

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative
Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) 染色体工学技術を用いたヒト抗体産生ラットの作製
(英語) Generation of transchromosomal rats that express human antibodies
via chromosome engineering technology

研究開発担当者 (日本語) 染色体工学研究センター 准教授 香月 康宏

所属 役職 氏名： (英語) Yasuhiro Kazuki, Associate Professor, Chromosome Engineering Research Center

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

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。新規人工染色体ベクターによる TC 技術が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を目指して、新規人工染色体ベクターを用いてヒト Ig 遺伝子全長 (H 鎖、L 鎖 κ および λ) を導入し、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。

平成 28 年度は以下のステップで研究を進めた。

(1) 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. CHO(hChr2-NAC)からヒト 14 番染色体が導入された CHO 細胞である CHO(hChr14-cen)に染色体導入法を用いて導入した。PCR 解析および FISH 結果から CHO(hChr14-cen)細胞に hChr2-NAC 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、hChr2-NAC ベクター上に IgH 領域をクローニングした(CHO(IgH/ κ -NAC)とよぶ)。PCR 解析および FISH 結果から NAC 上に hChr2 の Ig κ 領域と hChr14 上の IgH 領域が転座導入されていることが確認された。
2. ヒト 22 番染色体が導入された DT40 細胞である DT40(hChr22)に Ig λ -cen ベクターを導入し、相同組換えで Ig λ のセントロメア側に組換え部位を導入した。PCR 解析と FISH 結果から、Ig λ 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(hChr22-cen)とよぶ)。
3. 次に上記改変 DT40 細胞に Ig λ -tel ベクターを導入し、相同組換えで Ig λ のテロメア側に組換え部位を導入した。PCR 解析と FISH 結果から、Ig λ 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(hChr22-cen-tel)とよぶ)。
4. CHO 細胞に NAC の保持された CHO(NAC)に上記で改変した hChr22-cen-tel を染色体導入法を用いて導入した。PCR 解析と FISH 結果から、CHO(NAC)細胞に hChr22-cen-tel が導入されていることが確認された。

(2) ヒト抗体遺伝子搭載ラット ES 細胞の作製とラットの作製

上記で作製した IgH/ κ -NAC ベクターをラット ES 細胞に染色体導入法を用いて導入し、各 NAC ベクターの導入されたラット ES ラインを選別した。PCR 解析と FISH 結果から、ラット ES 細胞に IgH/ κ -NAC が導入されていることが確認された。次に上記で獲得されたラット ES 細胞をラットの胚盤胞期胚にインジェクション後、仮親に移植することでキメララットの作製に成功した。

(3) ラット抗体遺伝子破壊用ベクターの作製とラット抗体遺伝子破壊

H27 年度までに作成した各系統の F1 ラット(ヘテロ)どうしを交配することで F2(ホモ)ならびに F3(ホモ)ラットを獲得し、genotyping により各系統のホモ化に成功した。各ホモ化ラット系統については以下の解析に用いた。

(4) B 細胞機能欠損の確認と機能回復の確認

上記で作製した各ホモ化ラット系統について、FACS ならびに ELISA 解析を行い、機能解析を行ったところ、IgH-1 領域破壊系統では 9 系統中 4 系統において、Ig κ 領域破壊系統では 6 系統中 3 系統において、Ig λ 領域破壊系統では 1 系統中 1 系統において、IgH-2 領域破壊系統では 2 系統中 2 系統において、機能破壊が確認された。

Monoclonal antibody production using transgenic mice expressing the human immunoglobulin (Ig) gene has become the standard technique for the screening of candidate antibodies for medical use. However, the requirements for the production of functional antibodies and antibodies against specific antigens are increasingly difficult to achieve. Thus, increased technological advances in transgenic mice, some of which have already been generated, are expected to improve antibody production. If the Tc technology using NAC vectors can be applied to the production of fully humanized antibodies using non-mouse rodents, it is expected to be a breakthrough platform technology to obtain desired antibodies against higher numbers of antigens with a higher probability than using the currently available methods. The aim of this study is to generate rats expressing fully human antibodies by transferring the human Ig heavy and light chains (κ and λ) using the NAC vector and by knocking out the endogenous rat Ig genes for monoclonal antibody production as medical use.

During 2016. April and 2017. March, we performed the research as following steps.

(1) Homologous recombination-based chromosome modification in DT40 cells and human Ig genes cloning to novel artificial chromosome vector.

1. The hChr2-NAC in CHO cells was transferred to CHO cells containing the modified human chromosome 14(CHO(hChr14-cen)), via MMCT. PCR and FISH analyses confirmed that hChr2-NAC was actually transferred into CHO (hChr14-cen) cells. IgH region on the modified human chromosome 14 was cloned into the hChr2-NAC by inducing recombinase expression in CHO (hChr14-cen) carrying the hChr2-NAC and resultant clone was designated as CHO(IgH/ κ -NAC). PCR and FISH analyses showed that both Ig κ and IgH region were loaded on the NAC by translocation-based cloning as expected.

