

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05940・19K21105

研究課題名（和文）組換えタンパク質生産における染色体不安定性の利用

研究課題名（英文）Utilization of chromosomal instability in CHO cells in recombinant protein production

研究代表者

山野 範子 (Yamano, Noriko)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：20582795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然に生じて単離した高染色体数をもつCHO細胞において、生産するタンパク質量あたりに必要なmRNA量が少ないことが示唆された。また核型解析より、各染色体の平均本数を算出し、変動値の低い安定な染色体を特定した。染色体異数性を人為的に誘発し、染色体数が有意に増加したクローンを複数単離した。これらの細胞について生産試験を行ったところ、高染色体数の細胞を宿主とすると高い生産性が得られる傾向にあった。選抜した細胞株に抗体遺伝子を導入すると、変異を起こす前の細胞を宿主とした場合と比較して、IgG1抗体で約65倍、IgG3抗体で約7倍、二重特異性抗体で約33倍、三重特異性抗体で約3倍比生産速度が高くなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ医薬品を生産する各製薬企業において、CHO細胞の染色体不安定性への関心は高い。一方で、CHO細胞の染色体の安定性に着目した研究は行われているものの、染色体不安定性を積極的に活用するような研究は行われていない。一言で染色体不安定性とは言え、共通して安定な染色体が存在しており、その不安定性・安定性は染色体毎に異なることが示された。染色体不安定性を誘導、利用しつつ、発現させたい遺伝子はゲノム編集技術を用いて安定な染色体に導入することで、高生産で安定な生産株構築が可能となれば、染色体不安定性を臆することなく、むしろ積極的に利用するという選択肢が増えるのではないかと考える。

研究成果の概要（英文）：It was suggested that the amount of mRNA required per amount of protein produced was low in CHO cells with a high chromosome number isolated naturally. From the karyotype analysis, the average number of each chromosome was calculated, and stable chromosomes with low fluctuation values were identified. Next, chromosome aneuploidy was artificially induced and clones with significantly increased chromosome number were isolated. When these cells were tested for production, high productivity tended to be obtained when cells with a high chromosome number were used as a host. When the antibody gene was introduced into the obtained cell line, the specific production rate of the IgG1 antibody was about 65 times higher, that of the IgG3 antibody about 7 times higher, that of the bispecific antibody about 33 times higher, and that of the triple-specific antibody about 3 times higher than when the cell without aneuploidy induction was used as the host.

研究分野：生物化学工学

キーワード：組換えタンパク質生産 CHO細胞 宿主細胞 染色体不安定性 染色体不分離 染色体異数性 トランスクリプトーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複雑な構造を持つバイオ医薬品は、化学合成により生産することは現状では難しく、Chinese hamster ovary (CHO) を初めとする宿主細胞がその生産に用いられている。CHO 細胞は高等真核生物であり、他の主要な生産宿主細胞である大腸菌や酵母と比べて生産したタンパク質の高次構造の形成や糖鎖修飾などの高度な翻訳後修飾の点で優れており、「工業用動物細胞」として、バイオ医薬品の生産宿主細胞の中で品目数にして最も高い割合で産業に利用されている。また、ヒト由来細胞を用いる場合よりも、ヒトに有害なウイルスへの感染リスクが小さい。元々の Chinese hamster (Cricetulus griseus) の染色体は、常染色体 10 対と性染色体 2 本の計 22 本であるが、興味深いことに培養環境下における CHO 細胞の染色体は変化しやすく、培養を続けることで、自然に組換えや本数分布が生じる。この染色体不安定性は、世界的には好ましくないものとして捉えられている。

2. 研究の目的

これまでに、本数の異なる CHO 細胞を単離し、それらを宿主とした抗体発現株を構築すると、通常の本数のものよりも、染色体数の多い CHO 細胞を宿主とした場合において生産性が上がる結果を得た。染色体数の多い細胞では、外来遺伝子の挿入の機会が増加することが生産性向上の理由の一つであると考えられた一方、挿入箇所の増加を伴わない細胞でも生産性が向上する知見が得られた。また、抗体高生産株同士の細胞融合を誘導させると、コントロールには見られない幅広い異数性が観察され、中でも染色体数が少ない細胞と多い細胞が混在した、多様な染色体数分布を保持したクローン由来の細胞集団において、特に高い抗体濃度と比生産速度を示した（その中には、導入遺伝子のコピー数が増加していないクローンも含まれた）。これらの結果から、染色体の不安定性そのものが高い生産性を導く鍵ではないかという仮説を持っている。そこで本課題では、網羅的遺伝子発現解析による染色体異数性 CHO 細胞の特徴の解析、染色体数の異なる CHO 細胞の各染色体の安定性評価、安定染色体への抗体発現ベクター導入の試み、および、染色体不安定性の人為的誘導と組換えタンパク質生産に与える影響の評価を目的とした。

