

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04195

研究課題名(和文) 組換え昆虫細胞による次世代インフルエンザワクチンの迅速高生産技術の開発

研究課題名(英文) Production of influenza virus-like particles in recombinant insect cells

研究代表者

山地 秀樹 (Yamaji, Hideki)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：40283874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス様粒子は、ウイルス感染症を予防するための有効かつ安全な次世代ワクチンとして利用が期待されている。本研究では、A型のインフルエンザウイルスの構造タンパク質であるヘマグルチニンHAおよびマトリックスタンパク質M1の遺伝子を昆虫細胞に導入し、両遺伝子を共発現する組換え昆虫細胞の作製を検討した。異なる薬剤耐性遺伝子を有する2種類の高発現型プラスミドベクターを用いて両遺伝子を導入し、薬剤耐性遺伝子に対応する2種類の抗生物質の存在下で培養することにより、HAとM1を含むインフルエンザウイルス様粒子を分泌生産する組換え昆虫細胞を効率よく作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の構造タンパク質とエンベロープから構成されるインフルエンザウイルス様粒子の組換え昆虫細胞による生産については、これまで報告されていない。本研究で構築した基盤技術は、皿型の異なるインフルエンザウイルスのウイルス様粒子ワクチンを開発・生産する際にも利用することができる。気候変動、グローバル化、高齢化などにより感染症の深刻化が懸念される状況のもと、本研究で得られた成果はインフルエンザなどのウイルス感染症から人類を守る一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Production of influenza virus-like particles in recombinant insect cells was investigated. The cDNA fragments encoding hemagglutinin (HA) and matrix protein 1 (M1) of an influenza virus A were separately cloned into the plasmid vector pIHAb1a and pIHAneo. The pIHAb1a and pIHAneo contained the Bombyx mori actin promoter downstream of the B. mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) IE-1 transactivator and the BmNPV HR3 enhancer for high-level expression, together with either a blasticidin or neomycin resistance gene for use as a selectable marker, respectively. After cotransfection with the prepared plasmids, High Five cells were incubated with blasticidin and G418, and cells resistant to the antibiotics were effectively obtained. Sucrose density-gradient sedimentation analysis of the culture supernatant showed that secreted HA and M1 molecules were produced in a particulate form.

研究分野：生物化学工学

キーワード：昆虫細胞 組換えタンパク質生産 ウイルス様粒子 インフルエンザウイルス ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2014年、約70年ぶりに国内でデング熱の感染が相次ぎ、西アフリカではエボラ出血熱の流行が拡大するなど、ウイルス感染症の脅威が増大している。一方、H5N1などの高病原性鳥インフルエンザウイルスの脅威が存続する中、2013年以降中国では鳥インフルエンザウイルスH7N9のヒトへの感染が広がりパンデミック化が懸念されている。このような感染症の予防、阻止に向けて最も有効な対策はワクチンの接種である。治療薬とは異なり、健康者を対象とするワクチンは大量生産が必須であり、安全で有効なワクチンを低コストで迅速に製造可能な技術が不可欠となる。

インフルエンザワクチンは、現在わが国では、発育鶏卵内で増殖させたインフルエンザウイルスをショ糖密度勾配遠心分離法で濃縮精製した後、分解・不活化して製造されている。この方法ではワクチンの製造に大量の受精卵を準備する必要があり、半年以上の時間を要する。また、新型インフルエンザの流行に迅速に対応することはできない。このため、哺乳動物細胞を大量に培養し、ウイルスを培養細胞に接種して増殖させる細胞培養法の開発が進められている。細胞培養法はワクチンの迅速かつ大量生産が可能であるが、依然として感染性ウイルスを大量に取り扱う必要がある、ウイルスによっては高力価まで増殖しない場合がある、などの課題が残されている。

このようなことから、近年、遺伝子組換え技術を利用して調製したウイルス抗原タンパク質を有効成分とするサブユニットワクチンの研究開発が精力的に進められている。昆虫細胞-バキュロウイルス系は、昆虫ウイルスであるバキュロウイルスを外来遺伝子のベクターとして利用し、組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞に目的タンパク質を発現させる。2013年、本系を用いて生産された組換えヘマグルチニンを主成分とした季節性インフルエンザワクチンが米国で承認された。このことは、昆虫細胞が安全かつ有効なワクチンを生産するための優れた宿主であることを示している。しかしながら、バキュロウイルスは動・植物に感染しないものの、新たに増殖、出芽した組換えウイルスの除去や不活化が必要となる。また、抗原タンパク質を分散状態で用いるサブユニットワクチンは、しばしば免疫原性が低いという欠点を有している (Roy and Noad: Hum. Vaccin., 4, 5-8 (2008))。

