

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02537

研究課題名（和文）ゲノム編集ニワトリによる高機能インフルエンザワクチンの生産

研究課題名（英文）Genetic manipulation of chicken for better vaccine production

研究代表者

西島 謙一（Nishijima, Ken-ichi）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：10262891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：発育鶏卵によってインフルエンザワクチンを生産している際に増やしているウイルスは“トリ型化”ヒトインフルエンザである。本申請では、糖鎖編集によりトリ化の過程を不要にすることで大幅な短縮化と低コストを両立する手法を開発することを目指した。このための遺伝子改変ニワトリの作製が必要であり、安全性確保のために作製を計画した2系統の遺伝子改変ニワトリの取得に成功した。また、作製効率向上のために、遺伝子改変に使用する始原生殖細胞基礎研究も同時に行い、糖転移酵素の強発現により始原生殖細胞の増殖が抑制される現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作製した2系統のトランスジェニックニワトリの交配を開始しており、今後得られた卵を解析することで糖鎖変換とインフルエンザウイルスの増殖を評価する必要がある。これにより、期待通りインフルエンザワクチン生産に適した鶏卵作製を証明できれば、増殖が難しいワクチン株の生産等へ適用可能な技術となる。また、ニワトリ始原生殖細胞の増殖に関わる複数の因子を見出したことから、今後増殖制御や育種への利用への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：The human influenza virus propagated in embryonated chicken eggs is an "avianized" virus with the risk of mutation. We aimed to improve the propagation of the human virus in eggs by using transgenic chickens. For this purpose, it was necessary to create two transgenic chickens to increase safety. We implanted the transfected primordial germ cells into recipient embryos and succeeded in obtaining two transgenic chickens that we planned to create. In order to improve the efficiency of transgenic chicken production, we examined the characteristics of chicken primordial germ cells and found that strong expression of a glycosyltransferase suppresses the proliferation of the cells.

研究分野：ニワトリの生殖工学

キーワード：ニワトリ インフルエンザ ワクチン 遺伝子改変

## 1. 研究開始当初の背景

現在は発育鶏卵によって増殖させたヒトインフルエンザウイルスをワクチンの原料としている。オートメーション化が進み、大規模生産が可能でコスト的にも最も有利な生産法である。発育鶏卵で増やしているウイルスは“トリ型化”ヒトインフルエンザである。最も時間がかかるのは、本来ニワトリでは増えないヒトインフルエンザウイルスをニワトリでも増えるウイルスに変異させる“トリ化プロセス”である。この過程で起こる遺伝子変化によりワクチン効果が減弱することがある。特にワクチンの主要な成分である HA タンパク質は、ウイルス感染時に細胞の糖鎖レセプターと結合する役割を持つため変異が起りやすく深刻な問題となる。実際、2013 年の H3N2 型ワクチンはウイルス変異のため効果がなかったことは有名である。本申請では、糖鎖編集によりトリ化の過程を不要にすることで大幅な短縮化と低コストを両立する手法を開発する。

## 2. 研究の目的

発育鶏卵でウイルス株の増殖を左右するのは漿尿膜上に存在する糖鎖の結合パターンであるとされる。漿尿膜上の糖鎖は主に  $\alpha 2,3$  結合型シアル酸であり、ヒトインフルエンザウイルスが必要とするシアル酸とは異なる。そのため、鳥型の  $\alpha 2,3$  結合型シアル酸を感染に使用できる変異型ウイルスを分離しワクチン株として用いているが、これには長期間の馴化プロセスが必要である。理論上糖鎖をヒト型化できれば、ヒトウイルスを馴化プロセスなしで増やせるようになる。そこで本申請では、発育鶏卵の遺伝子改変によりこの点を解決する。これまで開発を進めてきたニワトリの遺伝子改変技術を用いてヒト型糖鎖発現ニワトリを作製する。安全性を確保するために複数のニワトリ系統の樹立が必要であり、遺伝子改変ニワトリ作製効率の向上のために、遺伝子改変に使用する始原生殖細胞（Primordial germ cell, PGC）の増殖・分化に関する基礎研究も同時に行う。

