

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07853

研究課題名(和文) バイオ医薬品製造用基材の内在性ウイルス除去

研究課題名(英文) Establishment of virus-free cell substrates for protein drug production

研究代表者

久米 晃啓 (Kume, Akihiro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10264293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現代の新規医薬品の主流は低分子化合物からバイオテクノロジー技術を利用したモノクロナル抗体などの蛋白製剤に移りつつある。その製造基材として、生産効率の高さから昆虫由来細胞株(Sf9、High Fiveなど)の利用が増えているが、最近、これら細胞株が遍く新規ウイルスに持続感染している事実が報じられ、安全性に大きな懸念を投げかけている。本研究課題はこの問題に取り組み、Sf9のデリバティブ細胞株(Mimic Sf9)から持続感染していたラブドウイルス(SfRV)を除去し、ウイルスフリーの細胞クローンを複数樹立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

医薬品、特にバイオ医薬品の安全性において、原材料から混入するウイルスやプリオンなどの感染性因子の問題は常に問題となる重大関心事である。Sf9に感染しているSfRVやHigh Fiveに感染しているTnNVについては、ヒトを含めた哺乳類に対する病原性は知られておらず、ICH-Q5ガイドラインでは「ケースC」として医薬品製造工程で十分なウイルスクリアランスを示せばよいことになっているが、工程内除去はあくまで相対的なものであり、根本的解決とは言い切れない。本課題の成果として得られたウイルスフリー細胞株は、そのような要求に対する答えの一つである。

研究成果の概要(英文)：The current mainstream of novel drug discovery is rapidly changing from small molecules to biotechnologically produced proteins such as monoclonal antibodies. To produce recombinant proteins, insect cell lines such as Sf9 and High Five have been increasingly favored cell substrates because of their superb efficiency. Recently, however, novel viruses have been discovered as persistent infectants of these cell lines, e.g., SfRV rhabdovirus on Sf9 and TnNV nodavirus on High Five. These findings brought safety concerns on the protein drugs produced with present cell substrates, therefore establishing virus-free insect cells is an urgent issue. Through this study, the researcher successfully removed SfRV from Mimic Sf9, a derivative of Sf9 cells, and established rhabdovirus-free cell lines. The result will aid safer production of recombinant protein drugs for human use.

研究分野：医歯薬学

キーワード：バイオ医薬品 細胞基材 ウイルス汚染

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) バイオ医薬品製造用細胞基材としての培養昆虫細胞株

現代の新規医薬品開発の主流は、有機合成を用いる従来の「低分子医薬品」から、バイオテクノロジー技術を活用した「バイオ医薬品」へと急速に変わりつつある。本研究を開始した当時の世界の医薬品売上高の統計（2017年度）を見ても、上位10品目中6品目がモノクロナル抗体をはじめとするバイオ医薬品であり、先行品目の特許が切れるとすぐさまバイオシミラーが発売される状況となっている。このようなバイオ医薬品、すなわち遺伝子組換え技術を用いて作られる蛋白製剤の製造法も、プラスミドなどで形質転換した微生物を用いる方法から、哺乳類培養細胞株をトランスフェクションする方法へ、さらに最近ではバキュロウイルス発現ベクターシステム（baculovirus expression vector system、BEVS）へと変わってきた。BEVSと昆虫細胞株の組み合わせによる蛋白製造効率は非常に高く、しかも培養系から動物血清を除くことも容易なので、牛海綿状脳症（bovine spongiform encephalopathy、BSE）/伝達性海綿状脳症（transmissible spongiform encephalopathy、TSE）伝播の恐れもなく安全性も高いと考えられていた。そのような昆虫細胞株の中でも代表的なものがツマジロクサヨトウ（*Spodoptera frugiperda*）由来のSf9細胞とイラクサギンウババ（*Trichoplusia ni*）由来のHigh Five細胞である。Sf9を用いて製造された季節性インフルエンザワクチンは米国をはじめ世界各国で、High Fiveを用いて製造されたヒトパピローマウイルスワクチンは我が国を含む世界各国で承認され、ヒトに投与されている。

### (2) 培養昆虫細胞株の持続性ウイルス感染

ところが、これらのバイオ医薬品製造用昆虫細胞株が持続性にウイルス感染していることが判明し、問題となった。最初の報告はHigh Five細胞についてで、この細胞株に新規ノダウイルス（TnNV）が持続感染しているというものである（Li T-C et al. J Virol 81: 10890, 2007）。当時この報告はさほど注目されず、High Five細胞を用いて製造されたワクチンの承認審査過程でも議論になった形跡はない。しかし、数年後Sf9細胞及びその親株Sf21細胞が遍く新規ラウドウイルス（SfRV）に持続感染していることが報じられると（Ma H et al. J virol 88: 6576, 2014）事態の深刻さが広く認識されるようになった。Sf9細胞を用いて製造されたワクチンは米国で承認されており、我が国でもこれを技術導入して臨床開発が進められようとしていたが、結局開発中止の已む無きに至った。

