

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：57103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580477

研究課題名(和文) 完全ヒト抗体高生産性ヒト細胞株の作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of techniques for establishing the fully human antibody high producing human cell lines

研究代表者

井上 祐一 (Inoue, Yuichi)

北九州工業高等専門学校・物質化学工学科・准教授

研究者番号：20284911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：完全ヒト抗体を生産するために、ヒト細胞を用いた細胞融合について検討した。その結果、A4H12のようなTリンパ球系ヒト融合パートナーを用いて細胞融合することによって、細胞凝集を形成し、レチノイン酸によって抗体生産量が増強するヒト融合細胞株(ハイブリドーマ)を汎用的に作製できることが分かった。細胞融合には、ウシ胎児血清の品質が最も重要であった。

また、組み換え型の完全ヒト抗体の生産についても検討した。フルクトース(果糖)輸送体GLUT5と抗体の共発現システムをヒト細胞株SC-01MFPに導入した結果、フルクトース基本培地において従来のグルコース基本培地の約2倍の完全ヒト抗体の生産が可能であった。

研究成果の概要(英文)：To produce fully human antibodies, cell fusion were examined using human cells. As a result, it was found that the cell fusion using the T lymphoid fusion partner such as A4H12 could generate universally human hybridomas that formed cell aggregation and increased their antibody production by retinoic acid. For the cell fusion, the quality of fetal bovine serum was the most important factor.

In addition, the production of recombinant fully human antibodies was also challenged. The introduction of the fructose transporter GLUT5 and antibody co-expression system into the human cell line SC-01MFP made it possible to produce them in the fructose-based medium up to about two-fold of the conventional glucose-based medium.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：ヒト抗体 ヒト細胞株 ハイブリドーマ レチノイド

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析、プロテオーム解析によって標的となるタンパク質が急速に増加し、抗体医薬は癌などの難治疾患領域でバイオ医薬の中心となっている。このような抗体医薬は低分子医薬よりも臨床試験での成功確率が高く、特許が切れても後発品が出にくい一方で、研究開発のための初期コストが高く、経験的なノウハウが必要とされる。現在は米国のジェネンテック社とアムジェン社を筆頭に数々の新興ベンチャー企業が標的タンパク質を探索し、スイスのロンザ社や英国グラクソスミスクライン社、アストラゼネカ社などが抗体受託生産をする状況にある。しかしながら、現在使用されている抗体医薬はキメラ抗体やヒト化抗体といった部分的にマウスの配列を含んだ抗体であり、その糖鎖も CHO 細胞などの動物細胞に由来する N-グリコシルノイラミン酸といったヒトとは異なるシアル酸が存在するため、ヒトを対象とした治療の場合必ずしも免疫学的に最適ではない。これらの問題を解決するためには、ヒト細胞による完全なヒト配列をもった抗体を使用することが理想的と考えられる。また、マウス抗体を遺伝子工学的にヒト化抗体に組み換えて CHO 細胞で生産するよりも、完全ヒト抗体を生産するヒト細胞を用いてそのまま抗体を大量生産する方が明らかにスマートで効率的と考えられる。

我々はこれまで肺線癌細胞株 A549 を免疫原としてヒト正常リンパ球を体外免疫し、ヒトリンパ腫細胞株と融合することによって、肺癌細胞を有効に識別するヒト抗体を生産する細胞の取得に成功してきた。この完全ヒト抗体による免疫喀痰染色は従来のパパニコロウ染色による喀痰細胞診の結果と良く一致し、免疫喀痰細胞診への有効性が示唆された。また、このハイブリドーマの抗体産生を増強する物質を検索した結果、全トランス型レチノイン酸 (ATRA) が最も効果的に抗体産生を増強できることを明らかにした。それゆえ、これまでの研究成果をもとに、完全ヒト抗体を高生産するヒト細胞を作製することとした。

2. 研究の目的

完全ヒト抗体の作製法としては、ヒト細胞を用いた細胞融合法や遺伝子工学的手法などがあるが、これらの方法には、ヒト細胞の融合効率が低い、あるいは抗体生産性が低いといった問題があった。そこで本研究では、ヒト細胞におけるこれらの問題を解決することを目的とした。

具体的には、まずヒト T リンパ球細胞株から融合効率が低い融合パートナーを作製する。続いて細胞融合条件を検討し、目的抗体を生産している融合細胞の出現・取得効率を高める。次に、ヒト融合細胞におけるレチノイド応答シグナル伝達機構を解明し、抗体生産性