## 3. 研究の方法

- ① PGC がニワトリ胚でどのようにして分化するかについては不明な点が多い。我々は *in vivo* での PGC の増殖に PRDM14 や BLIMP1 が必要であることを発見し (Dev Biol, 455:32, 2019)、PRDM14 遺伝子ノックアウトニワトリを作製したが、ホモノックアウトニワトリは PGC 分化以前に死んでしまうことが明らかとなった。そこで、PRDM14 のコンディショナルノックアウトを試みる。
- ② ヒトインフルエンザウイルスの効率よい増殖を可能とする遺伝子改変を施したニワトリ個体はヒトインフルエンザウイルスのリザーバーとなりかえって強毒株出現の温床となるおそれがある。そこで、Cre リコンビナーゼを発現するニワトリと、プロモーターと目的の糖転移酵素の間をスタッファーで区切った 2 種のニワトリ系統を樹立する。これら 2 系統を交配して得られた発育鶏卵では、Cre リコンビナーゼによりスタッファーが除去されヒト型糖鎖を発現するようになるため安全である。

## 4. 研究成果

①PGC がニワトリ胚でどのようにして分化するかについては不明な点が多い。我々が PRDM14 遺伝子に着目し、主に PGC におけるノックダウンによって機能解析を進めてきた。CRISPR/Cas9 を持ちいたノックアウトでは、片アレルノックアウト PGC のみが増殖してきており、両アレルノックアウト PGC は増殖できないことが推定された。ニワトリ始原生殖細胞における PRDM14 の役割を確認するために、PRDM14 遺伝子座にテトラサイクリン添加により PRDM14 の発現を抑制可能なプロモーターをノックインした (図 1)。内在性の PRDM14 プロモーターによって PGC で高発現される tTA タンパク質によってテトラサイクリン依存的に発現抑制が可能である。多くのクローンが片アレルのみノックインされた細胞である中、両アレルにノックインされた PGC 株の作製に成功した。PRDM14 の発現量は期待通りテトラサイクリンの添加により約 20%まで抑制できた (図 2)。しかし、調べた範囲で始原生殖細胞の増殖及び遺伝子発現に大きな影響はなかった。実験システム特性により残ったバックグラウンド発現により細胞の性質が維持されたものと推定された。

次に、培養 PGC で哺乳類 PGC に必要なサイトカインレセプター遺伝子のひとつをノックアウトしたところ、PGC の増殖が抑制されることが認められた。培養系にこのサイトカインは添加しておらず、今後増殖抑制メカニズムの確認が必要である。

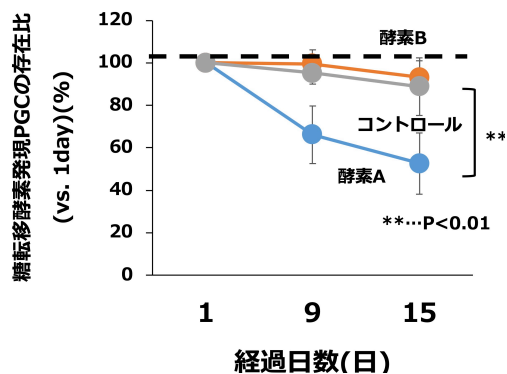


図 3. 糖転移酵素による PGC の増殖抑制。

ある。哺乳類においては酵素活性を失わせることが既知の変異体の遺伝子を導入したところ、増殖が阻害されることが観察された。酵素活性に寄らない増殖抑制メカニズムがある可能性が示唆される一方、発現量を正確に評価した上での検討が必要であるものと考えられた。現在は、定量的な解析を行うための発現系を作製中である。

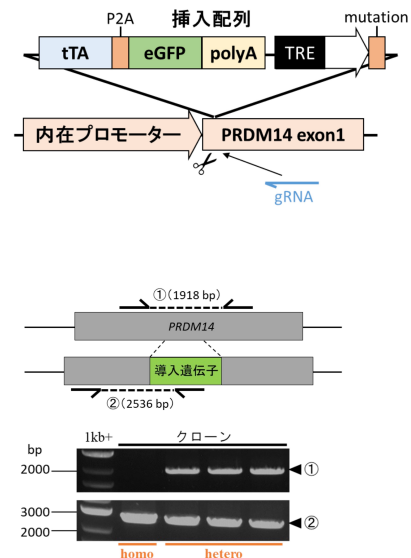


図 1. PRDM14 誘導 PGC 細胞の樹立。  
(上) コンストラクト概要. (下) ホモ・ヘテロノックイン細胞株の樹立.

