

平成22年 5月17日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380160

研究課題名（和文） ニワトリ ES 細胞株の基礎と応用に関する研究

研究課題名（英文） Basic and Applied Study on Chicken Embryonic Stem Cell Lines

研究代表者

堀内 浩幸（HORIUCHI HIROYUKI）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号：80243608

研究成果の概要（和文）：本研究では、ニワトリからいろいろな細胞に分化可能な胚性幹細胞（ES）細胞の樹立を行い、培養時や生体内での ES 細胞の特徴を解析するといった基礎研究から遺伝子組換えニワトリの作出への応用研究を行った。その結果、本研究で樹立したニワトリ ES 細胞は試験管内で多分化能と生殖細胞分化能を維持し、また生体内でもいろいろな細胞に分化できること、また緑色蛍光タンパク質の全身発現や眼が赤く光る遺伝子改変キメラニワトリ（G0）の作出に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, establishment of chicken embryonic stem (ES) cells and production of genetically modified chickens using the ES cells were carried out. The established chicken ES cells were able to differentiate into various cells *in vitro* and *in vivo*. The genetically modified chickens (G0) using the ES cells expressed green fluorescent protein (GFP) throughout the body or red fluorescent protein (DsRed) in the lens of the eye.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：ニワトリ・胚性幹細胞・遺伝子組換え

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換えニワトリは、基礎研究分野から商業的利用を目的とした応用研究まで幅広く利用されることが期待されている。しかし、安定して遺伝子組換えニワトリを作出する方法は、現在のところウイルスベクターを

用いて未分化胚に遺伝子を導入する方法に限られている。よって、組み込まれる遺伝子は、ランダムインテグレーションのみであり、マウスで行われているようなターゲットインテグレーションを基盤とした遺伝子のノックイン・アウトといった高度な遺伝子組換

えは適応できない。また導入できる遺伝子のサイズに制限があり、さらに導入遺伝子のサイレンシングの問題やウイルスを用いているための安全性の問題が完全に払拭できていない。このため、これらの問題点を全て解決し、遺伝子組換えニワトリの作出が可能な多能性幹細胞の樹立研究が進められてきた。しかし、研究開始当初まで、その成功には至っていなかった。研究代表者らのグループは、ニワトリの多能性幹細胞として ES 細胞に着目し、研究開始当初までに ES 細胞の培養に必須と考えられるニワトリ白血病阻害因子 (LIF) を世界に先駆けてクローニングしていた。またこの LIF を用いた培養系の改変によって、ニワトリ ES 細胞の候補細胞の樹立にも成功していた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、ニワトリ LIF を用いた ES 細胞の樹立系を完成させ、樹立した ES 細胞の *in vitro*, *in vivo* での評価系の確立とランダムインテグレーション並びに相同遺伝子組換えを必要とするターゲットインテグレーションを実現し (基礎研究部分)、そこから遺伝子組換えニワトリを誕生させることである (応用研究部分)。

## 3. 研究の方法

上記研究目的を達成するために、以下の項目の方法を用いて研究を行った。

### (1)ニワトリ ES 細胞の評価方法の確立

*in vitro* で簡潔に ES 細胞の多能性と生殖細胞分化能を評価するために、遺伝子発現とタンパク質発現の両面から評価方法を確立する。評価に値する遺伝子を複数種選択し、遺伝子発現では RT-PCR や real time PCR による発現解析を行った。またタンパク質の発現解析では、選択した遺伝子の翻訳産物に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作出し、抗体染色によりその発現を評価した。さらに *in vivo* での評価では、樹立した ES 細胞をレシピエント胚へ移植し、羽毛色キメラの誕生を指標に ES 細胞の多分化能を評価した。

### (2)遺伝子組換えベクターの構築

樹立した ES 細胞に対してランダムインテグレーション並びにターゲットインテグレーションで遺伝子導入できるベクターの構築を行った。ランダムインテグレーションでは、ハウスキーピング遺伝子やウイルス由来のプロモーターの下流に緑色蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) を配置し、体全体で緑色蛍光が観察できるベクターを設計した。またターゲットインテグレーションでは、相同遺伝子組換えにより早期にかつ視覚的に導入遺伝子の表現系を解析できるように標的に  $\delta 1$  クリスタリン遺伝子座を選択し、この遺伝子座

