

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：染色体工学技術を用いたヒト抗体産生ラットの作製
3. 研究開発代表者：香月 康宏
4. 研究開発の成果

ヒト免疫グロブリン (Ig) 遺伝子トランスジェニックマウスによるモノクローナル抗体作製技術は抗体医薬候補取得のための標準的技術となったが、機能抗体や抗体取得難易度の高い抗原に対する抗体取得のニーズは益々高まっており、同マウスの更なる高性能化が望まれ、現在に至るまで改良が続けられている。非マウスげっ歯類における完全ヒト抗体作製に適用できれば、より広範な抗原に対して望みの特徴を持つ抗体取得の確率を高める画期的なプラットフォーム技術になると期待される。本研究の目的は、抗体医薬品となりうるヒトモノクローナル抗体取得効率の向上を目指して、ヒト Ig 遺伝子全長を保持し、内在のラット Ig 遺伝子を破壊した、完全ヒト抗体産生ラットを作製することである。具体的には1) マウス・ラット個体で安定であり、巨大な遺伝子・複数の遺伝子が搭載可能な人工染色体技術を用いて、ヒト Ig 遺伝子群(H鎖、L鎖)をラットへ導入し、2) 上記に対応したラット Ig 遺伝子群をゲノム編集技術を用いて破壊し、3) 1)と2)を交配することで完全なヒト抗体を産生するラットを作製する。

平成 27 年度は以下のステップで研究を進めた。

(1) 相同組換えベクターの構築

Ig κ 領域のセントロメア側に 1 箇所(Ig κ -cen)およびテロメア側(Ig κ -tel)に 1 箇所、IgH のセントロメア側に 1 箇所(IgH-cen)、Ig λ のセントロメア側に 1 箇所(Ig λ -cen)およびテロメア側に 1 箇所(Ig λ -tel)について、目的部位の各種相同領域をクローニングし、組換え部位を含む合計 5 種類のベクターを構築し、以下の実験に用いた。

(2) DT40 細胞での相同組換えと人工染色体ベクターへのヒト抗体遺伝子クローニング

1. ヒト 14 番染色体が導入された DT40 細胞である DT40(hChr14)に IgH-cen ベクターを導入し、PCR 解析により 23 クローン中 10 クローンで相同組換えクローンであることが確認された。FISH 結果から、6 クローン中 5 クローンで IgH のセントロメア側に組換え部位が導入されていることが確認された (DT40(hChr14-cen)とよぶ)。
2. DT40 細胞にヒト 2 番染色体が導入された DT40(hChr2)に Ig κ -cen ベクターを導入し、PCR 解析により 44 クローン中 3 クローンで相同組換えクローンであることが確認された。FISH 結果から、3 クローン中全てで Ig κ のセントロメア側に組換え部位が導入されていることが確認された (DT40(hChr2-cen)とよぶ)。次に上記改変 DT40 細胞に Ig κ -tel ベクターを導入し、PCR 解析により 48 クローン中 23 クローンで相同組換えクローンであることが確認された。FISH 結果から、調べた 10 クローン中全てで Ig κ のテロメア側に組換え部位が導入されていることが確認された (DT40(hChr2-cen-tel)とよぶ)。
3. CHO 細胞に新規人工染色体の保持された CHO(NAC)に 2 で改変した hChr2-cen-tel を染色体導入法を用いて導入した。PCR 解析により 45 クローン中 7 クローンで hChr2-cen-tel 導入クローンであることが確認された。FISH 結果から、7 クローン中 2 クローンで CHO(NAC)細胞に hChr2-cen-tel が導入されていることが確認された。さらに、組換え酵素を発現させることで NAC ベクター上に Ig κ を含む 2 番染色体領域をクローニングした(CHO(hChr2-NAC)とよ

ぶ)。PCR 解析により 47 クローン中全てのクローンで部位特異的組換えクローンであることが確認された。FISH 結果から、12 クローン 6 クローンで NAC 上に hChr2 の Ig κ よりテロメア側の領域が転座導入されていることが確認された。

4. ヒト 22 番染色体導入 A9 細胞クローンを PCR 解析、FISH 解析から 1 クローン選別した。次に上記 A9(hChr.22)から DT40 細胞に染色体導入法を用いて導入した。PCR 解析により 26 クローン中 14 クローンで hChr.22 導入クローンであることが確認された。FISH 結果から、調べた 6 クローン中 2 クローンで DT40 細胞に hChr.22 が導入されていることが確認された。

(3) ラット抗体遺伝子破壊用ゲノム編集ベクターの作製とラット抗体遺伝子破壊

1. H26 年度までに IgH 領域その 1 に関しては 1 箇所切断による変異(#1 系統)、Ig κ 領域に関しては 1 箇所切断による変異 (#2 系統)、Ig λ 領域に関しては 2 箇所切断による欠失(#3 系統)、IgH 領域その 2 に関しては 2 箇所切断による欠失(#4 系統)、が起こることを想定し、活性の高いゲノム編集ベクターを作製した。高活性であったゲノム編集ベクターを用いて、ラット受精卵へインジェクション後、仮親に移植することで遺伝子破壊ラットを作製した。#1 系統では 200 個インジェクション胚の仮親への移植の結果、11 匹出生した。#2 系統では 131 個インジェクション胚の仮親への移植の結果、8 匹出生した。#3 系統では 200 個インジェクション胚の仮親への移植の結果、4 匹出生した。#4 系統では 239 個インジェクション胚の仮親への移植の結果、4 匹出生した。
2. F0 ラットの尻尾 DNA を用いて PCR 解析、シーケンス解析により、変異個体をスクリーニングした。その結果、#1 系統では 11 匹中 9 匹で何らかの変異がみられ、そのうち 5 匹でホモ変異個体が得られた。#2 系統では 8 匹中全てで何らかの変異がみられ、そのうち 5 匹でホモ変異個体が得られた。#3 系統では 4 匹中 1 匹で Ig λ 領域の欠損個体が得られた。#4 系統では 4 匹中 2 匹で IgH 領域その 2 の欠損個体が得られた。
3. 上記各種 F0 ラットと正常ラットを交配することで、F1 ラット(ヘテロ)を獲得し、各系統の子孫伝達個体をスクリーニングし系統化した。#1 系統では 9 系統、#2 系統では 6 系統、#3 系統では 1 系統、#4 系統では 2 系統、をヘテロにおいて系統化することに成功した。

次年度以降、上記ラット系統を交配することで完全ヒト抗体産生ラットを作製する予定である。