

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20360373

研究課題名（和文） CHO細胞のゲノム解析とその応用

研究課題名（英文） Genome-wide analysis and its application in Chinese hamster ovary 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）：チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、抗体医薬を始めとする蛋白質医薬品生産に多用されており、実際の上市されている医薬品の約1/3の生産に用いられている宿主細胞である。本研究で、世界で初めて遺伝子増幅CHO細胞の全ゲノム領域を含むバクテリア人工染色体ライブラリーを構築し、これを用いてCHO細胞の染色体の分類マーカーを確立し、構築した分類マーカーと配列情報に基づいてCHO細胞の細胞株構築過程における染色体再構築について解析した。

研究成果の概要（英文）：Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most dependable host cells for the industrial production of therapeutic proteins. We constructed CHO genomic bacterial artificial chromosome (BAC) library from a gene-amplified CHO cell line for genome-wide analysis of CHO cell lines. CHO chromosomal markers were constructed by fluorescence in situ hybridization (FISH) imaging using BAC clones as hybridization probes (BAC-FISH). Using constructed tools, we could analyze chromosome rearrangement in CHO cell line.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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、ゲノム、BACライブラリー、染色体

1. 研究開始当初の背景

動物細胞培養を研究の手段として用いる出発点は、細胞を生体外に取り出し、これを培養する技術の開発にある。微生物の応用に比較してその歴史は浅く、1907年に R. G. Harrison によって本格的に始められ、約100年弱の歴史しかない。現在ではインターフェロンやエリスロポエチン、さらには近年活発になってきている抗体医薬の生産手段とし

ても多用されている。さらに新しい利用法として細胞自身を治療や評価に用いる手法も広がってきている。さて、実際に蛋白質医薬品生産に多用されている細胞はいったい何であろうか。

2006年にアメリカとEUにおいて実際に上市されているバイオ医薬品116品目のうち、大腸菌が38%、Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞が33%、S. cerevisiaeが20%、すなわち

この3つの宿主細胞で実に90%以上のバイオ医薬品が生産されている。中でも高度な翻訳後修飾を必要とする抗体医薬品については、すでに上市されている2/3以上の宿主にCHO細胞が利用されている。

一方、これほどまでに多用されているCHO細胞であるが、細胞自身については殆ど解明されていない。現在、CHOに関してはゲノムプロジェクトを初めとして、染色体領域を解明する研究プロジェクトが全く無い。一方、生産株のcDNAマイクロアレイ解析や、プロテオーム解析は近年目覚ましい発展をとげている。米国ミネソタ大学Prof. Huのグループは、シンガポールA-star Instituteと共同で、CHO細胞のESTデータベースを構築し、アメリカ化学工学会内に米国企業からなるコンソーシアムを結成して利用を呼びかけている(Wlaschin *et al.*, 2006: <http://www.aiche.org/SBE/Corporate/CHO.aspx>)。一方、これとは独立にWyeth社はダブリン市立大と共同でESTデータベースを構築し、プロテオーム解析と共に生産株の生産性向上の研究を行っている(ESACT 2007)。しかしこれまでCHO細胞ゲノムそのものを解明利用したり、染色体増幅領域との関係解明を本格的に行った例は無い。

では、これほどまでに多用されているCHO細胞のゲノム配列の解明が進んでいなかったのはなぜであろうか？

これは、CHO細胞がハムスター卵巣癌由来細胞であり、ヒトやマウスのような個体でもなく、正常細胞でもない、また、線虫やシロイヌナズナに代表されるモデル生物でもないため、基礎科学者の注目を浴びていないという点も考えられる。さらに、大きな問題点はそのゲノムの巨大さである。CHO細胞の元となるチャイニーズハムスターは、そのゲノムサイズがほぼヒトやマウスと同じ3,000-4,000Mb(大腸菌は4.64 Mb、酵母は12.07Mb)と推定され、非常に大きなサイズとなり、その解明には多額の費用がかかる。また、CHO細胞は元々の卵巣細胞から構築されて生産株に適した条件に育種される際に、ゲノムの欠失や、変異が起こっており、正常な個体とはゲノムが異なっている点も挙げられる(Derouazi *et al.*, 2006)。

我々は、これまでCHO細胞を用いた物質生産において生産株構築の手法に最もよく用いられている「遺伝子増幅」現象に注目し、遺伝子増幅における選択圧条件を様々に変更した選択系を構築し、そこから得られた細胞集団の全体および、細胞集団から選抜した多数の細胞株の性質(比増殖速度、生産性、コピー数など)を詳細に解析した。その結果、高頻度な遺伝子増幅にある特定染色体領域が関与していることを見出し、さらに、FISH(蛍光 *In situ* hybridization)の手法を用い

