

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20H00322
研究課題名（和文）バイオ医薬品生産細胞構築の統合アニマルセル・エンジニアリングシステムの開発

研究課題名（英文）Development of integrated animal cell engineering system for biopharmaceutical production

研究代表者
上平 正道（Kamihira, Masamichi）
九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：40202022
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,800,000円

研究成果の概要（和文）：これまで開発してきた動物細胞を対象とした遺伝子改変技術をベースとして、バイオ医薬品や細胞医薬品生産のための機能細胞作製のためのセル・エンジニアリングサイクルを構築した。これにより、動物細胞の機能改変をシステム化することが可能となった。さらに、セル・エンジニアリングにおけるオリジナルな要素技術の開発として、新規ホスト細胞の開発、人工遺伝子発現制御システムの開発、人工染色体を使ったトランスジェニックニワトリ作製、トランスジェニックニワトリ作製のための胚操作技術の開発に取り組み、これらを応用したバイオ医薬品生産や機能細胞作製を行った。機能デザインに基づいた細胞やニワトリの作製が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
バイオ医薬品や細胞医薬品は、高い有効性から急速に品目の拡大が進んでいる。しかし、これらの革新的な先進医療を誰もが恩恵を受けられる一般的な治療法とするためには、コスト低減のための技術開発が必要である。動物細胞を用いたバイオ医薬品や細胞医薬品生産のコスト低減においては、安全性を担保しながら物質生産用の細胞あるいは治療用の細胞をいかに効率よく作り出せるかが重要である。本研究では、機能細胞作製のシステム化と新しいセル・エンジニアリング技術の開発に取り組んだ。本研究の成果は、バイオ医薬品や細胞医薬品の効率的な生産や将来的なコストの低減に資するものである。

研究成果の概要（英文）：Based on the gene engineering technology for animal cells that we have developed, we have constructed a cell engineering cycle for the production of functional cells used in biopharmaceutical production and cellular medicines. This has enabled the systematization of functional modification of animal cells. Additionally, as part of the development of original elementary technologies in cell engineering, we have worked on developing new host cells, creating artificial gene expression control systems, producing transgenic chickens using primordial germ cells, and advancing embryo manipulation technology to generate transgenic chickens. We have applied these efforts to the production of biopharmaceuticals and the creation of functional cells, making it possible to design and create cells and chickens with specific functions.

研究分野：生物・生体工学

キーワード：バイオテクノロジー バイオ医薬品 動物細胞 セルエンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

動物細胞培養による物質生産は、微生物では生産させることが困難な、生理活性を有するタンパク質やモノクローナル抗体などの生産が行えることから、工業規模での医薬品タンパク質やワクチンなどのバイオ医薬品生産において欠くことができない方法になっている。特に、1990年代後半からはがんやリウマチの治療のための抗体医薬が次々と上市されるようになり、2016年には、全世界の医薬品売り上げ上位10品目のうち、6品目が抗体医薬品となっている。遺伝子治療の分野においても、遺伝子治療用ウイルスベクターの生産には培養動物細胞が使われており、2017年には、患者由来のT細胞をウイルスベクターにより遺伝子的に改変して治療に使う細胞医薬品(Chimeric Antigen Receptor T-Cell, CAR-T)が、リンパ腫の治療薬としてアメリカ食品医薬品局(FDA)により認可され、臨床に使われている。我が国においても2019年に承認を受け、遺伝子組換えされた細胞医薬品の臨床応用が今後進むものと思われる。これらの革新的な先進医療を誰もが恩恵を受けられる一般的な治療法とするためには、コスト低減のための技術開発が必要である。

動物細胞を用いたバイオ医薬品や細胞医薬品生産のコスト低減において重要と考えられることは、安全性を担保しながら物質生産用の細胞あるいは治療用の細胞をいかに効率よく作り出せるか、ということである。このためには、目的の機能を持った細胞の作製をシステム化することが必要である。現在、実際に使われている遺伝子工学的な手法による機能改変された動物細胞の樹立では、多くの場合、プラスミドベクター(バイオ医薬品)やウイルスベクター(細胞医薬品)を用いて遺伝子導入を行い、細胞染色体に目的遺伝子が組み込まれた細胞を取得して、得られた細胞群の中から多大な労力を使って目的の性能を有する細胞を選び出すことで行われており、試行錯誤的な部分も多く、合理的な細胞設計に基づいて作製される場合はほとんどない。その理由として、動物細胞は、大腸菌などの微生物より複雑なメカニズムを有しているため、機能解析や精緻な改変のための効率的な技術が整っていないという側面がある。しかし近年では、遺伝子配列解析の大規模・低コスト化やゲノム編集技術の開発によって、機能設計に基づいた動物細胞の改変が短期間に行えるようになってきており、あらかじめ機能を設計された遺伝子回路を染色体上の望みの部位に効率よく導入することが可能となっている。我々はこれまで、人工遺伝子回路を設計・作製し、動物細胞に導入することで新たな機能細胞を作るための技術や、動物細胞染色体に目的遺伝子を効率よく組み込むための技術を開発してきており、開発した技術を統合したアプローチがうまく機能することを証明してきた。

