

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04574

研究課題名(和文) トランスジェニック鳥類を用いたインフルエンザパンデミック防御

研究課題名(英文) Avian transgenic technology against influenza

研究代表者

西島 謙一 (Nishijima, Ken-ichi)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10262891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリIFITM10がVSV-Gシュドタイプ型ウイルスの感染性を若干低下させることが示された。また、発現ベクター構築が可能なサイズのMuc13の過剰発現によっては強い抗ウイルス活性を持たせることは難しいことが示唆された。このため、巨大ムチンの発現系を構築中である。
また、長期培養した始原生殖細胞株の遺伝子導入及びゲノム編集条件を検討し、効率よい条件を見出した。実際にCRISPR/Cas9を用いて、EGFP遺伝子をノックインしたゲノム編集ニワトリの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、長期培養した始原生殖細胞を用いることにより、ゲノム編集を含めたニワトリの遺伝子改変を効率よく行えることが示された。一方、抗ウイルス活性が期待できる遺伝子候補の解析を進めつつあり、これらを融合してニワトリでのインフルエンザ流行抑制技術へつなげてゆくことが期待できる。逆に、ウイルス感受性が特に高いニワトリを作製し、侵入したばかりのウイルスを感度良く検出するために利用するなど期待できる。

研究成果の概要(英文)： It was shown that chicken IFITM10 slightly reduced the infectivity of VSV-G-pseudotyped virus. In addition, overexpression of Muc13, of which gene size is below the limit to construct an expression vector, did not prevent infectivity of VSV-G-pseudotyped virus. Thus, expression system for large size mucin is under construction.

We examined the gene transfer and genome editing conditions suitable for the long-term cultured primordial germ cells. Using CRISPR/Cas9, we succeeded in producing a genome-edited chicken in which the EGFP gene was knocked in.

研究分野：動物細胞工学

キーワード：ニワトリ 生殖細胞 ゲノム編集 ウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では2009年の「新型インフルエンザ」流行以降インフルエンザの脅威が遠のいた印象がある。しかし、世界的にはその脅威はいっこうに減ずる様子がない。特に、トリインフルエンザは近年になってからも、中国やエジプトでH5N1、H5N6など複数の亜型のウイルスがヒトに感染し、死者も出ている。2015年時点でトリインフルエンザが発生しているために世界58カ国/地域からの生肉の輸入が禁止されており、10年以上も輸入停止措置が継続している地域も多い。まさに世界中で「蔓延し続けている」ともいえる状況であり、強毒株の出現が恐れられている。

確認が可能な1918年以降、すべてのパンデミック(世界的流行)インフルエンザはトリ由来である。このため、パンデミックの阻止にはトリでのインフルエンザ流行を抑えることが有効である。本申請は、我々がこれまで開発してきたトランスジェニックニワトリ作製技術を利用してこれらを実現することを目指すものである。

2. 研究の目的

トリインフルエンザウイルスはワクチンでは防げない。生産業者から要望が高いにもかかわらずニワトリ用ワクチンが我が国を含めた多くの国で禁止されている理由は、①効果が不完全でウイルスがいつまでも残存し、この間に抗体が攻撃する部位が変異するため、②免疫系をすり抜ける強毒株が出現しやすくなるためである。

我々はウズラ、ニワトリの家禽を遺伝子的に操作する技術開発を進めてきた。人の遺伝子治療にも用いられるレトロウイルスベクターを用いることで、効率よく遺伝子導入(組換え)鳥類を作製できる。この技術により、本申請では、ニワトリが本来持つ感染防御機構に着目し、その活性を人為的に制御することで目的を達成する。

宿主側のウイルスなどの感染防御機構としては、

- a) 組織表面における粘膜などによる物理的遮蔽
 - b) 細胞への侵入阻止
 - c) 免疫作用による感染細胞の除去
 - d) 細胞内でのウイルス増殖の阻止
- などが考えられる。

本申請ではこれらのうちこれまで試みられてこなかったa)粘膜による阻止、b)細胞への侵入阻止を取り上げた。具体的には粘膜タンパク質糖鎖の改変、ウイルスの細胞への融合を阻害するタンパク質の利用を試みた。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ IFITM10 の機能解析

