

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14867

研究課題名(和文) 遺伝子置換による糖鎖改変ニワトリの作製とインフルエンザワクチンの効率的生産

研究課題名(英文) Development of glyco-modified chicken by gene substitution aiming to efficiently produce influenza vaccine

研究代表者

金岡 英徳 (Kaneoka, Hidenori)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：30631973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザワクチンの生産を効率的にできる鶏卵を開発するために、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を用いてシアル酸転移酵素を導入した始原生殖細胞(PGC)の樹立を試みたが、細胞の樹立には至らなかった。一方で、トランスポゾンを用いた遺伝子導入法によりシアル酸転移酵素を発現するPGCの樹立に成功し、現在キメラニワトリの作製を行なっている。また、研究期間中にPGC移植によるGFP発現トランスジェニックニワトリの樹立に成功したことから、シアル酸転移酵素導入PGCに移植による操作改変トランスジェニックニワトリの樹立にも期待が持てる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型インフルエンザ発生とパンデミックの懸念からインフルエンザワクチン生産の効率化が急がれている。そこで糖鎖改変トランスジェニックニワトリを用いることで、現在のワクチン作製法をより効率化できると考えた。しかし、単純にニワトリの糖鎖改変を行うとヒトインフルエンザウイルスがニワトリへ感染する危険性が生じてしまうため、CRISPR/Cas9による遺伝子置換やCre/loxP作動性システムを考案した。Cre/loxP作動性システムはニワトリ始原生殖細胞(PGC)への導入に成功し、移植後の定着が観察された。今回樹立したPGCを用いることで糖鎖改変トランスジェニックニワトリの作製が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to produce influenza vaccine effectively, we tried to establish primordial germ cells (PGCs) into which the sialyltransferase gene was introduced using CRISPR/Cas9 system. Although we have attempted to transfer the gene under various conditions, we could not establish the PGCs line. On the other hand, we have succeeded in establishing the PGCs line expressing sialyltransferase by the piggyBac transposon system and now try to produce chimeric chickens. In addition, since we succeeded in establishing eGFP transgenic chickens by transplanting PGCs during this research period, we can expect to obtain the glycoengineered transgenic chickens by transplanting the PGCs expressing sialyltransferase.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ゲノム編集 トランスジェニックニワトリ インフルエンザワクチン 糖転移酵素 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザの世界規模での発生と、それに伴う新型インフルエンザ発生への強い懸念からインフルエンザワクチン生産の改善が急がれている。しかし、ウイルス培養に発育鶏卵を用いる従来法には多くの問題があるため、昆虫細胞を用いたウイルスタンパク質生産法や動物培養細胞を用いた新たな生産法が開発されているが、コストを劇的に下げようとする改善がない限り実用化は難しい。一方、発育鶏卵による従来法はワクチン生産に適した SPF 卵の供給システム、無菌的に大量の卵を扱うことのできる自動化機器類などの設備が整備されており、今後も主流の生産法と考えられる。

発育鶏卵による従来法において特に問題となっている点は「ウイルスの発育鶏卵への馴化に時間がかかる」「抗原性が変化する結果、ワクチン効果が減弱する可能性がある」である。これらの問題点はいずれも、ヒトインフルエンザウイルスが増殖する発育鶏卵の漿尿膜細胞に、感染に必要な α -2,6 結合シアル酸糖鎖より α -2,3 結合シアル酸が多く存在することに起因している。現在はウイルス感染後に、鶏卵での増殖に馴化した変異型ウイルスが自然に発生するのを待ち、これを増殖させワクチンを生産しているため時間がかかる。また、この過程は人為的に制御することは不可能であるため、変異型ウイルスによる抗原性の低下により、ワクチンの効果が減弱する可能性もある。現に H3N2 型のワクチンは鶏卵馴化による抗原性の変化により、有効性が低下している。

糖鎖構造には *N*-結合型と *O*-結合型の 2 種類があり、末端に付加されるシアル酸の結合様式はシアル酸転移酵素 (ST3Gal ファミリーは α -2,3 結合シアル酸、ST6Gal ファミリーは α -2,6 結合シアル酸を生成) により制御される。この中でインフルエンザウイルスの感染に重要な *N*-結合型糖鎖形成に関係する酵素は、ST3Gal ファミリーでは ST3Gal3, 4, 6、また ST6Gal ファミリーでは ST6Gal1, 2 である。申請者らはこれまでのニワトリシアル酸転移酵素の研究により、発育鶏卵の漿尿膜には ST3Gal6 が強く発現している一方で、ST6Gal1 の発現が弱いことを見出した。これらの知見から申請者が有するニワトリ始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) 移植によるトランスジェニックニワトリ作製技術を用いて、発育鶏卵の漿尿膜に α -2,6 結合シアル酸糖鎖を形成することで上記の問題を解決できるのではないかと発想に至った (図 1)。

