

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19560777
 研究課題名 (和文) 組換え昆虫細胞によるウイルス様粒子の連続生産システムの構築
 研究課題名 (英文) Continuous production of virus-like particles by recombinant insect cells
 研究代表者
 山地 秀樹 (YAMAJI HIDEKI)
 神戸大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号： 40283874

研究成果の概要： ウイルスの表面タンパク質の遺伝子を発現する組換え昆虫細胞を作製し、安全かつ有効なワクチンとして利用可能なウイルス様粒子の生産について検討した。カイコガ由来の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とエンハンサーを配し、選択マーカーを有する発現ベクターに、日本脳炎ウイルスの表面タンパク質 prM および E の遺伝子を挿入した。このプラスミドを培養昆虫細胞に導入して薬剤存在下で培養することにより、哺乳動物細胞と比べて 100 倍以上の E タンパク質を分泌生産する細胞を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 生物化学工学

科研費の分科・細目： プロセス工学 ・ 生物機能・バイオプロセス

キーワード： 昆虫細胞・組換えタンパク質生産・ウイルスタンパク質・ワクチン・ウイルス様粒子・日本脳炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、高病原性の H5N1 型トリインフルエンザウイルスがヒトの間で感染しやすい株に変異し、新型インフルエンザとして世界的な大流行 (パンデミック) を引き起こすことが危惧されている (*Nature*, 435, 399-424 (2005)). また、マールブルグ病, ラッサ熱, SARS (重症急性呼吸器症候群) などの新興感染症の出現やデング熱, 西ナイル熱などの再興感染症の拡大にみられるよう

に、近年の感染症事情は大きく変貌している。このような状況の下、これらのウイルス感染症に対するワクチンの接種は地球規模で人類の健康を守るための最も有効な手段であり、ワクチン開発の重要性はますます増大している。

しかしながら、有効で安全なワクチンの開発には膨大な経費と時間を要するのみならず、低コストで大量にワクチンを製造することは困難をきわめる。たとえば、日本

脳炎ワクチンは、日本脳炎ウイルスをマウスの脳内に接種し、そこで増殖したウイルスをショ糖密度勾配遠心分離法で精製し、ホルマリンで不活化することにより製造されている。ところが、ワクチン接種との因果関係が否定できない急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) が発生したことから、2005 年、厚生労働省はマウス脳由来不活化ワクチンからよりリスクの低いワクチンに切り替えられるまでワクチン接種の積極的勧奨を差し控える勧告を出した (倉根一郎：ワクチン, 55, 307-312 (2005))。このため、現在、我が国では日本脳炎の予防接種は事実上中止されており、マウスを使用しない安全な新型ワクチンの開発が待たれている。また、東アジア、東南アジア、南アジアなどの日本脳炎の流行国においては、より安価なものでないとワクチン接種の普及は望めない。一方、インフルエンザワクチンは発育鶏卵にウイルスを接種することにより製造される。しかしながら、新型インフルエンザの世界的流行による需要をまかなうだけのワクチン生産能力を世界の国々は今のところ持ち合わせていない。

このようなワクチン製造の従来法に対し、培養細胞を用いる生産法やさらに最近、遺伝子組換え技術によりウイルス表面タンパク質を生産する方法が検討されており、実用化が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、組換え昆虫細胞を用いて、安全かつ有効なワクチンとして利用可能なウイルス様粒子の高生産プロセスを開発するための基盤技術を開発することである。

ウイルスの表面タンパク質をコードする遺伝子を哺乳動物細胞に導入して発現させると、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。このような粒子は、ゲノムを持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ため、ワクチンとしての利用が期待されている。しかしながら、ウイルスタンパク質の哺乳動物細胞に対する毒性のため、生産性が非常に低いことが実用化を妨げていた。

これに対し、昆虫細胞は機能性タンパク質を大量に産生可能であり、哺乳動物細胞とは宿主域が大きく異なるため、ウイルス様粒子ワクチンを高生産可能な宿主として利用できると期待される。本研究では、日本脳炎ウイルスの表面タンパク質 prM および E の遺伝子が染色体に組み込まれた安定形質転換昆虫細胞を作製し、日本脳炎ウイルス様粒子の連続分泌生産系の構築につい

