

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18236

研究課題名（和文）Tgニワトリ生産系と同等/同質の生産能を持つモデル細胞、OVA細胞の開発研究

研究課題名（英文）Development of model cells to transgenic chicken bioreactor system

研究代表者

迎 武紘（MUKAE, Takehiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：40803309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではTgニワトリ生産系による組換えタンパク質生産の迅速な評価系として、安定した細胞増殖活性とオボアルブミン生産性を持つオボアルブミン恒常発現DF1細胞の開発を目指した。まず、オボアルブミン恒常発現DF1細胞を作成し、ウエスタンブロット、免疫染色、real-time PCR、ELISA、MTTアッセイによりその特性を評価した。次に、この細胞を用いて外来遺伝子であるIFN γ のノックインとその発現能を検証した。これにより、開発したオボアルブミン恒常発現DF1細胞がTgニワトリ生産系の迅速評価系として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により従来のTgニワトリ生産における組換えタンパク質の初回収収までに1.5年を要する課題が解消され、Tgニワトリ生産系の迅速かつ簡便な生産予測が可能となることが期待される。これにより、迅速かつ多品目の候補分子の生産が必要な創薬分野などでも、Tgニワトリ生産系を応用できる可能性が高まった。将来的にTgニワトリ生産系の応用分野が拡大することは、産業用途の組換えタンパク質の低コスト大量生産につながることで期待される。タンパク質は化合物に比べて副作用が少なく環境負荷も低いため、医療、農業、環境分野など様々な産業用途で社会的課題の解決に資する組換えタンパク質の利用を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a rapid evaluation system for recombinant protein production in transgenic chickens. To achieve this, we developed DF1 cells that constitutively express ovalbumin and show stable cell proliferation. First, we developed DF1 cells that constitutively express ovalbumin and characterized the developed cells using western blotting, immunostaining, real-time PCR, ELISA, and MTT assays. Next, to verify whether these cells could be used as an evaluation system for transgenic chickens producing recombinant proteins, we knocked in the IFN γ gene into these cells and evaluated the expression of IFN γ by real-time PCR, Western blot, and ELISA. In summary, we successfully developed DF1 cells constitutively expressing ovalbumin as a rapid evaluation system for transgenic chicken production.

研究分野：分子生物学

キーワード：バイオものづくり ゲノム編集 組換えタンパク質 評価技術 オボアルブミン Tgニワトリ 培養細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組換えタンパク質は、バイオ医薬品や研究用試薬に利用され、医薬品や医療技術の発展に大きく貢献している。しかしながら、既存の動物細胞や微生物細胞を利用した組換えタンパク質の生産は、培養プラントの設備費や管理費、細胞培養に関連する特許費用など、多大なコストがかかるという問題がある。現在、薬剤費の高騰による医療費の増加が社会問題となっており、持続可能な医薬産業の発展には、既存の方法に頼らない新しい組換えタンパク質生産技術の開発が急務である。

1990年代より、高効率な組換えタンパク質生産技術の開発を目指し、個体の外分泌機能を生物工場として利用した組換えタンパク質生産システムが注目されている。特に、トランスジェニック (Tg) ニワトリは、高いタンパク質生産能力を持ち、ヒトに近い翻訳後修飾が可能であり、産業動物としての知見を活用した効率的な飼育が可能であるため、優れた組換えタンパク質生産システムとして期待される。これまでに Tg ニワトリは、リソソーム酸性リパーゼ欠損症治療薬「カスマ®」の製造にも利用された医薬品開発実績もあるため、従来の培養細胞系に依存しない新しい組換えタンパク質生産技術として注目されている。しかし、従来技術であるウイルスベクターを用いた Tg ニワトリは、卵白中に生産される組換えタンパク質の発現量が少なく、個体間のばらつきも大きい、さらに生産能力が1世代に限られるなど、多くの課題があった。

申請者らは、従来の課題を解決するために、卵白の約半分を占めるオボアルブミンタンパク質の遺伝子座にゲノム編集技術を用いて正確に外来遺伝子をノックインすることで、卵白中に組換えタンパク質を大量に生産するゲノム編集 Tg ニワトリの開発に成功した。このゲノム編集 Tg ニワトリは、ウイルスベクターを用いた従来技術に比べて、組換えタンパク質生産能が約100倍高く、同一世代の個体間でばらつきも少ない、さらに次世代にも同等の生産能が伝播するため、高発現かつ安定的な組換えタンパク質生産が可能である。これまでに申請者らは世界有数の10種類22系統以上の遺伝子導入およびゲノム編集 Tg ニワトリの開発実績があり、Tg ニワトリ生産系の開発技術について世界に先んじた成果とノウハウをもつ。

