

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22286

研究課題名（和文）鳥類のゲノム編集・自由自在

研究課題名（英文）Master the genome-editing technology in birds

研究代表者

堀内 浩幸（Horiuchi, Hiroyuki）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：80243608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゲノム編集技術の適用が遅れている鳥類であるニワトリを対象として、以下の研究を実施し研究成果を得た。ニワトリにおけるゲノム編集の標的細胞であるPGCの培養の簡易化において、低分子化合物の選抜を行い、生殖細胞分化能を維持しつつ、増殖能を促進する培養方法の構築に成功した。培養PGCの添加物として必須なFGF2の安定化に寄与するヘパリンがゲノム編集ツールの導入効率を著しく低下させることを発見し、その対処方法を構築した。ゲノム編集ニワトリを作出するための前段階として早期にin vitroで評価するシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、今後、鳥類へのゲノム編集技術を加速させるための多くの知見を集積させることに成功した。特にニワトリは、食品や医薬品生産において利用される重要な産業動物であり、本研究成果はこれらの分野に大きく貢献することが期待される。特に鶏卵のアレルギ－問題（食品やワクチン生産）、動物愛護を重視した雌雄の産み分けや判定方法の簡易化、感染症対策として高病原性鳥インフルエンザへの貢献が十分に期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, I conducted the following research on chickens, which are birds whose application of genome editing technology has been delayed and obtained research results. In simplifying the culture of PGC, which is the target cell for genome editing in chickens, I selected low-molecular-weight compounds and succeeded in constructing a culture method that promotes proliferative ability while maintaining germ cell differentiation ability. I discovered that heparin, which contributes to the stabilization of FGF2, which is essential as an additive for cultured PGC, significantly reduces the introduction efficiency of genome editing tools, and constructed a countermeasure. As a preliminary step to create a genome-editing chicken, I constructed an early in vitro evaluation system.

研究分野：農芸化学およびその関連分野

キーワード：鳥類 ゲノム編集 ニワトリ 始原生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

ニワトリは基礎研究分野から産業利用を見据えた応用研究分野まで幅広い利用が可能な生物種であり、ゲノム編集技術の適用は、この分野にブレイクスルーを引き起こすと考えられる。しかしながら、ニワトリでは、ゲノム編集による遺伝子ノックアウトは効率よく行なえるものの、ノックインの適用は従来の相同遺伝子組換え (HR) では、効率が極めて低くほとんど進んでいない。またニワトリでは、1細胞期受精卵の操作が困難なため、ゲノム編集の標的には、生殖細胞の前駆細胞にあたる始原生殖細胞 (PGC) が用いられるが、こちらも培養が困難である。さらに、ゲノム編集した PGC は、一旦初期胚へ移植し、生殖細胞キメラを介してゲノム編集ニワトリを作出しなければならず、ゲノム編集ニワトリの評価には、2年以上の歳月を要することが問題である。ニワトリを含めた家禽において、ゲノム編集技術を自由自在に操るためには、PGC の培養方法を簡易化すること、ノックインの効率を改善すること、また有用タンパク質生産のためには、早期での評価系の構築が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、上記の問題点を解決するために、(1)ニワトリ PGC の培養方法の簡易化、(2)ゲノム編集ツールの導入効率を改善する、(3)マイクロホモロジー媒介性末端結合 (MMEJ) を活用した PITCh 法を導入し、ニワトリにおける高効率ノックイン法を完成させる。標的には、鶏卵の卵白中の最大量を有するオボアルブミンの遺伝子を選択し、この遺伝子の下流もしくは上流に抗体遺伝子をノックインし、内在的なオボアルブミン (OVA) の転写・翻訳系で卵白中に抗体を蓄積させる。また、標的遺伝子として、胚発生に影響しないオボムコイドを選択し、オボムコイド (OVM) をノックアウトして、有用タンパク質遺伝子をノックインする技術を構築することを目的とした。オボムコイドは、鶏卵の主要なアレルゲンタンパク質であり、オボムコイドの遺伝子座へのノックインは、有用タンパク質生産の増量と安全性の確保につながる事が予想された。最終的に本研究では、ニワトリにおけるゲノム編集を自由自在に使用可能とし、有用タンパク質生産系にゲノム編集ニワトリの活用を促進することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ PGC の培養方法の簡易化

