

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360372

研究課題名(和文) 幹細胞工学によるトランスジェニック鳥類を用いたバイオ医薬品生産基盤の創製

研究課題名(英文) Development of avian stem cell technology for biopharmaceutical production

研究代表者

上平 正道 (KAMIHIRA, MASAMICHI)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40202022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリなどの家禽鳥類をバイオ医薬品生産のための生体バイオリクターとして使用することを目的に、新たな技術基盤として、幹細胞工学技術をトランスジェニック鳥類作製に利用するためにニワトリ多能性幹細胞の誘導技術の開発を試みた。そのために、(1)ニワトリ多能性幹細胞培養技術の開発、(2)ニワトリ胚細胞トランスクリプトーム解析によるニワトリ多能性幹細胞誘導因子の探索について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Transgenic chickens have been used for biopharmaceutical production as a living bioreactor. In the present study, to apply stem cell technology for transgenic chicken production, culture techniques and transcriptome analysis for chicken embryonic cells were examined to establish efficient generation and culture procedures for chicken pluripotent stem cells.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物・生体工学 バイオテクノロジー トランスジェニック鳥類 幹細胞 フィーダー細胞 ニワトリ iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬に代表されるモノクローナル抗体やエリスロポエチン(EPO)といった医薬品タンパク質は、遺伝子組換えされたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの細胞培養によって生産されているが、高い生産コストや対象の多様化にともなう生産能力の限界といった問題が指摘されるようになり、細胞培養にかわるバイオ医薬品生産のための実用的なプラットフォームの開発が望まれている。近年、バイオ医薬品生産のためのプラットフォームとして、トランスジェニック動植物による生体バイオリクターが注目されている(Dove, *Nat Biotechnol* 2002; 20, 777-779)。ヤギ・羊・ウシといった大型哺乳動物の乳汁中に生産させるシステムは技術的にほぼ確立されており、実用化に向けた努力が続けられている。哺乳類乳汁中での生産よりさらに安価に生産できるシステムとして、ニワトリの卵への生産が期待されているが、哺乳類と同等の技術レベルにはいたっていない。その理由として、ニワトリなどの鳥類では、卵殻中で胚発生が進行するため、哺乳類と同じ手法によるトランスジェニック作製が困難であること、目的遺伝子の効率的な導入発現システムを独自に構築する必要があることなどがある。申請者らは、胚への遺伝子導入に、ヒトの遺伝子治療に使われているものと同タイプのレトロウイルスベクター(MoMLV)を用い、VSV-Gを外皮タンパク質に利用し、超遠心により濃縮したウイルス溶液を胚へ微量注入することによって、100%の効率で導入遺伝子を体組織に有しており、さらに80%以上の頻度で導入遺伝子を子に伝播可能な方法を開発した(Mizuarai et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286, 456-463)。さらに、導入遺伝子発現を最大化するためにウイルス注入する胚発生段階の最適時期の決定を行い、ニワトリ胚では孵卵55時間目、ウズラ胚では孵卵48時間目が最適であることを見出した。実用タンパク質生産の例として、Fc融合型一本鎖抗体(scFv-Fc)の生産を試み、胚操作して誕生させた全てのニワトリにおいて、血清中でmg/mLオーダーでの高発現に成功した(Kamihira et al., *J Virol* 2005; 286, 456-463)。また卵中での高発現も見られ、卵白中で平均5.6 mg/mLでの生産(卵1個当たり約0.2g)が可能であり、導入遺伝子は子孫への伝播もみとめられた。申請者らが開発したトランスジェニック鳥類作製技術は、高発現・高頻度であり、はじめてニワトリが生体バイオリクターとして実用レベルに到達した。現在までに、実用を目指したトランスジェニック鳥類作製の報告は、我々の方法も含めて、ウイルスベクターを用いる方法に限られている。ニワトリES細胞の樹立も試みられているが、いまだに生殖系列に伝播可能なES細胞の報告はない(Zhu et al., *Nat Biotechnol* 2005; 23, 1159-1169; Horiuchi et al., *Methods Mol Biol* 2006; 329, 17-34)。また、培養した始原生殖細胞(Primordial germ cell; PGC)を使って生殖系列への伝播が可能なトランスジェニック鳥類作製が報告されている(van de Lavoie et al., *Nature* 2006; 441, 766-769)が、増殖速度が非常に遅く

