

〈特集：カイコによるタンパク質生産と産業化〉

プロテインビーズの産業利用

森 肇

Application of protein beads

Hajime Mori

Summary Cypovirus (CPV) infections result in the production of significant amounts of protein microcrystals (occlusion bodies) termed polyhedra. Virus particles are occluded within polyhedra. Polyhedra stabilize virions allowing them to remain viable for long periods in the environment. We have successfully developed a system to immobilize foreign proteins into insect virus occlusion bodies. We found that the virion outer capsid protein, VP3, is implicated in the occlusion of viral particles into *Bombyx mori* CPV (BmCPV) polyhedra, and identified the N-terminal VP3 domain (VP3 immobilization signal) as responsible for association and incorporation of foreign proteins into BmCPV polyhedra. The atomic structure of BmCPV polyhedra revealed that the polyhedrin H1 helix at the N-terminus of the molecule is a useful tag for incorporating foreign proteins into polyhedra such as the VP3 immobilization signal. The immobilization signal-containing foreign proteins expressed under the control of baculovirus polyhedrin promoter are occluded in BmCPV polyhedra consisting of crystallized polyhedrin expressed by another recombinant baculovirus containing BmCPV polyhedrin gene.

Key words: Polyhedra, Protein beads, CPV, Cytokines, Slow release

I. はじめに

昆虫では2種類の多角体病が知られている¹⁾。一つは核多角体病で、その病原体は昆虫の脂肪体組織や血球細胞を始めとする多くの組織で増殖するnucleopolyhedrosis virus (NPV) と呼ばれる環状二本鎖DNAをゲノムに持つウイルスである²⁾。また、もう一つは細胞質多角体病として知

られ、この病原体は昆虫の中腸皮膜組織で増殖するcypovirus (CPV) という10本から12本に分節した二本鎖RNAをゲノムに持つウイルスである³⁾。つまり、NPVはDNAウイルスであるのに対して、CPVはRNAウイルスといった具合に全く異なったウイルスである。しかし、実はこれら両ウイルスは共に多角体と呼ばれる大きさが数mmのタンパク質微結晶を作るという共通し

京都工芸繊維大学応用生物学部門
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町1

Kyoto Institute of Technology,
Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

た特徴を持つ (Fig. 1A)。このため、読者の皆様にどちらのウイルスの話なの? という混乱が生じないように、これからできるだけ丁寧に説明することを心がけるつもりである。

NPVはバキュロウイルスベクターとして昆虫細胞あるいは昆虫 (カイコなど) を使った有用タンパク質の発現ベクターとして広く知られており、今回の特集の中でも「カイコバキュロウイルス系によるタンパク質生産」として紹介されているので、そちらをご参照願いたい。私をご紹介する内容は、カイコで増殖するCPVの多角体を外来タンパク質の「入れ物」として利用する話である。ただし、その「入れ物」を作るために、現在は主にバキュロウイルスベクターを利用しており、また一部では遺伝子組換えカイコ (こちらに関しても本特集の中で取り扱われており、詳細については該当箇所をご参照願いたい) でも作っている。

では、なぜタンパク質をCPVが作る多角体に入れるのかについて説明をしたい。NPVの場合も、CPVの場合も、そもそも多角体はウイルス自身が作るもので、さらにその中にウイルスが包埋される。昆虫は、冬になると餌がなくなり、また気温が低くなるため活動できない。このため、昆虫の種によって異なるが、卵・幼虫・蛹・成虫などの発育段階で休眠する。また、夏の高温時にも同様に行動をしなくなる昆虫も見られ、特にこれは夏眠と呼ばれている。この間、昆虫で増殖するウイルスは感染することができない。なぜなら大部分のウイルスの感染経路は餌などを介した経口感染であるからである。このため、昆虫で増殖するウイルスも何らかの方法で休眠しておかないとその感染性を失ってしまうことになる。そこで、昆虫ウイルスは“生存”するために多角体というタンパク質微結晶を自ら作ってその中に入り込み、感染できるチャンスを伺っているのであろうと考えられている³⁾。面白いことに、NPVとCPVの多角体を構成している多角体タンパク質 (polyhedrin) は共に分子量が約30kであるが、そのアミノ酸配列は全く異なっている。しかし、実は結晶学的には両者は非常に良く似ていることが最近分かってきた。つまり、まったく素材は異なるのにできた品物は外見的にも機能的にも非常に良く似ているという、読者泣かせの非常にややこしい

話でもある。

II. ウイルスと多角体の関係

多角体は感染後期に発現される多角体タンパク質であるpolyhedrinから構成される非常に安定なタンパク質微結晶である (図1A)。ウイルス粒子を内部に包埋し保護する役割を担っているため、微生物による腐敗や乾燥、紫外線、さらに酸性溶液や界面活性剤に対しても高い安定性を示す。一方で、アルカリ性溶液には溶解するといった特徴を持つ。ウイルス粒子を含んだ多角体を宿主昆虫の幼虫が食下すると、中腸管腔の消化液がアルカリ性であるため多角体は容易に溶解し、CPVの場合、中腸上皮の円筒細胞で増殖する。感染した細胞の細胞質で多数の多角体を産生するために、感染後期では中腸は白濁し、感染した細胞が剥がれ落ちると多角体と共に排出される。そして、他の宿主幼虫がその排出された多角体を餌と共に食下することで感染が広がる。このようにCPVは多角体に包埋されることで、外部環境下での感染力の維持と他の個体へのウイルス粒子の運搬を可能にしている。

CPVの中でも、1型に分類されるカイコサイポウイルス (*Bombyx mori cypovirus*, BmCPV) は養蚕業において有害な疫病の原因の一つである。そのため、他のCPVに比べるとBmCPVの研究は最も分子生物学的な解析が進んでいる³⁾。BmCPVは10本に分節したdsRNAセグメント (S1~S10) をゲノムに持つ。ウイルス粒子はそれぞれ、S1にコードされるVP1 (148kDa)、S2にコードされるVP2 (136kDa)、S4にコードされるVP3 (130kDa)、S6にコードされるVP4 (64kDa) そしてS7にコードされるVP7 (LPP、50kDa) の五つのタンパク質から構成される。VP1とVP3がウイルス粒子の外殻を構成する主なタンパク質であり、VP2も外殻に位置している。BmCPVがmRNAキャッピング酵素の活性とRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を持つことが分っており、VP2とVP3はそれぞれRNA依存性RNAポリメラーゼとmRNAキャッピングに関わるグアニリル転移酵素であると考えられる。

