



リン脂質を活用した動物細胞の無血清培養に関する研究

坂井，健太郎

(Degree)

博士（工学）

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2539

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002539>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【303】

氏 名・(本 籍) 坂井 健太郎 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博 士 (工学)

学 位 記 番 号 博い第240号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

リン脂質を活用した動物細胞の無血清培養に関する研究

審 査 委 員

主査 教授 福田 秀樹

教授 鶴谷 滋

教授 加藤 滋雄

動物細胞は、糖鎖の付加やアルキル化、アミド化などの翻訳後修飾が生体内での生理活性の発現や安定性の維持に重要であるタンパク質を生産するための生体触媒として非常に重要となっている。現在、インターフェロン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、モノクローナル抗体などの有用タンパク質が動物細胞培養により生産されている。しかしながら、動物細胞を工業的規模で培養し有用タンパク質を効率的に生産する技術は、微生物培養に比べるとまだ十分に確立されたものとはいえない。動物細胞培養による有用タンパク質の工業的規模での高生産プロセスを構築するために克服しなければならない課題の一つは、タンパク質含量の少ない無血清培地を用いた培養技術の確立である。動物細胞培養で用いられる培地には、生体外での細胞の生育を促すために、通常、牛の胎児などから調製した血清が5~20%添加されている。しかしながら、血清の使用により、生産コストが高くなる、原因不明のロット差があり再現性の良い結果が得られない、多量のタンパク質を含むため目的タンパク質の分離精製が困難となる、ウイルス、マイコプラズマ、プリオンなどの生体由来の病原性因子が混入する危険性があるなど多くの問題が生じる。このため、血清の代わりにホルモン、成長因子、血清アルブミンなどのタンパク質性の因子を添加した無血清培地の利用が検討されているが、目的タンパク質の分離精製や病原性物質の混入の危険性を考慮すると、無血清培地へのタンパク質の添加量を可能な限り少なくすることが望まれている。

これに関連して、近年バイオサイエンスの分野では、ホスファチジン酸 (PA) やリゾホスファチジン酸 (LPA) などのリン脂質がヒトなどの正常細胞の DNA 合成を促進することが報告されており、これらのリン脂質の細胞内情報伝達におけるメディエーターとしての機能が注目を集めている。

本研究では、有用物質生産のための遺伝子組換えの宿主として広く用いられているチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を対象として、PA や LPA などのリン脂質を細胞増殖や組換えタンパク質生産の促進因子として活用することにより、タン

パク質含量の少ない無血清培地を開発し、組換えタンパク質の効率的生産プロセスを構築することを目的として検討を行った。

まず第1章では、遺伝子組換えを行っていない CHO 細胞を用いて、超音波処理により無血清培地中に懸濁させた PA または LPA が細胞の増殖に及ぼす効果について検討した。卵黄レシチン由来の PA を α -MEM などの基本合成培地に添加すると、CHO 細胞の増殖は顕著に促進された。さらに、卵黄レシチン由来の PA は、血清代替成分として広く用いられているインスリンやトランスフェリンを添加した無血清培地においても細胞の増殖を促進した。次に、炭素数が14から18のアシル基を有する種々の PA の効果を比較したところ、不飽和のアシル基を有する dioleoyl-PA (C18:1) に最も顕著な細胞増殖促進効果が認められた。同様の結果は PA の代わりに LPA を用いた場合にも得られたことから、PA や LPA、なかでも不飽和のアシル基を有する PA や LPA は、CHO 細胞を培養するためのタンパク質含量の少ない無血清培地を開発するうえで細胞増殖促進因子として利用可能であることが示唆された。

このように PA や LPA は CHO 細胞の増殖促進効果を有することが明らかとなったが、LPA は Ca^{2+} に対し親和性が高く Ca^{2+} を介して複合体を形成することが報告されている。実際に PA や LPA を高濃度で無血清培地に添加すると沈殿の生成が観察され、このように沈殿を形成しているリン脂質は細胞に有効に利用されていないと考えられる。そこで第2章では、リン脂質の効率的な供給方法を開発することを目的として、Tween 80 や Pluronic F-68 などの非イオン性界面活性剤を用いて PA を分散させ、これらが CHO 細胞の増殖に及ぼす効果について検討した。これらの界面活性剤を用いることによって卵黄レシチン由来の PA は無血清培地中で良好に分散し、超音波処理によって懸濁させた場合に比べて沈殿の形成量は明らかに減少した。また、界面活性剤を使用しない場合に比べて、PA による増殖促進効果が顕著に増大した。Tween 80 や Pluronic F-68 そのものには細胞増殖を促進する作用はなかったことから、PA による細胞増殖促進効果が増大したのは細胞が PA をより有効に利用できたため

と考えられる。さらに、超音波処理により懸濁させた場合ほとんど細胞増殖促進効果がみられなかった、飽和のアシル基を有する PA の場合でも、界面活性剤を用いることによって CHO 細胞の増殖促進効果を発現させることが可能であった。

第3章では、ヒトインターフェロン- γ (hIFN- γ) を産生する組換え CHO 細胞 (HIIF-D, ATCC CRL-8200) を用いて、PA が組換えタンパク質生産に及ぼす影響を検討した。Tween 80 を用いて分散させた卵黄レシチン由来の PA を無血清培地に添加すると、遺伝子組換えを行っていない細胞の場合と同様に、組換え細胞の増殖速度や到達細胞密度が大きくなった。さらに、培地中に分泌された hIFN- γ の濃度も増大した。培養途中で PA を含まない培地で培地交換を行うことにより PA を除去すると、細胞増殖の促進効果がみられなかったことから、PA の添加により細胞の増殖速度や到達細胞密度が増大するためには、培養期間を通じて培地中に PA が存在している必要があることが明らかとなった。また、PA を含む培地で培地交換を行ったところ、PA を添加していない場合に比べて到達細胞密度は約 2.5 倍、hIFN- γ 生産量は約 5 倍となり、細胞増殖および組換えタンパク質生産が大幅に向上した。

また、LPA に起因する細胞内情報伝達経路を構成するタンパク質のアンタゴニストと PA を同時に添加した培地で HIIF-D 細胞の培養を行いフローサイトメトリーにより細胞周期を測定したところ、PA による細胞増殖促進作用はアンタゴニストの同時添加により阻害された。このことから、PA による細胞内情報伝達経路は LPA による経路と同様であることが推察された。さらに、細胞周期と組換えタンパク質生産との相関関係をフローサイトメトリーにより解析した結果、hIFN- γ の比生産速度は G0/G1 期の細胞の割合と負の相関関係にあったことから、本細胞株による組換えタンパク質の生産は増殖に連動していると考察された。

以上のことから、PA または LPA、特に非イオン性の界面活性剤である Tween 80 を用いて調製した PA は、無血清培養下において CHO 細胞の増殖を促進するとともに組換えタンパク質生産をも促進したことから、CHO 細胞を対象とした低タンパク

質無血清培地を構築する上で非常に有用であると結論付けられる。

氏名	坂井 健太郎		
論文 題目	リン脂質を活用した動物細胞の無血清培養に関する研究		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	福 田 秀 樹
	副 査	教 授	鶴 谷 滋
	副 査	教 授	加 藤 滋 雄
	副 査		
	副 査		
要 旨			
動物細胞培養は近年、インターフェロン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、治療用ヒトモノクローナル抗体などのバイオ医薬品の生産手段として確固とした地位を築くに至った。動物細胞培養による有用物質の高生産プロセスを構築するために不可欠な技術課題の一つは、培養の無血清化である。動物細胞培養で用いられる培地には、生体外での細胞の生育を促すために、通常、牛胎児などの血清を5-20%添加する必要がある。しかしながら、血清の使用は、コストが高くなる、ロットによる差が大きい、目的タンパク質の分離精製が困難となる、ウイルス、マイコプラズマ、プリオンなどの生体由来の病原性因子の混入の危険性がある、などの多くの問題を抱えている。このため、血清の代わりにホルモン、成長因子、血清アルブミンなどのタンパク質性の因子を添加した無血清培地が開発されているが、多量のタンパク質の添加によるダウンストリームへの負荷や生体由来の病原性因子混入の危険性の問題は依然として残されており、タンパク質含量の少ない無血清培地、究極的には無タンパク質培地の開発が強く望まれている。 最近、バイオサイエンスの分野では、ホスファチジン酸 (PA) やリソホスファチジン酸 (LPA) などのリン脂質がヒトなどの正常細胞のDNA合成を促進することが報告されており、これらのリン脂質の生体内情報伝達におけるメディエーターとしての機能が注目を集めている。本研究では、有用物質生産のための遺伝子組換えの宿主として広く用いられているチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を対象として、PAなどの情報伝達関連リン脂質を細胞活性化因子として活用することによりタンパク質含量の少ない無血清培養技術を確立するための検討を行った。 第1章では、無血清培地に添加したPAおよびLPAがCHO細胞の増殖に及ぼす効果について検討している。超音波処理により懸濁させたPAまたはLPAを添加した無血清培地中で細胞を3日間培養した後、細胞の増殖をMTT assayによって評価した。卵黄レシチン由来のPAをα-MEMなどの基本合成培地に添加するとCHO細胞の増殖は顕著に促進された。また、卵黄レシチン由来のPAは、インスリンやトランスフェリンなどを添加した無血清培地においても細胞の増殖を促進した。次に、炭素数が14から18のアシル基を有する種々のPAの効果を比較したところ、不飽和のアシル基を有するdioleoyl-PA (C18:1) に最も顕著な増殖促進効果が認められた。同様の結果はPAの代わりにLPAを用いた場合にも得られた。これらの結果から、PAやLPA、なかでも不飽和のアシル基を有するPAやLPAは、CHO細胞のためのタンパク質含量の少ない無血清培地を確立するうえで細胞増殖促進因子として利用可能であると結論付けている。LPAはCa²⁺に対し親和性が高く、Ca²⁺を介して複合体を形成することが報告されている。実際にPAやLPAを高濃度で無血清培地に添加すると、沈殿の生成が観察されたことから、沈殿を形成しているリン脂質は細胞に有効に利用されていない可能性が示唆された。 第2章では、リン脂質の効率的な供給方法を開発することを目的として、Tween 80やPluronic F-68などの非イオン性界面活性剤を用いてPAを分散させ、このようなPAがCHO細胞の増殖に及ぼす効果について検討している。これらの界面活性剤を用いることによって卵黄レシチン由来のPAは無血清培地中で良好に分散し、超音波処理によって懸濁させた場合に比べて沈殿の形成量は明らかに減少した。また、界面活性剤を使用しない場合に比べて、PAによるCHO細胞の増殖促進効果が顕著に増大した。Tween 80やPluronic F-68そのものには細胞増殖を促進する作用がなかったことから、PAによる増殖促進効果が増大したのは細胞がPAをより有効に利用できたためと考察している。さらに、超音波処理により無血清培地に懸濁させた場合ほとんど増殖促進効果がみられなかった、飽和のアシル基を有するPAの場合でも、界面活性剤を用いることによってCHO細胞の増殖促進効果を発現させることに成功している。			

氏名	坂井 健太郎
第3章では、ヒトインターフェロン-γ (hIFN-γ) を産生する組換えCHO細胞 (HIIF-D, ATCC CRL-8200) を用いて、PAが組換えタンパク質生産に及ぼす影響を検討している。卵黄レシチン由来のPAを無血清培地に添加して培養を行うと、遺伝子組換えしていない細胞の場合と同様に、組換え細胞の増殖が促進されたが、さらに培地中に分泌されたhIFN-γの濃度も増大した。Tween 80を用いて分散させたPAを用いると、細胞の増殖やhIFN-γの生産はさらに促進された。一方、Pluronic F-68はHIIF-D株によるhIFN-γの生産を阻害した。次に、PAを含む培地を培養途中でPAを含まない培地と培地交換したところ、細胞の増殖には影響がなかったことから、PAによる細胞増殖の促進効果が発現するためにはPAが長時間培地中に存在する必要があることがわかった。また、PAを含む培地で培地交換を行うと、PAを添加していない場合に比べて到達細胞密度が約2.5倍、hIFN-γ濃度は約5倍となり、細胞増殖および組換えタンパク質生産が大幅に向上することを見出している。 本研究は、有用物質を生産するCHO細胞用の無血清培地について、PAやLPAなどのリン脂質の利用による無血清培地の低タンパク質化を研究したものであり、基礎的かつ実用的観点から見て重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。 よって学位申請者坂井健太郎は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。	