

氏名（本籍）	佐々木 哲二（茨城県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 6655 号
学位授与年月	平成 25 年 4 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	バイオ医薬品生産のための無蛋白質、無脂質馴化細胞株の樹立

主査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田 修
副査	筑波大学教授	博士（医学）	中村 幸夫
副査	筑波大学講師	博士（医学）	河合 弘二
副査	筑波大学講師	博士（医学）	小林 麻己人

論文の内容の要旨

（目的）

遺伝子組換え蛋白製剤の安全性においては、従来の方法では多くの問題点が存在する。特に既存の CHO 細胞を用いた遺伝子組換え蛋白製剤の産生においては、他動物種由来物質が混入することから、安全であるとは言えない。本研究において、著者は安全でかつ低コスト生産可能な無蛋白質、無脂質培地を開発し、CHO 細胞を馴化させることにより細胞株の樹立とその性状について検討を行なった。

（対象と方法）

著者は CHO-K1 細胞を用い、以下の方法により解析を行った。

① 培地馴化法による馴化細胞株の樹立

培地から血清濃度を順次低減し、無蛋白質、無脂質培地に移行させることで無蛋白質、無脂質培地に馴化した株を樹立した。

② 馴化細胞株の ECM 固定培養表面に対する接着性の検討

浮遊性の馴化細胞株をフィブロネクチン、I 型コラーゲン及びアルブミンコートウエルで培養し、付着性による形態変化を解析した。

③ 馴化細胞株の可逆性の検討

馴化細胞株を血清添加培地に戻し継代培養を行い、継代毎の形態変化を解析した。次いで、継代培養後に接着形態に移行した細胞の増殖率を計測し、元株の細胞増殖率と比較した。

④ 抗 EGF 中和抗体のインスリン依存的増殖の抑制

無蛋白質、無脂質培地に抗 EGF 中和抗体の添加群と未添加群に分け、各々の群にインスリンを加え馴化細胞株を培養し細胞数を計測した。次いで、インスリンを加えた無蛋白質、無脂質培地で培養した馴化細胞株と血清添加培地の元株の CHO 細胞との増殖率を比較した。

⑤ ガングリオシド GM3 による馴化細胞株の増殖に与える影響

インスリンを加えた無蛋白質、無脂質培地に GM3 を加えて馴化細胞株を培養し、細胞を計測した。次いで、無蛋白質、無脂質培地にインスリンと GM3 を加えた無蛋白質、無脂質培地で培養した馴化細胞株と血清添加培地の元株の CHO 細胞との増殖率を比較した。

⑥ 馴化細胞株による遺伝子組換え蛋白質の発現効率の検討

元株の CHO 細胞、馴化細胞株及び GM3 を加えて培養した馴化株にトランジェント法を用いて分泌型ルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションし、分泌型ルシフェラーゼの発現を指標に比較検討した。

(結果)

著者は、無蛋白質、無脂質培地に馴化した細胞株 2 株を樹立した。馴化細胞株は何れも元株の細胞に比べ増殖速度は遅く、馴化細胞株は接着細胞から浮遊細胞へと形態が変化することを明らかにした。

また、著者は培地に血清を添加し元の培養条件に戻し細胞の形態と増殖を検討した。その結果、馴化細胞株は元株の CHO 細胞と同様の接着形態及び細胞増殖速度に戻ることが分かった。

馴化細胞株はインスリンを加えることで増殖速度を向上させることが可能であったが、抗 EGF 中和抗体で内在性の EGF の受容体への結合を抑制するとインスリンの有無にかかわらず増殖が抑制されることを見出した。さらに脂質ラフト形成に重要な GM3 の馴化細胞株の増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、GM3 を添加すると濃度依存的に細胞増殖率に改善が見られ、元株の CHO 細胞と同様の増殖率が得られることが分かった。

最後に著者は GM3 添加/非添加した馴化細胞株及び元株の CHO 細胞にトランジェント法で分泌型ルシフェラーゼ蛋白質の遺伝子を導入し検討を行なった。GM3 を添加した馴化細胞株では元株の CHO 細胞と同等のルシフェラーゼ蛋白質の発現を見出し、GM3 非添加では元株に対して3倍以上のルシフェラーゼ蛋白質が発現することを明らかにした。

(考察)

本研究で樹立した馴化細胞株は、タンク培養による大量生産が可能な浮遊形態を有しているが、元株の CHO 細胞に対して増殖性が劣るため、筆者は増殖能を活性化させる検討を行なった。馴化細胞株は、インスリン、EGF、および GM3 を添加することにより増殖能が促進することが明らかとなった。加えて、馴化細胞株の性能について、GM3 を加えることでより元株の CHO 細胞と同程度のルシフェラーゼ蛋白質を産生することが分かった。以上の結果は、より安全な遺伝子組換え蛋白質製剤産生に、馴化細胞株を用いる可能性を強く示唆するものである。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、より安全性の高い蛋白質製剤産生の可能性を大きく前進させるものであり、実現性に向けた研究内容は高く評価できる。

平成 25 年 3 月 4 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明

を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。