

博士論文

鶏卵バイオリクターに必要な技術に関する研究

令和6年3月

広島大学統合生命科学研究科

食品生命科学プログラム

ゲノム編集先端人材育成プログラム

梶原 亮太

目次

| | 頁 |
|--------------------------------------|-----|
| 主な略号 | 1 |
| 第1章 緒言 | 2 |
| 第2章 ニワトリ ES 細胞の培養条件の検討 | 7 |
| 2-1 序論 | 8 |
| 2-2 材料と方法 | 10 |
| 2-3 成績 | 18 |
| 2-4 考察 | 39 |
| 第3章 鶏卵バイオリクター <i>in vitro</i> 評価系の構築 | 43 |
| 3-1 序論 | 44 |
| 3-2 材料と方法 | 45 |
| 3-3 成績 | 71 |
| 3-4 考察 | 93 |
| 第4章 総合考察 | 97 |
| 第5章 総括 | 101 |
| 謝辞 | 103 |
| 参考文献 | 104 |

主な略号

| 略号 | |
|--------------|---|
| AP | alkaline phosphatase |
| CBCs | chicken blastodermal cells |
| chESCs | chicken embryonic stem cells |
| CHO | chinese hamster ovary |
| COUP | chicken ovalbumin upstream promoter |
| CRISPR i | CRISPR interference |
| CRISPR/Cas | clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein |
| EF1 α | elongation factor 1 α |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| ERE | estrogen response element |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FGF2 | fibroblast growth factor2 |
| gp130 | glycoprotein 130 |
| GSK3 β | glycogen synthase kinase-3 β |
| HR | homologous end joining |
| iPSCs | induced pluripotent stem cells |
| IRES | internal ribosome entry site |
| JAK | janus kinase |
| LEF | lymphoid enhancer-binding factor |
| LIF | leukemia inhibitory factor |
| LIFR β | LIF receptor- β |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| mEpiSCs | mouse epiblast stem cells |
| mESCs | mouse embryonic stem cells |
| MMEJ | microhomology-mediated end joining |
| NHEJ | non-homologous end joining |
| NRE | negative regulatory elements |
| OVA | ovalbumin |
| PAM | protospacer adjacent motif |
| PBase | piggybac transposase |
| PGCs | primordial germ cells |
| PITCh | precise integration into target chromosome system |
| PKC | protein kinase C |
| PSCs | pluripotent stem cells |
| SRE | steroid-dependent response elements |
| SSEA-1 | stage-specific embryonic antigen-1 |
| STAT3 | signal transducer and activator of transcription 3 |
| TALEN | transcription activator-like effector nuclease |
| TCF | T-cell factor |
| UTR | untranslated region |
| ZFN | zinc finger nuclease |

第1章 緒言

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。ゲノム編集技術とは、ゲノム DNA の任意の箇所に二本鎖切断を誘導し、DNA の修復機構を介して、生物のゲノム情報を編集する技術である。突然変異や品種改良により得られる変異を、高効率に誘導できるため、基礎的研究のみならず、家畜の改良を目的とする農畜産分野、遺伝子を標的にした医療分野など幅広い分野において利用されている。ゲノム編集ツールはこれまでに主に、zinc finger nuclease (ZFN) [1], transcription activator-like effector nuclease (TALEN) [2], clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas) [3] の3種類が報告されている。特に、CRISPR/Cas9 システムは、作製が簡便で、標的の自由度も高いため、様々な動物種において活発に利用されている。ゲノム編集は、狙った遺伝子の欠損（ノックアウト）が可能だけでなく、任意の箇所への外来遺伝子の導入（ノックイン）も可能である。ノックインは、DNA の修復機構を巧みに利用した手法であり、導入したい DNA 配列を搭載したドナーベクターを使用することで達成される。二本鎖切断が誘導されると、切断部位を直接つなぎ合わせる非相同末端結合（non-homologous end joining : NHEJ）、相同配列をもとに修復を行う相同末端結合（homologous end joining : HR）、切断部位の末端の 5-25 bp の相同配列が結合するマイクロホモロジー媒介末端結合（Microhomology-mediated end joining : MMEJ）などの機構により DNA が修復される。ドナーベクターに DNA との相同配列を付加することで、修復過程で外来遺伝子をゲノム DNA へ組み込むことができる。このように、ゲノム編集技術は、生物の任意の機能を欠損させることができるだけでなく、新たな機能を付与することもでき、生命科学の基礎・応用分野を大きく発展させ、これからも活発に利用されることが予想される。

ニワトリは、鶏肉、鶏卵が畜産物として利用されることから、食を支える家畜とし

て知られている。また、鶏卵はワクチンの生産工場や医薬品、化粧品の成分としても利用されている。その利用価値は、ゲノム編集技術によってますます高まっていくことが考えられる。最近では、卵白に含まれる主要なアレルゲンであるオボムコイドをノックアウトしたニワトリの安全性が確認され [4], ゲノム編集ニワトリの社会実装が本格化しつつある。食分野だけでなく、ニワトリは年に約 300 個の卵を生み、鶏卵に豊富なタンパク質を含むことから、バイオ医薬品や研究用のサイトカイン等の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）としての利用が進んでいる。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 [5][6]。OVA は卵管に特異的に発現し、卵 1 個あたり約 2.2g と大量に存在する。OVA の転写翻訳系を利用して組換えタンパク質を生産することで、鶏卵中へ組換えタンパク質を多量に蓄積させることができ、血流中にはそれらのタンパク質は移行しないことから、生体に影響を与えることもない。さらに、鶏卵中は無菌環境下で保たれ、複数のプロテアーゼ阻害物質が存在することから、生産物を安定した状態で蓄積することができると考えられる[7][8]。これまで卵管特異的に組換えタンパク質を発現させるため、卵管特異的に発現誘導が可能な OVA プロモーターが利用されている。それらの研究ではプロモーター領域の解析が試みられている[9-11]。再構築されたプロモーターはウイルスベクターに搭載可能で、トランスジェニックニワトリにおいて、組換えタンパク質の卵管特異的な発現を可能にする[12-15]。2015 年には、Food and Drug Administration (FDA) が、ニワトリで生産されたライソゾーム病の治療薬を承認した [16]。ウイルスベクターを利用し、ニワトリゲノム中に組換えタンパク質発現カセットを組み込んだ場合、組換えタンパク質の発現量が世代間で異なることがある。これは、導入されたウイルス由来の配列のサイレンシング、ランダムな組み込みによる位置効果が原因と考えられる[17, 18]。最近では、ゲノム編集技術を用いて、組換えタンパク質の遺伝子を目的

箇所に導入することで、これらの問題を回避し、世代間で安定的に組換えタンパク質を生産できるバイオリクターシステムが開発されている [5].

技術的に、ニワトリを利用したタンパク質生産システムが実現可能であるにも関わらず、それらが社会実装された例はごくわずかである。その原因の一つとして、生産系の構築に必要な、ゲノム編集ニワトリの作出に多大な労力が必要なことが考えられる。バイオ医薬品の生産現場では、動物細胞を利用し、細胞株の迅速なスクリーニングから、小ロット多品種生産、単一品種の大量生産を実現している。細胞系による生産系の利点として、迅速な組換え体の作出、小スケールでの評価が可能なが挙げられる。これにより、生産系の構築過程でバイオ医薬品の生産量・活性評価等が可能となり迅速な生産系の構築が可能となる。一方、鶏卵バイオリクターの構築では、ゲノム編集技術を用いた場合でも遺伝子改変体の作出に2-3年もの時間を要するため、生産する有用タンパク質の評価を迅速に実施することができない。そのため、生産量・活性等に問題があった場合、生産系の構築を最初からやり直す必要がある。従って、鶏卵バイオリクターシステムを実用化していくためには、生産系の構築を迅速に行う必要がある。そこで、重要となるのが、①ゲノム編集ニワトリ作出の効率化②鶏卵バイオリクターの迅速な評価である。本研究は、鶏卵バイオリクターの実用化を目指し、この2点に取り組んだ。

ニワトリの遺伝子改変は、哺乳類と比較して困難である。それは、ゲノム編集の標的となる一細胞期受精卵が、豊富な卵黄に覆われ直接的な操作が難しく、体外受精法も確立されていないことに起因する。従って、ニワトリの遺伝子改変は、幹細胞がゲノム編集の標的となる。多能性幹細胞 (pluripotent stem cells : PSCs) は三胚葉に分化でき、自己複製能を示す細胞である。最初の PSCs であるマウス胚性幹細胞 (mouse embryonic stem cells: mESCs) は、1981年にマウスの内部細胞塊を用いて樹立された [19]。その培養に利用される白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor : LIF) は、試験

管内で未分化の mESCs を維持する重要な因子である[20]. LIF が受容体に結合すると、チロシンキナーゼである Janus kinase (JAK) が活性化され, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) のリン酸化を介して mESCs の多能性と自己複製能の維持をサポートする (JAK/STAT シグナル)[21]. 2008 年には, mitogen-activated protein kinase (MAPK) が仲介する分化シグナルと glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) の阻害を含む培養系が, mESCs の培養を強力にサポートすることが報告された [22]. 再生医療や動物遺伝学の進歩により, ヒトを含む様々な哺乳動物で PSCs が樹立されている. しかし, マウスやラットなどの齧歯類と他の動物種の PSCs の増殖シグナルは, 明確に異なっている. 齧歯類では, JAK/STAT シグナルが PSCs の自己複製に重要であるのに対し, ヒトの PSCs では FGF ファミリーの一つである fibroblast growth factor 2 (FGF2) が重要である [23].

哺乳類だけでなく, 鳥類であるニワトリでも, ニワトリ胚性幹細胞 (chicken embryonic stem cells : chESCs) の研究が進んでいる. ニワトリでは, 哺乳類と発生段階が異なっており, 哺乳類の胚盤胞の内部細胞塊に相当する段階が観察されない. ニワトリでは, 胚盤葉を用いた移植実験により, 胚盤葉が体細胞と生殖細胞に分化できることが示されたため [24], 胚盤葉を採取して *in vitro* で培養することにより chESCs が樹立された [25]. 2004 年, ニワトリ LIF (chLIF) がクローニングされ [26], chLIF による STAT3 のリン酸化が chESC の維持に重要であることが報告された [27]. 興味深いことに, chESCs は mESCs と同様に JAK/STAT シグナルを活性化することで多能性を維持し [28], 初期胚への移植でキメラ形成能を示す [29]. さらに, RNA-seq 解析により, chESCs の遺伝子発現プロファイルは, mouse epiblast stem cells (mEpiSCs) [30] より mESCs に類似することが示された [31]. しかし, mESCs の特徴である生殖細胞系列への伝達は, chESC ではほとんど観察されていない [32]. さらに, 哺乳類の PSCs の中心的な多能性因子である Oct4 の相同遺伝子である PouV は, ニワトリにおいて多能性の

維持に関連しない可能性がある [33]. これらの知見から, chESCs はユニークな特徴を持つと考えられる. 従って, chESCs を利用して, ゲノム編集ニワトリの作出を行うためには, より詳細な chESCs の性状解析が求められる.

前述したように, 鶏卵バイオリアクターの構築では, 系の構築過程で発現タンパク質の評価を実施することができない. これは, このシステムを実用化する障壁となっている. 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. このシステムを構築するためには, 卵白成分を恒常的に発現する細胞株 (卵管上皮細胞) が必要である. 卵管上皮細胞は, 成熟した雌ニワトリの卵管内に存在し, ステロイドホルモンに応答し, 卵白成分を分泌する. ニワトリは多量のタンパク質を生産するため, 卵白成分の発現誘導システムはバイオリアクターに有用である. 従って, *in vitro* におけるホルモン応答に関する研究 [34]や, 医薬品タンパク質生産への利用 [35]を目的に, 卵管上皮の細胞株を樹立する試みがされてきた [36] [37]. しかし, 卵管上皮細胞の培養系は現在確立されていない. それは, 卵白成分を発現する卵管上皮細胞の単離が難しい事に起因する. ニワトリ卵管から採取した細胞群の中には, 目的の卵管上皮細胞の他に, 非分泌性の真皮線維芽細胞や上皮細胞-真皮線維芽細胞の中間の形態をもつ複数の細胞種が存在し, 目的の細胞群のみを *in vitro* で増殖させることは困難である [37]. さらに, 卵管内部は粘膜に覆われ, これが酵素処理の妨げになっている [38]. 鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価を可能にするためには, 以上の課題を回避し卵白成分を発現する細胞株の樹立が求められる.

以上の背景から, 本研究では, 鶏卵バイオリアクターの社会実装を最終目的に, その構築に必要な技術に関する研究に取り組んだ. 第2章では, cESCs を利用したゲノム編集ニワトリ作出を目指して, chESCs の培養条件の検討を実施した. 第3章では, 鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価系の構築を目的に, 卵白成分を発現する培養細胞株の樹立と, 細胞株を利用した *in vitro* 評価に取り組んだ.

第2章

ニワトリ ES 細胞の培養条件の検討

2-1 序論

前章で述べたように、chESCs は、mESCs と同様に LIF により活性化される JAK/STAT シグナルが多能性の維持に寄与する。その一方で、多能性関連因子の差異、潜在的な分化能の違いから chESCs は哺乳類 PSCs とは異なるユニークな特徴を有すると考えられる。その違いの一つであり、ゲノム編集個体を作成する上で焦点となる、生殖細胞への分化能が chESCs ではほとんど確認されていない [32] [39]。

本研究では、生殖細胞への分化が可能な chESCs の樹立を目指し、培養条件の検討に着手した。その中で、mESCs の増殖を支える代表的なシグナル伝達経路である Wnt/ β -カテニンシグナル経路に注目した。Wnt 遺伝子ファミリーは、胚発生を制御する糖タンパク質をコードしている [40]。Wnt/ β -カテニンシグナル経路が活性化されると、 β -カテニンは核に移動し、T 細胞因子 (T-cell factor : TCF) とリンパ球エンハンサー結合因子 (lymphoid enhancer-binding factor : LEF) ファミリーに結合し、転写因子として機能する。Wnt/ β -カテニンシグナル経路の活性化は、未分化な mESCs を維持することが報告されている [41] [42]。しかしながら、哺乳類の PSCs において重要な役割を果たす Wnt/ β -カテニンシグナル伝達が chESCs に及ぼす影響については、未だ不明である (図 1)。

そこで、本研究では Wnt/ β -カテニンシグナル経路を活性化、阻害する低分子阻害剤を利用することで、Wnt/ β -カテニンシグナル経路が chESCs の多能性維持にもたらす影響を解析した。その後、得られた知見をもとに、chESCs の培養条件を最適化し、chESCs の多能性を遺伝子の発現レベル、分化能の双方から評価した。

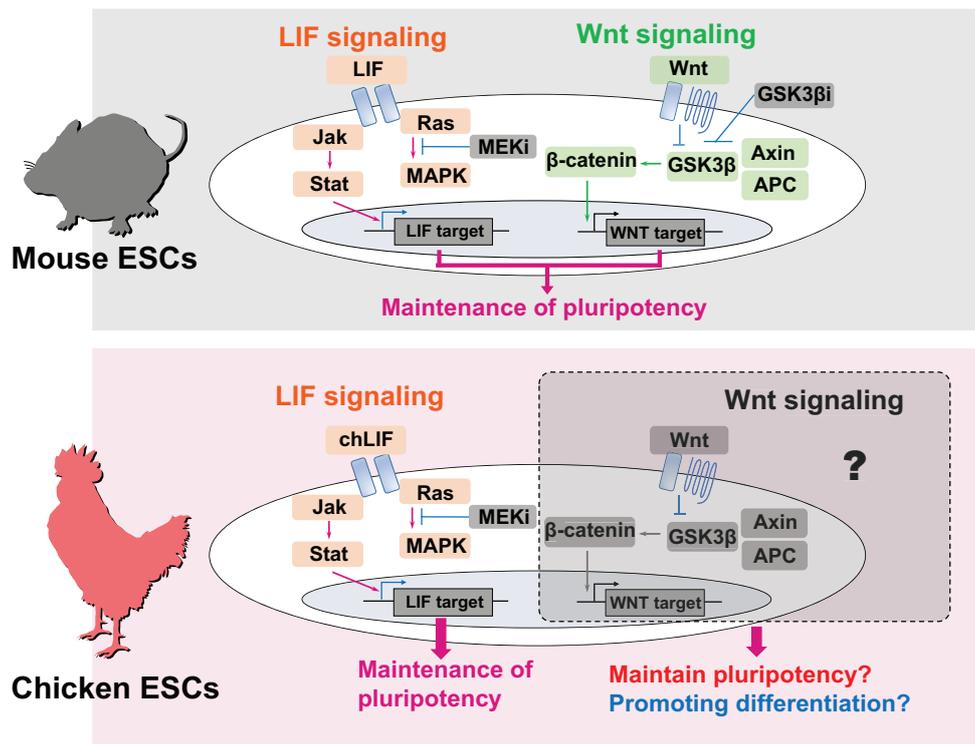


図1. マウス ESCs とニワトリ ESCs の多能性維持に関連するシグナル経路

2-2 材料と方法

(1) 実験動物

本実験では白色レグホーン種の受精卵を用いた。白色レグホーンの受精卵は株式会社アキタフーズから購入した。ニワトリ胚盤葉細胞 (Chicken blastoderm cells : CBCs) は, Eyal-Giladi and Kochav [43]が定義する胚 X 期の受精卵から、既報のプロトコールに従って採取した [44] (図 2)。本研究で実施した動物実験は、広島大学動物実験委員会の承認 (承認番号 : C21-45-4) を受け、広島大学のガイドラインに従って実施した。

(2) chESCs の培養

CBCs は、フィーダー細胞を播種した 6 ウェルプレートまたは 60 mm ディッシュ (Corning) で、38°C、5% CO₂、3% O₂ の条件下で培養した。フィーダー細胞として、Sandoz inbred mouse-derived thioguanine- and ouabain-resistant (STO) 細胞 (American Type Culture Collection) を用いた。STO 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS; Sartorius AG) を添加した DMEM (Thermo Fisher Scientific) 中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養した STO 細胞を 10 µg/ml のマイトマイシン C (Sigma-Aldrich) で処理し、0.1%ゼラチン (nacalai tesque) -DW でコートした 6 ウェルプレートまたは 60 mm ディッシュに、フィーダー細胞を 1.5×10^4 cells/cm² の密度で播種した。

chESCs は、20 % Knockout Serum Replacement (KSR; Thermo Fisher Scientific) , 2 % chicken serum (Thermo Fisher Scientific) , 1 × sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific) , 1 × MEM non-essential amino acid solution (Thermo Fisher Scientific) , 1 × EmbryoMax nucleosides (Merck) , 1 × GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) , 1 × antibiotic-antimycotic mixed stock solution (nacalai tesque) , 1 × monothioglycerol (富士フイルム和光純薬) を添加した chicken embryonic stem cell medium (CESM) で培養し

た. chESCs は TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて単離し, 2-3 日ごとに継代した. 培地の半分は毎日新鮮な培地と交換した.

その他の添加物は, 20 ng/ml chLIF [26], 1 μ M PD0325901 (Axon Medchem) , 10 μ M Y-27632 (Fujifilm Wako Pure Chemical) , 3 μ M CHIR99021 (Focus Biomolecules) , 5 μ M XAV939 (Fujifilm Wako Pure Chemical) , 5 μ M IWP-2 (Fujifilm Wako Pure Chemical) , および 2 μ M Gö6983 (Fujifilm Wako Pure Chemical) を適宜添加した.

(3) コンパクトコロニーのカウント

コンパクトな高密度コロニーの割合を測定するために, コロニー形成アッセイを行った [45]. chESCs を様々な条件下で培養し, コロニー形成後, IX71 顕微鏡 (オリンパス) を用いてランダムな 10 視野を撮影した. 視野内 (約 2.2 mm²) の高密度のコンパクトコロニーを数え, 総コロニー数を用いて, コンパクトなコロニーの割合を算出した.

(4) Alkaline phosphatase (AP) 染色

6 ウェルプレートで培養した chESCs を AP 染色に供試した. 培養液を除去し, chESCs を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後, 4 % paraformaldehyde (PFA ; Fujifilm Wako Pure Chemical) で固定した. 固定した chESCs を, Stemgent AP Staining Kit II (ReproCELL) を用いて, プロトコールに従って染色した.

(5) RT-qPCR

FastGene RNA Premium Kit (Nippon Genetics) を用いて, chESCs から全 RNA を抽出した. 抽出した RNA を SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した. RT-qPCR は, KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い

て行った。サイクル条件は、初期変性 98°C 2 分の後に、98°C, 10 秒, 60°C 10 秒, 68°C 1 分を 40 サイクル実行した。融解曲線分析条件は、95°C 15 秒, 60°C 1 分, 99°C 15 秒の条件で実行した。標的遺伝子は β -actin, 多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*) , 生殖細胞マーカー (*Cvh*, *Dazl*) で、プライマーの配列は表 1 に示した。遺伝子発現は β -actin の発現量で正規化した。

(6) 免疫細胞化学染色

chESCs の多能性マーカーの発現を免疫細胞化学染色法により解析した。chESCs を 4%PFA-PBS で 20-25°C, 30 分間固定し、PBS で洗浄した。その後、0.1% TritonX-100-PBS を加え、20-25°C で 5 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、chESCs を 3%BSA-PBS で 20-25°C で 15 分間ブロッキングした。0.1%BSA-PBS で洗浄後、一次抗体 (抗 Nanog 抗体 [29], 1%BSA-PBS で 1:25 に希釈) および抗 Stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) 抗体 (sc-21702; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; 1%BSA-PBS で 1:100 に希釈) と共に 37°C で 40 分間インキュベートした。0.1% BSA-PBS で洗浄後、chESCs を二次抗体 : ヤギ抗マウス IgM (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse immunoglobulin M [IgM; μ chain]; Ref: A21042; Thermo Fisher Scientific; 1%BSA-PBS で 1:200 希釈) およびヤギ抗ウサギ IgG (Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit immunoglobulin G [IgG; H+L]; Ref: A11037; Thermo Fisher Scientific; 1% BSA-PBS で 1:200 に希釈) と共に 37°C で 40 分間インキュベートした。洗浄後、chESCs を VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame) with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で封入した。蛍光観察は蛍光顕微鏡 (BX53; オリンパス) を用いて観察した。

(7) Stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) 陽性細胞比率の測定

各種条件で培養した chESCs の, SSEA-1 陽性細胞の割合を MA900 セルソーター (Sony Biotechnology) を用いて測定した. TrypLE Express を用いて chESCs を単一細胞に分離し, 洗浄バッファー (0.5 % bovine serum albumin (BSA), 0.1 % N_3Na -PBS) で洗浄した. 洗浄後, chESCs を抗 SSEA-1 抗体: SSEA-1 (480) Alexa Fluor 488 (sc-21702 AF488; Santa Cruz Biotechnology; 洗浄バッファーで 1:100 に希釈) と氷上で 40 分間反応させた. インキュベート後, chESCs を洗浄バッファーで洗浄し, 1 % PFA-PBS で固定した. 測定前に, chESCs をさらに洗浄バッファーで 2 回洗浄し, 測定に供試した.

(8) Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 発現 chESCs の樹立

chESCs の *in vivo* における分化能を評価するため, chESCs を蛍光標識した. EGFP-chESCs は PiggyBac システムを用いて作製した. PiggyBac transposase (PBase) と EF1 α -EGFP を発現する 2 種類のベクターを Vector Builder Japan に委託し, 構築した. そのベクターマップを図 3 に示す. 遺伝子導入には Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた. 遺伝子導入の 7 日後, EGFP を発現する chESCs を MA900 セルソーターにより分取することで, EGFP-chESCs を樹立した.

(9) EGFP-chESCs を用いたキメラニワトリの作出

樹立した EGFP-chESCs (2.0×10^4 cells) を白色レグホーン受精卵の胚盤葉下腔に注入し, レシピエント胚を発生させた. 5 日後, 胚を卵黄から分離し, PBS で洗浄した後, 蛍光実体顕微鏡 (Leica M165 FC; Leica Microsystems GmbH) を用いてニワトリキメラ胚を観察した.

(10) 統計解析

得られたデータは GraphPad Prism 10 ソフトウェアを用いて統計解析を実施し, グラ

フを作成した。2 群間で得られた結果の比較には Welch's t-test を用い、多重比較には Tukey's test を用いた (ns: not significant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

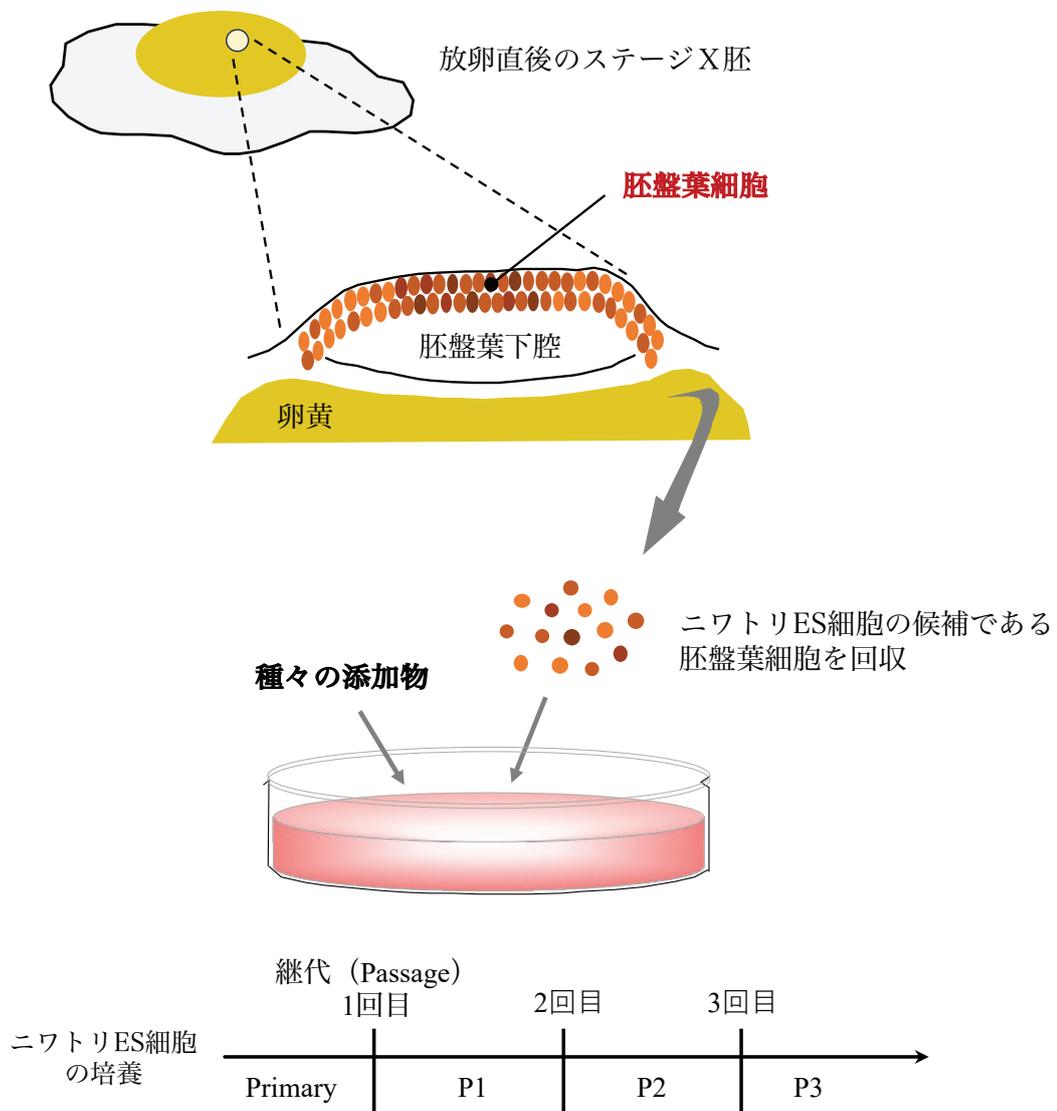


図2. ニワトリ胚盤葉細胞の回収と培養の模式図.

表 1. RT-qPCR に使用したプライマー

| Gene | Sequence (5'→3') | Annealing temperature (°C) |
|------------------------|-------------------------|----------------------------|
| <i>β-actin</i> forward | ACCCCAAAGCCAACAGAGAG | 65 |
| <i>β-actin</i> reverse | AACACCATCACCAGAGTCCATC | |
| <i>Nanog</i> forward | AAGGTGGAACAAGCTGCAAC | 65 |
| <i>Nanog</i> reverse | ACAGGAGAGCTCGAGAACTG | |
| <i>Sox2</i> forward | CCAACTCGGCCGGAACAAC | 65 |
| <i>Sox2</i> reverse | CGCGGGACCACACCATGAAG | |
| <i>Lin28a</i> forward | CGGTAACAGCCACAACCTCGGAA | 65 |
| <i>Lin28a</i> reverse | CTTCGCACCTGCAAACCTGCT | |
| <i>Dnmt3b</i> forward | CAAACCACTGGGCGTCAAAG | 65 |
| <i>Dnmt3b</i> reverse | ATGAACAAGGCACAGCACCT | |
| <i>Prdm14</i> forward | GTTTCGCCTACCGCTACTACC | 65 |
| <i>Prdm14</i> reverse | CAGAGGTGGCAGGGGAATTT | |
| <i>Cvh</i> forward | CAAAGCACAGGTGGTGAACG | 65 |
| <i>Cvh</i> reverse | GAACGGAAATCGCGAAGAGC | |
| <i>Dazl</i> forward | GCTCAGACGTATGCGTACAG | 65 |
| <i>Dazl</i> reverse | GTGGTGGAGCCTGATAGTTG | |

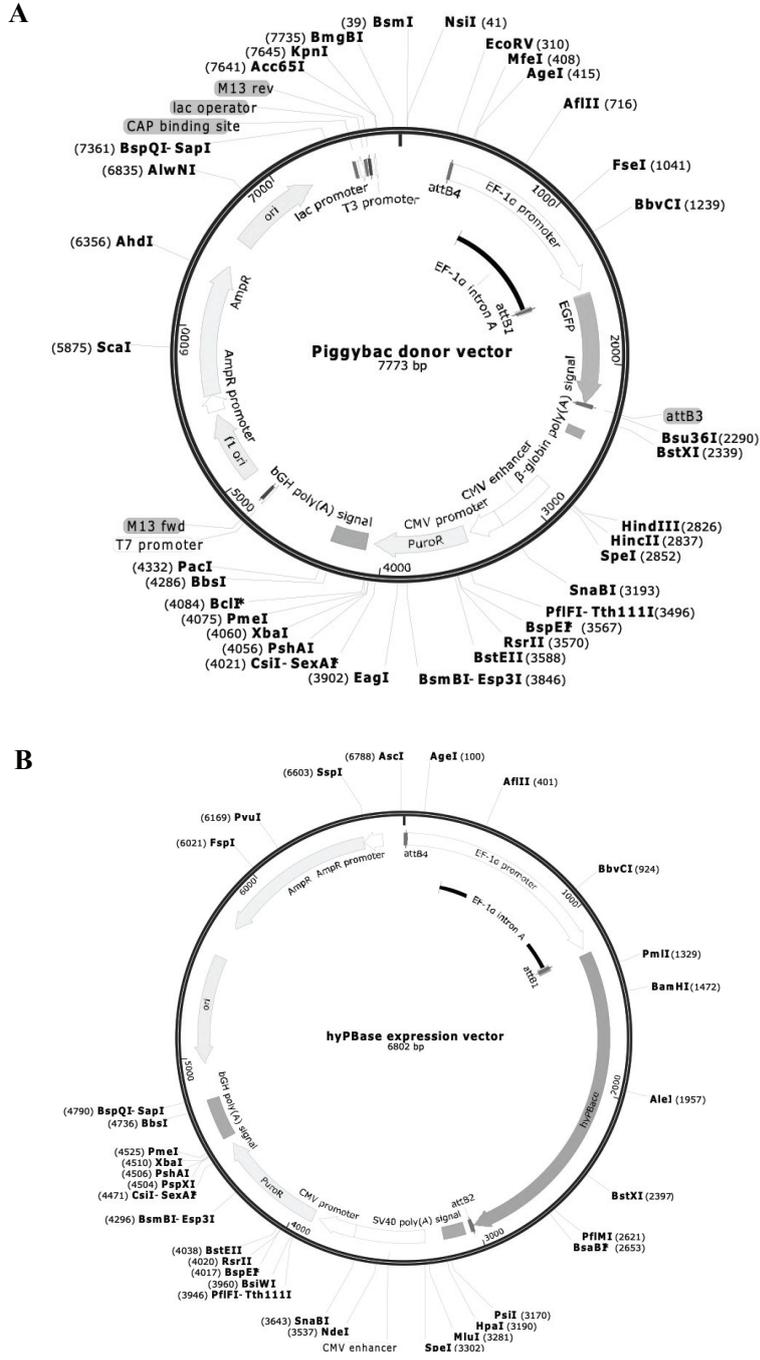


図 3. chESCs の蛍光標識に利用したプラスミドベクターのベクターマップ。(A) EF1 α -EGFP を搭載するドナーベクター。(B) EF1 α -PBase を搭載する発現ベクター (Snap Gene Viewer により表示).