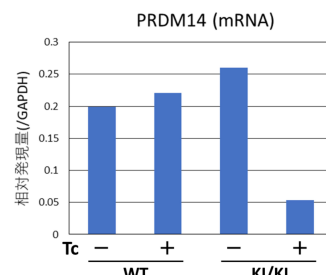


図 2. PRDM14 の誘導発現。  
テトラサイクリンによりノックダウンされることが確認された。

また、培養 PGC において、糖転移酵素の一種を過剰発現したところ増殖が抑制されることが認められた。Cre リコンビナーゼによりスタッフアーを除去することで糖転移酵素を発現する PGC 株では、Cre を一活性に発現した細胞の割合が経時的に減少することが確認された (図 3)。この遺伝子は、哺乳類ではある種のガン細胞において発現昂進が認められむしろ増殖促進に寄与することが想定される遺伝子であることから、トリーで認められる新たな現象である可能性も

②本申請ではニワトリの遺伝子改変技術を用いてヒト型糖鎖発現ニワトリを作製することを目指す。安全性を確保するために2系統の遺伝子改変ニワトリを作成することを目指した(図4)。まずこの2系統の遺伝子改変 PGC 株を作製し、レシピエント胚に移植することで生殖腺キメラを作製した。生殖腺キメラ個体が成熟した後、遺伝子改変された次世代のニワトリを得るために交配とスクリーニングを進めた。その結果、まず複数の Cre リコンビナーゼ発現ニワトリ個体が得られた。インバース

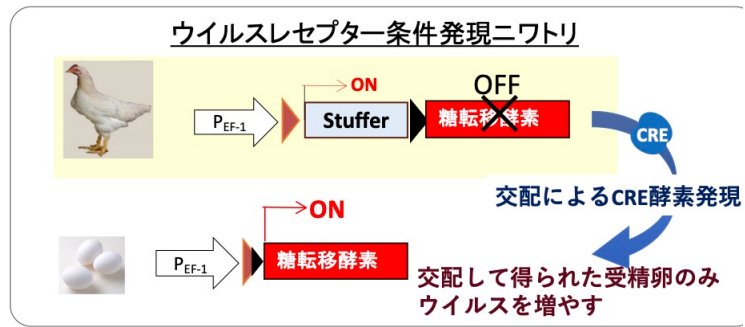


図4. 発育鶏卵でのみ糖鎖改変を行うニワトリ系統の作製。

PCR によって遺伝子挿入部位を調べたところ、異なった染色体部位に挿入されていることが示された。次に、プロモーターと糖転移酵素の間をスタッファーで区切ったニワトリ系統を作製した。生殖腺キメラニワトリを交配して、生まれたヒヨコをスクリーニングした。その結果目的のトランスジェニックニワトリ系統の樹立に成功した。生まれた個体はスタッファーとして挿入した蛍光タンパク質遺伝子を強く発現しており、スタッファーを除去した際には目的遺伝子を強く発現できることが期待された。遺伝子導入 PGC を移植した胚を孵化させて得た成熟後の2系統のニワトリの交配を開始している。今後、得られた卵を解析することで糖鎖変換とインフルエンザウイルスの増殖を評価する必要がある。

今回作製したトランスジェニックニワトリでは全身発現性のプロモーターを用いたが、発現遺伝子によっては過剰発現により悪影響を及ぼす際には組織特異的な発現を利用する可能性もある。そのためのモデルとしてリゾチームプロモーターの解析も行った(図4)。約6kbの上流領域のうち輸卵管における組織特異的な発現に必要な領域を同定した。

