

# タンパク質の品質管理機構を応用した生産性向上手法

大政 健史

セルプロセッシング計測評価研究部会の大きな目的の一つは生物工学分野における「動物細胞」の産業応用にかかる技術課題を解決することにある。動物細胞の産業応用は、近年話題になっているiPS細胞やES細胞、初代細胞などを用いた再生医療・細胞療法・医薬品評価などの細胞自身を治療や評価の手段として利用する手法と、細胞自身を媒介として医薬品を生産する手法がある<sup>1)</sup>。後者は、生体外大規模細胞培養が実現可能になることにより実現されており、古くは1970年代のワクチン生産から、1980年代後半に始まった組換えタンパク質生産までさまざまな産業応用がなされている。これらの大規模培養の手法は、微生物の培養において培われた生物化学工学の知識と経験が生かされている典型的な例と言えよう。

一方、生物化学工学的な定量的な取り扱い、その生産を担う細胞自身に対してはあまり十分には行われてはこなかった。本研究部会では、産業応用に必要な計測評価を切り口の一つとして、定量的取り扱い手法の確立や、それに基づいた細胞自身の改良を行うことにより「動物細胞」の産業利用に関する基盤を確立することを目指している。本特集記事においてはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を例にとり、最近の動向と筆者らが行っているタンパク質の品質管理機構を応用した生産性向上を目指した細胞の改良<sup>2,3)</sup>について紹介する。

## タンパク質生産における動物細胞の位置づけ

タンパク質医薬品の生産における動物細胞につきまとう代名詞は「コストが高い」、「微生物に比較して生産性が悪い」である。これは、1990年代初頭に血清培地を用いてタンパク質生産を行うプロセスにて生産された薬価が、合成医薬品と比較して高く位置づけられたこと、また大学などの実験室で利用されている細胞培養用培地の値段が非常に高く設定されており、さらに実験室レベルで構築する細胞の生産性が低いために、実験室で生産するコストが高く誤解を招いていると考えられる。

動物細胞には、正しくフォールディングされた糖タンパク質を培地中に分泌生産でき、培地からの他タンパク質の混在が少なく、しかも得られた生産物の分解が少ないという大きな利点があるものの、欠点ばかり強調されているために、その特徴や問題点が明確になっていないと考えられる。では、実際のコストや生産性はどの程度

になっていると考えられるのであろうか。下記では、まずはコストや生産性について述べる。

**大腸菌とのコスト比較** 動物細胞と微生物細胞の産業生産におけるコストを直接比較した論文はあまりみかけない。古いデータとなるが、1993年にPall社のDatarらが組換えティッシュプラスミノゲンアクティベータ(tPA)生産を大腸菌とCHO細胞にて非常に詳細に解析し、比較した例がある<sup>4)</sup>。この論文ではCHO細胞で5%血清培地を用いて33.5 mg/lで生産、回収率(overall process yield) 47%と、大腸菌で460 mg/l生産、回収率2.8%を比較した結果、1gのtPAを生産するのに必要なコストはCHO細胞で生産した場合は10,600ドル、大腸菌は22,030ドルという試算となっている(図1)。

この理由として、当時の実データに基づいて設定した低い回収率がコスト増加の大きな要因となっているが、もし大腸菌においてリフォールディング効率が90%に改善したとしても7,530ドルとなり、コスト的にも大腸菌が極端に有利であることはない。コストの内訳はCHO細胞ではannual material costとして培養が75%、回収が25%、逆に大腸菌では培養が12%、回収が88%となり、精製工程の複雑さが大きく影響し、大腸菌のコストは思ったより高いと言わざるを得ない。ここでは植物における生産は示されていないが、植物個体を用いる場合、精製工程の複雑さは大腸菌と同様と考えられ、生産コストは大腸菌と同レベルと推定される。この試算では、CHO細胞プロセスにおける血清のコストに占める割合

