

# バイオ医薬品生産細胞構築のための 逐次遺伝子組込みシステムの開発

上平 正道

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の生産には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などを宿主とした遺伝子組換え動物細胞の大規模培養がしばしば用いられる。生産細胞の構築では、宿主細胞に目的遺伝子を有するベクターを導入することによって得られるが、長期間安定に生産する細胞を得るためには、目的遺伝子は細胞染色体に組み込まれる必要がある。動物細胞染色体への遺伝子導入には、大きく分けてウイルス法と非ウイルス法があるが<sup>1)</sup>、ウイルス法は効率が高い反面、ベクター生産の手間や安全性への懸念から工業用生産細胞株作製ではほとんど用いられず、通常は非ウイルス法が用いられる。しかし通常の非ウイルス法では、導入遺伝子が染色体に組み込まれる効率は低く、薬剤耐性遺伝子などを選択マーカーとして用いることによって、偶発的に目的遺伝子が組み込まれた細胞を、導入遺伝子の働きによる選抜培地中での生存によってスクリーニングされている。この場合における、外来遺伝子が細胞染色体へ組み込まれるメカニズムは、いまだ十分に解明されたとはいえず、基本的に、特定の染色体部位への導入は困難である。導入された染色体部位によって導入遺伝子の発現が影響される場合も多く、発現抑制 (遺伝子サイレンシング) もしばしば観察される。そのため、多くの安定形質転換体の中から高生産、高安定なものを選択する必要がある。さらに、工業生産に適した高生産細胞株を得るために導入遺伝子の増幅処理が行われる場合がある。代表的な遺伝子増幅法として、デヒドロフォレートレダクターゼ (DHFR) -メトトレキセート (MTX) システム、グルタミンシンターゼ (GS) -メチオニンスルフォキシミン (MSX) システムがある。MTX、MSXはそれぞれ対応する酵素 (DHFR、GS) の阻害剤であり、目的遺伝子と同時にこれらの酵素遺伝子を導入し、薬剤によって選抜する。さらに、選抜薬剤濃度を段階的に上昇させることによって培養し、高薬剤濃度でも増殖性を保持している細胞をスクリーニングすることによって、結果的に導入遺伝子コピー数が増大し、目的遺伝子発現が向上した細胞株を取得することが可能である。この方法は、生産性の高い細胞株の樹立のためによく用いられる手法となっているが、高生産株を作製できる保証はなく、細胞の選抜にも長期間を要することとなる。こういったことから、確実に導入遺伝子の高発現が期待できる染

色体部位に目的遺伝子の導入が行え、さらに高生産を達成するためにその部位での遺伝子増幅を迅速に行うことができる遺伝子導入法の開発が求められている。

## 逐次遺伝子組込みシステム (AGIS)

これまで、配列特異的な組換え酵素 (リコンビナーゼ) を用いた、配列特異的遺伝子組換えシステムが動物細胞の染色体工学において種々検討されている。動物細胞で使われてきた組換え酵素の代表的なものとして、バクテリオファージP1由来Cre、酵母由来Flp、バクテリオファージΦC31由来インテグラーゼがある。これらの組換え酵素は、組換えターゲットサイトとよばれる配列モチーフ (それぞれ、*loxP*、*FRT*および*attB/attP*とよばれる) を認識し、これに作用して遺伝子断片の効率的な組換えを触媒することができる。最近では、これら以外にも動物細胞で利用できる多くの組換え酵素とその認識配列のシステムが開発されており、独立して作用させることができるので、組み合わせた利用も可能である。Cre-*loxP*やFlp-*FRT*システムでは、それぞれ対応する相同な2つのターゲットサイト間での組換え反応を触媒するため、反応は可逆的であるが、ターゲットサイト間の距離が反応に影響するため、反応平衡としては、分子内反応である削除反応に大きく偏っていることが知られている。2種類のお互いに組換え反応をしない変異配列を持つターゲットサイトを用いることで、それらのターゲットサイトで挟まれた遺伝子を置換することも可能となっており、遺伝子カセット交換法 (Recombinase-mediated cassette exchange: RMCE) とよばれている。ΦC31インテグラーゼの組換えシステムでは、2つのターゲットサイトが元来ヘテロなものであり、不可逆的な組込みあるいは置換反応を触媒することができる。Cre-*loxP*やflp-*FRT*システムにおいても、いくつかの変異ターゲットサイトが開発されたことにより不可逆的な組込み反応や置換反応を促進することが可能となった。

