

平成 21 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760555
 研究課題名（和文） トランスジェニック鳥類による高活性型ヒトエリスロポイエチンの卵黄での生産
 研究課題名（英文） Production of recombinant human erythropoietin/Fc fusion protein in egg yolk of transgenic chickens
 研究代表者
 河邊 佳典（KAWABE YOSHINORI）
 九州大学・大学院工学研究院・助教
 研究者番号：30448401

研究成果の概要：

本研究では糖タンパク質であるヒトエリスロポイエチン(hEpo)をニワトリ卵黄へ移行蓄積できる Fc 領域との融合タンパク質とすることで、糖鎖構造を制御できると考え、hEpo/Fc 融合タンパク質を生産する遺伝子導入ニワトリの作製を行った。作製したニワトリが生産した hEpo/Fc のバイオアッセイを行ったところ、ニワトリ卵黄由来 hEpo/Fc は卵白由来よりも血清由来 hEpo/Fc の性質に類似しており、高活性型となっていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：トランスジェニック鳥類 ヒトエリスロポイエチン レトロウイルスベクター
 Fc 融合タンパク質 卵黄移行 WPRE

1. 研究開始当初の背景

(1) トランスジェニック動物バイオリクターは、近年急激な需要に対する次世代の生産システムとして期待されており、なかでもニワトリなどの鳥類は大型哺乳動物に比べて多くの利点があるため、その卵中にバイオ医薬品を生産させる方法が注目されている。これまで数年来、申請者のグル

ープも含めて世界中の多くの研究チームより様々なアプローチで実用を目指したトランスジェニック鳥類作製法の技術開発が行われてきたが、組換えタンパク質を実用レベルで生産するトランスジェニック鳥類を作製した報告はなかった。
 (2) 近年申請者らは、遺伝子導入法としてレトロウイルスベクターを用いて鳥類胚体

へ遺伝子導入し、レポーター遺伝子の導入遺伝子発現を最大化するための最適条件を決定した。実用タンパク質生産としてFc融合型一本鎖抗体の生産を試み、卵中での生産量を解析したところ~mg/mlという非常に高い濃度で生産し続けた。導入遺伝子は子孫への伝播も可能であり、高発現が観察された。他の組換えタンパク質としてモノクローナル抗体やヒトエリスロポイエチン(hEpo)を生産する遺伝子導入ニワトリを作製してきた。

2. 研究の目的

- (1) 実用レベルの生産性に達する遺伝子導入鳥類の作製に成功したが、目的タンパク質の生理活性に重要な影響を与える糖鎖構造を解析した結果、ニワトリ血清中で生産された組換え抗体の糖鎖構造は末端シアル酸まで修飾された構造であるに対して、ニワトリ卵白由来組換え抗体ではガラクトースの付加までとなっていた。また、糖タンパク質である hEpo を生産するニワトリを作製し、ニワトリが生産した hEpo のバイオアッセイを行ったところ血清由来 hEpo は卵白由来 hEpo よりも活性が高かった。そのため、血清中で生産された hEpo を卵中で回収することを目的として研究を行った。
- (2) 申請者らは目的タンパク質をFc融合タンパク質とし、産卵ニワトリの血中に投与すると、卵子上のFcレセプターを介して卵黄へ移行蓄積されることを見出している。そこでhEpoをFc融合タンパク質として遺伝子導入ニワトリに生産させ、卵中で回収できると考えて、Fc融合型hEpo(hEpo-Fc)を生産する遺伝子導入ニワトリの作製を行った。

3. 研究の方法

- (1) hEpo-Fc 発現用レトロウイルスベクターの作製
申請者らはこれまでにヒトIgG由来Fc融合タンパク質を卵黄に移行させる際、ヒトIgGサブクラスとしてIgG2が最も移行蓄積

できることを見出していた。そのため、遺伝子組換えによりhEpoをコードする遺伝子とヒトIgG2由来ヒンジ領域を含むFc領域とを融合させ、目的遺伝子であるhEpo-Fc遺伝子を作製した。hEpo-Fcはニワトリβアクチンプロモーターで制御される発現ユニットとしてウイルスベクター生産用プラスミド(pMSCV)に組込んだ。

