

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06358

研究課題名(和文) 鶏卵を介した新規バイオ医薬品生産法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel biopharmaceutical production method via chicken eggs

研究代表者

河西 文武 (Kawanishi, Fumitake)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：50585560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、難治生疾患での高い治療効果からバイオ医薬品の需要が高まっている。しかしバイオ医薬品は薬価が高いという問題点がある。そこで本研究ではバイオ医薬品を安価に生産させる技術として鶏卵を介したバイオ医薬品の大量生産技術の開発を目的としこれを達成するために AAVベクターを利用する方法、始原生殖細胞(PGC)を利用する方法を検討した。 に関してはAAVベクターの作成およびニワトリ胚由来筋芽細胞における異種発現の確認に成功したが、発現量が低かったため成鶏への投与には至らなかった。 に関してはPGCを安定的に増殖させる培養方法の確立には成功したが、遺伝子導入効率が低く安定発現株の樹立はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、バイオ医薬品の中でも抗対医薬品とよばれるが医薬品ががんを始めとする難治生疾患の治療で目覚ましい治療効果を挙げている。特に日本は今後超高齢化社会を迎え、死亡原因の1位が悪性新生物(がん)であることから、抗体医薬品の需要は増すばかりと推定される。しかし抗体医薬品を始めとするバイオ医薬品は非常に薬価が高く、今後も売り上げを伸ばしていった場合、本邦の医療費負担を逼迫することが懸念される。また、本法において抗体医薬品の製造量はあまり増えておらず、高まっている需要分は輸入に頼っており国内生産量の増加が望まれている。本研究はこれらの課題を解決する社会的意義の大きいものである。

研究成果の概要(英文)：Recently, demand for biopharmaceuticals has been increasing due to their high therapeutic efficacy in intractable diseases. However, biopharmaceuticals are expensive. In this study, we aimed to develop a technology for mass production of biopharmaceuticals via chicken eggs as a low-cost production method for biopharmaceuticals, and to achieve this goal, we investigated the use of (1) AAV vectors and (2) primordial germ cells (PGCs). For (1), we succeeded in creating an AAV vector and in confirming its heterologous expression in chick embryo-derived myoblasts, but the expression level was low and we could not administer it to adult chickens. For (2), we succeeded in establishing a culture method to stably grow PGCs, but were unable to establish a stable expression strain due to low gene transfer efficiency.

研究分野：発生生物学、薬理学、細胞生物学

キーワード：ニワトリ キメラ 始原生殖細胞 バイオ医薬品

1. 研究開始当初の背景

2016年の世界の大型医薬品売り上げランキングを見ると、上位20品目のうち12品目がバイオ医薬品である。(World Pharmaceutical Sales Ranking 2016 Release, 2017/, Ken Pharma Brain)。特に、本邦においては小野薬品を中心に開発された抗体医薬品オプジーボは、メラノーマ等への高い薬効から注目を集め、驚異的な勢いで売り上げを伸ばしている。一方で、これらバイオ医薬品が抱える最大の問題は薬価が高いことである。主にその製造コストの高さが薬価に反映されている。上記のオプジーボは当初の薬価が約73万円(100mg)であり、保険財政への影響を考え異例ともいえる薬価引き下げが行われている。これらの問題を解決するには従来の培養細胞を用いた高コスト型的手法ではなく、より安価で大量に製造可能な手法の開発が急務と言える。そこで本研究ではこの問題を解決するため鳥類が持つ卵黄中への抗体移行システムを介したバイオ医薬品の大量生産技術の開発を目的とする。鳥類ではIgYと呼ばれる哺乳類のIgGに相当する抗体を血中から卵黄中に移行させることが知られている。また卵黄中には一般に約10mg/mLのIgY抗体が含まれており、産卵鶏である白色レグホーン種の平均的な卵黄量から換算すると約100mgのIgYが精製分離できるとされる(Hatta et al., Agric. Biol. Chem., 1990)。本研究課題が達成されれば、本邦の平均的な養鶏規模換算しても上記のオプジーボの様なバイオ医薬品を毎日1万人以上投与可能な原薬の生産が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では鶏卵を介したバイオ医薬品生産法として以下の2つに分けた方策を取る

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用したペプチド製剤生産法

AAVベクターは導入できる遺伝子のサイズが短いため抗体医薬品のような巨大分子の導入は難しい。しかしAAVは非病原性ウイルスであることから安全性が高く、非分裂細胞にも遺伝子導入でき、長期に安定な遺伝子発現が期待できる。そこで本研究では抗体に比べ分子量の小さなヒトエリスロポエチン(hEPO)を導入したAAVベクターを作成し、免疫寛容ニワトリの大腿へ導入することで最終的には卵黄中へのhEPOの移行を目指した。