これらの新規ウイルスはヒトを含む哺乳類には感染しないと考えられていたものの、ヒトに投与する医薬品の中に混在することは好ましくない。特に、ワクチン類は健常者を対象に何千万人～何億人という単位で投与されるものであるから、安全性に関してはリスクを極小化する必要がある。本課題研究開始当時、世界中の研究者がウイルスの性状について発表していたが、その見解は一定したものでなく、自身の手でその存在と程度を確認する必要があった。細胞株からウイルスを除去する試みも伝えられていたが、企業秘密の壁もあって詳細は不明だった。

## 2. 研究の目的

### (1) Sf9感染ラウドウイルス（SfRV）とHigh Five感染ノダウイルス（TnNV）の性状解析

Sf9細胞とその派生株であるMimic Sf9細胞（哺乳類由来糖転移酵素を人工的に発現させている）並びにHigh Five細胞の細胞及び培養上清にあるSfRVとTnNVのRNAゲノムを同定し、定量する。また、Sf9培養上清中のSfRVがこれに感染していないHigh Five細胞に感染するかを確認する。逆に、High Five培養上清中のTnNVがこれに感染していないSf9細胞に感染するかを解析する。

### (2) SfRVとTnNVの除去

SfRVとTnNVはともにRNAウイルスであり、その生活環においてウイルスゲノムは宿主細胞と独立して存在する。そこで、これらのウイルスを細胞から除去して、ウイルスフリーの細胞株を樹立する。

## 3. 研究の方法

血清フリー/アニマルフリー培養に馴化されたSf9細胞、Mimic Sf9細胞、High Five細胞はThermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。Sf9細胞はSf-900 III SFM培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて28℃にて振盪培養した。Mimic Sf9細胞は10% ウシ胎仔血清 (SAFC, Lenexa, KS, USA) 及び0.1% Pluronic F-68 (Thermo Fisher Scientific) を添加したTNM-FH培地 (Grace's Insect Medium, Supplemented; Thermo Fisher Scientific) を用いて28℃にて振盪培養した。High Five細胞はExpress Five SFM培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて28℃にて振盪培養した。

昆虫細胞に感染しているラウドウイルス・ノダウイルスの複製・増殖に与える影響を見るた

めに、以下の抗ウイルス剤を培地に添加して培養した：エファビレンツ (efavirenz、富士フィルム和光純薬、大阪)、リバピリン (rivabirin、富士フィルム和光純薬) 6-アザウリジン (6-azauridine、東京化成工業、東京)、T-705 (favipiravir、Cayman Chemical、Ann Arbor、MI、USA)、T-1105 (3-hydroxy-2-pyridinecarboxamide、富士フィルム和光純薬)。

#### (2) SfrV 及び TnNV からの RNA 抽出と cDNA 合成

樹立された昆虫細胞株の細胞体からの全 RNA 抽出には ISOGEN 試薬 (ニッポンジーン、富山) を、培養上清からの全 RNA 抽出には ISOGEN-LS 試薬 (ニッポンジーン、富山) を用いた。樹立以前のスクリーニング段階の小規模細胞培養上清からの全 RNA 抽出には NucleoSpin RNA Virus キット (Machery-Nagel、Düren、Germany) を用いた。

得られた RNA を鋳型に、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ、大津) でランダムプライミング～逆転写により cDNA を合成した。

#### (3) エンドポイント PCR

エンドポイント PCR による SfrV の検出には、Ma らの論文 (J virol 88: 6576, 2014) を参考に、以下のプライマーセットを用いた。

[Set 1] Forward: Mono-1 5' -GGCAAGGCTGTTTGGATTACTGACC-3'

Reverse: Mono-2 5' -ACAGGTTTGCAGCTAAGGAGGACA-3'

[Set 2] Forward: Mono-1i 5' -ATATGAGAGCCCCAGACACACAGCC-3'

Reverse: Mono-2i 5' -ACGATGTGGTGAAGAAACACTCCT-3'

[Set 3] Forward: Mono-3 5' -TGCCGAGGGACTGCTGCTTACAGAAGG-3'

