= シリーズテーマ =

動物培養細胞と物質生産

動物培養細胞と物質生産	村上 浩紀	1498
初代細胞の無限増殖	白畑 実隆, David W. Barnes	1502
有用物質生産株の育種と分離	山田 耕路, 川原 浩治	1506
エリスロポエチンの構造と機能	大橋 秀哉, 竹内 誠	1509
ヒト型モノクローナル抗体の作製と生産	橋爪 秀一, 黒田 和彦, 亀井 優徳	1513
2つの特異性を有するハイブリッド抗体の作製	新本 洋士, 堂迫 俊一	1517

動物培養細胞と物質生産†

村 上 浩 紀

(九州大学農学部)

高等動物は、外因性および内因性の異常に対して、代謝調節、免疫応答などの諸反応によってそれらを解消し、正常にもどそうとする動きを持っている。この恒常性維持のための各種反応は、それが細菌感染箇所への貪食細胞の動員といった一見物理的な現象であっても、その情報は細胞が作り出した化学物質によって伝達される。それらの化学物質はきわめて高い作用特異性を有しており、一種の化学物質は生体内の一連の化学反応のうち特定の反応段階のみに関与する。生物体を構成する数百種の細胞は、ホルモンをはじめとする数多くの生理活性タンパク質の生産を分担しているが、これらの生理活性タンパク質の大部分はその性質あるいは存在が不明確であり、そのなかにはペプチドやタンパク質のように複雑な構造を持ち、いわゆる有機合成化学的方法で大量に生産することが必ずしも容易でないものも多い。従来、抗生物質を始めとして数多くの有用物質を微生物が与えてくれた。多くの有用微生物は土壌から分離したのと

同様に、動物体から有用物質を生産する細胞を分離すれば、従来になかった新しい物質を次々と手にすることができるようになるものと期待される。この意味で、動物細胞は、未知あるいは既知の有用物質の宝庫であるといえよう。

培養細胞を物質生産の手段として利用することは、すでに 1960 年代の後半から主としてワクチン生産を目的として始められ、1975~6 年にかけて米国 MIT およびアラバマ大学に主として細胞成分の大量調製を目的とした細胞大量培養施設が建設された。しかし当時の細胞培養は血清に頼らざるをえず、その実用性（経済性）には悲観的な見方が多かったように思われる。加えて 1973 年の Cohen, Boyer による DNA 組換え技術の完成、それを用いての板倉, Boyer (1977) によるソマトスタチンの大腸菌による生産、ジェネンティク社によるヒトインシュリンの大腸菌での生産 (1978) といった一連の画期的な成果によって、物質生産の手段としての細胞培養法の価値は低下したと受け取られていた。

筆者は、1972 年から動物細胞培養の研究を開始し、1978 年から G. H. Sato のもとで無血清培養法の研究に従事した。その間に、この方法によって細胞培養が一般的に血清を必要としなくなるであろうこと、さらには生

† Production of Biomacromolecules by Cultured Mammalian Cells.

Hiroki MURAKAMI (Institute of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812)

産活性タンパク質には高分子でしかも糖タンパク質などのように修飾を受けたものが多いことから、培養細胞による物質生産の可能性を強調してきた。事実血清中に現れる数百種のタンパク質のほとんどすべては糖タンパク質であることが知られてきた。近年、物質生産のための細胞培養法の特質が明らかになるにつれ、さらには多くの研究者による細胞大量培養法の研究や無血清培養法の進展につれて細胞培養法は有用物質生産の重要な手段としての地位を占めるようになってきた。

生理活性なタンパク質の多くは、ペプチド鎖の合成後に特定のアミノ酸残基がアルキル基で修飾を受けたタンパク質、さらには糖質の結合したタンパク質である。これらのタンパク質は微生物体を用いて完全な合成が困難である。複合タンパク質はそのタンパク部分のみでは生理活性が現れないものが多い。たとえば LH (luteinizing hormone: 黄体形成ホルモン)、FSH (follicle stimulating hormone: 濾胞刺激ホルモン)、エリスロポイエチン、ティッシュプラスミノゲンアクチベータ (TPA) などはシアル酸などの糖質を含んだタンパク質であり、糖質を除去するとその活性は失われてしまう。一方、糖タンパク質の生理活性の本体はそのタンパク部分にあり、*in vitro* で試験するかぎり、糖の除去されたアポタンパク質のみ十分なものである。しかしそのようなタンパク質でも動物体に投与すると部分的に糖を除去したタンパク質は糖を除去しないタンパク質に比べてきわめて急速に血液中から除去される場合がある⁽¹⁾。