2-3 成績

(1) chLIF と 2 種類の阻害剤 (PD0325901, Y-27632) を用いた chESCs の培養

先行研究で報告されている条件下で, chESCs を安定に培養できるかどうかを調べた. chESCs の培養には, JAK/STAT シグナルの活性化と MAPK Kinase (MEK) の阻害が有用であるため [26] [46], ステージ X の受精卵から採取した chicken blastodermal cells (CBCs) を, chLIF と 2 種類の低分子阻害剤 (PD0325901 と Y-27632 ; 2i + LIF 条件) の存在下で培養した. 培養された CBCs はコロニーを形成し, 2i + LIF 条件下で安定に増殖した. 興味深いことに, chESCs は 2 種類のコロニーを形成した (図 4-A). mESCs と同様に細胞密度が高いコンパクトなコロニー (黒矢印) と, 個々の細胞が明瞭な平坦なコロニー (白矢印) をそれぞれ示す. chESCs の未分化能を評価するため, Alkaline phosphatase (AP) 染色すると, 小さなコロニーは強く染色され, 平坦なコロニーは弱く染色された (図 4-B). このことから, 小コロニーは平らなコロニーよりも高い多能性を保持していることが示唆された. 最初の継代 (P1) 後, コンパクトコロニーの数は急速に減少した (図 5). 3 回目の継代 (P3) では, 小型コロニーの割合が P1 後に比べて増加した. 培養 2-3 週間が経過すると, 2 種類のコロニーが共存した状態で, 安定した増殖を示した.

(2) chESCs における Wnt/ β -カテニンシグナル活性化の影響

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. CHIR99021 はアミノピリミジン誘導体で, GSK3 α と GSK3 β を阻害する. CHIR99021 を添加すると初代培養において, chESCs は 2i + LIF 条件下と同様に, コンパクトなコロニーを形成した (図 6, 黒矢印). しかし, P1 以降, コンパクトなコロニーの数は著しく減少し, 各細胞は個々の細胞が明瞭な平坦なコロニーを形成した. その後, コンパクトな

コロニーはほとんど形成されず、ほとんどの chESCs は平坦なコロニーを形成した。CHIR99021 の添加が chESCs の多能性維持に機能しているかどうかを調べるために、多能性関連マーカー (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*) および生殖細胞マーカー (*Cvh* および *Dazl*) の発現レベルを RT-qPCR により解析した。これらのマーカーの発現は、CHIR99021 添加後 5 日目から 9 日目にかけて経時的に減少した (図 7)。

CHIR99021 添加条件下で培養した chESCs は AP 染色陰性であり (図 8) , これは RT-qPCR の結果と一致した。これらの結果から、Wnt/ β -カテニンシグナルの持続的な活性化は、chESCs の多能性の維持を促進しないことが示唆された。

(3) chESCs における Wnt/ β -カテニンシグナル阻害の効果

CHIR99021 添加後、多能性関連マーカーおよび生殖細胞マーカーの発現レベルが低下したため、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化が分化を誘導していると考え、Wnt/ β -カテニンシグナル経路の阻害を試みた。Wnt/ β -カテニンシグナル阻害には、タンキラーゼの阻害剤である XAV939 を用いた。さらに、chESCs の培養条件を最適化するために、ヒトの PSCs の培養に利用されるプロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) 阻害剤である Gö6983 を添加した。4 種類の阻害剤 (PD0329501, Y-27632, XAV939, Gö6983) と chLIF (4i+LIF) の存在下で chESCs を培養した。XAV939 は、2.5-10 μ M の濃度で、SSEA-1 陽性細胞の割合を増加させた (図 9)。XAV939 の添加濃度が高いほど、より迅速な SSEA-1 陽性率の上昇が見られたが、培養を継続していくにつれて陽性率の差は小さくなった。その中で、安定した SSEA-1 陽性率の増加が見られた 5 μ M の XAV939 を培養系に添加した。CBCs の初代培養では、コロニーの約 40% がコンパクトタイプであった (図 10)。P1 後、いくつかの平坦なコロニーが観察された。しかし、同時に chESCs は 2i 条件下で観察されたコロニーと比較して、より多くのコンパクトコロニーを形成した ($p < 0.0001$)。さらに P3 以降は、80% 以上の chESCs がコンパクト

トなコロニーを形成した。継代条件にも特徴が見られ、4i + LIF 条件下で培養した chESCs は、シングルセル継代が可能であった。4i + LIF 条件下で chESCs が多能性を維持しているかどうかを調べるため、多能性関連マーカー (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*) および生殖細胞マーカー (*Cvh* および *Dazl*) の発現レベルを RT-qPCR により解析したところ、これらのマーカーの発現レベルは5日目から9日目まで経時的に上昇した (図 11)。さらに、多能性マーカーである SSEA-1 と *Nanog* の発現を免疫細胞化学染色で調べた。その結果、SSEA-1 は細胞膜に、*Nanog* は核に局在しており、多能性マーカーの発現が確認された (図 12-A)。形成されたコンパクトなコロニーは AP 染色で強い陽性を示した (図 12-B)。これらの結果から、Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤である XAV939 と PKC 阻害剤である Gö68983 が、chESCs の多能性維持に効果的であることが示唆された。

(4) chESCs の多能性維持に関与する因子 (サイトカイン, 阻害剤) の特定

4i + LIF 条件下で培養した chESCs は mESCs と類似したコンパクトなコロニーを形成し、安定した多能性関連遺伝子の発現を示した。この現象がどの添加物により生じているかを特定するため、各因子の非存在下で chESCs を培養した。chLIF 非存在下では、2 回目の継代 (9 日目) でコンパクトなコロニーが形成された。しかし、4 回目の継代 (14 日目) 後には、一部のコロニーが線維芽細胞様細胞に分化していた (図 13)。PD0325901 非存在下では、chESCs はコンパクトなコロニーを形成し、安定した増殖を示した。興味深いことに、PKC 阻害剤である Gö6983 の非存在下では、個々の細胞が明瞭な平坦なコロニーの形成が促進された。重要なことは、XAV939 非存在下では、コンパクトなコロニーはほとんど観察されず、細胞は最終的に増殖を停止して死滅したことである。多能性マーカーである SSEA-1 の陽性率をフローサイトメトリーで解析した。SSEA-1 陽性細胞の割合は、XAV939 添加後に有意に増加した ($p <$

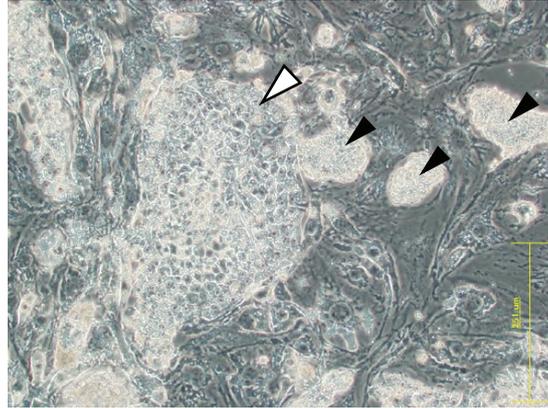
0.0001) (図 14). 以上のことは, Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤である XAV939 が, chESC の多能性維持を促進したことを示している.

次に, 他の Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤によって chESC の多能性が維持されるかどうかを調べた. そこで, XAV939 とは作用点が異なる Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤である IWP-2 を用いた (図 15). まず, IWP-2 の添加濃度を決定するため, 濃度検討を実施した (図 16). 5 μ M, 10 μ M を検討し, 5 μ M の IWP-2 を培養系に添加した. IWP-2 の存在下で培養した chESC はコンパクトなコロニーを形成し, そのコロニーは XAV939 の存在下で培養した chESC のコロニーと類似していた (図 17). しかし, コンパクトなコロニーの割合は, XAV939 添加群よりも IWP-2 添加群の方が低かった ($p < 0.0001$). フローサイトメトリーにより SSEA-1 陽性割合を解析した結果, IWP-2 添加群ではコントロール群 (DMSO 添加群) よりも SSEA-1 陽性細胞の割合が有意に高かった (図 18; $p < 0.05$). しかしながら, IWP-2 添加群の陽性率は XAV939 添加群よりも有意に低かった ($p < 0.05$). これらの結果から, Wnt/ β -カテニンシグナルの阻害は chESC の多能性維持に機能することが明らかになった. 一方で, 多能性維持の効果は阻害剤の種類によって異なることが示唆された.

(5) chESC の分化能の評価

Wnt/ β -カテニンシグナル活性化剤および阻害剤の存在下で培養した chESC の *in vivo* における分化能を評価した. 移植後, レシピエント胚との区別ができるように, chESC を蛍光標識した (図 19). EGFP-chESC (2.0 $\times 10^4$ cells) を受精卵の胚盤葉下腔に移植し, 5 日間孵卵した (図 20-A). XAV939 添加条件で培養した EGFP-chESC を移植した胚では, EGFP 蛍光が観察された (図 20-B). 一方, CHIR99021 培地で培養した移植-EGFP-chESC を移植した胚では, 僅かな EGFP の蛍光しか観察できなかった.

A



B

AP 染色

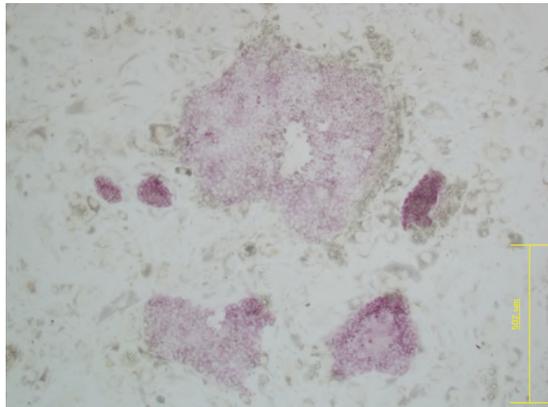


図 4. chLIF+PD0325901+Y-27632 (2i+LIF) 条件下で培養した chESC の形態観察と多能性評価. (A) 白い矢印は平らなコロニー, 黒い矢印は細胞密度が高いコンパクトなコロニーを示す. (B) 胚盤葉細胞回収後, 12 日間培養した chESC の AP 染色の結果.

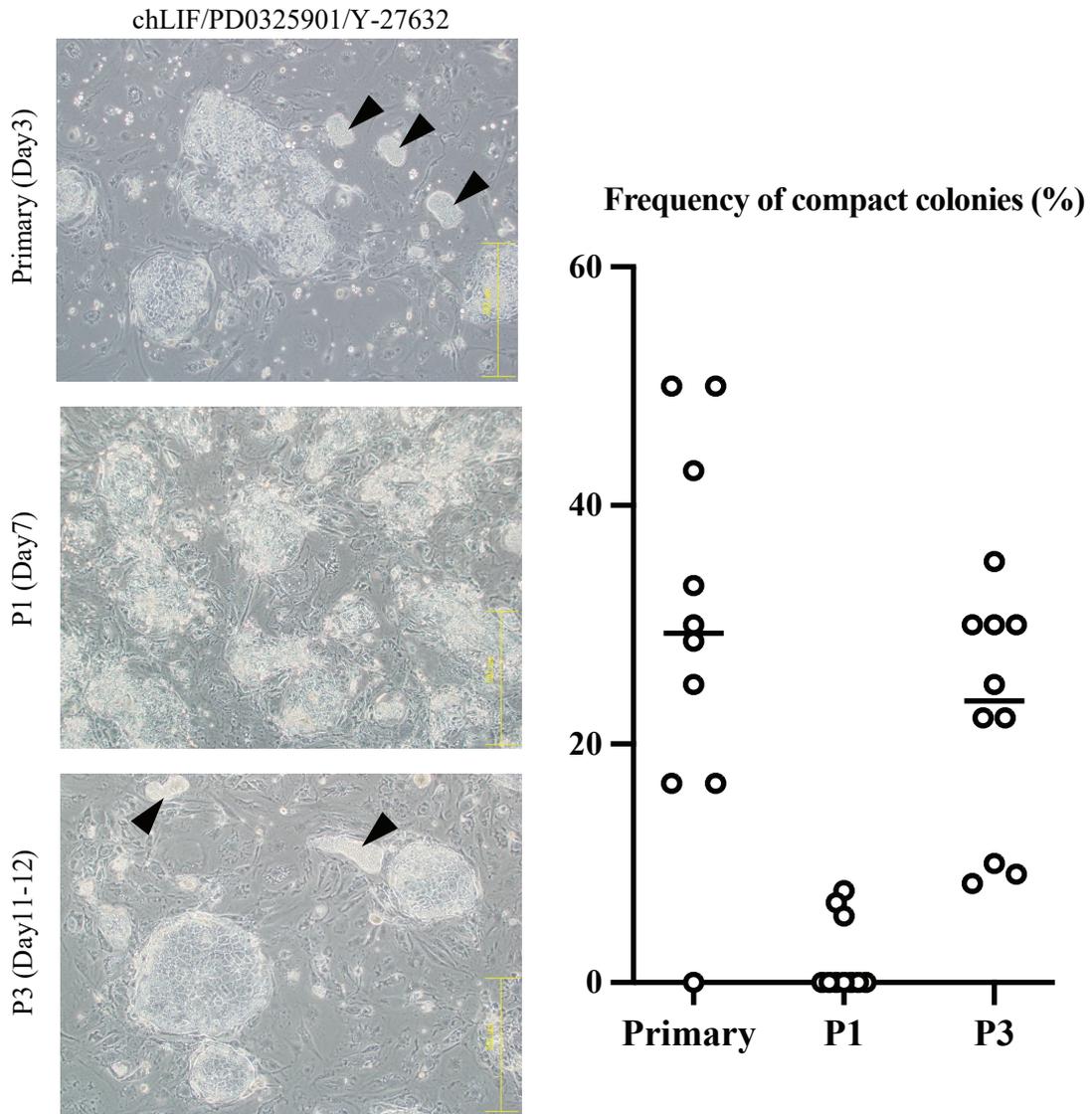


図 5. chLIF+PD0325901+Y-27632 (2i+LIF) 条件下で培養した chESCs の経時的な形態変化. 黒い矢印はコンパクトなコロニーを示す. グラフは, それぞれの培養期間におけるコンパクトコロニーの割合を示す. 各プロットは, 算出された割合を表し黒い直線は平均値を表す.

chLIF/PD032/Y-27632
/CHIR99021

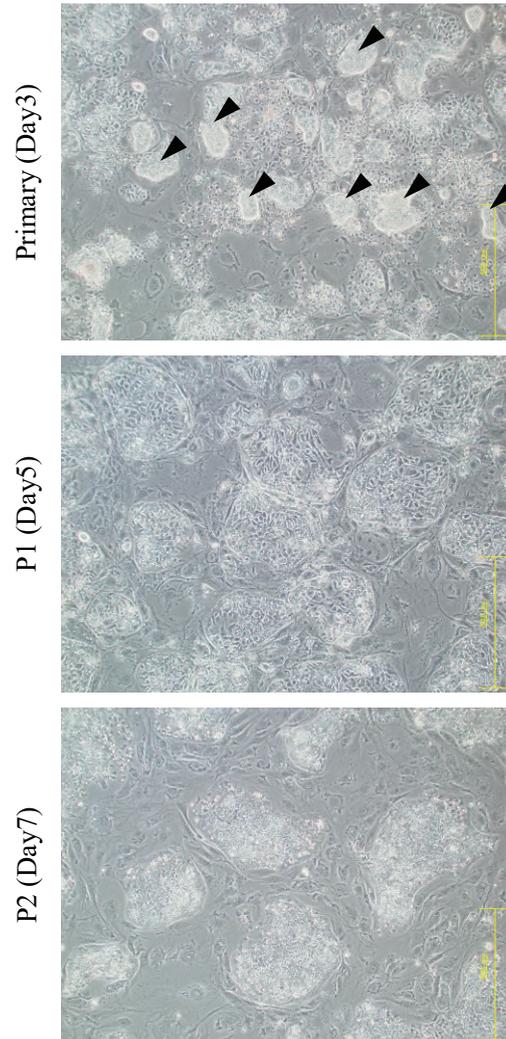


図 6. CHIR99021 添加条件下で培養した chESCs の経時的な形態変化. 黒い矢印はコンパクトなコロニーを示す.

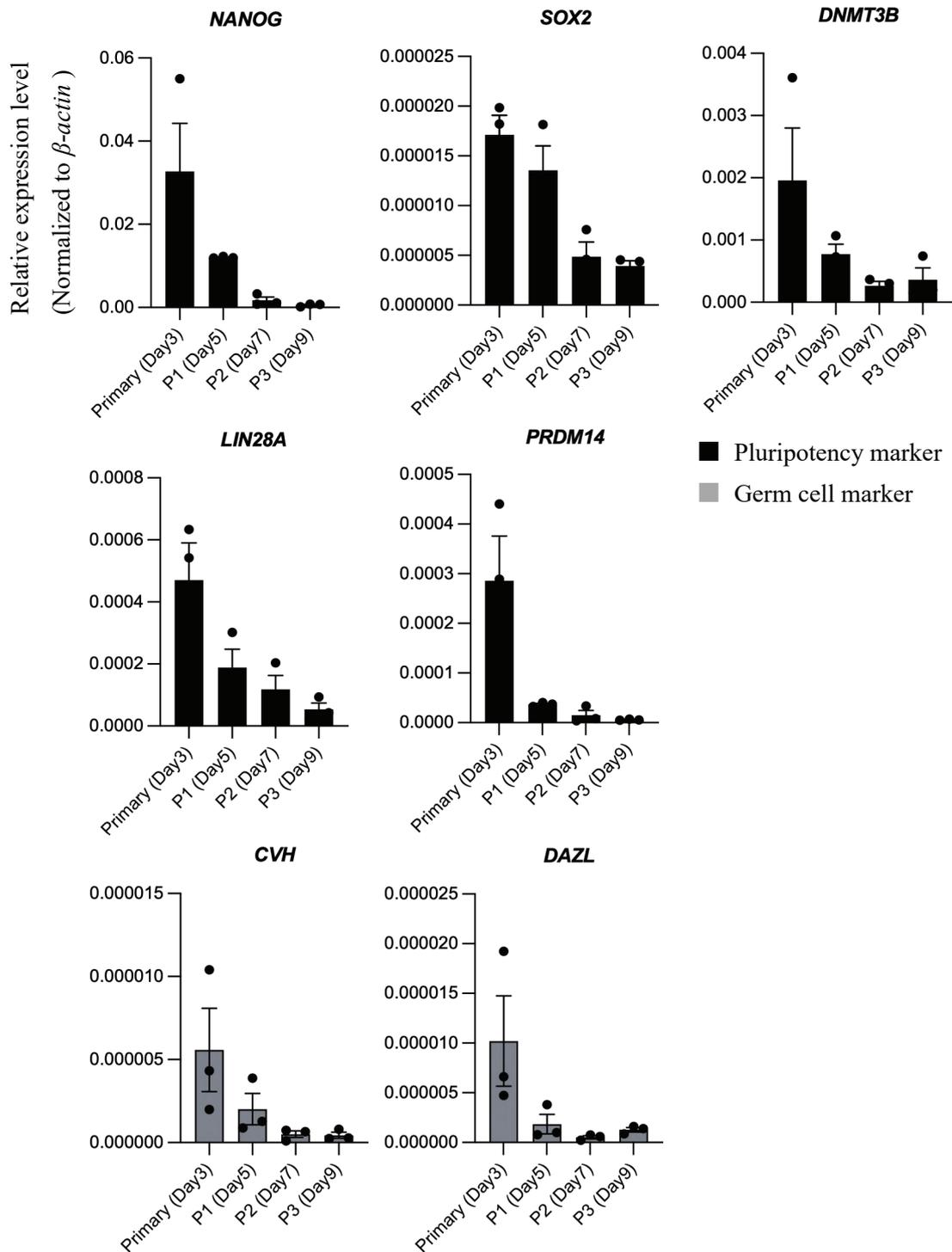


図 7. RT-qPCR による多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Dnmt3b*, *Lin28a*, *Prdm14*) および生殖細胞関連遺伝子 (*Cvh*, *Dazl*) の発現解析. 胚盤葉細胞を回収し, CHIR99021 添加条件 (LIF+PD0325901+Y-27632+CHIR99021) で培養した chESCs の遺伝子発現の変動を示す. エラーバーは, 平均値の標準誤差 (SE) を表す (n=3).

AP 染色

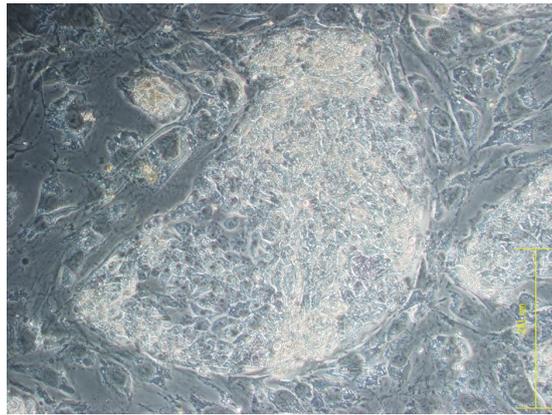
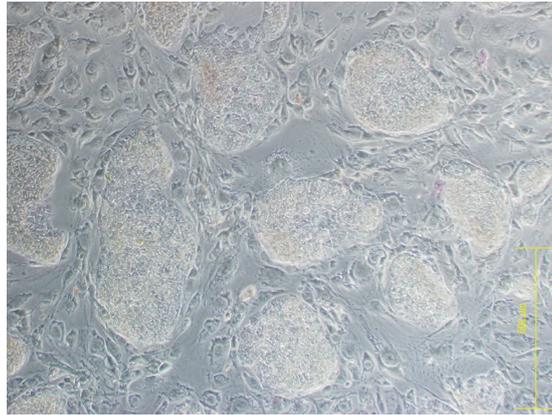
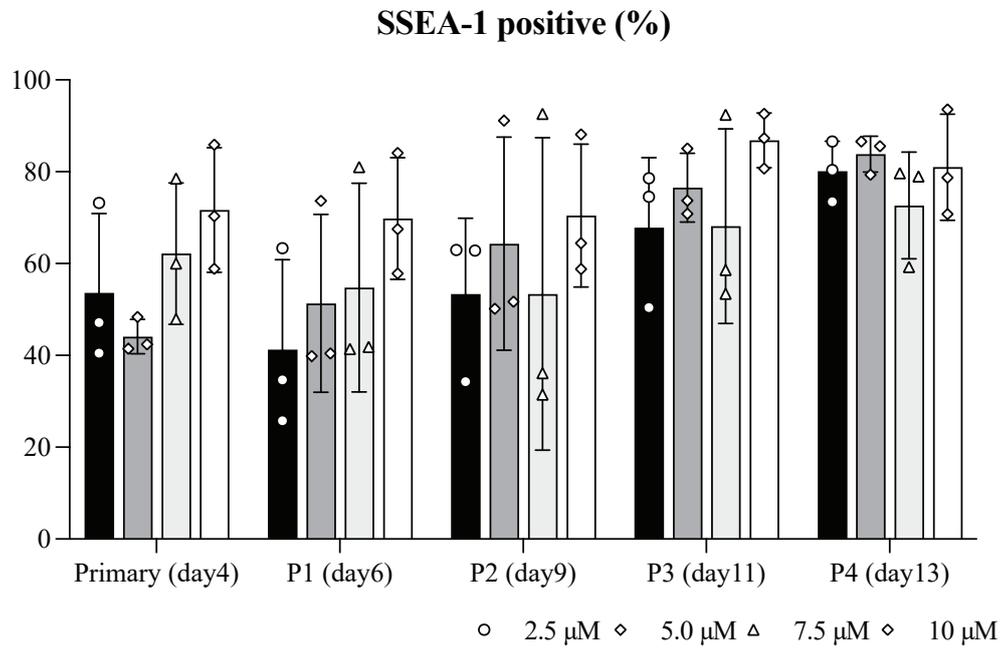


図 8. CHIR99021 添加条件 (LIF+PD0325901+Y-27632+CHIR99021) で培養した chESCs の AP 染色結果. CHIR99021 添加後, 7 日間培養した chESCs を染色に供試した.

A



B

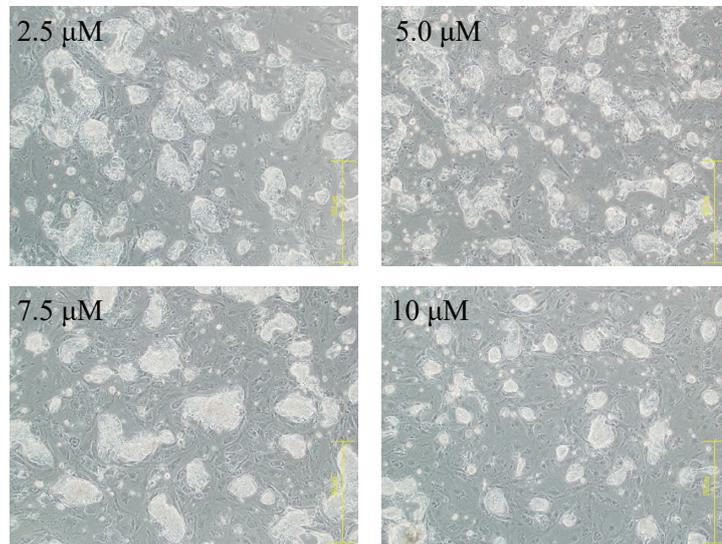


図9. XAV939の濃度検討。(A) XAV939を異なる濃度で添加した場合の、SSEA-1陽性率の経時的な変化。エラーバーは、平均値の標準偏差(SD)を表す。(B) XAV939添加時のchESCsの形態観察。添加濃度は2.5, 5.0, 7.5, 10 μM 。

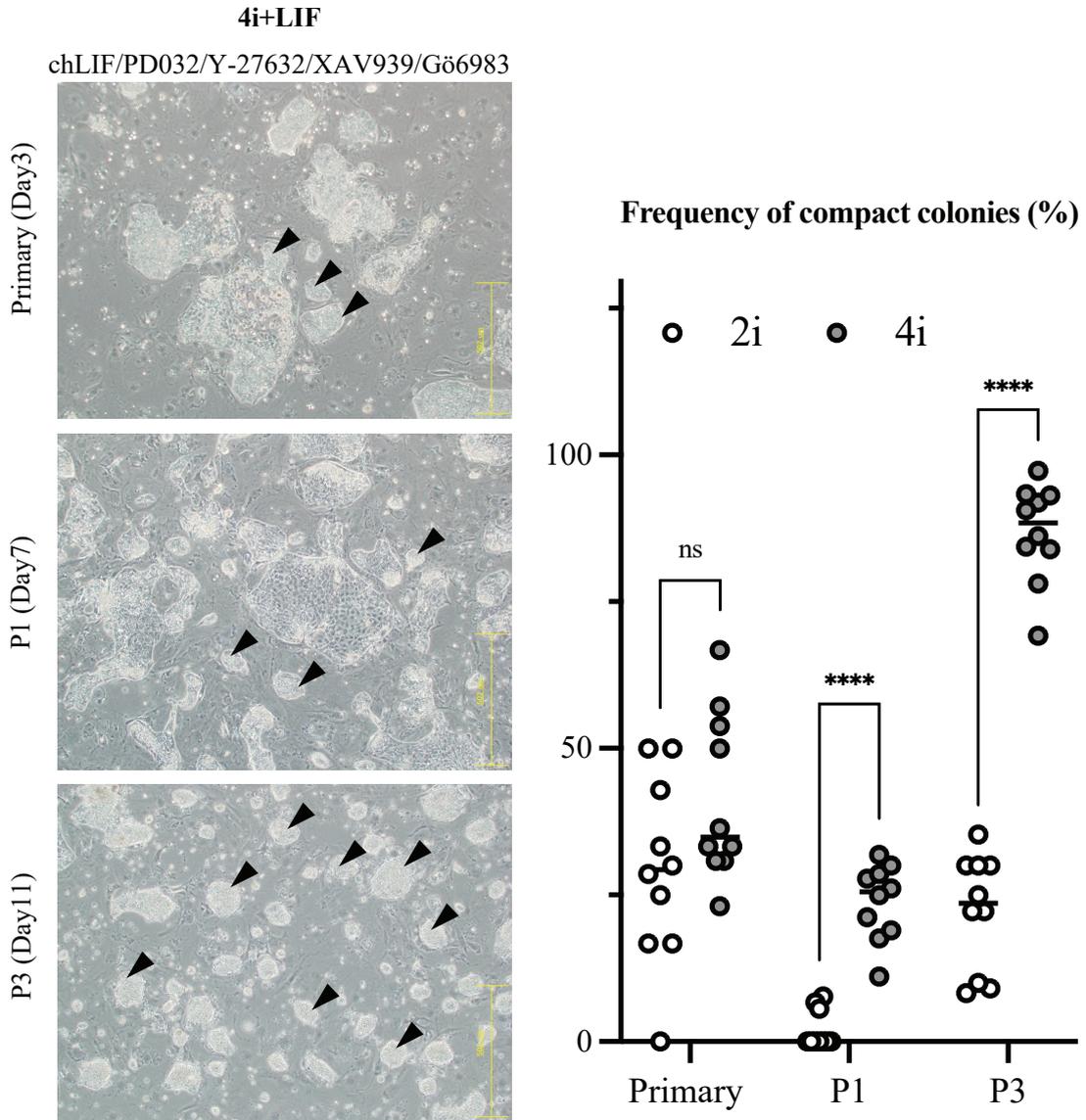


図 10. chLIF+PD0325901+Y-27632+XAV939+Gö6983 (4i+LIF) 条件下で培養した chESCs の経時的な形態変化. 黒い矢印はコンパクトなコロニーを示す. グラフは, それぞれの培養期間におけるコンパクトコロニーの割合を示す. 白いプロットは, 2i+LIF 条件下で形成されたコンパクトコロニー, 灰色のプロットは, 4i+LIF 条件下で形成されたコンパクトコロニーの割合を示す. 統計解析は, Welch's t-test により行われた. ns: not significant; ****p < 0.0001 (n = 10).

