

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292151

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集によるPRRS抵抗性ブタの開発

研究課題名(英文) Generation of PRRS-resistant pigs using CRISPR/Cas9 system

研究代表者

小野 悦郎 (Ono, Etsuro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00160903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)の新たな制圧方法として、PRRS抵抗性ブタの開発を目的に、CRISPR/Cas9システムを利用して、PRRSウイルスのレセプター分子であるCD163及びSiglec1遺伝子をゲノム編集した。家畜ブタの受精卵を用いたゲノム編集では、1頭の産仔でSiglec1遺伝子に1個のアデニンのinsertionが確認されたが、ゲノム編集はモザイク状態であることが示唆された。マイクロミニブタ由来の線維芽細胞において、CD163遺伝子の1塩基deletion或いは1塩基insertionされたゲノム編集細胞を樹立し、未受精卵との細胞融合による体細胞クローン胚を作製した。

研究成果の概要(英文)：Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is the most economically important disease of swine worldwide. Vaccines have been unable to control the disease. It has been suggested that CD163 and/or Siglec 1 are the receptors for entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) into cells. Thus, we hypothesized that pigs with defective CD163 and/or Siglec 1 would be resistant to PRRSV. Here, we have tried to generate PRRS-resistant pigs using CRISPR/Cas9 system by introducing mutations in the CD163 and Siglec 1 genes to secrete a soluble form of each molecule. Total 11 piglets were born from foster pigs transferred zygotes injected with each sgRNA and Cas9 and an adenine insertion was detected in the Siglec 1 gene in one of them. Unfortunately, the piglet exhibited a mosaic genotype. In addition, somatic cell nuclear transfer was performed using porcine fibroblasts possessing the CD163 gene edited by CRISPR/Cas9 system.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：豚繁殖・呼吸障害症候群 ゲノム編集 抗病性動物 PRRS

1. 研究開始当初の背景

豚繁殖・呼吸障害症候群 (porcine reproductive and respiratory syndrome: 以下 PRRS) は現在、世界的規模で養豚産業に莫大な経済的損失を引き起こしている。PRRS は、妊娠豚の死産や虚弱子分娩等の繁殖障害と育成豚の呼吸障害を主徴とする疾病であり、米国では年間約 600 億円、我が国においても約 300 億円の経済的損失があると言われている (山根ら、2009)。PRRS は、1980 年代後半に西ヨーロッパと北アメリカで粗同時に見つけられた非常に伝染性の強いウイルス性疾患である。我が国においては、1990 年前後に関東の養豚場にて PRRS と思われる症例が認められ、以後全国の養豚場に PRRS ウイルスの感染が認められるようになった。本ウイルスは遺伝的多様性が非常に大きいことが知られており、ワクチン開発の障害となっている。

従って、現在の本疾病の対策は、母豚への免疫付与・安定化、オールイン・オールアウト等による感染環の遮断、農場外からのウイルス株の侵入防止、他の呼吸器病原体への対策による混合感染による病態の悪化防止といった総合的な飼養衛生管理に留まっている。以上のように、本疾病は、世界的に見ても、獣医畜産業界において解決しなければならない緊急最重要課題の一つである。しかし、PRRS ウイルスは、一本鎖、非分節の RNA ウイルスであり、激しく遺伝的変異を起こすため、申請者は、本疾病はワクチンによる制圧が困難な感染症であると考えている。従来、弱毒生ワクチンが市販されているものの、ワクチンが免疫個体から非免疫個体に水平伝播した例や病原性の復帰が疑われた例などが報告されている。また、ワクチン接種によって免疫個体の臨床的 PRRS 症状は有効に抑制されたものの、その個体におけるウイルス複製は抑制されなかったことが報告されており (奥田ら、2009)、感染防御可能な有効なワクチンは未だ開発されていない。従ってワクチンは、病態の軽減を目的として使用されているだけで、感染防御能を付与できない。