て検討した。

3. 研究の方法

昆虫細胞として *Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) (Invitrogen) を、培地として無血清培地である Express Five SFM (Invitrogen) を使用した。発現ベクターとして、*Bombyx mori* 由来の細胞質アクチンプロモーターの上流に *B. mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) 由来のトランス作用因子 IE1 とエンハンサー HR3 を有し、さらに選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子またはブラストジジン耐性遺伝子を含む pIHAneo および pIHAbLa (図 1) (Yamaji *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, 41, 203-209 (2008)) を用いた。

これらのプラスミドベクターに、日本脳炎ウイルスの表面タンパク質 prM および E の遺伝子 (prM/E 遺伝子) を挿入した。prM/E 遺伝子は M タンパク質の前駆体 prM の遺伝子と E タンパク質の遺伝子から構成されるが、ここでは、prM から M に切断される部位に 1 アミノ酸置換の変異を挿入したものと挿入していないものの 2 種類の遺伝子 (Konishi *et al.*: *J. Virol.*, 75, 2204-2212 (2001)) を使用した。作製したベクターを陽電荷脂質を用いて High Five にトランスフェクションし、G418 またはブラストジジンの存在下で培養を行うことにより、

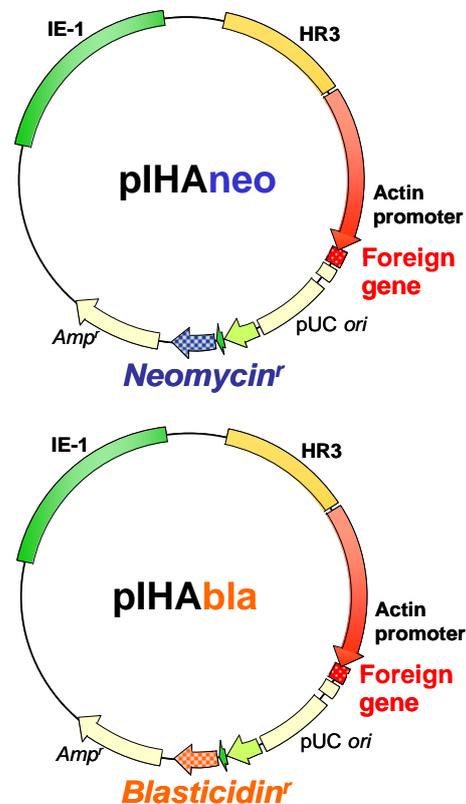


図 1 昆虫細胞用高発現プラスミドベクター

薬剤耐性を示す細胞を取得した。培養上清中の日本脳炎ウイルス E タンパク質の濃度を、マウスモノクローナル抗 E タンパク質抗体を用いる酵素免疫測定法 (ELISA) により測定した。

4. 研究成果

まず、変異を挿入した prM 遺伝子あるいは変異を挿入していない prM 遺伝子と E タンパク質の遺伝子を昆虫細胞 High Five に導入して一過性発現を行い、E タンパク質の分泌生産量を比較した。その結果、いずれの発現ベクターを用いた場合でも、変異を挿入した prM 遺伝子を発現させると、変異のない prM 遺伝子を挿入した場合に比べて 2 倍以上の E タンパク質が分泌生産されることがわかった。日本脳炎ウイルスのウイルス様粒子は哺乳動物細胞に対して細胞融合活性による毒性を示す。これに対し、prM から M に切断される部位に 1 アミノ酸置換の変異を挿入することにより、発現したウイルス様粒子の哺乳動物細胞への細胞融合活性が抑制されることが報告されている (Konishi *et al.*: *J. Virol.*, 75, 2204-2212 (2001)). 上の結果は、High Five のような昆虫細胞に対しても prM 遺伝子への変異の導入が有効であることを示唆しており、E タンパク質の分泌生産量が増大したものと考えられる。また、一過性発現で得られた培養上清をショ糖密度勾配遠心分離法により分画して ELISA により分析したところ、培養上清中の E タンパク質は粒子構造を形成していることが示唆された。