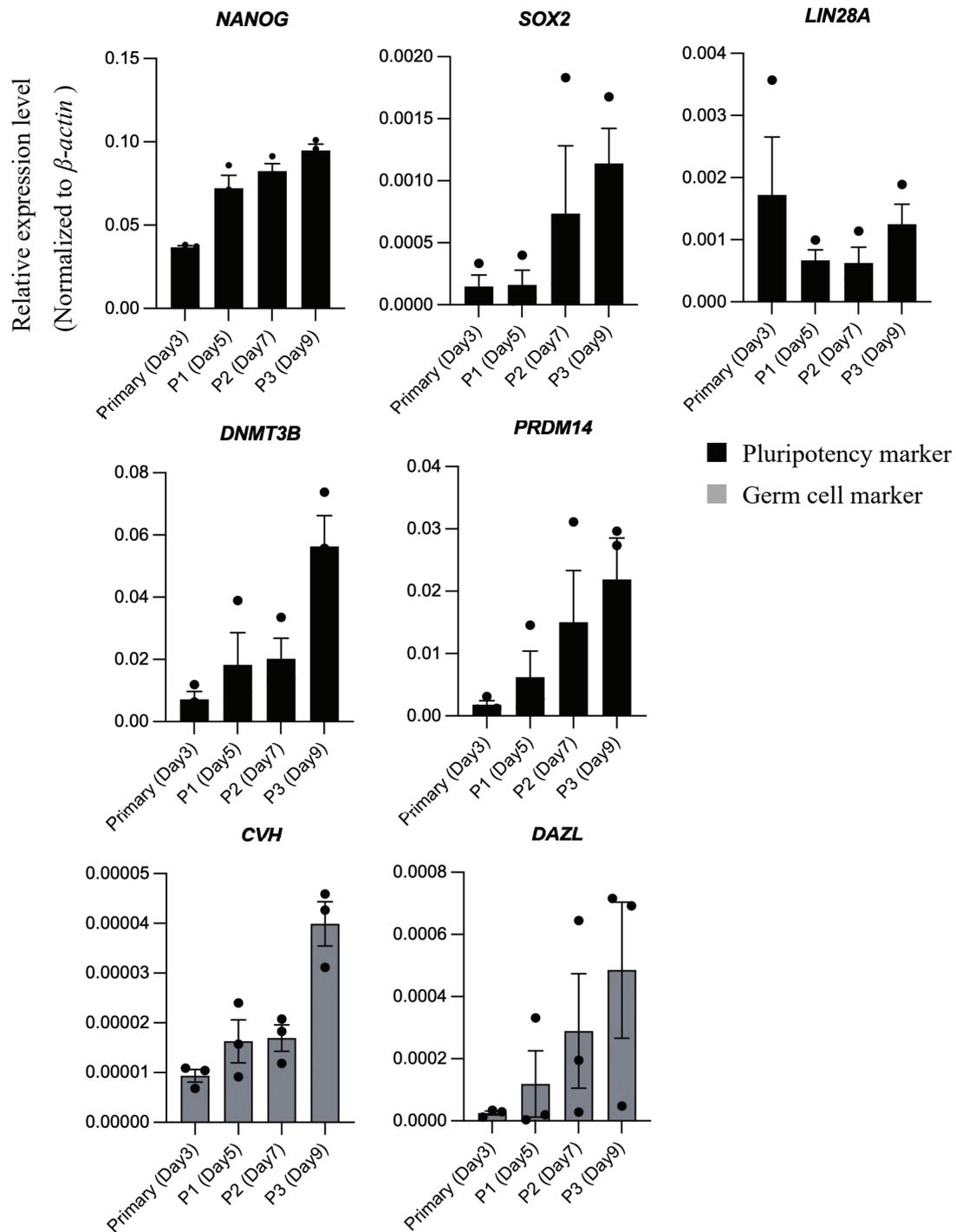
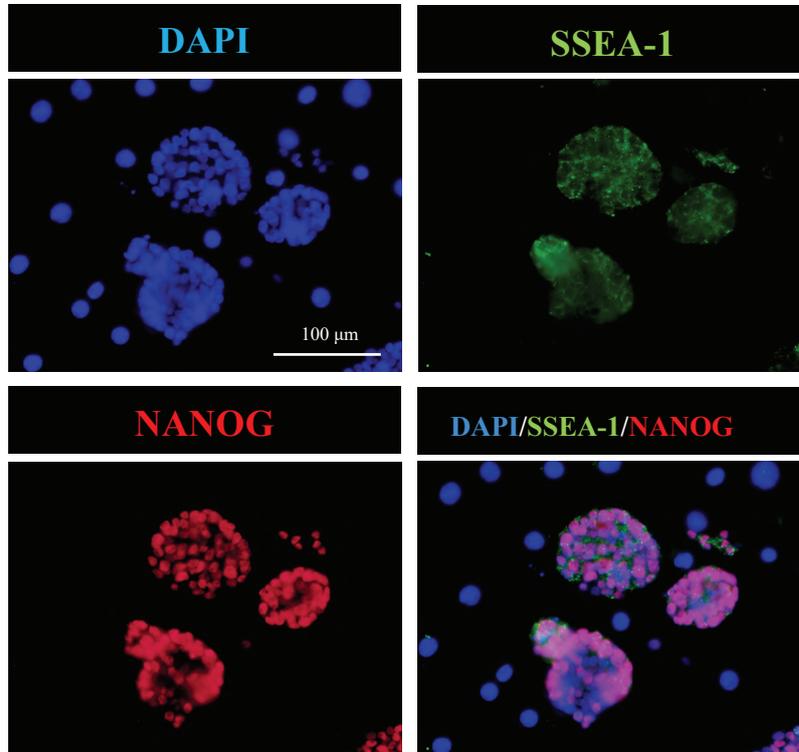


図 11. RT-qPCR による多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Dnmt3b*, *Lin28a*, *Prdm14*) および生殖細胞関連遺伝子 (*Cvh*, *Dazl*) の発現解析. 胚盤葉細胞を回収し, XAV939, Gö6983 添加条件 (LIF+PD0325901+Y-27632+XAV939+Gö6983) で培養した chESCs の遺伝子発現の変動を示す. エラーバーは, 平均値の標準誤差 (SE) を表す (n=3).

A



B

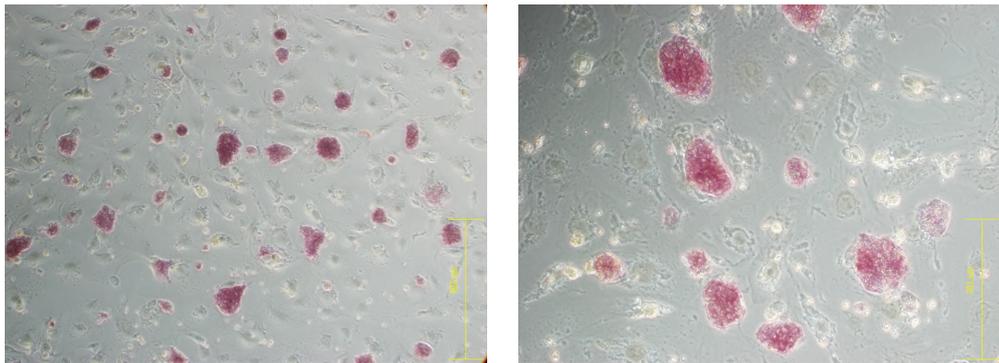


図 12. 4i+LIF 条件下で培養した chESCs の多能性評価. (A) 免疫細胞化学染色の結果. (B) AP 染色の結果.

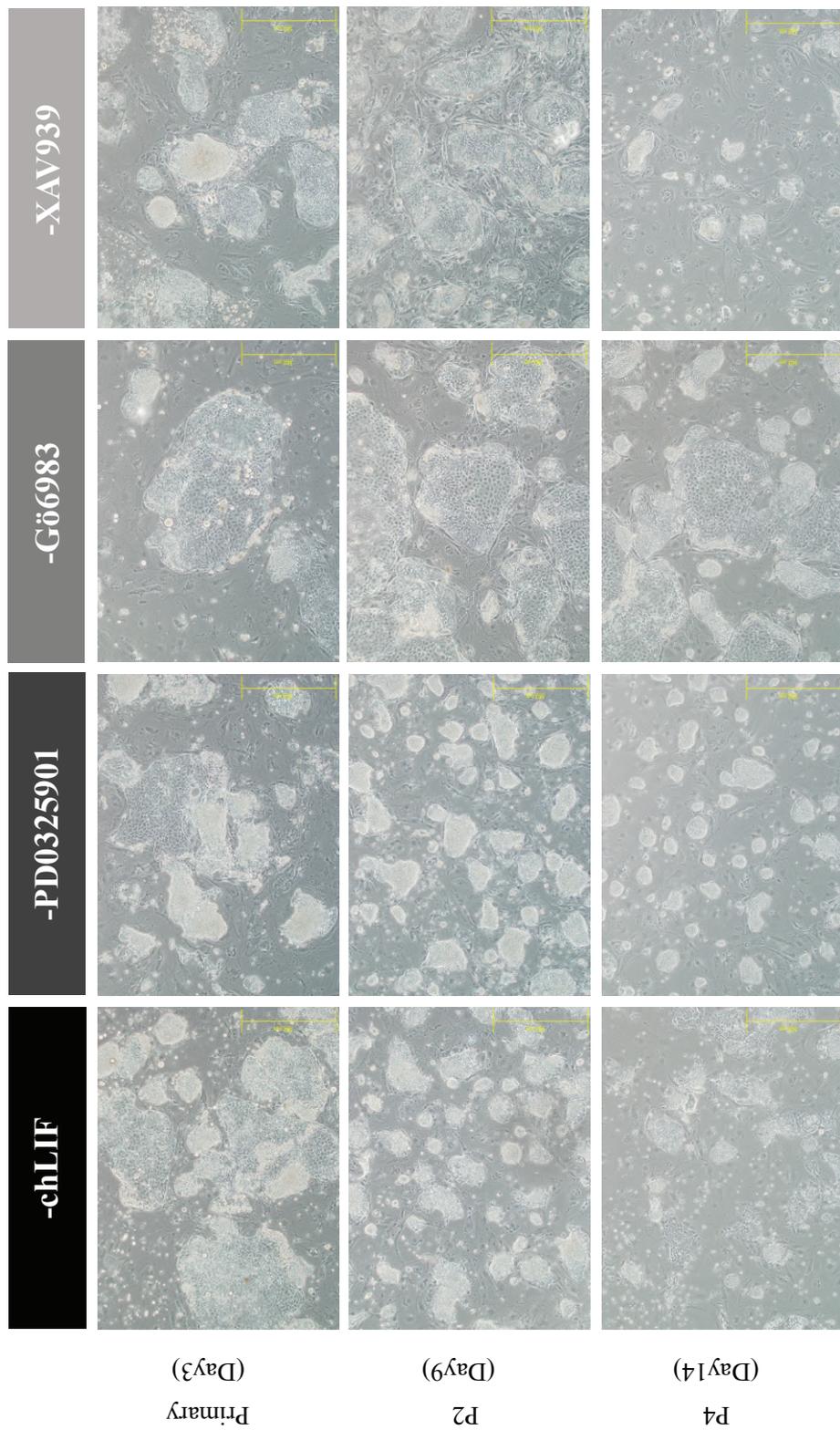


図13. 各添加因子 (chLIF, PD0325901, Gö6983, XAV939) 非添加条件における chESCs の形態。胚盤葉細胞回収から、初代培養 (Day3), P2 (Day9), P4 (Day14) 時における形態を示す。

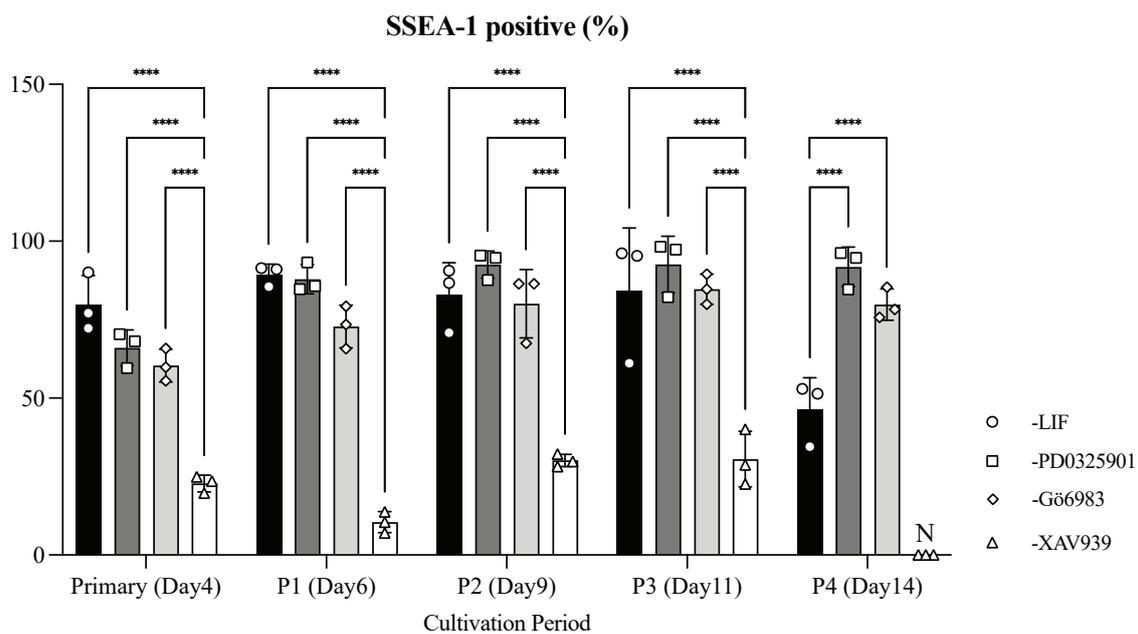


図 14. chESCs の培養に必要な添加物の特定. chLIF, PD0325901, Gö6983, XAV939 非添加条件における chESCs の SSEA-1 陽性率の経時的変化を示す. エラーバーは, 平均値の標準偏差 (SD) を表し, Tukey の検定により統計的に解析された **** $p < 0.0001$ ($n=3$). 'N' は測定していないことを表す.

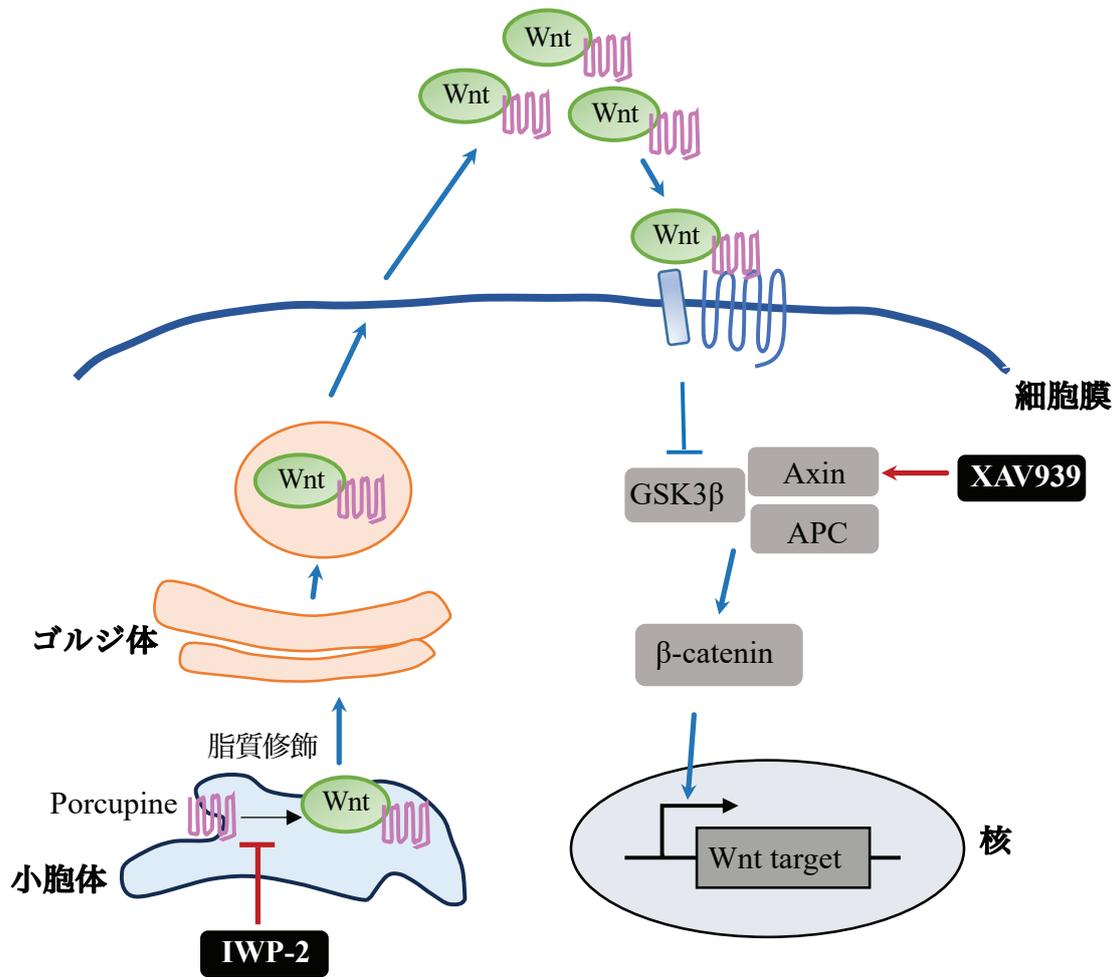


図 15. XAV939 と IWP-2 の作用機序の違い. IWP-2 は膜結合型アシルトランスフェラーゼである Porcupine を不活性化することで, Wnt タンパク質の脂質修飾を阻害する. XAV939 は β -catenin の分解複合体の Axin タンパク質を安定化することで, β -catenin の分解を促進する.

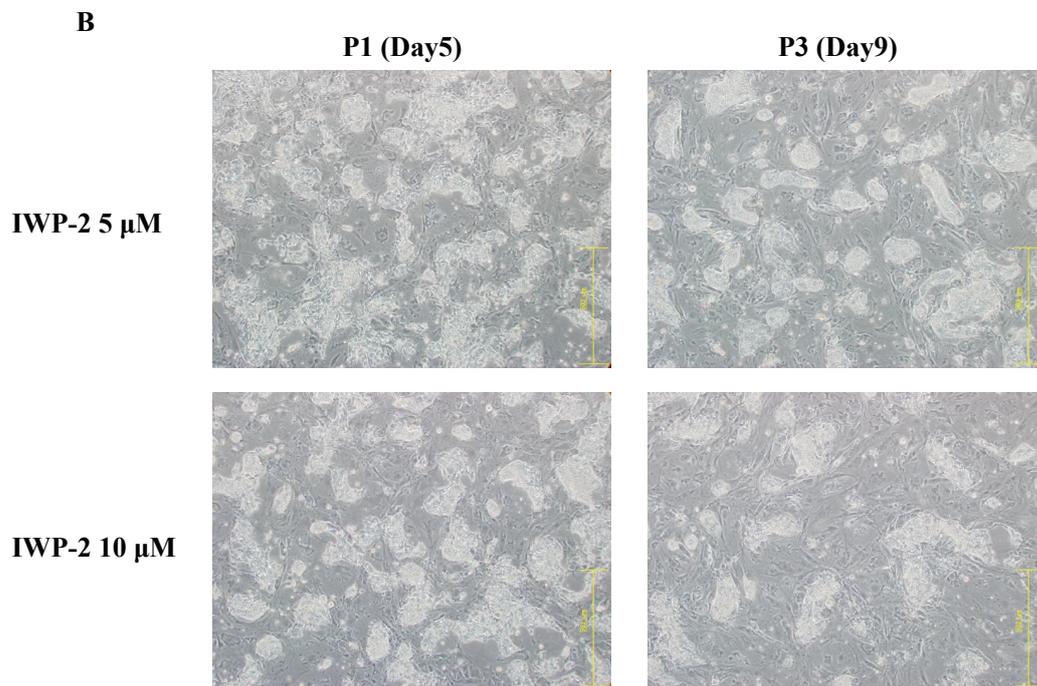
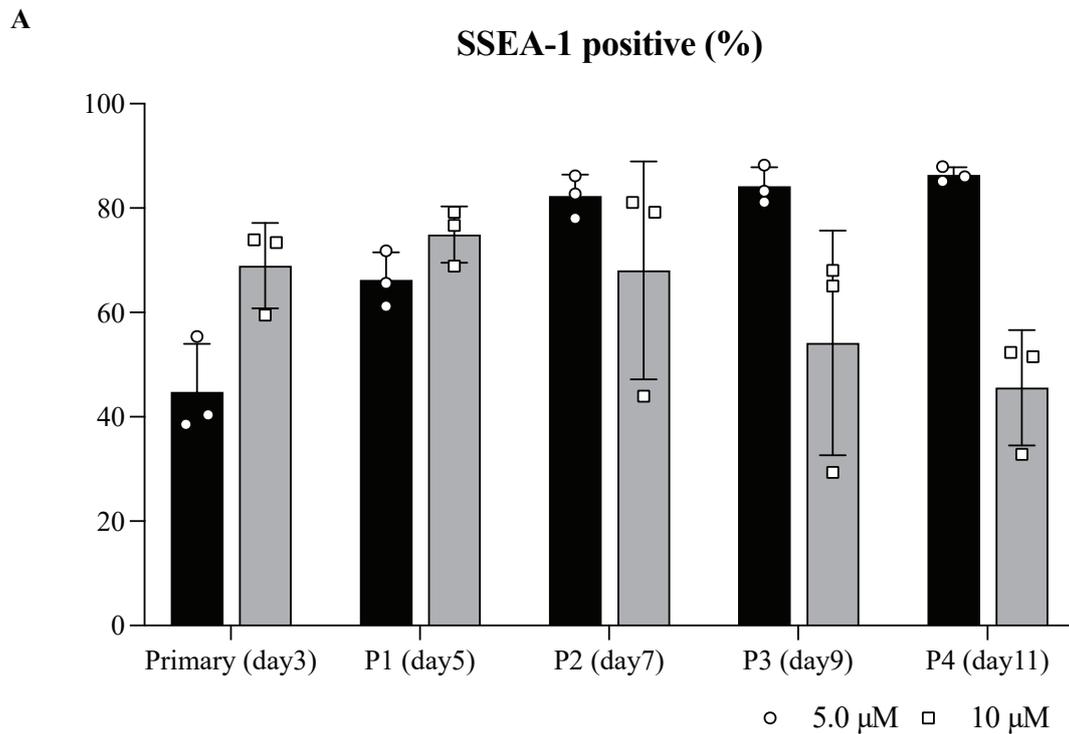


図 16. IWP-2 の濃度検討. (A) IWP-2 (5 μM , 10 μM) の濃度で添加した場合の, SSEA-1 陽性率の経時的な変化. エラーバーは, 平均値の標準偏差 (SD) を表す. (B) IWP-2 (5 μM , 10 μM) 添加時の chESCs の形態観察.

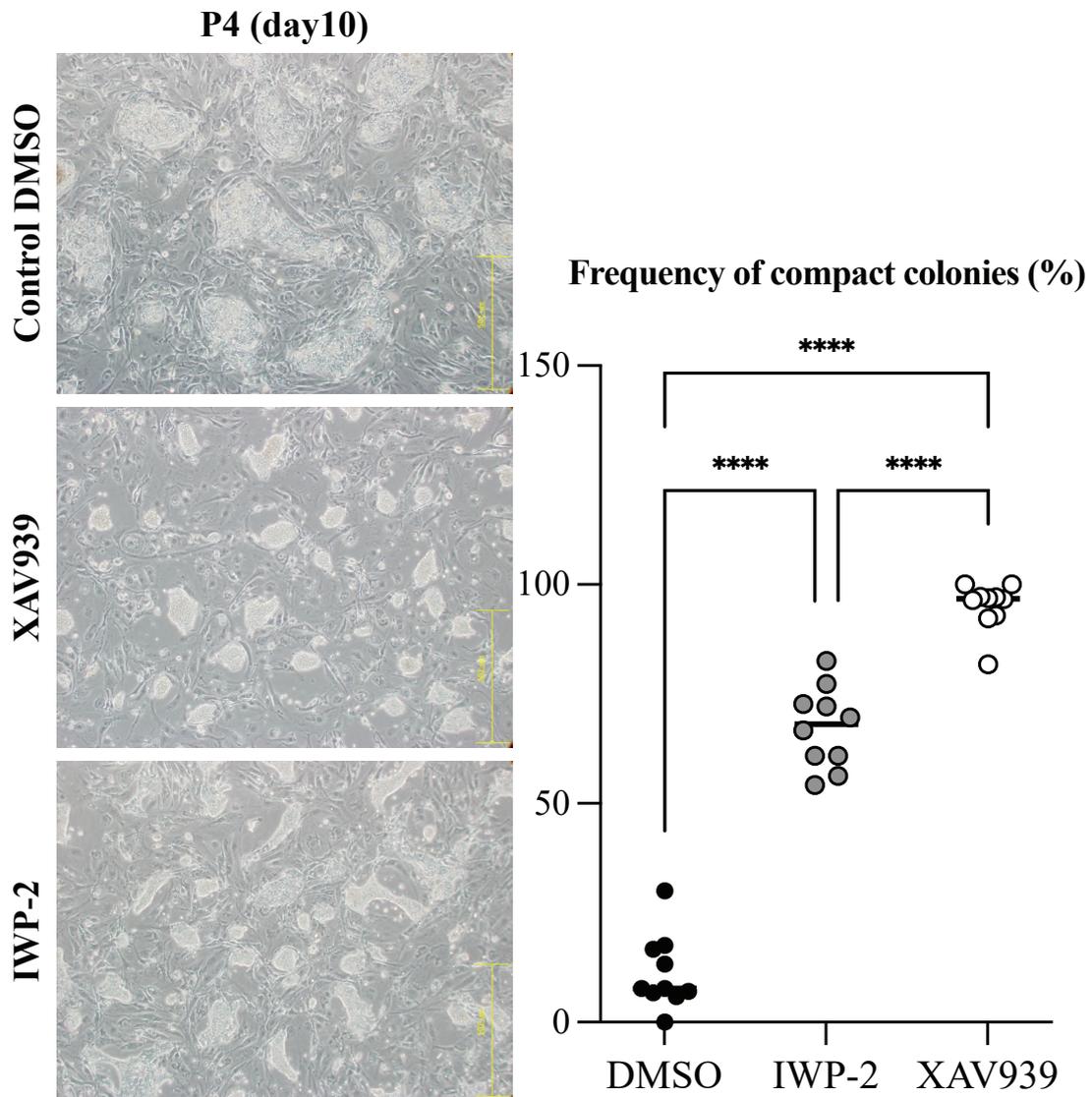


図 17. Wnt シグナル阻害剤を添加した条件で培養した chESCs (P4, day10) の形態。培養条件は Control DMSO (chLIF+Y-27632+Gö6983+DMSO) , XAV939 (chLIF+Y-27632+Gö6983+XAV939) , IWP-2 (chLIF+Y-27632+Gö6983+IWP-2)である。グラフは、それぞれの培養期間におけるコンパクトコロニーの割合を示す。黒いプロットは DMSO 条件下、灰色のプロットは IWP-2 条件下、白いプロットは XAV939 条件下で形成されたコンパクトコロニーの割合を示す。統計解析は、Tukey の検定により実施された **** $p < 0.0001$ (n=10) .

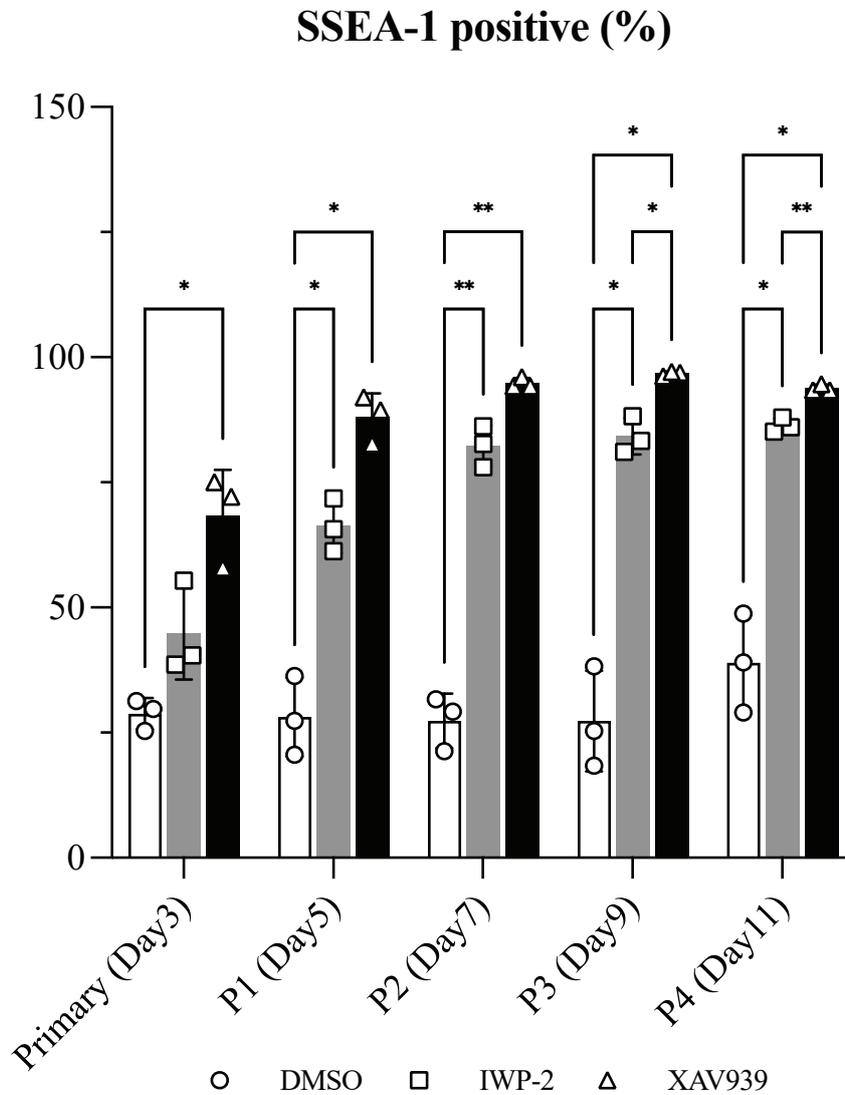


図 18. Wnt シグナル阻害剤添加条件における chESCs の SSEA-1 陽性細胞率の経時的な変化. エラーバーは、平均値の標準偏差 (SD) を表し、Tukey の検定により統計的に解析された * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n=3$) .

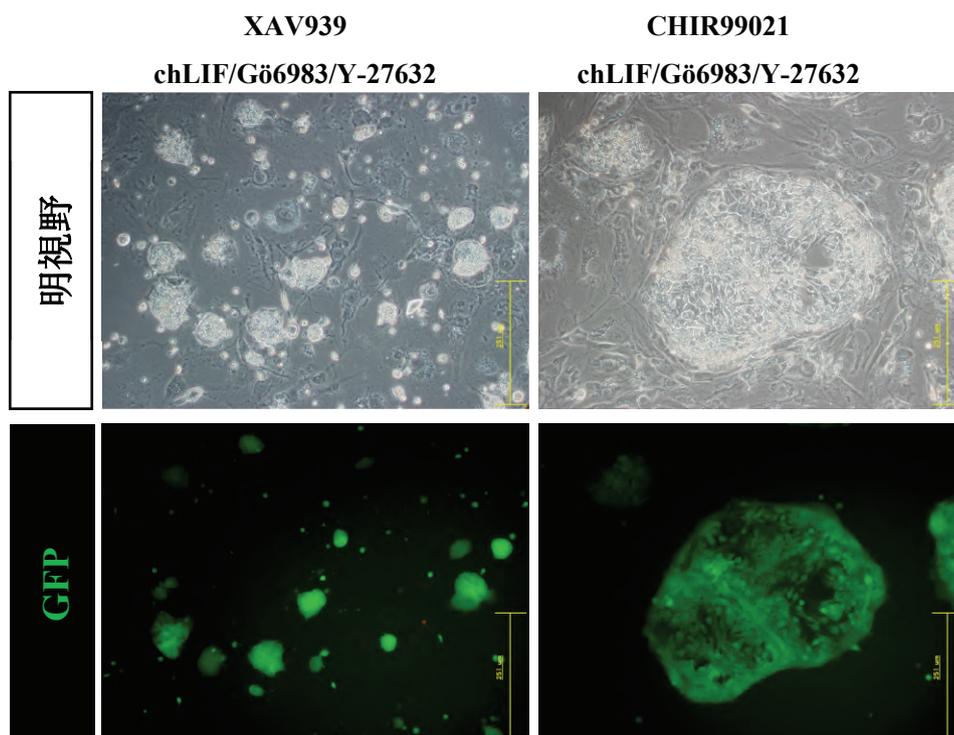


図 19. EGFP 発現 chESC. XAV939 条件と CHIR99021 条件のそれぞれで培養した EGFP-chESCs を示す.

