

トランスジェニック家畜を利用した 生理活性物質生産システムの現状と展望

東 條 英 昭

日本獣医生命科学大学客員教授（非常勤講師）・東京大学名誉教授

要 約 1980年代にヒトのインスリンや成長ホルモンが遺伝子組換え大腸菌から得られるようになった。しかし、この生産システムはこれらのホルモン以外の生理活性物質に適用するには限界がある。細菌は、高次構造をもつタンパク質を構築できない。これまでに、酵母、植物、昆虫、ニワトリなどを宿主とした生産システムが開発されてきたが、生理活性物質の生産に利用するには限界がある。現在、トランスジェニック (Tg) 家畜の乳汁中にヒトの生理活性物質を分泌させる生産システムが注目されている。2006年にEAEM (欧州医薬品評価庁) がTgヤギの乳汁から得たヒトアンチトロンビンⅢを世界で最初の医薬品として認可した。この生産システムには、未だ改善すべき課題はあるものの、将来多くの関連企業が参入してくることが予想される。

キーワード：トランスジェニック家畜，組換えタンパク質，医薬品

日獣生大研報 63, 12-22, 2014.

1. はじめに

1980年に、遺伝子DNAを動物(マウス)の受精卵の前核に注入する方法¹⁸⁾により、外来遺伝子を個体レベルで発現させることができるトランスジェニック技術(Transgenic technology)が開発された。その後、トランスジェニック技術によって作製された膨大な数のトランスジェニック(以後Tgと略称)動物が、生物学、医学、薬学、農学における生命科学研究の進展に大きく貢献してきた。つづいて、1985年にHAMMERら²⁰⁾がTg家畜の作出に初めて成功したことから、トランスジェニック技術を家畜に応用して、家畜の遺伝的改良、家畜生産物(肉、乳、毛、卵など)組成の改変、さらには、家畜を宿主とする臨床医学上重要なヒト生理活性物質の生産システム(バイオリアクター)の開発や異種臓器移植用の遺伝子改変ブタの開発などを目指した研究が精力的に進められ、これまで非常に多くのTg家畜が作出されてきた。Tg家畜の応用に関しては、過去に多くの総説等^{8,39,58,70,71,77)}が適宜発表されているので参照頂きたい。

本稿では、Tg家畜のうち、ヒト有用物質を生産させるバイオリアクターとしての利用に関する研究や実用化の現状ならびに今後の課題・展望について紹介する。

2. 生理活性物質の利用の歴史

古くは、ヒト糖尿病の治療にブタの膵臓から抽出したインスリンが使用され、また、成長ホルモン(GH)の場合には、

ヒトの脳下垂体から抽出したものが利用されていた。その他にも、ヒトの血液から抽出・精製された多くの生理活性物質が血液製剤として利用されている。しかし、これらの物質のほとんどは、血液中に微量にしか含まれていないため、ヒトの血液や臓器由来の製剤を利用するには量的に限界があり、非常に高価である。また、各種病原体(エイズウイルスや肝炎ウイルスなど)の汚染の問題もある。ところが、1980年代初期に遺伝子工学技術が開発されたことにより、ヒトインスリンを大腸菌で生産・抽出できるようになった。現在では糖尿病患者はこのヒトインスリン製剤を使用している。その後、ヒトGHも同様な方法で生産することに成功し、治療等に利用されている。また、以前は、ウシの成長や乳量の向上を目的にウシ脳から抽出したGHが利用されていたが、プリオン(ウシ海綿状脳症の原因物質)の汚染が大きな問題となった歴史がある。現在は、大腸菌を宿主とした生産システムにより安全なウシGHが得られるようになった。

3. 遺伝子組換え技術を利用した生理活性物質の 種々な生産システム

インスリンやGHは純タンパク質であるが、ほとんどのヒトの生理活性物質は、遺伝子からの翻訳後に種々な修飾(post-translational modification: 翻訳後修飾)を受けて初めて生理活性を持つ物質となる。即ち、大腸菌内では、タンパク質のサブユニットの形成や糖鎖の付加などの高次構造を構築させることができない。さらには、生理活性物

質は、通常、コードする遺伝子からは活性を持たない前駆体（プレプロプロテインまたはプロプロテイン）として合成され、その後に各種のプロセッシングを経て活性を持つ物質が生産される。翻訳後修飾には、糖鎖の付加の他に、 γ -カルボキシル化、S-S結合、リン酸化などの反応があり、また分泌性タンパク質はシグナルペプチドの除去が必要である。これらの理由から、純タンパク質であるインスリンやGHでさえも、大腸菌を宿主として活性を持つ物質を得るまでには、予想外の時間を要した経緯がある。

ヒトの生理活性物質を大腸菌で生産させるシステムの限界から、大腸菌以外の様々な生物種を宿主とする生産システムを開発する研究がこれまでに精力的に行われてきた（Table 1, Table 2）。

酵母は、大腸菌の様な原核生物と異なり、ヒト細胞と同様に真核生物であることから、タンパク質のプロセッシングが期待され、またタンパク質を大量に生産できる利点¹⁹⁾がある。しかし、致命的な問題は、タンパク質におけるS-S結合を形成する能力がないため、タンパク質の高次構造を作れない。そのため、ほとんどのヒト生理活性物質やモノクローナル抗体、さらにはウイルスワクチンなどの生

産に適用できない。

つぎに、昆虫細胞を宿主とする生産システムが開発されている。遺伝子組換えバキュロウイルス Sf9 をベクターとして昆虫細胞に感染（遺伝子導入）させて有用物質を生産させるシステム^{12,47)}は、限られたタンパク質であるが、これまでに広く利用されてきている。しかし、この方法にも幾つかの限界がある。まず、組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に導入（感染）する場合には、組換えウイルスが新しい細胞へ再感染するまで細胞の増殖を継続させなければならない技術的な課題がある。また、昆虫細胞はタンパク質に糖鎖を付加する能力がなく、ごく一部のタンパク質は例外として、ヒト生理活性物質の生産には適用できない。

