

平成 29 年 6 月 6 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：26289316
研究課題名(和文) トランスジェニックバイオリクターのためのニワトリ多能性幹細胞操作技術の開発

研究課題名(英文) Manipulation technology development of chicken pluripotent stem cells for constructing transgenic bioreactors

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオ医薬品の新しい生産プラットフォームとして、ニワトリ多能性幹細胞からトランスジェニックニワトリを作出するための技術開発を行った。まず、ニワトリにおいて多能性幹細胞の存在がわかっている胚盤葉細胞からRNAを抽出し、大規模シーケンサーによってリプログラミング因子遺伝子の発現挙動を解析した。リプログラミング遺伝子をニワトリ胚性繊維芽細胞に導入することで、ニワトリiPS細胞を誘導した。さらに、ニワトリ多能性幹細胞の遺伝子操作のために、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムの適用を試みた。性決定に重要とされているDMRT1遺伝子を高効率に標的可能なベクターの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a technology to generate transgenic chickens derived from pluripotent stem cells as a new production platform for biopharmaceuticals. Total RNAs extracted from chicken blastodermal cells, containing pluripotent stem cells, were applied for the massive sequencing technology to analyze expression profiles of reprogramming factor genes. Using reprogramming factor genes identified by the transcriptome analysis, chicken induced pluripotent stem cells were generated. Furthermore, a genome editing technique, CRISPR/Cas9 system was applied for targeting a sex determination gene, DMRT1. A targeting vector designed efficiently altered the target region in DMRT1 gene of chicken cells.

研究分野：生物工学

キーワード：バイオテクノロジー 生物・生体工学 生体バイオリクター ニワトリ 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の生産品目拡大や医薬品全体に占める売上高の上昇には目覚ましいものがある。これらの医薬品タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を宿主とした遺伝子組換え動物細胞を用いた細胞培養によって主に生産されている。しかし、生産コストの低減や生産品目の多様化対応が求められており、細胞培養にかわる生産プラットフォームの開発が望まれている。細胞培養以外のバイオ医薬品生産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アクターがかねてより注目されてきた。ヤギやヒツジなどの大型哺乳動物の乳汁への生産システムはすでに実用化されており、トランスジェニック植物による医薬品生産についても動物薬の生産法として実用化段階に入っている。同様に、トランスジェニックニワトリの卵に生産するシステムについても開発が進められているが、哺乳類や植物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遺伝子導入個体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。申請者は、トランスジェニック鳥類を生体バイオリアクターとして、バイオ医薬品の新しい生産法として用いるために必要な技術を開発してきた。これまで独自に、鳥類胚培養法、ウイルスベクターを用いた高効率遺伝子導入、卵管特異的な遺伝子発現システムの開発を行い、抗体などの組換えタンパク質を卵や体組織に生産するニワトリ・ウズラの作出に成功している。医薬品タンパク質生産以外にも、食べる医薬品としてスギ花粉症治療のためのアレルゲン T 細胞エピトープを卵に生産するニワトリの作製に成功し、この卵の食餌によって花粉症の治療が行えることを明らかにした。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。ウズラでヒト由来 iPS 誘導因子遺伝子を用いて iPS 細胞の樹立が報告されているが (Lu et al., *Stem Cells Dev* 2012, 21, 394-403) 生殖系列分化は達成されていない。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が、増殖速度が非常に遅く、培養によって形質が変化しやすいため一般化していない。

2. 研究の目的

本研究では、ニワトリ多能性幹細胞の操作技術を開発することを目的とした。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ノックインを実現するためには、ES/iPS 細胞のような多能性幹細胞を用いた染色体操作技術の確立が必要である。本研究では、多能性が証明されている胚盤葉細胞から iPS 細胞誘導のためのリプログラミング因子のニワトリホモログの発現解析から効果的なリプログラミング因子の探索を行い、ニワトリ由来のリプログラミング因子による iPS 細胞の誘導を試みる。

また、近年のゲノム編集技術の進展はニワトリの染色体操作においても大きな役割を果たすと期待されている。鳥類は、生殖細胞系列へと完全に伝播可能な胚性幹細胞が樹立されていないことから、標的配列のノックアウトや相同組換え等が技術的に困難である。また、哺乳類と比較して発生過程の観点から多く違いがあるため、マウスなどの実験動物で確立された通常の遺伝子ターゲティング技術は、鳥類には適用できない。2014 年には、ゲノム編集技術である TALEN を使用して、ニワトリ始原生殖細胞のオボアルブミン遺伝子をターゲットにして、ノックアウトニワトリの作製が報告されている。本研究では、簡便にターゲティングベクターの作製ができるため急速に多様な種への適用が検討されているゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムをニワトリ多能性幹細胞に適用するための技術開発を行う。