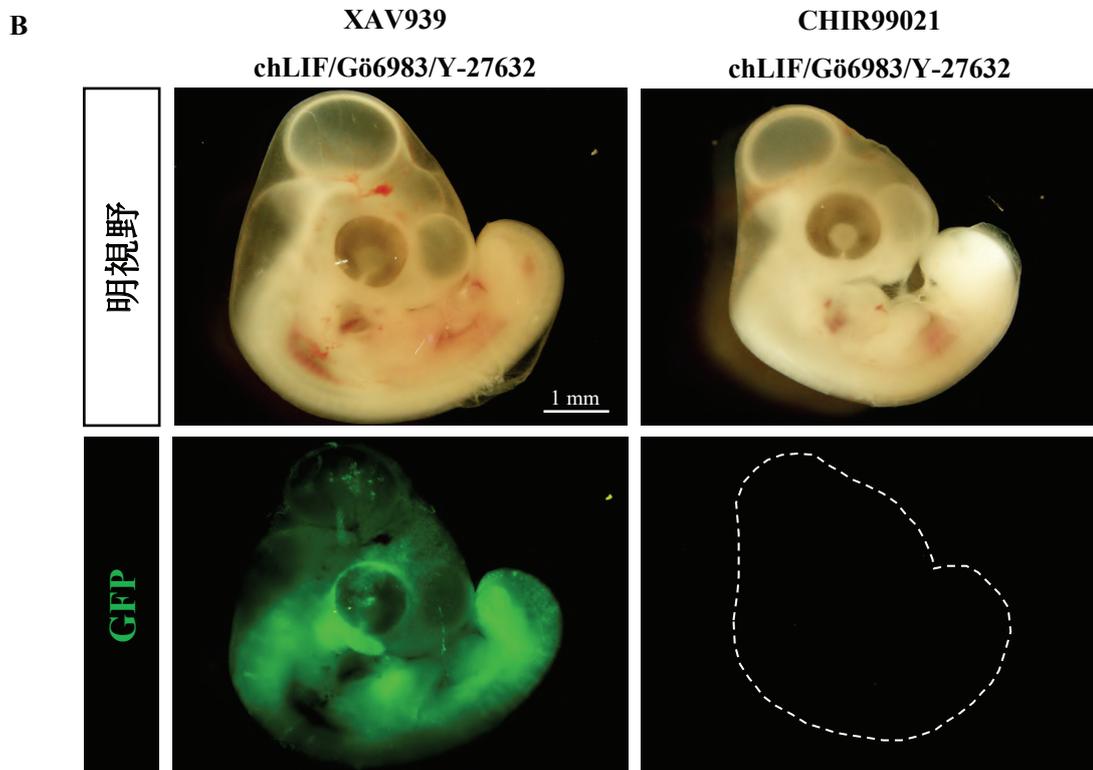
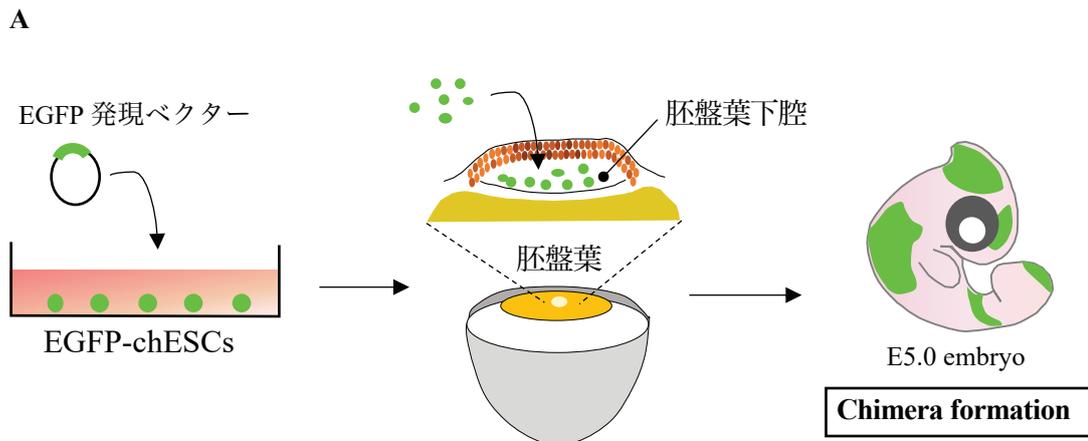


図 20. EGFP 発現 chESCs のキメラ試験. (A) キメラ試験の概要図 (B) XAV939, CHIR99021 条件下で培養した EGFP-chESCs を移植したキメラニワトリ胚を示す (5 日目胚) .

2-4 考察

本研究では、Wnt/ β -カテニンシグナルが chESCs に及ぼす影響を解析した。その結果、Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害すると、chESCs の多能性が維持された。一方、数日間にわたる Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は、多能性を低下させた。GSK3 β の阻害を介した Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は、mESCs において自己複製を促進する [42] [41]。hPSCs では、Wnt シグナルの効果は明確には分かっておらず、Wnt/ β -カテニンシグナルの効果は、研究グループによって異なっている [41] [47]。最近の研究では、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達はある特定の作用を持つのではなく、経時的に調節される様々な作用をもつことが示唆されている [48]。従って、Wnt/ β -カテニンシグナルは発生制御に密接に関係しており、そのメカニズムの解明は幹細胞研究の進展にとって重要である。

Wnt/ β -カテニンシグナルは進化的に保存されており、ニワトリでは発生を制御している [49]。また Wnt/ β -カテニンシグナルは、発生に関与するだけでなく、ニワトリ幹細胞の一種である始原生殖細胞 (primordial germ cells : PGCs) の増殖に機能することが示唆されている [50]。本研究において、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は、chESCs の平坦なコロニーの形成を促進し、多能性関連マーカーの発現を低下させた。これは、chESCs が多能性を失い、他細胞へと分化したことが考えられる。本研究では、数日間にわたる Wnt/ β -カテニンシグナル活性化の影響を調べた。しかし、短期間のシグナルの活性化や低濃度での刺激が、chESCs に及ぼす影響については調べることができなかった。ヒト PSCs では、短時間 (24 時間以内) の Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化 [48]や、低濃度での Wnt/ β -カテニンシグナル活性化因子の添加 [51]が hPSCs の増殖を促進した。したがって、Wnt/ β -カテニンシグナルは chESCs において、時間依存的・濃度依存的に様々な機能を発揮している可能性がある。今後、より詳細な検討

により、chESCsにおけるWnt/ β -カテニンシグナルについてより深い理解が得られるかもしれない。一方で、Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤の添加により、キメラ形成能を有する機能的なchESCsを培養することができた。しかしながら、当初の目的であったchESCsの生殖細胞への分化能を解析することはできなかった。chESCsの性状を解析する中で、生殖細胞マーカーのmRNA発現レベルが上昇したことは大変興味深い。従って、最適化された培地で培養したchESCの生殖細胞への分化能を、レシピエント胚のガンマ線処理 [52]およびCvhの強制発現によるchESCsの誘導 [53]などの手法により解析することで新たな知見が得られるかもしれない。

chESCsは2つのコロニー形態を示し、それら2つの細胞の比率は様々であった。先行研究で、chESCsは複数のタイプのコロニー形態を示すことが報告されている [33]。その研究では、異なるコロニーが胚盤葉上層と胚盤葉下層からそれぞれ形成された。その中で、胚盤葉上層に由来する高密度でコンパクトなコロニーのみが多能性マーカーであるNanogを発現していた。この観察結果と一致して、本研究では、高密度のコンパクトなコロニーは高い多能性を保持していることが示唆された。興味深いことに、chESCsにおいてWnt/ β -カテニンシグナルを制御すると、異なるタイプのコロニーが形成された。Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害するとコンパクトなコロニーが形成され、Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化すると平坦なコロニーの形成が促進された。これはおそらくE-カドヘリンと β -カテニンの影響によるものと考えられる。E-カドヘリンは、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達を中心因子として機能する β -カテニンと相互作用する。コンパクトなコロニーを形成するmESCsは、E-カドヘリン- β -カテニン複合体を介する細胞接着により、コンパクトなコロニーを形成する [54]。chESCsの形態は、mESCsの形態と同様に、E-カドヘリン- β -カテニン複合体の作用に影響されているのかもしれない。

β -カテニンは細胞間接着に関与するだけでなく、転写因子としても機能する [55]。したがって、Wnt/ β -カテニンシグナルの調節が、 β -カテニンの作用を介したchESCsの多

能性維持に影響を及ぼしている可能性がある。GSK3 β による β -カテニンのリン酸化はCHIR99021によって阻害され、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化を誘導する。その結果、 β -カテニンは分解されずに蓄積する。Wnt/ β -カテニンシグナル経路の阻害を誘導するXAV939はタンキラーゼ阻害剤であり、axis inhibition (AXIN) タンパク質を安定化することにより β -カテニンの分解を促進する [56]。IWP-2は、Porcupineを阻害することで、Wntリガンドのパルミトイル化を抑制し、Wntリガンドの分泌を阻害する。結果として、Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害し、 β -カテニンの蓄積を抑制する [57]。本研究で用いた低分子阻害剤は、 β -カテニンの蓄積と分解を介して、Wnt/ β -カテニンシグナルの下流の遺伝子発現を調節することで、chESCsの多能性を変化させたと考えられる。対照的に、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化による β -カテニンの安定化は、*in vitro*でのニワトリPGCsの増殖に重要である [50]。これらの知見は、Wnt/ β -カテニンシグナルの制御が、哺乳類だけでなくニワトリの幹細胞の研究にとっても重要であることを示唆している。

哺乳類のPSCsには「ナイーブ」な状態と「プライム」な状態がある [58]。ナイーブ型は未分化の基底状態、プライム型は基底状態から発生が進んだ段階と定義される。そのため、再生医療や遺伝子工学に用いることを目的に、ナイーブ型PSCsの樹立に関する研究が、いくつかの動物種で行われている [59] [60] [61]。近年、鳥類にもナイーブ型とプライム型が存在する可能性が複数の研究で示唆されている。受精卵の発育段階は鳥類種によって異なる。ゼブラフィンチはステージVI-VIIで産卵し、ニワトリ(ステージX)よりも早い発育段階で産卵する。フィンチの胚盤葉細胞はニワトリよりも、哺乳類におけるナイーブ特異的マーカー遺伝子を高発現する [62]。mPSCsとchESCsを用いて行った遺伝子の網羅的発現解析では、chESCsの発現プロファイルはmEpiSCsの発現プロファイルよりもmESCの発現プロファイルに類似していることが明らかになった [31]。Avian-induced pluripotent stem cells (iPSCs)に関する最近の研究

では、鳥類種によって iPSCs の性質が異なることが判明しており、特に、雷鳥由来の iPSCs は mESC に類似した性質を示した [63]. 本研究では、Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤存在下で培養した chESCs は、コロニー形態、LIF シグナル依存性、キメラ形成能、高いクローン形成能など、ナイーブ型の mESC [58]. と類似したいくつかの特性を示した。しかしながら、哺乳類と鳥類では発生パターンが異なること、鳥類ではナイーブ型とプライム型を定義する明確なマーカーが知られていないことから、本研究では chESCs の状態を定義することはできなかつた。さらなる詳細な解析により、鳥類 PSCs の特徴を明確に定義できるかもしれない。

結論として、本研究では、chESCs に対する Wnt/ β -カテニンシグナルの影響を調べ、Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤を用いることで、chESCs の未分化状態を安定に維持できることを見出した。一方で、当初の目的であった chESCs の生殖細胞への分化を実現することはできなかつた。しかし、培養条件の最適化により、生殖細胞関連遺伝子の発現が安定化したことから、継続的な研究により、chESCs の生殖細胞への分化を実現できる可能性がある。まとめると、本研究成果は、ニワトリ ES 細胞に関する研究を行っていく上で重要な知見を提供するものとなった。

第3章

鶏卵バイオリアクター*in vitro* 評価系の構築

3-1 序論

近年、バイオ医薬品など医療用の組換えタンパク質の需要が高まっている。これらのタンパク質は新しい標的分子に作用し、低分子医薬品とは異なる高い特異性と有効性を有する。しかし、翻訳後修飾を受ける治療用組換えタンパク質の生産には、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞が主に用いられており、その、製造コストの高さが課題となっている。

緒言で述べたように、ニワトリはその生産性の高さから、上記の課題を解決するバイオリアクターとして有用と考えられる。しかしながら、卵管上皮細胞の培養系が確立されていないことから、生産系の評価を迅速に実施することができない。すなわち、ゲノム編集個体の作出後に初めて生産物の評価が可能になることが実用化の障害になっていると言える。

そこで、本研究では、まずゲノム編集技術を利用して、主要な卵白成分である OVA を恒常的に発現するニワトリ培養細胞株 (DF-1 細胞) を樹立した。続いて、有用物質として hFGF2 を選択し、hFGF2 遺伝子を OVA 発現細胞株の OVA 遺伝子座にノックインし、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* モデルを作製した。遺伝子間のリンカー、ノックイン箇所を変えた株を複数樹立し、発現する hFGF2 タンパク質の量から、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価を実施し、評価系の有効性を確認した。

3-2 材料と方法

■ OVA 発現細胞株の樹立

(1) 供試細胞

本実験に使用された DF-1 細胞は American Type Culture Collection (# CRL-12203) から入手し, 10% fetal bovine serum (FBS; SARTORIUS) , 1% 100X GlutaMax™ (Thermo Fisher Scientific) を添加した KO-DMEM (Thermo Fisher Scientific) で培養し, 60 mm デイッシュ (Corning) で 37°C, 5% CO₂ で培養した.

(2) ゲノム編集ツールの作製

OVA 遺伝子座への強制発現プロモーターのノックインを実施するため, Precise Integration into Target Chromosome system (PITCh system) を利用した [64]. それに伴い以下に示す 3 種類のベクターを作製した.

① OVA 遺伝子座を標的とする CRISPR/Cas9 ベクター

OVA 遺伝子座の標的配列を図 21-A に示した. 強制発現プロモーターのノックイン箇所として, OVA 遺伝子の 2 箇所を標的とした. 1 箇所は, エクソン 1 上流のイントロン領域, もう 1 箇所は, エクソン 2 の開始コドン上流である. gRNA として機能する 20 塩基を合成オリゴとして, ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託し, 合成した. 合成オリゴの配列は図 21-B に示す. それらの合成オリゴを, BpI (Thermo Fisher Scientific) と Ligation high Ver.2 (TOYOBO)を使用した Golden Gate 法により, pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ベクター (Addgene #42230; 図 22-A) に挿入した.

② elongation factor 1 α (EF1 α) プロモーターを搭載した PITCh ドナーベクター

PITCh ベクターの構築に利用した pBApo-EF1 α Pur DNA (Takara bio) のベクターマップを図 22-B に示す。本研究で使用した PITCh ドナーベクターは、pBApo-EF1 α Pur DNA のマルチクローニングサイト内の BamHI, HindIII に OVA 遺伝子と相同な約 20 bp (マイクロホモロジー) の配列を挿入することにより作製した。挿入する配列は、合成オリゴとしてユーロフィンジェノミクス株式会社に委託し、合成した (図 23)。pBApo-EF1 α Pur DNA は BamHI, HindIII により制限酵素処理し、1%アガロースゲルで電気泳動した。アガロースゲルから目的の領域を切り出し、精製した (FastGene Gel/PCR Extraction Kit; Nippon Genetics)。精製したベクターとインサートを、Ligation high Ver.2 により連結した。

③ PITCh ドナーベクターを標的とする CRISPR/Cas9 ベクター

②で作製した PITCh ベクター中の標的配列を図 24 に示す。gRNA を合成オリゴとして、ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託し、合成した (図 24)。それらを pX330 ベクター (Addgene #42230) へ挿入することで作製した。

(3) DF-1 細胞への遺伝子導入

作製したゲノム編集ツールを DF-1 細胞へと遺伝子導入した。60mm デイッシュ (Corning) で 70-90%コンフルエントに達した細胞に対して、Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用して、トランスフェクションを実施した。トランスフェクションから 24 時間後、EF1 α プロモーターのノックインに成功した細胞は 1.0 μ g/mL Puromycin (Thermo Fisher Scientific) を用いて選択した。選択から 2 週間後、96 ウェルプレート (Corning) に限界希釈培養法を用いて細胞を播種し、細胞を単一化した。

(4) ノックインの検出

EF1 α プロモーターを搭載したドナーベクターが、OVA 遺伝子座の目的箇所 (エクソン 1 上流およびエクソン 2 開始コドン上流) にノックインされているかを、polymerase chain reaction (PCR) とシーケンス解析により確認した。PCR 解析に使用したプライマーは表 2 に示す。PCR は、KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) を使用し、98°C 10 秒、63°C 5 秒、68°C 1 秒のサイクルを 35 サイクル実行した。シーケンス解析は、抽出したゲノム DNA (Genetra Puregene Cell Kit; Qiagen) から解析領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法により実施した。サイクルシーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を使用し、96°C 30 秒、50°C 15 秒、60°C 4 分のサイクルを 25 サイクル実行した。本研究のシーケンス解析は、SeqStudio genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。データの解析は Snap Gene Viewer を用いた。さらに、EF1 α プロモーターが対立遺伝子の、片アレルにノックインされているか、両アレルにノックインされているかを調べるために、PCR によるジェノタイピングを実施した。使用されたプライマーは表 2 に示す。サイクル条件は、98°C 10 秒、63°C 5 秒、68°C 30 秒で 35 サイクルである。PCR 産物は、1%アガロースゲルを使用した電気泳動に供試した。以上の解析により樹立した細胞株を以下のように定義する。エクソン 1 上流に EF1 α プロモーターがノックインされた株：EF1 α -Exon1 株、エクソン 2 の開始コドン上流に EF1 α プロモーターがノックインされた株：EF1 α -Exon2 株。

(5) オフターゲット変異の検出

使用した CRISPR/Cas9 ベクターにより、オフターゲット変異が生じていないかを解析した。CRISPRdirect ソフトウェア (<http://crispr.dbcls.jp>) を用いて、OVA のエクソン

1の上流, エクソン2の開始コドン上流, および PITCh ドナーベクターを標的とする2種類の gRNA の計4種類を検索した. 各 gRNA は23塩基に及び, protospacer adjacent motif (PAM) 配列を含む. CRISPRdirectにより, PAM近位の12bp(シード配列)が一致するゲノム領域を検索した. さらにその領域が遺伝子のコード領域であるかを UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>)により調べた. 各オフターゲット候補部位は, 遺伝子をコードする領域を解析対象とした. EF1 α -Exon1株, EF1 α -Exon2株, および野生型 DF-1細胞からゲノムDNAを抽出し (Genetra Puregene Cell Kit; Qiagen), オフターゲット候補領域を増幅した. 使用したプライマーセットを表3に示す. その後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンシングを行い, SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)を用いて配列を解析した.

(6) OVAの発現解析

① RT-PCR, RT-qPCR

EF1 α -Exon1株, EF1 α -Exon2株においてOVAが発現しているかをRT-PCRにより解析した. EF1 α -Exon1株, EF1 α -Exon2株および野生型 DF-1細胞の全RNAを, Fastgene RNA Premium Kit (Nippon Genetics)を使用して, 抽出した. 抽出後, 全RNAをcDNAに逆転写した (SuperScript IV Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific). OVAに特異的なプライマーセット(表4)を使用して, KOD One Master MixによりPCRを行った. サイクル条件は, 98°C 10秒, 63°C 5秒, 68°C 1秒で35サイクルである. PCR産物は, 1%アガロースゲルを使用した電気泳動に供試した. RT-qPCRはKOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて実施した. サイクル条件は, 初期変性 98°C 2分の後に, 98°C, 10秒, 60°C 10秒, 68°C 1分を40サイクル実行した. 融解曲線分析条件は, 95°C 15秒, 60°C 1分, 99°C 15秒の条件で実行した.

解析した遺伝子は *OVA* と *β -actin* で、プライマーの配列は表 4 に示した。遺伝子発現は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

② OVA mRNA の配列解析

OVA 転写産物が正しく転写されたかどうかを確認するため、EF1 α -Exon1 株および EF1 α -Exon2 株の転写産物配列をダイレクトシーケンス法により確認した。EF1 α -Exon1 株および EF1 α -Exon2 株の cDNA を鋳型として、KOD One Master Mix (TOYOBO) を用いた PCR により OVA の開始コドンから終止コドンの領域を増幅した。サイクル条件は、98°C 10 秒、63°C 5 秒、68°C 1 秒を 35 サイクル実行した。サイクルシーケンシングは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を使用し、SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス解析を行った。使用したプライマーセットを表 5 に示す。

③ Western blot

EF1 α -Exon1 および EF1 α -Exon2 株のライセートおよび培養上清中の OVA タンパク質を、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および Western blot により検出した。ライセートサンプルの調製には nuclear extraction kit (ACTIVE MOTIF) を用いた。プロトコールに従い、60 mm ディッシュでコンフルエントにした EF1 α -Exon1 株と EF1 α -Exon2 株からサンプルを調製した。培養上清サンプルは、EF1 α -Exon1 および EF1 α -Exon2 株を 60 mm ディッシュでコンフルエントになるまで培養した後に、培地を吸引し、細胞を PBS (-) で 2 回洗浄した後、4mL の無血清培地 FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific) を加え、4 日後に回収した。回収した培養上清サンプルを Amicon Ultra-4 (30 K; Merck) を用いて、限外濾過によりサンプルを約 30 倍に濃縮し、ポリアクリルアミドゲル (CHR520L c・パジエル HR; ATTO) を用いて

SDS-PAGE を行った。サンプルに 2-mercaptoethanol を 2.5% の濃度で加え、70°C で 10 分間熱処理した。分離したタンパク質バンドをメンブレン (Immun-BlotPVDF Membrane for Protein Blotting 0.2 mm; BIO-RAD) に転写した。メンブレンを PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO) で 4°C、一晩ブロッキングした。一次抗体は、Anti-OVALBUMIN (Hen Egg White) rabbit antibody (ROCKLAND) を Solution1 (Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution; TOYOBO) で 1 : 2000 に希釈し、20-25°C で 40 分間、抗体反応させた。二次抗体は、HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti-RabbitIgG (H+L) HSA Liquid Conjugate 1 mg/ml; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を Solution2 (Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution; TOYOBO) で 1:100,000 に希釈したものを用いた。化学発光は SuperSignal West Atto Ultimate Sensitivity Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Amersham Imager 680 (GE Healthcare) により検出した。

④ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

EF1 α -Exon1 株および EF1 α -Exon2 株の培養上清およびライセートサンプル中の OVA タンパク質濃度を推定するために、抗 OVA 抗体を用いて ELISA を行った。培養上清は、EF1 α -Exon1 株および EF1 α -Exon2 株を 60mm ディッシュに播種し、コンフルエントに達した 4 日後に回収した。ライセートサンプルの調製には nuclear extraction kit (ACTIVE MOTIF) を用いた。捕捉抗体は Anti-OVALBUMIN (Hen Egg White) rabbit antibody (ROCKLAND) を用いた。捕捉抗体は PBS で 1:2000 に希釈し、F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE (Thermo Fisher Scientific) を使用し、4°C で一晩固相化した。0.05% Tween20 (nacalai tesque) - PBS により洗浄後、25% ブロックエース (株式会社ケー・エー・シー) を使用し、37°C 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、測定サンプルを 37°C、2 時間固相化した。OVA スタンダードは、オボアルブミン、

低エンドトキシン (Fujifilm Wako Pure Chemical) を PBS で段階希釈し使用した。検出抗体は, Peroxidase Labeling Kit (Dojindo Molecular Technologies) で標識したウサギ抗 OVA 抗体 (Egg Western Blotting Kit; Morinaga) を Solution 1 (Can GetSignal Immunoreaction Enhancer Solution; TOYOBO) で 1:1000 希釈し, 37°C で 2 時間反応させた。基質には SureBlue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (SeraCare Life Sciences) を用いた。発色は Multiskan SkyHigh マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。OVA タンパク質の正味吸光度は, 測定値からコントロール (PBS) の吸光度を差し引いて算出した。

■ Fibroblast growth factor2 (hFGF2) 遺伝子のノックイン

(7) 供試細胞

EF1 α -Exon1 株において, OVA タンパク質が高発現しているため, EF1 α -Exon1 株を本実験に供試した。

(8) ゲノム編集ツールの作製

hFGF2 遺伝子の OVA 遺伝子座へのノックインを行うため, 以下の 3 種類のゲノム編集ツールを準備した。

① OVA 遺伝子座 (開始コドン近傍) を標的とする CRISPR/Cas9 ベクター

OVA 遺伝子座を標的とする CRISPR/Cas9 ベクターは, OVA 発現細胞株の樹立で作製した CRISPR/Cas9 ベクター (エクソン 2 を標的) を使用した。

② OVA 遺伝子座 (終止コドン近傍) を標的とする TALEN ベクター

終止コドン近傍を標的とする TALEN ベクターは, 広島大学統合生命科学研究科の

佐久間哲史教授に依頼し、作製していただいた。

③ hFGF2 遺伝子を搭載したドナーベクター

3種類のドナーベクターを作製した。2A ペプチドを介して、開始コドン上流に hFGF2 遺伝子をノックインするドナーベクター、2A ペプチドと internal ribosome entry site (IRES) 配列を介して終止コドン下流に hFGF2 遺伝子をノックインする2種類のドナーベクターの計3種類である。ドナーベクターの設計過程を図 25, 26 に示す。Homologous recombination (HR) によるノックインを実施するため、HR 用のドナーベクターを作製した。まず、PCR により、OVA 遺伝子座の標的領域近傍の約 1,000 bp をホモロジー領域として増幅し、pCR2.1-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) にクローニングした。その後、hFGF2 遺伝子、2A ペプチドおよび IRES 配列をそれぞれ増幅し、In fusion 反応 (Takara bio) によりドナーベクターに組み込んだ。hFGF2 遺伝子は、住友化学株式会社の高橋康彦主任研究員、浅野宏治研究員より供与していただいた。2A ペプチド配列は、広島大学統合生命科学研究科の佐久間哲史教授から供与していただいた pCRIS-PITChv2-FBL ベクターから増幅した。IRES 配列は、pLVX-IRES-ZsGreen1 ベクター (Takara bio) から増幅した。EF1 α -Exon1 株には、EF1 α プロモーターのノックイン時に、Puromycin 耐性遺伝子が組み込まれているため、Neomycin 耐性遺伝子を薬剤選択マーカーとして、ドナーベクターに組み込んだ。使用したプライマーは表 6 に示す。

(9) EF1 α -Exon1 株への遺伝子導入

作製したゲノム編集ツールを EF1 α -Exon1 株へと遺伝子導入した。樹立する細胞株は図 27 に示す3種類である。60 mm デイッシュ (Corning) で 70-90% コンフルエントに達した細胞に、Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、トラ

ンスフェクションを行った。トランスフェクションから 24 時間後, hFGF2 遺伝子を含むドナーベクターのノックインに成功した細胞は 150 µg/mL G418 (50 mg/mL G-418 sulfate solution; Fujifilm Wako Pure Chemical) を用いて選択した。選択から 2 週間後, 96 ウェルプレート (Corning) に限界希釈培養法を用いて細胞を播種し, 細胞を単一化した。

(10) ノックインの検出

hFGF2 遺伝子を搭載したドナーベクターが, OVA 遺伝子座の目的箇所 (エクソン 2 開始コドン上流, エクソン 8 終止コドン下流) にノックインされているかを, PCR およびシーケンス解析により確認した。PCR 解析に使用されたプライマーは表 7 に示す。PCR は, KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) を使用し, 98°C 10 秒, 65°C 5 秒, 68°C 30 秒のサイクルを 35 サイクル実行した。PCR 産物は, 1%アガロースゲルを使用した電気泳動に供試した。シーケンス解析は, 抽出したゲノム DNA (Genetra Puregene Cell Kit, Qiagen) から解析領域を増幅し, それらをテンプレートにして, ダイレクトシーケンス法により実施した。サイクルシーケンス反応は, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を使用し, 96°C 30 秒, 50°C 15 秒, 60°C 4 分のサイクルを 25 サイクル実行した。データの解析は Snap Gene Viewer を用いた。ノックインが検出された株について, 以下のように定義する。2A ペプチドを介して, OVA 上流に hFGF2 がノックインされた株: hFGF2-2A-OVA 株。2A ペプチドを介して, OVA 下流に hFGF2 がノックインされた株: OVA-2A-hFGF2 株。IRES 配列を介して, OVA 下流に hFGF2 がノックインされた株: OVA-IRES-hFGF2 株。

(11) オフターゲット変異の検出

使用した CRISPR/Cas9, TALEN ベクターにより, オフターゲット変異が生じていないかを解析した. CRISPR/Cas9 ベクターによるオフターゲット変異解析には, CRISPRdirect ソフトウェア (<http://crispr.dbcls.jp>), TALEN ベクターによるオフターゲット変異解析には PROGNOS ソフトウェア

(<http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html>) [65] を使用した. 各オフターゲット候補部位について, 遺伝子をコードする領域を解析対象とした. OVA-2A-hFGF2 株, OVA-IRES-hFGF2 株, hFGF2-2A-OVA 株, および DF-1 細胞からゲノム DNA を抽出し (Genetra Puregene Cell Kit; Qiagen), オフターゲット部位を増幅した. 使用したプライマーセットを表 8 に示す. その後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンシングを行い, SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて配列を解析した.

(12) OVA, hFGF2 の発現解析

① RT-PCR

OVA-2A-hFGF2 株, OVA-IRES-hFGF2 株, hFGF2-2A-OVA 株において OVA, hFGF2 が発現しているかを RT-PCR により解析した. OVA-2A-hFGF2 株, OVA-IRES-hFGF2 株, hFGF2-2A-OVA 株および野生型 DF-1 細胞のトータル RNA は, Fastgene RNA Premium Kit (Nippon Genetics) を使用して, 抽出した. 抽出後, トータル RNA を cDNA に逆転写した (SuperScript IV Reverse Transcriptase; Thermo Fisher Scientific). 使用したプライマーセットは表 9 に示し, KOD One Master Mix を用いて PCR を行った. サイクル条件は, 98°C 10 秒, 65°C 5 秒, 68°C 5 秒で 35 サイクルである. PCR 産物は, 1%アガロースゲルを使用した電気泳動に供試した.

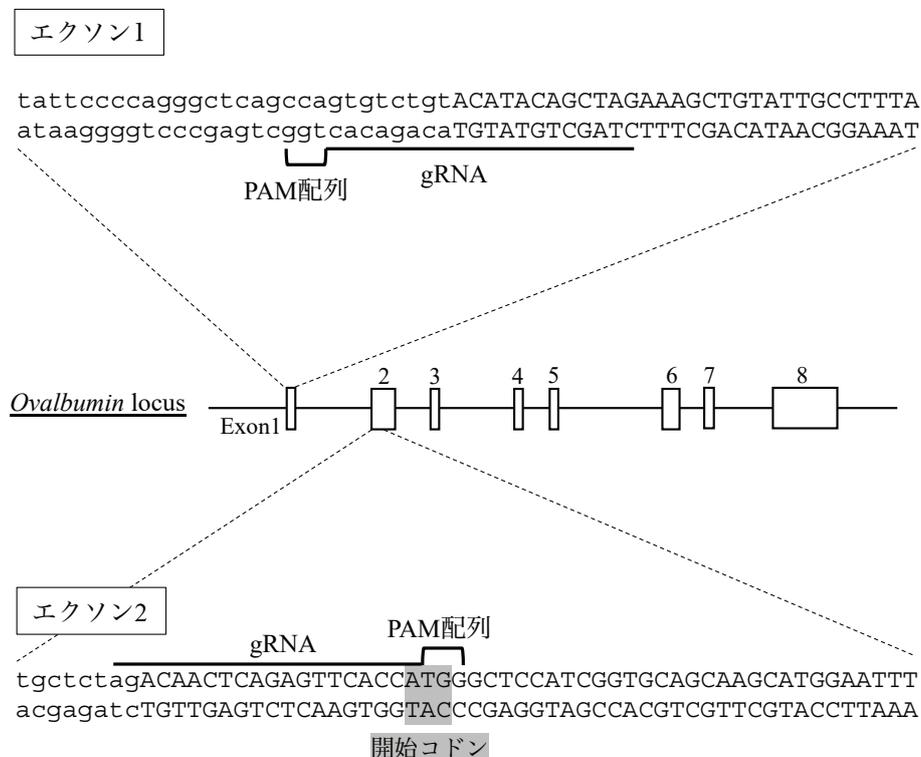
② ELISA

OVA-2A-hFGF2 株, OVA-IRES-hFGF2 株, および hFGF2-2A-OVA 株の培養上清, ライセートサンプル中の OVA タンパク質, hFGF2 タンパク質をサンドイッチ ELISA で測定した. 培養上清は, DF-1 細胞を 60 mm ディッシュに播種し, コンフルエントに達した 3 日後に回収した. 溶解液サンプルは, 1.0×10^7 cells/mL の細胞溶解バッファー (Human FGF2 sandwich ELISA kit; Proteintech) に溶解して調製した. OVA タンパク質濃度は, (6) - ④と同様の手法で測定した. hFGF2 タンパク質濃度は, Human FGF basic/FGF2/bFGF DuoSet ELISA kit (R&D Systems) のプロトコールに従って測定した. hFGF2 タンパク質の吸光度は, 野生型 DF-1 細胞ライセートサンプルの吸光度を差し引くことにより算出した.

