

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06248

研究課題名(和文) ゲノム編集による効率的なワクチン製造のための培養細胞株樹立の試み

研究課題名(英文) Attempt to establish cell lines for efficient vaccine production by genome editing

研究代表者

河東 康彦 (Kawato, Yasuhiko)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員

研究者番号：90634220

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)：本研究では、効率的な不活化ウイルスワクチンの産生を目的として、ゲノム編集技術を利用してウイルス複製阻害因子をノックアウトした培養細胞株の樹立を試みた。マダイイリドウイルスの培養に用いるイシガキダイ由来の培養細胞を用いた遺伝子発現解析の結果、免疫応答に関わる遺伝子群がウイルス複製の阻害に関与している可能性が示唆された。これらの情報を元に、2種類の遺伝子を対象にCRISPR-Cas9システムによる遺伝子のノックアウト試験を実施した。当該遺伝子をノックアウトした細胞を約1か月間は維持できたが、細胞の増殖速度が非常に遅かったためノックアウト細胞のウイルス感受性を評価するまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養細胞におけるマダイイリドウイルスの複製阻害要因が推定され、当該遺伝子をノックアウトする系も構築されつつある。ノックアウト細胞のスクリーニングと培養条件が整理できれば、ゲノム編集細胞株を用いた効率的なワクチン製造の足掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to establish a cell line in which viral replication inhibitory factors were knocked out using genome editing technology for the purpose of efficient production of inactivated viral vaccines. Transcriptome analysis using a cell line derived from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* which is used to propagate red sea bream iridovirus suggested that a gene cluster involved in an immune response may be involved in the inhibition of virus replication. On the basis of the information, the genome editing using the CRISPR-Cas9 system was conducted targeting two genes. Although we were able to maintain cells in which the gene was knocked out for approximately one month, we were not able to evaluate the viral susceptibility of the knockout cells because the cell growth was very slow.

研究分野：魚病学、ウイルス学

キーワード：ゲノム編集 ワクチン 複製阻害 マダイイリドウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マダイイリドウイルス (RSIV) 病はマダイやブリを始めとした 30 種以上の海産養殖魚で発生しており、日本では最も被害の大きいウイルス病である。また、国際獣疫事務局 (WOAH) のリスト疾病にも指定されており、ワクチン等による本病の適切な管理は、海外への水産物輸出が促進されている情勢下で重要な取り組みとなる。本疾病に対しては不活化ワクチンが市販されているが、製造時に使用されている魚類培養細胞のウイルス産生能力は低く、ワクチンの製造コストが高くなるという問題がある。そのため、ブリ類に比べて魚価に対するワクチンコストが高くなるマダイ養殖ではワクチンの普及率が低く、養殖場全域での疾病防除が進まないことから、依然として RSIV 病は海産養殖で最も発生件数の多いウイルス病として報告されている。これまでに研究代表者は、RSIV への感受性が高いイシガキダイから培養細胞 (SKF-9) を樹立し、従来の魚類培養細胞よりも効率的にウイルスが培養できることを確認した (Kawato et al. 2017)。また、ウイルスの抗原量が多いワクチンほど有効性が高くなることを確認し、培養細胞のウイルス産生量を高めるといった戦略が、ワクチン効果の増強や製造コストの低下につながることを示唆されている。一方、SKF-9 細胞においても、RSIV を接種した細胞で、徐々に細胞変性効果 (CPE) が回復していく現象が観察されている。先行研究 (若手 B、17K15313) では、細胞の継代を重ねることにより SKF-9 細胞において何らかのウイルス複製阻害が働き、ウイルス産生量が低下していることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的な遺伝子発現解析により SKF-9 細胞における RSIV の複製阻害因子を推定し、ゲノム編集技術による当該遺伝子のノックアウトによりウイルス産生量の高い培養細胞株の樹立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 継代数の異なる細胞におけるウイルス増殖性の比較

SKF-9 細胞では細胞継代数が 50 を過ぎると、ウイルス産生量が低下していくことが確認されている (Kawato et al. 2017)。そこで、細胞継代数 (P) 28 と P103 の SKF-9 細胞における RSIV の産生量を比較した上で、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により網羅的なトランスクリプトーム解析を実施した。25cm² フラスコに播種した SKF-9 細胞 (P28 および P103) に RSIV KagYT-96 株を多重感染度 (MOI) が 1 となるように接種した。1 時間後に接種源を除去し、培地で細胞を 3 回洗浄してから新たな培地を加えてウイルス接種細胞の培養を開始した。1 時間、3 日後、7 日後および 14 日後に細胞培養上清を回収し、ウイルス感染力価 (TCID₅₀/mL) を測定した。各試験は 3 反復で実施した。

