

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656530

研究課題名（和文）CHO細胞における山中因子によるリプログラミング

研究課題名（英文）The effect of expression of Yamanaka factors on CHO cells

研究代表者

大政 健史（OMASA TAKESHI）

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：00252586

研究成果の概要（和文）：山中因子と呼ばれる4因子の導入によって、様々な生体由来体細胞からiPS細胞を作製することが可能となった。本研究は、蛋白質医薬品生産に多用されているCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞にこれらの因子を導入し、構築した細胞の形質を検討した。マウス由来*Oct3/4*、*Klf4*、*Sox2*をCHO細胞に遺伝子導入し、発現レベル上昇を確認した。構築した細胞においては、細胞形状、比増殖速度の変化は見られず、これらの因子の導入によって細胞の形質は変化しないと推定された。

研究成果の概要（英文）：Introduction of four factors, which are called Yamanaka factors, could construct induced pluripotential stem (iPS) cells from somatic cells. In this study, we introduce these factors into Chinese hamster ovary (CHO) cells which are workhorse for biopharmaceutical production and investigated the characteristics of these CHO cells. By introducing of mouse *Oct3/4*, *Klf4*, and *Sox2* factors, we constructed CHO cells which over-expressed these factors. The specific growth rate and morphology of constructed cells were not affected by introduced factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，生物機能・バイオプロセス

キーワード：CHO細胞，山中因子，リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオ医薬品の世界的な潮流と産業生産における問題点

抗体医薬品を始めとする蛋白質医薬品は現在の世界の医薬品産業の成長エンジンとなり、その重要性はますます高まっている。蛋白質医薬品の開発における大きなボトルネックは生産細胞の構築であり、如何に安定でかつ、高性能・高品質な生産細胞を構築するか、は産業上大変重要な課題となっている。細胞株構築における大きな問題点の一つは、発現レベルの安定性である。細胞株に外来蛋

白質遺伝子を組み込むと、その直後はその発現レベルが高く維持されているが、この発現レベルは数日で急激に低下し、さらに世代を経るに従って、徐々に発現レベルが低下する。産業応用には、多数の細胞株の中から、できるだけ発現レベルが低下しない細胞株を選択して用いているのが現状であるが、近年、これらの発現レベルの低下原因が、エピジェネティック機構に基づく転写抑制であることが判明してきた。

(2) 発生再生における細胞の分化制御におけるエピジェネティック機構

哺乳類の個体発生はたった 1 個の細胞が 200 種類もの多様な細胞に分化する。この分化過程において遺伝情報は同一であり、細胞の個々の特性は塩基配列の変更を伴わない「エピジェネティック機構」と呼ばれる染色体 DNA に対する一連の修飾機構（メチル化、ヒストンリン酸化、アセチル化、SUMO 化等）により発現調節されることが近年明確にされつつある。

(3) 産業応用における問題点解決に向けて

我々のグループでもチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に外来遺伝子を組み込む際にエピジェネティックによる転写抑制をブロックするインスレーター配列を CHO 細胞から新規に単離し、これを用いた発現系を構築し、論文、特許化、企業に導出している。CHO 細胞は、現在バイオ医薬品の生産に用いられている宿主動物細胞としては最も汎用されている細胞であり、欧州・米国・日本の ICH に関わる三極においても、バイオ医薬品の宿主細胞として大腸菌に次いで品目数ベースで多くの種類の医薬品の生産宿主となっている。この CHO 細胞における生産上の安定性は、現在重要な課題となっているが、その生産性に影響する因子として、我々は(1)染色体自身の分布と不安定性、(2)エピジェネティックを始めとする後天的修飾による発現低下の大きく 2 つの機構が関わっていると考えている。これらの安定性は、マスターセルバンク (MCB)、ワーキングセルバンク (WCB) を構築し、産業レベルでの物質生産を行うためには、検討が欠かせない項目であり、少なくとも WCB から始まり、数千 L という大規模生産にまでその生産性を持続させるだけの世代時間の間、安定に高生産を保つ必要がある。これらの安定性の検討には、実際に細胞を長時間にわたって培養して検討を行う必要となり、生産株の迅速構築におけるボトルネックの一つとなっている。

induced pluripotent stem (iPS) 細胞作製に用いられた山中因子と呼ばれる 4 つの転写因子の導入は、分化した体細胞を全てリプログラミングし、初期胚に近い状態に戻す（「初期化」する）ことができる。これはまさに後天的に獲得した発現抑制を解除する機構であり、我々は、この手法を CHO 細胞に応用すれば、遺伝子を組み込んでも高発現状態を維持できる細胞が構築できる可能性があると考えている。山中因子は初代細胞をリ

