

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20360376  
 研究課題名（和文） バイオロジクス生産のためのトランスジェニック鳥類プラットフォームの開発  
 研究課題名（英文） Development of transgenic avian platform for the production of biologics  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

申請者らが開発したトランスジェニック鳥類作製技術をベースにして、ニワトリなどの家禽鳥類をタンパク性医薬品などのバイオロジクス生産のための生体バイオリクターとして使用するために、(1)生産物を安定して大量に発現するための卵白特異的発現システムの開発、(2)生産物が糖タンパク質である場合に付加糖鎖の制御、(3)鳥類での生産に適したバイオロジクス生産、について検討を行った。

## 研究成果の概要（英文）：

Transgenic chicken bioreactor systems were developed for the production of pharmaceutical proteins using the avian transgenic technology. In the present study, development of oviduct-specific gene expression systems, control strategy for sugar chain modification of glycoprotein products, and biologics production suitable for transgenic chicken bioreactors were examined to establish the procedure as a biologics production system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

## 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：生物・生体工学、バイオテクノロジー、トランスジェニック鳥類、バイオロジクス、ウイルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、抗体医薬に代表されるモノクローナル抗体やエリスロポエチン（EPO）といった医薬品タンパク質（バイオロジクス）は、遺伝子組換えされたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などを用いた細胞培養によって生産されてきた。しかし、細胞培養による生産方法では、高い生産コストや対象の

多様化にともなう生産能力の限界といった問題が指摘されるようになり、細胞培養にかかわる実用的なプラットフォームの開発が望まれている。21世紀に入ってバイオロジクス生産のための新しいプラットフォームとして、トランスジェニック動植物による生体バイオリクターが注目されている。ヤギ・羊・ウシ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ほぼ確立されており、実用化に近い状況となっている。哺乳類乳汁中での生産よりさらに安価に生産できるシステムとして、ニワトリの卵への生産が期待されているが、生産システムとしては技術的にまだ確立されていない。申請者らは、胚への遺伝子導入において、ヒトの遺伝子治療に使われているものと同タイプ(MoMLV)のレトロウイルスベクターを用い、VSV-Gを外皮タンパク質に利用し、超遠心により濃縮したウイルス溶液を胚へ微量注入することによって、100%の効率で導入遺伝子を体組織に有しており、さらに80%以上の頻度で導入遺伝子を子に伝播可能な方法を開発した。申請者らが開発したトランスジェニック鳥類作製技術は、これまでに報告がないほど高発現・高頻度であり、はじめてニワトリが生体バイオリクターとして実用化可能なレベルに到達したものである。



図1. トランスジェニック鳥類による医薬品タンパク質生産の概要

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発してきたトランスジェニック鳥類作製技術をベースにして、ニワトリなどの家禽鳥類をタンパク性医薬品などのバイオリクス生産のための安全かつ安価な生体バイオリクター（動物工場）として使用するために必要な技術開発を行うことを目的とした。具体的には、(1)生産物を安定して大量に発現するための卵白特異的発現システムの開発、(2)生産物が糖タンパク質である場合に付加糖鎖の制御、(3)鳥類での生産に適したバイオリクス生産、について検討を行った。これらの課題を通して、バイオリクス生産のためのプラットフォームとしてトランスジェニック鳥類の有効性を実証することとした。

## 3. 研究の方法

(1)人工合成プロモーターによるニワトリ卵管特異的遺伝子発現システムの開発

プロモーター領域として卵管特異的な発現が報告されているオボアルブミン、コンアルブミンのTATA周辺領域をニワトリゲノムDNAからPCR法により取得した。これらをTRE配列下流に配置した人工合成プロモーターを設計し、同プロモーターの制御下で目的遺伝子である赤色蛍光タンパク質(DsRed)遺伝子が発現するユニットとして、レトロウイルスベクター生産用プラスミド

に組み入れた(図2)。

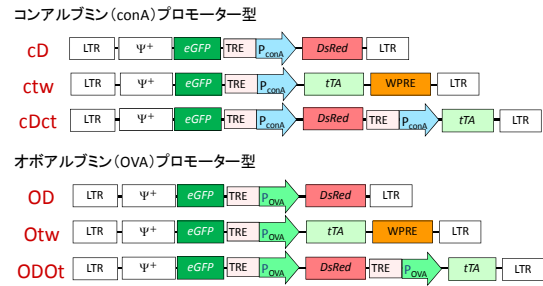


図2. 卵管特異的発現システムの構築

メスのヒヨコに女性ホルモンを2週間投与することで強制的に肥大させた卵管組織から、トリプシンおよびコレゲナーゼを含む分散バッファーでの処理を経て、初代卵管細胞(TGC)を取得した。卵管細胞に、各種条件でウイルスを感染させ、48時間後に細胞を回収した。回収した細胞はフローサイトメーター(FACS)を用いて、ウイルス感染細胞中のDsRed陽性細胞の割合を評価した。コントロールとして、ニワトリ胚性繊維芽細胞(CEF)へ同様に感染させた。

