

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22360345

研究課題名（和文） 昆虫細胞を用いた次世代ワクチンの高生産プロセスの開発

研究課題名（英文） Efficient production of virus-like particles using 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・教授

研究者番号：40283874

研究成果の概要（和文）： 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ことから、ワクチンや診断薬としての利用が期待されている。本研究では、デングウイルスや日本脳炎ウイルスなどのフラビウイルスをターゲットとして、組換え昆虫細胞を用いたウイルス様粒子の生産について検討した。細胞毒性が低下するように改変したウイルス表面タンパク質遺伝子、外来遺伝子を高発現可能なプラスミドベクター、および生産性の高い宿主細胞を利用することにより、組換え昆虫細胞による著量のウイルス様粒子の分泌生産が可能であった。

研究成果の概要（英文）： Virus-like particles (VLPs) are composed of one or several recombinant viral surface proteins that spontaneously assemble into particulate structures similar to authentic virus particles or naturally occurring subviral particles. A high yield of a secretory form of flavivirus VLPs was successfully produced by lepidopteran insect cells engineered to coexpress the premembrane (prM) and envelope (E) proteins. This study demonstrated that recombinant insect cells offer a promising approach to the high-level production of VLPs for use as vaccines and diagnostic antigens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：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：バイオ生産プロセス・昆虫細胞・組換えタンパク質生産・ウイルスタンパク質・ウイルス様粒子・ワクチン

1. 研究開始当初の背景

2009年、パンデミックインフルエンザA(H1N1)が世界中で猛威をふるった。また、近年、高病原性鳥インフルエンザ、SARS（重症急性呼吸器症候群）、デング熱などの新興・再興感染症の脅威が増大している。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。しかしなが

ら、有効かつ安全なワクチンの開発には莫大な時間と経費を必要とする。また、治療薬とは異なり、健康な人を対象とするワクチンは大量生産が必須であり、低コストで迅速なワクチン製造技術の確立が喫緊の課題となっている。

たとえば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ウイル

スをショ糖密度勾配遠心分離法で精製濃縮し、不活化することにより製造されている。このような方法ではワクチン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。このため、MDCK 細胞や Vero 細胞などの哺乳動物細胞を大量に培養し、これらの細胞に接種して増殖させたウイルスを用いるワクチンの開発が進められており、一部の海外のメーカーでは実用化されている。細胞培養によるワクチンの製造法は従来法と比べてワクチンの迅速かつ大量生産が可能であるが、依然として感染性のあるウイルスを大量に取り扱う必要がある、動物由来の病原性物質の混入の危険性がある、など、安全性の面で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作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進められている。その中でも、安全かつ有効な次世代ワクチンとして注目を集めているのがウイルス様粒子である。ウイルスの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。このような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ことから、ワクチンや診断薬としての利用に適している。しかしながら、ウイルスタンパク質の動物細胞に対する毒性のため、生産性が低いことが実用化を妨げていた。これに対し我々は、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、哺乳動物細胞を用いた場合の 100 倍以上の収量のウイルス様粒子を分泌生産する組換え昆虫細胞を得ることに成功している。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産生可能であり、哺乳類に感染するウイルスの抗原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と考えられることから、ウイルス様粒子を効率よく生産するための宿主として有望であると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インフルエンザなどの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であるウイルス様粒子の高生産プロセスを構築するために基盤となる技術を確立することである。このために本研究では、未だ有効なワクチンが開発されていないデングウイルスをターゲットとして、ウイルスの表面タンパク質である prM および E の遺伝子を発現する組換え昆虫細胞を作製し、ウイルス様粒子の連続分泌生産系の構築を試みる。また、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用いて、ウイルス様粒子を高生産可能なバイオリクター技術およびクロマトグラフィーを用いたウイルス様粒子の高効率分離精製技術の開発を検討する。