を増強する。また、その機構を融合パートナーあるいは作製した融合細胞に導入し、あらゆる抗体で効率的に作製できるように汎用化する。最終的に、ヒトリンパ球と細胞融合したハイブリドーマを用いて、ローラーボトル回転培養システムで抗原特異的完全ヒト抗体を大量生産できることを確かめる。

さらに、遺伝子工学的手法を用いて、組み換え型完全ヒト抗体の高生産法についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 新規ヒト融合パートナーの樹立と融合条件の検討

まず、MOLT-4 などのヒト男性由来 T リンパ腫細胞株を 6-チオグアニン存在下で選択培養し、HGPRT 欠損細胞集団をクローニングした。一方で、ヒト B リンパ球のモデルとして、5-プロモウリジン耐性のチミジンキナーゼ (TK) 欠損 B リンパ腫細胞株クローンを作製し、それぞれのクローンをポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。一部の細胞を蛍光染色試薬で染色し、融合効率を蛍光画像解析システムを用いて解析した。HAT 培地で選択培養後、最終的に 96 ウェルプレートに出現する融合細胞のウェル数を確認した。また、融合条件を変えて融合効率を調べた。

(2) ヒト融合パートナーの違いによるハイブリドーマの比較

種々のヒト融合パートナーとヒトリンパ球とを細胞融合し、得られたハイブリドーマの ATRA による抗体産生増強の違いや培養特性を調べた。

(3) レチノイド応答シグナル伝達機構の解明

レチノイン酸受容体関連オファン受容体 (RORC2) と抗体産生増強効果との関係を調べた。そのために、抗体産生増強効果を示さない融合細胞に RORC2 遺伝子を導入した。また逆に、抗体産生増強効果を示す融合細胞に RORC2 の shRNA を導入して RORC2 発現を抑制した。

(4) 抗原特異的完全ヒト抗体の大量生産

まず静置培養において、肺癌特異的抗体産生ハイブリドーマの凝集形成条件について検討を行った。次に、その結果に基づいてローラーボトル回転培養システムを用いて培養を行い、完全ヒト抗体の生産量を確かめた。

(5) 組み換え型完全ヒト抗体の高生産法の検討

フルクトース (果糖) 輸送体 GLUT5 とヒト抗体の共発現ベクターをヒト細胞株 SC-01MFP に導入した。導入細胞をグルコース基本培地とフルクトース基本培地で培養し、組み換え型ヒト抗体の生産量を比較した。

また、共発現システムが他の細胞にも応用可能かどうかを調べるために、現在、医薬品生産分野で用いられているチャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO-K1 についても同様に実験を行った。

4. 研究成果

(1) 新規ヒト融合パートナーの融合効率と融合に影響を及ぼす因子

新規ヒト融合パートナーを作製し、TK 欠損ヒト B リンパ球腫細胞株との融合効率を蛍光画像解析システムで調べた結果、融合時の融合効率は約 50%であることが分かった。また従来のヒト融合パートナーでは約 76%であり、新規ヒト融合パートナーの方が効率は低かった。しかし、細胞融合時点の効率は新規ヒト融合パートナーでも十分に高く、むしろ融合後の細胞選択によって効率が低下していることが分かった。したがって、融合後の細胞選択条件を最適化にすることによって、高効率でヒトハイブリドームを取得することができると考えられた。

また、細胞選択条件について調べた結果、HAT 培地中のウシ胎児血清(FBS)の品質(ロット)が最も選択結果に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

(2) ヒト融合パートナーの違いによるハイブリドームの比較

FBS のロットチェック後、実際にヒトリンパ球との細胞融合を行った結果、新規あるいは従来のヒト融合パートナーのどちらとの融合においても平均 30%以上の効率でハイブリドームを取得することができた。ATRA による抗体産生増強は、T リンパ球系ヒト融合パートナーを用いて作製したハイブリドームでは見られたが、B リンパ球系ヒト融合パートナーを用いて作製したハイブリドームでは見られなかった。したがって、T リンパ球系ヒト融合パートナー中に抗体産生増強機構の重要因子が存在していると考えられた。

今回の T リンパ球系ヒト融合パートナーを用いて作製したハイブリドームでは、培養中に凝集を形成するため、細胞凝集の抗体産生増強に対する影響について調べた。ギャップ結合阻害剤の実験結果から、ハイブリドームは細胞間ギャップ結合を介して ATRA のシグナル伝達を行い、抗体産生を増強していることが示唆された。しかし、逆に細胞凝集が大きくなり過ぎると抗体産生の増強割合は低下し、凝集内部の細胞の抗体分泌が物理的に阻害を受けている可能性が考えられた。