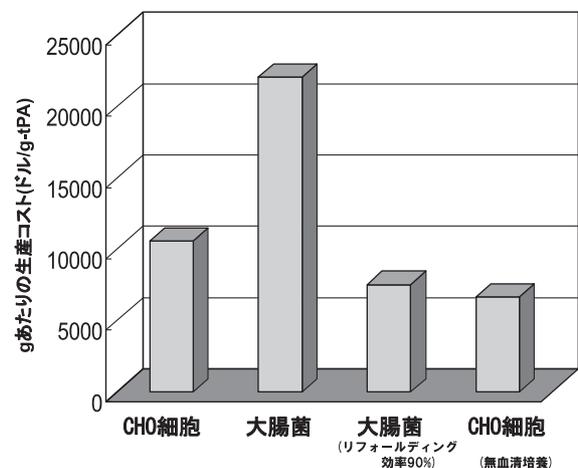


図1. tPA生産コスト比較 (文献4を元に作成)

は55%となっており、無血清培地を用いることにより1gあたり6,600ドルにまで低下する計算になる。これらの計算の基となるデータは当時の価格、技術であるが、その考え方と方向性は現在でも同様と考えられる。

近年では抗体に限ればg/lレベルでの生産も可能となっている。ではg/lレベルでの生産におけるコストはどの程度と推定されるであろうか。Wyeth社のKelleyによって2007年に発表された細胞培養を用いた抗体(IgG)生産の精製プロセスの試算に関する文献<sup>5)</sup>によると、10t培養槽(10,000l)を用いて5g/l濃度にてCHO細胞を用いて抗体を生産した場合の細胞培養にかかるコストは1gの最終製品あたり2ドル(人件費は除く)であり、「コストが高い」というイメージはすでに過去のものと言えよう。

**酵母との生産性比較** 一方、微生物に比較して生産性はどうか。細胞あたりの生産性は比生産速度にて評価することができる。CHO細胞を用いて高生産株を構築する場合、20–60 pcd (pg/cell/d)の比生産速度を持つ高生産細胞が構築されている<sup>6)</sup>。CHO細胞の正確な乾燥細胞重量はデータがほとんどないが、筆者らがハイブリドーマ細胞で得られている値<sup>7)</sup>を参考に、300 pg/cellと仮定して計算すると、20–60 pcdは0.0028–0.0083 (g-protein/g-dry-cell/h)の比生産速度に相当する。高生産でよく知られているメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の流加培養を用いたヒトアルブミン生産(12 g/lを達成時)における細胞の比生産速度は0.0005 (g-protein/g-dry-cell/h)程度と報告されており<sup>8)</sup>、CHO細胞の生産性は、その5–10倍と、非常に高い乾燥細胞重量あたりの生産性が達成されていることになる。

一方、酵母の流加培養系に比べて動物細胞流加培養では高細胞濃度が達成できていない<sup>9)</sup>。また、動物細胞の比増殖速度も酵母に比較して非常に低い<sup>9)</sup>。すなわち、現在の動物細胞系の特徴は、高いコストや低い生産性ではなく、低い細胞濃度と低い増殖速度にあると言える。さらに、g/lを実現できる高生産株構築方法も充分には確立していない。また実際の生産の観点からみると、必要なものは生産物であり、細胞ではないため、高細胞濃度は必要ではない。したがって、現時点での律速段階は高生産株構築と増殖速度の遅さと考えられるであろう。

#### タンパク質の品質管理機構を応用した生産向上法

いくつかの欠点はあるものの、動物細胞、とりわけ遺伝子組換えCHO細胞を用いた抗体生産は実際に多数の抗体医薬シーズの開発に使われ、上市されている。それに伴いここ10年ほど、飛躍的にプロセスの改良が行われた。特に適切な培地および培地添加物の開発ならびに、これらのショット的な添加により細胞培養時間が延長さ

れ、細胞あたりの生産性(比生産速度)も培養中を通じて高いレベルで維持可能となった。現在、抗体については10 g/lの濃度も報告されるようになってきている<sup>10)</sup>。

もちろん、この間も一貫して細胞自身の改良(比生産速度の増強)についてもさまざまな技術革新がなされている。高比生産速度を有する細胞株を構築するためのアプローチは大きく2つに分類可能と考えられる。1つは、転写プロセスに注目して高生産性を達成するアプローチである。これは強力なプロモーターの利用や、エンハンサー配列、さらにはゲノム中で発現遺伝子を安定に保つ安定化配列の利用、また gene dosage 効果などによって mRNA 量自身を増加させ、生産性を向上させる手法である。通常、高生産株を構築する場合においては、これらの手法がまずとられる第一の手段となる。

