

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				
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	上平	正道
	副 査	九州大学	教授	片山	佳樹
	副 査	九州大学	准教授	水本	博

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

モノクローナル抗体などのバイオ医薬品の生産では、目的物質を高生産できる細胞株を作製するために、目的物質をコードする外来遺伝子をゲノムに導入後増幅する遺伝子増幅法が行われている。これまでに DHFR-MTX 法や GS-MSX 法といった遺伝子増幅システムが開発されている。しかし、これらのシステムは高生産細胞株の作製に多大な時間と労力を要する。そのため、目的物質高生産細胞株を迅速かつ確実に樹立できる手法の開発が望まれている。本論文では、目的有用物質生産細胞株作製のための有望な戦略について検討している。

逐次遺伝子組込みシステム (AGIS) は Cre 組換え酵素とその認識配列である変異 *loxP* 配列を応用することにより、ゲノム部位特異的に目的遺伝子を多重化することに成功した。本論文では、AGIS の目的遺伝子組込み効率向上のために計 52 種類の変異 *loxP* 配列をスクリーニングした。まず、*in vitro* 評価系を構築し、変異 *loxP* 配列の組込み効率を測定した。その結果、これまでに AGIS で使用していた変異 *loxP* 配列よりも高い組込み効率を示す配列を複数見出した。*in vitro* 評価系よりスクリーニングされた変異 *loxP* 配列を AGIS に適用し、細胞内における目的遺伝子のゲノムへの組込み効率を測定した結果、*in vitro* 評価系によりスクリーニングされた変異 *loxP* 配列は、従来のシステムよりも 2.8-3.8 倍高い遺伝子組込み効率を示し、システムの効率化に成功した。

さらに本論文では、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向上を試みた。まず、一本鎖抗体 (*scFv-Fc*) 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 *scFv-Fc* 生産 CHO 細胞株を樹立した。次に、樹立した種々の *scFv-Fc* 生産細胞株の生産性を評価した結果、*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、インスレーター配列を配置していない細胞株と比べ、*scFv-Fc* の生産性が最大 2.5 倍まで向上し、この生産性の向上は *scFv-Fc* 遺伝子の発現量の向上に起因していることを定量 PCR により明らかにした。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であることを明らかにした。

以上の結果は、有用物質生産細胞株の作製においてゲノム改変効率の向上および目的物質高発現ユニットの構築に成功したもので、生産細胞株を迅速かつ確実に樹立できる手法の開発に寄与するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本申請者は博士 (工学) の学位を得る資格を有するものと認める。