一方で、抗体医薬の生産品目の多様化にともなって細胞培養による生産能力の限界といった問題が指摘されるようになり、細胞培養にかわるバイオ医薬品生産のための新しいプラットフォームの開発が求められている。1990年代より、バイオ医薬品生産の新たなプラットフォームとして、遺伝子改変個体(トランスジェニック動物)による生体バイオリクターが注目されてきた。ヤギやヒツジといった大型哺乳動物の乳汁中に生産させるシステムは、技術的にはほぼ確立されており、アンチスロンピンやアンチトリプシンの生産が行われている。哺乳類乳汁中での生産よりさらにスペース効率が高く安価に生産するシステムとして、トランスジェニック(TG)ニワトリの卵への生産のための技術開発が行われている。哺乳類乳汁への生産システム開発と同時期より検討が進められており、哺乳類のシステムと比べて実用化が遅れていたが、2015年にウォルマン病治療薬としてTGニワトリにより生産されたセベリパーゼ(Kanuma)がアメリカFDAにより初めて認可され、今後の生産品目の拡大が期待されている。現在、物質生産に実用化されているトTGニワトリ作製法は、ウイルスベクターを用いたもので、遺伝子導入効率の高いものの染色体への導入部位がランダムであるため、多数の遺伝子導入個体から生産に適した個体を選ぶ必要がある。近年では、将来生殖系列(卵子、精子)の細胞となる始原生殖細胞(PGC)の培養が可能となり、ゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9を使った遺伝子ノックインによるTGニワトリ作製も報告されているが、実用に際してはさらなる改良の必要がある。

2. 研究の目的

これまで動物細胞を対象として、遺伝子から細胞、組織・臓器、個体のレベルまで扱いながら、機能細胞作製のための各種セル・エンジニアリング技術の開発を行い、バイオ医薬品や細胞医薬品生産への適用について研究を行ってきた。例えば、合成生物学的アプローチにより遺伝子回路を設計・作製し、細胞に導入することで新たな細胞機能を発揮する細胞を作製し、抗体などのバイオ医薬品生産、細胞センサーとしての利用、新しい概念の遺伝子治療システムの開発を行った。また、動物細胞への遺伝子導入技術の開発として、ウイルスベクター、非ウイルスベクターの双方から新しい技術開発を行っており、レトロウイルスベクターに染色体への組込みにおける配列指向性を付与したハイブリッドウイルスベクターの開発や、組換え酵素を活用した配列特異的な遺伝子集積技術の開発を行っている。これらの技術が実際にバイオ医薬品を生産する生産細胞構築に利用できることを証明した。また新時代のバイオ医薬品生産技術として、独自にTGニワトリ作製技術を開発し、抗体などの医薬品となりうるタンパク質を卵中に生産するニワトリの作製に成功している。これらの技術は、独自性が高く、バイオ医薬品や細胞医薬品生産へ適

用を意識して開発を行っているので、実用性も高い技術である。

本研究では、これまで研究を行ってきた動物細胞を対象としたセル・エンジニアリング技術をベースとして、トータルシステムとして体系化することで、セル・エンジニアリングサイクル(細胞デザイン、遺伝子回路の設計・作製、細胞加工、細胞選別・増幅、機能評価、評価結果に基づいた改良サイクルへのフィードバック)を構築する。さらに、先進的な技術を取り入れながら、セル・エンジニアリングにおけるオリジナルな要素技術の開発を行うことを目的とする。そして、それらの技術を応用したバイオ医薬品や細胞医薬品の生産について検討する。セル・エンジニアリングサイクルを確立することで、動物細胞の機能改変をシステム化するとともに、近年のバイオ医薬品のモダリティの多様化に対応した汎用かつロバスタな技術とする。微生物では、細胞機能が単純であるためセル・エンジニアリングサイクルによって機能細胞を作製する取り組みが行われているが、動物細胞では対象ごとのアプローチとなっており、汎用性を目指した取り組みはこれまでにない。特に本研究では、細胞レベルでの機能改変にとどまらず、デザインされた細胞を使って個体再生(ニワトリを対象とする)までをシステム化されたセル・エンジニアリングプロセスとして実現する(図1)。