さらにもう1つの手法として、動物細胞に代表される真核細胞において発達している翻訳以降のプロセスを改良/強化することにより、生産性を高めたり、生産品質を向上(糖鎖を含む)させる手法である。この手法を用いることにより、前者の手法において構築された細胞株の生産性をさらに引き上げることも可能である。

筆者らは、翻訳および翻訳後プロセスに着目した生産性向上の手段として、小胞体ストレス応答の利用を行っている。これは、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質(unfolded protein)が蓄積する状態に備えた細胞の応答機構であり、さまざまな疾患にも関係している。高等動物での小胞体ストレス応答は、(1)翻訳を抑制して新生タンパク質が送り込まれないようにして負荷を抑制、(2)分子シャペロン遺伝子などを誘導し小胞体内のフォールディング能力を増強、(3)小胞体タンパク質分解機構の関連遺伝子を誘導しunfolded proteinの分解処理能力を増強、それでも状況が改善しない場合は(4)アポトーシスを誘導し細胞死を起こすという、合目的な4つの応答を示す<sup>11)</sup>。メカニズムにはまだ十分に解明されていない点も多いが、この小胞体ストレス応答に着目してタンパク質生産性を上昇させる試みもいくつかなされている。現在、動物細胞においては小胞体ストレス応答に関わる3つの小胞体ストレスセンサー、inositol-requiring-1 (IRE1)、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor 6(ATF6)が知られている。

IRE1経路においては、スプライシングされたX box-binding protein 1 (XBP1) mRNAから、活性型の転写因子XBP1sが産生される。この活性型の転写因子XBP1sをCHO細胞に強制的に発現させることにより生産性向上を図る試みがなされている<sup>12)</sup>。一方筆者らは、IRE1経路とは別のPERK経路の活性化を利用してタンパク質生産のさらなる増強を試みている<sup>13)</sup>。小胞体ストレスに