また、S10は多角体を構成するpolyhedrinがコードしている。BmCPVにはH株 (野生株)、A

株、B株、B2株、P株、C1株、C2株などが存在し、野生株とそれ以外の変異株のpolyhedrinにはそれぞれ、一つもしくは二つのアミノ酸の置換、C末端への4アミノ酸 (R-L-L-V) の付加が見られる。野生株であるH株の多角体は六面体であるが、変異株の多角体は針状、ピラミッド状、不定形などの様々な形態を示す。これらのBmCPV由来のpolyhedrinをバキュロウイルス/昆虫細胞発現系によってヨトウガ由来の昆虫培養細胞内で発現させることで多角体を産生することができる。バキュロウイルス発現系はバキュロウイルス科に属する*Autographa californica* NPV (AcNPV) のpolyhedrinプロモーター制御下で外来タンパク質を産生する発現系である。BmCPVはレオウイルス科に属しており、BmCPV由来のpolyhedrinによって作成された多角体にはバキュロウイルス粒子は包埋されず、ウイルスを含まない多角体を産生することができる。つまり、多角体の産生にはpolyhedrin以外のBmCPV由来の他の成分は必要ないと考えられる。2007年には、BmCPVの多角体の結晶構造が明らかとなった。タンパク質微結晶である多角体の単位格子は24個のpolyhedrinが会合して形成されており、格子定数は $a=b=c=103 \text{ \AA}$ あり空間群としては体心格子 (I23) に属している⁹⁾。

このように解析の進んでいるBmCPVは、一方で、多角体にウイルス粒子が包埋される機序についても明らかになりつつある。多角体へのBmCPVの包埋はウイルス粒子とpolyhedrinとの相互作用により引き起こされる。S4にコードされる構造タンパク質の一つであるVP3はウイルス表面にスパイクを形成するturret proteinである。このVP3と蛍光タンパク質であるenhanced green fluorescence protein (EGFP) の融合タンパク質をpolyhedrinとバキュロウイルス発現系によって昆虫培養細胞内で共発現させると多角体へのEGFPの取り込みが観察されることから、VP3が多角体へウイルス粒子を包埋するためのシグナルとして働くことが明らかとなった⁹⁾。

Ⅲ. 多角体へのタンパク質の固定化 (プロテインビーズの作製)

そこで、このウイルス粒子が多角体に包埋される仕組み (VP3とpolyhedrinの相互作用) を模

倣して、外来タンパク質をウイルスの代わりに多角体内に固定化する方法を開発した。VP3を付加した外来タンパク質とpolyhedrinを昆虫培養細胞に共発現させることで、細胞内で外来タンパク質の発現と共に多角体に包埋することができる。さらに、VP3のアミノ酸配列中で固定化に必要な配列を特定するために、様々なVP3断片をEGFPに付加することで解析された。その結果、1-79番目のアミノ酸配列 (79アミノ酸) が固定化に必要であることがわかった。そして、このVP3を用いた場合には多くのタンパク質が多角体に固定化できる。さらに、より短い42-93番目のVP3アミノ酸配列 (以後この配列をVP3と表記する) を目的とする外来タンパク質に付加することによっても、多角体へのタンパク質の固定化が可能であることがわかった^{6),7)}。このようにして作成した多角体は、多角体が化学的・物理的な安定性を維持する構造的な特徴を持つことから、固定化された外来タンパク質を安定に運搬できる担体として利用できる (図1B)。

さらに、2007年に2 Åという非常に高い分解能でpolyhedrinの原子構造の解明に成功した。その結果、多角体は形作されるために、まずpolyhedrinが3量体を形成し、さらに8つの3量体が会合して合計24分子からなる単位格子を形成する。多角体はこの単位格子が集まることで構築されることが分った。そして、この3量体の形成にはpolyhedrinのN末端にある α -ヘリックス (H1) が重要な役割を担っている⁹⁾。このH1同士の相互作用やH1とS1-S3ドメインに存在するチロシンクラスターとの相互作用により、polyhedrin分子間の会合や多角体の形成が生じるものと考えられる。また、アルカリ性溶液 (pH10以上) での多角体の溶解はH1とチロシンクラスターの相互作用が崩れることで引き起こされることが示唆された。つまり、H1は多角体の形成と溶解に深く関わる部位であると言える。このH1を外来タンパク質に付加することでpolyhedrinとの相互作用によって多角体に外来タンパク質を固定化できるのではないかと予想された。そこで、VP3と同様に外来タンパク質の多角体への固定化に必要な固定化シグナルとしてH1配列の有効性を調べた所、実際にH1がVP3と同様に固定化シグナルとして機能することが明らかとなった (図1B) ⁸⁾。このようにして

様々なタンパク質分子を固定化した多角体をプロテインビーズと呼んでいる。

IV. サイトカインを固定化したプロテインビーズの作製とその応用

1. FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) 固定化プロテインビーズ

サイトカインの中でも増殖因子は細胞の増殖を調節するペプチド因子であり、主にチロシン

キナーゼ受容体に結合して細胞内シグナルを伝達することが知られている。中でも線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2) は構造上の類似点からFGFファミリーに分類される。FGF受容体 (FGF receptor, FGFR) は7種類が知られているが、FGF-2は特にb型FGFR2、3以外の全てのFGFRと結合する。多様な組織がFGFRを発現しているため、FGF-2に感受性を示す組織は多い。特に、血管新生因子としてFGF-2が働くことが良く知られており、一方で、軟