このような状況下、米国では、ワクチンに因らない PRRS の制圧を目的に、ブタ遺伝子の量的形質遺伝子座 (QTL) 解析に 5 億円以上もの研究費を投入し、これまでに PRRS ウイルス易感染性遺伝子マーカーの同定に成功した。この研究成果をもとにブタの選抜・育種を開始するものと思われるが、これまで行われたインフルエンザ耐性遺伝子 (Mx) 等に基づく育種による感染抵抗性動物の開発が成功していないことから、今後系統化される品種についても感染防御能を付与できるかどうか不透明であると考えられる。

一方、遺伝子改変技術による抗病性動物の開発は、ワクチンプログラムでは動物に感染

防御が成立しないウイルス感染症に対して有効な手段であると考えられている (Whitelaw and Sang, 2005)。多くの抗原性の異なるウイルス株が存在する口蹄疫、抗原変異が激しい鳥インフルエンザや PRRS 等がその対象である。しかしながら、植物に比べ遥かに高等な生物である動物では、宿主-病原体相互作用が複雑で、抗病性の付与は容易ではなく、世界的にこの分野の研究は、あまり進展していない。また、ブタの遺伝子改変は、ES 細胞が樹立されていないこともあり、ブタ由来の線維芽細胞等の体細胞において相同遺伝子組換えを行い、その細胞核を未受精卵に移植する“体細胞クローン技術”が利用されてきた。この方法は、手技が煩雑で熟練と時間を要するため、遺伝子改変ブタの作製において最大の問題であった。しかし、近年、ZFN や TALEN 等のゲノム編集技術が急展開し、ES 細胞が樹立されていないマウス以外の動物でも遺伝子改変が容易になってきた。さらに、2013 年に入って直ぐに、新たなゲノム編集技術として

“CRISPR/Cas9 システム”が発表された。このような背景のもと、2013 年 4 月には、英国のロスリン研究所において、Whitelaw 博士らが、アフリカ豚コレラ抵抗性ブタの開発を目的に世界で初めてアデノウイルスベクターを用いたゲノム編集により、“Pig 26”と呼ばれる遺伝子改変ブタを開発したことが報道発表された。CRISPR/Cas9 システム等によるゲノム編集では、従来の遺伝子組換え技術とは異なり、外来遺伝子の導入がない動物を作出することができるため、食品としての安全性は、これまで以上に担保されると考えられる。

以上のような最新の研究動向から、申請者は CRISPR/Cas9 システムによるブタのゲノム編集が可能であると考え、申請者がこれまでに報告したオーエスキー病抵抗性動物の開発で用いた可溶性ウイルスレセプターの発現により抗病性を付与する戦略 (PNAS, 2004) を PRRS に応用する着想に至った。PRRS ウイルスの第一次増殖は局所のマクロファージで起こり、そこからリンパ性臓器や肺に急速に広がる。従って、局所マクロファージへの感染を阻止することで、理論的には感染防御が成立すると考えられる。そこで、申請者は、PRRS ウイルスのレセプター分子として報告されている CD163 及び Siglec1 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを利用してゲノム編集し、レセプターとして機能する膜蛋白としての CD163 及び Siglec1 の発現を完全に阻害し、PRRS ウイルスに結合し中和する可溶性 CD163 及び Siglec1 分子を発現させることで、ブタに PRRS ウイルス感染抵抗性を付与できると考えた。

2. 研究の目的

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は、口蹄疫、高病原性鳥インフルエンザ等と同様に多様な抗原性を示すウイルスによる感染症であり、

ワクチンプログラムで本病を制御することは極めて困難である。そのような感染症の新たな制圧方法として、遺伝子改変技術による抗病性動物の開発が提唱されて久しいが、未だ家畜での成功例は報告されていない。本研究課題では、PRRS抵抗性ブタの開発を目的に、次世代遺伝子改変技術である CRISPR/Cas9 システムを利用して、PRRSウイルスのレセプター分子であるCD163及びSiglec1遺伝子をゲノム編集し、PRRSウイルス感染抵抗性ブタを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 切断標的 DNA 配列の決定

切断標的DNAとなるブタのCD163遺伝子及びSiglec1遺伝子のトランスメンブラン領域DNA配列の上流約0.2KbをPCRで増幅し、標的DNAの切断をin vitroで確認するためのDSB-HDR アッセイ (Assay for DSB mediated HDR by EGFP reconstitution) 用レポータープラスミドpCAG-EGxxFPに挿入し、標的DNAが切断されると蛍光蛋白を発現するようになるDSB-HDR アッセイ用レポータープラスミドpCAG-EGxxFP-CD163及びSiglec1を構築した。

