

鶏卵を介したバイオ医薬品生産法の開発

富山県立大学医薬品工学科・講師 河西 文武

■ 緒言

近年、抗体医薬品を中心としたバイオ医薬品が医薬品売り上げの上位を占め始め、シェアを拡大している。中でも抗体医薬品はがんやリウマチの治療で非常に高い治療効果を発揮し、これらの疾患で苦しむ患者さんにとって大変ありがたい存在である。一方で大量生産に至るまでに多くの時間と費用を要し、医療費の高騰化が課題となっている。そこで本研究では有用な抗体医薬品を大量にかつ安価に生産させる技術として、鳥類が持つ卵黄中への抗体移行システムを介した抗体医薬品の大量生産技術の開発を目的とした。鳥類では IgY と呼ばれる哺乳類の IgG に相当する抗体を血中から卵黄中に移行させることが知られている。また卵黄中には一般に約 10mg/mL の IgY 抗体が含まれており、産卵鶏である白色レグホーン種の平均的な卵黄量から換算すると約 100mg の IgY が精製分離できるとされ¹⁾、本研究課題が達成されればほぼバイオ医薬品が大量にほぼ毎日得ることが可能となる。これまでに我々は、ニワトリ初生雛から胸腺を除去することで T 細胞が欠如した免疫寛容ニワトリの作成に成功している。そこで本研究ではまずラット IgG 抗体産生ハイブリドーマ (RB6.8c5) を腹腔内に投与することでラット IgG が鶏卵に移行するか検討を行う。さらに IgY が血中から卵黄中へ移行するのに必要とされる Cu3/Cu4²⁾ を融合した GFP を異種発現系で作成し、免疫寛容ニワトリに投与することで将来的に目的となるタンパク質を卵黄中へ到達させる方法を確立させることとする。

■ 方法

1. ハイブリドーマ培養および腹腔内投与

抗 Gr-1 抗体産生ハイブリドーマ (RB6.8c5) を RPMI 1640 (ナカライテスク) に 10% FBS を加えた培地で培養した。免疫寛容ニワトリに培養したハイブリドーマを 10^9 細胞、腹腔内に投与し、投与後から 30 日を目処に卵を回収した。

2. ラット IgG 精製

腹腔内投与後に回収した卵から卵黄のみを取り出し、IgG Purification System, Rat (American Qualex International, Inc.) を用いて精製を行った。精製後のサンプルをタンパク定量し、鶏卵への移行を確認した。

2. 大腸菌異種発現系

ニワトリ IgY の Fc フラグメント (GenBank: X07174³⁾) を参照に Cu3 および Cu4 ドメインのコドンで大腸菌用に最適化したものを合成した (Thermo Fisher Scientific: GeneArt 人工遺伝子合成サービス)。Cu3/Cu4 ドメインの N 末もしくは C 末に GFP を In-Fusion 法 (Takara Bio) で融合しインサートとした。作成したインサートは pET express (Clontech) に目的タンパクの N 末もしくは C 末に 6 × His が付与するように組み込み、プラスミドとして使用した。作成したプラスミドは BL21 系統の大腸菌に導入し異種発現株とした。異種発現株を OD: 0.8 まで培養後、発現誘導に IPTG (1mM) を加え、37°C で 5 時間培養後の上清を発現チェックに使用した。

3. メタノール資化性酵母異種発現系

ニワトリ IgY の Fc フラグメント (GenBank: X07174) を参照に Cu3 および Cu4 ドメインのコドンをメタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* 用に最適化したものを合成した (Thermo Fisher Scientific: GeneArt 人工遺伝子合成サービス)。Cu3/Cu4 ドメインの N 末側もしくは C 末側に 8 × His を付与した GFP を In Fusion 法で融合し、インサートした。作成したインサートを pPICZ α A (Thermo Fisher Scientific) の α factor 下に組み込みプラスミドとして使用した。作成したプラスミドは *Pichia EasyComp Transformation Kit* (Thermo Fisher Scientific) で *Pichia pastoris* に形質転換し異種発現株とした。異種発現株を BMGY 培地で 30°C、2 日間振盪培養後、発現誘導用培地である BMMY (メタノール濃度: 1%) に培地を交換した。培地交換後、メタノールを 1% 毎日加え 28°C、7 日間振盪培養した上清を発現チェックに使用した。

4. 異種発現の確認と精製

誘導培養後の各上清をサンプルに His-tag 抗体 (クローン: 2D8、MBL) を一次抗体とした Western

Blotting を行った。Western Blotting で異種発現が認められたサンプルを His60 Ni Superflow レジン (Takara) で精製を行いタンパク定量および SDS-PAGE で目的のタンパク質の確認を行った。

■ 結果

免疫寛容ニワトリへのラット IgG 抗体の移行を確認したところ、すべて検出感度以下であり、ラット IgG 抗体の移行は認められなかった。そこでニワトリの血中内の IgY が卵黄中へ移行するのに重要とされる Fc フラグメントに目的タンパクの代わりに検出が容易な GFP を付与し、血中内投与を経て鶏卵に移行が可能かを確認するために、Fc フラグメントの Cu3/Cu4 に GFP を結合させたタンパク質の作成を行った。まず大腸菌による異種発現を試みたところ、上清中に目的のタンパク質は認めず、不溶化しているものと思われた。次にメタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* による異種発現では Cu3/Cu4 ドメインの N 末側に 8 × His-GFP を付与したもののみが上清中に認められ Ni sepharose による精製を行ったところ、SDS-PAGE 上でシングルバンドとして認められた(図 1)。最終精製産物としては 12.6mg 得られた(表 1)。

