

最終報告

遺伝子改変鶏を利用した新規ワクチン生産プラットフォーム

研究代表者：西島謙一 東海国立大学機構名古屋大学 教授

共同研究者：高桑 弘樹 京都産業大学 教授



1. 研究の背景と達成目標

今後も出現が予測される新興感染症に対しては、治療薬の開発とともに、ワクチンの普及が大きなカギとなる。コロナ禍に際し RNA ワクチンや動物細胞培養によるワクチン生産など新たなワクチンモダリティが急速に進展した。一方、病原性ウイルスを大量に増やし原料とすることで作られる従来型ワクチンも依然重要である。生産リソースのかぶりが少ない複数の選択肢を保有することは、特に非常時に有効である。毎年大量のワクチンを接種するシステムが動いているインフルエンザでは、発育鶏卵によって増殖させたヒトインフルエンザウイルスをワクチン原料としている。オートメーション化が進み、大規模生産が可能でコスト的にも最も有利な生産法である。より危険な新興感染症に生産リソースを振り替えることができれば、生産キャパシティの問題が一挙にクリアできる可能性がある。この方法の本質的な弱点は、鶏卵で増殖可能なウイルスのみにしか適用できないということである。本研究では、遺伝子改変ニワトリを用いることで、鶏卵を用いた従来のワクチン生産法の限界を越えて高品質なワクチンを生産可能であることを実証する。

①新規インフルエンザワクチン生産系の構築

インフルエンザワクチンを発育鶏卵で生産する技術は完全に確立されたものではなく、増やしているのは“トリ型化”ヒトインフルエンザであるためワクチン株によってはウイルスの増殖能の低さや変異など深刻な問題が生じている。そこで発育鶏卵の糖鎖改変によりこの点を解決し、遺伝子改変ニワトリをワクチン生産系に適用する第一の実践例とする。

②プラットフォーム化へ向けた技術開発

プラットフォーム化へ向けインフルエンザウイルス以外のウイルスへの応用可能性を検討する。COVID-19 ウイルスはニワトリでは増殖しないため、ヒト由来の遺伝子を補うことにより増殖を可能とする。

ニワトリの遺伝子改変技術は、将来精子・卵子になる胚細胞である始原生殖細胞の培養が可能となり大きく進展した。あらゆる生物には将来精子・卵子になる細胞として始原生殖細胞が存在する。トリ始原生殖細胞の珍しい特徴は胚発生のごく初期に始原生殖細胞が血流により全身を巡る時期があることで、この時期の血を入れ替えることで、精子・卵子を入れ替えることができる。始原生殖細胞を *in vitro* で遺伝子操作してからレシピエント胚の血流中に戻すことで作製した生殖腺キメラニワトリ個体を交配することで遺伝子改変ニワトリを作製する方法が確立されつつある。本研究ではこの技術を用いてワクチン生産に適したニワトリ系統の樹立と、遺伝子改変ニワトリ作製プラットフォーム技術の確立を目標として進めた。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・インフルエンザワクチン生産のための新規トランスジェニックニワトリ系統の樹立に成功した。ニワトリ個体群がヒトウイルスのリザーバーとならないように、卵でだけ糖鎖を改変する方針とした。

このために、Cre リコンビナーゼの作用により初めてシアル酸転移酵素を発現するニワトリ系統と、Cre リコンビナーゼを全身で発現する系統の2つを別個に作製した。2系統の交配により得た受精卵を孵卵し、11日目に漿尿膜を採取し調べたところ、期待通り目的の糖転移酵素発現量が増えていることが確認された。トランスジェニックニワトリを利用したワクチン生産への道を開いた成果と考える。

