

# セリシンを利用した無血清培地の開発とその応用

寺田 聡

現在、哺乳類細胞培養を利用した産業が目覚ましい勢いで発展している。すなわち、抗体医薬やエリスロポエチンなどのタンパク質性のバイオ医薬品は、いわゆる翻訳後修飾の理由で哺乳類細胞培養によって生産されている。また、培養皮膚などの再生医療や、ガンに対する養子免疫（免疫細胞を体外で培養・活性化し、再び体に戻す）療法といった細胞治療の分野では、単離された有用細胞を体外で増幅・活性化する。このような目的で実施される細胞培養では、培養効率が高いことは当然のこととして、「感染の懸念のない」安全性が何より重視される。

一般に、細胞培養のための培地には、グルコースやアミノ酸といった低分子基質だけでなく、いわゆる成長因子の添加が不可欠である。成長因子にはインスリンやトランスフェリン、サイトカイン類など多数が報告されているが、これら既知因子だけでなく未知の因子も細胞培養には重要である。そのため、さまざまな因子に富む牛胎児血清を添加して培養が行われている。しかし、安全性の見地より、牛胎児血清をはじめとする哺乳類由来因子は、人畜共通感染症が懸念され、なるべく避けるべきであるとされている。特に、BSE（ウシ海綿状脳症）の発生を受けて2004年10月以降、医薬品に米国産のウシ由来原材料の使用は禁じられている。ところが、2006年6月に、中外製薬で動物細胞培養により生産しているエポジンなどの遺伝子組み換え製剤を製造する際に、誤って米国産牛の血清が用いられたため、製剤が廃棄されるに至った。これら製剤の年間売上高850億円の7%に相当する59億円分が回収対象になったという。

現在のところ豪州産牛の血清は利用可能であるが、いつBSEに類する感染症が発生しないとも限らないし、さらに上述のようなトラブルも懸念される。そのため、これら哺乳動物由来物にかわる因子の探索が求められている。

一方、安全性の高い無血清培地では細胞の増殖能が劣る、あるいはさまざまなストレスが誘因となって細胞死滅が生じやすい、といった問題点がある。また、無血清への馴化に時間を要することも問題である。すなわち、無血清培地にはまだまだ改善の余地が残されている。

われわれは、絹タンパク質セリシンに細胞増殖促進作用・細胞死抑制作用があることを見だし、その利用可

能性を検討してきた。セリシンの利点は次のとおりである。すなわち、昆虫カイコの繭（絹）由来であって哺乳動物由来でないこと、さらに絹糸は手術糸として永年の利用実績があり人体に対してある程度安全性があると考えられること、加えて、ほとんど活性を損なうことなく高圧蒸気滅菌できることから、安全性のきわめて高い因子である。セリシンはカイコ繭糸の主成分をなしており、その含量はフィブロインに次ぐ。セリシンの特徴はアミノ酸組成にあり、モル組成のおよそ1/3をセリンが占め、アスパラギン酸とグリシンがそれぞれ1/6前後である。

われわれはこれまでに、CHO細胞、HEK293細胞を含むさまざまな細胞に対するセリシンの作用を調べてきた。とくに無血清下での細胞増殖については、増殖能を持つ細胞に対して検討したところ、効果の程度に相違がみられるものの、検討したすべての細胞株に対して有効であった<sup>2,3)</sup>。

とくに、HEK293細胞についてはセリシンを用いることで、牛胎児血清を用いる場合の約2倍のアデノウイルスベクター生産を実現した<sup>4)</sup>。アデノウイルスベクターは遺伝子治療などに用いられる。

株化細胞以外には、ラット臍島細胞の体外培養にセリシンが有効なことも見いだしている<sup>5)</sup>。

## ハイブリドーマ細胞へのセリシンの作用

われわれがもっとも詳細にセリシンの作用を検討したのは、ハイブリドーマ細胞である。というのは、ハイブリドーマ細胞は有用物質（モノクローナル抗体）生産能を有しており、さらに浮遊細胞であるため、培養が容易でかつ増殖アッセイが行いやすいという長所があったからである。無血清培地の開発に際して、特にモノクローナル抗体生産に利用されるハイブリドーマ細胞を対象に、さまざまな検討を行ってきた。

まず、さまざまな市販の無血清培地にセリシンを添加し、細胞増殖を促進する作用があるかを検討した。対象として、味の素のASF104培地や日本製薬のダイゴT培地など、あわせて6種類の市販培地で検討したところ、いずれの培地でもセリシンの添加によって、細胞増殖を促進する効果が認められた。

