

日本医療研究開発機構
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)
事後成果報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）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
（英語）Transgenic Chicken-Based Platform for Efficient Production of Next-
Generation Therapeutic Antibodies

研究開発実施期間：令和 3 年 7 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）西島謙一
（英語）Ken-ichi Nishijima

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）東海国立大学機構・名古屋大学・教授
（英語）Tokai National Higher Education and Research System・Nagoya University・Professor

II 研究開発の概要

タンパク質性医薬品の生産は、CHO など培養動物細胞により行われている。しかし、生産量の限界やコスト低減圧力などは次世代抗体医薬品の市場展開において制限要因となりうる。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した。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。

近年、ニワトリ初期胚由来の始原生殖細胞（Primordial germ cell, PGC）の長期培養によりゲノム編集を含めた種々の遺伝子改変が可能となり、PGC からの遺伝子改変ニワトリ個体の作出が簡便になりつつある。本研究では、培養 PGC を用いて作製した遺伝子改変ニワトリによる次世代抗体医薬生産のための基盤技術を開発した。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として、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。

本研究は 5 個の研究開発項目を設定し、名古屋大学と九州大学で有機的に分担協力して進めた。

研究開発項目 1：次世代抗体生産へ向けた部位特異的遺伝子導入法の最適化

研究分担者は変異型 LoxP 配列への部位特異的遺伝子導入システム (Accumulative site-specific gene integration system, AGIS) を培養動物細胞において実現し権利化を行なってきた。本研究では鳥類細胞における有効性を確認するとともに、Cre-loxP をベースとして外来遺伝子を細胞ゲノムの特定部位に組み込み可能な PGC を樹立しその基本的な性質を確認した。培養温度や培養期間での導入遺伝子発現の安定性および未分化マーカー発現について測定し、PGC の培養特性を明らかとした。生殖腺キメラニワトリ作製の効率測定試験として、レポーター遺伝子導入 PGC を孵卵 50 時間程度のニワトリ胚の血流に移植することでその後の生殖巣への定着状況を調べた。フローサイトメトリーによる解析で生殖巣の細胞の最大 0.34% が移植した PGC であることがわかった。この PGC にモデル抗体である scFv-Fc の発現ユニットを Cre-loxP の反応により PGC の特定染色体部位に組み込んだ細胞を作製した。また、新たに取得した PGC へ scFv-Fc 抗体遺伝子をノックインした細胞を作製した。scFv-Fc 抗体遺伝子を組み込んだ PGC の培養における scFv-Fc 生産や未分化マーカーの発現解析を行い、長期間安定して生産していることを明らかにした。scFv-Fc 生産 PGC をニワトリ胚に移植することで、生殖腺キメラニワトリの作製を行った。

scFv-Fc 抗体以外のモダリティの異なる抗体生産の例として、抗ガン活性を有する二重特異性抗体の遺伝子を発現ユニットとして有するドナーベクターの作製を行い、二重特異性抗体生産を最大化する発現ユニットの構成を決定した。遺伝子を導入して樹立した PGC を移植することで生殖腺キメラニワトリを作製した。今後トランスジェニックニワトリ系統の樹立と生産性の確認を進める。

研究開発項目 2：ニワトリ個体における遺伝子高発現部位の同定

研究代表者はこれまでにニワトリ PGC を用いて抗体遺伝子発現ニワトリを含めて様々なトランスジェニックニワトリの作製を進めてきた。トランスジェニックニワトリの卵中に抗体等のタンパク質医薬品を生産する上で最大のハードルは、多くの個体の中から大規模なスクリーニングにより生産性に優れた優良個体を選抜して行う系統育成の段階である。ようやくニワトリでも可能となりつつあるゲノム編集を用いて、特定の染色体部位に抗体発現ユニットを導入することにより、個体差が少なく、スクリーニングが不要な抗体生産ニワトリの作製方法が実現できると考えられた。そこで、scFv-Fc を発現するユニットを特定の高発現遺伝子近傍に導入した PGC を作製した。この PGC を移植して得られた生殖腺キメラニワトリを交配し、トランスジェニック (ノックイン) ニワトリの作製に成功した。複数の G0 世代トランスジェニックニワトリの scFv-Fc 発現レベルの検定により、生産性の個体差を 2 倍以内に抑えられることが確認された。作製したトランスジェニックニワトリにおける scFv-Fc 発現レベルは、血清、卵白、卵黄において 1 年以上安定していることが示された。scFv-Fc の発現レベルは G2 世代も G1 世代と同レベルであり、個体差が小さいことが確認された。血清、卵白、卵黄から Protein A カラムにより精製した抗体の抗原結合能を確認したところ、いずれも正しく抗原結合能を有した抗体が生産されていることが確認された。これらの結果から、部位特異的遺伝子導入法を用いることで、従来のランダム導入によるトランスジェニックニワトリ作製法に比べて生産量の個体差は非常に小さくできることが示された。スクリーニングの個体数を減らすことができるため、ニワトリによる抗体生産の効率化に大きく貢献できるものと期待された。

