

2109-1 Fc 融合型ヒトエリスロポエチンの動物細胞での生産

○河邊 佳典¹, ベーノ カルロス², 井藤 彰¹, 上平 正道¹
(¹九大院・工・化工, ²九大院・シス生命)

我々はこれまでにトランスジェニック鳥類を生体バイオリアクターとして有用タンパク質生産に用いるための技術開発を行ってきたが、生産されたタンパク質に修飾された糖鎖構造は、卵白中よりも血中においてより高活性が期待できる構造であった。一方、組換えタンパク質をFc融合型とすることで鳥類の血中から卵黄中へ移行蓄積できることを報告してきた。そこで、ヒトエリスロポエチン (hEPO) のような糖鎖構造が生理活性に重要な役割を及ぼす場合、卵黄へ移行蓄積できるFc領域との融合タンパク質とすることで、血中で生産されたhEPOを卵黄で回収できるのではないかと考え、まずFc融合型hEPOの生産のためのレトロウイルスベクターの作製と動物細胞による生産を検討した。ニワトリβ-アクチンプロモーターの制御下で、hEPOと鳥類卵黄への移行蓄積効率が高いヒトIgG2由来のFc領域との融合タンパク質を発現ユニットにもつレトロウイルスベクタープラスミドを作製した。ウイルス外皮タンパク質としてVSV-Gを用いてウイルスベクターを調製し、CHO細胞に遺伝子導入した。GFP生産を指標にして、限界希釈法により高発現細胞株を樹立した。組換えCHO細胞によって生産されたFc融合型hEPOをウェスタンブロット法によって解析したところ、予想された分子量で検出することができた。

Production of human EPO/Fc fusion protein by recombinant animal cells

○Yoshinori KAWABE¹, Carlos A. Penno², Akira Ito¹, Masamichi Kamihira¹
(¹Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words erythropoietin, Fc fusion protein, transgenic avian

2109-3 CHO 細胞における染色体の識別及び再配列解析

○曹 溢華¹, 矢野 秀法¹, 木村 修一¹, 高木 康弘¹, 本田 孝祐¹, 大政 健史¹, 浅川 修一², 清水 信義³, 大竹 久夫¹
(¹阪大院・生命先端工学, ²慶大・医, ³慶大・先導研GSPセ)

【目的】抗体医薬を始めとするバイオ医薬品生産に多用されているChinese hamster ovary(CHO)細胞は、生産株構築過程において染色体のリアレンジメントが頻繁に生じる現象が観察されてきた。しかし、CHO細胞の染色体に対する簡便かつ正確な染色体分類法は未だ十分には確立されていない。そこで、本研究では、細胞株構築過程におけるCHO細胞の染色体リアレンジメントに着目し、簡便に各染色体が識別でき、且つ細胞株構築における染色体再構成を検証することも可能なBAC-FISHマーカーの構築を目的とした。

【方法、結果及び考察】本研究グループにおいて構築したDG44細胞株由来のdhfr遺伝子増幅株4N株のGenomic BAC libraryをFISH法を用いてBAC cloneを有する染色体を特異的に検出した。すなわち適切なBAC cloneを染色体識別マーカーとして利用することで、より正確なCHO細胞の染色体分類が可能となる。これまでは、4N株の平均20本の染色体のうち、15本の染色体に対して特異的に識別できるマーカーを構築した。さらに、構築したマーカーを用いて、細胞株構築における染色体再構成について検証するために、K1、4N及びDG44の3株間で比較を行った。その結果、3株間において安定的に保持される染色体も一部存在する一方、頻繁な染色体の再配列を示唆する結果も観察された。

Construction of chromosome marker in CHO cells

○Yihua Cao¹, Hidenori YANO¹, Shuichi KIMURA¹, Yasuhiro TAKAGI¹, Kohsuke HONDA¹, Takeshi OMASA¹, Shuichi ASAKAWA², Nobuyoshi SHIMIZU², Hisao OHTAKE¹
(¹Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering Osaka University, ²Keio University)