ニワトリでは、他の動物種とは異なり、1細胞期受精卵の操作が困難なため、ゲノム編集の標的には、生殖細胞の前駆細胞にあたる PGC が用いられる。初期胚における PGC の取得には、受精卵を孵卵して50時間前後の胚血液や6日以降の生殖原基から分離する手法があるが、いずれも、得られる PGC の数は少数であり、*in vitro* での培養による細胞数の確保が必須である。しかしながら、ニワトリ PGC の培養は極めて困難であり、培養方法の簡易化が必要であった。そこで本研究では、この課題を解決するために、ニワトリ PGC の培養方法の簡易化に取り組んだ。

ニワトリ PGC の培養には、生殖細胞への分化能の維持と共に、増殖能を付与する必要がある。そこで本研究では、これらの条件を満たす添加物として、低分子化合物の利用を検討した。低分子化合物には、間接的に ES 細胞の分化やアポトーシスを阻害するミオシンの特異的阻害剤である blebbistatin、ROCK 阻害剤である H-1152、アポトーシスを誘導するカスパーゼの阻害剤である Z-VAD を供試した。種々の濃度で希釈したそれぞれの低分子化合物を添加し、ニワトリ PGC を培養し、その増殖活性を ATP 量によって測定する Cell Titer-Glo (Promega 社) を用いて測定した。また培養した PGC が生殖細胞分化能を保持しているかどうかは、Nanog と chicken Vasa homologue (Cvh) の発現を免疫蛍光染色により確認するとともに、Green fluorescence protein (GFP) 遺伝子を導入した培養 PGC を初期胚へ移植し、その挙動を追跡した。

(2) ゲノム編集ツールの導入効率を改善する

以前より、培養ニワトリ PGC へのゲノム編集ツールの導入において、その効率の低さがゲノム編集効率を向上させるための障壁となっていた。そこで本研究では、何がこの障壁となっているかを明らかにするために添加物の再検討を行った。ニワトリ PGC の培養には、FGF2 の添加が必須であるが、FGF2 の培養液中での安定性が低いため、これを改善するためにヘパリンを添加している。ヘパリンは、血液の抗凝固剤として一般的に知られているが、電荷的に FGF2 を負に帯電し、培養液中での安定性と活性を維持する効果を有する。また、培養ニワトリ PGC へのゲノム編集ツールの導入には、エレクトロポレーション法やリポフェクション法が利用されているが、エレクトロポレーション法はその条件設定が難しく、また高導入効率の割に生存細胞数が極端に低いという問題点がある。リポフェクション法では、陽性荷電脂質を用いた細胞膜融合により細胞内へベクターを導入することで、陰性荷電のヘパリンが陽性荷電のリポフェクションの効果を阻害しているのではないかと考えた。そこでヘパリンの影響を調べるために、GFP 発現ベクター導入時に洗浄によりヘパリンを除去した群と除去しなかった群を準備し、フローサイトメーターと蛍光顕微鏡観察によりデータを収集した。

(3) マイクロホモロジー媒介性末端結合 (MMEJ) を活用した PITCh 法の導入

本研究では、有用タンパク質生産系にゲノム編集ニワトリの活用を促進するために、ノックインシステムとして MMEJ を活用した PITCh 法の導入を試みた。PITCh 法には、TALEN と CRISPR/Cas の 2 種を作製した。標的遺伝子には、鶏卵中で最大のタンパク質含有量である OVM の遺伝子座と 2 番目に含有量が高い OVM を選択した。OVA は胚発生過程に必須のタンパク質であるため、この遺伝子を有用タンパク質に置き換えることはできない。そのため、既存の成功例では、片アレルにノックインする手法により 60 mg/egg の蓄積ができることを報告している。しかしながら、OVA は 3 g/egg の蓄積量があり、既存の技術では OVA の内在的発現系を十分に生かし切れていないと考えた。そこで本研究では、OVA の発現系を完全に活かしつつ、有用タンパク質遺伝子をノックインする手法を考案した。具体的には、OVA 遺伝子座の 5' 側 (開始コドンを活かしつつ、IRES もしくは 2A で有用タンパク質遺伝子を連結する場合) および 3' 側に同様に導入する 4 パターンを計画した。この実験系を評価するには、まず培養系で内在的な OVA を発現するシステムが必要のため、ニワトリ培養細胞株である DF1 細胞を用いて、OVA の遺伝子座の開始コドン上流に、常時下流の遺伝子の発現を促進する EF1- α のプロモーターを PITCh 法により挿入した。OVA は、開始コドンがエクソン 2 にあるため、プロモーターの挿入位置をエクソン 1 の下流と上流の 2 種で試行した。その後、上記の 4 つの挿入パターンをヒト FGF2 遺伝子により評価した。

