

2Bp22 ATF4高発現CHO細胞における遺伝子発現解析

○筒井 智美¹, 白井 昭博², 鬼塚 正義², 西沢 明敏³, 間世田 英明², 本田 孝祐³, 大竹 久夫³, 大政 健史^{2,3}
(¹徳大院・先端技,²徳大院・STS研,³阪大院・工)
omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【序論】Chinese hamster ovary (CHO)細胞を用いた物質生産の大きな課題の一つは、翻訳後プロセスの改良による比生産速度向上である。我々のグループでは、antithrombin III(AT-III)生産株において小胞体ストレス応答(UPR)関連因子 activating transcription factor 4(ATF4)を高発現させる事で比生産速度を約2倍に向上させている。そこで、HiCep法によりATF4高発現株における発現遺伝子を解析した結果、元株と比べ、Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells(NF-kappa B) inhibitor, zeta (NFKBIZ)発現量が2倍以上増加していた。本研究では、NFKBIZ発現が細胞増殖・AT-III生産性に与える影響を検討した。

【方法】AT-III生産株にNFKBIZ発現ベクターを導入し、薬剤選択後、PCR法により染色体へのベクター導入とその発現を確認した。さらに回分培養を行い、比増殖速度及びAT-III比生産速度を解析した。

【結果及び考察】NFKBIZ高発現株は元株と比べ、比増殖速度は増加せず、比生産速度が最大で約3倍に上昇し、最終的にAT-III生産濃度が増加した。以上より、生産性向上手段の一つとしてNFKBIZ発現が利用可能と考えられる。

Gene expression profiles in ATF4-overexpressing CHO cell line

○Tomomi Tsutsui¹, Akihiro Shirai², Masayoshi Onitsuka², Akitoshi Noshizawa³, Hideaki Maseda², Kohsuke Honda², Hisao Ohtake³, Takeshi Omasa^{2,3}
(¹Adv. Tec. and Sci., Univ. Tokushima, ²Ins. of Tec. and Sci., Univ. Tokushima, ³Grad. Sci. Eng., Osaka Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cell, unfolded protein response, NFKBIZ

2Bp24 トレハロースを用いたCHO細胞培養における抗体の凝集抑制

○龍澤 実季¹, 鬼塚 正義², 白井 昭博², 間世田 英明², 大政 健史²
(¹徳大院・先端技,²徳大院・STS研)
Omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【目的】抗体医薬品の多くはChinese hamster ovary(CHO)細胞を宿主として生産されているが、製造工程で生じる抗体の凝集形成が問題とされている。これまで製剤過程においては化合物添加によるタンパク質凝集抑制法が報告されており、中でもトレハロースは高い凝集抑制効果を持つ。そこで本研究では凝集抑制法の報告例が少ない細胞培養過程に着目し、トレハロースを培地に添加して一本鎖二重特異性抗体産生CHO細胞株を培養し、凝集抑制効果について検討した。

【方法】無血清培地にて抗体産生CHO細胞株を浮遊培養し、培地中トレハロース濃度を段階的に上昇し継代を重ね、トレハロース馴化CHO細胞株を構築した。培養上清から抗体を精製後ゲル過クロマトグラフィー及び円二色性スペクトル測定を行い、抗体の凝集性及び二次構造を評価した。

【結果及び考察】抗体産生CHO細胞株をトレハロース含有培地に馴化した結果、150 mMトレハロース馴化株の構築が可能であった。次に凝集性を分析した結果、トレハロース存在下の培養では高分子量凝集体(Large Aggregates: LA)の形成が大きく抑制されていた。またmonomer及びdimerは抗体様のCDスペクトルを示し二次構造が類似していたが、LAは大きく異なる非天然型の構造であった。即ちmonomerからdimerそしてLAという凝集形成機構において、トレハロースはLAに転移する際の高次の構造変化を抑制する事で、凝集抑制効果を有すると推察された。以上より、トレハロース添加による抗体の凝集抑制はバイオ医薬品生産に有効な手段であると思われる。

The effect of trehalose addition on antibody aggregation in CHO cell culture

○Miki Tatsuzawa¹, Masayoshi Onitsuka², Akihiro Shirai², Hideaki Maseda², Takeshi Omasa²
(¹Adv. Tech. and Sci., Univ. Tokushima, ²Institute of Tech. and Sci., Univ. Tokushima)

