

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03916

研究課題名(和文) CD163のゲノム編集によるアフリカ豚コレラ及び高病原性PRRS抵抗性ブタの開発

研究課題名(英文) Generation of African swine fever and highly pathogenic PRRS-resistant pig by genome editing of CD163

研究代表者

小野 悦郎 (ONO, ETSURO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00160903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)抵抗性ブタの開発を目的に、PRRSウイルスのレセプター分子であるCD163の本来のスカーベンジャー機能は保存し、レセプター機能を削除するために、CD163の5番目の Scavenger receptor cysteine-rich ドメインのレセプター活性に関与する3つのアミノ酸の点変異、或は、レセプター活性のないマウスアミノ酸配列への置換を目的にゲノム編集を実施した。マイクロミニピッグ(MMP)由来の胎仔線維芽細胞において、CD163遺伝子にindelが確認された5株の細胞株を樹立した。MMPの受精卵を用いたゲノム編集では、現在までに産仔は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集による抗病性動物の作製方法の確立は、アフリカ豚コレラや豚繁殖・呼吸障害症候群をはじめとするワクチン開発が困難な感染症に対する新しい制圧法の開発に貢献する。現在、難治性感染症の病原体の多くが単球/マクロファージを初期感染細胞としているが、単球/マクロファージを準備することが困難で研究の進展を妨げている。胎仔線維芽細胞からのiPS細胞化、更に単球/マクロファージへの分化誘導法の確立は、感染症研究に新たな研究手法を提供する点において大きな意義がある。これらの研究は、将来の動物食料資源の確保と供給に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and African swine fever (ASF) are the most economically important disease of swine worldwide. We hypothesized that pigs with defective CD163 would be resistant to PRRS. Here, we have tried to generate PRRS-resistant pigs using CRISPR/Cas9 system by introducing amino acid mutations in the scavenger receptor cysteine-rich(SRCR5) domain of CD163 to keep the intact function and delete the virus receptor activity. Total 5 microminiature pig (MMP) embryonic fibroblast cell lines having indel in SRCR5 were established, which will be able to use somatic cell nuclear transfer for generating PRRS-resistant pigs. Cas9 protein, sgRNA and ssDNA for mutation were co-microinjected into the pronuclei of fertilized MMP embryos which were subsequently transplanted into pseudopregnant foster recipient pigs. It is, therefore, that the birth of PRRS-resistant MMP are expected.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：ゲノム編集 豚繁殖・呼吸障害症候群 CD163 アフリカ豚コレラ マイクロミニピッグ

1. 研究開始当初の背景

アフリカ豚コレラ (African Swine Fever:以下 ASF) は、国際連合食糧農業機関 (FAO) などの国際機関が「国境を越えて蔓延し、発生国の経済、貿易及び食料の安全保障に関わる重要性を持ち、その防疫には多国間の協力が必要となる疾病」と定義する「越境性動物疾病」の代表例である。ASF は、伝播力が強いことから、一度蔓延すれば、長期にわたり、畜産業の生産性を低下させ、国民への畜産物の安定供給を脅かし、地域社会・地域経済に深刻な打撃を与え、国際的にも、ASF の非清浄国として信用を失う恐れがある。国際的な人・物の往来が増加していることから、今後、我が国に ASF が侵入する可能性は否定できない。しかし、感染豚には中和抗体が産生されず、有効なワクチンや治療法は存在しない。

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などの繁殖障害と育成豚の呼吸障害を主徴とする疾病である。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。したがって、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、両疾病ともに、我が国のみならず、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。

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)。ワクチン開発が絶望的な ASF や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。しかし、近年、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。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。また、2015 年 12 月には、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)。しかし、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、本研究課題では、CD163 のスカベンジャーとしての機能を残したまま、ASF ウイルスレセプタードメインあるいは PRRS ウイルスレセプタードメインを欠失されるゲノム編集を着想するに至った。

2. 研究の目的

アフリカ豚コレラ (ASF) は、海外悪性伝染病の一つであり、感染豚には中和抗体が産生されないため有効なワクチンが存在しない。また、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は、多様な抗原性を示すウイルスによる感染症であり、有効なワクチンの開発は極めて困難である。本研究課題では、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 ASF および PRRS 抵抗性ブタの開発を目的に、先ず、CRISPR/Cas9 システムを利用して、両ウイルスのレセプター分子である CD163 を本来のスカベンジャー機能は保存し、レセプター機能を削除するゲノム編集により両ウイルスに対する感染抵抗性を付与した細胞株を樹立する。次に、ゲノム編集細胞の核移植による体細胞クローン技術により、ASF および PRRS 抵抗性マイクロミニピッグ (MMP) を作製する。

