

ゲノム操作工学によるバイオ医薬品生産技術の開発

河邊 佳典・上平 正道*

はじめに

バイオ医薬品の中でも特に注目されている抗体医薬は、糖鎖付加などの翻訳後修飾や適切なフォールディングができる動物細胞により生産されており、中でもチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞が生産ホストとしてよく用いられている。CHO細胞による抗体医薬品生産については、プラットフォーム化が進められており、細胞株構築から細胞培養、分離精製、さらには製剤化までの流れが確立されている。しかし、生産における最上流プロセスとなる細胞株構築では、生産に適した導入遺伝子の高発現細胞を選抜する必要があり、遺伝子増幅などのプロセスを経て数多くの細胞の中から、労力と時間をかけて生産細胞株の樹立が行われている。

遺伝子増幅の手法として、DHFR-MTX法やGS-MSX法がある。これらの方法では、はじめに薬剤により偶発的にゲノムに目的遺伝子発現ユニットを組み込ませた後、段階的に薬剤濃度を上昇させることで導入遺伝子のコピー数が増幅された細胞を得る。しかしこの際、導入遺伝子はゲノム上に不特定部位に挿入されるため、ゲノム周辺環境の影響により、生産量が安定しないことがある。また、過剰な遺伝子増幅により、細胞ゲノム上の増幅領域がヘテロクロマチン化し発現抑制されやすいことが報告されている。これらによりゲノム上の目的遺伝子のコピー数と発現量が必ずしも一致せず、薬剤などの選択圧のない培養環境で長期培養を行った場合、発現量が徐々に低下していくといった問題点もある。このように、遺伝子増幅処理に基づく高生産細胞株構築法は確立されてはいるものの、未知のメカニズムによるところもあるため、高品質の生産物を安定的に高生産する細胞を迅速かつ確実に構築する技術の開発が望まれている。

本稿では、バイオ医薬品製造のための高安定高発現な細胞を迅速かつ確実に樹立するためのゲノム操作技術例として、筆者らが開発した逐次遺伝子組込みシステムについて紹介する。

Cre/loxP組換えシステム

組換え酵素は、動物細胞ゲノムの部位特異的遺伝子改変ツールとして幅広く用いられている。Cre, Flpや

ΦC31といった組換え酵素は、特定のDNA配列(順に、それぞれloxP, FRT, attB/attP)を認識し、DNAの組換えを効率よく触媒する。組換え酵素の中でも、バクテリオファージP1由来のCreは、動物細胞中で高い活性を示すことが報告されており、ターゲットサイトloxPを認識し、二つのターゲットサイト間で、削除、組込、反転といった反応を起こすことができる(図1a)。反応の平衡性が削除反応に傾いていることを利用して、Cre/loxP組換えシステムは、コンディショナルノックアウトマウスの作出などで頻用されている。

Cre/loxP反応の特性は、変異loxPを用いることで、改変できる。loxPは、34 bpからなるDNA配列であるが、中央のスペーサー領域(8 bp)とその両端に二つのアーム領域(13 bp)から構成されている(図1b)。アーム領

