

電気穿孔法によるヒト型ハイブリドーマへの薬剤耐性遺伝子の導入

誌名	九州大学農学部学芸雑誌 = Science bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University
ISSN	03686264
巻/号	444
掲載ページ	p. 233-238
発行年月	1990年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



電気穿孔法によるヒト型ハイブリドーマ への薬剤耐性遺伝子の導入

立花宏文・白畑実隆*・山田耕路・村上浩紀*

九州大学農学部食糧化学教室

*遺伝子資源工学専攻細胞制御工学教室

(1989年12月28日 受理)

Introduction of Genes for Drug Tolerance into Human-Human Hybridomas by Electroporation

HIROFUMI TACHIBANA, SANETAKA SHIRAHATA*, KOJI YAMADA
and HIROKI MURAKAMI*

Institute of Food Chemistry and Laboratory of
Cellular Regulation Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812

緒 言

モノクローン抗体を分泌するハイブリドーマの作製は、1975年にその方法が確立(Köhler and Milstein, 1975)されて以来、適当な設備さえあれば特殊な技術を必要とせずに日常的に行われるようになった。またヒト型モノクローン抗体の作製においても、ハイブリドーマ出現効率が高い融合パートナー(Ohashi et al., 1986)が得られた現在では、単に抗原特異的ヒト型モノクローン抗体の作製のみを行う段階から、ヒト型モノクローン抗体の応用面に目を向けることが可能となってきた。モノクローナル抗体を病気の診断や治療に利用する場合、ハイブリッド抗体(Milstein and Cuello, 1983; Sinmoto et al., 1988)の作製に見られるように、天然では得られない抗体や天然型よりも優れた特性を持つ超天然型抗体を作製するアプローチが今後重要となるであろう。超天然型抗体を得るには、抗体の化学修飾、優れた抗体を産生するハイブリドーマ突然変異体のスクリーニング、遺伝子操作による方法などが考えられる。これらの方法の中で、遺伝子操作による方法は高い確率で変異抗体を得ることができる点で優れている。また、単に外来遺伝子を導入するだけで、ハイブリドーマの抗体産生に関与する遺伝子群の発現が乱されて、異なる性質をもった抗体が産生される可能性も考えられる。ハイブリドーマのような浮遊細胞に

外来遺伝子を導入する方法として、DEAE-デキストラン法が遺伝子の一時的発現に利用されているが安定な形質転換はできていない(Sompayrac and Danna, 1981)。これに対し、電気穿孔法は電気パルスにより細胞膜に穴を開け、遺伝子を導入する方法であり、ハイブリドーマに対して高い導入効率が期待された。

そこで、種々の抗原特異的抗体を産生するヒト型ハイブリドーマに、薬剤耐性遺伝子である neo や gpt 遺伝子をもつプラスミド DNA を電気穿孔法により導入し、ハイブリドーマの抗体産生に及ぼす遺伝子導入の影響を検討したので報告する。

実験材料及び方法

細胞及び培養法

ヒト肺ガン特異的抗体を産生するヒト-ヒトハイブリドーマ HB4C5 及び HF10B 4 は、当教室で開発された高い融合効率をもつヒト型親細胞株である NAT-30 と、肺ガン患者のリンパ球とを融合させることにより作製された(Murakami et al., 1985)。H15F2 (Aihara et al., 1988) は HO-323 (Ohashi et al., 1986) を親株とするヒト-ヒトハイブリドーマであり、乳ガン細胞に対する抗体を産生する。ハイブリドーマは 5% 牛胎児血清 (FCS) を添加した ERDF 培地で培養された。肺線癌細胞株 PC-8 は 10% FCS 添加 ERDF 培地で培養

された。

pSV2-neo プラスミド DNA はキリン株式会社より提供された。また、Eco gpt-E1A プラスミド DNA は、東京大学の小野寺一清助教授より提供された。

電気穿孔法による遺伝子導入

細胞懸濁液を50ml容の遠心管に移し、1000rpm, 5分遠心した。細胞ペレットを導入用緩衝液(0.25M Mannitol, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.2mM Tris-HCl, pH7.4)で2回洗浄し、この緩衝液およびDNA溶液で 2×10^7 /mlの細胞密度となるように懸濁した。DNA濃度は終濃度で100 μ g/mlとなるようにした。この懸濁液をチェンバーに入れ、電気穿孔装置(電子科学製 ESCF-3001型)を用いて電気パルスを与えた。パルス電圧: 4.0~5.0KV/cm, パルス回数: 2回, パルス幅: 30マイクロ秒の条件でパルスを印加した。印加後、常温で10分放置し、ERDF培地に懸濁し、一度洗浄した。その細胞を10% FCS-ERDF培地に懸濁し、 $1 \sim 3 \times 10^5$ /mlの細胞密度で96well培養プレートに0.1mlずつ分注した。また、パルス電圧印加後の生存率を、トリパンブルー染色法を用いて測定した。