Reverse: Mono-4 5' -CACAGCCGGGGTGCAATCA-3'

[Set 4] Forward: Mono-5 5' -ACAGGAGATGCGGAAGACCCCTC-3'

Reverse: Mono-6 5' -ATCTCGCAGGTGGGACAACCC-3'

Sf9 細胞で発現している遺伝子の内部対照として、*S. frugiperda* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 配列を Genetyx-Mac ソフトウェア (ゼネティクス、東京) で検索し、以下のプライマーセットを作成して PCR に用いた。

[Set 5] Forward: SfGAPDH162F 5' -GGGCACCGTTGACATGCAAG-3'

Reverse: SfGAPDH587R 5' -CCATCACGCCACAGTTTTCCAG-3'

同じくエンドポイント PCR による TnNV には、Li らの論文 (J Virol 81: 10890, 2007) を参考に、以下のプライマーセットを用いた。

[Set 6] Forward: Noda-D1 5' -GTAAACAATCCAAGTTCCA -3'

Reverse: Noda-U1 5' - ACCTTAGTCTGTTGACTTAA-3'

[Set 7] Forward: Noda-D4 5' - ACATCCAGATCCGATCAAGT -3'

Reverse: Noda-U4 5' -GCCAGGAATGTTGCTTGCAA -3'

High Five 細胞で発現している遺伝子の内部対照として、*T. ni* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 配列を Genetyx-Mac ソフトウェアで検索し、以下のプライマーセットを作成して PCR に用いた。

[Set 8] Forward: TnGAPDH213F 5' -CGCAGTTTACTGCGAAAGGG-3'

Reverse: TnGAPDH775R 5' -CCTTCTGTTTGGATGGCATCGT-3'

[Set 9] Forward: TnGAPDH464F 5' -CGCCTCTCGCTAAAGTCATCCA-3'

Reverse: TnGAPDH947R 5' -CCGAAGTCTGCTGATACCA-3'

PCR の反応は SimpliAmp サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) を用いて、変性 94 1分、アニーリング 60 1分、伸長 72 1分で 35 サイクル行い、アガロースゲル電気泳動で産物を確認した。

#### (4) 定量 PCR (qPCR)

SfrV のコピー数を定量するため、SfrV の全ゲノム配列を Genetyx-Mac ソフトウェアで検索し、以下のプライマーセットを作成して qPCR に用いた。

[Set 10] Forward: SfrV2F 5' -AATCCTCCAGAGGTCCGGTCA-3'

Reverse: SfrV2R 5' -CATCTCCGCTAATGCGGACT-3'

[Set 11] Forward: SfrV3F 5' -GCCAAGACAGCTCACAGGAT-3'

Reverse: SfrV3R 5' -GAATCCATGGTCACGCAAGC-3'

[Set 12] Forward: SfrV5F 5' -TCACCGGCTCTATCCACTCT-3'

Reverse: SfrV5R 5' -CCACCTCCTTGATGGTTCC-3'

[Set 13] Forward: SfrV7F 5' -GATTGACTCCAGGTGGCTC-3'

Reverse: SfrV7R 5' -TGCCAGTCAAGGACGATCTG-3'

[Set 14] Forward: SfrV10F 5' -TTCTCCACATGCAGACCTGG-3'

Reverse: SfRV10R 5' -AGTCCTGCAACCATGAGACC-3'

Sf9 細胞及び Mimic Sf9 細胞の qPCR 用内部対照として、*S. frugiperda* の GAPDH mRNA 配列を Genetyx-Mac ソフトウェアで検索し、以下のプライマーセットを設定した。

[Set 15] Forward: SfGAPDH309F 5' -GAAGGCGTCTGCTCACTTGG-3'

Reverse: SfGAPDH506R 5' -TCAACGATCTCGAAGTTGTCATGG-3'

TnNV のコピー数を定量するため、TnNV のゲノム配列を Primer BLAST ソフトウェア (National Center for Biotechnology Information, USA) で検索し、以下のプライマーセットを作成して qPCR に用いた。

[Set 16] Forward: TNCLa-39F 5' -GACCAAAACGGCAACGATCC-3'

Reverse: TNCLa-227R 5' -ACTTGAGAAACGCCAACCCA-3'

[Set 17] Forward: TNCLa-96F 5' -TTCCACAGCCAAACGTACCA-3'

Reverse: TNCLa-272R 5' -TTCCTTTTGCGGGATCGGTG-3'

[Set 18] Forward: TNCLa-363F 5' -TTATCGCACCTACCCCTGGA-3'

