

# 博士学位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第51号

2023年3月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条の規定による公表を目的とし、令和5年3月19日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第4条第1項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第2項によるもの（いわゆる論文博士）である。

---

---

# 目 次

---

---

## 課程博士

1.	<small>キュウマ</small> 久間 <small>アンナ</small> 杏那	[博士 (物理学)]	1
2.	<small>ミタライ</small> 御手洗 <small>ショウ</small> 彰	[博士 (先端情報学)]	4
3.	<small>ヤマダ</small> 山田 <small>トモヒト</small> 等仁	[博士 (生命科学)]	9
4.	<small>タネムラ</small> 種村 <small>ヒロキ</small> 裕幸	[博士 (生命科学)]	12

氏名（本籍）	種村 裕幸（愛知県）
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	乙生 第2号
学位授与年月日	令和5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
論文題目	Hspa5 プロモーターを用いた新たな抗体安定発現系の構築
論文審査委員	主 査 潮田 亮 准教授
	副 査 板野 直樹 教授
	〃 川根 公樹 准教授

## 論文内容の要旨

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は抗体医薬の製造に広く使用されている。そのCHO細胞における抗体遺伝子の発現には CMV や hEF1 $\alpha$  といった汎用プロモーターが使用されているが、これらのプロモーターは、14日間のフェドバッチ培養の後期（7~10日目以降）において、そのプロモーターからの目的抗体遺伝子の転写量が減少し、結果として抗体の生産効率が低下するという課題があった。本研究では、抗体生産性向上のため、高発現かつ培養後期まで抗体遺伝子の転写量を維持できるプロモーターの開発を目的として、トランスクリプトーム解析を基にした新規高発現プロモーターの探索を試みた。複数の抗体製造培養条件下でのトランスクリプトーム解析によって選抜した発現量が高い遺伝子の候補プロモーター領域をルシフェラーゼによるレポーターアッセイ及び実際の抗体発現量を評価することによってスクリーニングした。培養後期においても発現量が維持していた高発現プロモーターとして Hspa5 プロモーター（Hspa5p）が単離された。さらに、in silico 解析によるプロモーター領域の詳細な解析結果を基にプロモーター長を最適化し、抗体発現量をさらに向上させることに成功した。最適化した Hspa5p の制御下で各種 IgG サブクラス遺伝子を発現させた結果、いずれもフェドバッチ培養後期まで生産性が維持され、コントロールプロモーター（hEF1 $\alpha$ ）下流で発現させた場合と比較して生産性が向上しているこ

とが確認され、抗体医薬品製造用の細胞構築に活用できる汎用プロモーターとして使用できることが明らかとなった。Hspa5 は小胞体ストレスによって発現誘導される分子シャペロンである。そこで小胞体ストレス応答との関係を解析するため、Hspa5p 下流で抗体遺伝子を発現する独立した細胞株の小胞体ストレス関連遺伝子群の培養経時的な発現量を解析した。その結果、これらの遺伝子と抗体生産量及び重合体含量との間に相関があることが示唆された。すなわち、抗体の発現は小胞体ストレスを誘導し、小胞体ストレス関連因子の発現が上昇するのと同様に、小胞体ストレス応答プロモーターである Hspa5p の発現強度が上昇することによって抗体生産量を向上させることが示唆された。これらの結果から、外来タンパク質（抗体）をコードする遺伝子の発現を制御するプロモーターとして Hspa5p を利用することで、CHO 細胞が有する、小胞体におけるタンパク質環境の恒常性（プロテオスタシス）の維持機能に同調した、より安定な抗体産生を実現できることが期待された。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は CHO 細胞における IgG 抗体産生について、抗体産生のための長期培養後半でおこる発現量の低下を克服するために、小胞体の主要な分子シャペロン Hspa5 のプロモーターを利用し、抗体発現量の低下を抑え、培養後期で抗体発現量を増加させることに成功した。

近年、抗体医薬品は、癌細胞特異的に抗がん剤を届けるなど抗がん剤などのドラッグデリバリーシステムにおいて非常に有用な治療法として需要がある。この現状をふまえ、CHO 細胞発現系において抗体の産生を向上させるため、目的遺伝子の発現を制御するプロモーターに着目して、高発現プロモーターのスクリーニングを実施した。トランスクリプトーム解析の結果、CHO 細胞の培養後期において、hspa5 遺伝子が高発現していることを明らかにし、この遺伝子上流領域を用いて、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を評価し、培養後期においても高いプロモーター活性を有していることを示した。また、抗体重鎖および軽鎖遺伝子をプロモーターに連結して抗体生産性を評価し、このプロモーターが抗体産生に適していることを確認した。さらに長さの異なる hspa5 遺伝子上流領域を用いて、抗体生産性を評価し、抗体産生に必要な最小プロモーター領域を特定した。本研究では、更に、hspa5 プロモーターによる高発現化機構について調査し、このプロモーターの高活性と小胞体ストレス応答との関連性について明らかにしている。そして、Hspa5p が抗体産生を向上させる活性が、小胞体ストレス応答を介す可能性を検証するために小胞体ストレス関連遺伝子の発現解析を行った結果、小胞体ストレス応答と抗体生産量に正の相関があることが示唆された。

本研究で申請者は、高い抗体生産性を実現する技術開発として、抗体産生細胞の培養期間を通じて抗体遺伝子の高発現を可能にする新規プロモーターの同定に成功している。そして、抗体医薬品の製造に向けた技術移転の諸課題についても検討を加え、一定の成果を得ている。得られた成果は、いずれも高く評価できるものであり、抗体医薬の生産性向上に資する技術基盤として、

極めて有用であると考えられる。

本研究に関する内容は、国際雑誌「Scientific Reports」に掲載され、主査および副査から構成される博士論文調査委員による論文審査の結果、研究課題に新規性が認められること、作業仮説や実験方法に妥当性があること、結果の解釈や考察が適切に導かれていることから、本論文は博士学位論文としてふさわしいものであると認められた。また、令和5年2月14日に開催された公聴会では、発表内容は論理的かつ明瞭にまとめられており、質疑応答に対し的確に回答されていた。よって、申請者は当該分野に関する学力において、博士の学位に相応しい資格を有していることが確認できた。

以上、本論文は博士（生命科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。