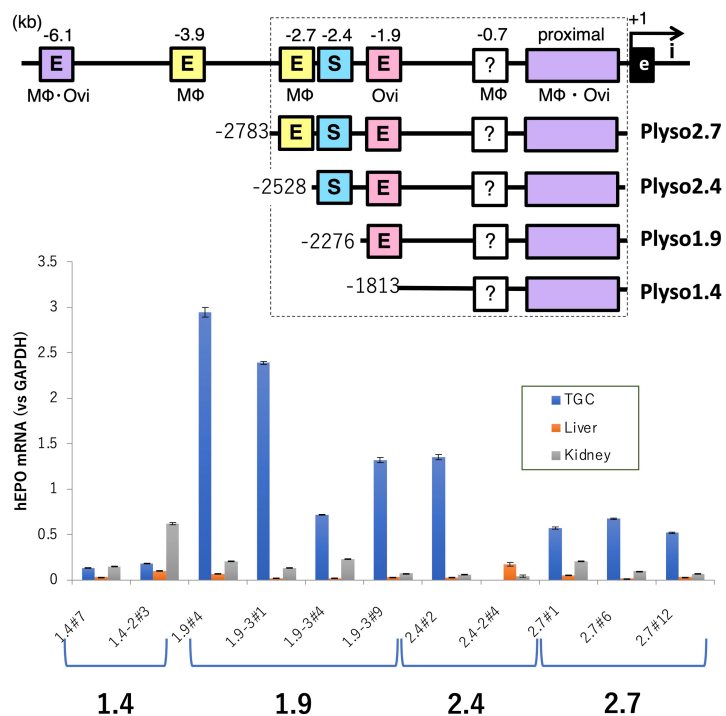


図5. 組織特異的なプロモーターの解析。レトロウイルスベクターにより遺伝子改変キメラ個体を作製した。リゾチームプロモーター下流に連結したエリスロペチンの発現を輸卵管(TGC)、肝臓、腎臓で比較した。

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 Kojima Yusuke, Okuzaki Yuya, Nishijima Ken-ichi, Moriwaki Shuichiro, Asai Seiya, Kaneoka Hidenori, Iijima Shinji	4. 巻 131
2. 論文標題 Regulatory mechanism of chicken lysozyme gene expression in oviducts examined using transgenic technology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 453 ~ 459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.11.011	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 3件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yuya Okuzaki, Mitsuo Nunome, Takayuki Suzuki, Yoichi Matsuda, Yumi Ozaki, Takeo Uemura, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Cultivation of chicken primordial germ cells from the chickens at Avian Bioscience Research Sciences Center, Nagoya University
3. 学会等名 11th Avian Model Systems Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yukiko Kondo, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Development of the transgenic chicken constitutively-expressing Streptococcus pyogenes Cas9
3. 学会等名 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2023)（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Fujiwara, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Knockout of Chicken Fucosyltransferase 8 Towards The Production System of Pharmaceutical Antibodies
3. 学会等名 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2023)（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西島謙一, 塚田光, 奥寄雄也
2. 発表標題 NBRP ニワトリ・ウズラ - 研究を推進するリソース
3. 学会等名 第47回 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西島謙一
2. 発表標題 NBRP ニワトリ・ウズラリソース事業とデザイン型ゲノム育種への夢
3. 学会等名 令和5年度東海畜産学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Transgenesis of chicken and quail towards designed-type breeding
3. 学会等名 2023 International Symposium on Animal Stem Cells & Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Okuzaki, Yuki Kondo, Ken-ichi Nishijima
2. 発表標題 Development of the SpCas9 constitutively expressing transgenic chicken
3. 学会等名 11th Avian Model Systems Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Nishijima
2. 発表標題 Transgenesis of chicken and quail towards designed-type breeding
3. 学会等名 Joint SBJ Meeting with Indonesia, Philippines, and Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧田芳隆, 奥寄雄也, 佐野観月, 金岡英徳, 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 糖鎖科学中部拠点 第16回 「若手の力」フォーラム
4. 発表年 2020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	金岡 英徳 (Kaneoka Hidenori)  (30631973)	愛知工業大学・工学部・准教授  (33903)	
研究分担者	小野 悦郎 (Ono Etsuro)  (00160903)	九州大学・医学研究院・教授  (17102)	2022年度まで

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
---------	---------