③Western blot

2A ペプチドが機能的であるかを確認するため, hFGF2-T2A-OVA 株から分泌される OVA タンパク質を Western blot により検出した. 培養上清サンプルは, hFGF2-T2A-OVA 株を 150 mm ディッシュでコンフルエントになるまで培養した後に, 培地を吸引し, 細胞を PBS (-) で 2 回洗浄した後, 15 mL の無血清培地 FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific) を加え, 7 日後に回収した. 回収した培養上清サンプルを Amicon Ultra – 15 (3 K; Merck)を用いて, 限外濾過によりサンプルを約 30 倍に濃縮し, ポリアクリルアミドゲル (CHR520L c・パジェル HR; ATTO) を用いて SDS-PAGE, 及び OVA 抗体を利用した Western blot を実施した. 手法は, (6) - ③に記載した.

A



B

エクソン1標的 合成オリゴ

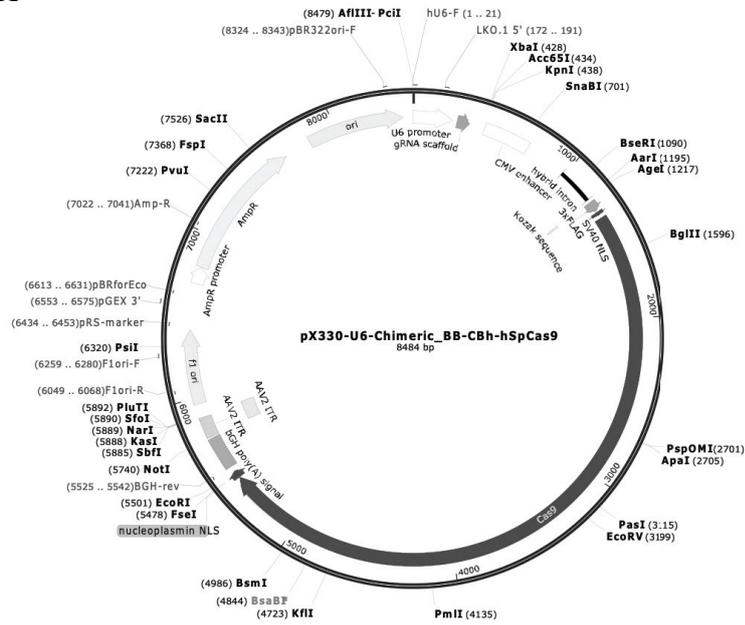
5' - CACCGCTAGCTGTATGTACAGACAC - 3'
 3' - CGATCGACATACATGTCTGTGCAAA - 5'

エクソン2 標的 合成オリゴ

5' - CACCGAGACAACCTCAGAGTTCACCA - 3'
 3' - CTCTGTTGAGTCTCAAGTGGTCAAA - 5'

図 21. OVA 遺伝子座における CRISPR/Cas9 ベクターの標的配列 (A) と, gRNA と
 して合成した配列 (B)を示す. (A) において小文字はイントロン領域, 大文字はエ
 クソン領域を表す.

A



B

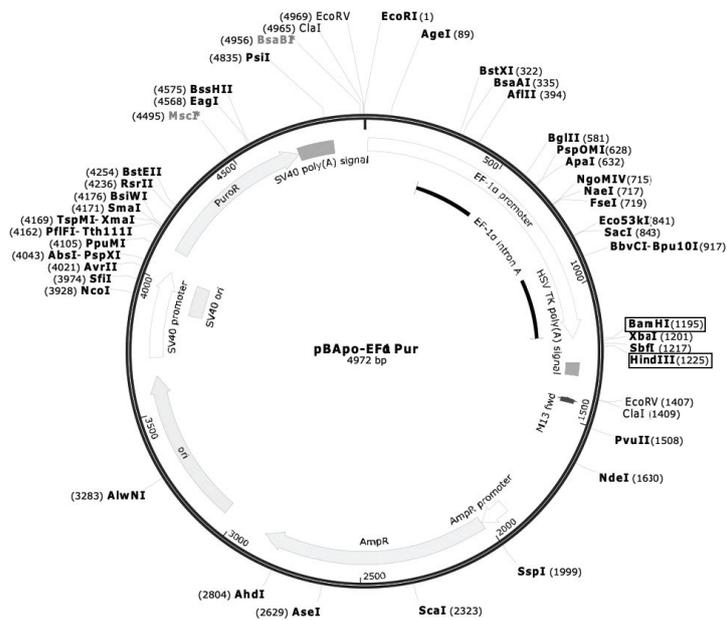


図 22. CRISPR/Cas9 ベクターの作製に利用した (A) pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ベクター (Addgene #42230)と, PITCh ドナーベクターの作製に利用した (B) pBApo-EF1a Pur DNA (Takara bio) のベクターマップを示す (Snap Gene Viewer により表示).

エクソン1編集用PITChベクター 合成オリゴDNA

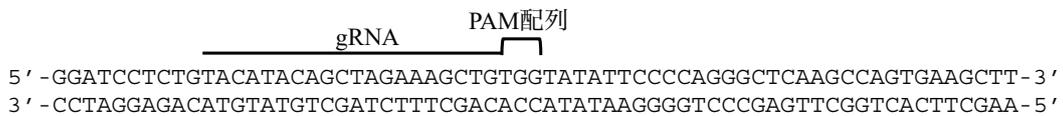
5' -GGATCCTCTGTACATACAGCTAGAAAGCTGTGGTATATTTCCCAGGGCTCAAGCCAGTGAAGCTT -3'
3' -CCTAGGAGACATGTATGTTCGATCTTTCGACACCATATAAGGGGTCCCAGTTCGGTCACTTCGAA -5'
BamHI 3'マイクロホモロジー 5'マイクロホモロジー HindIII

エクソン2編集用PITChベクター 合成オリゴDNA

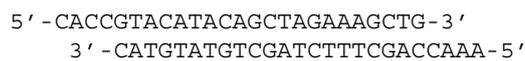
5' -GGATCCGCCACCATGGGCTCCATCGGTGCAGCAAGCCTTTGCTCTAGACAACCTCAGAGTTCAAAGCTT -3'
3' -CCTAGGCGGTGGTACCCGAGGTAGCCACGTCGTTTCGAAACGAGATCTGTGAGTCTCAAGTTTCGAA -5'
BamHI 3'マイクロホモロジー 5'マイクロホモロジー HindIII

図 23. PITCh ドナーベクターに挿入した合成オリゴの配列を示す。制限酵素配列、OVA 遺伝子座との相同なマイクロホモロジー配列が含まれる。

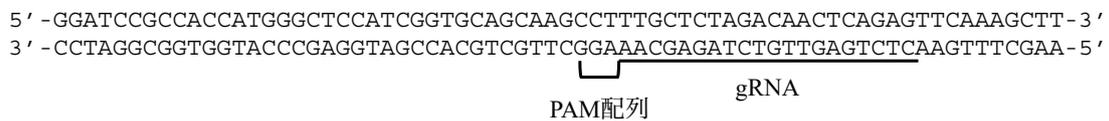
エクソン1編集用PITChベクター CRISPR/Cas9標的配列



CRISPR/Cas9ベクター 合成オリゴDNA



エクソン2編集用PITChベクター CRISPR/Cas9標的配列



CRISPR/Cas9ベクター 合成オリゴDNA

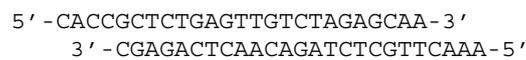


図 24. PITCh ドナーベクターを標的とする gRNA の配列.

表 2. EF1 α プロモーターのノックインの検出に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|------------------------------------|----------------------------|
| EF1 α -Exon1 Fragment 1 fwd | CTGTGGGTGGGTCACAATTC |
| EF1 α -Exon1 Fragment 1 rev | GACCGAACCCCGCGTTTA |
| EF1 α -Exon1 Fragment 2 fwd | CTGTGGGTGGGTCACAATTC |
| EF1 α -Exon1 Fragment 2 rev | CACGCAGGTACTIONTACCCTT |
| EF1 α -Exon2 Fragment 1 fwd | GGGTTATGGCCCTTGCGTG |
| EF1 α -Exon2 Fragment 1 rev | CATTGGCATGGTGGACTTTGA |
| EF1 α -Exon2 Fragment 2 fwd | GGGTTATGGCCCTTGCGTG |
| EF1 α -Exon2 Fragment 2 rev | TTCTGGGACAGTTTGCTACCC |

表 3. オフターゲット変異の検出に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|-----------------------|----------------------------|
| <i>DACH1</i> forward | GACGGATTTTCAGTTGCCAGC |
| <i>DACH1</i> reverse | TCTGGAACACTGCAGACACC |
| <i>IFT140</i> forward | TCCCATAGGTTTCAGAATTTTCCTTC |
| <i>IFT140</i> reverse | TGTTCTGTGGGAAGTAAGCCC |
| <i>TRAIP</i> forward | GATGGGCTCCCTCAGCTTTT |
| <i>TRAIP</i> reverse | GGGAAGCAGAGCAGTCTCAG |
| <i>SNX2</i> forward | ACTGATGCCACCTTGCTAC |
| <i>SNX2</i> reverse | AAGTTGGGTGGCAGTGTGA |
| <i>ATP2A2</i> forward | CTGCAGTCATGCTAAGGAAGC |
| <i>ATP2A2</i> reverse | GCACAGATCGTTGCCAGTTC |
| <i>KIF4B</i> forward | TACAACCTTTCTCTGGGGGC |
| <i>KIF4B</i> reverse | CGGTCTCCTTCAGCTTTGGT |

表 4. RT-PCR, RT-qPCR に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|--|----------------------------|
| <i>OVA</i> RT-PCR forward | GCGCAGCAAGCATGGAATTT |
| <i>OVA</i> RT-PCR reverse | AGAAGAGAACGGCGTTGGTT |
| <i>OVA</i> RT-qPCR forward | GCGCAGCAAGCATGGAATTT |
| <i>OVA</i> RT-qPCR reverse | AGAAGAGAACGGCGTTGGTT |
| β - <i>actin</i> RT-qPCR forward | AATCCGGACCCTCCATTGTC |
| β - <i>actin</i> RT-qPCR reverse | AATCCGGACCCTCCATTGTC |

表 5. OVA mRNA の配列解析に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|-------------------------|----------------------------|
| <i>OVA</i> mRNA primer1 | ATGGGCTCCATCGGCGCAGC |
| <i>OVA</i> mRNA primer2 | CCAAATCACCAAACCAAATG |
| <i>OVA</i> mRNA primer3 | AAGTATTCTGGCAGGATTGG |
| <i>OVA</i> mRNA primer4 | TACCAGATTGGTTTATTTAG |
| <i>OVA</i> mRNA primer5 | GCAGAAATCAATGAAGCAGG |
| <i>OVA</i> mRNA primer6 | GTTGGAAGGGACAGAGTTTT |

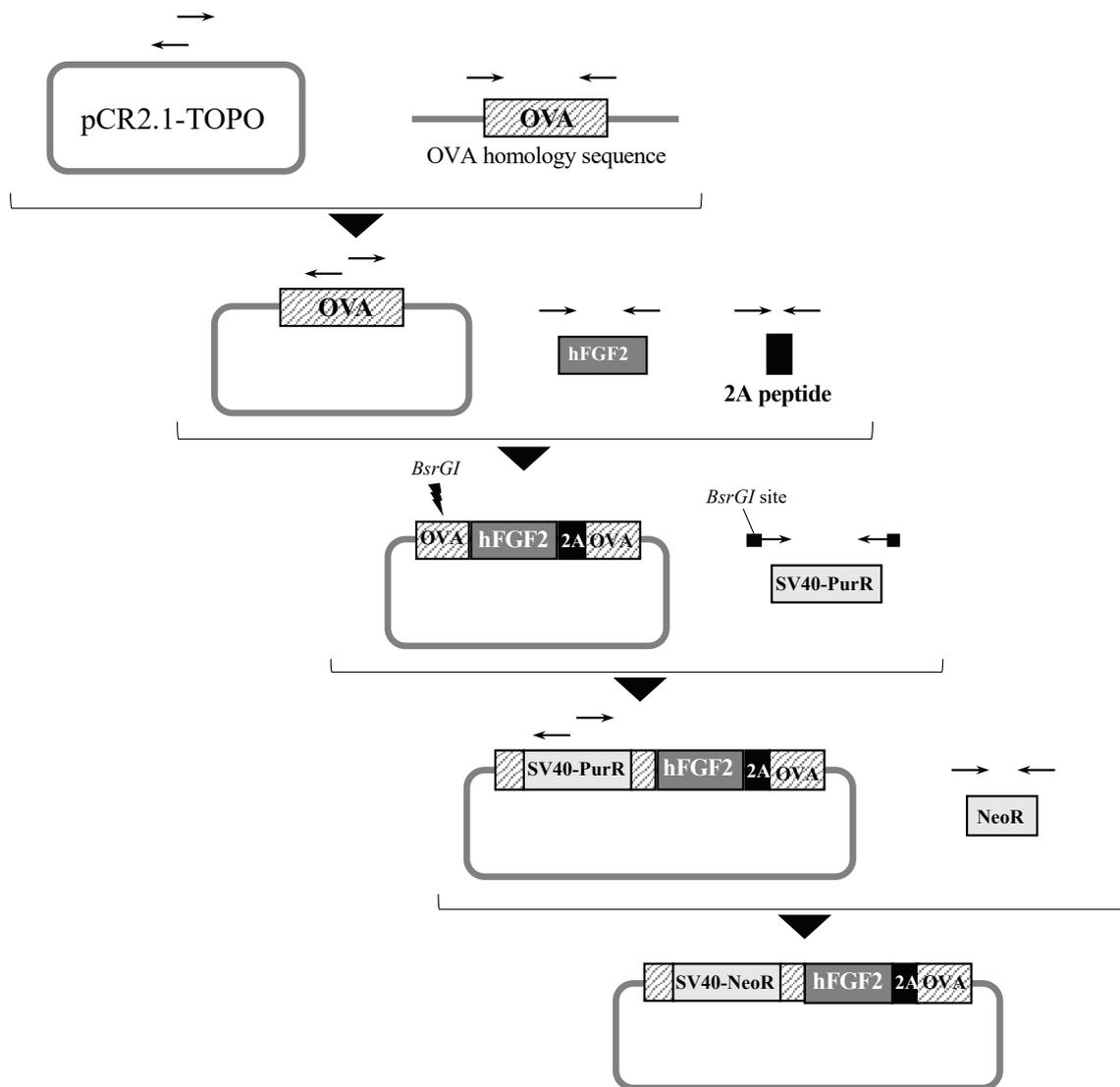


図 25. OVA 上流に hFGF2 遺伝子をノックインするために使用するドナーベクターの作製過程. 各矢印は, PCR に使用したプライマーを示す.

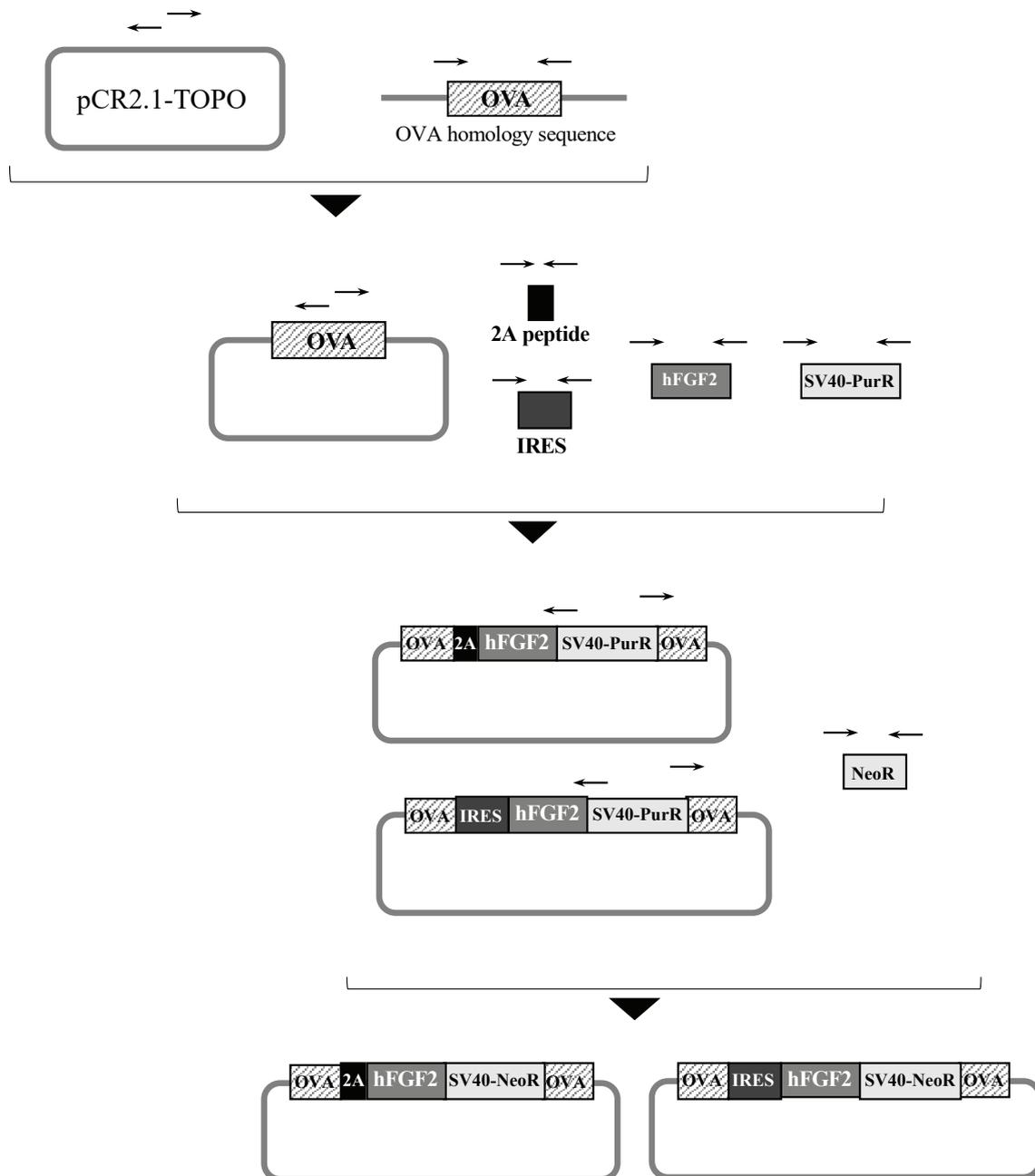


図 26. OVA 下流に hFGF2 遺伝子をノックインするために使用するドナーベクターの作製過程. 各矢印は, PCR に使用したプライマーを示す.

表 6. hFGF2 遺伝子を搭載したドナーベクター作製に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|--|--|
| PurR-hFGF2-2A donor (<i>OVA</i> homology forward) | GCAAGCCTCTGCTTTCTCAT |
| PurR-hFGF2-2A donor (<i>OVA</i> homology forward) | GCTTCCAGAGGAAAGGGACA |
| PurR-hFGF2-2A donor (pCR2.1-TOTO forward) | ATGGGCTCCATCGGTGCA |
| PurR-hFGF2-2A donor (pCR2.1-TOTO reverse) | GAAGCTCTGAGTTGTCTAGAGCAAACAG |
| PurR-hFGF2-2A donor (hFGF2 forward) | CTCTAGACAACACTCAGAGTTCGCCACCATGGCTGCTGGCAGCATC |
| PurR-hFGF2-2A donor (hFGF2 reverse) | CTCCGCTTCCATGGTGATGGTGATGATGGCTCTTGGCGCTCATTGG |
| PurR-hFGF2-2A donor (2A peptide forward) | CGCCAAGAGCCATCATCACCATCACCATGGAAGCGGAGAGGGCAGA |
| PurR-hFGF2-2A donor (2A peptide reverse) | GCTGCACCGATGGAGCCCATAGTCCAGGATTCTCCTCG |
| PurR-hFGF2-2A donor (SV40-PurR forward) | ATGTTAACTAGGGTGTGGAAAGTCC |
| PurR-hFGF2-2A donor (SV40-PurR reverse) | ATGTTAACTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC |
| 2A-hFGF2-PurR donor (<i>OVA</i> homology forward) | CAGGAAGGAAAGTTATGTGCGC |
| 2A-hFGF2-PurR donor (<i>OVA</i> homology forward) | AAGAGCACATTCACAAGACCCAT |
| 2A-hFGF2-PurR donor (pCR2.1-TOTO forward) | AAAGAAGAAAGCTGAAAACTCTG |
| 2A-hFGF2-PurR donor (pCR2.1-TOTO reverse) | AGGGGAAACACATCTGCC |
| 2A-hFGF2-PurR donor (hFGF2 forward) | TCCTGGACCTATGGCTGCTGGCAGCATC |
| 2A-hFGF2-PurR donor (hFGF2 reverse) | TCAATGGTGATGGTGATGATGGCTCTTGGCGCTCATTGG |
| 2A-hFGF2-PurR donor (2A peptide forward) | TTGGCAGATGTGTTTCCCTGGAAGCGGAGAGGGCAGA |
| 2A-hFGF2-PurR donor (2A peptide reverse) | CAGCAGCCATAGGTCCAGGATTCTCCTCG |
| 2A-hFGF2-PurR donor (SV40-PurR forward) | CATCATCACCATCACCATTGAGGTGTGGAAAGTCCCCAG |
| 2A-hFGF2-PurR donor (SV40-PurR reverse) | GTTTTTCAGCTTTCTTCTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG |
| IRES-hFGF2-PurR donor (<i>OVA</i> homology forward) | CAGGAAGGAAAGTTATGTGCGC |
| IRES-hFGF2-PurR donor (<i>OVA</i> homology forward) | AAGAGCACATTCACAAGACCCAT |
| IRES-hFGF2-PurR donor (pCR2.1-TOTO forward) | AAAGAAGAAAGCTGAAAAAC |
| IRES-hFGF2-PurR donor (pCR2.1-TOTO reverse) | TTAAGGGGAAACACATCTG |
| IRES-hFGF2-PurR donor (hFGF2 forward) | CGATGATAATGCCACCATGGCTGCTGGCAGCATC |
| IRES-hFGF2-PurR donor (hFGF2 reverse) | TCAATGGTGATGGTGATGATGGCTCTTGGCGCTCATTGG |
| IRES-hFGF2-PurR donor (IRES forward) | GCAGATGTGTTTCCCTTAAGCCCTCTCCCTCCCCC |
| IRES-hFGF2-PurR donor (IRES reverse) | CCATGGTGGCATTATCATCGTGTTTTCAAAGGAAAACCAGTCCCC |
| IRES-hFGF2-PurR donor (SV40-PurR forward) | CATCATCACCATCACCATTGAGGTGTGGAAAGTCCCCAG |
| IRES-hFGF2-PurR donor (SV40-PurR reverse) | GTTTTTCAGCTTTCTTCTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG |
| NeoR-hFGF2-2A donor (NeoR forward) | GTCTGGATCTTCAGAAGAACTCGTCAAGAA |
| NeoR-hFGF2-2A donor (NeoR reverse) | CGGATCTACCATGATTGAACAAGATGGATT |
| NeoR-hFGF2-2A donor (hFGF2-2A forward) | GTTCAATCATGGTAGATCCGGGACCTGAAA |
| NeoR-hFGF2-2A donor (hFGF2-2A reverse) | GTTCTTCTGAAGATCCAGACATGATAAGAT |
| 2A-hFGF2-NeoR donor (NeoR forward) | CGGATCTACCATGATTGAACAAGATGGATTG |
| 2A-hFGF2-NeoR donor (NeoR reverse) | GTCTGGATCTTCAGAAGAACTCGTCAAG |
| 2A-hFGF2-NeoR donor (2A-hFGF2 forward) | GTTCTTCTGAAGATCCAGACATGATAAGATACATTGATG |
| 2A-hFGF2-NeoR donor (2A-hFGF2 reverse) | GTTCAATCATGGTAGATCCGGGACCTGAAAATAAAG |
| IRES-hFGF2-NeoR donor (NeoR forward) | CGGATCTACCATGATTGAACAAGATGGATTG |
| IRES-hFGF2-NeoR donor (NeoR reverse) | GTCTGGATCTTCAGAAGAACTCGTCAAG |
| IRES-hFGF2-NeoR donor (IRES-hFGF2 forward) | GTTCTTCTGAAGATCCAGACATGATAAGATACATTGATG |
| IRES-hFGF2-NeoR donor (IRES-hFGF2 reverse) | GTTCAATCATGGTAGATCCGGGACCTGAAAATAAAG |

OVA上流にhFGF2をノックイン



OVA下流にhFGF2をノックイン

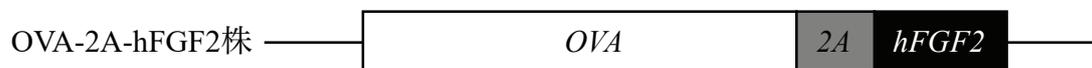


図 27. hFGF2 遺伝子のノックインにより樹立する細胞株.

表 7. hFGF2 遺伝子のノックインの検出に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|-----------------------------------|----------------------------|
| hFGF2-2A-OVA fragment1 forward | AGTACCTGCGTGATACCCCC |
| hFGF2-2A-OVA fragment1 reverse | CCACTCTTCCATCGGGGTGA |
| hFGF2-2A-OVA fragment2 forward | CTTCAAGGACCCCAAGAGACTG |
| hFGF2-2A-OVA fragment2 reverse | AGGGCTTGGAACAGCTAAGAG |
| hFGF2-2A-OVA fragment3 forward | AATCGGACGGGGGTAGTCTC |
| hFGF2-2A-OVA fragment3 reverse | CCACTCTTCCATCGGGGTGA |
| OVA-2A- hFGF2 fragment1 forward | GCCATGACAAGAGCAATCAGTT |
| OVA-2A- hFGF2 fragment1 reverse | CCACTCTTCCATCGGGGTGA |
| OVA-2A- hFGF2 fragment2 forward | TGCTTCTTCTTCGAACGCCT |
| OVA-2A- hFGF2 fragment2 reverse | GCTGTAGGGGACTCTTGTTCA |
| OVA-2A- hFGF2 fragment3 forward | GAAGTGGGTGGGAGAGTTTCG |
| OVA-2A- hFGF2 fragment3 reverse | TTGAAGTGGCCTGGTGGAAA |
| OVA-IRES- hFGF2 fragment1 forward | GCCATGACAAGAGCAATCAGTT |
| OVA-IRES- hFGF2 fragment1 reverse | CCTCACATTGCCAAAAGACGG |
| OVA-IRES- hFGF2 fragment2 forward | TGCTTCTTCTTCGAACGCCT |
| OVA-IRES- hFGF2 fragment2 reverse | GCTGTAGGGGACTCTTGTTCA |
| OVA-IRES- hFGF2 fragment3 forward | GAAGTGGGTGGGAGAGTTTCG |
| OVA-IRES- hFGF2 fragment3 reverse | TTGAAGTGGCCTGGTGGAAA |

表 8. オフターゲット変異の検出に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|-----------------------------------|----------------------------|
| <i>ATP2A2</i> forward | CTGCAGTCATGCTAAGGAAGC |
| <i>ATP2A2</i> reverse | GCACAGATCGTTGCCAGTTC |
| Chr4: 63892460- 63892504 forward | TCAGTGGGTGTTGGTCCAAGC |
| Chr4: 63892460- 63892504 reverse | CCCTTAATCTGGCAAGCAAGCCAT |
| Chr20: 10738775- 10738838 forward | GCCTGCAGACTGTAAGAACAAGTG |
| Chr20: 10738775- 10738838 reverse | CACAACACGAGGAATGGCTTCTAG |
| Chr21: 1158817- 1158880 forward | CTCCAGCTCGCAGATAACACAAAG |
| Chr21: 1158817- 1158880 Reverse | GCAAAGTACCTGGGAATGATGGAG |

表 9. RT-PCR に使用したプライマー

| Primer | Sequence (5' to 3') |
|----------------------------------|----------------------------|
| hFGF2-2A- OVA cell line forward | ATGGCTGCTGGCAGCATCAC |
| hFGF2-2A- OVA cell line reverse | AGAAGAGAACGGCGTTGGTT |
| OVA-2A-hFGF2 cell line forward | ATGGGCTCCATCGGTGCAGC |
| OVA-2A-hFGF2 cell line reverse | GCTCTTGGCGTCAT |
| OVA-IRES-hFGF2 cell line forward | ATGGGCTCCATCGGTGCAGC |
| OVA-IRES-hFGF2 cell line reverse | GCTCTTGGCGTCAT |

3-3 成績

(1) OVA 発現細胞株の樹立

OVA の強制発現は、PITCh 法を用いて OVA 遺伝子座に EF1 α プロモーターをノックインすることで実施した。3 種類のプラスミドベクター（OVA 遺伝子座を標的とする CRISPR/Cas9 ベクター、EF1 α プロモーターを有する PITCh ドナーベクター、および PITCh ドナーベクターを標的とする CRISPR/Cas9 ベクター）を用いて、エクソン 1 上流のイントロン、開始コドン上流のエクソンに EF1 α プロモーターをノックインした。クローン化した細胞からゲノム DNA を抽出し、図 28-A および図 29-A に示すように、フラグメント 1 および 2 を増幅することで、ノックインを検出した。PCR の結果、EF1 α プロモーターが OVA 遺伝子座の目的箇所にノックインされたことを確認した（図 28-B および図 29-B）。さらに、PITCh ドナーベクターは OVA のエクソン 1 上流、エクソン 2 の開始コドン上流の標的 2 箇所において、対立遺伝子の片アレルにノックインされたことを確認した（図 28-C および図 29-C）。

続いて EF1 α -Exon1 株、EF1 α -Exon2 株において、オフターゲット変異が生じたかどうかを解析した。CRISPRdirect を用いて、gRNA と相同性の高い領域をスクリーニングした。スクリーニングした領域のうち、遺伝子をコードする 6 つの領域をオフターゲット解析のために選択した。候補領域を PCR により増幅し、シーケンス解析を実施した結果、EF1 α -Exon1 および EF1 α -Exon2 株にインデル変異は認められなかった（表 10）。

(2) OVA の発現解析

まず、EF1 α -Exon1 および EF1 α -Exon2 株における OVA 発現を mRNA レベルで解析した。RT-PCR の結果、OVA は EF1 α -Exon1 および EF1 α -Exon2 株で発現していたが、ゲ

ノム編集ツールを導入していない DF-1 細胞では発現していなかった (図 30-A). 次に, EF1 α -Exon1 株と EF1 α -Exon2 株の間で OVA の転写レベルに違いがあるかどうかを調べるため, RT-qPCR を行った. RT-qPCR の結果, EF1 α -Exon1 細胞株では, EF1 α -Exon2 細胞株よりも OVA 発現が約 3 倍高いことが示された (図 30-B). また, 合成した cDNA を鋳型としたシーケンス解析により, 正常に OVA mRNA が転写されているかを確認した. シーケンス結果を, GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 上の OVA mRNA 配列 (accession number : MF321659.1) と比較し, 正常な転写が生じていることを確認した (図 31).