3. 研究の方法

CHO-DG44 細胞で自然に生じた、主な染色体数が 20 本と 39 本のサブクローン (DG44-SC20・DG44-SC39) とそれらを宿主とした IgG3 生産細胞 (IgG3-SC20・IgG3-SC39) について、RNA-seq 解析を行った。宿主細胞である DG44-SC20・DG44-SC39、または、IgG3 を生産する IgG3-SC20・IgG3-SC39 細胞で、染色体数の異なるものを比較し (DG44-SC20 vs DG44-SC39, IgG3-SC20 vs IgG3-SC39) 発現量が 2 倍以上に上昇もしくは 1/2 以下に低下している遺伝子数を検討した。また、DG44-SC20・DG44-SC39・IgG3-SC20・IgG3-SC39 の 4 種類の細胞について核型解析を行い、各染色体の安定性について評価した。さらに、CHO 細胞の各染色体に対応した物理地図を作成している CHO ゲノムライブラリーの配列情報を用いて、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムにより、安定染色体に抗体発現ベクターを導入する試みを行い、その生産性の評価を行った。次に、CHO 細胞において中心体を過剰に形成させることが報告されている Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 阻害剤 3-アミノベンズアミド (3-AB) を培地中に添加し、組換えタンパク質の発現ベクターを導入していない CHO-K1 細胞に染色体異数性を誘導した。染色体数が有意に変化したクローンを複数単離し、抗体生産細胞を構築し、生産宿主細胞としての能力を評価した。

4. 研究成果

宿主細胞である DG44-SC20・DG44-SC39、または、IgG3 を生産する IgG3-SC20・IgG3-SC39 細胞で網羅的遺伝子発現解析を行った結果、高染色体数をもつ細胞において、生産するタンパク質量あたりに必要な mRNA 量が少ないことが示唆された。染色体数の異なるものを比較し (DG44-SC20 vs DG44-SC39, IgG3-SC20 vs IgG3-SC39) 発現量が 2 倍以上に上昇もしくは 1/2 以下に低下している遺伝子数を検討したところ、IgG3-SC39 は IgG3-SC20 と比較して発現量が増加する遺伝子数よりも発現量が減少する遺伝子数が多かった。これらの発現変動遺伝子群のシグナル伝達経路について解析をした結果、染色体数の変化に伴い、増殖や分化、アポトーシスに関わる遺伝子が増減し、IgG3 生産細胞については脂質代謝やヒストン修飾に関わる遺伝子が変動した。これらの成果については、Journal of Bioscience and Bioengineering 誌に投稿し、受理された。

また、DG44-SC20・DG44-SC39・IgG3-SC20・IgG3-SC39の4種類の細胞について核型解析を行った。各染色体の平均本数を算出した結果、通常よりも染色体数の多いDG44-SC39とIgG3-SC39の両方で、2番、5番、6番、10番染色体の増加率が偏差値で50以上あり、染色体数が増えやすい傾向にあった。また平均本数の変動係数を算出した結果、1番から6番染色体の変動係数の値が低い傾向にあり、7番から10番染色体、X染色体と比べて安定だと考えられた。CHO細胞の安定染色体に抗体発現ベクターを導入する試みを行ったところ、染色体上の不特定の位置に導入する場合と比較して、高い生産性をもつセルプールを得ることができた。しかし、安定染色体由来の配列にベクターが導入されている細胞が確認できたものの、遺伝子ターゲティングを行った影響から複雑な転座を起こしており、中でも最も高い生産性を示したクローンは目的位置に遺伝子が挿入されていなかった。

