

第 481 回月例研究会資料

トランスジェニック (TG)ニワトリを活用した卵白からの医薬品タンパク質の回収
【 基本 DNA 構築、生殖細胞ゲノムへの挿入ベクター構築、TG ニワトリ作出技術】

令和 6 年 3 月 15 日

元明治大学 教授 丸山公明

トランスジェニック(TG)ニワトリを活用して 卵白からの医薬品タンパク質の回収

《基本DNA構築、生殖細胞ゲノムへの挿入ベクター構築、
TGニワトリの作出技術》

丸山公明

2024年3月15日 科学飼料協会月例研究会

- DNA = 遺伝子
 - ✓塩基配列の一部はタンパク質にコードしているDNA
 - ✓cDNA
- 発現ベクター
 - ✓プロモーター + cDNA
 - ✓細胞内にてアミノ酸を連結して標的タンパク質を合成
 - ✓DNAワクチン
- トランスジェニック(TG)動物
 - ✓モザイク
- 発現ベクターのファインコントロール
 - ✓特定の塩基配列=プロモーターの<ON/OFF>スイッチ
 - ✓特定の組織・細胞 eg. 卵管上皮細胞
 - ✓生理状態 eg. ホルモン環境

バイオ医薬品(biomedicine、生体由来医薬品)

- 最初に人工的に生産されたのはヒト型インスリン
 - ◆大腸菌、酵母(Eli Lilly、1982年)
- 1990年代、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロン、インターロイキン、血小板由来成長因子(PDGF)、骨形成タンパク質(BMP)など特定疾患治療バイオ医薬品の生産
- 抗体やアルブミンの生産開始により第二世代バイオ医薬品の登場
 - ◆抗体を使った検査キット、治療薬
 - ◆ガンなどの手術後の術後ケア
- 2010年末、新薬開発の30%~50%はバイオ医薬品

バイオリアクター

医療用タンパク質の生体からの抽出・精製に代わって
生物を使って生産

1. 真正細菌(大腸菌、枯草菌)
2. 酵母
3. 昆虫細胞
4. 動物細胞

微生物・細胞培養ではパイロットプラントなどの高額な設備投資と
細胞培養液などの無菌環境と精製試薬など的高額な消耗品が必要

5. 動物

遺伝子組換え動物をバイオリアクターと活用すれば畜舎、飼養は通常の家畜・家禽生産と同じで大量のバイオ医薬品をミルク、卵白から回収できる。

バイオリクターとしてのトランスジェニックニワトリ

- A) 標的タンパク質にコードした遺伝子がゲノムに組み込まれたトランスジェニック(TG)始祖(Founder)集団の確立
- B) このTG始祖集団を選抜して繁殖母集団(Primary Breeder)の確保、生産集団の作出
- C) 以降、生産世代を通常飼育し卵白に標的タンパク質を生産

>重要課題は

- 1. 高い効率で始原生殖細胞群のゲノムに標的タンパク質にコードするDNAを挿入できる技術の開発
- 2. 個体選抜を育成時期と性成熟後に行い、精子・卵子ゲノムに高い頻度で当該DNAをゲノムに取り込んだ始祖集団の確立

トランスジェニック(TG)ニワトリ創生のストラテジー

- ① 胚操作を用いて、ニワトリ胚始原生殖細胞 (PGC) ゲノムに標的遺伝子を挿入したTGニワトリを作出 (P0世代)
- ② P0世代を交配して、TG始祖 (Founder) 世代 (P1世代) を作出

理由

放卵時点ではニワトリ胚は60,000細胞まで分裂した胚盤葉ステージに到達しており、通常の遺伝子導入ではトランスジェニックモザイクが生じる。

7日胚では生殖巣に多数の生殖上皮細胞と約1000個のPGCが存在している。

TGニワトリ創生ストラテジー

7日胚時点で高い確率で標的DNAをゲノムに取り込んだPGCが多数存在する生殖巣モザイク個体 (P0世代) を選抜した後、陽性卵子と陽性精子を持つ個体の交配によりホモ接合体を持つ個体をP1世代として作出する

