



Title	Development of an efficient gene amplification system by cell cycle checkpoint engineering in Chinese hamster ovary cells
Author(s)	Lee, Kyounggho
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34480
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

〔 題 名 〕

Development of an efficient gene amplification system by cell cycle checkpoint engineering in Chinese hamster ovary cells

(新規遺伝子増幅系を用いた高タンパク質生産細胞の構築)

学位申請者

KYOUNGHO LEE

Dihydrofolate reductase (DHFR)-mediated gene amplification has been widely used to establish high-producing mammalian cell lines. However, since gene amplification is an infrequent event, in that many rounds of methotrexate (MTX) selection to amplify the transgene and screening of over several hundred individual clones are required to obtain cells with high gene copy numbers. Consequently, the process for DHFR-mediated gene amplification remains as a bottleneck during the cell line development. The aim of my research is to establish more efficient gene amplification system for high-producing cell line development.

This thesis consists of five chapters.

Chapter 1 deals with the general introduction of the present study. The importance of CHO cells in the biopharmaceutical industry, mechanisms of gene amplification, and DNA damage responses are described in this chapter.

Chapter 2 deals with a novel method to generate high-producing CHO cells by accelerating transgene amplification. A small interfering RNA (siRNA) expression vector against ATR was transfected into CHO cells, and the influences of ATR downregulation on gene amplification and the productivity were investigated in CHO cells producing green fluorescent protein (GFP) and secreting a monoclonal antibody. The ATR-downregulated cells showed a much faster increase in transgene copy numbers during gene amplification, resulting in higher antibody productivities as compared with the mock cells. The results suggest that high-producing CHO cells could be more rapidly generated by the downregulation of cell cycle checkpoints.

Chapter 3 describes the relationship between cell cycle transition of the arrested cells and gene amplification. In order to confirm the previous results of chapter 2, CDC25A phosphatase which is a target of ATR-mediated DNA damage signaling pathways was overexpressed in CHO cells. The effects of CDC25A overexpression on the cell cycle, transgene copy numbers and antibody productivity were examined using both wild-type and mutated CDC25A-overexpressing CHO cells. CDC25A overexpression resulted in the G2 to M phase transition of arrested cells in the presence of MTX and a rapid increase in transgene copy numbers. In addition, high-producing CHO clones were obtained with high frequency in CDC25A-overexpressing cells. This chapter shows the improvement of a conventional gene amplification system via cell cycle engineering at the early stage of cell line development.

Chapter 4 describes the effects of mutant cell division cycle 25 homolog B (m-CDC25B) overexpression on the generation of cells producing a monoclonal antibody. The m-CDC25B expression plasmids were transfected into CHO DG44-derived cells producing a monoclonal antibody, and the frequency of highly producing cells was assessed following gene amplification in the presence of 250 nM methotrexate (MTX). Most of the clones obtained from the m-CDC25B-overexpressing cells had higher antibody titers than did mocktransfected control cells, which arose from either higher transgene copy numbers or higher mRNA expression levels for the antibody. This chapter shows that the m-CDC25B overexpression could contribute to the efficient selection of highly producing CHO cells.

Chapter 5 deals with the conclusions of this thesis. Models to summarize the results in the chapter 2, 3 and 4 are proposed in this chapter.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (李 京 浩 Kyounggho Lee)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	大竹 久夫
	副 査	教 授	原島 俊
	副 査	教 授	福井 希一
	副 査	招へい教授	大政 健史

論文審査の結果の要旨

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO 細胞)は、バイオ医薬品の生産宿主として最も汎用されている宿主細胞である。CHO 細胞の生産性向上に汎用されている手法は遺伝子増幅法と呼ばれ、本手法を用いると外来導入遺伝子のゲノム中の数を飛躍的に増加させることが可能となる。一方、本手法は数ヶ月にわたる長い時間と労力を要する手法であり、その効率化が求められている。本論文では、遺伝子増幅を加速する新規の手法として細胞周期制御に着目した細胞周期チェックポイントエンジニアリングという概念を提唱し、実証している。

第 1 章 序論

ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を用いた遺伝子増幅手法は高生産性 CHO 細胞構築法として最もよく用いられている手法である。本章では、この DHFR 遺伝子増幅手法に焦点をあてて、遺伝子増幅誘発剤であるメトトリキセート(MTX)による選択手法の現状、問題点、ならびに、本論文にて提案する手法の原理となる、遺伝子増幅における細胞周期制御の果たす役割について概説し、本論文の目的を述べている。

第 2 章 細胞周期チェックポイントエンジニアリングによる外来遺伝子増幅 CHO 細胞構築法

本章では、まずは細胞周期チェックポイントキナーゼの一種である Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related (ATR) に対する siRNA 発現ベクターを構築し、細胞にトランスフェクションすることにより、ATR 発現を抑制した細胞を作成している。構築した宿主細胞を用いて緑色蛍光蛋白質または単クローン抗体を生産する細胞を遺伝子増幅法を用いて構築したところ、GFP 生産細胞構築においては 6 倍、抗体生産細胞においては 4 倍の比生産速度を持つ細胞が構築可能となり、ATR 発現抑制により、生産性が向上できることを確認している。

第 3 章 Cell division cycle(Cdc) 25 ホモログ過剰発現による高生産 CHO 細胞構築

本章では、ATR の下流に位置する CDC25 フォスファターゼを対象として、生産性向上を試みている。Cdc25 ホモログ A (Cdc25A) を CHO 細胞より単離同定し Cdc25A の過剰発現が細胞構築に及ぼす影響を検証している。その結果、Cdc25A ならびに変異 Cdc25A の過剰発現により、高効率に生産細胞が構築可能となり、250nM MTX 存在下において選択したクローンにおいてはその比生産速度が 2.9 倍に向上し、本手法が遺伝子増幅の効率化に有効であることを示している。

第 4 章 変異 Cell division cycle(Cdc) 25 ホモログ B の過剰発現による CHO 細胞選択法

本章では、CdcA とは機能の異なる Cdc である Cdc25B に着目し、変異 Cdc25B の過剰発現による高生産 CHO 細胞構築法について検討している。変異 Cdc25B の過剰発現の後、遺伝子増幅を経ることにより、変異 Cdc25B の過剰発現においても Cdc25A と同様に高効率に生産細胞が構築可能となり、本手法が一般的に高生産株構築に利用可能なことを示している。

第 5 章 総括

本章では、バイオ医薬品生産における現状を総括するとともに、本論文において構築された概念である細胞周期チェックポイントエンジニアリングならびに、本構築手法の結果について総括し、CHO 細胞を用いたバイオ医薬品生産系構築における本研究の位置づけについて述べている。

以上のように、本論文はバイオ医薬品生産における主要なボトルネックである生産細胞構築に焦点をあて、新たな手法である細胞周期チェックポイントエンジニアリングという概念を提唱し、実証したものであり、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。