形質転換体の選択

実験に使用した薬剤耐性遺伝子は以下に述べるようなものである。pSV2-neo (Southern and Berg, 1982)はトランスポゾン Tn5由来のアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neo 遺伝子)をSV40 oriを含むエンハンサー、プロモーター、スプライシング及びポリA付加シグナルからなるpSV2ベクターにつないだものである。neo 遺伝子が導入、発現された哺乳動物細胞はタンパク質合成阻害剤G418存在下で生育できる。

一方、Eco gpt-E1A (Shiroki et al., 1983)はpSV2-neoのneo 遺伝子がEcogpt 遺伝子及びアデノウィルスE12株由来のE1A 遺伝子に置換されているのみで、他の塩基配列はpSV2-neoと全く同じである。Ecogpt (Mulligan and Berg, 1981)は核酸合成阻害剤ミコフェノール酸(MPA)耐性を付与する遺伝子であり、MPAを含む選択培地中でEcogptが形質導入された細胞を分離することができる。G418, MPA両薬剤ともに細胞によって感受性が異なることが知られており(Toneguzzo et al., 1986), まず細胞の死滅する薬剤濃度を検討した。その結果、G418に関しては2 mg/ml, MPAは2 μ g/mlで細胞の増殖を阻害するのに十分であり、それぞれこの濃度に設定した。キサンテン濃度に関しては原報(Mulligan and Berg, 1981)に従って250 μ g/mlとした。15% FCS-ERDFに上記の濃度の薬

剤を含む培地を形質転換体選択培地とした。電気穿孔法による遺伝子を導入後、分注した細胞を5% CO₂, 7% O₂制御インキュベーター内で48時間培養後、2倍濃度の薬剤を含む上記選択培地を各wellに100 μ lずつ添加した。以後、2-3日毎に選択培地を交換した。形質転換体の出現が認められたwellについては選択培地から10% FCS-ERDF培地に切り替え、スケールアップを行った。形質転換効率は1well中の形質転換細胞を単クローンとみなし、パルス電圧印加後の生細胞 10^6 個当たりの形質細胞出現well数で示した。

抗体量の測定

ERDF培地にインスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、重セレン酸ナトリウムを添加した培地(ITES-ERDF培地)及びFCSを10%添加した培地(FCS-ERDF培地)中で 5×10^5 /mlの細胞密度で各細胞をまいた後、3日間培養し、細胞数及び抗体産生量を測定した。抗体量の測定には後述するELISA法を用いた。

ELISA法

抗原である細胞株PC-8をシャーレより回収し、細胞ペレットを必要量の10% FCS-ERDF培地に懸濁し、96well培養プレートの各wellに0.1mlずつ分注した。プレートのwellの底面に単層を細胞が形成するまで培養後、培養液を捨て、各wellに300 μ lの0.06%グルタルアルデヒド溶液を添加し、室温で15分放置することにより細胞を固定した。0.05% Tween20含有生理リン酸緩衝液(TPBS)で3回洗浄後、非特異的吸着部位を防ぐために、蒸留水で4倍希釈したブロッカー(雪印乳業)を各wellに0.3mlずつ添加した。37°Cで2時間放置後、TPBSで3回洗浄し、各細胞の培養上清を各wellに添加した。培養上清を捨てTPBSで3回洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ(POD)標識抗ヒトIgM抗体(Tago社)を各wellに100 μ lずつ添加し、37°Cで1時間保温した後、溶液を捨て、TPBSで3回洗浄した。最後に基質溶液(0.03% H₂O₂及び0.3 mg/ml p-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt含有0.1Mクエン酸緩衝液)を各wellに100 μ l添加し、37°Cで発色反応を行った。96wellマイクロプレート用分光光度計を用いて415nmにおける吸光度を測定した。抗体量の測定のために抗原細胞の代わりに抗ヒトIgM抗体を50mM炭酸緩衝液(pH9.6)に溶解し、1000倍希釈したものをイムノプレートの各wellに0.1mlずつ分注し、4°Cで一晩放置した。溶液を捨てTPBSで3回洗浄し、ブロッキングを行い、以下の操作はすでに述べた通りに行っ

Table 1. Frequency of stable transfection of human-human hybridomas by electroporation.