Reverse: TNCLa-528R 5' -GCGTACCTGAAGGAGGACAC-3'

[Set 19] Forward: TNCLa-912F 5' -TTGTATCCGTGTCTCTGCC-3'

Reverse: TNCLa-1121R 5' -ACATTGATGCGTTTTGCGCT-3'

[Set 20] Forward: TNCLa-941F 5' -GCAGTCAACTCCGCCATACT-3'

Reverse: TNCLa-1099R 5' -GATGACAGCAACCGCAAAG-3'

High Five 細胞の qPCR 用内部対照として、*T. ni* の GAPDH mRNA 配列を Genetyx-Mac ソフトウェアで検索し、以下のプライマーセットを設定した。

[Set 21] Forward: TnGAPDH287F 5' -CTGGTGATTCAACACAGAG-3'

Reverse: TnGAPDH460R 5' -GGCAGTTGTTGTGCAAGAG-3'

[Set 22] Forward: TnGAPDH516F 5' -GACCACCGTACACGCTACCA-3'

Reverse: TnGAPDH684R 5' -CATACCGGTCAGTTTTCCGTTCA-3'

[Set 23] Forward: TnGAPDH789F 5' -TGCAGGCCCTCTCAAGGGAA-3'

Reverse: TnGAPDH949R 5' -AGCCGAACCTGTTGTCGTACCA-3'

定量 PCR の反応は Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラバイオ) を用いて、変性 95 5 秒、アニーリング/伸長 60 30 秒で 40 サイクル行い、付属の LCD アプリケーションソフトを用いて結果を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 昆虫細胞に持続感染しているウイルス RNA の検出、定量

Sf9 細胞及び Mimic Sf9 細胞それぞれについて、細胞及び培養上清から抽出した RNA の逆転写-PCR (RT-PCR) によって、Ma らの報告 (J virol 88: 6576, 2014) の通りに、新規ラブドウイルス SfRV のゲノム RNA が存在することを確認した。次いで、独自に開発した qPCR の系を用いて Sf9 細胞中の SfRV ゲノム RNA を定量し、1 細胞中のウイルス量を算出すると、500~600 copies/cell となった。

同様に、High Five 細胞及び培養上清から抽出した RNA の RT-PCR によって、Li らの報告 (J Virol 81: 10890, 2007) にある通り、新規ノダウイルス TnNV の RNA ゲノムを確認した。qPCR を用いて 1 細胞当たりのウイルス量を算出したところ、上記と同程度の値となった。

##### (2) 持続感染しているウイルスの感染力の確認

購入直後の High Five 細胞には SfRV が感染していないことを確認した上で、Sf9 培養上清中のウイルスに感染力があるか実験を行った。Sf9 培養上清を 0.22µm フィルターで濾過後、High Five 細胞に 1 日接触させた後に細胞を洗浄して通常の培養を再開すると、翌日には High Five 細胞中に SfRV が検出され、培養を続けても持続感染が成立していた。逆に、当初は TnNV 陰性だった Sf9 細胞に High Five 培養上清濾過液を接触させると、こちらも感染が成立した。すなわち、Sf9 細胞は感染力のある SfRV を、High Five 細胞は感染力のある TnNV をそれぞれ放出していることを確認した。

##### (3) 抗ウイルス剤の効果

市販の抗ウイルス剤によって SfRV や TnNV の複製・増殖が抑制できるか、Sf9 細胞及び High Five 細胞の培養系に添加して、細胞中のウイルス RNA 量の推移を測定した。用いた抗ウイルス剤と添加濃度は以下の如くである。

エファビレンツ	100µM
リバビリン	100µM
6-アザウリジン	40µM
T-705	150µM

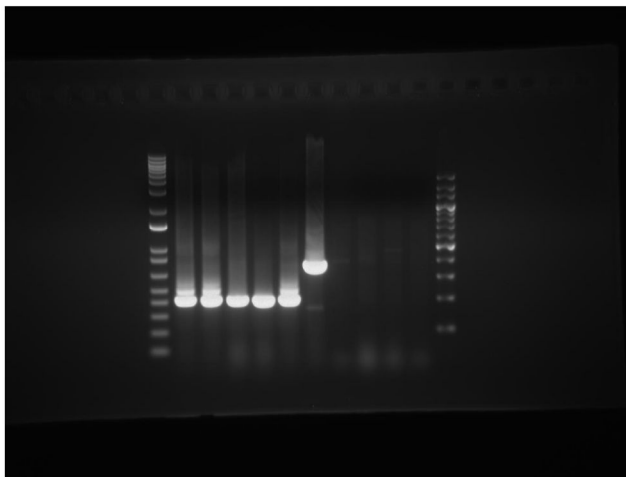
いずれの薬剤を用いても、振盪培養中の昆虫細胞におけるウイルス RNA 量は全く減少せず、無効と判断した。