一方、植物を宿主とする生産システム¹⁾は、遺伝子の導入が比較的容易であり、倫理的問題がほとんどなく、現在ヒト疾患の診断や実験研究に必要な酵素類が企業レベルで生産・販売されている。しかし、このシステムをヒト生理活性物質の生産に利用するには、やはり限界がある。植物細胞は、動物細胞と同様にタンパク質の高次構造を効率的に構築する能力があり、また、サブユニットの形成能力も有するものの、動物細胞の様に糖鎖を付加する能力がな

Table 1. Comparison of the different production systems of recombinant proteins*

	Bacteria	Yeasts	Insect cells + baculovirus	Animal cultured cells	Transgenic plants	Transgenic animals
Practical productivity	++	++	+	+	++	++++
Investment cost	+++++	+++++	++	+	+++	+++
Production cost	+++++	+++++	++	+	+++	+++
Time for the first production	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++
Collection	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Purification	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Post-translational modifications	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Stability of products	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Pathogenic contamination	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Patent potency	++++	+++	+++	++	+++	+++
Marketing of products	++++	+++	+++	+++++	+	+++

* Cited in part from the paper by HOUNDEBINE²⁸⁾

Table 2. Protein synthesis and post-translational modification of recombinant proteins produced by different systems*

	Protein synthesis	Glycosylation					Xylole
		Galactose	Fucose	Mannose	N-acetylcoline	Cyaric acid	
Bacteria	○	×	×	×	×	×	×
Yeasts	○	○	×	×	○	×	×
Insect cells	○	○	○	○	○	×	×
Plants	○	○	○	○	○	×	○
Animals	○	○	○	○	○	○	×

* Cited in part from the paper by HOUNDEBINE²⁸⁾ ○ : possible, × : not possible

い。また、植物で合成されるタンパク質にはシアル酸末端がない。これらの欠点を補う手段として、動物細胞で起こる糖鎖の付加に関与する各種の酵素遺伝子を植物細胞に導入する研究¹⁷⁾が進められており、今後の進展が期待される。

ところで、植物を利用するシステムでは、通常、組込む遺伝子のプロモーターに依存して組換えタンパク質が葉や種子に貯蔵されるが、それらを抽出する過程で植物に含まれているプロテアーゼにより組換えタンパク質が分解されるため、抽出・精製が難しい。また、植物細胞はヒトに対して有害な免疫反応の原因となるキシロースを含んでいる。しかし、何と云っても、植物を宿主とする生産システムの最大の利点は、農業技術により大規模化が可能のため組換えタンパク質を無限に生産できる点である。また、植物はヒトや動物に感染する病原微生物をほとんど含まず、組換えタンパク質を葉や種子の状態ですべて長期貯蔵ができ、さらには、組換え植物種子のバンクを設立することにより、必要に応じて組換えタンパク質の再生産が可能である。現在、植物を宿主とする生産システムは、ヒトの食材として利用しないタバコや家畜の飼料用牧草（アルファルファ等）¹⁾を宿主とする生産システムが企業レベルで計画されている。また、浮き草（アオウキグサ）やある種の藻類を宿主とする研究⁴²⁾も進められている。一方、組換え植物が野外で栽培された場合には、ヒトに対してアレルゲンとなる物質³⁶⁾を拡散させる恐れがある。その対策として、植物を屋内（閉鎖型植物工場）で栽培し、植物由来のウイルスをベクターとして植物に感染させる方法²¹⁾が研究されている。事実、植物を宿主とする方法で活性を持つ抗体の生産に成功¹⁶⁾している。今後植物からの精製技術が向上してくれば、組換えタンパク質の大量生産システムとしての将来が期待できる。

これらの宿主に比べ、ヒトや動物から樹立された培養細胞、特にチャイニーズハムスター卵巣の細胞から樹立された CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞が、有用物質を

生産させる宿主として、この 20 年間、広く利用されてきた。CHO 細胞を宿主とする生産システムの最大の利点は、動物の生体内で合成される生理活性物質と同様に十分な翻訳後修飾を経た物質を培養液中に分泌させることができることである。しかし、この方法にも弱点があり、タンパク質への糖鎖の付加が必ずしも完全でないことである。また、細胞内での組換えタンパク質の生産量が低く、さらには、動物細胞の培養技術は向上したものの、培養コストが高く、その利用には限界がある。

4. 動物を宿主とする生産システム

以上の様な生物種に比べ、動物を利用した生産システムには多くの利点がある。これまで、血液中⁵²⁾、精漿中¹²⁾、尿中³⁴⁾、卵白⁵⁵⁾、カイコの絹糸腺⁶³⁾、昆虫の幼虫（蛹）のリンパ液中⁴⁷⁾に分泌させる方法が研究されている。特に家畜は、ヒトと同じ哺乳類であるため、タンパク質の翻訳後修飾が十分に期待できることである。すなわち、家畜を宿主として利用すれば、ヒトで合成される生理活性物質と同様な物質を比較的 low cost で大量生産できる (Table 3)。動物の血液中に分泌させる方法は、組換えタンパク質の生産量が多い場合には、動物自体の生理機能に悪影響すること⁵³⁾が認められている。また、動物から由来する人獣共通病原体の汚染の問題があり、動物自体の同類物質との分離にも技術的な課題がある。そこで、導入遺伝子のプロモーターとして乳腺で特異的に発現する遺伝子を利用すれば、Tg 動物の乳汁中に有用物質を分泌させることができる。現在、家畜の乳汁中に有用物質を分泌させる生産システムの開発が進行中で、関連の総説^{24,26,28,35,52,62,64)}が適宜発表されている。Tg 動物の乳腺を有用物質生産の宿主として利用するシステムの利点は、1) 高い生産量が得られる。2) 培養細胞の利用に比べ資本の投資が少なく済む。3) タンパク質の翻訳後修飾などのプロセッシングが期待できる。4) ヒト血液に由来する病原体（エイズウイルスや

