

番号: Selexis_2013_April_PLOS ONE

分野: MARS (MAR 含有トランスポゾンベクターによる抗体産生)

添付3

論文	MAR Elements and Transposons for Improved Transgene Integration and Expression
雑誌	PLoS ONE (2013), 8(4): e62784. doi:10.1371/journal.pone.0062784
著者	De'borah Ley ¹ , Niamh Harraghy ¹ , Vale'rie Le Fourn ² , Solenne Bire ³ , Pierre-Alain Girod ² , Alexandre Regamey ² , Florence Rouleux-Bonnin ⁴ , Yves Bigot ³ , Nicolas Mermoud ^{1*}
機関	1) Institute of Biotechnology, University of Lausanne, and Center for Biotechnology UNIL-EPFL, Lausanne, Switzerland, 2) Selexis SA, Geneva, Switzerland, 3) PRC, UMR INRA CNRS 7247, Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, France, 4) GICC, UMR CNRS 7292, UFR de Me'decine, Tours, France
要旨	<p>【背景】 遺伝子治療およびバイオ工学の応用開拓にとって、特に抗生物質による選別工程が適用できないケースでは導入遺伝子の信頼性の高い長期発現系確立は今もって意味のある挑戦的課題である。これに関連して、トランスポゾンは、哺乳動物の多くの細胞タイプに効率よいゲノム組込みを促進する能力において魅力ある代表的な遺伝子導入ベクターである。しかしながらゲノム組込み用ベクターからの発現は様々な転写および/または遺伝子抑制事象により阻害される。</p> <p>【研究目的】 本研究では、二つのMAR (1-68とX-29)をpiggyBacトランスポゾンに導入し信頼度の高い高効率発現がCHO細胞で可能となるか検討した。</p> <p>【結果】 MAR1-68をトランスポゾンの中央に配置した場合、転位効率は変わらず、抗生剤による選択無しで培養した集団全体のなかで容易に発現細胞を見出せた。MARを使うことにより挿入コピー当りの高い発現活性が認められ、信頼性のある発現がゲノム当り2-4コピーのMAR含有トランスポゾンベクターで可能になると期待できた。MAR X-29含有トランスポゾンは、選択遺伝子なしのベクターを用いてもポリクローナルと単クローン性CHO細胞で治療用タンパクの高い発現を達成した。</p> <p>【結論】 全体的に、MARとトランスポゾンの共用は遺伝子導入の改善に役立つ。薬剤耐性選択が適用できない場合や、導入遺伝子の組み込みコピー数を少数限定にしたい場合など、特に有用と考えられた。</p>

【分野背景】

機能研究、たんぱく質生産そして遺伝子/細胞治療のための効率の良い遺伝子導入とその発現は通常当該DNAの信頼置ける送達システムと標的細胞における転写が必要である。ウイルスあるいは非ウイルス性のベクターに基づいた遺伝子導入法は送達と発現を最大化するように開発されてきたが、高い信頼性と効率そして安全性を兼ね備えるシステムはまだ得られていない。例えば、非ウイルス性のベクターは、挿入変異のリスクに関してレトロウイルスベクターに比べれば低く、また調製も容易であるが[1]、遺伝子導入操作に物理的装置あるいは化学的試薬が必要でin vivoでの用途には向いてない、また通常これらのベクターはゲノムへの組み込みが必要な場合、効率の点でウイルスベクターに劣っている。ゲノムへの組み込みは、通常、分裂細胞における持続的な導入遺伝子発現ためには必須条件である。ゲノム組み込みはプラスミドベクターを用いた時、細胞内因子によって行われる。例えば、細胞のDNA修復と組換え酵素の作用による安定的導入の成否は、ひとつか数箇所の遺伝子座に組み込まれた希少な細胞の選別が可能か否かに依存している[2]。このため、マルチコピーのプラスミドを通常頭尾配列したコンカテマーの組み込みに行き着いた[3,4]。しかしながら、導入遺伝子の反復配置は、特に遺伝子増幅法を適用した場合、不安定な発現傾向を示し、結局、変動の大きい発現や遺伝子抑制に終わる傾向にある[5]。このような不都合な効果を軽減するためエピジェネティック調節エレメントを組み込んだベクターは非常に高度なレベルの発現を培養細胞系で達成している[6]。それにも関わらず、導入遺伝子の多数コピーの組み込みは、治療用たんぱく質産生細胞のスクリーニングを複雑なものにしている。実際、ひとつあるいは少数コピーの配列に点変異が起こる確率が上がることが予想されるが、初期の細胞株特性評価時期に検出が難しい[5-7]。

