

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23656523

研究課題名（和文）

糖鎖改変ニワトリによる新規インフルエンザワクチン生産法の開発

研究課題名（英文）

Production of influenza vaccine using genetically manipulated chickens

研究代表者

西島 謙一 (NISHIJIMA KENICHI)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10262891

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザワクチン生産時にウイルスを増殖させる発育鶏卵の漿尿膜はヒトウイルス増殖に適さず、トランスジェニックニワトリ作製技術を応用して糖鎖を改変することでワクチン生産を効率化できる可能性があり、そのための基礎的検討を行った。まず、eGFP発現トランスジェニックニワトリの受精卵を用い、アクチンプロモーターを用いれば外来遺伝子を漿尿膜で効率よく発現できることを確認した。また、ヒトウイルスの感染に重要とされる α 2,6 シアル酸を付加するシアル酸転移酵素及び効果の高いワクチンとなることが期待できる α -ガラクトース転移酵素遺伝子を発現するレトロウイルスベクターのパッケージング細胞を樹立した。これらは、漿尿膜の糖鎖改変ニワトリ作製へ向けた有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Vaccine against influenza virus is currently produced in developing chicken eggs. Allantoic membrane, the site for virus propagation for vaccine, does not express α 2,6-linked sialic acid on cell surface, resulting poor infection/growth of human influenza virus. Therefore, chicken eggs with α 2,6-linked sialic acid on allantoic membrane might be useful tool for vaccine production. To genetically modify chickens to express α 2,6-linked sialic acid, the sialyltransferase gene was cloned and its enzymatic activity was confirmed. We also confirmed that ubiquitous actin promoter effectively expressed eGFP and single-chained antibody in allantoic membrane. The sialyltransferase gene was inserted into the downstream of actin promoter of retrovirus vector construct. The packaging cell lines that produce high titer of retrovirus vector were successfully established. These are helpful to make transgenic chickens that express modified glycans on allantoic membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細胞工学

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：生物機能工学、感染症、糖鎖、トランスジェニックニワトリ、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザワクチンは培養動物細胞を用いた新たな生産法も開発されつつある

が、当面は発育鶏卵を用いた生産が主流である。インフルエンザワクチン生産の際ウイルスが増殖する漿尿膜細胞は、本来ヒトウイル

スを増やすことが出来ない。そこでこれまで
は鶏卵で長期間植え継ぎ、卵での増殖に適
した変異型ウイルスを用いてきた。しかし、
変異を制御することは不可能である上、
新型インフルエンザの場合のように、
ウイルスの増殖が鶏卵で難しい場合
ワクチンの生産量が確保できない。

近年の報告では従来の認識と一致しない
ケースも報告されており、詳細はさらに
検討される必要があるが、現在ヒトの
インフルエンザウイルスが漿尿膜で増殖
しない原因として有力なのは糖鎖の違
いである。ヒトウイルス感染の一番最
初のステップでは宿主細胞表面の $\alpha 2,6$
結合型シアル酸にウイルスが結合する
ことが必要である。しかし、ニワトリ
漿尿膜細胞は $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸
を持たないため、本来ヒトウイルスの
増殖に適さない。そこで、漿尿膜に
 $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸を持つ鶏卵を
作製できれば、ヒトインフルエンザ
ワクチンの生産に有用なツールとなる
可能性がある。

漿尿膜に $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸を持つ
ニワトリ亜種を探索する試みは成功して
おらず、またトランスジェニック技術
を直接応用して $\alpha 2,6$ 結合型シアル
酸を漿尿膜に発現するニワトリ卵を
生産する試みについても研究代表者
の知る限り他にない。