Key words CHO, chromosome marker, rearrangement

2109-2 CHO 細胞遺伝子増幅メカニズムの解明にむけた染色体上増幅領域の配列解析

○高木 康弘¹, 矢野 秀法¹, 曹 溢華¹, 朴 俊映¹, 大政 健史¹, 浅川 修一², 清水 信義³, 大竹 久夫¹
(¹阪大院・生命先端工, ²慶大・医, ³慶大・先導研GSPセ)

【目的】抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の生産系にはChinese hamster ovary (CHO)細胞に代表される本来の発現系に近い動物細胞を宿主として用いる必要がある。しかし、動物細胞を用いた場合、微生物に比べ、増殖速度が低い、培地が高価であるといった問題点が存在するため、高発現CHO細胞株を構築する際には遺伝子増幅現象が用いられているが、遺伝子増幅領域の染色体配列や増幅のメカニズムについて十分には明らかになっていない。そこで、遺伝子増幅のメカニズムの解明を目指し、CHO細胞における染色体上の遺伝子増幅にかかる近傍領域の配列を解明することを目的とした。

【方法、結果及び考察】本研究においてdhfr遺伝子とその阻害剤であるMTXを用いて構築した遺伝子増幅CHO細胞DR1000L-4N株を用いて構築した、約12万cloneからなるBacterial Artificial Chromosome (BAC) libraryに基づいて、遺伝子増幅に関連する染色体領域の取得を試みた。BAC libraryからdhfr cDNA配列を保持しているcloneを11個選択し、その中の1つのcloneの配列解析をshotgun sequence法を用いて行ったところ、dhfr遺伝子増幅に関連する染色体近傍領域の配列が得られ、IR構造をとっていることが推定された。

Analysis of gene-amplified chromosomal region in Chinese hamster ovary cells

○Yasuhiro TAKAGI¹, Hidenori YANO¹, Yihua CAO¹, Joon Young PARK¹, Takeshi OMASA¹, Shuichi ASAKAWA², Nobuyoshi SHIMIZU³, Hisao OHTAKE¹
(¹Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Keio University School of Medicine, ³Keio University)

Key words Chinese hamster ovary cell, genome, BAC library

2110-1 魚血清を用いた CHO 細胞の接着培養における血清濃度の影響

○塚田 亮平¹, 藤原 政司¹, 塩谷 格², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²日水中研)

【目的】医薬生産や再生医療などを目的とした動物細胞培養では、安全上の問題からウシ胎仔血清 (FCS) を添加せずに動物細胞を培養する技術の開発が強く求められている。これに対して、ヒトに感染するウイルスが報告されていない魚血清 (FS) をFCSの代わりに添加した培地でチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を接着培養したところ、FS は細胞接着を阻害するが、細胞増殖を促進することが明らかとなった。そこで、FSによるCHO細胞増殖の促進効果をさらに改善するために、FSの添加濃度を検討した。

【方法】ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (hGM-CSF) 産生性CHO DR1000L4N株を24ウェルプレートに、10% FCSを含むHam's F12K培地を用いて播種 (2×10^4 cells/cm²) し、37℃、5% CO₂雰囲気下で24 h接着後、FS (プリ: *Seriola quinqueradiata*) またはFCSを種々の濃度 (0, 0.31, 1.25, 5, 10, 20%) 含むHam's F-12K培地に交換し、120 hまで増殖させた。細胞数は脱核染色法で測定した。

【結果】5~20%の範囲のFCS濃度で増殖が良好であったが、5%以下で細胞増殖が低下した。それに対して、5~20%の高濃度FSでは増殖細胞数が著しく少なかったが、0.31および1.25%では良好に増殖した。1.25%のFS添加培地では平均世代時間35 hで到達細胞密度も 1.4×10^5 cells/cm² となり、10% FCS培地の場合 (26 h, 2.9×10^5 cells/cm²) に近い成績を示した。

Effect of concentration of fish serum on adhesion culture of CHO cells

○Ryouhei Tsukada¹, Masashi Fujiwara¹, Itaru Shioya², Mutsumi Takagi¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Nissui Central Reserch Labo.)

Key words fish serum, serum concentration, CHO cell, animal cell