のエクソン領域にインフレームで赤色蛍光タンパク質遺伝子 (DsRed) を導入できるように設計した。

### (3)遺伝子組換え ES 細胞の選抜と評価

(2)で作製した遺伝子組換えベクターを用いて、ES 細胞へ遺伝子を導入し、薬剤選抜後の ES 細胞の多能性並びに生殖細胞分化能の評価を *in vitro* および *in ovo* で行った。またターゲットインテグレーション用ベクターの遺伝子導入では、相同遺伝子組換え細胞のクローニング方法の確立を行った。

### (4) 遺伝子組換え ES 細胞からキメラニワトリの作出

(3)で得られた遺伝子組換え ES 細胞をレシピエント胚へ移植することにより、キメラニワトリ (G0) の作出実験を行った。移植実験では、複数の孵化個体を得るとともに、移植胚の蛍光観察を実施した。

### (5)後代検定

(4)で孵化させたニワトリを性成熟するまで育成し、横斑プリマスロック種と交配することで後代検定を実施した。また同時に遺伝子組換えを行っていない ES 細胞を移植して誕生させたキメラニワトリも同様に後代検定を実施した。(参考:ニワトリは白羽毛色が優性形質、横斑プリマスロック種のヒナは黒羽毛色、ES 細胞は横斑プリマスロック種由来、レシピエント胚は白色レグホン種由来、よって後代検定で ES 細胞が生殖細胞に分化したときのみ、黒羽毛色のヒナが誕生する。)

### (6)ES 細胞の培養系の改変

現在のニワトリ ES 細胞の培養技術をさらに改善する (増殖性、多分化能、生殖細胞分化能の維持) ために、各種阻害剤を用いた培養培地の改変と評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1)ニワトリ ES 細胞の評価方法の確立

#### ①*in vitro* での遺伝子発現による評価

新たに 40 種の ES 細胞の候補となる細胞を樹立し、多能性維持に機能する因子の遺伝子として *Nanog* と *Sox2*, 生殖細胞へ分化する細胞マーカー因子遺伝子として *Cvh* と *chiwi* (研究代表者のグループがクローニングしたニワトリ *Piwi* ホモログ) の発現を mRNA レベルで解析した。まず ES 細胞を樹立するために使用する放卵直後の胚盤葉細胞において mRNA の発現を解析したところ、いずれの mRNA を強く発現していることがわかった。そこで次に樹立した ES 細胞において同様に発現解析を行ったところ、細胞種によって発現の強度にばらつきはあるもののいずれの細胞もすべての遺伝子が発現していることが明らかとなった。

#### ②各種抗体の作製

ES 細胞を免疫染色により簡便に評価する

ために、Nanog, Cvh および chiwi のリコンビナントタンパク質を作製し、これらを免疫原にウサギポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は、全て特異性解析を行い、各種免疫染色に利用できることを確認した。

### ③ *in vitro* でのタンパク質発現による評価

作製した抗体を用いて胚盤葉細胞に対して免疫染色を行った。その結果、抗 Nanog 抗体は胚盤葉細胞の核を、抗 Cvh 抗体は細胞質を染色することがわかった。また抗 chiwi 抗体は細胞全体を染色した。次に樹立した ES 細胞に対して同様の抗体染色を行ったところ、すべての細胞の核で Nanog が発現していることがわかった。一方、Cvh と chiwi はすべての ES 細胞で発現しているわけではなく、ES 細胞のコロニーの中に散在して 2 重陽性細胞が存在することがわかった (図 1)。また樹立した 40 種の中には Cvh と chiwi を発現しない ES 細胞も存在していた。