3. 研究の方法

本研究では、申請者が開発してきた動物細胞のセル・エンジニアリング技術を統合サイクルとして確立するとともに、今後必要と考えられる新しい技術として以下の4項目の研究開発を行った。(1) デザインされた新規機能細胞の開発、(2) 人工遺伝子発現制御システムの開発、(3) 人工筋組織による筋機能評価システムの開発、(4) TG ニワトリ作製技術の開発

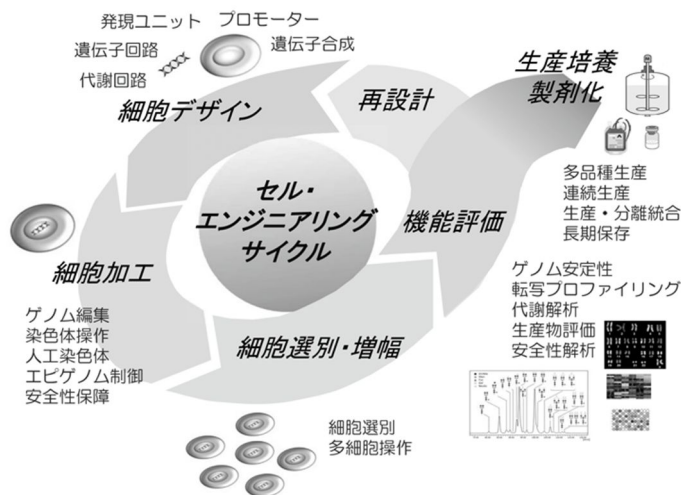


図1. 動物細胞機能改変のセル・エンジニアリングサイクル

4. 研究成果

(1) デザインされた新規機能細胞の開発

エストロゲン受容体のエストロゲン応答を利用して標的遺伝子の発現を制御するバイオ医薬品生産システムの構築を目指した。エストロゲン受容体は、リガンドであるエストロゲンと結合すると核に移行し、転写活性化因子として機能する。そのため、エストロゲンをスイッチとして利用する誘導発現システムは、細胞増殖モードと細胞生産モードを切り替えることができるバイオ医薬品生産システムの構築に利用できる。我々は、エストロゲン受容体リガンドの添加によって活性化されるキメラタンパク質 GaI4-ERT2-VP16 (GEV) を用いた人工遺伝子発現システムを採用した。GEV は、培養液へのエストロゲン、 α -エストラジオール (E2) または E2 拮抗薬 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) の添加に応じて標的遺伝子発現を誘導することができる転写活性化因子である。我々は、エストロゲン受容体リガンドによって遺伝子発現を制御できる GEV を恒常的に発現する CHO 細胞を作製した。まず、リガンド存在下で活性化された GEV に応答できるレポーター遺伝子発現システムを細胞に導入し、誘導発現挙動を解析した。次に、モデル抗体としてヒト IgG1 の Fc 領域を融合した抗プリオン一本鎖抗体 (scFv-Fc) を産生するための遺伝子発現カセットを細胞に組み込み、無血清培地を用いてリガンド薬剤に応答した誘導抗体産生を評価した。最後に、この人工遺伝子発現制御システムを用いた scFv-Fc の連続生産を、高密度半連続浮遊培養により試み、抗体産生の安定性を検討した。

さらに高力価の抗体を生産するための遺伝子発現および遺伝子導入システムの開発を行った。治療用抗体の需要が高まるにつれ、抗体生産には高い生産収率が求められており、高力価生産システムの開発がますます重要になっている。本研究は、CHO 細胞で標的遺伝子の高発現を強力に誘導できる人工転写因子に基づく遺伝子発現システムを設計することにより、合成生物学アプローチを用いた高生産システムを開発することを目的とした。この人工遺伝子発現システムの機能性と CHO 細胞での標的遺伝子の高発現誘導能を実証するために、このシステムを使用してモデル抗体 (scFv-Fc) を生産した。プレートスケールでは優れた結果が得られ、無血清培地を用いた高密度細胞浮遊培養によるバイオリアクターチューブを用いた半連続培養での連続生産を試みたところ、g/L レベルの高力価抗体生産が達成された。培養温度を 33 °C の低温にすることで、scFv-Fc 濃度は最大 5.5 g/L に達し、比生産速度は 262 pg/(細胞・日)となった。この人工遺伝子発現システムは、高収量生産システムの構築を目的とした CHO 細胞工学の強力なツールとなる。