Table 3. Human proteins secreted in milk of transgenic farm animals after 1990*

Proteins	Species where produced	Gene promoter	Researchers
Interleukin-2	Rabbit	Rabbit β -casein	Buhler et al, 1990 ⁵⁾
α -antitrypsin	Ovine	Ovine β -lactalbumin	Wright et al, 1991 ⁸⁴⁾
Tissue plasminogen activator	Goat	Ovine β -lactalbumin	Ebert et al, 1991 ¹³⁾
Lactoferrin	Cattle	Bovine α s1-casein	Krimpenfort et al, 1991 ³⁸⁾
Activated protein C	Pig	Mouse whey acidic protein	Velandar et al, 1992 ⁷⁶⁾
IGF-I**	Rabbit	Bovine α s1-casein	Wolf et al, 1997 ⁸³⁾
α -lactalbumin	Pig	Bovine α -lactalbumin	Bleck et al, 1998 ³⁾
Factor VIII ***	Ovine	Ovine β -lactalbumin	Niemann et al, 1999 ⁵¹⁾
Lysostaphin	Cattle	Ovine β -lactalbumin	Wall et al, 2005 ⁷⁸⁾
Lysozyme	Goat	Bovine α s1-casein	Maga et al, 2006 ⁴⁵⁾
IGF-I	Pig	Bovine α -lactalbumin	Wheeler et al, 2006 ⁸¹⁾

* Cited from the paper by NIEMANN and KUES⁵²⁾, ** Insulin-like growth factor-I, *** Blood coagulating factor VIII

Table 4. Comparison of the time required to obtain proteins in different transgenic species*

	Rabbit	Pig	Sheep	Goat	Cattle
Age at sexual maturity (months)	5	6	8	8	15
Gestation time (months)	1	4	5	5	9
Time between gene transfer and first lactation	7	16	18	18	33
Number of offspring	8	10	1-2	1-2	1
Annual milk yield (liters)	15	300	500	800	8000
Recombinant protein per female per year (kg)	0.02	1.5	2.5	4	40

* Cited from the paper by HOUNDEBINE²⁸⁾

肝炎ウイルス)などの有害物と分離できる。これまで、種々のヒト生理活性物質を各種哺乳類の乳汁中に分泌させることに成功している (Table 4)。しかし、大家畜をバイオリアクターとして利用する場合は、妊娠期間が長く、単胎であり、飼養経費が掛かるなどの要因で生産コストが高くなることを考慮しておく必要がある。これに比べるとヤギは、大家畜に比べ取扱いが容易で、多胎であり、世代交代が短かく、乳汁中から遺伝子組換えタンパク質を効率よく得られることから、これまで主に、乳用ヤギ⁴⁶⁾がバイオリアクターとして利用されている。しかし、ウサギの利用⁴⁹⁾が最も多く、ウサギは繁殖率が高く、多胎であり、プリオンの汚染もなく、ヒトと共通の病原体が少ないのが利点である。ブタは、ウサギに比べると生産システムを立ち上げるためのコストが高いが、乳量が多い。これらに対し乳牛は、生理活性物質を大量に生産させるのに最も適しているが、ウサギやブタの様には組換えタンパク質の糖鎖の付加が期待できない弱点⁶²⁾がある。

ところで、最近まで、Tg ニワトリの作出が技術的に非常に困難であった。ところが、レンチウイルスをベクターとして胚に感染させる方法^{43,56)}が開発され、さらに、ニワトリの始原生殖細胞から分化多能性を持つ細胞 (PGC: Pluripotent germ cell) が樹立されたことから、導入遺伝子をレンチウイルスに組み込み、これをベクターとしてPGCに導入 (感染) し、ついでキメラニワトリ作製する方法⁷⁵⁾で、Tg ニワトリを比較的容易に作製できるようになった。ニワトリのPGCに遺伝子を導入する方法により卵白でモノクローナル抗体を生産させることに成功⁸⁷⁾しており、PGCの利用によりニワトリへの遺伝子導入が容易になれば、今後、有用タンパク質を卵白で合成させるシステムが有効な手段として発展する可能性がある。

5. 家畜への各種遺伝子導入法

これまでに作出されたTg家畜のほとんどは、遺伝子DNAを受精卵の前核に顕微注入する方法¹⁸⁾によるものである。当初、Tg家畜を作出するための信頼できる唯一の手段は、受精卵の前核に遺伝子DNAを顕微注入する方法であったが、この方法によるTg動物の作出効率は注入受精卵の0.5~3%⁸³⁾である。その効率を上げるためにレン

チウイルスをベクターに用いた顕微注入法^{22,23)}が開発されている。また、遺伝子DNAと精子を共培養し、体外受精^{40,41)}あるいは顕微受精 (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection)^{50,54,85)}する方法、導入遺伝子をES細胞 (Embryonic stem cell: 胚性幹細胞) に導入 (トランスフェクション) し、キメラ動物 (マウス) の作製を経由してTg動物を作出する方法⁷⁾がある。ES細胞を利用する方法は、これまで、真のES細胞はマウスでしか樹立されていないため、家畜には利用できない。なぜ、ES細胞がマウス以外の動物種で樹立できないかの理由は不明である。なお、その他の動物種では、ES様細胞 (Embryonic-like stem cell)²⁾は得られているが、キメラ動物で生殖細胞へ分化する能力を持たないため有用性が低い。

ところが、1996年以降に家畜から採取した体細胞の核を徐核未受精卵に移植して、クローン個体を作製するのに成功^{6,82)}したことから、目的の遺伝子を体細胞やPGC⁷⁵⁾に導入 (トランスフェクション) し、さらに体細胞核移植によりクローン個体を作製する方法³³⁾で家畜への遺伝子導入が可能となった。この体細胞核移植によるクローン個体の作出法により、ES細胞が樹立されていない家畜においても内在遺伝子をノックアウト (gene targeting)^{57,60)}することが可能となった。遺伝子導入用の体細胞としては、様々な種類の体細胞が利用されてきたが、一般的に胎児の線維芽細胞が利用されている。その他にも、成体から採取した卵胞顆粒膜細胞や皮膚線維芽細胞も利用されている。この体細胞核移植による遺伝子ノックアウト法は、ヒトへの臓器移植用遺伝子改変ブタ⁹⁾の開発研究に不可欠な手段として利用されている。一方、組換えアデノウイルスをベクターとして乳腺に感染させ、目的の遺伝子を乳腺で一過性に発現させて、乳汁中に分泌させる方法⁷³⁾も研究されている。この方法は、外来遺伝子の発現による動物自体への影響を軽減する利点がある。

