Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-11

Study on Production of Virus-like Particles Using Stably Transformed Insect Cells

松田，拓也

(Degree)
博士（工学）
(Date of Degree)
2023-03-25
(Date of Publication)
2026-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8649号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482397

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（別紙様式 3）

論文内容の要旨

氏　　名　松田　拓也

専　　攻　応用化学専攻

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

Study on Production of Virus-like Particles Using Stably Transformed Insect Cells

組換え昆虫細胞を用いたウイルス様粒子の生産に関する研究

指導教員　山地　秀樹

（注）2，000 字～4，000 字でまとめること。

ウイルス様粒子 (Virus-Like Particles, VLPs) は、ウイルスの構造タンパク質や表面タンパク質から構成される粒子であり、外部構造はウイルスに似ているためウイルスと同様の免疫応答を誘導できるが、内部にはゲノムを持たないため感染性を有さない (Fig. 1a, b)。これらの特徴から、VLPs は安全かつ有効性の高いワクチンとして、哺乳動物細胞や酵母、大腸菌などの種々の組換えタンパク質生産系を用いて生産され、様々な感染症への応用が研究されており、これまでにいくつかの VLPs ワクチンが承認を受けている。また、昆虫細胞は組換えタンパク質の生産において、哺乳動物細胞に比べ安価かつ簡便に培養でき、ヒト型とは異なる糖鎖修飾を行うものの高等真核生物の翻訳後修飾を施すため複雑なタンパク質やタンパク質複合体の生産を行うことができる。そのため、ヒト型の糖鎖修飾が必要である抗体医薬とは異なり、ヒト型の糖鎖修飾が必須ではないと考えられる組換えタンパク質ワクチンの生産に応用可能であり、昆虫細胞は VLPs 生産のためのバランスの取れた宿主細胞であるといえるだろう。本論文ではこのような背景から、組換え昆虫細胞を用いた VLPs の生産に関する研究を行い、これについてまとめている。

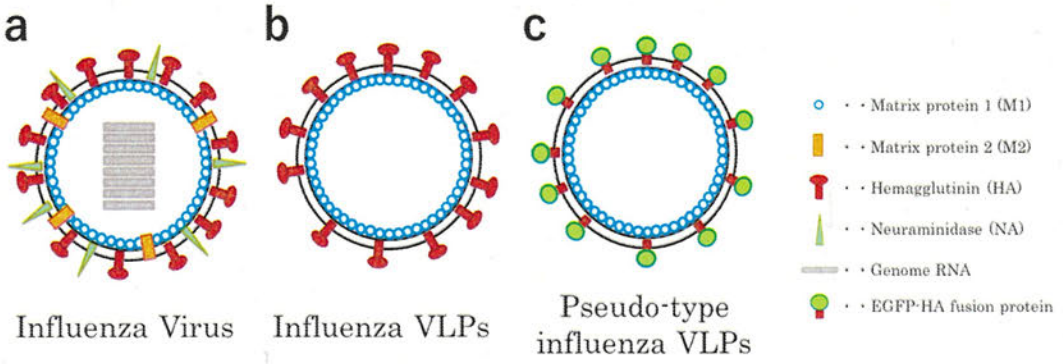

Fig. 1 インフルエンザウイルス(a)、本研究で作製したインフルエンザ VLPs (b) および緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 提示インフルエンザ VLPs (c) の模式図

第 1 章では、組換え昆虫細胞を用いたインフルエンザ VLPs (Fig. 1b) の生産について検討を行った。インフルエンザウイルスの主要抗原タンパク質であるヘマグルチニン (HA) および構造タンパク質であるマトリックスタンパク質 1 (M1) の遺伝子を、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に挿入した。構築した 2 種のプラスミドベクターを昆虫細胞 High Five にコトランスフェクションし、2 種類の抗生物質存在下で培養することにより、HA と M1 の遺伝子がゲノムに組み込まれた組換え昆虫細胞を樹立した。樹立した昆虫細胞において、HA は主に細胞膜、M1 は細胞質に存在しており、インフルエンザウイルス感染細胞における HA, M1 の存在領域と一致していた。また、western blotting を用いた分析により、培養上清中に HA および M1 分子が分泌されていることや、免疫沈降法により HA と M1 からなる複合体の存在が示唆された。TEM を用いた観察により表面に HA 分子が存在し、形態がインフルエンザウイルスに近い粒子の存在を確認した。