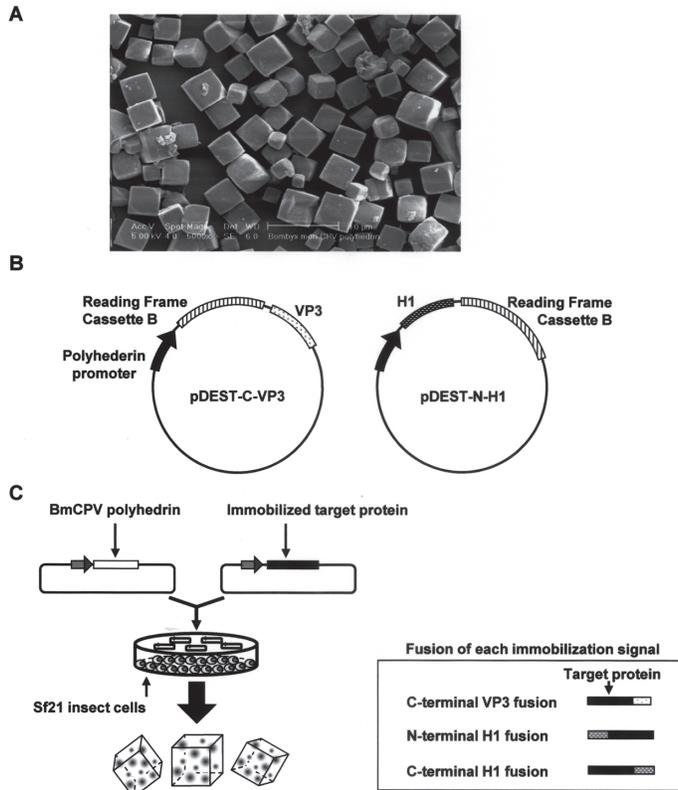


図1 多角体への外来タンパク質の固定化方法。

(A) BmCPVの多角体の走査型電子顕微鏡写真。この多角体はバキュロウイルス/昆虫細胞発現系で作製したものである。(B) Baculovirus transfer vector (pVL1392/1303) にVP3もしくはH1配列とReading frame cassette Bを挿入したDestination vector (pDEST-C-VP3, pDEST-N-H1) を作製した。このReading frame cassette BはGATEWAY™ systemにおける組換え反応に利用する。GATEWAY™ systemを用いることで目的遺伝子を挿入したbaculovirus transfer vector (pTrans-VP3, pTrans-H1) を作成した。Baculovirus transfer vectorとbaculovirus genomic DNAとの組換えにより目的タンパク質の融合タンパク質を発現する組換えバキュロウイルスを作成した。(C) 多角体への外来タンパク質固定化。得られた組換えバキュロウイルスとBmCPV由来のpolyhedrinを発現する組換えバキュロウイルス (AcCP-H(29S)) をSf21昆虫培養細胞に共感染させること、目的タンパク質と同時に多角体への固定化が可能である。

骨や骨形成、中枢神経系などでもFGF-2は多彩な機能を持つ。

また、FGF-2は細胞の増殖と分化を制御することで組織の再生や修復にも重要な役割を担っており、FGF-2の創傷治療薬としての利用も始まっている。しかしながら、このような治療薬としての利用において、FGF-2は安定性に乏しく、かつ感受性を示す組織が多いために標的組織以外にも影響を与えることが問題として挙げられる。このような問題解決のために安定性の向上とFGF-2を組織特異的に局在化させる研究は広く行われている。また、移植を目指した*in vitro*での組織培養では、血清などの異種性成分の代わりにFGF-2を始め多くの増殖因子が無血清培養に必須な因子として用いられる。しかし、その不安定性のために適時添加し続けなければならないといった問題がある。多くの増殖因子は生体内では細胞外マトリックスへの吸着・結合により活性が安定化することが知られている。FGF-2の場合はヘパリンやヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用による安定化と局在化が知られている。*In vitro*での組織培養においても、増殖因子の安定性向上と生体を模した局在性を持たせる技術が求められる。そこで、増殖因子の安定性を向上させ、局在性を与えるマイクロサイズの担体として多角体の利用を試みた。多角体に固定化させることにより増殖因子を安定化させハンドリングを容易にすると考えられる。そして、多角体上に増殖因子を配置することで局所的に活性を示すことができるかもしれない。

そこで、VP3によるFGF-2の多角体 (FGF-2/VP3多角体) とH1によるFGF-2の多角体 (H1/FGF-2多角体) への固定化を行った (図1B)。なお、多くの場合、VP3は外来タンパク質のC末端に、H1はそのN末端に入れる場合が多く、このFGF-2の場合もそれに従ってVP3はC末端にH1はN末端に付加した (図1B、C)。FGF-2/VP3多角体とH1/FGF-2多角体がFGF-2として生理活性を保持していることを調べるために、両多角体によって誘導された細胞の増殖はもちろん、以下の項目についても検討した。増殖因子によって刺激される細胞内シグナル伝達は増殖因子の受容体であるチロシンキナーゼ受容体を介したmitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン

酸化誘導が良く知られている。細胞増殖には特に古典MAPK (p44/42 MAPKまたは extracellular regulating protein 1/2、ERK1/2) のリン酸化を介するMAPKカスケードが主要な経路である。そこで、H1/FGF-2多角体によるp44/42 MAPKのリン酸化誘導についても調べた。リン酸化されたp44/42 MAPKは核内に移行し、増殖に関わる転写因子が活性化することで細胞周期を進行させる。そこで、FGF-2/VP3多角体とH1/FGF-2多角体によって誘導された細胞周期の進行に伴うDNAの合成量についても調べた。