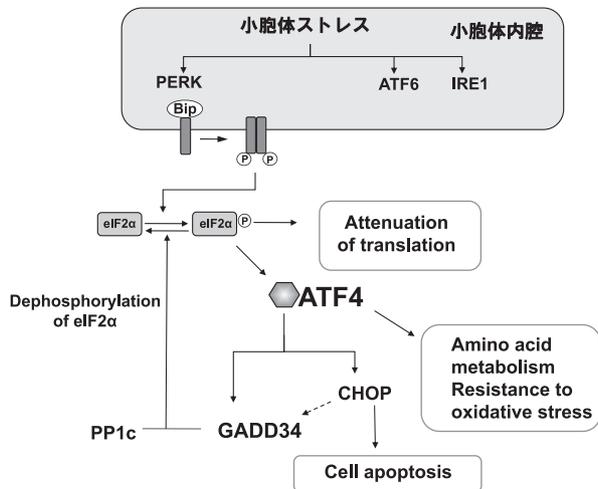


図2. PERKを介した小胞体ストレス応答に関わる分子機構<sup>14)</sup>

よって活性化された PERK は、翻訳開始因子である eukaryotic translation initiation factor 2 の  $\alpha$  サブユニット (eIF2 $\alpha$ ) をリン酸化し翻訳を抑制する。この翻訳抑制によって、転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) は逆に翻訳誘導される。この ATF4 はその下流にある growth arrest and DNA-damage-inducible gene 34 (GADD34) や C/EBP-homologous protein (CHOP)、さらにはアポトーシスを誘導する。さらにその先には GADD34 と catalytic subunit of protein phosphatase 1 (PP1c) によって、eIF2 $\alpha$  が脱リン酸化される負の制御機構が存在する (図2)。CHO-K1 細胞から CHO 由来の ATF4 cDNA を初めて単離し、発現ベクターを構築し、これをヒト AT-III 生産 CHO 13D-35D 細胞に組み込んだ。その結果、比生産速度は ATF4 の恒常発現によって 2 倍に上昇した<sup>13)</sup>。これは、ATF4 の過剰発現によって CHOP、GADD34 の発現が上昇し、eIF2 $\alpha$  の脱リン酸化が進み、翻訳が上昇したと考えられる。そこで、ATF4 の下流にある GADD34 発現ベクターを構築し、CHO 13D-35D 細胞に組み込んだところ、ATF4 を発現させた場合と同様に比生産速度が 2 倍程度に上昇した<sup>14)</sup> (図3)。生産物である AT-III の比活性と糖鎖修飾の代表としてフコース付加率を測定した結果、生産性を向上させてもその生産された AT-III の性質はほぼ同じであり、品質をたもったまま生産を増強可能と結論づけられた。また過剰発現によって AT-III の mRNA 量は影響を受けておらず、翻訳後プロセスが増強されて、生産性が向上したと推定され、細胞内におけるタンパク質の品質管理機構を利用することで生産性向上が可能となるといえる。

#### 今後のさらなる問題点解決にむけて

現在、遺伝子組換え CHO 細胞を用いたタンパク質医

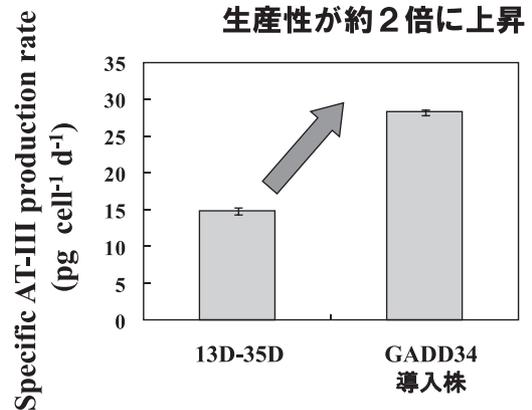


図3. GADD34 導入による生産性上昇<sup>14)</sup>

薬品生産は、生産性の高い CHO 細胞を構築さえすれば、g/l オーダーの生産が可能である。では、実際のこれらのプロセスは簡単に誰でも構築できるものになっているのであろうか。残念ながら単に発現ベクターを構築し、CHO 細胞にトランスフェクションしただけでは高いものから低いものまでさまざまなレベルの発現株が構築されてしまう。これは CHO 細胞自体のヘテロジェネイティによるものである。また、同じタンパク質でも、1 アミノ酸置換によって生産性が大きく変動することも、実際の利用する現場ではよく知られている。だれでも簡単にロバストな生産系を構築できるためには、タンパク質自身ならびに細胞個々の性質の違いを解析 / 解明 / 制御する技術が今後必要になると考えられる。

本稿にて紹介した筆者らの研究は、大阪大学大学院工学研究科においてなされたものである。共同研究者の大竹久夫教授、本田孝祐准教授、田辺三菱製薬 大屋智資博士ならびに本研究にご協力頂いた大学院生に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 大政健史：生物工学，**83**，117 (2005)。
- 2) 大政健史：化学と生物，**45**，9 (2007)。
- 3) 大政健史：化学と生物，**48**，255 (2010)。
- 4) Datar, R.V. et al.: *Bio/Technology*, **11**, 349 (1993)。
- 5) Kelley, B.: *Biotechnol. Prog.*, **23**, 995 (2007)。
- 6) Chartrain, M. and Chu, L.: *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 447 (2008)。
- 7) Omasa, T. et al.: *Bioprocess Biosystems Eng.*, **33**, 117 (2010)。
- 8) Ohya, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 876 (2005)。
- 9) 大政健史, 菅 健一: 蛋白質・核酸・酵素, **45**, 2188 (2000)。
- 10) Luan Y.-T.: *Abstr. Cell Culture Engineering XI*, p.61 (2008)。
- 11) 森 和俊：実験医学，**23**，2760 (2005)。
- 12) Tigges, M. and Fussenegger, M.: *Metabolic Eng.*, **8**, 264 (2006)。
- 13) Ohya, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 317 (2008)。
- 14) Omasa, T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 568 (2008)。