3. 研究の方法

(1) MMP 由来胎仔線維芽細胞 (MMPEF) からの iPS 細胞の樹立

エピソーマルベクター (hiPSC Generation Episomal Vector Kit, TAKARA; OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, mp53DD) をエレクトロポレーション法で、或いは、レトロウイルスベクター (HiPSC Generation All-in One Vector, TAKARA; OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG) を MMPEF に導入し、Cellartis DEF-CS 500 Culture System (TAKARA) を用いて培養した。ES 細胞様コロニーは、アルカリフォスファターゼ活性検出キット (Stemgent) で染色した。OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, mp53DD の発現は、RT-PCR で検出した。

(2) ゲノム編集用プラスミドの構築

CD163 の 5 番目の Scavenger receptor cysteine-rich (SRCR5) ドメインに対する DNA 断片を 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-SRCR5 を構築した。次に、CRISPOR により標的配列を 3 カ所決定し、CRISPR/Cas9 ベクターである pX459 に 20mer 標的配列に基づくオリゴヌクレオチド (sgRNA 合成用) を挿入し、標的 DNA 切断プラスミド pX459/SRCR5-1、 pX459/SRCR5-2 及び pX459/SRCR5-3 を構築した。構築した pCAG-EGxxFP-SRCR5 と pX459/SRCR5-1、 pX459/SRCR5-2 或いは pX459/SRCR5-3 を Cos-1 細胞に co-transfection 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 SRCR5 の DNA 配列に欠失変異が導入されたことを確認した。

(3) PRRS 抵抗性点変異導入 CD163 SRCR5 細胞の作製

CD163 の本来のスカベンジャー機能は保存し、レセプター機能を削除するために、CD163 の SRCR5 ドメインのレセプター活性に関与する 3 つのアミノ酸に点変異を導入するための ssDNA (SRCR5_m3) 及びレセプター活性のないマウスの SRCR5 のアミノ酸配列に置換するための ssDNA (SRCR5_m17) を合成した。

SRCR5_m3

```
ccc agg ctg gtt gga ggg gac att ccc tgc tct ggt cgt gtt gaa gta
aaa cat gga gac acg tgg ggc tcc gtc tgt gat tct gac ttc tct ctg
gag gcg gcc agc gtg ctg tgc agg gaa cta cag tgc ggc act gtg gtt
tcc atc ctg ggg gga gct cac ttt gga gaa gga agt gga cag atc tgg
gct gaa gaa ttc cag tgt gag ggg cac gag tcc cac ctt tca ctc tgc
cca gta gca ccc cgc cct gac ggg aca tgt agc cac agc agg gac gtc
ggc gta gtc tgc tca a
```

SRCR5_m17

```
ccc agg ctg gtt gga ggg gag att ccc tgc tct ggt cgt gtt gaa gta
aaa cat gga gac gtg tgg ggc tcc gtc tgt gat ttt gac ctc tct ctg
gag gcg gcc agc gtg gtg tgc agg gaa cta cag tgc ggc act gtg gtt
tcc atc ctg ggg gga gct cac ttt gga gaa gga agt gga cag atc tgg
ggt gaa gaa ttc cag tgt tcg ggg gac gag tcc cac ctt tca ctc tgc
tca gta gca ccc ccc ctt gac agg aca tgt acc cac agc agg gac gtc
agc gta gtc tgc tca a
```

MMPEF に pX459/SRCR5-1、 pX459/SRCR5-2 或いは pX459/SRCR5-3、Cas9 蛋白質および ssDNA をトランスフェクションし、10ug/ml の puromycin を含む 10%FBS-DMEM 培地で 72 時間選抜後、10%FBS-DMEM 培地で 3 週間培養し、puromycin 抵抗性細胞株を樹立した。樹立した細胞株から DNA を抽出し、SRCR5 の塩基配列を決定し、ゲノム編集の有無を確認した。