まず、FGF-2受容体下流の細胞内シグナル伝達因子であるMAPKのリン酸化について調べた。一般的に増殖因子が受容体に結合すると受容体のチロシンがリン酸化を受ける。この受容体下流の細胞内シグナル伝達因子であるMAPKカスケードの働きにより増殖に関わる転写因子が活性化される。MAPKファミリーには4つが知られており、特に増殖因子による細胞増殖誘導にはp44/42 MAPKが深く関わることが知られており、哺乳類細胞にさまざまな増殖刺激を与える時に共通に活性化される。FGF-2/VP3多角体およびH1/FGF-2多角体、ネガティブコントロールである空の多角体 (CP-H多角体) を用いた。リン酸化されたp44/42 MAPKを検出するために、NIH/3T3細胞を使って抗リン酸化p44/42 MAPK抗体を用いた免疫染色を行った。ポジティブコントロールとして用いたrecombinant human FGF-2 (rhFGF-2) は十分にMAPKのリン酸化を誘導しており、ネガティブコントロールである空の多角体 (CP-H多角体) の添加ではMAPKのリン酸化を観察することが出来なかった。これに対してFGF-2/VP3多角体とH1/FGF-2多角体では、リン酸化誘導が確認された (図2)。

さらに、これらのリン酸化されたMAPK量は多角体量に依存するのかを調べるため、抗リン酸化 p44/42 MAPK抗体と抗p44/42 MAPK抗体を用いたwestern blot解析を行った。その結果、FGF-2/VP3多角体とH1/FGF-2多角体によるp44/42 MAPKのリン酸化誘導は多角体量に依存していることが確認でき、その量はFGF-2/VP3多角体では 1.25×10^6 個/ml、H1/FGF-2多角体ではFGF-2/VP3多角体のおおよそ半分量である 0.63×10^6 個/mlからリン酸化が誘導されることがわかった (図3)。さらに、rhFGF-2、各FGF-2多角体によ

る刺激からリン酸化されたMAPKの時間変動を調べるために、経時的にサンプルを回収してwestern blot解析を行った。その結果、全ての実験区において15分でリン酸化MAPKの量が最大に達していることが分った。また、rhFGF-2の添加ではおおよそ6時間でリン酸化されたMAPK量が減少していた。一方、各FGF-2多角体では18時間までMAPKのリン酸化を維持した。このような各FGF-2による長時間のp44/42 MAPKのリン酸化誘導は、多角体からの緩やかな徐放によって引き起こされていることが示唆された(図3)。

次に、FGF-2の刺激による細胞周期の進行か

ら引き起こされるDNA合成と細胞増殖について調べるために以下の実験を行った。まず、ATDC5を用いてDNA合成量を調べた。ATDC5は軟骨前駆細胞であり、FGF-2の結合する受容体(FGFR1, 2, 3)を発現している。そのため、FGF-2への感受性が高いと考えられるため、各FGF-2多角体によるDNA合成促進作用の測定に用いた。ATDC5を96 well cell culture plateに播種し、サブコンフルまで培養後、各因子を添加した。FGF-2/VP3、H1/FGF-2、CP-H多角体をそれぞれ各個数となるように懸濁液(0.1 - 10 × 10⁴個/well)を作成し、各多角体の添加によって誘導されたDNA合成量を調べた。また、ポジティ

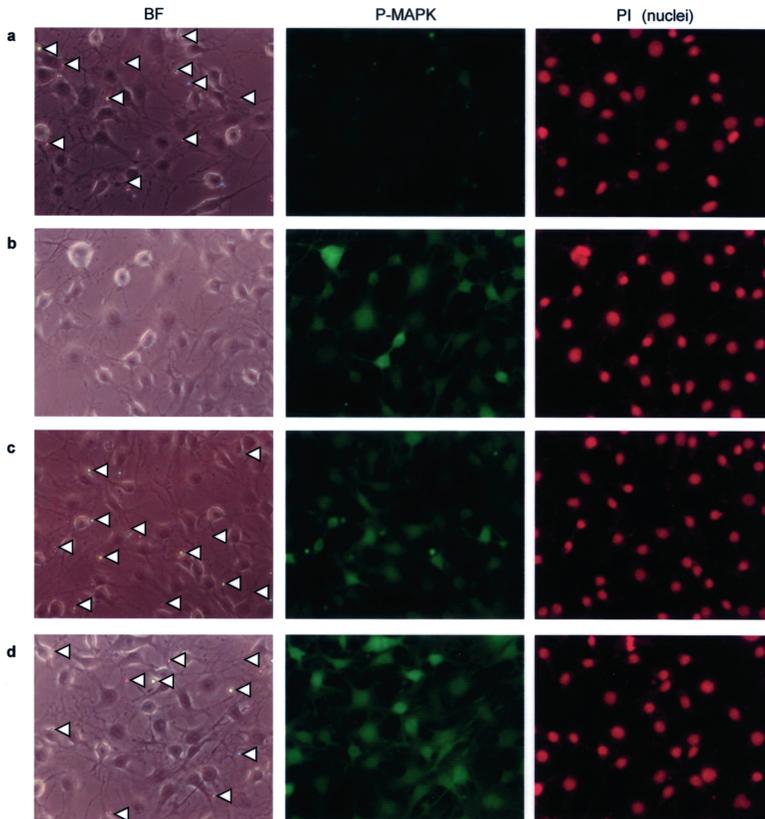


図2 FGF-2多角体によるNIH/3T3線維芽細胞のp44/42 MAPKのリン酸化。
無血清培地によって細胞周期をG1期に同調したNIH/3T3に各サンプルを添加し、p44/42 MAPKのリン酸化を誘導した。各写真はそれぞれrhFGF-2 (a, 50 ng/ml)、CP-H (b, 5 × 10⁴個)、H1/FGF-2多角体 (c, 5 × 10⁴個/ml)、FGF-2/VP3多角体 (d, 5 × 10⁴個/ml) を添加した細胞である。三角印は多角体の位置を示す。BFは明視野を示す。phospho-p44/42 MAPKは抗リン酸化p44/42 MAPK抗体を反応させ、Alexa488標識の抗ウサギ抗体で検出した。Rnase処理した細胞をPIで染色することで核のみを染色した。