- (2) hEpo-Fc 発現用レトロウイルスベクターの調製と鳥類胚への遺伝子導入および胚培養
ウイルスベクターを高いウイルス力価で生産させるために、まずGP293パッケージング細胞を樹立した。細胞樹立後、ウイルス外皮タンパク質としてVSV-Gを用いるために同遺伝子発現ベクター(pVSV-G)を一過性で導入して発現させることで、培養上清中にウイルスを生産させた。
ウイルス生産後、超遠心により高濃縮することで鳥類胚へ遺伝子導入するためのウイルス溶液を調製した。調製したウイルス溶液を適切な胚発生ステージの鳥類胚に微量注入することで遺伝子導入を行った。その後、操作個体を胚培養により孵化させ、hEpo-Fcを発現する遺伝子導入ニワトリを作製した。
- (3) 遺伝子導入ニワトリが生産したhEpo-Fcの解析
作製した遺伝子導入ニワトリの遺伝子導入の有無を確認するために、孵化個体から採血しゲノムDNAを抽出後、PCR法により解析した。採血後回収した血清中およびメンドリが性成熟後産卵した卵中に生産されたhEpo-FcをELISA法により定量した。血清、卵白、卵黄で生産されてhEpo-FcをプロテインAビーズにより精製した後、ウエスタンブロット法およびレクチンブロット法により分子量サイズおよび糖鎖結合様式を評価した。ニワトリが生産したhEpo-FcのバイオアッセイをEpo依存性細胞の細胞増殖応答を測定することで行った。

4. 研究成果

- (1) WPREによるウイルス力価の向上

トランスジェニック鳥類を高効率で作製するためには、高力価ウイルス溶液を調製する必要があることが我々のこれまでの報告でわかっている。そのため、hEpo の cDNA をウイルスベクターに組み込み、ウイルス力価および発現を測定したところ genomic DNA と比較して、低かった (data not shown)。そのため、ウイルスベクターの力価を向上させる WPRE を hEpo および hEpo/Fc 遺伝子に対して導入した。その結果、導入前と比較して、ウイルス力価がどちらの遺伝子においても約 10 倍向上した。遺伝子発現も WPRE 導入有り無しで比較したところ、hEpo において 6 倍、hEpo/Fc において 2 倍の増加が見られた。そのため、遺伝子導入

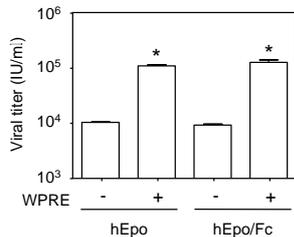


Fig.1 WPRE によるウイルス力価
ニワトリ作製には WPRE 挿入ウイルスベクターを使用することとした。

(2) hEpo/Fc を発現する遺伝子導入ニワトリの作製

ニワトリβ-アクチンプロモーター制御下で発現する hEpo/Fc 遺伝子が組み込まれたレトロウイルスベクターをニワトリ胚へ遺伝子導入した。4 回計 74 羽のニワトリ胚にウイルス溶液を 1.5-4.0μl 微量注入した。遺伝子導入後、孵化するまで、培養し続けた。ウイルス力価は 0.11-2.2 × 10⁸ IU/ml のものを使用し、孵化率は平均 28%であった。孵化したニワトリでは異常はみられず成長し、メスにおいては性成熟後産卵を開始した。遺伝子導入ニワトリの血清中および卵中における長期発現を ELISA 法により測定した。その結果、飼育期間中安定して生産し続けた。血清、卵白および卵黄における生産量は、それぞれ 27-144、9-66、12-41 μg/ml (Fig.1)であった。このことは卵を含めた全身で鳥類に対して毒性なく hEpo/Fc を発現できたことを意味している。これまで哺乳類バイオリアクターにおいては hEpo の発現で動物生理を乱し、毒性を与えることが報告されていることから、鳥類は哺乳類と比較してヒトサイトカインやホルモンなどの生産のための動物工場として有利であることがわかった。また、Fc 非融合型の hEpo においては卵黄で発現がみられなかったことから hEpo/Fc の Fc 領域により卵黄での生産に成功した。