細胞での評価同様、ウイルスベクターを用いてニワトリ胚に遺伝子導入した。導入後ニワトリ胚を胚培養し、人工孵化させた。孵化後採血を行い、ゲノムDNAを抽出し、PCR法により雌雄を判定するとともに、導入遺伝子の組込みを確認した。遺伝子導入されたメス個体へ女性ホルモンの投与を2週間行った。解剖時に、卵管組織の肥大を確認するとともに、各組織(脳、心臓、肝臓、筋肉、卵巣および卵管)を採取し、mRNAを抽出した。目的遺伝子DsRedのmRNA発現量をRT-PCR法により評価した。

(2)ヒトEPO生産における糖鎖構造の制御

目的遺伝子として、ヒトエリスロポエチンとヒトIgG2のFc領域との融合タンパク質(hEpo/Fc)を選択した。全身で高発現が期待できるニワトリβ-アクチンプロモーターの下流にhEpo/Fc遺伝子を連結して、レトロウイルスベクターpMSCVに組み入れた(図3)。このウイルスベクターを高力価に生産するパッケージング細胞を樹立後、VSV-Gの発現ベクターを一過性に発現させることで、VSV-Gを外皮タンパク質とするウイルスベクターを生産させた。高速遠心により濃縮後、ニワトリ胚へウイルス溶液を微量注入し、胚培養後人工孵化させた。

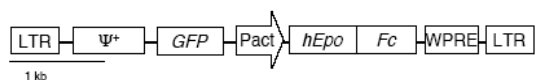


図3. hEPO/Fc生産のためのレトロウイルスベクター

孵化したニワトリの血清中および卵中の hEpo/Fc 発現量をウエスタンブロット法及び ELISA 法により解析した。次に、血清中、卵白中および卵黄中に生産された hEpo/Fc を Protein A カラムにより精製した後、Epo 依存性細胞を用いて生理活性をするとともに、レクチンブロットによって付加された糖鎖構造を解析した。

### (3) 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉症治療用融合タンパク質の生産

スギ花粉アレルゲン由来主要 7 連結エpitep (7crp) を、ニワトリ卵白タンパク質であるリゾチームの C 末端に遺伝子的に結合し、融合タンパク質として生産させることにした。目的遺伝子 (cLys-7crp) は、ニワトリβ-アクチンプロモーターの制御下で IRES を介して緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子と共にバイシストロニックに発現するように、レトロウイルスベクター生産用プラスミドに組込んだ (図 4)。このプラスミドを用いて、VSV-G を外皮タンパク質としたウイルスベクターを生産させた。生産させたウイルス溶液は超遠心で濃縮後、適切な発生ステージのニワトリ胚に微量注入した。胚培養法により人工孵化させた後、個体における導入遺伝子発現を、蛍光観察、PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。

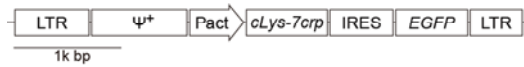


図4. cLys-7crp 生産のためのレトロウイルスベクター

cLys-7crp(L7)を生産する遺伝子導入ニワトリ (#L7406) が産卵した卵白を用いて、スギ花粉症の予防および治療効果を評価した。スケジュール概要を図5に示す。マウス (6 週齢) へ経口投与を用いて L7 含有卵白を 1 ヶ月間投与した。次に、皮下へスギ花粉抗原抽出物を投与し感作させた後、5 日間連続で同抽出物を経鼻投与した。花粉症症状の評価としては、経鼻投与後のくしゃみおよびくしゃみに伴う動作回数を測定することで行った。なお、コントロール群としては、野生型ニワトリ卵白を食餌させた。