機能細胞を効率的に作製するための遺伝子導入技術の開発を行った。ロングインタースペースエレメント 1 (LINE-1) などのレトロトランスポゾン、転位イベント(レトロトランスポジションと呼ばれる)を介して他のゲノム遺伝子座に自分自身をコピーすることができる。したがって、レトロトランスポゾンは、標的遺伝子の複数のコピーを組み込むための効率的な遺伝子送

達ツールになる可能性がある。この研究では、トランスジーンのコピー数を増やして標的遺伝子の組み込みを実現する、LINE-1 に基づくレトロトランスポゾンベクターを開発した。このベクターには、マーカー遺伝子としてイントロンによって分割されたネオマイシン耐性遺伝子と、モデル標的遺伝子として共通 (Fc) 領域と融合した抗体単鎖可変断片 (Fv) をコードする遺伝子 (scFv-Fc) が含まれている。このレトロトランスポゾンベクターを使用して G418 耐性チャイニーズハムスター卵巣細胞を生成し、細胞は培養培地で scFv-Fc を生産した。レトロトランスポジションを制御するために、LINE-1 の 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF1 と ORF2) を個別に発現するレトロトランスポゾンベクターシステムも確立しました。ゲノム PCR 分析により、試験したクローンのほぼすべてでトランスジーン配列が検出された。完全な LINE-1 ベクターを使用して確立されたクローンと比較して、分割 ORF1 および ORF2 システムで生成されたクローンは、同様の特異的 scFv-Fc 生産性とレトロトランスポジション効率を示した。レトロトランスポゾンベースのベクターシステムを使用したこのアプローチは、哺乳類細胞用の新しい遺伝子送達ツールを提供できる可能性がある。

さらに、ヘパトーマ細胞をベースに高肝機能を誘導できる新しい細胞株の樹立を行った。ヘパトーマ細胞は増殖能が高いため、バイオ人工肝臓 (BAL) システム構築のための有望な細胞源である。しかし、初代培養肝細胞と比較すると肝機能が低いことが大きな問題である。以前の研究で、我々は、薬剤誘導性トランスアクチベーターシステムを用いて、8 つの肝臓濃縮転写因子 (LETF) 遺伝子をマウス肝癌 Hepa1-6 細胞に導入した遺伝子改変肝癌細胞株 Hepa/8F5 を確立した。これらの細胞は通常の培養条件下で活発に増殖するため、大量に調製することが容易である。誘導薬の添加により LETF の過剰発現が誘導されると、細胞増殖が停止し、細胞形態が変化するとともに、肝機能が高発現する。しかし、肝機能は誘導薬の存在に大きく依存しており、これらの増強された機能を維持するためには誘導薬を継続的に添加する必要がある。本研究では、Hepa/8F5 細胞における LETF 過剰発現誘導法を改良し、継続的な薬剤添加の必要性を排除することを試みた。この目的のために、人工トランスアクチベーターを熱ショックタンパク質プロモーターの制御下で転写・増幅するシステムを構築し、それを Hepa/8F5 細胞のゲノムに導入した。改良した細胞株では、熱誘導性 LETF 発現が高肝機能を誘導することが確認された。導入細胞の薬剤スクリーニングの後、熱誘導性高肝機能を示す肝癌細胞株 (Hepa/HS) を確立した。Hepa/HS 細胞は、BAL システムの構築など肝臓研究のための新しい細胞源となる可能性がある。

また、実用性を考慮してヒトヘパトーマからの機能性細胞の樹立を行った。機能的ヒト肝細胞は、薬物代謝や肝毒性の調査などの薬理学的研究において極めて重要なツールとなっている。しかし、初代ヒト肝細胞は大量に入手することが難しく、倫理的問題を引き起こす可能性があり、ヒト初代肝細胞に代わる新しい細胞源の開発が必要である。誘導性増強肝機能を有する遺伝子改変マウスヘパトーマ細胞株の開発の場合と同様に、8 つの肝臓濃縮転写因子 (LETF) 遺伝子を誘導性トランスジーン発現カセットとしてヒトヘパトーマ細胞に導入した。今回、我々は HepG2 細胞を用いて加熱誘導性肝機能を有するヒト肝癌細胞株を確立した。HepG2/8F_HS と名付けた遺伝子改変肝癌細胞は、通常の培養条件下で活発に増殖するため、大量に容易に調製できる。43 で 30 分間の熱処理により LETF の発現を誘導すると、細胞は増殖を停止し、肝機能の増強を示した。さらに、HepG2/8F_HS 細胞の 3 次元スフェロイド培養では、熱処理により肝機能がさらに向上することが示された。DNA マイクロアレイを使用した包括的なトランスクリプトーム解析により、HepG2/8F_HS 細胞は、熱処理後に多くの肝機能関連遺伝子の全体的な発現が強化されたことが明らかになった。HepG2/8F_HS 細胞は、薬理学研究やバイオ人工肝臓システムの構築のための新しい細胞源として有用である可能性がある。