この目的でPGCゲノムに高効率でDNAを挿入できる技術開発が最優先課題である。

ニワトリ胚の胚操作と卵殻外培養

卵殻外培養

- 1. 破卵、卵の内容物をシャーレに移動
- 2. 胚操作1：マイクロキャピラリーによるDNA溶液を胚盤葉ブリッジ下部に注入
- 3. 胚操作2：リポフェクション、エレクトロポレーション（電気穿孔）、ソノポレーション（超音波照射）とこれらの併用で胚盤葉細胞へのDNAの導入
- 4. 初期胚と卵黄部分を新しい卵殻に移動、卵白の補充
- 5. 培養、7日胚で生殖巣の摘出、細胞染色（始原生殖細胞、導入遺伝子）
- 6. 通常培養、16日まで
- 7. 発生過程の胚と卵黄部分を新しく、大きな卵殻（二卵黄卵）に移動、卵白の補充、最終培養
- 8. 孵化

・リポフェクション(リポソームトランスフェクション)

✓リン脂質二重膜にDNAを封入し細胞膜を通過しやすくし、DNAを効率よく細胞内に移入させる

・エレクトロポレーション

✓瞬間的高電圧ショック

・ソノポレーション

✓アルブミン粒子を超音波に曝して爆発・振動ショック

エレクトロポレーター



ソノポレーター



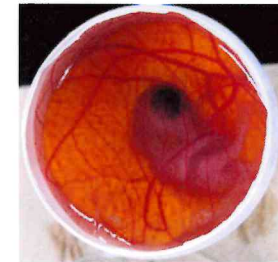
胚の卵殻外培養



胚の卵殻外培養



初期培養ステージ I

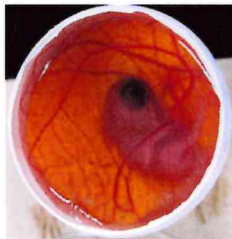


孵化培養ステージ II

卵殻外培養



3日胚



7日胚

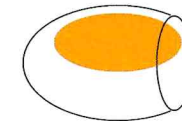


孵化したヒヨコ

参考

Ex ovo embryo culture, Stage I

Stage I (First 3 days)
Temperature : 38.0 °C
Relative humidity : 60~80%
Egg turning : every 15 minutes at 90°



参考

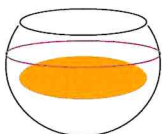
Ex ovo embryo culture, Stage II

Stage II (from the third day through 18th day)

Temperature : 37.5°C

Relative humidity : 60~80%

Egg turning : every 60 minutes at 30°



After embryo culture at Stage I for three days, an embryo is transferred to a larger egg shell to continue embryo culture through 18th day at Stage II

基本DNA(標的遺伝子DNAコンストラクト)

標的遺伝子発現ベクターでの必要要件

1. 標的タンパク質にコードするDNA配列が組み込めるサイトの存在 (MCS)
2. MCSの上流に遺伝子をステロイドに応答し、卵管上皮細胞特異的に遺伝子を発現させる塩基配列の存在
 - ◆オボアルブミン遺伝子コンプレックスではプロモーター上流に上記条件で遺伝子発現を誘導する6666塩基配列が存在
3. マーカータンパク質 (緑色蛍光タンパク質) にコードするDNA配列がIRES塩基配列で隔てられMCSの下流に存在

