

バイオ医薬品生産のための遺伝子増幅システムおよび発現ユニットの開発

稲生, 崇規

<https://hdl.handle.net/2324/1500537>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 稲生 崇規

論 文 名 : バイオ医薬品生産のための遺伝子増幅システムおよび発現ユニットの開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

近年、抗体医薬などに代表される医薬品タンパク質が、特異性や生体適合性の高さから非常に劇的な効果をあげている。医薬品タンパク質の生産は、タンパク質構造の複雑さや不安定さから、遺伝子組換え動物細胞に依存している。そのため、低分子医薬品などの化学合成と比べて生産性は著しく劣り、需要の高さに対して生産が追いついていない。この生産性の低さに伴い医薬品タンパク質の薬価は非常に高くなっており、有用性を認められながらも未だ一般的に使用されているとは言い難い。これまでに様々な観点から生産性向上のための研究が行われてきており、その中でも遺伝子増幅法や発現ユニットの構築は目的有用物質の生産性にダイレクトに影響を与える手段である。本研究では、「遺伝子増幅」と「発現ユニットの構築」に着目した。まず、遺伝子増幅においては、当研究室で開発された逐次遺伝子組込みシステム (AGIS) の目的遺伝子の細胞ゲノムへの組込み効率を高めることを試みた。次に、発現ユニットの構築においては、インスレーター配列を用いることによる目的物質の発現量の変化を検証した。

第1章では、本研究の背景および目的について記載した。

第2章では、本研究における既往の研究について述べた。

第3章では、AGISの目的遺伝子組込み効率向上のための変異 *loxP* 配列の探索を行った。AGISはCre組換え酵素と、その認識配列である *loxP* 配列を用いることで細胞ゲノムの部位特異的に目的遺伝子を繰り返し組込むことのできる遺伝子増幅システムである。*loxP* 配列とは、34 bpのDNA配列であり、8 bpのスペーサー領域と13 bpの回文配列である2つアーム領域から構成されている。本研究では、スペーサー領域を wild-type 配列を含む13種類の配列と、アーム領域の左右2種類ずつの変異配列を組み合わせた、計52種類の変異 *loxP* 配列の組込み反応効率を検証した。まず、変異 *loxP* 配列の組込み効率を評価するための *in vitro* 評価系を構築した。構築した評価系を用いて、変異 *loxP* 配列の組込み効率を測定した結果、これまでにAGISで使用されていた変異 *loxP* 配列よりも高い組込み効率を示す変異 *loxP* 配列を複数見出すことができた。さらに、各種変異 *loxP* 配列の反応特異性を評価した。AGISでは、使用する複数の変異 *loxP* 配列の反応特異性が担保されなければ目的遺伝子を逐次に組込むことができない。よって、変異 *loxP* 配列の反応特異性はスクリーニングにおいて注目しなければならないポイントである。異なるスペーサー領域間のCre組換え酵素による反応性を評価し、同じスペーサー領域間の組込み効率の結果から、AGISに適すると考えられる変異 *loxP* 配列をスクリーニングすることができた。

in vitro 評価系においてスクリーニングされた変異 *loxP* 配列をAGISに適応し、細胞内における目的遺伝子の組込み効率を測定した。細胞内における組込み効率の測定には、細胞ゲノム上の蛍光遺伝子を切り替え、その遺伝子が切り替わることによる細胞の蛍光を計数することにより組込み効率

を測定した。その結果、*in vitro* 評価系においてスクリーニングされた変異 *loxP* 配列は、これまでに AGIS で用いられていた変異 *loxP* 配列よりも 2.8 倍~3.8 倍高い細胞ゲノムへの目的遺伝子の組み込み効率を示した。本研究により、AGIS の目的遺伝子組み込み効率の向上に成功することができた。

第 4 章では、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞より単離されたインスレーター配列を用いて目的物質の生産性の評価を行った。本研究では、細胞ゲノム部位特異的遺伝子組み込みにより、同じゲノムローカスでインスレーター配列の配向性が及ぼす目的物質の発現量を評価した。生産性評価には、物質生産のモデルとして **single chain Fv (scFv) -Fc** を用いた。*scFv-Fc* 遺伝子発現ユニットの脇にインスレーター配列を様々な配向性で配置した部位特異的遺伝子組み込み用ドナープラスミドを作製し、作製したドナープラスミドを Cre 発現プラスミドと組換え CHO 細胞に共導入し、*scFv-Fc* 生産 CHO 細胞株を樹立した。

まず、種々の *scFv-Fc* 生産細胞株の増殖増殖能および *scFv-Fc* 生産性を測定した結果、どの細胞株においても細胞増殖速度に変化はなく、*scFv-Fc* 発現ユニットをインスレーター配列で挟むことにより、*scFv-Fc* 生産性が最大 2.5 倍まで向上した。次に、定量 PCR を用いて *scFv-Fc* 遺伝子の転写量を測定した。その結果、*scFv-Fc* 発現ユニットをインスレーター配列で挟むことにより、目的遺伝子転写量が最大 3 倍まで高くなっていることが明らかとなった。最後に、*scFv-Fc* 発現ユニットの両脇にインスレーター配列を配置した生産細胞株とインスレーター配列を配置していない細胞株の長期培養における *scFv-Fc* 生産性の評価を行った。その結果、発現ユニットの両脇にインスレーター配列を配置することにより、生産量の減少を抑えることができた。これらの結果から、CHO 細胞より単離されたインスレーター配列は有用物質生産に有効な遺伝子である可能性が示唆された。

第 5 章では、本研究の総括を行い、本研究に基づく今後の展望について述べた。