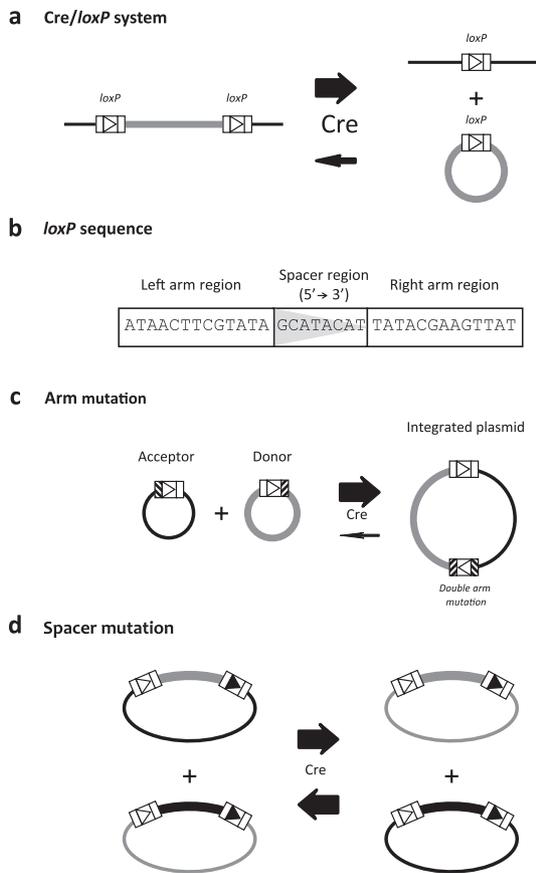


図1. Cre/loxP組換えシステム

*著者紹介 九州大学大学院工学研究院化学工学部門 (教授) E-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

域の配列は回文配列となっている。アーム領域の塩基配列を変異させることで、反応の平衡を組込み反応側へシフトできる(図1c)。これは以下のような原理になる。右アーム領域に変異を有する変異*loxP*と左アーム領域に変異を有する変異*loxP*とを反応させると、野生型の配列をアームに持つ*loxP*とともに、両アームに変異を有した変異*loxP*が生じる。この両アーム変異*loxP*において、Creによる認識が著しく低下するため、削除反応が起こらず、この状態で安定化する。結果として組込反応を促進することが可能となる。一方、スペーサー領域の変異では、特定の変異*loxP*とのみ反応させることが可能である(図1d)。この特性を用いて、変異*loxP*に挟まれた目的遺伝子間のカセット交換反応(recombinase-mediated cassette exchange: RMCE)を起こすことができる。実際にいくつかの変異*loxP*配列が報告されている(アーム変異:*lox71*や*lox66*, スペーサー変異:*lox2272*や*lox511*)¹⁾。

逐次遺伝子組込みシステム

筆者らは、変異*loxP*を用いることで、Cre/*loxP*組換えシステムによってゲノム上の特定の部位へ目的遺伝子を効率的に組み込むとともに、一度の組込みだけではなく、目的遺伝子を同じゲノム部位に繰り返し組み込むことができる遺伝子多重化増幅技術として使用できないかと考えた。そのために、独立して組換え反応が可能な変異*loxP*を選択し、Cre組換え酵素依存的に繰り返し導入可能な部位特異的遺伝子多重化法である、逐次遺伝子組込みシステム(accumulative gene integration system: AGIS)を開発した(図2)²⁾。この方法では、遺伝子組込みの起点となる変異*loxP*をあらかじめCHO細胞ゲノムへ導入後、目的遺伝子を有するドナープラスミドと、Cre発現ベクターを一過的に共導入することで、ゲノムに組込んだターゲット部位に複数の目的遺伝子をCre-RMCEにより逐次導入できる。

システムの有効性を実証するために、遺伝子組込みの起点となる変異*loxP*があらかじめ染色体に導入されたCHO細胞を作製後、Cre発現ベクターと組換え用の*loxP*で挟まれた蛍光タンパク質遺伝子を有するプラスミドを遺伝子導入したところ、Cre発現依存的に部位特異的に目的遺伝子が組み込まれていることをPCR解析で確認するとともに、逐次組込みに対応する蛍光タンパク質が検出できた。また、ゲノム中の組換え反応に関与した*loxP*配列周辺をシーケンス解析した結果、期待される組換え反応が起きていることがわかった。