(4) PRRS 抵抗性 MMP の作製

排卵誘発した雌 MMP に人工授精を行い、受精卵を回収した。受精卵に合成 sgRNA、Cas9 蛋白質および ssDNA をマイクロインジェクションで導入し、受精卵を仮親として使用する家畜ブタの卵管に移植した。

4. 研究成果

(1) MMPEF 由来 iPS 細胞の樹立

ゲノム編集 MMPEF 株を iPS 細胞化し、これをウイルス感染感受性である単球/マクロファージに分化させ、感染抵抗性について検討することを目的に、先ず、MMPEF からの iPS 細胞の樹立を試みた。

先ず、エピソーマルベクター (hiPSC Generation Episomal Vector Kit, TAKARA; OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, mp53DD) をエレクトロポレーション法で MMPEF に導入し、Cellartis DEF-CS 500 Culture System (TAKARA) を用いて培養したところ、ES 細胞様のアルカリフォスファターゼ弱陽性コロニーが出現した。作製細胞株の内在性 NANOG, SOX2, LIN28 は検出できたが、KLF4, OCT3/4, STELLA は検出できなかった。また、作製細胞株毎にマーカー遺伝子の発現強度が異なっていた (KLF4, OCT3/4, NANOG の陽性株も確認した)。

次に、レトロウイルスベクター (HiPSC Generation All-in One Vector, TAKARA; OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG) を MMPEF に導入したところ、ES 細胞様のアルカリフォスファターゼ陰性コロニーが出現した。内在性 NANOG, OCT3/4, LIN28, STELLA, SOX2, KLF4 が検出できた。このうち SOX2, KLF4 はエピソーマルベクター系で作製された細胞株より発現が低下していた。そこで、レトロウイルスベクターにエピソーマルベクター (SOX2, KLF4) を加えて遺伝子導入したところ、SOX2, KLF4 の発現量は改善されたが、ES 細胞様コロニーは、アルカリフォスファターゼ陰性のままであった。

更に、レトロウイルスベクターをMMPEFに導入し、Cellartis DEF-CS 500 Basal MediumをマウスESC用培地(2i+LIF)に代えて培養したところ、内在性NANOG, OCT3/4, LIN28, STELLA, SOX2, KLF4が検出できるアルカリフォスファターゼ弱陽性コロニーを出現させることができた(図1左および中央)。

しかしながら、何の場合もクローニング後、増殖させることができず、細胞株の樹立には至らなかった。一方、何の場合も、スフェロイド(胚様体)様の足場非依存的増殖は可能であった(図1右)。

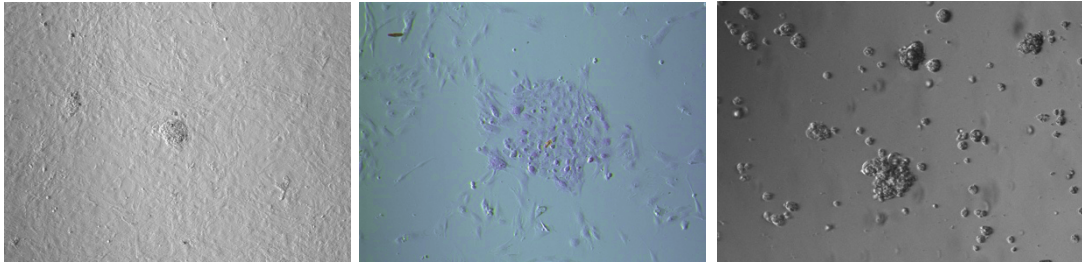


図1. ES細胞様コロニー(左)、ALP弱陽性コロニー(中央)、スフェロイド様増殖(右)