また、作製した組換え昆虫細胞の培養上清より、16 HAU/50 µl の HA 活性が確認され、ELISA により測定した HA 濃度は 11 µg/ml であった。これらの結果から、本研究で樹立した組換え昆虫細胞による、インフルエンザ VLPs の効率的な分泌生産が可能であることが分かった。

第 2 章では、第 1 章の組換え昆虫細胞を用いたインフルエンザ VLPs 生産の知見を活かし、インフルエンザ VLPs を基盤とする、VLPs 表面への外来タンパク質提示について検討を行った。現在、VLPs ワクチンの研究開発は非常に時間と労力が掛かるプロセスである。VLPs の生産では、VLPs を構成するウイルスタンパク質の組み合わせを決定する必要があるため、由来となるウイルスに関する知見が必要となり、特に新興感染症に対するワクチン開発において、抗原タンパク質の遺伝情報が分かれば生産可能である mRNA およびサブユニットワクチンに比べ時間が掛かってしまう。そこで、インフルエンザ VLPs を基盤として、他種のウイルスの抗原タンパク質を VLPs 表面に提示することにより、VLPs ワクチン開発の迅速化を目指した。本研究ではモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を選択し、EGFP の c 末端側に 4 種類の長さの異なる HA の c 末端側ペプチドをそれぞれ付加した EGFP-HA-short (-mid1, -mid2, -long) 融合タンパク質の遺伝子を作製し、プラスミドへ組み込んだ。それぞれの EGFP-HA 発現プラスミドを M1 発現プラスミドと共に昆虫細胞 High Five にコトランスフェクションし、一過的に発現させることで、EGFP を表面に提示したインフルエンザ VLPs の生産を試みた (Fig. 1c)。トランスフェクション後に共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、特に EGFP-HA-mid2 および-long を用いた場合において、細胞膜上に EGFP の蛍光が観察されたことから、HA の c 末端側ペプチドの付加による EGFP 分子の細胞膜への提示が可能であることが示唆された。また、蛍光を発する細胞の数は長い HA の c 末端側ペプチドを用いた場合ほど多くなった。Western blotting により培養上清を分析したところ、M1 単独の発現では M1 は検出されなかったが、EGFP-HA 融合タンパク質と M1 を共発現した場合には上清より M1 が検出された。このことから、EGFP-HA との共発現により M1 が細胞質から上清中に VLPs として分泌している可能性が示唆された。金ナノ粒子標識抗体による免疫染色を用いた電子顕微鏡観察では、精製後の上清から表面に EGFP 分子を持つ粒子が観察された。これらの結果から、EGFP-HA と M1 分子からなるインフルエンザ VLPs が分泌生産されていることが確認された。HA の c 末端側ペプチドと M1 を用いることにより、外来タンパク質をインフルエンザ VLPs の表面に提示できることを明らかにした。

第 1 章では、昆虫細胞－バキュロウイルス系などの一過性発現系ではなく、組換え昆虫細胞を用いた VLPs の安定発現について検討した。現在、組換えタンパク質生産に利用する組換え昆虫細胞の樹立にはプラスミドのランダムインテグレーションを利用しており、この方法では目的遺伝子の導入遺伝子座や導入コピー数が制御できないといった欠点がある。