CD163遺伝子及びSiglec1遺伝子のトランスメンブラン領域DNA配列の上流約0.2Kb塩基配列から切断標的となる配列を複数決定し、CRISPR/Cas9ベクターであるpX330に20mer切断標的オリゴヌクレオチドを挿入し、標的DNA切断プラスミドを各4種類構築した。

pCAG-EGxxFP-CD163或いはSiglec1と各々の標的DNA切断プラスミドをCos-1細胞にコトランスフェクションし、48時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを確認することでDSB-HDR アッセイ用レポータープラスミド中の標的DNA配列に欠失変異が導入されたことを確認し、蛍光の強さから切断効率が最良の標的配列を決定した。

(2) 家畜ブタの受精卵を用いたゲノム編集の確認

家畜ブタの卵巣から未受精卵を取り出し、培養することで成熟させた後、体外受精により受精卵を得た。受精卵の前核にpX330-CD163及びpX330-Siglec1を常法に従いマイクロインジェクションし、胚盤胞まで培養した。各胚盤胞からDNAを抽出し、標的DNAをPCRで増幅した時と同じプライマーペアでPCRにて増幅し、塩基配列を決定し遺伝子欠失変異を確認した。

(3) 家畜ブタの受精卵のゲノム編集

排卵誘発した雌家畜ブタに人工授精し、受精卵を回収した。受精卵の前核にpX330-CD163及びpX330-Siglec1あるいは、化学合成crRNA、tracrRNA及びCas9蛋白を、細胞質にsgRNAとCas9 mRNAあるいは、sgRNAと核移行シグナル

を付与されたCas9蛋白を常法に従いマイクロインジェクションし、受精卵を仮親として使用する家畜ブタの卵管に夫々移植した。

得られた産仔から皮膚を採取し、DNAを抽出後、標的DNAの欠失変異導入部位の前後について、塩基配列を決定し、欠失変異遺伝子型の確認を行った。

(4) マイクロミニピッグ由来初代線維芽細胞におけるゲノム編集

DSB-HDR アッセイにおいて、切断効率が良かった各20mer切断標的オリゴヌクレオチドを、puromycine耐性遺伝子を含むCRISPR/Cas9ベクターであるpX459に挿入し、マイクロミニピッグ由来初代線維芽細胞のゲノム編集用プラスミドを構築し、pX459/CD163及びpX459/Siglec1とした。

これらプラスミドをマイクロミニピッグ由来初代線維芽細胞にトランスフェクションし、5ug/mlのpuromycineを含む培地で96時間培養し、puromycine抵抗性細胞を選択し、その後、通常の培地で培養した。樹立した細胞株からDNAを抽出し、標的DNAの欠失変異導入部位の前後について、塩基配列を決定し、欠失変異遺伝子型の確認を行った。

(5) マイクロミニピッグ由来間葉系幹細胞におけるゲノム編集

未分化な細胞でゲノム編集を実施するため、マイクロミニピッグ由来間葉系幹細胞を樹立した。マイクロミニピッグの骨髓液を採取し、骨髓間葉系幹細胞分離デバイス(カネカ)を用いて、間葉系幹細胞を分離した。これをプラスチック培養ディッシュに播種して線維芽細胞様紡錘形を呈する細胞のコロニーを形成させることで間葉系幹細胞を単離した。これら樹立した間葉系幹細胞を使用して、初代線維芽細胞と同様にゲノム編集を行った。

(6) CD163ゲノム編集マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の作製

家畜ブタの卵巣から未受精卵を取り出し、TCM199培地で培養することで成熟させ、デメコルシン処理後、除核した卵子とCD163ゲノム編集MMP線維芽細胞を電氣的に細胞融合させ体細胞クローン胚を作製し、仮親ブタに移植した。