ブコントロールとして6つの希釈系列(0.05-10 ng/well)に調節したrhFGF-2を用いた。各因子添加から14時間培養後、さらに4時間BrdUを取り込ませた。その後、細胞を固定化し、取り込まれたBrdU量をPOD標識された抗BrdU抗体で検出した。その結果、各FGF-2多角体は共に1 ×

10⁶個で因子を添加していない区と比べて約3.5倍のDNA合成促進活性を示した。この1 × 10⁶個のFGF-2多角体によるDNA合成量の増加は、10 ngのrhFGF-2によるDNA合成量増加に相当することが分った(図4)。また、FGF-2/VP3多角体とH1/FGF-2多角体は共に、量依存的なDNA合成

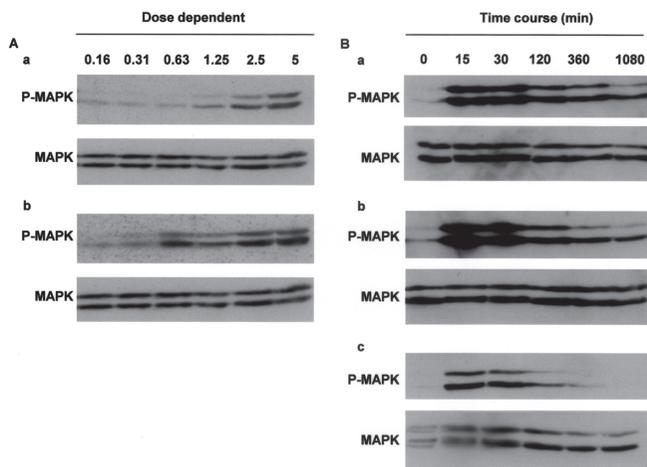


図3 NIH/3T3線維芽細胞のp44/42 MAPKのリン酸化とFGF-2多角体との関係。(A) 各FGF-2多角体の添加量に依存したMAPKのリン酸化。a, FGF-2/VP3多角体(0.16 × 10⁴個/ml - 5 × 10⁴個/ml) ; b, H1/FGF-2多角体(0.16 × 10⁴個/ml - 5 × 10⁴個/ml)。(B) 各サンプルの添加によるMAPKのリン酸化と時間経過。a, FGF-2/VP3多角体(5 × 10⁴個/ml) ; b, H1/FGF-2多角体(5 × 10⁴個/ml) ; c, rhFGF-2(50 ng/ml)。MAPK, 非リン酸化MAPK; P-MAPK, リン酸化MAPK

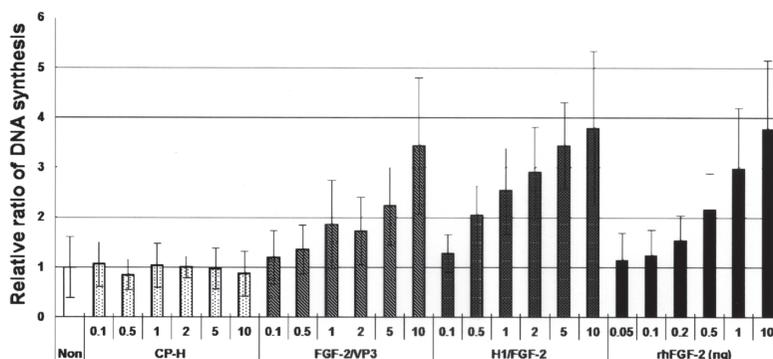


図4 FGF-2多角体によるATDC5軟骨前駆細胞でのDNA合成促進。ATDC5細胞をG1周期に同調後、各サンプルを添加し14時間培養した。その後、4時間BrdUを取り込ませることでDNA合成量を測定した。POD標識の抗BrdU抗体を反応させ、ATBS溶液(100ml)による発色(405 nm)を測定した。リファレンスとして495 nmの波長を測定した。各サンプルはそれぞれ、ネガティブコントロールとして何も添加していないNonとCP-H、そしてFGF-2/VP3多角体、H1/FGF-2多角体、rhFGF-2を用いた。各多角体の添加量(0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10)はそれぞれ0.1 × 10⁴個/well、0.5 × 10⁴個/well、1 × 10⁴個/well、2 × 10⁴個/well、5 × 10⁴個/well、10 × 10⁴個/wellを示している。ポジティブコントロールであるrhFGF-2量(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 10)はそれぞれ0.5 ng/well、0.1 ng/well、0.2 ng/well、0.5 ng/well、1 ng/well、10 ng/wellを示している。

促進活性を示していた。さらに、H1/FGF-2多角体はMAPKのリン酸化誘導に見られたように、FGF-2/VP3よりも高いDNA合成促進活性を示していることが明らかとなった(図4)。

次に、細胞の増殖が多角体量に依存して誘導されるかを定量的に調べた。細胞内脱水素酵素の活性を指標として細胞の増殖量を調べるために、cell counting kit (CCK, dojindo) を用いた。CCKの主成分であるWST-8は細胞内脱水素酵素により還元され、450 nmの吸光度を持つ水溶性ホルマザンを生成する。水溶性ホルマザンの色素量 (Abs 450 nm) は代謝活性を有する細胞数に直接比例するため、細胞の増殖を測定することができる。FGF-2に感受性を示すNIH/3T3を用いて、各多角体の添加による細胞の増殖誘導を試みた。細胞周期をG0に同調したNIH/3T3に各サンプル (CP-H多角体、FGF-2/VP3多角体、H1/FGF-2多角体、rhFGF-2) をそれぞれ添加し4日間培養した。培養中、2日毎に培地の交換を行った。rhFGF-2の実験区では培地交換毎に各濃度のrhFGF-2を新たに添加したが、各FGF-2多角体の実験区では最初に一度添加したのみであ