扱いが困難であるため汎用性に欠くものとなっている。

## 2. 研究の目的

ウイルスベクターを使ったトランスジェニック鳥類作製は比較的簡便な方法であるが、大きな遺伝子の導入や特定染色体部位への遺伝子のノックアウト・ノックインなど自由な染色体操作を実現するためには、ES細胞のような培養可能な多能性幹細胞を手に入れることが家禽鳥類を扱う研究者の悲願となっている。本研究では、トランスジェニック鳥類作製のための新たな技術基盤を創製するために、生殖系列キメラが作製可能なニワトリ初期発生(胚盤葉期; Blastoderm)胚細胞に、iPS化に使われるリプログラミング因子の遺伝子を導入することで生殖系列に分化でき、培養により増殖可能な多能性幹細胞の取得を試みる。同時に大規模配列解析技術を使ったトランスクリプトーム解析により、胚盤葉期細胞などの多能性幹細胞の遺伝子発現パターンを解析し、これらの細胞で特徴的な遺伝子を同定する。この結果をもとに、ニワトリでのリプログラミングや生殖系列分化に関わる遺伝子の探索を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

## (1) ニワトリ iPS 細胞の誘導

ES細胞やiPS細胞の樹立や未分化維持培養においては、未分化状態を維持するための因子を供給することができるフィーダー細胞が必要となっている。マウスやヒト由来のES/iPS細胞では、マウス胚性繊維芽細胞(MEF)や株化されたSTO細胞やSTO細胞にLIF遺伝子を導入したSNL細胞がよく使われる。ニワトリにおいては、専用の細胞が存在しないため、これらの細胞が使われるが、未分化維持因子としては、ニワトリ由来の因子を用いる必要があるものと考えられる。マウスやヒトのES/iPS細胞で未分化維持に用いられる因子として、LIF, SCF, bFGFといったサイトカインが用いられている。これらのサイトカインのニワトリホモログを独自に遺伝子としてニワトリ組織より採取して、STO細胞やSNL細胞に導入して、これらの因子を発現する遺伝子組換えSTO/SNL細胞を作製する。未分化維持因子遺伝子を導入することで得られたこれらの細胞をフィーダー細胞として用いて、ニワトリ胚盤葉期細胞の培養を行い、一定期間培養したのちにアルカリホスファターゼ陽性細胞の割合を計測することによってフィーダー細胞の性能を定量的に評価する。遺伝子導入フィーダー細胞における導入遺伝子発現についても定量PCRなどを用いることによって評価する。ニワトリiPS細胞の誘導では、iPS細胞誘導に必要な山中因子の遺伝子のニワトリホモログを採取し、iPS誘導因子遺伝子を発現させるためのレトロウイルスベクター生産用プラスミドを作製し、レトロウイルスベクターを生産させる。このレトロウイルスベクターを用いてニワトリ胚性繊維芽細胞にiPS誘導因子の遺伝子導入を行い、遺伝子導入フィーダー細胞上で培養することによって、ニワトリiPS細胞の誘導

を行う。アルカリホスファターゼ染色によってリプログラミング効率を測定するとともに、継代培養を行うことでニワトリ iPS 細胞株の樹立を試みた。(2) ニワトリ胚細胞のトランスクリプトーム解析