2. 研究の目的

トランスジェニックなどの発生物学的
技術が早くから発達した哺乳類に比べ、
大きな卵黄の存在が顕微鏡観察を妨げ
となることなどから鳥類の遺伝子導
入技術の開発は遅れていた。現在でも
難易度が高く、実際にトランスジェ
ニックニワトリを作製できる研究グ
ループの数も限られている。我々は、
高度に濃縮したレトロウイルスベク
ターを発生初期の胚に注入すること
によって効率よくトランスジェニック
ニワトリを作成可能であることを見
出し、これまでに一本鎖抗体/Fc
融合タンパク質、二本鎖抗体や、
TNFR/Fc、エリスロポエチンなどの
医薬品タンパク質を卵中に生産する
ニワトリや、eGFP を発現するグ
リーンチキンの作製に成功している。
また、卵白に生産させた組換えタン
パク質の糖鎖付加が不完全であるとい
う問題点を明らかとし、ガラクト
ース転移酵素遺伝子の導入により、
部分的にはあるが糖鎖付加パターン
を改善可能であることを報告してい
る。

本申請では、最終的にヒトインフル
エンザワクチン生産に適した発育鶏
卵の作製を目指して、ワクチンを生
産する漿尿膜細胞の糖鎖を改変した
トランスジェニックニワトリの作製
を目指した。 $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸
附加型ニワトリが作製できれば、
これまでの“擬似ヒト型”ではない
真の意味でのヒトウイルスの使用を
初めて可能にする。具体的効果と

して以下の二点を挙げる。

①野生型ヒトウイルス等使用できる
ウイルスレパトリーの拡大

例えば新型インフルエンザウイルス
のように H1N1 型のウイルスは本来
ニワトリに感染しない型であるため
そのままでは鶏卵での増殖が非常
に悪い。

②ウイルス変異、特にシアル酸を認
識する HA タンパク質の変異の抑制

現在日本で使われているインフル
エンザワクチンの主成分は HA タン
パク質であるが、現状では本来の結
合様式と異なる $\alpha 2,3$ 結合型シ
アル酸の存在下増殖させるため変異
が入りやすい。

3. 研究の方法

発生 0-2 日目の胚にレンチウイルス
ベクターを感染させ、トランスジェ
ニックニワトリを作製することを目
指す。導入する遺伝子として、ニ
ワトリの $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸転
移酵素遺伝子及びマウス $\alpha 1,3$ ガ
ラクトース転移酵素遺伝子を選択
した。

まずこれらの遺伝子の活性を確認
した。シアル酸転移酵素活性は、昆
虫細胞により組換えタンパク質を生
産・精製し、in vitro アッセイに
より確認した。 $\alpha 1,3$ ガラクト
ース転移酵素は、マウスより遺伝
子をクローニングし、酵素を持た
ないヒト 293 細胞株に発現させた
後、細胞表面を $\alpha 1,3$ ガラクト
ース特異的レクチン BS-IB4 に
より染色することにより活性を確
認した。

次に、漿尿膜細胞で発現させるた
めのプロモーターを選定し、高濃
度のレトロウイルスベクターを生
産するパッケージング細胞を樹立
した。これらを胚に注入することで、
糖鎖改変トランスジェニックニワ
トリの作製が期待できる。

4. 研究成果

4-1. ニワトリシアル酸転移酵素の活性確認

ニワトリは漿尿膜や気管では $\alpha 2,6$
結合型シアル酸を持たないが、肝
臓など他の臓器では $\alpha 2,6$ シアル
酸転移酵素が発現している。そ
こで、まずニワトリ $\alpha 2,6$ シアル
酸転移酵素遺伝子を PCR によりク
ローニングし、活性確認を試みた。
酵素タンパク質から膜貫通部位を
除いた活性部位のみを昆虫細胞
Tn5 に分泌生産させた。蛍光基質
を用いた in vitro アッセイに
より、クローニングしたシアル酸
転移酵素が期待通り $\alpha 2,6$ 結
合型シアル酸を付加する活性を持
つことが確認できた (図 1)。

