

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890114

研究課題名（和文）高性能人工染色体ベクターを用いた抗体医薬産生システムの開発

研究課題名（英文）Development of the antibody drug production system using a highly efficient artificial chromosome vector.

研究代表者

西田 直史（NISHIDA TADASHI）

鳥取大学・染色体工学研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：50588556

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、抗体医薬製造コストの削減を目指し、導入遺伝子の長期的安定発現が可能な人工染色体ベクターを用いて、細胞あたりの抗体産生量を飛躍的に増加させ、抗体医薬産生細胞の品質を安定させることができる技術の開発を試みた。

人工染色体ベクターに医薬候補遺伝子を導入し、培地中の目的蛋白質を測定したところ導入遺伝子数依存的に産生量が増加した。今後、導入遺伝子数を増幅させることができるシステムを利用して、更なる収量の増加を目指す。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried development of the technology which can increase the amount of antibody production and stabilize the quality of antibody drug production cells using the artificial chromosome vector (which enable long-term stable expression of transgenes) to reduce the cost for antibody-drug production in industry.

When we introduced the medicine candidate gene into the artificial chromosome vector and measured the purpose protein in a culture medium, the amount of production increased to the number of transgenes.

For the future, we continue the study to increase the amount of production using gene amplification system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,270,000	681,000	2,951,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：抗体医薬、人工染色体

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品には治療効果の高い次世代医薬品としての期待が高まっており、世界中で創薬開発研究が急速に進められている。一方で、

抗体医薬の開発・製造には多額の費用を必要とすることから薬価が高いという課題を抱えている。治療効果の高い抗体医薬が医療格差なく多くの人に供給され広く利用される

ためには、抗体医薬開発・製造のための新技術を開発し、コストを削減することが必要である。

新技術開発には、高い遺伝子導入効率、導入遺伝子の長期安定発現、複数遺伝子の導入が可能な人工染色体ベクターを利用する。

2. 研究の目的

人工染色体ベクターを用いて、細胞あたりの産生抗体量を飛躍的に増加させ、さらに抗体医薬産生細胞の品質を安定させることができる技術を開発し、抗体医薬製造コストの削減を目指す。具体的には、(1)抗体医薬産生用に用いられる齧歯類由来細胞内で安定な人工染色体ベクターに遺伝子導入プラットフォームを搭載、(2)導入遺伝子の発現を安定させるために既知及び新規インシュレータ配列をベクターに搭載し、その効果を比較し適当な配列を決定、(3)導入遺伝子のコピー数の任意に増幅させて、産生量の増加をはかる。

3. 研究の方法

(1)抗体産生型人工染色体ベクター構築：

共同研究者により開発され CHO 細胞内に保持された新規人工染色体ベクターに、複数の遺伝子導入部位を配置した遺伝子導入プラットフォームを Cre-loxP システムを用いて搭載する。得られた細胞の遺伝子導入部位に動作確認用遺伝子（蛍光タンパク質）を一つずつ導入し、PCR、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 及び蛍光顕微鏡観察を実施し、その動作と導入効率を評価する。

(2)インシュレータ配列の比較：

共同研究者から提供された新規インシュレータ配列 A を人工染色体ベクター上に導入し、その遺伝子安定性を既知のインシュレータ (cHS4) と比較する。また併用によりその効果を向上させられるか検証する。導入遺伝子の安定性は、人工染色体ベクターに分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、培養培地を用いたルシフェラーゼアッセイによって評価する。