6. 導入遺伝子の発現と翻訳後修飾

Tg動物で目的の遺伝子を発現させるためには、導入遺伝子内にプロモーター、エンハンサー、インスレーター、イントロン、転写終結点などのDNA領域を組込むこと^{15,27)}が必要である。そのうち、乳汁中に有用物質を分泌させる

ためには、乳汁タンパク質遺伝子（カゼイン遺伝子など）のプロモーターが利用されている。これまでの研究から、乳腺で目的の遺伝子を十分に組織特異的ならびに時期特異的に発現させるには、プロモーターを含む大きなサイズの 5' 側 DNA 領域を導入遺伝子に組込む必要のあることが明らかになった^{26,61)}。また、DNA 顕微注入による遺伝子導入法では、宿主 DNA に導入遺伝子の組込まれる部位が任意であるため、部位によっては導入遺伝子の発現がなく、発現があっても非常に低い場合がある。そこで、導入遺伝子の宿主 DNA 内の挿入部位に関係なく導入遺伝子の発現を得るために、エピソームベクター²⁵⁾（導入遺伝子を染色体外で発現させるベクター）の利用が研究されている。乳腺で組織特異的に発現する遺伝子プロモーターを利用した場合でも、Tg 動物自体の生理機能に影響がみられる場合がある。これは、通常サイズのプロモーターでは、導入遺伝子を乳腺のみで組織特異的に発現させることが困難であることを示している。導入遺伝子が乳腺で発現するだけでなく、他の臓器でも発現し血液中に分泌されたためである。事実、マウス乳清酸性タンパク質遺伝子（WAP）のプロモーターを組み込みヒト GH を乳汁中に分泌させる実験⁷²⁾で、Tg マウスの中に血液中の GH 濃度が高く、不妊を示すマウスが観察されている。また、ヒトエリスロポエチンを乳汁中に分泌した Tg ウサギ⁴⁸⁾では、自身の生理機能に影響があった。その後、組織特異的に発現する遺伝子について、プロモーター領域を含む、長い 5' 側制御領域を組み込めば²⁹⁾、導入遺伝子を組織特異的ならびに時期特異的に発現させることが可能であることが判明した。そこで、目的の遺伝子を YAC (Yeast artificial chromosome) に組み込んで、家畜に導入する研究が進められている。現在のところ、乳汁中に 1mg/ml 以上の濃度で有用物質が含まれていないと、商業化が困難であると考えられている。一方、乳腺で組換えタンパク質を高濃度に合成できたとしても、全ての組換えタンパク質への糖鎖の付加が期待できないという矛盾がある。事実、Tg ヤギの乳汁中に分泌させたヒトアンチスロンビン III は、自然界のそれに比べシアル酸含量の低かった結果が報告³⁷⁾されている。同様に、Tg ウサギ³⁷⁾の乳汁中に分泌させたヒト C1 インヒビターには、シアル酸が十分に付加されていなかった。さらには、Tg ニワトリの卵白から抽出したモノクローナル抗体にはシアル酸を全く含まれていなかった報告⁷⁴⁾もある。

このような物質は、生体内での半減期が短いので、実際の患者への使用には適さない。酵母や CHO 細胞を宿主に目的の遺伝子と糖鎖の付加に関する酵素遺伝子を同時に導入すると、糖鎖の付加の向上がみられたとの報告^{19,79)}がある。さらに、モノクローナル抗体を卵白で合成させる研究では、N-アセチルグルコサミン遺伝子を同時に導入・発現させることにより、抗体の高次構造が構築され、抗体の細胞障害性を高めるのに成功⁷⁴⁾している。一方、抗体におけるフコースの欠如は抗体の細胞障害能力を高める³¹⁾。また、シアル酸化された抗体は、Fc-FcRn レセプター（免

疫グロブリン分子の Fc 部位に対する受容体タンパク質）に対する親和性を低下させ、抗炎症反応の誘導を高めることが知られている。動物に感染するある種の病原性細菌は、抗体の脱シアル酸化を誘起することにより、毒性作用を高めること³¹⁾が知られている。このことから、もし組換えモノクローナル抗体にシアル酸を付加するか、あるいはフコースの除去ができれば、抗炎症反応を誘起できる可能性がある。抗体の理想的な作用はがん化した腫瘍細胞を破壊することである。卵白で合成させた組換え抗体がシアル酸とフコースを欠いており、腫瘍細胞を破壊する活性を有していたこと⁸⁷⁾は注目すべきである。

宿主で組換えタンパク質を合成させる場合、タンパク質の高次構造の構築、特に前駆タンパク質から生理活性を持つタンパク質にプロセッシングされる過程で起こる特定アミノ酸配列部位でのタンパク質の切断や γ -カルボキシル化を宿主細胞において正常に起こさせることが重要である。ヒトプロテイン C を Tg マウスの乳汁中に分泌させる研究^{11,44)}では、ヒトプロテイン C 遺伝子導入 Tg マウスを、乳腺でフーリン (furin: 活性がないタンパク質前駆体を生物学的に活性のある産物に転換させるプロタンパク質転換酵素) 遺伝子を導入した別の Tg マウスと交配させ、F1 Tg マウスの乳汁中から完全な生理活性を持ったプロテイン C が得られている。この研究成果は、複数の遺伝子導入により、乳腺で組換えタンパク質の翻訳後修飾を十分に起させることが可能であることを示している。

7. 乳汁中に分泌させる組換えタンパク質のその他の利用

家畜へ遺伝子を導入し Tg 家畜の乳汁中に組み換えタンパク質を分泌させる目的他に乳汁中自体の成分を変え家畜自体の生理状態を向上させる研究^{26,46,66-69)}が行われている。遺伝子導入により乳汁中の栄養価を高め、哺乳する子ブタの成長を促進させる研究^{78,81)}が行われている。また、牛乳を利用するヒトや哺乳する子牛の細菌に対する抵抗性を向上させるために、ラクトフェリン、リゾチーム、リソスタフィンの様な抗細菌活性を持つ物質を牛乳中に分泌させる研究³²⁾が行われている (Table 3)。マウス乳汁中にコロナウイルスに対するモノクローナル抗体を分泌させ、乳仔のウイルス感染を防ぐ効果を得ている⁶⁹⁾。また、牛乳成分の β -ラクトグロブリンを生産しない、すなわち当遺伝子をノックアウトした乳牛³⁰⁾が作出されている。

