

チャイニーズハムスター卵巢由来細胞(CHO細胞) 由来配列の応用

－ Power Express Element[®]－ を用いたバイオ医薬品生産ベクター

大阪大学大学院工学研究科

生命先端工学専攻物質生命工学コース 教授 大政 健史

動物細胞の産業応用は1970年代のワクチンの細胞培養での生産に始まり、無限増殖能を持つ細胞株を用いた生理活性物質の生産を経て、1980年代の遺伝子組換え技術の発展に伴い、組換え蛋白質生産の宿主細胞として用いられるようになった。さらに近年では、細胞そのものを医薬品・食品の機能性・安全性・毒性評価の手段としてや、細胞治療として用いる用途も拡大しており、細胞生物学や細胞培養工学・細胞工学など、近年の急速な生物学・生物工学分野における様々な技術的、工学的発展の受け皿としての社会実装の対象としても注目されている。

実際に動物細胞の大きな産業利用の対象はバイオ医薬品(蛋白質医薬品)の生産宿主細胞としての用途である。現在の工業用スケールの細胞培養においては、数千Lから数万Lの培養槽が開発され、年間でトン単位での蛋白質医薬品生産がなされている^{1,2)}。

バイオ医薬品においては、現在欧州とアメリカに上市されているバイオ医薬品の生産宿主として品目数ベースで30%程度が動物細胞と推定されているが、その中でも抗体医薬品においては、日米欧のいずれかで上市されている71品目のうち、68品目が動物細胞を用いて生産されている³⁾。

世界の医薬品産業を取り巻く状況はここ10年で大きく変化し、現在、抗体医薬品は、世界の医薬品売上トップ10のうち、6品目をしめており、世界の製薬産業の成長エンジンとして今後も期待されている⁴⁾。一時期、抗体医薬のターゲットとなる抗原の枯渇論が沸き上がり、抗体医薬の成長についても疑問視されていたが、現状では同じターゲットに対しても様々な抗体医薬品が開発され、二重特異的抗体や、抗体-薬物複合体(ADC)さらに抗体と細胞治療の組合せなど、抗体のフォーマットを用いた新規抗体医薬品も、様々な形で発展してきている。

さて、このように発展してきている動物細胞の産業応用であるが、日米欧のいずれかで上市されている抗体医

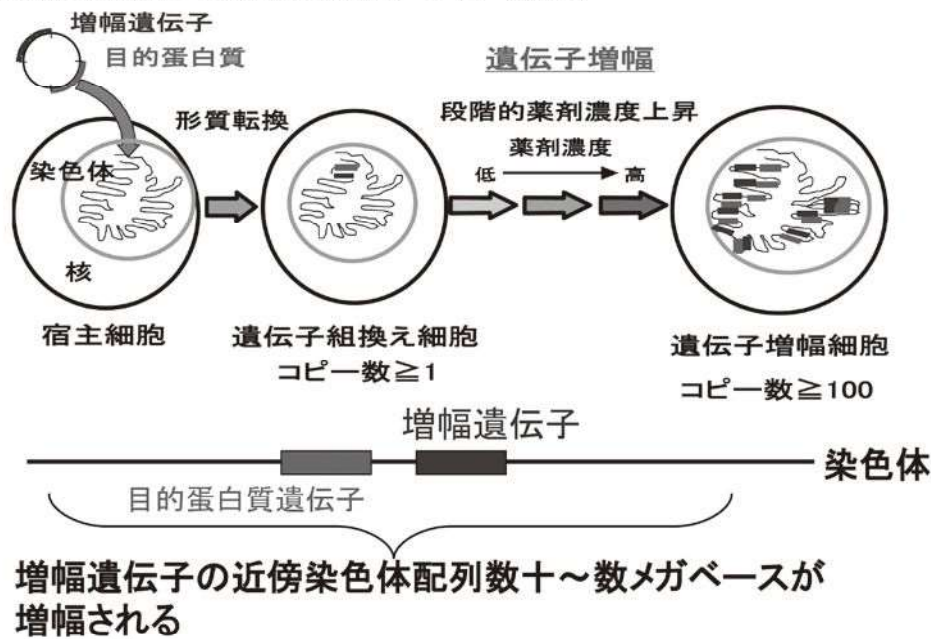
薬品のうち、42品目、実に60%の宿主として用いられているのがChinese Hamster Ovary (CHO) 由来のCHO細胞である。CHO細胞は1958年にPuckらによってチャイニーズハムスター卵巢組織から樹立され⁵⁾、Kaoらにより1968年に分離された亜種CHO-K1細胞株がATCCに登録されている。