Creは38 kDaの分子量をもつタンパク質で、*loxP*とよばれる34 bpのターゲットサイトを認識して組換え反応を行う (図1)。*loxP*は、Cre単量体の結合部位として機能するアームとよばれる13 bpの2つの回文配列とそれらにはさまれた8 bpのスペーサー配列からなる。これまでに、アーム配列やスペーサー配列における変異を

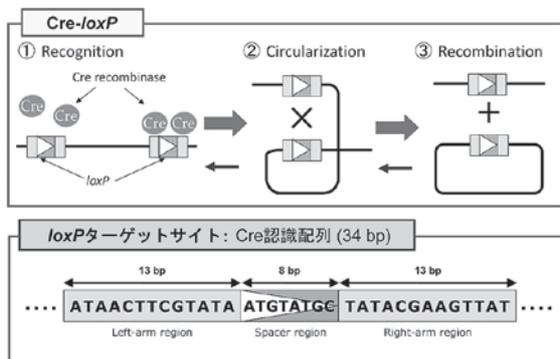


図1. 組換え酵素Cre-loxPシステムの反応様式

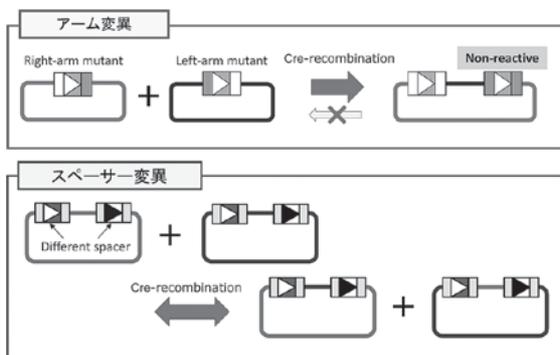


図2. 変異loxPを使った組換え反応の特性

有するターゲットサイトにより反応特性が変化することが報告されている(図2)<sup>2-4)</sup>。片側のアーム変異をもつものでは、反応後に両方のアームに変異が入ったものが生成することで不可逆的な挿入反応が促進され、スペーサー変異をもつものでは、組換え反応の特異性を持たせることが示されている。筆者らは、このような変異loxPの特性を組み合わせることで、方向性を制御しながら複数の遺伝子をタンデムに導入できる逐次遺伝子組込みシステム (Accumulative Gene Integration System, AGIS) を開発した<sup>5-7)</sup>。

AGISでは、目的遺伝子を含むドナーDNAの配列中に次の組込みのためのターゲットサイトを仕込んでおり、2回の組込み反応の後に組換え可能なターゲットサイトが初期状態に戻るよう設計している。このことによって、2つのドナーベクターを用意すれば、あらかじめ、染色体上に外来遺伝子を組み込むためのターゲットサイトを導入しておくことで、ドナーベクター上の目的遺伝子配列を特定染色体へ原理的に無限に繰り返し組み込むことが可能である。染色体に導入した2つのターゲットサイトへ遺伝子置換を行うRMCE型(図3a)<sup>5)</sup>と1つのターゲットサイトへ組込み反応を行う単純組込み型(図3b)<sup>7)</sup>がある。AGISでは反応制御のため複数のスペーサー変異を有するloxP配列(RMCE型で3種類、