った。この結果、 10×10^4 個のFGF-2/VP3多角体、および、 5×10^4 個のH1/FGF-2多角体は約2.5倍の増殖促進活性を示した。rhFGF-2が約2.5倍の活性を示すためには10 ngが必要であった。もちろん、各FGF-2多角体はDNA合成促進活性の場合と同様に、量依存的な細胞増殖促進活性の上昇が見られた。これらの結果から、1 ngのrhFGF-2に相当する活性を持つ各多角体の量は、FGF-2/VP3多角体では約 7.5×10^4 個、H1/FGF-2多角体では約 1.5×10^4 個であると見積もられた(図6)。また、各FGF-2多角体は長期にわたって活性を示し、加えて4℃での保存でも、その活性が長期間安定に維持されたことから、FGF-2の安定性は多角体に固定化されることで向上しているものと考えられる。

2. FGF-7 (fibroblast growth factor-7 or keratinocyte growth factor) とEGF (epidermal growth factor) 固定化プロテインビーズ

多角体の増殖因子を運搬する担体としての利用性を追及するためには、より多くの増殖因子について多角体への固定化を試み、かつ再生医

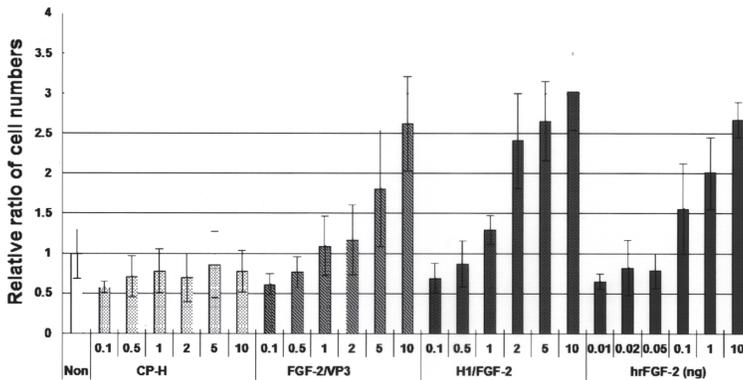


図5 FGF-2多角体によるNIH/3T3線維芽細胞の増殖促進。30%程度の播種密度となるようにNIH/3T3細胞を播種し、さらにG1期に同調した。その後、各サンプルを添加し4日間培養した。各多角体を添加したwellでは培地のみ交換した。ポジティブコントロールであるrhFGF-2を添加したwellでは培地交換の度にrhFGF-2を添加し直した。4日後、CCK溶液を加え4時間37℃、CO₂インキュベーターで反応させ、450 nmの吸光度を測定することで細胞の増殖量を測定した。各サンプルはそれぞれ、ネガティブコントロールとして何も添加していないNonとCP-H (空の多角体)、そしてFGF-2/VP3多角体、H1/FGF-2多角体、rhFGF-2を用いた。各多角体の添加量 (0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10) はそれぞれ 0.1×10^4 個/well、 0.5×10^4 個/well、 1×10^4 個/well、 2×10^4 個/well、 5×10^4 個/well、 10×10^4 個/wellを示している。ポジティブコントロールであるrhFGF-2量 (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 1, 10) はそれぞれ0.01 ng/well、0.02 ng/well、0.05 ng/well、0.1 ng/well、1 ng/ml、10 ng/wellを示している。

療への利用性が高い細胞種の培養を試みる必要性がある。そこでヒト表皮角化細胞（ケラチノサイト）の培養を試みた。

ヒト表皮は身体全体を覆う最大の組織であり、水分の透過・喪失を防ぎ、微生物の進入阻止、創傷の治癒、紫外線からの生体保護やビタミン

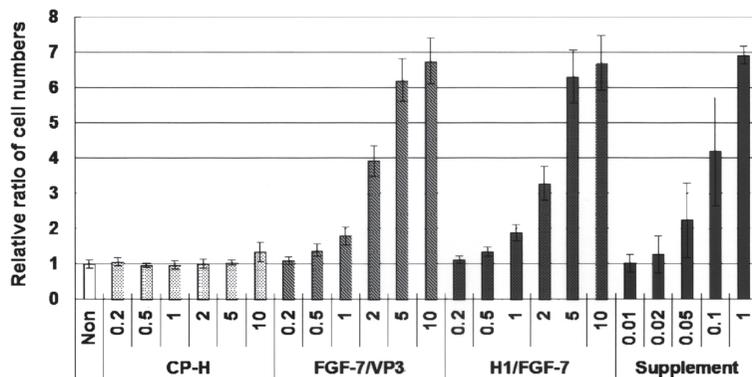


図6 FGF-7多角体によるケラチノサイトの増殖促進。

各多角体は96 well cell culture plateに各個数になるようにスポットし、風乾により貼り付けた。その後、ケラチノサイトを2500 cells/cm²となるように播種し5日間培養した。各多角体を添加したwellでは培地のみ交換した。ポジティブコントロールであるSupplement（DK-SFM付属）を添加したwellでは培地交換の度にSupplementを添加し直した。培養後CCK溶液を加え4時間、37℃、CO₂インキュベーターで反応させ、450 nmの吸光度を測定することで細胞の増殖量を測定した。各サンプルはそれぞれネガティブコントロールとしてCP-H（空の多角体）、そしてFGF-7/VP3多角体、H1/FGF-7多角体、Supplementを用いた。各多角体の添加量（0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10）はそれぞれ1 x 10³個/well、5 x 10³個/well、1 x 10⁴個/well、2 x 10⁴個/well、5 x 10⁴個/well、1 x 10⁵個/wellを示している。ポジティブコントロールであるSupplement量（0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 1, 10）は推奨された添加量を1とした希釈系列を示している。