さて、小生は大阪大学に奉職した1992年から、バイオ医薬品生産プロセスにおける細胞構築プロセスに着目し、CHO細胞そのものの研究をおこなってきた。当時は細胞構築プロセスについての研究はあまり注目されておらず、CHO細胞もバイオ医薬品の宿主としては数ある候補細胞株の一つにすぎず、上市された品目も数品目程度であった。CHO細胞の特徴は、遺伝子増幅現象にある。遺伝子増幅は、ある特定の遺伝子と阻害剤の組合せによって引き起こされるが、この現象は特にCHO細胞において観察されることが報告されている⁶⁾。

現在、産業応用されているCHO細胞株はCHO-K1由来細胞株もしくはコロンビア大学のChasinによって樹立されたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)欠損株であるCHO DG44細胞株⁷⁾が主なものである¹⁾。CHO DG44細胞が多用されている理由は、遺伝子増幅の際のセクションが容易になるようにDHFRを欠損させている点にある。

遺伝子増幅とはある特定の遺伝子がゲノム中に本来あるコピー数より増加する現象である。元々はガンの耐性メカニズムとして知られている現象であるが、目的遺伝子と*Dhfr*遺伝子を同時に細胞に導入してDHFRの阻害剤であるメトトレキセート(MTX)にて選択することにより、目的遺伝子共々*Dhfr*遺伝子、さらに近傍のゲノム領域も同時に増幅することにより高生産株を構築できる(図)⁶⁾。CHO DG44細胞は、この遺伝子増幅に適した宿主細胞として樹立された細胞であり、ライセンスの簡便さや、Chasinから分与されることにより幅広く用いられている。

動物細胞宿主構築・遺伝子増幅を用いてコピー数増加



小生は、特に細胞構築時における遺伝子増幅プロセスについて着目し、様々な遺伝子増幅条件において細胞を構築し、構築された細胞の性質について検討を重ねてきた。その結果、段階的にMTX濃度を上昇させて遺伝子増幅細胞株を構築した場合において、効率よく増幅細胞が構築できることを見出した^{8,9)}。また、複数の遺伝子増幅CHO細胞における遺伝子増幅位置について、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を用いて解析した結果、外来 *Dhfr* が、ある特定の染色体の特定位置において極めてコピー数が高く増幅している事を見いだした。

遺伝子増幅現象においては、外来から導入された遺伝子のゲノム内での増幅構造はこれまで十分には解明されてはいなかった。そこで、構築した細胞株の中でも、最も生産性が高く、コピー数も100コピー以上に遺伝子増幅されたCHO-DR1000L-4N細胞を遺伝子増幅構造の解明の対象として選択した。本細胞株からヒトゲノム解析にも用いられた手法であるバクテリア人工染色体ライブラリー (BACライブラリー) を構築し、構築した12万クローンから遺伝子増幅領域を含む7つのBACクローンを選択した¹⁰⁾。そのうち、BAC clone Cg0031N14を選択してショットガンシーケンスを行い、168 kbの長さの特定染色体領域由来のゲノム配列を明らかにした¹⁰⁾。その結果、増幅構造が巨大なIR構造をとっていることが明らかになった^{10,11)}。得られた構造における外来遺伝子は巨大なIR構造に挟まれた小さなIR構造をとっており(図)、この構

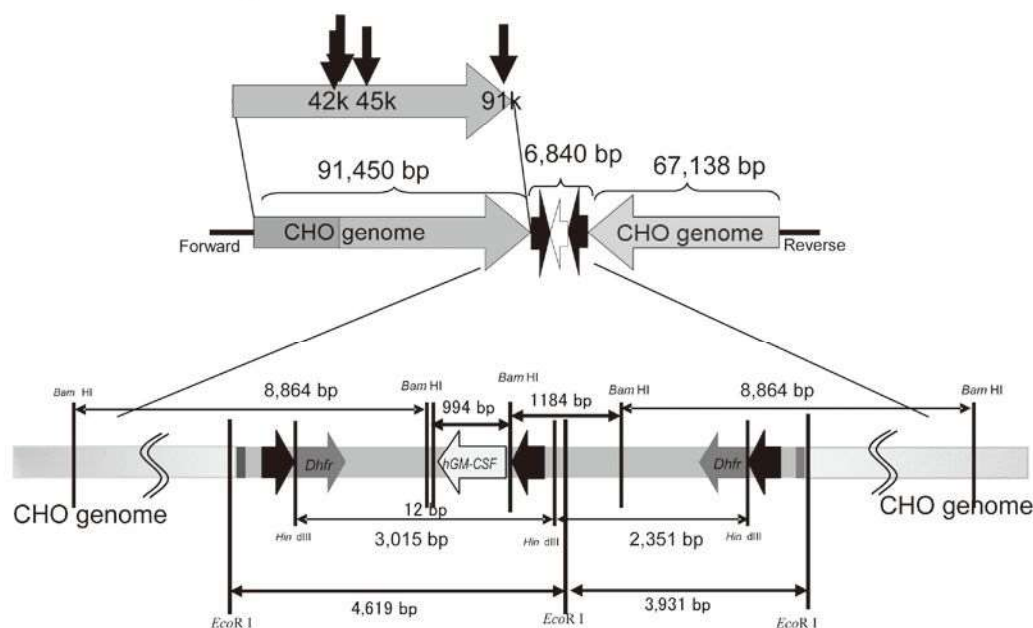
造を持つプラスミドを細胞に導入したところ、元の構造をもつプラスミドに比較して、より早くMTX耐性を獲得し、高発現細胞の出現割合が上昇した¹¹⁾。