て、染色体上の遺伝子増幅位置を解析した結果、「特定染色体P」の末端付近において遺伝子増幅を引き起こすことにより、明らかに遺伝子のコピー数、生産性が向上することを見出した。さらに、この「特定染色体P」領域より増幅領域を含む配列をCHO細胞のゲノムより取り出し、その配列構造を解明した。これらの解析の過程において、ヒト21,22番目の染色体のゲノム解析に貢献した慶応大学の協力の元、CHO細胞の全ゲノム配列の3-4倍の大きさをカバーする12万クローンからなるBAC(bacterial artificial chromosome)ライブラリーを、遺伝子増幅されたCHO細胞から構築し、このライブラリーから増幅領域を取り出した。

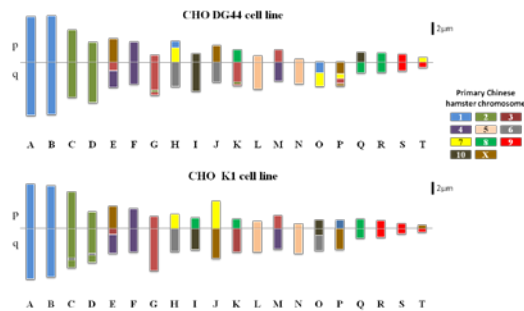
BACライブラリーとはゲノムプロジェクトの元で構築された大きなサイズのDNAを安定かつ1コピー保持できる大腸菌のプラスミドライブラリーであり、巨大で複雑なゲノムのマップ作成に活用されている。これまでの研究の過程で構築したBACライブラリーは、平均サイズ100kbの8万6771クローンと、平均サイズ150kbの3万5510クローンからなり、合計でCHO細胞の全ゲノムの3倍以上をカバーしている。そこで、本研究では、このBACライブラリーを活用して、現在解明されていないCHO細胞のゲノムを解明することを最終目的として、CHO細胞の染色体の再構築について解析する。

2. 研究の目的

本研究では、これらの結果を踏まえて、「CHO細胞BACライブラリー」を用いてCHO細胞の染色体の分類マーカーを構築する。さらに、構築した分類マーカーと配列情報に基づくゲノム上の遺伝子存在位置情報からCHO細胞の細胞株構築過程における染色体再構築について解析することを目的とする。

CHO細胞のゲノムはそれ自体では非常に巨大なサイズであるため、全てを解明することは本研究課題の計画内では到底達成できない。一方、ヒトゲノム1000ドル計画が米国で進みつつあり、DNA配列の大量解析手段が非常に早いスピードで進歩しつつあり、近未来においてゲノム解析が一段と簡単になると予測されている。この次世代の大量解析法の特徴は断片長が短い大量のシーケンシング情報を同時かつ大量に分析することにある。すなわち、予め配列情報が部分的にでも判明し、染色体上での位置関係が既に解明されている対象と比較することにより、ゲノム配列情報を簡単に得ることが可能である。そこで本研究では、次世代シーケンシングを用いて大量解析するに欠かせない既存マウスゲノムとの比較、染色体の分類マーカー構築、さらには細胞株構築過程における染色体再構築について解明することを目的とする。

BAC-FISH マーカーを用いて、親株である CHO-DG44 細胞株及び CHO-K1 株、さらには DG44 細胞株に増幅ベクターを導入して構築した CHO-4N 細胞株との染色体比較を行う。これに加えて、上記(2)にて構築した BAC-END 配列を元にしたマウスゲノム等との比較を用いることにより、CHO 細胞構築過程においてどの染色体領域が変化しているのかを解析する必要がある。そこで、正常なチャイニーズハムスターの染色体標本を作成し、CHO DG44 細胞に対して行った BAC-FISH の結果と比較することにより、CHO K1、CHO DG44、ならびに正常チャイニーズハムスター間での染色体再編成について解析した。その結果、ほぼ半数の染色体が維持されているものの、半数の染色体は非常に複雑な変化を引き起こしていることが世界で初めて明らかになった(下図)。



以上より、細胞株構築時における安定な染色体、不安定な染色体が明らかになり、細胞株構築時における細胞性質の変動の解明手段が構築できた。

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 8 件)

1. Wook-Dong Kim, Miwako Tokunaga, Hiroyuki Ozaki, Takuya Ishibashi, Kohsuke Honda, Hiroyuki Kajiura, Kazuhito Fujiyama, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Takeshi Omasa, and Hisao Ohtake "Glycosylation pattern of humanized IgG-like bispecific antibody produced by recombinant CHO cells" *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 85, pp. 535-542 (2010). 査読有
2. Joon Young Park, Yasuhiro Takagi, Miyuki Yamatani, Kohsuke Honda, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Takeshi Omasa, and Hisao Ohtake "Identification and analysis of specific chromosomal region adjacent to exogenous *Dhfr*-amplified region in Chinese hamster ovary cell

genome" *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 109, Number 5, pp. 504-511 (2010). 査読有