(2) 人工遺伝子発現制御システムの開発

遺伝子組換え CHO 細胞による抗体などの物質生産では、目的物質の生産のための遺伝子発現ユニットにおいて、ウイルスプロモーターや EF1 プロモーターなどの常時発現型のプロモーターが用いられている。長期の高密度連続培養では、安定した高発現を細胞増殖が停止した状態でも維持する必要があり、そのための遺伝子発現システムの設計が求められている。本研究では、合成生物学的なアプローチにより発現システム構築に必要な機能単位を組合せることによって、あらかじめ設定された細胞内状況や外部刺激によって高発現を誘導可能な発現システムを新規に開発する。汎用的なシステムとするために、細胞内の特異的な mRNA をセンシングして目的遺伝子発現を誘導できるシステムの構築を行った。

RNA 発現解析は、細胞内から物理的条件、化学的環境、内因性シグナルなど、さまざまな情報を取得するために使用できる。RNA を検出する場合、細胞内遺伝子発現を制御するシステムは、生きた細胞内で RNA 発現レベルをリアルタイムで監視できる可能性がある。合成生物学は、細胞内の RNA を検出および解析するための強力なツールを提供する。この研究では、合成生物学に基づいた誘導性複合体形成戦略を使用して、RNA 誘導性遺伝子発現活性化を誘導する RNA アプタマー媒介遺伝子活性化システム RAMGA を考案した。この方法論は、ファージコートタンパク質などの RNA 結合ドメインを使用して、DNA 結合ドメインとトランス活性化因子を標的 RNA を介して接続します。転写活性化因子と融合した MS2 バクテリオファージコートタンパク質とテトラサイクリンリプレッサー (tetR) と融合した PP7 バクテリオファージコートタンパク質は、MS2 および PP7 ステムループをコードする標的 RNA によって架橋され、転写活性化をもたらす。我々は、tetR 応答エレメントを持つ最小プロモーターによって制御される誘導性 GFP 発現モジュール

ルを含む組み換え CHO 細胞を生成した。トリガー-RNA を持つ細胞は強力なレポーター遺伝子発現を示したが、トリガー-RNA を欠く細胞は発現を示しなかった。GFP 発現は、ターゲット RNA 発現ベクターを持たない細胞と比較して 200 倍以上アップレギュレーションされた。さらに、このシステムは、アプタマータグでタグ付けされた mRNA の発現を検出し、元の mRNA をコードする遺伝子の発現に影響を与えることなく、ターゲット mRNA レベルに基づいてレポーター遺伝子発現を調節することができた。本研究で開発された RNA トリガー遺伝子発現システムは、遺伝子回路の構築、内因性遺伝子発現の評価、および新しい RNA 検出器の開発のための新しいプラットフォームとしての可能性を秘めている。

組織工学において、三次元組織の構築は細胞機能を向上させる重要なプロセスである。人工的に構築した組織を移植する場合、血管網が貧弱だと組織細胞への酸素や栄養の供給が制限され、細胞死や組織生着率の低下につながる。そのため、三次元組織内に血管網を構築するシステムの開発が必要である。そこで、人工三次元組織内の低酸素と栄養不足を改善するために、血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) を産生する低酸素応答性遺伝子発現システムを開発した。ここで、低酸素応答性 VEGF 遺伝子発現システムを導入した細胞が、低酸素ストレス依存的に VEGF の発現を自律的に制御することを実証した。次に、*in vitro* で、三次元細胞シート内で VEGF の発現が低酸素環境に反応して誘導されることを確認し、遺伝子組み換え細胞シートをマウスの皮下に移植し、低酸素応答性 VEGF 遺伝子発現システムの生体内での実現可能性を評価した。