これに対し、安全かつ有効な次世代ワクチンとして注目されているのがウイルス様粒子である (Kushnir *et al.*: Vaccine, 31, 58-83 (2012))。ウイルス表面に存在するエンベロープタンパク質やキャプシドタンパク質は、自発的に会合することによりウイルス粒子の形成に至る。このようなウイルス表面タンパク質の遺伝子を哺乳動物細胞で発現させると、ウイルス感染細胞と同様の生合成過程によりウイルス様の空の粒子が形成、分泌される。ウイルス様粒子はゲノムをもたず感染性がないため安全性が高く、本来のウイルス抗原と同等の抗原性や免疫原性を示す。しかしながら、ウイルスタンパク質が哺乳動物細胞に対して毒性を示すため、生産性が低いことが実用化の障害となっていた。これに対し研究代表者らは、日本脳炎ウイルスの表面タンパク質の遺伝子を高発現型のプラスミドベクターを用いて培養昆虫細胞に導入し、動物細胞を用いた場合の100倍以上の収量の日本脳炎ウイルス様粒子を分泌生産する組換え昆虫細胞を短時間で作製することに成功している (Yamaji *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, 1071-1079 (2013))。昆虫細胞は本来の構造や機能を保持した組換えタンパク質を大量に生産可能であり、動物ウイルス由来のタンパク質を発現させても昆虫細胞に対する毒性は低いことから、ウイルス様粒子ワクチンを高生産するための強力なプラットフォームになると期待される。

2. 研究の目的

本研究では新たに、インフルエンザ流行の原因となるA型のインフルエンザウイルスのウイルス様粒子を組換え昆虫細胞により迅速に高生産するための技術基盤を確立する。具体的には、インフルエンザAウイルスの構造タンパク質のうち、主要感染防御抗原であるヘマグルチニンHAとエンベロープ(脂質二重層)を裏打ちしているマトリックスタンパク質M1の遺伝子を高発現型のプラスミドベクターを用いて昆虫細胞に導入し、両遺伝子を共発現する安定形質転換細胞の作製について検討する。HA、M1と脂質二重層から構成されるインフルエンザウイルス様粒子を高分泌生産する組換え昆虫細胞を効率よく取得可能な技術を構築する。

3. 研究の方法

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科 (*Orthomyxoviridae*) に属し、8分節の1本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとするエンベロープウイルスである。ヒトにおいてインフルエンザの流行を引き起こすのは、A型およびB型の2種類のインフルエンザウイルスである。その中で、新たなパンデミックが懸念されている鳥インフルエンザウイルスH7N9や高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1は、いずれもA型のインフルエンザウイルスである。インフルエンザウイルスの感染を防御する主役はHAに対する中和抗体であり、宿主にこの中和抗体を誘導できなければワクチンは有効でない。一方、ウイルス粒子内部に存在するマトリックスタンパク質M1は、エンベロープを裏打ちすることによりエンベロープの形態を維持するとともに、HAやNAの細胞質領域と相互作用することにより、ウイルス粒子の形成や出芽を促進する (Zhang *et al.*: Virology, 269, 325-334 (2000))。本研究では、インフルエンザAウイルスの構造タンパク質のうちHAおよびM1から構成され、エンベロープを有するウイルス様粒子の生産について検討した。