Cells	Exp.	electric field strength (KV/cm)	viability after electroporation	No. of wells seeded	No. of wells growing (No. per 10 ⁶ cells)
HB4C5	1	5.0	89%	576	8 (3.6)
	2	5.0	26%	192	7 (21.7)
HF10B4	1	4.5	74%	96	5 (5.4)
	2	4.5	67%	192	52 (15.7)
H15F2	1	4.0	63%	192	1 (0.3)
	2	4.0	50%	192	4 (1.9)

Various human-human hybridomas were subjected to electroporation in the presence of the pSV2-neo plasmid DNA (100 µg/ml).

Table 2. Effect of selection condition of drug-resistant hybridomas on frequency of transfection.

Exp.	electric field strength (KV/cm)	viability after electroporation	No. of wells seeded	No. of wells growing (No. per 10 ⁶ cells)
1	4.0	64%	480	8 (1.9)
2	4.0	60%	480	0 (0)

H15F2 cells were subjected to electroporation in the presence of Eco gpt-E1A plasmid DNA at the same condition as described in Table 1. After electroporation, cells in Exp. 1 were cultured for 48 hr in ERDF containing 10% FCS. Then, the medium was changed to selection medium containing mycophenolic acid and xanthin.

In Exp 2, the experimental conditions were the same as in Exp 1, except that culture period in ERDF containing 10% FCS was 96 hr, and selection medium contained 20% conditioned medium of H15F2 cells in addition to mycophenolic acid and xanthin.

た。既知濃度のヒト血清 IgM (ミドリ十字社) を用いて標準曲線を作製し、培養上清中の抗体量を測定した。

結果および考察

I. 電気穿孔法による薬剤耐性遺伝子の導入

電気穿孔法は一对の電極板の間に細胞懸濁液と DNA 溶液を混ぜ合わせて入れ、電気パルスをかけることにより細胞膜を局部的に破壊し、物質の透過性を増大させることにより細胞内に DNA を取り込ませる方法である。パルス電圧と細胞膜の透過性には比例関係があるが (Schwister and Deuticke, 1985)、逆に過大なパルスは膜の非可逆的な破壊を生じ、細胞は死滅する。そこで、どの程度のパルス電圧を印加できるかを、実際の導入手順に従ってパルス電圧を細胞に印加し、細胞の生存率を検討した。生存率が50%程度となるパルス電圧を目安に、HB4C5に対して5.0KV/cm、HF10B4に対して4.5KV/cm、H15F2に対して4.0KV/cmのパルス電圧をそれぞれ用いることにした。Table 1に示した様に、形質転換効率には0.3~21.7といった

ような幅広い値が得られた。HB4C5では2回同じ条件下で pSV2-neo を導入した結果、パルス電圧を印加直後の生存率が89%の場合3.6、23%の場合21.7であった。HF10B4においては生存率が74%の場合5.4、67%の場合15.7であった。これらの結果はパルス電圧を印加する場合、生存率がある程度低い値を示す程度の障害を細胞に与えることが形質転換効率を増加させるために必要であることを示唆している。H15F2における結果もこのことを支持した。これらの結果から、遺伝子の効率良い導入には、パルス印加後の生存率を一つの指標として用いることができよう。

遺伝子として Eco gpt-E1A を用い、pSV2-neo 導入時と同じ条件下で F15F2に導入した場合の結果を Table 2 に示した。実験 1 の条件で遺伝子導入及びスクリーニングを行った場合、3回の繰り返し実験で形質転換細胞は一つも得られなかった。そこで実験 2 では遺伝子導入時の条件はそのままとし、スクリーニング条件を変化させた。変化させた点は 1. 薬剤による選択開始時期を導入後 2 日目から 4 日目に遅らせたこと、2. 選択培地に H15F2 を通常培地で培養すること

Table 3. Immunoglobulin production of hybridomas and their drug-resistants.

