

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

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 アフィニティー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

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.

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.

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.

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.)

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

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 - 難治固形がんの遺伝子治療 - 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