(3) レチノイド応答シグナル伝達機構の解明

抗体産生増強が見られないヒトハイブリドームに RORC2 遺伝子を導入した結果、数クローンにおいて ATRA 非依存的な抗体産生増強が確認された。RORC2 は今回の T リンパ球系融合パートナーに特異的に発現しており、

それと細胞融合して作製したヒトハイブリドームへの RORC2 shRNA の導入は、ATRA による抗体産生増強を抑制する傾向にあった。これらの結果から、RORC2 の抗体産生増強への関与が示唆された。しかし、レチノイド応答シグナル伝達機構についてはさらに解析する必要があり、既存のヒトハイブリドームへの抗体産生増強機構の導入については今後の課題であった。

(4) 抗原特異的完全ヒト抗体の大量生産

凝集形成が抗体産生増強に関与していることが示唆されたため、まず静置培養において凝集条件について検討した。培養底面積と培地の高さについて検討した結果、細胞凝集は培地の高さが高いとサイズが大きくなることが分かった。また、ATRA による抗体産生増強に最適な凝集サイズは 150~200 マイクロメートルであった。次にローラーボトル回転培養システムを用いて条件検討を行った。その結果、150~200 マイクロメートルの凝集サイズを維持するために最適な回転数は 0.5 rpm で、培養期間は最大 7 日間であることが分かった。最終的に、ATRA を添加したヒトハイブリドームのローラーボトル培養を 7 日間行った結果、従来の約 8 倍の完全ヒト抗体の生産が可能であることが分かった。ローラーボトルは本数を増やすことが可能であり、回分培養でロット管理も容易なため、医薬品の生産にも適していることが知られている。

(5) 組み換え型完全ヒト抗体の高生産法

組換え型の完全ヒト抗体の高生産についても検討した。フルクトース(果糖)輸送体 GLUT5 と抗体の共発現システムをヒト細胞株 SC-01MFP に導入した結果、フルクトース基本培地では従来のグルコース基本培地の約 2 倍の組み換え型ヒト抗体を生産できることが分かった。また、この GLUT5 共発現システムは同様に CHO-K1 細胞株においても抗体産生増強が確認され、他の細胞や組み換えタンパク質にも応用できると考えられた(BMC Proceedings, Vol. 5, Suppl 8, 2011)。特に、内在性 GLUT5 を発現していない細胞では、より高いタンパク質生産増強効果が見られると考えられる。

以上の結果から、抗原特異的ヒトリンパ球を取得し、本研究のようなヒト融合パートナーと細胞融合することによって、汎用的かつ効率的に抗原特異的な完全ヒト抗体を生産できると考えられた。また、組み換え型の完全ヒト抗体の高生産についても、GLUT5 共発現システムを細胞に導入することで達成できると考えられた。

本研究の成果は、完全ヒト抗体高生産性ヒト細胞株の作製技術の開発に役立つ。

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., Inoue, A., Kawahara, H.:
Efficient production of recombinant IgG
by the GLUT5 co-expression system. BMC
Proceedings 査読無、Vol. 5 (Suppl 8)
(2011).
DOI: 10.1186/1753-6561-5-S8-P50

[学会発表](計4件)

川原浩治、井上愛子、井上祐一、タンパク
質生産用ヒト細胞株 SC-01MFP の樹立、
日本動物細胞工学会 2011 年度大会、東京
都、2011. 7. 22, 23.

Inoue, Y., Inoue, A., Kawahara, H.,
Enhanced Production of Human Monoclonal
Antibodies by Retinoic Acid through Gap
Junctions in Human Hybridomas. The 25th
Annual and International Meeting of the
Japanese Association for Animal Cell
Technology, Nagoya, Nov. 27-30, 2012.
井上祐一、井上愛子、川原浩治、ヒトハイ
ブリドーマのレチノイン酸応答性を利用
した完全ヒト抗体の汎用的・効率的生産法
の開発、日本動物細胞工学会 2013 年度大
会、福井市、2013. 7. 18, 19.

峠美穂、井上愛子、井上祐一、川原浩治、
レチノイン酸によって抗体産生能が増強
するヒトハイブリドーマ、日本農芸化学会
関西・中四国・西日本支部および日本ビタ
ミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区合
同大会(2013 年度合同広島大会) 広島市、
2013. 9. 5, 6.

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・物質化学工学
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・物質化学工学
科・教授
研究者番号：20321515

(3)連携研究者

なし