

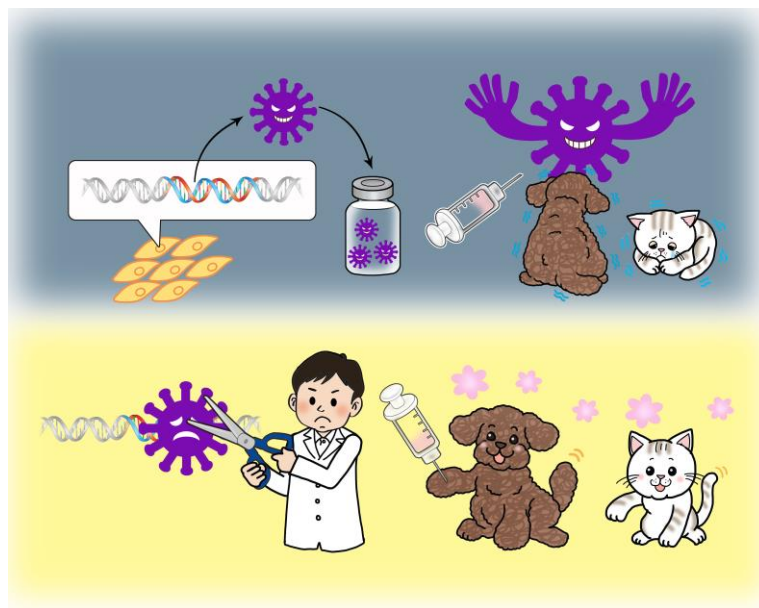
# ゲノム編集による内在性レトロウイルス排除 —より安全なワクチン製造を目指して—

## 概要

宮沢孝幸 医生物学研究所 准教授、下出紗弓 広島大学ゲノム編集イノベーションセンター 助教、山本卓 同教授、佐久間哲史 広島大学大学院統合生命科学研究科 准教授らの共同研究グループは、より安全なワクチン製造のために、動物が生まれながらにもっているレトロウイルス（内在性レトロウイルス〔endogenous retrovirus, ERV〕（注1））が産生されないワクチン製造用株化細胞の樹立に成功しました。

ネコの腎臓由来株化細胞である CRFK 細胞は、動物用生ワクチン（注2）の製造に広く使用されていますが、感染性の ERV が産生され、ワクチン製造で問題になっていました。今回我々は、国産ゲノム編集ツールである Platinum TALEN（注3）を用いてネコで問題になっている ERV のノックアウト（注4）に成功しました。本研究により樹立したノックアウト細胞は ERV 由来感染性粒子の混入がないワクチン製造に使用できることが期待されます。

本研究成果は、2022年4月27日18時（日本時間）に国際学術誌「Scientific Reports」に掲載されました。



図：本研究の概要図

（上段）従来の生ワクチン製造方法。CRFK 細胞を使用した生ワクチン製造では、ERV 由来感染性粒子が生ワクチンに混入することがあり、接種された動物は ERV に感染する危険性がありました。

（下段）本研究成果。ゲノム編集により CRFK 細胞の ERV を排除し、ERV 由来感染性粒子の混入がないワクチン製造が可能となりました。

## 1. 背景

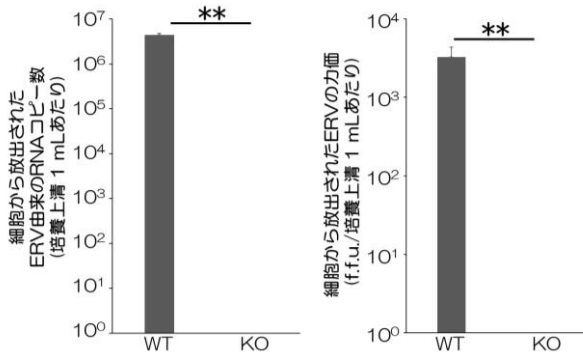
内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus, ERV) は、宿主ゲノムに含まれているレトロウイルス様の配列です。ERV は通常、不活性化状態にあります。ときに活性化し感染性粒子を産生することがあります。

ネコ腎臓由来株化細胞である CRFK 細胞は動物用生ワクチンの製造に使われています。しかし、CRFK 細胞は培養上清中に RD-114 ウイルスと呼ばれる ERV 由来の感染性粒子を放出しており、CRFK 細胞を使用して製造した生ワクチンの一部には RD-114 ウイルス粒子が混入しています。RD-114 ウイルスの病原性については現時点では不明ですが、より安全なワクチン製造のためには、RD-114 ウイルスを放出しない CRFK 細胞の樹立が望まれていました。

## 2. 研究手法・成果

RD-114 ウイルスは、RDRS A2、RDRS C1 と呼ばれる 2 つの ERV 配列が細胞内で組換え反応 (注 5) を起こし産生されることがわかっています。RD-114 ウイルスを放出しない CRFK 細胞を作製するため、国産ゲノム編集ツールである Platinum TALEN により RDRS A2 と RDRS C1 を同時にノックアウトしました。樹立したノックアウト細胞は RD-114 ウイルスを産生していませんでした (図 1)。ノックアウト細胞のワクチン製造への有用性を評価するため、ネコ用 3 種混合生ワクチンの種ウイルス (注 6) として使用される猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、猫カリシウイルス、猫汎白血球減少症ウイルスの増殖性を調べました。その結果、ノックアウト細胞でも各種ウイルスをふやすことができることがわかりました (図 2)。また、ノックアウト細胞で増殖させた各種ウイルス液に感染性の RD-114 ウイルスや RDRS 配列をもったウイルス粒子の混入は認められませんでした (図 3)。