このため、目的タンパク質を高発現可能な細胞の樹立には長期間のスクリーニングを行う必要がある。そこで第3章では、高発現な組換え細胞株樹立の樹立の迅速化を目指し、昆虫細胞におけるゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を利用した目的遺伝子座への遺伝子導入を検討した。CRISPR-Cas9 によるゲノムの切断位置としては、High Five 細胞の由来である *Trichoplusia ni* において活性の阻害が幼虫の成長に致命的でないことが報告されている carboxypeptidase A2 遺伝子の exon1 領域を選択した。High Five における CRISPR-Cas9 によるゲノム切断用に設計した Cas9 プラスミドとターゲット領域への位置特異的な遺伝子ノックインのために設計したドナーベクターを High Five 細胞にコトランスフェクションしたところ、ゲノム DNA への目的遺伝子の組込みが確認された。抗生物質を用いたセレクションの後に得られた 21 個の抗生物質耐性細胞株の内 19 個の株よりゲノム DNA への遺伝子の組込みが確認されたが、目的遺伝子の発現および目的タンパク質の活性は確認できなかった。これらの結果から、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 により位置特異的に遺伝子ノックインを行うことにより組換え昆虫細胞を樹立できたが、今後 High Five において導入遺伝子を高発現可能な遺伝子座を特定する必要があると考えられる。

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	松田　拓也		
論文題目	Study on Production of Virus-like Particles Using Stably Transformed Insect Cells 組換え昆虫細胞を用いたウイルス様粒子の生産に関する研究		
審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	教　授	山地　秀樹
	副　査	教　授	荻野　千秋
	副　査	教　授	南　　秀人
	副　査		
	副　査		印

要　　旨

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は世界中で猛威を振るった．COVID-19 が収束しても，グローバル化や自然環境破壊が進み気候変動が常態化する状況のもと，今後も新たな感染症のパンデミックの発生は避けられない．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，低コストで安全なワクチンを迅速に開発・製造可能な技術が不可欠となる．近年，遺伝子組換え技術を用いて作製したウイルス抗原タンパク質を有効成分とする組換えワクチンの開発が精力的に進められている．そのなかでも，ウイルス様粒子 (virus-like particles, VLPs) は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．ウイルスのエンベロープタンパク質やキャプシドタンパク質などの表面タンパク質は，ウイルス感染細胞内で自発的に会合しウイルス粒子を形成する．このようなウイルス表面タンパク質の遺伝子を遺伝子組換え技術により哺乳動物細胞で発現させると，中空のウイルス様粒子が生成する．ウイルス様粒子は目的ウイルスの表面タンパク質の遺伝情報に基づいて比較的迅速に生産することができる．ウイルス様粒子はゲノムをもたず感染性がないため，安全性が高い．また，本来の立体構造を保持した抗原タンパク質が高密度で粒子表面に提示されるため，天然のウイルス抗原と同等の抗原性や免疫原性を示す．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通常低いことから，ウイルス様粒子を高生産するための強力なプラットフォームとして利用できると期待される．

本研究では，組換え昆虫細胞を用いて新たなウイルス様粒子を迅速かつ大量に生産するための基盤技術の確立を目指して基礎的な検討をおこなっている．本論文は Introduction，Chapter I・II・III，および General Conclusion and Future Study から構成されており，Chapter I・II・III の概要を以下に示す．

Chapter I では，組換え昆虫細胞によるインフルエンザウイルス様粒子の分泌生産について検討している．インフルエンザウイルスは，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 (脂質二重層) をもつウイルスである．インフルエンザウイルスの感染を防御する主役はウイルス表面に存在するヘマグルチニン (HA) に対する中和抗体であり，被接種者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 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．本研究では，インフルエンザ A ウイルス (H1N1) の HA および M1 の cDNA を，プラスミドベクターを用いて培養昆虫細胞に導入し，両遺伝子を共発現する組換え細胞を作製した．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昆虫細胞に導入し，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 から成る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．ウイルス様粒子を含む培養上清は赤血球凝集活性を