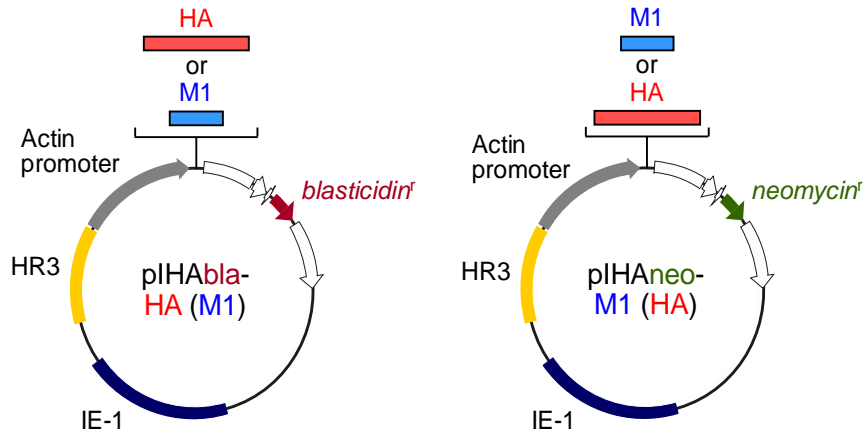


図1 HA および M1 の共発現に用いた 2 種類のプラスミドベクター

宿主昆虫細胞として、*Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) を使用した。プラスミドベクターとして、プラスタサイジン耐性遺伝子あるいはネオマイシン耐性遺伝子を有する pIHAbla, pIHAneo (Yamaji *et al.*: Biochem. Eng. J., 41, 203–209 (2008)) を使用した。pIHAbla, pIHAneo はカイコガ由来の細胞質アクチンプロモーターの上流にバキュロウイルス由来のトランス作用因子 IE-1 およびエンハンサー HR3 を有しており、目的タンパク質の高発現が期待できる (図 1)。これらのプラスミドのアクチンプロモーターの下流に、インフルエンザ A ウイルス H1N1 由来の HA または M1 の cDNA を挿入した。構築した HA, M1 遺伝子を含む 2 種類のプラスミドを High Five にコトランスフェクションし、プラスタサイジンおよび G418 の存在下で 2 週間以上培養を行い、安定形質転換細胞を取得した。細胞の培養上清をウェスタンブロット法、動的光散乱法、赤血球凝集試験、透過型電子顕微鏡観察などで分析した。

4. 研究成果

まず、インフルエンザ A ウイルス A/New Caledonia/20/99(H1N1) の HA および A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) の M1 の cDNA を、GenBank に公開されている塩基配列 (AY289929.1, CY009445.1) に基づきそれぞれ全合成した。この際、昆虫細胞における発現に向けてコドンの最適化をおこなった。合成した遺伝子を、異なる薬剤耐性遺伝子を有する 2 種類の高発現型プラスミドベクター pIHAbla, pIHAneo にクローニングした。作製した HA および M1 の発現ベクターを *Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) にトランスフェクションし、一過性発現を試みた。培養上清を抗インフルエンザ A ウイルス HA H1 抗体および抗 M1 抗体を用いるウェスタンブロット法で分析したところ、HA および M1 に相当する分子量付近にそれぞれ特異的なバンドを検出することができた。このことから、発現ベクターを導入した High Five は HA および M1 を分泌発現することを確認した。

次に HA および M1 を共発現する安定形質転換細胞の構築を試みた。HA および M1 の cDNA をそれぞれクローニングした pIHAbla または pIHAneo を High Five にコトランスフェクションした後、これらのプラスミドに含まれる薬剤耐性遺伝子に対応する 2 種類の抗生物質、すなわちプラスタサイジンおよび G418 の存在下で 2 週間以上培養することにより、薬剤耐性株を取得した。得られた薬剤耐性株の培養上清を抗 HA 抗体および抗 M1 抗体を用いてウェスタンブロット法により分析したところ、HA および M1 に相当する分子量付近にそれぞれ特異的なバンドが検出された。このことから、本研究で用いた手法により、2 種類の抗生物質の存在下で培養するだけで HA および M1 遺伝子が両方とも導入された組換え昆虫細胞を比較的短時間で効率良く得られることがわかった。また、培養上清をショ糖密度勾配遠心分離により分画した

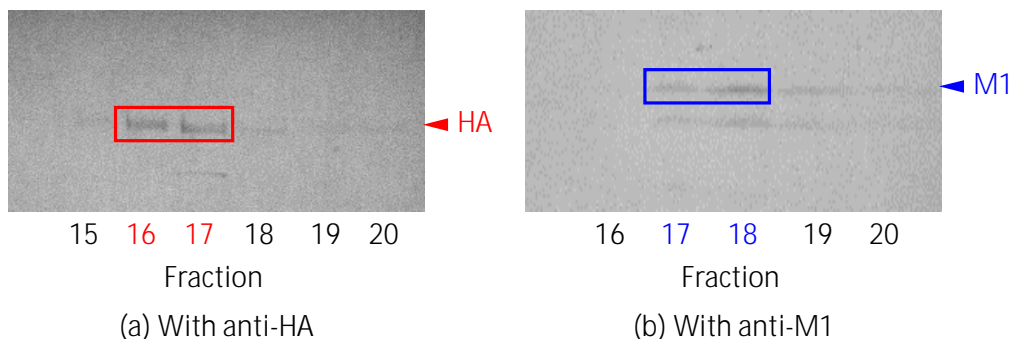


図2 ショ糖密度勾配遠心分離により分画した培養上清のウェスタンブロット法による分析
20–50% のショ糖密度勾配に培養上清を重層し遠心分離後、チューブの底から 20 画分を分取