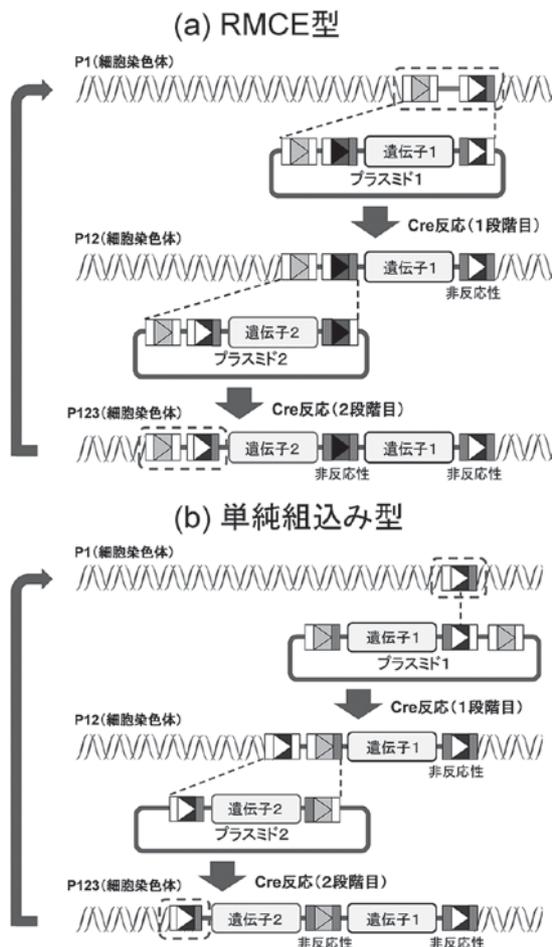


図3. 逐次遺伝子組込みシステム (AGIS)

単純組込み型で2種類)が必要であるが、目的遺伝子の組込み効率は使用するスペーサー配列に大きく依存していた<sup>5)</sup>。そこで、AGISへの適用に適した組込み効率の高い変異loxPの探索を行い、それまで使用していた変異loxPよりも約3倍高い組込み効率を示すものを選抜することができ<sup>8)</sup>、現在ではその配列を使用している。

以下に、AGISを利用した発現増強配列の導入効果の検証、およびAGISを用いた特定染色体への繰り返し遺伝子組込みの迅速化、について述べる。

### AGISの生産細胞構築への応用

#### AGISを利用した発現増強配列の導入効果の検証

AGISでは、特定の染色体部位へあらかじめ導入したターゲットサイトに目的遺伝子の組込みを行うものであり、組み込んだ染色体部位での導入遺伝子の働きを観測することができる。この特徴を利用して、発現ユニットに対して発現を増強する効果がある遺伝子配列 (Production Enhancer, PE) が、染色体に組み込まれた際の効果を解析し、最適な発現ユニット構成を見出すための方法として用いた<sup>9)</sup>。PE (東洋紡 (株) より提供)

を発現ユニットに対してさまざまな配置で組み込んだ AGIS用のドナーベクターを調製し、CHO細胞にCre発現ベクターとともに遺伝子導入することによって染色体に組み込んだ(図4)。特定染色体への外来遺伝子の組み込みには、近年では、ゲノム編集ツールであるTALENやCRISPR/Cas9が使われるようになってきたが、組み込み効率に関しては、Creを利用した本システムの方が数倍高いことがわかった<sup>10,11)</sup>。そのため、比較的簡単にターゲットサイトを導入した染色体部位に目的遺伝子を組み込んだ細胞の取得が可能である。また、外来遺伝子を特定染色体に組み込み反応を行って選抜された細胞プールから樹立されたクローンにおいて、クローン間で生産性にあまり差がないことを確認している。ここでは、発現ユニットに対して、PEを上流や下流に挿入方向をかえて1つ組み込んだ細胞や、種々の方向の組合せで挟んだ細胞を作製した。これによって、均一の染色体バックグラウンドで染色体上での発現ユニットにおけるPEの効果解析することができる。結果として、ここで用いたPEは、発現ユニットの下流に配置することで生産性を増大させる効果があり、挟むことによってさらに増大できることが明らかとなった。その効果としては、転写活性の増強によるものであることがわかった。さらに、AGISを使って同じ染色体部位にタンデムに発現ユニットを導入する際に、PEによる発現増強効果を保ちつつ導入コピー数に応じた生産量を得るためのPEの配置についても検討を行い、効果的な配置を決定した。

**AGISを用いた特定染色体への繰り返し遺伝子組み込みの迅速化** 基本的にAGISでは、組み込み反応ごとに細胞をスクリーニングおよびクローニングして目的の細胞

であることを確認して、次の組み込み反応に供していた。この場合には、3回の組み込み反応で3回のスクリーニング/クローニングを行っており、複数の遺伝子導入細胞を得るためには多くの手間と時間が必要となる。そこで、2つの組み込み反応を1回の反応で行うことによって、複数の遺伝子を組み込む際の手間を半減するためのシステ

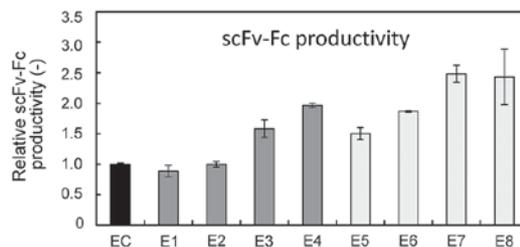
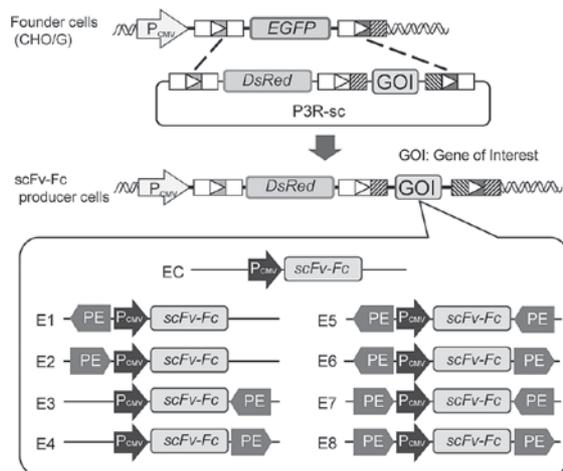


図4. AGISによる発現増強配列 (PE) の評価

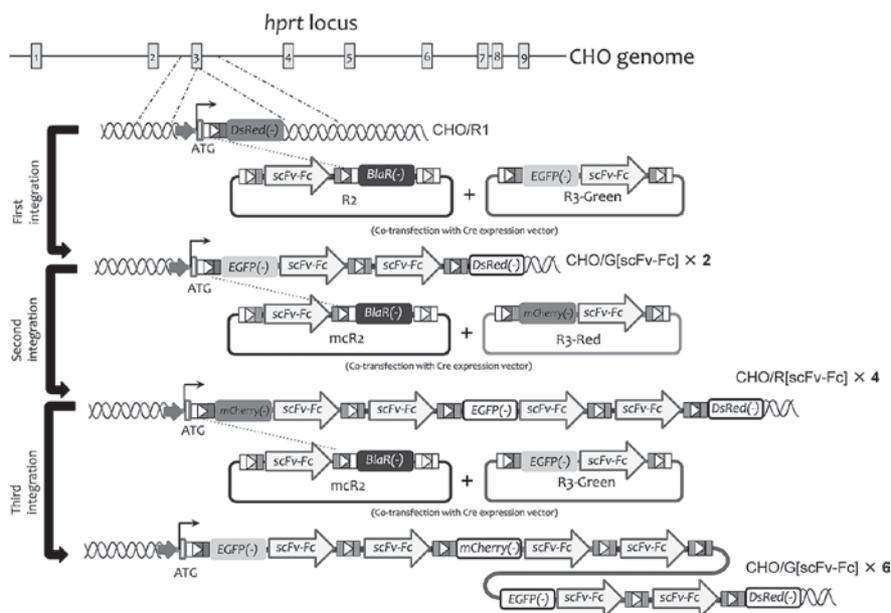


図5. AGISによる繰り返し遺伝子組み込みの迅速化

ムの開発を試みた。単純組込み型AGISをベースにドナープラスミドの再設計と、目的細胞の迅速スクリーニングのためにレポーターとなる蛍光タンパク質の色が順に変わるシステムを開発した(図5)<sup>12)</sup>。このシステムが機能するか確認するために、モデル抗体(scFv-Fc)を生産するCHO細胞の作製を行った。目的遺伝子を組み込む染色体部位としては、高安定・高生産が報告されているヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(*hprt*)遺伝子座へ導入することとした。CHO細胞の*hprt*遺伝子座にAGISの起点となるターゲット配列を含んだ赤色蛍光タンパク質発現ユニットを相同組換えにより導入した細胞(TOTO(株)より提供)を用いて、新しいAGISにより、scFv-Fc遺伝子発現ユニットをコードした2つのドナープラスミドを1回の遺伝子導入操作で組み込んだ。1回目の組込み操作では、赤色蛍光から緑色蛍光に変化した細胞をFACSにより選別し、ゲノムPCRにより、導入遺伝子の構造を確認したところ、高い効率で2コピーのscFv-Fc遺伝子発現ユニットが*hprt*遺伝子座に組み込まれた目的の細胞を得ることができた。この際に、ドナーベクターとして、通常のプラスミドベクターからバクテリア由来のバックボーン配列を取り除いたミニサークルDNAベクターを利用することが導入効率の向上に効果的であることがわかった<sup>12,13)</sup>。3回の組込み反応により6コピーのscFv-Fc遺伝子を*hprt*遺伝子座に組み込んだ細胞が確実に取得可能であった。非常に低頻度ではあるが、1回の組込み反応で6コピーのscFv-Fc遺伝子を*hprt*遺伝子座に組み込んだ細胞も出現した。このことより、ドナーベクターの細胞への導入やスクリーニング方法を工夫することによって、少

ない組込み反応操作で多くの導入遺伝子コピーを持った細胞の取得が行えるかもしれない。各組込み反応で樹立した細胞について、scFv-Fcの発現解析を行ったところ、導入遺伝子コピー数に応じて生産性が増加することがわかった(図6)。

## おわりに

本稿では、AGISのバイオ医薬品などの生産細胞構築への応用に関して述べた。基本的に生物種に制限はなく、Cre依存的に染色体に組み込まれたターゲットサイトに複数の目的遺伝子あるいは複数回目的遺伝子をタンデムに導入することができる。細胞染色体やベクター上で目的遺伝子の部位特異的導入、ホットスポットへのリターゲティング、大きな遺伝子の構築、遺伝子増幅システムとして用いることができる。人工染色体ベクターを開発している(株)chromocenterでは、染色体ベクターへの外来遺伝子の搭載ツールとしてAGISを採用している。また、筆者らはこのシステムがウイルスベクターによる標的染色体部位への遺伝子導入にも適用可能であることを報告している<sup>14,15)</sup>。近年では、CRISPR/Cas9システムがゲノム編集ツールとして脚光を浴びているが、AGISでは効率よく同じ遺伝子座に繰り返し遺伝子を組み込むことができるという特徴を有しており、ゲノム編集における1つの選択肢として有用性があると考えている。

## 謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号（JP17ae0101003）の支援によって行われた。

## 文 献

- 1) 上平正道：生物工学，**95**，734（2017）。
- 2) Albert, H. *et al.*: *Plant J.*, **7**, 649（1995）。
- 3) Lee, G. *et al.*: *Gene*, **216**, 55（1998）。
- 4) Missirlis, P. I. *et al.*: *BMC Genomics*, **7**, 73（2006）。
- 5) Kameyama, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 1106（2010）。
- 6) Kawabe, Y. *et al.*: *Cytotechnology*, **64**, 267（2012）。
- 7) Obayashi, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 381（2012）。
- 8) Inao, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 99（2015）。
- 9) Kawabe, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 390（2017）。
- 10) Sakuma, T. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 23849（2015）。
- 11) Kawabe, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 599（2018）。
- 12) Wang, X. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 583（2017）。
- 13) Wang, X. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **13**, e1800063（2018）。
- 14) Huang, S. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **107**, 717（2010）。
- 15) Kawabe, Y. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 1600（2016）。

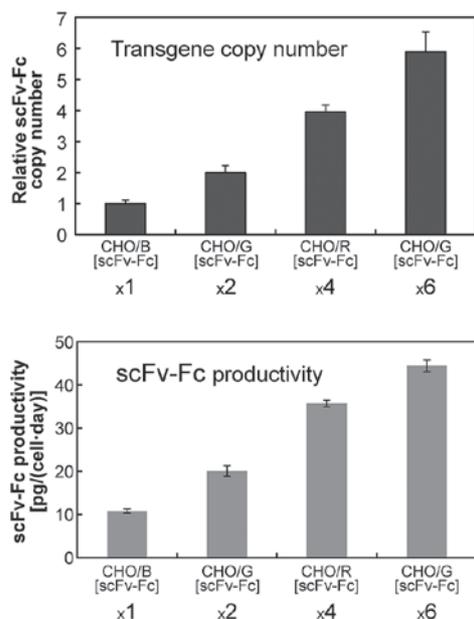


図6. AGISにより作製した生産細胞の評価