TG ニワトリ作出用 AT-3/EGFP 発現ベクター

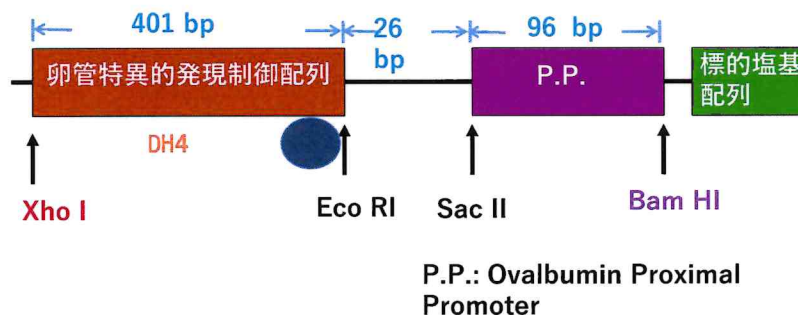
卵管上皮細胞特異的、ステロイド応答遺伝子発現制御カセット (DH4 カセット) + 標的遺伝子cDNA + IRES + EGFP

DH4 断片 + P.P. カセット (特許第5152708号)

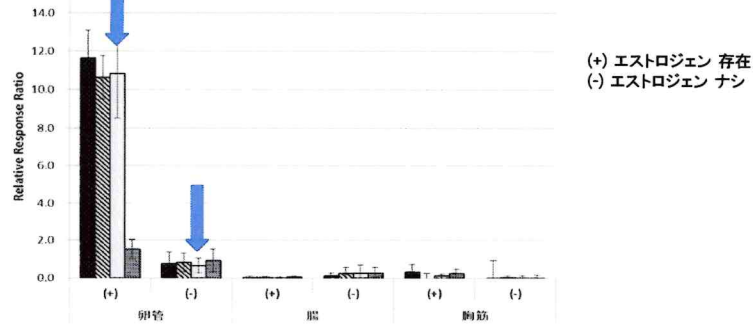
このカセットを標的遺伝子上流に連結することで、産卵時のエストロジェン、プロゲステロン分泌に応答して、卵管上皮細胞だけで遺伝子発現を誘導する



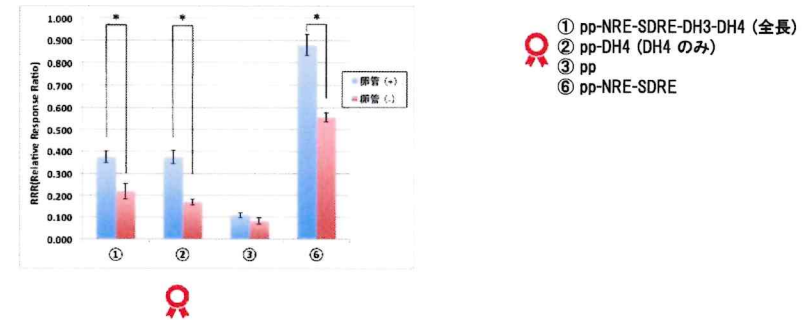
基本(卵管特異的、エストロジェン応答) 発現カセット(特許第5152708号)



組織特異的、ステロイド応答遺伝子発現制御カセット (in vitro、ルシフェラーゼ)



卵管上皮細胞特異的、ステロイド応答遺伝子発現制御カセット 666塩基配列 vs 401塩基配列 DH4



始原生殖細胞ゲノム挿入ベクター

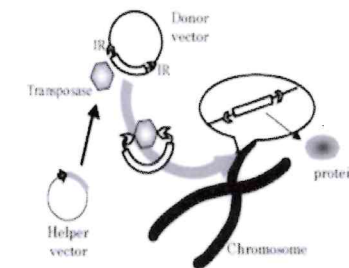
選択肢

- 基本DNAをリポフェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーション、これらの併用
 - ゲノム挿入効率 最大0.1%
 - 基本DNAだけでは十分なゲノム挿入が達成されず、P1世代創生での選抜効率が悪い
- トランスポゾンを活用
 - 標的遺伝子にコードした基本DNAをゲノム挿入ベクター (トランスポゾン) に取り込み、この複合DNAをリポフェクションだけ、リポフェクションとエレクトロポレーション、またはリポフェクションとソノポレーションの併用にて細胞内に導入し、細胞ゲノムへ挿入
 - トランスポゾンの活用でゲノム挿入効率の圧倒的向上 1.5%