プログラミングする目的にて利用されているが、産業応用されている細胞株に対して用いられた例は全くない。もし、この仮説が実証されれば、まさに多能性を持った蛋白質生産用の産業細胞が構築でき、長期にわたる細胞の評価を経なくても安定に高生産を保つことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、山中因子と呼ばれる Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の 4 因子を CHO 細胞に導入することにより、リプログラミングされた CHO 細胞を構築することを最終目標として、これらの因子導入が細胞の形質にどのような影響を与えるのかを検討することを目的とする。すなわち、①4 遺伝子のうち、どの遺伝子を CHO 細胞に導入することにより、効果がみられるかを検討し、②次に、選択した候補遺伝子の導入によるこれらの因子の高発現 CHO 細胞の構築、さらに、③構築した細胞の形質評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

実験に用いた細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)由来の細胞株の CHO K-1 細胞株を選択した。

(2) 発現ベクター構築

pEB Multi-Hyg ベクターを基に、addgene 社の pCX-OKS-2A から山中因子である OKS を切り出し組み込むことで導入ベクターを作製した。pEB Multi ベクターは、遺伝子発現ベクターとして主に霊長類(ヒト、サル)、イヌなどの細胞に導入することができる Episomal 型ベクターである。Episomal 型とは、Epstein-Barr Virus (EBV) 由来の複製起点 OriP と EBV Nuclear Antigen 1 (EBNA1) 遺伝子の働きにより、遺伝子導入細胞中において Plasmid が細胞分裂後の娘細胞に分配される性質を持つ。本ベクターを用いることにより、染色体に組み込まれることなく、遺伝子発現を行うことが可能となる。本研究では、マウスの Oct3/4、Klf4、Sox2 の 3 遺伝子が組み込まれている pCX-OKS-2A ベクターより、3 因子配列を切り出し、これを pEB Multi-Hyg ベクターに組み込むことにより、発現ベクターを構築し、CHO 細胞にトランスフェクションを行い、得られた細胞の形質を検討した。

(3) 構築した細胞の形質評価

構築した細胞の形質を評価するために、RT-PCR 法を用いて導入した目的遺伝子の発現を解析した。本導入ベクターは OKS の 3 因子が連結した mRNA が形成されるため、下記のプライマーを用いて遺伝子発現を評価した。

・使用プライマー

Primer	Sequence
Mouse Oct3/4 Primer_fwd	5'-CAGGCCCGGAAGAGAAAGCGAA-3'
Mouse Sox2 Primer_rev	5'-CGGGTGCTCCTTCATGTGCAGA-3'

構築した細胞の細胞増殖については回分培養によって、その細胞増殖を評価した。細胞濃度測定は、Vi-Cell XR オートアナライザーを用いて測定し、細胞直径も評価した。また、細胞濃度の経時変化より比増殖速度を以下の式を用いて算出した。

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu X_v$$

$$\ln(X_t) = \mu \int \left(\frac{X_v}{X_t}\right) dt + \ln(X_t)_0$$

ここで μ は比増殖速度、 X_v は生細胞濃度、 X_t は全細胞濃度を表している。生残率の積分値と全細胞濃度の対数値をプロットすることにより、比増殖速度を算出した。また、同様の手法を用いてバイオセンサ BF-7S/D とオートサンブラ BF-30AS を用いて測定したグルコース、乳酸についても比消費・生産速度を算出した。

4. 研究成果

(1) 導入因子選択

まず、山中 4 因子それぞれのアミノ酸配列についてヒト、ラット、マウスと CHO 細胞を比較した。その結果、それぞれの機能ドメインについては、マウスと CHO 細胞由来 4 因子のアミノ酸配列は非常に高い相同性を有しており、マウス由来因子を導入しても十分に CHO 細胞において機能する可能性が高いと判断した。

これまでに、山中因子と呼ばれる Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の 4 因子の導入によって、様々な生体由来体細胞から iPS 細胞を作製することが可能となっている。これら 4 因子のうち、c-Myc に関しては、細胞の無限増殖能

を誘導する機能が主たるものであり、すでに無限増殖能を獲得している CHO 細胞株においては、c-Myc を導入してもあまり形質の変化がないという報告もあり、c-Myc 以外の 3 因子 (Oct3/4、Klf4、Sox2) を導入することにより、細胞の形質に及ぼす変化を検討することとした。

(2) CHO 細胞株への遺伝子導入

pEB Multi-Hyg ベクターおよび pCX-OKS-2A ベクターを用いて構築したベクターを用いて、CHO K-1 株にマウス OKS を、X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent によって、リポフェクション法を用いて導入した。

導入に際しては、構築したベクターならびに、これらの因子を含まない Mock ベクターの 2 種類を導入し、比較した。薬剤選択の結果、pEB Multi-Hyg ベクターを導入した細胞株はいずれも Hygromycin 耐性を得たことが確認できた。