次に EF1 α -Exon1 株と EF1 α -Exon2 株から分泌される OVA タンパク質を, 抗 OVA 抗体を使用した Western blot で確認した. その結果, EF1 α -Exon1 株の培養上清から多量の OVA タンパク質が検出されたのに対し, EF1 α -Exon2 株の培養上清からは微量の OVA タンパク質しか検出されなかった (図 32). ライセートサンプルからは OVA タンパク質は検出されなかった. 培養上清およびライセート中の OVA タンパク質濃度を推定するため, サンドイッチ ELISA を実施した. 濃度の推定に用いた標準曲線を図 33-A に示す. EF1 α -Exon1 細胞株の培養上清には約 1.5 μ g/mL の OVA タンパク質が含まれ, ライセートには約 140 ng/mL の OVA タンパク質が含まれていた (図 33-B).

(3) hFGF2 遺伝子のノックイン

EF1 α -Exon1 株は EF1 α -Exon2 株と比較して, OVA タンパク質を高発現するため *in vitro* 評価系に使用した. 有用タンパク質として, 再生医療における重要性から hFGF2 タンパク質を選択した. OVA の開始コドンは, ニワトリを利用したバイオリクターにおけるノックイン部位として一般的に用いられている [5, 6]. しかしながら, OVA は胚発生に必須であるため, OVA の完全な欠失は胚性致死を引き起こす. そこで本研究では, OVA を hFGF2 へと置き換えるのではなく, OVA と hFGF2 タンパク質の共発

現系の構築を試みた。OVA 開始コドンの上流への hFGF2 遺伝子のノックインの模式図を図 34-A に示す。hFGF2 遺伝子を、2A ペプチドを介して OVA 上流にノックインし、薬剤選択マーカーは、エクソン 2 上流のイントロン領域に位置するように設計した。ドナーベクターのノックインは、PCR により増幅されるフラグメント 1-3 によって確認した。シングルセルクローニングの後にジェノタイピングを実施した結果、3 つの hFGF2-2A-OVA 株 (#2, #12, #19) においてドナーベクターのノックインが確認された (図 34-B)。OVA 終始コドン下流への、2A ペプチドを介した hFGF2 遺伝子のノックインの模式図を図 35-A に示す。ジェノタイピングを実施した結果、3 つの OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8) においてドナーベクターのノックインが確認された (図 35-B)。同様に、IRES 配列を介した hFGF2 遺伝子のノックインの模式図を図 36-A に示す。ジェノタイピングを実施した結果、3 つの OVA-IRES-hFGF2 株 (#6, #11, #30) においてドナーベクターのノックインが確認された (図 36-B)。それぞれの、細胞株において、ドナーベクターが正確に目的領域にノックインされているかを確認するためシーケンス解析を実施した。その結果、hFGF2-2A-OVA 株 (#2, #12, #19)、OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8)、および OVA-IRES-hFGF2 株 (#6, #11, #30) において目的位置に正確にドナーベクターがノックインされていることが確認された (図 37)。

続いて hFGF2-2A-OVA 株 (#2, #12, #19)、OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8)、および OVA-IRES-hFGF2 株 (#6, #11, #30) において、オフターゲット変異が生じたかどうかを解析した。ニワトリゲノムにおける CRISPR/Cas9 の変異候補領域を CRISPRdirect , TALEN の変異候補領域を、PROGNOS を用いてスクリーニングした。スクリーニングした領域のうち、遺伝子をコードする領域をオフターゲット解析のために選択した。候補領域を PCR により増幅し、シーケンス解析を実施した結果、hFGF2-2A-OVA 株 (#2, #12, #19)、OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8)、および OVA-IRES-hFGF2 株 (#6, #11, #30) にインデル変異は認められなかった (表 11)。

(4) hFGF2 遺伝子ノックイン細胞株の解析

hFGF2 をノックインした hFGF2-2A-OVA 株 (#2, #12, #19), OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8), および OVA-IRES-hFGF2 株 (#6, #11, #30) で, OVA と hFGF2 が転写されるかどうかを調べた. それぞれの株においての予測 mRNA 配列を図 38-A, 図 38-C および図 38-E に示す. RT-PCR の結果, すべての細胞株で OVA と hFGF2 が転写されていることを確認した (図 38-B, 図 38-D および図 38-F).

培養上清とライセート中の OVA と hFGF2 タンパク質の濃度を推定するため, サンドイッチ ELISA を実施した. 濃度の推定に用いた検量線を図 39-A, B に示す. まず, リンカーの検討のため, OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8), OVA-IRES-hFGF2 株 (#6, #11, #30) における OVA, hFGF2 タンパク質の発現量を測定した (図 40-A, B). OVA-2A-hFGF2 株においては, OVA タンパク質は培養上清中に 100-150 ng/ml, hFGF2 タンパク質はライセート中に 1.0-2.5 ng/ml に含まれていた. OVA-IRES-hFGF2 株においては, OVA タンパク質は培養上清中に 160-180 ng/ml, hFGF2 タンパク質はライセート中に約 1.0 ng/ml に含まれていた (図 40-A, B). これらの結果は, 2つの遺伝子をリンカー (2A ペプチド, IRES) により接続する場合, 下流に位置する遺伝子の発現量は, 2A ペプチドを利用することで, 高収量が得られる傾向があることを示唆している.

続いて, 有用タンパク質のノックイン箇所として, OVA の上流または下流を検討するため, hFGF2-2A-OVA 株 (#2, #12, #19), OVA-2A-hFGF2 株 (#1, #6, #8) における OVA, hFGF2 タンパク質の発現量を測定した. hFGF2-2A-OVA 株においては, OVA タンパク質は培養上清中に約 50 ng/ml, hFGF2 タンパク質はライセート中に 10-15 ng/ml に含まれていた (図 41-A, B). この結果を, OVA-2A-hFGF2 株の測定結果と比較すると, OVA 上流への hFGF2 遺伝子のノックインにより, より多量な hFGF2 タンパク質 ($p < 0.05$) が得られることが示唆された. さらに, 2A ペプチドが機能的であるかどうか

かを確認するために、hFGF2-2A-OVA から分泌された OVA タンパク質をウェスタンブロットティングにより検出した。その結果、培養上清中から単一の OVA タンパク質が検出され、2A ペプチド領域で切断が起こったことが示唆された (図 42)。一方、ライセートサンプル中から、hFGF2 タンパク質を検出することはできなかった (データは示していない)。

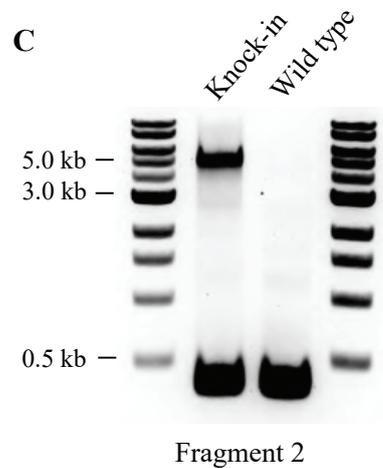
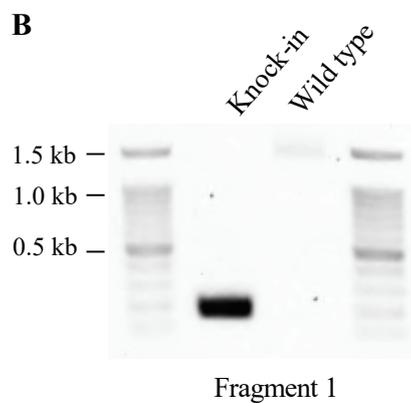
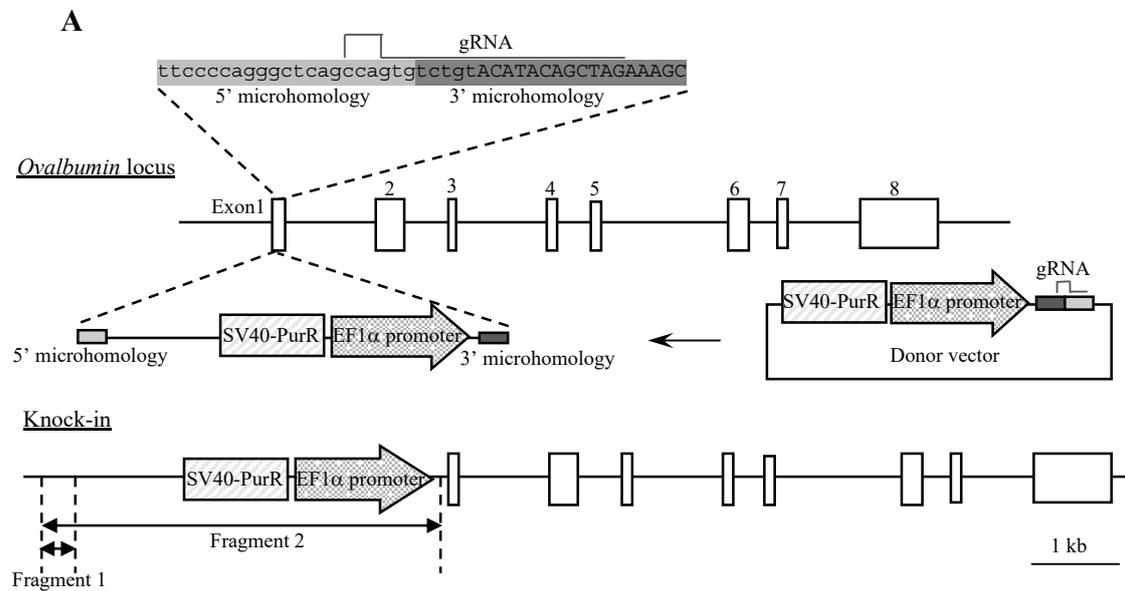


図 28. OVA 上流への EF1 α プロモーターのノックイン. (A) ノックインの模式図を示す. Fragment1 と Fragment2 はノックインの検出で増幅された領域を表す. (B) Fragment1 の検出. (C) Fragment2 の検出.

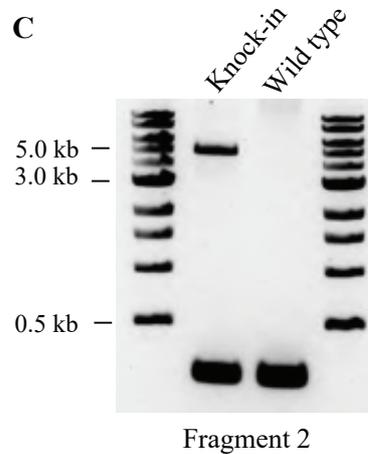
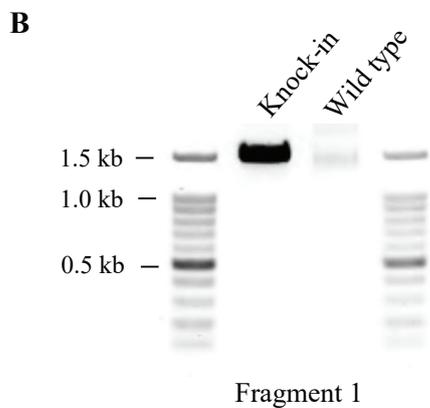
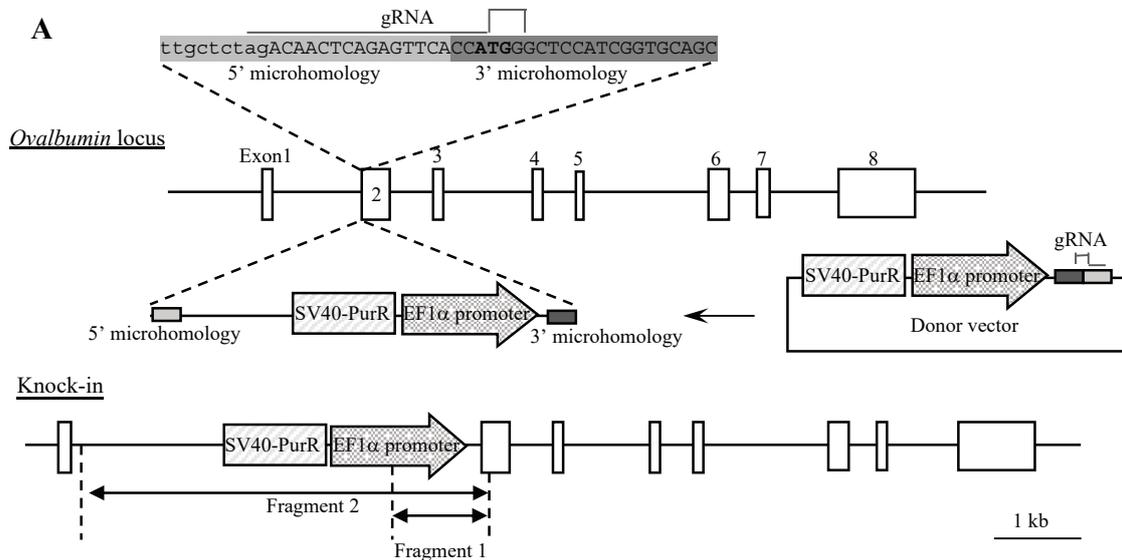


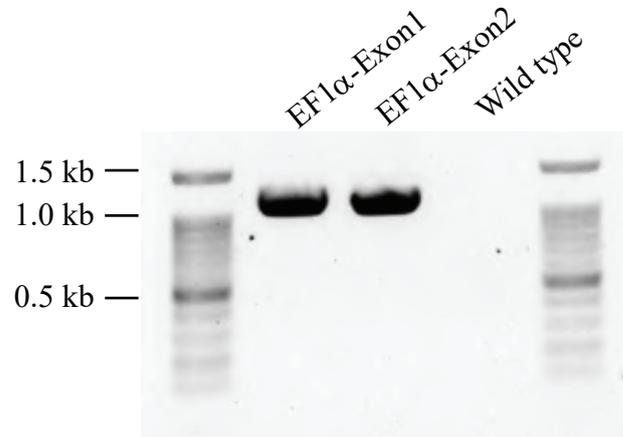
図 29. OVA 下流への EF1 α プロモーターのノックイン. (A) ノックインの模式図を示す. Fragment1 と Fragment2 はノックインの検出で増幅された領域を表す. (B) Fragment1 の検出. (C) Fragment2 の検出.

表 10. オフターゲット変異候補領域の解析

| | Chromosomal Coordinates | Genomic Region | Sequence | Mutation |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------|--|----------|
| CRISPR/Cas9 for Exon1 | Chr1: 1559184010-155918431 | Intron of <i>DACHI</i> | CCT <u>GTG</u> <u>CTGTACATGAAGCAG</u> | – |
| | Chr14: 13769000-13769021 | Intron of <i>IFT140</i> | ATGTG <u>ATGTACAGACACAGGAG</u> | – |
| CRISPR/Cas9 for donor vector | Chr12: 2564717-2564739 | Intron of <i>TRAIIP</i> | CCT <u>CAGCTTTCTAGCACACGGAA</u> | – |
| | ChrZ: 81080422-81080443 | Exon of <i>SNX2</i> | CCT <u>CAGCTTTCTAGCCCCAAC</u> | – |
| CRISPR/Cas9 for Exon2 | Chr15: 5310793-5310814 | Intron of <i>ATP2A2</i> | <u>GGAA</u> <u>CTACAGAGTTCACCA</u> GGG | – |
| CRISPR/Cas9 for donor vector | Chr4: 1250624-1250646 | Intron of <i>KIF4B</i> | <u>CCGTATC</u> <u>CCTGTCTAGAGCA</u> GGG | – |

シーケンスの太字は PAM 配列を示す。下線は使用した gRNA と相同な配列を表す。

A



B

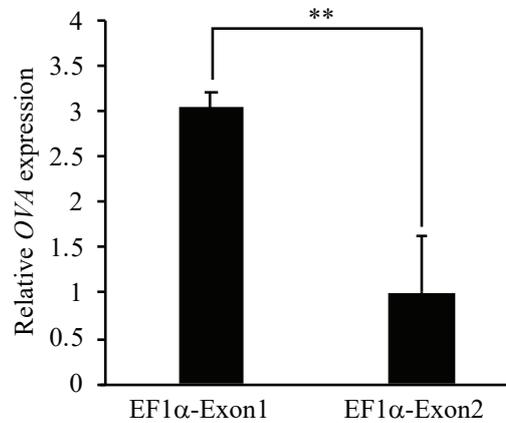


図 30. RT-PCR および RT-qPCR による OVA の発現解析. (A) RT-PCR による EF1α-Exon1 株, EF1α-Exon2 株および野生型 DF-1 の OVA の発現を示す. (B) RT-qPCR による EF1α-Exon1 株, EF1α-Exon2 株間における OVA の発現レベルの差を示す. エラーバーは, 標準偏差 (SD) を示す (n=3). 統計解析は Two tailed Welch's t-test により実施した (** $p < 0.01$).

```

EF1α-Exon1 1:ATGGGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATTTGGTTTGTATGATTCAAGGAGCTCAAAGTCCACCATGCCAATGAGAACATCTTCTACTGCCCCATGGCCATCATGTAGCTTAGCC 120
EF1α-Exon2 1:ATGGGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATTTGGTTTGTATGATTCAAGGAGCTCAAAGTCCACCATGCCAATGAGAACATCTTCTACTGCCCCATGGCCATCATGTAGCTTAGCC 120
OVA mRNA 1:ATGGGCTCCATCGGTGCAGCAAGCATGGAATTTGGTTTGTATGATTCAAGGAGCTCAAAGTCCACCATGCCAATGAGAACATCTTCTACTGCCCCATGGCCATCATGTAGCTTAGCC 120
M G S I G A A S M E F C F D V F K E L K V H H A N E N I F Y C P I A I M S A L A

EF1α-Exon1 121:ATGGTATACCTGGGTGCAAAGACAGCACCCAGGACACAAATAAATAAGGTTGTTTCGCTTTGATAAATCTCCAGGATTCGGAGACAGTATTGAAGCTCAGTGTGGCACATCTGTTAAACGTT 240
EF1α-Exon2 121:ATGGTATACCTGGGTGCAAAGACAGCACCCAGGACACAAATAAATAAGGTTGTTTCGCTTTGATAAATCTCCAGGATTCGGAGACAGTATTGAAGCTCAGTGTGGCACATCTGTTAAACGTT 240
OVA mRNA 121:ATGGTATACCTGGGTGCAAAGACAGCACCCAGGACACAAATAAATAAGGTTGTTTCGCTTTGATAAATCTCCAGGATTCGGAGACAGTATTGAAGCTCAGTGTGGCACATCTGTTAAACGTT 240
M V Y L G A K D S T R T Q I N K V V R F D K L P G F G D S I E A Q C G T S V N V

EF1α-Exon1 241:CACTCTTCACTTAGAGACATCTCAACCAATCACCACCAATGATGTTTATTCGTTGAGCTTCCAGTAGACTTTATGCTGAAGAGAGATACCAATCTCCGAGAATACTTGCAG 360
EF1α-Exon2 241:CACTCTTCACTTAGAGACATCTCAACCAATCACCACCAATGATGTTTATTCGTTGAGCTTCCAGTAGACTTTATGCTGAAGAGAGATACCAATCTCCGAGAATACTTGCAG 360
OVA mRNA 241:CACTCTTCACTTAGAGACATCTCAACCAATCACCACCAATGATGTTTATTCGTTGAGCTTCCAGTAGACTTTATGCTGAAGAGAGATACCAATCTCCGAGAATACTTGCAG 360
H S S L R D I L N Q I T K P N D V Y S F S L A S R L Y A E E R Y P I L P E Y L Q

EF1α-Exon1 361:TGTGTGAAGGAACGTATAGAGGAGGCTTGAACCTATCAACTTCAAACAGCTGCAGATCAAGCCAGAGAGCTCATCAATCTGGGTAGAAAAGTACAGACAAATGGAATTTATCAGAAAT 480
EF1α-Exon2 361:TGTGTGAAGGAACGTATAGAGGAGGCTTGAACCTATCAACTTCAAACAGCTGCAGATCAAGCCAGAGAGCTCATCAATCTGGGTAGAAAAGTACAGACAAATGGAATTTATCAGAAAT 480
OVA mRNA 361:TGTGTGAAGGAACGTATAGAGGAGGCTTGAACCTATCAACTTCAAACAGCTGCAGATCAAGCCAGAGAGCTCATCAATCTGGGTAGAAAAGTACAGACAAATGGAATTTATCAGAAAT 480
C V K E L Y R G G L E P I N F Q T A A D Q A R E L I N S W V E S Q T N G I I R N

EF1α-Exon1 481:GTCCCTCAGCCAAGCTCCGTTGGATTCTCAACTGCAATGGTCTGTTTAAATGCCATTGCTTCAAAGGACTGTGGGAGAAAAGCATTAAAGGATGAAGACACACAAGCAATGCCTTTCAGA 600
EF1α-Exon2 481:GTCCCTCAGCCAAGCTCCGTTGGATTCTCAACTGCAATGGTCTGTTTAAATGCCATTGCTTCAAAGGACTGTGGGAGAAAAGCATTAAAGGATGAAGACACACAAGCAATGCCTTTCAGA 600
OVA mRNA 481:GTCCCTCAGCCAAGCTCCGTTGGATTCTCAACTGCAATGGTCTGTTTAAATGCCATTGCTTCAAAGGACTGTGGGAGAAAAGCATTAAAGGATGAAGACACACAAGCAATGCCTTTCAGA 600
V L Q P S V D S Q T A M V L V N A I V F K G L W E K A F K D E D T Q A M P F R

EF1α-Exon1 601:GTGACTGAGCAAGAAAGCAAACCTGTGCAGATGATACCAGATGGTTTATTTAGAGTGGCATCAATGGCTTCTGAGAAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTGGCCAGTGGGACAAATG 720
EF1α-Exon2 601:GTGACTGAGCAAGAAAGCAAACCTGTGCAGATGATACCAGATGGTTTATTTAGAGTGGCATCAATGGCTTCTGAGAAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTGGCCAGTGGGACAAATG 720
OVA mRNA 601:GTGACTGAGCAAGAAAGCAAACCTGTGCAGATGATACCAGATGGTTTATTTAGAGTGGCATCAATGGCTTCTGAGAAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTGGCCAGTGGGACAAATG 720
V T E Q E S K P V Q M M Y Q I G L F R V A S M A S E K M K I L E L P F A S G T M

EF1α-Exon1 721:AGCATGTGGTGTCTGTTCCCTGATGAAGTCTCAGGCCTTGAGCAGCTTGAGAGATATAATCAACTTTGAAAACTGACTGAATGGACAGTTCTAATGTTATGGAAGAGAGGAGAGATCAA 840
EF1α-Exon2 721:AGCATGTGGTGTCTGTTCCCTGATGAAGTCTCAGGCCTTGAGCAGCTTGAGAGATATAATCAACTTTGAAAACTGACTGAATGGACAGTTCTAATGTTATGGAAGAGAGGAGAGATCAA 840
OVA mRNA 721:AGCATGTGGTGTCTGTTCCCTGATGAAGTCTCAGGCCTTGAGCAGCTTGAGAGATATAATCAACTTTGAAAACTGACTGAATGGACAGTTCTAATGTTATGGAAGAGAGGAGAGATCAA 840
S M L V L L P D E V S G L E Q L E S I I N F E K L T E W T S S N V M E E R K I K

EF1α-Exon1 841:GTGTACTTACCTCGCATGAAGTGGAGGAAAAATACAACCTCACATCTGCTTAAATGGCTATGGCCATTACTGACGTGTTTAGCTCTTCAGCCAAATCTGCTGGCACTCTCCTCAGCAGAG 960
EF1α-Exon2 841:GTGTACTTACCTCGCATGAAGTGGAGGAAAAATACAACCTCACATCTGCTTAAATGGCTATGGCCATTACTGACGTGTTTAGCTCTTCAGCCAAATCTGCTGGCACTCTCCTCAGCAGAG 960
OVA mRNA 841:GTGTACTTACCTCGCATGAAGTGGAGGAAAAATACAACCTCACATCTGCTTAAATGGCTATGGCCATTACTGACGTGTTTAGCTCTTCAGCCAAATCTGCTGGCACTCTCCTCAGCAGAG 960
V Y L P R M K M E E K Y N L T S V L M A M G I T D V F S S S A N L S G I S S A E

EF1α-Exon1 961:AGCCTGAAGATATCTCAAGCTGTCCATGCAGCACATGCAGAAATCAATGAAGCAGGACAGAGGTTGGTAGGTCAGCAGAGGCTGGAGTGGATGCTGCAAGCGCTCTCTGAAGAATTTAGG 1080
EF1α-Exon2 961:AGCCTGAAGATATCTCAAGCTGTCCATGCAGCACATGCAGAAATCAATGAAGCAGGACAGAGGTTGGTAGGTCAGCAGAGGCTGGAGTGGATGCTGCAAGCGCTCTCTGAAGAATTTAGG 1080
OVA mRNA 961:AGCCTGAAGATATCTCAAGCTGTCCATGCAGCACATGCAGAAATCAATGAAGCAGGACAGAGGTTGGTAGGTCAGCAGAGGCTGGAGTGGATGCTGCAAGCGCTCTCTGAAGAATTTAGG 1080
S L K I S Q A V H A A H A E I N E A G R E V V G S A E A G V D A A S V S E E F R

EF1α-Exon1 1081:GCTGACCATCCATCTCTTCTGTATCAAGCACATCGCAACCAACGCCGTTCTCTCTTTGGCAGATGTGTTCCCTTAA 1161
EF1α-Exon2 1081:GCTGACCATCCATCTCTTCTGTATCAAGCACATCGCAACCAACGCCGTTCTCTCTTTGGCAGATGTGTTCCCTTAA 1161
OVA mRNA 1081:GCTGACCATCCATCTCTTCTGTATCAAGCACATCGCAACCAACGCCGTTCTCTCTTTGGCAGATGTGTTCCCTTAA 1161
A D H P F L F C I K H I A T N A C V L F P G R C V S P *

```

図 31. OVA mRNA のシーケンス解析の結果. EF1α-Exon1 株, EF1α-Exon2 株, およびデータベース上の OVA の mRNA 配列 (accession number MF321659.1).

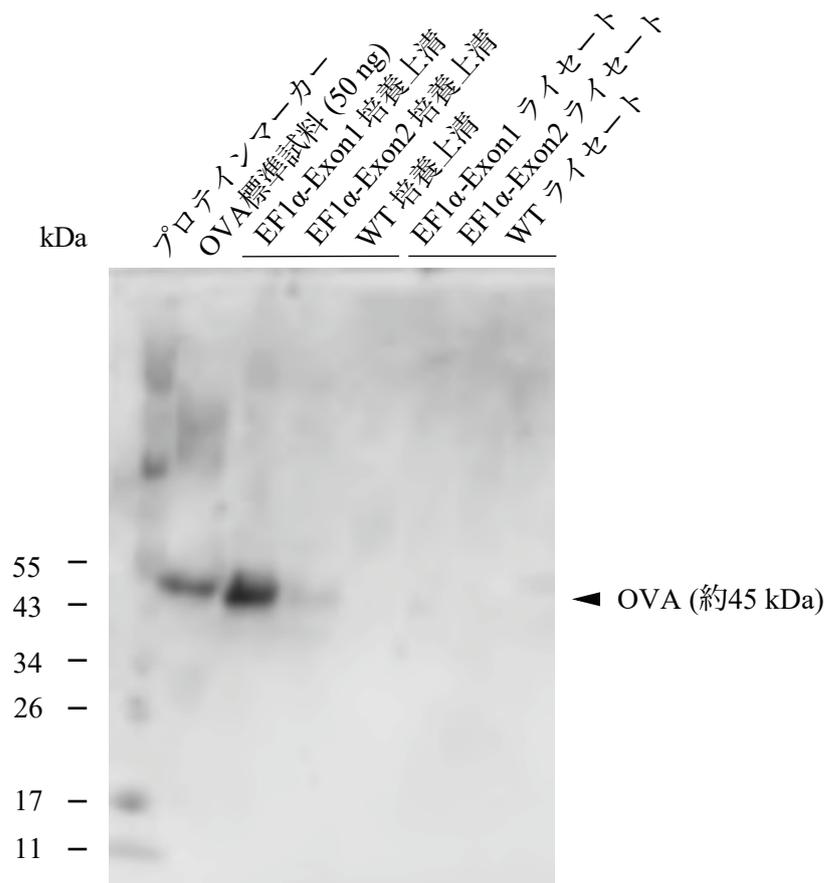
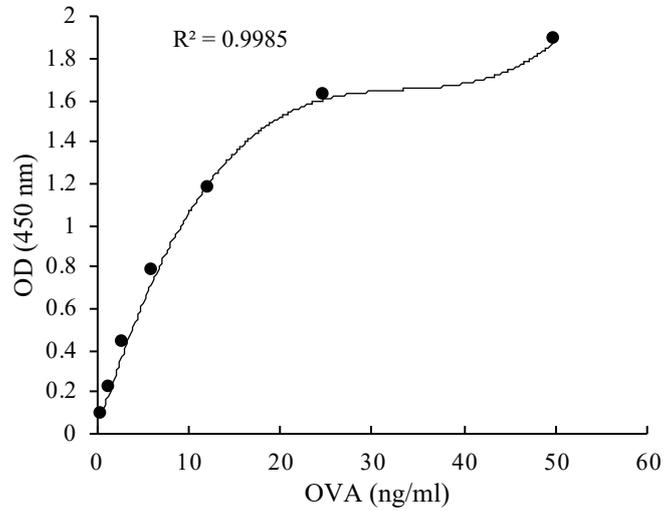


図 32. 抗 OVA 抗体を使用した Western blot の結果. 左レーンからプロテインマーカー, OVA 標準試料 (50 ng), EF1 α -Exon1 培養上清, EF1 α -Exon2 培養上清, WT 培養上清, EF1 α -Exon1 ライセート, EF1 α -Exon2 ライセート, WT ライセート.

A



B

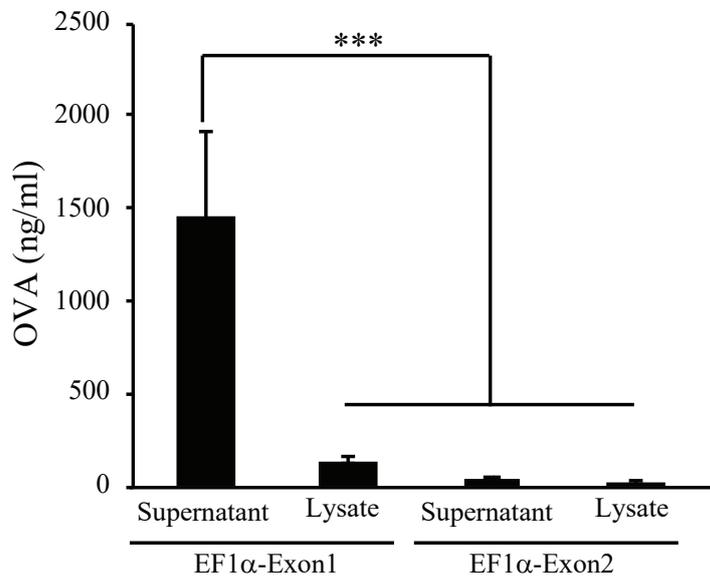


図 33. 抗 OVA 抗体を使用した ELISA の結果. (A) OVA 標準試料を使用して作製した検量線. (B) 検量線を使用して算出された, 培養上清およびライセート中の OVA タンパク質の濃度. エラーバーは平均値の SD として表され, Tukey の検定により統計的に解析された $***p < 0.001$ ($n=3$).