・遺伝子改変プロセスを1年半から約半分の期間に短縮可能なプラットフォーム技術を開発した。

COVID-19はヒトACE2とTMPRSS2の強制発現によりトリ細胞でも増殖可能であるが、今後のプラットフォーム化に向けて、最大のネックは遺伝子改変ニワトリを得るための時間をいかに短縮するかである。遺伝子改変ニワトリ作製の必須ステップである生殖腺キメラニワトリの作製・交配過程の効率化に資する内在性PGC欠損ニワトリの作製に成功した。理論上100%の効率で遺伝子改変ニワトリを得られるため、作製期間の短縮化、飼育必要個体数の大幅削減が可能となる。ニワトリ遺伝子を自由に改変できれば、基礎研究に役立つばかりでなく、ワクチンや医薬生産や低アレルギー性や抗病性などを持つ我が国独自の系統の作製などへの応用が期待できる。また、作製したニワトリは稀少鳥類保存への応用が可能である。

3. 研究成果

①新規インフルエンザワクチン生産系の構築

インフルエンザワクチン生産法として動物培養細胞を用いた新たなウイルス培養法が開発されているが、コストを劇的に下げようとする改善がない限り実用化は難しい。一方、発育鶏卵による従来法はワクチン生産に適した自動化機器類などが整備されており、今後も広く利用されると考えられる。発育鶏卵による従来法においては、ヒトのウイルスを発育鶏卵でも増殖可能な株に馴化させる過程で遺伝子変化が起こり、ワクチン効果が減弱する恐れがある（実際、2013年のH3N2型のワクチン効果が弱かった原因は、馴化過程での抗原変異であることが分かっている）。ウイルス株の増殖を左右するのは発育鶏卵の膜上に存在する糖鎖の結合パターンである。理論上糖転移酵素をニワトリ型からヒト型に変換する遺伝子操作により糖鎖をヒト型化することが可能で、ヒトウイルスを馴化プロセスなしで増やせるようになる。

発育鶏卵でインフルエンザウイルスの増殖を左右するのは漿尿膜上に存在する糖鎖の結合パターンである。糖鎖は複雑かつ不均一であり、「ヒト型」糖鎖は必ずしもヒト固有の糖鎖ではなく、ニワトリにも存在する。しかし、感染時にウイルスが増殖する肺や気管支などの呼吸器あるいは発育鶏卵では漿尿膜で発現する糖の種類が異なることがウイルス感染の種特異性の一因となっている。理論上漿尿膜に多く存在するトリ型の糖鎖をヒト型に置換できれば、ヒトウイルスを馴化プロセスなしで増やせるようになる。そこで、ニワトリの遺伝子改変技術を用いてヒト型糖鎖発現ニワトリを作製することを目指した。作製したニワトリが全身でヒト型糖鎖を発現すると、ヒトインフルエンザウイルスのリザーバーとなり強毒株出現の温床となるおそれがある。そこで、Cre リコンビナーゼを発現するニワトリと、プロモーターと目的の糖転移酵素の間をスタufferで区切った2種のニワトリ系統を樹立する（図1）。これら2系統を交配することではじめて発育

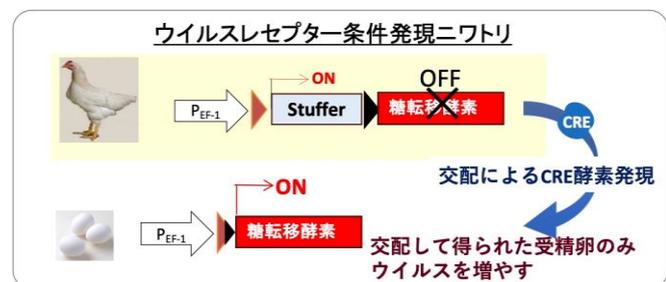


図1. 受精卵のみ「ヒト型」糖鎖を発現するニワトリ系統の作製

鶏卵でヒト型糖鎖を発現するため安全である。

遺伝子改変ニワトリ作製法の概略を図 2 に示す。培養始原生殖細胞に *in vitro* で遺伝子を導入し目的細胞を選択し、発生初期のレシピエント胚血管中に移植する。さらに孵卵を続け、得られた個体が生殖腺キメラ個体 (G0 世代と呼ぶ) である。G0 世代の生殖腺中には、もともとレシピエント胚が持っていた始原生殖細胞由来の精子・卵子と、外から移植した始原生殖細胞由来の精子・卵子が混在する状況となる。