生殖細胞ゲノムへの遺伝子導入効率の向上 トランスポゾン(transposon)の利用

【トランスポゾンは】
Transposase 酵素の作用により染色体上を移動する塩基配列

【作用機序】
TransposaseがTransposonの両末端にある反復配列を認識してその部分を切り取り、染色体に挿入する。





【Tol2】

- メダカ由来
- Overproduction inhibitionは確認されていない
- 2-vector system



【piggyBac】

- イラクサギンウワバ由来
- Overproduction inhibitionが生じる、生じない両方の報告がある
- 1-vector system

Overproduction inhibitionとは・・・transposaseの量が増加すると transposonの転移頻度が低下する現象

ゲノム挿入ベクター トランスポゾンベクター

2種類のトランスポゾンベクターから選択： Tol2、 piggyBac

1. 実験用 Tol2

トランスポダーゼにコードする塩基配列を持つプラスミドとカーゴ収納塩基配列を持つプラスミドからなる2ベクターシステムでカーゴ収納プラスミドにEGFP 遺伝子 DNA が取り込まれている (国立遺伝研)

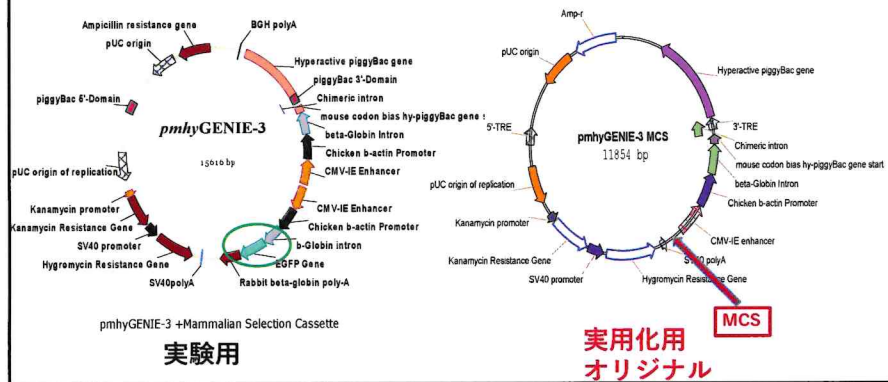
2. 実験用 piggyBac GENIE-3

トランスポダーゼにコードする塩基配列、カーゴ収納塩基配列が一つの環状プラスミドに含まれるトランスポゾンベクターでEGFP 遺伝子 DNA が取り込まれている (ハワイ大学)

3. 実用化用 piggyBac GENIE-3 MCS

piggyback GENIE-3 を改変し MCS (multiple cloning site) を設置した新規ベクター

PiggyBac トランスポゾンベクター



MCS (複数クローニングサイト)

- このサイトに設置されている複数の制限酵素サイトを活用してDNA断片を挿入する。
- 現在、ヒト・アンチトロンビン III (AT III) cDNA を MCS にて pmhy GENIE-3 MCS に挿入したベクターはニワトリ細胞株に導入され、AT III 安定発現株ストックの用意がある。
- TG ニワトリ作出では基本DNAに標的DNAを連結し、このMCSにて pmhy GENIE-3 MCS に組み込む。

トランスポゾンを用いた7日胚生殖巣組織での 始原生殖細胞ゲノムへの遺伝子挿入

実験プロトコール

1. 胚操作

◆マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーション

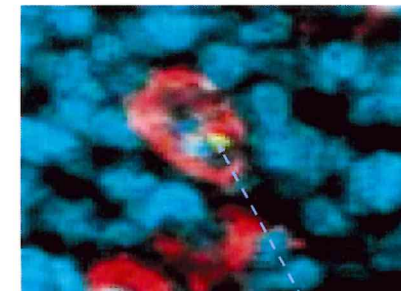
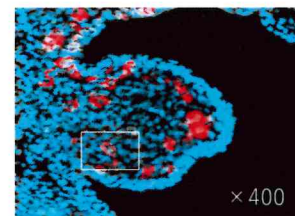
2. 卵殻外培養