3. 研究の方法

(1) デングウイルス様粒子の生産

昆虫細胞として *Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) (Life Technologies) を、培地として無血清培地である Express Five SFM (Life Technologies) を使用した。また、プラスミドベクターとして、我々が以前構築した、目的遺伝子の高発現が可能な pIHAb1a および pIHAneo (Yamaji *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, 41, 203-209 (2008)) を用いた。これらのベクターは、*Bombyx mori* 由来の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 IE-1 とエンハンサー HR3 を有し、さらに薬剤耐性遺伝子としてブラストサイジン耐性遺伝子またはネオマイシン耐性遺伝子を保持している。

これらのプラスミドベクターに、デングウイルス 2 型の表面タンパク質である prM および E の遺伝子 (prM/E 遺伝子) を挿入した。ここで、本来の prM 遺伝子のみならず、ウイルスの成熟過程において prM が M に切断される部位のアミノ酸を置換した prM 遺伝子 (Konishi and Fujii: *Vaccine*, 20, 1058-1067 (2002)) も使用した。作製した発現ベクターを、陽電荷脂質を用いて High Five にトランスフェクションし、培養上清をウェスタンブロット法および酵素免疫測定法 (ELISA) により分析した。また、変異を導入した prM/E 遺伝子を挿入した pIHAb1a を High Five にトランスフェクションし、ブラストサイジン存在下で培養することにより、薬剤耐性を示す細胞を取得した。得られた細胞の培養上清をショ糖密度勾配遠心分離法で分画し、ELISA により分析した。

(2) 日本脳炎ウイルス様粒子の生産および分離精製

上と同様にして、日本脳炎ウイルスの prM/E 遺伝子を High Five に導入して作製した組換え昆虫細胞を用いた。組換え昆虫細胞の培養上清から、ポリエチレングリコール沈殿法およびショ糖密度勾配遠心分離法により精製したウイルス様粒子を、4 週齢の雄 C3H/He マウスに 2 週間隔で 2 回免疫した。初回免疫後 2 週目以降に採血を行い、血清中の中和抗体価を測定した。

また、通気攪拌槽型のバイオリクター (図 1) (Yamaji *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, 28, 67-72 (2006)) を用いて、組換え昆虫細胞の回 分 培

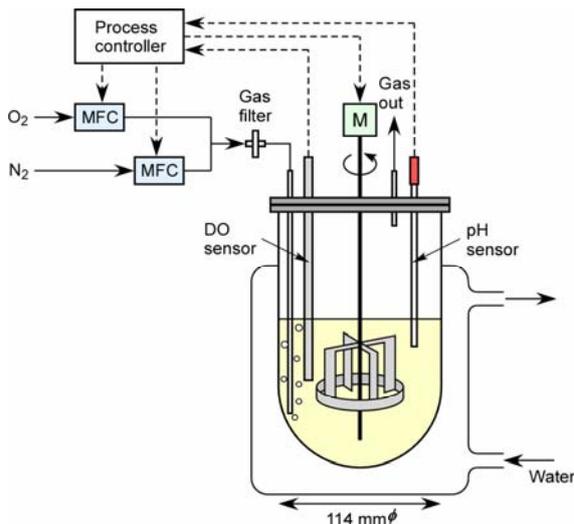


図1 通気攪拌槽型のバイオリクターシステム。M：モーター，MFC：マスフローコントローラー

養を行い，E タンパク質の生産を検討した。培養液量は 1L であり，温度は 27℃，攪拌速度は 90 rpm で一定とし，O₂ と N₂ の混合ガスを通気（通気速度：20 ml/min）することにより，培地中の溶存酸素濃度を空気飽和濃度に維持した。

4. 研究成果

(1) 組換え昆虫細胞によるデングウイルス様粒子の生産

まず，デングウイルス 2 型の prM/E 遺伝子を High Five にトランスフェクションし，一過性発現を検討した。培養上清をウェスタンブロット法および ELISA で分析したところ，培養上清中に E タンパク質が存在していることが確認された（図 2）。また，prM 遺伝子における変異の有無が E タンパク質の発現に及ぼす影響を比較検討したところ，本来の prM 遺伝子を用いた場合よりも，prM が M に切断される部位のアミノ酸を置換した prM 遺伝子を用いた方がより多量の E タンパク質が分泌されることがわかった。