一方、トランスポゼースやウイルスインテグラーゼあるいは合成インテグラーゼなどのDNA組換え酵素を標的細胞で一時発現させるか、導入遺伝子DNAと一緒に共導入し導入遺伝子の組み込みを補助するといった方法が可能かもしれない。この方法は通常のプラスミドベクターに比べ導入遺伝子の組み込み頻度が向上する。これらのなかには、ウイルスインテグラーゼやトランスポゼースなどのランダムな組み込みを仲介するたんぱく質とは対照的に、ゲノムDNAの特定遺伝子部位を切断、組み込みを促進するメガヌクレアーゼやZnフィンガーヌクレアーゼなどのたんぱく質がある[8]。しかしながら、この標的組み込みは細胞集団の一部にしか起こらず、また組み込み遺伝子コピー数も1つか多くて2個程度に留まり、導入遺伝子発現を制限している。組換え酵素やヌクレアーゼは非特異的なDNA切断も起こし、染色体再構成の引き起こす[9]、これは培養細胞での活用において制限要因となる。

非ウイルス性ベクターの中では1コピーの組み込みを多数の染色体部位に高頻度で引き起こすトランスポゾンベクターが特に魅力的である[10]。ウイルスベクターと異なり、いくつかのトランスポゾンは細胞遺伝子の近傍への組み込みが優先されず、したがって有害突然変異が起こる可能性が低くなる。さらに、トランスポゾンの調製と取り扱いが容易である。トランスポゾンシステムは、運搬するDNAとその両側のフランキング配列である末端逆位配列(IRT)を含むトランスポゾンドナープラスミドとトランスポゼースを発現するヘルパープラスミドあるいはmRNAから構成される。いくつかのシステムは様々な細胞株に内因性のトランスポゾンと干渉することなくDNAを送達するように開発されている。例えば、piggyBac (PB) トランスポゾンは元々cabbage looper moth [11]から分離され、多くの哺乳動物細胞にDNAを効率よく転位することが報告されている[12]。

エピジェネティック調節エレメントは、不都合なエピジェネティック効果から導入遺伝子を保護するのに使われている。例えば、MAR 1-68に代表されるMARと称されるエレメントは、ヘテロクロマチンによる遺伝子抑制を回避し、導入遺伝子の発現亢進と組み込み数の増加を起こすことで知られている[2,13,14]。これらは、インシュレータとしても働き、他の近傍遺伝子の活性化を引き起こさない[15]。MARエレメントは高く持続性のある導入遺伝子発現をプラスミドあるいはウイルスベクター上で実現している[16]。しかしながら、このような優れた特性をもつMARエレメントとトランスポゾンを組み合わせることは未だ試されていない。MARをトランスポゾン内に配置した時、トランスポゾンのDNA転位効率や導入遺伝子発現に与える効果は未知である。

本研究では、ヒト MAR 含有 piggyBac トランスポゾンを用い、効率よい持続的な遺伝子発現が少数コピーの組み込み遺伝子で達成できるか、抗生物質の選択操作無しで産生した細胞集団を用い検討した。