次に、CHO細胞において中心体を過剰に形成させることが報告されているPoly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) 阻害剤3-アミノベンズアミド(3-AB)を培地中に添加し、組換えタンパク質の発現ベクターを導入していないCHO-K1細胞に染色体異数性を誘導した。最終濃度10mM、72時間の処理において染色体数分布の多様性が生じ、染色体数が有意に増加したクローンを複数単離することに成功した。一方で、低染色体数をもつ細胞は単離できなかった。取得した高染色体数の細胞を宿主細胞として外来遺伝子を導入すると、導入される外来遺伝子のコピー数が高くなる傾向がみられた。これらの細胞について生産試験を行ったところ、高染色体数の細胞を宿主とすると、高い生産性が得られる傾向にあった。次に、GFPの発現ベクターを一過的に発現させ、そこからGFPの発現強度が高くなるクローンを選択した。取得したクローンに抗体遺伝子を導入し、難発現性のものを含む複数種類の抗体についてそれぞれ安定発現細胞を構築したところ、変異を起こす前のCHO-K1細胞を宿主とした場合と比較して、IgG1抗体で約65倍、IgG3抗体で約7倍、二重特異性抗体で約33倍、三重特異性抗体で約3倍、比生産速度が高くなる結果を得た。また、染色体異数性誘発による宿主細胞の染色体数の増加が、生産する抗体(IgG1)の糖鎖構造に影響を及ぼさないことを確認した。これらの取得したクローンについて網羅的遺伝子発現解析を行い、高生産性となるクローンで共通して発現量が高い遺伝子を295個同定した。今後、これらの遺伝子についての解析を行うことで、高生産宿主細胞となり得る要因の解明が期待される。得られたこれらの結果については、近々学術雑誌で発表をする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Noriko Yamano-Adachi, Norichika Ogata, Sho Tanaka, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa	4. 巻 129
2. 論文標題 Characterization of Chinese hamster ovary cells with disparate chromosome numbers: Reduction of the amount of mRNA relative to total protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 121-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.06.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jun Ho Lee, Wataru Tanaka, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa	4. 巻 14(Suppl 5)
2. 論文標題 The effect of telomere sequences on chromosomal translocations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Proceedings 2020	6. 最初と最後の頁 16-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12919-020-00188-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山野-足立 範子	4. 巻 52
2. 論文標題 組換えタンパク質生産における染色体不安定性の利用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」2020年7月号 特集 染色体医工学	6. 最初と最後の頁 39-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 畑展史, 中西悠人, 田中航, 古賀雄一, 山野-足立範子, 大政健史
2. 発表標題 IgG生産細胞株構築における異数性CHO細胞の人為的誘導の効果
3. 学会等名 化学工学会第85年会 (紙面開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五百井風香, Christopher Quach, 山野-足立範子, 古賀雄一, 大政健史
2. 発表標題 ゲノム安定化を目指したCHO細胞におけるp21/p53遺伝子の機能解析
3. 学会等名 化学工学会第85年会 (紙面開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畑展史, 中西悠人, 田中航, 古賀雄一, 山野-足立範子, 大政健史
2. 発表標題 IgG生産細胞株構築における異数性CHO細胞の人為的誘導の効果
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五百井風香, Christopher Quach, 山野-足立範子, 古賀雄一, 大政健史
2. 発表標題 ゲノム安定化を目指したCHO細胞におけるp21/p53遺伝子の機能解析
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirofumi Hata, Yuto Nakanishi, Wataru Tanaka, Yuichi Koga, Noriko Yamano-Adachi, Takeshi Omasa
2. 発表標題 Establishment of IgG1 producing Chinese hamster ovary cells with the same vector integration site and number and with different chromosome number distribution between the sub-clones
3. 学会等名 The 33rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2020 Fuchu) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Ho Lee, Wataru Tanaka, Noriko Yamano, and Takeshi Omasa
2. 発表標題 The effect of telomere sequences on chromosomal translocations
3. 学会等名 The 26th ESACT Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuto Nakanishi, Wataru Tanaka, Noriko Yamano-Adachi, Hirofumi Hata, Yuichi Koga and Takeshi Omasa
2. 発表標題 Analysis of antibody productivity among Chinese hamster ovary cells constructed by Crispr/Cas9-mediated sitespecific integration
3. 学会等名 Asian Congress on Biotechnology 2019 (ACB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Yamano, Norichika Ogata, Yuan Shan Lai, Sho Tanaka, Wataru Tanaka, Yuichi Koga, Takeshi Omasa
2. 発表標題 Characterization of CHO cells with disparate chromosome numbers and induction of artificial aneuploidy cells
3. 学会等名 The 31th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2018 Tsukuba) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuma Kita, Noriko Yamano, Yuichi Koga, and Takeshi Omasa
2. 発表標題 Analysis of chromosomal diversity in CHO cell lines for establishment of stable highly-productive cell line in recombinant therapeutics production
3. 学会等名 The 24th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Ho Lee, Wataru Tanaka, Noriko Yamano, and Takeshi Omasa
2. 発表標題 Analysis of the interstitial telomeric sequences (ITs) and chromosomal translocations in <i>Cricetulus griseus</i> -derived cells using FISH
3. 学会等名 The 24th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------