

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：57103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460167

研究課題名(和文) ヒト細胞を用いた医療用タンパク質高生産システムの開発

研究課題名(英文) Establishment of high expression system for therapeutic protein production using human cells

研究代表者

井上 祐一 (Inoue, Yuichi)

北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・准教授

研究者番号：20284911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：医療用タンパク質生産用の新規Good Manufacturing Practice (GMP) 対応ヒト細胞株を樹立するために、まず非GMP環境下でヒト末梢血リンパ球から不死化細胞を樹立する条件を確立した。また、それらの条件をGMP用に改良し、長期培養可能なヒトBリンパ球様クローンの取得に成功した。成熟Bリンパ球は小胞体が発達しているため、取得したクローンは主に分泌タンパク質の生産に有効と考えられた。今後さらに細胞の無血清培養やタンパク質生産性増強によって、ヒト細胞を用いた医療用タンパク質の生産実用化につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To establish new GMP-compliant human cell lines for therapeutic protein production, we determined the conditions for making immortalized cells from human peripheral blood mononuclear cells in a non-GMP environment. Then, we improved them for a GMP environment and succeeded in obtaining human B lymphoid clones that could be cultured for a long time. The obtained clones might be mainly suitable for secreted protein production because mature B lymphocytes have the extensive endoplasmic reticulum. Further study on serum-free cell culture and cell protein productivity enhancement will lead to a practical application of therapeutic protein production using human cells.

研究分野：農学

キーワード：ヒト細胞株 医療用タンパク質 GMP

1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞は再生医療に非常に期待されており、現在、世界中で精力的に研究が進められている。2010年10月米国バイオベンチャー企業ジェロン社は、世界で初めてヒトES細胞を使った臨床試験を脊髄損傷の患者に対して始めたと発表した。ES細胞やiPS細胞による再生医療の実現化に伴い、今後ますます細胞増殖・分化に必要なサイトカインの需要が高まると考えられる。しかしながら、現在使用されているサイトカインの多くは研究用試薬であり、医薬品レベルのものはほとんど使用されていない。最近ではバイオシミラー(バイオ医薬品の後続品)も注目されているが、それらの生産宿主は主にCHO細胞などの動物細胞であり、糖鎖にN-グリコシルノイラミン酸のようなヒトとは異なるシアル酸が含まれているため、ヒトを対象とした場合には免疫学的に必ずしも最適ではなかった。

一方、これまで本研究室ではヒトタンパク質の生産に理想的なヒト細胞株の樹立を試みてきた。その結果、ヒト骨髄腫由来細胞株から比較的タンパク質の生産能が高く長期安定生産可能な細胞株 SC-01MFP の樹立に成功した(特許第4849408号(2011)、US Patent 7,678,570 (2010))。こうしたタンパク質の工業生産を視野に入れたヒト細胞株の樹立は、世界でもオランダ Crucell 社(現在 J&J 社)と我々だけであり、画期的な技術としてこれまで注目されてきた(2005年5月5日付日本経済新聞、2006年2月26日付化学工業日報、2007年6月16日読売新聞)。実際に、英国の Orla Protein Technologies 社のプロダクトとして製品化された実績もある。さらに2007年、本研究室では医薬品製造管理及び品質管理基準(GMP)に適合したハードウェア環境を整備し、英国創薬支援企業エデン社及び国内製薬会社 OB の協力のもと、管理運営体制に関するソフトウェア環境を構築してきた。そこで本研究では、新規の GMP 対応ヒト細胞株を樹立し、その細胞株を用いてサイトカインなどの医療用タンパク質の効率的生产をめざした。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト末梢血リンパ球をホルボールエステルなどの発癌促進物質を用いて突然変異させ、新規の GMP 対応ヒト細胞株の樹立及びマスターセルバンクの作製を行うことを目的とした。また、細胞株の樹立と並行して、ヒトリンパ球に適合したプロモーターの取得を行い、リンパ球に最適なタンパク質発現ベクターの構築を試みる。一方で、GMP 対応ヒト細胞株が樹立されるまで、ヒトリンパ球系細胞株のモデルである SC-01MFP 等を用いてタンパク質発現活性化及び無血清培養化の検討も行う。最終的に、それらの条件を GMP 対応ヒト細胞株に応用する。

3. 研究の方法

(1) 新規 GMP 対応ヒト細胞株の樹立

まず非 GMP 環境下でヒト末梢血リンパ球から細胞株を樹立する条件を確立し、樹立したヒト細胞株の特性を調べた。

フィコール密度勾配遠心法によってヒト末梢血リンパ球を分離し、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)及びIL-6を加えた12.5%FBS-ERDF培地で1週間培養を行った後、培地交換をしながら高密度のまま3ヶ月間培養を続けた。

