

博士論文を要約したもの

博士論文題目 CHO 細胞の増殖性に寄与する分岐鎖アミノ酸代謝特性の解明
Elucidation of branched-chain amino acid metabolic characteristics contributing to proliferative property of CHO cells

氏 名 中澤祐人

(要約)

抗体をはじめとするバイオ医薬品の生産において、適切な糖鎖修飾能や大規模製造法の実績などの観点から、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞が宿主細胞として広く利用されている。この CHO 細胞には様々な派生株が存在するが、それらは全て 1950 年代に樹立された細胞を起源としている。一方、新たに Chinese hamster から採取した卵巣から、初代培養を経て、不死化、無血清馴化、浮遊化によって、由来の異なる新規 CHO 細胞が樹立された。この新規 CHO 細胞は既存の CHO 細胞と比較して、倍加時間が短く最高細胞密度が高いなど、特徴的な増殖特性を有している。しかしながら、その表現型を司る要因は明らかになっておらず、細胞形質の改良や最適な培養制御法の確立においては課題が多く残されている。本研究では、CHO 細胞のトランスクリプトーム解析から、増殖能および代謝能に関わる遺伝子の発現プロファイルを解析し、増殖特性に繋がるメカニズムを解明することを目的とした。

まず、RNA-seq により新規 CHO 細胞の網羅的な遺伝子発現解析を実施した。得られた結果を既存 CHO 細胞のデータベース情報と比較すると、遺伝子発現プロファイルにおいて、既存 CHO 細胞と新規 CHO 細胞の遺伝子の発現の有無は概ね一致していたが、発現量は多くの遺伝子で異なっていた。得られた解析データをさらにエンリッチメント解析したところ、予想に反し、細胞増殖に関するアノテーションは提示されなかった。一方で、新規 CHO 細胞ではミトコンドリアが関係する代謝経路、特に脂肪酸・アミノ酸分解および TCA サイクルなどのエネルギー代謝経路が優位に活性化していることが示唆された。この解析結果は、新規 CHO 細胞のグルコースおよび酸素消費量が既存 CHO 細胞と比較して高いという結果を支持している。さらに上記エネルギー代謝経路周辺の遺伝子発現を比較した結果、既存 CHO 細胞では発現していないが、新規 CHO 細胞で比較的高発現している遺伝子として *GeneX* が見出された。*GeneX* は主に脂肪酸や分岐鎖アミノ酸代謝に関与するタンパク質をコードしており、その欠損はヒトでは脂肪酸代謝異常を引き起こすこと

が報告されているため、CHO 細胞においても培養時の細胞増殖および代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

次に、*GeneX* の発現の有無が CHO 細胞の表現型に与える影響を調べるために、CRISPR/Cas9 システムにより新規 CHO 細胞の *GeneX* のノックアウト (KO) を実施した。この細胞を Fed-batch 培養によって評価した結果、新規 CHO 細胞が示す高い最高細胞密度が KO によって大幅に低下した。さらに、*GeneX*-KO 株の *GeneX* を相補した結果、最高細胞密度は回復した。一方で、*GeneX* の発現の有無によって、新規 CHO 細胞の倍加時間には有意な変化を与えなかった。以上の結果から、*GeneX* の発現は、新規 CHO 細胞が示す高い最高細胞密度の表現型に必須であることが明らかになった。

GeneX の発現の有無により観察された増殖特性変化の原因を解明するため、CHO 細胞の *GeneX* に関連する代謝経路を解析した。分岐鎖アミノ酸代謝に着目すると、KO によってロイシン・イソロイシン・バリンの消費が大きく減少していた。これらの分岐鎖アミノ酸異化経路を分析すると、KO 体でのみロイシン、イソロイシン、バリンそれぞれの異化中間体に由来する Isovaleric acid、2-Methylbutyric acid、Isobutyric acid 全てにおいて顕著な蓄積が観察された。これらの結果から、新規 CHO 細胞では分岐鎖アミノ酸の異化が活発に行われており、その正常な反応には *GeneX* が必須であることが示された。KO 体では *GeneX* を失ったことで異化反応が阻害されるため代謝中間体が蓄積したと考えられた。これらの異化中間体は CHO 細胞の増殖を阻害して最高細胞密度を低下させることが報告されているため、*GeneX* の発現による正常な分岐鎖アミノ酸異化経路の存在が新規 CHO 細胞における高い最高細胞密度に極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、新規 CHO 細胞の高い最高細胞密度には、既存 CHO 細胞では発現していない *GeneX* の発現が必須であることが示された。本研究により *GeneX* が CHO 細胞の分岐鎖アミノ酸異化経路で機能することが、新規 CHO 細胞の特徴的な増殖特性に極めて重要であることを明らかとした。