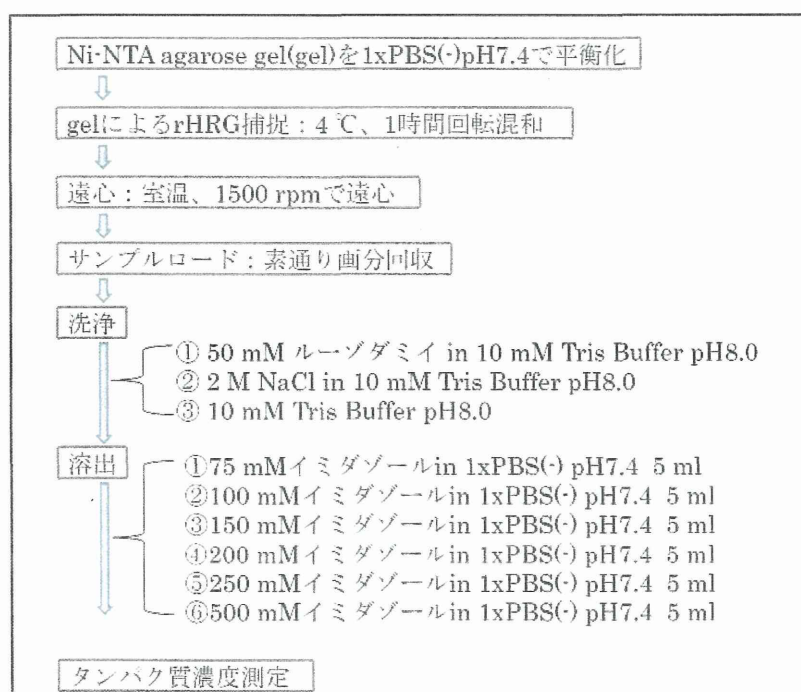


(資料)

pCMViR-TSC と CHO 細胞を用いたヒト組換え HRG の作製

pCMViR-TSC と CHO 細胞を用いて、安定発現細胞株の培養上清中から、分泌されたヒト組換え HRG を回収した。ヒト組換え HRG の精製には、Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィー（下フロー図参照）を用いた。



Ni-NTA アフィニティー精製法による培養上清からの rHRG の精製プロトコール

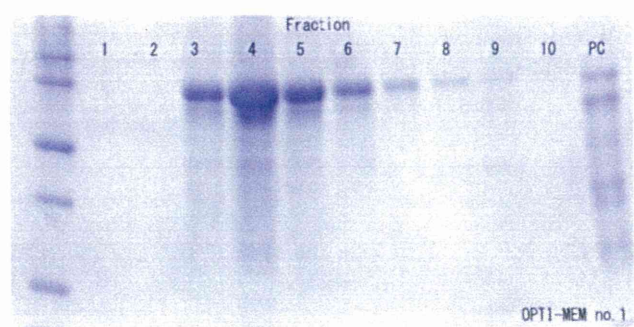
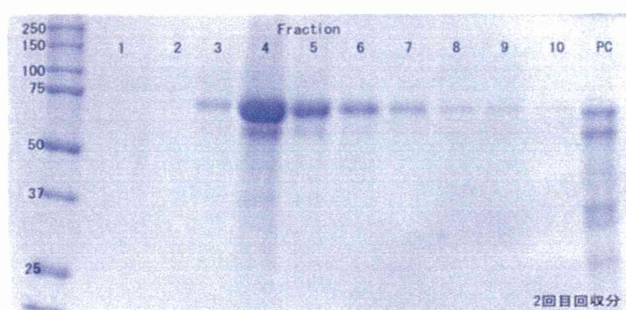
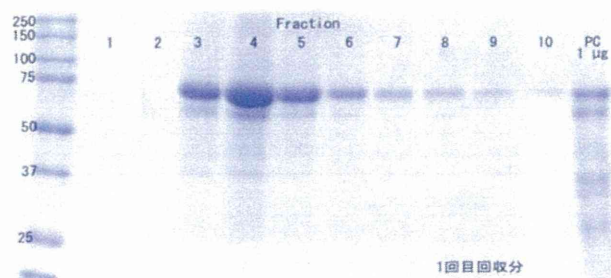
1. 精製と収量のまとめ

Lot.	細胞初期濃度 (cells/ml)	回収回数 (times)	回収培地量 (ml)	終濃度 (mg/ml)	収量 (mg)
1	1.5×10^5	4	1000	1.08	2.5
2	1.0×10^5	4	1000	1.12	3.7
3	1.0×10^5	2	500	1.14	1.9
4	1.0×10^5	8	2000	1.52	3.04
5	1.0×10^5	6	1500	2.0	8.4
6	1.0×10^5	6	1500	2.0	4.61
7	1.0×10^5	6	1500	1.96	4.81
8	1.0×10^5	6	1500	2.0	3.76

