

2Bp18 培養プロセスにおける増殖ポテンシャルの定量評価に関する研究

○野口 展士¹, 幡多 徳彦², 野中 一洋³, 舟久保 昭夫¹
⁽¹⁾電機大院 理工, ⁽²⁾電機大学・フロンティア共研セ, ⁽³⁾McGowan Inst. Univ. Pittsburgh)
 11udq01@ms.dendai.ac.jp

【背景および目的】

細胞医療において用いる細胞組織の生産工程は、管理、品質維持のために細胞から組織形成に至るまでの工程での評価技術が重要である。培養細胞は個々に異なる性質を有しており、細胞の運動機能や形態は培養の経過とともに変化するため、細胞機能や寿命は細胞組織の形成プロセスにおいても変化する。そのため、組織形成プロセスにおける細胞挙動の定量的な評価指標について検討する必要がある。本研究では、細胞から組織に至る培養中の細胞集団に着目し、培養プロセスにおける個別細胞の細胞寿命に関連した細胞増殖能評価を目的とした。

【方法および結果】

実験にはヒト肺静脈血管平滑筋細胞 (HPASMC) を用い、組織培養用 12well plate に 0.25×10^4 cells/cm² の濃度で接種し、温度 37℃、5%CO₂ の培養環境下において 10 分間隔で 7 日間のタイムラプス撮影を行い、得られた細胞画像について非侵襲かつ定量的な評価・解析を行った。その結果、継代回数の増加に伴い、個別細胞の移動は、速い移動をする細胞割合が減少する傾向が確認された。一方、細胞投影面積は増加する傾向が確認された。これらの結果を基に新たに細胞寿命の評価指標として面積あたりの移動量を算出し、細胞増殖との関係性を検討した。その結果、細胞増殖に伴い、細胞寿命は線型的に減少することが確認された。以上のことより、培養プロセスにおいて細胞面積と細胞移動を計測することで、細胞寿命を予測することが可能と示唆された。

Study on evaluation of cell growth potential in cell culture process

○Hiroo Noguchi¹, Norihiko Hata², Kazuhiro Nonaka³, Akio Funakubo¹
⁽¹⁾Grad. Sch. Sci. Eng. Tokyo Denki Univ., ⁽²⁾FRDC. Tokyo Denki Univ., ⁽³⁾McGowan Inst. Univ. Pittsburgh)

Key words Cell behavior, Image processing, Passage culture, Cell growth potential evaluation

2Bp20 肝特異的転写因子を誘導発現可能なヘパトーマ細胞の肝機能評価

○山元 秀晃, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道
 (九大院・工・化工)
 kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】近年、肝不全の治療法として人工装置と肝細胞を組み合わせたバイオ人工肝臓システムの開発が進められている。バイオ人工肝臓システムに用いられる細胞源としては、培養が困難な初代肝細胞の代わりに、培養が容易で増殖可能なヘパトーマ細胞がしばしば用いられるが、この細胞は初代肝細胞に比べ肝機能発現が低い。以前より我々は、肝機能発現を転写レベルで調節する肝特異的転写因子を用いて、ヘパトーマ細胞の肝機能を向上させる試みを行っており、転写因子群を誘導可能な発現ユニットとして細胞に導入することで、増殖と肝機能発現を切換え可能なヘパトーマ細胞の樹立に成功している。本研究では、このヘパトーマ細胞の肝機能発現について詳細な解析を行った。

【実験方法・結果】ドキシサイクリン (Dox) の添加によって、8 種類の肝特異的転写因子を発現誘導可能なヘパトーマ細胞株 (Hepa/8F5) を樹立し、この細胞に対し種々の肝機能評価を行った。その結果、Dox 添加によって、アルブミン分泌能やシトクロム P450 活性といった代表的な肝機能が顕著に向上し、初代肝細胞に匹敵するレベルに達することが分かった。また、リアルタイム PCR 法によって肝関連遺伝子の転写レベルでの発現量を解析した結果、アポリポタンパク質、グルコース 6-ホスファターゼ、アシアロ糖タンパク質レセプターなど様々な肝特異的遺伝子の発現が、Dox 添加によって、有意に向上することが分かった。これらの結果から、この遺伝子改変ヘパトーマ細胞は、バイオ人工肝臓システムや肝細胞研究において有用な細胞になり得ると考えられる。

Functional evaluation of genetically engineered hepatoma cells

○Hideaki Yamamoto, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira
 (Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Hepatoma cells, liver-enriched transcription factor, liver function, bioartificial liver

