

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289312

研究課題名(和文) トランスジェニック技術を用いたインフルエンザワクチンの効率的生産

研究課題名(英文) Improvement of influenza vaccine production by transgenic chicken

研究代表者

飯島 信司 (Shinji, Iijima)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00168056

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)：インフルエンザワクチンの生産を効率的にできる鶏卵を開発するために、レトロ及びレンチウイルスベクターを用いて、リコンビナーゼあるいはシアル酸転移酵素遺伝子を導入したキメラニワトリを作製しかけあわせにより子孫の取得を試みたが、トランスジェニック子孫を得ることができなかった。一方、ウイルスの感染を抑制することが知られているIFITMタンパク遺伝子のニワトリにおける発現を解析し、インフルエンザウイルスが増殖する漿尿膜においても一定レベル発現していることを示した。さらに複数のニワトリ由来の発育鶏卵でのウイルス生産能を、in vitroでウイルスを使用せずに解析可能なアッセイ系の確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：In order to produce influenza vaccine effectively, we tried to establish transgenic chicken that lays eggs suitable for virus propagation. Chimeric chickens were established those expressed either phiC31 recombinase or sialic acid transferase by using retrovirus and lentivirus vectors. By crossing these chimeric chicken, we tried to establish transgenic chickens. Although we have analyzed more than 250 offspring, we could not detect transgenic chicken. The expression of IFITMs those prevent influenza virus propagation, was analyzed in chicken, and certain level of expression could be detected in chorioallantoic membrane where influenza virus propagates. We also establish in vitro and viral particle free assay system of influenza virus propagation.

研究分野：生物生体工学

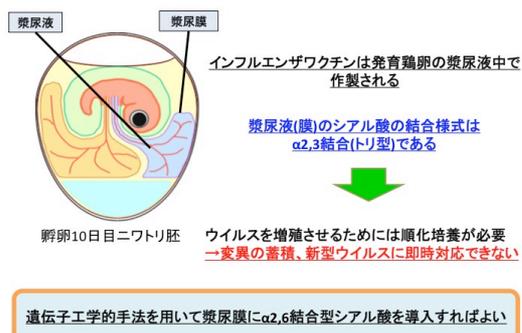
キーワード：トランスジェニックニワトリ インフルエンザ シアル酸

1. 研究開始当初の背景

ウイルスによる感染症は、いまだ克服できない難病として大きな問題となっている。特にトリインフルエンザをはじめとする新型インフルエンザはその大流行が懸念され、ワクチン(精製したウイルスタンパク)の効率的生産が求められている。しかし、鶏卵を用いる方法には潜在的な問題があり、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、スケールアップなどで解決すべき技術的課題が多い。一方、鶏卵を用いた従来法は、ワクチン生産に適した微生物汚染のないSPF卵の大量供給システム、無菌的に大量の卵を扱うための自動化機器類などのインフラストラクチャーが整備されており、問題があるものの当面は生産の主流と考えられる。

インフルエンザワクチン生産の際ウイルスが増殖する鶏卵の漿尿膜細胞は、感染に必要な α -2,6結合型シアル酸糖鎖を持たないため、原理的にはこの糖鎖を受容体とするヒトインフルエンザウイルスを増やすことができない(図1)。

図1 発育鶏卵によるインフルエンザワクチンの製造と問題点



現在は、ウイルス感染後に卵での増殖に適した変異型ウイルスが自然に出現するのを待ち、これを増殖させた後ワクチンとして用いている。したがって生産開始までに時間がかかり、また、この過程は制御できない上に、新型インフルエンザのように鶏卵でよく増えないウイルスではワクチンの生産量が確保できない。我々はこれまでに、卵白中への医薬品タンパク質生産を目的として様々なトランスジェニックニワトリを作製してきた。(引用文献1、2)特に、医薬品の活性に重要なタンパク質への糖鎖附加に着目し、糖鎖の構造を自在に改変するための技術基盤を開発している(引用文献3、4)。この研究を行ううちに、同様の手法で発育鶏卵の糖鎖を改変できればインフルエンザワクチン生産を飛躍的に改善できるのではと考えた。具体的には、ヒトへの感染に必須だが鶏卵漿尿膜に存在しない α -2,6結合型シアル酸を持った鶏卵を利用できれば、この点が改善でき、高品質ワクチンの安定生産が可能となる。