リソソームの加水分解酵素は特定の細胞表面受容体に強い親和性を示して結合し効率よく取り込まれる。酵素上で受容体を認識する識別マーカーはマンノースリン酸を含むオリゴ糖であり、この識別マーカーを除去した加水分解酵素は完全な酵素活性を示すが細胞内には取り込まれない。ムコ多糖類代謝異常症に一例にハラー病がある。この場合には患者の細胞の大部分にグリコサミノグリカンの蓄積した大型の消化胞が観察され、特徴ある骨の変形が起こる。この細胞にはムコ多糖を分解する α -L-イズロニダーゼが欠損しているためで細胞外からこの酵素を加えてやれば病状は解消する。このときマンノースリン酸を含むオリゴ糖の結合したイズロニダーゼは細胞表面受容体と結合しエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるが糖の結合していないイズロニダーゼは受容体に結合しないため細胞内に取り込まれることはない⁽²⁾。さまざまな細胞に多様な受容体が発見され

てきており、糖類がその認識マーカーとして働くことが知られるようになってきた。このことは各種の機能性タンパク質がその糖鎖によって受容体に結合し、機能を発現していることを示している。近年、この糖鎖構造は動物種によって異なっていることが知られてきている。この差異が識別マーカーとしての糖鎖の機能に影響を及ぼすことになれば異種動物細胞中で合成されたヒト糖タンパク質はヒト細胞の受容体に必ずしも認識されないことになる。

このような点から生理活性な修飾あるいは複合タンパク質は培養細胞を用いて生産することが実際的である。したがって培養細胞を有用物質生産の手段として、いわば一種の新しい工業用微生物として利用する領域が開けつつある。物質生産の手段として動物細胞を用いる場合には細胞の分化した機能の表現としての有用物質生産能の発現、維持、さらには増幅を自由に制御できることが必要となる。そのためには細胞の生理環境を任意に調節することができる無血清培地が主要な役割を果たす^(3,4)。「動物培養細胞と物質生産」を主題とする今回のレビューでは有用物質生産を目的とした動物細胞培養法の基礎的な問題を具体的な例をもとに現在その方面でわが国で活発に業績をあげておられる各執筆者に下記の項目について議論していただくことにした。

- (1) 初代細胞の無限増殖
- (2) 有用物質生産株の育種と分離
- (3) エリスロポイエチンの構造と機能
- (4) ヒト型モノクローナル抗体の作製と生産
- (5) 2つの特異性を有するハイブリッド抗体の作製

培養動物細胞とくにヒト培養細胞が生産する有用物質は医薬として特定の疾患の治療に使用することを主要な目的としていることはいうまでもない。しかし細胞によって作られるこのタンパク性物質が、生体内で合成される場合にはそれが医薬としてではなく、あくまでも生体の恒常性を維持するための物質 (化学伝介物質: chemical mediator) として作られていることは明らかである。ではそのような化学伝介物質はそのままで医薬としての必要な特性をすべて備えているのであろうか。筆者は必ずしもそうではないと考える。化学伝介物質は健康人の体内に大過剰に存在することはない。それは化学伝介物質の合成が他の調節物質によって制御されているとともに、合成された化学伝介物質を一定のレベルで常に不活性化する機構 (たとえばインヒビタータンパクとの