Key words Chinese hamster ovary cell, Antibody, Aggregation, Trehalose

2Bp23 Chinese hamster ovary細胞株における染色体不安定性

○高橋 舞¹, 木村 修一¹, Haghparsad Seyed Mohammad Ali², 曹 溢華², 本田 孝祐², 大竹 久夫², 大政 健史^{2,3}
(¹徳大院・先端技,²阪大院・工,³徳大院・STS研)
omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【序論】高度な翻訳後修飾を必要とするバイオ医薬品は主にChinese hamster ovary (CHO)細胞を宿主として生産されている。しかし、CHO細胞の生産能、増殖能に関連するゲノムや染色体自体に関する研究はこれまでほとんど行われていない。そこで本研究では、CHO細胞の性質について、染色体本数の観点から解析を行った。

【方法】特定染色体に遺伝子増幅領域を保持しているCHO細胞を用いて、限界希釈法を行い、染色体本数ごとにクローニングを行った。得られたサブクローンについて、細胞直径、染色体本数と核型を解析、さらに回分培養により比増殖速度を算出した。

【結果及び考察】CHO細胞サブクローンの細胞直径を計測した結果、細胞群は2群に分かれた。比増殖速度もそれぞれ0.030 h⁻¹と0.025 h⁻¹と違いがみられた。その中でも30本以上の染色体を有するサブクローンについて詳細に核型解析した結果、遺伝子増幅領域を保持している染色体が倍に増加していた。以上より、CHO細胞株における染色体本数と細胞性質に関する知見を得ることができた。これらの知見は安定生産株構築に寄与できると考えられる。

Clonal variability and chromosomal instability in Chinese hamster ovary cell lines

○Mai Takahashi¹, Syuichi Kimura¹, Seyed Mohammad Ali Haghparsad², Cao Yihua², Kohsuke Honda², Hisao Ohtake², Takeshi Omasa^{2,3}
(¹Adv. tech. Sci., Univ. Tokushima, ²Grad. Sci. Eng., Osaka University, ³Institute of Tech. Sci., Univ. Tokushima)

Key words Chinese hamster ovary cell, chromosomal heterogeneity, chromosome number

2Bp25 組換えタンパク質高生産CHO細胞株におけるWFS1発現の影響

○白井 昭博¹, 佐藤 浩一郎², 鬼塚 正義¹, 間世田 英明¹, 大政 健史¹
(¹徳大院・STS研,²徳大・工)
omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【目的】複雑な翻訳後修飾を伴うバイオ医薬品生産は、CHO(Chinese hamster ovary)細胞が生産宿主として多用されている。当研究室では、組換えタンパク質の生産性向上のために小胞体ストレス応答(UPR)を利用している。本研究では、Wolfram syndrome 1(WFS1)に着目した。WFS1は、UPR機構において誘導され、またマウスβ細胞においてその過剰発現がインスリン分泌を向上させている。そこで、UPR関連転写因子activating transcription factor 4(ATF4)の過剰発現により、antithrombin III(AT-III)の比生産速度が約2倍上昇したATF4過剰発現株(ATF4株)におけるWFS1の発現影響を検討した。

【方法】CHO K1株からWFS1 cDNAをクローニングし、WFS1発現ベクターをATF4株に導入した。構築したWFS1株の染色体へのベクター導入は、genomic PCR、WFS1の発現はRT-PCRにより確認した。WFS1発現株の回分培養を行い、比増殖速度及びAT-III比生産速度に対するWFS1発現の影響を検討した。

【結果・考察】WFS1発現ベクターをATF4株に導入し、構築したWFS1株16株の内、7株でWFS1の発現を確認した。回分培養による各比速度をATF4株と比較した結果、比増殖速度は5株、比生産速度は3株で上昇した。以上より、ATF4株におけるWFS1高発現は、組換えタンパク質の更なる生産性向上に有効であると考えられる。

The effect of WFS1 over-expression on recombinant protein production

○Akihiro Shirai¹, Koichiro Sato², Masayoshi Onitsuka¹, Hideaki Maseda¹, Takeshi Omasa¹
(¹Ins. of Tec. and Sci., Univ. of Tokushima, ²Fac. Eng., Univ. of Tokushima)

Key words Chinese hamster ovary cell, unfolded protein response, WFS1