これらによって、バイオ医薬品生産を目的とした家禽鳥類のバイオテクノロジーを発展させるための新たな技術基盤の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚盤葉細胞のトランスクリプトーム解析によるリプログラミング因子の探索および iPS 細胞誘導

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) を採取した。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、酵素処理を行い分散させてから遠心分離し、数日間培養したものを使用した。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 4×44K, 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 法で配列解析を行った。

ニワトリ iPS 細胞の誘導では、iPS 細胞誘導に必要なリプログラミング因子の遺伝子のニワトリホモログの配列情報を上記の次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析から取得し、それぞれの遺伝子を全合成した。全合成したリプログラミング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た。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、フィーダー細胞上で培養することによって、ニワトリ iPS 細胞の誘導を行った。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した。

(2) ゲノム編集技術を用いたニワトリ染色体操作技術の開発

本研究では、ニワトリの性決定に重要な役割を果たすとされる DMRT1 遺伝子座を標的とし、CRISPR/Cas9 システムをベースとしたゲノム編集用プラスミドベクターの作製を行った。ベクターは、guide RNA (gRNA) 発現カセットおよびコドンヒト化 Cas9 発現カセットが搭載された 1 パック型の pX330 プラスミド (pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9, Plasmid #42230; addgene) を用いた。プラスミドベクターは、脱リン酸化した pX330 に、リン酸化およびアニーリング後のオリゴ DNA (gRNA) を組み込むことで作製した。gRNA の設計には、gRNA デザインサイト CRISPR direct を用い、ニワトリ DMRT1 遺伝子配列 (Accession No, AF123456) を入力することで、それぞれ特異性が高くオフターゲットが少ないと予想される exon 2、exon 3 の二つの gRNA を設計した。

細胞へのプラスミドベクターの導入は、エレクトロポレーションによって行った。遺伝子導入処理した細胞は数日間培養した後トリプシン処理によって回収した。回収した細胞から DNA 抽出キット (MagExtractor-Genome-, Toyobo) を用いてゲノム DNA を取得した。CRISPR/Cas9 システムの適用による標的遺伝子部位の改変効率の評価は、ゲノム DNA を鋳型として標的領域を PCR により増幅後、T7 エンドヌクレアーゼアッセイによ

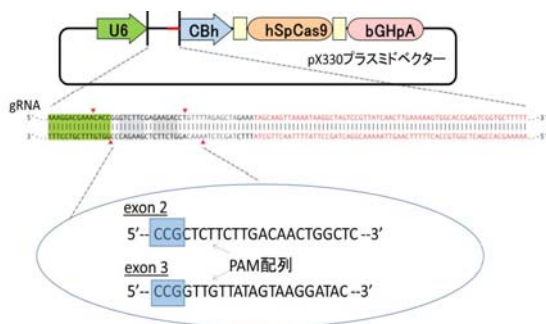


図1. CRISPR/Cas9 プラスミドベクター

て行った。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚盤葉細胞 (CBC) のトランスクリプトーム解析によるリプログラミング因子の探索

CBC から RNA を抽出後、NGS を用いて多能性がわかっている CBC において発現している全遺伝子の解析を行った。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、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。ヒトタンパク質発現リソース (HuPEX) からヒト転写因子を基に解析したところ、2,949 個のニワトリ転写因子ホモログ遺伝子を抽出することができた。得られた遺伝子の塩基配列は、既にデータベースに報告されている配列情報と比較したところ、いくつかの遺伝子においてアミノ酸配列レベルで相違が見られた。今後は、NGS から得られた配列情報に従って遺伝子材料を取得することにした。

転写因子	NGSによるマルチプルアライメント	塩基配列	アミノ酸配列
POUV (Oct4)		g116a, c124t, a237g	G39E, P42S
Sox2		t144c, t162c, g960c, g1014a	
Klf4		g42x, c43x, c44x, T315c, t540c, c762a, c866t	P15X, A289V (X=deletion)
c-Myc		c138a, a1170g	
Nanog		not detected	
Lin28		a464g, a668g, a1197c	S120G, K188E

図2. ニワトリ胚盤葉細胞で発現しているリプログラミング因子の NGS による配列解析結果

多能性幹細胞における網羅的遺伝子発現解析を行うために、CBC より作製した cRNA を用い、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。NGS からトランスクリプトーム解析で得られた 2,949 個の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。その結果、CBC において、CEF と比較し 819 個の転写因子遺伝子が 2 倍以上の遺伝子発現量を示した。多能性マーカーとして知られる *POUV* (*Oct4* に相当)、*Nanog* の CBC での発現量は、NGS での発現量 (FPKM 値) 及びマイクロアレイ解析の CEF との相対値の双方において、高い発現が確認されたが、一方で、*Klf4* や *Sox2* ではあまり高発現は確認できなかった。