次に、目的遺伝子を組換え抗体遺伝子発現ユニットと

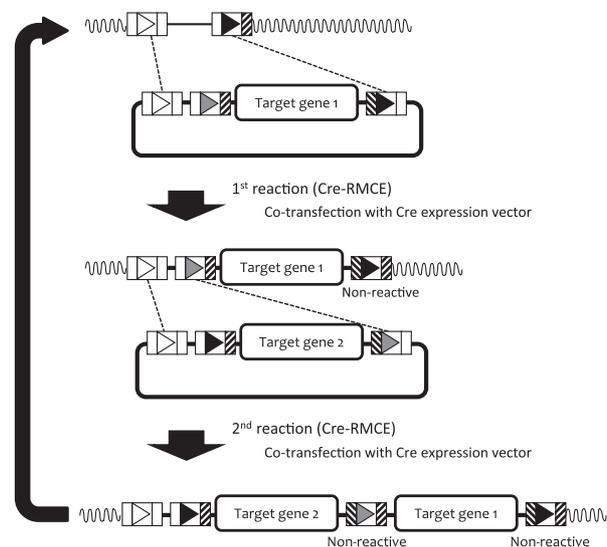


図2. 逐次遺伝子組込みシステム (AGIS) の概略. 組換え酵素Creと変異*loxP*を用いて、複数の目的遺伝子を配列部位特異的に導入することができる。

して逐次組込み反応を行った。まず、あらかじめ組み込む*loxP*を赤色蛍光タンパク質遺伝子とともにCHO細胞へ導入し、赤色蛍光強度が高い細胞株を目的遺伝子組込みのための宿主細胞として選抜した。組換え抗体遺伝子を有するプラスミドを逐次遺伝子組込みし、サザンブロット解析により部位特異的遺伝子導入を確認した。抗体遺伝子を導入した細胞を用いて生産性を評価したところ、導入した発現ユニット数に応じて抗体生産量の増加が見られた³⁾。

AGISの効率化とその応用

Cre-RMCEによるAGISにおいては、3種類の独立して組込み反応できる変異*loxP*を使用していたため、各組込み段階での効率が異なっていた。AGISに関わる変異*loxP*の数を2種類に減らすことで、組込み反応をよりシンプルにしたAGISの開発を試みた(図3)。この場合、1段階目の目的遺伝子組込みは、Cre-RMCEではなく、組込み・削除が可能なタイプとした。ドナープラスミドには組込み用の変異*loxP*とともに、プラスミドバックボーンを削除する変異*loxP*をレポーター遺伝子(薬剤耐性ならびに蛍光タンパク質遺伝子)の両端に挟んでおいた。2段階目の逐次組込みは、Cre-RMCEによる反応とした。一つの変異*loxP*がゲノム上に組込まれたCHO細胞をファウンダー細胞として作製後、ドナープラスミドをCre発現ベクターとともに遺伝子導入した。その後、対応する薬剤で選抜し、形成したコロニー数を測定したところ、4回の逐次組込み反応段階で、ほぼ同

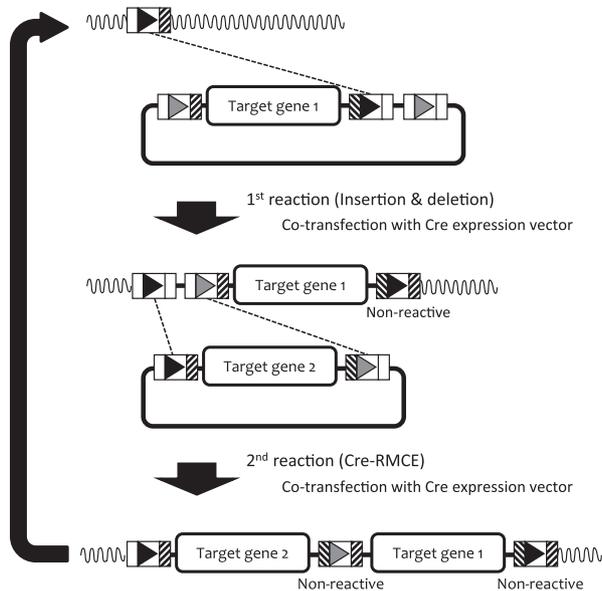


図3. 簡素化したAGISの概略。一段階目の反応では、組込み後、プラスミドバックボーンの削除が起こる。二段階目の反応は、Cre-RMCEにより起こる。

数のコロニーが形成され、組込み効率に有意な差は認められなかった。また、フローサイトメーターによりCre反応各段階におけるレポーター遺伝子の蛍光強度を測定したところ、目的遺伝子の導入数に応じて蛍光強度が増していた。これらのことから、逐次遺伝子組込みを繰り返しても、効率が変わることなく導入することができ、導入遺伝子の発現量が導入数依存的に増加していた。逐次組込みに用いる変異*loxP*を限定することで、AGISでの組込み効率を安定化させることができた⁴⁾。