Cells	10% FCS		ITES	
	Ig Concentration, (ng/ml)	Ig/cell (ng/10 ⁵ cells)	Ig Concentration (ng/ml)	Ig/cell (ng/10 ⁵ cells)
HB4C5	960	188	68	27
clone 1	93	23	96	42
2	1533	277	277	80
3	1650	390	113	66
4	1155	385	60	70
5	1380	300	70	83
TM5A11	735	259	42	24
TF23B11	656	256	43	34
H15F2	127	23	—	—
clone A	357	56	—	—
clone B	522	61	—	—

Various human-human hybridomas and their drug-resistants (5×10^4 cells/ml) were cultured in ERDF containing 10% FCS or ITES for 3 days. Clone 1, 2, 3, 4 and 5 were drug-resistants produced by transfection of HB4C5 cells with pSV2-neo, and TM5A11 and TF23B11 were those with Eco gpt-E1A. Drug-resistants of H15F2 cells with pSV2-neo were clone A and B.

で得られた培養上清 (conditioned medium) を20%添加したことである。こうした操作で1.9の形質転換効率を得られた。選択開始時期を遅らせること及び低密度からの細胞自身の増殖を助ける conditioned medium (Puck and Marcus, 1955) を添加したことは、いずれも極めて少ない形質転換体が増殖するのを助けることを目的としたものである。遺伝子導入に際しては、導入時の条件のみならずその後のスクリーニング条件を考慮することで形質転換体を効率良く得ることが示唆された。

II. 形質転換体の抗体産生能

ウイルスにはSV40初期遺伝子の72bp反復配列のように、プロモーターからの転写活性を増大させるエンハンサー領域が存在することが知られているが (Khoury and Gruss, 1983), 抗体遺伝子にも同様の働きを持つエンハンサー領域が見いだされている (Falkner and Zachau, 1984), さらに抗体遺伝子のエンハンサーに作用する細胞内調節因子がSV40エンハンサーにも作用することが示されている (Sassone-Corsi et al., 1985). 本研究に用いたプラスミドはSV40エンハンサー部位を有しており、さらにE1A遺伝子の産物であるE1Aタンパク質はトランス作用を有する因子である。そこで、pSV2-neo及びEco gpt-E1Aの導入による抗体産生に与える影響をHB4C5、H15F2について検討した。

HB4C5にpSV2-neo遺伝子を導入した細胞5株のうち、10% FCS添加培地ではクローン2, 3, 4, 5の細胞において抗体産生量の増加が見られた (Table 3). 一方、同じpSV2-neo遺伝子導入株であるクローン1ではむしろ抗体産生量は減少した。ITES添加培地ではHT0以外の細胞は抗体産生量がFCS添加培地に比べ減少しているのに対し、クローン1は細胞数当りの産生量はむしろ増加していた。再度pSV2-neo遺伝子をHB4C5に導入した際に得られた形質転換体5株のうち2株においてクローン1同様にFCS添加培地での抗体産生の減少が観察された。HB4C5にEco gpt-E1A遺伝子を導入した細胞株TM5A11及びTF23B11においては顕著な差は観察されなかった。H15F2にpSV2-neoを導入した細胞2株 (クローンA及びB) ではいずれも細胞数当りの抗体産生量が2.5倍増加した。このように、抗体産生が遺伝子導入によって増加あるいは減少したことから、遺伝子導入法が高い抗体産生能を持つハイブリドーマを作製するために利用しうる可能性が示唆された。

III. ハイブリドーマへの遺伝子導入による抗体の抗原特異性への影響

つぎにpSV2-neo遺伝子の導入が、ハイブリドーマの産生する抗体の抗原との反応性に及ぼす影響を検討した。HB4C5は肺ガン細胞株PC-8と特異的に反応するモノクローン抗体を産生する。HB4C5およびその

pSV2-neo 導入株の産生する抗体の PC-8 との反応性を Table 4 に示した。クローン 2 及び 3 が産生する抗体は HB4C5 の産生する抗体よりも PC-8 と高い反応性を示した。これに対し、クローン 1 が産生する抗体は PC-8 とほとんど反応しなかった。なぜ抗体の抗原との反応性に変化が生じたかについては現在検討中であるが、抗体産生能が pSV2-neo 遺伝子の導入により増加した株では反応性が増加し、抗体産生能が減少したクローン 1 では抗原との反応性が低下したことは、pSV2-neo 遺伝子の導入の抗体分子の生合成への関与を強く示唆するものである。

以上、述べてきた様に、薬剤耐性遺伝子である neo を含むプラスミド DNA を導入したハイブリドーマは抗体産生能および産生する抗体の反応性に変化を生じさせた。同様な薬剤耐性遺伝子である gpt をもつプラスミド DNA を導入したハイブリドーマでは顕著な変化は見られなかったことから、形質導入の効果がプラスミドによって異なる可能性が示唆された。形質導入により形質転換体の産生する抗体の性質が変化する機構については、さらに検討する必要がある。しかし、ここで示されたような、外来遺伝子の導入による抗体分子生合成の変化は、ヒト型ハイブリドーマによるモノクローン抗体の産生増強等に今後利用できるであろう。