3. Joon Young Park, Miyuki Yamatani, Souhei Wadano, Yasuhiro Takagi, Kohsuke Honda, Takeshi Omasa and Hisao Ohtake "Effects of palindrome structure on *Dhfr* amplification in Chinese hamster ovary cells" *Process Biochemistry* Vol. 45, pp. 1845-1851 (2010). 査読有
4. Takeshi Omasa, Masayoshi Onitsuka, and Wook-Dong Kim "Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells" *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol.11, pp. 233-240 (2010). 査読有
5. 曹 溢華、大政健史、大竹久夫 "タンパク質医薬品生産宿主としての Chinese hamster ovary (CHO) 細胞ゲノム解析—特に染色体の変化について—" *ソフトウェアバイオロジー* 第 8 巻、pp. 11-13 (2009). 査読無
6. Takeshi Omasa, Yihua Cao, Joon Young Park, Yasuhiro Takagi, Shuichi Kimura, Hidenori Yano, Kohsuke Honda, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu and Hisao Ohtake "Bacterial artificial chromosome library for genome-wide analysis of Chinese hamster ovary cells" *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 104, No. 5, pp. 986-994 (2009). 査読有
7. 大政健史 "Chinese hamster ovary (CHO) 細胞の BAC ライブラリー構築とその活用" *日本生物工学会誌* vol. 86 No. 8 p. 393-395 (2008). 査読無
8. 大政健史、大竹久夫 "Chinese hamster ovary (CHO) 細胞のゲノム解析とその応用" *ソフトウェアバイオロジー* 第 7 巻、pp. 8-13 (2008). 査読無

[学会発表] (計 8 件)

1. Takeshi Omasa "Physical mapping of CHO cell genome" In: The 5th International Conference on Geomics (iCG-V), p. 57, November 17, 2010, Shenzhen, China
2. Takeshi Omasa "Next generation cell engineering for the production of biologics" In: the 3rd International Scientific Forum organized by

- Advanced Medical Research Center,
Yokohama City University, February 2,
Yokohama, Kanagawa, Japan (2010)
3. Takeshi Omasa, Miyuki Yamatani,
Shuichi Kimura, Yihua Cao, Joon Young
Park, Kohsuke Honda, and Hisao Ohtake
"Bacterial artificial chromosome
library for genome-wide analysis of
Chinese hamster ovary cells" In; 9th
Asia-Pacific Biochemical Engineering
Conference 2009, BP-K2 (AN-010)
(APBIOChEC'09), November 26, Kobe,
Japan, Abstract: Journal of
Bioscience and Bioengineering vol. 108,
issue S1, pages S7-S8 (2009)
 4. Takeshi Omasa "Production of novel
therapeutic antibody in Chinese
hamster ovary cells" In;
International Symposium on Bioprocess
and Biosystems Engineering 2009
(ISBBE2009), KIII-1, August 4, 2009,
Shanghai, China
 5. Takeshi Omasa, Yihua Cao, Shuichi
Kimura, S. M. A. Haghparast, Yasuhiro
Takagi, Kohsuke Honda and Hisao Ohtake
"Chinese Hamster Ovary Cells BAC
library: Application to the
characterization of CHO chromosomes"
In; The thirteenth international
biotechnology symposium and
exhibition (IBS2008),
IL-116, October 16, 2008, Dalian, China,
Journal of Biotechnology, vol. 136S,
p. S141 (2008)
 6. Takeshi Omasa, Yihua Cao, Joon-Young
Park, Yasuhiro Takagi, Hidenori
Yano, Kohsuke Honda, Shuichi Asakawa,
Nobuyoshi Shimizu, and Hisao Ohtake
"Analysis of the specific
chromosomal region adjacent to the
DHFR gene amplified in CHO DR 1000L-4N
cell line" In; Engineering
Conference International: Cell
Culture Engineering XI, 1. B. 11, p. 105,
April 14, 2008, Sunshine Coast,
Queensland, Australia

[図書] (計1件)

1. 「抗体医薬のための細胞構築と培養技術」
大政 健史 著・監修 309 ページ、シーエ
ムシー出版 (2010)

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称：遺伝子発現安定化エレメント

発明者：山崎友実、増田兼治、西井重明、川
上文清、大政健史

権利者：大阪大学・東洋紡績
種類：特許
番号：第 4568378 号
取得年月日：2010 年 8 月 13 日
国内外の別：国内

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

白井 昭博 (SHIRAI AKIHIRO)
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：40380117

大竹 久夫 (OHTAKE HISAO)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：10127483

本田 孝祐 (HONDA KOHSUKE)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90403162

(3) 連携研究者

()

研究者番号：