本申請では糖鎖制御工学に基づき α -2,6結合型シアル酸附加型トランスジェニックニワ

トリを新たに作製し、ヒトインフルエンザワクチンの生産に適した発育鶏卵を生産する。効果としては以下の2点が考えられる。

(1) 使用できるインフルエンザウイルスのレパートリーを大きく広げることができ、かつ迅速にワクチンを生産できる。

(2) ウイルス変異、特にワクチンの主成分であるHAタンパク質の変異を抑える。HAタンパク質はシアル酸を認識するウイルスタンパクであるが、現状では本来の結合様式と異なる α -2,3結合型シアル酸の存在下でウイルスを増殖させるため変異が入りやすい。

さらにニワトリにはToll受容体やインターフェロン誘導性タンパク質(IFITM)などウイルスを不活化する感染防御機構も存在し、インフルエンザウイルス抵抗性に関与すると考えられる。そこで漿尿膜におけるこれらの活性を調べ、必要な場合これらをノックダウンしたニワトリを作製し、さらなる生産性の向上を目指す。

一般にタンパク質の糖鎖修飾は、リジン残基に結合するN型糖鎖とセリン、スレオニンに結合するO型糖鎖があり、インフルエンザウイルスの感染にはN型糖鎖の重要性が報告されている。N型糖鎖附加は小胞体およびゴルジ体で起きるが、末端のガラクトースとシアル酸附加はゴルジ体でおきる。我々は、卵白に医薬品を生産するため、卵白タンパク質を分泌する輸卵管細胞を解析し、この細胞ではガラクトース転移酵素及びシアル酸転移酵素活性が弱いことを見出し、ガラクトース転移酵素を発現させたトランスジェニックニワトリにおいて卵白の糖鎖を改変できることを示している(引用文献3、4)。同様の手法により、漿尿膜のシアル酸を改変できる可能性はきわめて高い。一方、N型糖鎖に限定すれば、漿尿膜でガラクトース転移酵素と α -2,3シアル酸転移酵素は発現している。そこで本申請では、 α -2,6結合シアル酸を付加する糖転移酵素発現トランスジェニックニワトリを作製する

2. 研究の目的

① ヒトインフルエンザウイルス増殖用鶏卵の生産

我々がこれまでに開発してきたレトロウイルスベクターを用いたトランスジェニックニワトリ作製法を応用する。この場合は、 α -2,6シアル酸転移酵素遺伝子を有する高いタイトアのベクターをニワトリ胚の心臓に感染し、感染細胞がモザイク状に存在するキメラニワトリを得る。プロモータとしては、全身での発現が可能な β -アクチンやCMVプロモータを用いる。キメラニワトリを交配することで、トランスジェニックニワトリの系統を樹立す

ることをめざす。しかし、 α -2,6シアル酸転移酵素を全身発現するニワトリを作製すると、このニワトリ自身へのインフルエンザ感染性が増し、新たなバイオハザードの原因となることも否定できない。そこでプロモータ下流に eGFP タンパクを導入し、Cre-loxP などの組換えシステムでこの配列が除去された後はじめて活性のあるシアル酸転移酵素が発現するシステムを開発する。具体的には、組換えに必要な att 配列では含まれた eGFP 配列を、CMV あるいは β -アクチンプロモータとシアル酸転移酵素遺伝子配列の間に挿入したトランスジーンを導入したニワトリ、及びリコンビナーゼ (PhiC31) 発現ベクターを有するキメラニワトリを別々に作製し、これらをかけあわせて得られた子孫にのみ活性型シアル酸転移酵素が発現するよう工夫する。

