

2P-249 A New Enterprise Platform for Rational, Knowledge-driven Improvement of Media, Processes and Cell Lines

Kaori Moriaki¹, Jens Niklas², Julia Rete², Sebastien Ribrioux²,
Steffen Fehrmann², Ludwig Macko², Thomas Hartsch²,
Ben Adamczyk³, Masako Shinjoh¹
(¹Genedata KK, ²Genedata AG, ³Genedata Inc.)
masako.shinjoh@genedata.com

Both process and media development are still often largely driven by trial and error. Knowledge and know-how is often distributed only in the minds of different experts, and therefore not readily accessible to all involved in the process. To avoid loss of expertise and IP, enable knowledge sharing and allow rational, knowledge-driven improvement of processes, media, feeds and cell lines, we developed an integrated data analysis and knowledge management platform, called Genedata Selector. Advanced, integrated analysis tools enable you to easily observe limitation/accumulation of metabolites and discover previously hidden relationships, for example through visualizing cell culture process data on pre-defined or customized metabolic pathway maps. Different data can be integrated (e.g. extracellular/intracellular metabolomics, NGS or metabolic flux) and media and processes can be optimized rationally, thereby avoiding costly trial & error. Here use of RNAseq-aided genome refinement of reference genome is a key for success. New insights into cell behavior are generated by integrated genomics/omics data analysis, enabling the understanding of molecular differences between cell lines, cultivation conditions and time points, and to find novel relationships buried in experimental data. A rich statistical toolbox and interactive data exploration tools facilitate the identification of relevant biological functions and pathways.

A New Enterprise Platform for Rational, Knowledge-driven Improvement of Media, Processes and Cell Lines

Kaori Moriaki¹, Jens Niklas², Julia Rete², Sebastien Ribrioux²,
Steffen Fehrmann², Ludwig Macko², Thomas Hartsch², Ben Adamczyk³,
Masako Shinjoh¹
(¹Genedata KK, ²Genedata AG, ³Genedata Inc.)

Key words CHO, media and process development, omics, statistics

2P-250 IR/MAR 遺伝子増幅法による組換え蛋白質生産

清水 典明, 大崎 究, 福岡 美樹
(広島大院・生物圏)
shimizu@hiroshima-u.ac.jp

我々は、がん細胞内での遺伝子増幅に関する基礎研究から独自に、哺乳動物複製開始領域 (IR) と核マトリックス結合領域 (MAR) を持つプラスミドが、動物細胞内できわめて効率よく増幅され、がん細胞に見られるような染色体外の double minutes (DMs) や染色体内の homogeneously staining region (HSR) を形成することを見いだした。その後、この実験系を用いて遺伝子増幅の機構を明確にし、様々な生物学研究に用いてきた。さらに、この実験系を組換え蛋白質生産系として応用するための研究を 2009-2011 年度に JST 育成研究として行った。その結果、簡便な操作で迅速に、高い組換え蛋白質生産効率を持つ安定な細胞株が得られることから、充分な国際競争力を持つ方法であることが示唆された。一方この方法は、導入遺伝子が縦列反復構造となるために、遺伝子増幅を利用する他の方法と同様、発現抑制を受けやすいことが課題であった。そこで、1) 発現抑制を受けにくい染色体外で導入遺伝子を増幅させる方法や、2) 発現抑制を解除するゲノム配列を単離し、3) 発現を高める配列が数十 kbp 連続する中に目的遺伝子を埋め込み、それを単位として増幅する方法、等の改良法を検討してきた。本会では、そのような現況をまとめて紹介する。なお、この研究は現在、経済産業省「次世代バイオ医薬品製造技術研究組合」から再委託を受けて実施している。

Recombinant protein production by the IR/MAR gene amplification technology

Noriaki Shimizu, Kiwamu Ohsaki, Miki Fukuma
(Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