他方、Tg ニワトリはウシやヒツジなどの大型哺乳類に比べると短いものの、組換えタンパク質の初回回収までに約1.5年と、培養細胞系よりも長い準備期間が必要となる。そのため、多種多様な候補分子の迅速生産が困難であり、創薬分野などへの応用には大きな障壁があった。すなわち、Tg ニワトリ生産系は短期間で組換えタンパク質生産評価ができないという課題がある。

この課題解決のために申請者は、Tg ニワトリ生産系の組換えタンパク質生産に関わるオボアルブミン生産機構に注目した。すなわち、Tg ニワトリ生産系をミミックした培養モデル細胞が開発されれば、迅速な生産評価が可能になるのではないかとアイデアに至った。本研究の開始するまでに、ニワトリのオボアルブミンタンパク質を生産する卵管腺細胞の初代培養技術は開発されていたものの、長期培養が困難であることやオボアルブミン発現能が直ちに消失することが知られていた。また、長期培養が可能なニワトリ由来培養細胞としてニワトリ線維芽細胞 (以下、DF1細胞)が開発されていたが、DF1細胞は低濃度培養が難しく、またオボアルブ

ミン分泌能もないことが知られていた。つまり、安定培養可能なオボアルブミン生産能をもつ細胞系の開発は未達の課題であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、Tg ニワトリ生産系を用いた組換えタンパク質生産の迅速評価を可能とするために、安定培養可能なオボアルブミン生産能をもつ培養細胞システムの開発を目指した。当該研究期間内に、オボアルブミン生産能をもつ DF1 細胞を開発し、この細胞を用いた組換えタンパク質生産性を評価し、Tg ニワトリ生産系と生産能力を比較する。

3. 研究の方法

(1) 低濃度培養可能な DF1 増殖培地の開発

遺伝子導入後の薬剤セレクションなどで低細胞濃度になっても、DF1 細胞の増殖能力を維持させるために、DF1 細胞の培養条件の最適化を行った。従来培地として、10% DMEM および 1% L-glutamine を含む D-MEM を用いた。また、改良培地として、10%FBS、1% L-glutamine、4.5% Chicken serum、1% Vitamin、0.8mM Folic Acid、0.5% DMSO を含む RPMI 培地を用いた。いずれの培地も 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む。これらの従来培地または改良培地を用いて、DF1 細胞を培養し、細胞増殖能を観察した。

(2) オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞の開発と性格づけ

オボアルブミン転写開始点上流に汎用プロモーターである CAG プロモーターをノックインし、オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞を開発した。TATA 配列に違いのある 2 種類の CAG ノックインコンストラクトと、2 種類のガイド RNA を用いて、合計 4 種類のオボアルブミン恒常発現細胞を作成した。また、トランスフェクションのポジティブコントロールとして、トランスポゾン特異性末端逆位配列を有するベクターを用いた EGFP 発現 DF1 細胞を開発した。

候補となるオボアルブミン恒常発現 DF1 細胞は、抗オボアルブミン抗体を用いたウエスタンブロットおよび免疫染色法によるオボアルブミン発現の評価、さらに real-time PCR 法および ELISA 法によるオボアルブミン発現量の評価、MTT アッセイによる細胞増殖活性評価により性格づけを行った。

(3) オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞への外来遺伝子ノックイン

Tg ニワトリ生産系を用いた組換えタンパク質生産の迅速評価系としての有用性を検証するために、開発したオボアルブミン恒常発現 DF1 細胞に外来遺伝子をノックインし、その発現を検討した。外来遺伝子は、Tg ニワトリでの開発実績があるインターフェロン β （以下、IFN β ）を用いた。IFN β の発現能の性格づけを行うために、real-time PCR 法、ELISA 法、および抗 IFN β 抗体を用いたウエスタンブロットによる評価を行った。

4. 研究成果

(1) 低濃度培養可能な DF1 増殖培地の開発

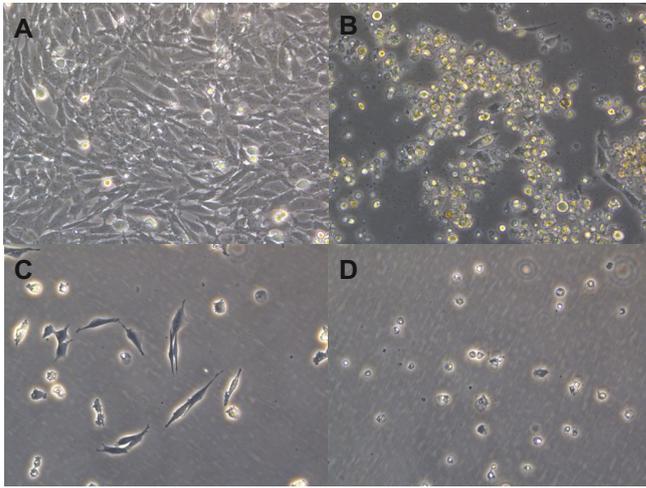


図 1 DF1 細胞の形態

まず、低細胞濃度でも DF1 細胞の増殖能力を維持させるための培地条件を検討した。DF1 細胞の培養の様子を Fig. 1 に示す。10cm ディッシュに従来培地を用いて DF1 細胞を 1×10^7 /well で播種した場合、培養 2 日後にはコンフルエントに達した (Fig. 1A)。しかし、 0.5×10^7 /well で播種した場合、十分な培養が困難であった (Fig. 1B)。次に、改良培地を用いて 6 ウェルディッシュに DF1 細胞を 0.1×10^5 /well で播種した場合、培養 1 日後には細胞が生着し、線維芽細胞

様の形態を示した (Fig. 1C)。この細胞はコンフルエント状態まで培養可能であった。しかし、従来培地では、培養 1 日後には細胞が生着せず、これ以上培養することができなかった (Fig. 1D)。これらの結果から、低細胞濃度でも培養可能な DF1 細胞の培地条件を見出した。以降の実験では改良培地を用いて DF1 細胞を培養した。

(2) オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞の開発と性格づけ

次に、オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞の開発を目指し、オボアルブミン転写開始点上流に汎用プロモーターである CAG プロモーターをノックインした #1 から #4 の 4 種類の CAG ノックイン DF1 細胞を作成した。これら CAG ノックイン DF1 細胞の解析結果を Fig. 2 に示す。まず、ポジティブコントロールとして野生型卵白溶液 (E. W.)、ネガティブコントロールとして無処置の DF1 細胞 (#6) をそれぞれ用いて、抗オボアルブミン抗体によるウェスタンブロットを行なった結果、いずれの CAG ノックイン DF1 細胞の細胞ライセートおよび培養上清でオボアルブミンタンパク質のバンドが確認された (Fig. 2A)。次に、ネガティブコントロールとして無処置の DF1 細胞を用いて、DAPI による核染色とともに、抗オボアルブミン抗体を用いた免疫染色を行なった結果、いずれの CAG ノックイン DF1 発現細胞でオボアルブミンのシグナルが確認された (Fig. 2B-E)。

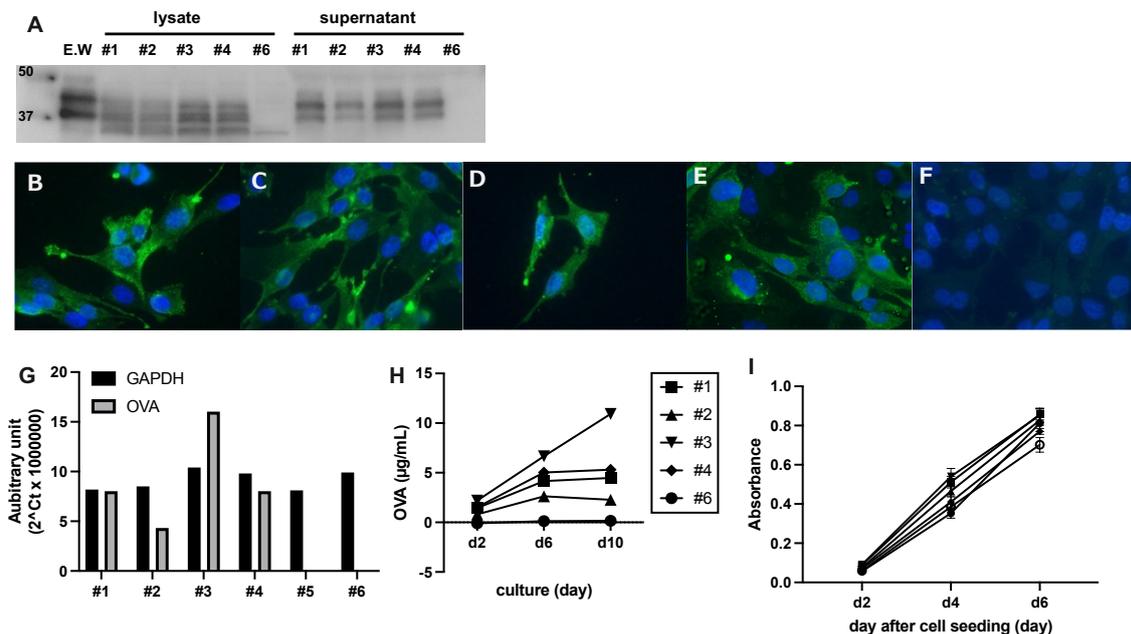
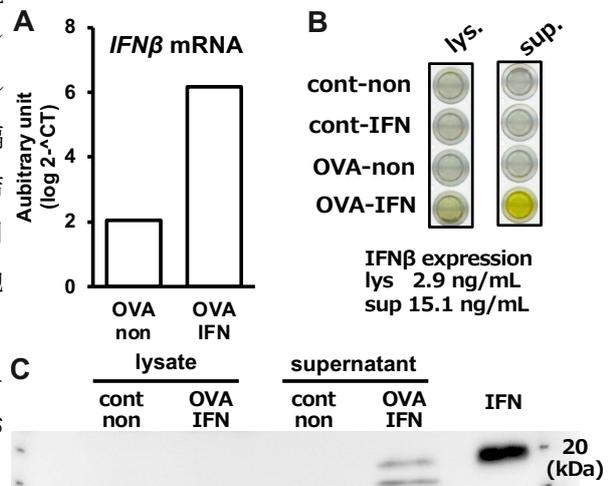


図 2 CAG ノックイン DF1 細胞の特徴づけ

一方、無処置の DF1 細胞では確認されなかった (Fig. 2F)。そして、GAPDH 遺伝子を内標準として、ネガティブコントロールとして EGFP 発現 DF1 (#5) および無処置の DF1 細胞 (#6) を用いて、オボアルブミンプライマーを用いた real-time PCR を行った結果、いずれの CAG ノックイン DF1 細胞でもオボアルブミン mRNA の発現が確認された (Fig. 2G)。さらに、ELISA 法によるオボアルブミン発現量を定量した結果、いずれの CAG ノックイン DF1 細胞でオボアルブミンタンパク質が経時的に発現することが確認された (Fig. 2H)。最後に、コントロールとして無処置の DF1 細胞を用いて MTT アッセイによる細胞増殖活性を評価した結果、いずれの CAG ノックイン DF1 細胞も安定した細胞増殖活性をもつことが確認された (Fig. 2I)。これらの結果から、オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞に成功した。以降の実験では #4 を用いて解析を行った。

(3) オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞への外来遺伝子ノックイン

最後に、開発したオボアルブミン恒常発現 DF1 細胞の有用性を検証した。オボアルブミン恒常発現 DF1 細胞に IFN β 遺伝子をオボアルブミン遺伝子座のプロモーター下にゲノム編集ノックインし、IFN β の発現能を評価した結果を Fig. 3 に示す。まず、IFN β プライマーを用いた real-time PCR の結果、ノックイン細胞では IFN β mRNA の発現が確認された (Fig. 3A)。次に、抗 IFN β 抗体を用いた ELISA およびウェスタンブロットの結果、ノックイン細胞における IFN β のタンパク質発現が確認された



(Fig. 3B-C)。これらの結果から、IFN β をゲノム編集ノックインされたオボアルブミン恒常発現 DF1 細胞は、IFN β 発現能を有することが明らかになった。

図 3 IFN β ノックイン OVA 恒常発現細胞の解析

まとめると、本研究では、安定した細胞増殖活性とオボアルブミン生産性を持つオボアルブミン恒常発現 DF1 細胞を開発した。この細胞は Tg ニワトリ生産系の迅速評価系として有用であることが実証された。今後、より多くの種類の遺伝子の生産性評価が必要であるが、今回得られた知見は、Tg ニワトリの課題である迅速な生産評価を可能にし、その応用性を高めるものである。そして、将来的には持続可能な医薬産業の発展に資する新しい組換えタンパク質生産技術としての Tg ニワトリの応用に貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 迎 武紘
2. 発表標題 ゲノム編集ニワトリ由来IgG抗体を用いた低コスト抗原検出技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会(札幌)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 迎 武紘
2. 発表標題 遺伝子組換えニワトリにより生産された モノクローナルIgG抗体の精製工程と糖鎖構造の評価
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会(横浜)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者迎 武紘ら 合計60名、技術情報協会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 605
3. 書名 ゲノム編集の最新技術と医薬品・遺伝子治療・農業・水畜産物・有用物質生産への活用	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------