一方、これらの実験中に、Glycobac という米国企業が Sf9 細胞から SfRV を、High Five 細胞から TnNV を除去した細胞株 (Sf-RNV 及び Tn-NVN) を樹立して特許申請したという情報を入手した (Maghodia J et al. WO2017/075627 A1)。当該申請資料によると、40 $\mu$ M 6-アザウリジン添加と限界希釈培養を組み合わせることで Sf-RNV を、800 $\mu$ M リバビリン添加と限界希釈培養を組み合わせることで Tn-NVN を樹立したとのことである。そこでこれらの追試を試みたが、不成功に終わった。

#### (4) 限界希釈法によるウイルスフリー細胞の分離

研究中に、さらに新たな情報を入手した。すなわち、SfRV 発見者たちのその後の研究で、Sf9 細胞集団中には非常に低頻度ながら SfRV 未感染の細胞が存在しており、限界希釈法を用いて分離できるというものである (Ma H et al. Virology 536: 125, 2019)。上記 4 (3) とも合わせて、Sf9 細胞と High Five 細胞のウイルス除去は他の研究者たちに先んじられたので、本課題ではウイルス除去が報じられていない Mimic Sf9 細胞のウイルス除去を目指すこととした。これらの昆虫細胞の増殖はパラクリン様成長因子に依存しているらしく、通常の限界希釈のようにウェル当たり平均 1 細胞以下のような低密度培養ではクローンを分離することができない。そこで、Mimic Sf9 細胞の限界希釈に当たっても、播種する細胞の密度を広範囲で変化させ、できるだけ低密度で播種したウェルで増殖してくる細胞集団の培養上清中の SfRV を RT-qPCR でスクリーニングした。その結果、2 つの独立した SfRV 陰性細胞集団を見出し、再クローニングを繰り返して SfRV 陰性クローンを樹立した (図)。通常の Sf9 細胞は昆虫に由来するため哺乳類の分泌蛋白や膜蛋白の多くが持っているような糖鎖修飾がない。このような糖鎖修飾はバイオ医薬品やウイルスベクターが構造特異性や生理活性を発揮する上で不可欠な要素である場合もありうると考えられ、本課題で樹立したウイルスフリー Mimic Sf9 細胞の利用も期待される。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



1. 1kb Plus Ladder
2. Mimic Sf9 GAPDH
3. Clone 184 樹立時 GAPDH
4. Clone 184 継代後 GAPDH
5. Clone 150 樹立時 GAPDH
6. Clone 150 継代後 GAPDH
7. Mimic Sf9 SfRV
8. Clone 184 樹立時 SfRV
9. Clone 184 継代後 SfRV
10. Clone 150 樹立時 SfRV
11. Clone 150 継代後 SfRV
12. 200bp Ladder

図. Mimic Sf9 細胞親株と SfRV 除去クローンの RT-PCR 解析

内部対照とした GAPDH (プライマーセット 1 で増幅) の発現は親株と SfRV 除去クローンで同等であるが、除去クローンでは親株に見られる SfRV ゲノム (プライマーセット 1 で増幅) が検出されない。

#### (5) ウイルスフリー細胞が存在するメカニズム

Sf9 細胞集団中では大多数の SfRV 感染細胞から新たなウイルスが培地中に持続的に放出されているにもかかわらず、同じ細胞集団中に SfRV 陰性細胞が存在しうるのはなぜかという新しい課題が浮上した。そこで、低頻度でウイルス陰性細胞が集団中に存在するメカニズムについて、仮説を立てて検証を開始した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurosaki F, Uchibori R, Mato N, Sehara Y, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Sugiyama Y, Kume A	4. 巻 29
2. 論文標題 AAV6-mediated IL-10 expression in the lung ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1242-1251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/hum2018.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kume A, Muramatsu S, Mizukami H, Onmori T
2. 発表標題 Adenoassociated virus (AAV) serotype 3-based vector as an alternative vehicle for liver-directed gene therapy
3. 学会等名 European Society of Gene and Cell Therapy（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久米 晃啓	4. 発行年 2018年
2. 出版社 サイエンス&テクノロジー	5. 総ページ数 121
3. 書名 バイオ医薬品・再生医療等製品開発のためのカルタヘナ法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------