4-2. 漿尿膜における遺伝子発現系の構築

ワクチン生産の際にウイルスを増
殖させる漿尿膜において、外来遺
伝子を発現させる

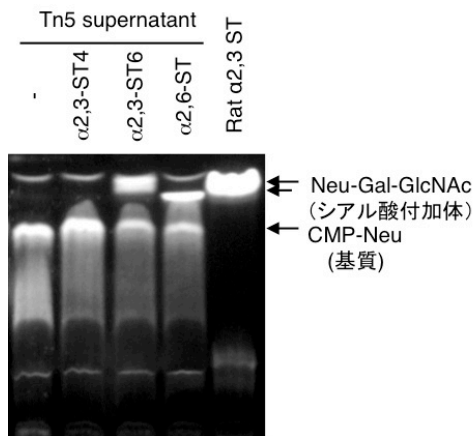


図 1. ニワトリシアル酸転移酵素の活性確認

上でアクチンプロモーターが使用可能であるかを検討した。アクチンプロモーター制御下で eGFP を発現するトランスジェニックニワトリの受精卵を 10 日間発生させ、eGFP の発現を蛍光顕微鏡で確認した。その結果、漿尿膜が光っていることが観察された(図 2)。

次に、組換えタンパク質によるサブユニットワクチンの生産を想定し、モデルタンパク質として抗プリオン一本鎖抗体/Fc 融合タンパク質(scFvFc)をアクチンプロモーターにより発現するトランスジェニックニワトリの卵を用いた確認を行った。受精卵を 12 日間孵卵し、漿尿液中に蓄積した scFvFc をウエスタンブロット法により検出した。その結果、既に蓄積が確認されている血中と同じ分子量に、scFvFc が検出された(図 3)。これらのことより、アクチンプロモーターを用いて外来遺伝子を漿尿膜で効率よく発現できることが示唆された。今後、糖転移酵素の発現により、scFvFc の糖鎖を変換可能であることを確認してゆく。

実際にトランスジェニックニワトリを製作するには、高濃度のレトロウイルスベクターが必要である。そこで、レトロウイルスベクターを生産するパッケージング細胞の樹立を行った。GP293 細胞に力価測定済みのウイルス溶液を MOI (multiplicity of infection, 多重感染度)が 100 となるように加え、感染させた GP293 細胞を限界希釈法によりクローニングした。各クローンのウイルス生産性を検討し、高いタイターのウイルスを生産する株を選択した。パッケージング細胞の樹立と濃縮を 2 回繰り返すことで、力価を 60 倍以上高めることができた。