各フラクションをウェスタンブロット法で分析すると、HA と M1 に相当するバンドがほぼ同等のシヨ糖密度のフラクションで確認された (図 2) . このことから、作製した組換え昆虫細胞は HA と M1 を含むウイルス様粒子を分泌生産していると考えられる . さらに、シヨ糖密度勾配遠心分離により分画した培養上清を動的光散乱法で分析したところ、上清中に粒子径が 100 nm 程度の粒子が存在する可能性が示唆された .

HA および M1 を共発現する安定形質転換細胞を作製する際、HA、M1 各遺伝子の上流に *Drosophila* 由来の BiP シグナル配列を付加した pIHAb1a または pIHAneo をコトランスフェクションしたところ、付加していない場合に比べて、HA および M1 の分泌生産量が著しく増大したクローンが得られることがわかった (図 3) . この結果から、High Five によるインフルエンザウイルス様粒子の分泌生産性を増大させるためには BiP シグナル配列の利用が有効であることがわかる . また、ニワトリ赤血球を用いた赤血球凝集試験により、培養上清中に赤血球凝集活性が存在することを確認した (図 4) . この結果は、組換え昆虫細胞が分泌したウイルス様粒子を構成する HA が赤血球凝集活性を保持していることを示唆している . さらに、シヨ糖密度勾配遠心分離法で濃縮、精製した培養上清を透過電子顕微鏡で観察したところ、脂質二重層や HA のスパイク構造を有する粒子が確認された (図 5) .

以上のことから、本研究で検討した手法により、インフルエンザウイルス様粒子を高分泌生産する組換え昆虫細胞を効率よく作製できることがわかった . 本研究で確立した技術は、亜型の異なるインフルエンザウイルスのウイルス様粒子ワクチンを開発・生産する際にも利用可能である . 気候変動、グローバル化、高齢化などにより感染症の深刻化が懸念される状況のもと、インフルエンザ以外のウイルス感染症のワクチン生産への応用展開も期待される .