(2) 網羅的な遺伝子発現解析によるウイルス複製阻害因子の推定

上述のウイルス接種 3 日後および 7 日後の培養上清を回収した細胞から RNA を抽出し、DNBSEQ-G400 を用いたシーケンシング解析により 1 サンプルあたり約 3G の情報量を持つ、トランスクリプトーム由来のシーケンスリードを得た (RNA-seq)。さらに、P103 の SKF-9 細胞から全 DNA を抽出して、DNBSEQ-G400 を用いたシーケンシング解析により約 25G の情報量を持つゲノム DNA 由来のシーケンスリードを得た。ゲノム DNA 由来のシーケンスリードをアセンブルすることで、総塩基数 723.4Mb、64,438 個のコンティグを得た。得られたコンティグに、ゼブラフィッシュの Gene Ontology データベースおよび KEGG データベースから、それぞれ GO term および KEGG_ID を割り当てた。ウイルス接種 3 日後および 7 日後における RNA-seq データを、ゲノム DNA 由来のコンティグにマッピングして TPM 値として各サンプルの遺伝子発現量を補正し、P28 と P103 の細胞で有意に発現変動している遺伝子を割り出した。有意な発現変動が見られた遺伝子の KEGG_ID を元に、KEGG Mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/search.html>) を用いたパスウェイ解析を実施した。

(3) ウイルス複製阻害因子を標的とした CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

パスウェイ解析において、ウイルス複製の阻害に関与していると推定された chemokine-like receptor 1 (CLR1) および有意な発現変動が確認されなかった interferon regulatory factor 9 (IRF9) を標的としたゲノム編集を行った。各遺伝子のゲノム配列情報を元に、ORF の開始 300bp 以内におけるプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 直前の 20 塩基について、ゼブラフィッシュ遺伝子の参照配列からオフターゲット効果が最も低いと推定された領域を標的に sgRNA を人工合成した。ゲノム編集細胞のスクリーニングを行うために、ピューロマイシン耐性遺伝子および GFP 遺伝子が搭載されたプラスミド (HR700PA-1) に、標的遺伝子との相同組み換えを狙った 40 塩基のホモロジーアームを左右に持つドナーベクターを作製した。コンフルエント状態の SKF-9 細胞 (P108) をトリプシン処理により分散し、細胞が浮遊懸濁されている状態で、上述の sgRNA およびドナーベクター、および Cas9 ヌクレアーゼを細胞内にトランスフェクションした。トランスフェクション細胞は、抗生物質 (ピューロマイシン) を添加していない培地を用いて 25cm² フラスコ内で培養を開始した。2 日後に 0.1μg/mL のピューロマイシンを添加した培地と交換し

て培養を行い、適宜、位相差および蛍光顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

(1) 継代数の異なる細胞におけるウイルス増殖性の比較

ウイルス接種3日後および14日後では、P28における培養上清中のウイルス量がP103よりも有意に高かった。なお、細胞の増殖速度はP103の方が早く、コンフルエント時の細胞数も多くなることから、細胞の増殖性が悪い場合ウイルス産生量が落ちたとは考えにくい。また、P103では細胞変性効果の出現も弱かったため、細胞内で何らのウイルス複製阻害が起こっていると考えられた。