【結果】

1. 被験配列含有トランスポゾンと PB トランスポゼース含有ヘルパープラスミドの構成は図 1 の通り

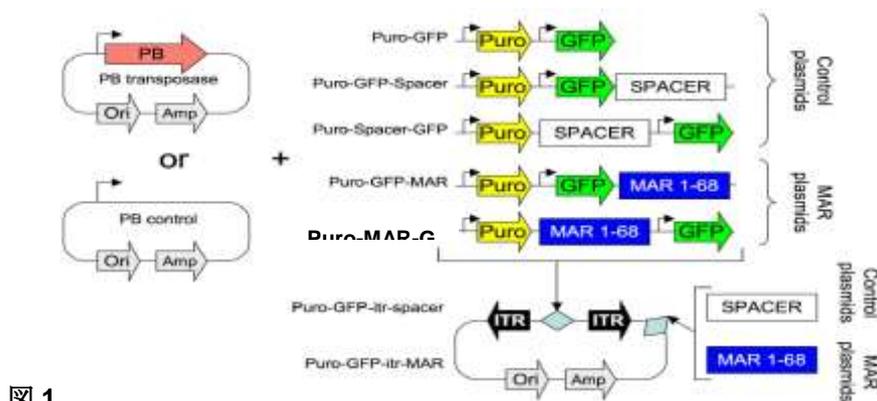


図 1

2. MAR 含有トランスポゾンの転位効率などに対する MAR の影響。

- 1) 耐性選択無しの場合の GFP 陽性細胞の出現頻度。導入後 3 週間培養(図 2A):
 - ◆ Puro-GFP、PB トランスポゼース(+)では 3%の GFP 陽性細胞、Puro-GFP、PB トランスポゼース(-)では 0.2%、前者はトランスポゼース活性、後者は細胞の自家組換え活性による。
 - ◆ Puro 下流で GFP 上流の位置の MAR とスペーサ対照は影響を与えず。Puro-GFP-MAR は阻害活性、スペーサ対照は影響なし。2つの ITR の外側に MAR あるいはスペーサ対照を配置した場合も影響は僅か。
 - ◆ 【結論】 MAR1-68 は、位置によって阻害はするが、陽性細胞増加の効果は全くなかった。
- 2) 50,000 の導入細胞を2週間の Puro 耐性選択培養、耐性細胞コロニー数を計測(図 2B): 耐性細胞出現率が全体に低い。対照の Puro-GFP で 0.6%。
- 3) 導入 GFP 遺伝子の転写レベルに対する MAR の影響。淘汰圧無しでの 3 週間の培養後あるいは薬剤耐性選択培養 2 週間後、細胞蛍光測定で平均 GFP 強度を測定。(図 3A,B): Puro 耐性選択の有無、トランスポゼースの有無に関わらず MAR 含有(中央位置)トランスポゾンが最も高かった、そして耐性選択の場合の平均強度は、淘汰圧無しより一桁高かった。
- 4) 組み込み遺伝子コピー数への MAR の影響(図 3S、図 4):
 - ◆ 組み込みコピー数への MAR 含有効果は特に認められなかった。
 - ◆ 淘汰圧無しの場合、トランスポゼース±で同程度で 1~6 コピー/ゲノムであった。
 - ◆ 薬剤耐性の場合、トランスポゼース無しの場合が、有りの場合(2~7)の倍量のコピー数(6~14)を示した。前者ではコンカテマーの関与が考えられる。
 - ◆ Puro-MAR-GFP のトランスポゾンが組み込み遺伝子1個当りの最も高い発現量を示した。

