

令和4年度

博士論文

Hspa5 プロモーターを用いた新たな抗体安定発現系の構築

第一三共株式会社

種村 裕幸

目次

0. 要旨	4
1. 序論	5
1.1 抗体医薬品の製造方法	5
1.2 抗体生産性向上のアプローチ	5
1.3 CHO 細胞で用いられるプロモーターと課題	6
1.4 抗体医薬品の構造の多様性	6
1.5 本研究の目的	7
2. 方法	14
2.1 トランスクリプトーム解析用 CHO 細胞の培養	14
2.2 RNA 抽出とトランスクリプトーム解析	14
2.3 プラスミドベクター構築	14
2.4 CHO 細胞への発現ベクターのトランスフェクション (一過性発現)	15
2.5 ルシフェラーゼアッセイ	15
2.6 ルシフェラーゼおよび抗体を発現するステーブルプールの構築	15
2.7 モノクローン細胞株の獲得	16
2.8 フェドバッチ培養	16
2.9 <i>in silico</i> でのプロモーター配列解析	16
2.10 各種添加剤添加条件の検討	16
2.11 小胞体ストレス誘導物質の添加	17
2.12 RNA 抽出と逆転写	17
2.13 定量 PCR (digital droplet PCR)	17
2.14 ウェスタンブロットティング	18
3. 結果	23
3.1 Hspa5 プロモーターの取得及び抗体安定生産への活用	23
3.1.1 トランスクリプトーム解析による高発現遺伝子のスクリーニング	23
3.1.2 ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性評価	23
3.1.3 Hspa5 プロモーターでの抗体生産性評価	24
3.1.4 Hspa5 プロモーターの最適化	24
3.1.5 生物種による Hspa5p の活性評価	25
3.1.6 Hspa5p のプロモーター長の最適化	25
3.1.7 IgG サブクラス間での生産性評価	25
3.1.8 モノクローン株の生産性評価	26
3.2 小胞体ストレス応答と Hspa5p による抗体生産との相関	26
3.2.1 CHO 細胞における小胞体ストレス関連遺伝子の発現量の詳細解析	26
3.2.2 Hspa5p での抗体発現と UPR 遺伝子発現との相関	27

3.2.3	小胞体ストレス誘導剤添加の影響評価.....	27
4.	考察.....	55
5.	謝辞.....	59
6.	引用文献.....	60

0. 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 α 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 α ）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。

1. 序論

近年、遺伝子組換え技術を利用したモノクローナル抗体（monoclonal antibody、mAb）の開発は、高い特異性と有効性を有する有望な薬剤としてますます注目を集めている。抗体医薬品は、1986年に Muromonab-CD3 が承認されて以来、がん、自己免疫疾患領域を中心に開発され、2021年までに120品目以上承認されている（Gauzy-Lazo, Sassoon et al. 2020）（Figure 1）。抗体医薬品の製造にはチャイニーズハムスター卵巣細胞（Chinese hamster ovary cell、CHO 細胞）（Figure 2）が主として用いられ、安定した抗体生産のプロセス開発を目指した研究が推進されてきた（Kunert and Reinhart 2016）。CHO 細胞での抗体生産性は、医薬品製造コストや供給の安定性に大きく影響し、また限られた製造設備の中で効率的な製造を実施するため、一度の製造で必要な生産量を確保できることが望ましい。年々抗体医薬品に対する需要が高まり、抗体医薬品の生産性の向上は社会的に強く求められている。

1.1 抗体医薬品の製造方法

抗体医薬品は Figure 3 に示すようなプロセスで製造される。まず、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子をコードしたベクターを CHO 細胞に導入し、得られた抗体産生細胞を培養・分注・凍結したバイアルをセル・バンクとして樹立する。実際の製造現場で、セル・バンク化された CHO 細胞を拡大培養し、最終的に 2000 L–20000 L 程度のスケールで生産培養が実施され、培地中に分泌された抗体を含む培養液を得る。培養終了後、フィルターろ過や遠心分離等によって CHO 細胞を除いた除細胞液から、Protein A アフィニティークロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィー等によって目的抗体を高度に精製する。

バイオ医薬品製造における CHO 細胞の培養方法は主に 2 種類ある（Figure 4）（Bielser, Wolf et al. 2018）。一つはフェドバッチ法であり、バイオリクター内で増殖した細胞密度に応じて消費した様々な炭素源、窒素源を補うため新しい培地を添加する培養法である。フェドバッチ培養では細胞播種後に培養環境に応じた細胞密度まで細胞が増殖するが、その後代謝老廃物の蓄積などによって増殖が停止し、以降細胞生存率が低下する。もう一つの培養方法はパーフュージョン培養である。この培養方法では、フィルターを介して新しい培地の添加と培養液の抜き取りを連続的に行う。これによって細胞密度は長期間一定に維持され、培地成分も一定に保たれる。近年、注目されているバイオ医薬品製造プロセスの連続化において重要な培養技術であるが、特殊な設備を必要とする点や大量の培地を必要とする点など、製造プロセスとして適用する上で課題がある。いずれの培養方法を適用する場合でも、培養期間を通して高い抗体生産性が維持されることが安定した抗体生産を実現する上で重要である。

1.2 抗体生産性向上のアプローチ

CHO 細胞培養による抗体生産法は、様々なアプローチによって生産性向上が試みられている。ゲノムレベルでは、ゲノムに挿入される抗体発現ベクターの挿入位置の最適化やコピー数の制御による発現向上が試みられている（Srirangan, Loignon et al. 2020）。また、転写レベルでは、プロモーターの改良やエンハンサーの導入による発現向上がなされている（Romanova and

Noll 2018)。さらに、翻訳効率の向上やシャペロン導入によるフォールディングと分泌効率向上のアプローチもある (Zucchelli, Patrucco et al. 2016)。また、培養法の改良による発現向上の研究も進められており、培地の改良や通気攪拌方法、pH 制御方法の検討がなされている (Barnes, Bentley et al. 2003, Ritacco, Wu et al. 2018, Ahleboot, Khorshidtalab et al. 2021)。さらに、生産性向上に向けた CHO 細胞の様々な特性を理解するため、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析 (DNA マイクロアレイ及び RNA シークエンス)、プロテオーム解析、メタボローム解析といったマルチオミクス解析の手法によっても生産性の改良が試みられている (Lakshmanan, Kok et al. 2019)。

1.3 CHO 細胞で用いられるプロモーターと課題

抗体生産性向上に向けた各種アプローチの中で、目的遺伝子の発現を制御するプロモーターは極めて重要な因子である。プロモーターは、コアプロモーター及び、TATA-box や CpG アイランドといった DNA 配列(シスエレメント)で構成され、遺伝子の転写量を制御する (Baumann, Pontiller et al. 2010) (Figure 5)。タンパク質生産に用いられる細胞として使われる CHO 細胞や HEK293 細胞、マウスミエローマ細胞 (NS0) において、これまでに様々なタンパク質発現用のプロモーターが取得され、利用されている (Table 1)。

ウイルス由来のプロモーターとしては、Human Cytomegalovirus (hCMV)、Simian Virus 40 Early (SV40E)、Rous Sarcoma Virus (RSV) プロモーターが挙げられる。また、真核生物由来のプロモーターとして、Mouse Phosphoglycerate Kinase 1 (PGK) や、Human Ubiquitin C (UBC) プロモーター、Human elongation factor-1 α promoter (hEF-1 α) も CHO 細胞でのタンパク質生産に用いられている。ウイルス由来や異種真核生物由来プロモーターにおいてサイレンシングを受けやすい特徴があることから、CHO 由来のプロモーターについても開発がされており、Chinese hamster elongation factor-1 α promoter (CHEF-1 α) や、エンハンサーとして CHO 細胞由来シスエレメントである E77 の導入などが例として挙げられる。人工合成プロモーターの活用例もあり、CMV とショウジョウバエ由来の配列を組み合わせた高発現プロモーターなどがある。また、テトラサイクリン (Tet) システムを活用した誘導型プロモーターも用いられている (Running Deer and Allison 2004, Moritz, Becker et al. 2015, Wang, Guo et al. 2018, Nguyen, Baumann et al. 2019, Nguyen, Novak et al. 2020)。

このように、動物細胞を用いた抗体発現には様々な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からの発現量は、一般的な 14 日間のフェドバッチ培養の後期 (培養 7~10 日目以降) において減弱することが知られている。そこで、抗体生産性向上のため、高発現かつ従来のプロモーターの特性とは異なる培養後期まで目的遺伝子の転写量を維持できるプロモーターが求められている。

1.4 抗体医薬品の構造の多様性

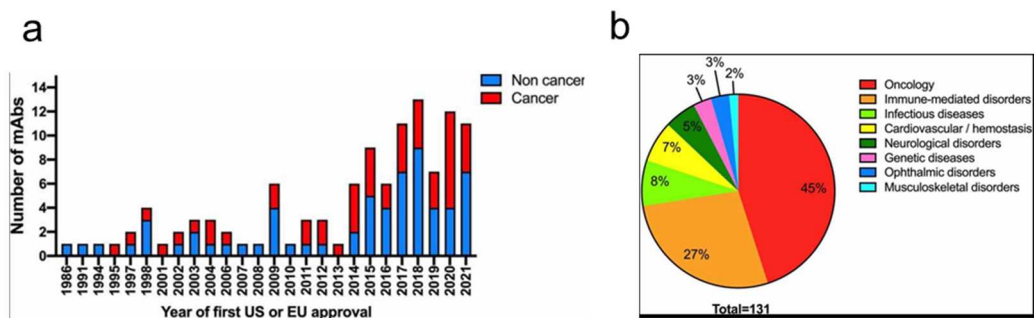
抗体医薬品として使用されている IgG は Fab ドメインと Fc ドメインのマルチドメイン構造となっており (Figure 6)、Fab ドメインは相補性決定領域 (complementarity-determining regions、

CDR) として知られる 6 つのペプチドループを介して抗原を認識する。一方で、Fc ドメインは定常ドメイン (CH2 および CH3) を含み、補体タンパク質や Fc 受容体などの免疫学的受容体分子に結合することによってエフェクター機能を媒介する (Tiller and Tessier 2015)。Fab ドメインと Fc ドメインの間の重鎖領域はヒンジ領域と呼ばれる。

また、IgG は 2 本の軽鎖と 2 本の重鎖からなり、それぞれ可変領域と定常領域を持つ。軽鎖と重鎖はジスルフィド結合によって結合しており、ジスルフィド結合の数やヒンジ領域の違いによって IgG1、2、3、4 の 4 つのサブクラスに大別される (Liu and May 2012) (Figure 6)。可変領域を除くと、同一サブクラスは約 90% の相同性であり、サブクラス間では 60% 程度の相同性がある。抗体医薬品として主に IgG1、2、及び IgG4 のヒンジ領域のセリンをプロリンに置換し構造を安定化させた IgG4Pro (Rayner, Hui et al. 2014) が開発されており、構造の多様性に加え、CHO 細胞における生産量も多様である。

1.5 本研究の目的

本研究では、CHO 細胞による抗体生産プロセスの改良に向け、培養後期に抗体発現プロモーター活性が低下する課題を解決することを目的とし、新規プロモーターの開発を試みた。抗体産生細胞を複数の細胞培養条件下で培養し、遺伝子発現プロファイルをトランスクリプトーム解析によって比較し、強発現かつ培養後期まで発現が維持される遺伝子を探索し、その発現特性を解析することによって、候補遺伝子のプロモーター領域を選抜した。クローニングされた高発現遺伝子の推定プロモーター領域は、レポーターとしてルシフェラーゼ及びモデル抗体の生産性によって評価され、推定プロモーター領域は *in silico* 解析によってプロモーターとしての必須領域の特定及びプロモーター長の最適化が試みられた。また、抗体製造プロセスに広く活用するため、各種 IgG サブクラスの生産性を確認し、CHO 細胞による抗体製造プロセスに適用する新規プロモーターの開発を目指した。さらに単離したプロモーターの高発現化機構の解明に向けて、CHO 細胞における転写調節機構を考察した。



2020年 世界で最も売れた医薬品トップ20

前年比は%

順位	前年	製品名	社名	20年世界売上高		
				億ドル	前年比	億円
1	1	ヒュミラ	アッヴィ	290.11	7.5	31,912
2	2	エリキュース	プリストル/ファイザー	173.90	28.3	19,129
3	3	キイトルーダ	メルク	151.13	32.9	16,624
4	4	イクザレルト	バイエル	117.29	12.0	12,902
5	7	ステラーラ	J&J	111.44	25.9	12,258
6	5	ランタス	サノフィ	103.02	3.0	11,332
7	11	トルリシティ	イーライリリー	98.50	34.4	10,835
8	—	ピクタルビ	ギリアド	92.50	69.6	10,175
9	6	エンブレル	ファイザー	91.87	▲ 5.7	10,106
10	8	オブジーボ	プリストル/小野薬品	83.88	2.1	9,227
11	9	ジャヌビア	メルク	78.19	4.3	8,601
12	10	ノボラビッド	ノボルディスク	71.69	▲ 2.9	7,886
13	—	ジャディアンス	BI/イーライリリー	70.57	44.2	7,763
14	17	イムブルピカ	J&J	66.69	17.6	7,336
15	19	レブラミド	プリストル	63.97	13.0	7,037
16	—	オゼンピック	ノボルディスク	63.77	146.3	7,015
17	—	アイリーア	バイエル	61.51	59.7	6,766
18	20	イブランス	ファイザー	61.05	9.8	6,716
19	—	コセンティクス	ノバルティス	59.77	18.7	6,575
20	12	レミケード	J&J	57.43	▲ 17.5	6,317

J&J=ジョンソン・エンド・ジョンソン、BI=ベーリンガーインゲルハイム。前年比は為替変動の影響を除く。1ドル=110円換算。米 IQVIA 調べ

Figure 1 抗体医薬品の承認数の推移と売り上げ

(a) 抗体医薬品の承認数の推移 (Gauzy-Lazo, Sassoon et al. 2020 より引用)。(b) 抗体医薬品の対象疾患の割合 (Gauzy-Lazo, Sassoon et al. 2020 より引用)。(c) 2020年の世界の医薬品の売り上げトップ20 (以下の Web サイトより引用 : <https://answers.ten-navi.com/pharmanews/21306/#:~:text=2020%E5%B9%B4%E3%81%AB%E4%B8%96%E7%95%8C%E3%81%A7,%E3%83%9D%E3%82%A4%E3%83%B3%E3%83%88%E9%98%BB%E5%AE%B3%E8%96%AC%E3%80%8C%E3%82%AD%E3%82%A4%E3%83%88%E3%83%AB%E3%83%BC%E3%83%80%E3%80%8D%E3%80%82>)。売上上位のうち、ヒュミラ、キイトルーダ、ステラーラ、オブジーボ、コセンティクス及びレミケードは抗体医薬品であり、エンブレル及びアイリーアは抗体医薬品の一部の構造を使用している。

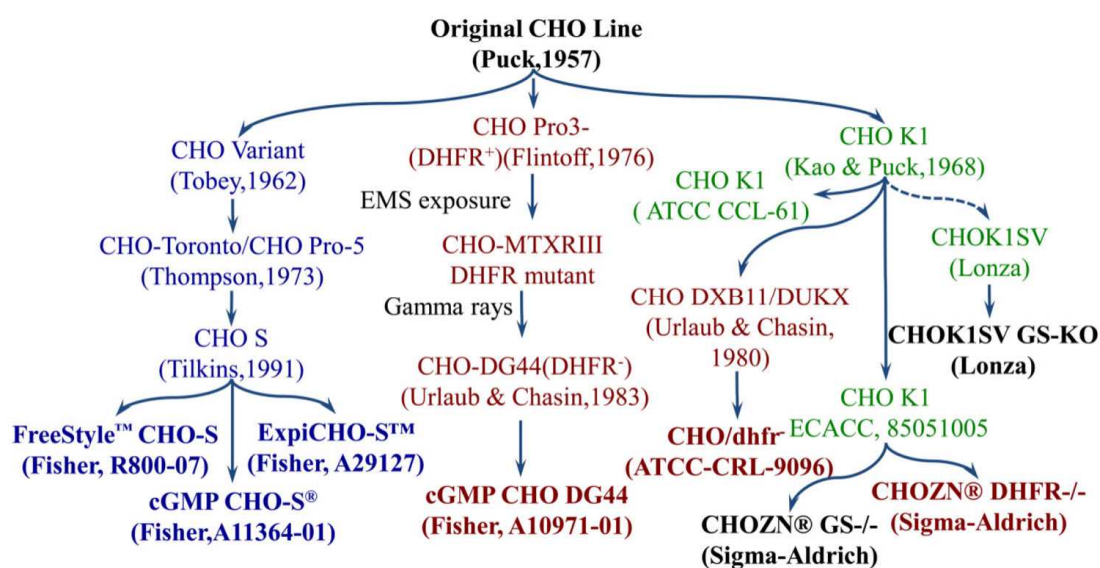


Figure 2 CHO 細胞の系統

Xu, Ma et al.2017 より図を引用。CHO 細胞は、1956 年に Theodore Puck らがチャイニーズハムスターの卵巣細胞の培養液から単離して作製された (Puck 1957)。単離された細胞から CHO-K1、CHO-DG44、および CHO-S などの様々な系統が樹立され、バイオ医薬品の製造に広く用いられている。これら CHO 細胞の系統には染色体セグメントのいくつかの欠失、転座またはリアレンジメントが生じており、遺伝的多様性の原因となっている。また、遺伝子レベルだけでなく、エピジェネティックな変異 (ヒストン修飾、クロマチンリモデリングおよび DNA メチル化など) も CHO 細胞に存在し、細胞系統間の多様性の原因となっている。これらの遺伝的多様性は細胞系統の違いだけでなく、同一の細胞系統内のクローンによっても違いが見られる (Wurm 2004, Reinhart, Damjanovic et al. 2019, Wurm and Wurm 2021)。

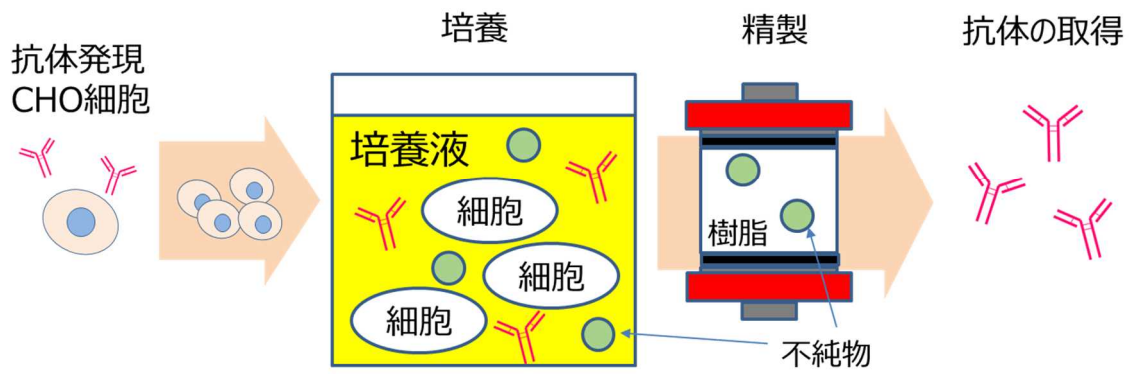


Figure 3 抗体製造プロセス

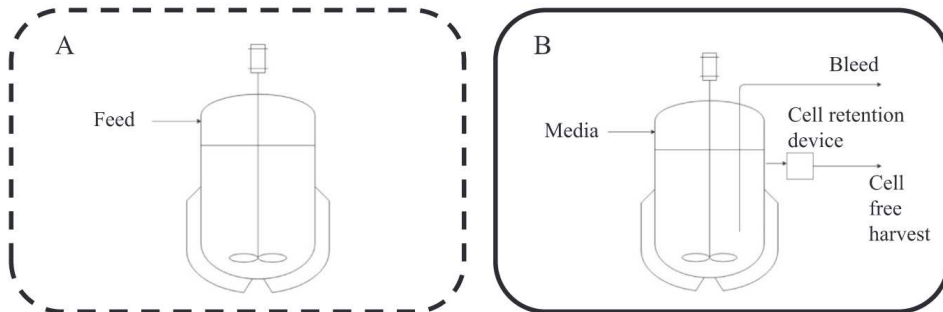


Figure 4 CHO細胞の培養方法

A: フェドバッチ培養、B: パーフュージョン培養 (Bielser, Wolf et al. 2018 より引用)。

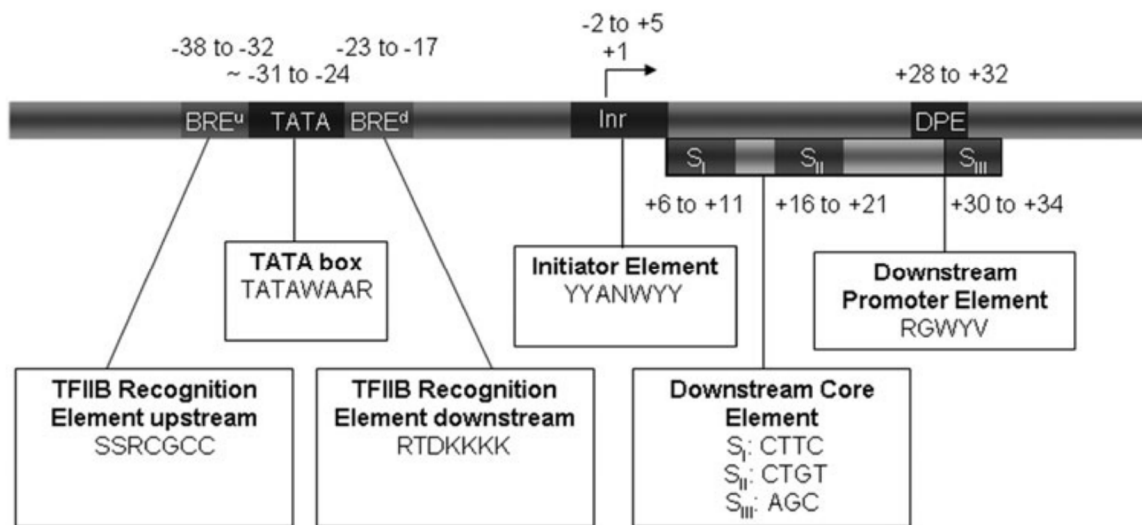


Figure 5 プロモーターを構成するエレメント

プロモーターは、コアプロモーター及び、近傍プロモーターエレメント、エンハンサー、サイレンサー、およびインスレーターといった DNA 配列（シスエレメント）で構成される（Baumann, Pontiller et al. 2010 より引用）。哺乳類のコアプロモーターは、遺伝子の転写開始に必要な DNA 配列の最小領域と定義され、遺伝子上流約 40 kb の領域に存在する。RNA ポリメラーゼ II と、それに結合した基本転写因子（general transcription factors、GTF）から構成される開始前複合体（pre-initiation complex、PIC）がコアプロモーターに結合することで転写が開始される。プロモーターエレメントである TATA ボックスには共通配列 TATAWAAR があり、上流の T は転写開始部位に対して約-31~-30 に位置している。基本転写因子 TFIID の TATA 結合タンパク質（TBP）サブユニットをもち、転写開始点を正確に認識する。TATA ボックス下流にイニシエーターエレメント（Inr）と呼ばれる転写開始部位があり、哺乳動物ではコンセンサス配列は YYANWYY である。また、Inr 領域下流に下流プロモーターエレメント（downstream promoter element、DPE）が転写開始点認識に関わることもあり、共通配列は RGWYV である。TATA ボックスとは異なるプロモーターエレメントとして、CG ジヌクレオチドで構成される CpG アイランドがある。CpG アイランドは、メチル化されていない CpG ジヌクレオチドが多く存在する 0.5~2 kb の DNA 領域として定義されている。これらはハウスキーピング遺伝子または組織制限発現パターンを有する遺伝子と関連することが多く、CpG アイランドのメチル化が遺伝子発現レベルと相関することが示されている。CpG アイランドは典型的には TATA ボックスまたは DPE を欠いているが、Sp1 および関連する転写因子の結合部位を表す複数の GC ボックスモチーフを含む。また、CpG アイランドプロモーターは、TATA ボックスまたは DPE 依存性プロモーターとは対照的に、100 bp 以上の領域にわたる複数の転写開始部位を含む。