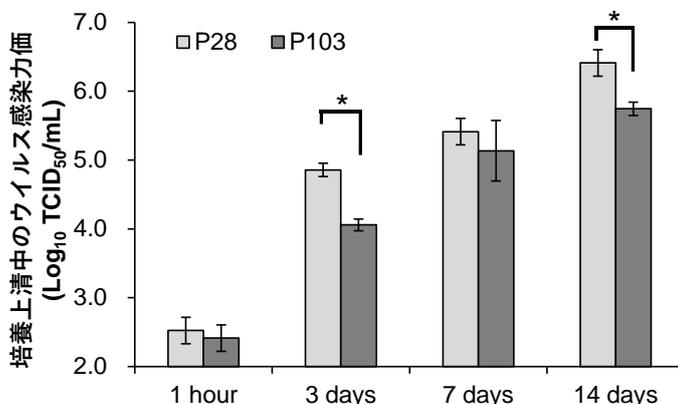


図1. 培養上清における継時的なウイルス量の変化。

結果はn = 3の平均値であり、バーは標準偏差を示す。アスタリスクは有意水準P < 0.01を示す。

(2) 網羅的な遺伝子発現解析によるウイルス複製阻害因子の推定

継代数が100を超えるSKF-9細胞ではウイルスの増殖性が有意に低下していたことから、ウイルス接種3日後(3 dpi)と7日後(7 dpi)の感染細胞における網羅的な遺伝子発現をP28とP103で比較した。3 dpiおよび7 dpiのP103において発現量が有意に上昇していた遺伝子について、q値(false discovery rate: FDR)の情報を元に上位10遺伝子を、それぞれ表1および表2にまとめた。10遺伝子中6遺伝子は3 dpiおよび7 dpiでも共通して発現量が上昇している遺伝子であった。また、いずれの遺伝子も細胞の構造物、複製、あるいは恒常性維持に関わる遺伝子であり、ウイルスの複製阻害に直結するとは考えにくかった。

表1. ウイルス接種3日後のP103において発現量が有意に上昇していた上位10遺伝子

コンティグ名	KEGG_id	推定機能	TPM値(正規化後の発現量)								発現量比 P103/P28	q.value (FDR)
			P28, 3dpi				P103, 3dpi					
			1	2	3	Mean	1	2	3	Mean		
TCONS_00015289	K22429	fibroblast growth factor 21	3.89	3.07	2.38	3.11	42.67	55.01	64.07	53.92	17.3	3.4E-154
TCONS_00004497	K07994	matrix metalloproteinase-13 (collagenase 3)	1.42	1.47	1.52	1.47	21.09	26.35	26.19	24.55	16.7	3.1E-145
TCONS_00017446	no hit	不明	9.66	9.38	7.42	8.82	85.81	98.91	132.7	105.8	12.0	2.2E-131
TCONS_00000012	K14354	solute carrier organic anion transporter family, member 4A	1.87	1.51	1.24	1.54	16.72	18.78	26.56	20.69	13.4	2.2E-117
TCONS_00003963	K13785	thymosin beta 10	4.01	4.53	3.90	4.15	44.70	52.60	59.46	52.25	12.6	3.1E-114
TCONS_00000294	K09546	heat shock protein beta-7	3.19	2.67	2.66	2.84	22.75	28.03	31.23	27.34	9.6	2.1E-104
TCONS_00003287	K10955	mucin-2	0.00	0.00	0.00	0.00	1.18	1.51	1.25	1.31	NA	2.9E-95
TCONS_00015907	K23577	IGFBP5; insulin-like growth factor-binding protein 5	1.62	1.43	1.14	1.40	7.86	9.26	10.18	9.10	6.5	6.7E-93
TCONS_00022833	K16756	CCDC64; coiled-coil domain-containing protein 64	0.14	0.26	0.28	0.23	1.06	1.11	1.66	1.27	5.6	9.1E-89
TCONS_00016599	no hit	不明	2.25	1.85	0.98	1.69	28.79	23.48	26.91	26.39	15.6	6.8E-88
TCONS_00028548	K04245	chemokine-like receptor 1	0.05	0.02	0.03	0.03	1.89	1.74	1.42	1.68	48.4	1.6E-32
TCONS_00019854	K04693	interferon regulatory factor 9	0.66	0.97	0.54	0.72	0.54	0.90	0.48	0.64	0.9	0.37