放卵直後のニワトリ受精卵 (Line-M) からニワトリ胚盤葉細胞 (CBC) を取得した。ニワトリ胚性繊維芽細胞 (CEF) は、ニワトリ受精卵 (Line-M) を自動転卵装置付き孵卵器にて 10-11 日間培養した後、胚体組織を細かく裁断、酵素処理をして分散させてから遠心分離し培養したものを使用した。ニワトリ胚性幹細胞 (cES) ならびにニワトリエピプラスト幹細胞 (EpiSC) は、広島大学堀内教授よりご提供いただいたものを使用した (Alev C et al., *Methods Mol Biol*, 1074:151-173, (2013))。これらの細胞から RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出し、遺伝子発現解析に供した。マイクロアレイ解析では、マイクロアレイチップとしては、Chicken 遺伝子発現解析用マイクロアレイ (Gallus (chicken) オリゴ DNA マイクロアレイ 4x44K, Agilent technologies) を用い、シングルカラーで解析した。得られたデータは、解析用ソフトウェア (GeneSpring GX ver12.5, GeneSpring) を用いて行い、ノーマライゼーションならびに変動遺伝子リスト等を作成した。また、抽出した RNA サンプルを用いて、次世代シーケンサー (NGS) (HiSeq2000, Illumina) にて Paired-end 法でシーケンシングした。

#### 4. 研究成果

##### (1) ニワトリ iPS 細胞の誘導

幹細胞工学によるトランスジェニック鳥類作製技術を確立するために、ニワトリ iPS 細胞の樹立を試みることにした。生殖系列キメラが作製可能なニワトリ胚盤葉期胚細胞に、マウスで報告されている iPS 細胞の誘導に必要な遺伝子のニワトリホモログ遺伝子をウイルスベクターにより導入し、新たに開発したニワトリ LIF, SCF, bFGF などの未分化維持に必要なサイトカインを生産するフィーダー細胞上で培養することによって、iPS 細胞を誘導することとした。まず、多能性幹細胞の未分化維持培養に必要なフィーダー細胞の樹立を試みた。ニワトリ細胞のゲノムや mRNA から、ES/iPS 細胞の未分化維持に有効とされている LIF, bFGF, SCF のニワトリ cDNA を取得した。これらの遺伝子を発現ユニットとして有するレトロウイルスベクターによって STO 細胞に遺伝子導入し、クローニングによって導入した遺伝子を高発現する細胞株を樹立した。また、これらの遺伝子を複数発現する細胞株の樹立も行った。ニワトリ胚盤葉期胚細胞を使って、これらの細胞株の未分化維持能力を測定したところ、LIF と SCF を共発現する STO 細胞をフィーダー細胞として用い、LIF と bFGF を生産する STO 細胞の培養上清を培地に添加した場合が最も未分化維持能力が高いことがわかった。フィーダー細胞の作製と同時に、iPS 誘導因子遺伝子として報告がある、Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, L-Myc, Nanog, Nr5a2

のニワトリホモログをこれまでの報告やゲノム情報から同定し、これらの cDNA をニワトリ細胞ゲノムや mRNA から取得した。これらの遺伝子を発現ユニットとして有するレトロウイルスベクター生産用プラスミドを作製した。これらのウイルスベクターを用いて CEF に iPS 誘導因子の遺伝子導入を行い、上記のフィーダー細胞上で培養することによって iPS 細胞の誘導を行ったところ、培養 6 日目においてアルカリホスファターゼ陽性の細胞の出現を確認することができたが、長期培養においてフィーダー細胞の著しい劣化が観察されたため、アルカリホスファターゼ陽性細胞を継代培養することができなかった。このため、マウスやヒト ES/iPS 細胞培養で実績のある SNL 細胞を親細胞として、ニワトリ LIF, bFGF, SCF 遺伝子を導入したフィーダー細胞を作製した。新たに作製したフィーダー細胞では、長期培養でも維持できることがわかった。この細胞を用いてニワトリ胚盤葉期細胞を培養したところ、以前作製したものより未分化維持能力が若干劣るものの未分化培養が可能であった (図1)。フィーダー細胞の作製と同時に、ニワトリ胚性繊維芽細胞に iPS 誘導因子遺伝子を導入することによるニワトリ iPS 細胞誘導についても検討を行った。これまでに取得した Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, L-Myc, Nanog, Nr5a2 のニワトリホモログの遺伝子に、Glis1, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  も加えて検討したところ、アルカリホスファターゼ陽性細胞の出現を確認できた (図2)。今後、継代培養によるニワトリ iPS 細胞株樹立を行うこととしている。