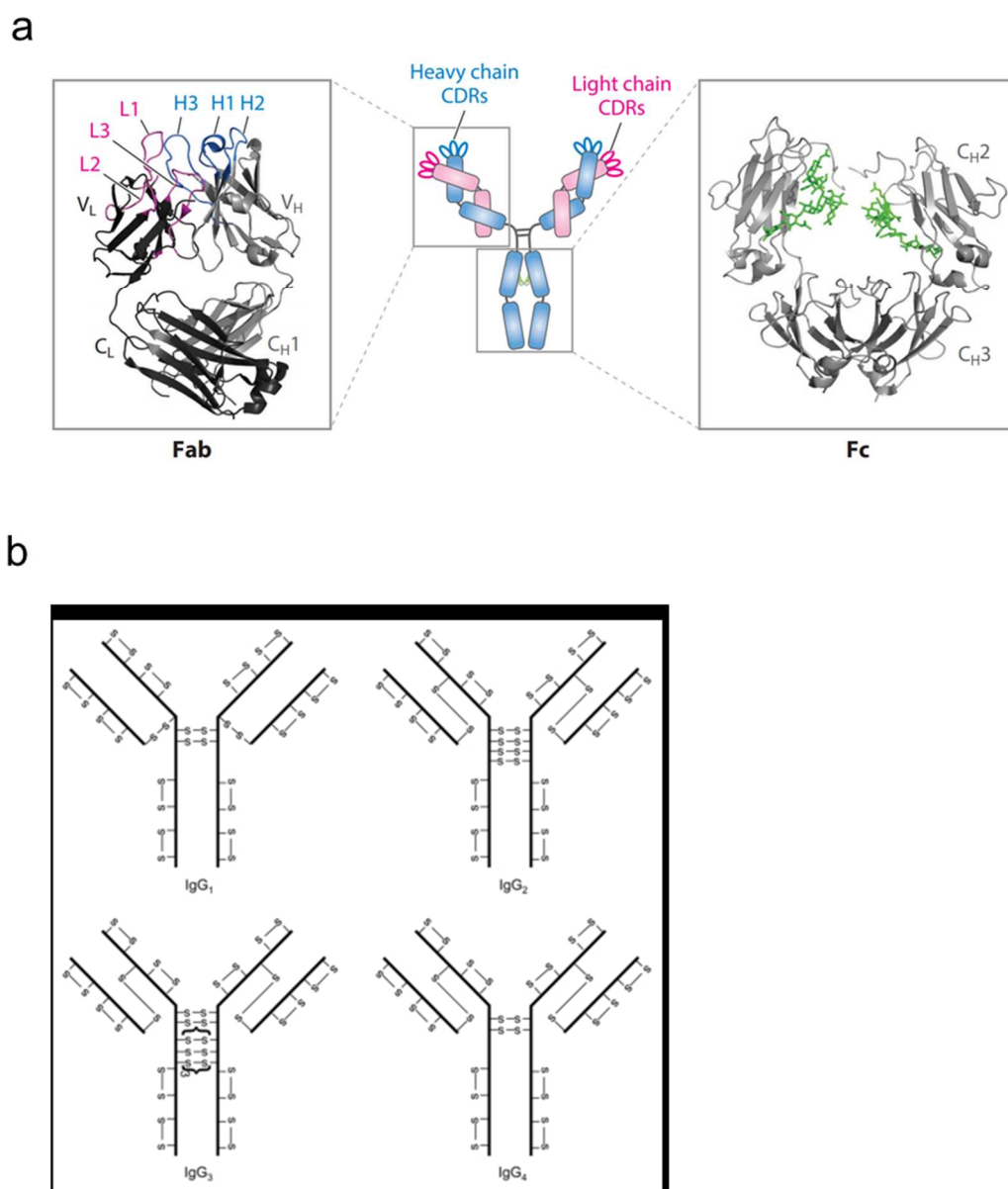


Figure 6 抗体の構造

(a) 抗体を構成するドメイン。Fab ドメイン及び Fc ドメインからなる (Tiller and Tessier 2015 より引用)。(b) 抗体の構造とサブクラス。ジスルフィド結合の数やヒンジ領域の違いによって IgG1, 2, 3, 4 に大別される (Liu and May 2012 より引用)。

Table 1 CHO 細胞での抗体生産に使用されるプロモーター

ウイルス、各種真核生物、CHO 細胞由来のプロモーター及び人工合成プロモーターがこれまで抗体生産に使用されてきた (Romanova and Noll 2018 より引用)。

Promoter	Vector example	Supplier	Comments
Human cytomegalovirus hCMV	pRc	Sigma-Aldrich/Merck http://www.sigmaaldrich.com	Enhanced CMV2 promoter/enhancer, and polyadenylation signal (pAn) from bovine growth hormone (BGH)
	pcDNA3.3-TOPO	Invitrogen https://www.thermofisher.com	Native CMV promoter/enhancer (672 bp)
	pCI	Promega https://www.promega.com	hCMV enhancer/promoter, β -globin/IgG chimeric intron and SV40 pAn
	gWiz pHCMV	Genlantis https://www.genlantis.com	Optimised hCMV followed by intron A
	pAdCMV5	Genetic map is available upon request ^[23]	Adenovirus vector with a chimeric CMV showing enhanced expression compared to natural CMV
Simian virus SV40	pGL2	Promega	Basic vector contains only SV40E promoter but no enhancer
	PSF-SV40	Sigma-Aldrich/Merck	SV40 enhancer/promoter and pAn
Rous sarcoma virus RSV	pRSV (5.2 kb)	Sigma-Aldrich/Merck	RSV enhancer/promoter and BGH pAn
	pRC-RSV	Invitrogen	RSV promoter, SV40 enhancer and pAn
PGK	pDRIVE3-SEAP-mPGK	Invivogen https://www.invivogen.com	Vector with PGK promoter and secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter protein
Homo Sapiens Ubiquitin C UBC	pUB-GFP	Addgene https://www.addgene.org	Plasmid was a gift from Connie Cepco to Addgene ^[103]
	pUb6/V5 His C	Invitrogen	UBC promoter for transgene expression and SV40E controlling the resistance marker
hEF-1 α	pDRIVE5-GFP-1	Invivogen	Composite hEF-1 promoter/enhancer sequences and GFP reporter
CHEF-1 α	Various vectors with different markers	CMC Biologics http://www.cmcbio.com/	CHEF1 [®] Expression Platform for cell line development for GMP protein production
	pSF-CHEF1-Fluc	Oxford Genetics https://www.oxfordgenetics.com	CHEF-1 promoter/enhancer and firefly luciferase reporter gene
Plasmids with inducible promoters	pAdenoVator-CMV5 (CuO)-IRES-GFP (AES2041)	MP Biomedicals www.mpbio.com/	Plasmid contains hybrid CMV5 promoter and cumate operator (CuO) in combination with QBI-HEK 293CymR cells
	pAdTR5	Genetic map is available upon request ^[104]	Adenovirus (AdV) vector with an inducible tetracycline-regulated expression cassette ^[23]
	Tet-On/Tet-Off	Takara Bio USA http://www.clontech.com/	Two vector systems for tetracycline-regulated expression
	Tet-One	Takara Bio USA	Single vector system for tetracycline-inducible expression

2. 方法

2.1 トランスクリプトーム解析用 CHO 細胞の培養

CHO-K1 (CCL-61; ATCC, Manassas, VA, USA) (Okumura, Masuda et al. 2015) から派生した無血清、浮遊化細胞由来の IgG を発現する 2 クローンについて、1 L 動物細胞培養容器 (ABLE 社、東京、日本) を用いてカスタム培地 G13 (富士フィルム和光純薬) 及び CD DA1 (ThermoFisher Scientific) で培養した。フィード培地としてそれぞれ F13 (富士フィルム和光純薬) および DAFM3 (ThermoFisher Scientific) を用いた。生産培養は 14 日間行い、培養 4, 7, 9, 11, 14 日目に 1×10^6 個の生存細胞を取得し、PBS で洗浄 (300rpm, 5 分間) し、液体窒素で凍結した後、 -80°C で凍結保存した。

2.2 RNA 抽出とトランスクリプトーム解析

タカラバイオ社にて、解凍した細胞から RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いて total RNA を抽出した。Nanodrop 及び Agilent2100 Bioanalyzer (アジレントテクノロジー) を用いて RNA の品質分析を実施後、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (イルミナ) 及び自動化装置 (アジレントテクノロジー) を用いてシーケンスライブラリーを作成した。PolyA+ RNA を単離、断片化し、cDNA を合成した。合成した cDNA の両末端を平滑化・リン酸化処理した後、3'-dA 突出処理を行い、Index 付きアダプターを連結した。アダプターを連結した二本差 cDNA を鋳型とし、PCR による増幅を行い、AMPure XP (ベックマン・コールター) を用いた時期ビーズ方にて得られた PCR 産物を精製し、シーケンスライブラリーを作製した。シーケンスライブラリーを用いて、HiSeq システム (イルミナ) を用いて高速シーケンス解析を実施した。シーケンスの鋳型となるクラスターを作製し、鋳型 DNA の塩基配列 (fastq 形式) を取得した。シーケンス解析によって得られたリード配列をゲノム配列にマッピングした (Figure 7)。位置情報にもとづいてノーマライズされた遺伝子発現量 (RPKM, Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads、すなわちマッピングしたシーケンスが 100 万配列としたときのリード量に換算した値) を算出した。

2.3 プラスミドベクター構築

ルシフェラーゼレポーターおよびコントロールベクターとして、それぞれ pGL4.10 および pGL4.74 (Promega Biosciences Inc.) を用いた (Figure 8)。pGL4.10 は、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子 *luc2* を含み、各候補プロモーターを *luc2* の上流の multiple cloning site に挿入した。pGL4.74 は、HSV-TK プロモーターおよび *Renilla* ルシフェラーゼ遺伝子 *hRluc* を含む。

抗体発現には、pEF1/myc-His B (ThermoFisher Scientific) をバックボーンベクターとし、抗体発現遺伝子 (重鎖及び軽鎖) を挿入した。重鎖、軽鎖それぞれの上流に各種プロモーターを挿入した。大腸菌でのプラスミド構築用の耐性遺伝子としてアンピシリンを使用し、CHO 細胞へのトランスフェクションのための耐性遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を使用した (Figure 8)。

プロモーターのクローニングは CHO 細胞のゲノム DNA を鋳型とし、Table 2 に示したプライマーを用いて PCR によって増幅した。Table 2 に示した制限酵素を用いて各ベクターに挿入した。異種 Hspa5p のクローニングのための鋳型 DNA として、ヒト、ラット、マウスのゲノム DNA をそれぞれ用いた。

2.4 CHO 細胞への発現ベクターのトランスフェクション（一過性発現）

宿主 CHO 細胞 (5×10^5) を含む培養液を遠心分離し (240 xg、24°C、3 分間)、培地を除去した。その後、Opti-MEM 培地 (ThermoFisher Scientific) 2 mL に細胞ペレットを懸濁した。遠心分離により上清を除去した後、残りを Opti-MEM 培地 2 mL に再懸濁し、24 ウェル培養プレートに 2 ウェルに培養液 1 mL を分注した。発現ベクター 3.2 μ g と Opti-Pro SFM 培地 (ThermoFisher Scientific) 68 μ L の混合物を、遺伝子導入試薬 8 μ L と Opti-Pro SFM 培地 68 μ L の混合物と混合し、室温で 20 分間反応させた。反応物を 2 つのウェルのそれぞれに分注し、5% CO₂ および 37°C の条件下にて、CO₂ インキュベーター中で静置培養した。

2.5 ルシフェラーゼアッセイ

ベクタートランスフェクション後、細胞を一晩静置培養し、全培養液を遠心分離 (9000 xg、5 分) して、細胞ペレットを得た。細胞を PBS で洗浄し、1×lysis buffer を 100 μ L を加えた後、室温で 5 分間インキュベートした。ルシフェラーゼアッセイには Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Biosciences Inc) を用いた。調製した細胞ライセートを蒸留水で 100 倍に希釈し、希釈液 20 μ L 及び Luciferase assay reagent II 100 μ L を混和した。この試料を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター (OT245-01; Berthold Technologies) で 10 秒間測定した。その後、Stop & Glo Solution 100 μ L を添加し、ルミノメーターにて *Renilla* ルシフェラーゼ活性 (内部コントロール) を 10 秒間測定した。ホタルルシフェラーゼ測定の結果を *Renilla* ルシフェラーゼ測定の結果で除してルシフェラーゼ活性を計算した。(Figure 9)

2.6 ルシフェラーゼおよび抗体を発現するステーブルプールの構築

トランスフェクション後 24 時間培養し、2 ウェルの培養液を 1 本のチューブに回収した。培養液を遠心分離 (240 xg、24°C、3 分間) して上清を除去し、細胞ペレットを 800 μ g/mL の Geneticin を含む 4 mL のトランスフェクション培地に懸濁した。トランスフェクション培地として C/E 培地 (CD-CHO (ThermoFisher Scientific) 及び ExCell325 (SAFC) を 6:4 の比率で混合した培地) (Masuda, Watanabe et al. 2021) を使用した。その後、この懸濁液を 6 ウェルの培養プレートに移し、続いて CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) でインキュベートし、Geneticin による薬剤選択を実施した。3、4 日おきに培地を終濃度 800 μ g/mL Geneticin を含むトランスフェクション培地 (C/E 培地) に遠心分離 (240 xg、24°C、3 分間) によって置換し、細胞の増殖に合わせて T-25 培養フラスコに拡大した。3~4 日間インキュベーションした後、培養液を 125 mL の三角フラスコに拡大し、ステーブルプールとして使用した。

2.7 モノクローン細胞株の獲得

半固体培地 100 mL に、C/E 培地で 100 倍に希釈した細胞培養培地を、生存細胞密度 48 cells/mL に加えた。気泡が形成されないように穏やかに混合し、半固体培地用の 6 ウェルプレート上にステープルプールを約 2 mL/ウェル播種した。細胞を 240 xg で 5 分間、4°C で遠心分離し、その後、37°C と 5% CO₂ の条件にて CO₂ インキュベーター中で 14 日間培養した。その後、自動動物細胞コロニー採取システム (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) を用いて、形成された 1 細胞由来のコロニーを取得した。採取した各コロニーを細胞培養用の 96 ウェルプレートに播種し、C/E 培地 150 μL を各ウェルに分注し、CO₂ インキュベーター中で 37°C および 5% CO₂ の条件で培養した。継代後、モノクローン細胞をフェドバッチ培養で評価した。

2.8 フェドバッチ培養

ルシフェラーゼおよび mAb を発現するステープルプールを、125 mL 三角フラスコまたは 15 mL 小型バイオリアクター (Sartorius) でのフェドバッチ培養により評価した。三角フラスコでの生産培養は、5% CO₂、37°C、120rpm の条件で 14 日間行った。15 mL 小型バイオリアクターでの培養は 37°C、850 rpm、溶存酸素 50% air saturation、5% CO₂ の条件で 14 日間培養した。培地はカスタム培地 G13 及び Feed 培地 F13 を使用した。

培養中、経時的に細胞濃度、生存率、代謝物、抗体濃度をモニタリングした。細胞濃度と生存率は Vi-CELL (Beckman Coulter) を用いて測定した。代謝物は、Bio Profile FLEX2 (Nova Biomedical) を用いて分析した。抗体濃度は、Protein A アフィニティーカラム (PA ID センサーカートリッジ Φ2.1mm×30mm; ThermoFisher Scientific) を用いて HPLC (Agilent Technologies) により分析した。抗体濃度は titer (力価) として記載した。転写解析のため、1×10⁶ 個の細胞を含む細胞ペレットを培養期間中に取得し、-80°C で凍結保存した。

2.9 *in silico* でのプロモーター配列解析

hspa5 遺伝子上流領域の配列と転写開始点 (cDNA 配列) に関する情報を National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースから検索した。配列解析にはソフトウェア GENETYX-SV/RC Ver 13.1.1 (GENETYX 社) を用いた。Polymerase II promoter 解析の cut-off 値は TATA-box -8.16、Cap signal -3.75、CCAAT-box -4.54、GC-box -4.9 とした。CpG アイランド解析条件は、window size 100, average span 10, minimum CpG island length 200, minimum GC content 50%, and minimum Obs/Exp CpG 0.6 とした。BLAST 解析を用いて、上流遺伝子領域の相同性を解析した。転写開始点は NCBI データベース (NM_001246739.2) の mRNA 配列により同定した。

2.10 各種添加剤添加条件の検討

抗体発現モノクローン株をフェドバッチ培養し、培養 3 または 7 日目に添加剤として以下を添加した。: ツニカマイシン (富士フィルム和光純薬) (終濃度 0.002、0.02、および 0.2 μg/mL)、MG132 (富士フィルム和光純薬) (終濃度 0.005、0.05、および 0.5 μg/mL)、クロロキン (富士

フィルム和光純薬) (終濃度 0.014、0.14、および 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。コントロール条件として同量の DMSO を添加した。詳細な添加条件は Table 6 に示した。培養 7、10、14 日目に転写解析用の細胞を取得し、ウェスタンブロッティングによって Hspa5 発現量を解析した。

2.11 小胞体ストレス誘導物質の添加

抗体発現モノクローンをフェドバッチ培養し、培養 7 日目に小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) ストレス誘導剤として以下を添加し、IgG および *hspa5* 遺伝子転写レベルを分析した: Dithiothreitol (DTT) (富士フィルム和光純薬) (終濃度 1、2、5、および 10mM)、ツニカマイシン (終濃度 0.01、0.05、0.1、0.2、および 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、およびタプシガルギン (富士フィルム和光純薬) (終濃度 0.002、0.005、および 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、プレフェルジン A (富士フィルム和光純薬) (終濃度 1、0.5、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。詳細な添加条件は Table 7 に示した。培養 10 日目に転写解析用の細胞を取得し、IgG および内因性 *hspa5* の転写レベルを解析した。定量 PCR には Table 2 に示したプライマーを使用した。

2.12 RNA 抽出と逆転写

培養した細胞 1×10^6 cells を遠心分離 (300 xg、5 分間) し、350 μL の Buffer RLT を添加後、1 分間ボルテックスで混合した。ライセートを 2 mL コレクションチューブにセットした gDNA Elimination Spin Column に入れ、8,000 xg で 30 秒間遠心した。取得したろ液に等量の 70%エタノールを添加し、形成した沈殿を含むサンプルを 2 mL コレクションチューブにセットした RNeasy MinElute Spin Column にアプライした。8,000 xg で 15 秒間遠心し、ろ液を捨てた。続いて、700 μl の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加し、8,000 xg で 15 秒間遠心し、ろ液を捨てた。500 μl の Buffer RPE を RNeasy MinElute Spin Column に添加し、8,000 xg で 2 分間遠心し、ろ液を捨てて、新しいコレクションチューブにセットした。カラムのふたをせずに最大回転数で 5 分間遠心し、乾燥させ、カラムを 1.5 mL コレクションチューブにセットして、RNase free 水を 14 μL 添加し、最大回転数で 1 分間遠心し、RNA 溶液を回収した。

続いて、以下の方法で逆転写反応を実施した。dNTP Mixture (10 mM each) 1 μL 、Random 6 mers (20 μM) 1 μL 、Template RNA 1 μL 、RNase Free dH₂O 7 μL を混合し、サーマルサイクラーを用いて 65°C、5 分間でアニーリングした。反応液 10 μL 、5 \times PrimeScript Buffer 4 μL 、RNase Inhibitor 0.5 μL 、PrimeScript RTase 0.5 μL 、RNase Free dH₂O 5 μL を混合し、サーマルサイクラーを用いて 42°C、30 分逆転写反応し、その後 95°C、5 分間で不活化し、cDNA 溶液を取得した。

2.13 定量 PCR (digital droplet PCR)

上流水で希釈した cDNA 溶液 2.2 μL 、2 \times ddPCR Evagreen Supermix 11 μL 、Forward Primer (5 μL) 1.1 μL 、Reverse Primer (5 μL) 1.1 μL 、water 6.6 μL を混合し、Automated Droplet Generator (BioRad) を用いてドロップレットを作製した。続いて、95°C 5 分、[95°C 30 秒、62°C 1 分] (40 サイクル)、4°C 5 分、90°C 5 分の条件で PCR 反応を実施し、Droplet Reader を用いて増

幅した cDNA コピー数を定量した。コントロールとして、ハウスキーピング遺伝子である *gapdh* 及び *actβ* を用いた (Figure 10)。使用したプライマーは Table 2 に示した。

2.14 ウェスタンブロッティング

細胞 (4.0×10^6 cells) を Lysis buffer に懸濁し、懸濁液を 20 分間、氷上に静置後、13,900 rpm、20 分間、4°C で遠心分離後、得られた上清を可溶性画分として回収した。遠心分離により得られた沈殿物は、Lysis buffer 500 μ L で懸濁し不溶性画分とした。可溶性画分と 4 \times LDS サンプルバッファーを 3 : 1 の割合で混合し、100°C、10 分間熱処理し、遠心分離し、上清を SDS-PAGE のサンプルとして用いた。調整したサンプル 13.3 μ L をアプライし、200V、30 分間通電して、SDS-PAGE を行った。

泳動終了後、ゲルをトランスファーバッファーに浸し、転写機器 (トランスプロット SD セル、BIO-RAD) の上に、下から順に、陽極板 \rightarrow ろ紙 \rightarrow メンブレン \rightarrow ゲル \rightarrow ろ紙 \rightarrow 機器の陰極板の順に置き、15V、60 分間転写を行った。転写終了後、プラスチックトレイにメンブレンを移し、メンブレンを PBS-T で洗浄後、ブロッキング液にメンブレンを十分に浸し、室温で 1 時間穏やかに振とうした。ブロッキング操作後、PBS-T を用いて洗浄 (室温、4 分間穏やかに振とう) を 4 回実施した。続いて、PBS-T で希釈した一次抗体溶液 (Rabbit Bip Antibody (500 倍希釈) 及び Anti-GAPDH antibody [mAbcam 9484] (1,000 倍希釈)) にメンブレンを浸し、室温で 1 時間穏やかに振とうした。抗体溶液を廃棄し、PBS-T で 4 回洗浄した。PBS-T で 10000 倍に希釈した二次抗体溶液 (ECL Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey) (10,000 倍希釈)) にメンブレンを浸し、室温で 1 時間穏やかに振とうした。抗体溶液を廃棄し、PBS-T で 4 回洗浄した。メンブレンを洗浄後、ハイブリパックにメンブレンを移し、しっかりと洗浄液を除去した。発光試薬 (EzWest Blue) をメンブレンに滴下し、暗所で 5 分間静置した。発色後、検出されたバンドを目視にて確認した。

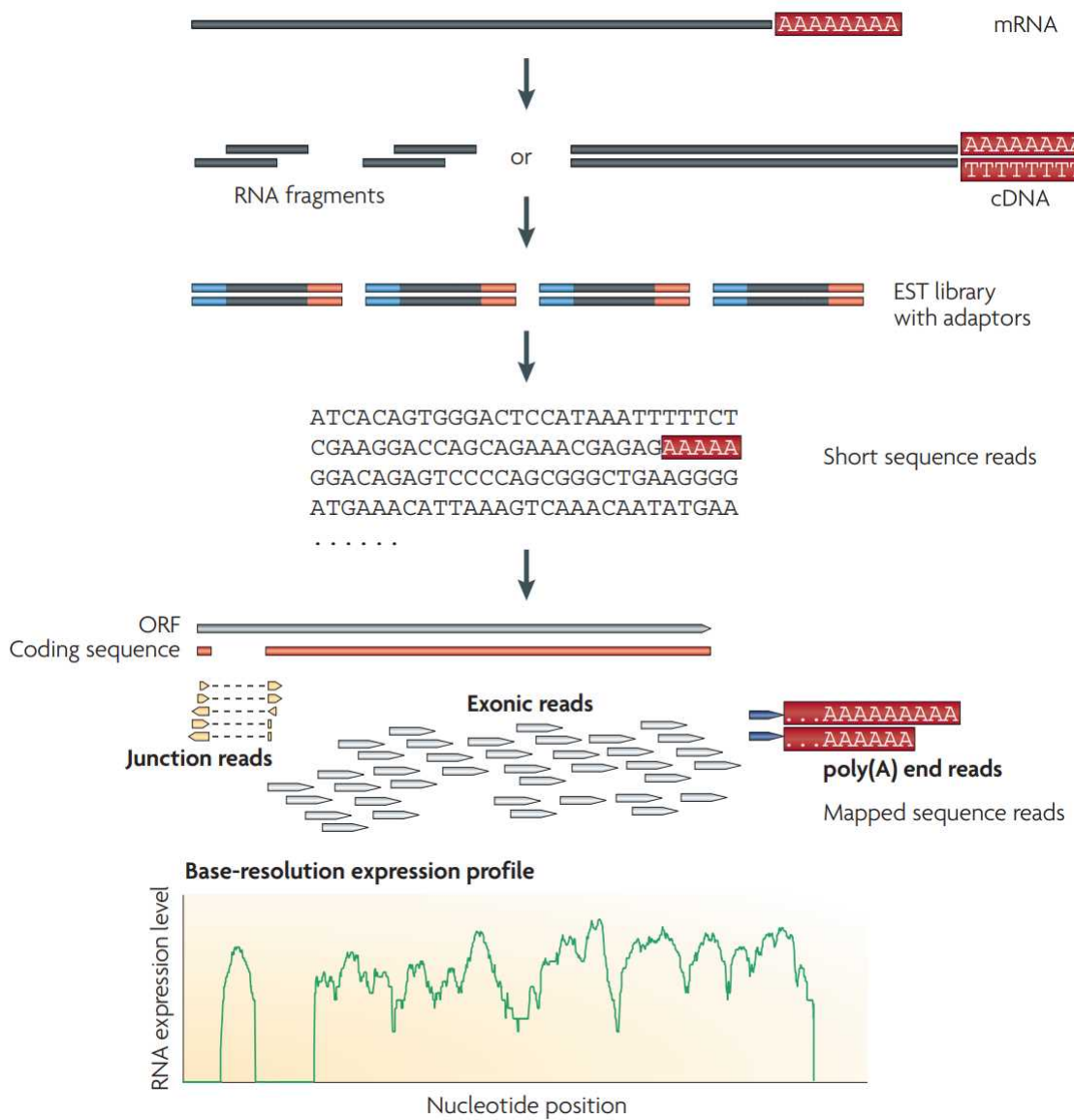


Figure 7 トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) のフロー
 Wang, Gerstein et al. 2009 より引用。