AGISによる目的遺伝子のゲノムへの組込み効率は、使用する変異*loxP*に大きく依存していた。そこで、AGISにおける目的遺伝子の組込み効率を高めるために、AGISに適した変異*loxP*を探索した。スペーサー領域を野生型の配列を含む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、計52種類の変異*loxP*の組込み反応効率を検証した。まず、26種類ずつのアクセタープラスミドとドナープラスミドを作製した。次に、*in vitro*における組込み効率の評価系を構築した。これは、試験管内でドナープラスミドおよびアクセタープラスミドをCreにより反応させた後、組込み反応が起こったプラスミドのみ検出可能なプライマーを用いて、リアルタイムPCRによる生成プラスミドの定量により組込み反応効率を測定する方法である。*in vitro*評価系を用いて、同じ変異スペーサー領域を持つ変異*loxP*間の組込み効率を測定した。その結果、これまでにAGISで使用されていた変異*loxP*よりも高い組

込み効率を示す変異*loxP*を複数見いだすことができた。

AGISでは、複数の変異*loxP*が、それぞれ独立して反応することで目的遺伝子を逐次的に組み込ませる。よって、変異*loxP*間の反応特異性はスクリーニングにおける重要なポイントである。そこで、各種変異*loxP*の反応特異性を評価した。その結果、組込み効率および反応特異性が高く、AGISに適用可能な変異*loxP*を、これまでに報告がない配列を含めて選抜することができた。*in vitro*評価系においてスクリーニングされた変異*loxP*をAGISに適用し、細胞内における目的遺伝子の組込み効率を測定したところ、スクリーニングされた変異*loxP*は、これまでにAGISで用いていた変異*loxP*よりも2.8倍～3.8倍高い組込み効率を示し、AGISにおける目的遺伝子組込み効率を向上させることができた⁵⁾。

組込み細胞を取得する際、薬剤によるスクリーニングでは、選抜に時間を要する。AGISにおけるCre/*loxP*組換え反応は、酵素反応で進行するため、細胞内への遺伝子導入後、ゲノムへの組込みは短時間で完了すると期待される。そこで、蛍光タンパク質遺伝子を選択マーカーとして用い、部位特異的組込みにおいてのみ見られる蛍光細胞をセルソーターによりスクリーニングを行うことにしたところ、より迅速な選抜が可能となった⁶⁾。

これまでに述べたようなAGISでより適した変異*loxP*配列やセレクション方法を用いて、組換え抗体生産細胞株の樹立を行った。CHO細胞におけるタンパク質生産の向上と安定化のために、多くのシス作用性因子が検討されている。筆者らはCHO細胞ゲノムより単離されたシスエレメントを用いて、一本鎖抗体scFv-Fc遺伝子発現ユニットを部位特異的に導入したCHO細胞において、シスエレメントの配向性を検討するとともに、複数逐次組込みしたCHO細胞を作製したところ、発現ユニットをシスエレメントで挟むことで、scFv-Fc組換え抗体の生産性が向上できることを見いだしている⁷⁾。

おわりに

目的物質の高生産細胞株を取得するためには、細胞染色体上の高発現・高安定領域、いわゆる染色体ホットスポットといわれているゲノム部位に効率的に遺伝子導入できれば、目的タンパク質遺伝子ごとにランダム組込みにより高発現細胞株樹立を行う従来法と比べ、高発現・高安定な細胞株を迅速かつ確実に樹立する方法になりうると考えられ、AGISへの適用を念頭に高発現部位の同定を進めている⁸⁾。一方、細胞染色体には、ゲノム上の外来遺伝子の安定発現可能な領域、genomic safe harbor (GSH) が知られている。*Rosa26*や*AAVS1*といっ

た遺伝子座はその代表例であり，外来遺伝子の導入部位として報告されている．CHO細胞ゲノムにおいては，*Hprt* 遺伝子座が比較的安定発現を示すことがわかっており，現在筆者らはCHO細胞の既知遺伝子座にAGIS用の起点となる変異*loxP*を導入し，AGISを用いた連続的な逐次組込みによる細胞構築の迅速化法の開発を行っている(図4)^{9,10}．