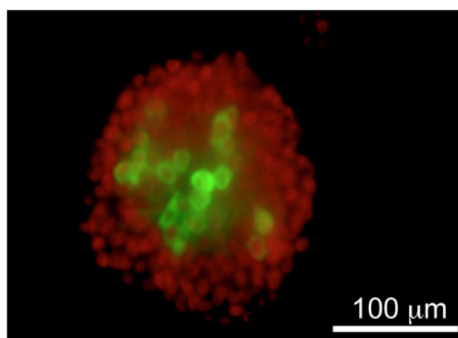


図1 ES細胞のコロニー中のNanog陽性細胞(赤)とCvh陽性細胞(緑)

### ④ キメラ形成能による評価

Nanog, Cvh および chiwi の 3 重陽性細胞の ES 細胞が存在する割合が高い ES 細胞を 4 種選抜し、白色レグホン種の受精卵胚へ移植実験を行った。樹立した ES 細胞はいずれも横斑プリマスロック種の受精卵から樹立しているため、ES 細胞が多分化能を有していれば、キメラは白と黒羽毛色のぶちとなる。その結果、選抜した 4 種の ES 細胞からはいずれも羽毛色キメラが得られ、キメラ形成能を有していることが明らかとなった (図 2)。



図2 ES細胞から誕生した羽毛色キメラ

## (2) 遺伝子組換えベクターの構築

### ① ランダムインテグレーション用ベクター

ランダムインテグレーション用ベクターは、ニワトリのハウスキーピング遺伝子のプロモーター制御下で GFP 遺伝子と薬剤耐性遺伝子が共発現できるよう計画したが、同様の構造をもったベクターが他の研究に利用されていることがわかり、ベクターを構築した研究者 (現理学研究所・神戸・丹羽仁博士) から分与を受けた。このベクターは制御領域に CMV のエンハンサー、ニワトリの  $\beta$  アクチンプロモーター、ウサギの  $\beta$  グロビン遺伝子の polyA シグナルサイトを有し、その下流に EGFP, IRES 配列を挿んでピューロマイシン耐性遺伝子を持つベクターである。

### ② ターゲットインテグレーション用ベクター

ターゲットインテグレーション用ベクターの構築ではまず、ニワトリのゲノムから  $\delta$  1 クリスタリン遺伝子座 (エクソン 3 からエクソン 17 とその下流のイントロンの領域、約 7.4 kbp) を BAC ベクターにクローニングした。さらにこの遺伝子座のエクソン 17 に存在するストップコドンの前にインフレームで DeRed 遺伝子の翻訳領域のみを挿入し、さらにエクソン 17 の下流のイントロン領域にランダムインテグレーション用ベクターの制御領域からピューロマイシン耐性遺伝子までの領域を挿入した。本ベクターは相同遺伝子組換えを挿入型で行えるよう構築した。

## (3) 遺伝子組換え ES 細胞の選抜と評価

### ① 遺伝子組換え ES 細胞の評価

ランダムインテグレーション用ベクターは、4 種の ES 細胞へエレクトロポレーション法により導入した。遺伝子導入の 24 時間後からピューロマイシン (0.1~0.6  $\mu$ g/mL) により細胞の選抜を開始し、約 10 日間の培養でほぼすべての細胞で EGFP が発現することを確認した (図 3)。