2. In DT40 cells harboring a human chromosome 22 ((DT40(hChr22))), a recombination site was inserted upstream of Ig λ region by homologous recombination using targeting vector, Ig λ -cen. PCR and FISH analyses revealed that the recombination site was inserted to desired region on human chromosome 22 (DT40(hChr22-cen)).

3. In DT40(hChr22-cen) cells, a recombination site was inserted downstream of Ig λ region by homologous recombination using targeting vector, Ig λ -tel. PCR and FISH analyses confirmed that desired modification was successfully performed (DT40 (hChr22-cen-tel)).

4. Modified human chromosome 22, hChr22-cen-tel, was transferred into CHO cells carrying the NAC vector via MMCT. PCR and FISH results revealed that hChr22-cen-tel was successfully transferred into CHO cells containing the NAC.

(2) Establishment of rat ES cells carrying human Ig genes and generation of rats with human Ig genes. Constructed IgH/ κ -NAC vector was transferred into rat ES cells via MMCT. PCR and FISH analyses confirmed that the IgH/ κ -NAC was actually maintained in rat ES cells. Next, rat ES cells carrying the IgH/ κ -NAC were injected into rat blastocysts. Injected blastocysts were transferred into pseudopregnant females and chimeric rats were obtained.

(3) Construction of vectors for disruption of rat Ig genes and knock-out (KO) of rat Ig genes. F1 hetero rats were crossed and obtained homo F2 and F3 rats were confirmed by genotyping for each strain establishment. Each homo KO rat strain was further analyzed to confirm gene disruption.

(4) Confirmation of B cell deficiency and functional restoration.

FACS and ELISA analyses were performed using each homo KO rat strain. Results confirmed the functional KO in each rat Ig gene KO strains. In 4 of 9 IgH-1 KO strains, 3 of 6 Ig κ KO strains, 1 of 1 Ig λ KO strain and 2 of 2 IgH-2 KO strains, Ig genes were functionally disrupted.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 3 件)

1. Suzuki T, **Kazuki Y**, Oshimura M, Hara T. Highly Efficient Transfer of Chromosomes to a Broad Range of Target Cells Using Chinese Hamster Ovary Cells Expressing Murine Leukemia Virus-Derived Envelope Proteins. *PLoS One*. 2016 Jun 7;11(6):e0157187. doi: 10.1371/journal.pone.0157187. eCollection 2016.
2. Nakamura K, Morimoto K, Shima K, Yoshimura Y, **Kazuki Y**, Suzuki O, Matsuda J, Ohbayashi T. The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development. *Theriogenology*. 2016 Nov;86(8):2083-90. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.07.001. Epub 2016 Jul 13. PubMed PMID: 27527405.
3. Tomimatsu K, Kokura K, Nishida T, Yoshimura Y, **Kazuki Y**, Narita M, Oshimura M, Ohbayashi T. Multiple expression cassette exchange via TP901-1, R4, and Bxb1 integrase systems on a mouse artificial chromosome. *FEBS Open Bio*. 2017 Jan 28;7(3):306-317. doi: 10.1002/2211-5463.12169. PubMed PMID: 28286726; PubMed Central PMCID: PMC5337897.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **香月康宏**、小林カオル、平林真澄、久世治郎、佐久間哲史、阿部智志、橋本真里、墳崎靖子、千田直人、梶谷尚世、嵩原昇子、香月加奈子、山本卓、千葉寛、押村光雄 (2016年10月13-15日、松本、キッセイ文化ホール/松本市総合体育館)、ヒト薬物代謝予測のためのマウス人工染色体とゲノム編集によるヒト化CYP3Aラットの作製 (ポスター、ベストポスター賞受賞)、日本薬物動態学会第31回年会、国内
2. 宇野愛海、宇野勝洋、古本真也、末松拓郎、**香月康宏**、押村光雄 (2016年9月6-7日、広島、広島国際会議場)、CHO細胞中におけるCRISPR/Cas9を用いた染色体改変技術の開発 (ポスター)、日本ゲノム編集学会第一回大会、国内
3. **香月康宏** (2016年5月27日、つくば産業技術総合研究所)、染色体工学技術によるヒト化動物の作製と医学・薬学応用 (口頭)、第23回HAB研究機構学術年会、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 香月康宏、染色体を利用して何ができる？、ひらめき☆ときめきサイエンス(日本学術振興会 KAKENHI) 講義、平成 28 年 8 月 6 日、細胞から染色体までのミクロの世界を覗いてみよう！、国内

(4) 特許出願