次に、本研究課題を遂行中に、OVM ノックアウトニワトリの実験系から、OVM はニワトリの発生過程に必須ではないことが判明した。OVM は OVA につぐ卵白中の蓄積タンパク質であり、強力なアレルゲンとなっている。そこで OVM の翻訳領域を完全に有用タンパク質遺伝子に置き換えれば、既存の 60 mg/egg の蓄積量の 5~10 倍の生産系が構築できると考えた。これを実証するためには、まず評価系が必要であることから、OVA の場合と同様に、まず培養系で内在的な OVM を発現するシステムを構築した。その後、この発現細胞の OVM 遺伝子座にヒト FGF2 遺伝子を PITCh 法により導入し、その発現量を比較した。最終的に OVA 系ならびに OVM 系ともに、ニワトリ PGC へ導入した。

4. 研究成果

(1) ニワトリ PGC の培養方法の簡易化

低分子化合物を用いたニワトリ PGC 培養方法の改変では、いずれの低分子化合物も PGC の培養 6 日以降に PGC の増殖を促進することがわかった。特にその効果は、blebbistatin が最も高く、次に H-1152 であった。いずれの低分子化合物は高濃度 (2 μ M) では効果が低く、最適な添加濃度は 0.25 μ M であった。培養開始して 75 日目に、一部の細胞を回収し Nanog および Cvh の免疫染色を行ったところ、全ての細胞が陽性であることがわかった。培養 PGC に GFP 遺伝子を導入し、GFP 発現 PGC (培養 80 日目) を初期胚へ移植し追跡した結果、孵卵 7.5 日の生殖原基で移植した GFP 発現 PGC の集積が確認された (図 1)。本成果は、Cytotechnology 72(3)397-405, 2020 で公表するとともに、「始原生殖細胞の培養方法及び始原生殖細胞の培養用培地添加物」として特許を取得した (特許番号 6754966, 2021/8/10, ただし出願日は 2016 年のため成果項目には不記載, 特許審査過程で本研究期間中に得られた新たな成果を考慮して、請求項の修正を行い、特許が認められた)。

(2) ゲノム編集ツールの導入効率を改善する

ニワトリ PGC でのゲノム編集効率の低さは、ゲノム編集ツールの導入効率の低さにあるのではないかと考え、その原因を追求した。その結果、ヘパリンを除去した PGC では、ヘパリン含有 PGC よりも GFP 発現が 40 倍以上高くなることがわかり、ヘパリンの存在が遺伝子導入試薬のリポフェクションの効果を阻害することが明らかとなった (図 2)。またこの現象は、陽性荷電物質であるプロタミンの添加により再現されたことから、ヘパリンの存在がゲノム編集ツールの導入効率を阻害していることが明らかとなった。本研究成果は、第 45 回鳥類内分泌研究会で「ニワトリ PGCs における遺伝子工学的な特徴」と「ニワトリ培養細胞の heparin による遺伝子導入効率の低下現象に関する研究」で学会発表を行い、前者について優秀発表賞を受賞した。現在、学術誌へ投稿を行っている。

(3) マイクロホモロジー媒介性末端結合 (MMEJ) を活用した PITCh 法の導入

本研究項目では、まず TALEN と CRISPR/Cas の 2 種の PITCh ベクターを作製した。TALEN の PITCh ベクターは設計上のミスや PGC への適応が困難であることが判明し、CRIS/PITCh で以下の成果を得た。まずは、鶏卵での有用タンパク質生産系には早期のシステムの評価系が必要であることから、OVA と OVM の発現細胞の樹立を行なった。OVA と OVM は性成熟した雌鳥の卵管内分泌細胞から産生されるが、その培養系は確立されていない。すなわち PGC やニワトリの既存の培養細胞では OVA も OVM も産生されることはない。そこで、ニワトリの培養細胞株である DF1 細胞に CRIS/PITCh 法を用いて強制発現プロモーターを導入して、発現細胞の樹立を行なった。その結果、OVA と OVM のそれぞれ発現細胞の樹立に成功した (特願 2021-192781, 2021/11/31)。特に、OVA では、エクソン 1 の上流に強制発現プロモーターを導入しなければならないことも明らかにした (第 44 回 日本分子生物学会年会 2021 で発表, 現在, 学術誌へ投稿中)。