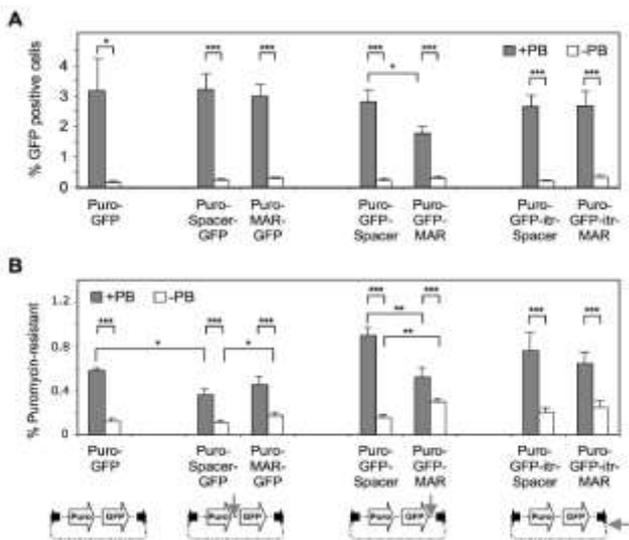


図 2 転位効率への影響

CHO 細胞に300 ng の各Puro-GFP, Puro-MAR-GFP、Puro-GFP-MAR、Puro-GFP-ITR-MARのプラスミッドを導入。MAR含有各プラスミッドの対照はMARの代わりに同じ長さのスペーサをいれたもの。PBTランスポゼース (塗潰し棒) と対照プラスミッドの構成は図1の通り(白色棒)。プラスミッド構成図の中の、灰色矢印はMARあるいはスペーサDNAの挿入位置、黒い矢印はPBのITR配列の位置をそれぞれ表す (A) 淘汰圧無しで3週間培養した細胞集団におけるGFP陽性細胞の出現頻度を細胞蛍光測定で定量した。(B) トランスフェクトした50,000個の細胞を10cmプレートに播種、ピューロマイシン存在下(5 μg/ml)で2週間培養後、耐性コロニー数を計測した。表示値は平均値 ± SEM (n = 3)。*P,0.05, **P,0.01, ***P,0.001.

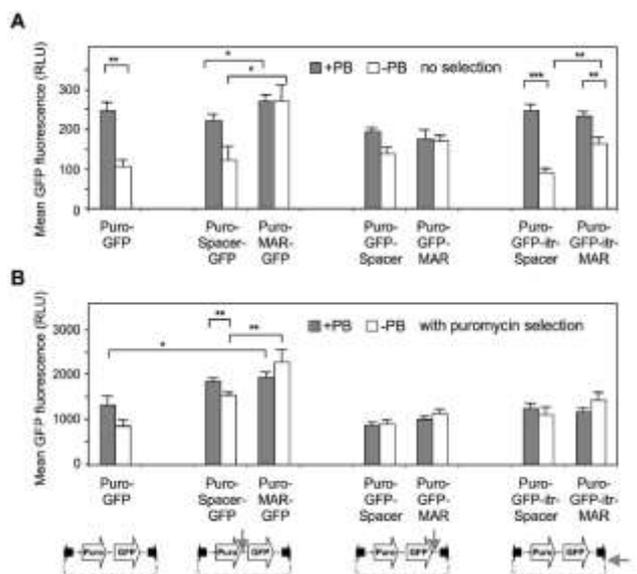


図 3 導入遺伝子の発現レベルへの影響

平均GFP蛍光強度を細胞蛍光分析法で測定(図2)。A: 淘汰圧無しの3週間の培養細胞 B: ピューロマイシン存在下2週間の培養細胞

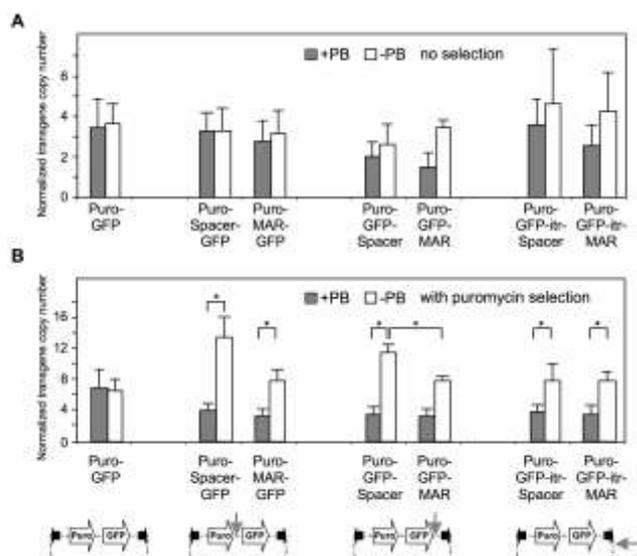


図 S3 組み込みコピー数への影響

淘汰圧のない培養の細胞群はFACSで選別した細胞、耐性選択の場合は培養後の細胞を用いて細胞βミクログロブリン遺伝子の測定値を基準にGFPコード配列の定量を行い、組み込み遺伝子数を求めた。(A)淘汰圧なし (B)ピューロマイシン耐性細胞 表示値は平均値 ± SEM (n = 3)。*P<0.05.