*NAはP28での発現量が0であったもの

*水色塗りつぶしはウイルス接種7日後のP103でも上位10遺伝子に入ったもの

表2. ウイルス接種7日後のP103において発現量が有意に上昇していた上位10遺伝子

コンティグ名	KEGG_id	推定機能	TPM値(正規化後の発現量)								発現量比 P103/P28	q.value (FDR)
			P28, 7dpi				P103, 7dpi					
			1	2	3	Mean	1	2	3	Mean		
TCONS_00016599	no hit	不明	0.99	1.64	1.32	1.31	26.91	31.59	42.30	33.60	25.6	1.5E-126
TCONS_00000012	K14354	solute carrier organic anion transporter family, member 4A	1.29	1.42	1.74	1.48	14.59	12.86	13.69	13.71	9.3	1.6E-86
TCONS_00015289	K22429	fibroblast growth factor 21	3.21	5.48	5.47	4.72	47.14	51.25	84.09	60.83	12.9	5.8E-82
TCONS_00011733	K23577	IGFBP5; insulin-like growth factor-binding protein 5	4.21	5.23	5.49	4.98	31.79	38.60	52.34	40.91	8.2	4.8E-80
TCONS_00000294	K09546	heat shock protein beta-7	2.01	2.41	2.63	2.35	19.84	22.53	33.33	25.23	10.7	5.5E-73
TCONS_00015907	K23577	IGFBP5; insulin-like growth factor-binding protein 5	0.70	0.90	0.72	0.77	5.49	5.97	7.05	6.17	8.0	4.7E-72
TCONS_00003287	K10955	mucin-2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.86	1.13	1.08	1.02	NA	9.0E-72
TCONS_00017446	no hit	不明	1.93	2.24	3.61	2.59	21.74	21.04	34.12	25.63	9.9	1.6E-69
TCONS_00001978	K18435	transcription factor SOX9 (SOX group E)	0.10	0.11	0.09	0.10	4.94	3.00	5.42	4.45	44.3	3.5E-69
TCONS_00006415	K19871	sal-like protein	0.38	0.39	0.39	0.39	3.11	3.05	3.56	3.24	8.3	2.2E-68
TCONS_00028548	K04245	chemokine-like receptor 1	0.05	0.00	0.00	0.02	0.86	0.80	1.44	1.04	61.9	6.5E-25
TCONS_00019854	K04693	interferon regulatory factor 9	0.58	0.64	0.46	0.56	0.76	0.88	0.61	0.75	1.3	0.93

*NAはP28での発現量が0であったもの

*水色塗りつぶしはウイルス接種3日後のP103でも上位10遺伝子に入ったもの

*赤字はゲノム編集の標的とした遺伝子

そこで、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)データベースを用いたパスウェイ解析によりウイルス複製の阻害に関与する遺伝子群の推定を行った。3 dpi および 7 dpi に P28 と P103 の間で、KEGG_id が付与された有意に発現変動していた遺伝子は、それぞれ 7525 個（上昇 3899 個、低下 3628 個）および 5373 個（上昇 2894 個、低下 2479 個）であった。パスウェイ解析において、30 個以上の遺伝子が関与していたパスウェイは 3 dpi および 7 dpi で、それぞれ 124 種類および 84 種類が確認された。多くの遺伝子が関与していたパスウェイは、Metabolic pathways (3 dpi : 390 遺伝子、7 dpi : 293 遺伝子) や Pathways in cancer (3 dpi : 167 遺伝子、7 dpi : 128 遺伝子) であった。特に癌化に関与する経路で遺伝子変動が大きいということは、P103 が株化細胞としての増殖性が増していることを示唆している。30 個以上の遺伝子が関与していたパスウェイのうち、ウイルス複製阻害に関与しているものとして、Chemokine signaling pathway に着目した。この経路では、3 dpi および 7 dpi で、それぞれ 42 個および 38 個の遺伝子の発現変動が確認された。この経路の下流はアポトーシスに関与しており、ウイルス複製阻害への関与が示唆された(図2)。この経路の上流に chemokine-like receptor 1 (CLR1) があり(図2)、3 dpi および 7 dpi における P103 の感染細胞では、P23 に比べて遺伝子発現が大きく上昇していたことから(表1 および表2)、この遺伝子をノックアウトすることでウイルス複製阻害を取り除けるのではないかと考えた。