次に、それぞれの発現細胞に対して、ヒト FGF2 遺伝子を CRIS/PITCh により導入し、それぞれ

発現が可能かどうかを試験した。その結果、OVA への遺伝子座へのノックインでは、最もヒト FGF2 の発現が高かったのは、5' 側の開始コドン直下にヒト FGF2 遺伝子-IRES-OVA で連結する系であった。ところがこの系では、OVA の発現がノックイン前と比較して約 1/20 となることがわかり、これはノックインニワトリの胚発生に影響がでることが懸念された。次に発現量が高い系は、OVA の 3' 側の終始コドンの前に T2A 配列を不可した OVA-T2A-ヒト FGF2 の系であった。前者と比べて、ヒト FGF2 の発現量は 1/3 となったが、生体に換算すると生産量は 1 g/egg となり、従来法の約 20 倍の蓄積量であることがわかった。さらにこの系では、OVA の発現量に影響がなく、発生への影響も無いことが示唆された。

もう一つの系である標的に OVM を選択したものでは、OVM の発現量に比較して、ヒト FGF2 の発現量は 1/1000 に低下するこがわかった。これは分子数の比較ではなく、免疫法による定量的な比較であるため、正確な考察はできないが、ヒト FGF2 の発現において何かしらの問題が生じていることが予想された。他の実験において、ヒト FGF2 のニワトリ細胞内での発現量が高いものの、分泌タンパク質としての検出量が低いことを経験しており、この点は現在、解析中である。いずれの系でも、ニワトリ培養 PGC へのノックインが完了し、実証研究を開始している。