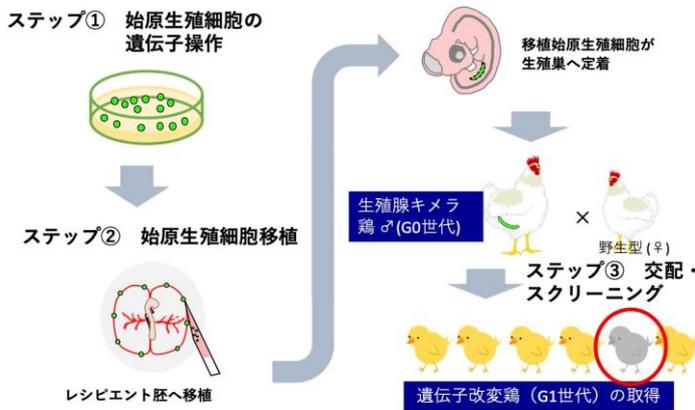


図 2. 始原生殖細胞を用いたニワトリの遺伝子改変法

雄 G0 個体を通常の雌と交配して得られた受精卵を孵卵して得られた次世代 (G1 世代) の中に遺伝子改変した始原生殖細胞由来のニワトリが含まれる。技術的な難しさに加え、ニワトリは世代時間が約半年と長い上に G1 個体のスクリーニングには労力と時間を要し、実験動物としては大型なニワトリ個体を飼育する施設維持の大変さから研究室レベルで実際にトランスジェニック・ゲノム編集ニワトリ系統を作製しているところは数えるほどである。図 1 で示した 2 系統の遺伝子改変始原生殖細胞株を作製しレシピエント胚に移植することで生殖腺キメラ個体を作製した。

この過程で、この糖転移酵素の発現がニワトリ細胞の増殖にマイナスに作用することを見いだしたが、増殖抑制の強度はそれほど大きくないため、発現により発生に悪影響を及ぼす可能性は低いものと考えられた。成熟した雄の生殖腺キメラ個体のうち、精子中で目的遺伝子の導入コピー数が高かった個体を野生型の雌と交配して得られた G1 世代を PCR によりスクリーニングし、目的のトランスジェニックニワトリ個体を得ることに成功した。今回は G1 世代でトランスジェニックニワトリを得る効率が比較的高く、Cre リコンビナーゼ発現ニワトリはスクリーニングした G1 世代個体 107 羽のうち 18 羽がトランスジェニック個体であった。また、酵素遺伝子導入ニワトリは G1 世代 50 羽のうち 8 羽がトランスジェニック個体であった。後者はスタッパーとして挿入した蛍光タンパク質遺伝子を嘴や脚などで強く発現していることが確認され、スタッパーを除去した際には目的遺伝子を強く発現できることが期待された。

2 系統のトランスジェニックニワトリの成熟を待ち、交配により得た受精卵を孵卵した。ウイルスを増やす 9-11 日胚の漿尿膜における遺伝子発現を RT-qPCR 法により解析した。その結果、両方の遺伝子を持つ胚の漿尿膜で目的の糖転移酵素遺伝子の発現が高いことが確認された(図 3)。発現レベルは、ヒトウイルスの増殖をサポートできる羊膜と同レベルであることも示唆された。ゲノム DNA の PCR 解析からはスタッパー遺伝子が残存していることも示されたため、必要に応じて Cre リコンビナーゼの発現量をさらに強めることが必要である可能性も示唆された。この受精卵を用いてインフルエンザウイルスを効率良く増殖させることが可能と考えられる。

