

2P-265 ゲノムライブラリーを利用した CHO 細胞の各染色体の安定性と配列解析

○山野 範子^{1,2}, 高橋 舞³, Frank Jana^{1,2}, 鬼塚 正義^{1,2}, 白井 昭博¹, 大政 健史^{1,2,4}
 (1徳島大院・ソシオ, 2MAB組合, 3徳島大院・先端技科, 4阪大院・工)
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞は、バイオ医薬品生産を司る主要な宿主細胞である。細胞のゲノム情報は生産細胞を構築する際の重要な情報基盤であり、Chinese hamster および CHO 細胞株ゲノムのドラフト配列 (約 2.5 Gb) が公開されているが、染色体上の位置は不明である。我々はこれまでに、CHO ゲノムバクテリア人工染色体 (BAC) ライブラリーを構築し、CHO DG44 株、K1 株ならびに Chinese hamster の染色体に対応する物理地図を作成している。ライブラリーは、150-300 kb 程度と 100-150 kb 程度の 2 つの画分から構成される。本研究では、染色体上の位置が特定された 304 種類の BAC クローンの配列解析を、HiSeq を用いて行った。また、インサート由来配列のアセンブルを行い、100 kb と 180 kb 程度をピークとしたアセンブル結果を得た。本解析により、BAC 配列を指標とし、ゲノム配列の染色体上の位置を明らかにすることが一部可能となった。我々はまた、染色体数変化の起こりやすい CHO 細胞において、BAC-fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いた解析から、特定の染色体が増減する結果を得た。この結果は、CHO 細胞の各染色体の安定性が異なることを示唆する。各染色体の安定性の違いとその配列情報は、より効果的なベクター導入位置を探索するための、強力なツールと成り得る。

Stability difference and sequence analysis of each chromosome in CHO cells by using the genomic library

○Noriko Yamano^{1,2}, Mai Takahashi³, Jana Frank^{1,2}, Masayoshi Onitsuka^{1,2}, Akihiro Shirai¹, Takeshi Omasa^{1,2,4}
 (1Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., 2MAB, 3Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., 4Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Chinese Hamster Ovary cells, chromosome, sequence analysis, aneuploidy

2P-266 CHO 細胞を宿主とした重鎖抗体の発現及び精製の試み

○香川 悠馬¹, 鬼塚 正義^{2,3}, 山野 範子^{2,3}, 白井 昭博², 大政 健史^{2,3,4}
 (1徳大院・先端技術, 2徳大院・ソシオ, 3MAB組合, 4阪大院・工)
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【序論】近年、従来のヒト IgG1 抗体と構造フォーマットが異なる重鎖抗体が注目されている。重鎖抗体の抗体医薬への展開が期待されていると同時に、今後その生産系構築が必要とされる。当研究室ではサメ由来 IgNAR をモデル抗体とした重鎖抗体の生産系構築を試みている。現在、CHO 細胞を生産宿主とした抗体医薬生産では、Protein A クロマトグラフィー精製が基盤技術として確立しており、IgNAR においても同様に精製出来る事が生産系構築において必要である。そこで、本研究では Protein A で精製可能になるような IgNAR 配列改変を試み、生産系構築への有用性を検討することとした。

【方法および結果】Protein A と IgG1-Fc 複合体の立体構造(PDB: 1L6X)に基づき、ROBETTA による Computational Ala Scanning を実施した結果、14 個のアミノ酸残基が Protein A 結合に重要であると予測された。配列解析の結果、IgG1-Fc と相溶性の高い IgNAR C2-C3 及び C4-C5 には Protein A 結合性残基が存在しなかった。そこで Protein A 結合部位を導入した改変型 C2-C3 及び C4-C5 配列を設計し Homology modeling による立体構造予測を行った所、改変部位を含めて IgG1-Fc 様の立体構造を取る事が予想され、C2-C3 の方が高い構造収束性を示しているため、Protein A 結合部位の移植に許容性が高いと考察された。今後、改変配列を CHO 細胞で発現させ、Protein A 精製を試みる予定である。

Expression and purification of IgNAR heavy chain antibody in CHO cells

○Yuma Kagawa¹, Masayoshi Onitsuka^{2,3}, Noriko Yamano^{2,3}, Akihiro Shirai², Takeshi Omasa^{2,3,4}
 (1Grad. Sch. of Adv. Tech. & Sci., Tokushima Univ., 2Inst. Tech. and Sci., Tokushima Univ., 3MAB, 4Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.)