(2) PRRS抵抗性点変異導入CD163 SRCR5細胞の作製

MMPEFに、CD163の本来のスカベンジャー機能は保存し、レセプター機能を削除するために、CD163のSRCR5ドメインのレセプター活性に関与する3つのアミノ酸に点変異を導入するためのssDNA(SRCR5_m3)及びレセプター活性のないマウスのSRCR5のアミノ酸配列に置換するためのssDNA(SRCR5_m17)とSRCR5内の3ヶ所を切断する3種類のpX459/SRCR5-1、pX459/SRCR5-2 或いは、pX459/SRCR5-3の中の1つのプラスミドを同時に導入し、10ug/mlのpuromycinを含む10%FBS-DMEM培地で72時間選択後、10%FBS-DMEM培地で3週間培養し、puromycin抵抗性細胞株を樹立した。樹立した細胞株からDNAを抽出し、切断部位の塩基配列を調べた結果、SRCR5へのアミノ酸の点変異導入は認められなかった。しかしながら、pX459/SRCR5-1の使用により、樹立した21細胞株中2株でindel(5塩基挿入及び4塩基欠損変異)が確認され、pX459/SRCR5-2では、27細胞株中2株でindel(4塩基欠損変異)が、pX459/SRCR5-3では、44細胞株中1株でindel(1塩基挿入変異)が確認され、ゲノム編集CD163遺伝子ノックアウトPEFを5株樹立することに成功した(図2)。これらの細胞株は、CD163欠損PRRS抵抗性MMP作製用細胞として利用することが可能である。

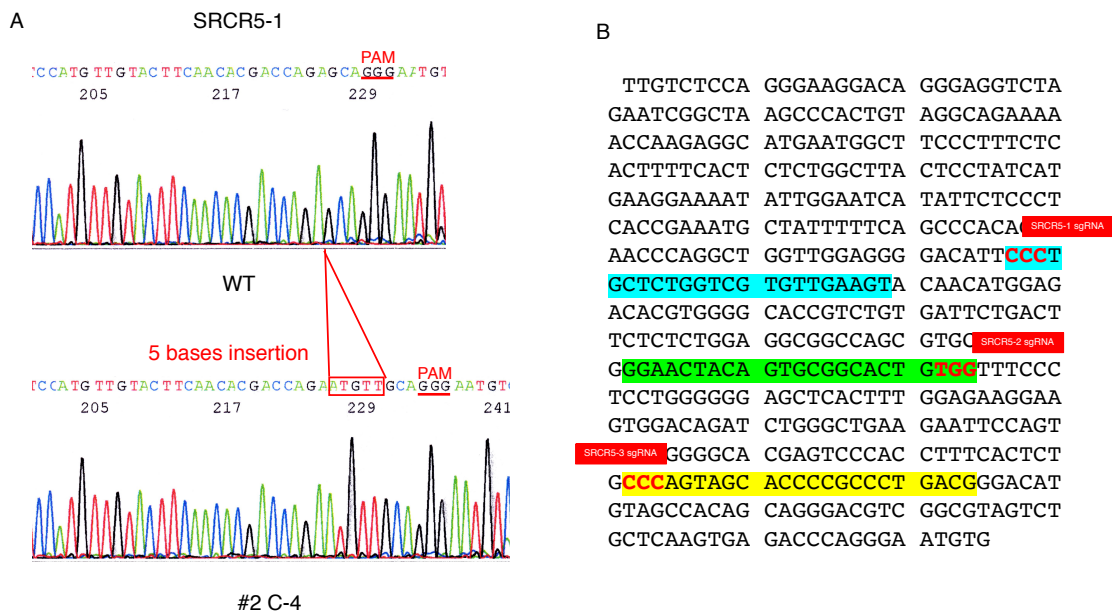


図2. ゲノム編集によりブタCD163のSRCR5ドメイン内にindelが導入されたMMPEF(A) SRCR5ドメインの塩基配列と3個のPAM配列(赤字)を含むsgRNAに対する塩基配列(B)

(3) PRRS抵抗性MMPの作製

MMPの受精卵を用いて、2回のインジェクションを実施した。SRCR5ドメイン内に存在する上記3カ所の標的切断部位に対する3種類の合成sgRNA、Cas9蛋白質および

び上記2本のSRCR5ドメイン内のアミノ酸置換用ssDNA (SRCR5_m3とSRCR5_m17)をマイクロインジェクションにより、MMPの受精卵前核に注入後、仮親ブタに移植した。

1回目は、3頭の雌MMPから採卵し、計17個の受精卵にマイクロインジェクションし、全ての受精卵を仮親ブタに移植したが、妊娠は確認されなかった。2回目は、5頭の雌MMPから採卵し、計32個の受精卵にマイクロインジェクションし、生存した20個の受精卵を仮親ブタに移植した。今後、ゲノム編集MMPの誕生が期待される。