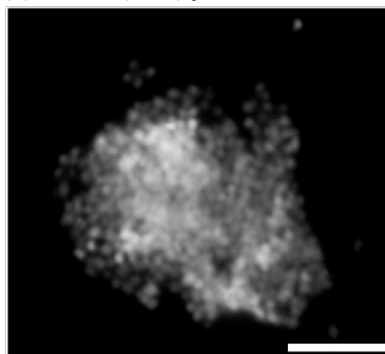


図3 GFPを発現するES細胞のコロニー

次に抗 Nanog 抗体と抗 Cvh 抗体を用いて免

疫染色したところ、遺伝子導入前の ES 細胞と同様、ES 細胞のコロニー全体で Nanog が発現し、その中に Cvh を発現する細胞が散在することがわかった。

#### ②相同遺伝子組換え細胞のクローニング

①と同様にターゲットインテグレーション用ベクターも 3 種の ES 細胞へ導入し、ピューロマイシンによる選抜をおこなった。次にこの ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR により相同遺伝子組換え細胞の検出を行い、選抜した 1 種の ES 細胞の中に相同遺伝子組換えを起こした細胞の存在が確認された。そこで次に、限界希釈法による細胞クローニングを行った。その結果、通常の培養方法では、1 細胞から ES 細胞のコロニーの形成がほとんど誘導されなかったが、10 mM の濃度で ROCK 阻害剤を培地に添加することで、10~30% の割合で 1 細胞から ES 細胞のコロニーが形成されることがわかった。コロニーが出現した培養器から一部の細胞を取りだし、PCR 法により相同遺伝子組換え細胞を選抜した。またクローニングは少なくとも 2 回以上実施した。最終的に相同遺伝子組換えの正否は、PCR 産物の塩基配列の決定とサザンブロット法により確認し、クローニングした ES 細胞で確実に相同遺伝子組換えが行えていることを証明した。

#### ③相同遺伝子組換え細胞の評価

クローニングした ES 細胞もまた、(1) ③と同様の方法で抗体染色により、多能性維持と生殖細胞分化能を評価し、Nanog と Cvh の発現がクローニング後も維持されていることを確認した。

#### (4) 遺伝子組換え ES 細胞からキメラニワトリの作出

##### ①GFP 導入キメラニワトリ

ランダムインテグレーションで EGFP を導入した ES 細胞 (EGFP-ES 細胞) をレシピエント胚へ移植し、全胚培養システムを用いて、キメラニワトリの作出を行った。また同時に胚発生段階での EGFP 発現細胞の観察も実施した。その結果、孵卵 3 日胚の観察では、胚体のほぼ全身でモザイク状に EGFP の発現が観察された (図 4)。



図4 GFP導入キメラ胚

また、孵卵 50 時間後の循環する胚血液並びに孵卵 6 日後の生殖隆起近傍の組織切片を抗 Cvh 抗体で免疫染色して観察したところ、Cvh 陽性でかつ EGFP を発現する細胞が観察され、EGFP-ES 細胞が始原生殖細胞に分化していることがわかった。本実験では複数個体のキメラニワトリの作出を行い、(3) の後代検定に使用した。

##### ②DsRed 導入キメラニワトリ

ターゲットインテグレーションで DsRed を  $\delta 1$  クリスタリン遺伝子座へ導入した ES 細胞 (DsRed-ES 細胞) をレシピエント胚へ移植し、全胚培養システムを用いて、キメラニワトリの作出を行った。また同時に胚発生段階での DsRed 発現細胞の観察も実施した。その結果、孵卵 5 日胚では (4) ①と同様、EGFP がモザイク状に胚体のいたるところで発現が観察され、その中に眼球だけが赤色蛍光を発する個体が観察された。そこで、この胚体から眼球部分を摘出し、組織切片にし、抗 DsRed 抗体で免疫染色したところ、 $\delta 1$  クリスタリン遺伝子が発現するレンズの水晶体線維細胞で特異的に DsRed が発現していることがわかった (図 5)。

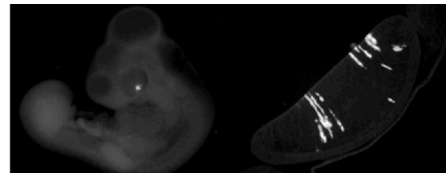


図5 胚の眼球部分とで水晶体線維で赤色蛍光が認められる

この結果から DsRed-ES 細胞では確実に相同遺伝子組換えが行われていることを表現系から証明できた。本実験では複数個体のキメラニワトリの作出を行い、(3) の後代検定で使用した。

##### (5)後代検定

(4)で作製したキメラニワトリを育成・性成熟させ、横斑プリマスロック種との掛け合わせによる後代検定を実施した。研究期間の関係で多くの後代検定は実施できなかったが、現在までのところ(4)で作製したキメラニワトリからは、生殖系列の個体が確認されていない。しかし、性成熟した遺伝子組換えキメラニワトリの精子や卵巣のゲノム中に導入遺伝子 (EGFP 等) が存在していることを確認した。現在もなお、後代検定を続行中である。一方、遺伝子組換えを行っていない ES 細胞から誕生したキメラニワトリからは、生殖系列の個体が確認されており (図 6)、現在その出現頻度等の解析を進めている。