要 約

電気穿孔法による外来遺伝子のヒト型ハイブリドーマへの導入法及びその抗体産生に及ぼす影響を検討した。電気穿孔法により、抗原特異的抗体を産生するヒト型ハイブリドーマ HB4C5, HF10B4 及び H15F2 に薬剤耐性遺伝子をもつ pSV2-neo や Eco gpt-E1A プラスミドを容易に導入することができた。電気穿孔法によるハイブリドーマへの遺伝子導入効率率は電気パルスの条件及び形質転換体のスクリーニング法に大きく依存した。ヒト型ハイブリドーマへ pSV2-neo を導入することにより、抗体産生能及び抗体の反応性に変化が認められた。これらの結果は、優れた抗体産生能を持つハイブリドーマの作製手段として、ハイブリドーマへの外来遺伝子の導入が利用しうることを示唆した。

文 献

Köhler, G. and C. Milstein 1975 Continuous cultures

Table 4. Reactivity of monoclonal antibodies of HB4C5 cells and their drug-resistants with PC-8 cells.

Cells	Reactivity
HB4C5	0.140
clone 1	0.070
2	0.340
3	0.380

Reactivities were determined by ELISA, and represented by the absorbance at 415 nm.

of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497

Ohashi, H., S. Hashizume, H. Murakami, K. Aihara, K. Shinohara and H. Omura 1986 HO-323, a human B lymphoblastoid cell line useful for making human-human hybridoma. *Cell Biol. Int. Rep.*, **10**: 77-83

Milstein, C. and A. C. Cuello 1983 Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*, **305**: 537-540

Shinmoto, H., H. Murakami, S. Dosako, K. Yamada and H. Omura 1988 Human hybrid immunoglobulin M containing immunoglobulin A. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **24**: 505-510

Sompayrac, L. M. and K. J. Danna 1981 Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7575-7578

Murakami, H., S. Hashizuma, H. Ohashi, K. Shinohara, K. Yasumoto, K. Nomoto and H. Omura 1985 Human-human hybridomas secreting antibodies specific to human lung carcinoma. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **21**: 593-596

Aihara, K., K. Yamada, H. Murakami, Y. Nomura and H. Omura 1988 Production of human-human hybridomas secreting monoclonal antibodies reactive to breast cancer cell lines. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **24**: 959-962

Southern, P. J. and P. Berg 1982 Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV 40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**: 327-341

- Shiroki, K., I. Saito, K. Maruyama, Y. Fukui, Y. Imatani, K. Oda and H. Shimojo 1983 Expression of adenovirus type 12 early region 1 in KB cells transformed by recombinants containing the gene. *J. Virol.*, **45**: 1074-1082
- Mulligan, R. C. and P. Berg 1981 Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthin-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2072-2076
- Toneguzzo, F. and A. Keating 1986 Stable expression of selectable genes introduced into human hematopoietic stem cells by electric field-mediated DNA transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 3496-3499
- Shwister, K. and B. Deuticke 1985 Formation and properties of aqueous leaks induced in human erythrocytes by electrical breakdown. *Biochim. Biophys. Acta*, **816**: 332-348
- Puck, T. T. and P. I. Marcus 1955 A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**: 432-437
- Khoury, G. and P. Gruss 1983 Enhancer elements. *Cell*, **33**: 313-314
- Falkner, F. G. and H. G. Zachau 1984 Correct transcription of an immunoglobulin gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature*, **310**: 71-74
- Sassone-Corsi, P., A. Wildeman and P. Chambon 1985 A trans-acting factor is responsible for the simian virus 40 enhancer activity in vitro. *Nature*, **313**: 458-463

Summary

We examined the effect of gene transfer into human-human hybridomas by electroporation on their production of immunoglobulin. Drug-resistant hybridomas were easily obtained after transfection of hybridomas with the pSV2-neo or Eco gpt-E1A plasmid DNA by electroporation. Cell viability after electroporation and selection condition of drug-resistant hybridomas affected frequencies of transfection. Drug-resistant hybridomas showed different productivities of monoclonal antibodies which have different binding properties for antigen. These results suggested that gene transfer technique would be useful for producing hybridomas which secrete a lot of superior monoclonal antibodies.