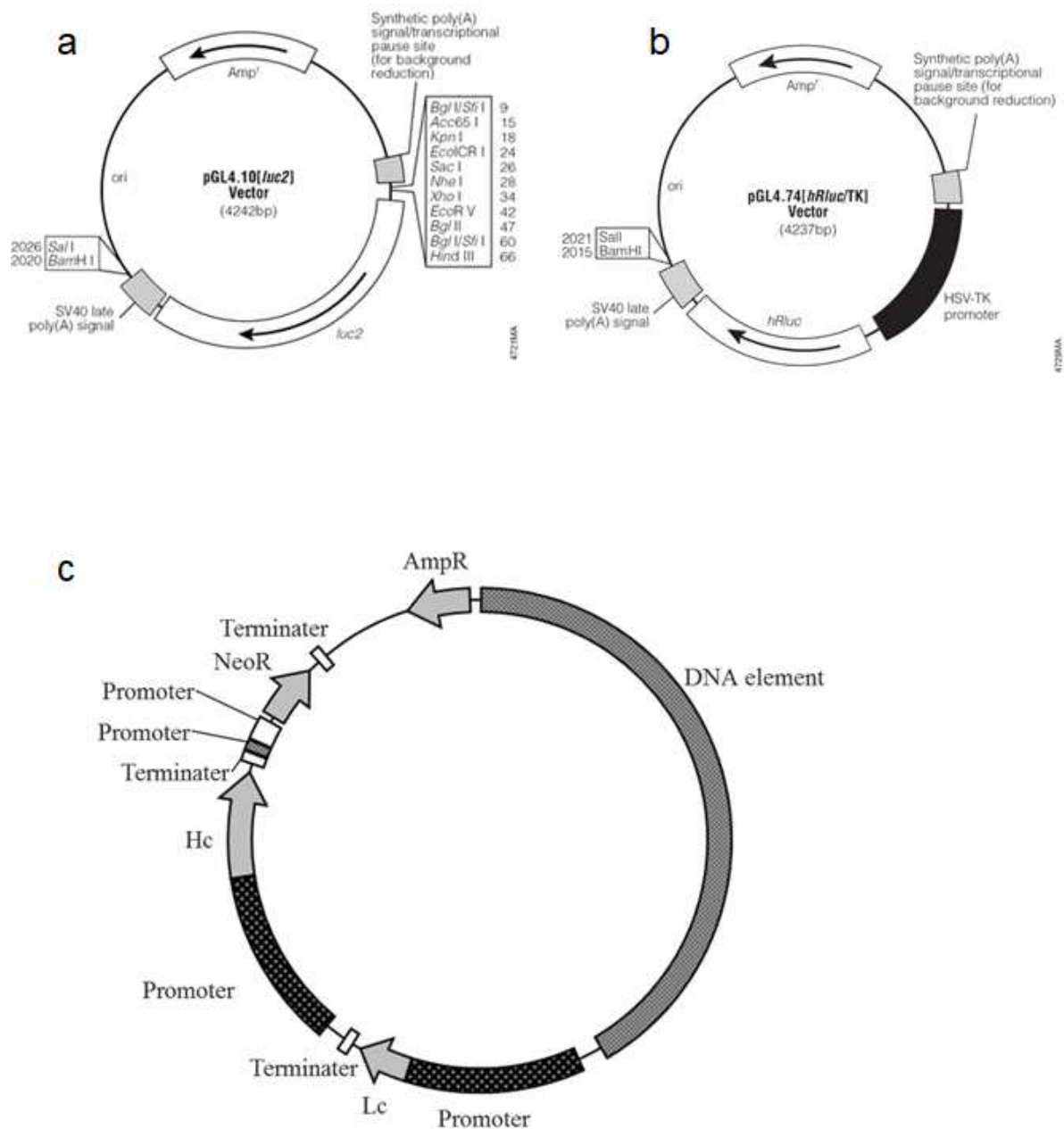


Figure 8 使用したベクター

(a) レポーターベクター (Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Biosciences Inc) のプロトコルより引用 : https://www.promega.jp/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl4-10-vector.pdf?rev=b64bfb2fbca447268d909a14f1621145&sc_lang=en)、(b) コントロールベクター (Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Biosciences Inc) のプロトコルより引用 : <https://www.promega.jp/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl474-vector.pdf?rev=691c1f16b33047138e1edb76abc27527&la=en>)、(c) 抗体発現ベクター

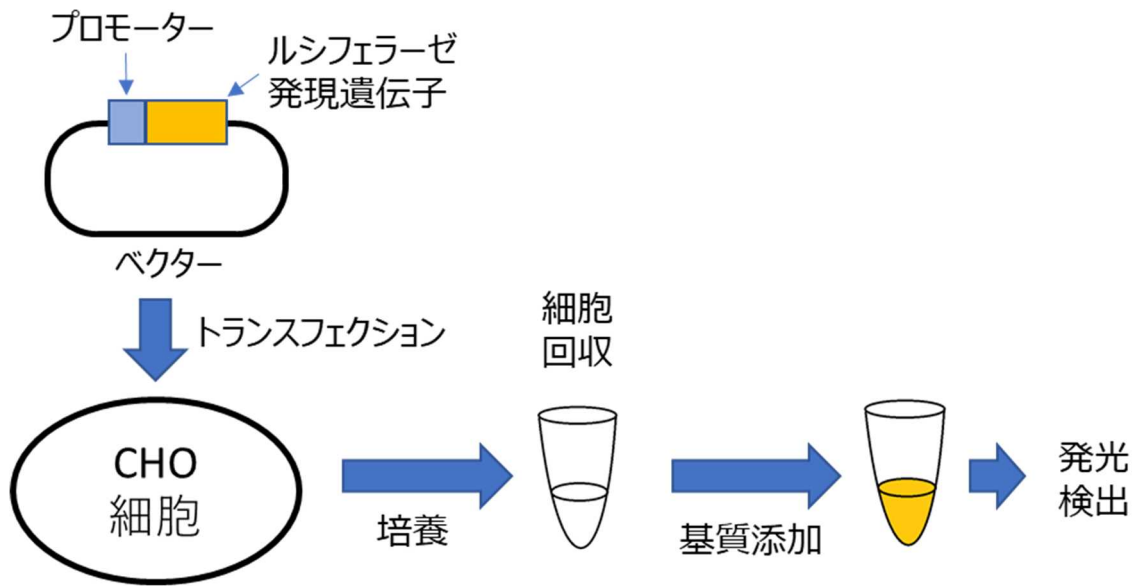


Figure 9 ルシフェラーゼアッセイのフロー

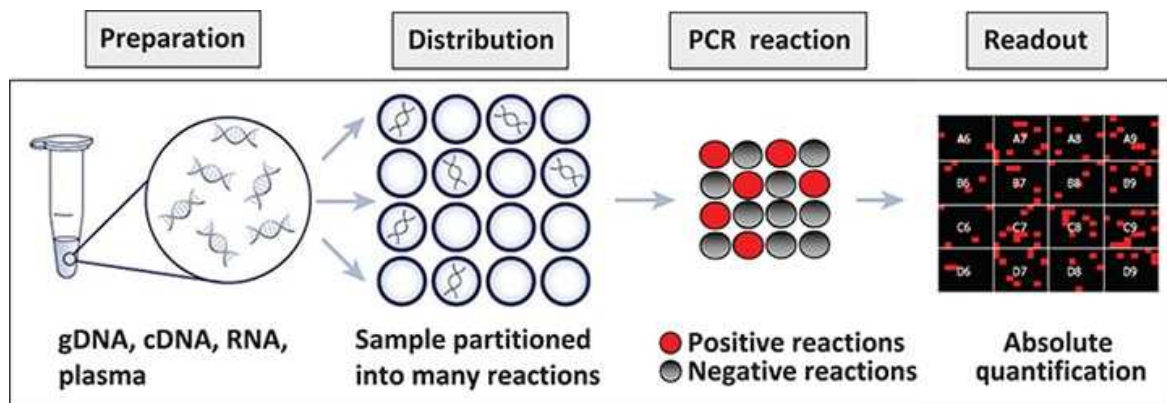


Figure 10 定量 PCR (digital droplet PCR) のフロー

以下の Web サイトより引用：<http://www.miyazaki-u.ac.jp/frontier/news/files/pcr2019.pdf>

Table 2 使用したプライマー配列

(a) プロモーターのクローニング (b) 定量 PCR

a

Promoter	Restriction enzyme		Forward primer sequence	Reverse primer sequence
	Forward	Reverse		
Rps14	XhoI	HindIII	tctctgagGGA ^{CT} CA ^{AG} CA ^{AG} CTCA	tcaagcttTTCTGAGTGG ^{AAG} GAGA ^{ACC}
Gapdh	NheI	XhoI	tcgctagcCACTCAGCAACGAAAGTCCA	tcctcgagTGCCTCTCCGGAGCGAGGCT
Eef1a1	XhoI	HindIII	tctctgagACACAGTGAGTTTGAGGCCA	tcaagcttGTTGGATTGGAATTAGCGGT
Rps11	NheI	XhoI	tcgctagcATGATGAAGGATCTCCAC	tcctcgagCTCCCGGAGCCTGAGGAA
Rplp0	XhoI	HindIII	tctctgagCTTCCTGGAGGTTGCAAAAG	tcaagcttCACGGCGGTGCGTCAGGGAT
Rps4	KpnI	XhoI	tcggtaccGAGAAACCGGAAATCACCC	tcctcgagGGCTGCGCTGGGAAACGGAAA
Hspa5	KpnI	HindIII	tcggtaccTATAGCCCAGGCACACATGA	tcaagcttCTTGCCGCGCTGTGGGCCA
PKM	NheI	XhoI	tcgctagcCTCTTGT ^{TTTT} GAGCTGGGG	tcctcgagGTTTCTGAGGTCCTGGGTC
Rps2	NheI	XhoI	tcgctagcAACTCAAGGGCAAACCTGTG	tcctcgagTTGCTAGAGAAGCAAAAAG
Actb	NheI	HindIII	tcgctagcCCATTGCAGACCAGACAGAA	tcaagcttGGCGAACTATATCAGGGCAC
Chub2	NheI	HindIII	tcgctagcGAATGTTGGGATTGAAGGTG	tcaagcttTGCTGTCCACACACAAC
Rps3	XhoI	HindIII	tctctgagGACAGGGTTTGTGGCATCTT	tcaagcttGGTGTGCTGAGAGAGCCAA
Prdx1	XhoI	HindIII	tctctgagGGGATTAAGTCGTGAGCCA	tcaagcttCTTGCTATCAGCTGAAAAG
Rpsa	KpnI	XhoI	tcggtaccTTGGGAAAGACTGGAGCTAA	tcctcgagTGTTAAGTTTCCCTTATA
Rps25	NheI	HindIII	tcgctagcGCCAGACCAGAGACAAAA	tcaagcttGATGAAGCTCGGAGAGTGGC
Rpl8	XhoI	HindIII	tctctgagGATTTCTCTGCATTCGAGGC	tcaagcttGGCGGCGAGTCTGAAAGGG
Fth1	XhoI	HindIII	tctctgagGTTCCATCCCAAGACTGAA	tcaagcttGGCGGCGCGGCGCGGTGG
Hspd1	KpnI	XhoI	tcggtaccAATTCTGGGTCTTCTGCCT	tcctcgagTCTGGGAGAGGGGGGAAA
Hspa5 (2.5 kb)	NotI	HindIII	ggggggcgccgcTGGTGGTGTAAAGCAC	tcaagcttCTTGCCGCGCTGTGGGCCA
Hspa5 (2.0 kb)	NotI	HindIII	ggggggcgccgcTCCCAACTGGACACAGTAAT	tcaagcttCTTGCCGCGCTGTGGGCCA
Hspa5 (1.5 kb)	NotI	HindIII	ggggggcgccgcAATTCTACCTGTACCACTCA	tcaagcttCTTGCCGCGCTGTGGGCCA
Hspa5 (1.0 kb)	NotI	HindIII	ggggggcgccgcCGGGAACATTATGGGGCGAC	tcaagcttCTTGCCGCGCTGTGGGCCA
Hspa5 (0.6 kb)	NotI	HindIII	ggggggcgccgcGAACTGACACGCAGACCCC	tcaagcttCTTGCCGCGCTGTGGGCCA
Hspa5 (human)	NotI	NheI	gtgttgcggccgcACAGTAGGGAGGGGACTCAGAGC	gtgggctagcCTTGCCAGCCAGTTGGGGAGCAG
Hspa5 (mouse)	NotI	XbaI	ggtggcgccgcATGGTGAAAGTGCTCTTTGACC	ggtggtctagaGCCGCGCTGAGGACCAAGTCGCTC
Hspa5 (rat)	NotI	XbaI	ggtgagcgccgcCTCAACGGAGAAGGGCTCCGGAC	gtaggtctagaCTTGCCGCGCTGTGGACCAGTC

b

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Actβ	GTGCTATGTTGCCCTGGACT	AAGGAAGGCTGAAAAGAGC
Hspa5	CCAGCGCCAAGCAACCAAAG	TATCCAGGCCATACGCAATAGCAG
GPR94	ACCTGCTGCATGTACAGAC	AAAAACTCGCTCGTTCCAGA
GPR170	TCCGTTATTTCAGCACCTC	GTCTGCCTCTGTGGTCAAT
ERdj3	GGAGGTGTTTGTGACGAGT	GCCATCTCTCACACCAAGTT
PDI	CAACAGCCAGACGTCACCTA	TCTGTACAGAGTTCCCTGTG
XBP1 spliced	ACTACTGAAGAGGCTCCAGAGACGG	GAGGTGCACGTAGTCTGAGTGCTG
XBP1 full	ACTACTGAAGAGGCTCCAGAGACGG	TGACAACCTGGGCTGCACCT
Ero1b	AAGCGACCATGTCCTTTTTG	TGCCACGCTTTAATCCAAC
ATF4	AGCACTTCAAACCTCATGGTTCTC	GGTGTCTGAGGCACTGACCAAC
ATF6α	CTCCTCGCTCCGTAGACTCTTG	CTGAGGATGGGCTATTACAGCTTTC
CHOP	GGAAATGAAGAGGGGGAGTC	AGCTGCTTGTGACCTCTGCT
Elf2	TTCTGGAGCTTTCCAGCAAT	GCCCTGCTCTAATCTTGAC
PERK	CCTGGTGGGAACAAAGAAGA	CAATCAGCAACGAAACCTT
IRE1	CCAAACGTGATCCGCTACTT	GCAAAGTCTTCTGCTCCAC
EDEM	TACCAGGCAACCAAGAATCC	GCATACCCGATTTGACTTT
IgG (heavy chain)	TCCGCCTCCTCCTGTACTC	GCTGAGATTGTGAGGGTAAAG
IgG (light chain)	GCCAGCCGAGAACAACTAC	CACGGTCAGCTTGAGTACAG

3. 結果

3.1 Hspa5 プロモーターの取得及び抗体安定生産への活用

3.1.1 トランスクリプトーム解析による高発現遺伝子のスクリーニング

CHO 細胞のゲノムから抗体遺伝子発現向上に活用可能なプロモーターを取得するため、トランスクリプトーム解析により CHO 細胞の各遺伝子の転写量を解析し、高発現遺伝子の特定を試みた。種々の培養条件での各遺伝子の転写レベルを解析するために、IgG1 産生株 (CHO-K1) の 2 つのクローンについて、カスタム培地 G13 及び CD DA1 を用いて培養し、細胞増殖及び抗体濃度の培養経時変化を観察した。培養は以下の 3 条件で実施した；培養条件 1: クローン 1/ G13 培地、培養条件 2: クローン 1/ CD DA1 培地、培養条件 3: クローン 2/ G13 培地。観察の結果、Figure 11 のように細胞増殖、生産された抗体濃度が異なる培養結果が得られた。これらの 3 条件下、培養経時的に取得した細胞から mRNA を抽出し、トランスクリプトーム解析により各遺伝子の転写レベルを網羅的に解析した。培養初期から培養終了時まで高発現していた遺伝子を同定するため、クローン 1 および G13 培地の条件の培養 4 日目の転写量 (RPKM) をランク付けし、最も発現の高かった遺伝子上位 20 個を抽出した (Figure 12、Table 3)。

抽出された遺伝子の中で、*gapdh* と *actβ* はハウスキーピング遺伝子として知られており、*efla* は mAb 産生のための高発現プロモーターとして利用される。その他の高発現遺伝子としては *rps14* をはじめとしたリボソーム関連遺伝子や細胞内の代謝に関わる遺伝子 (*pkm*, *fth1* など) が同定された。高発現している遺伝子のほとんどは培養期間中に転写レベルが低下したが、対照的に *hspa5* [heat shock protein family A (Hsp70) member 5] 遺伝子の発現は培養後期にかけて増加していた (Figure 12)。

3.1.2 ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性評価

同定された転写量上位遺伝子 (Table 3) のプロモーター活性を評価するために、各遺伝子の上流約 3 kb の領域について、pGL4.10 ベクターのホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に接続し、レポーターアッセイによりプロモーター活性を評価した。プロモーター活性は CHO 細胞を用いたルシフェラーゼの一過性発現により評価した。コントロールとして、CHO 細胞で一般的に高発現プロモーターとして用いられている hEF1α プロモーター (hEF1αp) を用いた。その結果、hEF1αp と *hspa5* 遺伝子プロモーター (Hspa5p) について、他の遺伝子よりも高いプロモーター活性を示した (Figure 13)。*hspa5* 遺伝子はトランスクリプトーム解析の結果において培養後期に高発現するというユニークな特徴を有していたため、mAb 産生を増加させる新規高発現プロモーター候補になり得ると考え、ルシフェラーゼを発現するステーブルプールによりさらにプロモーター活性を評価した。

一過性発現評価に用いたベクター (hEF1αp 及び Hspa5p) を用いて、ルシフェラーゼを発現するステーブルプールを作製し、フェドバッチ培養によって培養経時的なルシフェラーゼ活性を評価した。培養期間中、経時的に細胞サンプルを取得しルシフェラーゼ活性を測定した結果、Hspa5p でのルシフェラーゼ活性は培養後期にかけて増加していた。一方で、hEF1αp を用いた場合は培養経時的にルシフェラーゼ活性が低下していた (Figure 13)。これは、*hspa5* の mRNA

レベルが培養後期にかけて大きく増加していたトランスクリプトーム解析の結果と一致しており、Hspa5p が培養後期に発現量が向上する新規抗体発現プロモーターとして活用できる可能性を示す結果が得られた。

3.1.3 Hspa5 プロモーターでの抗体生産性評価

Hspa5p が安定的な抗体高生産プロセスに利用できることを確認するために、Hspa5p を抗体 (IgG1) 重鎖及び軽鎖の上流にそれぞれ接続し、抗体を発現するステーブルプールを構築した。これまでの実験と同様に、コントロールとして hEF1 α p も用いた。抗体産生能を評価するため、構築したステーブルプールを G13 培地にてフェドバッチ培養し、経時的に抗体遺伝子転写量、細胞あたりの抗体生産性 (specific production ratio、SPR)、IgG 濃度 (titer) を評価した。

培養の結果、抗体遺伝子転写量及び SPR は Hspa5p を用いたステーブルプールにおいて培養後期まで維持されており、ルシフェラーゼアッセイデータを再現する結果が得られた (Figure 14)。一方でコントロールの hEF1 α p を用いた場合は抗体遺伝子転写量及び生産性は培養後期にかけて低下していた。また、培養 14 日目の抗体収量 (titer) もコントロールの hEF1 α p と比較して向上することが示された (Figure 14)。細胞増殖及び細胞生存率の培養経時的な推移はプロモーターによらず同等であった。これらの結果から、Hspa5p を抗体発現に用いることにより、転写レベルで抗体発現量を改善し、結果として抗体収量を向上させることが示された。

3.1.4 Hspa5 プロモーターの最適化

Hspa5p での抗体生産性をさらに向上させるため、プロモーター領域配列の最適化を検討した。まず、*in silico* にてプロモーター配列の詳細な解析を行った。NCBI のデータベースより、各生物種 (チャイニーズハムスター、ヒト、マウス、ラット) の *hspa5* 上流領域 (約 3 kb) の配列情報を取得し、遺伝子配列ソフトウェア (GENETYX) を用いたホモロジー解析により、*hspa5* 遺伝子上流領域の保存性を解析した。ヒト、マウス、ラットの *hspa5* 遺伝子上流領域を比較したところ、チャイニーズハムスターとの相同性はそれぞれ 66%、78%、78%であった。また、遺伝子上流約 0.6 kb の保存性が高いことが示され、この領域でのチャイニーズハムスターの配列との相同性はヒト 72%、マウス 85%、ラット 84%であった (Figure 15、コンセンサス配列①)。通常、共通配列には転写因子結合領域が含まれることが示唆されることから、この領域の配列を詳細に解析した。その結果、*hspa5* 遺伝子上流約 0.6 kb の領域にコアプロモーターエレメントである TATA-box、CpG アイランド、CCAAT-box、GC-box がコンセンサス配列に存在した (Figure 16)。さらに、Hspa5p の転写因子結合配列である ER stress-responsive elements (ERSE) (Mao, Tai et al. 2006, Casas 2017) がこの領域に含まれていた。これらの結果から、*hspa5* 遺伝子上流約 0.6 kb が Hspa5p のプロモーター活性に重要であることが示唆された。また、2.0~2.5 kb 上流付近にもコンセンサス配列が存在することが示唆された (Figure 15、コンセンサス配列②)。この領域に Hspa5p 活性に関わる遺伝子や転写因子結合配列が存在するか確認するため、BLAST 検索による相同性検索を実施した。その結果、この領域との間に高い相同性のある遺伝子配列は認められなかった (Table 4)。

3.1.5 生物種による Hspa5p の活性評価

異なる生物種の Hspa5p プロモーター配列を用いることで抗体生産性が向上するか検証するため、チャイニーズハムスター、ヒト、マウス、ラットの *hspa5* 遺伝子上流領域 (約 1.0 kb) をクローニングし、抗体遺伝子上流に挿入し、フェドバッチ培養によって抗体生産量を評価した。その結果、抗体生産性 (SPR 及び titer) はチャイニーズハムスター由来 Hspa5p と同等であることが示された (Figure 17)。このことから、*hspa5* 遺伝子のプロモーター活性に関わるエレメントは、異種間でも保存されている配列に含まれていることが示唆された。プロモーター活性に差がなかったことから、以降の評価にはこれまでの検討で用いてきたチャイニーズハムスター由来の Hspa5p を使用することとした。

3.1.6 Hspa5p のプロモーター長の最適化

次に、Hspa5p プロモーター長の抗体発現への影響を検証した。*in silico* 解析から、*hspa5* 遺伝子上流 0.6 kb 領域にプロモーターエレメントが存在することが示唆されたため、プロモーター領域を 3.0 kb から約 0.5 kb ずつ、約 0.6 kb まで短縮し、最小のプロモーター長を特定した。*hspa5* 遺伝子上流領域 (3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、および 0.6 kb) を抗体遺伝子上流に挿入し、フェドバッチ培養によって抗体生産量を評価した結果、評価した中で最小の長さである 0.6 kb で抗体生産性が最大となり、クローニングした元配列 (3.0 kb) と比較して生産性が 1.4 倍程度に向上し、コントロール (hEF1 α) と比較して 2 倍程度の生産性となることが示された (Figure 18)。一方、*in silico* 解析の結果、*hspa5* 上流 2.0~2.5 kb 付近にコンセンサス配列があることが示唆されていたが、この領域を削除しても Hspa5p が高発現だったことから、Hspa5p の転写活性に寄与しないことが示唆された。

先行研究では Hspa5p のさらなる欠失変異体は、遺伝子発現レベルが低くなった (Lee 2005, Mao, Tai et al. 2006, Banach, Jiang et al. 2019) ことから、*hspa5* の開始コドンからその上流 0.6 kb までの領域を Hspa5p の最小プロモーター領域と同定し、以降の研究に使用した。

3.1.7 IgG サブクラス間での生産性評価

Hspa5p が各種抗体医薬品製造に汎用的に使用できることを検証するために、異なるジスルフィド結合パターンを有する種々のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG4Pro) を CHO 細胞で発現させた。フェドバッチ培養で抗体生産性を評価した結果、コントロール (hEF1 α) と比較して、これまでの IgG1 での結果と同様に、各サブクラスにおいて培養後期に細胞あたりの生産性が増加し、抗体濃度 (titer) が向上した (Figure 19)。一方で、細胞増殖、代謝はプロモーターによらず顕著な差は見られなかった (Figure 20)。また、産生された抗体品質について、抗体重合体含量及び断片体含量 (Size Exclusion Chromatography, SEC) 及び N 型糖鎖プロファイルを分析した結果、プロモーターによる顕著な差は見られず、Hspa5p を用いた場合でも抗体医薬品として使用できる品質の抗体が産生されることが示された (Figure 21)。

続いて、各サブクラスの IgG を発現させた細胞について、抗体遺伝子及び内因性 *hspa5* 遺伝

子の転写量を解析した。定量的 PCR の結果、Hspa5p の制御下にある IgG 遺伝子の転写レベルは、各 IgG サブクラス (IgG1、IgG2、IgG4Pro) について hEF1 α p よりも高いことが示された (Figure 22)。しかし、異なる IgG サブクラスを産生する細胞における内因性 *hspa5* 遺伝子の発現レベルに差は認められなかった (Figure 22)。このことから、発現させる抗体の配列によらず *hspa5* 遺伝子は高発現しており、Hspa5p で高い抗体生産性が得られることが示された。

3.1.8 モノクローン株の生産性評価

これまでの Hspa5p 抗体生産性評価はステابلプールによって実施してきたが、医薬品製造ガイドラインである ICH Q5D において、抗体医薬品製造に用いられる CHO 細胞は 1 細胞由来のモノクローンであることが求められている。モノクローン株での抗体医薬品生産において Hspa5p が活用可能か検証するため、抗体発現ステابلプールと同様にモノクローン株でも高生産となるか検証した。Hspa5p 下流に抗体遺伝子を接続したベクターを用いて構築した CHO 細胞ステابلプールについて、限界希釈法によってモノクローン化を実施した。取得したモノクローン株について、抗体染色によって高発現上位クローンを選抜し、選抜されたクローンについてフェドバッチ培養にて抗体生産性を評価した。その結果、ステابلプールと同様に培養後期に生産性が向上する特徴を示したことから、モノクローンにおいても同様に高発現となることが示された (Figure 23)。

3.2 小胞体ストレス応答と Hspa5p による抗体生産との相関

3.2.1 CHO 細胞における小胞体ストレス関連遺伝子の発現量の詳細解析

これまでの結果から、Hspa5p が新たな抗体安定発現系として利用できることが明らかとなった。*hspa5* は、別名 BiP、GRP78 などとしても知られる ER ストレス応答性シャペロン Hspa5 をコードし、小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response、UPR) において発現が活性化されることが知られている (Wang, Lee et al. 2017) (Figure 24)。Hspa5p が高発現となる機構を解明するため、CHO 細胞における小胞体ストレス応答について、詳細に解析した。