しても認識されうるタンパク性化学仲介物質は必ずしもそのままで医薬として最適であるといえないことになる。理想的な医薬としては化学仲介物質が持つきわめて高い反応特異性を保存しながら生体内の不活性化反応をそれほど容易に受けたくないような物質が求められることになる。これらのことを模式的に示せば Fig.1 のようになる。化学仲介物質 (O) を生体に大量に投与しても、特異的インヒビター、RES 系等の恒常性維持機能 (A) によって急速にその濃度が低下し、高濃度の生理活性タンパク質を必要とする状態にある標的組織には十分量が到達しないことになる。一方、生理活性は維持しているけれども生体の調節機構の影響を受けないようにその構造が改造された改造機能物質 (⊙) は (A) の影響を受けないので効率よく標的組織に到達することになる。しかし生体の調節機能の影響を受けないことのみを重視してそのタンパク構造を大きく改変するとそれはもはや、自己タンパク (autologous protein) ではなく異種タンパク (heterologous protein) (●) として認識されることになり、生体防御機構 (B) によって排除されてしまうであろう。

化学仲介物質は関連した生化学反応を効率よく行うために、1 個の分子が複数の生理機能を持っている場合がある。インスリンはグルコース輸送、グリコーゲン合成等に関与する代謝機能促進活性と細胞増殖等の成長促進活性の2つの機能を持っている。これらの機能はインスリンの立体構造中の異なった部位にある (Fig.2)。両者の機能の発現濃度は 1000 倍程度の違いがあり、代謝機能促進活性は $0.1 \sim 1 \text{ nM}$ で現れるが成長促進活性は $0.1 \sim 1 \mu\text{M}$ で初めて示される。したがってもしインスリンの成長促進活性に注目して医薬として用いようとしても必然的に代謝機能活性が伴う。これは特定の疾患のみに対処しようとする目的には必ずしも合致しない。insulin like growth factor 1 (IGF-1) はグルコース酸化能はほとんど示さないがきわめて高い増殖促進活性を持つ⁽⁶⁾。このことは特定のタンパク構造を作製すれば、インスリンの持つ2つの機能の一方のみをインスリンのそれよりもはるかに強めることができることを示している。さらに七面鳥由来のインスリンはヒトあるいはブタのそれよりも両機能に関してはるかに強い活性を有して

いる。これらの事実はタンパク質の部分構造の変化によって一方の機能を除去したり、機能を昂進させたりすることが可能であること、さらに生体由来の化学仲介物質から医薬としての機能のよりすぐれたものを作りうることを示唆している。いいかえれば化学仲介物質は医薬としては必ずしも最高のものではないことを想像させる。優れたタンパク性医薬を製造するためには、タンパク質工学的考察によって天然より優れた物質を設計し、対応する DNA をそれが単純タンパク質に対応するものであれば微生物で、複合タンパク質に関するものであれば動物細胞で発現させることになるであろう。しかし、この場合でも考慮しておかなければならないことは前述のようにそのような非天然型タンパク質が抗原性を持っていることであり、タンパク性抗原構造の解明の研究の進展が重要な問題となってくる。

このように見てくると動物細胞の生産する医薬用タンパク質としては天然型のものが必ずしも最適ではなく天然型よりも優れた超天然 (super natural) 物質が望まれる。Super natural な医薬用タンパク質生産手段としての培養動物細胞の役割が今後増大してくると思われる⁽⁷⁾。

- (1) 村上浩紀:「細胞制御工学」, 学窓社 (1986).
- (2) A. Kaplan, D. T. Achord, W. S. Sly.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **44**, 357 (1976).
- (3) H. Murakami: "Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology," ed. by D. W. Barnes, D. A. Sirbasku and G. H. Sato, Alan R. Liss, New York, 1984, p. 197.
- (4) H. Murakami: "Advances in Biotechnological Processes, Vol.11," ed. by A. Mizrahi, Alan R. Liss, New York, 1988, in press.
- (5) 松尾 理, 田中健蔵, 松尾 理 編:「Non-UK type の plasminogen activator」, 学際企画, 1983, p. 61.
- (6) G. L. King and C. R. Kahn: "Growth and Maturation Factors," ed. by G. Guroff, John Wiley & Sons, New York, 1984, p. 223.
- (7) H. Murakami and K. Yamada: "Modern Approaches to Animal Cell Technology," ed. by R. E. Spier and J. B. Griffiths, Butterworth & Co., Sevenoaks, 1988, p. 52.