さらに、我々は、このIR構造以外に、同時に増幅されたゲノム領域に何らかの安定性・高生産性に関連する機能配列が存在するのではと考えた。すなわち、ゲノム上の高発現を実現可能な領域であるHot spot周辺の染色体上にインスレーター様の何らかの遺伝子発現を安定化するような配列が存在すると仮定し、その探索を試みた^{12,13)}。

挿入遺伝子の周囲の配列から配列中のCTCFの結合配列モチーフの予測部位に基づいて、遺伝子発現安定化配列の候補を4つ見出し、それらの因子の発現に及ぼす影響について検討した。その結果、最も発現上昇効果の大きかった配列を選択し、本配列を「Power Express Element」と命名した。また、本エレメントを用いることにより、長期継代時においても安定して発現を維持できることも見出している。現在、本エレメントは共同研究先の東洋紡に導出され、本エレメントを含む哺乳類細胞タンパク質高発現システムMammalian Power Express System[®]として、市販されている¹⁴⁾。本発現系を用いることによってg/Lオーダーの抗体生産を達成することができ、バイオ医薬品の生産のみならず、医薬品、診断薬、検査キット用の高発現システムとして実用化されている。また、つい先日

の本年3月7日に、日本動物細胞工学会2016年度技術賞を「哺乳類細胞タンパク質高発現システムMammalian

CTCF-binding site motif



BAC clone : Cg0031N14 (168 kb)の構造 長大なIR(逆位繰り返し)構造となっている。

Power Express System[®]の開発」(西井 重明、山崎 友実 (東洋紡株式会社)、大政 健史 (大阪大学大学院工学研究科))として受賞している。

本稿にて紹介した著者らの研究は、大阪大学大学院工学研究科および徳島大学においてなされたものである。共同研究者の皆様方に感謝いたします。

参考文献

- 1) Omasa, T. *et al.*, Curr. Pharm. Biotechnol., **11**:233-240 (2010).
- 2) 大政健史, 生物工学会誌, **91**, 507(2013).
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部資料
<http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/Mab-T1-180212.pdf> (2018年2月12日現在)
- 4) 特許庁特許出願技術動向調査「抗体医薬」平成26年度
https://www.jpo.go.jp/shiryou/pdf/gidou-houkoku/26_11.pdf (2018年3月16日現在)
- 5) Puck, T.T. *et al.*, J Exp. Med., **108**: 945-956 (1958).
- 6) Omasa, T.: J. Biosci. Bioeng., **94**, 600-605 (2002).
- 7) Urlaub, G. and Chasin, L.A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **77**, 4216-4220 (1980).
- 8) Yoshikawa, T.*et al.*, Cytotechnology, **33**, 37-46 (2000).
- 9) Yoshikawa, T.*et al.*: Biotechnol. Prog., **16**, 710-715 (2000).
- 10) Omasa, T.*et al.*: Biotechnol. Bioeng., **104**, 986-994 (2009).
- 11) Park, J.Y. *et al.*: J. Biosci. Bioeng., **109**, 504-511 (2010).
- 12) Y.Takagi *et al.*, Cytotechnology, **69** (3), 451-460 (2017).
- 13) 山崎知実、増田兼治、西井重明、川上文清、大政健史
遺伝子発現安定化エレメント 特許第4568378号
- 14) http://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=116

(醗酵 昭和61年卒 昭和63年修士 平成4年博士)