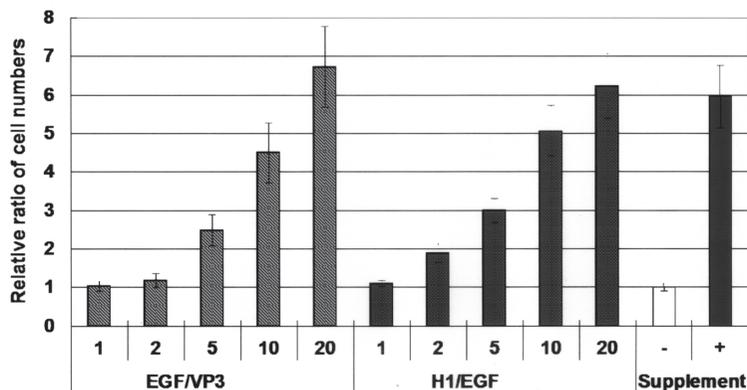


図7 EGF多角体によるケラチノサイトの増殖促進。

図6と同様に各多角体をスポットし、風乾により貼り付けた。その後、ケラチノサイトを2500 cells/cm²となるように播種し5日間培養した。5日後CCK溶液を反応させた後、450 nmの吸光度を測定することで細胞の増殖量を測定した。各サンプルはそれぞれEGF/VP3多角体、H1/EGF多角体、Supplementを用いた。各多角体の添加量（1, 2, 5, 10, 20）はそれぞれ1 x 10⁴個/well、2 x 10⁴個/well、5 x 10⁴個/well、1 x 10⁵個/well、2 x 10⁵個/wellを示している。ポジティブコントロールとしてSupplementは推奨された添加量を加えた。

Dの産生といった多様な機能を持っている。その中でケラチノサイトはヒト表皮を構成する主要な細胞種であり、表皮のおよ90%以上を占める。組織工学や再生医療といった研究領域において、このケラチノサイトの*in vitro*での培養によって移植可能な細胞シートの開発が行われている。また近年、マウスなどの実験動物を用いた研究の実施が困難であるため、創傷の治癒、紫外線や薬物への表皮の応答に関する研究においても皮膚組織を模した*in vitro*での皮膚モデル作成に注目が集まっている。ケラチノサイトの培養が多角体を用いることにより可能となれば、多角体の増殖因子を運搬するマイクロサイズのキャリアーとしての有用性を示すことができると考えられた。そこで、増殖因子を固定化した多角体を用いてケラチノサイトの培養を行い、*in vitro*での表皮モデルの開発を目指した。

ケラチノサイトが高い感受性を示す増殖因子として、FGF-7 (fibroblast growth factor-7、keratinocyte growth factor) とEGF (epidermal

growth factor) が挙げられる。FGF-7はFGF familyに属し上皮細胞に対して増殖誘導活性を示す増殖因子であり、さらにケラチノサイトが感受性を示す主な増殖因子である。

また、EGFは多くの組織において発現が確認されており、皮膚においてはケラチノサイトの増殖誘導や遊走を促進することが知られている。また、FGF-7とEGFの活性はケラチノサイトの増殖だけではなく創傷の治癒にも関わっている。多角体に固定化したFGF-2は細胞増殖を十分に誘導することができたことから、多角体が増殖因子のキャリアーとして十分に機能することが示唆された。そのため、FGF-7、EGFについても多角体への固定化後に活性を維持しているか、また、ケラチノサイトの培養に利用可能かを調べた。まず、これらの増殖因子にVP3とH1それぞれの固定化シグナルを付加することで多角体への固定化を行い、その固定化量を調べた。さらに、FGF-7多角体 (FGF-7/VP3、H1/FGF-7) とEGF多角体 (EGF/VP3、H1/EGF) の活性をケラ

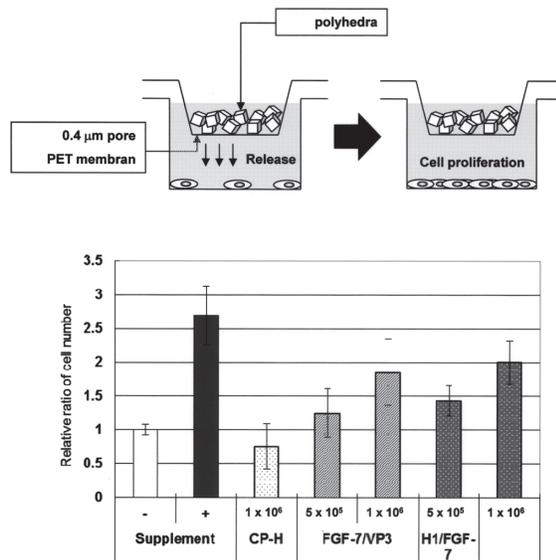


図8 FGF-7多角体からのFGF-7の徐放によるケラチノサイトの増殖誘導。多角体の隔離と徐放されたFGF-7による細胞増殖誘導の模式図(上図)。多角体から徐放されるFGF7/VP3とH1/FGF-7の効果を調べるためにcell culture insert (0.4 mm pore PET membrane) で多角体をトラップした。徐放されたFGF-7によって誘導された細胞増殖の定量的解析(下図)。FGF-7/VP3多角体とH1/FGF-7多角体はそれぞれ5 x 10⁵個/wellもしくは1 x 10⁶個/wellである。ケラチノサイト培養後、CCK溶液を反応させ450 nmの吸光度を測定することで細胞の増殖量を測定した。

チノサイトの増殖促進活性を指標にして調べた。また、生体内においては単独の増殖因子が細胞の増殖に関わるわけではなく、複数の増殖因子が協同的に細胞に作用することでその活性を示すことが知られている。既知の組換え増殖因子も複数組み合わせることで活性の相対的な上昇が見られる。多角体に固定化した増殖因子も組み合わせることで細胞に作用させることで、協同的に活性の増強が見られるのかを調べた。

まず、FGF-7多角体によるケラチノサイトの増殖誘導が可能であるかを調べるために、多角体を風乾により固着させた培養器を用いてケラチノサイトの培養を試みた。培養液として内容成分に異種性成分を含まないdefined-keratinocyte serum free medium (DK-SFM, Invitrogen) を用いた。またポジティブコントロールとして、DK-SFMに付属のsupplementを用いたが、その内容成分については公表されていない。そのために、添加するsupplement量は推奨される量を基準として、そのケラチノサイトに対する増殖促進活性と各増殖因子固定化多角体の活性を比較した。その結果、FGF-7/VP3多角体とH1/FGF-7多角体の両FGF-7多角体存在下でケラチノサイトの増殖が見られ、さらに多角体から離れた位置でも細胞の増殖が見られた。つまり多角体を用いる場合は既知の液性因子のように培地に添加する必要は無く、あらかじめ増殖因子固定化多角体を培養器に塗布しておくことで十分ケラチノサイトの培養が可能であることが分った。このような細胞増殖促進活性は多角体からのFGF-7の徐放によるものと考えられる。

