

1P-221 Chinese hamster ovary 細胞株における染色体不安定解析と抗体生産への応用

○高橋 舞¹, 森下 明彦¹, 鬼塚 正義², 白井 昭博², 間世田 英明², 大政 健史²
 (¹徳島大院・先端技科, ²徳島大院・ソシオ)
 omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【序論】CHO 細胞を用いた抗体医薬品生産において、抗体高発現株を効率的に構築する事は困難である。この一因は細胞の性質を決める染色体の不安定な変化である。そこで、本研究では抗体生産株の染色体本数の変化に着目し解析を行い、その結果に基づき効率的な抗体高生産株構築法を確立する事を目的とした。

【方法】CHO-DG44 株から染色体本数が 20 本の細胞 (DG44-SC20) 及び 30 本以上に増加した細胞 (DG44-SC39) を取得した。そして、DG44-SC39 における特定染色体の増加を CHO-genome BAC ライブラリーを用いた FISH により解析した。更に両者の細胞を用いて IgG3 生産株 (IgG3-SC20, IgG3-SC39) を構築し、抗体生産性と染色体への抗体遺伝子導入の関連を FISH により解析した。

【結果及び考察】BAC-FISH 解析により、DG44-SC39 では特定染色体が 1 本から 2 本に増加していた。IgG3-SC39 の抗体生産性は IgG3-SC20 の 3.7 倍に増加していた。抗体遺伝子導入を解析した所、IgG3-SC20 の 1ヶ所に対し IgG3-SC39 では 2ヶ所の特定染色体領域に導入されていた。以上より、染色体の全体本数の増加に伴う特定染色体本数の増加により抗体遺伝子導入数が増加し、その結果生産性も上昇したと考察される。よって染色体本数の異なる親細胞の選択により、効率的な抗体高生産株構築が可能であると考えられる。

Analysis of chromosomal instability and its application to antibody production in Chinese hamster ovary cell

○Mai Takahashi¹, Akihiko Morishita¹, Masayoshi Onitsuka², Akihiro Shirai², Hideaki Maseda², Takeshi Omasa²
 (¹Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Univ. Tokushima, ²Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

Key words Chinese hamster ovary cell, chromosomal instability, antibody production

1P-223 ヒト化抗体高生産 CHO 細胞株樹立のための細胞表面 FIA 法の最適化

○木田 晶子, 良元 伸男, 黒田 俊一
 (名大院・生命農学)
 skuroda@agr.nagoya-u.ac.jp

バイオ医薬産業では B 細胞、ハイブリドーマ、CHO 細胞等が生産株として用いられており、同株の樹立においては、大量の細胞ライブラリーから高生産株を迅速に選抜し、生産性と安定性を最大限に高めるように育種することが重要である。しかし、従来のコロニー形成を経る選抜方法は、ハイスループット性に乏しく、かつ同一コロニーの各細胞間に見られる異種性が育種の障害となる。そこで今後は、生産性が最も高い細胞を迅速に 1 細胞単離し、増殖しても高生産能が安定に維持される「1 細胞育種技術」の開発が重要である。

これまでに我々は、有用タンパク質高分泌細胞をリアルタイムかつハイスループットに選抜するため、1 細胞単位で非侵襲的かつ分泌量依存的に蛍光標識する「細胞表面 FIA 法 (CS-FIA)」を開発した (木田ら, Anal. Chem. 2013)。具体的には、脂質を介して細胞表面に提示した捕捉抗体により分泌タンパク質を固定し、さらに蛍光標識抗体でサンドイッチすることで、1 細胞単位での分泌タンパク質の極微量定量 (>10 fg/cell) を可能にした。一方我々は、蛍光を指標に目的細胞を 1 細胞単位で解析・単離する全自動装置も開発しており、本 CS-FIA と併用することで、抗体高分泌ハイブリドーマの 1 細胞育種に成功した (良元ら, Sci. Rep. 2013)。本研究では、バイオ医薬産業の中核的細胞資源である CHO 細胞を用い、細胞表面層へ捕捉抗体提示に適した脂質を選定して CS-FIA を最適化し、全自動 1 細胞解析単離装置を用いてヒト化抗体分泌 CHO 細胞の 1 細胞育種を予備的に行ったので報告する。

Optimization of cell surface-fluorescence immunosorbent assay (CS-FIA) for colonial refinement of humanized antibody-producing CHO cells