(3) 人工筋組織による筋機能評価システムの開発

骨格筋の収縮機能は生命活動の維持に必須である。筋ジストロフィーなどの筋疾患は患者の生活の質を著しく低下させ、最終的には死に至るため、これらの疾患に対する治療薬の開発が急務となっている。我々はこれまでの研究で、磁力を利用した組織工学技術を用いて作製した三次元骨格筋組織が収縮活動を示し、骨格筋組織の収縮活動に基づいて薬剤の効果を評価できることを示した。しかし、報告された方法は多数の細胞を必要とし、組織調製手順が複雑であるため、組織調製法の改良が必要である。本研究では、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製の小型デバイスを用いて、ハイスループットスクリーニングに適用可能な収縮する骨格筋組織の製造を簡素化した。この小型筋肉デバイスを用いて、マウス C2C12 筋芽細胞およびヒト人工多能性幹細胞から作製した骨格筋組織の収縮力発生に対するモデル薬剤の効果を評価した。

また、ヒトの筋疾患病態を模擬する人工筋モデルの作成を行った。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィンタンパク質の欠損により発症する遺伝性疾患である。近年、DMD 患者由来の人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた DMD 病態モデルが作成されています。また、CRISPR-Cas9 技術を用いたジストロフィン遺伝子の修復による遺伝子治療が DMD の新たな治療法として提案されているが、遺伝子修復 iPS 細胞由来の筋管の収縮機能が回復するかどうかは不明である。この研究では、電気パルス刺激培養における筋管の成熟を調べ、筋管の収縮挙動を観察することで遺伝子修復の影響を検討した。ジストロフィン遺伝子修復 iPS 細胞由来の筋管の収縮活性は、電気パルス刺激培養によって改善された。本研究で用いた筋収縮活性評価のための iPS 細胞法は、遺伝性筋疾患の発症メカニズムの解析や新薬・遺伝子治療の有効性評価に有用な技術と考えられる。

