

## 学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 鶏卵バイオリクターに必要な技術に関する研究

広島大学大学院統合生命科学研究科

食品生命科学プログラム

学生番号 D214086

氏 名 梶原 亮太

ゲノム編集技術は、生物の設計図である DNA を編集できる技術として、生命科学分野に大きな変革をもたらした。主要な畜産動物であるニワトリの利用価値も、ゲノム編集技術により高まっている。

バイオ医薬品の需要が高まりを見せる中、ニワトリはその生産性の高さから有用物質を生産するバイオリクター（鶏卵バイオリクター）としての利用が進められている。ニワトリをバイオリクターとして利用する場合、鶏卵に最も多く含まれるタンパク質である Ovalbumin (OVA) がしばしば標的として用いられる。2018 年には OVA を標的に、ゲノム編集技術を利用することで、鶏卵バイオリクターが構築可能であることが報告された。しかし、鶏卵バイオリクター構築に多大な労力が必要で、構築を効率化する技術が成熟していない。

本研究では、鶏卵バイオリクターの社会実装を目指し、以下の 2 つの研究を行なった。

### 研究 1: ニワトリ ES 細胞の培養条件の検討

#### 序論

ニワトリ胚性幹細胞 (chicken embryonic stem cells; chESCs) は、多能性幹細胞としてゲノム編集ニワトリの作出に利用できる可能性がある。chESCs は、マウス胚性幹細胞 (mouse embryonic stem cells; mESCs) と同様に Leukemia Inhibitory Factor (LIF) により活性化される Janus kinase (JAK) / Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) シグナルが多能性の維持に寄与する。しかし、mESCs とは異なり生殖細胞への分化能が、ほとんど確認されていない。そこで本研究では、chESCs の培養条件の検討を行い、ゲノム編集ニワトリ作出に利用可能な chESCs の確立を目指した。具体的には、mESCs の多能性維持に重要なシグナル経路である Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが、chESCs の多能性にもたらす影響を解析した。

#### 材料及び方法

##### (1) 既報の培養系における chESCs の培養

chESCs の多能性維持に効果があると報告されるニワトリ白血病阻害因子 (chicken LIF) , MAPK (mitogen-activated protein kinase) /ERK (extracellular signal-regulated kinase) kinase (MEK) 阻害剤 (PD0325901), rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤 (Y-27632) を添加し、chESCs を培養した。多能性評価は alkaline phosphatase (AP) 染色、コロニー形態の観察により実施した。

## (2) chESCs の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化

Wnt シグナルを活性化するために、低分子阻害剤 CHIR99021 を培養系に添加した。それに伴う chESCs の性状の変化は、形態観察、Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)、AP 染色により解析した。

## (3) chESCs の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの阻害

Wnt シグナルを阻害するために、低分子阻害剤 XAV939 を培養系に添加した。それに伴う chESCs の性状の変化は、形態観察、RT-qPCR により解析した。さらに、chESCs の多能性を評価するために、キメラ形成試験を実施した。

## 結果と考察

### (1) 既報の培養系における chESCs の培養

既報の培養条件下で chESCs を培養すると、コンパクトなコロニーと平らなコロニーの 2 種類のコロニー形態を示し、それらが共存しながら増殖した。AP 染色を実施するとコンパクトなコロニーが強い陽性を示したことから、chESCs はコロニー形態により未分化能が異なることが示唆された。

### (2) chESCs の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化

CHIR99021 を添加すると、chESCs は 2 種類のコロニーの混在状態から、平らなコロニーに変化した。さらに、多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*), 生殖細胞関連遺伝子 (*Cvh*, *Dazl*) はそれに伴い発現が低下した。AP 染色は平らなコロニーでは陰性を示した。以上から、chESCs において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化は多能性維持をサポートしないことが示唆された。

### (3) chESCs の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの阻害

XAV939 を添加すると、chESCs は 2 種類のコロニーの混在状態から、コンパクトなコロニーに変化した。さらに、多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*), 生殖細胞関連遺伝子 (*Cvh*, *Dazl*) は、発現が上昇あるいは維持された。さらに、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの阻害条件下で培養した chESCs はキメラ形性能を示した。以上から、chESCs において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの阻害は多能性維持をサポートすることが示唆された。