近年，任意のゲノム配列を認識し，切断することが可能な人工ヌクレアーゼの開発と応用により，標的遺伝子の改変技術，いわゆるゲノム編集技術が開発され，研究

が活性化している．ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)の開発を発端に，TALEN，CRISPR/Cas9システムが開発されているが，ロックアウトと比較して，一般的にゲノム編集技術による特定ゲノム部位へのロックインでは，目的遺伝子を数百から数千bpなる相同配列で挟んだドナープラスミドが，編集酵素やガイドRNAとともに必要であることや，特定の方向性で挿入できないことから，目的どおりロックインされる効率は必ずしも高くない．最近筆者らは，広島大学の山本らとともに，非常に限られた短い相同領域のみ(～20 bp)を用いた標的ゲノム領域への正確な遺伝子挿入技術(PITCh)をCHO細胞に適用し，組換え抗体遺伝子を特定ゲノム部位へ効率よくロックインできることを報告した¹¹⁾．

これらのゲノム編集技術は，今後益々開発が進むと思われるが，現時点において同じ遺伝子座に追加的にロックインする技術としては，AGISの方が効率および簡便さの点で優れていると考えられる．AGISが今後，セルエンジニアリングのためのゲノム操作ツールとして，産業応用された技術になることを期待したい．

文 献

- 1) Turan, S. *et al.*: *Gene*, **515**, 1 (2013).
- 2) Kameyama, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 1106 (2010).
- 3) Kawabe, Y. *et al.*: *Cytotechnology*, **64**, 267 (2012).
- 4) Obayashi, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 381 (2012).
- 5) Inao, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 99 (2015).
- 6) Kawabe, Y. *et al.*: *BMC Proc.*, **9**, P5 (2015).
- 7) 小松 将大ら：日本生物工学会第67回大会要旨集, 2P-268 (2015).
- 8) 西島 謙一ら：日本生物工学会第67回大会要旨集, 2P-252 (2015).
- 9) Wang, X. *et al.*: 日本生物工学会第67回大会要旨集, 2P-269 (2015).
- 10) 山名 良正ら：日本生物工学会第67回大会要旨集, 2P-254 (2015).
- 11) Sakuma, T. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 23849 (2015).

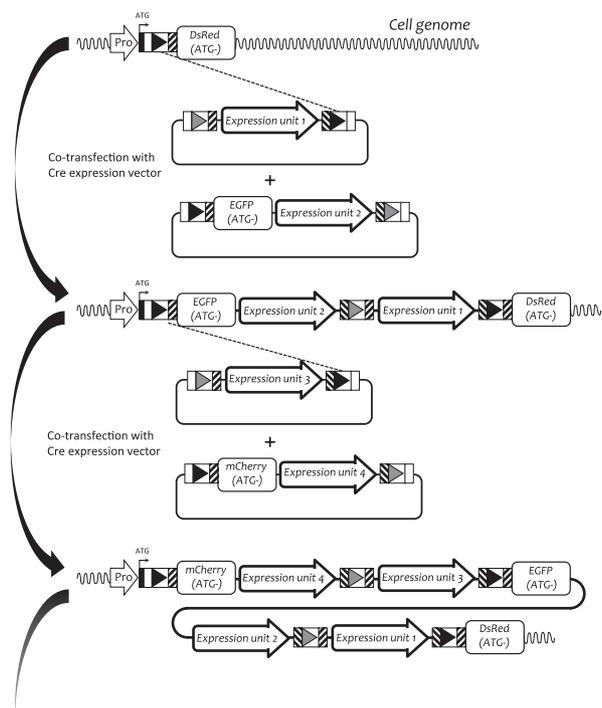


図4. AGISを用いた連続的逐次組込みによる生産細胞株構築の迅速化の概略図．1段階目と2段階目の反応を同時に起こすことで，複数の目的遺伝子がゲノムに組込まれた細胞を迅速に取得できる．