研究開発項目 3：高品質の次世代抗体を生産するニワトリ系統の作製

プラットフォームとして有用な新規ニワトリ系統として、ADCC 活性の高いフコース欠損糖鎖を有する抗体を生産するためのフコース転移酵素 8 (Fut8) を破壊したニワトリを作製した。ニワトリの *FUT8* 遺伝子をノックアウトするために、EGFP 発現ユニットを *FUT8* ローカスにノックインした PGC を作製し、生殖腺キメラを経て *FUT8* ノックアウトニワトリ系統の作製に成功した。*FUT8* ノックアウトニワトリのヘテロ個体において血中タンパク質及び臓器でのコアフコース付加量が減少していることが確認された。*FUT8* ホモノックアウトニワトリはほとんど孵化せず、少数生まれた個体も発育が非常に遅く、ニワトリの正常な発生・発育にコアフコースが重要であることが明らかとなった。ニワトリで生産した抗体の糖鎖を確認するために、研究項目 2 で作製したニワトリと交

配して scFv-Fc 生産 *FUT8* ヘテロノックアウトニワトリを作製して解析した。その結果、血中及び卵黄に生産したモデル抗体のフコース付加量は期待通り減少していた。

研究開発項目 4：次世代遺伝子操作法の開発

近年、染色体改変をとまわずに外来遺伝子を発現させる手法として、RNA ウイルス由来の自己複製型ベクターが報告されている。ステルス型 RNA ベクター (Stealth RNA vector; SRV) は、その一例であり、宿主ゲノムに外来遺伝子を組込むことなく、細胞質内で安定的かつ高レベルな遺伝子発現を可能とする点を特徴とする。本研究では、ゲノム DNA に影響を与えることなく医薬品生産が可能なトランスジェニックニワトリの作出を目指し、抗体遺伝子を有する SRV ベクターを PGC に感染させることで抗体生産 PGC の樹立を行った。SRV ベクターによるニワトリ PGC への遺伝子導入法の一般性を確認するため、由来の異なるオス PGC やメス PGC での遺伝子導入を試みたところ、いずれも SRV ベクターが導入された PGC を作製できた。培養特性解析を行ったところ、培養期間中安定して抗体生産が行われるとともに、未分化マーカー発現もみられた。さらに、PGC キメラニワトリ作製のために、SRV ベクター導入 PGC を孵卵 50 時間程度のニワトリ胚の血流に移植することで、その後の生殖巣への定着状況を調べたところ、高い効率で生殖巣に定着できることがわかった。生殖腺キメラニワトリから導入遺伝子を有する次世代ニワトリを得る試みを行っている。