(3)人工染色体ベクターでの産生量の評価：

人工染色体ベクターに医薬候補遺伝子を導入し、その産生量を評価する。またプロモータや導入遺伝子数を変えて、産生量に影響があるか検証する。

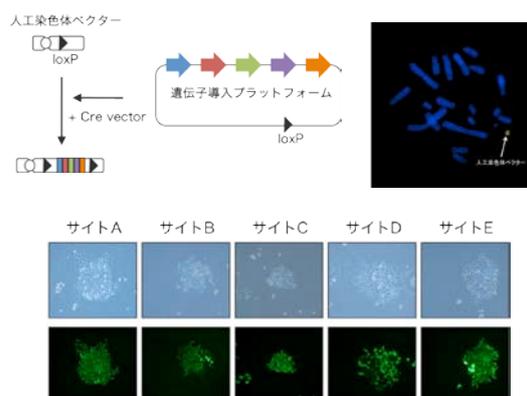
さらに、遺伝子増幅法が確立している細胞株 DG44 CHO に人工染色体ベクターを移入し、導入遺伝子数の増幅を試みる。

4. 研究成果

(1)抗体産生型人工染色体ベクター構築：

Cre-loxP システムを用いて、人工染色体ベクターに遺伝子導入プラットフォームを搭載

した。遺伝子導入プラットフォームはインテグレースの使い分けによって、目的の組換え部位に遺伝子を導入することができる。PCR 及び FISH 解析を実施し、適当なクローンを得た。この細胞の遺伝子導入プラットフォームにそれぞれのインテグ्रेस発現ベクターと蛍光タンパク質遺伝子を共導入し、部位特異的な遺伝子導入が可能か検討したところ、5 カ所の部位に特異的に遺伝子導入できた。導入した蛍光タンパク質の発現レベルはクローン内で比較的均一であり、宿主染色体上にランダムに遺伝子を導入する方法との差が明らかとなり、人工染色体ベクターの導入遺伝子の安定発現が確認できた。



(2)インシュレータ配列の比較：

既知インシュレータ cHS4 と新規インシュレータ A をそれぞれ導入したベクターと両方を導入したベクターを構築した。

導入遺伝子のコンストラクションには、複数フラグメントを効率よく 1 ステップで目的部位に導入できるキットを使用したが、cHS4 及び両方を持ったベクターにおいて、組換え効率が低く、目的のベクターを取得することが困難であった。そこでインシュレータを持っていないベクターを作製し、そのベクターでコンストラクションした後インシュレータを持つベクターに入れ直す方法をとった。その結果、3 通りのインシュレータ配列を持つベクターが構築できた。

このベクターを人工染色体ベクターにインテグ्रेस発現ベクターと共導入した。しかしながら、ベクターのコンストラクション同様、cHS4 及び両方のインシュレータを持つプラスミドにおいて組換え効率が低く、目的のクローンを得ることが困難であった。

導入試験を繰り返し、目的クローンを取得することができたが、導入効率の向上が今後の課題として浮き彫りとなった。

得られた細胞を用いての導入遺伝子安定性評価実験は、細胞取得に時間がかかってしまいデータをそろえられなかったが、共同研究者から現在利用している CAG プロモータより、サイレンシングを受けやすいプロモータ

(CMV 等) に変えた方が明確な差が出るのではとの助言を受けそのコンストラクションを作製中である。

(3)人工染色体ベクターでの産生量の評価：

インシュレータの比較実験に必要な細胞の作製に時間がかかったため、適当なインシュレータ配列の選定ができなかったが、新規インシュレータ配列を用いてタンパク質産生細胞を作製した。

本件実験においては、CAG プロモータを用いて目的のタンパク質を産生させ、目的遺伝子 1 コピーあるいは 2 コピーを人工染色体ベクター上に搭載した細胞を作製し、それぞれのタンパク質産生量及びその活性を比較した。

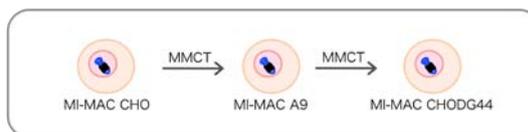
人工染色体ベクターに複数の遺伝子を導入する場合、1カ所ずつ導入するよりも2カ所同時に導入できた方が細胞作製にかかる時間を短縮できるため、2カ所同時導入条件を検討した。選択マーカーとして、G418 及びブラストサイジン S を用いた。遺伝子導入後、2つの薬剤を含む培地で培養した結果、多くの耐性クローンを得ることができた。それら耐性クローンをバルクで FISH 解析したところ、目的の遺伝子が人工染色体ベクター以外の部位に導入されたものがほとんどであり、人工染色体ベクター自体も宿主染色体へ転座したり、アンプリファイしている像が確認できた。複数遺伝子を同時に目的部位に 1 コピー導入できる技術が確立できれば、本技術の強力な PR ポイントとなる。