その後、取得したクローンについて、倍化時間、継代培養期間、不死化マーカー telomerase reverse transcriptase (TERT)、抗体産生、細胞表面抗原(CD マーカー)などを調べた。

次に、非 GMP 環境で得られた条件を GMP 環境に適合するように改良し、非 GMP と同様に GMP 環境下でクローンの取得を試みた。

(2) リンパ球に最適なタンパク質発現ベクターの構築と評価

まずリンパ球で発現量が高い遺伝子などのプロモーターを既存の B リンパ球細胞株からゲノム PCR で取得し、リンパ球に最適なプロモーターをもつ発現ベクターの構築を試みた。プロモーターは骨髄腫過剰発現 MYEOV2 及び細胞表面抗原 CD74 のものをクローニングした。基本となる発現ベクターには pSecTag を用いた。各プロモーターの発現ベクターを構築後、従来の CMV プロモーターとタンパク質生産量を比較した。

生産タンパク質としては、蛍光タンパク質 ZsGreen やインターフェロン(IFN)-beta を用いて生産量の違いを比較した。各発現ベクターを SC-01MFP 細胞株、取得したヒトリンパ球クローン、あるいは CHO 細胞株にそれぞれ遺伝子導入試薬 Lipofectamine を用いて導入し、タンパク質生産量を ELISA で調べることによってプロモーターの性能を評価した。

(3) 細胞のタンパク質発現活性化及び無血清培養化

タンパク質発現ベクターの MYEOV2 プロモーターを活性化するために、活性化因子である IFN-gamma を培地中に添加した。また別途、MYEOV2 プロモーターに CMV エンハンサーを付加した。その後、それぞれの条件について細胞のタンパク質生産量を比較した。

細胞を無血清培養化するために、無血清培地として市販の UltraCULTURE (LONZA 社)を用いた。細胞の無血清培地への馴化は LONZA 社のプロトコルに従い、無血清培地で増殖が行われるまで各継代培養において血清濃度を順次減少させていった。その後、同様に細胞のタンパク質生産量を比較した。

4. 研究成果

(1)新規 GMP 対応ヒト細胞株の樹立及びマスターセルバンクの作製

非 GMP 環境下での条件確立

非 GMP 環境下でヒト末梢血リンパ球を PMA で突然変異を試みた結果、3 つのクローンを取得することができた。通常、正常ヒト細胞は化学薬品によって突然変異させることが難しいと言われているが、今回は細胞を高密度のまま3ヶ月間培養を続けたことがポイントと考えられた。

取得したクローンは3つとも倍化時間が約30時間であった。これは通常のヒト癌細胞株と比較してやや長かった。しかし、すべてクローンは1年以上の継代培養が可能であり、長いものでは2年以上も継代培養が可能であった。代表的な不死化マーカーである TERT の発現はヒト末梢血リンパ球では見られなかったが、突然変異を誘導した3クローンについては発現が見られた。従って、3クローンとも不死化していると考えられた。また、3クローンは IgG 抗体あるいは IgM 抗体を生産しており、フローサイトメトリー解析の結果からも B リンパ球に特徴的な CD19 を発現していることから、得られたクローンはすべて B リンパ球系であることが分かった。そのうちの2クローンでは、epsilon GT 発現の IL-4 による誘導や TGF-beta による抑制も見られ、得られたクローンが正常細胞時の機能を一部保持していることが示唆された。成熟 B リンパ球は小胞体が発達しているため、取得したクローンは主に分泌タンパク質の生産に有効と考えられた。

GMP 環境下での細胞株樹立

GMP 環境下では使用できる試薬などが制限されるため、非 GMP の条件を GMP 用に改良し、改めて非 GMP 環境下においてクローンを取得できることを確認した。しかし、GMP 環境下では、非 GMP の時ようにクローンを取得することはできなかった。この結果の主な原因としては、GMP では除染工程や不自由なグロブ操作があるため、ヒト末梢血リンパ球の分離に時間を要し、細胞の回収率や生存率も低下したことが考えられた。そこで、リンパ球を回収する操作や手順を見直すことによって回収時間を短縮し、生細胞の回収率を従来の2倍までに改善した。その結果、非 GMP 環境下と同様に長期培養可能な B リンパ球系クローンを取得することに成功した。