8. 今後の課題と展望

DNA 顕微注入法により Tg 家畜が作出されて以来、20 数年にわたり、様々な目的で多くの Tg 家畜が作出されてきた。その後、体細胞核移植⁶⁵⁾、レンチウイルス⁵⁶⁾、トランスポゾン⁸⁰⁾、干渉 RNA³⁰⁾、人工ヌクレアーゼ^{59,86)}を利用した新たな遺伝子導入法が開発されたことにより、Tg 動物の作出が一層容易となってきた。動物をバイオリクターとして利用するシステムの開発が進展してきている。

これまでのところ、家畜を有用物質のバイオリクターとして利用することに対しては、特に生物学的かつ倫理的に大きな問題は起こっていない。事実、Tg家畜が舎外に逃亡した例がなく、それらが自然界に拡散する可能性は極めて低い。また、乳腺や卵白で合成された物質のほとんどは家畜自体に悪影響を及ぼす可能性が低い。これまでに、バイオリクターとして、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシの動物種が利用されている。ウサギを利用したシステムでは、年間数Kgの有用物質の生産が可能である。また、Tgヤギを利用した生産システムの場合は、年間に得られるヒトアンチスロンビンⅢ/頭は、4万人の血液から得られる量に匹敵すると考えられている。最近、ヒト血液凝固第Ⅸ因子(hFIX)の遺伝子が単離された。この因子の欠損は血友病Bの原因となる。当遺伝子はX染色体に帰属することから、3万人に一人の頻度で血友病Bを発症する。これまで、患者はヒトの血液から調整した濃縮hFIX剤の定期的な注射により発症を防いでいるが、血液製剤中に混入したエイズウイルスや肝炎ウイルス汚染の危険にさらされており、1日も早い家畜の乳汁中に分泌させる生産システムの開発が待たれる。

ところで、CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: 嚢胞性線維症の原因物質)¹⁰⁾ やアルカリフォスファターゼ⁴⁾ の様なタンパク質は、疎水性であり、乳汁中の脂肪球の膜上に濃縮されているため、それらの抽出・精製が容易でない。現在のところ、乳汁中から組換えタンパク質を抽出する標準的な方法はなく、それぞれの物質に対応した方法を工夫せざるを得ないのが現状である。また、乳腺での有用物質の生産量には、乳汁中のタンパク質成分として最も多いカゼインが影響している。今後は、カゼイン遺伝子をノックアウトした家畜を宿主とする有用物質生産システムを考える必要があるだろう。ウサギや

ブタはプリオンに感染性がないが、ウシの場合はプリオン汚染の問題があり、プリオン遺伝子をノックアウトしたウシ⁶⁰⁾ が作出されている。乳汁中や卵白から組換えタンパク質を抽出するシステム⁵⁵⁾ は病原微生物の汚染を防ぐことが比較的容易であるが、今後、病原体を含有しない組換えタンパク質を得るための指針の整備が必要である。さらに、組換えタンパク質を市場化するまでには、それらの安全性ならびに生化学的、生物学的性状を十分に解析することが極めて重要である。この課題は、組換えタンパク質が、自然界のそれと異なった構造、特に糖鎖構造が異なる場合である。例えば、ヒトアンチスロンビンⅢ (ATryn) をウサギの乳汁中に分泌させた研究¹⁴⁾ では、2ヶ所にシアル酸 (N-アセチルニューロミン酸: NANA と N-グルコニューロミン酸: NGNA) が付加されていた。ヒトにはNANA型のみが存在するため、実際の生理活性が不明であり、もし、ヒトに投与した場合には、免疫学的な副作用を誘起する可能性がある。この様に不安定なヒト型糖タンパク質合成にも関わらず、ATrynは特に不利益な効果を引き起こすことなく、2006年にTg動物で生産させた医薬品として世界ではじめてEMEA (European Medicines Evaluation Agency: 欧州医薬品審査庁) により認可された。つづいて、2009年に米国のFDA (Food and Drug Administration: 食品医薬品局) が同様にこの物質を医薬品として認可した。これらの事実は、EMEAが組換えタンパク質が自然界の物質と完全に一致しなくとも、臨床的かつ生物学的に安全であればケースバイケースで認可することを示唆しており、バイオテクノロジー関連企業にとって重要なメッセージとなった。現在、Tg家畜をバイオリクターとするヒト医薬品の生産システムを計画している企業が増えつつあるが (Table 5), 専門家によると、近い将来、組換え医薬品の需要は、企業がそれらを生産する能

Table 5. Some of the biomedicines under study produced in milk of transgenic animals that are currently in commercial development*

Proteins	Company	Animals	g/l	Glycosilation	Development
ATryn	GTC	Goat	3	<NANA, >NGNA	EMEA approved (2006) US approved (2009)
Inhibitor C1	Pharming	Rabbit	8	<NANA	Phase III
Fibrinogen	Pharming	Rabbit	?	?	Clinical
Malaria antigen	GTC	Goat	?	No	Clinical
Anti-CD137	GTC	Goat	?	?	Clinical
Albumin	GTC	Goat	?	No	Clinical
α -antitrypsin	GTC	Goat	?	?	Clinical
RotavirusVP2/VP6	BPT	Rabbit	0.5	No	Preclinical
Blood factor	BPT	Rabbit	3	<NANA	Preclinical
TNAP	AM Pharma	Rabbit	<0.1	?	Preclinical

* Cited from the paper by NIEMANN AND KUES⁵²⁾

TNAP, alkaline phosphatase; GTC, Genzyme Transgenic, USA; EMEA, European Agency for the Evaluation of Medical Products

力を超えると予測している。今後、生産システムのより一層の改善が進み、また、多くの医薬品の特許期限が近づきつつあり、さらには、各種家畜の DNA 解読が終了しつつある。以上の様な状況から、今後 10～20 年間に、Tg 家畜を利用した生産システムは、ヒト医薬品の生産システムの主流となることが予想される。