4-3. マウス α ガラクトース転移酵素遺伝子のクローニング及び活性確認

新たなワクチンとして、免疫系を強く刺激

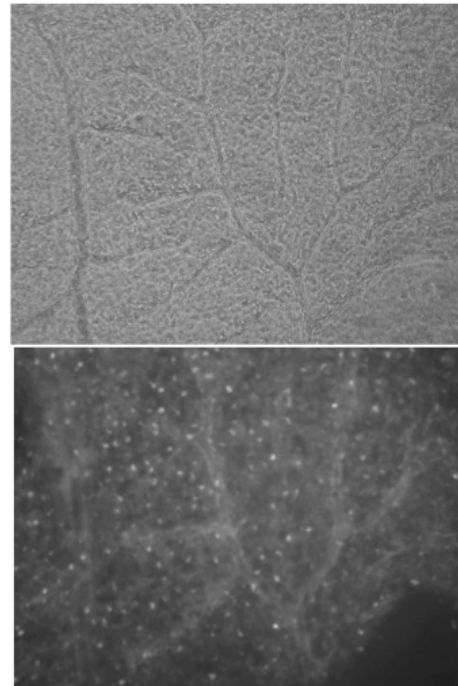


図 2. ニワトリ胚漿尿膜におけるアクチンプロモーターの活性確認
上：明視野； 下：eGFP 蛍光観察。

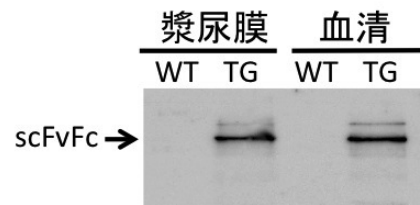


図 3. 漿尿液中の一本鎖抗体の検出
一本鎖抗体(scFvFc)をウエスタンブロットにより検出した。

するためにアジュバントを人為的に加えることでワクチン活性を高めることが欧米を中心に進められている。一方、ワクチン生産源であるニワトリ卵を改変し、卵そのものにアジュバント活性を持たせることも考えられている。この場合、使用する鶏卵を変更するだけで、現在使用している設備・手法をそのまま用いて、長期間持続する優れた予防効果を持ったワクチンを直接生産できる。

ワクチン効果の持続性を高めるために、シアル酸同様に漿尿膜の糖鎖を改変し、ワクチンタンパク質に α ガラクトース糖鎖を附加させる可能性を検討予定である。 α ガラクトース糖鎖を付加することでウイルスタンパクそのものにアジュバント様の効果が期待できる。ニワトリは α ガラクトース転位酵素を持たないため、マウスから $\alpha 1,3$ -ガラクト

シルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングした。マウス α ガラクトース転位酵素遺伝子は9個のエキソンからなり、アルタナティブスプライシングが起こることが知られている。全長のアイソフォーム1及びエキソン5及び6を欠きアイソフォーム1より102bp(34アミノ酸)短いアイソフォーム4の2種をマウス脾臓細胞cDNAよりクローニングし、発現ベクターに組み込んだ。細胞表面に α ガラクトースを持たないヒト293細胞に遺伝子導入し、 α ガラクトース特異的レクチンを用いた蛍光染色により細胞表面の α ガラクトースを検出した。その結果、アイソフォーム1、4いずれも、 α ガラクトース転移酵素活性を有することが確認できた(図4)。

シアル酸転移酵素遺伝子と同様にパッケージング細胞の樹立を試みたところ、ウイルス高生産細胞の樹立に成功した。これらは、漿尿膜の糖鎖改変ニワトリ作製へ向けた有用なツールとなることが期待される。

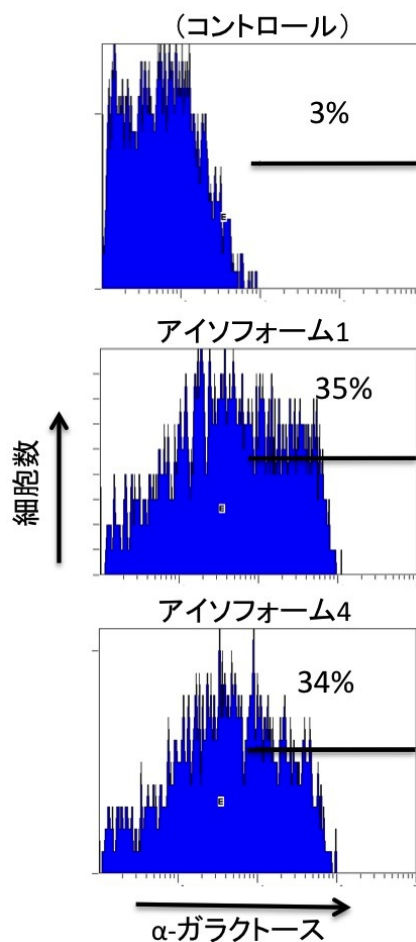


図 4. α ガラクトース転移酵素の活性確認
レクチンによる蛍光染色の結果.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ken-ichi Nishijima and Shinji Iijima, "Transgenic chickens", Development, Growth & Differentiation 55, 207-216 (2013). 査読あり

2. 西島謙一 "ニワトリ卵白に生産させた医薬用タンパク質の糖鎖制御" バイオサイエンスとインダストリー 69(5), 371-374 (2011). 査読無し

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西島 謙一 (NISHIJIMA, KEN-ICHI)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 10262891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小野 悦郎 (ONO, ETSURO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 00160903