インターフェロンにより誘導され、ウイルスが細胞に感染するのを抑制する IFITM (Interferon-induced transmembrane) タンパクファミリーに属しながら、唯一機能未知とされる IFITM10 の機能解析を目指した。VSV-G シュドタイプ型ウイルスを用いて抗ウイルス活性を中心に調べることにした。

(2) 粘液タンパク質ムチンの生理機能の検証

ムチンは粘膜をウイルス等の感染から守る粘液の主成分である。データベース上に見いだしたニワトリムチン候補配列の多くは、細胞外への分泌シグナルが存在せず、実際に発現しているムチンの転写開始・終結点の確認を含めさらに解析が必要である。そこで、本研究では

- ①ニワトリより低分子ムチンの遺伝子を発現ベクターにクローニングし、強制発現させた細胞のウイルス感染性を検証した。
- ②クローニングが困難な巨大ムチンの遺伝子は CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によりプロモーターを改変することにより強制発現させることを試みた。
- ③ニワトリ各臓器におけるムチン遺伝子の発現パターンを RT-PCR により調べ、候補遺伝子の絞り込みに利用した。

(3) ニワトリ始原生殖細胞の分化・増殖メカニズムの解明

トランスジェニックニワトリの取得効率上昇には、遺伝子改変を施した生殖細胞の精子・卵子への貢献度合いが重要である。そこで、効率を抜本的に改善するための基盤として、ニワトリ始原生殖細胞の分化・増殖メカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) ニワトリ IFITM10 の機能解析

抗ウイルス活性を有するとされる IFITM ファミリーのうち、機能未知の IFITM10 のクローニングと機能解析を行った。ニワトリ IFITM10 はほ乳類との相同性の低い N 末端と相同性の高い C 末端とを有する 240 アミノ酸のタンパク質であった。まず、ニワトリ個体での発現を定量 RT-PCR 法により調べた。成熟個体では輸卵管、脳、肺、卵巣などで発現していたが、その発現レベルは他の IFITM ファミリーに比べ低かった。また、IFITM10 は肝臓や精巣ではほとんど発現していなかった。一方、胚では IFITM ファミリー遺伝子は成熟個体よりも低い発現レベルを示す中で、IFITM10 は成熟個体よりもやや高いレベルで発現していた(図 1)。このことから、IFITM10 は IFITM3 とともに胚で発現する主要な IFITM であるものと考えられた。

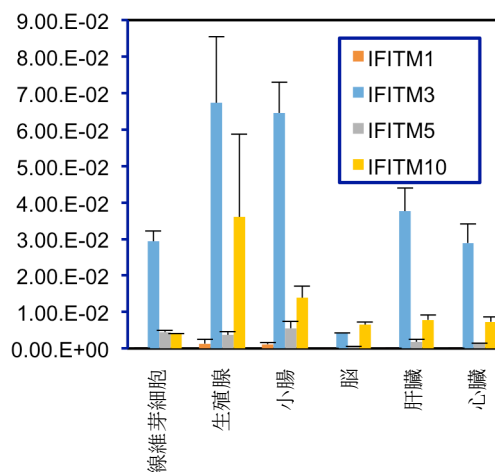


図 1. 胚における IFITM mRNA の発現

抗ウイルス活性を誘導するインターフェロン α によりニワトリ胚線維芽細胞を処理した際、他の IFITM の発現が強く誘導される一方、IFITM10 はほとんど誘導されないことが示された。次に、IFITM10 を培養細胞で発現させ機能解析を試みた。IFITM10 は VSV-G 発現細胞の酸処理により誘導される細胞融合を防ぐ活性が認められ、この活性は N 末端領域を除去しても消失しなかった。次に、ニワトリ線維芽細胞株 DF-1 を用いて IFITM10 安定発現細胞株を樹立した。この細胞を用いて これらのことから、抗ウイルス活性の中心を担っている IFITM は従来より知られている IFITM3 など他の IFITM であることが示唆された。胚で発現する IFITM10 は例えば細胞融合の制御などウイルスとは関係の無い固有の機能を持つ可能性が考えられる。