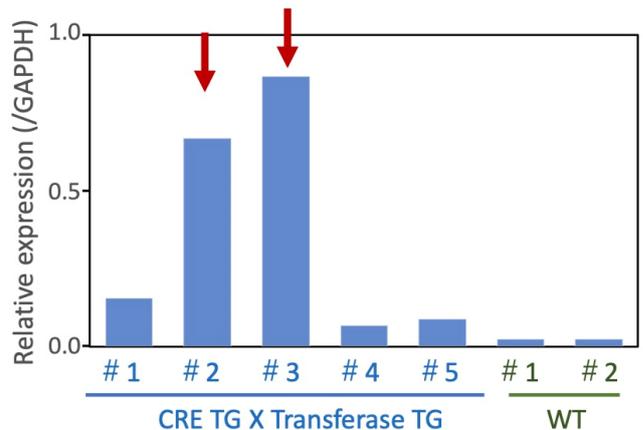


図 3. 漿尿膜における糖転移酵素の強制発現

②遺伝子改変プロセス短縮のためのトランスジェニックニワトリの作製

図2に示した始原生殖細胞を用いた遺伝子改変個体作製における

- ①体外に取り出したPGCに遺伝子操作を施す
- ②操作したPGCをレシピエント胚に移植する
- ③交配によりニワトリを樹立する

の3ステップのうち、トランスジェニック・ゲノム編集ニワトリ系統作製成功のカギは、ステップ②においていかに内在性の（レシピエント胚がもともと持つ）始原生殖細胞を押し除けて、移植した細胞を確実にレシピエント胚の生殖巣に定着させ、その後精子・卵子に分化させるかという点にある。そこで、将来精子・卵子になる細胞である始原生殖細胞を持たないニワトリ受精卵を作製する。始原生殖細胞を完全に欠損した胚が準備できれば、*in vitro*で遺伝子変換した始原生殖細胞由来の個体を確実に得ることができ手間と時間のかかるG1世代のスクリーニングが不要となる。さらに、これまではデザインしたコンストラクトが機能するか試験するだけであってもトランスジェニック後代ニワトリの作製とG2世代以降による試験が必須であったが、全てのG1個体がトランスジェニックニワトリであればG1世代で確認実験が完了し一世代分7-9ヶ月を節約できる。

このために、始原生殖細胞特異的にリコンビナーゼを発現するニワトリと、リコンビナーゼ依存的に細胞を除去できるニワトリの2系統のトランスジェニックニワトリを作製し、交配して得た受精卵中でのみ始原生殖細胞が細胞死により欠損する戦略とした(図4)。*in vitro*で始原生殖細胞にそれぞれの発現ベクターを導入し作製した生殖腺キメラを交配した。その結果、2系統ともトランスジェニックニワトリ系統の樹立に成功した。性成熟の後、この2系統を交配して得た受精卵を孵卵し始原生殖細胞の数を調べた。孵卵2.5日の胚により血中循環期の始原生殖細胞を調べたところ、期待通り2つの遺伝子を持つ個体では始原生殖細胞がほぼ除去されていることが認められた(図5)。今後生殖腺キメラを作製する際にこのニワトリの受精卵をレシピエント胚として用いることでトランスジェニック・ゲノム編集ニワトリ系統の作製効率の大幅上昇と個体を用いた解析に要する期間の短縮が可能となるものと期待される。