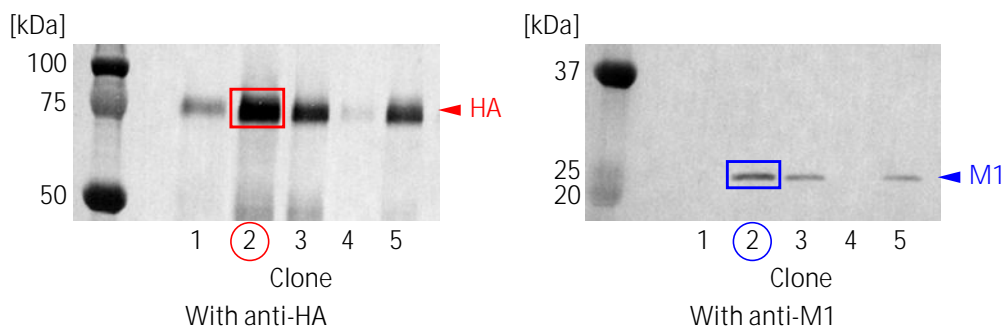


図 3 *Drosophila* 由来 BiP シグナル配列の及ぼす影響

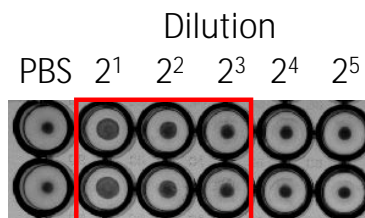


図 4 培養上清の赤血球凝集試験の結果
2 列目以降に培養上清の 2 倍希釈系列を作製 . 1% ニワトリ赤血球使用

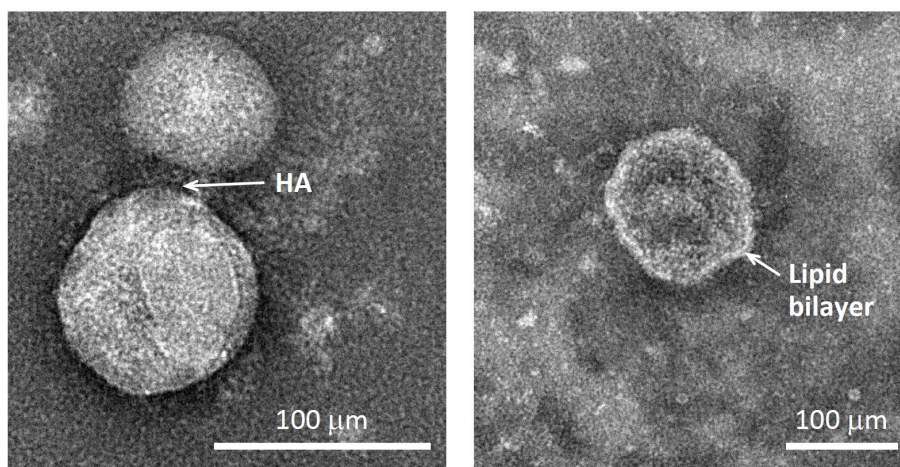


図 5 シヨ糖密度勾配遠心分離により分画した培養上清のネガティブ染色透過型電子顕微鏡像

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Effects of lithium on the secretory production of recombinant antibody from insect cells, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 査読有, Vol. 55, No. 1, 2019, 1–6

DOI: 10.1007/s11626-018-0303-1

Hideki Yamaji, Toshikazu Tanijima, Takuya Matsuda, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Production of influenza virus proteins in stably transformed insect cells, *New Biotechnology*, 査読無, Vol. 44S, 2018, S159

DOI: 10.1016/j.nbt.2018.05.1167

Yuki Ohmuro-Matsuyama, Hideki Yamaji, Modifications of a signal sequence for antibody secretion from insect cells, *Cytotechnology*, 査読有, Vol. 70, No. 3, 2018, 891–898

DOI: 10.1007/s10616-017-0109-0

Hideki Yamaji, Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Efficient protein production by transient gene expression using insect cells, *BMC Proceedings*, 査読無, Vol. 12 (Suppl 1), No. 3, 2018, 19

DOI: 10.1186/s12919-018-0097-x

Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Takafumi Ogawa, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Efficient production of an antibody Fab fragment by transient gene expression in insect cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 124, No. 2, 2017, 221–226

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.03.007

Yuki Ohmuro-Matsuyama, Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Hiroshi Ueda, Hideki Yamaji, Electrostatic engineering of the interface between heavy and light chains promotes antibody Fab fragment production, *Cytotechnology*, 査読有, Vol. 69, No. 3, 2017, 469–475

DOI: 10.1007/s10616-016-9955-4

Hideki Yamaji, Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Efficient antibody production by transient gene expression in insect cells, *New Biotechnology*, 査読無, Vol. 33S, 2016, S200–S201

DOI: 10.1016/j.nbt.2016.06.1413

Hideki Yamaji, Production of virus-like particles using insect cells, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 査読無, Vol. 52, Suppl 1, 2016, S10

DOI: 10.1007/s11626-016-0030-4

山地 秀樹, 昆虫細胞を用いた有用物質生産, *生物工程学*, 査読無, Vol. 94, No. 2, 2016, 76–80
Shinya Takada, Takafumi Ogawa, Kazusa Matsui, Tasuku Suzuki, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Baculovirus display of functional antibody Fab fragments, *Cytotechnology*, 査読有, Vol. 67, No. 4, 2015, 741–747

DOI: 10.1007/s10616-015-9876-7

[学会発表] (計 24 件)

Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Production of influenza virus proteins in recombinant insect cells, 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019), 2019

Hideki Yamaji, Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Production of influenza virus-like particles in insect cells, 26th ESACT (the European Society for Animal Cell Technology) Meeting (ESACT 2019), 2019

Takuya Matsuda, Toshikazu Tanijima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Production of influenza virus-like particles in stably transformed insect cells, 31st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2018 Tsukuba), 2018

Yu Mizote, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Production of antibody Fab fragment using 2A peptide in insect cells, 31st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2018 Tsukuba), 2018