次に、抗体生産について検討を行ったところ、いずれの培養でも抗体生産の向上が認められ、とくにダイゴT培地にセリシンを添加した場合、2.5倍まで抗体生産量が増大した。以上のように、セリシンは添加されるだけで現状の無血清培地を改善できる（図1）。

セリシンを添加すべき最適な時期はあるのだろうか。すなわち、細胞培養は次の4つの時期に分類される。誘導期、指数増殖期、定常期、死滅期である。これらいずれの時期にセリシンを添加することが有効なのか。完成した市販の無血清培地に添加する場合には、誘導期の添加では、誘導期を短縮して速やかに増殖を始める作用が認められ、指数増殖期の初期での添加では増殖速度を大きくする効果が認められる。しかしながら指数期の半ばに至ると効果は小さくなっていく。これは、指数増殖期の最中では市販の無血清培地の性能が十分高いレベルに達しており、改善の余地に乏しいことに起因すると思われる。実際、増殖速度のそれほど大きくない培地にセリシンを添加した場合には、その効果がより顕著に現れる。

そして定常期ないし死滅期に添加した場合には、増殖促進というよりも細胞死滅を抑制する効果が認められた。さらにリアルタイムPCRを用いた検討では、セリシン添加によってアポトーシス抑制遺伝子*bcl-2*の発現量が増大していた。

これらのことから、セリシンには培養の全体にわたって効果を発揮でき、その作用は培養の前半では増殖促進、後半では細胞死滅の抑制である。

### セリシンによる細胞保護効果

細胞培養においては、細胞膜の主成分である脂質が制限因子になることがしばしばみられる。脂質を培地に添

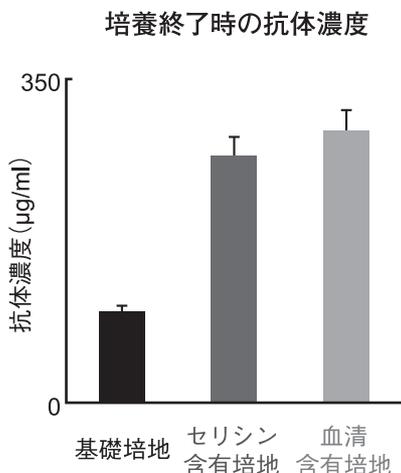


図1. ダイゴT培地へのセリシンによる抗体生産増強

加しても溶解/分散が困難であるため、同時に界面活性剤を加えられるべきであるが、界面活性剤自体に細胞毒性があるため問題である。

そこで、界面活性剤の毒性を、セリシンが緩和できるか検討した<sup>6)</sup>。アニオン、カチオン、ノニオン系の界面活性剤を検討したところ、いずれの毒性もセリシンは抑制することができた。そこで、界面活性剤の毒性に対するセリシンの細胞保護効果をさまざまなタンパク質と比較した。POEラウリルエーテル硫酸ナトリウムの細胞毒性に対してBSAやγグロブリン添加ではわずかに緩和効果が見られたが、セリシン添加は最もよく細胞毒性を緩和した（図2）。なお、アポトーシス進行の実施因子酵素カスパーゼの活性は界面活性剤の添加で上昇し、ここにセリシンを添加するとカスパーゼ活性が減少した。このことから、セリシンが界面活性剤の毒性を緩和できることが示される。

続いて、温熱の及ぼすストレスを緩和できるかを検討した。HepG2細胞を、51℃で10分間の温熱処理を行い、処理前後で生細胞数を測定したところ、無添加ではほとんど死滅（生存は6-7%程度）したのに対し、セリシン存在下ではその3倍以上、20%強の細胞が生存していた。実際の培養槽ではこれほどの異常な温度上昇は生じないと考えられるが、何らかの制御不良によってこのようなストレスが生じたとしても、セリシンによって細胞が保護されることはセリシンのもうひとつの利点であろう。

さらに、DMSOによる細胞障害からもセリシンは細胞を保護できる。DMSOは、凍結保護剤としてしばしば細胞凍結保存液に添加されるが、細胞凍結液にセリシンを添加することで、凍結解凍後の細胞の生存率が高まることも見いだしている<sup>6)</sup>。