フラビウイルス科，フラビウイルス属に属するデングウイルスはエンベロープを有するウイルスであり，エンベロープの脂質二重膜に E と M が存在する。E は中和抗体が認識し，防御免疫誘導の中心となるタンパク質である。一方，M は前駆体タンパク質 prM として合成された後，ウイルスの成熟過程においてフリントとよばれる宿主細胞由来のプロテアーゼによって切断され，M および E を含む感染性のあるウイルス粒子となる。デングウイルスと同じくフラビウイルス属に属する日本脳炎ウイルスの prM/E 遺伝子を安定発現

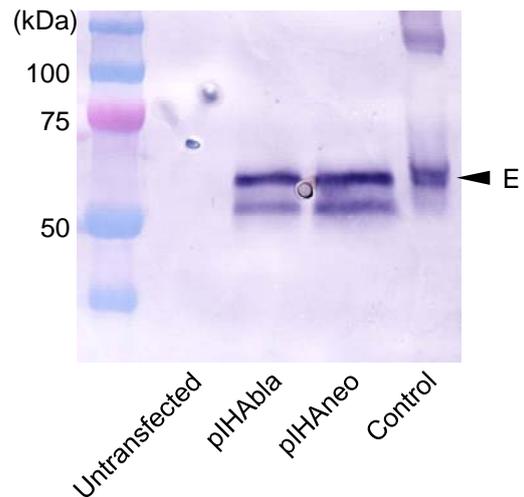


図2 デングウイルス 2 型の prM/E 遺伝子をトランスフェクションした High Five の培養上清のウェスタンブロット法による分析。変異を導入した prM/E 遺伝子を pIHAb1a または pIHAneo を用いて High Five に導入した後，得られた培養上清をポリエチレングリコール沈殿法で処理し，ウェスタンブロット法で分析した結果を示す。

する組換え CHO 細胞の作製が試みられたが，M および E タンパク質を含む粒子の哺乳動物細胞に対する毒性のため，安定形質転換細胞は得られなかった。これに対し，プロテアーゼによって prM が M に切断される部位に 1 アミノ酸置換の変異を導入した prM 遺伝子を E 遺伝子とともに使用することにより，prM および E タンパク質を含むウイルス様粒子を安定に分泌発現する CHO 細胞の樹立に成功している（Konishi *et al.*: *J. Virol.*, 75, 2204-2212 (2001)）。本研究で得られた結果から，prM/E 遺伝子を導入することによりフラビウイルスのウイルス様粒子を生産する組換え細胞を構築する際には，哺乳動物細胞の場合と同様に，昆虫細胞の場合も変異を導入した prM 遺伝子の利用が有効であることがわかる。

次に，変異を導入した prM/E 遺伝子を，pIHAb1a を用いて High Five にトランスフェクションし，プラストサイジンの存在下で培養することにより，薬剤耐性を示す細胞を取得した。得られた細胞の振とう培養を行い，培養上清を ELISA で分析したところ，これまでに報告されている組換え CHO 細胞（Konishi and Fujii: *Vaccine*, 20, 1058-1067 (2002)）と比べて 10 倍以上の収量の E タンパク質を分泌生産する組換え昆虫細胞が得られることがわかった。また，ショ糖密度勾配遠心分離法により培養上清を分画して ELISA により分析したところ，分泌生産され

たEタンパク質は、ウイルス感染細胞から放出される非感染性粒子 (slowly sedimenting hemagglutinin (SHA) particles) とほぼ同じ密度のフラクションにおいて検出されたことから、Eタンパク質が粒子状で分泌されていることが示唆された。以上のことから、組換え昆虫細胞により著量のデングウイルス様粒子を分泌生産できる可能性が示唆される。