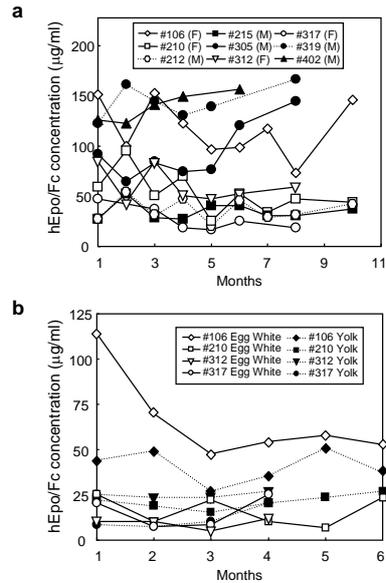


Fig.2 ニワトリによる hEpo/Fc の生産

(3) 遺伝子導入ニワトリが生産した hEpo/Fc の解析

ニワトリの血清、卵白、卵黄で生産されて hEpo-Fc をプロテイン A ビーズにより精製した後、ウエスタンブロット法により解析した。その結果、卵白由来 hEpo/Fc は血清および CHO 細胞由来のものと比較してわずかに分子量が低く検出された。また、卵黄においては複数の分子量サイズでバンドが検出された。低分子量サイズのバンドは Fc 領域のサイズと思われ、血清からの卵黄移行の際に Fc 領域において切断を受けたものと考えられる。これは我々がこれまで報告した結果と一致しており、融合部位における配列をさらに考慮する必要があることがわかった。

我々はこれまでニワトリが生産した hEpo の糖鎖構造を解析した結果、血清と卵白間で異なっていることがわかっているため、ニワトリの血清および卵中で生産された hEpo/Fc の糖鎖構造をレクチンブロット法により解析した。その結果、ニワトリ由来サンプルすべてにおいて ECA レクチンを認識したことから末端ガラクトースを N 結合型糖鎖構造に付加されていることがわかった。MAM および SSA レクチンを用いた結果、血清および CHO 細胞由来 hEpo/Fc では α-3 結合シアル酸残基が含まれていることがわかった。一方 CHO 細胞由来のものでは α-2-6 結合シアル酸残基が含まれていなかった。これは CHO 細胞には α-2-3 結合シアル酸を修飾する転移酵素しか発現していないことと一致している。α-2-6 結合シアル酸残基は血清由来 hEpo/Fc とわずかではあるが卵黄由来 hEpo/Fc にも含まれていた。

最後に、ニワトリが生産した hEpo/Fc のバ

イオアッセイを Epo 依存性細胞により解析した(Fig.2)。その結果、血清、卵白、卵黄およびCHO細胞由来EC50値はそれぞれ28.4、0.89、33.5、42.9mIU/ml となり、卵黄由来 hEpo/Fc は血清およびCHO細胞由来 hEpo/Fc と同程度の活性を示した。これらのことから、卵黄由来 hEpo/Fc は血清由来 hEpo/Fc が卵黄移行して蓄積したものを裏付けるものであり、血清中に生産された高活性型 hEpo/Fc を卵黄で回収可能であることに成功した。

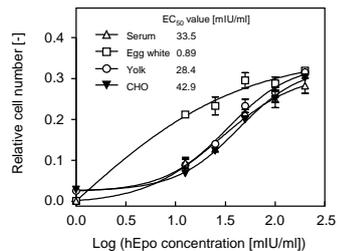


Fig.3 ニワトリ由来 hEpo/Fc のバイオアッセイ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計6件)

- (1) 河邊 佳典、ペーノ カルロス、井藤 彰、上平 正道
遺伝子導入ニワトリが生産した Fc 融合型ヒトエリスロポイエチンの解析
化学工学会第74年会 2009年3月 横浜
- (2) Penno CA, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M
Generation of genetically manipulated chickens producing human erythropoietin/Fc fusion protein
The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Associated for Animal Cell Technology
Nov. 2009 Fukuoka
- (3) Penno CA, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M
Generation of genetically manipulated chickens producing Epo/Fc fusion protein
第60回日本生物工学会 2008年8月 仙台
- (4) 河邊 佳典、ペーノ カルロス、井藤 彰、上平 正道
遺伝子組換えニワトリによるヒトエリスロポイエチン Fc 融合タンパク質の生産
化学工学会沖縄大会 2008年8月 那覇
- (5) Penno CA, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M

Generation of transgenic chickens for the production of human erythropoietin/Fc fusion protein

第45回化学関連支部合同九州大会 2008年7月 小倉

- (6) 河邊 佳典、ペーノ カルロス、井藤 彰、上平 正道
Fc 融合型ヒトエリスロポイエチンの動物細胞での生産
第59回日本生物工学会 2007年9月 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河邊 佳典 (KAWABE YOSHINORI)
九州大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号; 30448401