


図6. ヒトインターフェロン ノックインニワトリ由来卵野生型(左) ノックインニワトリ由来(右)の卵 ノックイン卵は卵黄周辺に大量の白濁した部位(cloudy)を含む。濃厚卵白はすべて白濁している。辺縁に透明な水様性卵白(clear)が一部認められる。

r-hIFN $\beta$  WT IFN $\beta$  KI

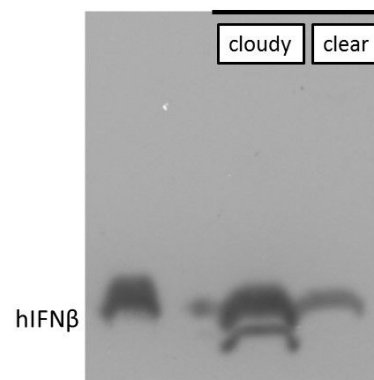


図7. ノックインニワトリ由来卵はヒトインターフェロンを含む。市販組換えインターフェロン(レーン1)野生型卵白(レーン2) ノックインニワトリ卵白の白濁部(レーン3)および透明部(レーン4)を SDS-PAGE 後抗ヒトインターフェロン 抗体を用いて western blotting を行った。



最後にインターフェロンの生理活性についてレポーター解析 (Invivogen 社 HEK-Blue™ IFN-α/β Cells) により検討した。その結果、ノックイン鶏卵の卵白では総重量の 5% 程度の活性に留まることが明らかとなった。白濁が生じていることと合わせると、生産されたインターフェロンが凝集や misfold を起こしていると予想される。実際、ノックイン卵白をグアニジン塩酸塩を用いて変性し、ケミカルシャペロン (Takara bio 社 CA refolding kit) を用いて再構成したところ 100% の活性を回復した (図 8)。これらのことから、生産するタンパク質の種類によって得られる性状が異なることが考えられる。

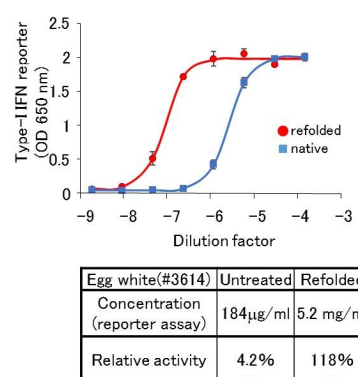


図 8. 卵白のインターフェロン 生理活性  
ノックイン卵白を未処理 (青、Untreated) および変性後再構成 (赤、Refolded) したものを連続希釈しレポーター活性を測定した。未処理時に 5% 程度だった活性は処理後完全に回復した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens., Scientific Reports. Oishi Isao, Yoshii Kyoko, Miyahara Daichi, Tagami Takahiro 8 #10203 (2018) DOI: 10.1038/s41598-018-28438-2

〔学会発表〕(計 13 件)

Chicken genome editing using primordial germ cells. 17thAAAP animal science congress. Isao Oishi, (2016)

家禽ゲノム編集と産業応用への展望 日本家禽学会公開シンポジウム 大石勲 (2016)

家禽ゲノム編集による新育種技術ならびに 新たな養鶏産業の創出 アグリビジネス創出フェア 大石勲 (2016)

ゲノム編集による遺伝子 ノックインニワトリの開発 日本家禽学会 大石勲 (2017)

始原生殖細胞を用いたニワトリゲノム編集 日本ゲノム編集学会 大石勲 (2017)

バイオ医療技術に資するニワトリゲノム編集技術の開発と展望 関西バイオ医療研究会 大石勲 (2017)

ゲノム編集技術による遺伝子ノックアウトニワトリの作製と解析 日本分子生物学会 大石勲 吉井京子 田上貴寛 (2017)

Gene targeting of egg white allergen gene in chicken using CRISPR/Cas9 system. International Forum on Avian Germplasm and Genome Editing 2017 Isao Oishi, (2017)

ゲノム編集による遺伝子ノックインニワトリの解析 日本家禽学会 大石勲 吉井京子 田上貴寛 (2018)

ニワトリゲノム編集と鶏卵への組換え蛋白質の生産 日本化学工学会 大石勲 (2018)

④ Chicken genome editing using primordial germ cells -Creating low allergenic eggs and golden eggs. The International Egg Symposium in KYOTO 2018 Isao Oishi, (2018)

ニワトリゲノム編集～低アレルギー卵と金の卵の開発、展望～ 四国オープンイノベーションワークショップ 大石勲 (2018)

鶏卵バイオリクター ～「金の卵」による組換え蛋白質生産技術～ 関西スマートセルフォーラム 大石勲 (2018)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。