Key words heavy chain antibody, IgNAR, chinese hamster ovary (CHO) cells, protein A

2P-267 凝集抑制物質を用いた抗体生産 CHO 細胞培養とそのメタボローム解析

○鬼塚 正義^{1,2}, 大賀 拓史³, 東條 繁郎³, 大政 健史^{1,2,4}
 (1徳島大院・ソシオ, 2MAB組合, 3HMT, 4阪大院・工)
 onitsuka@tokushima-u.ac.jp

【背景と目的】

抗体医薬品の工業生産を担う CHO 細胞の培養では、培養方法が生産物としての抗体収量及び抗体品質に直結している。従って、抗体品質と収量の向上を両立させる培養法の確立が必要である。本研究では品質制御物質としてトレハロースを添加した IgG1 産生 CHO 細胞の抗体品質と抗体生産量の解析、及び細胞内代謝物を評価した。

【方法】

ヒト型 IgG1 産生 CHO 細胞の無血清浮遊培養を実施した。精製抗体をゲル濾過分析し凝集体量を評価した。培養過程で細胞内代謝物の抽出を行い、CE-TOFMS 分析により代謝物の同定及び濃度定量を行った。

【結果と考察】

トレハロース添加培養ではコントロールと比較して、凝集抗体量の低減による品質向上及び抗体比生産速度の上昇による抗体収量の増加が認められた。中心代謝解析の結果、トレハロース添加培養では培養初期に解糖系代謝が抑制され、後期には好気呼吸の亢進によるエネルギー生産が認められた。この結果より培養後期のエネルギー生産が長期間にわたる安定な抗体生産をもたらすと考察された。

Cell culture of IgG1-producing CHO cells in the presence of anti-aggregation additive and its metabolome analysis

○Masayoshi Onitsuka^{1,2}, Takushi Ouga³, Shigeo Tojo³, Takeshi Omasa^{1,2,4}
 (1Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., 2MAB, 3HMT Inc., 4Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Industrial antibody production, CHO cell culture, trehalose, CE-TOFMS

2P-268 逐次遺伝子組み込みした CHO 細胞におけるインスレーターによる scFv-Fc 発現増強

○小松 将大¹, 稲生 崇規², 河邊 佳典¹, 井藤 彰¹, 上平 正道¹
 (1九大院・工, 2九大院・シス生科)
 kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】我々はこれまでに、細胞ゲノム上の特定の配列に複数の目的遺伝子を組み込むことが可能な逐次遺伝子組み込みシステム (AGIS) を開発している。インスレーター配列は安定的に遺伝子発現可能な DNA シス配列である。本研究では、目的遺伝子である scFv-Fc 発現ユニットにインスレーター配列を配置し、逐次遺伝子組み込み CHO 細胞における scFv-Fc 生産を評価した。

【方法】scFv-Fc 発現ユニットの両側にインスレーター配列を配置したプラスミドを Cre 発現ベクターとともに CHO/P12G 細胞に導入した。導入後、各ドナープラスミドがゲノム上の特定位置へ組み込まれたときのみに見られる蛍光細胞を FACS で単離した。培養上清中の scFv-Fc 生産濃度は ELISA 法で測定した。

【結果と考察】scFv-Fc 発現ユニットが 1 コピー組み込まれた CHO 細胞の scFv-Fv 生産性と安定性を評価したところ、インスレーター配列をもたない細胞と比べて、高い生産性と長期安定性を示した。2 コピー目の発現ユニットを AGIS により組み込み、scFv-Fc 生産性を評価したところ、発現ユニット数の増加に伴って scFv-Fc 生産性のさらなる向上が見られた。

(本研究は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の再委託により助成を受けて実施した。インスレーター配列は Toyobo より提供された。)

Enhanced production of scFv-Fc in recombinant CHO cells using insulator element

○Shodai Komatsu¹, Takanori Inao², Yoshinori Kawabe¹, Akira Ito¹, Masamichi Kamihira¹
 (1Fac. Eng., Kyushu Univ., 2Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words Accumulative gene integration, Cre/LoxP system, scFv-Fc