(2) 粘液タンパク質ムチンの生理機能の検証

① ニワトリ低分子ムチン Muc13 の解析

データベース上に記載されたニワトリムチン候補遺伝子のうち、細胞外に分泌するためのシグナル配列を確認できた遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により測定した。このうち、Muc13 が鳥類でのウイルス感染の場でもある腸での発現が認められたため、遺伝子をクローニングした。クローニングした配列は、NCBI に登録された予測配列に比べ、N 末端近傍に存在する TR ドメインの繰り返し 1 回分に相当する 20 アミノ酸短いことが確認された。

次に、発現ベクターを作製し、ニワトリ細胞株 DF-1、LMH で強制発現させたところ、ウェスタンブロットで Muc13 の発現が確認された。分子量はタンパク質配列から計算される 67kDa よりはるかに大きな 100kDa 以上であったため、O 型糖鎖が附加されていることが示唆された。また、67kDa よりも小さな分子量のバンドが検出されたことから、細胞膜型ムチンの特徴である開裂が起きていることが示唆された。さらに、Hela や 293FT などに導入したところ、細胞によって Muc13 の分子量が異なったことから、糖鎖附加の状態が異なっていることが示唆された。

次に局在を調べたところ、N 末に付加した抗 FLAG 抗体による染色では、細胞全体と核周囲で蛍光が観察されたことから、Muc13 は細胞質もしくはタンパク質輸送経路の細胞内小器官に多く局在していることが示唆された。一部は細胞膜上での発現が確認された。

クローニングした Muc13 遺伝子を発現させた細胞に対し、モデルウイルスとして VSV-G シュドタイプ型のウイルスベクターを用いて抗ウイルス活性を検討した。293FT に一過性に Muc13 を発現させ、ウイルス感染性を検討したところ、大きな影響は認められなかった。このことから分子量の小さい Muc13 の過剰発現によっては強い抗ウイルス活性を持たせることは難しいことが示唆された。

② ニワトリ高分子ムチンの解析

Muc5 遺伝子は分泌シグナルを有する比較的低分子のムチン遺伝子候補である。Muc5 はムチン遺伝子がクラスターになって存在する染色体部位に位置するが、さらに下流のムチン遺伝子には分泌シグナル配列が認められず、同一の分子が分断されて登録されている可能性を想定した。そこで、ニワトリ各組織における遺伝子発現を調べたところ、すぐ下流のムチンと発現パターンに相関が認められた。内在性の Muc5 を発現させるために、Muc5 のプロモーターをウイルス性の恒常性プロモーターに改変し、本来ムチンを発現していないニワトリ DF1 に発現させるゲノム編集用ベクターを作製した。今後ニワトリ Muc5 の遺伝子構造の一端が明らかとなることが期待される。充分量の糖鎖附加型ムチンが発現できれば、抗ウイルス活性を検討する予定である。

(3) ニワトリ始原生殖細胞の分化・増殖メカニズムの解明

将来精子・卵子となる始原生殖細胞を長期培養して操作した後、ニワトリ個体まで効率よく発生させることができれば、ニワトリの遺伝子改変を自由に進めることができる。トランスジェニックニワトリの取得効率を抜本的に改善するための基盤としてニワトリ始原生殖細胞の分化・増殖メカニズムを調べることとした。

未分化な ES 細胞様の細胞が存在する産卵直後の胚盤葉細胞を回収し、BMP や Activin を含む始原生殖細胞培養用の培地で培養した後遺伝子発現を検討した。その結果、3 日間の培養後においても CVH や DAZL など生殖細胞特有遺伝子の発現レベル上昇は認められなかった。一方、ある程度の分化を誘導するとされるサイトカインなしの DMEM 培地においてもやはり生殖細胞関連遺伝子の発現は低いものであった。

複製型レトロウイルスベクターを用いた PRDM14 及び BLIMP1 の *in vivo* ノックダウンにより、生殖巣内に定着する始原生殖細胞の数が有意に減少することが確認されたことから、PRDM14 及び BLIMP1 がニワトリ始原生殖細胞分化に重要であることが示されている。そこで、PRDM14, BLIMP1 及びニワトリ始原生殖細胞の分化に重要との報告がある CVH 遺伝子を胚盤葉細胞に遺伝子導入し、始原生殖細胞の性質を誘導できるか検討した。遺伝子導入に成功した細胞のみをセルソーターにより回収し遺伝子発現の変化を調べたところ、PRDM14, BLIMP1 の導入により、生殖細胞特異的な遺伝子とされる DAZL や CVH の発現は若干上昇したが、本来の発現レベルに比べると低かった(図 2)。CVH 過剰発現によって誘導される DAZL などの発現も始原生殖細胞に比べて低いものであった。今後、複数の遺伝子の共導入により誘導できる遺伝子発現レベルを明らかとする必要がある。