4. 研究成果

(1) 切断標的 DNA 配列の決定

切断標的DNAとなるブタのCD163遺伝子及びSiglec1遺伝子のトランスメンブラン領域DNA配列の上流約0.2KbをPCRで増幅し、DSB-HDRアッセイ用レポータープラスミド pCAG-EGxxFP-CD163及びSiglec1を構築した。

標的DNAの塩基配列から切断標的となる配列を4箇所決定し、CRISPR/Cas9ベクターであるpX330に20mer切断標的オリゴヌクレオチドを挿入し、sgRNAおよびCas9蛋白質を発現す

るpX330/CD163及びSiglec1 #1~#4を構築した。

pCAG-EGxxFP-CD163或いはSiglec1と各々の標的DNA切断プラスミドをCos-1細胞にコトランスフェクションし、48 時間後に蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを確認した。使用した全ての標的DNA切断プラスミドは、標的配列を切断した。切断効率の高かったpX330/CD163及びSiglec1を受精卵のインジェクションに使用することにした。

(2) 家畜ブタの受精卵を用いたゲノム編集の確認

家畜ブタの卵巣由来体外受精卵の前核にpX330-CD163 及び pX330-Siglec1 を常法に従いマイクロインジェクションし、胚盤胞まで培養した。合計 80 個の胚盤胞から DNA を抽出し、各標的 DNA を PCR で増幅した時と同じプライマーペアで PCR にて増幅し、塩基配列を決定したが、ゲノム編集による遺伝子の欠失等は確認できなかった。

(3) 家畜ブタの受精卵のゲノム編集

CD163 及び Siglec1 に対するゲノム編集用プラスミドの家畜ブタ受精卵前核へのインジェクションによるゲノム編集操作を3回実施した。1 回目は、39 個の胚を1頭の仮親ブタに移植し、6 頭の産仔を得た。得られた産仔から皮膚を採取し、DNA を抽出し、標的 DNA の欠失変異導入部位の前後について、塩基配列を決定したが、ゲノム編集による遺伝子の欠失等は確認できなかった。2 回目は 10 個の胚を1頭の仮親ブタに移植し、白子1頭を得たが、ゲノム編集による遺伝子の欠失等は確認できなかった。3 回目は、9 個の胚を1頭の仮親ブタに移植したが着床しなかった。

ゲノム編集用合成 crRNA+tracrRNA+Cas9 蛋白の受精卵前核へのインジェクションによるゲノム編集操作を実施し、35 個の胚を1頭の仮親ブタに移植したが着床しなかった。

CD163 及び Siglec1 に対するゲノム編集用合成 sgRNA と Cas9 mRNA の細胞質へのインジェクションによるゲノム編集操作を2回実施した。1 回目は、66 個の胚を1頭の仮親ブタに移植したが、妊娠中に胃破裂により仮親が死亡し、7 頭の胎仔について、皮膚を採取し、DNA を抽出し、標的 DNA の欠失変異導入部位の前後について、塩基配列を決定したが、ゲノム編集による遺伝子の欠失等は確認できなかった。2 回目は、9 個の胚を1頭の仮親ブタに移植したが、着床しなかった。

CD163 及び Siglec1 に対するゲノム編集用合成 sgRNA 2 種類と Cas9 蛋白の細胞質へのインジェクションによるゲノム編集操

作を1回実施した。2 頭の仮親ブタに、各々90 個の胚を移植し、各々7 頭及び4 頭の産仔がえられた。計 11 頭の産仔について、皮膚から DNA を抽出し、塩基配列の解析を実施したところ、1 頭で Siglec1 遺伝子に1 個のアデニンの insertion が確認された(図1)。他の部位の皮膚についても塩基配列の解析を実施したが、ゲノム編集は認められなかった。このことから、当該ブタのゲノム編集はモザイク状態であることが示唆された。当該皮膚由来の線維芽細胞を培養し、体細胞クローン胚による個体化のために細胞を凍結保存した。