(2) 組換え昆虫細胞による日本脳炎ウイルス様粒子の生産および分離精製

日本脳炎ウイルスのprM/E遺伝子を導入して作製した組換え昆虫細胞の培養上清から、ポリエチレングリコール沈殿法およびショ糖密度勾配遠心分離法により精製したウイルス様粒子をマウスに免疫して、血清中の中和抗体価を測定した。ウイルス様粒子のみ免疫した場合もアラム (Alum) アジュバントと混合して免疫した場合も、免疫後に投与量に依存して中和抗体価が上昇し、特にアラムアジュバントを用いた場合、高い中和抗体価が得られることがわかった。したがって、組換え昆虫細胞が分泌生産した日本脳炎ウイルス様粒子は、中和抗体による液性免疫をマウスに誘導しうることが示唆される。

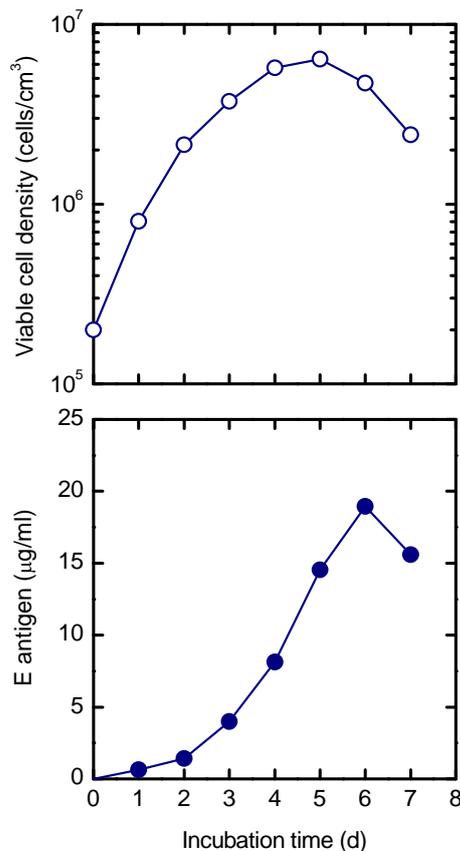


図3 通気攪拌槽型バイオリアクターを用いた回分培養による日本脳炎ウイルスEタンパ

ク質の生産

次に、通気攪拌槽型のバイオリアクターを用いて組換え昆虫細胞の懸濁培養を行い、回分培養によるEタンパク質の生産を試みた結果を図3に示す。培養条件は最適化されたものではないが、培養液量1Lの直接気泡通気をとまなう遊離懸濁培養においても、組換え昆虫細胞は振とう培養の場合と同等以上の 6.4×10^6 cells/cm³の細胞密度に達した。また、振とう培養の場合と同程度の収量のEタンパク質を分泌生産することがわかった。この結果は、バイオリアクタープロセスにおけるウイルス様粒子の効率的な大量生産の可能性を示唆している。

また、クロマトグラフィーによるウイルス様粒子の分離精製について検討した。組換え昆虫細胞の培養上清を、Sephacryl (GE Healthcare)などのゲルろ過担体を充填したカラムに負荷したところ、Eタンパク質はカラム溶出液の素通り画分において検出された。さらに、培養上清をポリエチレングリコール沈殿法で処理することにより、培地由来の夾雑物を効率よく除去できることがわかった。これらのことから、従来法であるショ糖密度勾配遠心分離法の代替技術として、ポリエチレングリコール沈殿法やゲルろ過クロマトグラフィーを用いることにより、ウイルス様粒子を効率的に分離精製できる可能性が示唆された。