次に、prM/E 遺伝子を High Five にトランスフェクションした後、G418 またはブラストシジンの存在下で培養を行い、薬剤耐性を示す細胞を取得した。得られた形質転換細胞の中で、E タンパク質を著量分泌生産する細胞を選択したところ、変異を挿入した prM 遺伝子を用いて作製したものであった。この E タンパク質の分泌生産能の高い細胞を用いて静置培養および振とう培養を行い、細胞密度と培養上清中の E タンパク質濃度の経時変化を測定した結果を図 2 に示す。図に見られるように、振とう培養の場合、静置培養に比べて、2 倍以上の到達細胞密度が得られた。また、E タンパク質の分泌生産量も、同様に振とう培養では静置培養の 2 倍以上となった。これは、静置培養に比べて振とう培養の方が細胞への酸素供給速度が大きいため、細胞増殖および組換えタンパク質生産が良好に行われたためと考えられる。哺乳動物細胞 (CHO 細胞) を用いた場合の E タンパク質の収量は約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (Konishi *et al.*: *J. Virol.*, 75, 2204-2212 (2001)) であったのに対し、昆虫細胞を用いることにより哺乳動物細胞の 100 倍

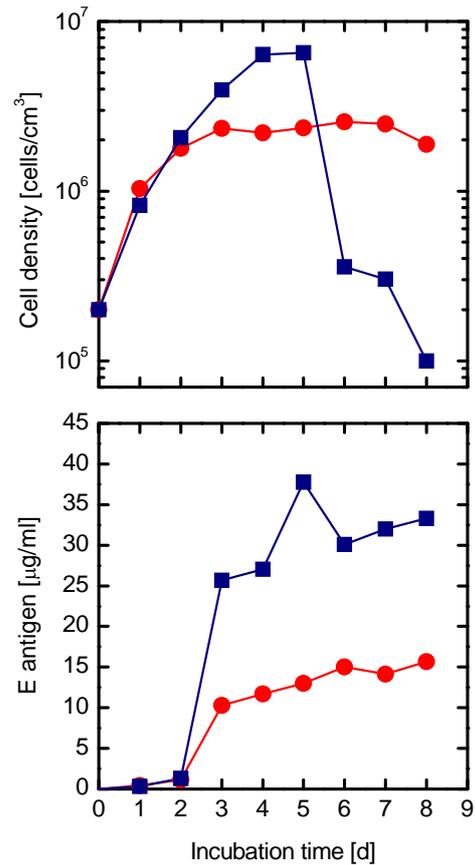


図 2 組換え昆虫細胞の増殖と日本脳炎ウイルス E タンパク質の分泌生産。●：静置培養，■：振とう培養

以上の E タンパク質の分泌生産量が得られることがわかった。

昆虫細胞を用いた組換えタンパク質の発現系として、昆虫に特異的に感染す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する昆虫細胞-バキュロウイルス系が広く用いられている。2007 年、オーストラリアおよび欧州で相次いで子宮頸がん予防ワクチン Cervarix が認可された。Cervarix は子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルスのウイルス様粒子ワクチンであり、昆虫細胞-バキュロウイルス系を用いて製造されている (Harper *et al.*: *Lancet*, 367, 1247-1255 (2006)). このことは、安全かつ有効なウイルスワクチンを大量生産するための宿主細胞として、昆虫細胞が有用であることを示すものである。しかしながら、昆虫細胞-バキュロウイルス系はウイルスの感染により宿主昆虫細胞が死滅してしまうため、目的タンパク質を連続的に生産できない。また、バキュロウイルスは動・植物に感染しないものの、ウイルス様粒子ワクチンを生産する場合、バキュロウイルスとの分離が問題となる可能