各ゲノム編集操作の結果を以下の表に示す。

| PRRS | 日付 | 核数 | 細胞核数 | 挿入用ブタ | | 仮母ブタ | | 移植胚数 | 産仔数 |
|------|-----------|----|------|-------|------|------|-------|------|-----------|
| | | | | 挿入胚数 | 挿入位置 | 仮母数 | 移植日 | | |
| 1 | 2014/1/28 | 10 | 5 | 99 | 61 | 2 | 1Day2 | 39 | 6頭(正常分娩) |
| 2 | 2015/4/22 | 5 | 3 | 73 | 36 | 2 | 1Day2 | 10 | 白子1頭(分娩) |
| 3 | 2015/6/24 | 5 | 3 | 31 | 31 | 4 | 1Day2 | 9 | 再産 |
| 4 | 2015/7/28 | 7 | 4 | 50 | 43 | 4 | 1Day2 | 35 | 再産 |
| 5 | 2015/12/1 | 6 | 3 | 66 | 66 | 3 | 1Day1 | 66 | 胃破裂7頭(胎死) |
| 6 | 2016/3/8 | 7 | 4 | 27 | 9 | 2 | 1Day1 | 9 | 再産 |
| 7 | 2016/6/1 | 6 | 6 | 191 | 180 | 3 | 2Day1 | 180 | 7+1頭(分娩) |
| 計 | | 46 | 30 | 537 | 426 | 20 | | 9 | 348 |

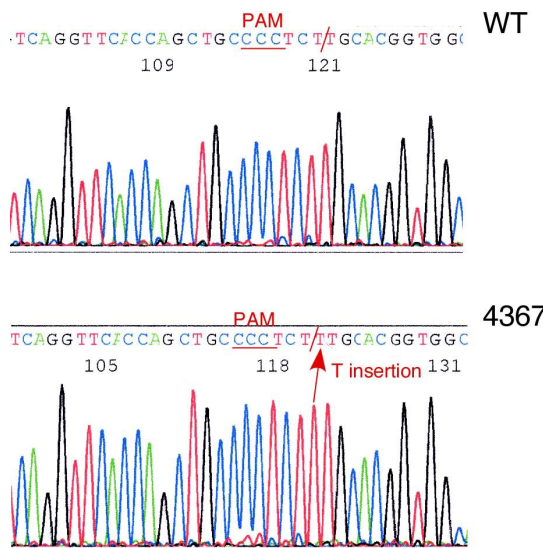


図1. 家畜ブタにおける Siglec1 遺伝子のゲノム編集

(4) マイクロミニピッグ由来初代線維芽細胞におけるゲノム編集

マイクロミニピッグ由来の線維芽細胞に CD163 遺伝子ゲノム編集用プラスミド (pX459/CD163) をトランスフェクションし、puromycin で選択することで、1 塩基 deletion 及び1 塩基 insertion されたゲノム編集細胞を樹立した(図2)。

一方、pX459/Siglec1 によるトランスフェクションでは、1、2 及び3 塩基 deletion と1 塩基 insertion されたゲノム編集細胞を樹立した(図3)。

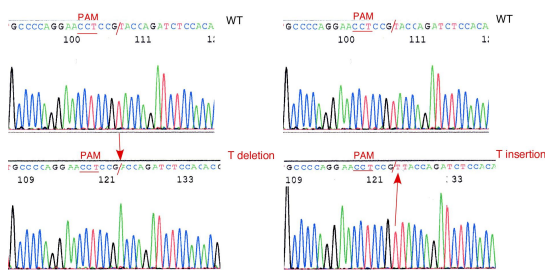


図 2. 線維芽細胞における CD163 遺伝子のゲノム編集

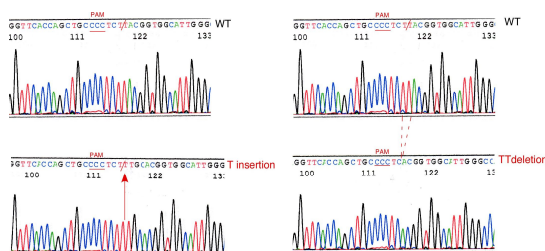


図 3. 線維芽細胞における Siglec1 遺伝子のゲノム編集

(5) マイクロミニピッグ由来間葉系幹細胞におけるゲノム編集

マイクロミニピッグ由来の間葉系幹細胞細胞に CD163 遺伝子ゲノム編集用プラスミド (pX459/CD163) をトランスフェクションし、puromycin で選択することで、1塩基 deletion されたゲノム編集間葉系幹細胞を樹立した。