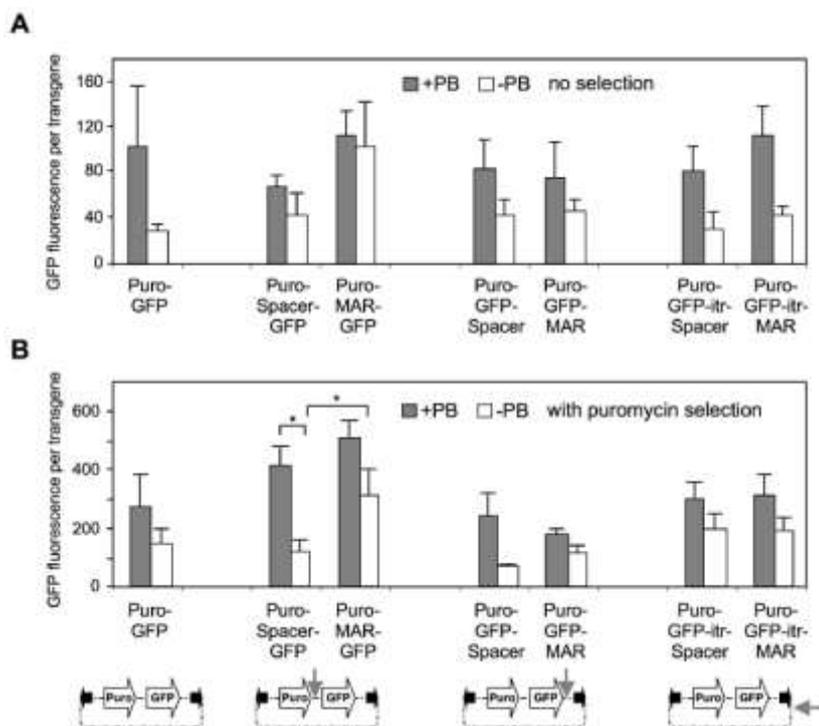


図4 組み込み遺伝子当りの活性比較

組み込まれたGFP遺伝子のコピー数は qPCR で定量した。平均GFP蛍光強度を組み込み遺伝子数で除して (平均発現活性) / (組み込みGFP遺伝子1コピー) を推測した。(A)淘汰圧なし (B)ピューロマイシン耐性 CHO 表示値は=平均値±SEM (n = 3). *P,0.05.

3. 選択マーカーを含まないトランスポゾンベクターを用いた治療用たんぱく質の発現

- 1) 浮遊培養系のCHO-M細胞[2]を用いた治療用たんぱく質の発現にMAR含有トランスポゾンを利用できるか、そして、淘汰圧なしでこれが可能か否か検討した。浮遊培養で増殖する細胞ではリポフェクションの遺伝子導入は効率的でないため、MAR1-68含有piggyBacベクターのCHO-Mへの導入に電気穿孔法を試みた。MAR1-68を中央に置いたトランスポゾンの電気穿孔法はGFP発現の細胞出現頻度を約15%にまで上昇させた。淘汰圧がない状態で発現は安定に4週間以上持続した(図S5A)。これまでと同様に、MARをトランスポゾンの端に配置した場合転位効率は減少した。抗生剤選択マーカー遺伝子を取り除き、MAR1-68をMARX-29で置換したトランスポゾン(GFPは含有)はMAR1-68(中央位置)と同様な活性を示した(図S5A)。CHO-M細胞に対して、単回あるいは2回反復[2]の電気穿孔法によるMAR含有トランスポゾンベクターの遺伝子導入を行った。全ての細胞を淘汰圧のない3週間の培養後細胞蛍光測定分析に供した。非常に高い比率の蛍光陽性細胞が、トランスポゼース(+)の単回(30%)および2回反復(45%)の電気穿孔法で得られた(図5A)。付着細胞へのリポフェクションによる遺伝子導入で得られた2-4%の出現頻度(図2A)をはるかに凌駕した。総じて、化学試薬より電気穿孔法でのトランスポゾンの転位効率ははるかに高い理由として、多くの細胞に導入遺伝子を取り込まれること、そして、一時発現が複数回の電気穿孔をする間に起こることが挙げられる。しかしながら、発現レベルは、リポフェクションと同じレベルであった(図5Bと図3A)。