○Akiko Kida, Nobuo Yoshimoto, Shun'ichi Kuroda
 (Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words single-cell analysis, cell surface engineering, high-throughput screening, antibody

1P-222 細胞周期制御による抗体医薬品高生産 CHO 細胞株構築系の確立

○筒井 智美¹, Kyoung Ho Lee³, 鬼塚 正義², 白井 昭博², 間世田 英明², 大政 健史²
 (¹徳島大院・先端技科, ²徳島大院・ソシオ, ³阪大院・工・生命先端・生工)
 omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【序論】一般に抗体医薬品高生産 CHO 細胞株は遺伝子増幅現象を利用して構築される。遺伝子増幅の引き金は DNA 鎖損傷であるが、DNA 鎖複製異常は細胞周期チェックポイントにより監視・修復されており、遺伝子増幅効率を低下させていると考えられる。本研究では効率的な遺伝子増幅系構築を目的とし、G2/M 期チェックポイント因子 Cell division cycle 25B(CDC25B)に着目した。CDC25B によるチェックポイント機能を弱める事が効率的な遺伝子増幅誘導に繋がると考え、その活性制御が遺伝子増幅及び抗体生産能力に与える影響について検討した。

【方法】CDC25B(25B) 及び CDC25B 活性制御に重要なリン酸化部位を変異させた S318A(m25B)発現ベクターを構築した。抗体生産 CHO 細胞に各ベクターを導入後、遺伝子増幅を誘導し、Mock・25B・m25B 株を構築した。回分培養による比速度算出、核型解析、コピー数測定を行った。

【結果・考察】比増殖速度に差はなかったが、比生産速度は m25B 株では Mock、25B 株の約 15 倍に上昇した。更に、より遺伝子増幅が生じており、抗体遺伝子コピー数増加が観測された。つまり、m25B 発現による恒常的 DNA 修復能力弱体化が効率的な遺伝子増幅を誘導する事が示された。本結果は、遺伝子増幅現象による高生産株構築の律速が細胞の DNA 修復能力である事を示唆しており、本手法は効率的な遺伝子増幅系として医薬品生産に有用であると考えられる。

Generation of High-producing Cell Lines by Cell cycle engineering in CHO Cells

○Tomomi Tsutsui¹, Lee Kyoung Ho³, Masayoshi Onitsuka², Akihiro Shirai², Hideaki Maseda², Omasa Takeshi²
 (¹Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Univ. Tokushima, ²Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, ³Dept. Biotechnol., Div. Adv. Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cell, gene amplification, cell cycle

1P-224 胚性幹細胞の低コスト分化法開発を志向した抗体 / 受容体キメラの構築

○中林 秀人, 河原 正浩, 長棟 輝行
 (東大院・工・化生)
 kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

胚性幹細胞 (ES 細胞) / 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は各種細胞への分化能と自己複製能を併せ持つため、再生医療において魅力的な細胞であるが、これらの細胞の特異的系譜への分化を効率よく、また、コストを抑えて達成することが再生医療の実用化に向けた大きな課題となっている。そこで本研究では、造血系細胞への分化を効率的かつ安価に行うことのできる新規分化法の開発を目的とした。

ES/iPS 細胞の造血細胞系譜への分化法として、胚様体形成を経て、骨形成タンパク質-4 (BMP4)、Activin A、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の 4 つのサイトカインを加えて培養する方法が報告されている。しかし、このようなサイトカインは非常に高価であり、分化におけるコストの増加の原因となっていた。抗体 / 受容体キメラは、サイトカイン受容体のリガンド認識部位を一本鎖抗体に置き換えることにより構築された人工受容体であり、サイトカインとは異なる抗原を認識しシグナルを細胞内に伝達する。そのため、抗体 / 受容体キメラを恒常発現させた細胞において、サイトカインを安価な抗原で代替し、安価に分化を誘導可能ではないかと考えた。そこで、これらのサイトカインの受容体をそれぞれ抗体 / 受容体キメラ化し、ES 細胞に発現させ、サイトカインの代わりに抗原を添加し、分化を誘導した。その結果、抗体 / BMP 受容体、抗体 / Activin 受容体、抗体 / FGF 受容体を発現させた細胞では、対応するサイトカインを加えていない状態において、キメラ受容体非発現細胞より高い分化効率を示された。

Construction of antibody/receptor chimeras for cost-effective differentiation of embryonic stem cells

○Hidetō Nakabayashi, Masahiro Kawahara, Teruyuki Nagamune
 (Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words differentiation, cytokine, chimeric receptor