上述のように、組換え昆虫細胞は哺乳動物細胞と比べて著量のウイルス様粒子を分泌生産しうることから、ウイルス様粒子ワクチンを高生産するための新たなプラットフォームとして利用できると考えられる。本研究において高い生産性が得られた要因として、細胞毒性が低下するように改変したウイルス表面タンパク質遺伝子、外来遺伝子を高発現可能なプラスミドベクター、および分泌生産性の高い宿主昆虫細胞の利用が挙げられる。今後は、ウイルス様粒子ワクチンの高生産プロセスの構築に向けて、バイオリアクタープロセスの最適化やアフィニティークロマトグラフィーなどを用いたウイルス様粒子の高度分離精製技術の開発に関する研究を進めていく必要がある。

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4件)

- ① Hideki Yamaji, Eiji Konishi: Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cells, *Bioengineered*, in press (2013) DOI 10.4161/bioe.24514 (査読有)

- ② Hideki Yamaji, Masataka Nakamura, Miwa Kuwahara, Yusuke Takahashi, Tomohisa Katsuda, Eiji Konishi: Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1071-1079 (2013) DOI 10.1007/s00253-012-4371-y (査読有)
- ③ Hideki Yamaji, Maiko Segawa, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 657-662 (2012) DOI 10.1016/j.jbiosc.2012.06.012 (査読有)
- ④ 山地秀樹: 昆虫細胞を用いたウイルス様粒子の生産, *PHARM TECH JAPAN*, 28, 2503-2508 (2012) <http://www.jiho.co.jp/shop/list/detail/tabid/272/catid/75/pdid/92354/Default.aspx> (査読無)
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Yuri Hotta, Azusa Minamitani, Kazuma Narita, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji: Production and purification of Japanese encephalitis virus-like particles from recombinant insect cells, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012) (2012/11/30) 名古屋
- ② Hideki Yamaji, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Secretory production of virus-like particles by recombinant insect cells, The 15th European Congress on Biotechnology of the European Federation of Biotechnology (ECB15) (2012/9/26) (Istanbul, Turkey)
- ③ 山地秀樹, 瀬川麻衣子, 中村匡崇, 勝田知尚: 昆虫細胞-バキュロウイルス系によるウイルス様粒子の生産, 化学工学会第 77 年会 (2012/3/15) (東京)
- ④ 山地秀樹: 昆虫細胞を用いたウイルス様粒子ワクチンの生産, JBA バイオエンジニアリング研究会講演会 (2012/1/20) (東京) [依頼講演]
- ⑤ 成田和馬, 堀田有里, 南谷梓, 永菅尚, 勝田知尚, 山地秀樹: 昆虫細胞によるウイルス様粒子生産に及ぼす培養条件の検討, 化学工学会第 43 回秋季大会 (2011/9/14) (名古屋)
- ⑥ Miwa Kuwahara, Hideki Yamaji, Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue type 2 virus produced by insect cells for use as vaccine and diagnostic antigens, IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011 Sapporo Congress (2011/9/13) (札幌)
- ⑦ Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Efficient production of extracellular subviral particles of Japanese encephalitis virus by recombinant insect cells, IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011 Sapporo Congress (2011/9/13) (札幌)
- ⑧ Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Secretory production of virus-like particles from recombinant insect cells, ESACT (European Society for Animal Cell Technology) 2011 Meeting (2011/5/16) (Vienna, Austria)
- ⑨ Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cell expression systems, 13th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2010) (2010/10/6) (Taipei, Taiwan)
- ⑩ 山地秀樹: 培養昆虫細胞を用いた有用物質生産, 化学工学会第 42 回秋季大会 (2010/9/7) (京都) [依頼公演]
- ⑪ Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Hideki Yamaji: Production of Japanese encephalitis virus-like particles using insect cells, The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2010) (2010/9/3) (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・教授
研究者番号: 40283874

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

勝田 知尚 (KATSUDA TOMOHISA)
神戸大学・環境管理センター・准教授
研究者番号：50335460

(4) 研究協力者

小西 英二 (KONISHI EIJI)
大阪大学・微生物病研究所・デングワクチン
（阪大微生物病研究会）寄附研究部
門・教授
研究者番号：40135786