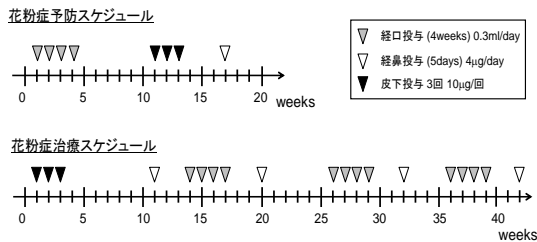


図5. スギ花粉症予防・治療実験スケジュール

一方、治療実験としては、まずマウスへスギ花粉抗原抽出物を皮下投与した後、同抽出物を鼻腔投与することで花粉症モデルマウスを作製した。モデルマウス作製は、くしゃみ回数測定および ELISA 法による血中のアレルゲン特異的 IgE 量により評価した。モデルマウスに対して、L7 含有卵白をマウスへ投与した後、同抽出物を経鼻投与した。この投与を繰り返しながら、各経鼻投与後のくしゃみ回数を同様に測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 人工合成プロモーターによるニワトリ卵管特異的遺伝子発現システムの開発

##### ① 初代卵管細胞を用いた発現評価

図6のレトロウイルスベクターの組合せで TGC 及び CEF に遺伝子導入を行った。導入後 48 時間後、TGC 及び CEF を回収し FACS を用いて DsRed 陽性細胞割合を評価したところ、cDct および ODOt 条件において DsRed 遺伝子を発現する細胞が顕著に増加していることがわかった (図7)。cDct 及び ODOt では、cD 及び OD を基準としてそれぞれ約 8 倍と約 12 倍の陽性細胞数の増加を示した。また、CEF における cDct は cD を基準として約 2 倍の細胞数増加を確認した。ODOt は OD を基準として増加は見られなかった。この結果より、ワンパック型の遺伝子発現システムではポジティブフィードバックシステムが卵管細胞において効果的に機能し、目的遺伝子の発現増大に寄与することが確認できた。これらの結果から、初代卵管細胞においてポジティブフィードバックによる目的遺伝子の卵管特異的発現を確認できた。

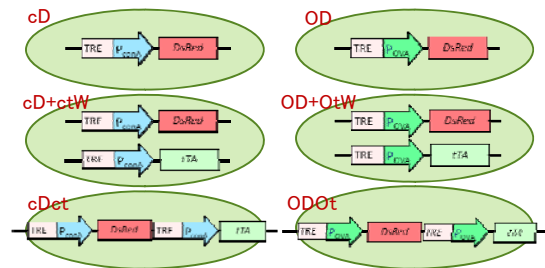


図6. ウイルス導入の組合せ条件

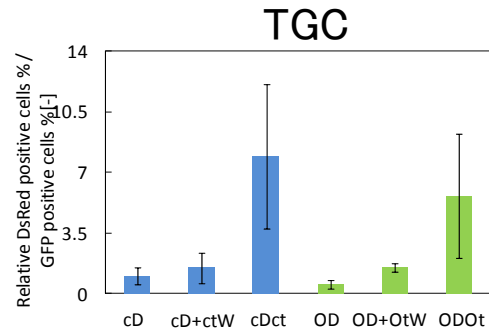


図7. 感染細胞中の DsRed ポジティブ細胞の割合

②ニワトリ生体 (*in vivo*) での発現評価

次に、ニワトリ生体における卵管特異的な遺伝子発現を評価するために、ウイルス溶液をニワトリ胚へ遺伝子導入した。導入後胚培養を行い、人工孵化させた。孵化後、ゲノムDNAを抽出し、メスのみに増幅されるプライマーを用いてゲノムPCRを行ったところ、cD条件では#106の1個体、cD+ctW条件では#208、#237、#241の3個体、cDct条件では#210、216の2個体、OD条件では#125の1個体、OD+OtW条件では#135、#140の2個体およびODOt条件では#232の1個体のメス個体を取得した。これら各個体に対して、目的遺伝子が導入されたかどうかをゲノムPCRで確認したところ、条件どおりの遺伝子導入ができたことがわかった。次に、1週齢に達した遺伝子導入個体に女性ホルモン誘導を行い、最終投与から18時間後に解剖を行った。各組織(脳、心臓、肝臓、筋肉、卵巣および卵管)の摘出を行った。#210(cDct)の心臓と筋肉でDsRedの発現が確認した以外では各個体ともに目的遺伝子DsRedの卵管特異的な遺伝子発現を確認した。卵管における遺伝子発現を画像解析ソフトにより定量化した(図8)。コンアルブミンプロモーターを用いた条件では、cDを基準としてcD+ctWでは4.8倍、cDctは6倍の遺伝子発現の増加を確認した。オボアルブミンプロモーターを用いた条件では、ODを基準としてOD+OtWでは2倍、ODOtは3倍の遺伝子発現の増加を確認し、ODではcDと比較して2倍の増加がみられた。培養細胞における評価同様に、生体組織においても共導入型と比較してワンパック型の方が遺伝子発現の増加が大きいことがわかった。また、オボアルブミンプロモーターを用いた方がコンアルブミンプロモーターよりも発現が強いことがわかった。