本研究で用いた CHO 細胞において、小胞体ストレス関連因子の発現を確認するため、トランスクリプトーム解析の結果から、小胞体ストレスに関連する遺伝子を抽出し解析した。小胞体に局在する因子としては KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) のデータベースより Pathway map (map04141: Protein processing in endoplasmic reticulum) (Figure 25) に記載されている遺伝子を抽出した。各遺伝子の転写量 (RPKM) を解析した結果、Hspa5、Hspa90 (Grp94)、そして PDI ファミリーといった ER シャペロンが強く発現していることが分かった。また、主要な小胞体ストレス応答経路 (ATF6 経路、PERK 経路、IRE1 経路、アポトーシス経路) に関連する各種遺伝子についても発現していることが確認された (Table 5)。このことから本研究で用いた CHO 細胞において、小胞体ストレスが惹起されていることが示唆された。また、Hspa90b1 (Grp90) など一部の遺伝子について、Hspa5 と同様に培養 7~14 日目にかけて発現が上昇している傾向が見られた (Table 5)。

3.2.2 Hspa5p での抗体発現と UPR 遺伝子発現との相関

Hspa5p での抗体生産が高発現となる機構を解明するため、Hspa5p による抗体生産と UPR 遺伝子発現との関係性を評価した。抗体生産性と UPR の相関を確認するために、異なる抗体生産性を示した CHO 細胞 (Hspa5p で IgG1 を発現させた CHO-K1) モノクローン (#6、#30、#33、#42、#48 の 5 株) を培養し、培養 7 日目と 10 日目の *hspa5* 遺伝子と各種 UPR 関連遺伝子の転写レベルを解析した。その結果、興味深いことに、抗体生産性及び抗体重合体 (ゲルろ過クロマトグラフィーで検出された high molecular weight species, HMWS) の割合と、UPR 関連遺伝子の発現量にも相関が見られた。抗体生産性に関しては、様々な ER ストレス応答経路に関連する PERK、IRE1、ATF6 の遺伝子転写レベルとの相関が認められた (Figure 26、Figure 28)。また、抗体重合体の含量と、GRP94 や ERdj3 などの ER シャペロンとの相関も見られた (Figure 27、Figure 28)。さらに、Ire1 経路下流の転写因子である *xbp1* について、Figure 29 に示したようにスプライシング領域を含むプライマーを用いることで *xbp1* mRNA のスプライシング率を検出した結果、*xbp1* mRNA のスプライシング率も抗体生産性および重合体含量と相関を示した (Figure 27、Figure 28)。

3.2.3 小胞体ストレス誘導剤添加の影響評価

Hspa5p での抗体生産性と小胞体ストレス応答遺伝子発現に相関が見られたことから、小胞体ストレス誘導によってさらに抗体生産性を向上させられる可能性が考えられた。これを検証するため、小胞体ストレスが誘導される条件を検討し、検討した小胞体ストレス誘導条件において Hspa5p での抗体生産性が向上するか検証した。

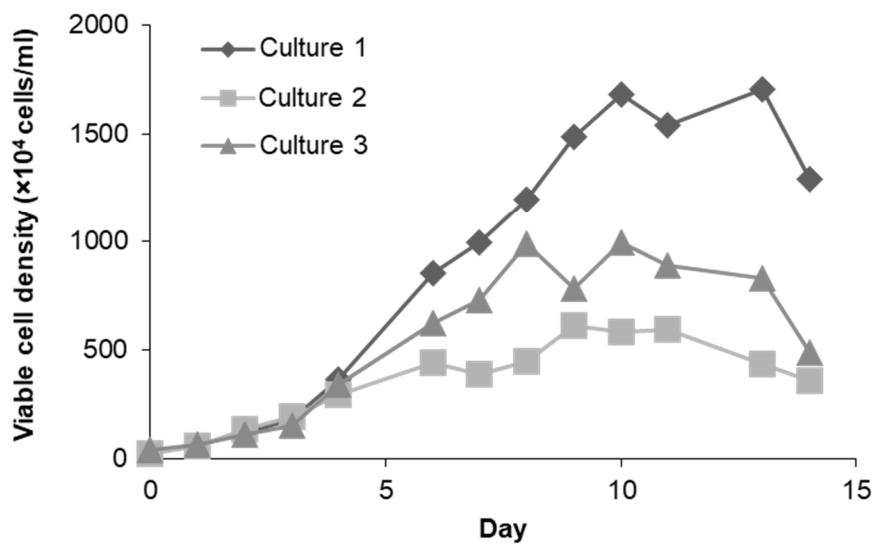
小胞体ストレスが誘導される条件として各種添加剤を検討した。まず、N 型糖鎖付加阻害剤としてツニカマイシン、プロテアソーム阻害剤である MG132 およびオートファジー阻害剤であるクロロキンの添加による影響を検証した。培養 3 日目及び 7 日目、添加濃度として Table 6 に示した濃度を検討した。培養の結果、各阻害剤の添加条件において、細胞増殖が低下する条件が見られた (Figure 30)。これらの条件において小胞体ストレスが誘導されているか確認するため、ウエスタンブロッティングによって、Hspa5 の発現状態を確認した。その結果、ツニカマイシンを添加した条件において Hspa5 が増加した (Figure 31)。一方で、MG132 およびクロロキンを添加した条件では Hspa5 の発現増加は見られなかった。

続いて、小胞体ストレス誘導剤として、還元剤 DTT、Ca²⁺-ATPase 阻害剤タプシガルジン、タンパク質輸送阻害剤ブレフェルジン A の添加を検討した。フェドバッチ培養 7 日目に各種小胞体ストレス誘導剤 (DTT、タプシガルジン、ツニカマイシン、ブレフェルジン A) を添加し、培養 10 日目に内因性 *hspa5* 転写量を解析した。添加条件は Table 7 に示した。フェドバッチ培養には Hspa5p 抗体発現モノクローンをを用いた。生存率が低下傾向 (Figure 32) であった条件で取得した細胞について、定量 PCR によって *hspa5* 遺伝子の転写量を解析した結果、DTT 及びツニカマイシンを添加した条件において、内因性 *hspa5* 遺伝子の転写レベルが大きく上昇することが示された (Figure 33)。*xbp1* mRNA のスプライシング率も同様に DTT 及びツニカマイシンを添加した条件においてが増加していることが確認された (Figure 33)。一方で、タ

プシガルジン及びブレフェルジン A については本研究で実施した添加条件では小胞体ストレス誘導は見られなかった。以上の結果から、本研究に用いた CHO 細胞において、ツニカマイシン及び DTT を添加した場合に小胞体ストレスが誘導されることが示された。

最後に、小胞体ストレス誘導条件(ツニカマイシン及び DTT の添加条件)下における、Hspa5p で抗体遺伝子発現を制御する場合の抗体生産性を検証した。その結果、小胞体ストレスが誘導され、内因性の *hspa5* 遺伝子転写量は増加しているにもかかわらず、Hspa5p 下で発現する抗体遺伝子の転写レベル及び SPR は DTT 及びツニカマイシンの添加条件では向上しなかった (Figure 32、Figure 33)。

a



b

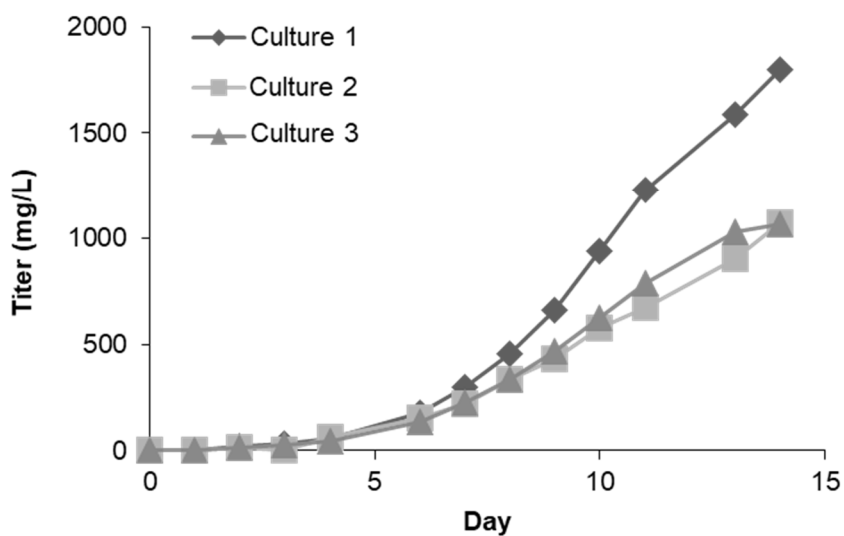
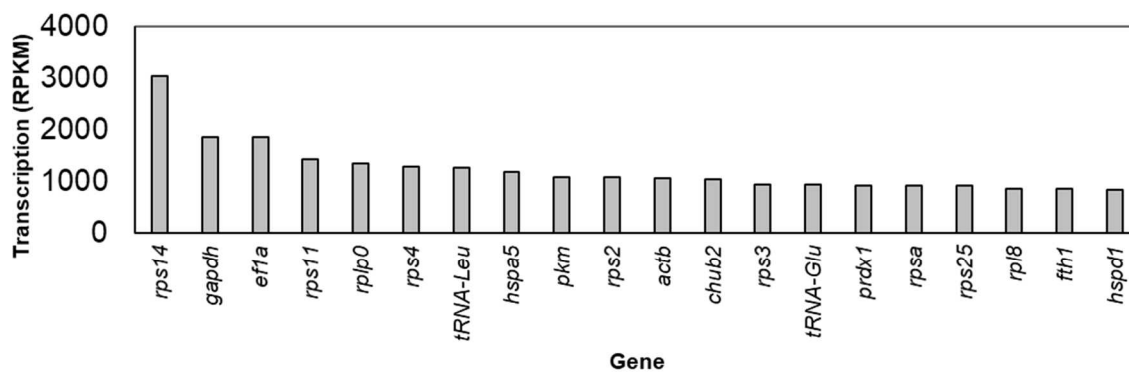


Figure 11 トランスクリプトーム用の細胞培養結果

以下の 3 条件の細胞及び培地の組み合わせで細胞培養を行った。Culture:1:クローン 1/ G13 培地、Culture 2:クローン 1/CD DA1 培地、Culture3: クローン 2/G13 培地。培養 4、7、9、11、14 日目にトランスクリプトーム解析用の細胞サンプルを取得した。

(a) 細胞増殖、(b) 生産された抗体濃度

a



b

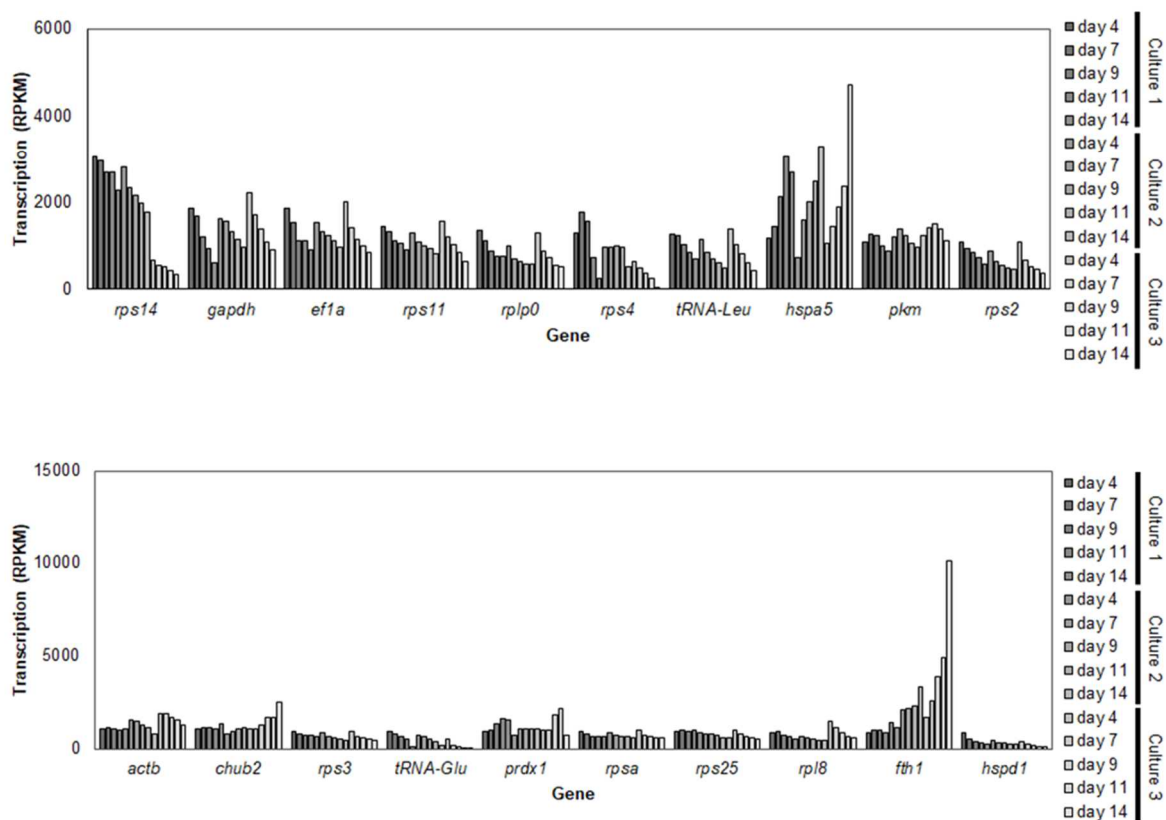


Figure 12 トランスクリプトーム解析結果

(a) Culture 1 (クローン 1 および G13 培地) の培養 4 日目の転写量 (RPKM) をランク付けした上位 20 遺伝子。(b) 各遺伝子の培養経時的な転写量

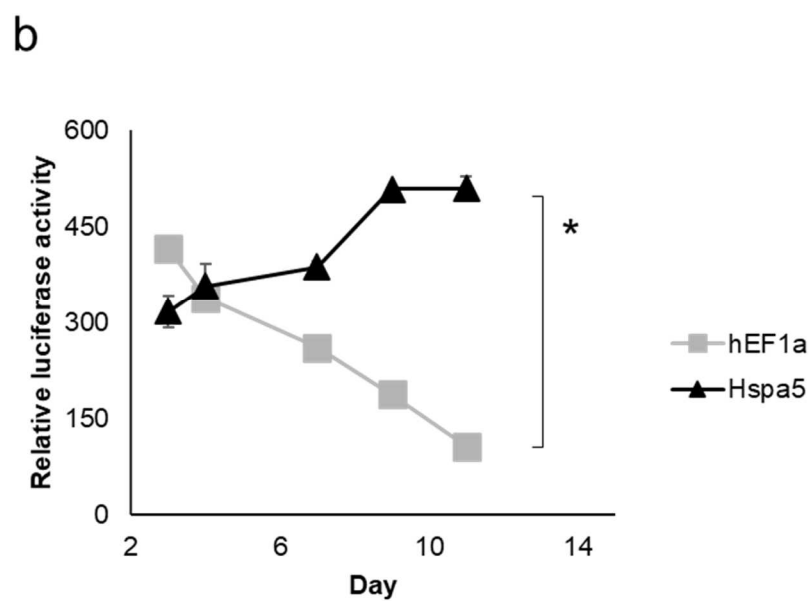
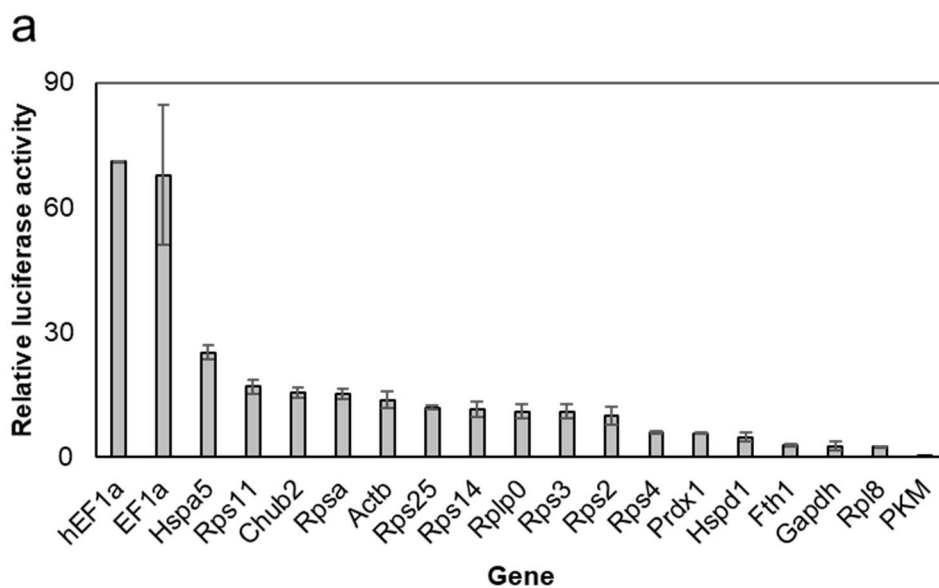


Figure 13 ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性評価

(a) 一過性発現細胞プール (n=2) における高発現候補プロモーターのルシフェラーゼアッセイ (b) スターブルプールのルシフェラーゼ発現レベルの培養時間経過。*12日目のt検定で $P < 0.05$ (n=2)。

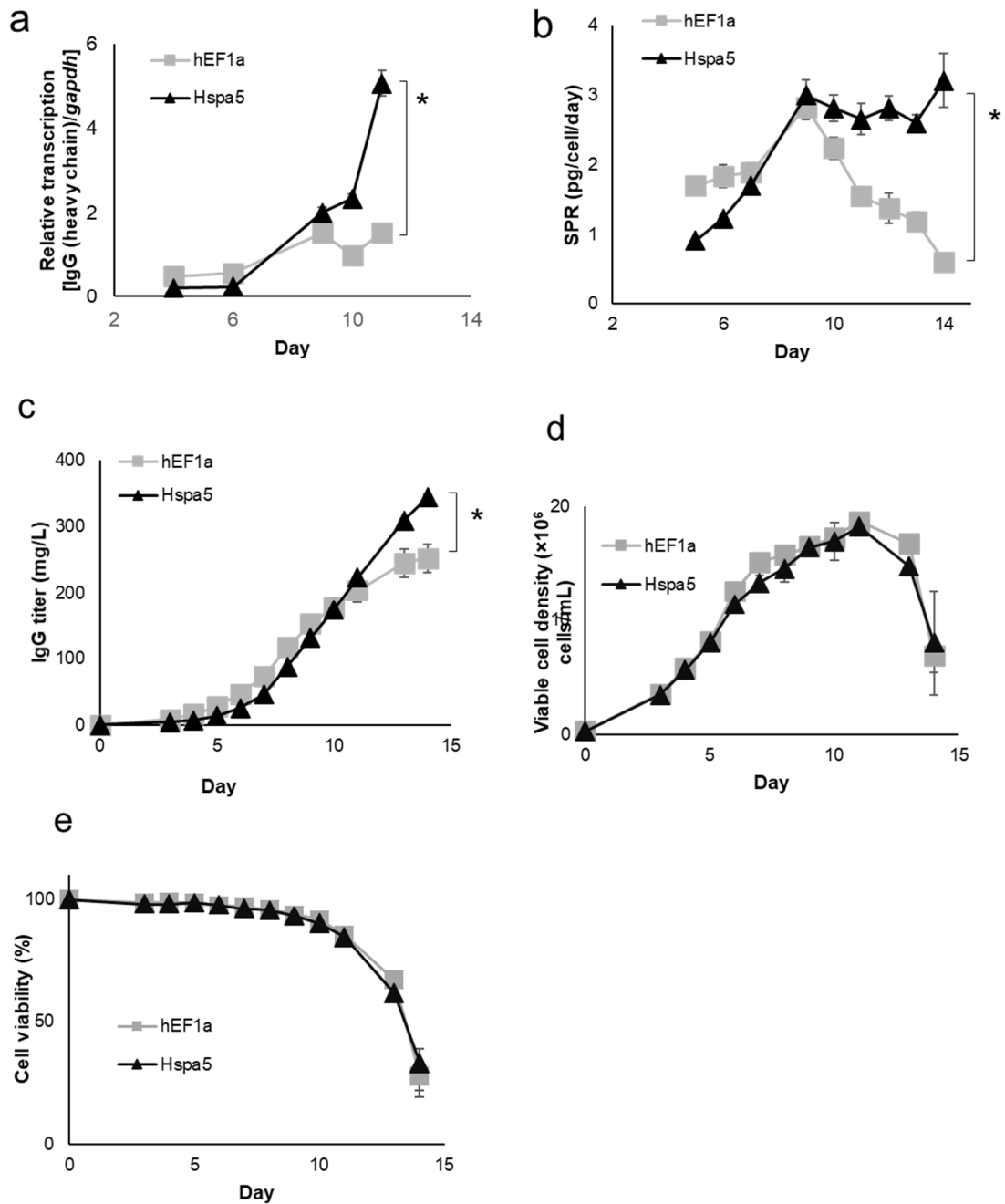
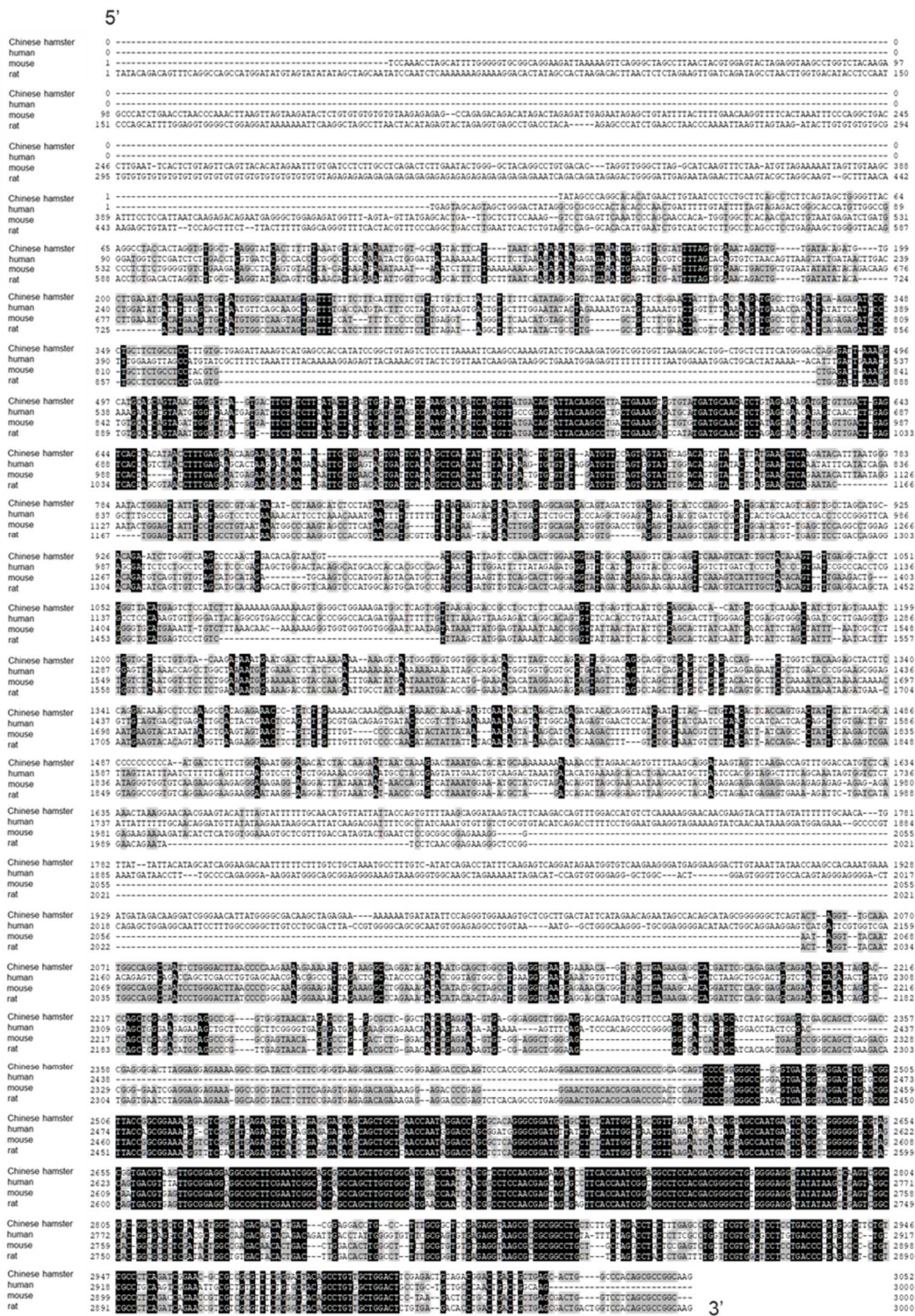


Figure 14 Hspa5p での抗体生産性評価

(a) IgG (H 鎖) の遺伝子発現の培養時間経過。 *gapdh* 遺伝子を内部コントロールとして用いて相対的転写レベルを算出した。*12 日目の t 検定で $P < 0.05$ ($n = 2$)。 (b) 細胞あたりの IgG 産生 (SPR) の培養時間経過。*14 日目の t 検定で $P < 0.05$ ($n = 2$)。 (c) 培養液中に生産された抗体濃度 (IgG titer) の培養時間経過。*14 日目の t 検定で $P < 0.05$ ($n = 2$)。 (d) 細胞増殖。 (e) 細胞生存率。



コンセンサス配列②

コンセンサス配列①

Figure 15 *hspa5* 遺伝子上流領域の保存性

異なる種（チャイニーズハムスター、ヒト、マウス、ラット）の *hspa5* 遺伝子上流領域を比較した結果。*hspa5* 遺伝子上流約 0.6 kb（コンセンサス配列①）及び 2.0~2.5 kb（コンセンサス配列②）に保存性の高い領域が見いだされた。