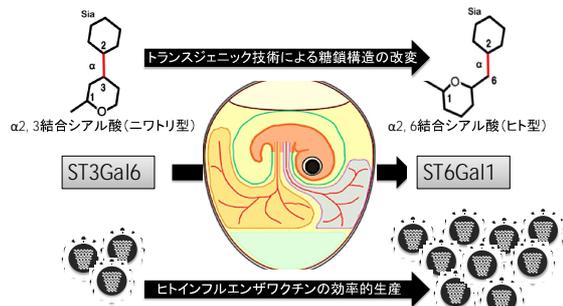


図1 遺伝子置換による糖鎖改変トランスジェニックニワトリの作製とその発育鶏卵を用いたヒトインフルエンザワクチンの効率的生産

2. 研究の目的

インフルエンザワクチンを効率的に生産するために、糖鎖改変トランスジェニックニワトリの利用が考えられる。しかし、単純にニワトリの糖鎖改変を行うとヒトインフルエンザウイルスがニワトリへ感染する危険性が生じてしまう可能性がある。この問題を解決するため CRISPR/Cas9 による遺伝子置換と Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システムを考案した。それぞれのシステムにおいて遺伝子導入条件などを培養細胞で検討し、遺伝子導入 PGC の樹立を行う。

(1) CRISPR/Cas9 による遺伝子置換

遺伝子置換により漿尿膜で発現の高い ST3Gal6 遺伝子座に ST6Gal1 遺伝子の組み込みを行う。発育鶏卵漿尿膜の糖鎖を α -2,3 結合シアル酸 α -2,6 結合シアル酸に変換することにより、高品質のワクチンが安定的に生産できるようになると考えられる。ST3Gal6 遺伝子座にゲノム編集を行うため、CRISPR/Cas9 システムを用いる。

(2) Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システム

このシステムは loxP 配列にはさまれたスタッファー遺伝子 (mCherry) の下流に ST6Gal1 遺伝子を配する (mCherry-ST6Gal1) ことにより、通常 ST6Gal1 は発現しないが、Cre リコンビナーゼが作用して初めて ST6Gal1 が発現することが可能になる。Cre リコンビナーゼを発現する系統 (eGFP-Cre) と mCherry-ST6Gal1 システムを樹立し、交配することにより受精卵で Cre/loxP 組換えが起こる。この受精卵を孵化させない限り糖鎖改変ニワトリは生まれることがないため、受精卵でウイルスを培養するワクチン生産に適したシステムであると考えられる。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 による遺伝子置換

ニワトリ PGC におけるゲノム編集

ニワトリ PGC を 24well プレートに播種し、1 晩 37°C でインキュベート後、Lipofectamine2000 (ThermoFisher) またはエレクトロポレーションを用いて px330/U6-(ST3-6#6)-T2A-PuroR プラスミドのトランスフェクションを行った。ピューロマイシンによる薬剤選択後、限界希釈法によりクローンの取得を行なった。CRISPR/Cas9 をリボヌクレオプロテインで導入する場合は、MEGashortscript™ T7 Transcription Kit (ThermoFisher) で合成した short guide RNA (sgRNA) とリコンビナント Cas9 (ThermoFisher) と氷上でインキュベートし、LipofectamineCRISPRMAX (ThermoFisher) またはエレクトロポレーションを用いて導入した。蛍光または薬剤選択を行った後、限界希釈法によりクローンの取得を行なった。

(2) Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システム

Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 発現プラスミドの構築

ニワトリ ST6-1 遺伝子の上流にスタッパー遺伝子として loxP 配列ではさんだ mCherry を持つ pPV/EF1 α -mCherry-ST6Gal1 プラスミドを作製した。ベースとなる pPV ベクターは PiggyBac トランスポゾンによる安定発現細胞株の樹立が可能である。さらに Cre リコンビナーゼを発現する pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドを作製した。このプラスミドは eGFP と Cre リコンビナーゼを P2A 配列でつなぐことで 2 つの遺伝子を同時に発現することが可能である。