②ニワトリ IFITM についてクローン化、ニワトリにおける発現やその抗ウイルス活性を確認する。

3. 研究の方法

トランスジェニックニワトリを作製するために、図2に示すような EPO(エリスロポエチン)またはシアル酸転移酵素 (ST6-1) の発現ベクターを、レトロウイルスベクター-pMSCV を用いて作製した。

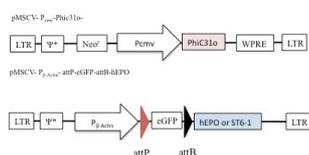


図2 レトロウイルスベクターの構造

EPO 及び ST6-1 遺伝子は我々がクローン化済みである引用文献(2、5)。このコンストラクトでは EPO または ST6-1 遺伝子のすぐ上流に組換え配列 attP 及び attB には含まれた eGFP を導入してあり、そのままでは不活性な EPO 又は ST6-1 がニワトリ β -アクチンプロモータから生産されるように設計した。またリコンビナーゼ PhiC31o が CMV プロモーターから発現するベクターを作製した。レトロウイルスベクター作製は引用文献 1 にしたがったが、トランスジーンとウイルス gag-pol を発現するパッケージングセルラインを取得し、この細胞に VSV-G 発現ベクターを一過的に感染させる事によりウイルスベクターを調製した。さらに eGFP-ST6-1 または PhiC31o を発現するレンチウイルスベクター (pSicoR) を作製した (図

3)。方法の詳細は引用文献 6 に記載済みであるが、トランスジーン、gag-pol 遺伝子、VSV-G 遺伝子を同時に 293FT 細胞に感染させて調製した。

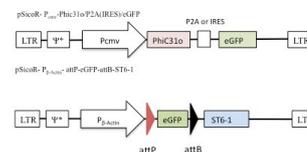


図3 レンチウイルスベクターの構造

ウイルス力価が 10^8 /ml 以上となるようにウイルスベクター粒子を濃縮した、レトロウイルスベクターの場合は 55 時間孵化胚の心臓に感染し、レンチウイルスベクターの場合は分離した始原生殖細胞に感染後、この細胞を 55 時間孵卵胚に移植した。いずれの場合も胚を in vitro で孵化してキメラを得た。キメラは性成熟後かけあわせ、生まれた子孫の血球細胞から DNA を抽出し、PCR にて目的遺伝子の存在を検定した。PCR では eGFP 部分 (レンチウイルスベクター) 及びパッケージングシグナル部分 (レトロウイルスベクター) を増幅した。

IFITM 発現解析のため、RNA を白色レグホン各組織から ISOGEN II を用いて精製した。ReverTra Ace (東洋紡) で cDNA を合成した。PCR には LightCycler (ロッシュ) を用い、 95°C 60 秒で変性後、 95°C 3 秒、 60°C 10 秒 72°C 3 秒を 40 サイクル反応し cDNA を増幅した。発現量はクローン化した IFITM 1, 2, 3 及び 5 の発現ベクター及び GAPDH により規格した。プライマーは以下のとおりである。

IFITM1, forward: cacaccagcatcaacatgcc and reverse: cctacgaagtccttgccgat; IFITM3, forward: tcacggcccatctgatcaac and reverse: gggccaatgaattcgggggt; IFITM5, forward: gactcatctcccaccactgc and reverse: ttgacagagaaggcgagagc; GAPDH, forward: gggcagccatcactatc and reverse: gtgaagacaccagtggactcc.

IFITM3 のノックダウンのため DF-1 細胞を 96 穴培養皿に 1.25×10^4 シード後増殖させ、IFITM3 の siRNA あるいはコントロール siRNA を Lipofectmine 3000 を用いて導入した。48 時間後 VSV-G でシュードタイ

プロ化した eGFP を発現するレンチウイルスベクターを moi 0.1 で感染した。9 時間後に細胞を集めウイルス cDNA を QIAamp DNA Mini Kit で精製後 PCR で定量した。