研究開発項目 5：プラットフォームとなるニワトリ系統の作製

PGC を用いた遺伝子改変個体作製の効率化のために、PGC を持たない受精卵を作製しレシピエント胚として利用する技術を開発した。PGC 特異的に Cre リコンビナーゼを発現するニワトリと、Cre リコンビナーゼ依存的に毒素を発現するニワトリの 2 系統のトランスジェニックニワトリを作製し、交配して得た受精卵中で PGC のみで毒素が発現して細胞死により生殖細胞を欠損する戦略とした。2 種のコンストラクトを遺伝子導入した PGC をそれぞれレシピエント胚に移植して生殖腺キメラニワトリ個体を作製した。生殖腺キメラの交配では、Cre 依存的に毒素を発現するトランスジェニック後代は 19%、PGC マーカーのプロモーターにより Cre リコンビナーゼを発現するニワトリは 0.7% の効率でトランスジェニックニワトリを得ることに成功した。性成熟後にこの 2 系統を交配して得た受精卵を解析した。発生初期 (孵卵 2.5 日胚) の血中循環期 PGC の数を調べたところ、ダブルトランスジェニックニワトリで PGC の数が減少していることが確認された。成熟後のメス個体は全く産卵しなかったことから完全に生殖細胞が失われたものと推定された。この受精卵をレシピエント胚として用いて新規トランスジェニックニワトリを作製したところ、調べた G1 世代個体のうち 43% が目的のトランスジェニックニワトリであることが確認された。これにより、抗体生産トランスジェニックニワトリの作製時のスピード・効率を制限する段階である G1 世代のスクリーニングを飛躍的に効率化することに成功した。理論通り 100% の G1 個体がトランスジェニックニワトリとなるための改善を進めている。

本研究で作製した Cre 依存的に毒素を発現するニワトリは Cre 非存在下では mCherry を発現するが、その発現は非常に強いことが明らかとなった。トランスジェニックニワトリゲノムをインバース PCR に供することによって遺伝子挿入部位を決定したところ、ニワトリ 14 番染色体に挿入されていることが明らかとなった。マウスの *Rosa26* ローカスのように全身で挿入遺伝子の高発現を保証する遺伝子領域である可能性が示唆された。

In recent years, a long-term culture of primordial germ cells (PGCs) derived from early chicken embryos has enabled a variety of genetic modifications, including genome editing, making the production of genetically modified chickens via PGCs increasingly straightforward. In this project, we aimed to establish a platform for the low-cost, large-scale production of next-generation therapeutics using genetically modified chickens.

We confirmed that the accumulative site-specific gene integration system (AGIS), targeting mutant loxP sequences, is also effective in avian cells. We established PGCs in which exogenous genes can be integrated

into specific genomic loci using the Cre-loxP system and confirmed their fundamental properties: stability of reporter transgene expression, maintenance of PGC marker expression, and gonadal colonization efficiency. We generated PGCs in which an expression unit for the model antibody scFv-Fc was integrated via Cre-loxP-mediated recombination. scFv-Fc production and PGC marker expression remained stable in long-term culture.

Targeted insertion of antibody expression units into specific chromosomal loci would enable the generation of antibody-producing chickens with minimal individual variation, eliminating the need for screening. To confirm this strategy, we generated PGCs with the scFv-Fc expression unit inserted near candidate high-expression loci and successfully obtained transgenic (knock-in) chickens. Evaluation of scFv-Fc expression levels in multiple G0 individuals demonstrated that inter-individual variation in productivity could be minimized. Expression levels of scFv-Fc in serum, egg white, and egg yolk remained stable for over one year. Comparable expression levels were observed in the G2 generation relative to G1, with low individual variability. Antibodies purified from serum, egg white, and egg yolk using Protein A columns retained antigen-binding activity.

To produce antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity via afucosylated glycosylation, we generated FUT8-knockout chickens. In heterozygous FUT8-knockout individuals, reduced core fucosylation levels were confirmed in serum proteins and tissues. In scFv-Fc-producing FUT8 heterozygous-knockout chickens, the fucosylation level of the model antibody produced in serum and egg yolk was reduced as expected.

Recently, self-replicating vectors derived from RNA viruses have been used to achieve gene expression without altering host chromosomes. Transgenic chickens producing therapeutics can be obtained using these vectors without changing host chromosomes. We established antibody-producing PGCs by introducing the vector and confirmed that these PGCs stably produced antibodies during culture.

To improve the efficiency of generating genetically modified chickens using PGCs, we developed two transgenic chicken lines: one expressing Cre recombinase specifically in PGCs and another expressing a toxin in a Cre-dependent manner. Fertilized eggs from crosses between these lines showed a marked reduction in circulating PGCs. Using these eggs as recipients significantly improved the efficiency of generating transgenic chickens.