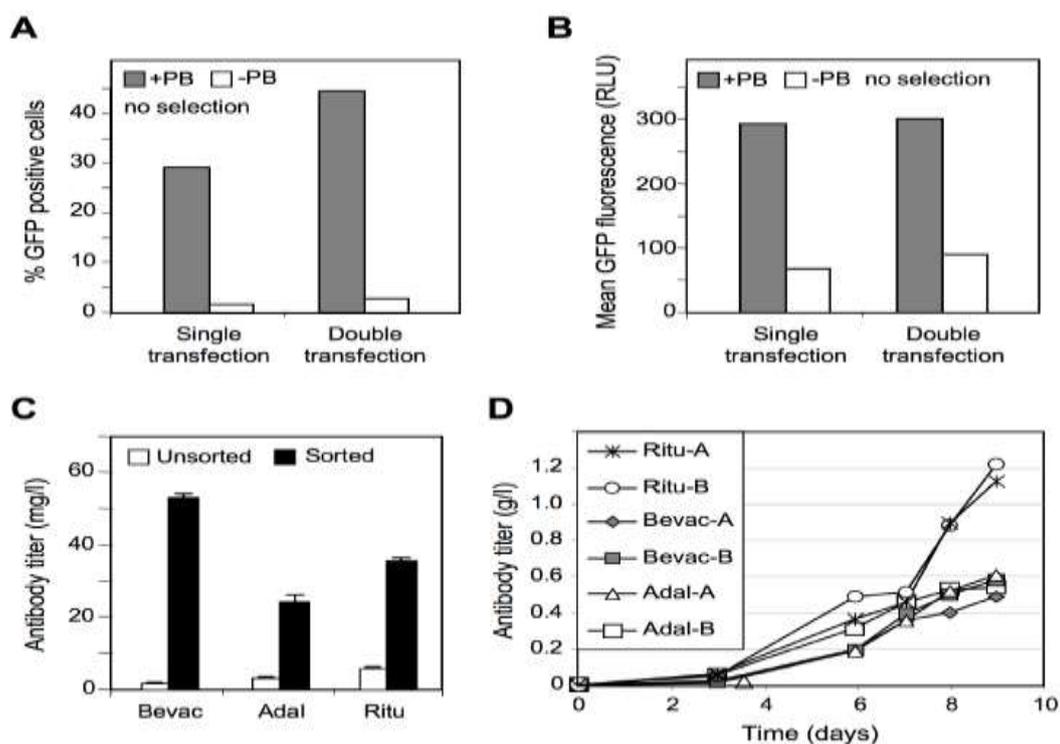


図 5 (MAR X-29+抗体遺伝子) 含有トランスポゾン単回あるいは2回反復電気穿孔導入した CHO-M 細胞の抗体産生能

- 次に、3種類のIg遺伝子(Bevacizumab, AdalimumabおよびRituximab)の重鎖あるいは軽鎖をコードする発現カセットを、ピューロマイシン耐性マーカー遺伝子とGFP遺伝子の代わりにMARX-29含有トランスポゾンベクターのMARX-29の上流に挿入した。この構築ベクターをpiggyBacトランスポゼースとCHO-M細胞に電気穿孔法で2回反復共導入した。選択圧無しでの3週間の培養後、培養上清の抗体量を測定した。何回かの導入試験で、1~8 mg/mlのBevacizumab, Adalimumab, そしてRituximabが得られ、これら抗体の有意な発現が、選択培養を経てないポリクローン性細胞集団の培養上清を評価することで得られる可能性を示唆した(図5C)。さらに、親和性選択法(細胞表面に一時的に現れる分泌Igを介してストレプトアビジン磁気ビーズで細胞を捕捉[20])により産生濃度を23~55mg/mLに上げることが出来た。選択マーカー遺伝子をつかったトランスポゾンの従来法[21]と同レベルの抗体量が本法で得られることが示唆された。
- コロニーピッキング機能付画像装置(ClonePix)を使うことで“non-sorted and non-selected”のポリクローン性細胞集団から高発現クローンが得られるか検討した。適切な大きさ(良い細胞増殖性の指標)と高い抗体産生能を示す二つのコロニーを、3種のIg産生細胞集団から拾い上げた。この計6クローンの抗体分泌能を、小規模の浮遊培養器具(バイオリアクター遠心管)での流加培養で評価した。これらのクローンは9日間の培養で0.55~1.2 g/Lの抗体を産生した(図5D)、尚、その間に高密度に到達したが高い細胞生存率を保持していた(図S6)。選択マーカーを含まないMAR含有トランスポゾンベクターを用い、治療用たんぱく質の産生が簡便に出来ることを例示した。