4. 研究成果

① ニワトリ胚細胞で PhiC31 リコンビナーゼが機能する事を確認するため eGFP を Stuffer として用い、リコンビナーゼによりこの Stuffing が除去されると EPO を発現するよう設計したターゲットベクターを作製し、PhiC31 発現ベクターとともに 55 時間孵化胚の心臓に導入した。7 日間インキュベート後漿尿膜を分離し EPO 活性を測定した。ターゲットベクターのみでは EPO が発現せず、PhiC31 発現ベクターと一緒に導入すると EPO が発現することを確認した(図 4)。

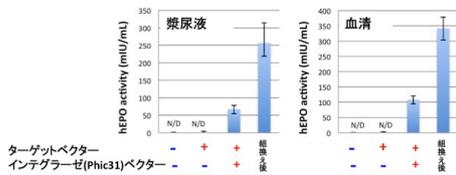


図4 PGICにおけるPhiC31の組換え効率

また PhiC31 及び EPO の発現プロモータとして種々のプロモータを検討し、図 2 に示すようなベクターを作製した。次に実際に遺伝子組換えニワトリを作製するためのインジェクションを行った。

PhiC31 については 1 回 20~30 の卵に 4 回インジェクションした。精子中のトランスジェーンのコピー数が高いキメラのオスとメスをかけ合わせ合計 250 個程の卵を解析したがトランスジェニック子孫をとることはできなかった(表 1)。

表1 レトロウイルスによる遺伝子導入

日時	ウイルス種類	ナンバー	雌雄	血中コピー数	精子中コピー数
2014.11.07	PhiC	PGK3	♀	0.61	
2014.12.05	ST	#2	♂	0.67	0.012
		#3	♂	0.54	0.012
		#6	♂	3.95	0.069
2015.0306	PhiC	#10	♂	2.86	0.035
		#12	♀	2.46	
		#13	♂	2.46	0.012
		#14	♂	3.18	0.013
2015.04.10	PhiC	#15	♂	2.02	0.011
		#16	♂	1.55	ND
		#18	♂	2.02	ND
		#16	♀	0.39	
2015.04.24	ST	#17	♂	0.46	0.016
		#18	♂	0.42	ND
		#19	♂	0.44	ND
		#22	♂	1.06	0.014
2015.05.11	ST	#26	♂	0.91	0.008
		#27	♂	1.75	0.001
2015.07.09	ST	#29	♀	2.65	
		#30	♂	0.63	0.002
2015.07.28	PhiC	#32	♀	1.60	
		#21	♂	6.19	
		#35	♀	0.61	
		#36	♀	0.54	

ST6-1 キメラについても 5 回作製を試みたがキメラニワトリの血中のトランスジェンコピー数は 1 以下であった。かけあわせでトランスジェニック子孫の取得を試みている(表

1)。

レトロウイルスベクターを用いた実験で PhiC31 を発現するニワトリを得ることができなかったため、レンチウイルスを用いた始原生殖細胞に遺伝子を導入後移植することを試みた。現在迄 4 回のインジェクションを行ない性成熟したキメラ 3 羽についてかけあわせを行っている。

② ニワトリ抗ウイルスベクター IFITM の解析 IFITM はインターフェロン誘導性の抗ウイルスタンパクであり、ヒトでは IFITM 1, 2, 3, 4, 5, 6 の存在が知られ、そのうち IFITM3 はインフルエンザウイルスの増殖を抑制すると報告されている。そこでニワトリにおけるこれらの IFITM の発現を調べたところ、成鶏の胚では IFITM3 が、また大腸では IFITM1 及び 3 の発現が高いことが判明した。ニワトリ胚や始原生殖細胞での発現は成鶏に比べ低いレベルであった。またこれら IFITM のうち IFITM2 と 3 はインターフェロン α により強く誘導された。卵においては、漿尿膜や羊水において IFITM3 の発現が強く、つづいて IFITM1 が発現していることを確認した。発現レベルは成鶏の 1/10 以下で線維芽細胞セルライン DT40 の半分程度であった。ワクチン製造時にインフルエンザウイルスが増殖する漿尿膜における発現レベルは低いものの、ウイルス生産に影響する可能性がある。そこで、漿尿膜と IFITM3 の発現レベルがほぼ同じである DT40 細胞において siRNA によりその発現をノックダウンした。次にこの細胞に VSV-G でシュードタイプ化したレトロウイルスベクター(トランスジェニックニワトリ作製に用いたベクターとほぼ相同なウイルス)を感染しその効率を調べた。siRNA で IFITM3 の発現を 1/4 程度に減少させた時、ウイルスの感染効率は 2 倍になった。VSV-G でシュードタイプ化したレトロウイルスベクターとインフルエンザウイルスは同様の経路で感染することから、この程度の低レベルの IFITM3 でもインフルエンザウイルスの感染とワクチンの生産を阻害すると考えられた。したがって将来、ワクチンの生産を効率化するために IFITM3 ノックアウトニワトリを作製することが望ましいと考えられた。

