



Title	Control of apoptosis for tPA production by CHO cells in a serum-free medium
Author(s)	雲, 戦友
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44324
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏 名	雲 戦 友
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 8 9 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Control of apoptosis for tPA production by CHO cells in a serum-free medium (CHO 細胞の無血清培養による血栓溶解剤生産におけるアポトーシスの制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 田 敏 臣 (副査) 教 授 塩 谷 捨 明 教 授 小 林 昭 雄 教 授 金 谷 茂 則 教 授 室 岡 義 勝 教 授 卜 部 格 教 授 原 島 俊

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、CHO 細胞無血清培養による血栓溶解剤 (tPA) 生産のためのアポトーシス (細胞死) 制御法を研究した。アポトーシスの主原因物質のひとつである細胞内活性酸素分子種 (ROS) に注目し、還元剤添加およびグルコース代謝促進による ROS 除去、キレート剤添加による ROS 生成阻止を効果的に組合せるアポトーシス制御法を提案し、血栓溶解剤生産量を増大することにも成功した。本論文は第 1 章、第 2 章、第 3 章、第 4 章及び第 5 章から構成されている。

第 1 章ではアポトーシスについて概論するとともに、本論文の目的と意義について述べた。即ち、動物細胞による医薬品タンパク質の生産には、無血清培養におけるアポトーシスの制御が必須である。そこで、アポトーシスの主原因物質のひとつである ROS の細胞内レベルを低く維持することによるアポトーシス制御基本政策を考案した。

第 2 章では、還元剤であるグルタチオン (GSH) やアスコルビン酸 2 リン酸 (VCP) を無血清培養に初発添加することにより、ミトコンドリア膜ポテンシャルを高く維持し、アポトーシスを抑えることにより、tPA 生産量を増大できることを示した。

第 3 章では、還元剤 GSH およびキレート剤の初発添加のそれぞれが細胞内 ROS レベルおよびアポトーシスに与える影響について調べるとともに両者の同時添加の効果についても検討した。金属イオンを介した ROS 生成反応をキレート剤添加により抑えることができると考えその効果を確認した。その結果、aurintricarboxylic acid (ATA)、desferrioxamine (DFO) の両キレート剤添加に細胞内 ROS レベルおよびアポトーシス低減化効果が認められた。また、還元剤 GSH とキレート剤がそれぞれ ROS 除去、ROS 生成阻止と異なった作用により ROS レベルを下げるため、還元剤 GSH とキレート剤 (ATA または DFO) の同時初発添加は各単独添加に比べてより効果的に ROS レベルおよびアポトーシスを低減化できることを明らかにした。

第 4 章では、インシュリンの逐次添加によるグルコース代謝促進、ROS レベル抑制を通じたアポトーシスの動的制御法について述べた。第 2 章と第 3 章で VCP と ATA が ROS レベル抑制とともにグルコース消費を促進したことから、グルコース消費が促進されることで ROS が抑制されると考えた。そこで、GSH、ATA 初発添加培養にインシュ

リンを添加した結果、グルコース消費が促進されるとともに、ROS レベル、アポトーシスがさらに低減化された。またインシュリンが培地中の GSH に還元される速度を考慮し 0 および 24 h にインシュリンを逐次添加した結果、アポトーシスをさらに抑え、tPA 生産を最大にできた。

第 5 章では、以上の結果に基づき、CHO 細胞無血清培養において還元剤 GSH とキレート剤を初発添加するとともにインシュリンを逐次添加するアポトーシス制御法を提案した。

論文審査の結果の要旨

動物細胞培養は医薬品の生産手段として極めて重要であるが、生産物である医薬品の品質確保のために無血清培地の使用が必須であり、これに起因する細胞死が実用上大きな問題になっている。これに対して本論文では、

- (1) 還元剤添加により無血清培養中の細胞のミトコンドリア膜ポテンシャルを高く維持し、細胞死の大半を占めるアポトーシスを抑えてタンパク質生産性を向上できることを実験的に示している。
- (2) 還元剤とは作用の異なるキレート剤でも細胞死低減化が可能であり、さらに両者を併用することにより効果的に細胞死を抑えることを実証した。また、両者は細胞内の活性酸素種を減少させることにより細胞死を抑えていることを示した。
- (3) 培養期間中においても随意に活性酸素種の量を制御する方法としてインシュリンの逐次添加による糖代謝速度制御を提案し、この細胞死制御政策の有効性を実証した。

細胞死を随意に制御する技術は産業的に有用であるが、本論文は上述のように添加物による動的な細胞死制御政策を提案し、さらにこれを実験によって実証している。本研究の成果は、今後の医薬品生産を目的とした動物細胞培養の制御法開発に寄与するところが大きい。よって本論文は、細胞培養工学の分野で顕著な貢献をするものであり博士論文として価値あるものと認める。