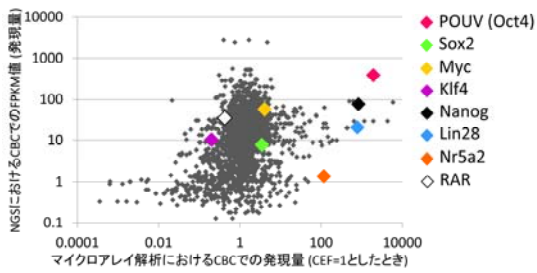


図3. CBC における発現量の比較

マイクロアレイ解析による結果と合わせて、これまで使用しているリプログラミング因子 (POUV (Oct4)、Sox2、Klf4、cMyc、Nanog、Glis1、Nr5a2、RAR α 、RAR γ 、Lin28) の代替となりうる因子の選定を行った。現在使用している因子のファミリー遺伝子に着目し、リプログラミング因子の発現量を比較した結果、いくつかの遺伝子のファミリーにおいてこれまで使用していた因子と比較し、CBCにおいて高発現している因子を明らかにすることができた。

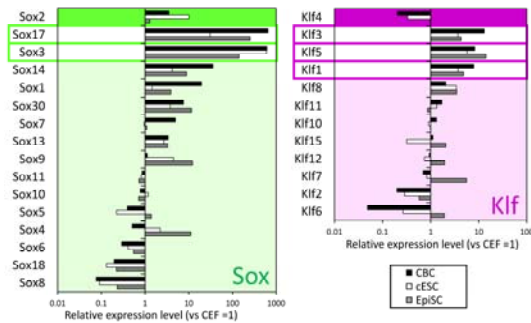
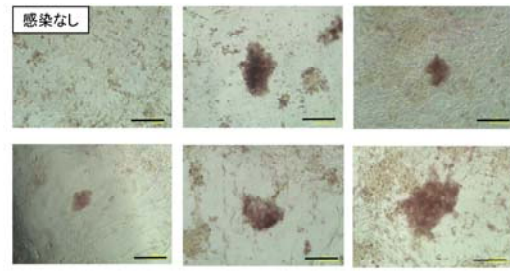


図4. リプログラミング因子のファミリー遺伝子の幹細胞における発現量比較 (Sox, Klf)

これらの因子の中で、Sox3、Sox17、Klf1、Klf3、Klf5、Nr6a1、Lin41、Prdm14 について、ニワトリ細胞のリプログラミングに効果が期待されるニワトリホモログとして検討することにした。これらの遺伝子を NGS による配列情報から全合成により取得後、レトロウイルスベクター生産用プラスミド pQMSCV ベクターに組み込み、レトロウイルスベクターを生産させた。これまでに検討してきた 10 因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Lin28、Glis1、Nr5a2、RAR α 、RAR γ) との組合せで CEF にウイルスベクターにより遺伝子導入することで iPS 細胞の誘導を行った。

検討の一例として、山中 4 因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc) において、Sox、Klf ファミリー遺伝子 (Sox2、Sox3、Sox17、Klf1、Klf3、Klf4、Klf5) をそれぞれ 1 因子ずつ代替した際におけるアルカリホスファターゼ染色陽性コロニー数の結果を示す。培養 7 日目において、従来の Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc の組

合せよりも陽性数が多い条件を見出した。しかし、継続的に未分化状態を維持した細胞の樹立には至っておらず更なる検討が必要である。



AP陽性コロニー数の比較 (7日目における結果 n=3)

	Klf1	Klf3	Klf4	Klf5
Sox2	35	18	12	25
Sox3	6	10	15	20
Sox17	16	10	9	12

図5. ニワトリ iPS 細胞の誘導

(2) ゲノム編集技術を用いたニワトリ染色体操作技術の開発

エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入の初期検討として、CEF での最適遺伝子導入条件を決定した。この条件を用いて DMRT1 exon 2 および exon 3 を標的とする gRNA を組み込んだ CRISPR/Cas9 システムプラスミド (pX330/DMRT1) を CEF に導入・培養後、ゲノム DNA を抽出して PCR により標的領域の遺伝子配列を増幅することができた。標的配列の特異的な増幅を確認後、PCR 産物を精製し、ハイブリダイゼーション後に T7 エンドヌクレアーゼアッセイによる遺伝子変異の確認を行った。その結果、exon 2 においては遺伝子変異が確認できなかったが、exon 3 においては遺伝子変異が確認された。遺伝子変異が確認できた exon 3 での編集効率は約 25% であり、通常の CRISPR/Cas9 でのゲノム編集にお