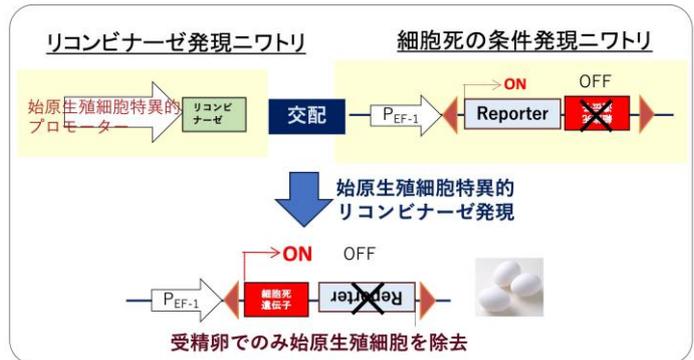


図4. 始原生殖細胞除去レシピエント胚の作製

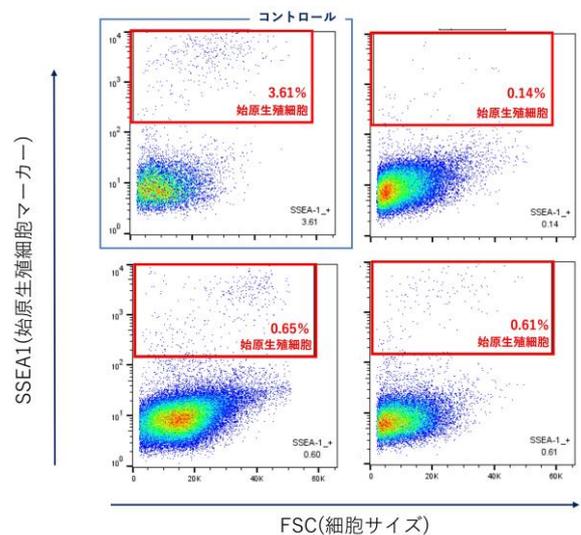


図5. 交配トランスジェニックニワトリ受精卵における始原生殖細胞の除去

4. 今後の展開

本研究後半部で作製したニワトリを利用すれば、*in vitro* で遺伝子改変した PGC からニワトリ個体を自由に作製することができるようになる。実用面ではワクチン生産への展開に加え、卵白バイオリアクターによる抗体医薬生産や低アレルゲン卵の作製、抗病性などの望ましい形質を付与した我が国独自の新規系統の育種、稀少鳥類の保存などへの応用が可能である。基礎生物学としては、卵生生物で最も高等なニワトリ生命現象の解明につながる。記憶の一形態を明らかとするための研究対象とされてきた刷り込みは、母子間の愛情など種々の側面から解析が可能である。また、鳥類は特徴的な解析系として、例えば季節性の歌学習にともなう神経系の再生過程の解析や、嗅覚よりも視覚情報に基づく異性選択など、マウスでは見られない現象のモデルとしても利用されている。哺乳類以外に遺伝子操作が可能な高等モデル生物を提供できるようになる点で基礎科学上の貢献も絶大である。

1) 遺伝子改変ニワトリを利用したワクチンや医薬品の生産

我々も開発に参画したネコエリスロポエチンは本研究の実施期間中に販売開始された。動物医薬品の場合、世界的に薬を供給するとしても数千羽の雌鳥で十分であり、採卵用に商用で用いられている規模よりはるかに小さい。現有設備の一部改変により飼育が可能になれば、新たな産業としての方途が広がると思われる。また、次世代抗体を生産する新たな生産ツールとして鶏卵を用いるための技術開発が AMED のプロジェクトで進められている。

2) 低アレルゲン化卵

乳幼児の約 20 人に 1 人が発症する卵アレルギーの発症を防げれば、負担の大きい子育て世代に対する支援ともなる。アレルゲンの原因となるのは卵の高栄養のもとであるタンパク質自体であるため完全にアレルゲンを除くのは困難であるが、主要なアレルゲンであるオボムコイドを破壊したニワトリが我が国で作製されている。さらに、タンパク質分解酵素阻害活性を持つトリプシンインヒビター遺伝子を破壊できれば、市販されている低アレルゲン化牛乳の場合と同様に卵白タンパク質の分解により低アレルゲン化は十分に可能である。

3) デザイン型ゲノム育種への応用

消費者が持つ遺伝子組換え食品に対する拒否反応が強いため、家畜としてのニワトリ育種はいまなお従来の地道な交配によりなされている。ゲノム編集により破壊された遺伝子は、自然でもまれに起こる突然変異と区別がつかない。法規制の上でも自然交配による変異と見分けがつかないゲノム編集個体は遺伝子組換え生物とみなさないとする方向で議論が収束しつつあり、安全な食品として今後受け入れられていくことが期待される。短期間に低アレルゲン化卵や高機能化鶏肉を育種できる方法が開発できれば、例えば地域ごとの生産者の要望に応えた育種も迅速に可能となる。現在ニワトリの新規系統開発・種卵供給は大規模な国際資本にほぼ独占されているが、我が国独自の試みも可能となる。

