

新規高機能インフルエンザワクチン生産法の確立

西 島 謙 一*

Chicken eggs suitable for the production of influenza vaccine: application of transgenic technology

Ken-ichi Nishijima*

Vaccine against influenza virus is currently produced in developing chicken eggs. Allantoic membrane, the site for virus propagation for vaccine, does not express $\alpha 2,6$ -linked sialic acid on cell surface, resulting poor infection/growth of human influenza virus. Therefore, chicken eggs with $\alpha 2,6$ -linked sialic acid on allantoic membrane might be useful tool for vaccine production. To genetically modify chickens to express $\alpha 2,6$ -linked sialic acid, the sialyltransferase gene was cloned and its enzymatic activity was confirmed. We also confirmed that ubiquitous actin promoter effectively expressed eGFP in allantoic membrane. The sialyltransferase gene was inserted into the downstream of actin promoter of retrovirus vector construct. The packaging cell lines that produce high titer of retrovirus vector were successfully established. These are helpful to make transgenic chickens that express $\alpha 2,6$ -linked sialic acid on allantoic membrane.

1. はじめに

インフルエンザワクチンは発生中のニワトリ卵(発育鶏卵)を用いて生産されている。ワクチン生産に適した SPF (specific-pathogen free) 卵の大量供給システム、無菌的に大量の卵を扱うための自動化機器類などのインフラストラクチャーが整備されており、当面ワクチンの大部分を生産する方法であり続けると考えられる。

インフルエンザウイルスは感染時に細胞表面の糖鎖に結合する必要がある。ヒトインフルエンザウイルスが通常トりに感染しないのは、(特に気管支などの)細胞表面糖鎖が種によって異なるからである。近年の研究では、例外があることも示されているためさらに検討が必要であるが、ヒトインフルエンザウイルスの感染には $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸が重要であることが示唆されている。発育鶏卵を用いてワクチンを生産する際には、インフルエンザウイルスを漿尿膜細胞に感染・増殖させる。この細胞は $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸を持たないため、本来ヒトウイルスを増やすことができず、これまでには卵での増殖に適した変異型ウイルスをワクチン生産に用いてきた。しかし、新型インフルエンザの場合のように、ウイルスの増殖が鶏卵で難しい場合はワクチン生産量の確保が問題となる。

このため、 $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸を持った鶏卵を作製・利用できれば、ワクチン生産に有用なツールとなることが期待される。我々は、これまでにレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いて、様々なトランスジェニックニワトリを作製し、卵白中へ抗体やエリスロポエチン等を生産できることを報告してきた(1-4)。また、糖転移酵素遺伝子を発現するトランスジェニックニワトリにおいて卵白の糖鎖を改変できることも報告している(5)。本研究では我々のトランスジェニックニワトリ作成技術を応用し、発育鶏卵の糖鎖を改変することによって、新規インフルエンザワクチン生産法を開発することを目指した。

2. ニワトリシアル酸転移酵素の活性確認

ニワトリは漿尿膜や気管では $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸を持たないが、肝臓など他の臓器では $\alpha 2,6$ シアル酸転移酵素が発現している。そこで、まずニワトリ $\alpha 2,6$ シアル酸転移酵素遺伝子を PCR によりクローニングし、活性確認を試みた。酵素タンパク質から膜貫通部位を除いた活性部位のみを昆虫細胞 Tn5 に分泌生産させた。蛍光基質を用いた *in vitro* アッセイにより、クローニングしたシアル酸転移酵素が期待通り $\alpha 2,6$ 結合型シアル酸を付加する活性を持つことが確認できた(図1)。

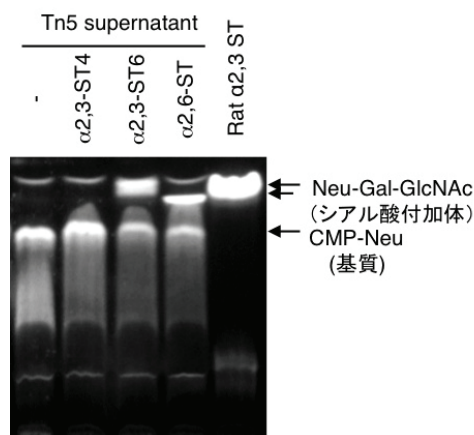


図 1. ニワトリシアル酸転移酵素の活性確認

2013年3月22日 受理

*豊田理研スカラー (名古屋大学大学院工学研究科化学・
生物工学専攻 生物機能工学分野)