戸上 真也, 増見 恭子, 勝田 知尚, 山地 秀樹, ゲノム編集技術を用いた組換え昆虫細胞の作製, 化学工学会第 50 回秋季大会, 2018

溝手 結, 増見 恭子, 勝田 知尚, 山地 秀樹, 昆虫細胞における 2A ペプチドを用いた抗体生産, 第 70 回日本生物工学会大会, 2018

Hideki Yamaji, Toshikazu Tanijima, Takuya Matsuda, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Production of influenza virus proteins in stably transformed insect cells, 18th European Congress on Biotechnology (ECB2018), 2018

松田 拓也, 谷島 寿和, 増見 恭子, 勝田 知尚, 山地 秀樹, 昆虫細胞によるインフルエンザウイルス抗原タンパク質の生産, 化学工学会第 83 年会, 2018

溝手 結, 増見 恭子, 勝田 知尚, 山地 秀樹, 昆虫細胞による 2A ペプチドを用いた抗体タンパク質の生産, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017

Hideki Yamaji, Toshikazu Tanishima, Kyoko Masumi-Koizumi, Tomohisa Katsuda, Production of influenza virus proteins by recombinant insect cells, International Meeting & 42nd Annual Conference of the Malaysian Society for Biochemistry & Molecular Biology (MSBMB), 2017

山地 秀樹, 谷島 寿和, 増見 恭子, 勝田 知尚, 昆虫細胞を用いたインフルエンザウイルスタンパク質の生産, 第 30 回日本動物細胞工学会 2017 年度大会 (JAACT2017), 2017

Hideki Yamaji, Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Efficient protein production by transient gene expression using insect cells, 25th ESACT (the European Society for Animal Cell Technology) Meeting (ESACT 2017), 2017

大室 有紀, 上田 宏, 山地 秀樹, リチウム添加による昆虫細胞からの抗体分泌生産の向上, 化学工学会第 82 年会, 2017

Toshikazu Tanishima, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Production of virus-like particles using recombinant insect cells, 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2016 Kobe), 2016

Ryoma Takahashi, Kyoko Masumi-Koizumi, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Transient gene expression in insect cells for efficient recombinant antibody production, 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2016 Kobe), 2016

Yuki Ohmuro-Matsuyama, Hideki Yamaji, Lithium increases secretory production of antibody from recombinant insect cells, 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2016 Kobe), 2016

Hideki Yamaji, Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tomohisa Katsuda, Efficient antibody production by transient gene expression in insect cells, 17th European Congress on Biotechnology (ECB2016), 2016

Hideki Yamaji, Production of virus-like particles using insect cells, 2016 World Congress on In Vitro Biology, 2016

Hideki Yamaji, Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Yuki Ohmuro, Tomohisa Katsuda, Recombinant antibody production by transient gene expression in insect cells, Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), 2015

Yuki Ohmuro-Matsuyama, Hideki Yamaji, Modifications of endoplasmic reticulum signal sequence for antibody secretion from insect cells, Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), 2015

⑲ 大室 有紀 山地 秀樹, 昆虫細胞による抗体分泌生産のための小胞体シグナル配列の改変, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015

⑳ 森 慶太, 濱田 宏嗣, 大室 有紀, 勝田 知尚, 山地 秀樹, 昆虫細胞を宿主とした一過性発現による抗体タンパク質の生産, 第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAACT2015), 2015

㉑ 大室 (松山) 有紀, 森 慶太, 濱田 宏嗣, 山地 秀樹, 小胞体シグナル配列の改変が昆虫細胞による抗体分泌生産に及ぼす影響, 第 15 回日本回蛋白質科学会年会, 2015

㉒ Keita Mori, Hirotsugu Hamada, Yuki Ohmuro, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji, Production of an antibody molecule by transient gene expression in insect cells, 24th ESACT (the European Society for Animal Cell Technology) Meeting Barcelona 2015, 2015

[図書] (計 2 件)

山地 秀樹, (株) エル・アイ・シー, バイオロジクスの開発と品質・安全性確保 上巻 監修: 早川堯夫, 第 1 部第 1 章第 1 節第 4 項「昆虫細胞を用いたバイオ医薬品の生産」を分担執筆, 2018, pp. 74-80

Hideki Yamaji, Eiji Konishi, Springer Science+Business Media, Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases, Sunil Thomas (ed.), Methods in Molecular Biology, vol. 1404, Production of Japanese Encephalitis Virus-like Particles Using Insect Cell Expression Systems (Chapter 25) を分担執筆, 2016, pp. 365-375
DOI: 10.1007/978-1-4939-3389-1_25

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 勝田 知尚

ローマ字氏名: KATSUDA Tomohisa