



Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens

TNFレセプター/Fc融合タンパク質の遺伝子組換えニワトリによる生産

(JBB, Vol.105, No.5, 454-459, 2008)

京極 健司¹・吉田 和央²・渡邊 裕幸¹・山下 敬¹・河邊 佳典^{2,3}
元野 誠²・西島 謙一^{2*}・上平 正道^{2,3}・飯島 信司²

リウマチのような難病も、治療用抗体を注射することで、症状を劇的に改善できるようになってきた。リウマチやガンなど抗体療法の適用範囲は急速に広まりつつあるが、抗体はホルモンに比べ桁違いに多くの量を投与する必要がある。これらの医薬品は主に培養動物細胞で生産されており、医療費上昇の一因となっている。現在、CHO細胞培養による大量生産技術の改良が鋭意進行中である。一方、新たな可能性として、トランスジェニック技術を応用して、ウシやヤギなど大型ほ乳類の乳汁中やニワトリの卵中に医薬品タンパク質を高生産させる「生きたバイオリアクター」の開発に期待が寄せられている。なかでもニワトリは、“卵は物価の優等生”といわれるほどに安価に大量供給が可能な上、比較的成熟期間が短く、プリオンの問題もないため、有用性が高いと考えられている。一方、その遺伝子組換え技術は、巨大な卵黄が存在するため高倍率の顕微鏡の使用は不可能であることなど、哺乳類で通常用いられている方法が適用できないために大きく立ち後れていた。

著者らは、ニワトリに遺伝子を導入し卵中に医薬品タンパク質を生産させる技術を開発してきた。高力価レトロウイルスベクターをニワトリ胚心臓に注入する手法により、これまでにモデル抗体やエリスロポエチンなどを卵中に生産させることに成功している¹⁻³⁾。今回、ヒト腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) レセプターの細胞外ドメインと IgG1 の Fc 領域の融合タンパク質 TNFR/Fc を対象として選択し、トランスジェニックニワトリによる生産を試みた。TNFR/Fc は炎症を引き起こすサイトカイン TNF- α と結合してその働きを阻害する活性があり、リウマチなどの治療薬としてすでに上市されている。

著者らの常法に従い、導入遺伝子のサイレンシングが起りにくいと考えられるステムセルウイルスをもとにしたレトロウイルスベクターを使用し、全身で発現するアクチンプロモーターの下流に TNFR/Fc 遺伝子を連結した。遺伝子の高発現を可能とするため、受精卵を2.5日孵卵

して発生を進めた初期胚の心臓にウイルスを注入した。孵化したヒヨコでは全身で導入遺伝子 DNA が検出され、ELISA による測定により血清中で TNFR/Fc タンパク質が半年以上安定して発現していることが確認された。

血清中の抗体や Fc 融合タンパク質は、Fc を介して卵黄に移行・蓄積することが知られている⁴⁾。成熟したメンドリでは、卵黄で TNFR/Fc の蓄積が認められ、その発現レベルは半年以上安定であった。一方、卵白では TNFR/Fc はほとんど検出されなかった。なぜ抗体やエリスロポエチンと異なり卵白での生産が低いのか今後検討が必要である。次に、L929 細胞による TNF- α 細胞傷害性試験により、生産された TNFR/Fc の生物活性を *in vitro* で測定した。その結果、卵黄由来 TNFR/Fc の生理活性は血清由来 TNFR/Fc の数分の一程度であった。この原因は現在のところ不明である。以上のことより、標的タンパク質特有の性質を考慮する必要があるが、基本的には著者らの方法でさまざまな医薬品タンパク質を卵中に生産可能であることが示された。

多くの医薬品タンパク質は糖タンパク質であり、体内での生理活性は付加糖鎖の構造に大きく左右されることが知られている。著者らの解析ではトランスジェニックニワトリの血中に生産させた抗体の糖鎖は、末端にシアル酸やガラクトースを含み²⁾、高い生理活性が期待できる。血中から移行してくる卵黄タンパク質にもシアル酸が存在することを確認している。しかし、タンパク質生産に適している卵白においては、シアル酸とガラクトースが結合していなかった²⁾。現在、卵白に生産した医薬品タンパク質の附加糖鎖改善をめざして研究を展開している。

1) Kamihira, M. *et al.*: *J. Virol.*, **79**, 10864 (2005).

2) Kamihira, M. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **141**, 18 (2009).

3) Kodama, D. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 834 (2008).

4) Kawabe, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 518 (2006).

* 著者紹介 ² 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻 (助教) E-mail: nishijma@proc.nubio.nagoya-u.ac.jp

¹ 株式会社カネカ, ³ 現, 九州大学大学院工学研究科化学工学部門