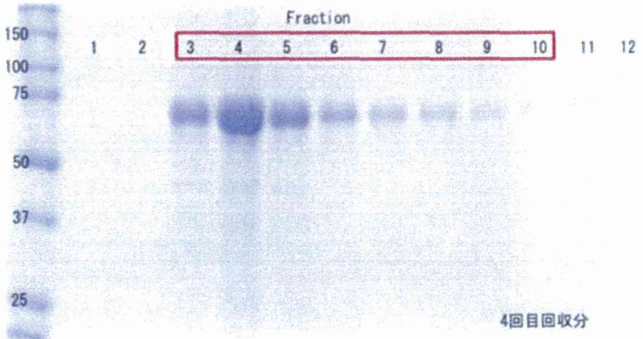
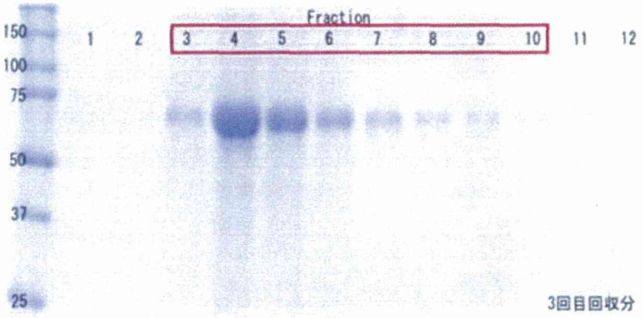
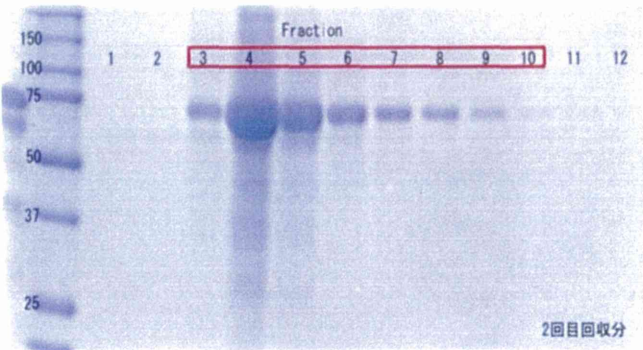
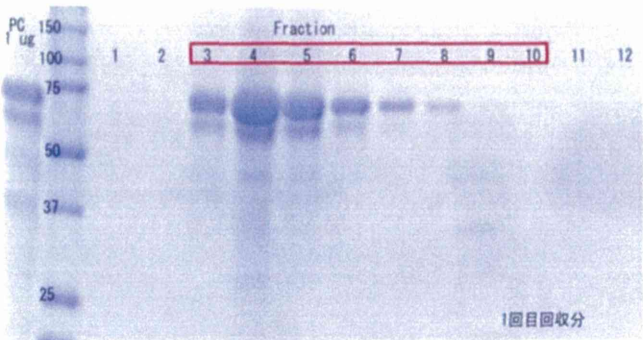
これまでに8つのロットに付き、250 ml の培養スケールで組換え HRG の発現と培養上清からの精製を実施した。上表はそのまとめである。それぞれのアフィニティ溶出フラクションの SDS-PAGE クマシー染色とウェスタンブロット結果を以下のページに示す。陽性対照(PC)はヒト新鮮凍結血漿からの精製品を示す。その結果、組換え HRG は、クマシー染色では陽性対照と同様のダブルットバンドあるいは 75Kd のシングルバンドであり、ウェスタンブロットでは、陽性対照と同様のダブルットとして検出された。以上の結果から、組換え HRG の糖鎖付加の不均一性は極めて少なく、CHO 細胞で作製されたヒト組換え HRG は、タンパク泳動上の見かけのサイズでは、極めて近似することがわかった。ヒト組換え HRG タンパクの生物活性の検討には、Lot.2 の精製品を用いた。

2. 回収した 250 ml 培地それぞれの SDS-PAGE クマシーブルー染色

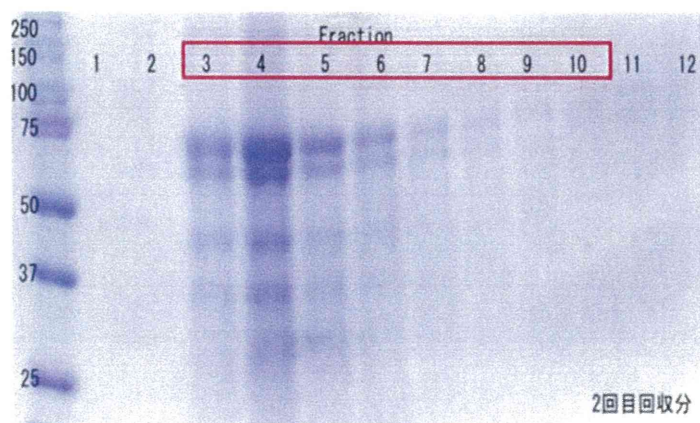
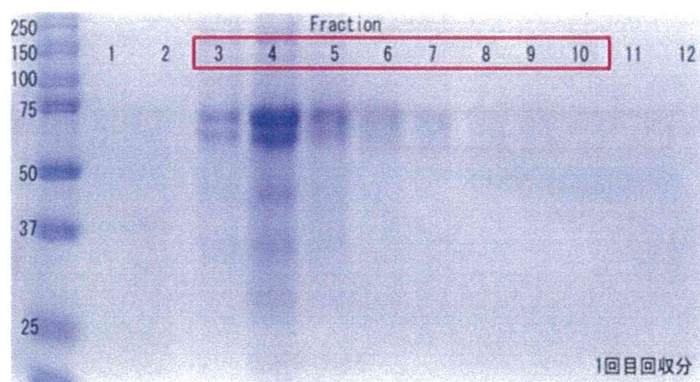
Lot.1



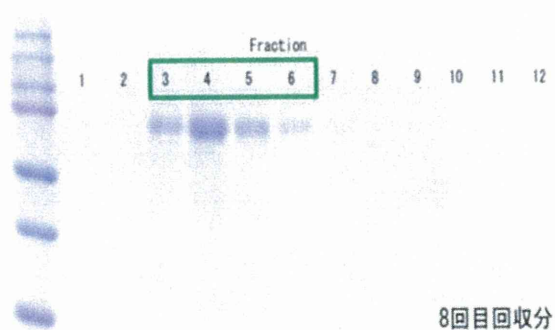
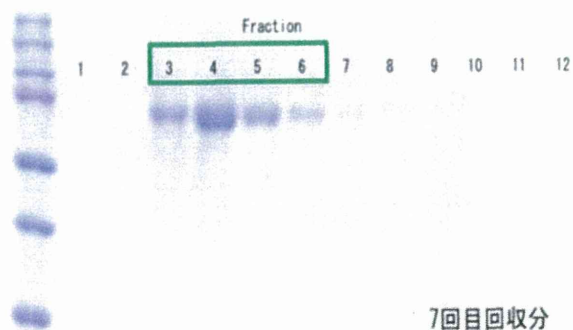
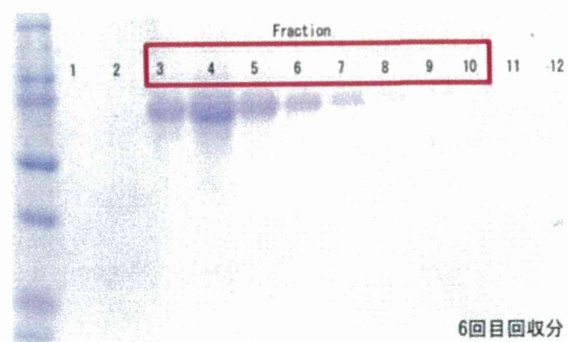
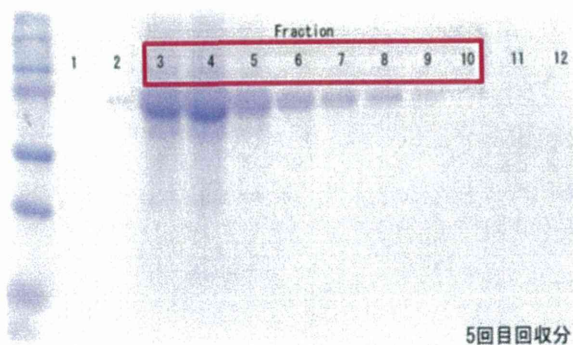
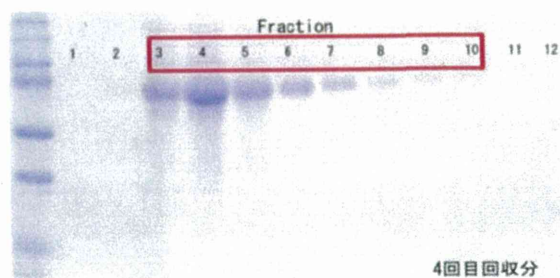
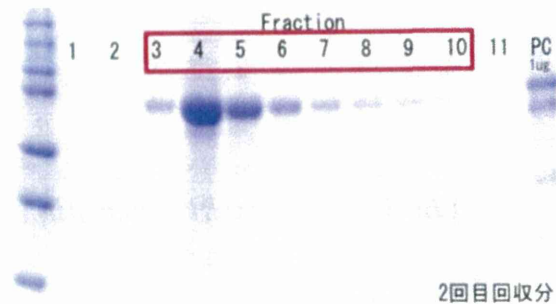
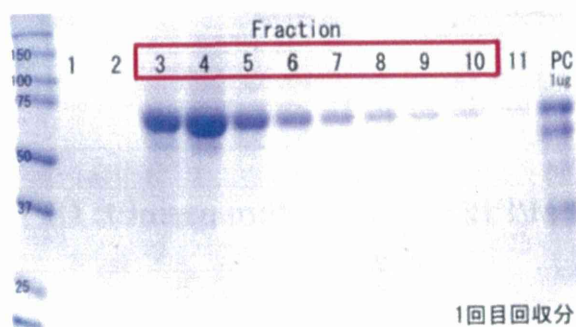
Lot.2