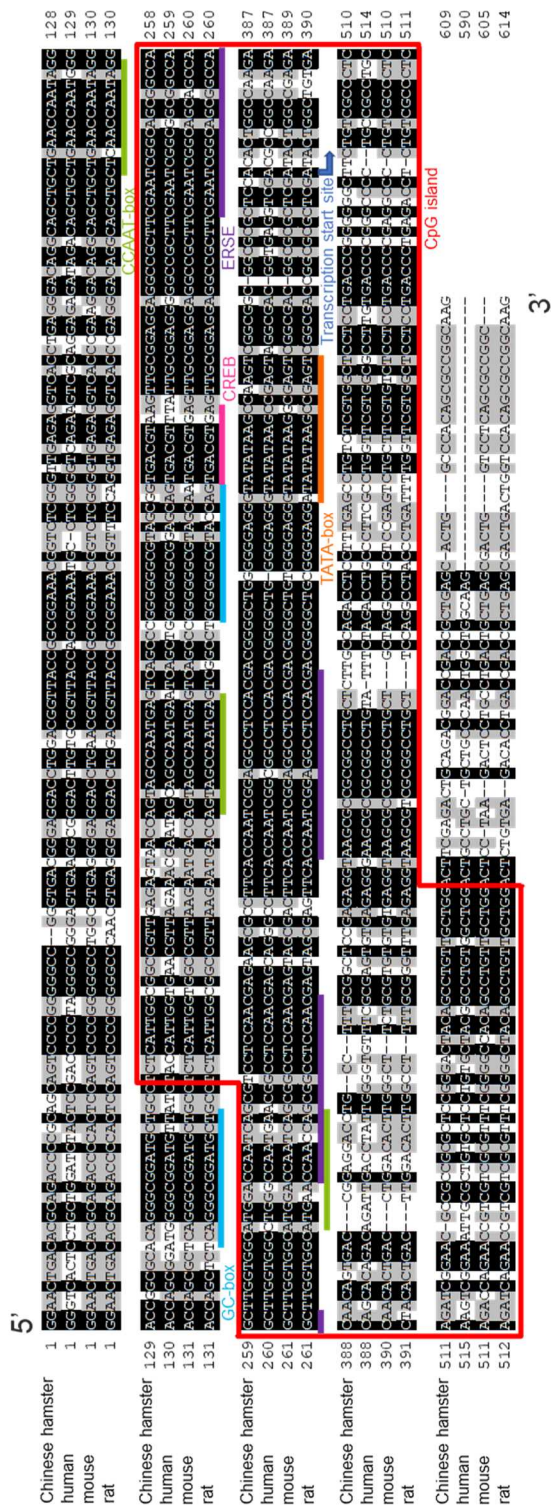
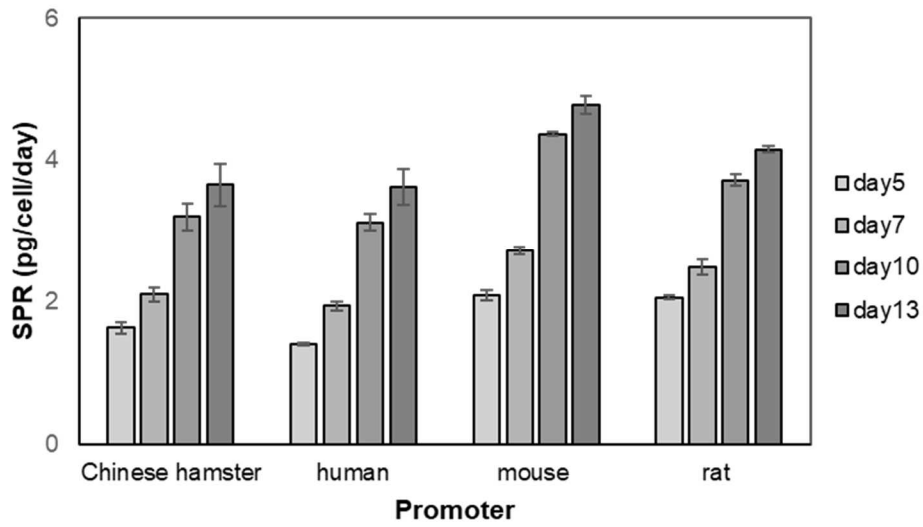


Figure 16 *hspa5* 遺伝子上流領域の詳細解析

コアプロモーターエレメントである TATA-box、CpG アイランド、CCAAT-box、GC-box および、Hsp5p の転写因子結合配列である ER stress-responsive elements (ERSE) が見いだされた。転写開始部位は NCBI データベース (NM_001246739.2) の mRNA 配列により同定した。

a



b

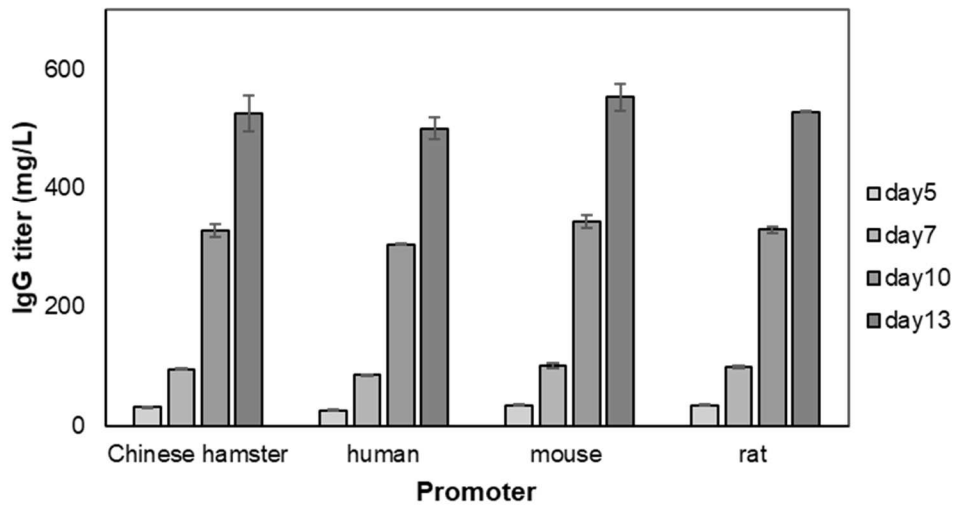


Figure 17 異種 Hspa5p での抗体生産性評価

チャイニーズハムスター、ヒト、マウス、ラットの *hspa5* 遺伝子上流領域 (約 1.0 kb) を抗体遺伝子上流に挿入し、フェドバッチ培養によって抗体生産量を評価した (n=2)。(a) SPR (b) 培養液中に生産された抗体濃度。

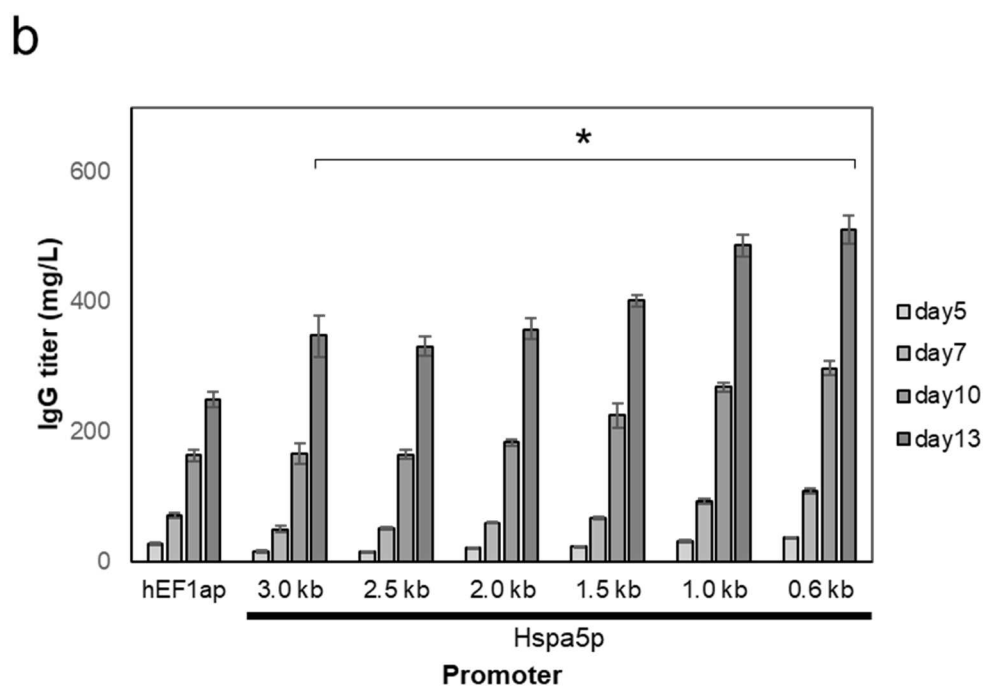
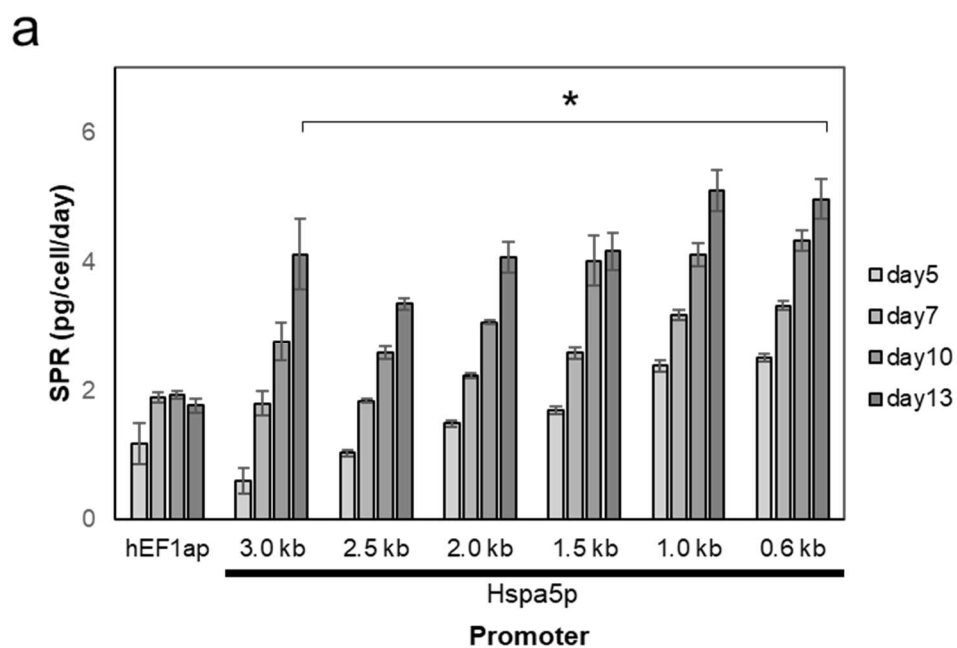
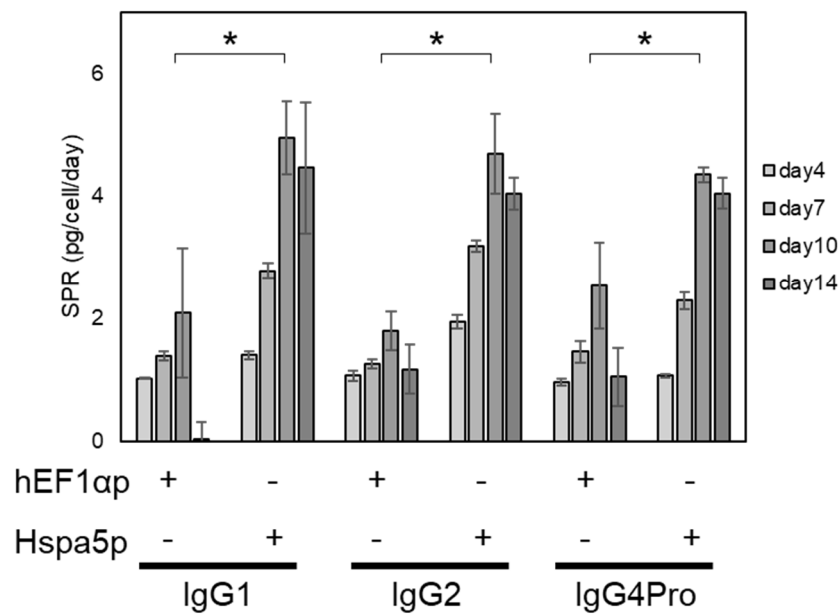


Figure 18 各プロモーター長での抗体生産性評価

hspa5 遺伝子上流領域 (3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、および 0.6 kb) を抗体遺伝子上流に挿入し、フェドバッチ培養によって抗体生産量を評価した (n=2)。(a) SPR (b) 培養液中に生産された抗体濃度。*13 日目の t 検定で P<0.05 (n=2)。

a



b

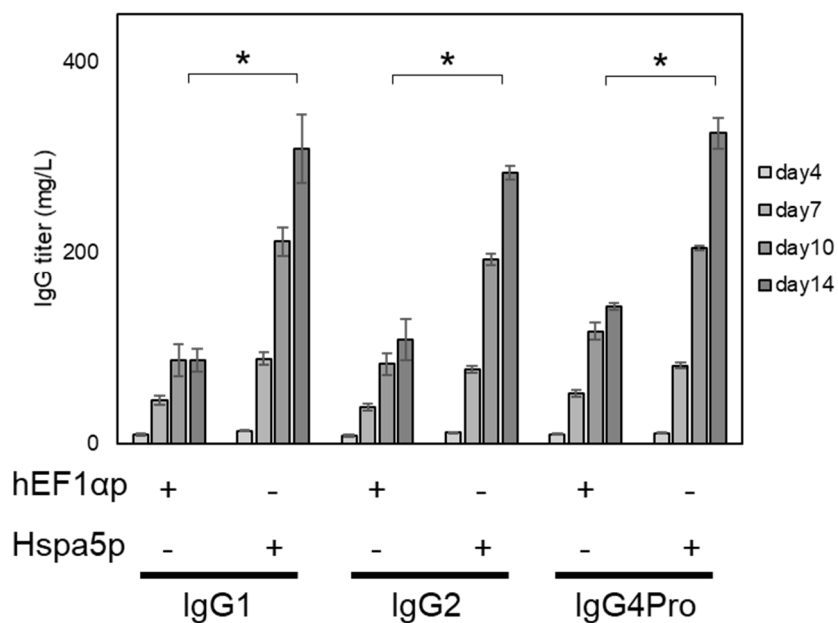


Figure 19 各 IgG サブクラスでの抗体生産性評価 (抗体生産性)

異なるジスルフィド結合パターンを有する種々のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG4Pro) を CHO 細胞で発現させた。フェドバッチ培養で抗体生産性を評価した (n=3)。(a) SPR (b) 培養液中に生産された抗体濃度。*14 日目の t 検定で P<0.05 (n=3)。

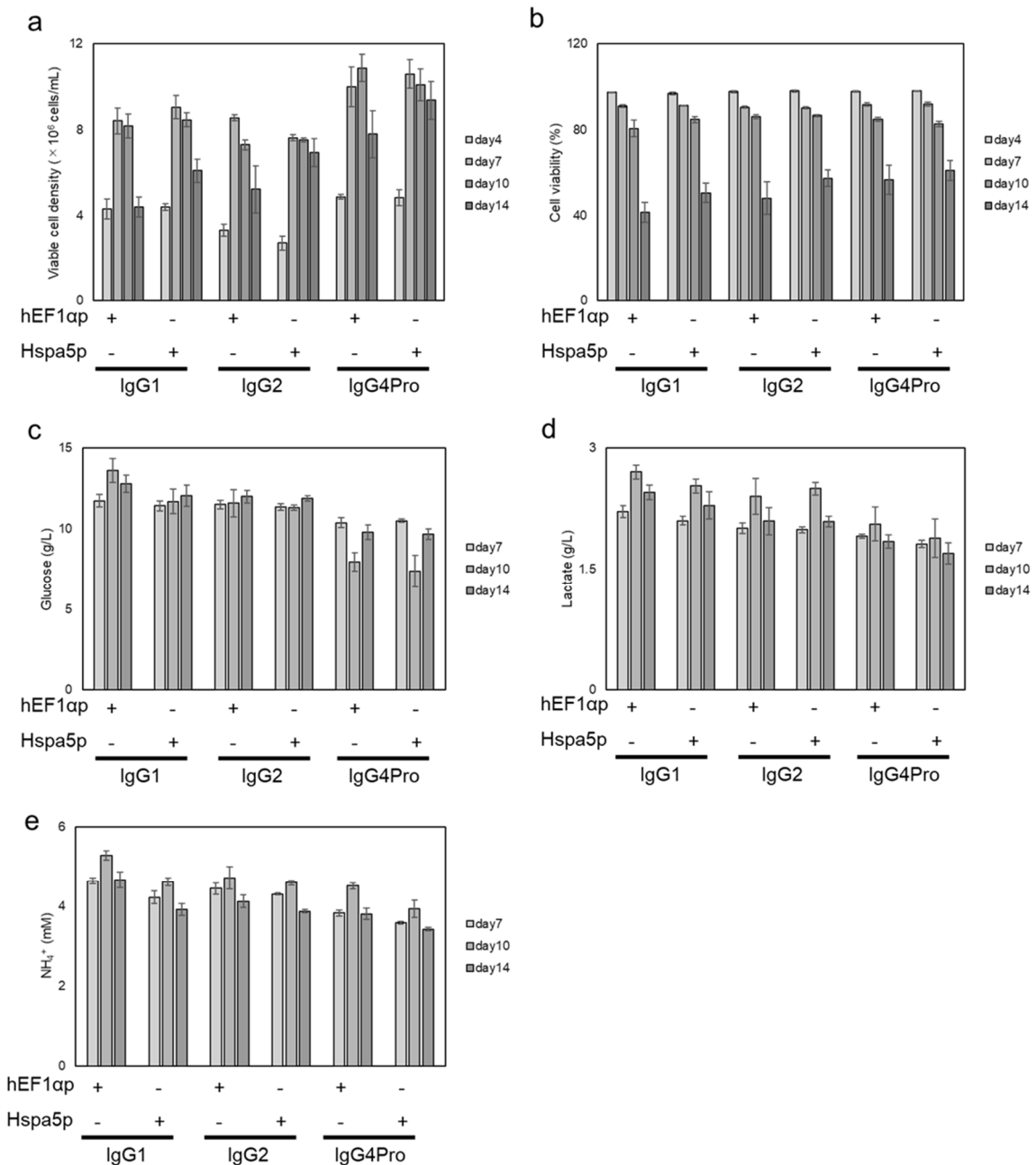


Figure 20 各 IgG サブクラスでの抗体生産性評価（細胞増殖及び代謝プロファイル）

異なるジスルフィド結合パターンを有する種々のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG4Pro) を CHO 細胞で発現させた。フェドバッチ培養で抗体生産性を評価した (n=3)。(a) 細胞増殖 (b) 細胞生存率 (c) 培養液中のグルコース濃度 (d) 培養液中の乳酸濃度 (e) 培養液中のアンモニウムイオン濃度。

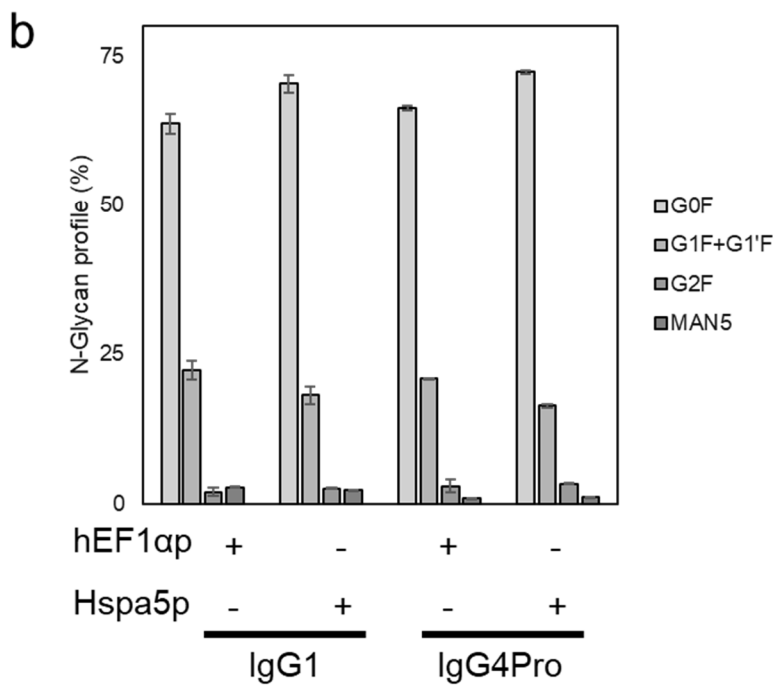
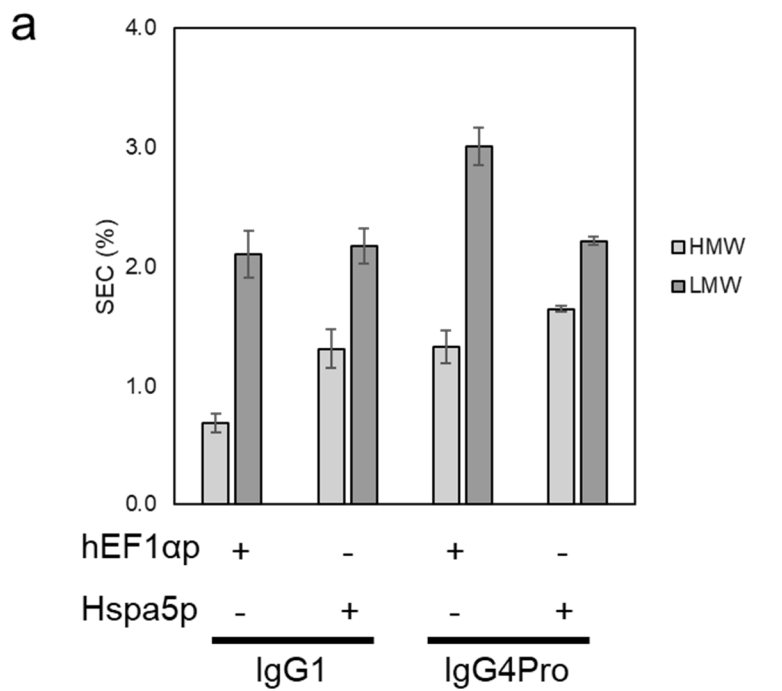


Figure 21 各 IgG サブクラスでの抗体生産性評価 (産生された抗体品質)

異なるジスルフィド結合パターンを有する種々のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG4Pro) を CHO 細胞で発現させた。フェドバッチ培養で抗体生産性を評価した (n=3)。(a) SEC (b) N 型糖鎖。

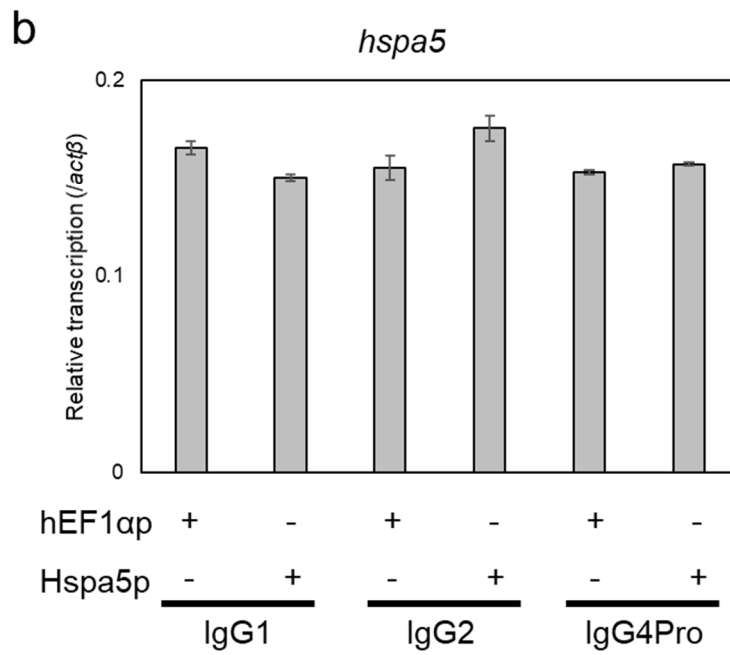
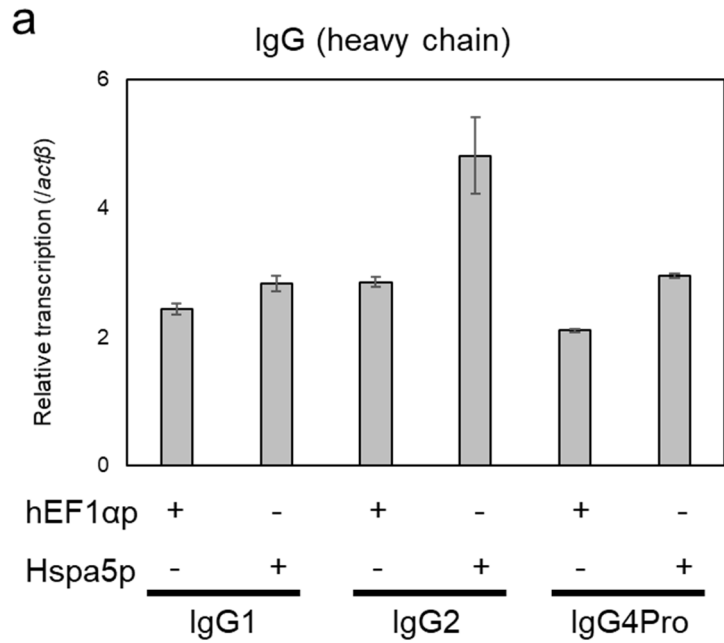
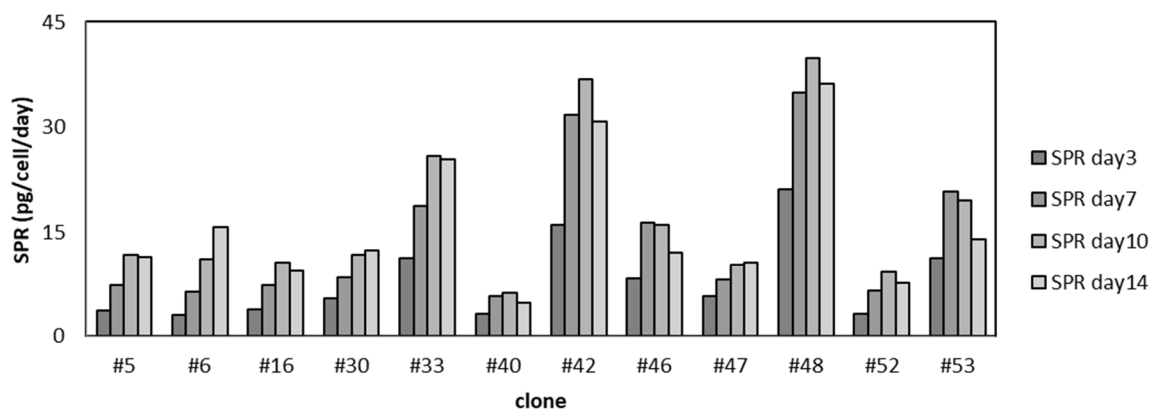