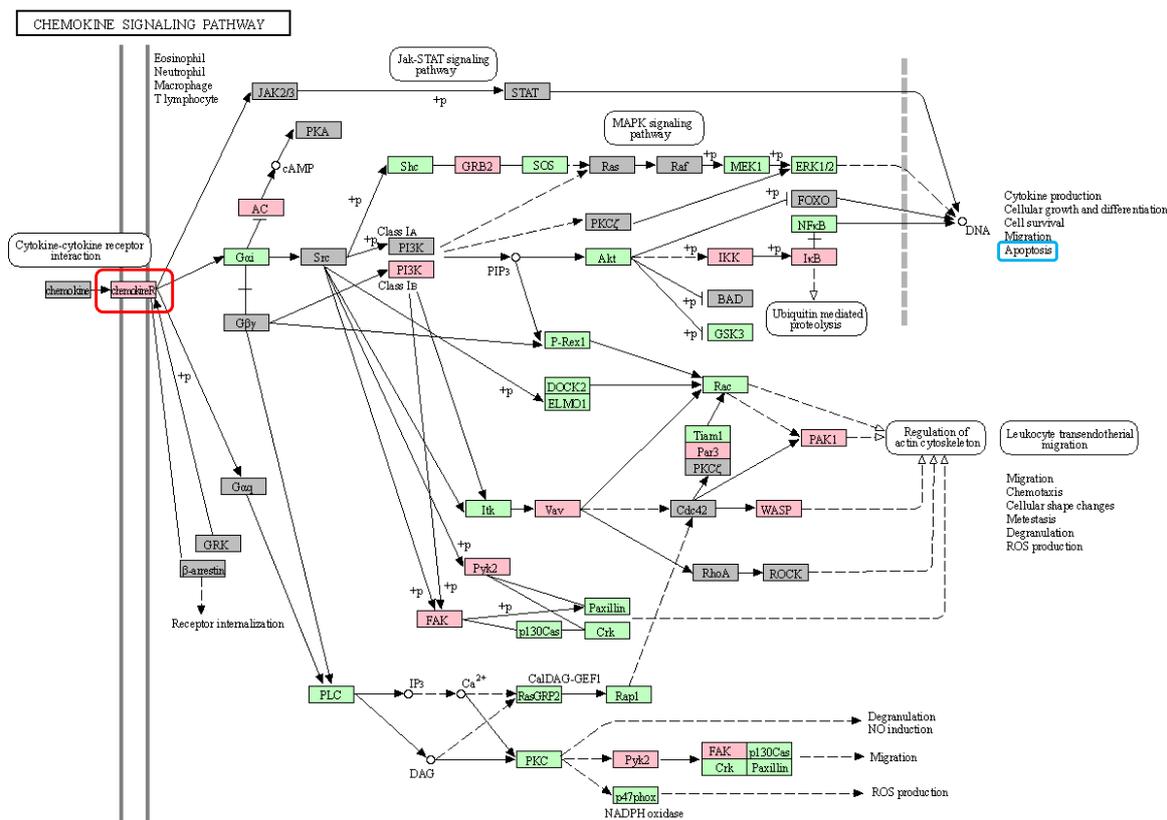


図2. RSIV 感染細胞 (3 dpi) における Chemokine signaling pathway

P103 で P28 よりも有意に発現上昇している遺伝子をピンク、有意に発現低下している遺伝子をグリーンで示している。赤枠は Chemokine-like receptor 1 遺伝子を示す。青枠はパスウェイ下流にアポトーシス経路があることを示す。

(3) ウイルス複製阻害因子を標的とした CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

パスウェイ解析において、ウイルス複製の阻害に関与していると推定された CLR1 に加えて、有意な発現変動が確認されなかった interferon regulatory factor 9 (IRF9) をゲノム編集の標的遺伝子とした(表1 および表2)。当初は、これ以外の遺伝子もスクリーニングすることを目的として、2 種類の sgRNA で DNA を切断し、2 種類のオリゴ DNA でプラスミド DNA をノックインする方法(2 ヒット 2 オリゴ法: 2H2OP 法)を検討した。この方法を用いると、1 種類のドナーベクターを構築すれば、オリゴ DNA の設計のみで様々な種類の遺伝子に対するゲノム編集に対応できるため、多くの遺伝子に関してスクリーニングできると考えられた。しかしながら、予備的に CLR1 を対象に実施した 2H2OP 法では、ゲノム編集効率が非常に低く、蛍光細胞がほとんど確認できなかった。そのため、常法通りマーカー遺伝子を挿入するためにノックアウトした標的遺伝子のホモロジーアームを組み込んだドナーベクターを作製して、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト試験を行った。また、ゲノム編集された SKF-9 細胞の選抜に適したピューロマイシンの濃度を検討し、SKF-9 細胞では 0.1μg/mL の濃度が適していることも予備試験により確認した。ノックアウト試験結果の概要として、複数ラウンドで実施したいずれの試験