例えば、ニワトリが本来持つ免疫システムを強めることができれば、ニワトリ遺伝子のみで（遺伝子組換えの範疇外のセルフクロニングにより）病気に耐性を持つニワトリが樹立出来る可能性がある。我が国の養鶏業においては抗生物質の投与が厳しく制限されているため、生産者の感染症に対する不安は大きい。特に、インフルエンザウイルスについては、調べられた 1917 年以降のパンデミックは全てトリ由来のウイルスが原因であり、ニワトリでの流行を防ぐ技術は公衆衛生上も重要性はきわめて高い。

4) 鳥類遺伝資源の保存

始原生殖細胞の保存と個体復活の技術は、絶滅危惧種や地鶏・在来種など広く鳥類の遺伝子資源保護に繋がる基盤技術となり得る。現在鳥類の冷凍保存技術は唯一精子の保存が実用化されているのみである（巨大な卵黄があるため、卵子・受精卵の冷凍保存は不可能である）。凍結始原生殖細胞を自由に個体へ還元できれば、精子・卵子ともに復活させることができるため、ニワトリを含め多くの鳥類種の保存に有用である。オナガドリなど日本には多くの伝統的なニワトリ系統が存在する世界的に見ても珍しい「鶏王国」であるが、近年多くの品種が絶滅の危機にあり遺伝資源の保存は急務となっている。

5. 発表実績

【論文】

【学会発表】

1. “Chicken/Quail resources in Avian Bioscience Research Center in Nagoya University.” Ken-ichi Nishijima, Animal Genomics and Genome Project Chapter 4 (2021).
2. “Transgenesis of chicken and quail towards designed-type breeding.” Ken-ichi Nishijima, Joint SBJ Meeting with Indonesia, Philippines, and Thailand (2022).
3. “Development of the SpCas9 constitutively expressing transgenic chicken.” Yuya Okuzaki, Yuki Kondo, Ken-ichi Nishijima, 11th Avian Model Systems Meeting (2023)
4. “Cultivation of chicken primordial germ cells from the chickens at Avian Bioscience Research Sciences Center, Nagoya University.” Yuya Okuzaki, Mitsuo Nunome, Takayuki Suzuki, Yoichi Matsuda, Yumi Ozaki, Takeo Uemura, Ken-ichi Nishijima, 11th Avian Model Systems Meeting (2023).
5. “Generation and application of transgenic chickens towards robust production system of recombinant proteins.” Yoshinori Kawabe, Ken-ichi Nishijima, Masamichi Kamihira, 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2023).
6. “Development of the transgenic chicken constitutively-expressing *Streptococcus pyogenes* Cas9.” Yukiko Kondo, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima, 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2023).
7. “Knockout of chicken fucosyltransferase 8 towards the production system of pharmaceutical antibodies.” Kohei Fujiwara, Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima, 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (2023)
8. 「ニワトリシアル酸転移酵素による細胞増殖調節」 牧田芳隆、奥寄雄也、佐野観月、金岡英徳、飯島信司、西島謙一、第73回日本生物工学会大会 (2021).
9. 「アデノ随伴ウイルスベクターによる鳥類細胞及び胚への遺伝子導入の試み」 奥寄雄也、西島謙一、日本動物細胞工学会 2022 年度大会 (2022).
10. 「次世代抗体生産トランスジェニックニワトリ作製へ向けた始原生殖細胞の開発」 辻井竜太郎、奥寄 雄也、西島 謙一、第75回日本生物工学会大会 (2023).

【特許】

【その他】

1. 国際シンポジウム主催 “Chicken as the Crossroads of Basic and Applied Research Fields.” Yuya Okuzaki, Ken-ichi Nishijima, 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology S1 (2023).
2. 「ニワトリ始原生殖細胞の遺伝子改変への応用」 西島謙一、基盤技術整備プログラム成果発表ワークショップ (2021).
3. 「ゲノム編集ニワトリによる抗ウイルスワクチンの生産」 奥寄雄也、西島謙一、BioJapan2021 展示会場プレゼンテーション「わが国のワクチン・バイオ医薬品製造は世界に伍していけるのか？」 (2021).
4. 「遺伝子改変ニワトリによるワクチン生産系の構築」 西島謙一、予防早期医療創成センター 第10回ワークショップ (2022).