謝 辞

本稿の投稿を承諾頂きました研究成果報告委員会委員長和田新平先生に深謝致します。

引用文献

- 1) ABRANCHES, R., MARCE, I S., ARCALIS, E., ALTMANN, F., FEVEREIRO, P. and STOGER, E. (2005). Plants as bioreactors, a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *J. Biotechnol.*, **120**, 121-134.
- 2) ANDERSON, G.B. (1999). Embryonic stem cells in agricultural species. *In Transgenic animals in agriculture.* (J.D. MURRAY, G.B. ANDERSON, A.M. OBERBAUER & M.M. MCGLOUGHLIN, eds). CABI Publishing, New York, 57-66.
- 3) BLECK, G.T., WHITE, B.R., MILLER, D.J. and WHEELER, M.B. (1998). Production of bovine α -lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J. Anim. Sci.*, **76**, 3072-3078.
- 4) BODROGI, L., BRANDS, R., RAABEN, W., SEINEN, W., BARANYI, M., FIECHTER, D., et al. (2006). High level expression of tissue nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res.*, **15**, 627-636.
- 5) BUHLER, TH-A, BRUYER, T.H., WENT, D.F., STRANZINGER, G. and BURKI, B. (1990). Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Bio/Tech.*, **8**, 140-142.
- 6) CAMPBELL, K.H., MCWHIR, J., RITCHIE, W.A. and WILMUT, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, **380**, 64-66.
- 7) CAPECCHI, M.R. (1989). The new mouse genetics, altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.*, **5**, 70-76.
- 8) CLARK, J. and WHITELAW, B. (2003). A future for transgenic livestock. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 825-833.
- 9) COCK, H., NOTTLE, M., LEW, A.M., ANTHONY, J.F. and COWAM, P. (2011). Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation. *Transplantation*, **25**, 9-20.
- 10) DI TULLIO, P., CHENG, S.H., MARCHALL, J., GREGORY, R.J., EBERT, K.M., MEADE, H.M., et al. (1992). Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice. *Biotechnology*, **10**, 74-77.
- 11) DREWS, R., PALEYANDA, R.K., LEE, T.K., CHANG, R.R., REHEMTULLA, A., KAUFMAN, R.J., et al. (1995). Proteolytic maturation of protein C upon engineering the mouse mammary gland to express furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10462-10466.
- 12) DYCK, M.K., LACROIX, D., POTHIER, F. and SIRARD, M.A. (2003). Making recombinant proteins in animals-different systems, different applications. *Trends Biotechnol.*, **21**, 394-309.
- 13) EBERT, K.M., SELGRATH, J.P., DITULLIO, P., DENMAN, J., SMITH, T.E., MEMON, M.A., SCHINDLER, J.E., MONASTERSKY, G.M., VITALE, J.A. and GORDON, K. (1991). Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)*, **9**, 835-838.
- 14) EDMUNDS, T., VAN PATTEN, S.M., POLLOCK, J., HANSON, E., BERNASCONI, R., HIGGINS, E., et al. (1998). Transgenically produced human antithrombin, structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, **91**, 4561-4571.
- 15) GIRALDO, P., RIVAL-GERVIER, S., HOUEBINE, L.M. and MONTOLIU, L. (2003). The potential benefits of insulators heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res.*, **12**, 751-755.
- 16) GIRITCH, A., MARILLONNET, S., ENGLER, C., VAN ELDIK, G., BOTTERMAN, J., KLIMYUK, V., et al. (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with non competing viral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **103**, 14701-14706.
- 17) GOMORD, V., CHAMBERLAIN, P., JEFFERIS, R. and FAYE, L. (2005). Biopharmaceutical production in plants, problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.*, **23**, 559-565.
- 18) GORDON, J.W., SCANGOS, G.A., PLOTKIN, D.J., BARBOSA, S. and RUDDLE, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7380-7384.
- 19) HAMILTON, S.R., BOBROWICZ, P., BOBROWICZ, B., DAVIDSON, R.C., LI, H., MITCHELL, T., et al. (2003). Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*, **301**, 1244-1246.
- 20) HAMMER, R.E., PURSEL, V.G., REXROAD, C.E. JR, WALL, R.J., BOLT, D.J., EBERT, K.M., PALMITER, R.D. and BRINSTER, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, **315**, 680-683.