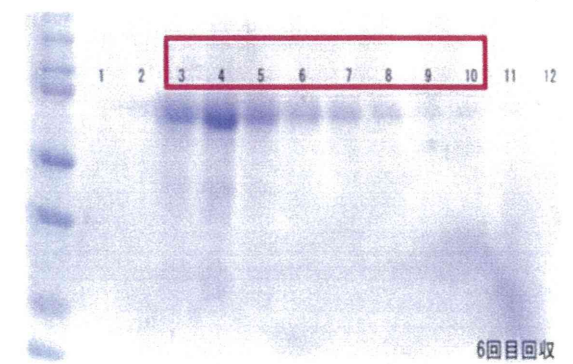
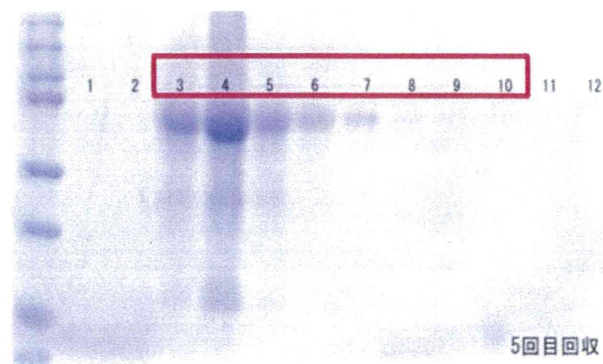
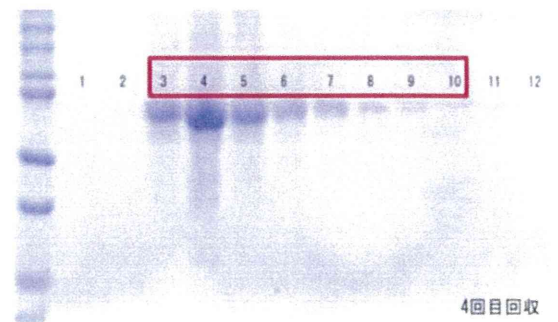
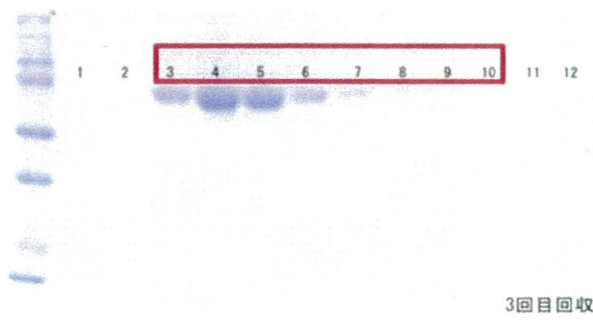
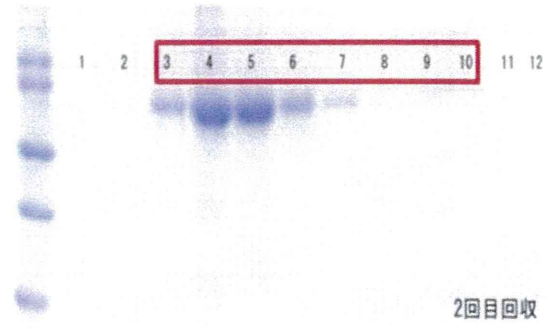
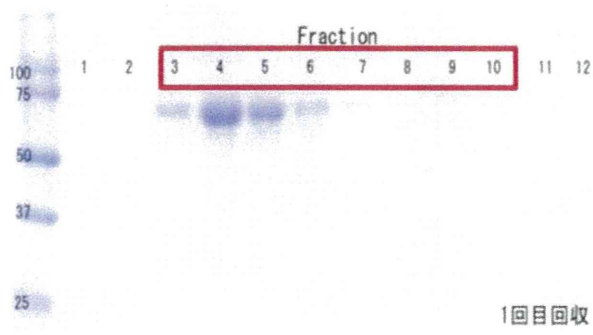
Lot.3 (上清回収時の medium は DMEM/F12 + 1%FBS, Puromycin(-)。OPTI-MEM
ではない)



Lot.4



Lot.5



SDS-PAGE gel image showing protein bands across 12 fractions. Molecular weight markers are on the left (150, 100, 75, 50, 37, 25 kDa). Fractions 3-10 are boxed. A prominent band is visible in fraction 3 at approximately 75 kDa.