さらにゲノムより抽出した RNA を用いた RT-PCR の結果、OKS 導入株において OKS 発現レベルが上昇していることが確認できた。

(3) 構築した導入 CHO 細胞株の形質評価

CHO K-1 細胞が iPS 様細胞化した場合、細胞増殖が接着性から浮遊性に変化することが予想されたが、通常の培養ディッシュで培養した OKS 導入株も浮遊化せずに接着増殖し、細胞形状を含めて変化は見られなかった。そこで、得られた細胞について回分培養を行い、構築した細胞の形質を評価した。

まず、Vi-Cell XR オートアナライザーを用いて構築した細胞の直径を測定した結果を下記に示す。ここに示すように、構築した細胞株間において、細胞サイズの顕著な差はみられなかった。

表 構築した細胞株の細胞直径

細胞株	細胞直径 (μ m)
CHO-K1 株	14.23 \pm 2.05
OSK 導入株	14.62 \pm 2.42
Mock 導入株	14.55 \pm 2.32

次に、構築した細胞株を用いて 150 時間にわたる細胞培養を行い、その経時変化から比増殖速度を算出した。その結果を下記の図に示す。

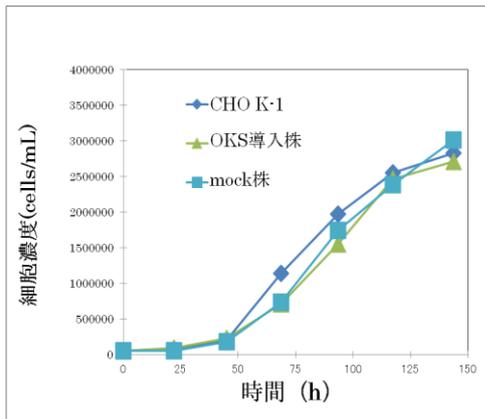


図 回分培養における細胞濃度の経時変化

この結果に基づいて比増殖速度を算出した結果、構築した細胞株において顕著な差はみられず、OKS 導入は CHO 細胞に対して、形態および増殖に影響を与えないと結論づけられた。また、回分培養時におけるグルコース比消費速度、乳酸比生産速度についても同様に評価を行った結果、顕著な差はみられなかった。以上をまとめると、山中因子と呼ばれる 4 因子のうち、OKS3 因子の導入によっては、それぞれ発現した因子は細胞の増殖ならびに代謝、形態には影響を及ぼさないという結果が得られた。細胞の増殖速度低下や、代謝の低下、さらには形態を変化を引き起こす手段は、実際の生産細胞株構築に利用するには大きな問題となる。いくら高発現を持続可能な細胞を構築できても、増殖速度の低下を招く手法は実際の生産細胞株構築に利用されることは無い。この 3 因子を発現させた CHO 細胞が元の CHO-K1 細胞と増殖速度、代謝、形態が変化しないということは、産業レベルでの宿主細胞構築に応用できる可能性が示唆されたと言えよう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① 鬼塚正義、白井昭博、大政健史、糖タンパク質生産における翻訳後プロセスの解明と制御 (バイオ医薬製造技術シリーズ)、PHARM TECH JAPAN、査読無、Vol. 28、No. 5、2012、pp. 949-954

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 大政健史、CHO 細胞のゲノム解明のもたらすもの、Perkin Elmer 75 周年記念イベント for the Better Forum 012、2012. 11. 15、六本木アカデミーヒルズ 49 (東京都)

- ② 大政健史、バイオ医薬品生産におけるプロダクションサイエンス (シンポジウム「実用化に資する医薬品生産技術の課題と展開—抗体医薬品から細胞医薬品まで—」)、第 64 回日本生物工学会大会、2012. 10. 24、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ③ Takeshi Omasa、Chromosome heterogeneity and rearrangement of CHO cells、Bielefeld University、2012. 9. 26、Bielefeld University (Germany)
- ④ Takeshi Omasa、Chromosome heterogeneity and rearrangement of Chinese hamster ovary cells、University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna、2012. 9. 24、University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (Austria)
- ⑤ 大政健史、バイオ医薬品生産における CHO 細胞基盤情報とその応用、化学工学会第 44 回秋季大会、2012. 9. 21、東北大学 (宮城県)
- ⑥ Takeshi Omasa、Next Generation Mammalian Host Cell、Biotechnica 2011、2011. 10. 12、Hanover (Germany)
- ⑦ Takeshi Omasa、Masayoshi Onitsuka、Yihua Cao、Next Generation Mammalian Host Cell、Asian Congress on Biotechnology (ACB-2011)、2011. 5. 12、Shanghai (China)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 白井昭博、大政健史、サイエンス&テクノロジー、バイオ/抗体医薬品・後続品における CMC 研究・申請と同等性確保、2011、107-124
- ② 鬼塚正義、大政健史、シーエムシー出版、バイオ医薬品開発における糖鎖技術、2011、37-44

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大政 健史 (OMASA TAKESHI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：00252586

(2) 研究分担者

鬼塚 正義 (ONITSUKA MASAYOSHI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：80571174

(3) 連携研究者