- 4) 次に、たんぱく質分泌能などの改良を目的としたCHO細胞の代謝工学にトランスポゾンベクターが使えるか検討した。我々は、最近、SRP9、SRP14、SRP54、SRPR α 、SRPR β そして/あるいはトランスロコンのサブユニットなど小胞体輸送に関わる諸因子の何通りかのセットの発現により、Infliximab抗体のような難発現性Igの有意な発現亢進が達成できることを別途報告した[22]。安定的にInfliximab抗体を発現するCHO-Mは、通常のプラスミッド発現ベクターとネオマイシン耐性選択プラスミッドの共導入か、あるいはトランスポゼース発現プラスミッドと一連の分泌経路たんぱく質発現用トランスポゾンベクターの共導入により樹立された。プラスミッドベクターでの遺伝子導入の場合、自家細胞内因子による導入遺伝子組み込み細胞をネオマイシン存在下の耐性選択培養で選別した。一方、トランスポゾンでの遺伝子導入の場合、淘汰圧なしで培養した。これらのポリクローン性細胞集団の培養物は、特異抗体の分泌量(一日当りおよび細胞当り)で評価した。プラスミッドベクターにより強化した細胞集団では若干の発現亢進が見られ、Infliximabのみを導入した対照細胞に比べ、最大1.5倍のIg産生量を示した(図6)。一方、トランスポゾンを利用した細胞集団は2倍以上の産生量を示した。

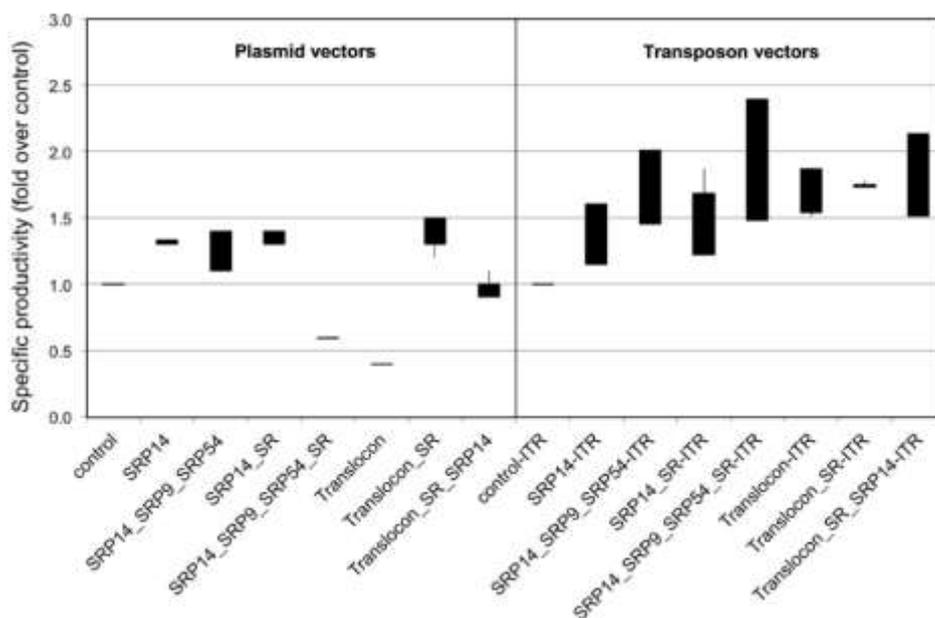


図 6. トランスポゾンベクターあるいはプラスミッドベクターから発現した分泌経路たんぱく質の導入遺伝子発現に対する効果

(A). トランスポゾンあるいは通常のプラスミッドベクターを、分泌経路たんぱく質(SRP9, SRP14, SRP54, SRP受容体 α と β サブユニット(SR)、あるいはTransloconを発現するように構築した。トランスポゾンベクターはpiggyBactトランスポゼースベクターと共導入した。一方、非トランスポゾンベクターは単独でInfliximab抗体を発現しているクローンに遺伝子導入した。[22]。淘汰圧無しで3週間培養後、細胞培養上清のinfliximab抗体を測定した。