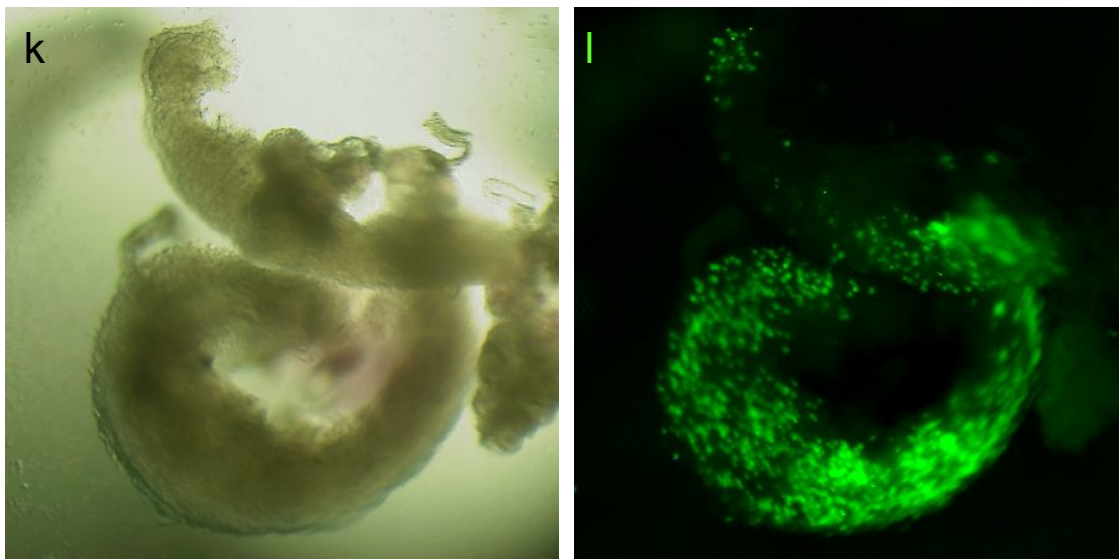


図 1 . 孵卵 7.5 日の生殖原基で移植した GFP 発現 PGC の集積

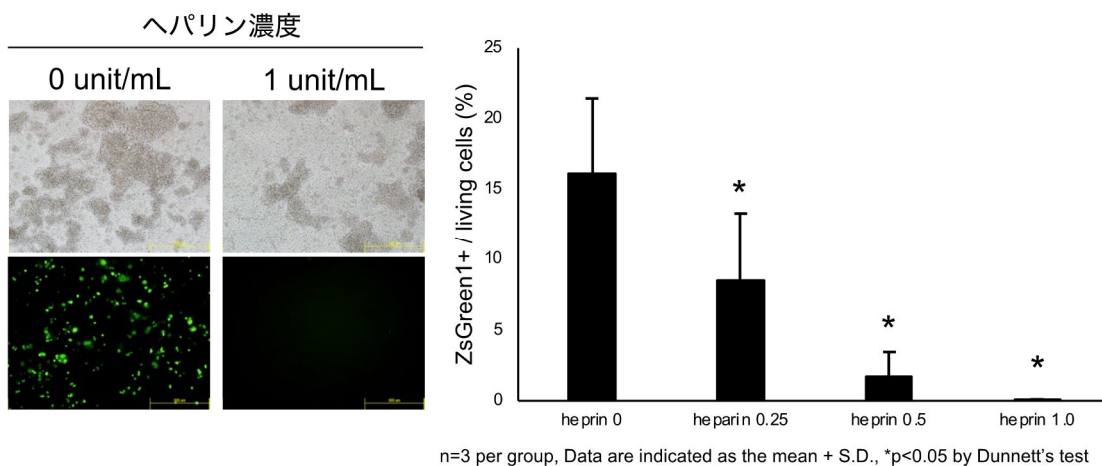


図 2. ヘパリンの存在が遺伝子導入試薬のリポフェクションの効果を阻害する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Ezaki Ryo, Hirose Fumiya, Furusawa Shuichi, Horiuchi Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 An improved protocol for stable and efficient culturing of chicken primordial germ cells using small-molecule inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 397 ~ 405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-020-00385-9	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 Ryo Ezaki, Kennosuke Ichikawa, Mei Matsuzaki, Hiroyuki Horiuchi	4. 巻 59
2. 論文標題 Targeted Knock-in of a Fluorescent Protein Gene into the Chicken Vasa Homologue Locus of Chicken Primordial Germ Cells using CRIS-PITCh Method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 182-190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0210067	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 Kennosuke Ichikawa, Yuzuha Motoe, Ryo Ezaki, Mei Matsuzaki, Hiroyuki Horiuchi	4. 巻 27
2. 論文標題 Knock-in of the duck retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) into the Mx gene in DF-1 cells enables both stable and immune response-dependent RIG-1 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101084	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11件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原亮太、江崎僚、松崎芽衣、堀内浩幸
2. 発表標題 ゲノム編集を用いた低コスト組換えタンパク質生産系の構築
3. 学会等名 第44回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内浩幸
2. 発表標題 ゲノム編集を用いた家禽の品種改良技術の確立
3. 学会等名 COI-NEXTxOPERAx卓越大学院 オンライン合同シンポジウム「TRINITY」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川健之助・元榮柚花・江崎僚・松崎芽衣・堀内浩幸
2. 発表標題 ニワトリ始原生殖細胞の体細胞分化に関する研究
3. 学会等名 日本家禽学会2022年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智勇太, 渡邊天海, 市川健之助, 江崎僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 ニワトリ培養細胞のheparinによる遺伝子導入効率の低下現象に関する研究
3. 学会等名 第45回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊天海, 越智勇太, 市川健之助, 江崎僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 ニワトリPGCsにおける遺伝子工学的な特徴
3. 学会等名 第45回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山西菜々子, 江崎僚, 笹浪知宏, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 鳥類アデノ随伴ウイルスベクターのウスズラ胚に対する感染能評価
3. 学会等名 第45回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山脇まゆ子, 江崎 僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 ニワトリ生殖細胞の分化過程に関する研究
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶原亮太, 江崎僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 ニワトリ培養細胞を用いた鶏卵バイオリクター評価系の構築
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内浩幸
2. 発表標題 ゲノム編集の今とこれから
3. 学会等名 NACS中国支部研修講座(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山脇まゆ子, 江崎 僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 ニワトリ生殖細胞の分化過程に関する研究
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川健之助, 江崎僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸
2. 発表標題 宿主免疫応答におけるニワトリ MDA5 およびLGP2 の機能解析
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 江崎僚, 松崎芽衣, 堀内浩幸	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 386
3. 書名 ゲノム編集実験スタンダード	

1. 著者名 分担 堀内浩幸	4. 発行年 2021年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 244
3. 書名 SDGsに向けた生物生産学入門 (1章14:ゲノム編集とは何か)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 鳥類の培養細胞株、バイオリクターの評価用培養細胞株の製造方法及びバイオリクター評価用キット	発明者 堀内浩幸, 他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-192781	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------