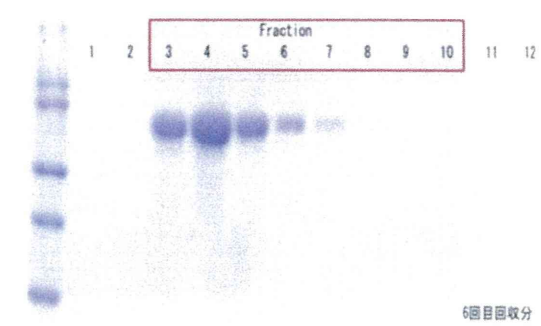
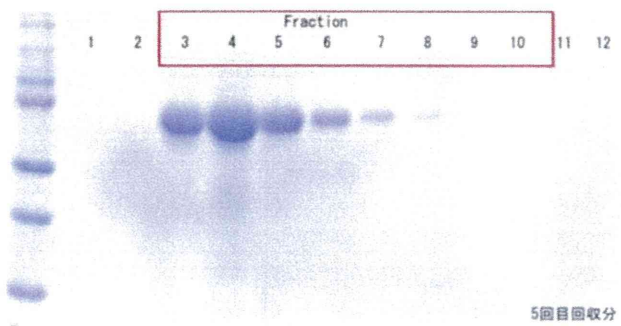
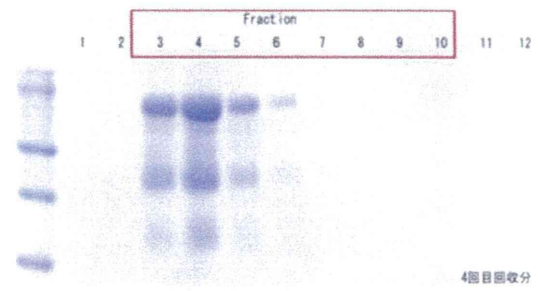
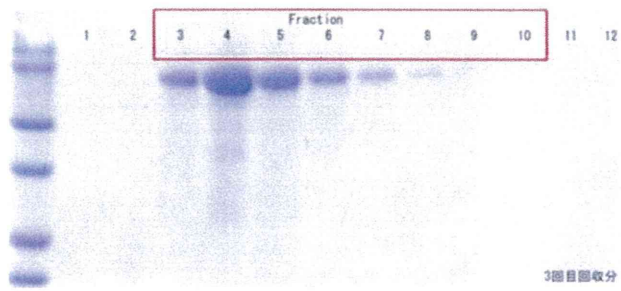
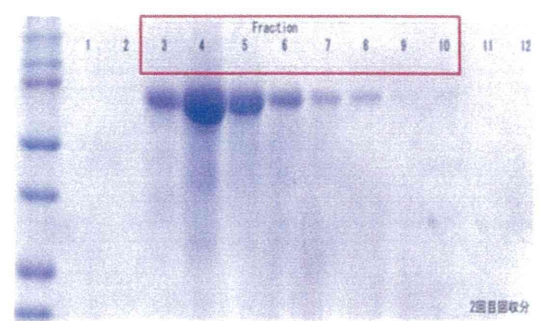
3. 固相回收分

Figure 4: Gel electrophoresis image showing 12 lanes. Lanes 1-2 are molecular weight markers. Lanes 3-12 show protein bands. A red box highlights lanes 3-10. Lane 3 has a single band. Lane 4 has two bands. Lane 5 has a single band. Lanes 6-10 show faint bands. Lane 11 is empty. Lane 12 has a single band.

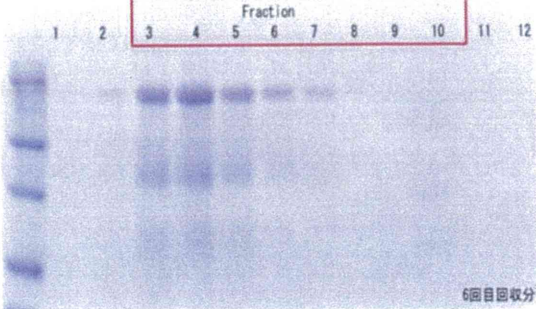
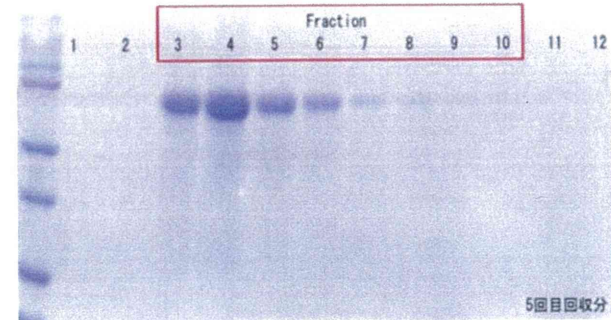
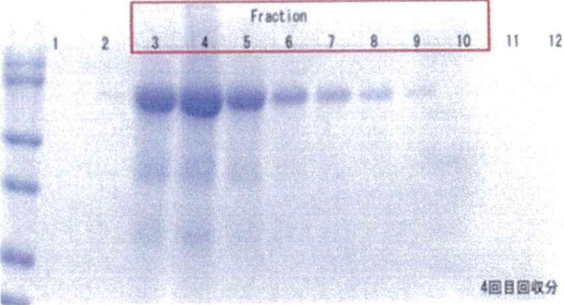
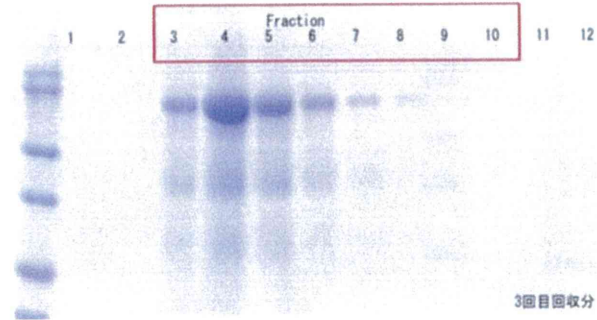
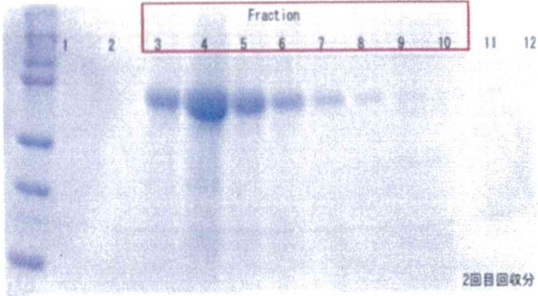
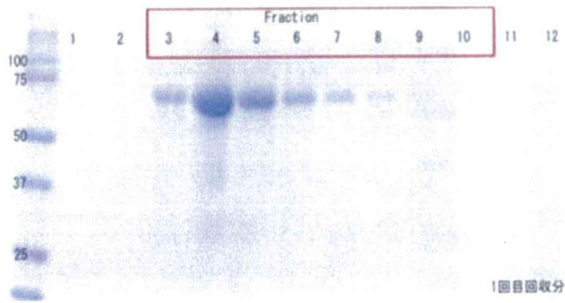
[illegible]