③ α -2, 6 結合型シアル酸転移酵素を導入したトランスジェニックニワトリが作製された時に、複数のニワトリ由来の発育鶏卵でのウイルス生産能を in vitro でまず比較し、最も生産効率の高いニワトリを選抜するために、ウイルスを使用せずに解析可能なアッセイ系の確立を試みた。

インフルエンザウイルスポリメラーゼ活性の測定には、主にルシフェラーゼがレポーター蛋白質として利用されてきた。ウイルスポリメラーゼ複合体の働きを介して合成された

ルシフェラーゼは細胞内に蓄積するため、合成されたルシフェラーゼの活性測定には細胞の溶解が必要である。よって、同一細胞集団を用いた経時的かつ正確なウイルスポリメラーゼ活性の評価は不可能であった。そこで、この問題を解決するため、伊藤ら（未発表）が構築した合成後に細胞外に分泌される Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) を利用した、インフルエンザウイルスポリメラーゼ活性測定系の評価を実施した。

A 型インフルエンザウイルス NP 遺伝子の ORF 領域を SEAP 遺伝子で置換した cDNA を合成後、ヒト由来 RNA pol I プロモーターにより発現が制御される RNA 発現プラスミドにクローニングした (pHuman_Pol I /SEAP)。さらに、インフルエンザウイルス RNP 複合体を構成する 4 種類の蛋白質 (PB2, PB1, PA, NP) 遺伝子を蛋白質発現プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドを HEK-293T 細胞に共トランスフェクション後、2 日間培養した (図 5)。回収した培養上清に基質を添

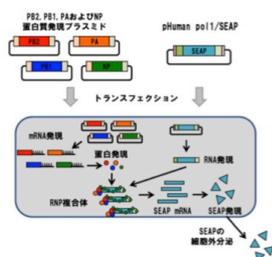


図5 SEAPを利用したインフルンザポリメラーゼ活性測定系

加し、化学発光量を測定した結果、培養上清中には導入プラスミド量に依存した SEAP の発現が認められたことから、HEK-293T 細胞においては、SEAP を利用したインフルエンザウイルスポリメラーゼ活性測定系が使用可能であることが示された。さらに、pHuman_Pol I /SEAP を導入した細胞にウイルス接種後、2 日目の培養上清中においても SEAP の発現を確認したことから、感染性ウイルスを用いたポリメラーゼ活性測定系にも応用できることが明らかとなった。

次に、ニワトリ由来細胞株 DF-1 及びニワトリ胎仔線維芽細胞において、このアッセイが使用可能か試みたが、SEAP の発現が検出限界以下であった (図 6)。RNA pol I プロモーターによる

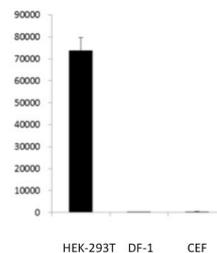


図6 pHuman Pol1/S APとトランスフェクション細胞におけるポリメラーゼ活性の測定結果

細胞内での RNA 発現制御には、高い動物種特異性が要求されるため、SEAP 遺伝子のプロモーターをヒト由来 RNA ポリメラーゼ I プロモーターからニワトリ由来 RNA ポリメラーゼ I プロモーターに置換し、ニワトリ胎仔線維芽細胞における SEAP RNA の発現量を増強することで、ニワトリ胎仔線維芽細胞でのアッセイ系の確立をひき続き検討している。