氏名	松田　拓也

有することを確認している．また，組換え昆虫細胞によるHAの生産性は，昆虫細胞－バキュロウイルス系と同等の高レベルであった．

インフルエンザウイルスのHAの膜貫通領域およびC末端側領域と，他のウイルスの表面タンパク質のウイルス粒子表面に露出しているN末端側領域を融合タンパク質として昆虫細胞でM1と共発現することにより，インフルエンザウイルス様粒子をプラットフォームとした新たなキメラウイルス様粒子を迅速かつ大量に生産できると期待される．Chapter II では，組換え昆虫細胞を用いて新たなウイルス様粒子を迅速かつ大量に生産可能な技術の構築に向けて，異種タンパク質を表面に提示したインフルエンザウイルス様粒子の生産について検討している．HAと連結してウイルス様粒子の表面に提示するモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (GFP) を選定し，GFP遺伝子のC末端にHAの膜貫通・C末端側領域のcDNAを連結した融合遺伝子とM1遺伝子を昆虫細胞にコトランスフェクションし，HAの膜貫通・C末端側領域のペプチド鎖長が融合タンパク質の発現に及ぼす影響について検討している．共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞を観察した結果，発現したGFPとHAの融合タンパク質およびM1は，インフルエンザウイルス様粒子の出芽に向けて細胞内でそれぞれ適切な領域に存在していることを明らかにしている．また，フローサイトメーターによる分析の結果，HAの膜貫通・C末端側領域の鎖長が長くなるにつれて緑色蛍光を発する細胞数の増加を確認している．このように，異種タンパク質を適切な鎖長のHAの膜貫通・C末端側領域に連結した融合タンパク質として昆虫細胞でM1と共発現させることにより，異種タンパク質を表面に提示したインフルエンザウイルス様粒子を生産可能であることを明らかにした．

これまで，組換え昆虫細胞の作製は，細胞に導入したプラスミドのゲノムへの偶発的な組み込みに依存していたため，組み込み確率が低く，細胞株の樹立にしばしば多くの労力と数週間以上の時間を要した．また，目的遺伝子のゲノムへの組み込みの位置やコピー数を制御できないため，組換えタンパク質の高発現が長期間持続する細胞株の取得は困難であった．そこで，Chapter III では，ゲノム編集技術CRISPR-Cas9を昆虫細胞に応用し目的遺伝子を部位特異的にゲノムに組み込むことにより，長期間安定に目的タンパク質を高発現可能な組換え昆虫細胞を効率よく樹立する技術の確立を目指して検討をおこなっている．昆虫細胞High Fiveのcarboxypeptidase A2遺伝子のexon1領域をターゲットとして，High Five由来のU6 promoterの下流にgRNA配列を配置しCas9遺伝子を含むプラスミドをHigh Fiveにトランスフェクションした結果，ターゲット領域でのDNAの二本鎖切断を確認している．また，このgRNA-Cas9プラスミドとターゲット領域への部位特異的な遺伝子ノックインのためにhomology armをもつドナーベクターをHigh Five細胞にコトランスフェクションしたところ，ゲノムDNAへの目的遺伝子の組込みを確認している．異なる長さのhomology armをもつドナーベクターを比較検討した結果，500 bpのhomology armを有するドナーベクターを用いた場合に高いゲノム組込み効率を得た．gRNA-Cas9プラスミドとドナーベクターをHigh Fiveにコトランスフェクションして遺伝子組換え昆虫細胞株を作製したところ，得られた21株のうち19株において部位特異的な遺伝子ノックインを確認している．これらことから，CRISPR-Cas9により遺伝子組換え昆虫細胞を効率的に樹立できる可能性を示唆している．

以上のように本研究は，組換え昆虫細胞を用いたインフルエンザウイルス様粒子の高分泌生産，インフルエンザウイルス様粒子をプラットフォームとして，表面に異種タンパク質を提示したキメラウイルス様粒子の生産，およびゲノム編集技術を用いた組換え昆虫細胞の迅速な作製に関して基礎的な検討をおこない，新たなウイルス様粒子ワクチンを迅速に開発し高生産するための重要な知見を得ており価値ある集積である．提出された論文は工学研究科学位論文評価基準を満たしており，学位申請者の松田 拓也は博士 (工学) の学位を得る資格があると認める．