2Ka01 磁化細胞アレイを用いた細胞応答の検出

○小出 寛展¹, 松村 拓¹, 高野 翔¹, 千賀 威², 大河内 美奈¹, 本多 裕之^{1,3}
 (¹名大院・工・生物機能, ²名大院・医・腫瘍生物学, ³名大予防早期医療創成セ)

【背景・目的】細胞アレイ化技術は、細胞の機能や挙動の解析に有効な技術である。我々はこれまでに、磁性微粒子をラベル化した細胞を磁力で誘導することによってパターンニング表面に修飾や加工を必要としない細胞アレイの作成技術を開発した。この手法を用いて1細胞レベルでの細胞の挙動や形態解析、サイトカイン応答の検出に成功している。本研究では、この細胞アレイ化技術を用いてさらなる細胞挙動解析やドラッグスクリーニングへの応用を目指した。

【方法・結果】がん細胞の抗がん剤に対する応答の評価を行った。生体内環境に近づけるために三次元ECM中で作製した細胞アレイに対して、抗がん剤としてマトリックス分解酵素 MMP の阻害剤を添加し細胞挙動を解析したところ、濃度依存的な応答が評価可能であった。さらに、細胞ごとの細胞死の機構解明のため、シグナル伝達を調整すると考えられる脂質ラフトドメインのダイナミクスの観察を試みた。そこで、コレラトキシンBサブユニットを用いて脂質ラフト領域を標識し、細胞膜上での存在状態と細胞応答との関連の評価を試みた。また、このように本研究で開発した細胞アレイは細胞の伸展・増殖などの挙動やシグナル伝達などの細胞機能が1細胞で確認できるため汎用性が高い手法であると考えられる。

Detection of cellular response by using magnetized cell array

○Hironobu KOIDE¹, Taku MATSUMURA¹, Sho TAKANO¹, Takeshi SENGÅ², Mina OKOCHI¹, Hiroyuki HONDA^{1,3}
 (¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Div. Canc. Biol., Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., ³MEXT Innovative Research Center for Preventive Medical Engineering)

Key words Cell analysis, Magnetite, Magnetic force, Cell array

2Ka03 L-valine ester a novel small molecular enhancer for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells

○Chi-Hsien Liu¹, Chun-Chieh Wen¹
 (¹Graduate Institute of Biochemical and Biomedical Engineering, Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan)

Small molecule additives to cell culture media that are capable of enhancing the expression of recombinant proteins have significant utility in the production and manufacture of therapeutic protein. To identify novel small molecule enhancers of recombinant protein expression in CHO cells, we screened six amino acid esters to check their enhancing ability for the expression of recombinant proteins under the serum-free conditions. Macrophage colony-stimulating factor secreting CHO cells were used as a model cell line in this study. The esters tested include glycine-, valine-, 4-hydroxy proline-, alanine-, proline-, and serine ester. ELISA and Coulter counter were used to evaluate the M-CSF production and cell growth, respectively. Among the tested compounds, valine ester could significantly improve the 1.6-fold M-CSF production. All esters did not inhibit the growth of CHO cells at the concentration of 0.5 mM level. However, the ester exhibited an inhibition on cell proliferation at the concentration above the 5mM. The real mechanism of valine ester will be investigated by analyzing of mRNA levels to check the transcriptional activation. The results presented here provide valuable information for the production of recombinant protein drug by CHO cells.

L-valine ester a novel small molecular enhancer for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells

○Chi-Hsien Liu¹, Chun-Chieh Wen¹
 (¹Graduate Institute of Biochemical and Biomedical Engineering, Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan)

Key words Chinese hamster ovary (CHO) cells, small molecule enhancer

2Ka02 細胞特異的接着・増殖制御ペプチドの探索および評価

○蟹江 慧¹, 趙 瑛梓¹, 成田 裕司², 加藤 竜司¹, 大河内 美奈¹, 本多 裕之¹
 (¹名大院・工・生物機能, ²名大院・医)

【背景・目的】ペプチドは様々な機能を持つだけでなく生体適合性も高く、高純度かつ安価、安定供給を行うことのできる分子であり、多彩な反応が可能であるため様々な無機材料表面に合成、塗布することで生体機能性や親和性を付加させることが可能である。細胞培養において、細胞接着誘導活性を有する細胞接着ペプチドは、無血清培養への応用の点から注目されており、現在までにRGD配列など、様々な接着ペプチドの探索が行なわれている。また、再生医療の分野において、医療機器や医療材料などには、目的の細胞を目的の位置に接着・増殖させるような細胞制御が必要であり、マテリアルとしても応用可能なペプチドが現在注目されている。そこで、本研究では、各種細胞の接着・増殖を制御するようなペプチドを、アミノ酸の物理的性質を加味し、その特徴を評価することを目的とする。

【実験方法・結果】本研究では、細胞スクリーニング技術として有効な、ペプチドアレイを用いて実験を行った。ペプチドアレイは、セルロースメンブレン上に多種類のペプチドを任意に合成することが可能である。そこで我々は、数種類の細胞とペプチドとの接着・増殖を、ペプチドアレイを用いて評価した。ペプチドの選出には、アミノ酸の物理的性質を加味した3残基ペプチドを使用した。評価の結果、各種細胞に特異的な配列が20種類以上得られ、目的に応じた細胞制御の可能性が示唆された。

Screening and evaluation for controlling cell adhesion and proliferation by using peptide array method

○Kei Kanie¹, Yingzi Zhao¹, YUJI NARITA², RYUJI KATO¹, MINA OKOCHI¹, HIROYUKI HONDA¹
 (¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Sch. Med. Nagoya Univ)

Key words Peptide Array, cell adhesion, cell proliferation

2Ka04 昆虫細胞を用いた日本脳炎ウイルス様粒子の生産

高橋 裕輔, 永菅 尚, 中村 匡崇, 勝田 知尚, 〇山地 秀樹
 (神戸大院・工・応化)

【背景】日本脳炎ウイルスの表面タンパク質prMおよびEをコードする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(virus-like particles; VLPs)が形成、分泌される。VLPs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ことから、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動物細胞に対する毒性のため、生産性がきわめて低いことが課題であった。本研究では組換え昆虫細胞を作製し、日本脳炎ウイルス様粒子の生産を試みたので報告する。

【実験方法・結果】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IE1とエンハンサーHR3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prM/E遺伝子を挿入した。このプラスミドを*Trichoplusia ni*由来のBTI-TN-5B1-4 (High Five) にトランスフェクションして薬剤存在下で培養を行うことにより、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。シヨ糖密度勾配遠心分離法により培養上清を分画して分析したところ、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。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の新たな高生産プロセスを構築できる可能性が期待される。

Production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant insect cells

Yusuke TAKAHASHI, Takashi NAGASUGA, Masataka NAKAMURA, Tomohisa KATSUDA, 〇Hideki YAMAJI
 (Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words insect cell, Japanese encephalitis virus, virus-like particles, vaccine