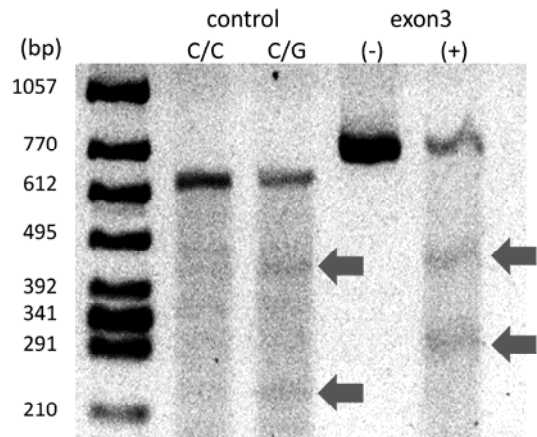


図6. T7エンドヌクレアーゼアッセイによる評価

ける一般的な効率よりも高かった。したがって、ニワトリの DMRT1 遺伝子座においては、exon 3 を標的としエレクトロポレーションの最適条件を用いることで、高効率な遺伝子の編集が可能であると考えられる。編集された遺伝子領域での遺伝子変異のパターンをシーケンス解析により確認した。解析を行った 15 クローンのうち、4 サンプルにおいて変異が確認されたため、シーケンス解析からの編集効率は約 27% となった。したがって、T7 エンドヌクレアーゼアッセイにより算出した効率 (25%) とほぼ同程度であることが確認できた。エレクトロポレーションによる遺伝子導入効率が 45% 程度であったことから、今回設計した DMRT1 遺伝子の exon3 での gRNA は、非常に高効率に遺伝子改変が行えるものと考えられる。

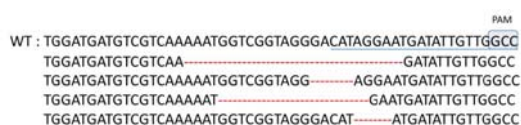


図7. 標的遺伝子部位の配列解析による評価

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 11 件)

- ① 大坪 嵩征, 小畑 玲奈, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、遺伝子導入ニワトリ卵を用いた経口免疫ワクチンによるアレルギー治療法の開発、第53回化学関連支部合同九州大会、2016年7月2日、北九州国際会議場
- ② 椎葉 温, 河邊 佳典, 福丸 詩帆, 山田 拓矢, 井藤 彰, 上平 正道、ニワトリ胚盤葉細胞の網羅的遺伝子発現解析、第52回化学関連支部合同九州大会、2015年6月27日、北九州国際会議場
- ③ 河邊 佳典, 上平 正道、ゲノム操作工学によるバイオ医薬品生産技術の開発、第38回分子生物学会年会、2015年12月4日、神戸ポートアイランド
- ④ 小畑 玲奈, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、遺伝子導入ニワトリによるアレルギー治療のためのTGF-beta1の生産、第67回日本生物工学会大会、2015年10月28日、城山観光ホテル(鹿児島)
- ⑤ 椎葉 温, 河邊 佳典, 福丸 詩帆, 山田 拓矢, 井藤 彰, 上平 正道、ニワトリ胚盤葉細胞の網羅的発現遺伝子解析による多能性幹細胞誘導因子の探索、化学工学会第47回秋季大会、2015年9月9日、北海道大学札幌キャンパス
- ⑥ Masamichi Kamihira、Biopharmaceutical protein production using transgenic chickens、5th Annual International Conference on Advances in Biotechnology (BIOTECH2015)、2015年3月13日、Indian Institute of Technology, Kanpur
- ⑦ 小畑 玲奈, 河邊 佳典, 奥園 健太, 井藤 彰, 上平 正道、遺伝子導入ニワトリが生産したMHC-アレルゲンエピトープ含有卵による経口免疫治療、化学工学会第80年会、2015年3月20日、芝浦工業大学(東京)
- ⑧ Yoshinori Kawabe, Shiho Fukumaru, Nodoka Shiiba, Takuya Yamada, Akira Ito, Masamichi Kamihira、Transcriptome analysis of chicken blastodermal cells、The 27th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2014)、2014年11月14日、Kitakyushu International Conference Center (Kitakyushu)
- ⑨ 小畑 玲奈, 奥園 健太, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、遺伝子導入ニワトリ由来 MHC-アレルゲンエピトープ含有卵によるスギ花粉症治療評価、化学工学会第46回秋季大会、2014年9月17日、九州大学伊都キャンパス(福岡)
- ⑩ 山田 拓矢, 福丸 詩帆, 椎葉 温, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、ニワトリ多能性幹細胞樹立のための胚盤葉細胞の網羅的遺伝子発現解析、化学工学会第46回秋季大会、2014年9月17日、九州大学伊都キャンパス(福岡)
- ⑪ 小畑 玲奈, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道、アレルギー治療を目的とした遺伝子導入ニワトリによるTGF-β1の生産、第51回化学関連支部合同九州大会、2014年6月28日、北九州国際会議場

[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