Figure 22 各 IgG サブクラスでの抗体生産性評価 (IgG 及び *hspa5* 遺伝子転写量)

異なるジスルフィド結合パターンを有する種々のサブクラス (IgG1, IgG2, IgG4Pro) を CHO 細胞で発現させた。フェドバッチ培養で抗体生産性を評価した (n=3)。(a) 抗体 (重鎖) 遺伝子転写量 (b) 内因性 *hspa5* 遺伝子転写量。

a



b

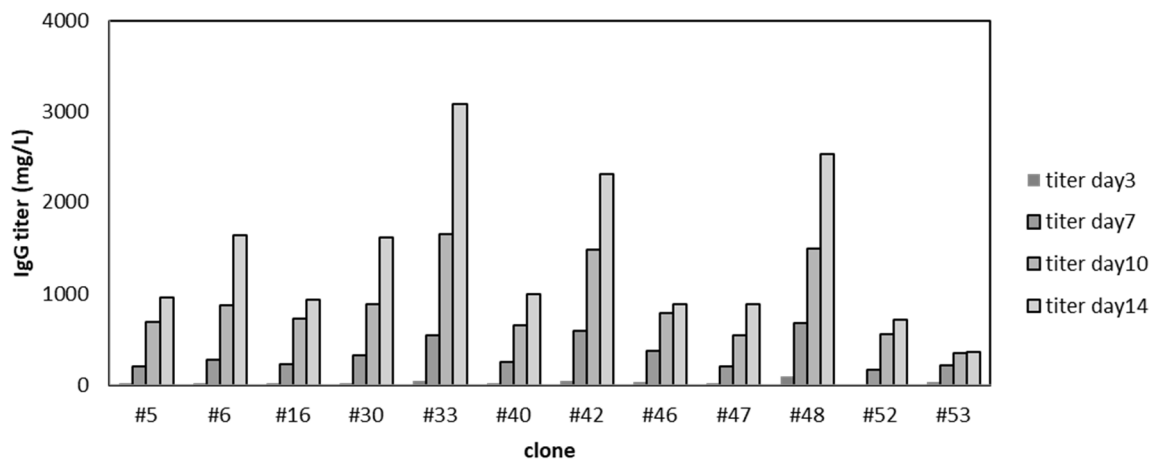


Figure 23 モノクローン株での生産性評価

モノクローン化して取得した生産性上位 12 株について、フェドバッチ培養で抗体生産性を評価した。(a) SPR (b) 培養液中に生産された抗体濃度。

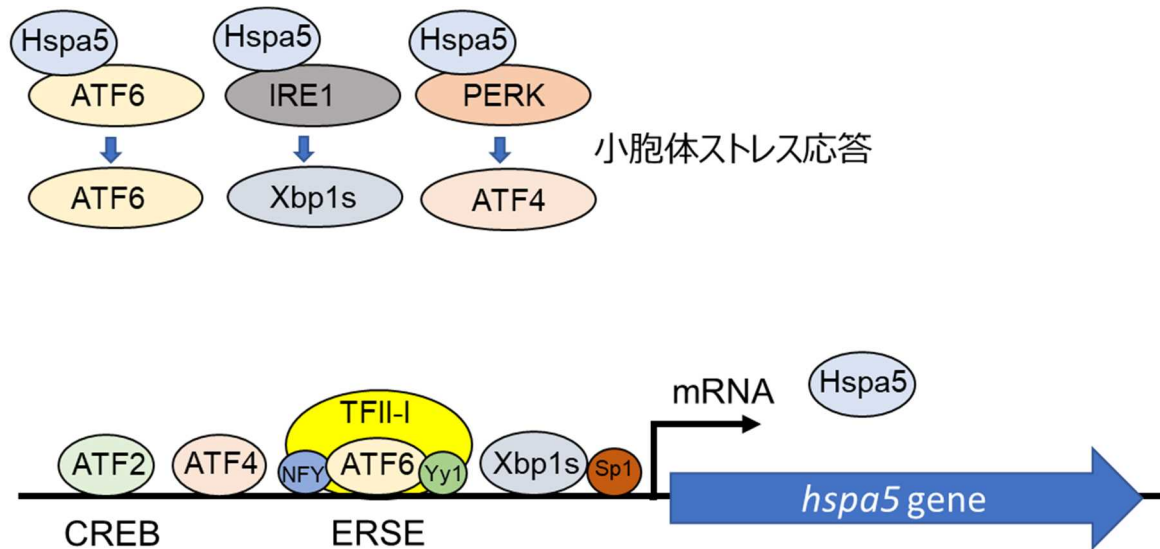


Figure 24 Hspa5 発現制御機構

Hspa5 は Heat shock protein 70 ファミリーに属する ER シャペロンであり、基質結合ドメインを介してタンパク質の疎水性領域に結合し、ATPase ドメインによる ATP の加水分解によって立体構造を変化させてフォールディングを促進する (Davis, Schooley et al. 2000, Borth, Mattanovich et al. 2005, Mohan and Lee 2010)。グルコースを含まない培地で培養されたニワトリ胚線維芽細胞において強く誘導される 78-kDa タンパク質として 1977 年に初めて発見された (Shiu, Pouyssegur et al. 1977)。

Hspa5 発現向上の分子機構は複数存在し、CCAAT ボックス (Resendez, Wooden et al. 1988)、cAMP 応答エレメント (CREB) (Alexandra, Nakaki et al. 1991)、および ER ストレス応答エレメント (ERSE) (Resendez, Wooden et al. 1988) などの *hspa5* 遺伝子のプロモーターにおいて保存されたエレメントが関わっている (Li and Lee 2006)。これらの領域を欠如することによって *hspa5* 転写活性が大きく減少することが報告されている (Lee 2005, Mao, Tai et al. 2006)。また、Hspa5p に結合する転写因子は複数存在し、CBF/NF-Y (Roy and Lee 1995)、CREB、活性化転写因子 2 (ATF-2) (Chen, Hung et al. 1997)、YY1、YB1、Sp1 (Li, Hsiung et al. 1997)、ATF4 (Luo, Baumeister et al. 2003)、TFII (Parker, Phan et al. 2001)、ATF6 (Yoshida, Okada et al. 2001)、および XBP1 (Yoshida, Matsui et al. 2001) などがある。また、転写後調節機構としては、Hspa5 mRNA の 5'非翻訳領域における IRES (internal ribosome entry site) の活性化によって制御される機構 (Macejak and Sarnow 1991) などがある。なお、Hspa5p にはヒートショック関連因子が存在せず、ヒートショックによっては誘導されないことが知られている (Casas 2017)。

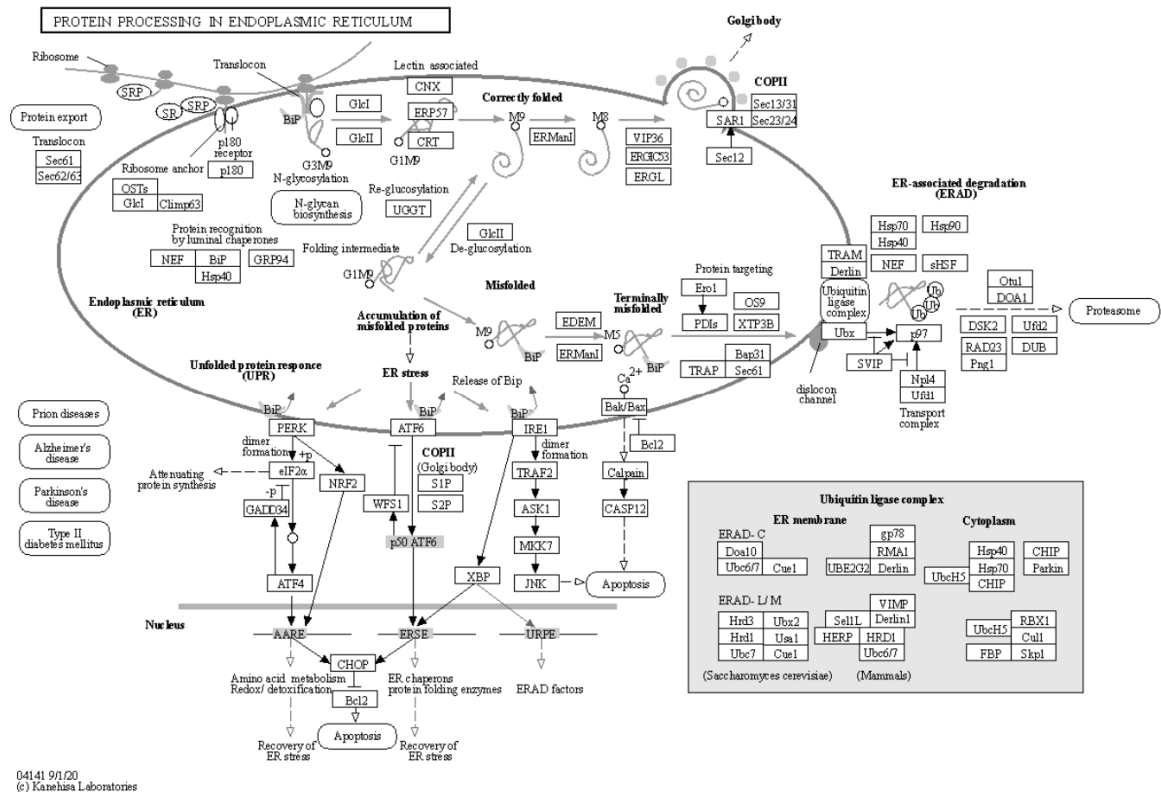


Figure 25 小胞体ストレス応答関連パスウェイ

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースの Pathway map (map04141) Protein processing in endoplasmic reticulum より引用。真核生物の ER ストレス応答には、翻訳停滞、ER シャペロン発現誘導によるタンパク質フォールディング機能強化、ERAD 関連因子の発現増強による異常タンパク質分解、アポトーシスの誘導の 4 つの機序があり、複数の調節経路によって調節されている。小胞体ストレス誘導の制御系には PERK 経路、ATF6 経路、IRE1 経路、そしてアポトーシス誘導経路の 4 つが知られている。

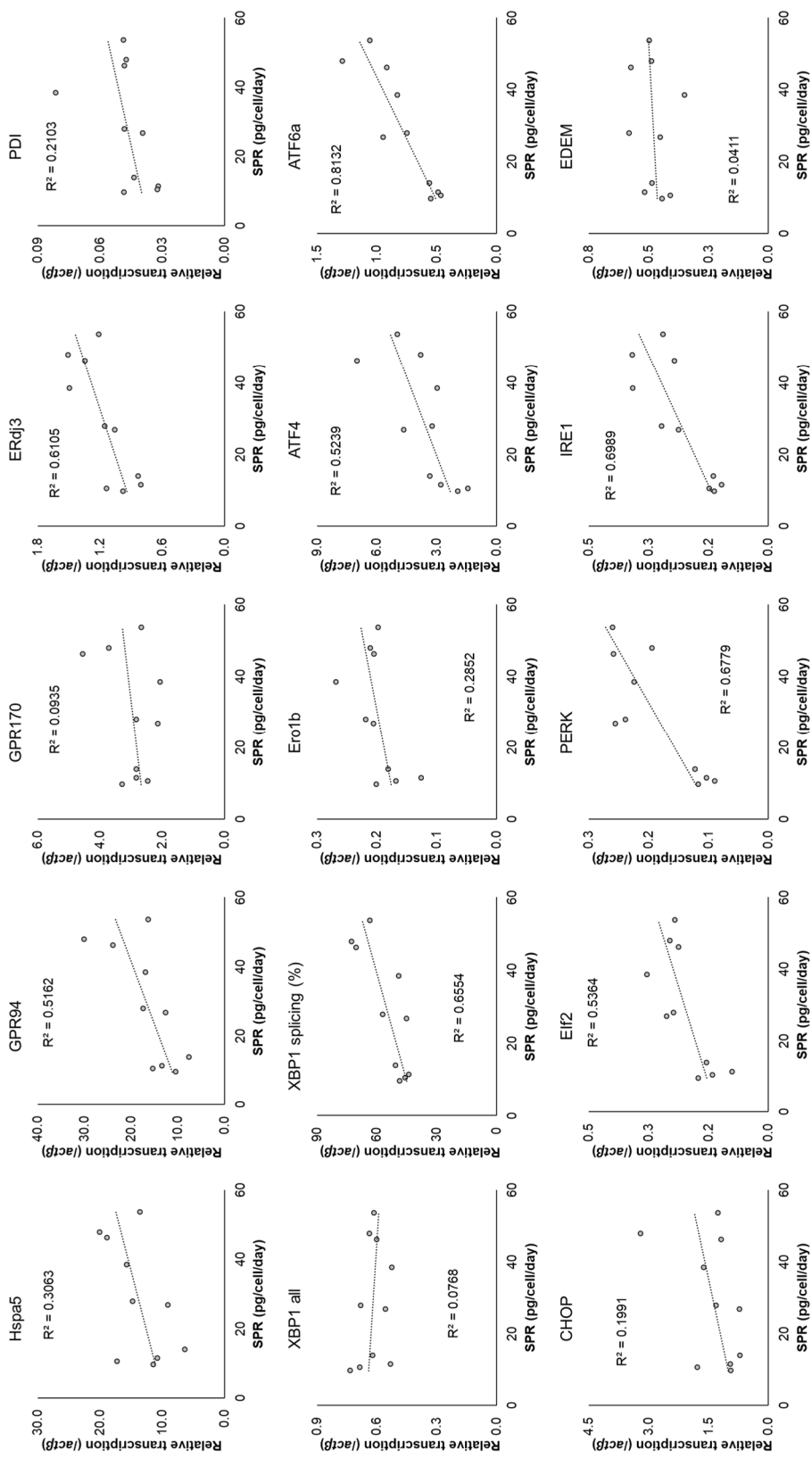


Figure 26 抗体生産性と小胞体ストレス関連遺伝子転写量の相関

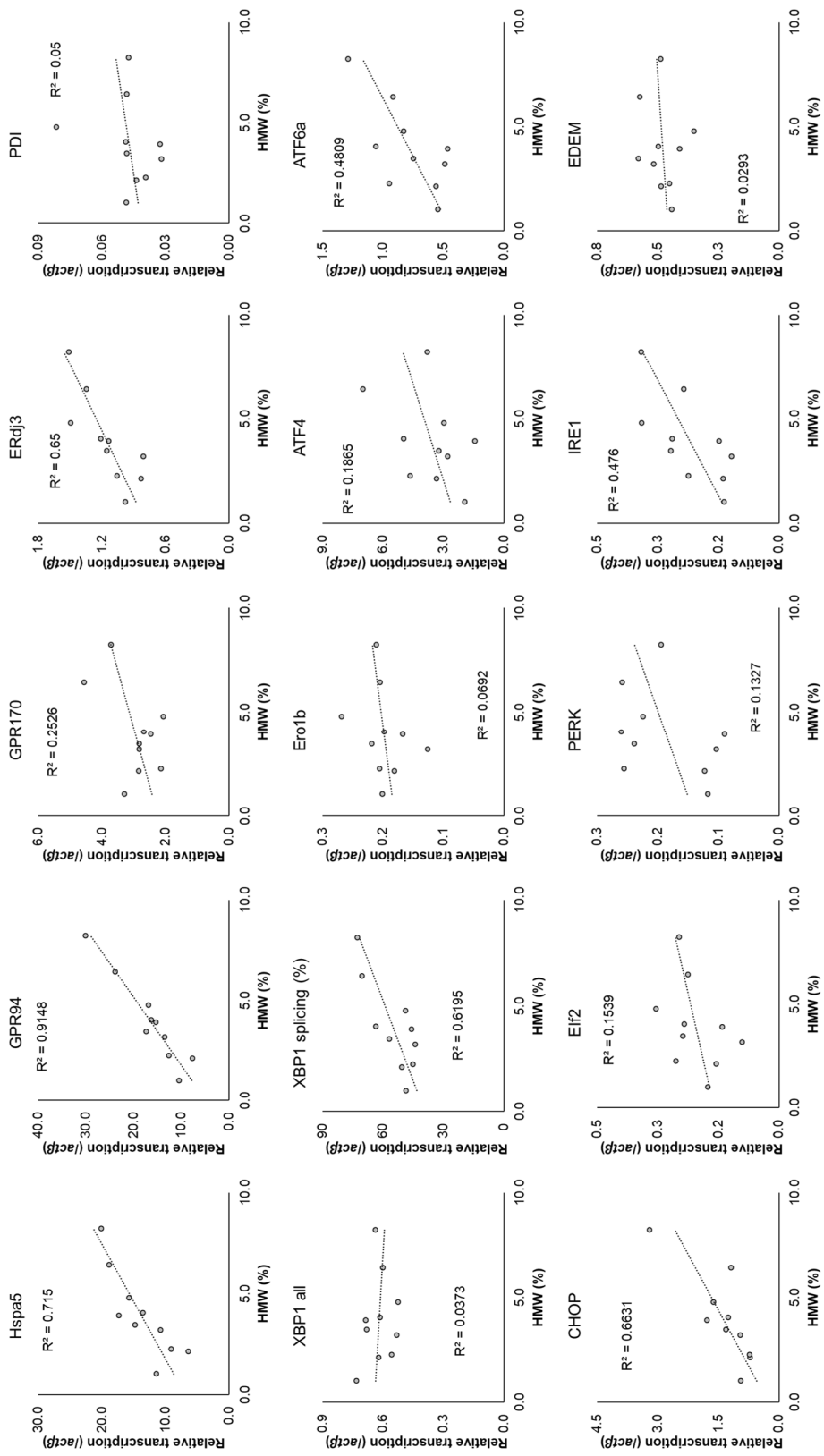
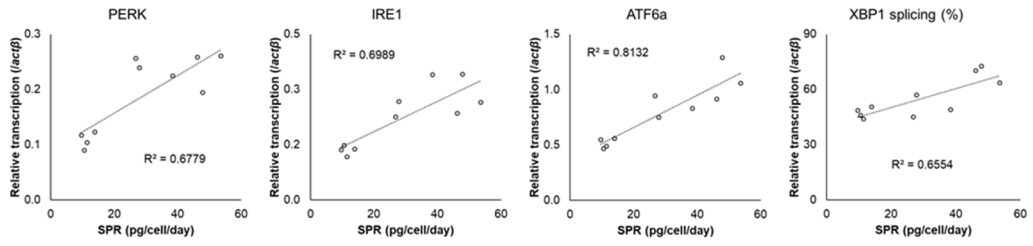
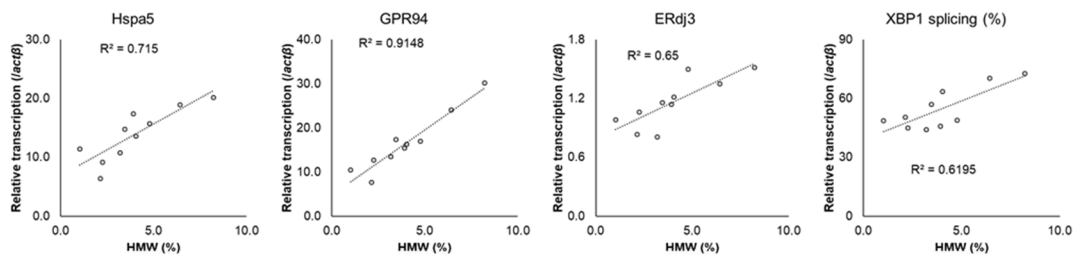


Figure 27 抗体重合体と小胞体ストレス関連遺伝子転写量の相関

a



b



c

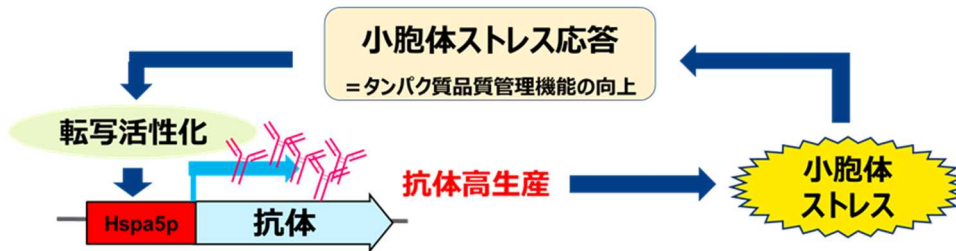


Figure 28 Hspa5p 高発現化機構のモデル

(a) 抗体生産性との相関 (b) 抗体重合体との相関 (c) 高発現化機構のモデル

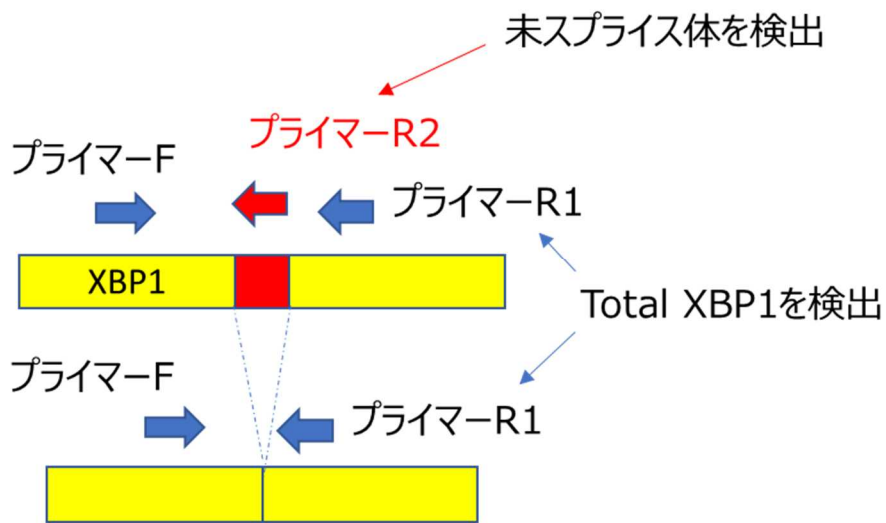


Figure 29 Xbp1 スプライシング率の検出方法

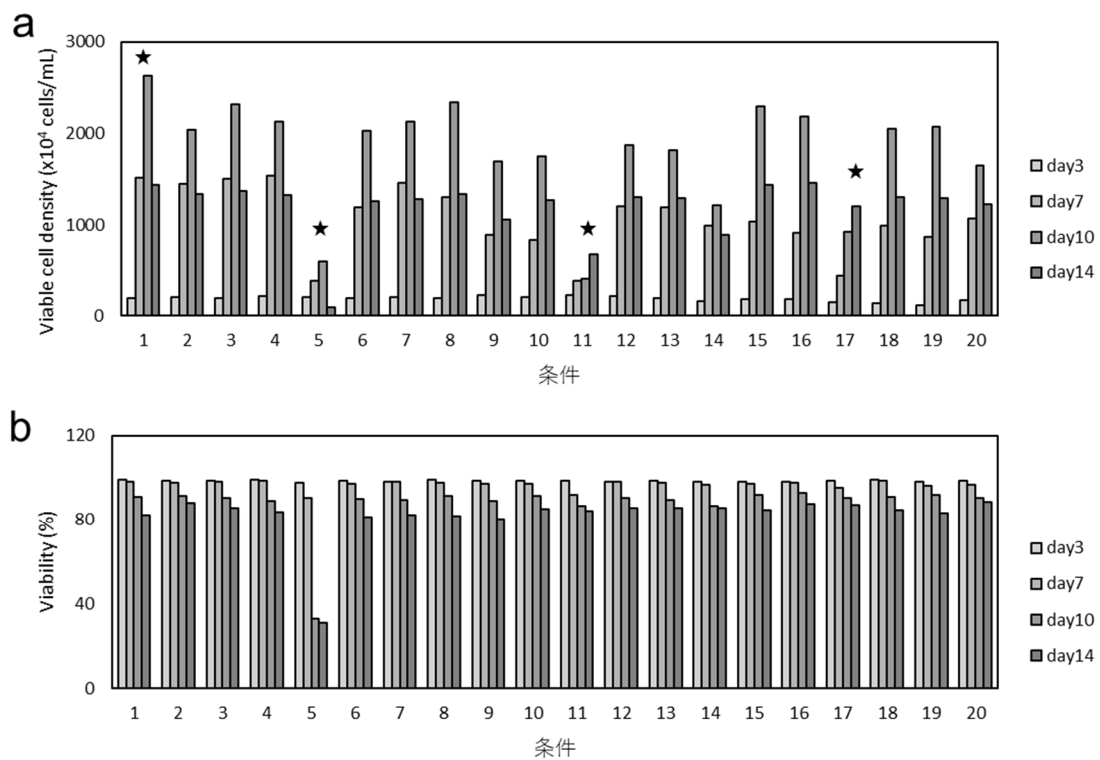


Figure 30 各種添加剤添加濃度の検討

Table 6 に示した添加条件で培養を実施し、細胞増殖データを取得した。生存率が低下傾向にあった条件に (★) ついて、細胞サンプルを経時的に取得し、ウエスタンブロッティングによって Hspa5 濃度を検出した。(a) 細胞増殖 (b) 細胞生存率