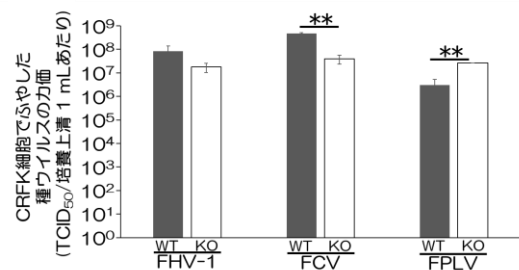
本研究により樹立したノックアウト細胞は、より安全なワクチン製造に応用されることが期待されます。



WT: 野生型 KO: ノックアウト  
力価: 試料中に含まれる感染性をもつウイルスの量。ウイルスの感染性の指標。

\*\*p<0.05で有意差あり

図1 ノックアウト細胞ではERVの産生はみられなかった

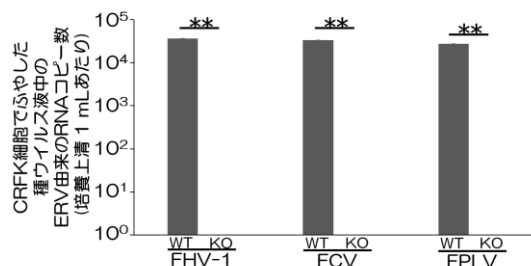


WT: 野生型 KO: ノックアウト

FHV-1 (feline herpesvirus type 1): 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス  
FCV (feline calicivirus): 猫カリシウイルス  
FPLV (feline panleukopenia virus): 猫汎白血球減少症ウイルス

\*\*p<0.05で有意差あり

図2 ノックアウト細胞でも種ウイルスをふやすことが可能



WT: 野生型 KO: ノックアウト

FHV-1 (feline herpesvirus type 1): 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス  
FCV (feline calicivirus): 猫カリシウイルス  
FPLV (feline panleukopenia virus): 猫汎白血球減少症ウイルス

\*\*p<0.05で有意差あり

図3 ノックアウト細胞でふやした種ウイルス液に ERV の混入はなかった

### 3. 波及効果、今後の予定

ゲノム編集技術による ERV の制御技術は、異種移植（注7）などの医療分野にも応用できます。哺乳類ゲノムの約 10%を占めるとされる ERV ですが、多くの機能はわかっていません。今後、本技術を応用することで ERV の機能解析も可能になることが期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

このプロジェクトは以下の助成を受けて実施されました。

独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費助成事業 若手研究

「レトロトランスポゾンによる家畜化関連遺伝子の発現制御機構の解明」(20K15692)

独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費助成事業 若手研究(B)

「内在性レトロウイルスによる生物多様性の創出機構の解明」(16K21129)

独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究(B)

「共生レトロウイルスの抗腫瘍ポテンシャルの解明と有効活用」(20H03150)

独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究(C)

「ウイルス感染が生物進化に与えた影響を紐解く」(22K06043)

#### <用語解説>

**(注1) 内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus, ERV)**：宿主ゲノムに含まれるレトロウイルス様配列。過去に宿主の生殖細胞ゲノムに入り込んだレトロウイルスの痕跡と考えられており、ヒトゲノムの約 8%、マウスゲノムの約 10%を占める。

**(注2) 生ワクチン**：生きた病原体（ウイルスや細菌）の病原性（毒性）を弱めたもの。これを接種することによってその病気にかかった場合と同じように免疫がつくことが期待される。

**(注3) Platinum TALEN**：TALEN (transcription activator-like effector nuclease) は植物の病原細菌である Xanthomonas (キサントモナス) がもつ DNA 結合タンパク質 (TALE) に、制限酵素の一種である Fok-Iヌクレアーゼドメインを融合させた人工ヌクレアーゼの一種。国産ゲノム編集ツールである Platinum TALEN は従来の TALEN の TALE 部分を改変した高活性型 TALEN。

**(注4) ノックアウト**：特定の遺伝子等を欠損させること。

**(注5) 組換え反応**：レトロウイルスはウイルス粒子を形成する際に 2 本のウイルスゲノムを包み込むが、ゲノム間のよく似た部位でお互いを交換することがあり組換え反応と呼ばれる。組換え反応により、2 本のゲノム情報が混ざり合った新たなゲノムがつくられる。

**(注6) 種ウイルス**：ワクチンを製造する際の元となるウイルス。

**(注7) 異種移植**：ある種の個体から別の種の個体へ、生きた細胞、組織、または臓器を、移植すること。

#### <研究者のコメント>

私たちは 2007 年に動物用生ワクチンに感染性の RD-114 ウイルスが混入していることを発見しました。ようやく解決策を見つけることができほっとしています。国産ゲノム編集ツールである Platinum TALEN でノックアウトに成功したことは、国内の知的財産保全の観点においても極めて大きい意義があると思います。その他のワクチン製造用細胞にもこの技術が応用され、より安全なワクチン製造につながることを祈っております。  
(宮沢)

大学生当時、動物用生ワクチンに感染性の ERV 粒子が混入しているというお話を伺ってとても驚いたのを覚えています。この論文発表まで長く時間がかかってしまいましたが、近年のゲノム編集技術の発展やたくさんのお会いにより成し遂げられたものと思っています。この技術は医療や獣医療に寄与することも多いかと思いますが、さらなる ERV 研究にも役立てたいと思います。(下出)

### <論文タイトルと著者>

タイトル：Establishment of CRFK cells for vaccine production by inactivating endogenous retrovirus with TALEN technology (TALEN 技術を用いた内在性レトロウイルスの不活化によるワクチン製造用 CRFK 細胞の樹立)

著者：Sayumi Shimode, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takayuki Miyazawa\*

\* Corresponding author (責任著者)

掲載誌：Scientific Reports DOI：10.1038/s41598-022-10497-1

### <補足資料>

本研究の概要図に関する注釈