- 21) HELLWIG, S., DROSSARD, J., TWYMAN, R.M. and FISCHER, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1415-1422.
- 22) HOFMANN, A., KESSLER, B., EWERLING, S., WEPPERT, M., VOGG, B., LUDWIG, H., STOJKOVIC, M., BOELHAUVE, M., BREM, G., WOLF, E. and PFEIFER, A. (2003). Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.*, **4**, 1054-1060.
- 23) HOFMANN, A., ZAKHARTCHENKO, V., WEPPERT, M., SEBALD, H., WENIGERKIND, H., BREM, G., WOLF, E. and PFEIFER, A. (2004). Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol. Reprod.*, **71**, 405-409.
- 24) HOUEBINE, L.M. (2000). Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res.*, **9**, 305-312.
- 25) HOUEBINE, L.M. (2002). The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J. Biotechnol.*, **98**, 145-160.
- 26) HOUEBINE, L.M. (2005). Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod. Domest. Anim.*, **40**, 40269-40281.
- 27) HOUEBINE, L.M. (2006). Transgenic animal models and target validation. *Methods Mol. Biol.*, **360**, 163-202.
- 28) HOUEBINE, L.M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, **32**, 107-121.
- 29) HUXLEY, C. (1998). Exploring gene function: use of yeast artificial chromosome transgenesis. *Methods*, **14**, 199-210.
- 30) JABED, A., WAGNER, S., MCCracken, J., WELLS, D.N. and LAIBLE, G. (2012). Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16811-16816.
- 31) JEFFERIES, R. (2006). A sugar switch for anti-inflammatory antibodies. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1230-1231.
- 32) KARATZAS, C.N. and TURNER, J.D. (1997). Toward altering milk composition by genetic manipulation, current status and challenges. *J. Dairy Sci.*, **80**, 2225-2232.
- 33) KEEFER, C.L., BALDASSARRE, H., KEYSTON, R., WANG, B., BHATIA, B., BILODEAU, A.S., ZHOU, J.F., LEDUC, M., DOWNEY, B.R., LAZARIS, A. and KARATZAS, C.N. (2001). Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, **64**, 849-856.
- 34) KERR, D.E., LIANG, F., BONDIOLI, K.R., ZHAO, H., KREIBICH, G., WALL, R.J. and SUN, T.T. (1998). The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 75-79.
- 35) KHODAROVICH, Y.M., GOLDMAN, I.L., SADCHIKOVA, E.R. and GEORGIEV, P.G. (2013). Expression of eukaryotic proteins and driving them from the milk of transgenic animals. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **49**, 711-722.
- 36) KIRK, D.D., MCINTOSH, K., WALMSLEY, A.M. and PETERSON, R.K. (2005). Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Res.*, **14**, 449-462.
- 37) KOLES, K., VAN BERKEL, P.H., PIEPER, F.R., NUIJENS, J.H., MANNESSE, M.L., VLEGENTHART, J.F., et al. (2004). N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology*, **14**, 51-64.
- 38) KRIMPENFORT, P., RANDEMARKERS, A., EYESTONE, W., VAN DER SCHANS, A., VAN DEN BRIOEK, S., KOOIMAN, P., KOOTWIJK, E., PLATENBURG, G., PIEPER, F., STRIJKER, R. and DE BOER, H. (1991). Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biotechnology*, **9**, 844-847.
- 39) KUES, W.A. and NIEMANN, H. (2011). Advances in animals transgenesis. *Prev. Vet. Medicine*, **102**, 146-156.
- 40) LAVITRANO, M., CAMAIONI, A., FAZIO, V.M., DOLCI, S., FARACE, M.G. and SPADAFORA, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs, genetic transformation of mice. *Cell*, **57**, 717-723.
- 41) LAVITRANO, M., BACCI, M.L., FORNI, M., LAZZERESCHI, D., DI STEFANO, C., FIORETTI, D., GIANCOTTI, P., MARFE, G., PUCCI, L., RENZI, L., WANG, H., STOPPACCIARO, A., STASSI, G., SARGIACOMO, M., SINIBALDI, P., TURCHI, V., GIOVANNONI, R., DELLA CASA, G., SEREN, E. and ROSSI, G. (2002). Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14230-14235.
- 42) LEON-BANARES, R., GONZALEZ-BALLESTER, D., GALVAN, A. and FERNANDEZ, E. (2004). Transgenic microalgae as green cell factories. *Trends Biotechnol.*, **22**, 45-52.
- 43) LILICO, S.G., SHERMAN, A., MCGREW, M.J., ROBERTSON, C.D., SMITH, J., HASLAM, C., et al. (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1771-1776.
- 44) LUBON, H. (1998). Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins. *Biotechnol. Annu. Rev.*, **4**, 1-54.

- 45) MAGA, E.A. and MURRAY, J.D. (1995). Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology (NY)*, **13**, 1452-1457.
- 46) MAGA, E.A., SHOEMAKER, C.F., ROWE, J.D., BONDURANT, R.H., ANDERSON, G.B. and MURRAY, J.D. (2006). Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **289**, 518-524.
- 47) MARKAKI, M., DRABEK, D., LIVADARAS, I. and CRAIG, R.K. (2007). Stable expression of human growth hormone over 50 generations in transgenic insect larvae. *Transgenic Res.*, **16**, 99-107.
- 48) MASSOUD, M., ATTAL, J., THEPOT, D., POINTU, H., STINNAKRE, M.G., THERON, M.C., et al. (1996). The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**, 555-563.
- 49) MEADE, H.M., ECHELARD, Y., ZIOMEK, C.A., YOUNG, M.W., HARVEY, M., COLE, E.S., GROET, S. and CURLING, J.M. (1999). Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals. In *Gene expression systems, using nature for the art of expression (J.M. Fernandez & J.P. Hoeffler, eds)*. Academic Press, San Diego, 399-427.
- 50) MOROZUMI, K., SHIKANO, T., MIYAZAKI, S. and YANAGIMACHI, R. (2006). Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17585-17586.
- 51) NIEMANN, H., HALTER, R., CARNWATH, J.W., HERRMANN, D., LEMME, E. and PAULM, D. (1999). Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res.*, **8**, 237-247.
- 52) NIEMANN, H. and KUES, W.A. (2003). Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim. Reprod. Sci.*, **79**, 291-317.
- 53) PALMITER, R.D., BRINSTER, R.D., HAMMER, R.E., TRUMBAUER, M.E., ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C. and EVANS, R.M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with methallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, **300**, 611-6115.
- 54) PERRY, A.C., WAKAYAMA, T., KISHIKAWA, H., KASAI, T., OKABE, M., TOYODA, Y. and YANAGIMACHI, R. (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, **284**, 1180-1183.
- 55) PETTITE, J.N. and MOZDZIAK, P.E. (2007). The incredible, edible, and therapeutic egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1739-1740.
- 56) PFEIFER, A. (2006). Lentiviral transgenesis—a versatile tool for basic research and gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, **6**, 535-542.
- 57) POLEJAEVA, I.A. and CAMPBELL, K.H. (2000). New advances in somatic cell nuclear transfer, applications in transgenesis. *Theriogenology*, **53**, 117-126.
- 58) PURSEL, V.G., PINKERT, C.A., MILLER, K.F., BOLT, D.J., CAMPBELL, R.G., PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L. and HAMMER, R.E. (1989). Genetic engineering of livestock. *Science*, **244**, 1281-1288.
- 59) RÉMY, S., TESSON, L., MÉNORET, S., USAL, C., SCHARENBERG, A.M. and ANEGON, I. (2010). Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res.*, **19**, 363-371.
- 60) RICHT, J.A., KASINATHAN, P., HAMIR, A.N., CASTILLA, J., SATHIYASEELAN, T., VARGAS, F., et al. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 132-138.
- 61) RIVAL-GERVIER, S., VIGLIETTA, C., MAEDER, C., ATTAL, J. and HOUEBINE, L.M. (2002). Position-independent and tissue-specific expression of porcine whey acidic protein gene from a bacterial artificial chromosome in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.*, **63**, 161-167.
- 62) ROSEN, J.M., LI, S., RAUGHT, B. and HADSELL, D. (1996). The mammary gland as a bioreactor, factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**, 627S-632S.
- 63) ROYER, C., JALABERT, A., DA ROCHA, M., GRENIER, A.M., MAUCHAMP, B., COUBLE, P., et al. (2005). Biosynthesis and cocoon export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. *Transgenic Res.*, **14**, 463-472.
- 64) RUDOLPH, N.S. (1999). Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotech.*, **17**, 367-374.
- 65) SCHNIEKE, A.E., KIND, A.J., RITCHIE, W.A., MYCOCK, K., SCOTT, A.R., RITCHEM, M., WILMUT, I., COLMAN, A. and CAMPBELL, K.H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, **278**, 2130-2133.
- 66) SOLER, E., LE SAUX, A., GUINUT, F., PASSET, B., COHEN, R., MERLE, C., et al. (2005). Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res.*, **14**, 833-844.
- 67) SOLER, E., PAREZ, N., PASSET, B., DUBUQUOY, C.,