でもゲノム編集細胞の株化には成功しなかった。以下に最も成績の良かった状況を示す。25cm²培養フラスコで、sgRNA およびドナーベクターの添加量をそれぞれ 3 μg および 6 μg とした時のゲノム編集効率が最も良かった。その時の ΔCLR1 および ΔIRF9 の SKF-9 細胞では、ピューロマイシンによる選抜により、当該遺伝子がノックアウトされたと思われる蛍光細胞が、試験開始 1 週間後には顕著に確認された (図 3 左)。試験開始 12 日後に死細胞を除去して蛍光細胞を濃縮する目的で、25cm²培養フラスコからトリプシン処理で細胞を回収して遠心濃縮し、24 well plate の 1 well 分にダウングレードして播種した。その後、ΔCLR1 では細胞の増殖がほとんど確認できず、試験開始 1 カ月後にはほとんどの細胞が死滅してしまった。一方、ΔIRF9 ではピューロマイシンにより選抜された細胞において増殖が確認され、一時は細胞株として樹立できるかと思われた (図 3 右)。しかしながら、試験開始 1 カ月をピークに培養上清の交換と共に細胞が不調となり、こちらの細胞も死滅してしまった。

ゲノム編集細胞の株化が出来なかったことから、対象とした遺伝子がウイルス増殖に関与しているかどうかについては明らかにできなかった。他方、ΔCLR1 および ΔIRF9 でゲノム編集直後の蛍光細胞の比率はほとんど同じであったことから、対象とする遺伝子が細胞増殖に致命的に関与するかどうか、ゲノム編集細胞の株化には非常に重要であることが示唆された。今後の改善点としては、ゲノム編集の標的遺伝子を再考することに加えて、培地に細胞増殖因子を添加して薬剤選抜した細胞の増殖を促すこと、あるいは、セルソーターによりゲノム編集された細胞を効率的に集約させることなどが考えられた。ウイルス産生量の高い細胞をゲノム編集により樹立する前段階として、細胞に致死的に作用しない遺伝子を用いて、ゲノム編集細胞を効率的に株化する手法の確立が必要であることも明らかとなった。

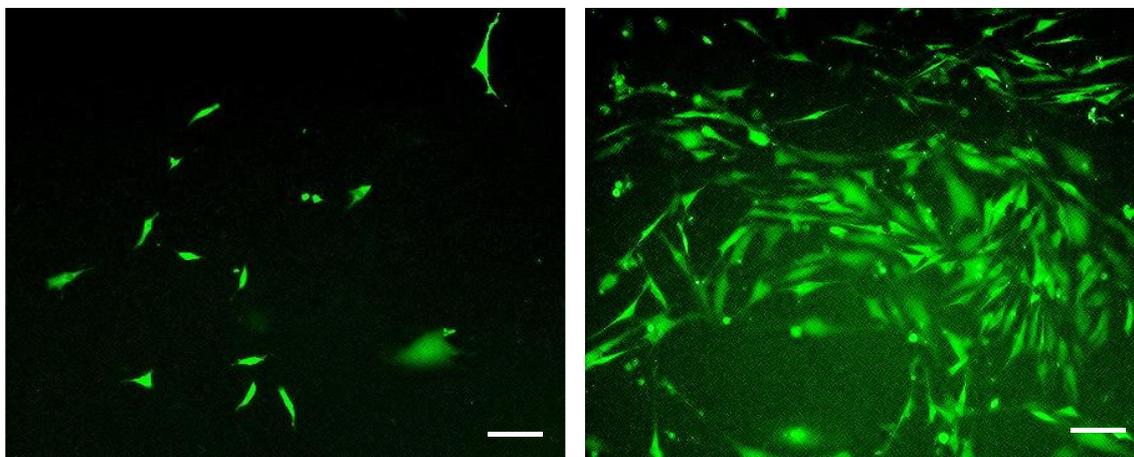


図 3. ΔCLR1 (左) および ΔIRF9 (右) の SKF-9 細胞
ΔCLR1 (左) はノックアウト試験開始 7 日後の蛍光細胞、ΔIRF9 (右) はノックアウト試験開始 27 日後の蛍光細胞を示す。スケールバー= 100 μm

引用文献

- Kawato, Y., Yamashita, H., Yuasa, K., Miwa, S., Nakajima, K., 2017. Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) for red sea bream iridovirus. *Aquaculture*. 473, 291-298.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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