3. 7日胚の生殖巣を採取、免疫染色にて始原生殖細胞を探知、緑色蛍光によりゲノムに挿入した EGFP 遺伝子を探知

注) 卵殻外培養中の胚組織、血液から DNA 鑑定で性別を判定する技術は確立してある。

EGFP遺伝子発現が認められた始原生殖細胞

*piggyBac*をリポフェクション法とエレクトロポレーション法の併用法で導入したサンプル



青：核
赤：SSEA-1 (始原生殖細胞)
緑：EGFP (リポーター遺伝子)

※左図の白枠を拡大したもの

EGFP 遺伝子がゲノムに挿入された始原生殖細胞

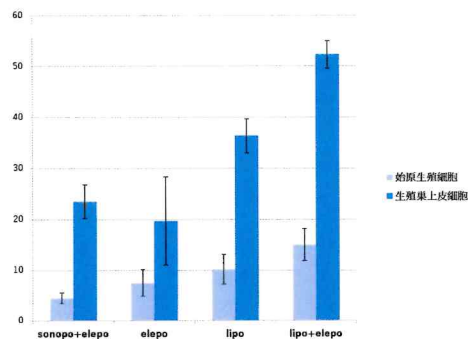
*piggyBac*を導入した際にEGFP遺伝子発現が認められた1 個体当たりの細胞数

	始原生殖細胞	生殖巣上皮細胞
Sonoporation + Electroporation	4.50	23.50
Electroporation	7.50	19.67
Lipofection	10.17	36.33
Lipofection + Electroporation	15.00	52.33
	1:3.5	

【始原生殖細胞内での比較】
・ Sonopo+ElepoとLipo+Elepo間で有意差有り ($\alpha=0.05$)

【生殖巣上皮細胞内での比較】
・ Sonopo+ElepoとLipo+Elepo間
・ ElepoとLipo+Elepo間
・ LipoとLipo+Elepo間で有意差有り ($\alpha=0.05$)

【合計した時の比較】
・ Sonopo+ElepoとLipo+Elepo間
・ ElepoとLipo+Elepo間で有意差有り ($\alpha=0.05$)



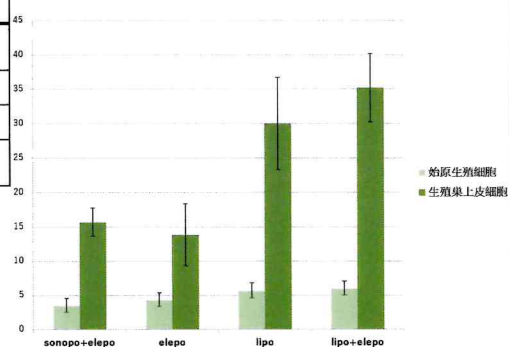
*Tol2*を導入した際にEGFP遺伝子発現が認められた1 個体当たりの細胞数(参考)

	始原生殖細胞	生殖巣上皮細胞
Sonoporation + Electroporation	3.50	15.67
Electroporation	4.33	13.83
Lipofection	5.67	30.00
Lipofection + Electroporation	6.00	35.17
	1:5.9	

【始原生殖細胞内での比較】
有意差無し

【生殖巣上皮細胞内での比較】
・ Sonopo+ElepoとLipo+Elepo間
・ ElepoとLipo+Elepo間で有意差有り ($\alpha=0.05$)

【合計した時の比較】
・ Sonopo+ElepoとLipo+Elepo間
・ ElepoとLipo+Elepo間で有意差有り ($\alpha=0.05$)



プロジェクト総括

1. 緑色蛍光タンパク質遺伝子をリポーターとして用いた場合、EGFP cDNA を piggyBac トランスポーズンに組み込む。
2. EGFP-piggyback DNAをリポフェクタミン試薬でコーティングし（リポフェクション）、胚盤葉ブリッジの下に注入し、胚に電気パルスショックを与えた（エレクトロポレーション）後、卵殻外培養を行う。
3. 7日胚の生殖巣では約15個の始原生殖細胞にて外来遺伝子の挿入が認められる。この時点で始原生殖細胞の総数は約1000個であるから1.5%の確率でゲノム挿入が期待できる。