■ 考察

IgY は哺乳類 IgG と構造的に異なり、むしろ IgM や IgE に近いことが知られている³⁾。免疫寛容ニワトリに IgG 抗体を投与しても卵黄中へ移行できなかったのはこの構造的な違いによるものと思われた。大腸菌による異種発現の失敗からアルコール資化性酵母による異種発現系への切り替えに時間を要してしまい、残念ながら期間内で免疫寛容ニワトリへの目的タンパクの投与は間に合わなかったが、本研究課題で作成したタンパクを大量培養を行い投与実験レベルまで増やした後、鶏卵中への目的タンパク質の移行確認を行っていきたい。また本研究課題で作成したタンパクの鶏卵への移行が認められた後は、GFP の代わりにラット IgG 抗体を TEV 配列を挟んで付与し、投与実験を行い、当初の目的であった鶏卵を介したバイオ医薬品生産法の足がかりとしていきたい。

■ 要約

近年、バイオ医薬品が医薬品売り上げの上位を占め始め、シェアを拡大している。中でも抗体医薬品はがんやリウマチの治療で非常に高い治療効果を発揮し注目されているが、一方で大量生産に至るまでに多くの時間と費用を要し、医療費の高騰化が課題となっている。そこで本研究では抗体医薬品を大量にかつ安価に生産させる技術として、鶏卵を介した異種抗体生産法の開発を目的とした。まずニワトリ初生雛から胸腺を除去することで T 細胞が欠如した免疫寛容ニワトリにラット IgG 抗体産生ハイブリドーマ (RB6.8c5) を腹腔内に投与することでラット IgG が鶏卵に移行するか検討したところ、残念ながら鶏卵中への移行は認められなかった。そこで次に IgY が血中から卵黄中へ移行するのに必要とされる Cu3/Cu4 を融合した GFP を異種発現系で作成することとした。その結果、大腸菌による異種発現系では不溶化しており、目的のタンパク作成はできなかったが、*Pichia pastoris* 異種発現系において、N 末側に GFP を付与した Cu3/Cu4 が作成できた。今後、本研究課題で作成したタンパクを免疫寛容ニワトリに投与することで将来的に目的となるタンパク質を卵黄中へ到達させる方法を確立させることとする。

■ 文献

- 1) Hatta H, Kim M, and Yamamoto T., Agric. Biol, Chem., 54, 2531-2535, (1990)
- 2) Murai A, Murota R, Doi K, Yoshida T, Aoyama H, Kobayashi M, and Horio F., Develop. Comp. Immunol., 39, 378-387, (2013)
- 3) Parvari R, Avivi A, Lentner F, Ziv E, Tel-Or S, Burstein Y, and Schechter I., EMBO J., 7, 739-744, (1988).

表1 タンパク質精製表

	Protein (mg)	Yield (%)
Supernatant	2034	100
Ni Superflow	12.6	0.6

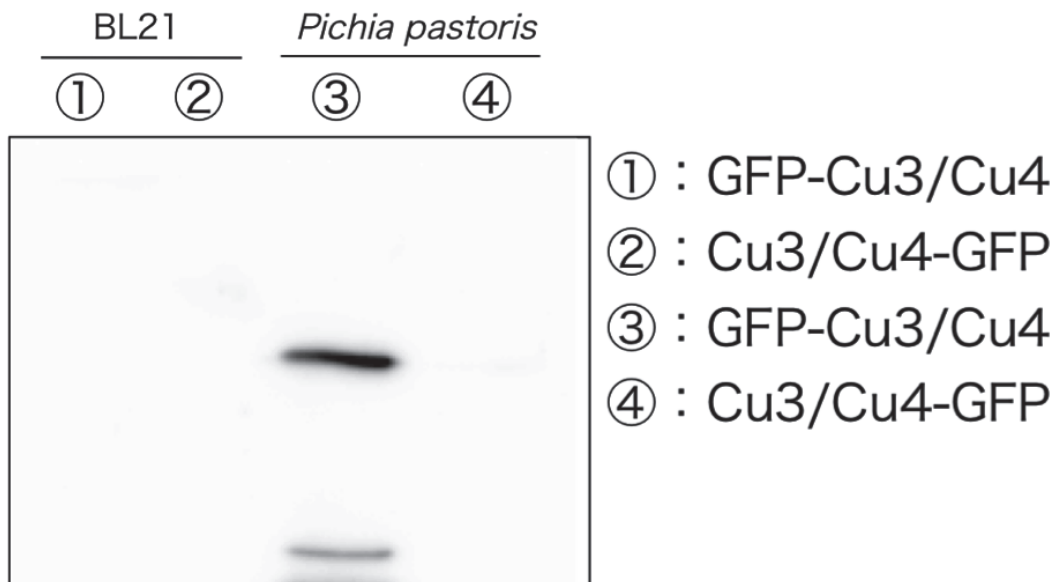


図1. 培養上清の Western Blotting (Anti-His-tag)
 ③レーンでのみ目的タンパクの発現を認めた