一方、pX459/Siglec1 によるトランスフェクションでは、ゲノム編集細胞を樹立できなかった。

(6) CD163ゲノム編集マイクロミニピッグ体細胞クローン胚の作製

CD163 遺伝子をゲノム編集したマイクロミニピッグ由来の線維芽細胞と未受精卵との細胞融合により、体細胞クローン胚を作製し、仮親ブタに、34 個の胚を移植し、現在妊娠中に出産待ちの状況である。

(5) 今後の展望

本研究結果から、ブタのゲノム編集においても、モザイク個体の出現が確認され、その克服がゲノム編集ブタの開発において最重要課題であることが再認識された。マウス等では、野生型との繰り返し交配によりモザイク個体からゲノム編集系統を樹立しているが、ブタにおいてはマウス等に比べ、その妊娠期間や性成熟までの発育期間が長く、ゲノム編集系統の樹立に膨大な時間と多くの動物を必要とし、維持繁殖に必要な飼育スペースを確保する必要があるため、現実的ではない。現状で最も効率的であると考えられるのは、ゲノム編集細胞と未受精卵の細胞融合による“体細胞クローン胚”を作製し、仮親に移植する方法である。申請者らも実施期間の

最後に、CD163 遺伝子をゲノム編集したマイクロミニピッグ由来の線維芽細胞と未受精卵との細胞融合により、体細胞クローン胚を作製し、仮親ブタに、34 個の胚を移植し、現在妊娠中に出産待ちの状況である。また、挑戦的萌芽研究 266602258 「CRISPR/Cas9 ゲノム編集による筋ジストロフィー疾患モデルミニピッグの開発」において作製したモザイク個体由来のゲノム編集線維芽細胞と未受精卵との細胞融合により、体細胞クローン胚を作製し、仮親ブタに胚を移植し、現在妊娠中に出産待ちの状況である。このように最初に遺伝子組み換えが起こらない方法でゲノム編集個体を作製し、その個体由来のゲノム編集線維芽細胞を使用する方法も有効であると思われる。

本計画の目的は、PRRS ウイルスのレセプター分子として報告されている CD163 および Siglec1 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを利用してゲノム編集し、レセプターとして機能する膜蛋白としての CD163 および Siglec1 の発現を完全に阻害し、PRRS ウイルスに結合し中和する可溶性 CD163 および Siglec1 分子を発現させることで、ブタに PRRS ウイルス感染抵抗性を付与することであった。しかしながら、研究実施期間中に、Whitworth らによって、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集で CD163 遺伝子をノックアウトしたブタが PRRS 感染に抵抗することが報告された (Whitworth et al., 2015)。この Whitworth らの研究によって、申請者の仮説が正しいことが証明されたが、CD163 のノックアウトや可溶性 CD163 の発現による抵抗性の付与では、CD163 のスカベンジャーとしての機能も失われることで個体に対する副作用の出現が懸念される。そこで、今後の課題として、CD163 のスカベンジャーとしての機能を残したまま、PRRS ウイルスレセプタードメインを欠失されることやレセプター活性に必須のアミノ酸の置換等のゲノム編集が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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〕

特別講演

1. 小野悦郎

「マイクロミニピッグを用いた次世代幹細胞移植再生治療モデルシステムの構築」
第41回日本実験動物技術者協会北海道支部総会、2016.04.23, 札幌

2. 小野悦郎

「遺伝子改変技術による難制圧性ウイルス感染症抵抗性ブタ開発に関する現況」
第160回日本獣医学会学術集会、日本実験動物医学会シンポジウム、2017.09.15, 鹿児島(予定)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

河原崎 達雄 (KAWARASAKI TATSUO)
東海大学・農学部・教授
研究者番号：70500247

柴田 昌利 (SHIBATA MASATOSHI)
静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・研究統括監
研究者番号：70501443

(3)連携研究者

岩森 巨樹 (IWAMORI NAOKI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：70647362

富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：50374674

藤本 佳万 (FUJIMOTO YOSHIKAZU)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20613631