参考値として、マウス（ブタ）に DNA をマイクロインジェクションした場合の挿入率は0.1%と報告されていることを考慮すると、始祖世代作出の確率に優位性が認められる。

高付加価値家畜産業 1 候補タンパク質とマーケット規模

・ヒト用治療薬、コンパニオンアニマル(イヌ)用治療薬

タンパク質	需要量 (kg)	動物種
ヒト血清アルブミン	100,000	ウシ
α-アンチトリプシン	5,000	ヒツジ
モノクローン抗体	100	ヤギ
アンチトロンピン III	75	ヤギ
ファクター IX	2	ブタ
プロテイン C 阻害剤	1	ウサギ

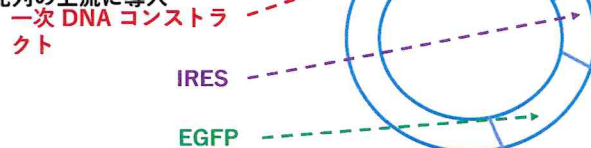
Houdebine
(2009)

産業化に向けた具体的開発努力 - 1

1. 治療薬としてマーケットアブルタンパク質の選定
 - ・ヒト用、コンパニオンアニマル用
 - ・マーケット規模
 - ✓本プロジェクトではヒト血栓形成阻害用アンチトロンピン（ATIII）を標的遺伝子として確保

2. 一次 DNA コンストラクトの構築

3. 二次 DNA コンストラクトの構築
 - ・市販プラスミドベクターを用いて、一次 DNA コンストラクトを IRES-EGFP 塩基配列の上流に導入



産業化に向けた具体的開発努力 - 2

4. 二次 DNA コンストラクトを pmhyGENIE-3 MCS に組み込む
5. DNA を胚操作によってニワトリ胚に導入し、卵殻外培養にて TG 雛を孵化し、育雛、選抜を行い、始祖世代を作出する

タンパク質製剤市場規模、生産コスト

抗体 >3000億円

貧血治療薬 >1000億円

ガン治療薬 >100億円

- CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞株 10,000 L 培養プラント
 - ・ 設備投資 37億円、年間生産量 100kg

ニワトリバイオリクターでの試算 (伴侶動物ガン治療薬)

- 市場 10億円/年間、精製タンパク質 8g、粗原料 32g
- 卵白 1mL 中発現量 10 µg 鶏卵 1個中 300 µg (文献値 50 mg max)
- 鶏卵必要数 107,000個 必要飼育羽数 370羽

高付加価値家禽産業 2 ビジネスモデル

養鶏産業での新規展開

1. TG ニワトリ始祖世代の確立
2. 原原種集団の確保、維持
3. 生産集団の生産
4. 生産集団による卵生産

• ビジネス形態

- a. 提携製薬会社に出荷するTG卵生産 (項目1-4)
- b. 始祖世代または原原種集団の作出、維持、生産集団の販売 (項目1-3)
- c. 始祖世代の委託作出 (項目1)
- d. タンパク質製剤の自己生産

参考情報

- 遺伝子組換えで作製されたタンパク質は翻訳後修飾を受けて、糖鎖が付加される。糖鎖付加パターンは生物種により異なる。
- 現在タンパク質製剤生産に活用されている大腸菌などの原核細胞では翻訳後修飾が行われず、生体中での薬理的半減期が非常に短いので、動物細胞でのタンパク質生産に優位性がある。
- 本プロジェクトの予備実験ではニワトリ細胞が生産するATIIIIには糖鎖付加が認められ、十分な酵素活性が認められた。
- 文献情報ではニワトリ細胞での糖鎖付加パターンはヒト型に一番近く、免疫応答の可能性が一番低いと考えられる。一方、ブタでの糖鎖付加パターンには免疫応答での問題点が一番高いとされている。