性がある。これに対し、近年、外来遺伝子を直接昆虫細胞に導入して安定形質転換細胞を作製し、目的タンパク質を連続的に生産する安定発現系が開発されている。このような系は、細胞がウイルス感染による障害を受けないため目的タンパク質の正確な翻訳後修飾が行われるなどの利点を有するものの、一般的に発現レベルが低いとされていた。

本研究では、カイコガ由来の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とエンハンサーを配し、選択マーカーを有するプラスミドベクター (Yamaji *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, 41, 203-209 (2008)) を用いて、日本脳炎ウイルスの prM/E 遺伝子を直接昆虫細胞に導入して安定形質転換細胞を作製した。この発現ベクターは非常に強力であり、おそらくウイルスタンパク質の昆虫細胞に対する毒性も比較的低いため、哺乳動物細胞に比べて 100 倍以上の収量の E タンパク質を連続的に分泌生産する安定発現系を構築することに成功した。今後、このような組換え昆虫細胞を用いることにより、ウイルス様粒子ワクチンを高生産可能な新たなシステムを構築できると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Takuya Shishido, Naoya Kurata, Myung Eui Yoon, Tsutomu Tanaka, Hideki Yamaji, Hideki Fukuda, Akihiko Kondo: A high-level expression vector containing selectable marker for continuous production of recombinant protein in insect cells, *Biotechnol. Lett.*, 31, 623-627 (2009) (査読有)
- ② Hideki Yamaji, Toshitaka Manabe, Keizo Watakabe, Masaru Muraoka, Ikuo Fujii, Hideki Fukuda: Production of functional antibody Fab fragment by recombinant insect cells, *Biochem. Eng. J.*, 41, 203-209 (2008) (査読有)
- ③ Takuya Shishido, Masaru Muraoka, Hideki Yamaji, Akihiko Kondo, Hideki Fukuda: Production of bionanocapsules in immobilized insect cell culture using porous biomass support particles, *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 572-574 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 高橋裕輔, 中村匡崇, 勝田知尚, 山地秀樹: 昆虫細胞を用いた日本脳炎ウイルスタンパク質の生産, 化学工学会第 74 年会 (2009/3/19), 横浜
- ② Naoya Morishita, Kentaro Yamada, Shuji Kubo, Akinobu Gotoh, Tomohisa Katsuda, Hideki Fukuda, Hideki Yamaji: Low multiplicity infection of 293 cells for adenovirus vector production, JAACT 2008 Fukuoka (The 21th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology), "POWER OF CELLS, Animal Cell Technology in Bioscience, Bioengineering and Bioindustries" (2008/11/26), Fukuoka
- ③ Naoya Morishita, Shuji Kubo, Akinobu Gotoh, Tomohisa Katsuda, Hideki Fukuda, Hideki Yamaji: Production of adenovirus vector by 293 cells immobilized within porous biomass support particles, JAACT 2008 Fukuoka (The 21th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology), "POWER OF CELLS Animal, Cell Technology in Bioscience, Bioengineering and Bioindustries" (2008/11/26), Fukuoka
- ④ Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Takanori Furuta, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji: Secretory production of Japanese encephalitis virus E protein by recombinant insect cells, "Bioseparation for Biorecognition and Bionanotechnology" Conference (2008/10/27), Hanyang University, Korea
- ⑤ 森下直矢, 山田健太郎, 山地秀樹, 福田秀樹: 293 細胞の固定化培養によるアデノウイルスベクターの生産, 化学工学会第 73 年会 (2008/3/18), 浜松
- ⑥ Hideki Yamaji, Hideki Fukuda: Display of functional antibody Fab fragment on the baculovirus surface, 13th European Congress on Biotechnology (2007/9/18), Barcelona, Spain
- ⑦ 古田貴憲, 山地秀樹, 福田秀樹: 昆虫細胞を用いる機能性抗体の生産システム, 化学工学会第 39 回秋季大会 (2007/9/14), 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山地 秀樹 (YAMAJI HIDEKI)
神戸大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：40283874

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし