

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)  
研究開発中間進捗／成果概要報告書 (公開版)

令和5年8月17日

1. 公募研究開発課題名：革新的な次世代抗体医薬品製造基盤技術の開発
2. 研究開発課題名：次世代抗体医薬生産のためのトランスジェニックニワトリプラットフォームの開発
3. 代表機関名：国立大学法人東海国立大学機構
4. 研究開発代表者名：西島謙一
5. 所属・役職：名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
6. 全研究開発期間：令和3年7月1日 ～ 令和8年月31 (予定)

#### 【研究開発概要】

本研究開発課題では、日本で例外的に90%以上の消費量を自給できている鶏卵に着目し、遺伝子改変ニワトリを用いることで次世代医薬品を安価・大量に生産できるプラットフォームの構築を目指す。ニワトリは産卵までが約半年と短く、集密化・自動化された飼育システムも利用可能であることから、コスト面で有利な「生きたバイオリクター」となりうる。次世代抗体を生産するニワトリを一度作製してしまえば、繁殖させるだけで永続的に卵として抗体を回収できる点が特徴となる。

本研究開発課題では、研究代表者らが開発してきたトランスジェニックニワトリ作製技術を応用して、次世代抗体をヒトFc融合型タンパク質として遺伝子改変ニワトリで生産し、卵黄から回収するシステムを確立する。同時に、トランスジェニックニワトリの卵中へのタンパク質生産系をプラットフォームとして利用可能とするための、2つの律速ステップを解消することを目指す。第一番目の点として、遺伝子改変ニワトリを作製する上で必須な生殖腺キメラ個体から目的の遺伝子改変ニワトリを得るためのスクリーニングプロセスの効率を飛躍的に向上させる。第二番目の点として、物質生産に使用する系統を作製する上で多くの系統のスクリーニングが必要となる原因である導入遺伝子の挿入染色体の位置効果による発現のブレを最小限とし、狙った発現レベル・品質のニワトリをスクリーニングなしに得る手法を開発する。このために、研究分担者が開発してきたCre-loxPをベースとした細胞ゲノムへの遺伝子組み込み法である逐次遺伝子組み込みシステム (AGIS) を、ニワトリ細胞に適用することを試みる。これらを用いて、現在の主流である培養動物細胞による生産系とはリソースのかぶりにくい生産系を構築できれば、社会全体での次世代抗体安定供給に役立つことが期待される。

#### 【研究開発中間進捗／研究成果概要】

生殖系列 (精子) への分化実績のあるニワトリ始原生殖細胞 (Primordial germ cell, PGC) 株に遺伝子導入し、レシピエント胚に移植することで得た生殖腺キメラ個体を交配することでトランスジェニックニワトリ個体を得る。これまでに次世代抗体のモデルとして scFv-Fc 発現 PGC 株を用いて複数の生殖腺キメラオス個体を得ており、精子における導入遺伝子コピー数の高い個体を選択して交配と次世代のスクリーニングを進めている。生産された抗体の活性に大きな影響を与える糖鎖を改変したニワトリも同様に作製した。プラットフォーム化のためにトランスジェニックニワトリ作製効率の向上が必要であるため、PGCを欠損したレシピエント胚の作製を進めた。選択的な細胞死を誘導することでPGCを除去した受精卵を得るための2系統のトランスジェニックニワトリを作製した。

最低限の系統を作製するだけで次世代型抗体生産に適したトランスジェニックニワトリを得るための遺伝子操作技術を開発している。AGISに適合した変異LoxP配列と、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をレポーター遺伝子として発現ユニットに持つプラスミドを、CRISPR/Cas9システムによってPGCの特定染色体部位にGFP遺伝子発現ユニットを組み込んだPGCの取得に成功した。このPGCにCre-loxPシステムによってモデル抗体であるscFv-Fcの発現ユニットを導入し、同染色体部位にダブルアレルで導入された細胞の取得にも成功した。この細胞は、培養上清中にscFv-Fcを生産しており、現在トランスジェニックニワトリの作製を進めている。AGISによるPGCの特定染色体部位への遺伝子導入による抗体生産細胞作製の一般性を証明するために、二重特異性抗体を生産する細胞の作製に着手した。また、ニワトリPGCへの新しい遺伝子導入法についても検討を進めている。