さらに、ケラチノサイトの増殖に必要な各多角体の量を調べた結果、FGF-7/VP3多角体およびH1/FGF-7多角体は共に 10×10^4 個で推奨されるsupplement量と同等の活性を示した。また、その活性はFGF-7/VP3とH1/FGF-7でほとんど差は無かった(図6)。一方、EGF/VP3、H1/EGF多角体も共に同等の活性を示したが、FGF-7多角体と比較すると、supplementと同等のケラチノサイトの増殖のためには約2倍量の多角体を必要とすることが分った(図7)。生体内においては、単一の増殖因子が細胞増殖を誘導するよりも多数の増殖因子が協調的に働くことで活性の増強が起こることが知られている。FGF-7とEGFの多角体を同時に用いることで、この増

殖因子間の協調的な活性増強が見られるかを調べた。本来ならFGF-7多角体やEGF多角体単独ではケラチノサイトの増殖を誘導しない量(数)でも、FGF-7多角体とEGF多角体を混合することで、十分なケラチノサイトの増殖が確認された。このことから、サイトカイン固定化多角体をコンビネーションで使用することも重要であることがわかった。

さらに、FGF-7/VP3とH1/FGF-7多角体を0.4 mm poreのPET膜でトラップしておき、そこから徐放される各FGF-7融合タンパク質によってケラチノサイトの増殖誘導を試みた。その結果、ケラチノサイトの増殖を誘導することができた。その活性はサプリメントと比べて低いものであったが、培養基板上に貼り付けた際と同様にFGF-7/VP3とH1/FGF-7間で活性に違いはほとんど無かった。この結果から、多角体に固定化された各FGF-7融合タンパク質は一部が徐放去れており、多角体から徐放されたFGF-7によってもケラチノサイトの増殖誘導が引き起こされることが明らかとなった(図8)。

V. 終わりに

ここで述べたFGF-2多角体(プロテインビーズ)は言うまでもなく、ヒトiPS細胞の培養において未分化維持のために用いることができることが分かっている。一方、これまでにFGF-2、FGF-7、EGF以外のサイトカインとしては、血管新生を促進するvascular endothelial growth factorや血管新生を阻害するendostatin、また、骨形成を促進するbone morphogenetic protein 2 (BMP-2)、マウスES細胞の未分化維持に必要なleukemia inhibitory factorなどの多角体への固定化とその徐放化に成功している^{9,10)}。さらに、一部については腫瘍の肥大化を抑制するために血管形成阻害を目的としたendostatin多角体や顎堤再建を目的としたBMP-2多角体を用いた動物実験などを開始している。その他にもケモカインの徐放剤やこれら以外のサイトカインの徐放剤の開発にも取り組んでいる。このようにして様々なサイトカインを固定化したプロテインビーズを準備することで、今後は幹細胞から様々な細胞への分化誘導を試み、近い将来、ティッシュエンジニアリングなどに使って頂けるよう

な体制作りを心掛けたい。

参考文献

- 1) 国見裕久, 小林迪弘: 最新昆虫病理学 講談社, 2014.
- 2) Rohrmann GF: Polyhedrin structure. *J Gen Virol*, 67: 1499-1513, 1986.
- 3) Mori H, Metcalf P: Cypoviruses "Insect Virology" (Edited by Asgari S and Johnson KN) pp.307-324. Caister Academic Press, 2010.
- 4) Coulibaly F, Chiu E, Ikeda K, Gutmann S, Haebel PW, Schulze-Briese C, Mori H, Metcalf P: The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature*, 446: 97-101, 2007.
- 5) Ikeda K, Nagaoka S, Winkler S, Kotani K, Yagi H, Nakanishi K, Miyajima S, Kobayashi J, Mori H: Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4. *J Virol*, 75: 988-995, 2001.
- 6) Ikeda K, Nakazawa H, Shimo-Oka A, Miyata S, Hosokawa Y, Matsumura S, Masuhara H, Belloncik S, Alain R, Nomura N, Goshima N, Kawai A, Kuroita T, Kawakami B, Endo Y, Morigaki K, Mori H: Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. *Proteomics*, 6: 54-66, 2006.
- 7) Mori H, Shukunami C, Furuyama A, Notsu H, Nishizaki Y, Hiraki Y: Immobilization of bioactive FGF-2 into cubic proteinous micro-crystals (*Bombyx mori* cypovirus polyhedra) that are insoluble in a physiological cellular environment. *J Biol Chem*, 282: 17289-17296, 2007.
- 8) Ijiri H, Coulibaly F, Nishimura G, Nakai D, Chiu E, Takenaka C, Ikeda K, Nakazawa H, Hamada N, Kotani E, Metcalf P, Kawamata S, Mori H: Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized-cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials*, 30: 4297-4308, 2009.
- 9) Nishishita N, Ijiri H, Takenaka C, Kobayashi K, Goto K, Kotani E, Itoh T, Mori H, Kawamata S: The use of leukemia inhibitory factor immobilized on virus-derived polyhedra to support the proliferation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*, 32: 3555-3563, 2011.
- 10) Matsumoto G, Ueda T, Shimoyama J, Ijiri H, Omi Y, Yube H, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, Kinoshita Y, Arias DG, Shimabukuro J, Kotani E, Kawamata S, and Mori H: Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus. *Sci Rep* 2, 935 DOI: 10.1038/srep00935, 2012.
- 11) Matsumoto G, Hirohata R, Hayashi K, Sugimoto Y, Kotani E, Shimabukuro J, Hirano T, Nakajima Y, Kawamata S, Mori H: Control of angiogenesis by VEGF and endostatin-encapsulated protein microcrystals and inhibition of tumor angiogenesis. *Biomaterials*, 35: 1326-1333, 2014.