(2) 始原生殖細胞(PGC)への遺伝子導入による抗体医薬品生産法

鶏卵を介した抗体医薬品生産法としてはPGCへの抗体遺伝子導入後、生殖系列キメラニワトリを作成し、卵黄中への抗体遺伝子の移行を目指した。以上の2つの方策により、鶏卵を介した新規バイオ医薬品生産法の開発を行った。これまでにIgY抗体の卵黄移行を介してバイオ医薬品の産生を行った報告はなく、本研究課題は非常に新規性に富んでいる。またニワトリを食用やインフルエンザワクチンの生産だけでなく、抗体産生という新たな用途を生み出すことで、家禽業界全体の活性化にも貢献しうると期待された。

3. 研究の方法

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用したペプチド製剤生産法

hEPOに卵黄移行モチーフ(Cu3/Cu4)を融合したhEPO発現ベクター、パッケージングベクター(pRCベクター、pHelperベクター)を構築し、HEK293T細胞にPEI transfection法で遺伝子導入しすることで目的遺伝子発現AAVベクターを作成した。

培養上清中のAAVベクターを濃縮し、タイターチェックを行った。

ニワトリ胚由来筋芽細胞の初代培養を行い、将来的に成鶏の骨格筋への感染を見据え、in vitroにおける鳥類へのAAVベクターの有効性を検証した

(2)始原生殖細胞(PGC)への遺伝子導入による抗体医薬品生産法

PGCが血液中を循環する発生段階までニワトリ胚を培養し、PGCを含む血液を得た。

PGCが含まれる血液を大石らの報告(Oishi et al., Sci Rep, 2016)にある培養液組成(KO-DMEMを基礎培地に7.5% FBS, 2.5% Chicken Serum, 2mM Gluta Max, 1mM Sodium Pyruvate, 1× Nucleosides, 1× NEAA, 0.5mM Monothioglycerol, 5ng/mL hbFGF, 4ng/mL hSCF, 2ng/mL hLIF, 30% Buffulo Rat Liver conditioning medium)を参考に培養を行った。抗 CVH 抗体を用いた免疫染色により PGC であるかの判定を行い、増殖後に GFP の遺伝子導入を行うことで遺伝子導入効率の判定を行った。

4. 研究成果

(1)アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用したペプチド製剤生産法

AAV ベクターの作成およびニワトリ筋芽細胞への感染は成功したものの、発現効率および発現量が低かったため成鶏への投与には至らなかった。今後はよりプロモーターを変更するなどし異種タンパク質の高発現誘導が可能な AAV ベクター作成を行い成鶏への投与を目指したい。その後は以下の検討を行い最終的に hEPO が導入された鶏卵を得ることを目標とする。

AAV ベクター導入後、血液中の hEPO の発現を Western Blotting 法で確認し卵を得る。卵黄中から hEPO を精製し、既に上市されているヒトエリスロポエチン製剤(エスポー、協和発酵キリン)と各種比較を行う(質量分析によるペプチドマッピング、Biacore を用いた分子間相互作用など)

(2)始原生殖細胞(PGC)への遺伝子導入による抗体医薬品生産法

cPGC を培養し、細胞数を増やすことには成功したが、遺伝子導入効率が低く抗体遺伝子を安定発現する PGC 株を樹立することは叶わなかった。今回遺伝子導入にはリポフェクション法で行っていたが、エレクトロポレーション法やウイルスベクターを使用するなど別の手法を用いることでより高効率に遺伝子導入し安定発現株を得る方法を模索したい。その後は以下の検討を行い最終的に抗体医薬品が内包された鶏卵を得ることを目標とする。

PGC に配列が明らかとなっているインフリキシマブ(抗ヒト TNF モノクローナル抗体)の軽鎖、重鎖を導入した Mammalian PowerExpress System 用ベクター(東洋紡)で目的抗体遺伝子を導入し、高発現細胞株を選択する。

ブスルファン法で内在性 PGC を除去したレシピエント胚に遺伝子導入 PGC を移植し生殖巣キメラニワトリを作出する。

作出した生殖巣キメラニワトリ同士で交配を行い、抗体産生ニワトリを得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Watanabe Sachiko, Usui-Kawanishi Fumitake, Komada Takanori, Karasawa Tadayoshi, Kamata Ryo, Yamada Naoya, Kimura Hiroaki, Dezaki Katsuya, Ohmori Tsukasa, Takahashi Masafumi | 4. 巻 531 |
| 2. 論文標題 ASC regulates platelet activation and contributes to thrombus formation independent of NLRP3 inflammasome | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 125 ~ 132 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.063 | 査読の有無 無 |
| 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 Watanabe Sachiko, Usui Kawanishi Fumitake, Karasawa Tadayoshi, Kimura Hiroaki, Kamata Ryo, Komada Takanori, Inoue Yoshiyuki, Mise Nathan, Kasahara Tadashi, Takahashi Masafumi | 4. 巻 235 |
| 2. 論文標題 Glucose regulates hypoxia induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology | 6. 最初と最後の頁 7554 ~ 7566 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29659 | 査読の有無 無 |
| 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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 中村 隼明 (Nakamura Yoshiaki) (30613723) | 広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教 (15401) | |

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 |
|---------|---------|