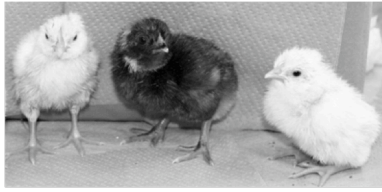


図6 ES細胞から得られた後代 (中央)

#### (6) ES細胞の培養系の改変

分化誘導やアポトーシス誘導シグナルの種々の阻害剤を組み合わせ、ニワトリ ES細胞の培養系の改変を行った。その結果、多能性維持と細胞増殖にはMEK系のリン酸化阻害剤が有効であり、また細胞の維持やクロニングには、ROCK阻害剤が有効であることがわかった。また、STAT3のリン酸化阻害では、逆にES細胞の分化を促進させることがわかった。

#### (7) 得られた成果の位置づけとインパクト

本研究で得られた成果の主要な点は、生殖細胞に分化可能なニワトリES細胞の樹立に成功した点とそのES細胞に対して相同遺伝子組換えによるターゲットインテグレーションで遺伝子導入を可能にした点である。いずれの成果も未だ国内外での成功例は報告されておらず、そのインパクトは大きい。ES細胞による遺伝子組換えニワトリの作出技術は今後産業応用への期待が高まることが予想され、既にニワトリLIFの特許権を国内外で取得していること、また本研究により得られた成果も研究期間中に国内外に特許出願をすることができたため、今後日本発の技術として大きく世界に向けて発信できると考えられる。また従来のウイルスベクターでは、導入した外来のプロモーター制御による部位特異的な発現しかできなかったものが、相同遺伝子組換えを可能としたことで、遺伝子のノックアウトや内在性の制御領域を活用したノックインが利用可能となり、ニワトリを活用した基礎研究への貢献も十分に期待できる。

#### (8) 今後の展望

今後、本技術を発展させるためには、まだいくつかの課題が残されている。それは、遺伝子を導入していないES細胞と導入したES細胞において、各種評価遺伝子やタンパク質の発現に差がないのに対して、後代検定ではまだ遺伝子導入ES細胞からは後代が確認されていない点である。生殖細胞において導入遺伝子が確認されていることと、まだ試験数が少ないことを考えると、今後、後代が得られる可能性は十分考えられる。しかし、ES細胞の樹立から遺伝子導入、選抜と*in vitro*での培養期間が延長しており、このあたりで

何か違いが出ているのかもしれない。そのため、今後は未だ解明されていないニワトリにおける生殖細胞の運命決定機構の解明を含めた地道な基礎研究が必要であると考えている。

また本研究を進める過程でキメラニワトリの作出と後代検定の段階で非常に人手と時間と費用がかかることを痛感した。今後本技術をさらに汎用性のある技術にするためには、この段階での技術改良もしくは、規模の大きな共同研究チームを築く必要があるものと思われる。

今後の展望として、本研究成果は、基礎研究分野において、生殖細胞の発生機構などの発生生物学領域、ほ乳類以外での多能性幹細胞の特徴、進化などの分野で、また産業への応用において、物質生産、鶏卵成分の改変、ニワトリの育種など幅広い分野での活用が期待される。

以上の点を踏まえ、今後さらに汎用性のある技術に引き上げるための研究を遂行しなければならないと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計11件)

- ①堀内浩幸, 中野幹治, 鶏の遺伝子組換え技術のこれまでとこれから, 鶏の研究, Vol. 10, 2010 (印刷中) 査読無
- ②堀内浩幸, 有澤謙二郎, ニワトリの万能細胞“ES細胞”とその遺伝子組換え, 化学と生物, Vol. 48, 237-242, 2010, 査読無
- ③Fukushima, Y., Sato, M., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H. Construction of an insertion vector for gene targeting of chicken lens-specific gene. J. Poult. Sci., 47(2), 144-148, 2010, 査読有
- ④堀内浩幸, 江崎僚, アレルギーフリーのたまご開発が可能か, 鶏の研究, Vol. 5, 5-7, 2010, 査読無
- ⑤堀内浩幸, アレルギーフリーの卵開発は可能か, 養鶏の友, Vol. 575, 29-31, 2010, 査読無
- ⑥Nakamura, R., Nakamura, R., Nakano, M., Arisawa, K., Ezaki, R., Horiuchi, H. and Teshima, R. Allergenicity study of EGFP-transgenic chicken meat by serological and 2D-DIGE analysis. Food Chem. Toxicol., 48(5), 1302-1310, 2010, 査読有
- ⑦Miyoshi, M., Horiuchi, H., Fukushima, Y., Matsuda, H. and Furusawa, S. Cloning of the chicken interleukin-13 receptor alpha 2 gene and production of a specific