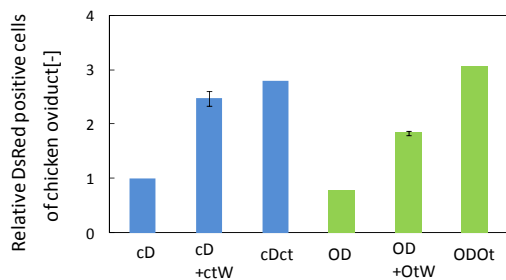


図8. 遺伝子導入ニワトリの卵管組織におけるDsRed ポジティブ細胞の割合

(2)ヒトEPO生産における糖鎖構造の制御

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が最も移行効率がよいことを見いだしている。そのため、hEpoをIgG2由来のFc領域との融合タンパク質として発現するレトロウイルスベクターを作製した。10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> IU/mlに濃縮したレトロウイルス

ベクターをニワトリ胚卵 55 時間目胚の心臓部に注入することで遺伝子導入を行った。胚培養により発生を進めたところ、約 32%の割合で孵化させることができた。遺伝子導入ニワトリの血清中における hEpo/Fc 融合タンパク質の発現量を ELISA 法により定量したところ、3-62 μg/ml の濃度で血清中に生産していた。次に、hEpo/Fc 融合タンパク質をウェスタンブロット法により解析したところ、予想された分子量サイズで検出でき、また糖鎖修飾がされていることも示唆された。性成熟後、メンドリが産卵した卵中の hEpo/Fc 融合タンパク質を ELISA 法により定量したところ、卵白中で 18-40 μg/ml、卵黄中では 17-30 μg/ml の濃度で生産されていることがわかった(図9)。Fc非融合型のhEpoを発現するニワトリでは卵黄中で生産されていなかったことから、hEpoをFc融合タンパク質としたことで血中から卵黄へ移行できたものと考えられる。またレクチンブロットによる糖鎖構造解析の結果、卵黄から回収された hEPO/Fc は、血清中の糖鎖構造を保持していることが示唆された(図10)。

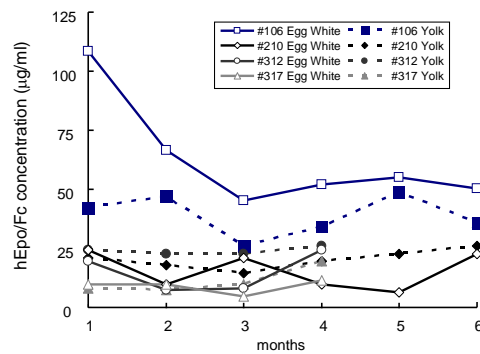


図9. 遺伝子導入ニワトリによる hEPO/Fc の卵中への生産

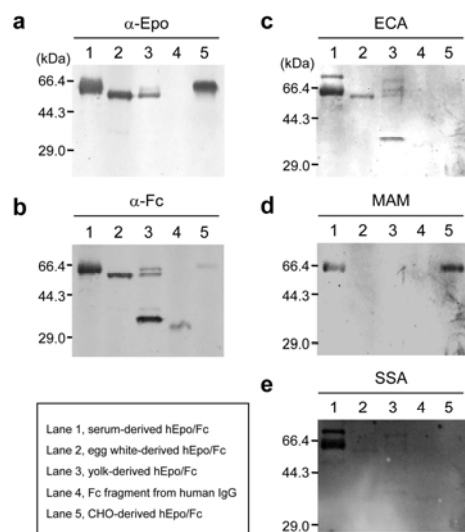


図10. 遺伝子導入ニワトリ生産した hEPO/Fc のレクチンブロット解析



(3) 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉症治療用融合タンパク質の生産

ウイルスベクターによりニワトリ胚細胞へ遺伝子導入を行った。超遠心により濃縮することで高ウイルス力価に調製したウイルス溶液を計4回65個のニワトリ胚に微量注入した。孵化率は、平均34% (20~44%)であった(表1)。

表1. L7 遺伝子導入ニワトリ胚の孵化率

遺伝子導入	力価 (IU/ml)	孵化個体数 / 導入個体数	孵化率 (%)
1	$8.9 \times 10^7$	4/9	44.4
2	$3.8 \times 10^8$	7/16	43.8
3	$1.9 \times 10^8$	4/15	26.7
4	$2.6 \times 10^9$	5/25	20.0

約1ヶ月後、孵化したニワトリから血液を採取し、PCR法による解析の結果、目的遺伝子が細胞ゲノム内に導入されたことが確認できた。また、蛍光顕微鏡観察の結果、血球細胞でウイルス力価に伴いGFPの強い蛍光が観察された。遺伝子導入ニワトリが生産したL7をウエスタンブロット法により解析したところ、卵白中において、予想される分子量で検出された(図11)。発現量を見積もったところ、約1-2 µg/mlで生産されていることがわかった。また、血清中では、L7の生産を確認することが出来なかった。血中細胞で、共発現させたEGFPの発現は確認できたことからこれらの細胞への遺伝子導入は行えたものの、L7は生産直後速やかに分解されたものと考えられる。

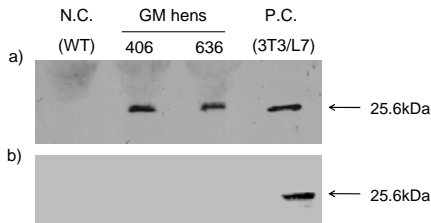


図11. 遺伝子導入ニワトリの卵白中に生産されたL7のウエスタンブロット解析

次に、L7含有卵の花粉症に対する予防および治療効果を評価した。B10.SマウスへL7含有卵白の食餌により抗スギ花粉症効果を評価した。はじめに、L7含有卵および野生型卵白をマウスに経口投与した。スギ花粉症抽出物を皮下投与することで感作した後、経鼻投与したところ、L7含有卵を投与した群において、くしゃみ回数の減少が認められた(図12)。この結果から、L7含有卵をあらかじめ経口摂取することで、スギ花粉症の予防ができることがわかった。次に、花粉症モデルマウスを用いた治療効果の評価を行った。スギ花粉抽出物を皮下投与することによ

って作製した花粉症モデルマウスへL7含有卵白を経口投与した後、経鼻投与したときの減感作を評価したところ、経口投与の回数が増えるに従って、くしゃみ回数の低下が観察された。これらのことから、遺伝子導入ニワトリが生産したスギ花粉症治療用エpitep含有リゾチームの経口投与による減感作療法への適用の可能性が明らかとなった。

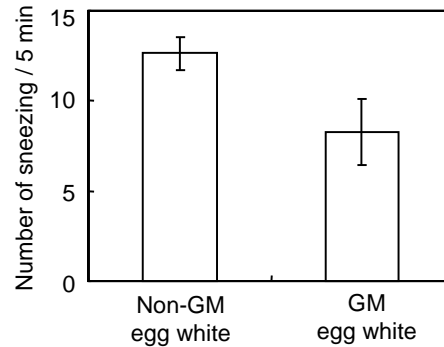


図12. L7含有卵白の経口投与によるスギ花粉症の緩和

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)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Y. Kawabe, M. Kamihira, Production of Antibody by Transgenic Avians (Chapter 6), Antibody Engineering and Production (Cell Engineering, Vol. 7), Springer, 査読無, 印刷中.
- ② C. A. Penno, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira, Production of recombinant human erythropoietin/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens, Transgenic Research, 査読有, Vol. 19, No. 2, 2010, pp. 187-195.
- ③ C. A. Penno, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira, Production of recombinant human EPO and EPO/Fc fusion proteins by Chinese hamster ovary cells, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Springer, 査読無, Vol. 16, 2010, pp. 197-202.
- ④ Y. Kawabe, K. Numata, M. Teramori, A. Ito, M. Kamihira, Development of oviduct-specific gene expression system for transgenic avian bioreactor, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Springer, 査読無, Vol. 16, 2010, pp. 203-208.
- ⑤ Y. Kawabe, Y. Hayashida, K. Numata, A. Hishigae, A. Ito, M. Kamihira, Production of therapeutic proteins composed of seven dominant human T cell epitopes derived from the Japanese cedar pollen allergens, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Springer, 査読無, Vol. 16, 2010, pp. 209-214.
- ⑥ M. Kamihira, Y. Kawabe, T. Shindo, K. Ono, K. Esaka, T. Yamashita, K. Nishijima, S. Iijima,

Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens, Journal of Biotechnology, 査読有, Vol. 141, No. 1-2, 2009, pp. 18-25.