6圖目回收分

Lot.7

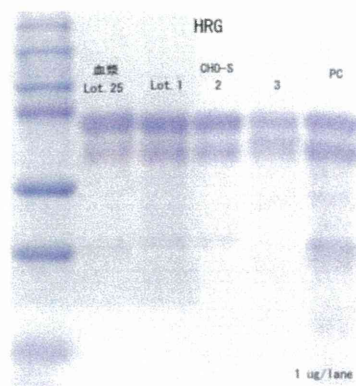
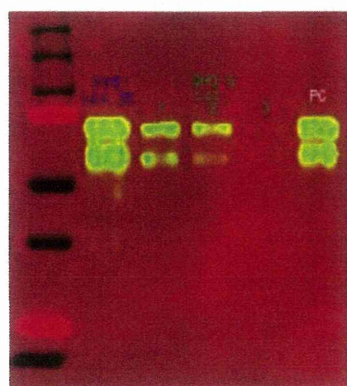


Lot.8

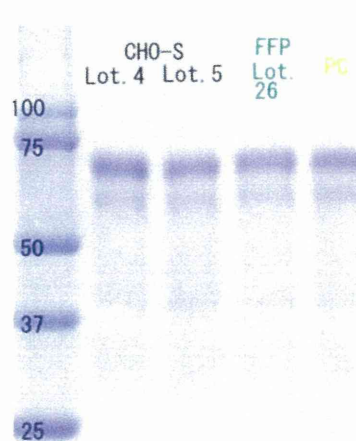
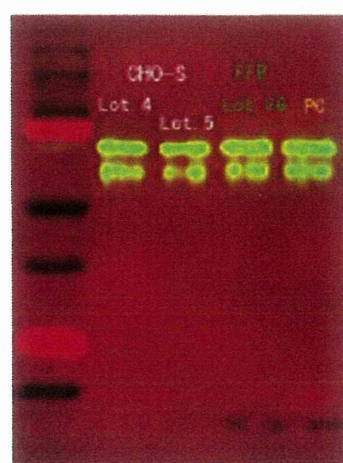