monoclonal antibody. Dev. Comp. Immunol., 31(4), 394-406, 2007, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ①堀内浩幸, 遺伝子改変ニワトリの開発, 第 6 回たまご研究会, 2009 年 10 月 17 日, 京都市
- ②堀内浩幸, ニワトリ ES 細胞を用いたジーンターゲットング技術の開発, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸市
- ③堀内浩幸, 精子形成過程におけるニワトリ Vasa homolog のタンパク質修飾, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸市
- ④堀内浩幸, ニワトリ ES 細胞における生殖細胞分化能, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸市
- ⑤堀内浩幸, ニワトリ胚性幹細胞のクローニング技術の開発, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸市
- ⑥堀内浩幸, ニワトリ Nanog 様遺伝子 (*Sachi-1*) の同定と発現解析, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 12, 13 日, 横浜市
- ⑦堀内浩幸, 新規ニワトリ胚性幹細胞株の樹立とその特徴, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 12, 13 日, 横浜市
- ⑧堀内浩幸, 新規ニワトリ ES 細胞株群の分子生物学的特徴と多能性評価, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 12, 13 日, 横浜市
- ⑨堀内浩幸, ニワトリ ES 細胞株への GFP 遺伝子の導入, およびキメラ胚による多能性の評価, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 12, 13 日, 横浜市
- ⑩堀内浩幸, ニワトリ ES 細胞の多能性維持における LIF シグナルの役割, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007 年 12 月 12, 13 日, 横浜市

[図書] (計 1 件)

- ①堀内浩幸, 大学教育出版, 分子から見た生命の不思議(第 2 章 ES 細胞って何?), 2009, 24-41.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ニワトリ胚性幹細胞およびその評価方法

発明者: 堀内浩幸

権利者: 広島大学

種類: 特許権

番号: 特願 2009-506353

出願年月日: 2008 年 3 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: Chicken embryonic stem cell and method for evaluation thereof

発明者: 堀内浩幸

権利者: 広島大学

種類: 特許権

番号: 08722827.6-1212 (EU)

12532548 (米国)

出願年月日: 2009 年 11 月 11 日

国内外の別: 国外

[その他]

○報道関連情報

- ①中国新聞, 2008 年 11 月 27 日, 内容: 遺伝子組換えニワトリの応用技術が紹介された。
- ②日経産業新聞, 2009 年 2 月 12 日, 内容: 「金の卵を探せ」と題して遺伝子組換えニワトリの技術が紹介された。
- ③読売新聞, 2009 年 5 月 2 日 (夕刊) 5 月 3 日 (朝刊), 内容: 遺伝子組換えニワトリの応用技術が紹介された。

○アウトリーチ活動情報

- ①(財)ちゅうごく産業創造センター「動植物工場によるバイオ産業創出可能性調査」委員会委員, 任期 2007 年 4 月~2008 年 3 月
- ②広島大学・公開講座「分子から見た生命の不思議」講師, 対象一般

○ホームページ

研究成果の公開や紹介

- ①<http://home.hiroshima-u.ac.jp/immunobi/>
- ②<http://www.hiroshima-u.ac.jp/top/kenkyu/now/no14/index.html>
- ③[http://www.hiroshima-u.ac.jp/gsbs/kenkyu\\_syokai/horiuchi/](http://www.hiroshima-u.ac.jp/gsbs/kenkyu_syokai/horiuchi/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 浩幸 (HORIUCHI HIROYUKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・助教

研究者番号: 80243608

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: