



Title	遺伝子増幅現象を利用した効率的物質生産に関する研究 : CHO細胞における遺伝子増幅を用いたhGM-CSF生産の定量的解析とその応用
Author(s)	吉川, 智啓
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3183665
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

遺伝子増幅現象を利用した効率的物質生産に関する研究

- CHO 細胞における遺伝子増幅を用いた hGM-CSF 生産の定量的解析とその応用 -

2000年

吉川 智 啓



①

遺伝子増幅現象を利用した効率的物質生産に関する研究

- CHO 細胞における遺伝子増幅を用いた hGM-CSF 生産の定量的解析とその応用 -

2000年

吉川智啓

目次

序論	1
第1章 段階的 MTX 濃度上昇系の違いが遺伝子増幅細胞へ与える影響	10
第1節 緒言	10
第2節 実験材料及び実験方法	11
2.1 使用細胞株	11
2.2 導入遺伝子及び使用ベクター	11
2.3 使用培地及び添加物質	12
2.4 培養条件及び操作	13
2.5 比速度測定(比増殖速度(μ), 比 hGM-CFS 生産速度(ρ))	13
2.6 遺伝子増幅領域の解析(fluorescence <i>in situ</i> hybridization, FISH)	16
2.6.1 染色体標本の作製	16
2.6.2 プローブの標識	17
2.6.3 ハイブリダイゼーション	17
2.6.4 シグナルの検出	18
2.6.5 顕微鏡による観察	20
第3節 MTX 濃度上昇条件が遺伝子増幅細胞に与える影響	22
第1項 使用細胞株	22
第2項 比速度と染色体中における遺伝子増幅領域の関係	24
2.1 遺伝子増幅領域の観察	24
2.2 ヘテロな遺伝子増幅細胞群の増幅遺伝子分布	26
2.3 長期培養における生産安定性	28
第4節 要約	30
第2章 遺伝子増幅領域の違いが増幅細胞の諸性質に及ぼす影響	31
第1節 緒言	31
第2節 実験材料及び実験方法	32
2.1 使用細胞株	32
2.2 使用培地及び添加物質	32
2.3 培養条件及び操作	32
2.3.1 限界希釈法によるクローニング	32
2.4 比速度測定(比増殖速度(μ), 比 hGM-CFS 生産速度(ρ))	33
2.5 遺伝子増幅領域の解析(fluorescence <i>in situ</i> hybridization, FISH)	33
2.6 コピー数の定量(Dot blotting, Slot blotting)	33

2. 6. 1	染色体 DNA 抽出	33
2. 6. 2	染色体 DNA の定量	34
2. 6. 3	プローブ DNA 作成	34
2. 6. 4	DIG 標識プローブ DNA 濃度検定	34
2. 6. 5	ハイブリダイゼーション	35
2. 6. 6	化学発光検出	35
2. 6. 7	使用試薬	35
2. 7	DHFR 活性測定	38
2. 7. 1	測定法	38
2. 7. 2	使用試薬	38
第3節	MTX 濃度上昇条件が遺伝子増幅細胞に与える影響	40
第1項	クローン細胞の諸性質	40
第2項	クローン細胞の長期培養における比速度の経時変化	43
第4節	要約	47
第3章	高生産細胞の効率的取得法	48
第1節	緒言	48
第2節	実験材料及び実験方法	49
2. 1	使用細胞株	49
2. 2	使用培地及び添加物質	49
2. 3	培養条件及び操作	49
2. 4	遺伝子増幅領域の解析(<i>fluorescence in situ hybridization</i> , FISH)	49
2. 5	flowcytometry(FCM)による細胞内 DHFR 量の測定	49
2. 5. 1	F-MTX 蛍光強度測定法	50
2. 5. 2	使用試薬	51
第3節	高生産遺伝子増幅細胞の効率的取得法	52
第1項	細胞内 DHFR 量の定量	52
第2項	F-MTX 蛍光強度を指標とした細胞選択	55
第3項	MTX 耐性獲得機構	57
第4項	高頻度に遺伝子増幅が生じる機構	63
第4節	要約	65
第4章	高頻度に遺伝子増幅が生じる染色体位置の同定	66
第1節	緒言	66
第2節	実験材料及び実験方法	67
2. 1	使用細胞株	67

2. 2	使用培地及び添加物質	67
2. 3	培養条件及び操作	67
2. 4	遺伝子増幅領域の解析(<i>fluorescence in situ hybridization</i> , FISH)	67
2. 5	FISH 画像の解析	67
2. 5. 1	画像処理	67
第3節	染色体上における増幅遺伝子位置の同定	69
第1項	標準的核型の取得	69
第2項	増幅遺伝子のマッピング	70
第4節	要約	74
総括		75
参考文献		78
関連論文リスト		93
謝辞		94

序論

近年の、医薬品開発は大きく分けて、2つの取り組みによってなされている。第1は、疾病に有効な化学物質を探索し、構造決定などを経て、生理活性物質を化学合成し、大量生産を行う方法である。第2は、化学的には合成不可能である薬効成分を生物材料を用いて生産するという方法である (Murakami, 1990)。後者は、一般的にバイオ医薬品と総称され、日本のみならず全世界においてその需要が高まってきている。さらに、1970年代後半以降の分子生物学、遺伝子工学の著しい発展に伴い、バイオ医薬品の生産が飛躍的に向上してきている。そのため、遺伝子組換え技術、細胞融合技術、細胞培養で生産されるバイオ医薬品は、その市場規模が拡大し続けている (村上ら, 1994, 森川, 1993)。

ヒトや動物などが発現している生理活性タンパク質遺伝子を大腸菌や酵母などの微生物に組込み、組換え微生物の培養により、インスリンや顆粒球刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) などの生理活性物質を生産する方法は大きな成功を収めた (高久, 1991)。ところが、対象となる生理活性物質の種類が増えるに従って、微生物による生産には不適當なものがあり、遺伝子組換え微生物を利用した生理活性物質の生産には、限界があることが明らかとなった (石田, 1994)。これは、糖鎖の付加やアルキル化、アミド化などの修飾を必要とするタンパク質や複雑なサブユニット構造を持つ高分子量タンパク質は、微生物を宿主として発現させると、動物細胞が生産する天然型のものと同一とならないため、動物内で十分な活性や安定性が得られないことによる。このような生理活性物質を生産するには本来その発現系である動物細胞を宿主として用いらざるを得ず、動物細胞は生体由来の有用生理活性物質を生産するための生体触媒として重要な位置を占めるようになった (村上, 1986, 村上ら, 1994)。

そのため 1980年代以降、動物細胞を宿主とした物質生産系の構築が我が国でも盛んに行われるようになってきた (片倉, 1995)。動物細胞培養技術は、生体の一部を取り出して、これを適切な成分を含む培地を用いて培養器内で生育させる技術、いわゆる組織培養から発展してきた。この組織培養技術は、複雑な生体制御機構から解放された器官、組織を細胞という最小単位で取り扱うことで、*in vivo* での生命現象を *in vitro* において解析を行うことを目的としてきた。その中でも、単離した細胞を培養する方法が、格段に進歩し、この技術によって細胞を生体から独立した生物として取り扱うことが可能となった。つまり、細胞レベルにおける分化、物質代謝、老化、発癌機構などを定量的に扱い、微生物で得られた知見や技術を利用できるようになった。

細胞培養技術の発展に伴い、微生物を宿主とした場合では十分な活性や安定性を達成できなかった、インターフェロン (interferon, INF) (Klein *et al.*, 1981, 小林, 1987)、ティシュー・プラスミノゲン・アクチベータ (tissue-type plasminogen activator, t-PA)

(Kaufman *et al.*, 1985)、エリスロポエチン (erythropoietin, EPO) (Lin *et al.*, 1985, Goto *et al.*, 1988)、血液凝固因子、コロニー刺激因子 (colony stimulating factors, CSFs) (高久, 1991)などの生理活性物質や、ウイルスワクチン (Radlett, 1987)、モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) (Birch *et al.*, 1985)などが、動物細胞を培養することにより生産されるようになった。さらに、急速に進展するゲノム情報の解読により、今後その種類と市場規模は拡大の一途をたどると思われる (貴島, 1996)。しかし現在、生産プロセスを構築するためには非常に長い期間を必要としており、今後、短期間で生産プロセスを構築し、大量かつ迅速に生理活性タンパク質を生産することが必要不可欠となってきている。

原核・真核を含む微生物を宿主とした場合には達成できない高度な翻訳後修飾能を有する動物細胞であるが、問題点も存在する。その問題点としては、動物細胞の元来有する性質と環境条件によるもので、以下のような事柄が挙げられる。

① 増殖速度が非常に低い

倍加時間で比較してみると、微生物の0.2-2時間に比べ、動物細胞では、10-72時間と非常に長い時間を必要とする。このため、培養が長期にわたり雑菌汚染に関しても注意を払う必要がある。

② 組織の一部として機能していた細胞を不死化することによって得られた細胞株では、一部機能を欠損している場合もある

ハイブリドーマやガン化細胞は、無限増殖能を有することで、長期間培養を行うことが可能となるが、代謝能力などが低下する場合があります、組織を形成していたとき有していた機能が消失する場合が多い。

③ 不死化しない場合においては、細胞の有する機能は短期間で消失してしまう場合が多い

初代肝細胞など、生体組織を形成していた細胞を分離して利用すると、不死化する場合と比べ細胞が有する多くの機能を利用することが可能であるが、有限寿命であることや、持っている機能の多くが次第に消失していく場合が多い。

環境条件に関しては、以下のようなものが挙げられる。

④ 培養の際に用いられる培地組成が複雑であり高価

動物細胞を培養する場合、栄養価が高く中性付近のpHである培地でしか生育できない。さらには、細胞の増殖に必須となる成分が、血清中にのみ存在する場合が多く、無血清化培地では、増殖能などが著しく低下することが多い。

⑤ 微生物に比べ細胞の構造が脆弱で剪断力に対して敏感

細胞壁を持たないために、剪断力に対して弱く、通気攪拌培養などの培養方法を適用するのが困難である。

さらに、物質生産を行うに当たって以下のようなことが問題となる。

⑥ 微生物で行われているような遺伝子操作が単純には利用できない

倍数性 (ploidy) の問題や微生物に比べて高度な修復機構を有するために、様々な遺伝子型を有する細胞株の構築が困難である。

⑦ クローン細胞取得に多大な時間が必要である

増殖能が低い動物細胞からのクローニングであるため、クローンの選択期間が長期にわたる。

⑧ 培地当たりの生産性が非常に低い

物質生産時、最も大きな問題としてあげられる問題であり、これを改善する取り組みとしては、

(1) 培養細胞の高密度化や培養技術の改良

(2) 単位細胞当たりの生産性を向上させるといった取り組み

が挙げられるが、これらの取り組みについて以下に詳しく述べる。

(1) 高密度化及び、培養技術の改良

ここでは、浮遊細胞の通気攪拌培養 (Zwerner *et al.*, 1981)、マイクロキャリア培養法 (Wezel, 1967, Giard *et al.*, 1979, 1980, 1977,), ホローファイバー培養法 (Altshuler *et al.*, 1986, 鮫島, 1983)、マイクロカプセル培養法 (Lim *et al.*, 1980, Nilsson *et al.*, 1980, 1983)、還流培養法 (Himmelfarb *et al.*, 1969, Tolbert *et al.*, 1983)、ゲル包括法 (Nilsson *et al.*, 1983, Shirai *et al.*, 1987, 1988, Iijima *et al.*, 1988, Kamihara *et al.*, 1993)といった様々な培養法が開発され、 $10^7 \sim 10^8$ cells ml⁻¹ という高密度化に成功しているとの報告もある (佐藤ら, 1983, Omasa *et al.*, 1995)。そのため、使用する細胞種や培養スケールによって最適な培養システムを選択することが可能となってきている。また培養条件に関しては、pH (Ceccarini *et al.*, 1971, Föhring *et al.*, 1980, Werner *et al.*, 1993)、酸化還元電位(Oxidation-Reduction Potential, ORP) (Daniels *et al.*, 1965)、溶存酸素(Dissolved Oxygen, DO) (Kilburn *et al.*, 1968, Miller *et al.*, 1987, Balin *et al.*, 1976, Gillissen *et al.*, 1997, Kimura *et al.*, 1998)、培養温度 (Werner *et al.*, 1993, Takahashi *et al.*, 1994, Kaufmann *et al.*, 1999)、浸透圧の増殖及び組換えタンパク質に及ぼす影響や、攪拌と剪断力の影響 (Groves *et al.*, 1987, Maas, 1994, Mannsfeldt *et al.*, 1999)などが研究されている。また、動物細胞は栄養要求性が高く複雑な培地組成中でしか生育できない。そのために、培地組成の検討に関しても様々な研究が行われている (Eagle, 1959, Dulbecco *et al.*, 1959, Iscove *et al.*, 1978, Morgan *et al.*, 1950, Ham, 1963, 1965, Moore *et al.*, 1967, Yamane *et al.*, 1975, Barnes *et al.*, 1980)。さらに、血清中の有用成分を分析し、これを補った培地組成を有する無血清培地の開発に関しても精力的な研究がなされている (Ganne *et al.*, 1991, Castro *et al.*, 1992, 1995, Kim *et al.*, 1998, 1999, Lee *et al.*, 1999)。また近年、代謝工学的手法を用いた、培養制御な

どの検討も精力的に行われている (Al-Rubeai *et al.*, 1991, Shen *et al.*, 1994, Farrell *et al.*, 1994, Ishaque *et al.*, 1998, Seifert *et al.*, 1999)。

(2) 単位細胞当たりの生産性の向上

単位細胞当たりの生産性の向上に関しては、大きく分類して、2つの取り組みが行われている。1つは、SV40 エンハンサー遺伝子 (高岡, 1983) や CMV プロモータ (Palermo *et al.*, 1991, Attal *et al.*, 1995-1996, Somasundaram *et al.*, 1999) などに代表されるような、遺伝子組み換えによって導入した遺伝子の発現量を向上させるという取り組み (Palermo *et al.*, 1991, Zhang *et al.*, 1997) が挙げられる。この分野に関しては、新たなプロモータの発見や改良 (Schwartz *et al.*, 1991, Jeannotte *et al.*, 1991, Rouet *et al.*, 1994, Benuck *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2000) 及び、エンハンサー配列の取得 (Meng *et al.*, 1994, Masuda *et al.*, 2000) が試みられている。もう1つの取り組みとしては、遺伝子増幅現象を利用した方法である (Kaufman, 1993)。ある条件で染色体中における遺伝子のコピー数が増幅され、その近傍配列が同時に増幅されるという現象を利用して、組換えタンパク質遺伝子のコピー数を上昇させることで、単位細胞当たりの生産性の向上を達成する方法である (Bendin, 1988, Moir *et al.*, 1990, Kellems, 1991, Wernicke *et al.*, 1992, Pu *et al.*, 1998)。また、近年の遺伝子治療などに必要となってくるターゲティングベクター開発 (Zeigler *et al.*, 1996, Farugi *et al.*, 1997, Lai *et al.*, 1999, Lacroix *et al.*, 1999, Chan *et al.*, 1999)、生産の効率化 (Chen *et al.*, 1994) についても精力的な研究が行われている。

ここで、遺伝子増幅現象を利用した組換えタンパク質生産の効率化に関する研究は、他の生産性の向上への取り組みに比べその結果が公開されていない。これは、遺伝子増幅現象自体に未解明な点が多いという問題の他に、実生産プロセス構築に密接に関連しているため、企業などが確立しているノウハウを公開していない点も挙げられる。物質生産を行うときに最も時間がかかり、労力が必要となるプロセスは細胞株の構築である。さらに、物質生産において細胞株の構築は、最も重要であるにもかかわらず、効率的な細胞株構築技術は未だに明らかにされておらず、経験的に構築された細胞株を利用して組換えタンパク質生産を行っているに過ぎない。そこで本研究では、動物細胞を用いた物質生産において、根幹にあると考えられる生産に適した細胞株の構築法の開発に焦点を絞って、遺伝子増幅現象を定量的に取り扱い、その知見から効率的な遺伝子増幅細胞構築法及びスクリーニング法について研究を行った。

遺伝子増幅現象を用いた組換えタンパク質生産プロセスは、Fig. 0.1. に示すように、増幅遺伝子及び生産させる組換えタンパク質遺伝子を含むベクターによって、宿主細胞を形質転換する。この段階では、導入された組換えタンパク質遺伝子のコピー数は低いために、生産細胞株には適さない。そこで、増幅遺伝子の機能を阻害するような

薬剤を段階的に濃度上昇させ、その薬剤濃度に対して耐性を有する細胞を選択する。その結果、染色体中において増幅遺伝子のコピー数が上昇した耐性細胞が出現する。増幅遺伝子が染色体中において増幅するとき、増幅遺伝子配列だけでなくその近傍の染色体領域 (数キロベースから数メガベースの領域) を同時に増幅することより (Looney *et al.*, 1988, Leu *et al.*, 1992, Shotkoski *et al.*, 1993)、増幅遺伝子と同時に染色体に組み込んだ目的タンパク質遺伝子のコピー数も上昇する。最終的には、染色体中に数百から数千の目的タンパク質遺伝子を有する遺伝子増幅細胞が構築できる。これによって、単位細胞当たりの生産性が上昇した生産細胞株が取得可能となる。

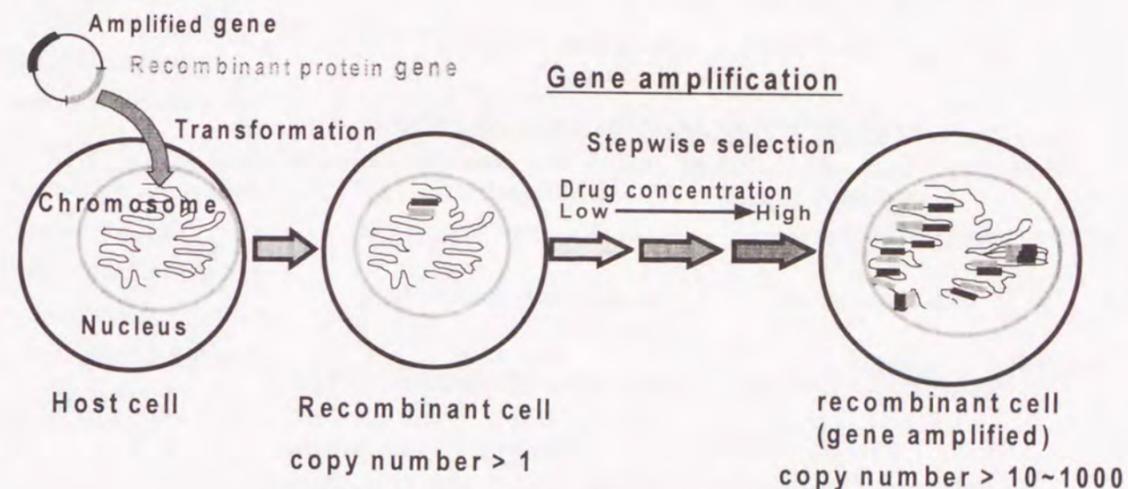


Fig. 0.1. Mechanism of gene amplification.

現在までに、報告されている遺伝子増幅系は、Table 0.1. に示すように多数に上っている。

Table 0.1. List of gene amplifications in mammalian cells (Kaufman *et al.*, 1993).

Host	Amplified gene	Selection reagent
CHO, human, mouse	Dihydrofolate reductase (DHFR)	Methotrexate (MTX)
CHO, myeloma	Glutamine synthetase (GS)	Methionine sulfoximine (MSX)
CHO, human tumor	Aspartate transcarbamylase (CAD)	N-phosphonacetyl-L-aspartate (PALA)
human, yeast, CHO, mouse	Metallothionein (MT)	Cadmium (Cd^{2+})
human, mouse, CHO	Adenosine deaminase (ADA)	Adenosine, alanosine, 2'-deoxycofomycin
hamster	Adenylate deaminase (AMPD1, 2)	Adenine, azaserine, cofomycin
mouse	UMP synthetase	6-Azauridine, pyrazofuran
mouse, human, hamster	P-Glycoprotein (P-gp, MDR)	Multiple drugs
CHO, carcinoma	Asparagine synthetase (AS)	β -Aspartyl hydroxamate or albizziin
human, hamster, mouse	Ornithine decarboxylase (ODC)	α -difluoromethyl-ornithine (DFMO)

以上のような数多くの遺伝子増幅系の報告例の中で、実際に組換えタンパク質生産に用いられている遺伝子増幅系としては、Dihydrofolate reductase (DHFR)、Glutamine synthetase (GS) 遺伝子増幅系である。これは、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞は、他の細胞に比べて染色体の再編成 (rearrangement) や相同組み換え (homologous recombination) などが頻繁に起こるために (10^{-4})、遺伝子増幅が生じやすいといった利点があるためである。さらに、ヒト由来の細胞やマウス細胞などと異なり、増殖速度についても CHO 細胞は高く ($T_d = 10 \sim 30$ hr)、この点においても生産に適している。我が国における、CHO-dhfr を用いた組換えタンパク質生産では、EPO、G-CSF、t-PA が実際に生産されている (高久, 1991, 石田ら, 1994)。

そこで本研究において、遺伝子増幅現象について研究を行うに当たり、対象とする遺伝子増幅系を、CHO-dhfr 遺伝子増幅系とした。DHFR は、葉酸 (folic acid) を還元し、ジヒドロ葉酸 (dihydrofolic acid, DHF) とし、さらに DHF を還元し、テトラヒドロ葉酸 (tetrahydrofolic acid, THF) にする反応などを触媒する酵素であり、核酸類 (AMP, GMP, TMP) やグリシンの合成に必須である (Fig. 0.2.)。

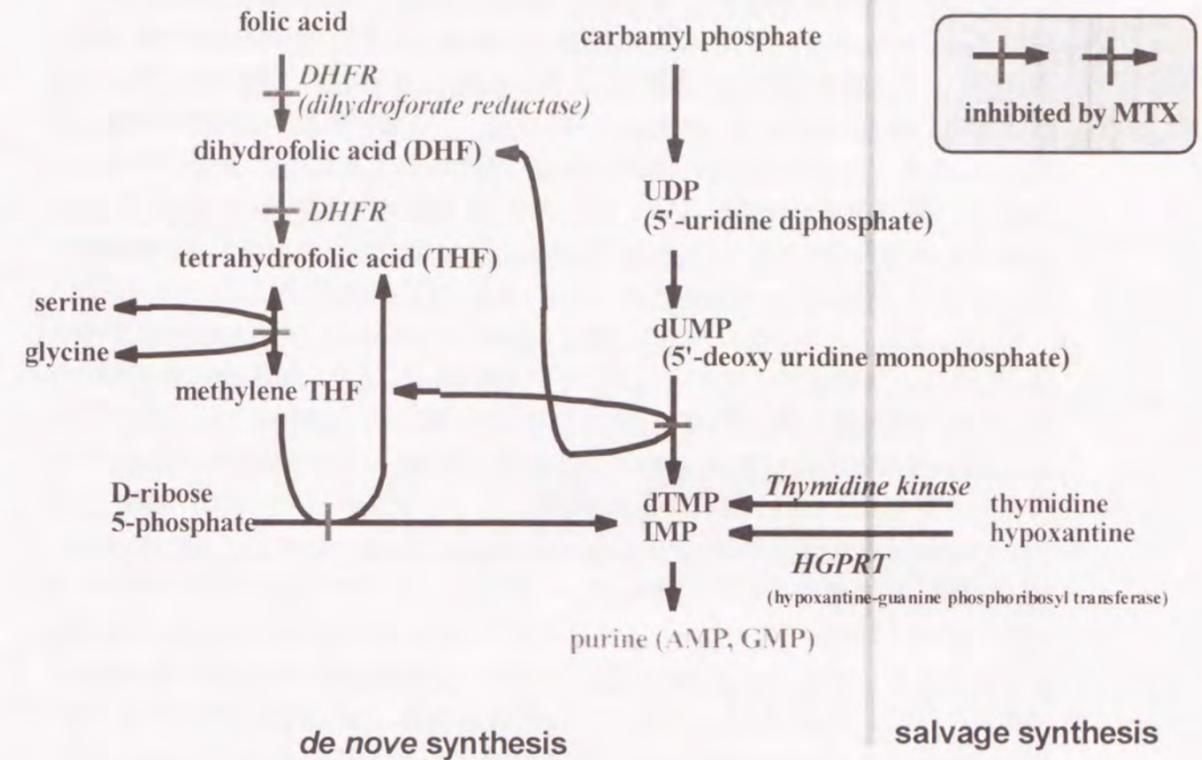


Fig. 0.2. Nucleic acid synthesis pathway in mammalian cell.

この酵素 DHFR の阻害剤であるメトトレキサート (methotrexate, MTX) の濃度を上昇させて細胞培養を行うと、染色体上で dhfr 遺伝子のコピー数が増加する。この系においては、ベクター中の、dhfr 遺伝子の隣に配した目的タンパク質の遺伝子のコピー数が同時に増加するため、タンパク質の生産性を高めることが可能である (Fig. 0.1.)。CHO 細胞では、dhfr 遺伝子欠損株 (DG44, DXB11 など) が得られており、導入プラスミド中の dhfr 遺伝子を選択マーカーとしても用いることができる。遺伝子増幅法においては、MTX 濃度上昇条件によって、遺伝子の増幅効率が変化し、遺伝子のコピー数、細胞あたりの目的タンパク質生産量が変化することが知られている (亀岡, 1995)。しかし、その最も効率の良い MTX 濃度上昇条件はいまだ確立されておらず、マウス 3T3 細胞において、200 nM-MTX の濃度上昇させるときの段階的濃度上昇条件が、生産性に及ぼす影響についての報告のみである (Rath *et al.*, 1984)。この結果では、0 から 200 nM-MTX としたときに比べ、複数の段階を踏んで 200 nM-MTX に到達させたときに遺伝子増幅頻度が 6 倍に上昇したという報告にとどまっていた。従って、MTX の段階的上昇系の組換えタンパク質生産に及ぼす影響に関しては、明らかになっていない。従って、現在工業生産に用いる細胞を選択する際には、ある程度試行錯誤

によってMTX濃度を上昇させ、遺伝子増幅細胞を選択している。また、DHFR 遺伝子増幅系によって、タンパク質の生産性を高めた細胞を培養し、目的タンパク質を生産させる際には、MTX の混入が問題となる。MTX は、白血病患者に投与され白血病細胞を排除する効果を持つ薬剤であり、人体に対しても有害であるので、タンパク質を医薬品として投与する際、混入してはならない物質である。したがって、生産レベルではMTX 非存在下での培養が好ましい。しかしながら、増幅された遺伝子が、選択圧のない MTX 非存在下においては脱落し、目的タンパク質の生産性が低下する現象も報告されている (Weidle *et al.*, 1988)。

そこで、本研究においては、MTX 濃度上昇条件の違いが、得られる細胞の比増殖速度、及び比生産速度に及ぼす影響について解析した。また、増幅遺伝子が存在する染色体上の位置の違いが、増幅頻度に及ぼす影響について解析した。さらに、どのような遺伝子増幅細胞が生産に適している細胞であるかについても検討を行った。発現させるモデルタンパク質として、ヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, hGM-CSF) を用いた。hGM-CSF は、多能性幹細胞の顆粒球、マクロファージへの分化を促進するサイトカインの一種で、抗癌剤使用後あるいは骨髄移植後の好中球減少症の治療等に画期的効果を示す (Antman *et al.*, 1988)。さらにこのタンパク質は、N 型糖鎖が 2 本と O 型糖鎖が 1 本存在し (Kaushansky *et al.*, 1987)、糖鎖の存在により活性が低下するという報告 (Moonen *et al.*, 1987) がある。一方、糖鎖修飾により血中安定性を有する (Gribben *et al.*, 1990) との報告もされているタンパク質である。

第1章では、遺伝子増幅の際に行う MTX の段階的濃度上昇条件が、遺伝子増幅頻度に及ぼす影響について検討を行った。CHO-dhfr 遺伝子増幅系においては、このような知見は報告されていない。本章では、様々な MTX 濃度上昇系を設定して種々の遺伝子増幅細胞集団を取得し、それぞれの細胞集団の比増殖速度と比生産速度を比較した結果、比生産速度の高い細胞集団には、テロメア近傍に増幅遺伝子が存在している細胞の割合が多いことが分かった。さらに増幅遺伝子の分布の変化に大きな影響を与えている段階が遺伝子増幅初期段階であり、初期において 50 nM-MTX において選択した場合、100 nM-MTX において選択したものに比べ、生産性及び増幅遺伝子をテロメア近傍に有している細胞の存在割合が高いことが明らかとなった。

第2章では、増幅遺伝子の染色体上における位置が、得られた遺伝子増幅細胞の生産性及び、薬剤非存在下における生産安定性に影響を与えているかを確認するために、クローン化を行い、遺伝子増幅領域の異なるクローン細胞において、細胞の性質について比較検討した。その結果、増幅遺伝子がテロメア近傍に存在するクローン細胞が、高い hGM-CSF コピー数、生産性及び、生産安定性を有していることを確認した。

第3章では、それまでの結果より明らかとなった、高生産性を有していたテロメア近傍に増幅遺伝子を有する細胞を効率よく取得する方法について検討を行った。選択法としては、一度に大量の細胞を解析し、かつ、分取することも可能であるセルソータを用いた細胞選択法について検討を行った。この結果、細胞内の DHFR タンパク質に特異的に結合する MTX に蛍光標識を施した F-MTX を用いることで、生産性の異なる細胞を区別することが可能であることを示し、ソーティングによってテロメア近傍に増幅遺伝子を有する細胞を多く含む細胞集団を取得できることがわかった。また、一連の結果から、MTX 耐性細胞集団中には、遺伝子増幅細胞の他に、MTX の膜透過性が変化したもの、DHFR の MTX に対する親和性が変化しているもの、単位コピー当たりの DHFR 活性が向上しているものが混在していることが明らかとなった。高頻度に遺伝子増幅が生じている理由として、染色体中に導入された DHFR 遺伝子の単位コピー当たりの活性が低い場合、これを補う形で遺伝子増幅が高頻度に生じることが明らかとなった。

第4章では、FISH による一連の解析から、テロメア近傍に増幅遺伝子が存在している細胞が、ある特定の染色体上に集中して観察された。そこで、染色体上における増幅遺伝子の染色体上における位置のマッピングを行った。Chromosome Image Analyzing System III (CHIAS III) を用いた画像解析の結果より、増幅遺伝子は 20 本の染色体のうちのある 1 本の染色体のテロメア近傍に集中して存在していることがわかった。このことから、染色体の特定の領域に組み込まれた増幅遺伝子の増幅頻度が高くなるという、遺伝子増幅の配列特異性の可能性が示唆された。

最後に本研究の結果を総括し、将来の展望を述べた。

第1章 段階的 MTX 濃度上昇系の違いが遺伝子増幅細胞へ与える影響

第1節 緒言

用いる細胞を取得する際に、より安定で、かつ高生産能を有する細胞の特徴を解析し、効率的取得法についての知見を得ることは非常に重要なことである。通常用いられる、段階的 MTX 濃度上昇によって得られる細胞群は、様々な細胞が混在している。この細胞群において、どのような細胞が生産に適しているか、また、どのように上昇系を設定することで高生産能を有する細胞を選択することができるのかについて、定量性を持って検討を行うことは効率的な細胞株を構築する際重要になる。

本章では、段階的 MTX 濃度上昇系の違いが、得られる遺伝子増幅細胞の比速度や安定性に与える影響について検討を行った。さらに、増幅遺伝子の種類や宿主細胞によって遺伝子増幅領域の違いが報告されていることから、増幅遺伝子の染色体上における位置が、得られる細胞の性質にどのような関連を持っているかについて検討を行うこととした。

第2節 実験材料及び実験方法

2.1 使用細胞株

宿主細胞として Chasin らが樹立した CHO DG44 株 (Urlaub *et al.*, 1980) を使用した。CHO DG44 株は、CHO-K1 内の DHFR が欠損した細胞株で、復帰変異が全く観察されなかった細胞株である。本細胞株は、Dr. L. Chasin により分与された。

2.2 導入遺伝子及び使用ベクター

増幅遺伝子を CHO 細胞に導入する際に使用したベクターは、亀岡が構築した、pSV2-dhfr/hGM-CSF を用いた。本プラスミドは、SV40 early プロモータ及び、SV40 polyA (Fiers *et al.*, 1978, Reddy *et al.*, 1978) 及び、マウス DHFR 遺伝子 (Chang *et al.*, 1978, Nunberg *et al.*, 1980, Setzer *et al.*, 1982) を有するプラスミド pSV2-dhfr (Southern *et al.*, 1982, Subramani *et al.*, 1981) (ATCC No. 37146) と、SV40 early プロモータ、SV40 polyA 及び hGM-CSF 遺伝子を有するプラスミドベクター pCD-hGM-CSF (Okayama *et al.*, 1982; 1983) (ATCC No. 57594) を用いて構築した。構築方法を Fig. 1.1. に示す。

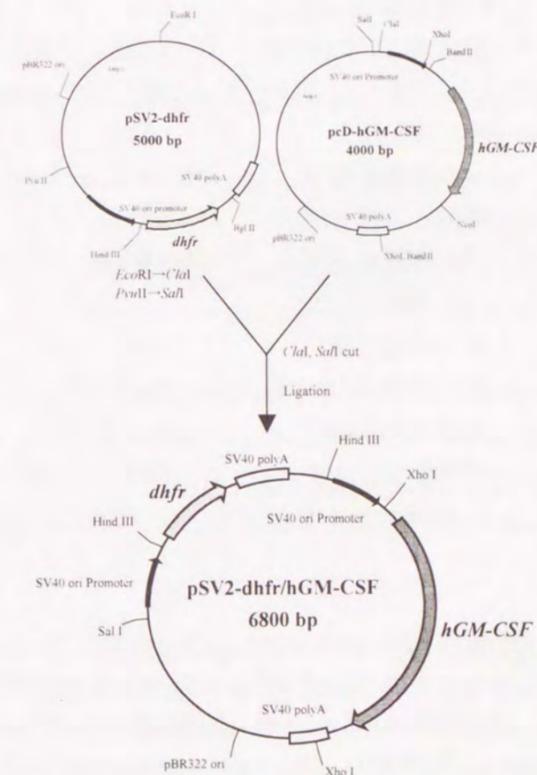


Fig. 1.1. Construction procedure of vector pSV2-dhfr/hGM-CSF.

また、pSV2-dhfr/hGM-CSF ベクターを CHO 細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法によって行った (亀岡, 1995)。IMDM (核酸+) を用いて培養した DG44 株にトリプシン溶液を加え、37°C にて 10 min 保温した。加えたトリプシン溶液と等量の IMDM (核酸+) を加えてトリプシン反応を停止させた。遠心分離によって細胞ペレットを取得し、導入バッファー (250 mM Mannitol, 100mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl (pH 7.2), filter sterile) に 5.6×10^7 (cells mL⁻¹) となるように再懸濁した。40 μL の DNA 溶液 (0.4 μg μL⁻¹) を 360 μL の細胞懸濁液に混合し、チャンバー (FTC-63, d=2 mm, volume=400 mL) に入れ、印加前 5 min に氷冷した。チャンバー抵抗測定後に電気パルス (SHIMAZU Somatic Hybridizer SSH-10) を行った。その後 5 min 氷冷し、30 min 室温放置後、IMDM (核酸+) に播種した。2 日後に培地を IMDM (核酸-) に交換し、形質転換体の選択を行った。電気パルス条件は以下の通りである (Table 1.1.)。

Table 1.1. Setting of electroporation.

電極間隔	2 mm
交流周波数	1 MHz
交流初期印加電圧	0 V
交流初期印加時間	1 sec
パルス幅	50
パルス電圧	600 V
パルス電界強度	3 kV/cm
交流二次印加電圧	0 V
パルス間隔	1.0 sec
パルス数	2
パルス電圧変化	+0 V
交流最終印加時間	0 sec
交流電圧減衰率	0 %
接触強化	OFF

2.3 使用培地及び添加物質

基本培地としては、Isocov's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Sigma I-7633) を使用した。これに、NaHCO₃ (Wako pure chemical 191-01305) 2.2 g、kanamycin (Wako pure chemical 113-00343) 36 mg、streptomycin (Wako pure chemical 194-08512) 120 mg を添加したものを 8N NaOH (Wako pure chemical 197-02125) によ

り pH 7.3 に調整し、超純水 (MILIPORE Milli-Q LABO) を用いて 1 L にメスアップした。その後、口径 0.22 μm のメンブレンフィルター (Falcon 7105) にて濾過滅菌したものを使用した。これを基本培地として、核酸を生育に要求する細胞株 (DG44) においては、hypoxanthine (Yamasa 7068)、thymidine (Yamasa 7083) を添加した。増殖因子の補給のため、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco 26140-079) を 10 % になるように添加した。また、血清に混入している核酸などの低分子成分を除去するために、透析 (Wako pure chemical 543-00061) を行った血清を形質転換体の使用時に用いた。遺伝子増幅時に使用した 1.0×10^{-4} M MTX 溶液 (AMETHOPTERIN: Sigma A-6770) (4.54 mg / MTX solution buffer 100 mL) は、下記 (Table 1.2.) に示した緩衝液に溶解させ、終濃度が目的の濃度となるように添加した。

Table 1.2. MTX solution buffer (pH 7.1).

NaCl (Nacalai tesque 313-20)	1.64	g
HEPES (Nacalai tesque 175-14)	1.12	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (Wako pure chemical 196-02835)	0.1	g
Ultra pure water	100	mL

2.4 培養条件及び操作

継代培養、長期培養、及び比速度測定用として、それぞれ以下の培養容器を用いた。

・25 cm² T-フラスコ (住友ベークライト MS-20050; 底面積 25 cm²、容量 50 mL) … 継代培養

・100 mm ディッシュ (Corning 25020) … 比速度測定

ここで、25 cm² T-フラスコと 100 mm ディッシュには 10 mL の培地を入れ使用した。

培養容器に植え込んだ細胞が増殖を続けていくには、栄養源の供給、代謝産物や老廃物の除去及び、pH の維持が必要となる。よって、コンフルエント (容器底面が全て細胞で覆われた状態) になった時点で、培地を全て取り除き、培地量の 1/2 容量の 0.25% トリプシン溶液 (DIFCO 0152-15) を加えて剥離し、新鮮培地への継代を行った。

2.5 比速度測定 (比増殖速度(μ)、比 hGM-CSF 生産速度(ρ)) (伊藤, 1994)

レプリカ法を用いて細胞濃度の経時変化、hGM-CSF 生産量を測定した。所定濃度の MTX を含む IMDM 培地 (核酸 +/-) に細胞を 1.0×10^5 (cells mL⁻¹) の濃度で接種した。接種した細胞は全て同じ状態であると仮定し、約 3 日間、所定のサンプリング間隔ごとに、ディッシュ 1 枚の細胞濃度を Bürker-Turk (ERMA 4296) 血球計算盤を用い

トリパンブルー色素 (Nakarai Chemicals 355-25) 排除法にて測定した (Omasa *et al.*, 1992)。培養上清の hGM-CSF 濃度を酵素標識抗体測定法 (ELISA 法) にて測定した (伊藤, 1994, 岩崎, 1983)。

細胞の μ と ρ は、下のような収支式 (1), (2) に基づいた (3), (4) 式を用いて算出した。

X_t : 全細胞数 (cells L⁻¹)

X_v : 生細胞数 (cells L⁻¹)

P : hGM-CSF 濃度 (g L⁻¹)

μ : 比増殖速度 (h⁻¹)

ρ : 比 hGM-CSF 生産速度 (g cell⁻¹ h⁻¹)

細胞および、生産物に関する収支式はそれぞれ

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu X_v \dots (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = \rho X_v \dots (2)$$

(1) 式の両辺を X_t で割って積分すると次の式が得られる。

$$\ln X_t = \mu \int \frac{X_v}{X_t} dt + \ln X_{t0} \dots (3)$$

(2) 式を積分すると次の式が得られる。

$$P = \rho \int X_v dt + P_0 \dots (4)$$

$\ln X_t$ と $\int X_v/X_t dt$ をプロットし、直線の傾きより比増殖速度 (μ)、 P と $\int X_v dt$ をプロットし、直線の傾きより比生産速度 (ρ) を求めることができる。

培養上清中の hGM-CSF 濃度は酵素標識抗体測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) の 1 つである 2 抗体サンドイッチ法を用いて測定した。

固層抗体 50 μ L を 0.05 M リン酸緩衝液 10 mL に希釈し、96 穴プレート (greiner イミュロン 600) に各ウェル 100 μ L ずつ分注し、4°C で over night 保温した後、ELISA 洗浄液で 3 回洗浄した。ブロッキング溶液 (プレート 1 枚あたり約 70 mL) を各ウェルにいっぱいになる様に分注し、37°C で 2 hr 保温した後、ELISA 洗浄液で 3 回洗浄した。以下のように培地で希釈した標準試料と適当な濃度 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 ng mL⁻¹ (終濃度)) に希釈した培養上清試料を、各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、37°C で 2 hr 保温した。その後、ELISA 洗浄液で 3 回洗浄し、一次抗体 20 μ L を PBS 10 mL に希釈し、各ウェル 100 μ L ずつ分注し、37°C で 2 hr 保温し、ELISA 洗浄液で 3 回洗浄した。二次抗体 2 μ L を二次抗体希釈液 10 mL に希釈し、各ウェル 100 μ L ずつ分注し、37°C で 2 hr 保温し、ELISA 洗浄液で 5 回洗浄した。p-NPP 基質 4 錠を酵素反

応基質溶液 20 mL に希釈し、各ウェル 5 秒おきに 200 μ L ずつ分注し、37°C で 1 hr 保温した。反応停止液を各ウェル 5 秒おきに 100 μ L ずつ分注し、マイクロプレートリーダー (東ソー MPR-A4) で Abs. 405 nm の測定を行った。

ここで使用した試薬を以下に示す。

- 0.05 M リン酸緩衝液 (pH7.0); 0.1 M NaH₂PO₄:0.1 M Na₂HPO₄ = 4:5 で混合
- ブロッキング溶液 (用時調製);
BSA (ALBUMIN, BOVINE : Sigma A-4503) 10 g L⁻¹ PBS
- PBS (pH7.4);
NaCl 8 g, KCl 0.2 g (Wako pure chemicals 163-03545), Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g (Nacalai tesque 287-27), 超純水 1 L
- 二次抗体希釈溶液 (pH 8.0); 10 mL ずつ分注して、-20°C 保存
Tris-HCl 6.06 g, BSA 5.0 g, 超純水 1 L
- 酵素反応基質溶液 (pH 9.8);
Diethanolamine 9.6 mL, MgCl₂·6H₂O 0.2 g, 超純水 1 L
- ELISA 洗浄液(蒸留水で作製); Tween 20 1mL / PBS 1 L
- 固層抗体; ヒツジ抗 hGM-CSF 抗体 (Endogen P-521) 1 mg / PBS 1 mL
- 標準試料; 酵母由来 hGM-CSF (Genzyme RH-CSF-C) 1 μ g / PBS 1 mL
- 一次抗体; ウサギ抗 hGM-CSF 抗体 (Genzyme LP-714) 1 mg / PBS 1 mL
- 二次抗体; Alkaline Phosphatase 標識抗ウサギ IgG (BIOSOURCE 社 6500)
- 基質; p-Nitrophenyl Phosphate Tablets (p-NPP) (Sigma N-9389)
- 反応停止液 (使用直前に調製); Na₂CO₃ 0.795 g / 超純水 10 mL

2.6 遺伝子増幅領域の解析 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

目的遺伝子が染色体上のどの領域に存在するかは、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescence *in situ* hybridization : FISH) 法によって解析した (Fig. 1.2.) (野上, 1996)。

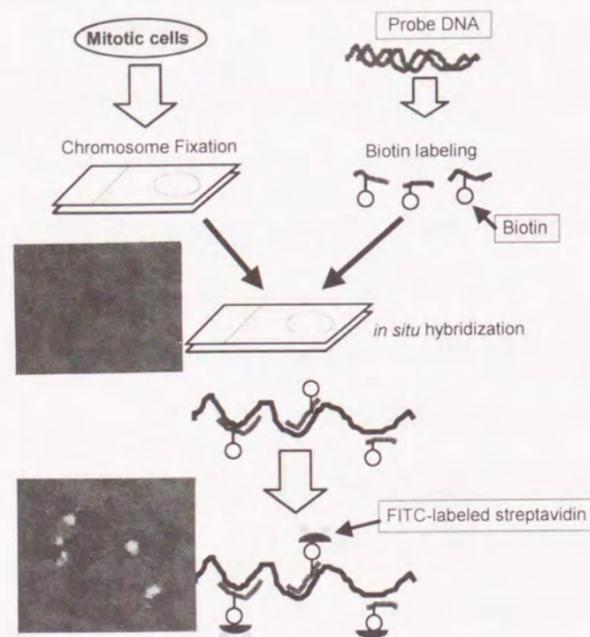


Fig. 1.2. Strategy of fluorescence *in situ* hybridization.

2.6.1 染色体標本の作製

75 cm² T-フラスコで細胞が 80 - 90 %程度コンフルエントの状態になった時、古い培地をピペットで吸引して捨て、新しい培地 30 mL を加え、コルセミド溶液 60 μL を加え、4 - 5 hr 保温した。Shake-off 法により、M 期の細胞を浮遊させ、遠心分離した後、細胞ペレットを 75 mM KCl 1.5 mL に懸濁して、室温で 20 min、細胞を膨張させた。固定液を 1 滴加えて、氷中で 5 min 静置した。遠心管を振とうしながら、固定液を 3 滴加えて、氷中で 5 min 静置した。遠心管を振とうしながら、固定液を 10 - 15 滴加えて、氷中で 5 min 静置した。遠心管を振とうしながら、固定液を 10 - 15 滴加え、続けて、二層になるように、壁をつたわせながら加え (総量 8 - 10 mL)、パスツールピペットでおだやかに混和した後、遠心分離し細胞ペレットを取得した。新しい固定液 5 mL に懸濁して、5 min 遠心分離した後、上清を捨てた。この操作を 3 度繰り返し、適量の固定液で希釈し、80 cm 程度上からスライドガラス (MATSUNAMI S-2124) に滴下し、染色体伸展標本作製した。37°C で over night 保温した後、ブラックボックスに入れて 4°C で保存した。

2.6.2 プローブの標識

Table 1.3. Nick-translation mixture.

H ₂ O	(58-x) μL
10×NT buffer	10
0.5 mM dAGC mixture	10
Biotin-16-dUTP (Boehringer 1093070)	4
template DNA (DNA amount = 1~10 μg)	x
0.1 M mercaptoethanol (Wako pure chemicals 137-06862)	10
DNA polymerase (10 U μL ⁻¹) (Boehringer 642711)	2
DNase I (Takara 2210A) (冷水にて2000倍希釈)	4
RNase溶液 (10 mg mL ⁻¹)	2
total	100

Table 1.3. に示す溶液を順に混合し、15°C で 2 hr 保温した後、-20°C で保存した。反応系の 10 μL を 100°C で 10 min 保温した後、氷中で 10 min 以上静置した。2 % のアガロースゲル電気泳動で、大きさを推定し、200~300 bp となっていることを推定した。プローブがより大きい場合には、反応液にさらに DNase I 2 μL、DNA polymerase 1 μL を加えて、15°C で 30 min 保温した後、-20°C で保存した。

2.6.3 ハイブリダイゼーション

顕微鏡で観察しながら、スライドガラス上の染色体の存在する領域にダイヤモンドペンで印をつけた後、37°C で 3 hr 保温した。コプリンジャーに入れた変性溶液 (Formamide 35 mL, 20×SSC (pH7.0) 5 mL, H₂O 10 mL) を室温の状態から 68°C に温めた (スライド 1 枚当たり 68+1°C に設定)。スライドを顕微鏡で観察し、ダイヤモンドペンにて印を付け、37°C で 3 hr ハードニングした。使用するプローブ DNA (Table 1.4.) をエタノール沈殿によって精製した。

Table 1.4. Probe mixture.

Biotin labeled probe DNA	8 μL
Sermon sperm DNA (Wako pure chemicals 047-22491)	8 μL
Total	16 μL / slide

乾燥させたプローブ DNA を 100 % ホルムアミド 6.5 μL / slide に 100 回程度のピペッティングにて溶解させ、20 % デキストラン硫酸溶液 (2×SSC) 6.5 μL を添加し、ピペッティングにて混合した後、20 min 攪拌し、氷中に保存した。ハードニング直後のスライドを、変性溶液内で、2 min 保温し、あらかじめ -20°C で冷却しておいた、70 % エタノ

ールで室温にて 5 min 保温した。室温保存しておいた 90 % エタノールで 5 min 保温した。室温保存しておいた 100 % エタノールで 5 min 保温した。プローブ DNA を 80°C で 10 min 変性させ、変性したプローブ DNA を、カバーガラス (MATSUNAMI 22×22) にマウントし、スライドガラスをのせ、ペーパーボンド (コクヨ タ-100) で封入し、モイストチェンバー内にて、37°C で一晩保温した。

2. 6. 4 シグナルの検出

モイストチェンバーからスライドを取り出し、ペーパーボンドを爪楊枝ではがして、カバーガラスを滑らせながらはずした。スライドを、43°C で保温した洗浄バッファー 1 (Table 1.5.) で 5 min, 3 回洗浄した。スライドを、60°C で保温した洗浄バッファー 2 (Table 1.6.) で 5 min, 3 回洗浄した。Blocking 溶液 (Table 1.7.) 150 μ L をカバーガラスにマウントし、スライドガラスを乗せ、モイストチェンバー内で、37°C, 30 min 保温した。検出溶液 (Table 1.8.) 600 μ L に対して、FITC-アビジン 1.5 μ L を溶かし混合した。150 μ L をカバーガラスにマウントし、スライドガラスを乗せ、モイストチェンバー内で、37°C, 30 min 保温した。スライドを、43°C で保温した洗浄バッファー 3 (Table 1.9.) で 5 min, 4 回洗浄した。DAPI 溶液 (Table 1.10.) 50 mL を作成し、スライドを 10 min 保温した。スライドを 2 倍希釈した洗浄バッファー 3 で 5 min 洗浄する。アンチフェード (Table 1.11.) 40 μ L をカバーガラスにマウントし、スライドガラスをのせ、マニキュアで固定した。

Table 1.5. Washing solution 1.

20×SSC (pH7.0)	16 mL
Formamide (Boehringer 1-814-320)	80 mL
Ultra pure water	64 mL
Total	160 mL

Table 1.6. Washing solution 2.

20×SSC (pH7.0)	6 mL
Ultra pure water	144 mL
Total	150 mL

Table 1.7. Blocking solution (filter sterile).

Block Ace (Yukijirushi UK-B80)	3 %
4×SSC	
Tween20 (Nacalai tesque 356-24)	0.1 %

Tween 20; Polyethylene Sorbitan Monolaurate

Table 1.8. Detection solution (filter sterile).

Block Ace (Yukijirushi UK-B80)	1 %
4×SSC	
Tween20	0.1 %

Table 1.9. Washing buffer 3.

20×SSC (pH7.0)	40 mL
Ultra pure water	160 mL
Tween20	200 μ L
Total	200 mL

Table 1.10. DAPI solution.

DAPI stock solution (400 μ g / mL) (Nacalai tesque 110-34)	25 μ L
2×SSC	50 mL
Total	50 mL

DAPI; 4', 6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride

Table 1.11. antifade.

DABCO (SIGMA D2522)	0.233 g
1M Tris-HCl (Kanto chemical 40326-00)	0.2 mL
Glycerol (Wako pure chemicals 075-00616)	9 mL
Ultra pure water	0.8 mL
Total	10 mL

Tris; Tris (hydroxymethyl) aminomethane

2.6.5 顕微鏡による観察

シグナルの観察は、蛍光顕微鏡 (ZEISS 社製 Axiophot) を用いて行った。対物レンズは $\times 63$ oil, $\times 100$ oil、偏光フィルターは ph 3 を用いた。

また、画像としての取り込みは蛍光顕微鏡に備え付けの冷却 CCD カメラ (フォトメリクス社製 PVCAM カメラ) と画像解析ソフト IPLab Spectrum™ を用いて行った。

ここで使用した試薬を以下に示す。

- コルセミド溶液 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$); Demecolcine (Sigma D6279) 1 mg, 超純水 100 mL
孔径 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターで濾過滅菌した後、 4°C で保存。
- 固定液 (用時調製); メタノール (Nacalai tesque 219-15) : 酢酸 (Nacalai tesque 002-12) = 3 vol. : 1 vol.
- 75 mM KCl ; KCl 0.56 g, 超純水 100 mL
- $0.5 \text{ mM dAGC mixture}$ (Table 1.12.); -20°C で保存した。

Table 1.12. dAGC mixture.

dATP (Takara 4026)	4.7 μL
dGTP (Takara 4027)	4.9 μL
dCTP (Takara 4028)	4.9 μL
Ultra pure water	1 mL

- RNase 溶液 (10 mg mL^{-1}) (Sigma R-5000); 100°C で 15 min 保温した後、 -20°C で保存。
- 0.1 M メルカプトエタノール; 原液 (14.3 M) を 140 倍希釈した後、 4°C で保存。
- $20\times \text{SSC}$ (pH 7.0) (Table 1.13.);

Table 1.13. $20\times \text{SSC}$ (pH 7.0).

NaCl	350.64 g
Na-Citrate	176.46 g
Ultra pure water	2 L

- 変性溶液 (Denature solution) (Table 1.14.);

Table 1.14. Denature solution.

Formamide (Boehringer 100144)	35 mL
$20\times \text{SSC}$	5 mL
Ultra pure water	50 mL

- サケ精子 DNA 溶液 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ; TE バッファーに溶かし、フェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿後、 -20°C で保存。

- 20% デキストラン硫酸溶液 (Dextran sulfate solution) ($2\times \text{SSC}$) ; 4°C で保存。

Table 1.15. Dextran sulfate solution.

50% dextran sulfate solution (autoclaved)	400 μL
$20\times \text{SSC}$	100 μL
Ultra pure water	1 mL

第3節 MTX 濃度上昇条件が遺伝子増幅細胞に与える影響

第1項 異なる MTX 濃度上昇条件における遺伝子増幅細胞の比速度

DHFR 遺伝子増幅により組換えタンパク質生産細胞を得るためには、段階的な MTX 濃度の上昇を行う。これは、各段階における MTX 耐性細胞を選択していくことで、次第に高濃度の MTX に対して耐性を持った細胞を選択する手法である。そこで、MTX 濃度の上昇条件が、得られる遺伝子増幅細胞の性質にどのような影響を与えているかを解析するために、Fig. 1.3. に示す MTX 濃度上昇系を用いて遺伝子増幅細胞を取得した (伊丹, 1997)。ここで用いた細胞は、エレクトロポレーション法によって pSV2-dhfr/hGM-CSF を導入し、IMDM (核酸-) にて選択した組換え CHO 細胞である。

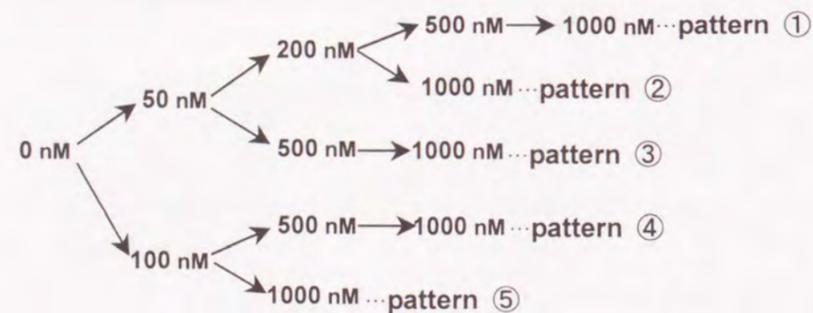


Fig. 1.3. Stepwise increase patterns of MTX concentration.

ここで設定した段階的 MTX 濃度上昇系は、比較的穏やかに多くの段階を踏んで終濃度である 1,000 nM の MTX に耐性を持たせるもの (pattern ①~③) と、比較的急激にかつ、少ない段階数で、同様の耐性を持たせるもの (pattern ④, ⑤) とした。また、1,000 nM-MTX 耐性になるまでの選択期間においてクローニング操作は行わず、ヘテロな細胞集団のまま薬剤選択を行った。一般的には、各段階においてクローニングを行い高生産細胞を選択するが、添加した MTX 濃度の耐性細胞集団の比増殖速度、比生産速度に及ぼす影響を選択したクローンの性質に影響を受けないで解析するために、本研究において遺伝子増幅細胞を得る際には、一切クローニング操作を行わなかった。その結果、全ての MTX 濃度上昇系において 1,000 nM-MTX に耐性を有する細胞群を取得することができた。得られた耐性細胞の比増殖速度及び、比生産速度を経時的に測定した結果を、Fig. 1.4. に示す。

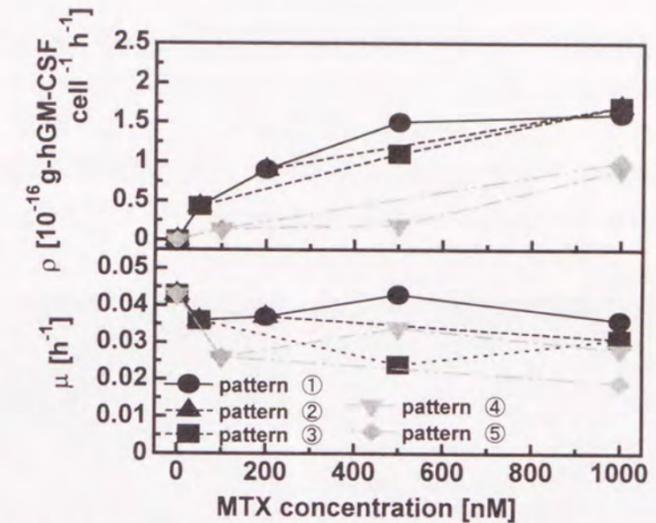


Fig. 1.4. Relationship between pattern of increase in MTX concentration and specific growth and production rates and stepwise selection.

The calculations of the specific growth and production rates are based on the use of heterogeneous cell lines. This calculation procedure is described in the Experimental protocol. In the 1,000 nM-MTX condition, we did not obtain tolerant cell lines (data not shown).

Specific human GM-CSF production rate (ρ) (top) ; specific growth rate (μ) (bottom)

その結果、比増殖速度に関しては MTX 濃度上昇系の違いによる明確な差は得られなかった。しかしながら、比生産速度に関しては、最も穏やかに MTX 濃度上昇を行った pattern ① の細胞集団が、最も急激に濃度上昇を行った pattern ⑤ の細胞集団に比べ高い比生産速度を有していることがわかった。

第2項 比速度と染色体中における遺伝子増幅領域の関係

2.1 遺伝子増幅領域の観察

これまでの研究者の報告から、使用する細胞株の種類や、増幅遺伝子の種類によって、染色体において遺伝子増幅が生じる形態が異なることが報告されている。一般に、増幅された遺伝子には、2つの形態が観察されている。1つは、Double minute (DM)と呼ばれる環状染色体であり、ヒトやマウスの細胞においてよく観察される増幅形態である。もう1つの増幅形態は、Homogeneously staining region (HSR)である (Fig. 1.5.) (Kuo *et al.*, 1998)。

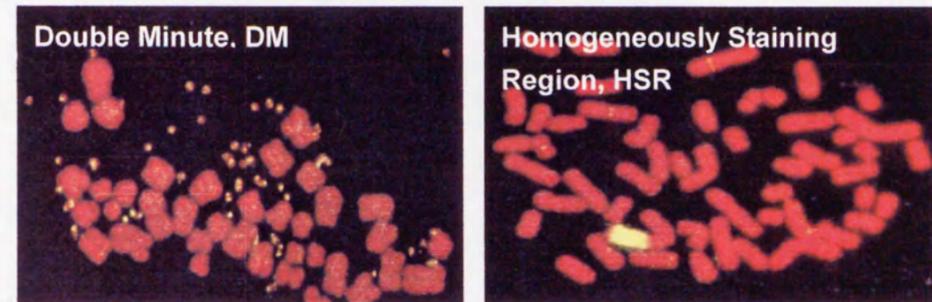


Fig. 1.5. Typical gene amplified form in metaphase. (Alberts *et al.*, 1994)

本研究において使用したCHO-DHFR 遺伝子増幅系では、増幅遺伝子の染色体中における形態は、HSR であることが既に報告されている (Kuo *et al.*, 1998)。また、これまでの研究において、使用する細胞株の種類や、増幅遺伝子の種類によって、染色体において遺伝子増幅が生じる形態が異なることも報告されている (Schimke, 1982, 1984, Stark, 1993, Wahl, 1989, Windle *et al.*, 1992, Hamlin *et al.*, 1991)。

我々は、増幅遺伝子の染色体中における位置が、遺伝子増幅頻度、ひいては遺伝子増幅細胞の生産性などに影響を与えているものと推測した。そこで、FISH 法を用いて増幅遺伝子の染色体上における位置を観察し、実際に遺伝子増幅細胞の増幅頻度、比生産速度などの諸性質に及ぼす影響を解析した (Fig. 1.6.)。

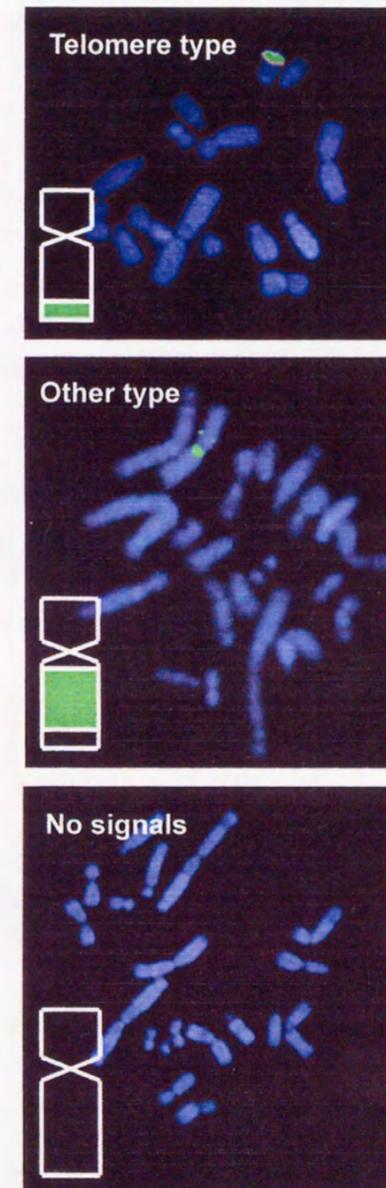


Fig. 1.6. Classification of amplified gene location on chromosome using FISH.

The procedure for FISH procedure was described in the Experimental protocol. Chromosomes were stained with DAPI and green signals (FITC) on chromosomal amplified gene locations. Amplified genes located near the telomeric region were classified as Group T (upper picture) and those located in other chromosomal regions were classified as Group O (middle picture). Those emitting no signals were classified as Group N (lower picture).

FISHによる増幅遺伝子の染色体上における位置を観察した結果 (Fig. 1.6.)、大別して3つのグループに分類することが可能と考えられた。第1のグループは、増幅遺伝子がテロメア近傍に観察されるグループであり (telomere type と名付けた)、第2のグループは、テロメア近傍以外の領域に増幅遺伝子が観察されたものである (other type と名付けた)。さらに第3のグループは、FISH の検出限界以下のコピー数しか存在しないと考えられる、シグナルが得られなかったグループである (no signal と名付けた)。観察された増幅遺伝子は、染色体上にHSRとして観察されるものや、小さな蛍光スポットとして観察されるものがあったが、DMとして観察される増幅遺伝子は存在しなかった。また、HSRとして観察される増幅遺伝子は、コピー数が高いものであり、スポットとして観察されるものは、コピー数の少ない増幅領域であると考えられた。

2.2 ヘテロな遺伝子増幅細胞群の増幅遺伝子分布

2.1で述べた、増幅遺伝子の領域を FISH にて観察し、3つの増幅領域分類に基づいて、ヘテロな遺伝子増幅細胞群の増幅遺伝子分布を測定した (Fig. 1.7.)。

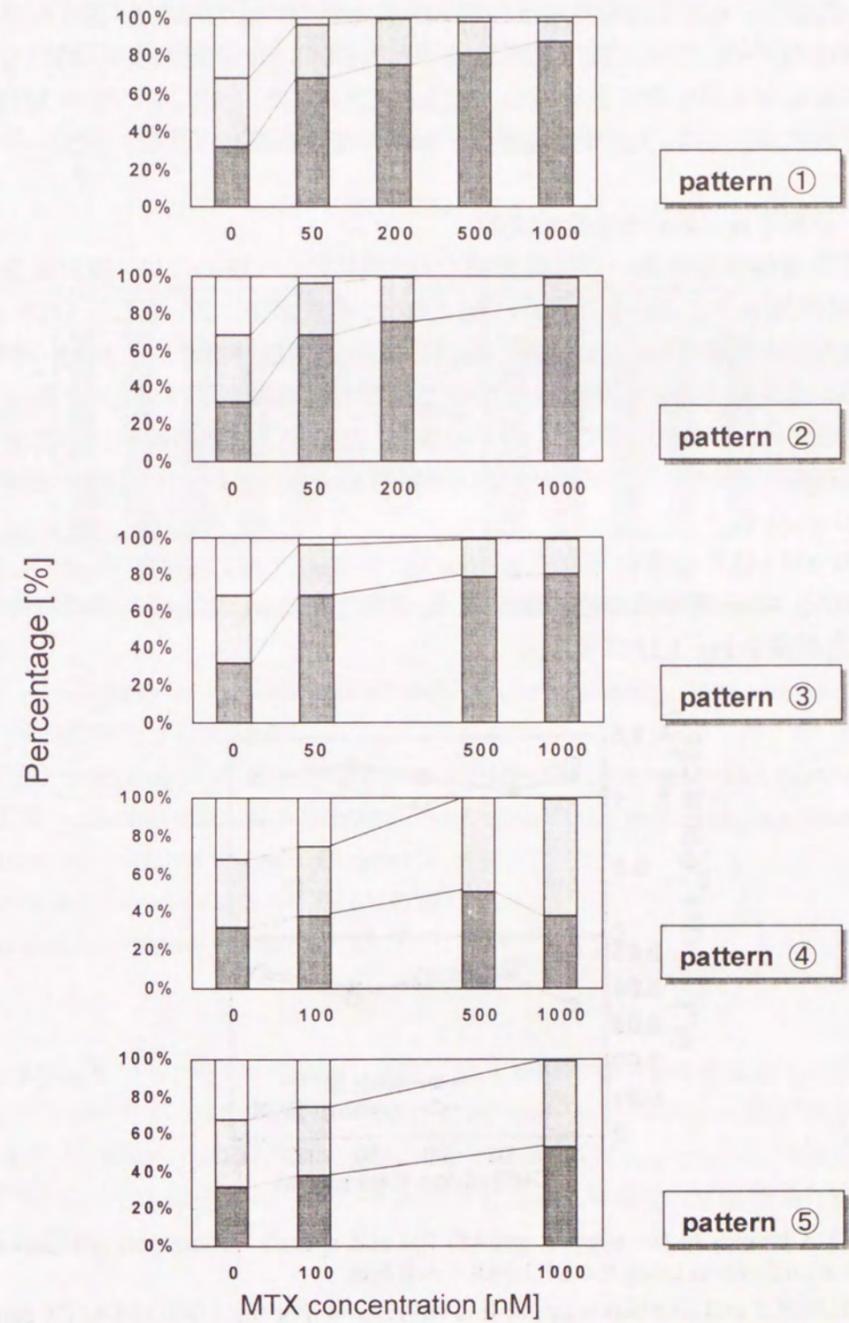


Fig. 1.7. Relationship between stepwise increase patterns of MTX concentration and the location of amplified gene in chromosomal DNA.

(■ : Telomere type □ : Other type □ : No signal)

Fig. 1.7. には 5 つの段階的 MTX 濃度上昇系における増幅遺伝子の染色体上における位置の分布の経時変化を示している。比較的穏やかな MTX 濃度上昇系である pattern ①～③ におけるごく初期段階である 0 から 50 nM-MTX の時に、telomere type の細胞分布が急激に上昇していることが観察された。一方、その後の MTX 濃度上昇段階においては、大きな増幅遺伝子領域の変化は観察されなかった。

2.3 長期培養における生産安定性

遺伝子増幅細胞を用いて物質生産を行う際には、一般的には、選択薬剤である MTX 非添加条件にて培養が行われる。これは、選択薬剤に用いられる MTX は非常に毒性の強い物質であるためである。しかしながら、選択薬剤である MTX 非添加条件における組換えタンパク質の生産安定性は、次第に低下するという報告がある (Pallavicini *et al.*, 1990)。そこで、我々の取得した遺伝子増幅細胞が、MTX 存在下、及び非存在下においてその生産性及び増幅領域分布がどのように変化するかについて検討した。

1,000 nM-MTX 耐性細胞群の pattern ① を用いて、MTX 存在下、及び、非存在下における 46 日間の長期培養を行い、比増殖速度及び、比生産速度の経時変化を測定した結果を Fig. 1.13. に示す。

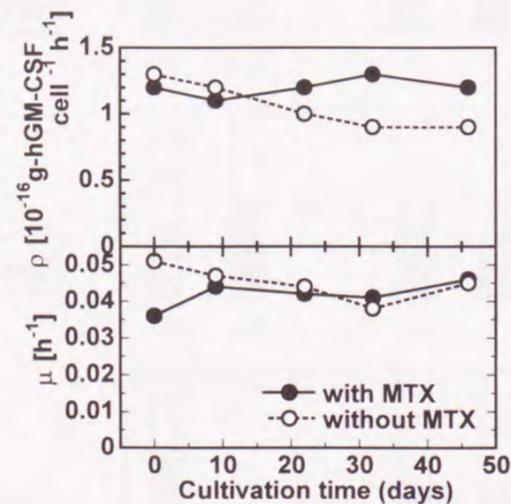


Fig. 1.13. Changes in the specific growth (μ) and specific production (ρ) rates during long-term cultivation using the DR1000L1 cell line.

The DR1000L1 cell line was used for this cultivation. For the 1,000 nM-MTX condition, MTX was added to Iscove's modified DMEM medium with 10% dialyzed FBS. Calculation methods for specific growth and hGM-CSF production rates were described in the Experimental protocol. Closed and open circles denote cultivation condition with and without MTX, respectively.

その結果、MTX 添加を行った長期培養においては、比生産速度に大きな低下はなかったが、MTX 非添加の条件では、次第に比生産速度が低下していることがわかった。

さらに、長期培養中の、遺伝子増幅領域の経時変化を測定した結果を Fig. 1.14. に示す。

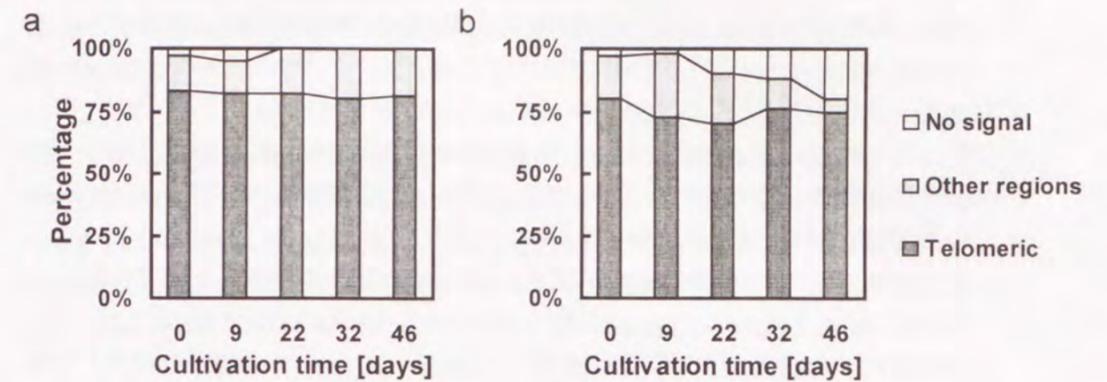


Fig. 1.14. Changes in the locations of amplified genes during long-term cultivation using the DR1000L1 cell pool.

The FISH procedure was described in the Experimental protocol. The percentage of amplified genes was calculated from the observation of the amplified gene locations in 100 chromosomal DNA sets per cell line.

a) long-term cultivation with MTX (1,000 nM)

b) long-term cultivation without MTX

Fig. 1.14a.及び b.から分かるように、MTX 添加時における増幅遺伝子分布は、大きな変化はなかったが、MTX 非添加条件では telomere type の細胞の存在割合が変化しないものの、other type 及び、no signal の分布が大きく変化していることがわかった。この結果から、比生産速度の MTX 非存在下における現象は、増幅領域の変化と関連があると推定された。

第4節 要約

遺伝子増幅時に段階的に添加される MTX 濃度の上昇条件が、得られる遺伝子増幅細胞に与える影響について検討を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- 遺伝子増幅領域を FISH によって観察した結果、増幅遺伝子の染色体上における位置は、3つのグループに分類することができた。増幅遺伝子をテロメア近傍に有する細胞 (telomere type) と、テロメア以外の染色体領域に増幅遺伝子を有する細胞 (other type) 及び、FISH のシグナルが観察されなかったもの (no signal) である。
- 得られた 1,000 nM-MTX 耐性遺伝子増幅細胞の遺伝子増幅細胞群において遺伝子増幅領域を測定した結果、生産性の高かった細胞群において telomere type の存在割合が高いことがわかった。
- 細胞選択中における増幅遺伝子領域の経時的な変化を測定した結果、穏やかな MTX 濃度上昇系のごく初期段階である 0 から 50 nM-MTX の段階において、増幅遺伝子分布に大きな変化が観察され、telomere type の細胞の分布がこの段階において急激に上昇していることがわかった。またこのことは、以後の MTX 濃度の上昇において、穏やかな MTX 濃度上昇系の比生産速度が他の系に比較して急激な上昇を示していることと関連していることも示唆された。
- 得られた 1,000 nM-MTX 耐性遺伝子増幅細胞の MTX 存在及び、非存在下における比増殖速度、比生産速度及び、遺伝子増幅領域の経時変化を測定した結果、MTX 非存在下において比生産速度の減少が確認され、この減少が増幅領域の変化に関連していることが示唆された。

第2章 遺伝子増幅領域の違いが増幅細胞の諸性質に及ぼす影響

第1節 緒言

前章において、染色体上の増幅遺伝子の位置が、遺伝子増幅細胞の性質に影響を与えていると推測し、遺伝子増幅細胞の増幅遺伝子の染色体上における位置を観察した。その結果、大別して2つの染色体領域に増幅遺伝子が存在していることが確認された。さらに、その2つの細胞の存在割合が変化すると、比生産速度が変化するという知見を得た。

そこで本章では、増幅遺伝子の染色体上における位置が、遺伝子増幅の生産性などに及ぼす影響について解析を行った。まず、限界希釈法によってクローニングを行い、複数の遺伝子増幅細胞について、比速度をはじめとする各パラメータの測定を行い、telomere type 及び、other type の細胞の差違を明確にすることを目的とした。

第2節 実験材料及び実験方法

2.1 使用細胞株

第1章と同じ、Chinese hamster ovary (CHO) DG44 株を用いた。
さらに、DG44 株の parent cell line である、CHO-K1 株を用いた。

2.2 使用培地及び添加物質

第1章と同じ培地及び添加物質を使用した。

2.3 培養条件及び操作

継代培養、長期培養、DHFR 活性測定、コピー数測定、及び比速度測定用として、それぞれ以下の培養容器を用いた。

・25 cm² T-フラスコ (住友ベークライト MS-20050; 底面積 25 cm²、容量 50 mL) … 継代培養

・75 cm² T-フラスコ (住友ベークライト MS-21250; 底面積 75 cm²、容量 250 mL) … M 期解析、DNA 抽出用及び、DHFR 活性測定

・225 cm² T-フラスコ (住友ベークライト MS-20800; 底面積 225 cm²、容量 800 mL) … DHFR 活性測定

・100 mm ディッシュ (Corning 25020) … 比速度測定

ここで、25 cm² T-フラスコと 100 mm ディッシュには 10 mL、75 cm² T-フラスコには 30 mL、225 cm² T-フラスコには 90 mL の培地を入れ使用した。

継代操作に関しては、第1章と同様に行った。

2.3.1 限界希釈法によるクローニング

培養を行って細胞懸濁液を得た後に、トリパンブルー色素排除法によって細胞濃度を測定した。その後、200 µL 培地中に 1 個の細胞が存在するように希釈を行い、96 穴プレート (Falcon 3072) に、200 µL ずつ播種した。1~2 日後に、位相差顕微鏡によって各ウェルに 1 細胞存在するものを確認し、数日後にそのウェル内の細胞を、クローン細胞として取得した。

2.4 比速度測定(比増殖速度(μ)、比 hGM-CSF 生産速度(ρ))

第1章と同様に算出した。

2.5 遺伝子増幅領域の解析(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

第1章と同様に算出した。

2.6 コピー数の定量 (Dot blotting, Slot blotting)

細胞内の染色体 DNA は、RapidPrepTM Micro Genome DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc) または、GenomicPrepTM Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc 27-5237-01) を用いて抽出した。検出に用いるプローブ DNA は、細胞に導入したプラスミド (pSV2-dhfr/hGM-CSF) を鋳型として、dhfr, hGM-CSF 遺伝子を PCR 法によって取得後、Digoxigenin (DIG)-DNA Labeling and Detection Kit (Roche 1-093-657) を用いて、dot-, slot-blotting にて行った。また PCR の際に用いたプライマーは、センス側に dhfr, hGM-CSF 遺伝子の N 末端配列より設計し、アンチセンス側に dhfr, hGM-CSF 遺伝子の C 末端配列より設計したものを、Taq polymerase (Takara R001A) 及び、KOD polymerase (TOYOBO KOD-101) により調製したものを、用いた。

2.6.1 染色体 DNA 抽出

75 cm² または 225 cm² T-フラスコにて培養を行い取得した 2.0×10^6 cells に PBS 500 µL を加えて再懸濁し、8,000 × g で 5 min 遠心分離した後、上清を除去した。抽出バッファー 100 µL を加えて穏やかにピペッティングすることによって再懸濁し、55°C で 10 min 保温した。Proteinase K 溶液 800 µL を加えて混合した後、68°C で 1 hr 保温し、15,000 × g で 2 min 遠心分離した後、上清を新しいマイクロチューブに移した。RapidPrepTM Micro Genomic DNA Isolation Kit 中のスピнкаラム内の樹脂をよく懸濁し、カラムをアシストチューブ (アシスト 72-692) に装着し、850 × g で 1 min 遠心分離した。Proteinase K (Sigma P-6556) 処理した溶液を、スピнкаラムに移し転倒混和後、室温で 1 min 放置し、アシストチューブにのせ、850 × g で 2 min 遠心分離した。洗浄バッファー 400 µL を 2 回にわたって加え、850 × g で 2 min 遠心分離した。新しいチューブにスピнкаラムを移し、溶出バッファー 200 µL を加え、850 × g で 2 min 遠心分離を 2 回行った。100 % イソプロパノール (-20°C) 320 µL を加え転倒混和し、室温で 10 min 放置し、850 × g で 10 min 遠心分離した後、デカンテーションによって上清を除去した。100 % エタノール (-20°C) 1 mL を加え、850 × g で 10 min 遠心分離後、上清を除去し、室温で 10 min 自然乾燥した後、TE バッ

ァー (pH 8.0) 100 μL に溶解させ、0.1 mg mL^{-1} RNase 溶液 20 μL を加え、37°C で 30 min 保温し混入している RNA の除去を行い -20°C、または -80°C にて保存した。

2. 6. 2 染色体 DNA の定量

標準試料として、 λ -DNA (265 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Takara 3010) の希釈系列 (0, 16.6, 33.1, 66.3, 132.5, 265 ng / TE バッファー 10 μL) を作成し、測定するサンプルとともに、1 mL H33258 測定溶液を加え、混合した。さらに、1 mL H33258 測定溶液を加え、蛍光光度計 (ex. 365 nm, em. 455 nm) で蛍光光度測定した (Freshney, *et al.*, 1994)。

2. 6. 3 プローブ DNA 作成

制限酵素処理 (nick translation) または、PCR によって取得した DNA 断片を、100°C で 10 min 変性させた後、氷中 (on ice with NaCl) で 10 min 静置し、氷中の シリコンコートをしたマイクロチューブ中にて Table 2.1. に示す溶液を添加した。

Table 2.1. DIG-labeling mixture.

DIG-High Prime (Roche 1585 606)	5	μL
Denatured DNA	15	
Total volume	20	

37°C で 20 hr 反応させた後、0.5M EDTA (pH8.0) 1 μL を加えて反応をとめ、エタノール沈殿後、0.1% SDS 50 μL を含む TE バッファーに溶かし、-20°C にて保存した。

2. 6. 4 DIG 標識プローブ DNA 濃度検定

標準試料 (pBR322, vial4) と濃度測定サンプルを TE バッファーでそれぞれ、1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg μL^{-1} に希釈した。この希釈系列及び、測定サンプルを、ナイロンメンブレンに 1 μL ずつ滴下し、120°C で 30 min 焼着後、両面 3 min ずつ UV クロスリンクした。メンブレンをバッファー 1 で 10 min 洗浄し、続いてバッファー 2 (10 mL) とバッファー 1 (90 mL) で 30 min 洗浄した。抗体溶液 (vial 8) 2 μL 、バッファー 2 (1 mL)、バッファー 1 (9 mL) を用いてハイブリパック (コスモバイオ S-1021, 1001) にてシールしたメンブレンを 30 min 保温した。その後、バッファー 1 (15 min) で 2 回洗浄し、続いてバッファー 3 に浸し 2 min 静置した。メンブレンをラップ (旭化成) 上で CSPD[®] (ベーリンガー CD005) 100 μL 、バッファー 3 (10 mL) に浸し、室温で 10 min 程度保温し、シールしたメンブレンを 37°C で 5~15 min 予備保温し、X 線フィルム (Fuji film RX-U 63D063) に露光した。

2. 6. 5 ハイブリダイゼーション

標準試料として、Sal I で制限酵素処理したプラスミド (pSV2-dhfr/hGM-CSF) の希釈系列を作製し、100°C で 10 min 変性させた 120 μg のサンプルともども、氷中 (on ice with NaCl) で 10 min 冷却した。DNA 溶液を Milli Blot. Kit systems (MILLIPORE) または、BIO-DOT[®] SF (Bio-rad) を用いてメンブレンにスポットし、メンブレンに固定した。10 \times SSC 100 μL で 2 回 洗浄し、120°C で 30 min 焼着後に、両面 3 min ずつ UV クロスリンクした。Hybridization バッファー (100 cm^2 当たり 20 mL バッファー) で、ハイブリパックにてシールしたメンブレンを 68°C で 1 hr 予備保温した。1 mL 中に 5 μL の DNA プローブを含む Hybridization バッファー (2.5 mL / 100 cm^2) を用いて、シールしたメンブレンを 68°C で一晩保温し、プローブ DNA をハイブリダイズさせた。

2. 6. 6 化学発光検出

メンブレンを 2 \times SSC; 0.1% SDS (室温) で 5 min 2 回洗浄し、続いて 0.1 \times SSC; 0.1% SDS (室温) で 5 min、2 度洗浄し、さらに、洗浄バッファー (室温) で 5 min 洗浄した。バッファー 2 (10 mL)、バッファー 1 (90 mL) を用いて、室温で 30 min 保温し、抗体溶液 (vial 8) 1 μL 、バッファー 2 (1 mL)、バッファー 1 (9 mL) でシールしたメンブレンを 30 min 保温した。メンブレンを洗浄バッファー (室温) で 15 min、2 度洗浄し、続いてバッファー 3 中にて 2 min 静置した。メンブレンをラップ上で CSPD[®] 30 μL 、バッファー 3 (3 mL) に浸し、室温で 10 min 程度保温し、ハイブリパックにてシールした。シールしたメンブレンを 37°C で 5~15 min 予備保温した後、X 線フィルムに露光し、シグナルをデンスitomーター (SHIMADZU CS-9300PC) を用いて定量した。コピー数の定量を行う際に用いた標準曲線は、CHO DG44 の染色体を測定する染色体量と同量プロットし、そこに、プラスミド DNA (pSV2-dhfr/hGM-CSF) を目的測定範囲のコピー数になるように加えて作成した。

2. 6. 7 使用試薬

ここで使用した試薬を以下に示す。

•RapidPrepTM Micro Genomic DNA Isolation Kit

抽出バッファー: 4 M Guanidinium Isothiocyanate, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)

洗浄バッファー: 100 mM Guanidinium Isothiocyanate, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5),
750 mM KCl

溶出バッファー: 1.5 M KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0)

カラム: 0.15% Kathon CG/ICP Biocide

- Proteinase K 溶液; Proteinase K 2.0 mg, TES バッファー 8 mL

Table 2.2. TES buffer (pH 7.8).

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 μ L
10% SDS	500 μ L
Ultra pure water	100 mL

- 10 \times TNE バッファー; 10 mM EDTA, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl

Table 2.3. 10 \times TNE buffer (pH 7.4).

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 mL
NaCl	11.69 g
Ultra pure water	100 mL

- H33258 測定溶液; TNE バッファー 100 mL を孔径 0.22 μ m フィルターで濾過滅菌した後、0.5 mg/mL Hoechst 33258 を 20 μ L 加えた。

- Prep-A-Gene DNA purification Kit

DNA 精製マトリックス:

結合バッファー: 6 M sodium perchlorate, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

洗浄バッファー: 400 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA (pH 7.5), 50% (v/v) EtOH

溶出バッファー:

- 10% (w/v) SDS ; sodium dodecyl sulfate 10 g, D.W. 100 mL

- 2 \times SSC 0.1% (w/v) SDS ; オートクレーブ後、SDS を加えた。

Table 2.4. 2 \times SSC 0.1% (w/v) SDS.

20 \times SSC	50 mL
10% SDS	5
D.W.	500

- 0.1 \times SSC 0.1% (w/v) SDS ; オートクレーブ後、SDS を加えた。

Table 2.5. 0.1 \times SSC 0.1% (w/v) SDS.

20 \times SSC	2.5 mL
10% SDS	5
D.W.	500

- Hybridization バッファー; オートクレーブ後、4 $^{\circ}$ C で保存した。

Table 2.6. Hybridization buffer.

20 \times SSC	25 mL
10% SDS	0.2
Buffer2	10
N-lauroyl sarcosine (Sigma L-5000)	0.1
D.W.	100

- バッファー 1 (pH 7.5) ; 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl

pH 調整のため、NaOH 15 g をあらかじめ加え、オートクレーブした。

Table 2.7. Buffer 1 (pH 7.5).

Maleic acid	23.21 g
NaCl	17.53 g
D.W.	2 L

- バッファー 2; 湯浴中にて加熱しながら溶かし、オートクレーブ後、4 $^{\circ}$ C で保存。

Blocking reagent (Boehringer 1-096-176) 10 g, バッファー1 100 mL

- 1 M MgCl₂; MgCl₂·6H₂O 101.65 g, ultra pure water 500 mL

- バッファー 3 (用時調製); 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

孔径 0.22 μ m のフィルターで濾過滅菌した。

Table 2.8. Buffer 3.

Tris	2.42 g
NaCl	1.17 g
1M MgCl ₂	10 mL
D.W.	200 mL

2.7 DHFR 活性測定

1 unit を 1 min に 1 μmol の基質を消費する酵素量と定義し、粗酵素液の酵素濃度 IU (units mL^{-1}) は、(5)式に従って算出した。

$$IU = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times \frac{V}{v} \times 10^3 \dots (5)$$

ΔA : 吸光度減少速度 (min^{-1})

V : 反応全液量 (mL)

v : 粗酵素液量 (μL)

ϵ : 分子吸光係数 ($= 12,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d : 光路長 (1 cm)

2.7.1 測定法 (辻井, 1998)

1×10^7 cells を 500 μL の PBS に懸濁し、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した (sonic 5 sec \rightarrow on ice 1 min ; $\times 4$)。18,000 $\times g$ で 5 min 遠心分離後、上清を新しいエッペンに移し、粗酵素液とした。酵素液以外を Table 2.9. の順番で混合し、30°C で 5 min 保温した。

Table 2.9. DHFR activity assay mixture.

Buffer	500	μL
Dihydrofolic acid (DHF)	100	
Ultra pure water	(290-x)	
MTX	x	
NADPH	10	
Crude enzyme solution	100	
Final volume	1,000	

粗酵素液を最後に加えて混合し、恒温セルホルダー (30°C) を装着した分光光度計により、340 nm の吸光度の減少を測定し、この減少値から DHFR 活性を算出した。

2.7.2 使用試薬

- 200 mM KH_2PO_4 / KCl バッファー (pH7.9);

Table 2.10. 200mM KH_2PO_4 / KCl Buffer (pH7.9).

KH_2PO_4	2.72	g
KCl	1.49	g
Ultra pure water	100	mL

- 500 μM DHF 溶液; dihydrofolic acid (Sigma D-7006) 2.2 mg, 超純水 10 mL

- 10 mM NADPH 溶液;

β -NADPH (Wako 309-50471) 10 mg, 10 mM Tris バッファー 1.2 mL

- MTX 溶液 (1.0×10^{-6} M);

MTX 保存溶液 (1.0×10^{-4} M) 100 μL , 超純水 10 mL

第3節 遺伝子増幅クローン細胞の諸性質

第1項 クローン細胞の諸性質

段階的な MTX 濃度上昇系によって得られる耐性細胞には、様々な細胞が存在する。前章で示したとおりに、この細胞群には、増幅遺伝子の染色体上における位置で分類すると、大きく分けて 2 つの細胞種が存在することが明らかとなった。これらの細胞には、生産性や、増幅遺伝子の染色体中における安定性に関して、違いがあることが推測された。そこで、2 種のクローン細胞を複数取得し、そのクローンにおける各諸性質を比較検討した (中西, 1999)。

限界希釈法によってクローニングを行った結果、pattern ①の細胞群からは、telomere type 14 クローンを取得でき (DR1000L-1A~Y)、pattern ④の細胞群からは、telomere type 1 クローンと other type 11 クローン (DR1000L-4B~N) を取得できた。

そこで、取得した各クローン細胞の、比速度、DHFR 活性、コピー数を測定した結果を Table 2.11. に示した。

Table 2.11. Characteristics of 1000nM-MTX-resistant gene-amplified clones.

Strain name	μ [hr ⁻¹]	ρ [g cell ⁻¹ hr ⁻¹]	Specific DHFR activity [10 ⁻⁷ units cells ⁻¹]	Number of copies [copy cell ⁻¹]	
				<i>dhfr</i>	<i>hGM-CSF</i>
DR1000L-1A	0.044	1.55 x 10 ⁻¹⁶	1.5	124	119
-1B	0.041	1.46 x 10 ⁻¹⁶	1.5	112	108
-1C	0.037	1.41 x 10 ⁻¹⁶	1.7	98	95
-1F	0.046	1.97 x 10 ⁻¹⁶	1.9	131	125
-1G	0.044	1.29 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1H	0.037	2.22 x 10 ⁻¹⁶	1.8	154	141
-1I	0.040	1.02 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
Telomere type -1J	0.043	1.85 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1K	0.045	1.55 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1R	0.036	1.06 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1V	0.033	1.53 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1W	0.042	1.85 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1X	0.041	3.38 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-1Y	0.044	1.47 x 10 ⁻¹⁶	n.d.	n.d.	n.d.
-4N	0.037	2.29 x 10 ⁻¹⁶	2.1	173	166
Averaged	0.040	1.70 x 10 ⁻¹⁶	1.8	132	126
-4B	0.031	7.80 x 10 ⁻¹⁸	1.2	4	3
-4C	0.024	1.29 x 10 ⁻¹⁷	0.8	3	2
-4D	0.029	1.53 x 10 ⁻¹⁷	n.d.	n.d.	n.d.
-4E	0.025	3.47 x 10 ⁻¹⁸	n.d.	n.d.	n.d.
Other type -4F	0.030	3.72 x 10 ⁻¹⁷	n.d.	4	3
-4G	0.029	9.24 x 10 ⁻¹⁷	1.3	56	52
-4H	0.027	1.06 x 10 ⁻¹⁷	1.0	2	1
-4I	0.027	4.50 x 10 ⁻¹⁸	0.6	4	4
-4K	0.026	1.29 x 10 ⁻¹⁷	1.1	5	5
-4L	0.026	5.79 x 10 ⁻¹⁷	n.d.	n.d.	n.d.
-4M	0.031	4.68 x 10 ⁻¹⁷	n.d.	28	23
Averaged	0.028	0.27 x 10 ⁻¹⁶	1.0	13	12

n.d. ; not determined

この結果から、telomere type のクローン細胞において other type の細胞に比べて、高頻度で遺伝子増幅が生じており、コピー数が上昇していることが明らかとなった。この結果を比較するために、細胞タイプごとに平均値を取った (Table 2.12.)。

Table 2.12. Characteristics of 1000nM-resistant clones.

Amplify Type (n : number of clones)	Specific DHFR		Specific production	
	activity [$\times 10^{-7}$ units cells $^{-1}$]	Specific Growth rate [h $^{-1}$]	rate [10^{-16} g-hGM-CSF cell $^{-1}$ h $^{-1}$]	dhfr copy number [-]
Telomere (n=16)	1.76 \pm 0.23	0.040 \pm 0.004	1.7 \pm 0.59	>100
Other (n=11)	0.95 \pm 0.22	0.028 \pm 0.003	0.27 \pm 0.28	<50
DG44	0.00	0.037	0.0	1
CHO-K1	0.01	n.d.	n.d.	1

n.d.; not determined

この結果から、telomere type のクローンは、比増殖速度に関しては、宿主細胞である DG44 株と同等の比増殖速度を有していることが分かった。一方、other type のクローンは、telomere type と比べて、明らかに低い比増殖速度を示した。さらに、比生産速度、コピー数、DHFR 比活性に関しても、other type のクローンは、telomere type に比べて低い値しか有していないことがわかった。

第2項 クローン細胞の長期培養における比速度の経時変化

遺伝子増幅を用いた組換え医薬品生産プロセスにおいて、遺伝子増幅時に用いられる MTX は、毒性が高い薬剤であるために、MTX 非添加条件において生産が行われている。しかしながら、MTX 非添加条件では、増幅遺伝子の脱落による生産性の低下が報告されている。そこで、本研究で取得した2種類のクローンにおいて、MTX 非存在下における比速度の経時変化を測定し、生産性の低下について検討した (Fig. 2.1.)。

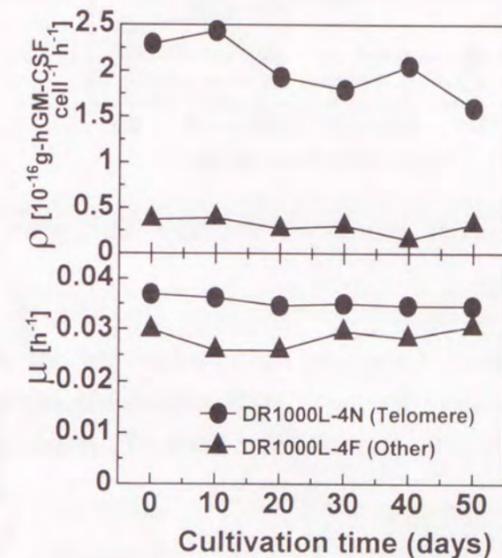


Fig. 2.1. Profiles of the specific growth and production rates during long-term cultivation without MTX.

Long-term cultivation in the absence of MTX was carried out for 50 days. The specific growth and production rates were determined per 10 days. Closed circles indicate the profile of telomere-type clone, DR1000L-4N, and closed triangles indicate the profile of the other type of clone, DR1000L-4F.

その結果、比増殖速度に関しては、telomere type, other type の両クローンともに、初発の比増殖速度を保っていることが分かった。しかしながら、比生産速度に関しては、telomere type, other type の双方のクローンにおいて、次第に低下していた。しかしながら、培養終了時における、比生産速度の値は、telomere type のクローンの方が、other type に比べて6倍以上の高い値を有しており、telomere type のクローンが、MTX 非存

在下における長期培養においても、高い比生産速度を保持していることが確認された。

さらに、MTX 非存在下における増幅遺伝子のコピー数の経時変化を測定した (Fig. 2.2.)。

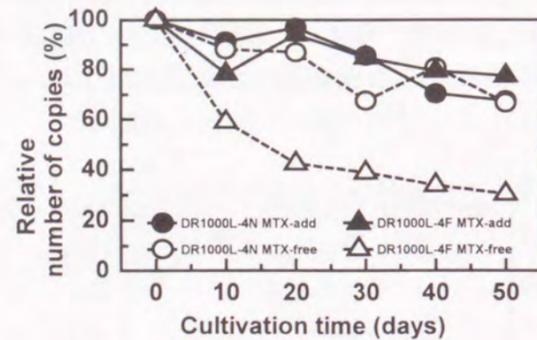


Fig. 2.2. Profile of the copy number of amplified *dhfr* genes during long-term cultivation.

Closed and open circles indicate telomere-type clone, DR1000L-4N, in the presence or absence of MTX, respectively. Closed and open triangles indicate other type of clone, DR1000L-4F, in the presence or absence of MTX, respectively. Initial number of copies of *dhfr* genes was 173 (DR1000L-4N) and 4 (DR1000L-4F), respectively.

その結果、telomere type 及び other type のクローンの双方において増幅遺伝子のコピー数は減少していた。また、telomere type クローンでは、MTX 添加及び、非添加条件において、増幅遺伝子のコピー数の減少に大きな差は見られなかった。一方、other type のクローンにおいては、MTX 添加時に比べ、MTX 非添加条件下における培養で、増幅遺伝子の急激な減少がみられた。

以上の結果から、MTX 非添加における比生産速度の低下は、増幅遺伝子の脱落が原因となっていることが推測され、特に other type の細胞において、増幅遺伝子の染色体からの脱落頻度が telomere type に比べ、著しいことがわかった。

テロメア近傍特有の遺伝子増幅モデルである、Breakage-fusion-bridge (B-F-B) cycle モデル (Fig. 2.3.) (Ruiz *et al.*, 1990, Kaufman *et al.*, 1983) では、*dhfr* 遺伝子が互いに逆方向を向いて並んだ状態で遺伝子増幅がおこる。

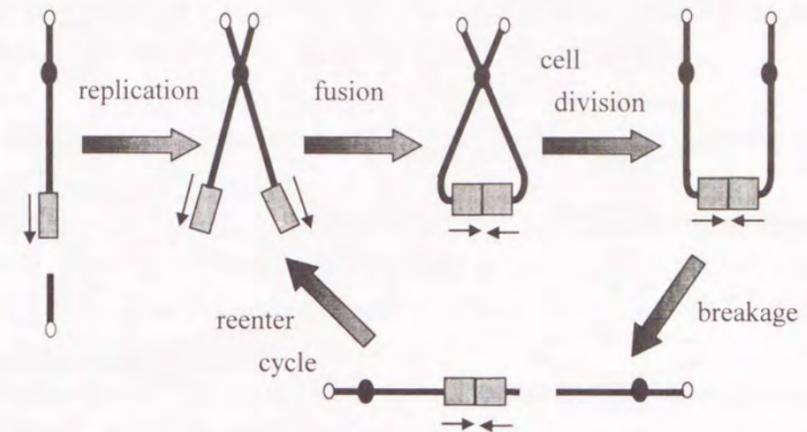


Fig. 2.3. Breakage-fusion-bridge (B-F-B) cycle model (telomere specific).

一方、Unequal sister-chromatid exchange モデル (Fig. 2.4.) (Windle *et al.*, 1992) では、*dhfr* 遺伝子が同一方向を向いて並んだ状態で遺伝子増幅がおこる。

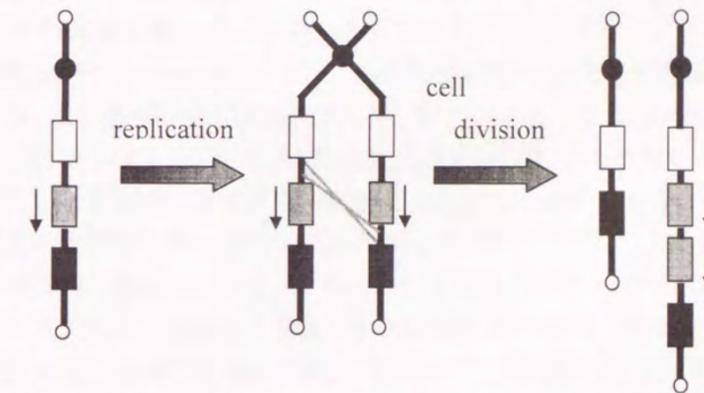


Fig. 2.4. Unequal sister-chromatid exchange model (homologous recombination).

遺伝子の脱落は、相同組換えによるものと考えられており、相同組換えがおこった場合は、同一方向を向いている増幅遺伝子は、欠失によって脱落するが、逆方向を向いている増幅遺伝子は逆位がおこるのみで脱落しない (Fig. 2.5.) (Watson *et al.*, (1990)). 従って、テロメア近傍で増幅した遺伝子よりも、それ以外の領域で増幅した遺伝子の方がより不安定になるものと考えられる。

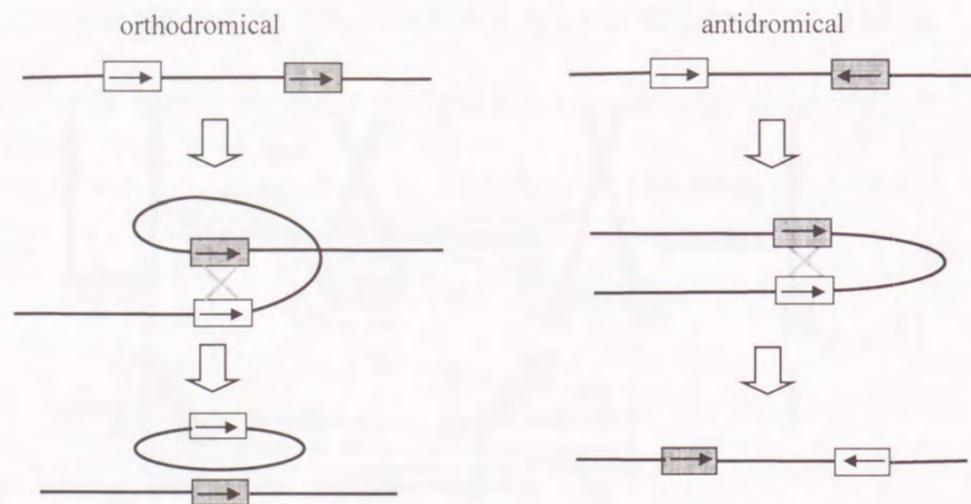


Fig. 2.5. Mechanism of homologous recombination.

また、増幅遺伝子の脱落頻度は、染色体構造の違いによることも考えられる。テロメア近傍は、一般に転写活性が不活性な部分であることが多い。これは、染色体構造を安定に保持するために、テロメア配列は他の染色体部位に比べさらに高度に折り畳まれた構造を取っているためと説明されている。さらに、その構造を保持するために、テロメア部分に結合するタンパク質も発見されている (Kozu *et al.*, 1995, Montuenga *et al.*, 1998, Gibbons *et al.*, 2000)。一方、テロメア近傍以外の領域では、活発に転写が行われており、コンパクトに折り畳まれた染色体構造が緩んでいる部分、つまり、染色体の脆弱部位 (fragile site, hot spot) が数多く存在する。増幅遺伝子が染色体に組み込まれるときにも、MTX 添加によって誘導された染色体の脆弱部位に多くの増幅遺伝子が導入されるという報告もある (Kuo *et al.*, 1998)。増幅によってコピー数を増やした増幅遺伝子が、染色体構造が緩んでいる部分において脱落していることも考えられ、そのため染色体の脆弱部位の少ないと考えられるテロメア近傍において、増幅遺伝子の脱落が少ないことも考えられる。

第4節 要約

増幅遺伝子の染色体上における位置が与える影響について解析を行うために、クローン細胞を用いて検討を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- telomere type のクローン細胞は、other type のクローン細胞に比べ高い比速度を有していることがわかった。
- 増幅遺伝子及び目的タンパク質遺伝子のコピー数に関しても、telomere type の細胞が、other type の細胞に比べ高い値を有していることがわかった。また、コピー数の脱落に関しては、telomere type の細胞は、染色体中に増幅遺伝子が保持されていることが示唆された。
- 増幅遺伝子の染色体上における位置が、得られる遺伝子増幅細胞の組換えタンパク質生産性に影響を与えていることがわかった。
- 増幅遺伝子の染色体上における位置が、MTX 非添加条件における増幅遺伝子の安定性に影響を及ぼしていることが示唆された。

第3章 高生産細胞の効率的取得法

第1節 緒言

実生産プロセスに使用する遺伝子増幅細胞の取得法に関しては、限界希釈法が通常用いられている。ところが、限界希釈法では、クローン取得までに1から2ヶ月という非常に長い選択期間を必要とする。遺伝子増幅を用いて生産株を構築する際には、段階的な薬剤の上昇を行う各段階において、さらに、このクローニング操作を複数回繰り返し行っている。その結果、生産細胞株構築までに、1から2年という非常に長い選択期間を必要としている。

そこで本章では、前章において明らかとなった、telomere type と other type の細胞の性質の違いを利用して、選択的に、高生産細胞である telomere type の細胞をヘテロな細胞集団から効率的に取得する方法について検討を行った (中西, 1999)。

第2節 実験材料及び実験方法

2.1 使用細胞株

第1章と同じ、Chinese hamster ovary (CHO) DG44 株を用いた。さらに、DG44 株の parent cell line である、CHO-K1 株を用いた。

2.2 使用培地及び添加物質

第1章と同じ培地を使用した。

添加物質として、fluorescein MTX (F-MTX) (Molecular probes M-1198)を使用した。

2.3 培養条件および操作

培養容器、培養条件、継代操作に関しては、前章までと同様の方法を用いた。

2.4 遺伝子増幅領域の解析 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

第1章と同様に観察した。

2.5 flowcytometry (FCM)による細胞内 DHFR 量の測定

フローサイトメトリー (flowcytometry, FCM) は、蛍光色素で染色した細胞を1個1個浮遊した形で細管を通過させ、これにレーザー光線を当てて、それにより発した蛍光の強弱により、大きさや相対的 DNA 量を測定するものである (Melamed *et al.*, 1992, 河本ら, 1994)。この機能を利用して、flow karyotyping、細胞周期解析及び、免疫細胞などの分離や検出に利用されている。さらに、細胞からの蛍光強度、または散乱角がある範囲内に収まっている細胞または染色体のみを選別収集することの出来る機能を有するセルソータによって、目的とする細胞を選択的に分取出来る機能を有したものもある。

原理としては、蛍光染色を施した細胞懸濁液を細管の中を通過させ、アルゴンレーザー光線を当てる。その結果、細胞に当たったレーザー光線は、散乱光と蛍光の2種類の光となる。散乱光のうち直進方向のもの (前方散乱光) は細胞の大きさを、直角方向のもの (側方散乱光) は細胞内構造を反映し、蛍光 (例; PI, FITC) は検索対象とした DNA 量や生物学的特徴を反映することになる。これらの光はそれぞれ直進およ

び直角方向の検出器により電気的信号に置換されヒストグラムとして表示されることとなる。

さらに、このように分析された細胞のうち、蛍光強度がある範囲内におさまっている細胞を正、あるいは負に荷電するよう設定しておくことによって、偏光板を通過する際に、目的の細胞のみを選択できるソート機能を持たせることが出来る (Fig. 3.1.)。

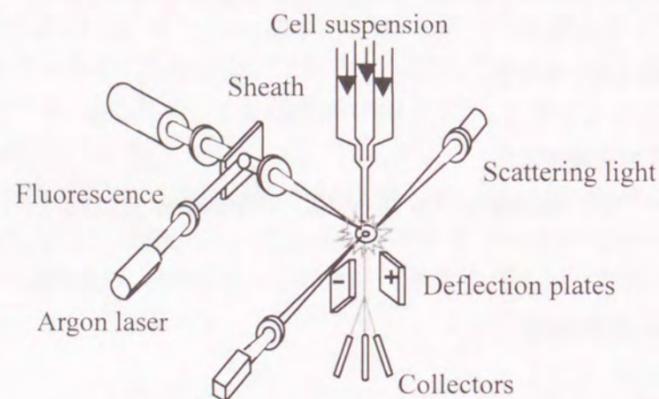


Fig. 3.1. Flowcytometry (FCM) schema.

本研究においては、Coulter 社製 EPICS ELITE[®] または、Becton-Dickinson 社製の FACS Vantage[®] を使用した。

2. 5. 1 F-MTX 蛍光強度測定法 (Kaufman, R.J. *et al.* (1978))

細胞内 DHFR に結合している MTX を完全に流出させることを目的に、MTX を含まない培地 (IMDM(核酸-)) 10 mL で細胞を 2 回継代培養し、3 回目継代時に、IMDM 培地 (核酸-) 5 mL の入った 60 mm または 100 mm ディッシュに 5×10^5 cells を接種した。24 hr 後、培地を駒込ピペットにて吸引除去し、F-MTX 溶液 200 μ L、IMDM 培地 (核酸+) 2.5 mL を加え、37°C、22 hr 保温した。結合していない過剰な F-MTX を流出させるために、イスコフ培地(核酸-) 2.5mL で洗浄後、IMDM 培地 (核酸-) 5 mL で、37°C で 0-24 hr 保温した。トリプシン処理後、95 \times g で 10 min 遠心分離し、上清を除去後、適量の PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} -) (Dainippon Pharmaceuticals Co. 28-103-05) に懸濁した。得られた細胞懸濁液を FCM を用いて、励起波長 488 nm で測定した。また、ソーティングを行うときには、メッシュ (Falcon 35-2235) を数回通した細胞懸濁液を FCM にかけた。

2. 5. 2 使用試薬

• 50 mM KH_2PO_4 バッファー (pH 9.0) ; KH_2PO_4 0.68 mg, 超純水 1 L

• 125 μ M F-MTX 溶液 ; fluorescein methotrexate (F-MTX) (Molecular probes

M-1198) 1 mg, KH_2PO_4 バッファー 8 mL

遮光して、-20°C で保存した。

第3節 高生産遺伝子増幅細胞の効率的取得法

第1項 細胞内 DHFR 量の定量

前章までの結果から、増幅遺伝子が染色体テロメア近傍に組み込まれ遺伝子増幅している細胞 (telomere type) が、組換えタンパク質生産能、増殖能、非選択培地中における生産安定性を有していることを明らかにした。しかしながら、MTX の段階的濃度上昇によって選択された細胞集団には、telomere type の他に other type や no signal の細胞も多数存在した (第1章)。そこで、このようなヘテロな状態の遺伝子増幅細胞集団から、選択的に telomere type の細胞を検出し、分取することを試みた。

高生産能を有する遺伝子増幅細胞である telomere type の細胞は、遺伝子増幅頻度が高く、染色体中に存在する増幅遺伝子のコピー数が高い。MTX は、folic acid のアナログ化合物であり、DHFR に結合して、folic acid から tetrahydrofolic acid への反応を強力に阻害する (Fry *et al.*, 1987)。そこで、蛍光標識した MTX (F-MTX) を、細胞に取り込ませることで、その蛍光量から細胞内の DHFR タンパク質量が定量できるものと考えた (Fig. 3.2.)。

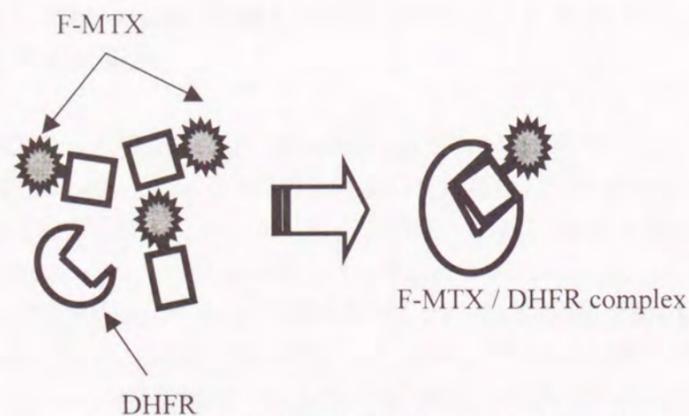


Fig. 3.2. Model of F-MTX/DHFR complex formation.

そこで、1000 nM-MTX 耐性の telomere type, other type のクローンを用いて、F-MTX 蛍光強度を FCM によって測定した (Fig. 3.3.)。

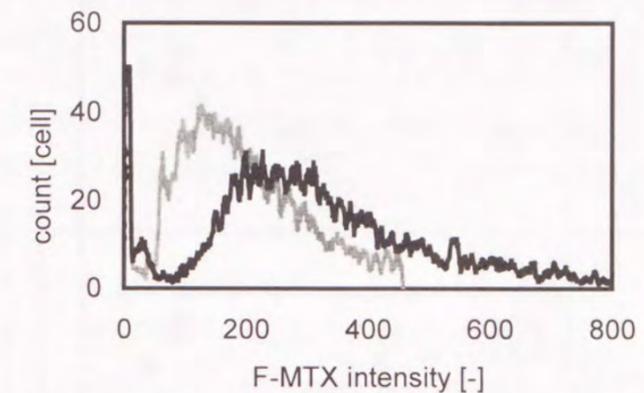


Fig. 3.3. F-MTX intensity of two cell types using flow-cytometry. Black line indicates F-MTX intensity of telomere type clone and gray line indicates that of other type clone. Total amount of cell number was 10,000 cells in each cell lines.

この結果、遺伝子増幅頻度が高い telomere type の細胞の方が、other type に比べ、高い F-MTX 蛍光強度を有していることがわかった。このことを確認するために、複数の telomere type, other type のクローンを用いて、F-MTX 蛍光強度を測定した。さらに、F-MTX 平均蛍光強度を算出して、その平均値を比較した (Table 3.1.)。

Table 3.1. Summary of average F-MTX intensity of two type clones.

Amplified type	Average F-MTX intensity
Telomere (n=6)	376 ± 51
Other (n=7)	236 ± 28
DG44	< 50
CHO-K1	< 100

以上の結果から、遺伝子増幅頻度の高い telomere type の細胞が高い F-MTX 蛍光強度を有していることがわかった。

さらに、F-MTX 平均蛍光強度と DHFR 比活性、比 hGM-CSF 生産速度を比較した (Fig. 3.4.)。

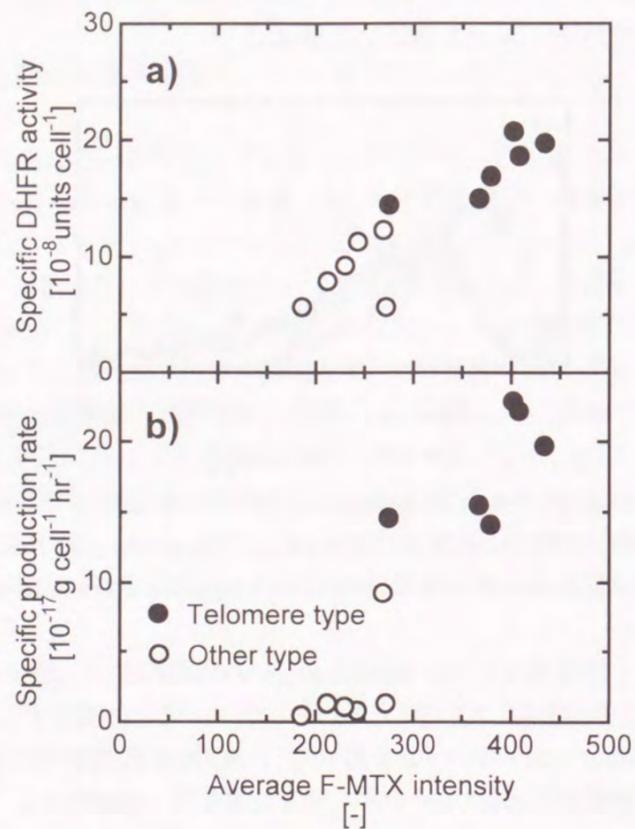


Fig. 3.4. Relationship between average F-MTX intensity and kinetic parameters.

- a) ; Specific DHFR activity vs. average F-MTX intensity
- b) ; Specific hGM-CSF production rate vs. average F-MTX intensity

以上の結果より、測定したF-MTX 蛍光強度は、DHFR 比活性および、比hGM-CSF 生産速度と相関があることが確認された。

第2項 F-MTX 蛍光強度を指標とした細胞選択

前項において、F-MTX 蛍光強度が高い細胞において、遺伝子増幅頻度が高く、さらに、これらの細胞は組換えタンパク質の生産性の高い telomere type の細胞であることがわかった。このことから、F-MTX 蛍光強度の高い細胞をソーティングによって分取することが出来れば、ヘテロな細胞集団から、効率的に telomere type の細胞を分取出来るものと考えられた (Fig. 3.4.)。

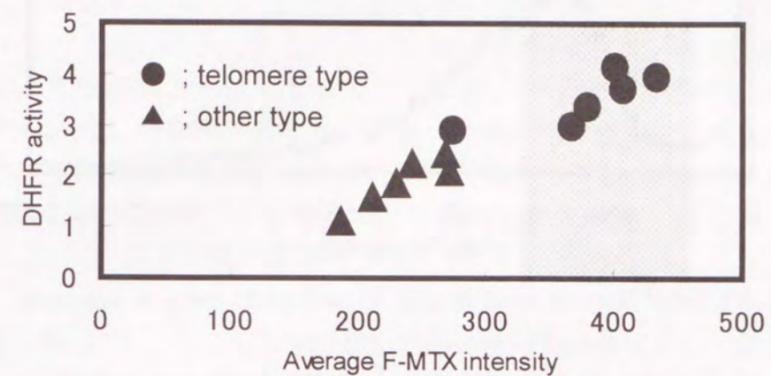


Fig. 3.4. Concept of cell sorting based on F-MTX intensity.

Fig. 3.4. の概念図に示すように、灰色の部分の細胞 (telomere type の細胞) を分取するために、F-MTX 蛍光強度のチャンネルを、ある区間で区切り、その区間中の蛍光強度を有する細胞をセルソータによって分取した。選択した区間としては、以下 Table 3.2. に示す G1~G6 を用いた。

Table 3.2. The gated segment by FCM.

Gate	F-MTX intensity segment
G1	80 - 160
G2	161 - 240
G3	241 - 320
G4	321 - 400
G5	401 - 520
G6	521 - 680

Table 3.2. の区間にゲートをかけ、無菌的に分取された細胞集団を培養し、その細胞集団の telomere type と other type の細胞の割合を算出した結果を、Fig. 3.5. 及び Table 3.3. に示した。存在割合を算出するに当たって、得られた細胞集団に対して

FISHを行い、データ解釈が観察者によって影響を受けないように、スライド上に固定した染色体セットを無作為に観察し、増幅遺伝子の位置を分類した後、それぞれの細胞タイプの存在割合を算出した。

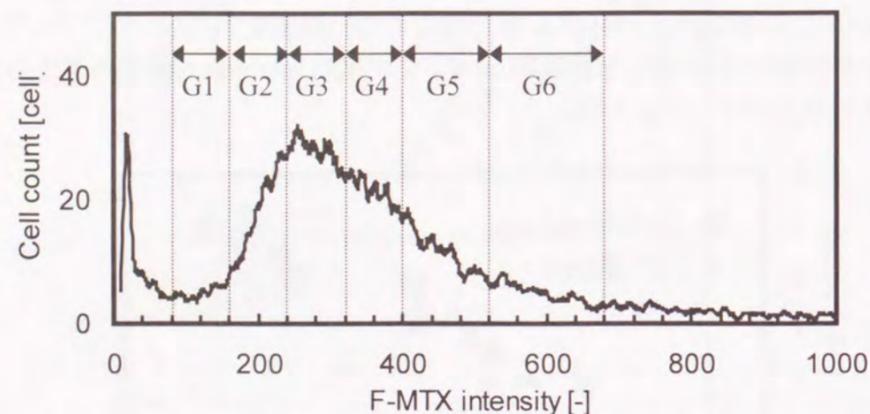


Fig. 3.5. F-MTX intensity of pattern ⑤ cell pools and gate segments.

Table 3.3. The ratio of two types of gene-amplified cells in sorted cell pools.

Gate	Telomere type [%]	Other type [%]
G1	75	25
G2	74	26
G3	79	21
G4	75	25
G5	64	36
G6	42	58
No gate (pattern ⑤)	62	38

その結果、ヘテロな細胞集団である pattern ⑤では、telomere type と other type が、ほぼ 6:4 の割合で存在していた。各ゲートの区間から分取された細胞集団に対して、telomere type 及び other type の存在割合を算出したところ、G3 区間で分取された細胞集団中に、約 80% の telomere type の細胞が含まれており、telomere type の細胞が最も多く存在する分画であった。

第3項 MTX 耐性獲得機構

前項の結果から、telomere type の F-MTX 蛍光強度よりも高い F-MTX 蛍光強度を有する other type の細胞集団について考察した。ある MTX 濃度に対して耐性を獲得する機構については、遺伝子増幅によって MTX に対して耐性を獲得するほかに、F-MTX の細胞膜透過性の変化 (Haber *et al.*, 1981) や、DHFR の MTX に対する親和性の変化 (Assaraf *et al.*, 1987) が考えられている。DHFR の MTX に対する親和性が変化した細胞では、取り込まれた F-MTX は、細胞内に存在する DHFR との複合体を通常に比べ形成しにくくなる。したがって、細胞内に存在している F-MTX は、洗浄操作によって細胞外に流出してしまい、非常に低い F-MTX 蛍光強度しか示さないと考えられる。一方、細胞膜の透過性が変化した細胞では、飽和量細胞内に取り込まれた F-MTX は、膜透過性が低いために洗浄操作を行っても、通常に比べ細胞外への F-MTX 流出量は低くなり、結果的に細胞内 F-MTX 量が高くなり、F-MTX 蛍光強度が高く測定されているものと考えた。

そこで、実際にこのような遺伝子増幅以外の耐性獲得機構によって MTX 耐性を獲得している細胞が存在するかを確認することとした。MTX の膜透過性に変化が生じているかを測定するために、Fig. 3.6. に示した方法で、F-MTX の膜透過性の違いを測定することとした。

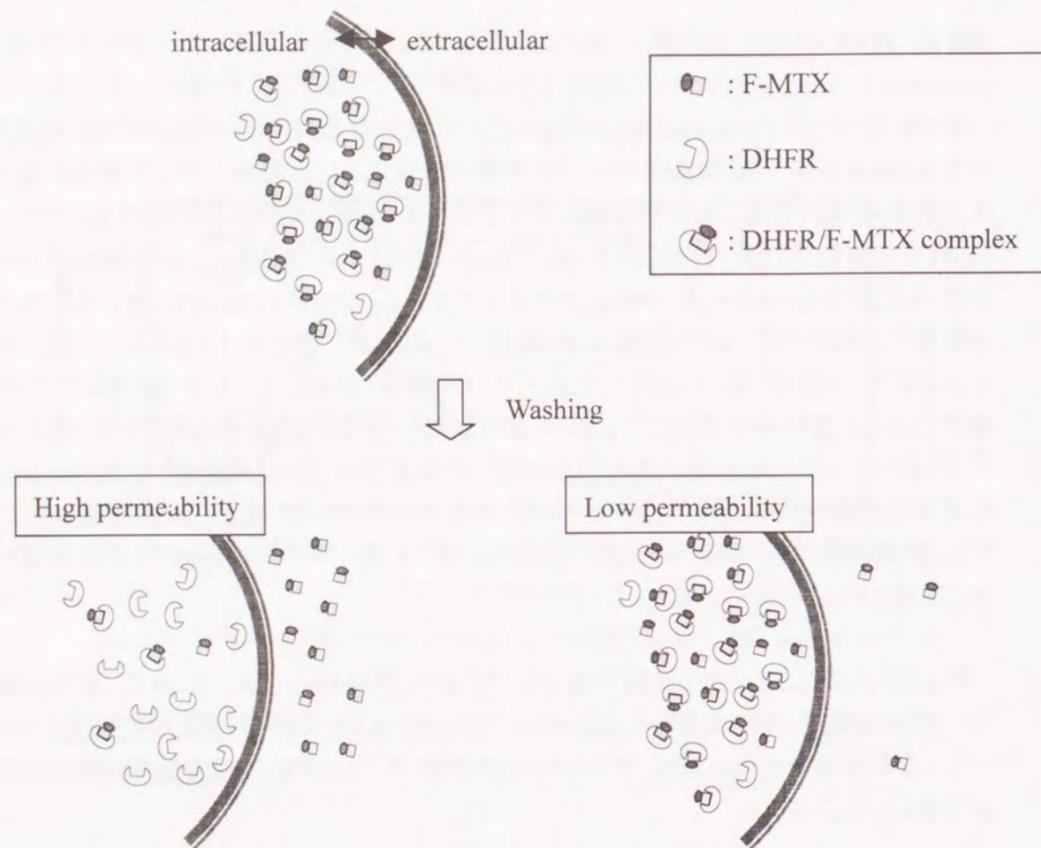


Fig. 3.6. Concept of differences between high and low membrane permeability.

Fig. 3.6. のように、膜透過性が低下している細胞では取り込まれた F-MTX が洗浄操作によって、細胞外へ流出しにくくなると考えられる。このことを確認するため、細胞内に取り込んだ飽和量の F-MTX が洗浄操作によって、細胞内から細胞外に流出しているかを検討した (Fig. 3.7.)。

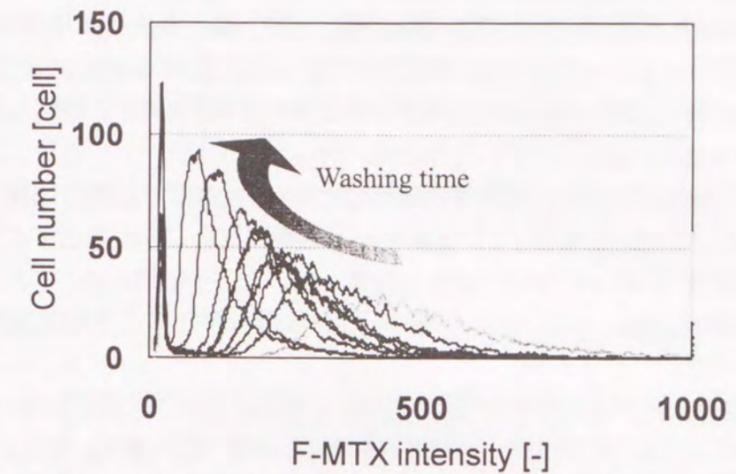


Fig. 3.7. Effect on washing time to decreasing of F-MTX intensity.

Fig. 3.7. のように、洗浄時間を長くすると、灰色で示した洗浄を行わなかった場合の F-MTX 蛍光強度から、減少して行くことが測定された。

さらに、各洗浄時間における F-MTX 平均蛍光強度を算出し、その自然対数を取った値を洗浄時間に対してプロットした結果を Fig. 3.8. に示す。これより、細胞内に飽和量取り込まれた F-MTX 平均蛍光強度の減少速度を算出し、3 株のクローン細胞の F-MTX 平均蛍光強度減少速度を比較した。

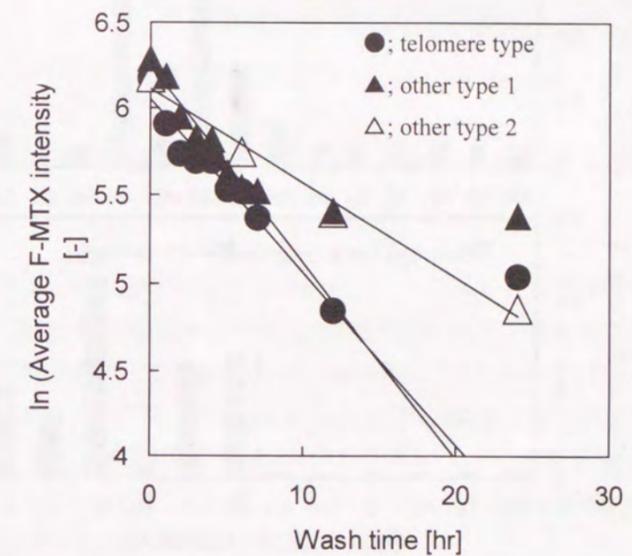


Fig. 3.8. Average F-MTX intensity decreasing rates.

その結果、telomere type 及び other type 1 のクローンについては、ほぼ同じ程度の F-MTX 平均蛍光強度の減少速度が得られた。一方、other type 2 の細胞については、低い減少速度を示した。このことは、細胞内に取り込まれた F-MTX の流出速度が低いことを示しており、other type 2 は、膜透過性変異によって MTX に対する耐性を獲得していると考えた。

このように、DHFR の MTX に対する親和性の変化や、MTX の膜透過性変化によって MTX に対して耐性を獲得している細胞が存在するため、増幅遺伝子のコピー数が低くても、高濃度の MTX に対して耐性を獲得していることがわかった。このようにして、other type の細胞には、コピー数の少ないものが多く存在していると推測された。

また、増幅遺伝子が染色体中に組み込まれる過程において、染色体構造が脆弱である部位に組み込まれやすいという報告がある (Kuo *et al.*, 1998)。このような染色体構造が脆弱な部位では、hot spot などは、転写活性が非常に高い遺伝子の近傍に存在するというものや、エンハンサー配列の近傍であることが報告されている。さらに、MTX 添加による影響で、染色体の脆弱部位が生じるとの報告もある (Kuo *et al.*, 1998)。このような染色体部分に組み込まれた遺伝子は、1コピー当たりの転写活性が高いことが予想される。そこで、このことを確認するために、遺伝子増幅細胞の単位コピー当たりの DHFR 活性を算出し、比較した (Fig. 3.9.)。

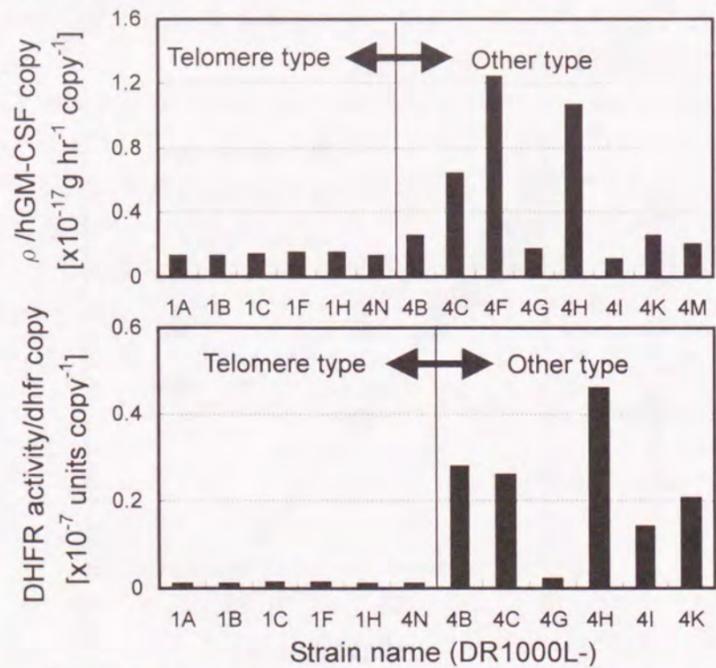


Fig. 3.9. Specific DHFR activity and specific production rate per each dhfr and hGM-CSF copy number.

その結果、telomere type の細胞の1コピー当たりの DHFR 活性は、other type の細胞に比べ低いことがわかった。また、増幅遺伝子のコピー数が、telomere type ほど (平均 100 copies cells $^{-1}$) ではないが、ある程度遺伝子増幅が生じている DR1000L-4G 株 (DR1000L-4G, コピー数 52 copies cells $^{-1}$) でも、telomere type の細胞と同様に、単位コピー当たりの DHFR 活性は低いことが明らかとなった。また、単位 hGM-CSF コピー当たりの hGM-CSF 比生産速度に関しても、DHFR 活性時と同様の結果を得た。

次に、細胞当たりの DHFR 比活性について考察した (Fig. 3.10.)。

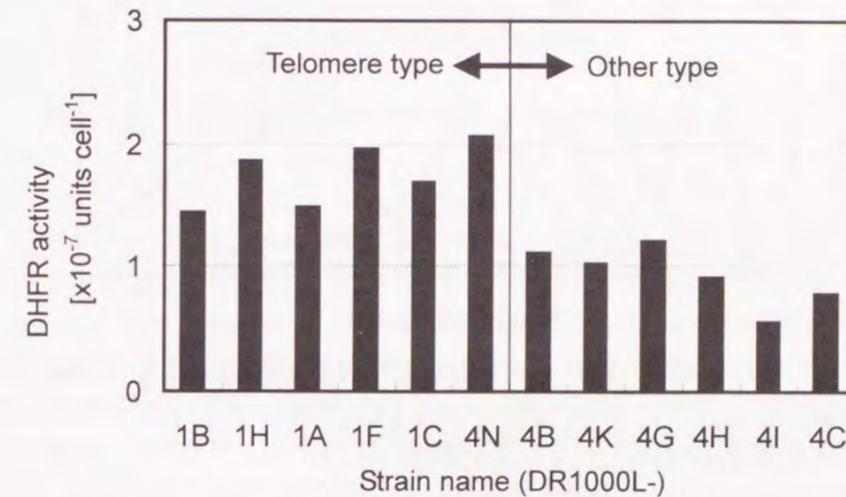


Fig. 3.10. Specific DHFR activity per cell.

細胞当たりの DHFR 活性に関しては、双方の細胞株において差が顕著でないことがわかった。

以上の結果から、other type の中の細胞には、エンハンサー配列の近傍に組み込まれるなど、dhfr 遺伝子の単位コピー当たりの転写活性が上昇しているものが存在していることが強く示唆された。この場合には、細胞内に存在する DHFR 分子数は、遺伝子増幅によって耐性を獲得した telomere type などの細胞と同レベルにあるため、測定される F-MTX 蛍光強度はほぼ同一のヒストグラムとなることが予想される。しかし、平均的な細胞当たりの DHFR 分子量は、遺伝子増幅細胞と単位コピー当たりの発現量の上昇した細胞とでは、若干の違いが見られた。

すなわち、段階的な薬剤濃度上昇によって得られた MTX 耐性細胞集団には、遺伝子増幅細胞の他に、① MTX への親和性が減少したもの、② MTX の膜透過性が低くなったもの、③ 単位コピー当たりの DHFR 発現量が上昇したものが存在し、それぞれが、その時点でも MTX に対して十分な耐性を獲得していることが考えられた。したがって、MTX 耐性細胞集団を、F-MTX 蛍光強度を指標として測定した場合、それぞれの耐性細胞の有する F-MTX 蛍光強度は、Fig. 3.11. の a, b, c, d に示すような分布で測定されると考えられた。

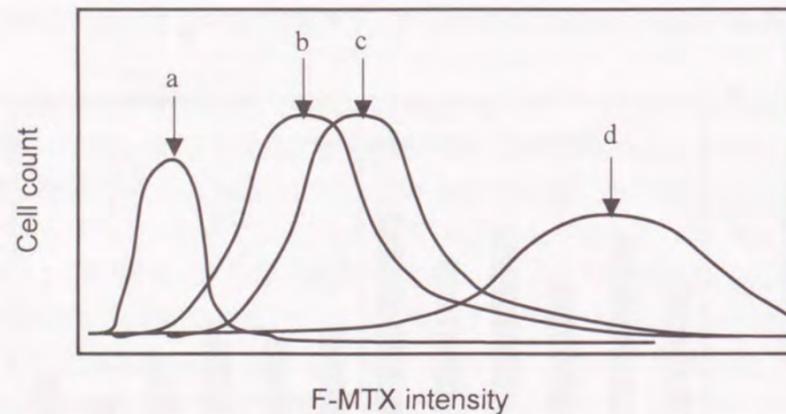


Fig. 3.11. F-MTX intensity of each mechanism for the acquiring to the resistance to MTX (concept).

- a: low affinity to MTX
- b: DHFR expression level elevation per *dhfr* copy
- c: gene-amplified cells
- d: membrane permeability mutation

そこで、Fig. 3.5. に示したソーティングを行った pattern ⑤ のヘテロな細胞集団において、各ゲート区間における telomere type と other type の細胞数を算出し、pattern ⑤ のヘテロな細胞集団において測定された F-MTX 蛍光強度のヒストグラムと合わせて図示し、両タイプの蛍光ヒストグラムを比較した (Fig. 3.12.)。

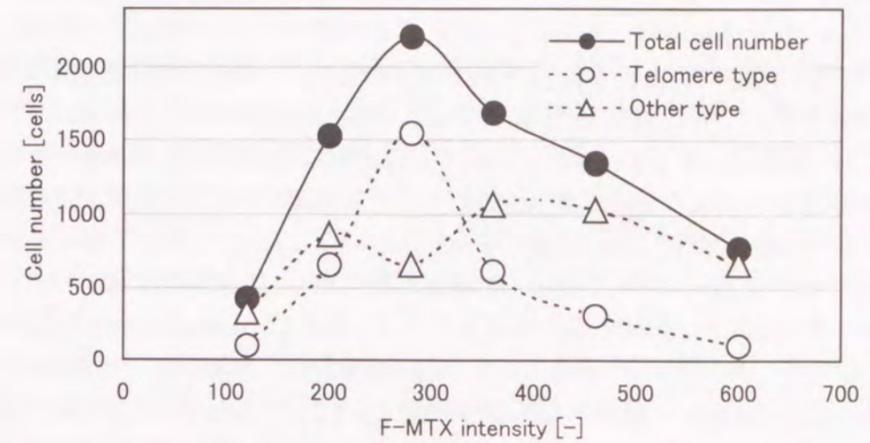


Fig. 3.12. Distribution of two type cells in heterogeneous cell pool, Pattern ⑤.

その結果、telomere type の存在している割合が多い F-MTX 蛍光強度と、other type が多い F-MTX 蛍光強度は、明らかにピークの位置及び、幅に大きな違いがあることがわかった。さらに、other type の F-MTX 蛍光強度分布は、MTX に対する耐性獲得機構が異なる二つの細胞集団の分布が重なり合っていると推測された。以上のことから、遺伝子増幅頻度の異なる細胞では、MTX に対する耐性獲得を遺伝子増幅以外の方法で獲得をしているものがあり、その細胞の有する F-MTX 蛍光強度は、遺伝子増幅によって耐性獲得した細胞の有する F-MTX 蛍光強度とは異なったパターンのヒストグラムを有していることが分かった。このような理由から、Fig. 3.5. および Table 3.3. に示す G3 のゲート位置においてソーティングした細胞集団中に、遺伝子増幅によって MTX 耐性を獲得した telomere type が多数含まれていたと考えられる。

第4項 高頻度に遺伝子増幅が生じる機構

前項までの結果より、増幅遺伝子のコピー数が低い場合でも、高濃度の MTX に対して耐性を獲得で出来ることがわかった。しかし、telomere type の細胞及び、other type の一部の細胞においては、高頻度に遺伝子増幅が生じていたことから、どのようなメカニズムで、高頻度に遺伝子増幅が生じるのかについて考察した。

前項において示した Fig. 3.9. では、telomere type の細胞は、単位コピー当たりの DHFR 活性が低いことがわかったが、細胞当たりの DHFR 活性に関しては、other type

のものとはほぼ同一のレベルであったことから考えると、遺伝子増幅頻度の高い telomere type では、単位コピー当たりの DHFR 活性が低いため、高濃度の MTX 濃度に対して耐性を獲得するためには、染色体中におけるコピー数を増加させる必要があったと考えられた。つまり、遺伝子増幅頻度を上げるためには、増幅遺伝子の単位コピー当たりの活性が上昇してしまうエンハンサー近傍のような転写活性が高い染色体部位に増幅遺伝子が組み込まれることは望ましくなく、比較的転写活性が低い環境にある染色体中に導入されることが必要であると考えられる。さらに、遺伝子増幅頻度は、増幅遺伝子及び目的タンパク質遺伝子を宿主細胞に導入する際に用いるベクター上のプロモータにも大きな影響を受けると思われる。例えば human cytomegalovirus (hCMV) プロモータなどの、高発現プロモータを使用すると、単位コピー当たりの発現量が上昇してしまうために、遺伝子増幅頻度が低くなることが考えられる。実際に、*dhfr* 遺伝子の発現のために hCMV プロモータを用いた場合には、遺伝子増幅頻度が低く、hCMV プロモータよりも弱いプロモータである SV40 プロモータを用いた場合に比べ、生産性も低い細胞しか得られなかったとの報告もある (Bebbington *et al.*, 1992)。以上のことから、遺伝子増幅の際に用いるベクターの構造としては、以下のような特性を持つベクターを用いることが望ましいと考えられる (Fig. 3.13.)。

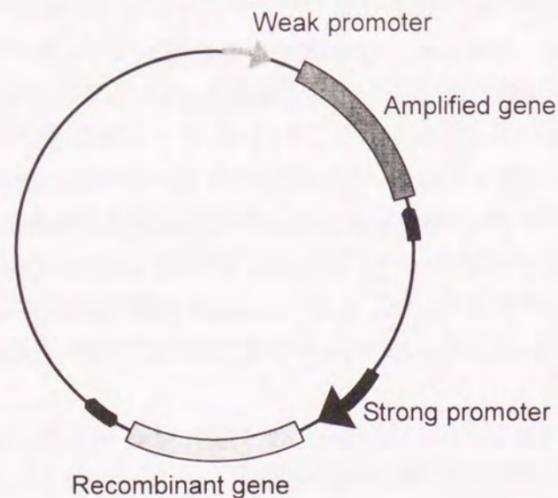


Fig. 3.13. A stable structure for highly amplifiable vector.

第4節 要約

限界希釈法では取り扱うことが困難である大量の細胞 ($>10^4$ cells) に対し、解析可能で、かつ選択的な分取可能な、FCM を用いて、F-MTX 蛍光強度を指標とした telomere type を多く含む細胞集団の選択法について検討した。その結果、以下に示すことが明らかとなった。

- F-MTX 蛍光強度のヒストグラムは、telomere type の細胞と other type の細胞とは異なる。
- MTX の段階的濃度上昇によって選択された MTX 耐性細胞を用いて、F-MTX 蛍光強度の異なる部分にゲートをかけ細胞をソーティングしたところ、telomere type を多く含む細胞集団を取得可能であることが分かった。
- 高濃度の MTX に対して耐性を獲得する機構が遺伝子増幅によるものだけでなく、MTX の膜透過性変異や単位コピー当たりの DHFR 活性が上昇することによって、耐性を獲得している細胞が存在していることが示唆された。
- 遺伝子増幅頻度が高い細胞では、単コピー当たりの DHFR 活性が低いため、これを補う形でコピー数が増幅する現象が起こっていると考えられた。

第4章 高頻度に遺伝子増幅が生じる染色体位置の同定

第1節 緒言

前章までの実験結果から、染色体のテロメア近傍に導入された増幅遺伝子が、高頻度に増幅しており、さらにそのような細胞である telomere type は、高生産能だけでなく、組換えタンパク質の MTX 非添加条件下における生産安定性も有していることが示された。研究を進めるうち、数多くの FISH 画像観察結果から、telomere type の細胞において観察される増幅遺伝子が、ある特定の染色体上に存在しているように思われた。このことより、染色体の特定部位に導入された増幅遺伝子が、高頻度に増幅していると推測された。そこで、本章では増幅遺伝子が組み込まれた染色体上における位置を同定することを目的とした。

しかし、ヒトやマウスなどとは異なり、CHO 細胞における核型解析及び遺伝子のマッピングについては、染色体の同定に用いる染色体特異的プローブが存在しないことや、マッピングする際に用いるサテライトマーカなどが存在しないという問題点があった。さらに、Gバンド、Qバンド、DAPIバンドなどによるバンドパターン解析から、染色体の同定を行い目的遺伝子の位置を同定する方法は、染色体再編成、相同組換えなどが頻繁に起こる非常に核型の不安定な CHO 細胞においては、大変な困難を伴うものと考えられた。

そこで本章では、染色体のバンドパターンを画像解析によって行い、このバンドパターンの違いによって染色体を区別し、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定することとした。

第2節 実験材料及び実験方法

2.1 使用細胞株

第1章と同じ、Chinese hamster ovary (CHO) DG44 株を用いた。

2.2 使用培地及び添加物質

第1章と同じ培地及び、添加物質を使用した。

2.3 培養条件及び操作

培養容器、培養条件、継代操作に関しては、前章までと同様の方法を用いた。

2.4 遺伝子増幅領域の解析(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

第1章と同様に観察した。

2.5 FISH 画像の解析

FISH によって取得した画像データを、マッキントッシュ PC (Power Mac. G3) を用い、NIH Image 及び Microsoft Excel のマクロプログラムである Chromosome Image Analyzing System III (CHIAS III) によって解析を行い、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定した (Fukui, 1986, Kato *et al.*, 1998)。

2.5.1 画像処理

2.4に示した方法によって TIFF 形式の FISH 画像を IPLab Spectrum™ により取得し、CHIAS III のプログラムに取り込んだ。取得した画像内の染色体領域を決定し、その染色体領域をプログラムに従い抽出した。抽出した染色体画像を 256 階調のグレースケールに正規化した。その後、染色体のセントロメア位置の決定を行い、染色体の中心上に線を描き、その線上の濃度値を数値化し、その数値に基づいて 256 階調のバンドパターン描き、最終的に濃淡の 2 値化を行うことによって染色体のバンドパターンを決定した (Fig. 4.1.)。

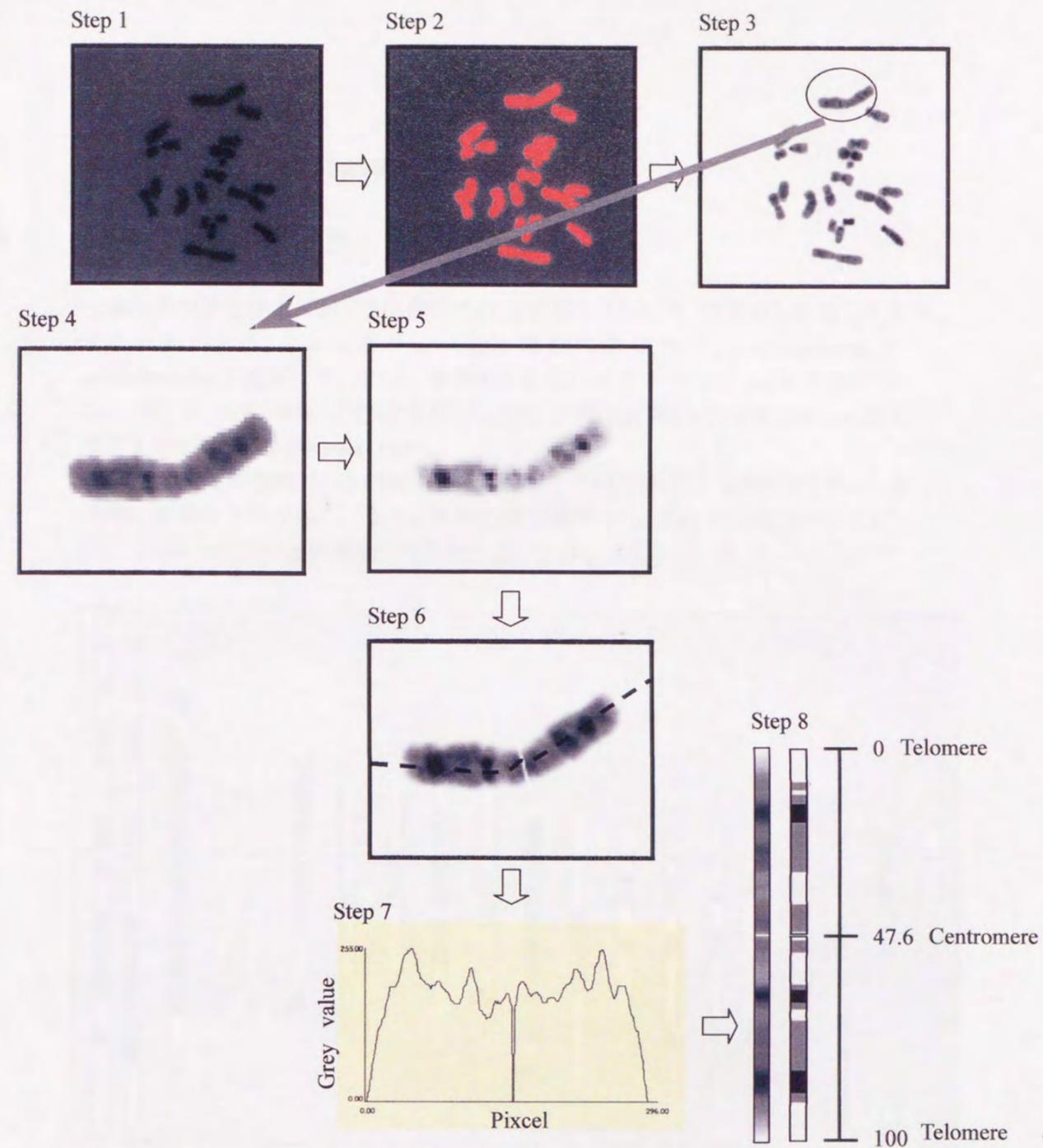


Fig. 4.1. Chromosome Image Analyzing System (CHIAS III) schema.

Step 1: Obtaining of chromosomes image, Step 2: Determination of chromosomes area

Step 3: Extraction of chromosomes, Step 4: Expansion ($\times 2$)

Step 5: Normalization to 256 gray scales,

Step 6: Determination centromere location and drawing centerline of chromatid,

Step 7: Quantification of gray value and draw histogram,

Step 8: Obtaining chromosomal band pattern

第3節 染色体上における増幅遺伝子位置の同定

第1項 標準的核型の取得

遺伝子の染色体上における位置をマッピングするためには、標準的な核型を決定する必要がある。しかしながら、CHO 細胞の染色体は、rearrangement や recombination が頻繁に生じており、標準的な核型がヒトやマウスのように確立されていない。そこで、CHO 細胞の核型を取得するには、実際に使用している細胞株の核型を決定する必要がある (Warner, 1999)。

そこで、宿主細胞株である CHO DG44 株に対して CHIAS III による解析を行い、標準的な核型を作成することとした。複数の核型解析から、その平均値を利用して、CHO DG44 株における標準的な核型を作成した (Fig. 4.2.)。

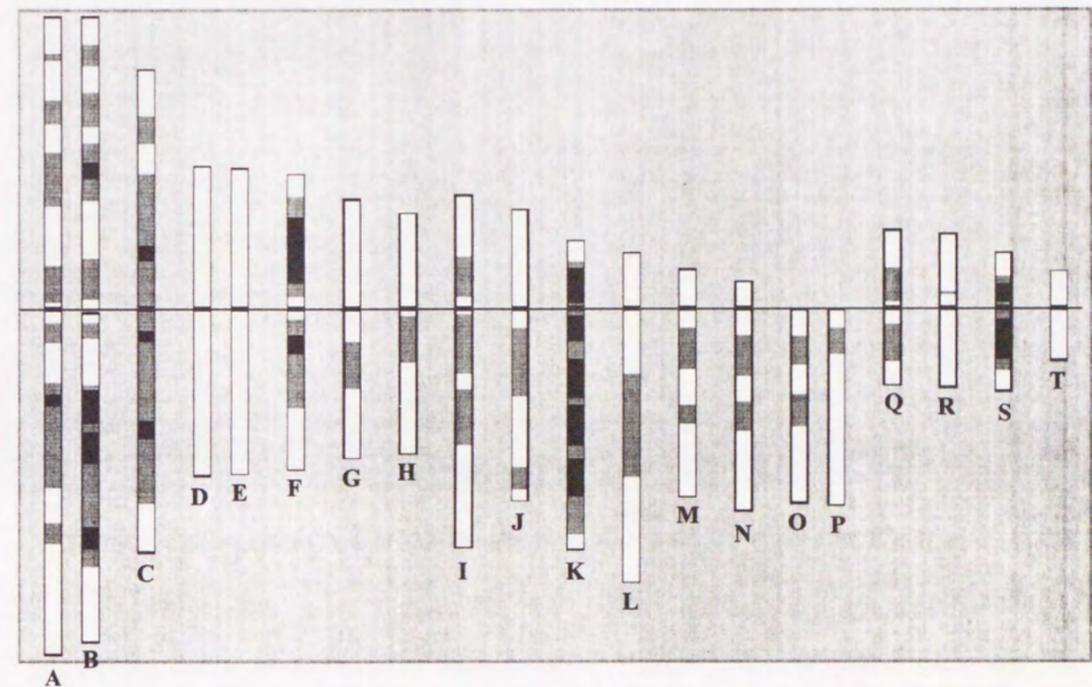


Fig. 4.2. Ideogram of CHO DG44 karyotype.

その結果、CHO DG44 株のゲノムは、20 本 (A~T) の染色体から構成されていることが明らかとなった。しかし、CHO 細胞の染色体は、染色体の再編成や組み換えが頻繁に起こっており、正確なナンバリングは困難であるため、ここでは染色体のナンバリングは行わなかった。

第2項 増幅遺伝子のマッピング

前項にて取得した標準的核型 (Fig. 4.2.) に基づいて、増幅遺伝子の染色体上における位置を FISH シグナルの大小に関わらず全てマッピングした (Fig. 4.3.)。このとき使用した細胞は、1,000 nM-MTX 耐性細胞集団である pattern ① 及び、pattern ⑤ の細胞集団である。

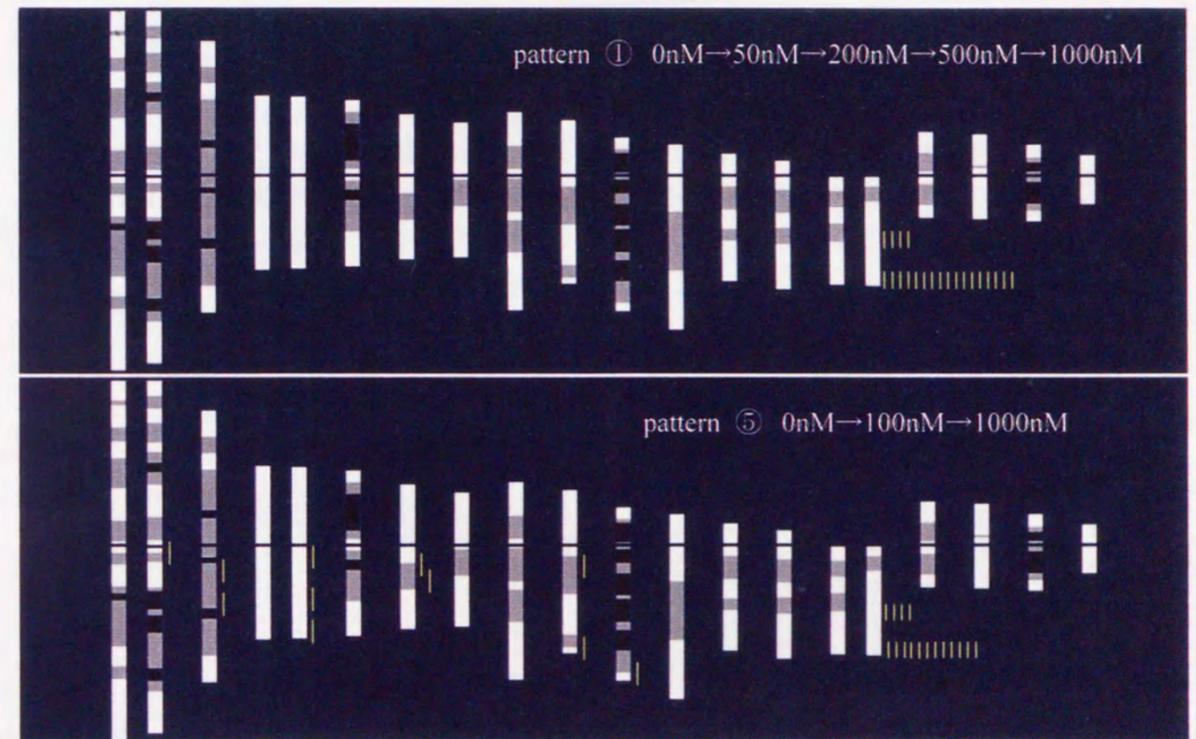


Fig. 4.3. The location of amplified genes on ideogram of DG44 karyotype.

この結果、比較的穏やかに MTX 濃度上昇を行って選択した 1,000 nM-MTX 耐性細胞集団 (pattern ①) では、Fig 4.2.に示すように便宜的に P とした染色体末端近傍に増幅遺伝子が集中して存在していることがわかった。一方、比較的急激に MTX 濃度上昇を行って取得した pattern ⑤ の細胞集団では、pattern ① と同様の染色体末端近傍にも増幅遺伝子は集中して存在してはいるが、その他の染色体においても増幅遺伝子が観察された。



これより、増幅遺伝子は主として特定の染色体末端に組み込まれており、そこで、高頻度に遺伝子増幅が生じていることがわかった。また、穏やかに MTX 濃度上昇を行った場合と、急激に MTX 濃度上昇を行った場合において増幅遺伝子の分布が異なることがわかり、遺伝子導入の際、染色体中に組み込まれる位置が、MTX の濃度によって異なるためと考えられた。MTX 濃度の違いによって、染色体中の脆弱部位の生じる頻度が異なるため、急激に MTX 濃度上昇を行った場合に、様々な染色体に増幅遺伝子が存在しているものと考えられた。このような細胞は遺伝子増幅頻度が低い other type で多く観察された。

ここで、FISH により得られた telomere type 及び、other type の細胞割合 (Fig. 1.7.) と、CHIAS による解析から得られた、テロメア近傍にマッピングされた増幅遺伝子と、それ以外の領域にマッピングされた増幅遺伝子の割合を比較した (Figs. 4.4., 4.5.)。ここで、CHIAS によるマッピングを行った結果を用いた場合には、増幅遺伝子が集中して存在していた P 染色体以外の染色体であっても、テロメア近傍に観察された増幅遺伝子は、telomere type として計数した。



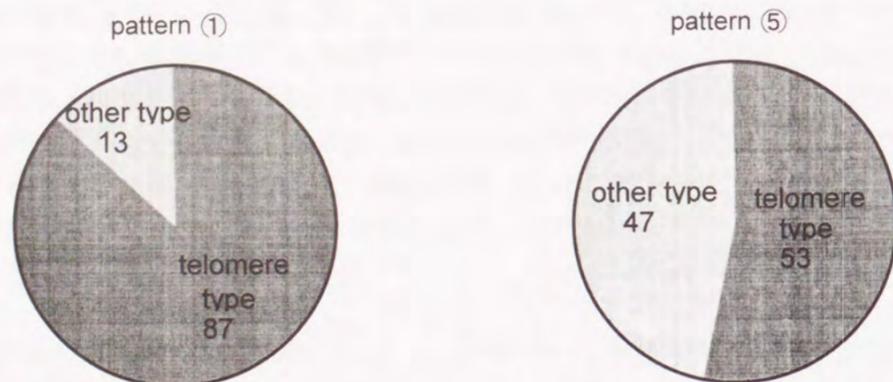


Fig. 4.4. Ratios of two types of gene-amplified cells, telomere type and other type, in chromosomal DNA based on FISH analysis.

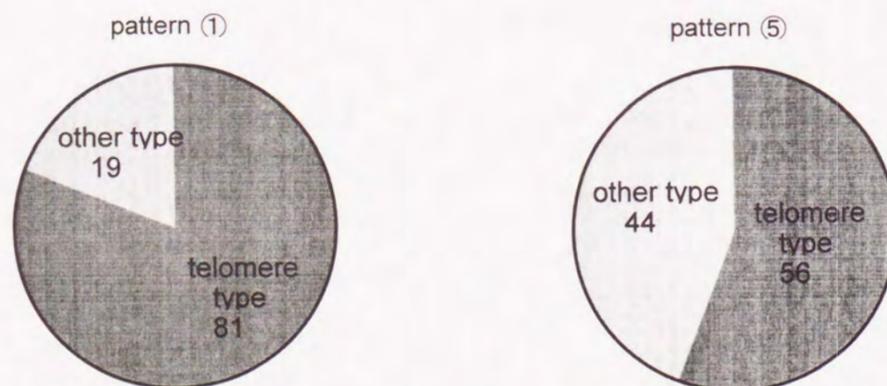


Fig. 4.5. Ratios of two types of gene-amplified cells, telomere type and other type, in chromosomal DNA based on CHIAS analysis.

その結果、FISH によって観察された telomere type 及び、other type の分布と、CHIAS によってテロメア近傍にマッピングされた増幅遺伝子と、それ以外の領域にマッピングされた増幅遺伝子の割合は、ほぼ同じであった。このことから、FISH によってテロメア近傍に観察された増幅遺伝子は、そのほとんどが CHIAS によるマッピングによって明らかとなった P 染色体のテロメア近傍に存在しているものと考えられた。

増幅遺伝子が染色体中に導入されやすい染色体部位や増幅ユニット、遺伝子増幅が生じる染色体配列の特異性に関しては、数報の報告があるに過ぎない (Dijkwel *et al.*, 1988, Anachkova *et al.*, 1989, Stolzenburg *et al.*, 1994, Brinton *et al.*, 1995)。しかも、遺伝子組み換えタンパク質生産に適した細胞株構築において、高頻度に遺伝子増幅が生じ、組換えタンパク質生産も安定している特定の染色体配列が存在するという報告はない。本章では、MTX 濃度の上昇系の違いによって、増幅遺伝子が導入された染色体の位置が変化することを明らかにした。さらに、特定の染色体に集中して増幅遺伝子が導入されていることも明らかにした。

第4節 要約

増幅遺伝子の染色体上における位置を同定するために、CHIAS III を用いて実験を行った結果、以下に示す結果を得ることが出来た。

- CHIAS III を用いて、CHO DG44 株の標準的な核型を決定した結果、CHO DG44 株は、20 本の染色体を有していることがわかった。
- 標準的な核型を用いて、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定した結果、増幅遺伝子が特定の染色体のテロメア近傍に存在することが確認された。

総括

遺伝子増幅現象を利用した動物細胞による組換えタンパク質生産の効率化に関する研究は、他の方法による生産性の向上への取り組みに比べその結果が公開されにくい。これは、遺伝子増幅現象自体に未解明な点が多いという問題の他に、実生産プロセス構築に密接に関連しているため、企業などが確立しているノウハウを公開していない点も挙げられる。また、動物細胞を利用して物質生産を行う場合に最も時間がかかり、労力が必要となるプロセスは細胞株の構築である。さらに、細胞株の構築は、最も重要であるにも関わらず、効率的な細胞株構築技術は完全には明らかにされておらず、経験的に構築された細胞株を利用して組換えタンパク質の生産を行っている例が多い。

本研究では、動物細胞を用いた物質生産において、根幹にあると考えられる生産に適した細胞株の構築法の開発に焦点を絞って、遺伝子増幅現象を定量的に取り扱い、その知見から効率的な遺伝子増幅細胞の構築法及びスクリーニング法について研究を行った。さらに、遺伝子増幅が高頻度に生じる理由についても考察した。

第1章では、遺伝子増幅時に添加される MTX の濃度上昇条件が、得られる遺伝子増幅細胞に与える影響について述べ、この影響を明らかにした。また、増幅遺伝子の染色体中における位置が、得られる細胞の性質に影響を与えていると考え、増幅遺伝子の染色体中における位置を fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法によって特定し、増幅遺伝子がテロメア近傍に存在する細胞 (telomere type) と、テロメア以外の染色体領域に増幅遺伝子を有する細胞 (other type) 及び、FISH のシグナルが観察されなかったもの (no signal) の3つのグループに分類した。増幅遺伝子の染色体中における位置が遺伝子増幅細胞の諸性質に影響を与えていると推測した。また、上昇系の違いによって得られてくる耐性細胞の増幅遺伝子の位置の分布に違いがあることを明らかにし、比生産速度の違いもあることがわかった。さらに、細胞選択中における増幅遺伝子領域の経時的な変化を測定した結果、MTX 濃度上昇系のごく初期段階である0から50 nM-MTXの段階において、増幅遺伝子分布に大きな変化が観察され、telomere type の細胞の分布がこの段階において急激に上昇していることがわかった。また、これらの細胞群を用いて MTX の存在及び、非存在下で、目的物質である hGM-CSF を生産させた結果、MTX 非存在下において比生産速度の減少が確認され、この減少が増幅領域の変化に関連していることを推測した。

第2章では、増幅遺伝子の染色体上における位置が細胞の性質に与える影響について解析を行うため、第1章で得られた細胞群の中から37クローンを取得し、それぞれのクローンについて比増殖速度、目的タンパク質生産速度を解析し、telomere type

のクローン細胞は、other type のクローン細胞に比べ高い比増殖速度、比生産速度を有し、MTX 非添加条件における長期培養においても、その生産性の低下は極めて少ないことを示した。これより、増幅遺伝子の染色体上における位置が、生産性及び、安定性に大きく影響していることを明らかにした。

第3章では、限界希釈法で取り扱う細胞数に比べ遙かに大量の細胞に対して解析可能で、かつ分取も可能な Flow-cytometry (FCM) を用いて、telomere type の細胞を多く含む細胞集団の選択法について検討した。その結果 F-MTX 蛍光強度のヒストグラムパターンは、telomere type の細胞と other type の細胞とでは異なることを明らかにした。また、ヘテロな MTX 耐性細胞を用い、種々の F-MTX 蛍光強度でソーティングしたところ、telomere type を多く含む細胞集団が取得できることがわかった。さらに、遺伝子増幅頻度が高い細胞では、単位コピー当たりの DHFR 活性が低いため、これを補う形でコピー数が増幅すると現象が起こっていると考えられた。そのほかの細胞では、遺伝子増幅によって高濃度の MTX に対して耐性を獲得するものだけではなく、MTX の膜透過性変異や単位コピー当たりの DHFR 活性が上昇していることが明らかとなった。

第4章では、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定するために、CHIAS III を用いて実験を行った。CHIAS III を用いて、CHO DG44 株の標準的な核型を作成した結果、CHO DG44 株は、20 本の染色体を有していることがわかった。この標準的な核型を用いて、増幅遺伝子の染色体上における位置を同定した結果、増幅遺伝子が特定の染色体のテロメア近傍に組み込まれていることを明らかにした。

本研究では、Chinese hamster ovary 細胞を宿主細胞として、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子増幅現象を定量的に解析し、遺伝子組換えタンパク質生産に適した遺伝子増幅細胞の効率的構築法及び、選択法について検討を行った。その結果、遺伝子増幅現象を定量的に解析することで、生産性が高く、生産性も安定している細胞株の特徴を見いだすことができた。さらにこの知見を利用して、一度に大量の細胞に対して選択が行える細胞選択法を開発することを試み、フローサイトメータを用いて効率的に、多くのテロメア近傍に増幅遺伝子が存在する細胞を、選択できる方法を提案した。このことから、今後のゲノム情報の公開から有用生理活性物質を医薬品として生産するに当たって、効率的に生産性の高い多数の細胞に対して選択を行うことが可能となると考えられた。さらに、本研究で用いた増幅遺伝子産物の蛍光標識した阻害剤を使用した定量化と、蛍光強度の違いに基づく選択法は、他の遺伝子増幅系における細胞選択時にも利用可能な方法であると考えられる。また、これまで行われてきた GFP 融合タンパク質を指標に細胞選択を行う方法に比べ、増幅遺伝子産物を特別な操作を必要と

しないで直接定量できることは、融合タンパク質形成によるタンパク質の性質の変化などを回避できることから、非常に有用な方法であると思われる。

染色体の特定領域において増幅遺伝子が存在しているという知見は、この特定領域に遺伝子増幅に適した配列の存在が推測され、今後この配列を取得し、その機能を解析することで、遺伝子増幅のメカニズムの解析が可能となり、さらにこの配列を利用した遺伝子増幅細胞構築システムの開発などが期待できる。

参考文献

B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell* Third Edition, Garland Publishing, Inc., NY, 1272 (1995)

M. Al-Rubeai, A. N. Emery and S. Chalder, Flow cytometric study of cultured mammalian cells. *J. Biotechnol.*, **19**, 67-81 (1991)

G. L. Altshuler, D. M. Dziejwski, J. A. Soweck and G. Belfort, Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors-separators. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 646-658 (1986)

B. Anochkova and J. L. Hamlin, Replication in the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells may initiate at two distinct sites, one of which is a repetitive sequence element. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 532-540 (1989)

K. S. Antman, J. D. Griffin, A. Elias, M. A. Socinski, L. Ryan, S. A. Cannistra, D. Oette, M. Whitley, E. Frei and L. E. Schnipper, Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 593-598 (1988)

J. Attal, M. Cajero-Juarez, D. Petitclerc, M. C. Theron, M. G. Stinnakre, M. Bearzotti, G. Kann and Houdebine, The effect of matrix attached regions (MAR) specialized chromatin structure (SCS) on the expression of gene constructs in cultured cells and in transgenic mice. *Mol. Biol. Rep.*, **22**, 37-46 (1995-1996)

A. K. Balin, D. B. Goodman, H. Rasmussen and V. J. Cristofalo, Atmospheric stability in cell culture vessels. *In Vitro*, **12**, 687-692 (1976)

D. Barnes and G. Sato, Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.*, **102**, 255-270 (1980)

C. R. Bebbington, G. Renner, S. Thomson, D. King, D. Abrams and G. T. Yarranton, High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (NY)*, **10**, 169-175 (1992)

M. M. Bendig, The production of foreign proteins in mammalian cells. *Genet. Eng.*, **7**, 91-127 (1988)

M. L. Benuck, Z. Li and G. Childs, Mutations that increase acidity enhance the transcriptional activity of the glutamine-rich activation domain in stage-specific activator protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25419-25425 (1999)

J. R. Birch, R. Boraston and L. Wood, Bulk production of monoclonal antibodies in fermenters. *Trends Biotechnol.*, **3**, 162-166 (1985)

B. T. Brinton and N. H. Heintz, Plasmid amplification-promoting sequence from the origin region of Chinese hamster dihydrofolate reductase gene do not promote position-independent chromosomal gene amplification. *Chromosoma*, **104**, 143-151 (1995)

P. M. Castro, P. M. Hayter, A. P. Ison and A. T. Bull, Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 84-90 (1992)

P. M. Castro, A. P. Ison, P. M. Hayter and A. T. Bull, The macroheterogeneity of recombinant human interferon-gamma produced by Chinese-hamster ovary cells is affected by the protein and lipid content of the culture medium. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **21**, 87-100 (1995)

C. Ceccarini and H. Eagle, pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68**, 229-233 (1971)

P. P. Chan, M. Lin, A. F. Faruqi, J. Powell, M. M. Seidman and P. M. Glazer, Targeted correction of an episomal gene in mammalian cells by a short DNA fragment tethered to a triplex-forming oligonucleotide. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11541-11548 (1999)

A. C. Chang, J. H. Nunberg, R. J. Kaufman, H. A. Erlich, R. T. Schmke and S. N. Cohen, Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase. *Nature*, **275**, 617-624 (1978)

S. Y. Chen, J. Bagley and W. A. Marasco, Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, **5**, 595-601 (1994)

J. Chen, P. Hayes, K. Roy and F. M. Sirotnak, Two promoters regulate transcription of the mouse folylpolyglutamate synthetase gene three tightly clustered Sp1 sites within the first intron markedly enhance activity of promoter B. *Gene*, **242**, 257-264 (2000)

W. F. Daniels, D. A. Parker, R. W. Johnson and L. E. Schneider, Controlled pH and oxidation-reduction potential with a new glass tissue-culture fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 529-553 (1965)

P. A. Dijkwel and J. L. Hamlin, Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5398-5409 (1988)

R. Dulbecco and G. Freeman, Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, **8**, 396-397 (1959)

H. Eagle, Amino acid metabolism in mammalian cell culture. *Science*, **130**, 432-437 (1959)

P. J. Farrell, N. Kalogerakis and L. A. Behie, Effect of endogenous proteins on growth and antibody productivity in hybridoma batch cultures. *Cytotechnology*, **15**, 95-102 (1994)

A. F. Faruqi, S. H. Krawczyk, M. D. Matteucci and P. M. Glazer, Potassium-resistant triple helix formation and improved intracellular gene targeting by oligodeoxyribonucleotides containing 7-deazaxanthine. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 633-640 (1997)

W. Fiers, R. Coutreras, G. Haegemann, R. Rogiers, A. Van de Voorde, H. Van Heuverswyn, J. Van Herreweghe, G. Volckaert and M. Ysebaert, Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature*, **273**, 113-120 (1978)

B. Föhling, S. T. Tjia, W. M. Zenke, G. Sauer and W. Doerfler, Propagation of mammalian cells and of virus in a self-regulating fermentor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **164**, 222-228 (1980)

D. W. Fry and R. C. Jackson, Biological and biochemical properties of new anticancer folate antagonists. *Cancer Metastasis Rev.*, **5**, 251-270 (1987)

K. Fukui, K. Sadamoto, S. Ohue, S. Takeda, H. Kimura and S. Sakaki, A case of chronic subdural hematoma associated with an unruptured cerebral aneurysm detected by cerebral computed angiography. *No Shinkei Geka*, **14**, 1397-1401 (1986)

V. Ganne and G. Mignot, Application of statistical design of experiments to the optimization of factor VIII expression by CHO cells. *Cytotechnology*, **6**, 233-240 (1991)

D. J. Giard and R. J. Fleischaker, Examination of parameters affecting human interferon production with microcarrier-grown fibroblast cells. *Antimicrob. Agent Chemother.*, **18**, 130-136 (1980)

D. J. Giard, D. H. Loeb, W. G. Thilly, D. I. C. Wang and D. W. Levine, Human interferon production with diploid fibroblast cells grown on microcarriers. *Biotech. Bioeng.*, **21**, 433-442 (1979)

D. J. Giard, W. G. Thilly, D. I. C. Wang and D. W. Levine, Virus production with a newly developed microcarrier system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 668-672 (1977)

R. J. Gibbons, T. L. McDowell, S. Raman, D. M. O'Rourke, D. Garrick, H. Ayyub and D. R. Higgs, Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat. Genet.*, **24**, 368-371 (2000)

A. Gillissen, M. Jaworska, M. Orth, M. Coffiner, P. Maes, E. M. App, A. M. Cantin and G. Schultze-Werninghaus, Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respir. Med.*, **91**, 159-168 (1997)

M. Goto, K. Akai, A. Murakami, C. Hashimoto, E. Tsuda, M. Ueda, G. Kawamishi, N. Takahashi, A. Ishimoto, H. Chiba and R. Sasaki, Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: Host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology*, **6**, 67-71 (1988)

J. G. Gribben, S. Devereux, N. S. B. Thomas, M. Keim, H. M. Jones, A. H. Goldstone and D. C. Linch, Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet*, **335**, 434-437 (1990)

B. J. Groves and P. A. Riley, A miniaturized parallel-plate shearing apparatus for the measurement of cell adhesion. *Cytobios.*, **52**, 49-62 (1987)

D. A. Haber, S. M. Beverley, M. L. Kiely and R. T. Schimke, Properties of an altered dihydrofolate reductase encoded by amplified genes in cultured mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9501-9510 (1981)

R. G. Ham, An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exptl. Cell Res.*, **29**, 515-526 (1963)

R. G. Ham, Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 288-293 (1965)

J. L. Hamlin, T. H. Leu, J. P. Vaughn, C. Ma and P. A. Dijkwel, Amplification of DNA sequences in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **41**, 203-239 (1991)

P. Himmelfarb, P. S. Thayer and H. E. Martin, Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension. *Science*, **164**, 555-557 (1969)

S. Iijima, T. Mano, M. Taniguchi and T. Kobayashi, Immobilization of hybridoma cells with alginate and urethane polymer and improved monoclonal antibody production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 572-576 (1988)

N. N. Iscove and F. Melchers, Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **147**, 923-933 (1978)

A. Ishaque and M. Al-Rubeai, Use of intracellular pH and annexin-V flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by bcl-2 over-expression in hybridoma cell culture. *J. Immunol. Methods*, **221**, 43-57 (1998)

L. Jeannotte, J. C. Ruiz and E. J. Robertson, Low level of Hox1.3 gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 5578-5585 (1991)

M. Kamihira, J. Wang, M. Hata, S. Iijima and T. Kobayashi, Immobilization of animal cells using photo-crosslinkable resin. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 138-144 (1993)

S. Kato and K. Fukui, Condensation pattern (CP) analysis of plant chromosomes by an improved chromosome image analysis system, CHIAS III. *Chromosome Res.*, **6**, 473-479 (1998)

R. J. Kaufman, *A Comprehensive Guide*. In: Kellems RE, ed.; New York: Marcel Dekker. 315-343 (1993)

R. J. Kaufman, J. R. Bertino and R. T. Schimke, Quantitation of dihydrofolate reductase in individual parental and methotrexate-resistant murine cells. Use of a fluorescence activated cell sorter. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5852-5860 (1978)

R. J. Kaufman, P. A. Sharp and S. A. Latt, Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 699-711 (1983)

R. J. Kaufman, L. C. Wasley, A. J. Spiliotes, S. D. Gossels, S. A. Latt, G. R. Larsen and R. M. Kay, Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1750-1759 (1985)

R. J. Kaufman, L. C. Wasley, A. J. Spiliotes, S. D. Gossels, S. A. Latt, G. R. Larsen and R. K. Zwerner, R. M. Cox, J. D. Lynn and R. T. Acton, Five-year perspective of the large-scale growth of mammalian cells in suspension culture. *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2717 (1981)

H. Kaufmann, X. Mazur, M. Fussenegger and J. E. Bailey, Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 573-582 (1999)

K. Kaushansky, P. J. O'Hara, C. E. Hart, J. W. Forstrom and F. S. Hagen, Role of carbohydrate in the function of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biochemistry*, **26**, 4861-4867 (1987)

R. E. Kellems, Gene amplification in mammalian cells: strategies for protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2**, 723-729 (1991)

E. J. Kim, N. S. Kim and G. M. Lee, Development of a serum-free medium for the production of humanized antibody from Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **34**, 757-761 (1998)

E. J. Kim, N. S. Kim and G. M. Lee, Development of a serum-free medium for dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **35**, 178-182 (1999)

T. Kimura, H. Kurosawa, H. Goto, S. Kora, Y. Ogata and Y. Amano, Oxygen carrying capacity and oxygen supply rate of artificial oxygen carrier, Neo Red Cell (NRC). *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **26**, 455-464 (1998)

D. G. Kilburn and F. C. Webb, The cultivation of animal cells at controlled dissolved oxygen partial pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 801-814 (1968)

F. Klein and R. T. Ricketts, Procedures for large-scale production and concentration of lymphoblastoid interferon. *Methods Enzymol.*, **78**, 75-83 (1981)

T. Kozu, B. Henrich and K. P. Schafer, Structure and expression of the gene (HNRPA2B1) encoding the human hnRNP protein A2/B1. *Genomics*, **25**, 365-371 (1995)

M. T. Kuo, R. C. Vyas, L. X. Jiang and W. N. Hittelman, Chromosome breakage at a major fragile site associated with P-glycoprotein gene amplification in multidrug-resistant CHO cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5202-5211 (1994)

L. Lacroix, J. Lacoste, J. F. Reddoch, J. L. Mergny, D. D. Levy, M. M. Matteucci and P. M. Glazer, Triplex formation by oligonucleotides containing 5-(1-propynyl)-2'-deoxyuridine: decreased magnesium dependence and improved intracellular gene targeting. *Biochemistry*, **38**, 1893-1901 (1999)

L. W. Lai and Y. H. Lien, Homologous recombination based gene therapy. *Exp. Nephrol.*, **7**, 11-14 (1999)

G. M. Lee, E. J. Kim, N. S. Kim, S. K. Yoon, Y. H. Ahn and J. Y. Song, Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *J. Biotechnol.*, **15**, 85-93 (1999)

T. H. Leu and J. L. Hamlin, Activation of a mammalian origin of replication by chromosomal rearrangement. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2804-2812 (1992)

F. Lim and A. M. Sun, Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, **210**, 908-910 (1980)

F-K. Lin, S. Suggs, C-H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S. M. Badrawi, P-H. Lai and E. Goldwasser, Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580-7584 (1985)

J. E. Looney, C. Ma, T. H. Leu, W. F. Flintoff, W. B. Troutman and J. L. Hamlin, The dihydrofolate reductase amplicons in different methotrexate-resistant Chinese hamster cell lines share at least a 273-kilobase core sequence, but the amplicons in some cell lines are much larger and are remarkably uniform in structure. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5268-5279 (1988)

A. G. Mannsfeldt, P. Carroll, C. L. Stucky and G. R. Lewin, Stomatin, a MEC-2 like protein, is expressed by mammalian sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, **13**, 391-404 (1999)

M. C. Mass, The effects of mandibular hypofunction on the development of the mandibular disc in the rabbit. *Arch Oral Biol.*, **39**, 1-11 (1994)

S. Masuda, S. K. Moon, T. Kambe, M. Nagao and R. Sasaki, A new biological strategy for high productivity of recombinant proteins in animal cells by the use of hypoxia-response enhancer. *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 157-164 (2000)

M. R. Melamed, Flow cytometry for detection and evaluations of urinary bladder carcinoma. *Semin. Surg. Oncol.*, **8**, 300-307 (1992)

Y. G. Meng and T. Wong, Transfection of murin myeloma cells to produce a chimeric antibody to the interleukin-2 receptor. *Gene*, **148**, 337-342 (1994)

W. M. Miller, C. R. Wilke and H. W. Blanch, Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J. Cell. Physiol.*, **132**, 524-530 (1987)

D. T. Moir and J. I. Mao, Protein secretion systems in microbial and mammalian cells. *Bioprocess Technol.*, **9**, 67-94 (1990)

L. M. Montuenga, J. Zhou, I. Avis, M. Vos, A. Martinez, F. Cuttitta, A. M. Treston, M. Sunday and J. L. Mulshine, Expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 changes with critical stages of mammalian lung development. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **19**, 554-562 (1998)

P. Moonen, J. J. Mermod, J. F. Ernst, M. Hirschi and J. F. Delamarier, Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4428-4431 (1987)

G. E. Moore, R. E. Gerner and H. A. Franklin, Culture of normal human leukocytes. *J. Amer. Med. Assoc.*, **199**, 519-524 (1967)

J. F. Morgan, H. J. Morton and R. C. Parker, Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 1-8 (1950)

H. Murakami, What should be focused in the study of cell culture technology for production of bioactive proteins. *Cytotechnology*, **3**, 3-7 (1990)

K. Nilsson and K. Mosbach, Preparation of immobilized animal cells. *FEBS Lett.*, **118**, 145-150 (1980)

K. Nilsson, W. Scheirer, O. W. Merten, L. Östberg, E. Liehl, H. W. D. Katinger and K. Mosbach, Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules. *Nature*, **302**, 629-630 (1983)

J. H. Nunberg, R. J. Kaufman, A. C. Chan, S. N. Cohen and R. T. Schimke, Structure and genomic organization of the mouse dihydrofolate reductase gene. *Cell*, **19**, 355-364 (1980)

H. Okayama and P. Berg, High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170 (1982)

H. Okayama and P. Berg, A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 280-289 (1983)

T. Omasa, K. Higashiyama, S. Shioya and K. Suga, The enhancement of specific antibody production rate in glucose- and glutamine-controlled fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 556-564 (1992)

T. Omasa, M. Kobayashi, T. Nishikawa, S. Shioya, K. Suga, S. Uemura, Y. Kitani and Y. Imamura, Enhancement of antibody production by growth factor addition in perfusion and hollow-fiber culture systems. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 673-680 (1995)

M. G. Pallavicini, P. S. DeTeresa, C. Rosette, J. W. Gray and F. M. Wurm, Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 401-404 (1990)

D. P. Palermo, M. E. DeGraaf, K. R. Marotti, E. Rehberg and L. E. Post, Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J. Biotechnol.*, **19**, 35-47 (1991)

H. Pu, L. M. Cashion, P. J. Kretschmer and Z. Liu, Rapid establishment of high-producing cell line using dicistronic vectors with glutamine synthetase as the selection marker. *Mol. Biotechnol.*, **10**, 17-25 (1998)

P. J. Radlett, The use of BHK suspension cells for the production of foot and mouth disease vaccines. *Adv. Biochem. Eng., Biotechnol.*, **34**, 129-146 (1987)

H. Rath, T. Tlsty and R. T. Schimke, Rapid emergence of methotrexate resistance in cultured mouse cells. *Cancer Res.*, **44**, 3303-3306 (1984)

V. B. Reddy, B. Thimmappaya, R. Dhar, K. N. Subramanian, B. S. Zain, J. Pan, P. K. Ghosh, M. L. Celma and S. M. Weissman, The genome of simian virus 40. *Science*, **200**, 494-502 (1978)

P. Rouet, F. Smith and M. Jasin, Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6064-6068 (1994)

J. C. Ruiz and G. M. Wahl, Chromosomal destabilization during gene amplification. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3056-3066 (1990)

R. T. Schimke, *Gene Amplification*; Cold Spring Harbor Symposium (1982)

R. T. Schimke, Gene amplification in cultured animal cells. *Cell*, **37**, 705-713 (1984)

B. Schwartz, P. Vicart, C. Delouis and D. Paulin, Mammalian cell lines can be efficiently established in vitro upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. *Biol. Cell*, **73**, 7-14 (1991)

D. B. Seifert and J. A. Phillips, The production of monoclonal antibody in growth-arrested hybridomas cultivated in suspension and immobilized modes. *Biotechnol. Prog.*, **15**, 655-666 (1999)

D. R. Setzer, M. McGrogan and R. T. Schimke, Nucleotide sequence surrounding multiple polyadenylation sites in the mouse dihydrofolate reductase gene. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5143-5147 (1982)

B. Q. Shen, P. F. Greenfield and S. Reid, Hybridoma cells in a protein-free medium within a composite gel perfusion bioreactor. *Cytotechnology*, **16**, 51-58 (1994)

Y. Shirai, K. Hashimoto, H. Yamaji and M. Tokashiki, Continuous production of monoclonal antibody with immobilized hybridoma cells in an expanded bed fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 495-499 (1987)

Y. Shirai, R. Sasaki, K. Hashimoto, H. Kawahara, K. Hitomi and H. Chiba, Continuous production of erythropoietin with immobilized animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 544-549 (1988)

F. A. Shotkoski and A. M. Fallon, An amplified mosquito dihydrofolate reductase gene: amplicon size and chromosomal distribution. *Insect Mol. Biol.*, **2**, 155-161 (1993)

C. Somasundaram, H. Takamatsu, C. Andreoni, J. C. Audonnet, L. Fischer, F. Lefevre and B. Charley, Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **70**, 277-288 (1999)

P. J. Southern and P. Berg, Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 327-341 (1982)

G. R. Stark, Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv. Cancer Res.*, **61**, 87-113 (1993)

F. Stolzenburg, R. Gerwig, E. Dinkl and F. Grummt, Structural homologies and functional similarities between mammalian origins of replication and amplification promoting sequences. *Chromosoma*, **103**, 209-214 (1994)

S. Subramani, R. Mulligan and P. Berg, Expression of the mouse dihydrofolate reductase complementary deoxyribonucleic acid in simian virus 40 vectors. *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 854-864 (1981)

K. Takahashi, S. Terada, H. Ueda, F. Makishita and E. Suzuki, Growth suppression of cultured mammalian cells enhances protein productivity. *Cytotechnology*, **15**, 57-64 (1994)

W. R. Tolbert and J. Feder, The large-scale cultivation of mammalian cells. *Sci. Am.*, **248**, 36-43 (1983)

Y. G. Assaraf and R. T. Schimke, Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7154-7158 (1987)

G. Urlaub and L. A. Chasin, Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4216-4220 (1980)

G. M. Wahl, The importance of circular DNA in mammalian gene amplification. *Cancer Res.*, **49**, 1333-1340 (1989)

T. G. Warner, Enhancing therapeutic glycoprotein production in Chinese hamster ovary cells by metabolic engineering endogenous gene control with antisense DNA and gene targeting. *Glycobiology*, **9**, 841-850 (1999)

C. J. Watson and R. T. Hay, Expression of adenovirus type 2 DNA polymerase in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1167-1173 (1990)

v. a. n. Wezel A. L., Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature*, **216**, 64-65 (1967)

U. H. Weidle, P. Buckel and J. Wienberg, Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene*, **66**, 193-203 (1988)

R. G. Werner and W. Noe, Mammalian cell cultures. Part II: Genetic engineering, protein glycosylation, fermentation and process control. *Arzneimittelforschung*, **43**, 1242-1249 (1993)

D. Wernicke and H. Will, Generation of recombinant CHO (*dhfr*⁻) cell lines by single selection for *dhfr*⁺ transformants. *Anal. Biochem.*, **203**, 146-150 (1992)

B. E. Windle and G. M. Wahl, A branching process model of gene amplification following chromosome breakage. *Mutat. Res.*, **276**, 199-224 (1992)

I. Yamane, O. Murakami and M. Kato, Role of bovine albumin in a serum-free suspension cell culture medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **149**, 439-442 (1975)

S. T. Zeigler, J. D. Kerby, D. T. Curiel, A. G. Diethelm and J. A. Thompson, Molecular conjugate-mediated gene transfer into isolated human kidneys. *Transplantation*, **61**, 812-817 (1996)

Y. Zhang, Y. Katakura, H. Ohashi and S. Shirahata, An autocatalytic expression system for regulated production of recombinant protein in mammalian cells. *Anal. Biochem.*, **252**, 286-292 (1997)

石田 功, 遺伝子発現マニュアル, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1994)

伊丹 清馬, 大阪大学修士論文 (1997)

伊藤 文人, 大阪大学卒業論文 (1994)

岩崎 辰夫, 安東 民衛, 市川 かおる, 保井 孝太郎, 単クローン抗体 ハイブリドーマとELISA, 講談社, 東京 (1983)

小田 鈞一郎, 鮎沢 大, 西川 義尚, 佐藤 征二, 江藤 譲, 柴井 博四郎, 北野一昭, 野口 忠, 木村 元喜, 吉田 稔, 別府 輝彦, 細胞工学別冊 4: 物質生産の素材としての動物細胞, 日本農芸化学会編, 秀潤社 (1988)

片倉 喜範, バイオサイエンスとインダストリー, 53, 687-692 (1995)

- 亀岡 大輔, 大阪大学修士論文 (1995)
- 河本 圭司, 赤木 清, フローサイトメリー入門, 医学書院, 東京 (1994)
- 貴島 静正, 続・新薬の話, 裳華房, 東京 (1996)
- 小林 茂保, BIO INDUSTRY, 4, 182-188 (1987)
- 佐藤 征二, 川村 一雄, 藤吉 宣男, 組織培養, 9, 286- (1983)
- 鮫島 夏樹, 中島 進, 述川 肇, 病態生理, 7, 403 (1983)
- 高岡 聡子, 組織培養, 9, 196- (1983)
- 高久 史麿, コロニー刺激因子の臨床応用, 蛋白質 核酸 酵素, 36, 1466-1472 (1991)
- 中西 扶実, 大阪大学修士論文 (1999)
- 野上 正弘, 三重大学修士論文 (1996)
- 村上 浩紀, 化学と生物, 24, 34- (1986)
- 村上 浩紀, 菅原 卓也, 細胞工学概論, コロナ社, 東京 (1994)
- 森川 寛, 生命のコンダクター: サイトカイン, 共立出版, 東京 (1993)

関連論文リスト

Papers

T. Yoshikawa, F. Nakanishi, S. Itami, D. Kameoka, T. Omasa, Y. Katakura, M. Kishimoto, and K. Suga, Evaluation of stable and highly productive gene amplified CHO cell line based on the location of amplified genes. *Cytotechnology*, **33**, 37-36, 2000.

T. Yoshikawa, F. Nakanishi, Y. Ogura, D. Oi, T. Omasa, Y. Katakura, M. Kishimoto, and K. Suga, The amplified genes location into chromosomal DNA affected the recombinant protein production and the stability of amplified genes. *Biotechnology Progress*, **16**(5), 2000. (in press)

T. Yoshikawa, F. Nakanishi, Y. Ogura, D. Oi, T. Omasa, Y. Katakura, M. Kishimoto, and K. Suga, Flow-cytometry: A powerful tool for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, (submitted)

特許

大政健史、吉川智啓、片倉啓雄、菅健一
”遺伝子増幅細胞の迅速選択法” 特願平 11-217095号

Proceeding

F. Nakanishi, T. Yoshikawa, S. Itami, T. Omasa, Y. Katakura, M. Kishimoto and K. Suga., Evaluation of stability in the DHFR gene amplification system using fluorescence *in situ* hybridization. K. Nagai and M. Wachi (eds.), *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. **10**: 259-263 (1997).

謝辞

本研究の遂行に当たり、終始御指導、御鞭撻を賜りました、菅 健一教授に心より感謝いたします。さらに、本研究の進行に際し、多大なる御指導を賜りました、岸本通雅助教授、片倉啓雄助手に深く感謝いたします。また、研究の進行に際して絶えず御助言、御指導を賜りました、大政健史助手に深い感謝の意を表します。また、終始御指導、御鞭撻を賜りました、山口大学工学部 応用生物工学科 化学生物工学講座 生物機能応用化学教育研究分野 西澤義矩教授、赤田倫治助教授に深い感謝の意を表します。

本論文の作成に当たり、有益な御指導と御助言を賜りました、室岡義勝教授、原島俊教授、卜部 格教授、福井希一教授、小林昭雄教授、塩谷捨明教授、吉田敏臣教授、関 達治教授、金谷茂則教授、二井將光教授に感謝の意を表します。

CHO DG44 株の分与していただくにあたり、許可を下さった Prof. L. Chasin (Columbia University)、実際に分与して下さった京都大学生体医療工学研究センターの岩田博夫先生ならびに国立循環器病センターの三宅靖子先生に厚くお礼申し上げます。Fluorescence *in situ* hybridization を行うに当たり、実験操作を御指導いただきました、三重大学生物資源学部、奥村克純先生に厚くお礼申し上げます。さらに、画像解析を行うに当たり Chromosome Image Analyzing System III の使用を快諾していただきました、大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻、細胞生理研究室、福井希一教授、さらに、実際に御指導いただきました、曾根岳史先生、伊藤美佳子さんに感謝の意を表します。また、フローサイトメトリによる解析及び、分取に関して御尽力いただきました、微生物病研究所、中村浩治朗先生に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者としてご協力いただきました、伊丹清馬氏、中西扶実さん、小倉有紀さん、大井大輔氏、東 恒仁氏に深く感謝いたします。また、在学中にお世話になりました菅研究室のみなさまに感謝いたします。

最後に、私がこの研究を遂行することが出来たのは、父 吉川 巖、母 雅子、祖母 三上 静枝、妻 智子の今日に至るまでの経済面、精神面での長きにわたる援助によるものであり、兄、雅紀による叱咤激励が大きな支えになったことを書き添え、ここに感謝の意を表します。