「引用文献」

- (1) Masamichi Kamihira, Ken-ichiro Ono, Kazuhisa Esaka, Ken-ichi Nishijima, Ryoko Kigaku, Hiroyuki Komatsu, Takashi Yamashita, Kenji Kyogoku, and Shinji Iijima: High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens using a retroviral vector, *Journal of Virology*, 79[17], 10864-10874 (2005)
- (2) Daisuke Kodama, Daisuke Nishimiya, Ken-ichi Iwata, Kazuhisa Yamaguchi, Kazuhiro Yoshida, Yoshinori Kawabe, Makoto Motono, Hiroyuki Watanabe, Takashi Yamashita, Ken-ichi Nishijima, Masamichi Kamihira and Shinji Iijima: Production of human erythropoietin by chimeric chickens, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367, 834-839 (2008)
- (3) Akifumi Mizutani, Hiroyuki Tsunashima, Ken-ichi Nishijima, Takako Sasamoto, Yuki Yamada, Yasuhiro Kojima, Makoto Motono, Jun Kojima, Yujin Inayoshi, Katsuhide Miyake, E. Y. Park and Shinji Iijima: Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white, *Transgenic Research*, 21(1), 63-75 (2012)
- (4) Yuusuke Kojima, Jyunn Wakita, Hidenori Kaneoka, Ken-ichi Nishijima and Shinji Iijima: Galactosylation of erythropoietin produced by a transgenic chicken expressing galactosyltransferase: *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117, 676-679 (2014)
- (5) Yusuke Kojima, Akifumi Mizutani, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima, Hidenori Kaneoka, Takako Sasamoto, Katsuhide Miyake and Shinji

Iijima: Analyses of chicken sialyltransferase related to N-glycosylation, Journal of Bioscience and Bioengineering. 119(6), 623-628 (2015)

(6) Makoto Motono, Yuki Yamada, Yuki Hattori, Ryo Nakagawa, Ken-ichi Nishijima and Shinji Iijima: Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector, Journal of Bioscience and Bioengineering, 109(4), 315-321 (2010)

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 2 件)

① Kidani S, Okuzaki Y, Kaneoka H, Asai S, Murakami S, Murase Y, Iijima S, Nishijima KI. Expression of interferon-inducible transmembrane proteins in the chicken and possible role in prevention of viral infections. Cytotechnology (2017)
DOI: 10.1007/s10616-016-9958-1
査読有

② Kidani S, Kaneoka H, Okuzaki Y, Asai S, Kojima Y, Nishijima K, Iijima S. Analyses of chicken sialyltransferases related to O-glycosylation. J Biosci Bioeng.122 379-384 (2015)査読有

[学会発表] (計 3 件)

①西島謙一、大西慎太郎、奥寄雄也、佐藤里歩、金岡英徳、飯島信司
PhiC31 インテグラーゼによる動物細胞誘導発現系
第66回日本生物工学会大会(ロイトン札幌)
2014/9/9-9/11

②木溪俊介、奥寄雄也、小島祐介、西島謙一、金岡英徳、飯島信司
ニワトリ IFITM 遺伝子の解析
生物学若手研究者の集い 夏のセミナー
2014 2014/7/12-7/13

③ 木溪俊介、金岡英徳、西島謙一、飯島信司
ニワトリシアル酸転移酵素の解析
日本農芸化学会 2016 年度大会 2016/3/28

6. 研究組織

(1) 研究代表者 飯島信司 (IIJIMA Shinji)
名古屋大学大学院工学研究科 生命分子工学専攻
研究者番号 : 00168056

(2) 研究分担者 小野悦郎 (ONO Etsuro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)
研究者番号 : 00160903