一方、増殖促進を指標に始原生殖細胞の生理機能を制御できる低分子試薬をスクリーニングしたが、Y27632 や CHIR を含め効果的な薬剤は見いだせなかった。

長期培養した始原生殖細胞における CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の効率について検討した。エレクトロポレーション法により導入した CRISPR/Cas9 発現ベクター上に挿入された薬剤耐性遺伝子の一時的発現により選択を行った。その後限界希釈法によりクローニングし、増殖してきた細胞のゲノムを調製、配列を確認した。その結果、多くの細胞で目的遺伝子部位に欠損が入っていることが確認された。さらなるゲノム編集効率の増大を目指し、培養始原生殖細胞への遺伝子導入効率の上昇を目指した。その結果、導入条件を変更することにより、簡便なりポフェクションで効率よく遺伝子導入できることが明らかとなった。この条件を用いれば始原生殖細胞の両アレルにレポーター遺伝子を同時にノックインすることが可能であることも確認された。

実際に培養始原生殖細胞を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノム編集ニワトリを作製した。PRDM14 遺伝子座に GFP 遺伝子を片アレルのみノックインした始原生殖細胞株をレシピエント胚に移植したところ、高効率で生殖腺に定着することが確認された。成熟したオス個体の交配により、GFP を持つ子孫を効率よく得ることに成功した。この PRDM14 ヘテロノックアウトニワトリは見かけ上健康であり、特に発生初期において始原生殖細胞を GFP 蛍光でトレースできるため、ニワトリの生殖細胞研究に有用なツールとなることが期待される。一方、予想に反して、PRDM14 ホモノックアウトニワトリは発生のごく初期で死亡することが確認された。このことから PRDM14 はニワトリの初期発生において、ほ乳類にない重要な役割を有しているものと考えられた。

本研究では、ニワトリの遺伝子改変を効率よく行う技術開発を目指した。得られた知見から、今後様々な遺伝子改変ニワトリを効率よく作成していくことが期待される。一方、抗ウイルス活性が期待できる遺伝子候補も解析を進めつつあり、これらを融合してニワトリでのインフルエンザ発生を抑制する技術へつなげてゆく計画である。一方、内在性の抗ウイルス因子の遺伝子を破壊することで、逆にウイルス感染性が特に高いニワトリを作製し、侵入したばかりのウイルスを感度良く検出する「炭鉱のカナリヤ」として利用することも期待できる。