今回は、同時導入法の確立に至らなかったため、1カ所ずつ目的遺伝子を人工染色体ベクターに搭載した。

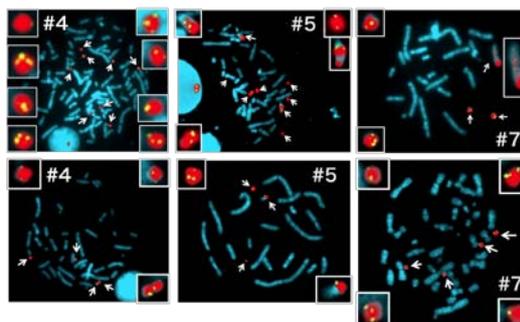
タンパク質の発現量及び活性は 1 コピーのものより 2 コピーの方が有意に高く、クローニングした細胞を FISH 解析したところ、人工染色体ベクターの保有率が高く、人工染色体ベクター以外の場所に遺伝子が導入されていないクローン程高産生となる傾向が示された。

コピー数依存的な産生量の増加が確認できたので、導入遺伝子数を飛躍的に増幅させるために、人工染色体ベクターを葉酸デヒドロゲナーゼ欠損株である DG44 CHO 細胞に移入し、メトトレキサートを用いた遺伝子増幅法を利用することとした。

まず、CHOK1 細胞内に保持された人工染色体ベクターを微小核細胞融合法により、マウス A9 細胞へ移入した。次に、その A9 細胞から DG44CHO 細胞へ染色体を移入し、人工染色体ベクターを保持した DH44 細胞を取得した。



しかしながら、得られた人工染色体ベクター保持 DG44 細胞を FISH 解析したところ、複数の人工染色体ベクターが細胞内に保持されていたり、転座、増幅した人工染色体ベクターが多く存在した。CHOK1 細胞内では見られない減少であるため、DG44 細胞の特徴に起因することが予想される。現在、選択薬剤濃度の検討等を行い原因の究明を進めている



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 11 件)

1. 西田直史、吉村裕貴、佐々木勝崇、中島芳浩、押村光雄、大林徹也、人工染色体ベクターを用いた好感度毒性評価の作成、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日 - 19 日 (発表確定)、仙台国際センター (宮城)

2. T. Nishida, Y. Yoshimura, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, T. Ohbayashi, N. Tanaka and M. Oshimura, APPLYING A HUMAN ARTIFICIAL CHROMOSOME VECTOR TO DEVELOP A HIGH-SENSITIVE BIOSENSOR CELL AS IN VITRO RISK ASSESSMENT METHOD, 2012 Society of Toxicology Annual Meeting, March 15, 2012, Moscone convention center, San Francisco (USA)

3. T. Nishida, Y. Yoshimura, K. Sasaki, Y. Nakajima, R. Saito, Y. Kazuki, S. Nishii, Y. Ohmiya, S. Aiba, M. Oshimura and T. Ohbayashi Development of a high-sensitivity toxicity test system using chromosome engineering and bioluminescence technology, 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、パシフィコ横浜 (神奈川)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：マウス人工染色体ベクター

発明者：押村光雄、香月康宏、滝口正人、松岡隆之

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2011/050490

出願年月日：2011年1月6日

国内外の別：国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 直史 (NISHIDA TADASHI)

鳥取大学・染色体工学研究センター

プロジェクト研究員

研究者番号：50588556

(2) 連携研究者

押村光雄 (OSHIMURA MITSUO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20111619

大林徹也 (OHBAYASHI TETSUYA)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号：80348804

香月康宏 (KAZUKI YASUHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90403401