- RIFFAULT, S., PILLOT, M., et al. (2007). Recombinant rotavirus inner core proteins produced in the milk of transgenic rabbits confer a high level of protection after intrarectal delivery. *Vaccine*, **25**, 6373-6380.
- 68) SOLER, E., THEPOT, D., RIVAL-GERVIER, S., JOLIVET, G. and HOUEBINE, L. (2006). Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod. Nutr. Dev.*, **46**, 579-588.
- 69) STOWERS, A.W., CHEN, L.H., ZHANG, Y., KENNEDY, M.C., ZOU, L., LAMBERT, L., et al. (2002). A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects Aotus monkeys from a lethal challenge with Plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 339-344.
- 70) 東條英昭. (1993). トランスジェニック動物の生産 - 家畜への遺伝子導入 -. *日畜会報*, **64**, 306-321.
- 71) 東條英昭. (2004). トランスジェニック動物. 朝倉書店, 東京, pp82-116.
- 72) TOJO, H., TANAKA, S., MATSUZAWA, A., TAKAHASHI, M. and TACHI, C. (1993). Production and characterization of transgenic mice expressing a hGH driven by the promoter of mouse whey acidic protein (mWAP) putatively specific to mammary gland. *J. Reprod. Develop.*, **39**, 145-155.
- 73) TOLEDO, J.R., SANCHEZ, O., SEGUI, R.M., GARCIA, G., MONTANEZ, M., ZAMORA, P.A., et al. (2006). High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *J. Biotechnol.*, **123**, 225-235.
- 74) UMANA, P., JEAN-MAIRET, J., MOUDRY, R., AMSTUTZ, H. and BAILEY, J.E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 176-180.
- 75) VAN DE LAVOIR, M.C., DIAMOND, J.H., LEIGHTON, P.A., MATHER-LOVE, C., HEYER, B.S., BRADSHAW, R., et al. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, **441**, 766-769.
- 76) VELANDER, W.H., JOHNSON, J.L., PAGE, R.L., RUSSELL, C.G., SUBRAMANIAN, A., WILKINS, T.D., GWAZDAUSKAS, F.C., PITTIUS, C. and DROHAN, W.N. (1992). High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12003-12007.
- 77) WAGNER, T.E., MURRAY, F.A., MINHAS, B. and KRAMER, D.C. (1984). The possibility of transgenic livestock. *Theriogenology*, **21**, 29-45.
- 78) WALL, R.J., POWELL, A., PAAPE, M.J., KERR, D.E., BANNERMAN, D.D., PURSEL, V.G., WELLS, K.D., TALBOT, N. and HAWK, H. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 445-451.
- 79) WEIKERT, S., PAPAC, D., BRIGGS, J., COWFER, D., GAWLITZKE, M., et al. (1999). Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1116-1121.
- 80) WESTPHAL, C.H. and LEDER, P. (1997). Transposon-generated 'knock-out' and 'knock-in' gene-targeting constructs for use in mice. *Curr. Biol.*, **7**, 530-533.
- 81) WHEELER, M.B., BLECK, G.T. and DONOVAN, S.M. (2001). Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. *Reprod. Suppl.*, **58**, 313-324.
- 82) WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J. and CAMPBELL, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**, 810-813.
- 83) WOLF, E., JEHLE, P.M., WEBER, M.M., SAUERWEIN, H., DAXENBERGER, A., BREIER, B.H., BESENFELDER, U., FRENYO, L. and BREM, G. (1997). Human insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in the mammary glands of transgenic rabbits, yield, receptor binding, mitogenic activity, and effects on IGF-binding proteins. *Endocrinology*, **138**, 307-313.
- 84) WRIGHT, G., CARVER, A., COTTOM, D., REEVES, D., SCOT, T.A., SIMONS, P., WILMUT, I., GARNER, I. and COLMAN, A. (1991). High level expression of active human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*, **9**, 830-834.
- 85) YONG, H.Y., HAO, Y., LAI, L., LI, R., MURPHY, C.N., RIEKE, A., et al. (2006). Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 595-599.
- 86) YU, S., LUO, J., SONG, Z., DING, F., DAI, Y. and LI, N. (2011). Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.*, **21**, 1638-1640.
- 87) ZHU, L., VAN DE LAVOIR, M.C., ALBANESE, J., BEENHOUWER, D.O., CARDARELLI, P.M. and CUISSON, S., et al. (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1159-1169.

Current Status and Prospects for Biomedicines Produced in Transgenic Farm Animals

Hideaki Tojo

Visiting Professor of Nippon Veterinary and Life Science University,
Professor Emeritus of University of Tokyo

Abstract

Human insulin and growth hormone were prepared in recombinant bacteria in the early 1980s, and used by patients. However, this production system was limited for the human proteins other than these proteins by the fact that bacteria cannot synthesize complex proteins which must be matured by post-translational modification to be biologically active. The different systems to produce recombinant pharmaceutical proteins have been implemented using yeasts, plants, insects or chickens as a source of recombinant proteins. However, they have advantages and limits, respectively. Transgenic animals offer particularly attractive system to produce recombinant proteins. Milk of transgenic farm animals is presently the most established system to produce biomedicines. In 2006, EAEM (European Agency of Evaluation Medicines) approved marketing of the first recombinant medicine, human antithrombin III, derived from the milk of transgenic goats. Although this production system has not yet been fully achieved and is still being improved, the number of companies involved in the production of biomedicines is expected to increase.

Key words : transgenic farm animals, recombinant proteins, biomedicines

Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ., **63**, 12-22, 2014.