3. 精製 HRG タンパクの SDS-PAGE 及び Western blotting

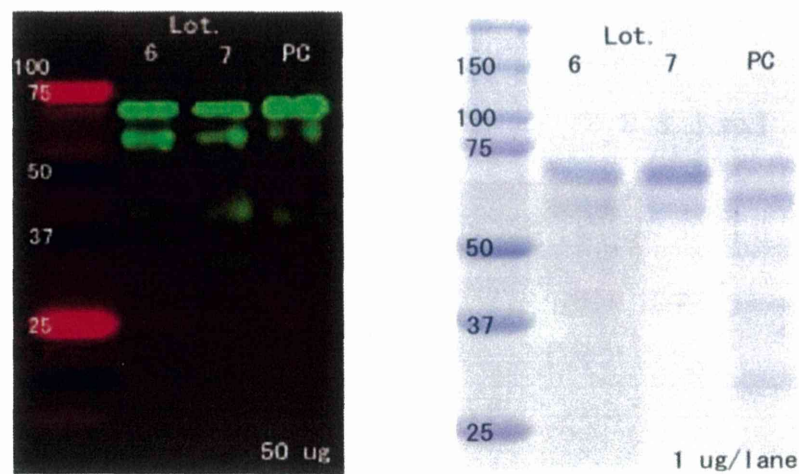
Lot.1, 2, 3



Lot.4, 5

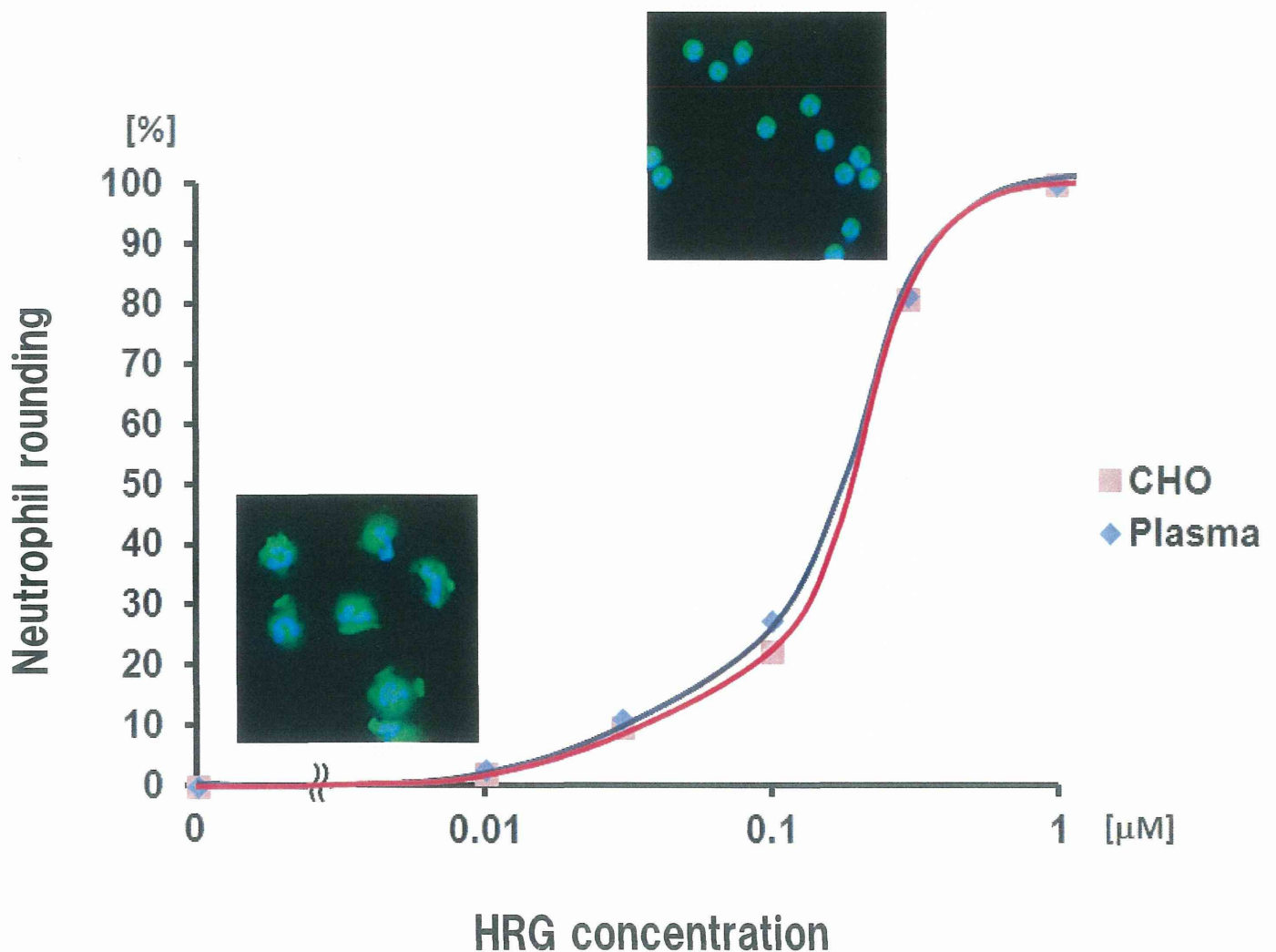


Lot.6, 7



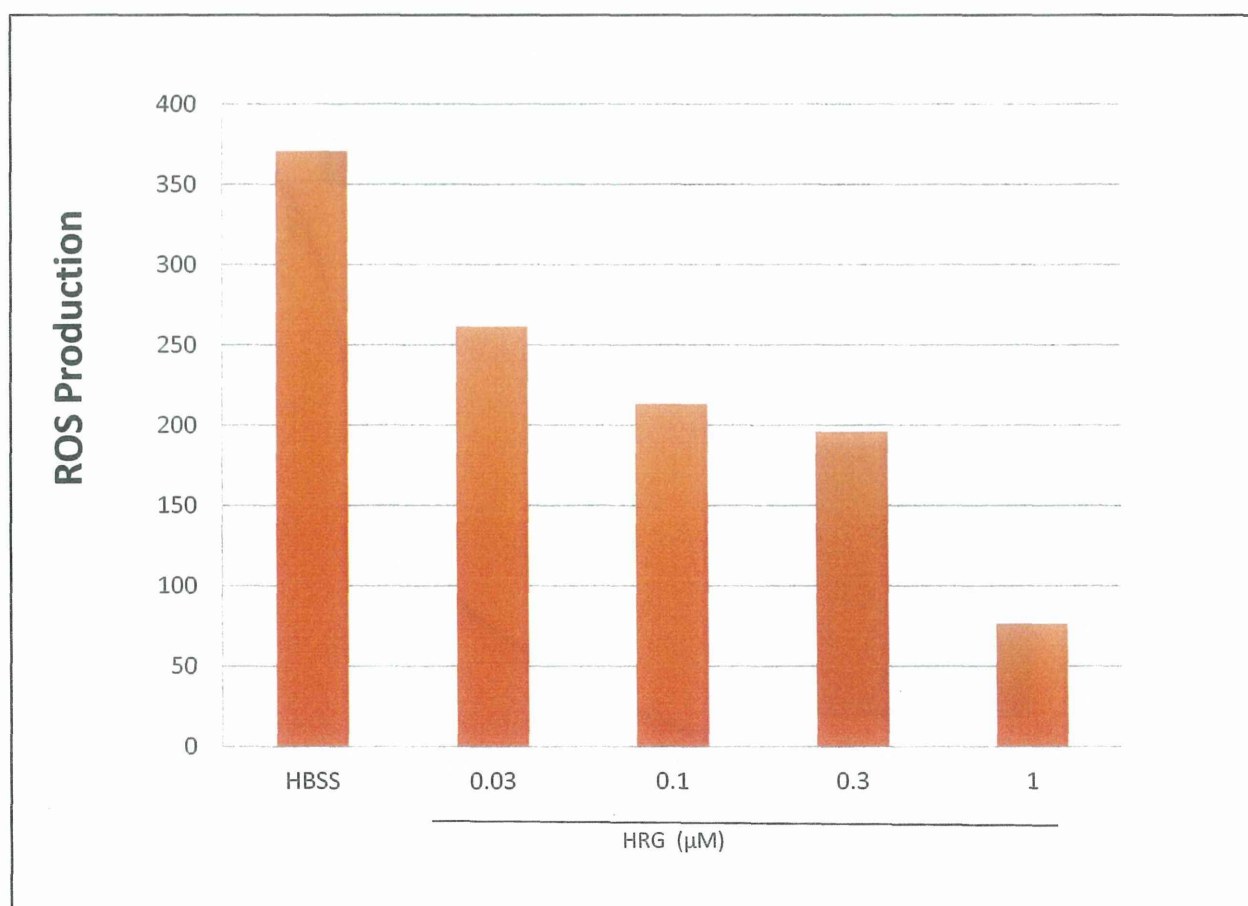
(資料)

Comparison of the effects of recombinant HRG with that of native HRG with regard to neutrophil-rounding effect



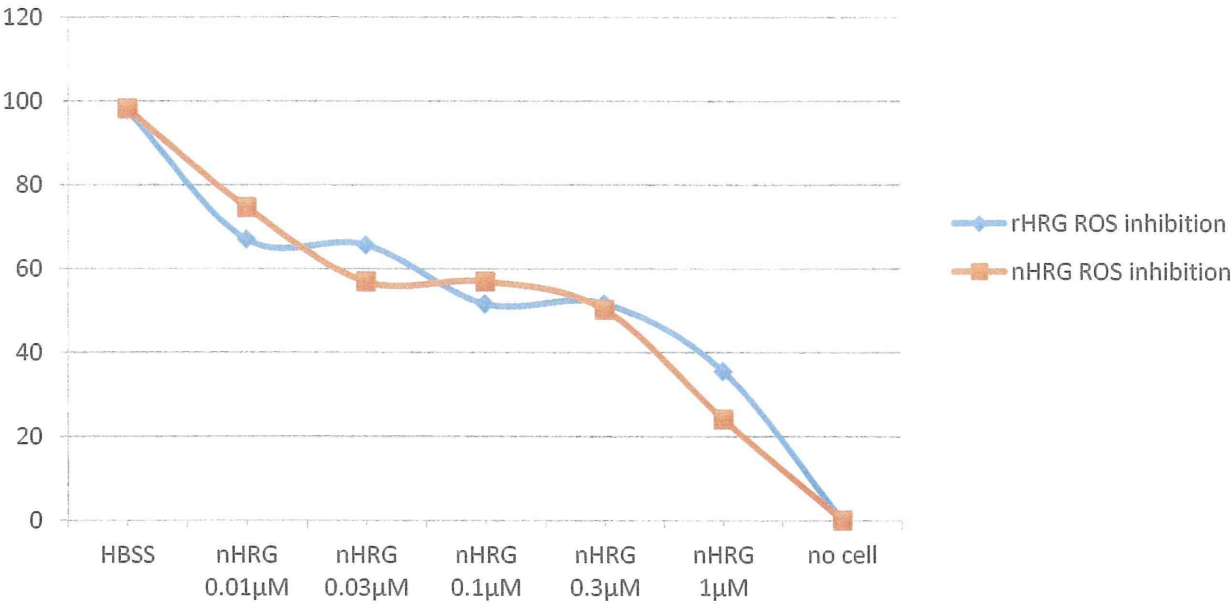
CHO細胞で作製されたヒト組換えHRGは、ヒト単離好中球の正球化に関し、ヒト血漿から精製されたnative HRG と略一致する用量作用曲線を描くことから、両者が同等の効力を持つことがわかった。