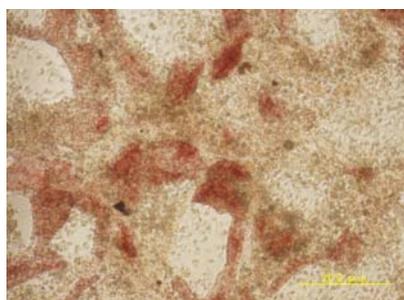


図1. ニワトリ胚盤葉細胞培養



図2. ニワトリ iPS 細胞誘導

##### (2) ニワトリ胚細胞のトランスクリプトーム解析

###### ① マイクロアレイを用いたグローバルな遺伝子発現プロファイル

ニワトリ万能細胞における網羅的遺伝子発現解析を行うために、CBC, cES および EpiSC より cRNA を作製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。この際、体細胞として CEF を対照細胞とした。

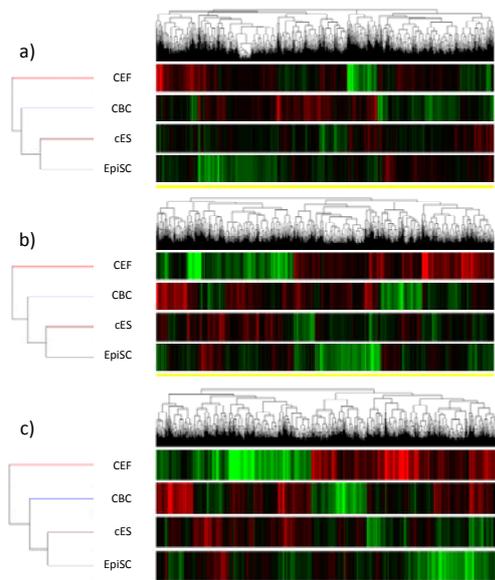


図3. 階層クラスタリング (グローバル)  
a) 2-fold, b) 5-fold, c) 10-fold

CEF と比較して、2 倍以上の発現上昇を示した遺伝子は、11,634 個(CBC)、10,835 個(cES)、14,486 個(EpiSC)、0.5 倍以下発現遺伝子は、9,631 個(CBC)、7,835 個(cES)、6,812 個(EpiSC)あった。また、cES、EpiSC 条件と比較した場合では、CBC で 2 倍以上の発現変動遺伝子がそれぞれ、8,616、9,514 個の遺伝子であった。取得した遺伝子データから階層的クラスタリングによるヒートマップを作成したところ、cES と EpiSC の階層は近く、CEF と最も離れていることが分かった。CBC は cES と EpiSC とは階層的に異なっていた(図3)。

体細胞と比較して、万能細胞で発現差のあった遺伝子群で、パスウェイ解析を行った。細胞運命を調節するシグナル伝達経路として、多能性維持の機構に関与する Wnt シグナル、発生過程や幹細胞における細胞運命決定を調節する Notch シグナル、ならびに、多能性幹細胞から内胚葉系(肝臓、腎臓)への分化促進として知られている Hedgehog シグナル経路において、体細胞に対して 2 倍、5 倍、10 倍条件での変動割合をもつ遺伝子を同定することができた(表1)。

表1. パスウェイ解析

Pathway name	Pathway No.	2-fold (genes)	5-fold (genes)	10-fold (genes)
Wnt Signaling Pathway and Pluripotency	WP779	67	36	15
Delta-Notch Signaling Pathway	WP827	77	35	11
Hedgehog Signaling Pathway	WP790	35	18	12

## ②次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析

ニワトリ胚盤葉細胞(CBC)からRNAを抽出後、NGSを用いてトランスクリプトーム解析した。その結果、取得リードは、全塩基数460億以上、リード数4.6億以上であった。CBCにおける転写産物の量をマッピングデータから推定し、発現量の解析を行ったところ、のべ38,520個の遺伝子発現の同定、定量化ならびに配列決定に成功した。解析した