(4) TG ニワトリ作製技術の開発

これまで、レトロウイルスベクターを遺伝子導入法として利用した TG ニワトリ作製技術を確立しているが、目的遺伝子の染色体への導入部位がランダムとなるため、多数の TG ニワトリから適したものを選抜する必要がある。近年では、PGC の培養が可能となったため、培養 PGC で遺伝子導入を行い、遺伝子改変 PGC を胚へ戻すことでキメラニワトリを作製し、その子の世代から PGC 由来の TG ニワトリを誕生させることができる。ちょうど、マウスにおける ES 細胞を使った TG マウス作製と同様のプロセスとなる。この方法では、培養細胞を介するので、選抜された遺伝子改変 PGC を使うことで、目的遺伝子座を改変した個体を確実に得ることができるが、TG 個体を得るために交配によって 1 世代経なければならないため多大な労力および時間が必要となる。2013 年に CRISPR/Cas9 を使ったゲノム編集技術による効率的な部位特異的ゲノム改変が可能となり、マウスでは受精卵での直接遺伝子ターゲティングが行えるようになった。しかしニワトリでは、1 細胞期の受精卵 (卵白や卵殻がつく前の状態でメンドリの腹の中にあり取得が困難) での胚操作は事実上不可能であり、放卵後の受精卵では約 6 万のものの細胞に胚発生が進んでいるため、全ての細胞に遺伝子を導入することは困難である (そのため、ウイルスベクターを使った)。申請者は放卵後のニワトリ初期胚で効率的な遺伝子導入が行えないかと考え、遺伝子導入法としてエレクトロポレーション法を用いて、電極形状に改良を加えるとともに、胚への DNA 溶液注入法、電圧、パルス幅、パルス回数を調整することによって、胚細胞へのダメージが少なく胚全体に遺伝子導入できる方法を確立した。本研究では、この方法により CRISPR/Cas9 ベクターを導入することで、卵白の主要タンパク質であるオボアルブミンの遺伝子座に目的タンパク質の遺伝子を導入して、卵白中に目的タンパク質を生産する TG ニワトリ作製技術を開発する。培養ニワトリ細胞でのオボアルブミン遺伝子座への遺伝子導入法は確立している。この方法は、培養 PGC を介さないため労力と時間を劇的に減少させることができるため、TG ニワトリ作製において革新的な方法となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Binbin Ying, Yoshinori Kawabe, Feiyang Zheng, Yuki Amamoto, Masamichi Kamihira	4. 巻 12
2. 論文標題 High-level production of scFv-Fc antibody using an artificial promoter system with transcriptional positive feedback loop of transactivator in CHO cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12222638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Md. Rashidur Rahman, Yoshinori Kawabe, Kozumi Suzuki, Satoshi Chen, Yuki Amamoto, Masamichi Kamihira	4. 巻 19
2. 論文標題 Inducible transgene expression in CHO cells using an artificial transcriptional activator with estrogen-binding domain	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2300362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.202300362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Feiyang Zheng, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira	4. 巻 13
2. 論文標題 RNA aptamer-mediated gene activation systems for inducible transgene expression in animal cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 230-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.3c00472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Feiyang Zheng, Yoshinori Kawabe, Mai Murakami, Mamika Takahashi, Kyoka Nishihata, Souichiro Yoshida, Akira Ito, Masamichi Kamihira	4. 巻 16
2. 論文標題 LINE-1 vectors mediate recombinant antibody gene transfer by retrotransposition in Chinese hamster ovary cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2000620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.202000620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Masumoto, Akihiko Ono, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira	4. 巻 132
2. 論文標題 Hypoxia-responsive expression of vascular endothelial growth factor for inducing angiogenesis in artificial three-dimensional tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 399-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kantaro Yoshioka, Akira Ito, Masanobu Horie, Kazushi Ikeda, Sho Kataoka, Keiichiro Sato, Taichi Yoshigai, Hidetoshi Sakurai, Akitsu Hotta, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira	4. 巻 10
2. 論文標題 Contractile activity of myotubes derived from human induced pluripotent stem cells: a model of Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Kitano, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira	4. 巻 11
2. 論文標題 HepG2-based designer cells with heat-inducible enhanced liver functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11071194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kantaro Yoshioka, Akira Ito, Md Arifuzzaman, Taichi Yoshigai, Fangming Fan, Kei-ichiro Sato, Kazunori Shimizu, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira	4. 巻 113
2. 論文標題 Miniaturized skeletal muscle tissue fabrication for measuring contractile activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 434-441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Kitano, Yuki Nagae, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira	4. 巻 73
2. 論文標題 Development of a genetically modified hepatoma cell line with heat-inducible high liver function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 353-362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-021-00457-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計46件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Development of cell engineering technology for creating functional animal cells
3. 学会等名 KSBB Spring Meeting 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 啓悟, 鄭 飛揚, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 動物細胞での赤色光誘導型遺伝子発現システムの構築
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉村 優作, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 CHK-Q細胞を用いた染色体操作技術の開発
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陳 智, 鈴木 瑚澄, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 ホルモン誘導型遺伝子発現システムによる組換え抗体の生産
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増原 誠, 片岡 笙, 園井 理恵, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 深層学習の動画像認識技術を用いた細胞機能評価システムの開発
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Silas Habimana, Hiroyuki Kitano, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Biofabrication of human liver microtissues using genetically modified hepatoma cells
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ying Binbin, Kawabe Yoshinori, Tanno Chiharu, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Improved IRES-mediated translation in mammalian cells using translation initiation factor fused with RNA-binding protein
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱岡 誠, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 ミニサークルDNAベクターの調製とCHO細胞への遺伝子ノックイン
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江上 豪, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 人工転写活性化システムによるCHO細胞でのモノクローナル抗体生産
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Kaneko, Yoshinori Kawabe, Ken-ichi Nishijima, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Development of Engineered Chicken Primordial Germ Cells for the Generation of Antibody-Producing Transgenic Chickens
3. 学会等名 第36回 日本動物細胞工学会2023年度国際大会 (JAACT2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshinori Kawabe, Ken-ichi Nishijima, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Generation and application of transgenic chickens towards robust production system of recombinant proteins
3. 学会等名 第36回 日本動物細胞工学会2023年度国際大会 (JAACT2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子悠哉, 河邊佳典, 西島謙一, 上平正道
2. 発表標題 始原生殖細胞におけるゲノム操作による抗体生産トランスジェニックニワトリの作出