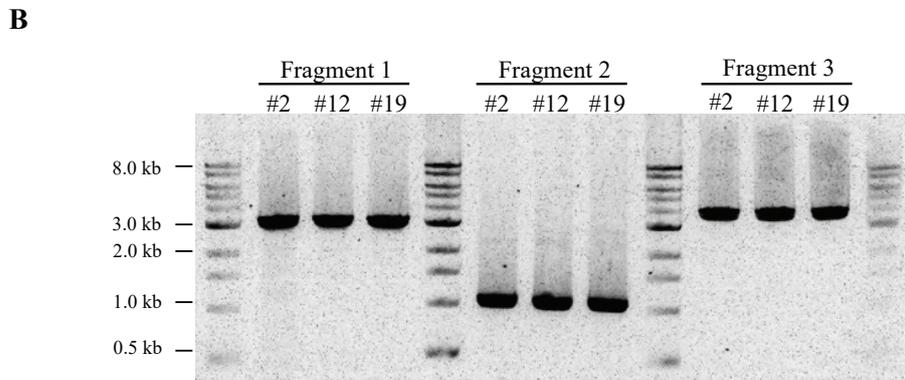
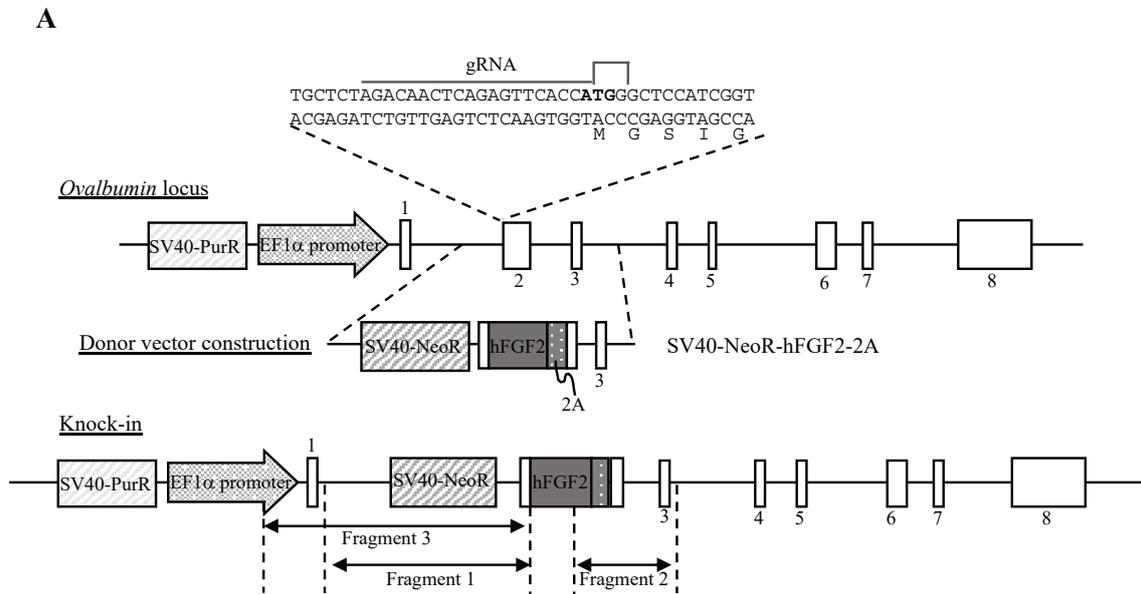


図 34. (A) OVA 上流への相同組換えによる hFGF2 ノックインの模式図. (B) PCR による Fragment 1 - 3 の検出. Fragment 1 はゲノムとドナーベクターの間の 5' 接合部, Fragment 2 はゲノムとドナーベクターの間の 3' 接合部, Fragment 3 は EF1 α プロモーターと hFGF2 遺伝子が同じ遺伝子座にあることを示す.

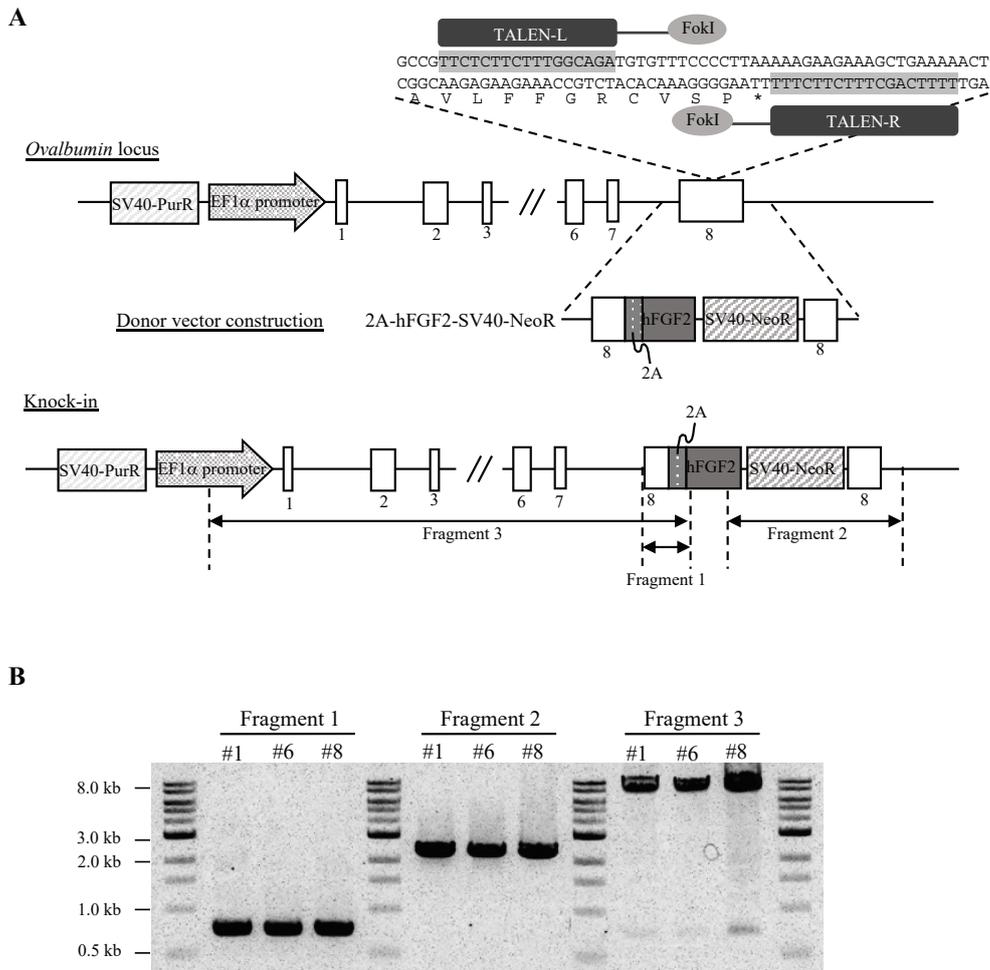


図 35. (A) 2A ペプチドを介した、OVA 下流への相同組換えによる hFGF2 ノックインの模式図. (B) PCR による Fragment 1-3 の検出. Fragment 1 はゲノムとドナーベクターの間の 5' 接合部, Fragment 2 はゲノムとドナーベクターの間の 3' 接合部, Fragment 3 は EF1 α プロモーターと hFGF2 遺伝子が同じ遺伝子座にあることを示す.

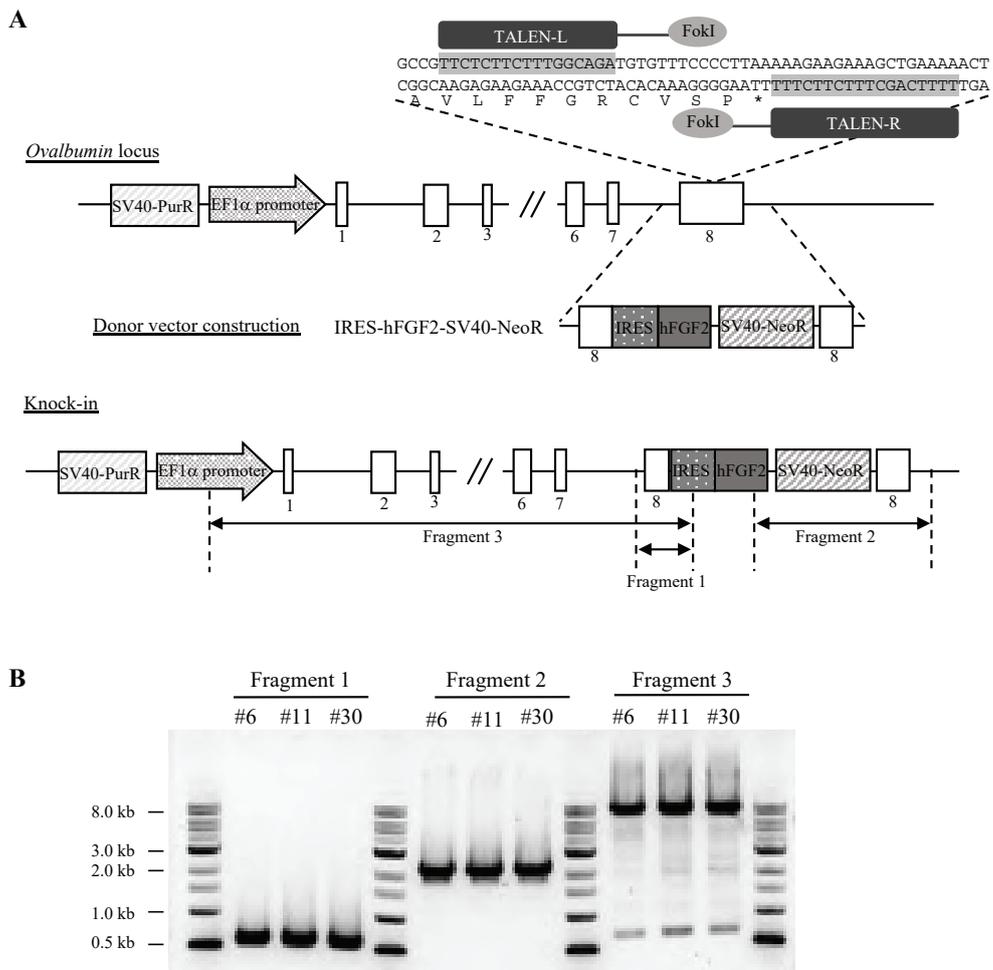
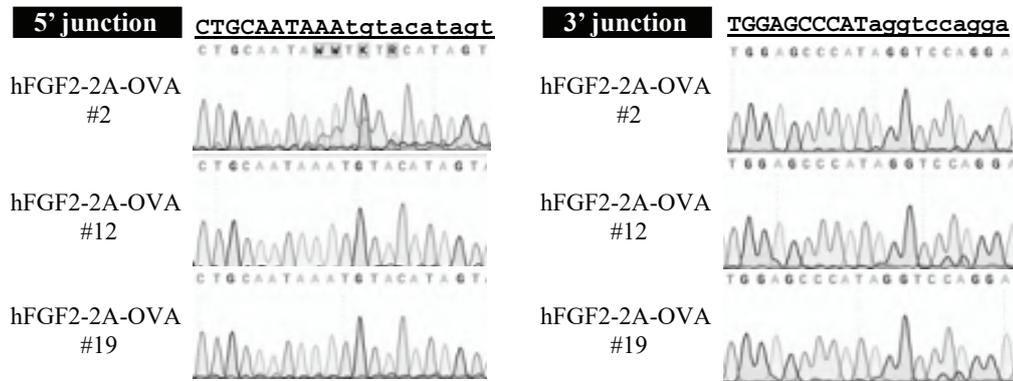
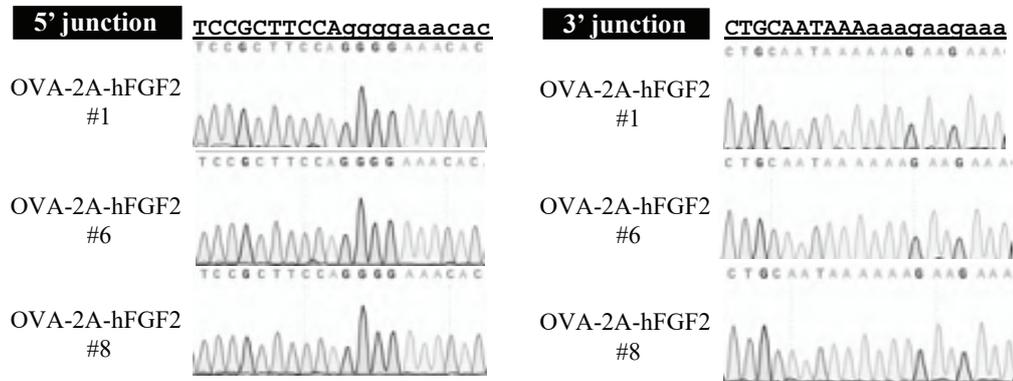


図 36. (A) IRES を介した, OVA 下流への相同組換えによる hFGF2 ノックインの模式図. (B) PCR による Fragment 1-3 の検出. Fragment 1 はゲノムとドナーベクターの間の 5' 接合部, Fragment 2 はゲノムとドナーベクターの間の 3' 接合部, Fragment 3 は EF1 α プロモーターと hFGF2 遺伝子が同じ遺伝子座にあることを示す.

A



B



C

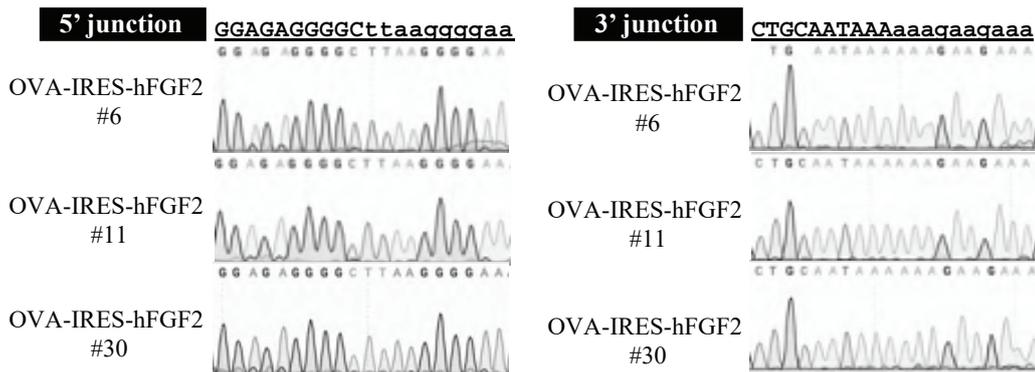


図 37. シーケンス解析の結果. 大文字はドナーベクターの配列, 小文字は OVA 遺伝子座の配列を示す. (A) hFGF2-2A-OVA 株のドナーベクター配列の 5' と 3' の接合部を示す. (B) OVA-2A-hFGF2 株のドナーベクター配列の 5' と 3' の接合部を示す. (C) OVA-IRES-hFGF2 株のドナーベクター配列の 5' と 3' の接合部を示す.

表 11. オフターゲット変異候補領域の解析

| | Chromosomal Coordinates | Genomic Region | Sequence | Mutation |
|-----------------------|--|------------------------------|--|----------|
| CRISPR/Cas9 for Exon2 | Chr15: 5310793-5310814 | Intron of <i>ATP2A2</i> gene | <u>GGAA</u> CTACAGAGTTCACCA GGG | – |
| | Chr4:63892460-63892504 (Match type : L11L) | Intergenic | Left : <u>TTATCTTCTATAACAA</u> Left : <u>GTCTATTCTTTAGAAGA</u> | – |
| TALEN for Exon8 | Chr20:10738775-10738838 (Match type : L29R) | Intergenic | Left : <u>ATATCTCCTTCAGCAGA</u> Right : <u>ATTTCACCTTTCATCTTT</u> | – |
| | Chr21:1158817-1158880 (Match type : L30L) | Intergenic | Left : <u>ATCTCTTCTTCAGCAA</u> Left : <u>CTCTTTCTCTAGCAGT</u> | – |

シーケンスの太字は PAM 配列を示す。下線は使用した gRNA, TALEN の認識配列と相同な配列を表す。

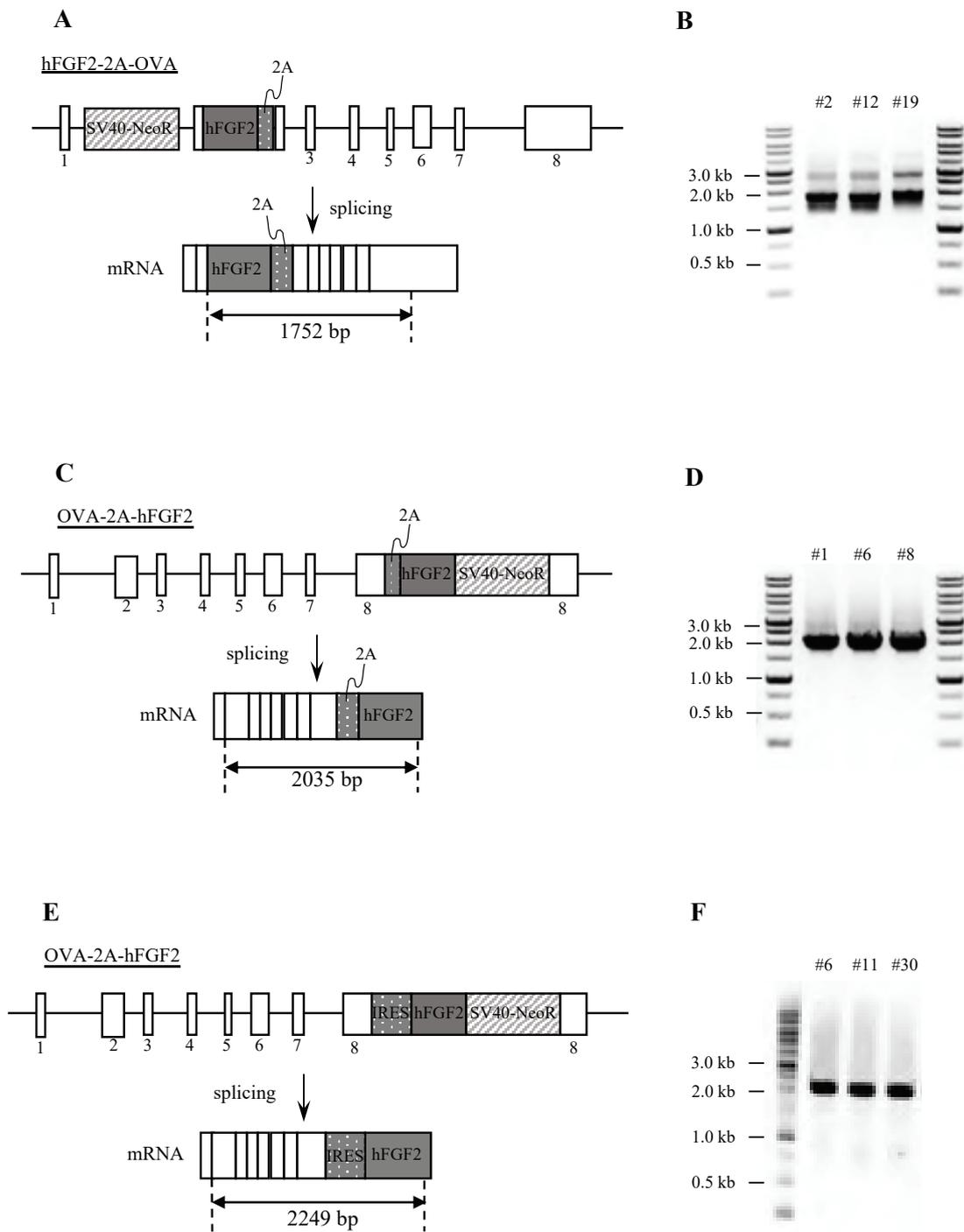
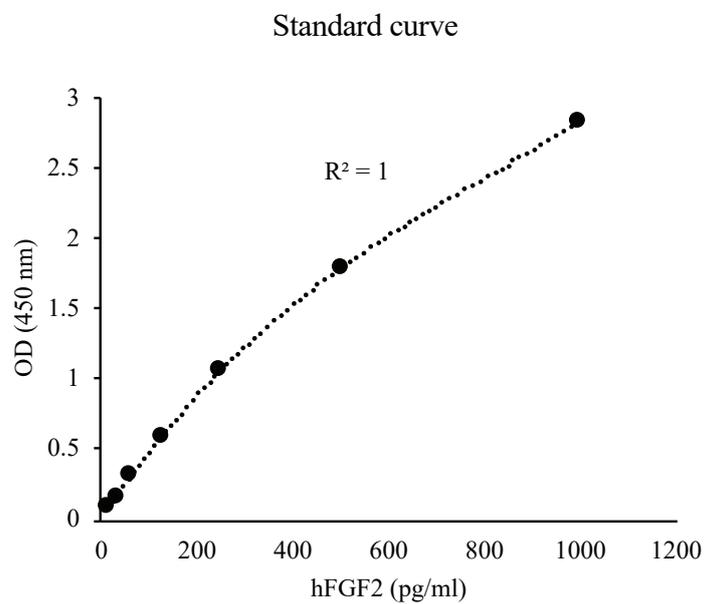


図 38. RT-PCR による hFGF2 および OVA mRNA の発現解析 (A) hFGF2-2A-OVA 株の予測 mRNA の概略図. (B) hFGF2-2A-OVA mRNA の増幅を示す. (C) OVA-2A-hFGF2 株の予測 mRNA の概略図. (D) OVA-2A-hFGF2 mRNA の増幅を示す. (E) OVA-IRES-hFGF2 株の予測 mRNA の概略図. (F) OVA-IRES-hFGF2 mRNA の増幅を示す.

A



B

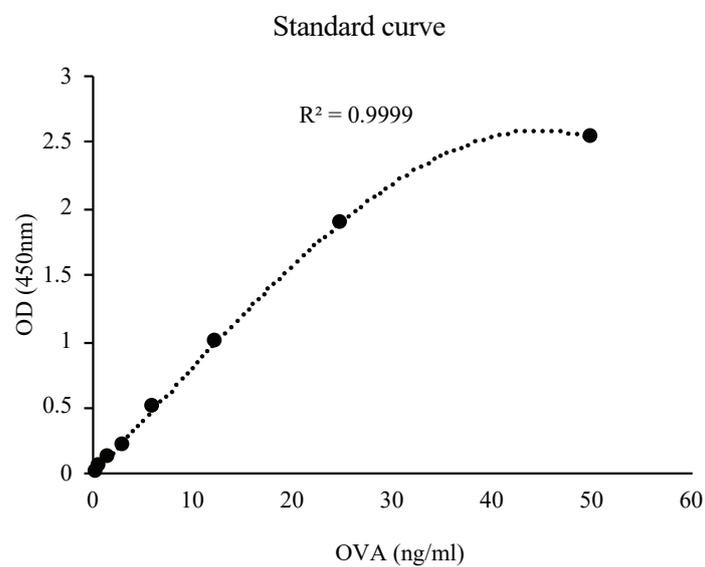
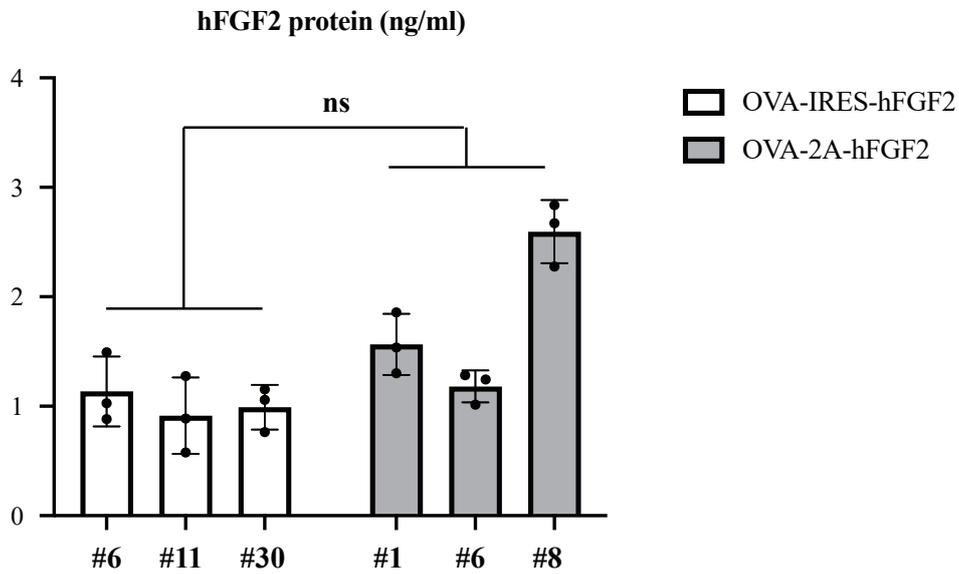


図 39. 濃度推定に利用した検量線. (A) hFGF2 標準試料を使用して作製した検量線. (B) OVA 標準試料を使用して作製した検量線.

A



B

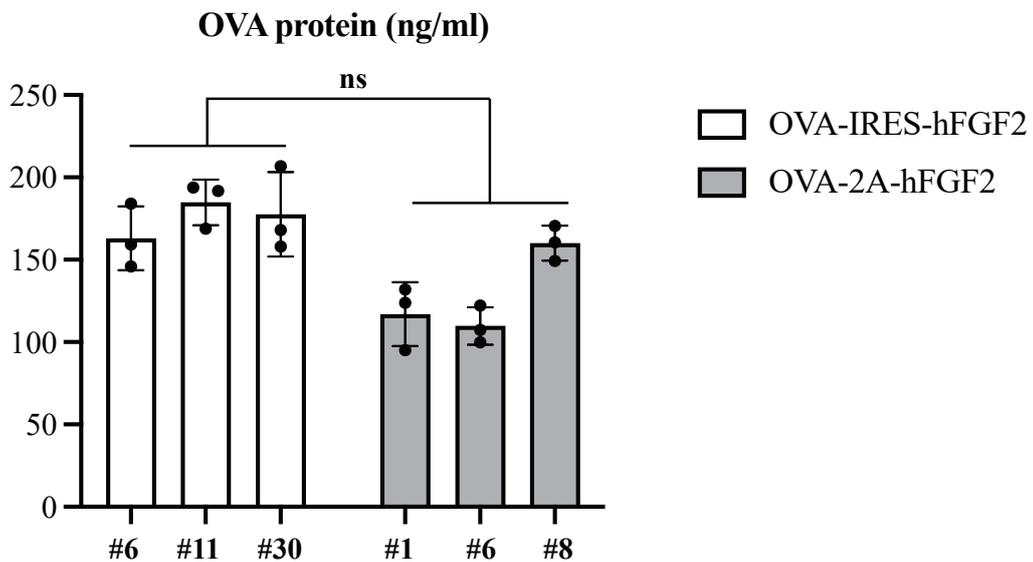
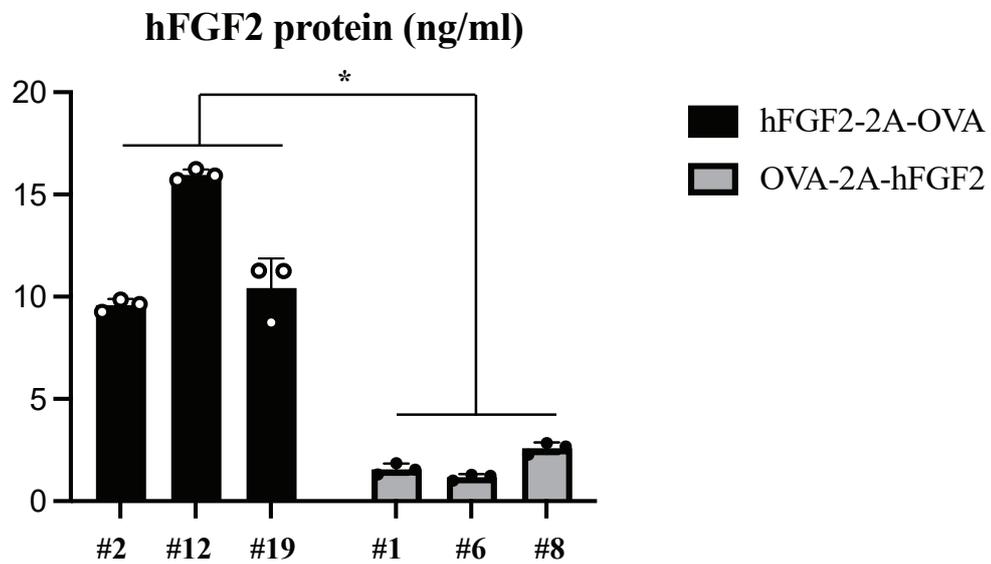


図 40. 抗 hFGF2, OVA 抗体を使用した ELISA の結果. (A) 検量線を使用して算出された, ライセート中の hFGF2 タンパク質の濃度. エラーバーは平均値の SD として表され, Two tailed Welch's t-test により統計的に解析された ns: not significant (n=3). (B) 検量線を使用して算出された, 培養上清中の OVA タンパク質の濃度. エラーバーは平均値の SD として表され, Two tailed Welch's t-test により統計的に解析された ns: not significant (n=3).

A



B

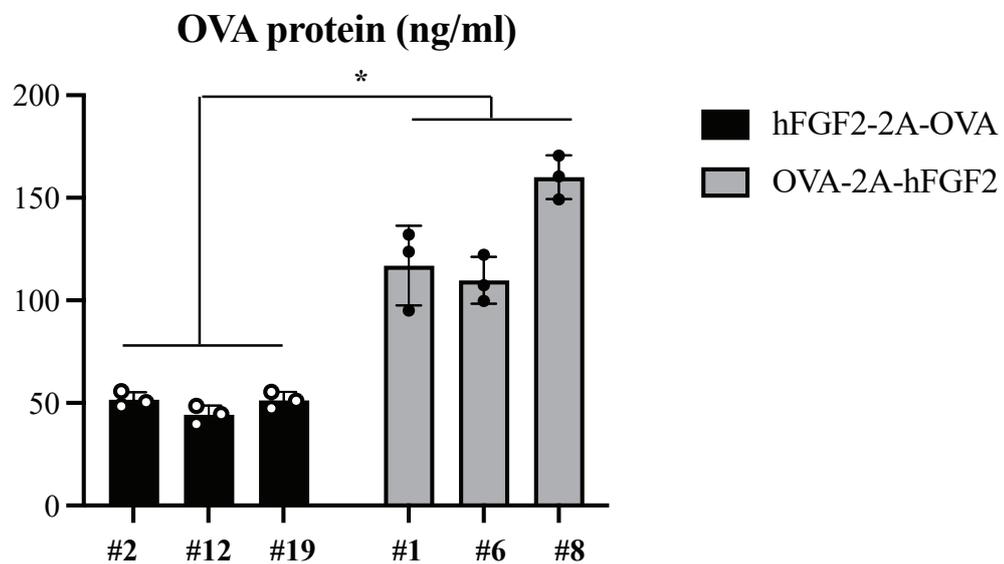


図 41. (A) 抗 hFGF2 抗体を使用した ELISA の結果. エラーバーは平均値の SD として表され, Two tailed Welch's t-test により統計的に解析された $*p < 0.05$ ($n=3$). (B) 抗 OVA 抗体を使用した ELISA の結果. エラーバーは平均値の SD として表され, Two tailed Welch's t-test により統計的に解析された $*p < 0.05$ ($n=3$).