Key words Gene amplification, recombinant production

2P-251 無血清培養での細胞増殖活性向上のためのキメラ受容体のデザイン

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

【背景・目的】動物細胞を用いた抗体医薬品生産においては、血清による感染リスクの観点から無血清培地での培養が求められるため、無血清培地とその添加物の開発が盛んに行われてきた。しかし、細胞の無血清馴化が必要であること、無血清培養では血清添加培養に比べて細胞増殖が劣ること、増殖特性は培地組成に大きく左右されてしまうことが課題である。そこで本研究では、従来の培地組成の改良ではなく、細胞の側を改良することによって、無血清培地における細胞の増殖ポテンシャルを最大限に引き出すことを目的とする。具体的には、増殖因子受容体を安価な物質に応答する受容体となるように遺伝子工学的に改変し、これを細胞で発現させることで増殖活性の向上を目指す。

【実験方法・結果】インスリン受容体 (IR)、上皮成長因子受容体 (EGFR)、マクロファージコロニー刺激因子受容体 (c-fms) のリガンド認識部位を抗フルオレセイン一本鎖抗体と置換したキメラ受容体遺伝子を構築し、マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 に導入した。その結果、EGFR、c-fms キメラ受容体導入細胞は抗原濃度依存的に細胞増殖が促進された。一方、IR キメラ受容体を用いたキメラ受容体導入細胞については抗原非依存的な細胞増殖が見られた。

そこで、IR キメラ受容体について、コンフォメーションを変化させるために、細胞内ドメインの膜近傍領域にアラニン を 1~4 個挿入した改変体を構築し、Ba/F3 細胞に導入して増殖アッセイを行った結果、抗原濃度依存的に増殖誘導できる改変体を得ることができた。

【謝辞】本研究は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合からの再委託を受けて実施した。

Design of chimeric receptors for enhancing cell growth activity in serum-free culture

Masahiro Kawahara, Hideto Nakabayashi, Kento Tanaka, Teruyuki Nagamune
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words chimera, receptor, serum-free medium, mammalian cell

2P-252 レトロウイルスベクターを用いた CHO 細胞導入遺伝子高発現部位の探索

西島 謙一¹, 森 孔明¹, 上平 正道², 飯島 信司¹
(¹名大院・工, ²九大院・工)
nishijima@nubio.nagoya-u.ac.jp

【目的】部位特異的遺伝子組換え技術は近年進展が著しく、CHO 細胞の導入遺伝子高発現遺伝子座を見出すことが出来れば、生産性に優れた細胞株の樹立を効率化出来る可能性がある。そこで、部位特異的逐次遺伝子組込システム (Accumulative gene integration system, AGIS) への利用を念頭に、導入遺伝子を高発現する遺伝子部位の探索を目指した。

【方法】レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は、感染させるウイルス濃度を調節することにより目的遺伝子を 1 コピーのみ持つ細胞集団を大量に調製できる。そこで、ウイルスベクターにより eGFP 遺伝子を導入した CHO 細胞からセルソーターにより高発現細胞クローンを分離し、その遺伝子導入サイトを決定することを試みた。

【結果】CHO-K1 細胞にレンチウイルスベクターとレトロウイルスベクターを感染させ、発現強度を比較した。クローン化前の細胞集団では、レトロウイルスベクターにより eGFP を発現させた場合の蛍光強度の方が全般に高いことが認められ、これら二種類のベクターで得られる遺伝子導入部位のレパートリーが異なることが示唆された。

次に、セルソーターにより eGFP 高発現細胞を分離・クローン化した。eGFP 発現強度上位 1~4% 程度の細胞をソートし約 20 クローンを得た。レンチウイルスベクターで得られたクローンは、平均の約 5 倍の発現強度を示した。現在、この細胞の遺伝子挿入サイトを決定中である。

なお、本研究は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合からの再委託を受けて行われた。

Genetic locus supporting high expression of transgene in CHO cells

Ken-ichi Nishijima¹, Komei Mori¹, Masamichi Kamihira², Shinji Iijima¹
(¹Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words CHO, retrovirus vector