The effects of recombinant HRG on production of reactive oxygen species (ROS) in human neutrophils



CHO細胞で作製されたヒト組換えHRGは、ヒト単離好中球の Reactive oxygen species (ROS) 産生に関し、濃度依存的な抑制効果を発揮することがわかった。

The inhibition of neutrophils ROS production by different concentration of HRG



CHO細胞で作製されたヒト組換えHRGは、ヒト単離好中球の Reactive oxygen species (ROS) 産生の抑制効果に関し、ヒト血漿から精製されたnative HRG と略一致する用量作用曲線を描くことから、両者が同等の効力を持つことがわかった。

ヒト組換え HRG の哺乳動物細胞発現系の確立

研究分担者 阪 口 政 清 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究要旨

ヒト組換え HRG の CHO 細胞を用いた超高効率遺伝子安定発現系を確立するため、前回の遺伝子発現ベクターに関して再改変を行った。試行錯誤から、（１）プラスミドの遺伝子発現ユニットを細胞の染色体内に容易に高効率に挿入する技術、（２）抗生物質でのスクリーニングの過程で、挿入遺伝子発現ユニットのコピー数を高効率に増幅させる技術、これら２つの技術をコンバインした新しいプラスミドベクターを創出するに至った。当ベクターによる HRG 発現の安定株を作成したところ、mix culture のままでもこれまでの発現を遥かに凌ぐ高効率発現が示された。

A. 研究目的

これまでの研究では、ヒト凍結新鮮血漿から Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーならびに陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製 HRG 標品を得てきた。この精製品を用いて、ヒト好中球に対する構造と機能にわたる基本的な鎮静化作用とマウス敗血症モデルにおける治療効果を明らかにしてきた。

本治療法をヒト敗血症やそれに続発する多臓器不全の治療法とするために、ヒト HRG タンパクを安全な製品として大量に製造する方法を確立する必要がある。この目的のために、CHO 細胞にヒト HRG 遺伝子を導入することで組換えヒト HRG タンパクを産生させる。CHO 細胞は、抗体をはじめとする組み換えタンパク質製剤全般の産生の基盤として実用化が認められているからである。

前回使用したベクターは、遺伝子の一過性発現には極めて有効であるものの、安定発現用には向いていないことが判明した。この問題を克服するため、今回、当ベクターを基本に HRG 超高効率安定発現を CHO 細胞に可能にする更なる改変法を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

CHO 細胞を用いて 10 種類の改変プロトタイププラスミドベクターを用いて、まず GFP-Puro^R の一過性発現について検討した。GFP の発現について、短時間（24h）での発現を一過性発現とし、ピューロマイシンを 3 週間作用させ、耐性細胞を取得した後の mix culture での発現を長期安定発現とし、プロトタイプベクター各々の効能の評価を行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については、大学の安全委員会で審査を受け、承認を得ている(課題番号: 13101)。

C. 研究結果

前回使用したベクター pCMViR-TSC は、HRG をはじめとする種々医療用タンパク質製剤の大量発現に有用と考えられたが、検討より一過性発現では、遺伝子の一過性発現には極めて有効であるものの、安定発現用には向いていないことが判明した。哺乳細胞セレクション用の抗生剤耐性遺伝子を同ベクター内に挿入すると、その高発現能力が消失する。あるいは、別に抗生剤耐性遺伝子発現ベクターを用意して、細胞に当ベクターと co-transfection しても、HRG 発現ユニットとして染色体に無傷で組み込まれるコピー数が少ないため、どうしても安定発現に有効とはならなかったのである。

この問題に直面し、試行錯誤を繰り返し、ついに最近、上記技術を進化させた新しい安定発現用超高効率遺伝子発現プラスミドベクターを開発するに至った。上記 pCMViR-TSC による超高効率遺伝子発現の能力を消失させず染色体内に高効率で複数組み込み、更に安定的に増幅させる革新的技術である。即ち、(1) プラスミドの遺伝子発現ユニットを細胞の染色体内に容易に無傷で高効率に挿入する技術(ベクターの導入操作回数を増やせば増やす程、染色体内に無傷で複数挿入されていく)、(2) 抗生物質でのスクリーニングの過程で、染色体内挿入遺伝子発現ユニットのコピー数を爆発的に増幅させる技術、これら 2 つの技術を pCMViR-TSC プラスミドベクターにコンバインした新しいプラスミドベクターである。

10 個のプロトタイプベクターを開発し、

CHO 細胞においてスクリーニングを行った結果、1G ベクター(仮称)が最良であることが判明した。当ベクターによる HRG 発現の安定株を作成したところ、mix culture のままでもこれまでの発現を遥かに凌ぐ高効率発現が示された。

D. 考察

HRG の安定発現は、ミックスカルチャーでの評価(様々な発現レベルの細胞の混在)なので、単一の陽性クローンのセレクションを追加するとさらに良好な発現細胞が得られるものと考えている。

また、この技術は、最初のプラスミド導入操作を増やせば増やす程染色体内に挿入される発現ユニットが増えるので、その増えた分全てが、抗生剤セレクションの後の遺伝子増幅につながるというまさに発現の相乗効果を生む非常に優れた革新的技術なのである。

今後、上記 HRG 安定発現細胞の mix culture から最適なクローンを選択する予定である。得られたクローンにおける発現タンパク質の糖鎖付加状態は固定化されているため、毎回同じ品質のものが得られる。当 CHO 細胞クローンで作製されたヒト HRG の生物活性について、付加糖鎖の構造解析を含め、追究していく計画である。

E. 結論

以上、当最新のプラスミドベクターは、HRG を大量調製するための CHO 細胞産生系に新たな光明をもたらすことが期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Sakaguchi M, Watabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IMW, Nasu Y, Kumon H, Huh NH.

Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene.

Mol Biotech, 56: 621-630, 2014.

- ② Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, Huh NH. DNAX-Activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes.

J Biol Chem, 289: 23389-23402, 2014.

- ③ Jaiswal JK, Lauritzen SP, Scheffer L, Sakaguchi M, Bunkenborg J, Simon SM, Kallunki T, Jäättelä M, Nylandsted J. S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells.

Nat Commun, 5: 3795, 2014.

- ④ Saito K*, Sakaguchi M*, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E.

Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells.

Oncogene, 33: 1274-1286, 2014. (Saito K* and Sakaguchi M* were equally contributed to this work.)