これらの発見は、マウスエピブラスト幹細胞での現象と類似しており、chESCs から生殖細胞を分化させる上での重要な知見となると考えられる。

## 研究 2: 鶏卵バイオリアクター *in vitro* 評価系の構築

### 序論

鶏卵バイオリアクターの構築では、ゲノム編集技術を用いた場合でも 2-3 年もの時間を要し、その生産性や生物活性の判定は構築後となってしまう。この課題を解決するためには、*in vitro* でタンパク質生産系を評価するシステムが有用であると考えられるが、卵白成分を分泌する卵管内分泌細胞の培養が構築されていない。そこで、本研究では、ゲノム編集技術を利用して、卵白成分として OVA を恒常的に発現する細胞株を樹立し、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価系を構築した。

### 材料及び方法

#### (1) OVA 発現細胞株の樹立

ニワトリの培養細胞株である DF-1 に OVA を強制発現させるために、細胞内恒常発現プロモーターである elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) プロモーターを OVA 遺伝子座にノックインした。ノックインの標的

領域は、*OVA* のエクソン 1 上流とエクソン 2 の開始コドン上流とした。その後、プロモーターをノックインした細胞株を、*OVA* の発現解析に供試した。

### (2) 鶏卵バイオリアクター*in vitro* モデルの構築

*OVA* と同時に生産させる有用タンパク質は、再生医療に利用されるヒト fibroblast growth factor (hFGF2) を選択し、*OVA* 発現 DF-1 細胞株を使用して、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* モデルを構築した。hFGF2 遺伝子の導入箇所や産生量を評価するため、hFGF2-T2A-*OVA* 株、*OVA*-T2A-hFGF2 株、*OVA*-IRES-hFGF2 株の 3 種類のモデルを構築した。

### (3) *in vitro* 評価

構築したそれぞれの細胞株は、培養上清サンプルと細胞ライセートサンプルを調製し、含有する *OVA* と hFGF2 タンパク質の量を ELISA 法により測定した。

## 結果と考察

### (1) *OVA* 発現細胞株の樹立

2 種類の細胞株 (EF1 $\alpha$ -Exon1 株と EF1 $\alpha$ -Exon2 株) を作製し、*OVA* の発現評価を実施した。その結果、両株で *OVA* の mRNA レベルの発現がみられた。なお、発現した mRNA の塩基配列の解析から、完全長の *OVA* の塩基配列と発現も確認した。さらに、抗 *OVA* 抗体を使用した Western blot の結果、EF1 $\alpha$ -Exon1 株で *OVA* が培養上清中から検出された。

### (2) 鶏卵バイオリアクター*in vitro* モデルの構築

(1) の結果から、EF1 $\alpha$ -Exon1 株を使用して *in vitro* モデルを構築した。hFGF2 を搭載したドナーベクターを構築し、ゲノム編集ツールとして TALEN, CRISPR/Cas9 を使用した。シングルセルクローニングを実施し、1 種類の *in vitro* モデルについて 3 種類のクローン株を樹立した。

### (3) *in vitro* 評価

*OVA*-T2A-hFGF2 株と *OVA*-IRES-hFGF2 株から生産される *OVA* と hFGF2 タンパク質の生産量には、有意な差は見られなかった。しかし、FGF2 タンパク質の生産量は、*OVA*-T2A-hFGF2 株で高い傾向が見られた。これは、遺伝子間のリンカーとして T2A の有用性を示唆していた。また、hFGF2-T2A-*OVA* 株と *OVA*-T2A-hFGF2 株間で *OVA* と hFGF2 タンパク質の生産量を比較した結果、hFGF2 タンパク質は hFGF2-T2A-*OVA* 株で有意に多く生産されていることがわかった ( $p<0.05$ )。これは、*OVA* 遺伝子上流へのノックインが、高効率な hFGF2 タンパク質生産に適していることを示唆した。

## 総括

研究 1 では、chESCs の多能性を安定的に維持するためのシグナル経路を特定し、chESCs に関する研究に新たな知見を見出した。研究 2 では、ゲノム編集技術を利用することで、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* モデルを作製し、培養細胞レベルで、迅速な鶏卵バイオリアクターの評価が可能であることが示唆された。この知見は、今後、ニワトリを対象とするゲノム編集研究がより一層発展することに貢献し、鶏卵バイオリアクター化を加速させることに貢献できるものと思われる。