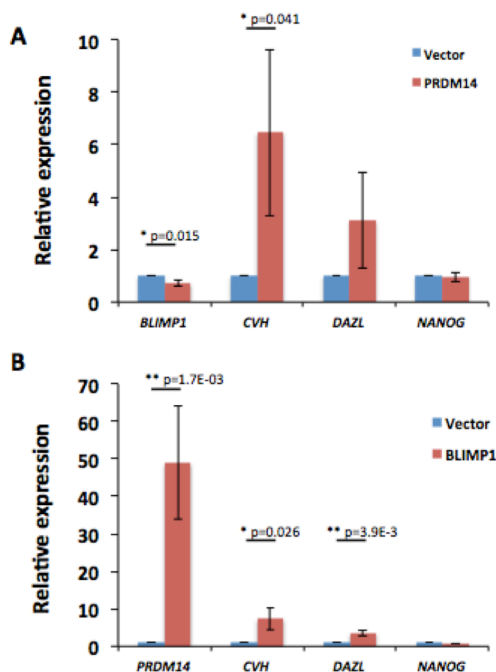


図 2. 胚盤葉細胞での過剰発現による遺伝子発現変化. (A) PRDM14, (B) BLIMP1. (Dev Biol 455:32 (2019)より)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okuzaki Yuya, Kidani Shunsuke, Kaneoka Hidenori, Iijima Shinji, Nishijima Ken-ichi	4. 巻 81
2. 論文標題 Characterization of chicken interferon-inducible transmembrane protein-10	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 914 ~ 921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2016.1274639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okuzaki Yuya, Kaneoka Hidenori, Suzuki Takayuki, Hagihara Yota, Nakayama Yuki, Murakami Seitaro, Murase Yusuke, Kuroiwa Atsushi, Iijima Shinji, Nishijima Ken-ichi	4. 巻 455
2. 論文標題 PRDM14 and BLIMP1 control the development of chicken primordial germ cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 32 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.06.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 西島謙一	4. 巻 57
2. 論文標題 糖鎖から見たインフルエンザの適応変異	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 138-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 西島謙一	4. 巻 -
2. 論文標題 シグレックと免疫制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖鎖生物学、編:北島健、佐藤ちひろ、門松健治、加藤晃一	6. 最初と最後の頁 237-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤万貴, 藤原亜衣, 金岡英徳, 西島謙一, 飯島信司
2. 発表標題 バイオ医薬品高生産に向けた遺伝子組換えニワトリの樹立
3. 学会等名 第82回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥寄雄也, 中山裕貴, 西島謙一, 金岡英徳, 萩原遥太, 飯島信司
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞における分化制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第82回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森脇 脩一郎, 吉田 琢哉, 原 駿平, 飯島 信司, 金岡 英徳, 西島 謙一
2. 発表標題 感染防御に関わるニワトリムチンの解析
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩原 遥太, 奥寄 雄也, 飯島 信司, 金岡 英徳, 西島 謙一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムによるeGFPノックインニワトリの作製
3. 学会等名 2018年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuya Okuzaki, Yota Hagihara, Hidenori Kaneoka, Yuki Nakayama, Maki Kato, Shinji Iijima, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Establishment of eGFP Knock-in Chicken by Manipulating Primordial Germ Cell Line Using CRISPR/Cas9
3. 学会等名 JAACT2018Tsukuba (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujimoto Y, Ozaki K, Ono E.
2. 発表標題 Suppression of influenza A virus replication in chicken embryonic fibroblasts lacking CD209L and ANP32A by the CRSPR/Cas9 system.
3. 学会等名 11th International Congress for Veterinary Virology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥崎雄也, 木溪俊介, 金岡英徳, 西島謙一, 飯島信司
2. 発表標題 抗ウイルスタンパク IFITMのニワトリホモログの解析
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥崎 雄也, 木溪 俊介, 金岡 英徳, 西島 謙一, 飯島 信司
2. 発表標題 ニワトリ IFITM の抗ウイルス機能の解析
3. 学会等名 第68回日本生物工学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西島謙一
2. 発表標題 糖鎖改変タンパク質医薬品の生産 ～ニワトリの「糖鎖制御工学」～
3. 学会等名 2019年度日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松林和菜、奥奇雄也、萩原遥太、中山裕貴、村上晴太郎、金岡英徳、飯島信司、西島謙一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 システムによる eGFP ノックインニワトリの作製と解析
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥奇雄也、萩原遥太、中山裕貴、村上晴太郎、飯島信司、金岡英徳、西島謙一
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞の分化・培養に関わるサイトカインの解析
3. 学会等名 2019年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金岡 英徳、加藤万貴、牧田芳隆、佐野観月、飯島信司、西島謙一
2. 発表標題 ニワトリシアル酸転移酵素の解析とインフルエンザワクチン生産効率化への応用
3. 学会等名 2019年度日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西島謙一、加藤万貴、奥崎雄也、金岡英徳、飯島信司
2. 発表標題 バイオ医薬品高生産に向けた遺伝子組換えニワトリの樹立
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金岡英徳、萩原遥太、奥崎雄也、松林和茉、鈴木孝幸、飯島信司、西島謙一
2. 発表標題 ニワトリ生殖細胞分化におけるPRDM14の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小野 悦郎 (Ono Etsuro) (00160903)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
連携 研究者	金岡 英徳 (Kaneoka Hidenori) (30631973)	名古屋大学・工学研究科・助教 (13901)	