### セリシンの作用機構

ところで、セリシンによる細胞増殖促進 / 細胞死抑制

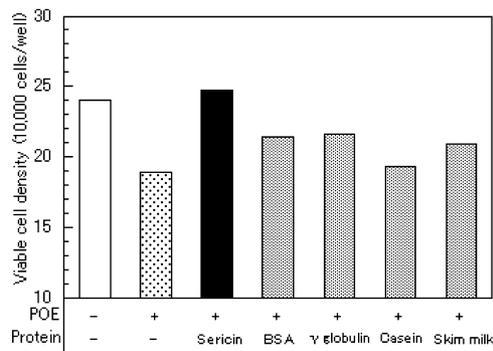


図2. POEラウリルエーテル硫酸ナトリウムの細胞毒性に対するセリシンや他のタンパク質の緩和効果

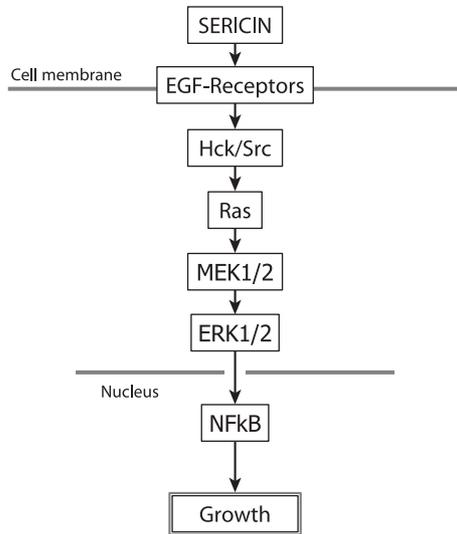


図3. セリシンの細胞増殖促進経路

は、どのような作用機構でなされているのであろうか。この解析のために、我々は、プロテオーム解析と、DNAチップ解析という二つの方向から探索を行った。

まず、プロテオーム解析によって、セリシンの細胞増殖促進機構に関与すると思われるタンパク質を2つ同定した。そしてこれら因子に対する特異的阻害剤を利用し、セリシンによる細胞増殖促進効果がこれら阻害剤によって中和されるかという検討を行った。対象として、血球系細胞であるハイブリドーマ細胞と、肝臓に由来するHepG2細胞という性格・由来ともまったく異なる細胞を、セリシンの作用機構の普遍性を確かめるために用いた。その結果、図3に示すように、セリシンによる細胞増殖促進機構には、Src経路が関与していることが示された(投稿中)。

一方、セリシンに応答して発現変化する遺伝子を解析する目的で、DNAチップを用いて解析したところ、セリシンのシグナル機構に関連していると思われる6つの遺伝子を特定できた。続いてリアルタイムPCRなどの手法で確認したところ、このうち、セリシン添加により、MAP3K5の発現消失と、myd118の発現誘導がみられた。このことから、JNKカスケードを通じてのアポトーシス抑制機構が予測された。さらに、カスパーゼ活性に対す

るセリシンの効果を検討したところ、カスパーゼ3/7の活性が約半分まで抑制されていることを見いだした。現在、詳細を解析している(投稿中)。

### 最後に

セリシンは生糸から絹糸への精練の過程で熱アルカリ処理によって除去されるもので、従来は廃棄物であった。保湿剤として化粧品に添加されるなど、セリシンの用途開発は進みつつあるが、本研究も廃棄物の再利用という観点でも有益であると考えている。また、このような熱アルカリ処理で得られたものであるため、セリシンはインタクトなタンパク質ではなく、加水分解物として得られている。このセリシン加水分解物中には、多様なポリペプチドが含まれていると考えられ、それぞれのポリペプチドが異なった作用をしていると思われる。このようなセリシン加水分解物のヘテロジニアスな産物から有効な単一のポリペプチドを同定することで一層の開発が期待される。

今後は、一層の研究により、セリシンを用いた無血清培地を実現したい。さらに、セリシン作用の機構解析を進め、この日本初の新素材の有効性/可能性をきわめていきたいと考えている。

ここで紹介した研究成果は、セーレン株式会社をはじめとする共同研究先で行われたものも含まれている。また、本研究の一部は、戦略的地域産官学共同研究(福井県、2002-2005年)、およびJST育成研究(2007-2009年)によって遂行された。なお、本研究で利用した絹由来タンパク質セリシンは、和光純薬工業株式会社より、ピュアセリシンとして市販されている。

### 文 献

- 1) 寺田 聡: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 683 (2002).
- 2) Terada, S. *et al.*: *Cytotechnology*, **40**, 3 (2002).
- 3) Terada, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 667 (2005).
- 4) Yanagihara, K. *et al.*: *Biotech. Appl. Biochem.*, **45**, 59 (2006).
- 5) Ogawa, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 217 (2004).
- 6) 柳原佳奈ら: 繊維工業研究協会報告, **16**, 49 (2006).
- 7) Sasaki, M. *et al.*: *Appl. Biochem.*, **42**, 183 (2005).