ニワトリ DF-1 細胞および PGC における安定発現細胞株の樹立

DF-1 細胞または PGC を 24well プレートに播種し、1 晩 37°C でインキュベート後、Lipofectamine2000 を用いて pPV/EF1 α -mCherry-ST6Gal1 プラスミドのトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 2 日後、セルソーター(FACSJazz; BD Biosciences)により mCherry 陽性細胞を分離し、限界希釈法により安定細胞株を樹立した。その後、樹立した mCherry 陽性細胞株に pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドをトランスフェクションで導入した。トランスフェクションから 1 週間後、Cre/loxP 組換え反応により mCherry 陰性(ST6Gal1 陽性)となった細胞をセルソーターにより再度分離した。PGC における pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドの安定発現株も上記の方法で樹立した。

定量 PCR による遺伝子発現量解析

細胞から ISOGEN II (NIPPON GENE)を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace (TOYOBO)により cDNA の合成を行った。合成した cDNA を使用し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて、発現遺伝子の定量を行った。

レクチン免疫染色

ガラスベースディッシュ(IWAKI)を Poly-L-lysine でコーティングし、細胞を播種した。翌日 PBS で細胞を洗浄し、0.025 U/ml のノイラミニダーゼ(nakarai tesque)で細胞を処理した。4%パラホルムアルデヒドを加え、室温で 20 分間固定化を行った後、PBS (+1%BSA)で 30 分間ブロッキングを行った。SSA レクチンを PBS (+1%FBS)で 50 倍希釈し、37°C で 2 時間反応させた。その後 mouse anti-SSA 抗体を PBS (+1%FBS)で 100 倍希釈し 4°C で 2 時間反応させた。PBS (+1%FBS)で 2 回洗浄後、anti-mouse IgG Alexa Flour® 488 を PBS (+1%FBS)で 1000 倍希釈し、4°C で 1 時間反応させた。PBS で 2 回洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

PGC 定着率の検定

ニワトリ種卵(日本レイヤー)を転卵角度 90°、転卵間隔 1 時間、転卵温度 38°C の条件で 2.5 日胚(HHSt14-16)まで発生を進行させた。mCherry-ST6Gal1 または eGFP-Cre を導入した PGC をレシピエント胚の血中へ 1 胚あたり 1 μ l (5000 cell) ずつ移植した。移植を行った種卵は穴を開けた面を上にした状態で転卵角度 30°、転卵間隔 1 時間、転卵温度 38°C の条件で 3.5 日間転卵を行った。

その後、発生が進んだ胚より生殖腺を回収し、トリプシン処理により 15 分反応し、細胞を分散した。その後 PBS (+1%FBS)で細胞を洗い、mCherry-ST6Gal1 導入 PGC は Alexa Fluor®488 anti-mouse/human SSEA-1 (BioLegend)、eGFP-Cre 導入 PGC は anti-SSEA-1 mouse monoclonal IgM (SantaCruz Biotechnology)を加えて 4°C で 1 時間反応させた。次いで遠心分離(1000 rpm, 5 min, 4°C)により細胞を回収し、PBS (+1%FBS)に懸濁して一度洗浄し、eGFP-Cre 導入 PGC は goat anti-mouse IgM-PE (Santa Cruz Biotechnology)と 4°C で 1 時間反応させた。その後遠心分離により細胞を回収し、PBS (+1%FBS)に懸濁した。染色した細胞はフローサイトメーターにより解析した。

4. 研究成果

(1) CRSPR/Cas9 による遺伝子置換

ST3Gal6 遺伝子を標的とした数種の sgRNA を設計し、ニワトリ PGC へ導入したが遺伝子置換が起きたクローンの取得には至らなかった。さらなる CRSPR/Cas9 導入法の検討やクローン選択法の検討が必要であると考えられる。

(2) Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システム

Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 安定発現細胞株の取得

ニワトリ培養細胞 DF-1 に mCherry を loxP 配列ではさんだ pPV/EF1 α -mCherry-ST6Gal1 プラスミドを PiggyBac トランスポザナーゼとともに導入し、安定発現細胞株の樹立を行った。mCherry 陽性細胞をセルソーターにより分離後、限界希釈によるクローン化を行い、発現量の異なる 3 種類(クローン#2, #3, #11)の細胞株を取得した。次に樹立したこれらの細胞へ Cre リコンビナーゼ発現プラスミド(pPV/PGK-eGFP-Cre)の導入を行った。Cre/loxP 組換えにより mCherry 遺伝子が polyA 付加配列とともに欠失するため、mCherry 蛍光が消失し、ST6Gal1 遺伝子が発現するようになる。セルソーターにより mCherry 陰性細胞を分離し、次の解析に用いた。

Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 の発現確認

Cre/loxP 組換え前後の細胞から total RNA を抽出し、cDNA の合成を行った。合成した cDNA を用いて定量 PCR を行い、それぞれの細胞における mCherry 遺伝子、ST6Gal1 遺伝子の発現量を測定した。mCherry の発現量は各クローンの蛍光強度と一致しており、蛍光の弱い#2 と強い#11 を比較するとその差は約 20 倍であった。また、Cre/loxP 組換え後はいずれの細胞株も mCherry の

発現減少が見られた。#11 は元の発現量が高かったため、組換え後も mCherry の発現が残っていたが、#2 と#3 は検出限界以下まで減少したことから、ほぼ全ての mCherry 遺伝子が欠失したと考えられる (図 2A)。一方、ST6Gal1 遺伝子は DF-1 細胞で内在性の発現はほとんど見られず、Cre/loxP 組換え後に発現が観察された (図 2B)。また、その発現量は組換え前の mCherry の発現量を反映しており、mCherry から ST6Gal1 に発現が切り替わったことを示唆している。

次に ST6Gal1 の発現により細胞表面に α -2,6 結合型シアル酸が形成されたことを確認するため、 α -2,6 結合型シアル酸を特異的に認識する SSA レクチンを用いて免疫染色を行った。Cre/loxP 組換え前後のクローン#3 を染色した結果、組換え前では α -2,6 結合型シアル酸を示す蛍光は観察されなかったが、組換え後の細胞では蛍光が観察されるようになった。さらに、この細胞を末端シアル酸を切断するシアリダーゼにより処理したところ、蛍光が消えたことから、細胞表面に α -2,6 結合型シアル酸が形成されたことを確認できた (図 3)。

Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 導入 PGC の定着率検定

DF-1 細胞を用いて Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システムの確認ができたため、pPV/EF1 α -mCherry-ST6Gal1 と pPV/PGK-eGFP-Cre プラスミドを安定発現するニワトリ PGC 株を樹立した。この細胞を 2.5 日レシピエント胚に移植し、その後 6 日胚の生殖腺より細胞を分離し、SSEA-1 染色を行った。移植した PGC は導入遺伝子による蛍光を持つため、内在性の PGC と区別が可能である。mCherry-ST6Gal1 導入 PGC の定着率は個体により差はあるが高いもので約 50% であり、eGFP-Cre 導入 PGC の定着率は 20-30% であった。これらの結果から今回樹立した Cre/loxP 作動性 ST6Gal1 システムを導入した PGC は生殖腺への定着能を有していることがわかり、今後これらの PGC 移植したニワトリを交配することにより、糖鎖改変トランスジェニックニワトリの作製が可能であると考えられる。

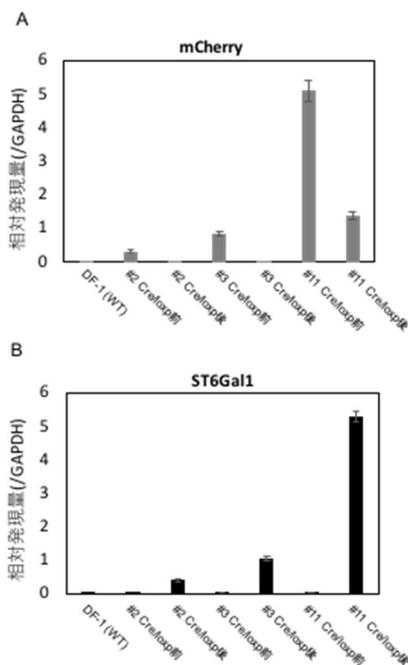


図2 Cre/loxP組換え前後の遺伝子発現量比較

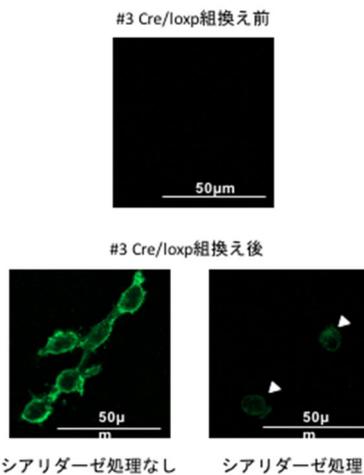


図3 Cre/loxP組換え前後のSSAレクチン染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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, 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） https://doi.org/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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

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 金岡英徳
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞の培養とその応用
3. 学会等名 次世代アニマルセルインダストリー研究部会 設立記念シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okuzaki Y., Hagihara Y., Kaneoka H., Nakayama Y., Kato M., Iijima S., Nishijima KI.
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 The 31st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋原遥太、奥崎雄也、金岡英徳、飯島信司、西島謙一
2. 発表標題 培養始原生殖細胞の樹立とCRISPR/Cas9によるeGFPノックインニワトリの作製
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----