

報告番号	※ 甲 第 10348 号
------	---------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 Establishment and analysis of genetically manipulated chickens producing pharmaceutical Fc-fusion proteins (Fc領域を含む医薬品タンパク質を生産する遺伝子導入鳥類の作製と解析)

氏 名 吉田 和央

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、遺伝子組換え技術を用いた有用物質の生産方法が確立され、現在では解析が進んだCHO細胞により生産されることが多い。CHO細胞は大腸菌に比べてタンパク質の折りたたみ、翻訳後修飾などの点で有利である。しかし高い生産性、コストパフォーマンスの良さ、スケールアップの容易さなどの点からは遺伝子組換え動物を利用した生産システムの確立が必要となる。特にニワトリは1日に約1個の割合で放卵するため、有用物質を卵へ蓄積させれば安定した生産が期待できる。また性成熟の早さ、飼育スペースの確保のしやすさなどの点より遺伝子組換え動物としては優れているので、ニワトリへの遺伝子導入技術の開発が行われてきた。

我々は、遺伝子組換えニワトリの作製にレトロウイルス法を用いてきた。この方法では、ウイルス作製用の細胞であるGP293へ遺伝子治療用に開発されたものと同じタイプのウイルスベクターとウイルス外皮タンパク質発現プラスミドを同時に導入することで、複製能欠損型の汎親和性ウイルスを作製する。作製したウイルスは濃縮後、孵卵55時間目胚(stage14-15)の心臓へ注入することにより、有用タンパク質をコードしている目的遺伝子が発現するニワトリを作製することができる。この方法により今までに抗プリオン一本鎖抗体やヒトエリスロポエチンを発現する遺伝子組換えニワトリが作製されている。

私は本論文で遺伝子組換えニワトリにより有用タンパク質を生産する可能性について検討した。第1章では、遺伝子組換えニワトリを取り巻く現状について述べた。

第2章では、炎症性疾患である関節リウマチなどで実際に医薬品として利用されているTNFR/Fcに着目し、卵中にTNFR/Fcを生産する遺伝子組換えニワトリを作製し、作製した個体に関する基礎的な解析を行った。炎症はアトピー性皮膚炎や花粉症、リウマチをはじめ多くの疾病の病態にかかわる。優れた抗炎症作用を持つ薬剤として、グルココルチコイドなどステロイドホルモンが用いられてきたが、長期間にわたる使用による薬効の減少や副作用など解決すべき問題点も多い。現在、新たな抗炎症剤として、炎症性サイトカインを特異的に阻害するタンパク質性医薬品が使われはじめている。例えば、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )は代表的な炎症性サイトカインであり、その活性を中

和する抗体や可溶性レセプターが炎症性疾患の治療薬として用いられている。本研究で着目した TNFR/Fc は 2 型 TNF レセプターの細胞外領域とヒト IgG の Fc 領域を融合した Fc 融合タンパク質で、関節リウマチや若年性特発性関節炎など炎症性疾患の治療薬として使用実績がある。

TNFR/Fc を生産する遺伝子組換えニワトリは、遺伝子治療に用いられたことのあるマウスシステムセルウイルス由来のベクターを使用して作製した。さらに TNFR/Fc 発現ニワトリの血清と卵に TNFR/Fc が発現、蓄積しているかどうかを酵素免疫測定法により解析した。その結果、血清中に TNFR/Fc が発現していることがわかった。また卵黄へ TNFR/Fc が蓄積していることを見出した。解析したすべてのニワトリにおいて、TNFR/Fc の蓄積量は卵白よりも卵黄の方が多かった。ニワトリを用いて有用タンパク質を生産する時には、安定して生産できることが重要になる。そのため TNFR/Fc が安定して発現しているかどうかを解析した結果、TNFR/Fc は血清、卵黄中に 6 カ月以上にわたり長期間、安定に発現、蓄積していることを見出した。次に、TNFR/Fc を Fc 領域と親和性のあるプロテイン A カラムを用いて精製し、ウェスタンブロットにより解析した。その際にマウスミエローマ細胞である NSO 細胞由来の TNFR/Fc を比較対象とした。TNFR/Fc を検出したところ、NSO 細胞と血清由来の TNFR/Fc は同じ分子量なのに対して、卵黄由来の TNFR/Fc は分子量が小さかった。この分子量差の原因は翻訳後修飾によるものであると推定した。TNFR/Fc は N 型糖鎖修飾部位が TNFR 細胞外領域に 2 箇所、Fc 領域に 1 箇所、また O 型糖鎖修飾部位が TNFR 細胞外領域に 10 箇所ある。ニワトリで生産した TNFR/Fc に N 型糖鎖、O 型糖鎖が付加しているかを N-グルカナーゼである PNGase と O-グルカナーゼである O-glycosidase を用いて解析した。血清、卵黄由来 TNFR/Fc を PNGase で処理したところ共に分子量が減少したため、血清、卵黄由来 TNFR/Fc は N 型糖鎖の付加を受けていることが示された。また PNGase、O-glycosidase により処理したところ分子量がさらに減少したため血清、卵黄由来 TNFR/Fc には O 型糖鎖も付加されていることがわかった。以上の解析結果より、遺伝子組換えニワトリにより生産された TNFR/Fc には N 型糖鎖と O 型糖鎖が付加していると考えられる。次に、遺伝子組換えニワトリにより生産された TNFR/Fc に TNF- $\alpha$  に対する中和活性があるかを、生細胞数を測定できるテトラゾリウム塩による呈色反応で解析した。その結果、血清、卵黄由来 TNFR/Fc は、TNF- $\alpha$  の動物細胞をアポトーシスへ誘導する作用を完全に抑えることができた。また血清由来 TNFR/Fc は NSO 由来 TNFR/Fc と同程度の中和活性を有することがわかった。これらより、遺伝子組換えニワトリにより生産された TNFR/Fc は TNF- $\alpha$  の活性を阻害する効果があると考えられる。以上のように、遺伝子組換えニワトリにより生産される有用タンパク質の一例として、TNFR/Fc を示すことができた。