⑦ Y. Kawabe, T. Naka, H. Komatsu, K. Nishijima, S. Iijima, M. Kamihira, Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol. 106, No. 6, 2008, pp. 598-601.

〔学会発表〕(計 17 件)

① 上平正道, 林田悠希, 沼田健作, 原田翔太, 河邊佳典, 井藤彰, スギ花粉症治療用タンパク質を生産する遺伝子導入ニワトリの作製, 日本農芸化学会 2011 大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学(開催中止)

② 河邊佳典, 林田悠希, 原田翔太, 沼田健作, 井藤彰, 上平正道, 遺伝子導入ニワトリが生産したスギ花粉症治療用エピトープペプチド含有卵の効能評価, 化学工学会第76年会, 2011 年 3 月 24 日, 東京農工大学(開催中止)

③ 黒原健志, 沼田健作, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, 合成プロモーターを用いたニワトリ卵管特異的発現システムの解析, 第 62 回日本生物工学会大会, 2010 年 9 月 29 日, 宮崎シーガイア

④ 林田悠希, 沼田健作, 山田紀子, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉症治療用エピトープ融合リゾチームの生産, 化学工学会第42回秋季大会, 2010 年 9 月 6 日, 同志社大学

⑤ 山元秀晃, 沼田健作, 寺森正志, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, 合成プロモーターシステムによる卵管特異的高発現の誘導, 第2回化学工学3支部合同北九州大会, 2009 年 10 月 30 日, 西日本総合展示場(北九州)

⑥ 沼田健作, 山田紀子, 林田義文, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉症治療用エピトープペプチド含有タンパク質の生産, 生物工学会平成21年度大会, 2009 年 9 月 24 日, 名古屋大学

⑦ 山元秀晃, 沼田健作, 寺森正志, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, ニワトリ卵管特異的高発現のための合成プロモーターシステムの開発, 生物工学会平成21年度大会, 2009 年 9 月 24 日, 名古屋大学

⑧ 山田紀子, 沼田健作, 林田義文, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, スギ花粉症治療のためのエピトープ含有タンパク質を生産する遺伝子導入ニワトリの作製, 化学工学会第41回秋季大会, 2009 年 9 月 17 日, 広島大学

⑨ 上平正道, 遺伝子導入鳥類による組換えタンパク質生産, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 29 日, 福岡国際会議場

⑩ 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 20 日, 横浜国立大学

⑪ K. Numata, Y. Kawabe, M. Teramori, A. Ito, M. Kamihira, Development of oviduct-specific gene expression system for transgenic avian bioreactors, 日本動物細胞工学会 2008 国際大会(JAACT2008), 2008 年 11 月 26 日, 福岡国際会議場

⑫ Y. Hayashida, Y. Kawabe, K. Numata, A. Hishigae, A. Ito, M. Kamihira, Production of therapeutic proteins composed of seven dominant human T cell epitopes derived from the Japanese cedar pollen allergens, 日本動物細胞工学会 2008 国際大会(JAACT2008), 2008 年 11 月 26 日, 福岡国際会議場

⑬ C. A. Penno, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira, Generation of genetically manipulated chickens producing human erythropoietin/Fc fusion protein, 日本動物細胞工学会 2008 国際大会(JAACT2008), 2008 年 11 月 26 日, 福岡国際会議場

⑭ 沼田健作, 寺森正志, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, 合成プロモーターを組み込んだニワトリ卵管特異的発現システムの開発, 生物工学会平成20年度大会, 2008 年 8 月 28 日, 東北学院大学土樋キャンパス

⑮ 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エチン Fc 融合タンパク質の生産, 化学工学会九州支部沖縄大会, 2008 年 8 月 8 日, 沖縄産業支援センター

⑯ C. A. Penno, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira, 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 5 日, 北九州国際会議場

⑰ 沼田健作, 林田義文, 河邊佳典, 井藤彰, 上平正道, 花粉症治療用エピトープペプチド含有タンパク質を生産するトランスジェニック鳥類の作製, 第 45 回化学関連支部合同九州大会, 2008 年 7 月 5 日, 北九州国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

河邊 佳典 (KAWABE YOSHINORI)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：30448401