- ⑤ Yamamoto H, Higasa K, Sakaguchi M, Shien K, Soh J, Ichimura K, Furukawa M,

Hashida S, Tsukuda K, Takigawa N, Matsuo K, Kiura K, Miyoshi S, Matsuda F, Toyooka S.

Novel germ-line mutation in the transmembrane domain of HER2 in familial lung adenocarcinomas.

J Natl Cancer Inst, 106: djt338, 2014.

2. 学会発表

1) 国際学会

該当なし

2) 国内学会

- ① 阪口政清.

高機能 REIC 遺伝子発現アデノウイルスベクターの開発.

岡山大学機能強化戦略プロジェクトー難治固形がんの遺伝子治療ー第2回シンポジウム, 岡山, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

新規敗血症バイオマーカーの開発

研究分担者 森 松 博 史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
樋之津 史 郎 岡山大学病院新医療研究開発センター・教授

研究要旨

今回、SIRS 患者において HRG 値を測定し、新規バイオマーカーとしての HRG を評価した。SIRS 患者では血中 HRG 濃度が健常人に比べて有意に低かった。SIRS 患者のうち感染を伴う敗血症群と伴わない群で比較すると、敗血症群でより低値であり、SIRS 患者のうち死亡群と生存群で比較すると死亡群で低かった。また、HRG 値と死亡とに有意な関連を認め、HRG 値の死亡に関しての ROC 分析では死亡予測の感度特異度が共に高いと示唆された。HRG は新規重症度マーカーとなり得る。

A. 研究目的

動物実験で示された敗血症における HRG 補充療法の有効性に関し、ヒトにおいても HRG 値の変動の有無やその意義を評価する必要がある。その目的のために、患者にて HRG 値を測定し、患者の病態や病勢、他の検査結果などと比較検討を行い、敗血症マーカーならびに重篤度・予後判定マーカーとしての HRG を検証する。また同時に、血漿 HRG を簡便に測定する方法を確立することは不可欠であり、測定法として ELISA を開発、確立する。

B. 研究方法

岡山大学病院内の倫理審査委員会にあらかじめ研究内容に関する審査書式を提出し、承認を得たのち本研究を開始した。

岡山大学病院 ICU に新規入室した患者のうち全身性の炎症を認める患者を対象とした。すなわち、入室 24 時間以内に Systemic

Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

に陥り、そのクライテリアを満たした成人患者を対象とした。文書による同意を得たのちに採血を行い、速やかに処理を行って血漿を保存した。保存検体を用いて HRG 値を測定した。その他の臨床情報はカルテより得た。また比較検討のため健常人ボランティアからも採血を行い、本研究における HRG 標準値とした。

測定は ELISA 法を新たに開発して行った。抗ヒト HRG モノクローナル抗体と、HRG に親和性の高い Ni-NTA を組み合わせることとで、サンドイッチ ELISA 法を確立した。

（倫理面への配慮）

上記のとおり、倫理審査委員会の承認を得たのち研究を開始した。同意書様式も審査を受けた。患者の同意を得る場合には、患者あるいはその家族に対し、研究内容の詳細な説明と危険、不利益、個人情報の保護に関する

説明を十分尽くしている。その際、研究への不参加は治療にいかなる変化ももたらさないことをよく説明している。

C. 研究結果

SIRS 患者 70 名から同意が得られ、採血を行った。そのうち 20 例は、SIRS に感染を伴った病態であり、敗血症の状態であった。また、70 例中 8 例は ICU 死亡症例であった。健康人ボランティアとしては、16 名から採血を行った。

健康人 (n=16) に対して SIRS 患者 (n=70) では HRG 値が有意に低下していた (60.18 ± 8.30 vs $28.10 \pm 14.45 \mu\text{g/ml}$; $p < 0.01$)。SIRS 患者のうち非敗血症群 (n=50) と敗血症群 (n=20) とで比較すると、敗血症群で HRG 値は有意に低かった (34.85 ± 10.75 vs $11.21 \pm 6.35 \mu\text{g/ml}$; $p < 0.01$)。また、SIRS 患者の生存群 (n=62) と死亡群 (n=8) とで比較すると、死亡群で HRG 値は有意に低かった (30.25 ± 13.65 vs $11.40 \pm 8.70 \mu\text{g/ml}$; $p < 0.01$)。単変量解析では、HRG 値と死亡とに有意な関連を認めた (死亡対生存オッズ比 0.86 ($p < 0.01$))。多変量解析を行い APACHE II スコアで調整したところ、HRG 値および APACHE II スコアの両者が独立因子として有意に死亡と関連するとの結果が得られた。HRG 値の死亡についての ROC 分析では AUC 値 0.88 となり、APACHE II スコア (AUC 値 0.93) と同等で、死亡予測の感度特異度が共に高いと示唆された。更に、SIRS 患者を ROC 分析での cut off 値 $16.01 \mu\text{g/ml}$ を用いて HRG 高値群と低値群に分け解析すると、低値群の生存率は有意に低かった (HR 9.18; $p < 0.01$)。

D. 考察

ヒトでの HRG 測定の報告は多くあるが、

炎症に注目し SIRS 患者や敗血症患者にて測定した報告は存在せず、本研究が初の検討である。今回、健康人と比較して SIRS 患者では HRG 値が有意に低く、敗血症患者ではより低いという結果が得られた。この結果は、先のマウス敗血症モデルにおける結果と同様であり、ヒトにおいても HRG の変動があることが示唆された。

今回は ICU 入室時に採血を行っており、SIRS に陥った初期の HRG 値を測定したことになるが、その ICU 入室時 HRG 値と、炎症の指標である CRP や重症度スコアである SOFA スコア、死亡予測因子である APACHE II スコアには有意な逆相関があり、患者の重症度が高いほど HRG 値は低いことが考えられ、HRG を重症度の指標とできる可能性が示唆された。

ICU 入室時の HRG 値は死亡と関連を認め、また APACHE II スコアと独立した因子であるとの結果が得られた。さらに、ROC 分析において HRG 値は感度特異度ともに高く死亡予測ができるとの結果であった。これらの結果は、確立された死亡予測因子である APACHE II スコアと独立した因子として HRG 値は死亡に関連を認め、しかも APACHE II スコアと同等の死亡予測因子として HRG 値を捉えることができるとの結果であり、HRG を新たな単一の死亡予測因子として用いることができる可能性が示唆された。

今回は、単回採血で HRG 値を測定しており、HRG 値の時間的な変動をみておらず、病態の変動とともに HRG 値がどう動くのかについては不明である。重症度マーカーとしての HRG を考える上では、刻々と変化する患者の重症度に応じて HRG 値がいかに変化するのを知ることは大変重要であり、今後の課題である。しかし、患者のある時点での