3. 学会等名 第29回日本生物工学会九州支部 福岡大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zheng Feiyang, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Inducible transgene expression using RNA aptamer-mediated gene activation systems
3. 学会等名 化学工学会第89年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Habimana Silas, Kitano Hiroyuki, Wulandari Diah Anggraini, Wakabayashi Rie, Kamiya Noriho, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Microgel-encapsulation of engineered hepatocytes with porous surface coating
3. 学会等名 化学工学会第89年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 江上 豪, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 人工遺伝子発現システムを用いた組換え抗体生産CHO細胞の作製
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱岡 誠, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 Cre組換え酵素を用いたミニサークルベクター調製法
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井 隼人, 河邊 佳典, 金子 悠哉, 上平 正道
2. 発表標題 トランスジェニックニワトリ作製のための染色体移植技術の開発
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増原 誠, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 深層学習を用いた画像解析による細胞判別システムの開発
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Feiyang Zheng, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Artificial gene regulation system using RNA aptamers
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 瑚澄, Rahman Md Rashidur, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 エストラジオール誘導型遺伝子発現システムによるCHO細胞での抗体生産
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 淳平, 北野 裕之, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 肝機能誘導型遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞株の機能評価
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子 悠哉, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 Cre 組換え酵素を用いたニワトリ始原生殖細胞への抗体遺伝子のノックイン
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上平 正道
2. 発表標題 機能細胞作製のためのセル・エンジニアリング技術の開発
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Cell engineering targets for CHO cells
3. 学会等名 ACB-AFOB 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀 美紗子, 遠藤 淳平, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 肝機能誘導型遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞株の樹立と機能評価
3. 学会等名 第28回日本生物工学会九州支部 佐賀大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zheng Feiyang, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 RNA-responsive artificial gene expression system for animal cells
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Habimana Silas, Kitano Hiroyuki, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Engineered functional hepatic cells and microtissues for bioartificial liver application
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ying Binbin, Kawabe Yoshinori, Amamoto Yuki, Zheng Feiyang, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Improved antibody production in CHO cells using an artificial transactivator system and a cold culture strategy
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子 悠哉, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 トランスジェニックニワトリによるバイオ医薬品生産のための始原生殖細胞の遺伝子改変
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 瑚澄, Rahman Rashidur, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 誘導型遺伝子発現システムを用いたバイオ医薬品生産技術の開発
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 淳平, 北野 裕之, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 セルエンジニアリングによる高肝機能誘導型ヒトヘパトーマ細胞の開発
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡 笙, 佐藤 圭一郎, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 薬剤スクリーニングのための筋管機能評価システムの開発
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子 悠哉, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 トランスジェニックニワトリ作製のためのゲノム編集技術を用いたニワトリ染色体改変技術の開発
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河邊 佳典, 巖 流征, 上平 正道
2. 発表標題 人工遺伝子発現システムを有する組換えCHK細胞の抗体生産誘導
3. 学会等名 第34回 日本動物細胞工学会2021年度大会 (JAACT2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北野 裕之, Manuel Souvervielle, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 高肝機能誘導型ヒトヘパトーマ細胞の三次元培養における肝機能評価
3. 学会等名 第34回 日本動物細胞工学会2021年度大会 (JAACT2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 淳平, 北野 裕之, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 ヒトヘパトーマ細胞の遺伝子改変による高肝機能誘導
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武末 和樹, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 ニワトリOVA遺伝子座への遺伝子ノックインによる組換え抗体生産細胞の作製
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北野裕之, Manuel Souvervielle, 河邊佳典, 上平正道
2. 発表標題 熱刺激によって高肝機能誘導可能な遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞株の特性評価
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 境 紘洋, 河邊 佳典, 巖 流征, 上平 正道
2. 発表標題 CHK細胞を用いた誘導型人工遺伝子発現システムによるscFv-Fc抗体の生産
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡 笙, 吉岡 貴太郎, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から誘導した筋管の張力測定による評価
3. 学会等名 第27回日本生物工学会九州支部 大分大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河邊 佳典, 境 紘洋, 巖 流征, 上平 正道
2. 発表標題 人工遺伝子発現誘導システムを有するCHK細胞の組換え抗体生産評価
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 瑚澄, Rahman Md Rashidur, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 エストラジオール誘導型遺伝子発現制御システムを持つCHO細胞の作製
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子 悠哉, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ニワトリ始原生殖細胞株の作製
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ying BingBing, Yoshinori Kawabe, Akio Kuno, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Improved Cre recombinase for transgene integration in mammalian cells
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Kitano, Manuel Souvervielle Manuel, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Establishment of human hepatoma cell lines with heat-inducible high liver functions
3. 学会等名 第33回日本動物細胞工学会国際大会 (JAACT2020 Fuchu) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiichiro Sato, Kantaro Yoshioka, Taichi Yoshigai, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Construction of a skeletal muscle contraction model using human iPS cell-derived myoblasts
3. 学会等名 第33回日本動物細胞工学会国際大会 (JAACT2020 Fuchu) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 組換えヘパリン様物質、及びその製造方法	発明者 上平 正道, 河邊 佳典, 秋山 京佑	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-022594	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

上平研究室
<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/>
 研究者情報 九州大学 上平正道
<https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002690/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西島 謙一 (Nishijima Ken-ichi) (10262891)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	中村 崇裕 (Nakamura Takahiro) (10464398)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	河邊 佳典 (Kawabe Yoshinori) (30448401)	九州大学・工学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	花井 泰三 (Hanai Taizo) (60283397)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------