(4) 今後の展望

本研究課題の当初の計画では、ASFウイルスレセプターとされるCD163のSRCR1、SRCR2及びSRCR3ドメイン (Sanchez-Torres et al., 2003) とPRRSウイルスレセプターとされるSRCR5ドメイン (Van Gorp et al., 2010) を部分的に欠損させるために、各SRCRドメイン内に2カ所の切断部位を設定し、CRISPR/Cas9システムを利用し、各SRCRドメイン欠失変異CD163を発現する細胞株を樹立し、次にASFウイルスやPRRSウイルスに対する抵抗性を検討するために、ゲノム編集細胞株をiPS細胞化し、さらに単球/マクロファージに分化させ、感染抵抗性について検討することを予定していた。しかし、研究開始後、ゲノム編集技術を用いてCD163のSRCR5を欠損させることでブタがPRRS抵抗性を示すことが示された (Burkard et al., PLOS Pathogens, 2017)。また、ASFに関しても、CD163ノックアウトブタがASFウイルスに感受性であることが示され、CD163がASFウイルスレセプターであることが否定された (Popescu et al., Virology, 2017)。そのため、当初の計画の変更を強いられることとなった。

PRRS抵抗性MMPの作製においては、SRCR5の欠損による副作用を防ぐことを目的に、CD163の本来のスカベンジャー機能は保存し、レセプター機能を削除するために、CD163のSRCR5ドメインのレセプター活性に関与する3つのアミノ酸に点変異を導入すること及びブタのSRCR5をレセプター活性のないマウスのSRCR5のアミノ酸配列に置換する計画に変更した。しかし、本研究期間内には、PRRS抵抗性点変異導入CD163 SRCR5細胞及びPRRS抵抗性点変異導入CD163 SRCR5MMPを作製することは出来なかった。その理由の1つとして、MMPEFはゲノム編集の効率が低いことが考えられる。ゲノム編集細胞を得る確率を向上させる目的でエレクトロポレーションによる方法を採用したが、改善は認められなかった。別のプロジェクトで同様にMMPEFのゲノム編集を実施しているが、他の細胞に比べ効率は悪い。MMPの受精卵を十分に使用出来るのであれば、クローン技術を使用することなく、直接受精卵へのインジェクションを使用する方が効率が良いと思われる。

ASF抵抗性MMPの作製においては、CD163に代わる新たな抵抗性因子の検索を行い、ASFウイルスの増殖に重要な役割を果たすRab7に着目した。低分子量G蛋白質のRab7は、多くの重要なウイルスの増殖過程に関与している。また、それらのdominant negative mutantが多くのウイルスの増殖を抑制することも知られている。培養細胞で一過性に強発現された後期エンドソームに存在するRab7のdominant negative mutantであるRab7_T22Nは、ASFウイルスの増殖を抑制する。しかしながら、この報告は一過性にRab7_T22Nを強発現された細胞での結果であり、stableにRab7_T22Nを発現させた細胞での抗ウイルス作用について検討した報告は存在しない。そこで、このdominant-negative mutantを発現する細胞株を樹立することを計画したが、実施するまでに至らなかった。

MMPEFのiPS細胞化については、種々の検討を実施したが成功には至らなかった。今回iPS細胞化に用いた遺伝子がヒト由来であることが原因の可能性もあり、今後、ブタの遺伝子を準備する必要があると思われる。

研究期間終了間際にMMPの受精卵にマイクロインジェクションし、仮親ブタに移植した実験によって、PRRS抵抗性点変異導入CD163 SRCR5MMPが誕生することを期待したい。

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
研究分担者	大竹 正剛 (OTAKE MASAYOSHI) (90605677)	静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター 養豚・養鶏・上席研究員 (83810)	
連携研究者	岩森 巨樹 (IWAMORI NAOKI) (70647362)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
連携研究者	藤本 佳万 (FUJIMOTO YOSHIKAZU) (20613631)	鹿児島大学・共同獣医学部・准教授 (17701)	
連携研究者	富岡 幸子 (TOMIOKA YUKIKO) (50374674)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
連携研究者	塩谷 聡子 (ENYA SATOKO) (30574561)	静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・上席研究員 (83810)	
連携研究者	寒川 彰久 (KANGAWA AKIHISA) (00638893)	静岡県畜産技術研究所・中小家畜研究センター・主任研究員 (83810)	