第 3 章では、遺伝子組換えニワトリにより生産された有用タンパク質の糖鎖の解析について述べた。近年 Fc 融合タンパク質の有効性が注目され、ヒト成長因子 (hGH) やヒトエリスロポエチン (hEPO) を Fc 領域と融合させた Fc 融合タンパク質が開発されている。このようにヒト IgG の Fc 領域はタンパク質の機能を向上させるために有効であり、Fc 融合タンパク質のより詳細な解析が必要となっている。一方糖鎖修飾に関しては、Fc 融合タンパク質の糖鎖の末端構造にシアル酸が含まれているかが重要になる。糖鎖末端のシアル酸が欠如していると、タンパク質の血中半減期が短くなる。また、抗体の修飾糖鎖の末端にシ

アル酸が付加されていると、免疫グロブリン大量静注療法 (IVIG 療法) で有効な効果がみられることが知られている。そのため糖鎖の末端にシアル酸が付加していることが望ましい。さらにヒトとニワトリの IgG には、同じ構造のシアル酸 (NANA, N-アセチルノイラミン酸) が付加されており、他の哺乳類のシアル酸の結合様式とは異なると報告されている。したがって遺伝子組換え動物の中でも特にニワトリで有用タンパク質を作製することに意義があるといえる。以前に我々の研究で抗プリオン一本鎖抗体を発現するニワトリが作製され、遺伝子組換えニワトリが生産した卵、特に卵白から多量の抗プリオン一本鎖抗体が得られている。また第 2 章で述べたように TNFR/Fc を発現するニワトリの卵から TNFR/Fc を得ることに成功しているが、これら一本鎖抗体や TNFR/Fc に機能性糖鎖が付加していることが望まれる。しかし、それぞれのタンパク質に修飾していると考えられる糖鎖について、詳しく解析はされていなかった。そのため、私は卵黄から得られた抗プリオン一本鎖抗体と TNFR/Fc に修飾している糖鎖について、特にその末端構造について解析を行った。

以前の報告では、血清から精製された抗プリオン一本鎖抗体の修飾糖鎖にはシアル酸が含まれていたが、卵黄から精製された抗プリオン一本鎖抗体の修飾糖鎖にシアル酸が含まれているかは不明であった。そこで、まず卵黄から精製された抗プリオン一本鎖抗体の N 型糖鎖の末端にシアル酸が付加しているかを解析した。糖鎖構造の HPLC 解析により、卵黄から精製された抗プリオン一本鎖抗体にはシアル酸を含む N 型糖鎖が 7% 存在することが明らかになった。次に、卵黄から精製された TNFR/Fc の修飾糖鎖のシアル酸付加をレクチンプロットにより解析したところ、卵黄由来の TNFR/Fc には  $\alpha$ -2,6 結合によりシアル酸が付加していることが分かった。解析には  $\alpha$ -2,6 結合により付加しているシアル酸を特異的に検出する SSA レクチンを用いた。これまでの結果では、卵黄由来の TNFR/Fc にシアル酸が  $\alpha$ -2,6 結合により付加しているが、それが N 型糖鎖に由来するのか O 型糖鎖に由来するのかは分からない。そのため N 型糖鎖特異的分解酵素である PNGase を用いて  $\alpha$ -2,6 結合により付加されているシアル酸がどちらの型の糖鎖に由来しているのかを解析し、その結果シアル酸は N 型糖鎖に  $\alpha$ -2,6 結合で付加していることがわかった。また消化後の分子量変化から  $\alpha$ -2,3 結合によりシアル酸が O 型糖鎖に付加している可能性も示唆された。これらの結果より、私は卵黄由来の一本鎖抗体や Fc 融合タンパク質に付加されている糖鎖、特に糖鎖末端にシアル酸が結合していることを示した。

第 4 章では第 2 章、第 3 章の内容を要約し、本論文の成果について触れた。本研究により遺伝子組換えニワトリを用いた有用物質の生産がより発展していくことを望む。