2Bp19 人工合成プロモーターを用いたニワトリ卵管特異的遺伝子発現

○原田 翔太, 河邊 佳典, 黒原 健志, 井藤 彰, 上平 正道
 (九大院・工・化工)
 kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景】

我々はこれまでに、レトロウイルスベクターを用いて、卵を含めた全身で組織タンパク質を高発現させる遺伝子組換え鳥類の作製に成功している。しかし、ニワトリ個体の生理に影響を及ぼすタンパク質を生産させる場合、全身発現では困難であり、胚発生や目的タンパク質生産に障害を引き起こす恐れがある。そこで、主要卵白タンパク質の最小プロモーター領域を Tet システムと組み合わせ、転写活性化タンパク質 (tTA) のポジティブフィードバックを働かせることで、卵管特異的に目的タンパク質を高発現させるための合成プロモーターシステムを開発してきた。本研究では、人工合成プロモーターを組み込んだレトロウイルスベクターを用いて、遺伝子導入ニワトリにおける導入遺伝子の卵管特異的発現を解析した。

【方法・結果】

ニワトリオボアルブミンまたはコンアルブミン遺伝子の TATA ボックス周辺プロモーター領域を、TRE 配列下流に配置した卵管特異的合成プロモーターを設計した。DsRed および tTA 遺伝子を合成プロモーターにより発現制御されるユニットとしてレトロウイルスベクターに組込んだ。これらのベクターを用いて遺伝子導入ニワトリの作製を行った。得られた個体の卵管組織を含む各組織における発現を RT-PCR で評価したところ、卵管組織特異的に DsRed 遺伝子発現が認められた。また、卵管組織切片において特異的に DsRed の赤色蛍光が観察された。tTA 発現ユニットを組み合わせた場合では、tTA 発現のポジティブフィードバック作用による DsRed の発現上昇を確認できた。

Chicken oviduct-specific gene expression using synthetic hybrid promoter system

○Shota Harada, Yoshinori Kawabe, Takeshi Kurohara, Akira Ito, Masamichi Kamihira
 (Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Transgenic avian bioreactor, Oviduct-specific gene expression, Synthetic hybrid promoter, Tet system

2Bp21 組換え昆虫細胞による scFv-Fc 融合タンパク質の生産

藺田 啓之¹, 熊田 陽一², 勝田 知尚¹, 〇山地 秀樹¹
⁽¹⁾神戸大院・工・応化, ⁽²⁾京工機大院・工芸科学)
 yamaji@kobe-u.ac.jp

【背景】昆虫細胞-バキュロウイルス系は、本来の立体構造や機能を保持した組換えタンパク質の発現系として広く利用されている。しかしながら、本系はバキュロウイルスの感染により宿主昆虫細胞が死滅してしまうため、目的タンパク質を連続的に生産できないなどの欠点を有する。これに対し、プラスミドを用いて外来遺伝子を昆虫細胞に導入して安定形質転換細胞を作製し、目的タンパク質を連続的に生産する安定発現系が検討されている。本研究では、抗体 Fc フラグメントと融合した一本鎖抗体 (scFv-Fc) の組換え昆虫細胞による分泌生産を試みたので報告する。

【実験方法・結果】マウス抗ウシ ribonuclease A 抗体である 3A21 の VH、VL ドメイン、および (G₄S)₃ リンカーからなる scFv とヒト IgG1 の Fc との融合タンパク質をコードする遺伝子を *Drosophila* 由来の Bip シグナル配列とともに、カイコ由来のアクチンプロモーターの上流にバキュロウイルス由来のトランス作用因子 IE1 とエンハンサー HR3 を有するプラスミドに挿入した。得られた発現ベクターと、選択マーカーを有するプラスミドを *Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) にコトランスフェクションし、薬剤存在下で培養することにより、安定形質転換細胞を得た。培養上清を酵素免疫測定法で分析したところ、抗原結合活性を有する scFv-Fc が分泌発現していることを確認した。振とう培養において約 60 mg/L の scFv-Fc を分泌生産する高発現株が得られた。

Production of single-chain Fv-Fc fusion protein by recombinant insect cells

Hiroyuki Sonoda¹, Yoichi Kumada², Tomohisa Katsuda¹, 〇Hideki Yamaji¹
⁽¹⁾Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ⁽²⁾Dept. Chem. Mats. Tech., KIT)

Key words insect cell, stable expression, single-chain variable fragment, Fc fusion protein