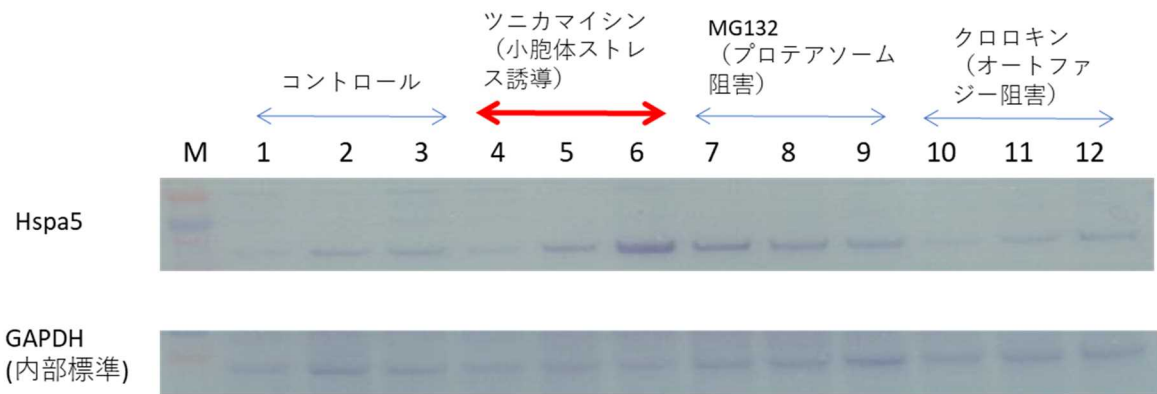


Figure 31 各種添加剤添加時の Hspa5 発現量 (ウエスタンブロッティング)

可用性画分の Hspa5 発現量をウエスタンブロッティングにより検出した。添加剤はレーン 1, 2, 3: コントロール (添加なし)、レーン 4, 5, 6: ツニカマイシン (d3, d7 添加)、レーン 7, 8, 9: MG132 (d3 添加)、レーン 10, 11, 12: クロロキン (d3 添加)。また、細胞取得日はそれぞれレーン 1, 4, 7, 10: day7、レーン 2, 5, 8, 11: day10、レーン 3, 6, 9, 12: day14 とした。

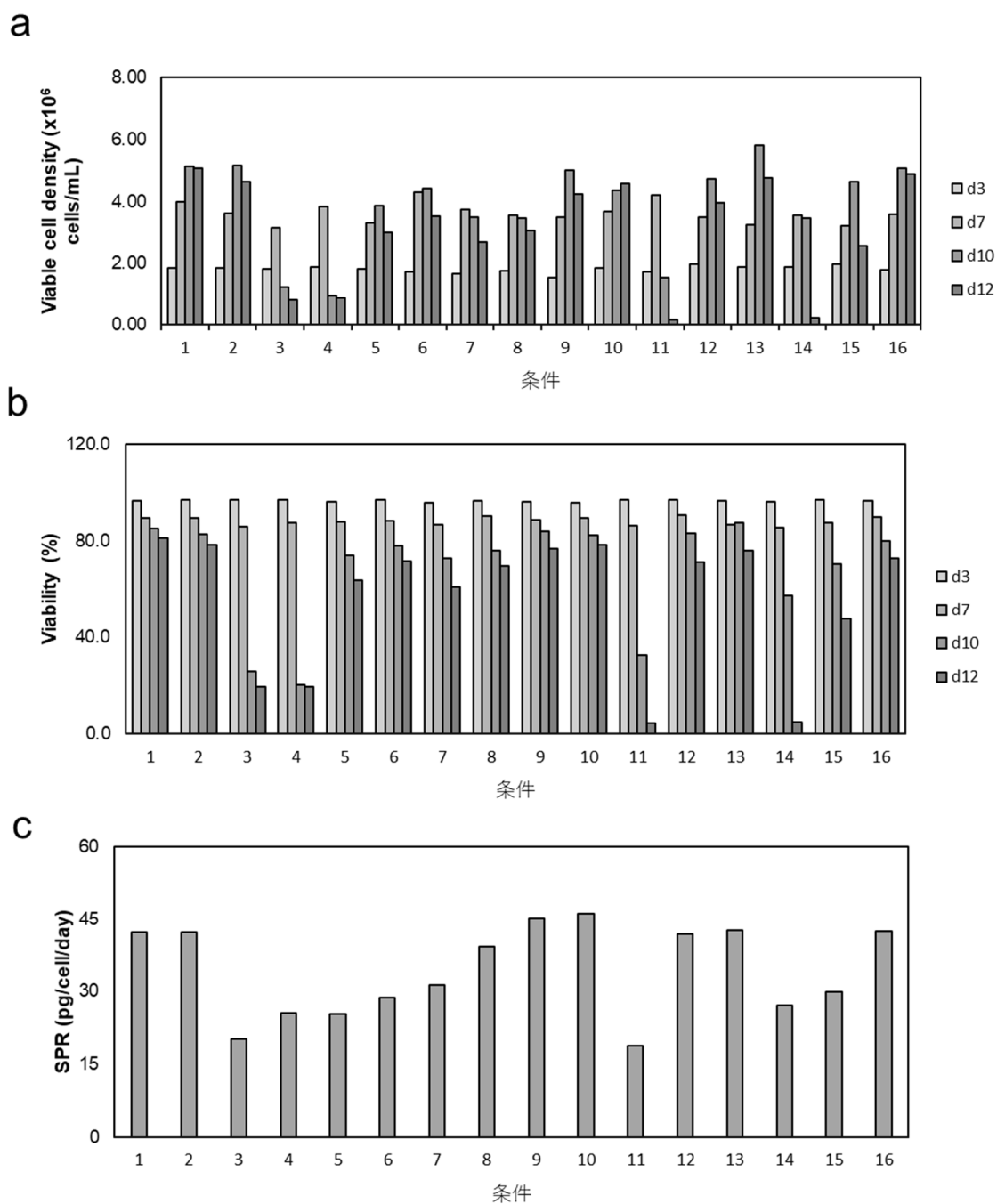


Figure 32 小胞体ストレス誘導剤添加条件での培養結果

小胞体ストレス誘導剤として、還元剤 DTT、Ca²⁺-ATPase 阻害剤タプシガルジン、タンパク質輸送阻害剤ブレフェルジン A をフェドバッチ培養 7 日目に添加し、培養結果への影響を確認した。(a) 細胞増殖 (b) 生存率 (c) SPR

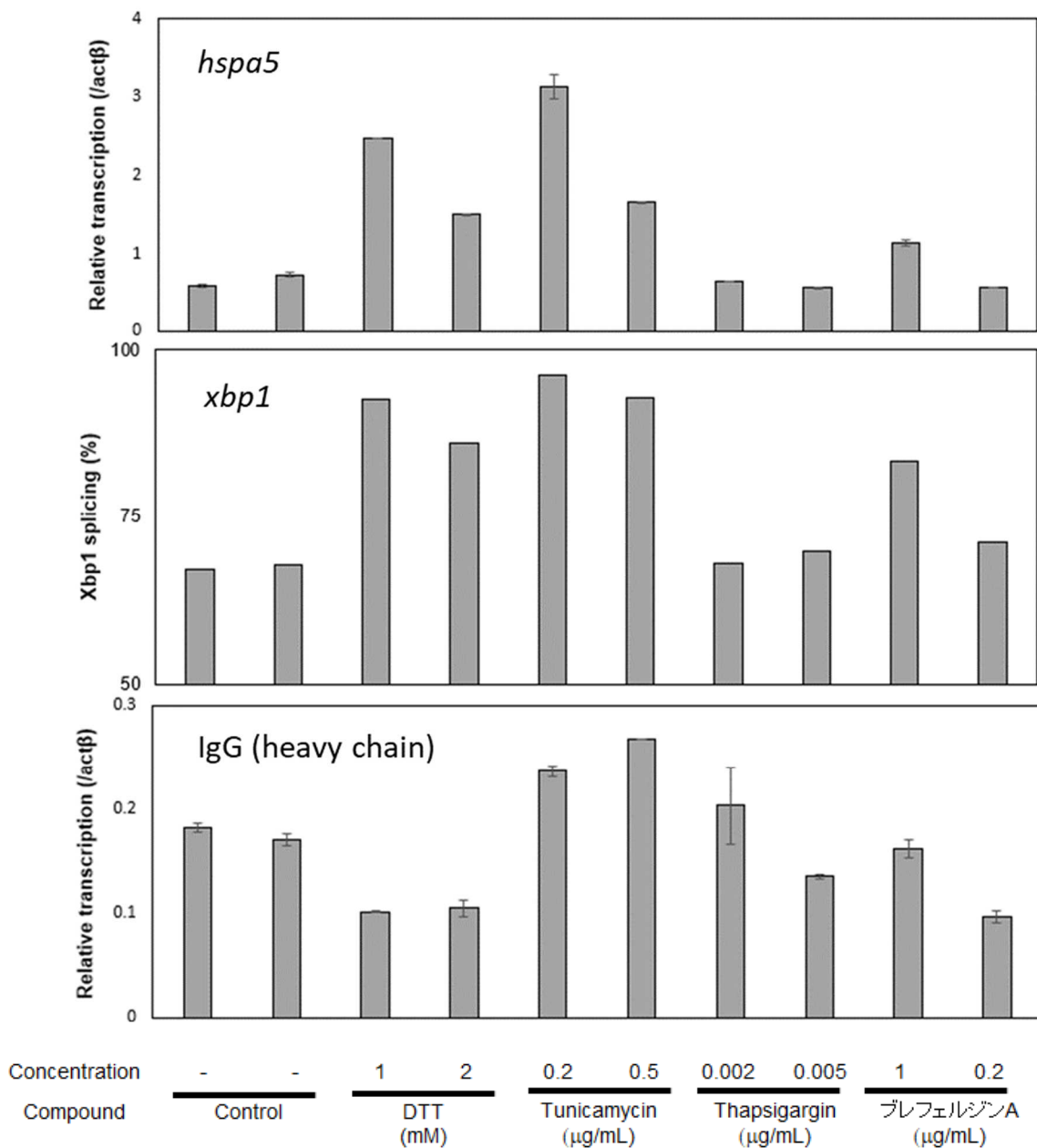


Figure 33 小胞体ストレス誘導剤添加条件における遺伝子転写解析

小胞体ストレス誘導剤として、還元剤 DTT、Ca²⁺-ATPase 阻害剤タプシガルジン、タンパク質輸送阻害剤ブレフェルジン A をフェドバッチ培養 7 日目に添加し、培養 10 日目に内因性 *hspa5* 転写量、*xbp1* mRNA のスプライシング率及び抗体（重鎖）遺伝子転写量をそれぞれ解析した。

Table 3 トランスクリプトーム解析結果

Culture 1 (クローン1 および G13 培地) の培養 4 日目の転写量 (RPKM) をランク付けした
上位 20 遺伝子

RPKM rank	Gene	Product	Database reference
1	<i>rps14</i>	ribosomal protein S14	GeneID:100689292 / Genbank:NM_001244519.1
2	<i>gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GeneID:100736557 / Genbank:NM_001244854.1
3	<i>ef1a</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	GeneID:100689276 / Genbank:NM_001244402.1
4	<i>rps11</i>	40S ribosomal protein S11-like	GeneID:100773922 / Genbank:XM_003508652.1
5	<i>rplp0</i>	60S ribosomal protein lateral stalk subunit P0	GeneID:100756201 / Genbank:XM_003495916.1
6	-	tRNA-Leu	
7	<i>Rps4</i>	ribosomal protein S4	GeneID:100689408 / Genbank:NM_001246673.1
8	<i>hspa5</i>	heat shock protein 5	GeneID:100689305 / Genbank:NM_001246739.1
9	<i>pkm</i>	pyruvate kinase M1/2	GeneID:100751347 / Genbank:XM_003498918.1
10	<i>rps2</i>	ribosomal protein S2	GeneID:100689058 / Genbank:NM_001244043.1
11	<i>actb</i>	beta-actin	GeneID:100689477 / Genbank:NM_001244575.1
12	<i>chub2</i>	polyubiquitin	GeneID:100689267 / Genbank:NM_001244378.1
13	<i>rps3</i>	40S ribosomal protein S3a-like	GeneID:100762337 / Genbank:XM_003504173.1
14	-	tRNA-Glu	
15	<i>prdx1</i>	peroxiredoxin 1	GeneID:100689332 / Genbank:NM_001246765.1
16	<i>rpsa</i>	ribosomal protein SA	GeneID:100689045 / Genbank:NM_001244033.1
17	<i>rps25</i>	40S ribosomal protein S25-like	GeneID:100759466 / Genbank:XM_003511566.1
18	<i>rpl8</i>	60S ribosomal protein L8-like	GeneID:100753709 / Genbank:XM_003515662.1
19	<i>fth1</i>	ferritin heavy chain 1	GeneID:100689102 / Genbank:XM_007617280.1
20	<i>hspd1</i>	heat shock protein family D (Hsp60) member 1	GeneID:100689473 / Genbank:XM_003504341.1

Table 4 *hspa5* 遺伝子上流領域の BLAST 検索

hspa5 遺伝子上流約 2.0~2.5 kb の領域を Query として BLAST 検索を実施した。

Description	Species	identity (%)
Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930558P17 product:hypothetical protein, full insert sequence	<i>Mus musculus</i>	83.28%
Mouse DNA sequence from clone RP23-446N16 on chromosome 2, complete sequence	<i>Mus musculus</i>	83.28%
Acomys russatus genome assembly, chromosome: 24	<i>Acomys russatus</i>	82.12%
Homo sapiens heat shock protein family A (Hsp70) member 5 (HSPA5), RefSeqGene on chromosome 9	<i>Homo sapiens</i>	72.31%
Human DNA sequence from clone RP11-65N13 on chromosome 9, complete sequence	<i>Homo sapiens</i>	72.31%
Lutra lutra genome assembly, chromosome: 13	<i>Lutra lutra</i>	68.34%
Sciurus carolinensis genome assembly, chromosome: 14	<i>Sciurus carolinensis</i>	70.56%
Heterocephalus glaber genome assembly, chromosome: 12	<i>Heterocephalus glaber</i>	69.50%
Heterocephalus glaber genome assembly, chromosome: 12	<i>Heterocephalus glaber</i>	69.50%
PREDICTED: Pteropus alecto uncharacterized LOC112484782 (LOC112484782), ncRNA	<i>Pteropus alecto</i>	74.17%
Pipistrellus pipistrellus genome assembly, chromosome: 11	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	68.95%
Meles meles genome assembly, chromosome: 11	<i>Meles meles</i>	68.12%
Sciurus vulgaris genome assembly, chromosome: 15	<i>Sciurus vulgaris</i>	70.40%
PREDICTED: Pteropus vampyrus uncharacterized LOC111742453 (LOC111742453), ncRNA	<i>Pteropus vampyrus</i>	72.85%
Canis lupus familiaris breed Labrador retriever chromosome 09a	<i>Canis lupus familiaris</i>	67.69%
Canis lupus familiaris breed Labrador retriever chromosome 09b	<i>Canis lupus familiaris</i>	67.69%
Canis lupus genome assembly, chromosome: 9	<i>Canis lupus</i>	67.69%
Felis catus Senzu DNA, chromosome: D4, American Shorthair breed	<i>Felis catus</i>	68.35%

Table 5 小胞体ストレス関連遺伝子の発現量 (RPKM)

遺伝子名	Culture1				Culture2				Culture3						
	day 4	day 7	day 9	day 11	day 14	day 4	day 7	day 9	day 11	day 14	day 4	day 7	day 9	day 11	day 14
Hspa5	1185.77	1434.08	2121.32	3035.06	2680.77	711.19	1592.48	2011.51	2468.07	3292.2	1062.69	1434.2	1886.57	2357.58	4714.43
Hsp90a	769.84	560.43	462.9	389.49	389.21	479.89	435.03	406.99	370.81	358.54	319.97	209.84	177.94	172.16	172.27
Hsp90b1/grp94	838.31	954.68	1274.18	1866.17	1639.11	726.81	1114.81	1327.97	1476.98	1954.22	621.36	774.76	930.49	1119.81	1886.85
Pdia3	289.21	334.5	387.85	489.48	406.53	352.84	602.69	665.32	770.56	775.86	275.58	317.74	366.4	430.45	522.1
Pdia4	47.11	65.01	96.96	120.36	104.2	55.56	93.28	117.02	130.78	164	133.99	218.32	284.43	359.18	500.7
Pdia5	30.77	36.38	45.61	59.27	66.6	34.48	36.23	49.99	55.14	73.19	33.16	43.94	55.05	64.51	79.31
Herpud1	45.08	46.38	72.11	67.31	80.44	24.18	26.42	28.21	31.39	39.16	47.39	48.91	49.81	50.75	179.89
Cherp	20.99	17.28	16.96	11.94	11.56	18.32	13.61	11.95	10.83	10.82	18.8	14.5	11.97	11.72	12.59
Edem3	28.4	23.38	29.8	40.52	46.2	32.79	27.62	33.62	32.37	44.66	19.9	25.78	34.31	45.35	44.94
Edem	22.27	17.09	26.48	41.71	58.78	35.19	25.09	31.74	31.08	52.43	11.76	18.55	20.67	34.23	36.78
Sel13	7.18	9.03	9.04	13.16	12.37	21.24	19.14	20.45	19.88	18.68	11.51	13.59	15.97	17.32	6.64
Sel11	24.76	25.28	35.72	40.65	56.92	23.18	27.31	32.91	38.82	48.52	22.63	27.56	31.65	38.93	76.62
Atf4	407.42	385.76	274.2	169.51	177.63	285.29	179.32	180.46	185.51	164.17	790.58	666.32	491.02	322.04	291.68
Atf6b	44.99	39.91	34.57	29.21	27.82	40.36	31.86	32.44	32.09	33.68	39.48	35.97	31.84	29.04	31.15
Atf2	19.04	17.57	18.2	18.8	22.98	22.41	16.55	16.08	15.84	17.59	15.64	16.55	17.46	18.32	19.09
Xbp 1	40.53	41.9	41.11	38.44	38.75	30.71	49.2	48.7	48.51	51.49	32.75	32.92	35.71	38.41	77.51
Ern1/ire1a	2.57	2.02	3.54	3.39	5.19	2.88	2.19	2.37	2.56	4.59	3.53	4.56	5.59	8.08	16.75
Ero1l	38.35	35.68	33.99	33.65	30.54	41.52	34.45	33.23	31.69	31.97	24.08	24.93	22.69	22.45	17.49
Ero1lb	6.02	7.79	12.1	17.74	20.72	6.86	9.52	14.92	16.65	24.59	4.93	8.39	11.3	15.34	20.28
Hyou1/grp17-	16.77	17.62	18.42	17.71	16.43	10.35	13.28	12.8	15.6	14.11	14.04	14.13	15.16	17.13	15.77
Gja1/CNX	63.5	76.28	104.24	139.49	165.11	101.71	95.58	106.05	109.36	139.84	135.91	187.87	279.78	393.73	340.28
Gja4	0.02	0	0.02	0.02	0.04	0	0.06	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02
Amfr/HRD	39.41	32.55	32.43	39.48	41.47	40.5	42.65	54.28	55.9	60.9	46.63	42.05	45.58	52.75	63.27
Cebpz/CHOP	56.55	54.99	52.76	51.68	55.68	40.83	43.85	43.94	43.03	42.83	52.35	46.64	44.24	43.37	45.32
Creb3i3	0.15	0.28	0.51	0.76	0.63	0.24	0.45	0.42	0.37	0.34	0.22	0.45	0.69	0.96	1.41
Creb3i2	0	0.02	0	0.02	0.18	0	0	0	0.13	0.09	0	0	0.04	0	0.11
DDIT	16.09	20.65	20.29	26.91	24.22	14.41	15.48	12.18	9.29	10.95	22.09	23.76	18.08	19.56	19.08
DDIT	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0
Eif2a	37.1	31.58	24.86	23.25	27.19	25.95	19.9	19.46	18.05	16.8	30.23	23.22	21.05	20.7	20.68
Eif2b4	26.8	23.08	18.76	15.64	16.59	14.07	16.63	15.24	14.62	13.66	19.49	15.09	13.09	12.15	15.4
Eif2c2	14.9	9.14	8.94	9.47	16.85	13.45	8.19	8.22	8.53	16.31	12.63	13.08	11.65	16.65	24.71
Eif2ak4	9.09	9.88	10.31	10.56	10	9.39	8.59	8.79	8.32	9.29	8.38	9.33	10.33	11.68	11.24
Eif2c1	0	0.01	0.08	0.02	0.02	0.02	0	0.01	0	0.02	0.01	0	0.01	0.01	0.01
Bak1	58.63	47.08	40	27.38	26.29	45.6	39.31	37.18	32.82	36.7	76.97	57.56	49.84	42.28	35.26
Bax	24.79	26.95	25.97	30.78	26.6	25.1	21.57	22.6	20.25	22.36	34.25	34.89	35.58	30.63	33.18
Traf2	17.56	20.31	17.58	15.1	15.46	12.41	13.09	12.37	11.91	10.19	20.82	19.34	19.7	17.9	18.08
Wfs1	7.09	11.38	17.38	20.47	25.26	7.79	16.33	22.55	25.03	26.6	9.05	18.14	27.49	32.63	23.86
Sec61a2	5.73	5.15	4.88	5.29	5.96	7.33	5.21	6.42	6.98	9.36	5.57	6.02	5.54	5.34	6.33
Tram2	4.44	3.87	4.22	3.91	4.13	5.13	3.42	3.56	2.84	3.43	2.63	2.87	3.78	3.68	3.24
Ubxn4	56.51	55.29	53.19	47.32	48.75	45.11	50.05	51.35	50.24	51.65	46.35	46.2	46.03	45.26	45.8
Sec63	18.74	18.08	19.72	24.7	31.89	18.44	22.23	24.81	25.94	30.97	34.34	38.81	45.42	55.22	75.75
Dnaja3	91.2	68.62	58.78	53.92	55.61	49.36	43.71	46.24	46.22	57.32	63.84	48.25	43.07	40.92	58.04
Dnaja10	68.95	69.33	68.96	85.67	82.24	69.63	93.78	115.84	114.32	118.83	62.92	83	92.11	101.1	84.84
Dnaja7	65.91	49.53	32.2	21.91	22.35	34.92	27.93	24.19	21.23	16.62	71.89	46.49	37.85	27.81	35.89
Dnaja11	54.63	53.24	49.59	43.29	43.79	52.67	45.22	46.15	44.3	42.79	50.44	41.35	37.49	35.57	36.6
Dnaja1	31.25	27.39	24.89	24.36	25.6	22.69	30.59	31.42	30.11	29.38	28.94	26.3	24.63	25.29	23.92
Dnaja3	28.76	31.54	42.43	53.91	61.45	36.03	53.36	65.18	77.05	92.52	18.1	22.13	26.44	31.87	35.77
Dnaja12	15.5	13.06	13.07	13.79	16.17	16.92	15.93	16	16.45	18.93	15.02	13.34	11.89	14.6	15.67
Dnaja4	10.35	13.04	15.42	16.87	15.89	14.52	15.6	17.65	17.19	15.69	22.04	36.36	40.72	36.07	33.32
Dnaja1	6.59	6.8	7.02	7.31	8.75	3.94	5.15	6.79	8.74	11.11	4.4	4.57	4.65	4.67	10.87
Dnaja18	6.1	5.72	5.86	7.42	8.08	7.44	6.34	7.09	6.86	10.26	4.2	5.53	6.21	6.9	9.78
Dnaja28	3.47	5.76	6.1	6.5	4.69	3.18	4.78	5.74	5.59	6.62	3.58	4.69	5.09	5.2	4.1
Dnaja6	1.17	0.99	0.83	0.86	1.3	0.91	0.55	0.54	0.62	1.07	0.8	0.81	1.09	1.36	2.15
Sec23b	57.32	56.59	51.4	44.49	45.71	42.36	49.24	46.14	43.06	41.58	49.32	42.52	39.39	36.25	35.52
Sec23ip	22.15	16.97	20.51	22.52	27.45	22.56	21.15	22.12	19.7	24.13	14.51	15.72	20.06	21.7	26.35
Sec23a	14.45	18.18	18	21.47	18.01	13.11	17.43	18.24	16.52	16.55	11.25	16.75	18.99	19.1	17.61
Sec24a	9.54	7.62	7.94	7.98	10.08	7.22	7.42	7.15	7.32	9.24	5.35	6.18	7.1	7.76	11.23
Sec31a	27.59	31.98	35.81	37.5	41.58	31.86	38.69	39.95	38.05	38.64	23.68	30.92	34.2	36.48	45.82
Sec31b	0.77	0.93	1.39	1.5	1.09	1.23	1.15	0.93	0.86	1.02	0.67	0.87	1.12	1.61	1.05
Traf5	2.01	5.77	5.97	5.84	7.91	3.6	6.48	8.08	8.1	8.55	3.56	6.06	6.52	6.7	7.57
Traf2	17.56	20.31	17.58	15.1	15.46	12.41	13.09	12.37	11.91	10.19	20.82	19.34	19.7	17.9	18.08
Aifm2	9.06	14.81	17.3	21.52	19.56	13.41	20.04	21.84	19.93	20.31	11.12	14.55	17.2	21.21	19.6
Aifm3	0.11	0.08	0.1	0.08	0.13	0.16	0.15	0.1	0.1	0.11	0.18	0.16	0.14	0.13	0.1
Casp3	23.39	26.49	25.26	27.84	23.73	37.11	31.82	30.03	26.25	23.9	30.44	30.99	31.63	31.97	25.31
Card10	10.44	16.84	19.28	18.07	17.02	15.13	17.52	17.01	16.41	15.05	18.27	20.91	21.46	24	22.74
Casp8ap2	7.88	7.52	7.22	6.9	6.62	8.55	4.75	4.65	4.22	4.09	6.48	5.57	5.56	4.97	5.33
Casp1	6.63	3.77	3.31	3.97	2.82	7.65	11.23	9.16	7.8	5.8	17.05	9.49	10.4	11.87	3.27
Noxa1	8.12	11.62	12.89	9.52	7.1	12.03	11.17	11.44	10.41	7.92	11.61	11.98	10.87	8.36	9.2
Apa1	3.66	3.71	4.46	5.69	5.85	4.28	3.25	3.43	3.19	4.01	2.93				

Table 6 各種添加剤添加条件

条件	添加剤	添加日	終濃度(ng/mL)
1	-		
2	DMSO	3	
3	ツニカマイシン	3	2.2
4	ツニカマイシン	3	22
5	ツニカマイシン	3	220
6	ツニカマイシン	7	2.2
7	ツニカマイシン	7	22
8	ツニカマイシン	7	220
9	MG132	3	5
10	MG132	3	50
11	MG132	3	500
12	MG132	7	5
13	MG132	7	50
14	MG132	7	500
15	クロロキン	3	13.7
16	クロロキン	3	137
17	クロロキン	3	1370
18	クロロキン	7	13.7
19	クロロキン	7	137
20	クロロキン	7	1370