今後、細胞形態や増殖能等を指標として最適な3クローンを選択し、細胞を増殖後、マスターセルバンクとして100以上に分注して液体窒素保冷容器にて保存する。最終的に GMP 保証文書を作成し、GMP 対応ヒト細胞株とする。

(2) リンパ球に最適なタンパク質発現ベクターの評価

プロモーターでの比較

CMV と MYEOV2 プロモーターとで ZsGreen の蛍光量を比較した。モデル細胞である SC-01MFP 細胞株で調べた結果、MYEOV2 プロモーターの ZsGreen 蛍光量は CMV プロモーターの約 1/20 であった。この結果は取得した B リンパ球系クローンにおいても同じ傾向が見られた。もう1つクローニングした CD74 プロモーターについても調べたが、SC-01MFP 細胞株及び B リンパ球系クローンともに CMV プロモーターの ZsGreen 蛍光量には至らなかった。

タンパク質生産物での比較

IFN-beta の生産についても、CMV と MYEOV2 プロモーターとで比較した。B リンパ球系クローンで調べた結果、ZsGreen の時と同様に、MYEOV2 の方が CMV プロモーターよりも IFN-beta 生産量は低かった。従って MYEOV2 プロモーターの生産能の低さは生産物の違いによるものではないと考えられた。

生産細胞での比較

CHO 細胞株と B リンパ球系クローンとで IFN-beta 生産量を比較した。CMV プロモーターで調べた結果、B リンパ球系クローンの IFN-beta 生産量は CHO 細胞株の約 1/200 であることが分かった。従って、B リンパ球系クローン自体のタンパク質生産能も高める必要があることが分かった。

(3) 細胞のタンパク質発現活性化及び無血清培養化

SC-01MFP 細胞において MYEOV2 プロモーターを活性化するために培地中に IFN-gamma を添加したが、IFN-beta 及び ZsGreen とともに生産性はほとんど上がらなかった。また、MYEOV2 プロモーターに CMV エンハンサーを付加しても同様であった。

一方、SC-01MFP 細胞や B リンパ球系クローンでは血清培養から無血清培養化することによって、MYEOV2 プロモーターでの ZsGreen の生産性は1.5倍まで増加した。

以上の結果から、非 GMP と同様に GMP 環境下でもヒト末梢血リンパ球から長期培養可能なヒト B リンパ球クローンを取得できることが明らかとなった。従って、取得したヒト細胞はサイトカインなどの分泌タンパク質の大量生産に適していると考えられた。今後さらに取得したヒト細胞の無血清培養やタンパク質生産性増強によって、医療用タンパク質の生産実用化につながると考えられる。

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)

[雑誌論文](計1件)

Inoue, Y., Iwamoto, A., Inoue, A., Kawahara, H.: Establishment and characterization of new human cell

lines for recombinant therapeutic protein production. BMC Proceedings 査読無、Vol. 9 (Suppl 9), P3 (2015). DOI: 10.1186/1753-6561-9-S9-P3

〔学会発表〕(計6件)

井上 祐一、山本 涼平、榮田 佳那子、川原 浩治、新規に作製したヒト細胞株とそのタンパク質生産能等について、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌市、2016. 3. 27-30.

Inoue, Y., Sakaeda, K., Kawahara, H., Establishment of GMP-compliant Human Lymphoid Cell Lines for Production of Therapeutic Proteins. The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Kobe, Nov. 9-12, 2016.

Inoue, Y., Iwamoto, A., Inoue, A., Kawahara, H., Establishment and characterization of new human cell lines for recombinant therapeutic protein production. The 24th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Barcelona (Spain), May 31-June 3, 2015.

井上 祐一、川原 浩治、末梢血リンパ球から樹立した新規ヒト細胞株の特性、日本動物細胞工学会 2015 年度大会、仙台市、2015. 7. 9, 10.

榮田 佳那子、井上 祐一、川原 浩治、GMP 対応バイオ医薬品生産用ヒト細胞株の樹立、日本農芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会、松山市、2015. 9. 17, 18.

Iwamoto, A., Inoue, A., Inoue, Y., Kawahara, H., Establishment of New Human Lymphoid Cell Lines for Production of Therapeutic Proteins. The 27th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Kitakyushu, Nov. 11-14, 2014.

〔図書〕(計1件)

井上 祐一、(株)技術情報協会、動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、2014、584 (461-463)

6. 研究組織(1)研究代表者

井上 祐一 (INOUE, Yuichi)
北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・准教授
研究者番号：20284911

(2)研究分担者

川原 浩治 (KAWAHARA, Hiroharu)
北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・教授
研究者番号：20321515

(3)連携研究者

なし