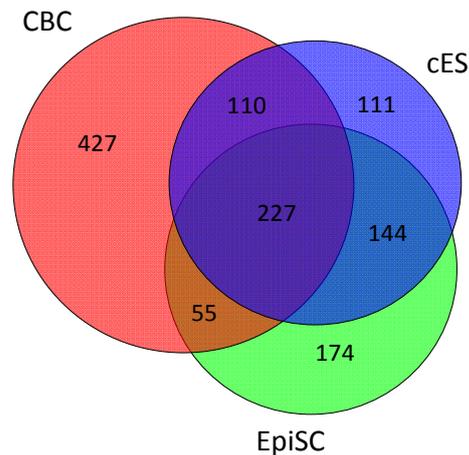


図4. 万能細胞間の発現変動遺伝子数

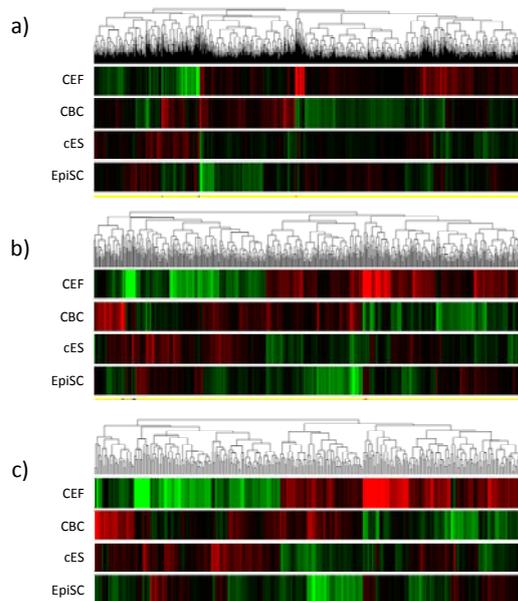


図5. 階層クラスタリング (選抜遺伝子)  
a) 2-fold, b) 5-fold, c) 10-fold

mRNAは、ニワトリSPFのLine-M系統のものをサンプルとして使用している。ニワトリゲノムバンクからマッピングしたところ、個々の遺伝子を、複数のSNPsを有する配列として決定することができた。

## ③mRNA-seqデータからのニワトリ転写因子の選抜と解析

得られたNGSデータから、ニワトリ転写因子を同定するために、ヒトタンパク質発現リソース(HuPEX)を活用した。HuPEXに含まれるヒト転写因子を基に解析したところ、様々なバリエーションを含んだ、のべ2,949個のニワトリホモログ転写因子遺伝子を抽出することができた。NGSからトランスクリプトーム解析で得られた転写因子遺伝子のうち、アレイ中にプローブを有した2,643個の遺伝子にフォーカスを当てて、体細胞ならびに万能細胞における発現プロファイルを解析した。体細胞と比較したところ、用意した万能細胞三種において、それぞれ819個(CBC)、592個(cES)、600個(EpiSC)の

転写因子遺伝子が2倍以上の遺伝子発現量を示した(図4)。また、階層的クラスタリングによるヒートマップ解析では、万能細胞間で明確な発現パターンの差異がみられており、発現変動遺伝子5倍および10倍以上では顕著であった(図5)。変動遺伝子をリストアップし、共通の遺伝子をベン図で絞りこみを行ったところ、227個の遺伝子が発現上昇していた(図4)。この領域には、転写因子遺伝子は、万能細胞の樹立や誘導、未分化維持培養に関与する可能性があると考えられる。実際に、これらの中には、ニワトリでの多能性遺伝子マーカーとして知られているPOUVやNanogが含まれていた。また、iPS化における山中初期化遺伝子以外のファミリー遺伝子が存在していることが分かった。