Table 7 小胞体ストレス誘導剤添加条件

条件	添加剤	添加後終濃度	(unit)
1	-	-	
2	-	-	
3	DTT	10	mM
4	DTT	5	mM
5	DTT	2	mM
6	DTT	1	mM
7	ツニカマイシン	0.5	ug/mL
8	ツニカマイシン	0.2	ug/mL
9	ツニカマイシン	0.1	ug/mL
10	ツニカマイシン	0.05	ug/mL
11	タブシガルジン	0.01	ug/mL
12	タブシガルジン	0.005	ug/mL
13	タブシガルジン	0.002	ug/mL
14	ブレフェルジンA	1	ug/mL
15	ブレフェルジンA	0.5	ug/mL
16	ブレフェルジンA	0.2	ug/mL

4. 考察

本研究では、細胞クローンと培地の組合せによって遺伝子転写のレベルが異なる可能性を考慮して、CHO 細胞において、抗体産生量を改善する新規のプロモーターを得るためにクローンと培地の組合せについてトランスクリプトーム解析を行った。また、培養期間を通して安定的に高発現であるプロモーターを取得するため、培養経時的にトランスクリプトームデータを取得した。その結果、培養終了までの遺伝子発現を解析することで、培養初期の発現が候補遺伝子の中で最も高くないにもかかわらず、培養後期に転写レベルが向上する遺伝子候補として *hspa5* を同定することができた。このことから、トランスクリプトーム解析の結果から抗体生産用の新規プロモーターを取得するためには、抗体製造に近い培養条件下で経時的に転写レベルを解析して高発現プロモーターを得ることが重要であると考えられる。

トランスクリプトーム解析の結果から、*rps14* などのリボソーム RNA 遺伝子、*gapdh*、*actβ*、*chub2* などのハウスキーピング遺伝子が高発現遺伝子として同定された (Table 3)。転写量上位遺伝子の中で、*Pkm* は糖代謝に関与するキナーゼであり、*Prdx-1* は活性酸素種によって引き起こされる酸化ストレスの抑制に機能する。また、*Hspd1* はミトコンドリアで機能するシャペロンであり、*Fth1* は細胞の鉄代謝に関与している (Palsson-McDermott, Curtis et al. 2015, Yabaji, Mishra et al. 2017, Di Sanzo, Quresima et al. 2020, Klebl, Feasey et al. 2021)。これらの遺伝子 (*Pkm*, *Prdx-1*, *Hspd1*, *Fth1*) は基礎的な代謝に関与するため、ハウスキーピング遺伝子として高発現していると考えられている。*Fth1* はトランスクリプトーム解析の 1 つの培養条件で著しく高い発現を示したが (Figure 12)、その発現レベルはクローンや培地によって異なっており、抗体製造プロセスに活用する上では望ましい特徴ではないと考えられる。また、その他の候補遺伝子についてもルシフェラーゼアッセイにおいて *Hspa5p* と比較してプロモーター活性が低いことが示唆されたため、抗体生産性の観点から適してはいないと判断した (Figure 13)。

本研究では新規の高発現プロモーターとして *Hspa5p* をクローニングし、プロモーターとしての有用性を確認するとともにプロモーター長を最適化した。本来 *Hspa5p* が発現を制御している *Hspa5* は小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response、UPR) において重要な役割を果たすシャペロンであり、CHO 細胞における *Hspa5* タンパク質及びプロモーターに関してはいくつかの報告がある。例えば、Prashad らは抗体産生能の高いクローンと低いクローンで UPR 関連遺伝子を網羅的に解析した結果、抗体産生能の高いクローンでは *hspa5* を含む UPR 関連因子の転写活性が向上していることを報告している (Prashad and Mehra 2015)。また、Pybus らは ER シャペロンと UPR 関連因子 (*Hspa5*、*ATF6c*、*XBP1-s*) の共発現により抗体産生能が向上し、細胞増殖能が低下することを示した (Pybus, Dean et al. 2014)。*Hspa5p* の使用例は Kober らによって、抗体生産クローン選択に *Hspa5p* を適用した事例が報告されている (Kober, Zehe et al. 2012)。また、*Hspa5* シャペロン過剰発現による抗体産生能の改善や抗体生産クローン選択への *Hspa5p* の利用に関して報告されているが、抗体医薬品生産に *Hspa5p* を使用した例はこれまで報告されていない。*Hspa5p* はフェドバッチ培養の後期にその制御下での遺伝子の発現が増強されるという点でユニークな特徴を有する新規の高生産プロモーターとして活用できることが明らかとなった。

Hspa5p 配列を詳細に解析するため、本研究では *hspa5* 遺伝子上流のコンセンサス配列に着目した。コンセンサス配列は遺伝子の ORF (open reading frame) または転写因子結合領域を含むことが多いため、Hspa5p のプロモーター活性に重要な領域である。*in silico* 解析より、Hspa5p のプロモーターエレメント及び転写因子結合領域は異なる生物種間 (チャイニーズハムスター、ヒト、マウス及びラット) で高度に保存されていることが示された (Figure 15)。また、これらの生物種の Hspa5p を用いた場合に抗体生産性に違いが見られなかったことから、保存されている配列がプロモーター活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、本研究において *hspa5* 遺伝子上流 2.0~2.5 kb に高度に保存された領域が見出された。プロモーター長の切縮めにより抗体生産性が向上したことから、この領域が Hspa5p の活性に影響している可能性が考えられた。一方で、BLAST 検索の結果からはこの領域と相同性の高い遺伝子は同定されず、この領域の欠失によりプロモーター活性が向上したことから、少なくともこの領域には Hspa5p を活性化する遺伝子や転写因子結合領域が含まれていないことが示唆された (Figure 18)。

抗体医薬品製造プロセス開発において、抗体生産細胞構築及び性能評価は非常に時間と工数を要する作業であり、特定のプロモーターを用いた発現ベクターをプラットフォームベクターとして活用できることは製造プロセス開発に関して大きなアドバンテージを所有することとなる。このため、Hspa5p が抗体生産株取得及びプロセス構築に汎用的に活用可能であることを示すことができれば、抗体医薬品生産及び安定供給に大きく貢献できると考えられる。本研究では、Hspa5p の汎用性を検証するため、抗体医薬品として用いられるサブクラス (IgG1, 2, 4Pro) を用いて抗体生産性を評価した。各 IgG サブクラスは異なるジスルフィド結合を有するため、protein disulfide isomerase-A1 (PDI) などのジスルフィドイソメラーゼの活性に影響を及ぼす可能性が考えられた (Kranz, Neumann et al. 2017)。PDI は小胞体ストレス応答経路において PERK 経路を活性化し、それによって Hspa5p 活性に影響を及ぼすことが知られている。したがって、IgG1、IgG2、および IgG4Pro という様々なサブクラスのフォールディングの違いが、ER ストレス応答および Hspa5p 活性に影響を及ぼし、抗体生産性が変化する可能性があると考えた。しかし、本研究で異なるサブクラスの抗体を発現させた結果、Hspa5p での抗体生産性と内因性 *hspa5* 遺伝子転写量は変化しなかった (Figure 19、Figure 22)。これらの結果は、IgG におけるジスルフィド結合パターンの違いは、*hspa5* を含む UPR に影響をせず、いずれのサブクラスにおいても安定的に高い抗体発現が得られることが示唆された。この特徴は抗体生産に汎用的に Hspa5p を活用していくうえで有用な特性と考えられる。

抗体生産性の向上によって凝集体の増加といった抗体品質の悪化の可能性が考えられたが、Hspa5p で生産された抗体はコントロールプロモーターで発現した場合と同等の抗体品質を有していた (Figure 21)。また、モノクローンによる生産性を評価した結果、ステーブルプールと同様に培養後期に発現量が向上し、高い生産性が得られることが示された (Figure 23)。以上の結果から、Hspa5p は各種抗体医薬品製造に対して汎用的に活用可能な新たな抗体安定発現系になり得ることが示された。今後、培養のスケールアップ検討により、Hspa5p を用いた生産株を用いた大スケール培養 (2000 L-20000 L) での性能を実証していくことで抗体製造に

活用できることを示すことができると考えられる。

続いて、Hspa5p の高発現機構の解明のため、Hspa5p での抗体発現と小胞体ストレス応答との関係を解析した。小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現を網羅的に解析した結果、CHO 細胞において各種小胞体ストレス応答遺伝子が発現しており、小胞体ストレス応答が起こっていることが示唆された (Table 5)。また、各種添加剤による小胞体ストレス誘導の結果、N 型糖鎖付加阻害剤ツニカマイシン及び還元剤 DTT を添加した場合に小胞体ストレスが誘導されたのに対し、プロテアソーム阻害剤 MG132、オートファジー阻害剤クロロキン、Ca²⁺-ATPase 阻害剤タプシガルジン、及びタンパク質輸送阻害剤ブレフェルジン A を添加した場合、本研究での添加条件においては小胞体ストレス誘導が見られなかった (Figure 31、Figure 33)。このことから、CHO 細胞においては糖鎖阻害負荷及び還元ストレスによって小胞体ストレスが誘導されやすいことが示唆された。

Hspa5p の高発現の理由を解析するために、Hspa5p での抗体発現と相関する因子を検討した。その結果、UPR 関連因子の発現と抗体生産性及び重合体含量との間に相関が認められた (Figure 26、Figure 27)。これらの結果から、Figure 28 に示すように、抗体生産によって生じる ER ストレスによって小胞体ストレス関連因子の発現が向上し、小胞体ストレス応答プロモーターである Hspa5p が活性化され発現が向上するモデルが示唆された。抗体過剰発現による ER ストレスと ER シャペロン活性化による ER ストレスの軽減のバランスによって、Hspa5p による抗体高生産が維持される可能性もある。一方、Hspa5p での抗体生産性と内因性 *hspa5* 遺伝子発現との直接の相関は、他の小胞体ストレス関連遺伝子の相関よりも弱かった (Figure 26)。内因性の *hspa5* と Hspa5p で発現させた抗体は同じプロモーターで発現させているにも関わらず強く相関していなかったことから、Hspa5p によって発現されるタンパク質に依存して転写量が増加する可能性が示唆された。この結果は、*hspa5* 遺伝子発現の制御機構に関する新規の知見である。

続いて、プロモーターとして Hspa5p を利用することにより、抗体生産のさらなる増強の可能性を考察した。本研究において、ER ストレス誘導剤の添加による生産性の改善を検討した結果、内因性 *hspa5* 遺伝子の転写レベルは有意に上昇したものの、Hspa5p 下で発現する mAb 遺伝子の転写レベルは改善されなかった (Figure 33)。このことは、タンパク質フォールディング能力を改善せずに ER ストレス導入剤によって Hspa5p を活性化させることは、Hspa5p での抗体生産性向上に有効ではないことを示しており、Hspa5p の活性化のためにはタンパク質のフォールディングキャパシティが Hspa5p での抗体高発現によって重要であることを示唆している。タンパク質合成機構を悪化させることなく小胞体ストレスを誘導することができれば、Hspa5p での抗体生産をさらに向上させられるかもしれない。

小胞体ストレス応答によって Hspa5p が活性化される一方で、過剰な抗体発現はタンパク質の成熟に負の影響を与え、ER におけるタンパク質の恒常性を破壊する。ER ストレスはアポトーシスを引き起こすことが知られており、抗体産生細胞は ER ストレス時に選択的に死滅する可能性が高い。Hspa5p を用いることにより、抗体生産と分子シャペロンの発現が同調するこ

とで ER におけるタンパク質フォールディング能力を維持し、ER ストレスによって誘発される細胞死から細胞が保護され、安定的に抗体生産ができる可能性がある。Hspa5p を利用することで、小胞体でのタンパク質環境の恒常性（プロテオスタシス）を維持し、安定した抗体産生が実現できることが期待される。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました京都産業大学 生命科学部 先端生命科学科潮田亮准教授及び研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

また、本研究の推進をご支援いただきました第一三共株式会社 バイオ医薬研究所所長 野中浩一博士、バイオ医薬研究所第一グループ長 奥村武博士、バイオ医薬研究所第一グループ 増田兼治博士、バイオ医薬研究所第二グループ 川原弘之主任研究員に深く感謝申し上げます。また、バイオ医薬研究所第二グループ 都木栄里女史には小胞体ストレス応答遺伝子の発現解析において多大なるご支援をいただきました。論文投稿に際しまして、ご支援・レビューをいただいたバイオ医薬研究所第二グループ長 柿原博文氏、バイオ医薬研究所第二グループ 梶原大介博士に心からの感謝を申し上げます。

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（JP15ae0101003）」の支援によって行われました。

最後に、本研究と論文作成を常に気にかけてくれ、応援し続けてくれた両親に心から感謝いたします。

6. 引用文献

- 1) Ahleboot, Z., M. Khorshidtalab, P. Motahari, R. Mahboudi, R. Arjmand, A. Mekarizadeh and S. Maleknia (2021) . "Designing a Strategy for pH Control to Improve CHO Cell Productivity in Bioreactor." Avicenna J Med Biotechnol **13** (3) : 123-130.
- 2) Alexandra, S., T. Nakaki, L. Vanhamme and A. S. Lee (1991) . "A Binding Site for the Cyclic Adenosine 3' ,5' -Monophosphate-Response Element-Binding Protein as a Regulatory Element in the grp78 Promoter." Molecular Endocrinology **5** (12) : 1862-1872.
- 3) Banach, A., Y. P. Jiang, E. Roth, C. Kuscu, J. Cao and R. Z. Lin (2019) . "CEMIP upregulates BiP to promote breast cancer cell survival in hypoxia." Oncotarget **10** (42) : 4307-4320.
- 4) Barnes, L. M., C. M. Bentley and A. J. Dickson (2003) . "Stability of protein production from recombinant mammalian cells." Biotechnol Bioeng **81** (6) : 631-639.
- 5) Baumann, M., J. Pontiller and W. Ernst (2010) . "Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview." Mol Biotechnol **45** (3) : 241-247.
- 6) Bielser, J. M., M. Wolf, J. Souquet, H. Broly and M. Morbidelli (2018) . "Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - A critical review." Biotechnol Adv **36** (4) : 1328-1340.
- 7) Borth, N., D. Mattanovich, R. Kunert and H. Katinger (2005) . "Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line." Biotechnol Prog **21** (1) : 106-111.
- 8) Casas, C. (2017) . "GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection." Front Neurosci **11**: 177.
- 9) Chen, K. D., J. J. Hung, H. L. Huang, M. D. Chang and Y. K. Lai (1997) . "Rapid induction of the Grp78 gene by cooperative actions of okadaic acid and heat-shock in 9L rat brain tumor cells--involvement of a cAMP responsive element-like promoter sequence and a protein kinase A signaling pathway." Eur J Biochem **248** (1) : 120-129.
- 10) Davis, R., K. Schooley, B. Rasmussen, J. Thomas and P. Reddy (2000) . "Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells." Biotechnol Prog **16** (5) : 736-

743.

- 11) Di Sanzo, M., B. Quaresima, F. Biamonte, C. Palmieri and M. C. Faniello (2020) . "FTH1 Pseudogenes in Cancer and Cell Metabolism." Cells **9** (12) .
- 12) Gauzy-Lazo, L., I. Sassoon and M. P. Brun (2020) . "Advances in Antibody-Drug Conjugate Design: Current Clinical Landscape and Future Innovations." SLAS Discov **25** (8) : 843-868.
- 13) Klebl, D. P., M. C. Feasey, E. L. Hesketh, N. A. Ranson, H. Wurdak, F. Sobott, R. S. Bon and S. P. Muench (2021) . "Cryo-EM structure of human mitochondrial HSPD1." iScience **24** (1) : 102022.
- 14) Kober, L., C. Zehe and J. Bode (2012) . "Development of a novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones." Biotechnol Bioeng **109** (10) : 2599-2611.
- 15) Kranz, P., F. Neumann, A. Wolf, F. Classen, M. Pomsch, T. Ocklenburg, J. Baumann, K. Janke, M. Baumann, K. Goepelt, H. Riffkin, E. Metzen and U. Brockmeier (2017) . "PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR) ." Cell Death Dis **8** (8) : e2986.
- 16) Kunert, R. and D. Reinhart (2016) . "Advances in recombinant antibody manufacturing." Appl Microbiol Biotechnol **100** (8) : 3451-3461.
- 17) Lakshmanan, M., Y. J. Kok, A. P. Lee, S. Kyriakopoulos, H. L. Lim, G. Teo, S. L. Poh, W. Q. Tang, J. Hong, A. H. Tan, X. Bi, Y. S. Ho, P. Zhang, S. K. Ng and D. Y. Lee (2019) . "Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits." Biotechnol Bioeng **116** (9) : 2117-2129.
- 18) Lee, A. S. (1987) . "Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells." Trends in Biochemical Sciences **12**: 20-23.
- 19) Lee, A. S. (2005) . "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." Methods **35** (4) : 373-381.
- 20) Li, J. and A. S. Lee (2006) . "Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer." Curr Mol Med **6** (1) : 45-54.

- 21) Li, W. W., Y. Hsiung, Y. Zhou, B. Roy and A. S. Lee (1997) . "Induction of the mammalian GRP78/BiP gene by Ca²⁺ depletion and formation of aberrant proteins: activation of the conserved stress-inducible grp core promoter element by the human nuclear factor YY1." Mol Cell Biol **17** (1) : 54-60.
- 22) Liu, H. and K. May (2012) . "Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function." MAbs **4** (1) : 17-23.
- 23) Luo, S., P. Baumeister, S. Yang, S. F. Abcouwer and A. S. Lee (2003) . "Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements." J Biol Chem **278** (39) : 37375-37385.
- 24) Macejak, D. G. and P. Sarnow (1991) . "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA." Nature **353** (6339) : 90-94.
- 25) Mao, C., W. C. Tai, Y. Bai, C. Poizat and A. S. Lee (2006) . "In vivo regulation of Grp78/BiP transcription in the embryonic heart: role of the endoplasmic reticulum stress response element and GATA-4." J Biol Chem **281** (13) : 8877-8887.
- 26) Masuda, K., K. Watanabe, T. Ueno, Y. Nakazawa, Y. Tanabe, Y. Ushiki-Kaku, K. Ogawa-Goto, Y. Ehara, H. Saeiki, T. Okumura, K. Nonaka and M. Kamihira (2021) . "Novel cell line development strategy for monoclonal antibody manufacturing using translational enhancing technology." J Biosci Bioeng.
- 27) Mohan, C. and G. M. Lee (2010) . "Effect of inducible co-overexpression of protein disulfide isomerase and endoplasmic reticulum oxidoreductase on the specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells." Biotechnol Bioeng **107** (2) : 337-346.
- 28) Moritz, B., P. B. Becker and U. Göpfert (2015) . "CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells." Sci Rep **5**: 16952.
- 29) Nguyen, L. N., M. Baumann, H. Dhiman, N. Marx, V. Schmieder, M. Hussein, P. Eisenhut, I. Hernandez, J. Koehn and N. Borth (2019) . "Novel Promoters Derived from Chinese Hamster Ovary Cells via In Silico and In Vitro Analysis." Biotechnol J **14** (11) : e1900125.

- 30) Nguyen, L. N., N. Novak, M. Baumann, J. Koehn and N. Borth (2020) . "Bioinformatic Identification of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cold-Shock Genes and Biological Evidence of their Cold-Inducible Promoters." *Biotechnol J* **15** (3) : e1900359.
- 31) Okumura, T., K. Masuda, K. Watanabe, K. Miyadai, K. Nonaka, M. Yabuta and T. Omasa (2015) . "Efficient enrichment of high-producing recombinant Chinese hamster ovary cells for monoclonal antibody by flow cytometry." *J Biosci Bioeng* **120** (3) : 340-346.
- 32) Palsson-McDermott, E. M., A. M. Curtis, G. Goel, M. A. Lauterbach, F. J. Sheedy, L. E. Gleeson, M. W. van den Bosch, S. R. Quinn, R. Domingo-Fernandez, D. G. Johnston, J. K. Jiang, W. J. Israelsen, J. Keane, C. Thomas, C. Clish, M. Vander Heiden, R. J. Xavier and L. A. O'Neill (2015) . "Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages." *Cell Metab* **21** (1) : 65-80.
- 33) Parker, R., T. Phan, P. Baumeister, B. Roy, V. Cheriya, A. L. Roy and A. S. Lee (2001) . "Identification of TFII-I as the endoplasmic reticulum stress response element binding factor ERSF: its autoregulation by stress and interaction with ATF6." *Mol Cell Biol* **21** (9) : 3220-3233.
- 34) Prashad, K. and S. Mehra (2015) . "Dynamics of unfolded protein response in recombinant CHO cells." *Cytotechnology* **67** (2) : 237-254.
- 35) Puck, T. T. (1957) . "The genetics of somatic mammalian cells." *Adv Biol Med Phys* **5**: 75-101.
- 36) Pybus, L. P., G. Dean, N. R. West, A. Smith, O. Daramola, R. Field, S. J. Wilkinson and D. C. James (2014) . "Model-directed engineering of "difficult-to-express" monoclonal antibody production by Chinese hamster ovary cells." *Biotechnol Bioeng* **111** (2) : 372-385.
- 37) Rayner, L. E., G. K. Hui, J. Gor, R. K. Heenan, P. A. Dalby and S. J. Perkins (2014) . "The Fab conformations in the solution structure of human immunoglobulin G4 (IgG4) restrict access to its Fc region: implications for functional activity." *J Biol Chem* **289** (30) : 20740-20756.
- 38) Reinhart, D., L. Damjanovic, C. Kaisermayer, W. Sommeregger, A. Gili, B. Gasselhuber, A.

- Castan, P. Mayrhofer, C. Grünwald-Gruber and R. Kunert (2019) . "Bioprocessing of Recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO Expression Hosts Favor Either mAb Production or Biomass Synthesis." Biotechnol J **14** (3) : e1700686.
- 39) Resendez, E., Jr., J. W. Attenello, A. Grafsky, C. S. Chang and A. S. Lee (1985) . "Calcium ionophore A23187 induces expression of glucose-regulated genes and their heterologous fusion genes." Mol Cell Biol **5** (6) : 1212-1219.
- 40) Resendez, E., Jr., S. K. Wooden and A. S. Lee (1988) . "Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein." Mol Cell Biol **8** (10) : 4579-4584.
- 41) Ritacco, F. V., Y. Wu and A. Khetan (2018) . "Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies." Biotechnol Prog **34** (6) : 1407-1426.
- 42) Romanova, N. and T. Noll (2018) . "Engineered and Natural Promoters and Chromatin-Modifying Elements for Recombinant Protein Expression in CHO Cells." Biotechnol J **13** (3) : e1700232.
- 43) Roy, B. and A. S. Lee (1995) . "Transduction of calcium stress through interaction of the human transcription factor CBF with the proximal CCAAT regulatory element of the *grp78/BiP* promoter." Mol Cell Biol **15** (4) : 2263-2274.
- 44) Running Deer, J. and D. S. Allison (2004) . "High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1alpha gene." Biotechnol Prog **20** (3) : 880-889.
- 45) Shiu, R. P., J. Pouyssegur and I. Pastan (1977) . "Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **74** (9) : 3840-3844.
- 46) Srirangan, K., M. Loignon and Y. Durocher (2020) . "The use of site-specific recombination and cassette exchange technologies for monoclonal antibody production in Chinese Hamster ovary cells: retrospective analysis and future directions." Crit Rev Biotechnol **40** (6) : 833-851.

- 47) Suzuki, C. K., J. S. Bonifacino, A. Y. Lin, M. M. Davis and R. D. Klausner (1991) .
"Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca²⁺-dependent association with BiP." J Cell Biol **114** (2) : 189-205.
- 48) Tiller, K. E. and P. M. Tessier (2015) . "Advances in Antibody Design." Annu Rev Biomed Eng **17**: 191-216.
- 49) Wang, J., J. Lee, D. Liem and P. Ping (2017) . "HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum." Gene **618**: 14-23.
- 50) Wang, W., X. Guo, Y. M. Li, X. Y. Wang, X. J. Yang, Y. F. Wang and T. Y. Wang (2018) .
"Enhanced transgene expression using cis-acting elements combined with the EF1 promoter in a mammalian expression system." Eur J Pharm Sci **123**: 539-545.
- 51) Wang, Z., M. Gerstein and M. Snyder (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." Nat Rev Genet **10**(1): 57-63.
- 52) Wurm, F. M. (2004) . "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." Nat Biotechnol **22** (11) : 1393-1398.
- 53) Wurm, M. J. and F. M. Wurm (2021) . "Naming CHO cells for bio-manufacturing: Genome plasticity and variant phenotypes of cell populations in bioreactors question the relevance of old names." Biotechnol J **16** (7) : e2100165.
- 54) Xu, N., C. Ma, J. Ou, W. W. Sun, L. Zhou, H. Hu and X. M. Liu (2017) . "Comparative Proteomic Analysis of Three Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cells." Biochem Eng J **124**: 122-129.
- 55) Yabaji, S. M., A. K. Mishra, A. Chatterjee, R. K. Dubey, K. Srivastava and K. K. Srivastava (2017) . "Peroxiredoxin-1 of macrophage is critical for mycobacterial infection and is controlled by early secretory antigenic target protein through the activation of p38 MAPK." Biochem Biophys Res Commun **494** (3-4) : 433-439.
- 56) Yoshida, H. (2007) . "ER stress and diseases." Febs j **274** (3) : 630-658.
- 57) Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001) . "XBP1 mRNA is

induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107** (7) : 881-891.

- 58) Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi and K. Mori (2001) . "Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors β alpha and β beta that activates the mammalian unfolded protein response." Mol Cell Biol **21** (4) : 1239-1248.
- 59) Zucchelli, S., L. Patrucco, F. Persichetti, S. Gustincich and D. Cotella (2016) . "Engineering Translation in Mammalian Cell Factories to Increase Protein Yield: The Unexpected Use of Long Non-Coding SINEUP RNAs." Comput Struct Biotechnol J **14**: 404-410.