3. 漿尿膜における遺伝子発現系の構築

ワクチン生産の際にウイルスを増殖させる漿尿膜において、外来遺伝子の発現が可能か検討した。まず、これまでに用いてきた全身で発現するプロモーターであるアクチンが使用可能であるかを検討した。アクチンプロモーター制御下で eGFP を発現するトランスジェニックニワトリの受精卵を 10 日間孵卵し発生を進めた後、漿尿膜における eGFP の発現を蛍光顕微鏡で確認した。その結果図 2 に示すように漿尿膜が光っていることが観察され、アクチンプロモーターにより外来遺伝子を漿尿膜で効率よく発現できることが示唆された。

4. 糖転移酵素発現ベクターを生産するパッケージング細胞株の樹立

実際にトランスジェニックニワトリを作製する際には、高濃度のレトロウイルスベクターが必要である。そこで、レトロウイルスベクターを生産するパッケージング細胞の樹立を行った。GP293 細胞に力価測定済みのウイルス溶液を MOI (multiplicity of infection, 多重感染度) が 100 となるように加え、感染させた GP293 細胞を順次スケールアップし、限界希釈法によりクローニングを行った。各クローンのウイルス生産性を検討し、高いタイターのウイルスを生産する株を選択した。パッケージング細胞の樹立と濃縮を 2 回繰り返すことで、力価を 60 倍以上高めることができた。

糖鎖末端に α -ガラクトースを持つ糖タンパク質は本来ヒトには存在せず、非常に強い免疫反応を起こすことが知られる。そのため、ワクチンとして接種するウイルスタンパク質に α -ガラクトースを付加できれば、より効果の高いワクチンとなることが期待できる。ニワトリは本来 α -ガラクトースを持たないが、漿尿膜細胞に α -ガラクトース付加酵素を発現させることでウイルスタンパク質に α -ガラクトースを付加可能であると考えられる。そこで、マウスよりクローニングした α -ガラクトース転移酵素遺伝子を同様にレトロウイルスベクターに組み込み、パッケージング細胞の樹立を行った。その結果、シアル酸転移酵素のパッケージング細胞と同程度のウイルスを生産する細胞株が樹立できた。今後これらのウイルスベクターを用いてニワトリ胚へ遺伝子導入してゆく予定である。

5. 謝辞

名古屋大学工学研究科飯島信司教授および遺伝子工学研究グループの皆さんに深謝いたします。また、豊田理研スカラーとしてご支援いただきました豊田理化学研究所に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- (1) Kamihira, M., Ono, K., Esaka, K., Nishijima, K., Kigaku, R., Komatsu, H., Yamashita, T., Kyogoku, K. and Iijima, S. (2005) 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*, 79, 10864-10874.
- (2) Kodama, D., Nishimiya, D., Iwata, K., Yamaguchi, K., Yoshida, K., Kawabe, Y., Motono, M., Watanabe, H., Yamashita, T., Nishijima, K. *et al.* (2008) Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochem Biophys Res Commun*, 367, 834-839.
- (3) Kyogoku, K., Yoshida, K., Watanabe, H., Yamashita, T., Kawabe, Y., Motono, M., Nishijima, K., Kamihira, M. and Iijima, S. (2008) Production of recombinant tumor necrosis factor receptor/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *J Biosci Bioeng*, 105, 454-459.
- (4) Kamihira, M., Kawabe, Y., Shindo, T., Ono, K., Esaka, K., Yamashita, T., Nishijima, K. and Iijima, S. (2009) Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *J Biotechnol*, 141, 18-25.
- (5) Mizutani, A., Tsunashima, H., Nishijima, K., Sasamoto, T., Yamada, Y., Kojima, Y., Motono, M., Kojima, J., Inayoshi, Y., Miyake, K. *et al.* (2012) Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white. *Transgenic Res*, 21, 63-75.

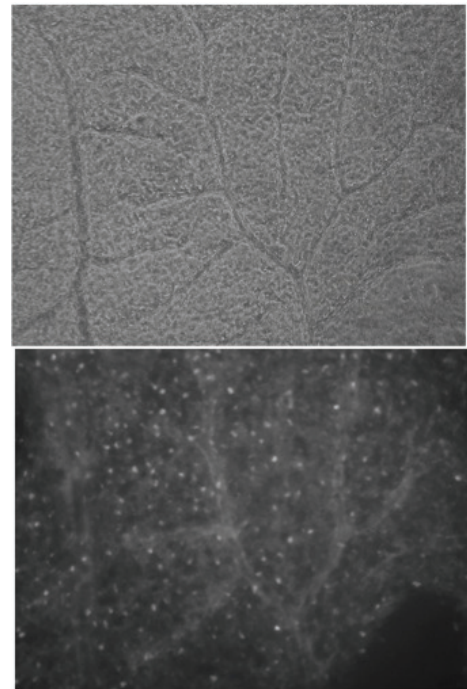


図 2. ニワトリ胚漿尿膜におけるアクチンプロモーターの活性確認。上：明視野；下：eGFP 蛍光観察。