万能細胞間での比較解析では、CBCでは、605個(cES)、765個(EpiSC)の遺伝子が対照細胞と比較して2倍以上の変動遺伝子であることがわかった。CBCは子孫へ形質を伝播可能な万能細胞であることから、変動遺伝子はニワトリ多能性幹細胞をより初期化させるうえで重要な遺伝子を含んでいると考えられる。現在ニワトリ初期化に係る転写因子遺伝子の解析を詳細に行っている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yoshinori Kawabe, Yuuki Hayashida, Kensaku Numata, Shota Harada, Yoshifumi Hayashida, Akira Ito, Masamichi Kamihira, Oral immunotherapy for pollen allergy using T-cell epitope-containing egg white derived from genetically manipulated chickens, PLoS ONE、査読有、Vol. 7, 2012, e48512 DOI: 10.1371/journal.pone.0048512

[学会発表] (計10件)

- ① 河邊 佳典, 小畑 玲奈, 矢野 敬二郎, 松田 直樹, 山田 紀子, 井藤 彰, 上平 正道, 卵管特異的にTGF- $\beta$ を発現する遺伝子導入ニワトリの作製、化学工学会第79年会、2014年03月19日、岐阜大学柳戸キャンパス
- ② 藤原 昇, 井藤 彰, 河邊 佳典, 上平 正道, 遺伝子導入フィーダーを用いた多能性幹細胞の未分化維持培養システムの開発、第65回日本生物工学会大会、2013年09月19日、広島国際会議場
- ③ 福丸 詩帆, 原田 翔太, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道, 鳥類多能性幹細胞樹立のための遺伝子改変フィーダーの作製、化学工学会第45回秋季大会、2013年09月17日、岡山大学
- ④ 矢野 敬二郎, 黒原 健志, 原田 翔太, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道, 遺伝子導

入ニワトリにおける卵管特異的導入遺伝子発現、第50回化学関連支部合同九州大会、2013年07月06日、北九州国際会議場

- ⑤ 河邊 佳典, 田中 慶彦, 松田 直樹, 野村 拓, 井藤 彰, 上平 正道, ニワトリ多能性幹細胞培養のための培養環境の構築、化学工学会第44回秋季大会、2012年09月19日、東北大学川内キャンパス
- ⑥ 河邊 佳典, 林田 悠希, 原田 翔太, 井藤 彰, 上平 正道, 遺伝子導入ニワトリが生産したエピトープペプチド含有卵白によるスギ花粉治療、化学工学会第77年会、2012年3月15日、工学院大学
- ⑦ 林田 悠希, 原田 翔太, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道, スギ花粉アレルギーT細胞エピトープ含有卵白の経口投与による花粉症治療に関する研究、第18回日本生物工学会九州支部福岡大会、2011年12月10日、九州大学伊都キャンパス
- ⑧ 原田 翔太, 林田 悠希, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道, エピトープペプチド含有卵白の経口投与によるスギ花粉症治療への応用、第63回日本生物工学会大会、2011年9月26日、東京農工大学小金井キャンパス
- ⑨ 河邊 佳典, 林田 悠希, 原田 翔太, 井藤 彰, 上平 正道, 遺伝子導入ニワトリ由来エピトープペプチド含有卵を用いたスギ花粉症治療の評価、日本動物細胞工学会2011大会、2011年7月22日、東京大学本郷キャンパス
- ⑩ 原田 翔太, 林田 悠希, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道, 遺伝子導入ニワトリによるスギ花粉症治療薬含有卵白の生産、第48回化学関連支部合同九州大会、2011年7月9日、北九州国際会議場

[図書] (計1件)

- ① Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Springer、Production of Antibody by Transgenic Avians (Chapter 6, pp. 121-141)、Antibody Expression and Production (Cell Engineering, Vol. 7)、2011

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上平 正道 (KAMIHIRA, Masamichi)  
九州大学・工学研究院・教授  
研究者番号：40202022

### (2) 連携研究者

河邊 佳典 (KAWABE, Yoshinori)  
九州大学・工学研究院・助教  
研究者番号：30448401