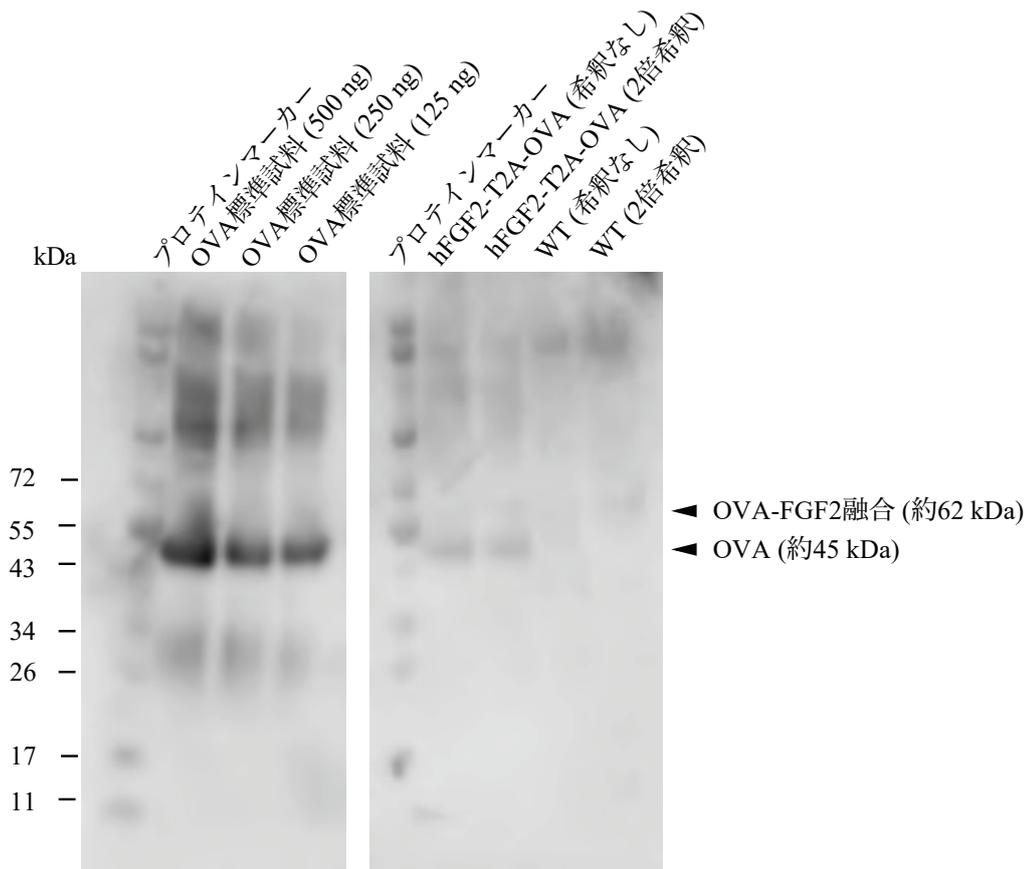


図 42. 2A ペプチドの機能評価. 抗 OVA 抗体を使用した Western blot の結果. 左
 レーンからプロテインマーカー, OVA 標準試料 (500 ng, 250 ng, 125 ng), プロテ
 インマーカー, hFGF2-T2A-OVA 培養上清 (希釈なし, 2 倍希釈), WT 培養上清 (希
 釈なし, 2 倍希釈).

3-4 考察

バイオリアクターでの鶏卵の使用にはいくつかの問題がある。大きな問題は、生産システムの構築には数年かかることである。これは鶏卵をバイオリアクターとして使用する生産者にとっては大きな障壁であり、その使用を制限している。ニワトリの培養細胞を用いた *in vitro* での組換えタンパク質の生産系は、OVA タンパク質の発現によって評価される。しかし、ニワトリにおいて OVA はステロイドホルモン応答性タンパク質であり、性成熟した雌ニワトリの卵管細胞でのみ産生される。また、雌ニワトリの卵管から分泌細胞を大量に採取することは困難であり、その長期培養法も確立されていない[36] [37]。したがって、雌ニワトリから卵管細胞を得て実験に利用することは現実的ではない。そこで本研究では、DF-1 細胞において、細胞内ハウスキーピング遺伝子である elongation factor 1 α (EF1 α) のプロモーターを OVA 遺伝子の上流にノックインすることにより、OVA 発現細胞株を樹立した。エクソン 1 の上流に EF1 α プロモーターをノックインした細胞 (EF1 α -Exon1 株) は、約 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の OVA タンパク質を産生した。これにより、OVA を産生するニワトリ細胞株の樹立に成功したことが確認された。また、エクソン 2 の上流に EF1 α プロモーターをノックインした EF1 α -Exon2 細胞株は、EF1 α -Exon1 細胞株と比較して OVA の発現量が低かった。このことは、5' untranslated region (UTR) である OVA のエクソン 1 領域が転写および翻訳に重要であることを示唆している。

OVA 発現細胞株の解析を通して、EF1 α プロモーターのノックイン位置によって、OVA の転写レベル、および分泌される OVA タンパク質の量が異なることを見出した。OVA 遺伝子はいくつかの因子によって制御されている。OVA の転写開始部位から 0.15, 0.8, 3.2, 6 kb 上流にある DNase I hypersensitive sites が OVA 発現に関与していることが報告されている [66]。また、転写開始部位の-30bp 上流には TATA ボックスがあり、その 5' 上流には estrogen response element (ERE) がある [67]。さらに、OVA の制

御領域には, chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) [68] [69], steroid-dependent response elements (SDRE) [70], および negative regulatory elements (NRE) [70]があり, これらは組織特異的な OVA 発現を制御している.

本研究では, OVA の転写開始部位の上流に約 5 kb の PITCh ドナーベクターがノックインされているため, 上記の調節領域は OVA の転写-翻訳系には関与していないと考えられる. したがって, 転写開始部位の下流の違いを考慮すると, 5' UTR のスキップが, EF1 α -Exon2 株における OVA の発現を低下させた可能性があり, これが EF1 α -Exon1 株と EF1 α -Exon2 株間の OVA の発現レベルの違いの原因であると考えられる. 成熟 mRNA では, リボソームが付着するために 5' UTR にキャップ構造が付加される. 5' UTR の配列は, mRNA の安定性と翻訳効率に影響することが報告されている [71]. したがって, 5' UTR 配列をスキップすることで, EF1 α -Exon2 株における OVA の発現が低下した可能性がある. 本研究では, 5' UTR の重要な配列を同定することはできなかった. 今後, OVA の 5' UTR をさらに解析することで, OVA 発現調節機構の理解が深まると考えられる.

OVA 発現細胞株を樹立した後, hFGF2 遺伝子をノックインすることで有用タンパク質の評価系を構築した. hFGF2 のノックインには CRISPR/Cas9 と TALEN を用い, OVA 上流の編集には CRISPR/Cas9 を, 下流の編集には TALEN を用いて, 開始コドン上流と終始コドン下流に hFGF2 遺伝子をノックインすることに成功した. これらの結果は, 標的部位に応じてゲノム編集ツールを使い分けることで, 標的部位を効率的に編集できることを示している.

OVA-2A-hFGF2, OVA-IRES-hFGF2 株を使用した解析により, 2A ペプチドを利用した細胞株で hFGF2 タンパク質の発現量が高い傾向があった. これは, リンカーの特性を反映しているものと考えられる. IRES はウイルスゲノム内にある非コード領域で, 5' キャップ非依存的な翻訳を誘導する [72]. 2A ペプチドは 20 アミノ酸ほどのウイル

ス由来のペプチドで、リボソームスキッピングにより、単一プロモーターからのポリシストロニックな遺伝子発現を誘導する [73]。両者とも、2つの遺伝子間に位置するとき、下流側の遺伝子の発現量が低下することが知られている。それは、IRESのキャップ非依存的な翻訳が、5'キャップ依存的な翻訳より効率が低い [74]、2Aペプチドのリボソームスキッピングの効率 [75]によるものである。また、hFGF2-2A-OVA、OVA-2A-hFGF2株における、ノックイン位置によるhFGF2タンパク質の発現の違いも、上記の2Aペプチドの特性のためだと考えられる。構築した*in vitro*モデルを利用した評価の結果は、これらのリンカーの特性を反映したものだ。これは、*in vitro*モデルが生体における転写翻訳系を再現していることを示唆しており、生産系構築時のノックイン戦略について知見を与えるものである。さらに2Aペプチドには、P2A (porcine teschovirus-1 2A)、E2A (equine rhinitis A virus 2A)、F2A (foot-and-mouth virus 2A)、T2A (thosa asigna virus 2A)などの種類があり、その切断効率は動物種や細胞種によって異なることが報告されている [73] [76]。ニワトリで高い切断効率を示す2Aペプチドを調べることで、発現系の効率が高まることが期待される。

タンパク質の発現解析において、hFGF2タンパク質はライセート中に、OVAタンパク質は培養上清中に蓄積した。これは両タンパク質の輸送経路の違いによるものと思われる。OVAタンパク質はアミノ酸残基21-47番目 [77] にシグナルペプチドを持ち、翻訳後、ERおよびゴルジ依存性の分泌経路で分泌される。一方、hFGF2タンパク質は、シグナル配列を持たず、ERおよびゴルジ非依存性の分泌経路で膜を透過し、膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに捕捉されることが報告されている [78]。したがって、hFGF2タンパク質はライセートサンプル中に蓄積する。これらの結果は、この評価系が、有用タンパク質の局在の決定にも有用であることを示唆している。本研究では、タンパク質の機能に影響する糖鎖付加を解析することはできなかった。ニワトリの糖鎖付加はヒトと類似しており [79]、有用タンパク質の発現系として有用である。また、

糖鎖修飾酵素を用いることで、糖鎖修飾のコントロールが可能である [80]. 今後は、これらの知見をもとに、ゲノム編集ニワトリを利用した解析を実施することで、ヒトへの応用が可能なタンパク質生産システムの構築が可能であると考えられる.

本研究では、OVA 発現細胞株の樹立に成功し、OVA-hFGF2 の共発現系におけるリンカー、OVA 遺伝子座におけるノックイン位置を評価した. このモデルは、鶏卵バイオリアクターにおける様々なタンパク質の発現系の迅速な評価と構築に利用できると考えられ、今後生産系の構築を実施するにあたり、重要な知見をもたらしたといえる.

第4章 総合考察

近年、バイオテクノロジー技術を利用して生産される、バイオ医薬品がその優れた薬効・特異性から、需要が増加している。バイオ医薬品は、細胞を利用して生産されるが、その培養、設備投資等に高額なコストが生じる。高額な医療費を抑え、治療を望む患者が平等に治療を受けられるように、バイオ医薬品の低コストな生産法の確立が望まれる。

本研究では、バイオ医薬品の低コストな生産を実現する鶏卵バイオリクターの確立を最終目的に、必要な技術の構築に努めた。具体的には、ゲノム編集ニワトリの作出に利用可能な chESCs の培養条件の検討 (第2章)、鶏卵バイオリクターの *in vitro* 評価系の構築 (第3章) である。

第2章では、chESCs の培養条件の検討を実施した。ここでは、特に、哺乳類 PSCs で多能性維持に重要な役割を持つ Wnt/ β -カテニンシグナルが chESCs にもたらす影響を解析した。その結果、chESCs において、Wnt/ β -カテニンシグナルを低分子阻害剤 CHIR99021 によって刺激した結果、chESCs のコロニーは平坦化し、多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*) および生殖細胞関連遺伝子 (*Cvh*, *Dazl*) の発現が低下した。一方、Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤である XAV939 を添加した結果、コロニー形態は mESCs に類似したコンパクトなコロニーを形成し、多能性関連遺伝子 (*Nanog*, *Sox2*, *Lin28a*, *Dnmt3b*, *Prdm14*)、生殖細胞関連遺伝子 (*Cvh*, *Dazl*) の安定的な発現が見られた。これらの結果は、chESCs において Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化は、分化を誘導するのに対して、Wnt/ β -カテニンシグナルの阻害は、多能性維持に機能していることを示唆していた。一方、鳥類の幹細胞の一つである PGCs においては、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化が増殖を活性化することが報告されている [50]。これは、哺乳類だけでなく鳥類の幹細胞においても Wnt シグナルが幹細胞の維

持に重要な役割を担っていることを示唆しており、本研究結果は、鳥類幹細胞研究に重要な知見をもたらしたといえる。

しかしながら、本研究で樹立された chESCs の生殖細胞への分化能を評価することはできなかった。これは、先行研究 [32]で課題となっていた chESCs の生殖細胞への分化能を改善できたとはいえない結果である。今後の研究として、哺乳類で活発に研究が行われている生殖細胞への分化誘導 [81] [82]が挙げられる。実際ニワトリにおいても *in vitro* 培養時に生殖細胞への誘導を実施することで生殖腺への定着能が向上した報告がある [53]。また、chESCs の生殖細胞への分化能をより厳密に評価するため、レシピエント胚のガンマ線処理 [52]、アポトーシス誘導遺伝子である iCaspase9 を利用した、生殖細胞をもたないゲノム編集ニワトリの利用 [83]など、レシピエント胚の生殖細胞を減少させるアプローチも有効であると考えられる。

現在、ゲノム編集ニワトリの作出には、精子・卵に分化する PGCs が利用される。ニワトリでは、PGCs の培養法が確立されており [84] [85]、PGCs にゲノム編集を施すことでゲノム編集ニワトリが作出される。しかし、現在ニワトリ以外の鳥類で PGCs を安定的に培養できる種は限られており、培養 PGCs へのゲノム編集の適応例は、ニワトリ以外報告されていない [86] [87]。従って、ニワトリ以外の鳥類へのゲノム編集の適応が制限されている。本研究で得られた Wnt/ β -カテニンシグナルに関する知見は、鳥類全般で応用できる可能性がある。実際に、ウズラ胚性幹細胞 (quail ESCs) の培養に Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤が有効であるデータが取得できている (未発表データ)。よって、本研究で得られた知見を利用することで、幹細胞が樹立されていない鳥類において、その樹立が可能になることが期待される。それは、鳥類へのゲノム編集技術の適応を促進するだけでなく、絶滅危惧種鳥類や希少鳥類の保全につながることを期待される。

第3章では、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価系を構築した。先行研究において

卵白成分を発現する細胞株の長期培養法が確立されていないという背景から、本研究では、ゲノム編集技術を利用することで、卵白成分を発現する細胞株の樹立を試みた。強制発現プロモーターである EF1 α プロモーターを、卵白の主要なタンパク質である OVA の遺伝子座にノックインした。その結果、ニワトリ培養細胞株である DF-1 細胞の OVA 遺伝子を発現させることができ、OVA 発現細胞株の樹立に成功した。有用タンパク質の生産、鶏卵バイオリアクターの評価を目的に、近年、卵白成分を発現する細胞株の樹立が相次いでいる。Taemeh らは、OVA の発現を負に調節する negative regulatory elements (NRE) に着目し、この領域を CRISPR interference (CRISPR i) [88]により抑制することで、DF-1 細胞における OVA 発現を実現した。さらに、NRE と steroid-dependent response elements (SDRE) の欠失が、DF-1 細胞においてステロイドホルモン非依存的な OVA の発現をもたらすことを明らかにした [89]。Liu らは、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を持つレトロウイルスベクターを、卵管上皮細胞に感染させることで、不死化卵管上皮細胞を樹立した [38]。Loubser と Nikitina は、Percoll を利用した遠心分離により、効率よく卵管膨大部から OVA 発現細胞株を分離できることを報告した [90]。OVA 発現細胞株を使用した研究により、鶏卵バイオリアクターに関する知見が充実することが期待される。

本研究では、OVA の発現細胞株の樹立に続き、OVA 遺伝子座に有用タンパク質遺伝子として hFGF2 を選択し、hFGF2 ノックイン細胞株を複数樹立することで、これまで前例がなかった鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価を実施した。その結果、T2A ペプチドと IRES 配列の比較では、T2A ペプチドが効率的なタンパク質発現に適していることが示唆された。本研究では、T2A ペプチドを利用したが、2A ペプチドの種類によって切断効率が異なることが先行研究で報告されている [73]。そのため、ニワトリにおいても 2A ペプチドを最適化することでより高効率なタンパク質の発現が可能になると考えられる。hFGF2 遺伝子のノックイン箇所については、OVA の開始コドン上流

が、終止コドン下流と比較して適していることが示唆された。これらの結果は、構築した *in vitro* モデルにより有用タンパク質の発現量の評価が可能であることを示している。しかしながら、この *in vitro* 評価系が、ゲノム編集ニワトリを利用した生産系の発現レベルを反映しているかは、本研究では明らかにできていない。今後、ゲノム編集ニワトリを作出し、有用タンパク質の発現レベルを解析することで、本評価系の有用性を継続的に調べていく必要がある。

第2章、第3章を通して、本研究では、鶏卵バイオリクターの構築に必要な技術について研究を実施した。chESCs に関する研究では、哺乳類 PSCs との多能性維持シグナルの差異に着目し、Wnt/ β -カテニンシグナルが chESCs の多能性維持に寄与することを明らかにした。この発見は、鳥類の幹細胞研究で活かされる知見であり、鳥類全般のゲノム編集の適応促進ならびに種の保全等に資するものである。*in vitro* 評価系の構築では、OVA の発現細胞株を樹立し、さらに hFGF2 遺伝子を使用し、その発現系を構築、評価した。本評価系により得られた知見は、高効率な有用タンパク発現を可能にする鶏卵バイオリクターの構築に繋がると期待される。

第5章 総括

ゲノム編集技術は、生命科学分野を飛躍的に発展させた。その技術は、生物の遺伝情報を自由に書き換えることができ、基礎研究のみならず、農畜産分野・医療分野など幅広い領域で応用されている。特に農畜産分野では、遺伝子改変動物を高効率に作出することができ、生命現象の解明、迅速な品種改良などを実現している。代表的な家禽であるニワトリにおいても、ゲノム編集技術が適応され、近年、アレルゲン低減卵の安全性が確認された。また、食品への応用のみならず、医療用や研究用のタンパク質の生産工場として、ニワトリは有用であると考えられる。実際に、ゲノム編集技術を利用することで鶏卵中に有用タンパク質を蓄積する鶏卵バイオリクターが実現している。この生産系は、現在の細胞を利用した手法と比べて、低コストな生産が可能であると考えられる。しかしながら、鶏卵バイオリクターの構築には、2-3年の時間が必要であり、生産系を実用化していくための障壁となっている。これらの背景を受けて、本研究では、鶏卵バイオリクターを構築するための技術開発に取り組んだ。

第2章では、ゲノム編集ニワトリの作出に利用する chESCs の培養条件の検討に取り組んだ。chESCs は、mESCs と同様の増殖シグナルにより培養維持され、網羅的な遺伝子発現解析から mESCs との類似性が高いことが報告されている。一方で mESCs と異なる特徴も有することから哺乳類 PSCs とは異なるユニークな特徴を持つと考えられる。従って、chESCs を利用した研究を進捗させる上で、その性状を理解することが不可欠である。そこで、本研究では、哺乳類 PSCs で重要な役割を果たす Wnt/ β -カテニンシグナルが、chESCs にもたらす影響を解析した。その結果、Wnt/ β -カテニンシグナルの阻害が chESCs の多能性維持をサポートし、Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化が chESCs の分化を促進することを示唆するデータを得た。これらは、chESCs を安定的

に培養する上で、大変重要な発見であり、chESCsを利用した研究に資するものである。

第3章では、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* 評価系の構築に着手した。*in vitro* モデルに必要な卵管上皮細胞がこれまで樹立されていないことから、本研究では、ゲノム編集技術を利用し、卵白成分である OVA を恒常的に発現する細胞株の樹立に取り組んだ。強制発現プロモーターである EF1 α プロモーターを、OVA 遺伝子座にノックインすることで、OVA を恒常的に発現する細胞株の樹立に成功した。さらに、樹立した細胞株を使用し、鶏卵バイオリアクターの *in vitro* モデルを構築することで、発現する hFGF2 タンパク質量の評価を実施した。その結果、効率的な有用タンパク質の生産に適した OVA 遺伝子座へのノックイン箇所また、遺伝子間のリンカーを同定することができた。以上から、本研究で構築した *in vitro* 評価系は、効率的な鶏卵バイオリアクターの構築を可能にする技術であると考えられる。

本研究では、鶏卵バイオリアクターの構築を最終目的とし、その構築に必要な2つの技術について研究を実施した。第2章では、chESCsの多能性を安定的に維持するためのシグナルを特定し、chESCsに関する研究を促進する知見を得た。第3章では、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となった。本研究で得られた知見は、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。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬご指導と恵まれた研究環境を施して頂いた広島大学統合生命科学研究科免疫生物学研究室 堀内浩幸教授に謹んで感謝の意を表します。日頃の研究においてご意見、叱咤激励を与えてくださった松崎芽衣助教、江崎僚特任助教、寺田拓実研究員、市川健之助研究員に深く感謝致します。

本研究に必要なゲノム編集ツールである TALEN, CRIS-PITCh v2 ベクターをご供与頂いた広島大学統合生命科学研究科の山本卓教授、佐久間哲史教授に深い感謝の意を表します。

研究の遂行にあたり、貴重なご意見、ご協力を頂き、hFGF2 遺伝子を分与して頂いた住友化学株式会社 高橋康彦主任研究員、笹岡紀男主任研究員、山本真寿研究員、浅野宏治研究員に深く感謝致します。

また、学生生活を共にした免疫生物学研究室の先輩、同輩、後輩諸氏ならびに研究の遂行にあたり多大なご協力を頂いた秘書の池田由紀さん、金指暁子さんに改めまして心から御礼申し上げます。

最後に、学部、修士、博士に至るまで、生活を側で支えていただき、どんなときも応援して下さった両親に深く感謝し、謝辞とさせていただきます。

参考文献

1. Kim, Y.G., J. Cha, and S. Chandrasegaran, *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1156-60.
2. Christian, M., et al., *Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases*. Genetics, 2010. **186**(2): p. 757-61.
3. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
4. Ezaki, R., et al., *Transcription activator-like effector nuclease-mediated deletion safely eliminates the major egg allergen ovomucoid in chickens*. Food Chem Toxicol, 2023. **175**: p. 113703.
5. Oishi, I., K. Yoshii, D. Miyahara, and T. Tagami, *Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10203.
6. Mukae, T., et al., *Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation*. Poult Sci, 2021. **100**(2): p. 452-460.
7. Rapp, J.C., et al., *Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens*. Transgenic Res, 2003. **12**(5): p. 569-75.
8. Harvey, A.J. and R. Ivarie, *Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white*. Poult Sci, 2003. **82**(6): p. 927-30.
9. Byun, S.J., et al., *Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011. **75**(4): p. 646-9.
10. Kodama, D., et al., *Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system*. J Biosci Bioeng, 2012. **113**(2): p. 146-53.
11. Yang, H., et al., *Development and in vitro evaluation of recombinant chicken promoters to efficiently drive transgene expression in chicken oviduct cells*. Poult Sci, 2021. **100**(10): p. 101365.
12. Lillico, S.G., et al., *Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1771-6.
13. Cao, D., et al., *Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0118626.
14. Herron, L.R., et al., *A chicken bioreactor for efficient production of functional cytokines*. BMC Biotechnol, 2018. **18**(1): p. 82.
15. Kwon, M.S., et al., *Generation of transgenic chickens expressing the human erythropoietin (hEPO) gene in an oviduct-specific manner: Production of transgenic*

- chicken eggs containing human erythropoietin in egg whites*. PLoS One, 2018. **13**(5): p. e0194721.
16. Sheridan, C., *FDA approves 'farmaceutical' drug from transgenic chickens*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(2): p. 117-9.
 17. Mizuarai, S., et al., *Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(3): p. 456-63.
 18. Kamihira, M., et al., *High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 10864-74.
 19. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
 20. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
 21. Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers, and A. Smith, *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2048-60.
 22. Ying, Q.L., et al., *The ground state of embryonic stem cell self-renewal*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 519-23.
 23. Amit, M., et al., *Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture*. Dev Biol, 2000. **227**(2): p. 271-8.
 24. Petite, J.N., et al., *Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells*. Development, 1990. **108**(1): p. 185-9.
 25. Pain, B., et al., *Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities*. Development, 1996. **122**(8): p. 2339-48.
 26. Horiuchi, H., et al., *Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24514-20.
 27. Yamashita, Y., et al., *Effect of novel monoclonal antibodies on LIF-induced signaling in chicken blastodermal cells*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(5): p. 513-22.
 28. Nakanoh, S., et al., *Jak1/Stat3 signaling acts as a positive regulator of pluripotency in chicken pre-gastrula embryos*. Dev Biol, 2017. **421**(1): p. 43-51.
 29. Nakano, M., et al., *Characteristics of Novel Chicken Embryonic Stem Cells Established Using Chicken Leukemia Inhibitory Factor*. Journal of Poultry Science, 2011. **48**(1): p. 64-72.
 30. Tesar, P.J., et al., *New cell lines from mouse epiblast share defining features with human*

- embryonic stem cells*. Nature, 2007. **448**(7150): p. 196-9.
31. Jean, C., et al., *Transcriptome analysis of chicken ES, blastodermal and germ cells reveals that chick ES cells are equivalent to mouse ES cells rather than EpiSC*. Stem Cell Res, 2015. **14**(1): p. 54-67.
 32. van de Lavoie, M.C., et al., *High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells*. Mech Dev, 2006. **123**(1): p. 31-41.
 33. Nakanoh, S., N. Fuse, Y. Takahashi, and K. Agata, *Verification of chicken Nanog as an epiblast marker and identification of chicken PouV as Pou5f3 by newly raised antibodies*. Dev Growth Differ, 2015. **57**(3): p. 251-63.
 34. Jung, J.G., et al., *Characterization and application of oviductal epithelial cells in vitro in Gallus domesticus*. Biol Reprod, 2011. **85**(4): p. 798-807.
 35. Oishi, I., et al., *Cre-LoxP-regulated expression of monoclonal antibodies driven by an ovalbumin promoter in primary oviduct cells*. BMC Biotechnol, 2011. **11**: p. 5.
 36. Kohler, P.O., P.M. Grimley, and B.W. O'Malley, *Protein synthesis: differential stimulation of cell-specific proteins in epithelial cells of chick oviduct*. Science, 1968. **160**(3823): p. 86-7.
 37. Kasperczyk, K., et al., *In vitro optimization of the Gallus domesticus oviduct epithelial cells culture*. Theriogenology, 2012. **77**(9): p. 1834-45.
 38. Liu, L., et al., *Electroporation-based Easi-CRISPR yields biallelic insertions of EGFP-HiBiT cassette in immortalized chicken oviduct epithelial cells*. Poult Sci, 2023. **102**(12): p. 103112.
 39. Petite, J.N., G. Liu, and Z. Yang, *Avian pluripotent stem cells*. Mech Dev, 2004. **121**(9): p. 1159-68.
 40. Moon, R.T., *Wnt/beta-catenin pathway*. Sci STKE, 2005. **2005**(271): p. cm1.
 41. Sato, N., et al., *Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor*. Nat Med, 2004. **10**(1): p. 55-63.
 42. Hao, J., et al., *WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 2006. **290**(1): p. 81-91.
 43. Eyal-Giladi, H. and S. Kochav, *From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology*. Dev Biol, 1976. **49**(2): p. 321-37.
 44. Horiuchi, H., S. Furusawa, and H. Matsuda, *Maintenance of chicken embryonic stem cells in vitro*. Methods Mol Biol, 2006. **329**: p. 17-34.
 45. Nakanoh, S., K. Okazaki, and K. Agata, *Inhibition of MEK and GSK3 supports ES cell-like domed colony formation from avian and reptile embryos*. Zoolog Sci, 2013. **30**(7): p.

- 543-52.
46. Farzaneh, M., M. Zare, S.N. Hassani, and H. Baharvand, *Effects of various culture conditions on pluripotent stem cell derivation from chick embryos*. J Cell Biochem, 2018. **119**(8): p. 6325-6336.
 47. Davidson, K.C., et al., *Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(12): p. 4485-90.
 48. Huang, T.S., et al., *A Regulatory Network Involving beta-Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling*. Stem Cells, 2015. **33**(5): p. 1419-33.
 49. Marvin, M.J., et al., *Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm*. Genes Dev, 2001. **15**(3): p. 316-27.
 50. Lee, H.C., S. Lim, and J.Y. Han, *Wnt/beta-catenin signaling pathway activation is required for proliferation of chicken primordial germ cells in vitro*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34510.
 51. Guo, G., et al., *Correction: Epigenetic resetting of human pluripotency (doi:10.1242/dev.146811)*. Development, 2018. **145**(8).
 52. Park, K.J., et al., *Gamma-irradiation depletes endogenous germ cells and increases donor cell distribution in chimeric chickens*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(10): p. 828-33.
 53. Laval, F., et al., *Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate*. Dev Biol, 2009. **330**(1): p. 73-82.
 54. Pieters, T. and F. van Roy, *Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 12): p. 2603-13.
 55. Daniels, D.L. and W.I. Weis, *Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 364-71.
 56. Huang, S.M., et al., *Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 614-20.
 57. Chen, B., et al., *Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(2): p. 100-7.
 58. Nichols, J. and A. Smith, *Naive and primed pluripotent states*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 487-92.
 59. Gafni, O., et al., *Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells*. Nature, 2013. **504**(7479): p. 282-6.

60. Chen, Y., et al., *Generation of Cynomolgus Monkey Chimeric Fetuses using Embryonic Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(1): p. 116-24.
61. Kawaguchi, T., et al., *Generation of Naive Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135403.
62. Mak, S.S., et al., *Characterization of the finch embryo supports evolutionary conservation of the naive stage of development in amniotes*. Elife, 2015. **4**: p. e07178.
63. Katayama, M., et al., *Induced pluripotent stem cells of endangered avian species*. Commun Biol, 2022. **5**(1): p. 1049.
64. Nakade, S., et al., *Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5560.
65. Fine, E.J., et al., *An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(6): p. e42.
66. Kaye, J.S., et al., *Steroid hormone dependence of four DNase I-hypersensitive regions located within the 7000-bp 5'-flanking segment of the ovalbumin gene*. EMBO J, 1986. **5**(2): p. 277-85.
67. Kato, S., et al., *A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically*. Cell, 1992. **68**(4): p. 731-42.
68. Sagami, I., et al., *Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(12): p. 4259-67.
69. Pastorcic, M., et al., *Control of transcription initiation in vitro requires binding of a transcription factor to the distal promoter of the ovalbumin gene*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(8): p. 2784-91.
70. Sanders, M.M. and G.S. McKnight, *Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter*. Biochemistry, 1988. **27**(17): p. 6550-7.
71. Morris, D.R. and A.P. Geballe, *Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8635-42.
72. Sachs, A.B., P. Sarnow, and M.W. Hentze, *Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes*. Cell, 1997. **89**(6): p. 831-8.
73. Kim, J.H., et al., *High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18556.
74. Hennecke, M., et al., *Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(16): p. 3327-34.

75. Liu, Z., et al., *Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2193.
76. Chng, J., et al., *Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells*. MAbs, 2015. **7**(2): p. 403-12.
77. Robinson, A., C. Meredith, and B.M. Austen, *Isolation and properties of the signal region from ovalbumin*. FEBS Lett, 1986. **203**(2): p. 243-6.
78. Pallotta, M.T. and W. Nickel, *FGF2 and IL-1beta - explorers of unconventional secretory pathways at a glance*. J Cell Sci, 2020. **133**(21).
79. Lillico, S.G., M.J. McGrew, A. Sherman, and H.M. Sang, *Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs*. Drug Discov Today, 2005. **10**(3): p. 191-6.
80. Kojima, Y., et al., *Galactosylation of human erythropoietin produced by chimeric chickens expressing galactosyltransferase*. J Biosci Bioeng, 2014. **117**(6): p. 676-9.
81. Hayashi, K., et al., *Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells*. Cell, 2011. **146**(4): p. 519-32.
82. Sasaki, K., et al., *Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2015. **17**(2): p. 178-94.
83. Ballantyne, M., et al., *Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 659.
84. Whyte, J., et al., *FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal*. Stem Cell Reports, 2015. **5**(6): p. 1171-1182.
85. Ezaki, R., F. Hirose, S. Furusawa, and H. Horiuchi, *An improved protocol for stable and efficient culturing of chicken primordial germ cells using small-molecule inhibitors*. Cytotechnology, 2020. **72**(3): p. 397-405.
86. Yakhkeshi, S., et al., *In vitro improvement of quail primordial germ cell expansion through activation of TGF-beta signaling pathway*. J Cell Biochem, 2018. **119**(6): p. 4309-4319.
87. Chen, Y.C., et al., *In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells*. Poult Sci, 2019. **98**(4): p. 1820-1832.
88. Qi, L.S., et al., *Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1173-83.
89. Yousefi Taemeh, S., et al., *Study of the regulatory elements of the Ovalbumin gene promoter using CRISPR technology in chicken cells*. J Biol Eng, 2023. **17**(1): p. 46.
90. Loubser, C. and N.V. Nikitina, *Protocol to establish an oviduct epithelial cell line derived from Gallus gallus using Percoll for in vitro validation of recombinant proteins*. STAR Protoc, 2023. **4**(3): p. 102495.