

## 新規CHO細胞株の樹立とタンパク質性医薬品製造への適用

堀内 貴之

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞は、広く抗体医薬など、組換えタンパク質性医薬品の製造に用いられている。現在入手可能なCHO細胞はすべて、欧米の研究機関や企業が権利を有しており、国内での使用のためには商用利用上の制限がかかる。そこで本プロジェクトにおいて、国産のCHO細胞株を新規に樹立し、タンパク質性医薬品の製造に資する宿主細胞CHO-MK株を開発した。本稿に述べる開発成果は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合による集中研事業において、大政PL、上平SPLのご指導のもと、第一三共株式会社様ならびに株式会社アイエスジャパン様からの貴重な技術供与と綿密な連携のもとに得られた成果である。

開発概要において特筆すべきこととして、遺伝子発現系の改良、生産培地の改良、細胞育種による細胞機能の改良、および培養プロセスの改良の結果、わずか5日間のフェドバッチ培養で5 g/L以上の組換え抗体を産生することが可能となった点があげられる。組換えタンパク質の産生量という点でCHO-MKの生産性は世界随一の能力といえる。また、CHO-MKを宿主細胞とする発現細胞構築プラットフォーム (マスターセルバンク構築プラットフォーム) の整備もあわせて完了した。任意の医薬品シーズのアミノ酸配列をご提示いただければ、ごく短期間で確実に高生産性の発現細胞株を樹立し、セルバンクを作製することができる。

新規CHO細胞株を樹立する目的で、週齢管理されたチャイニーズハムスターの雌個体から卵巣組織を摘出し、組織片からの初代培養を実施した (図1)。新規に樹立したCHO細胞株は、最終的には抗体など組換えタンパク質性医薬品の製造宿主細胞として産業利用する必要がある。産業への参入障壁を下げるうえでも、製造実績の豊富な既存のCHO細胞株と可能な限り近い細胞特性を有する細胞株を樹立することが重要となってくる。そこで筆者らは、初代培養細胞の中から特に上皮様細胞 (epithelial-like cells) にターゲットを絞って不死化することを試みた。圧倒的に数も多く増殖力の旺盛な線維芽細胞 (fibroblasts) の海の中から、上皮様細胞だけを優先的に選択して継代培養することは、複雑な技術開発を伴うものであった。

最終的に上皮様細胞を選択的に不死化するためのノウ

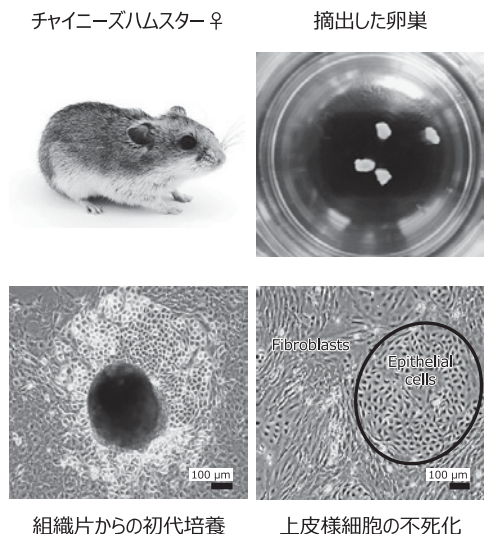


図1. 新規CHO細胞株の樹立. 左上: 雌のチャイニーズハムスター成体, 右上: 48週齢の2匹の個体から摘出した卵巣組織, 左下: ミンスした卵巣組織片と初代培養細胞, 右下: 上皮様細胞の選択的継代培養と不死化.

ハウを固めることに成功した筆者らは、独立の8個体から8系統の細胞株CHO-MK1~CHO-MK8を樹立した。これら8系統の細胞株はそれぞれに個性的な細胞特性を有していた。後の工業化を見据えた際、既存のCHO細胞よりも代謝活性に優れた細胞株を選定することで技術的に優位な差別化をはかることが、成熟市場の中でシェアを獲得するうえでも重要である。そこで、中でも取り分け増殖性に優れた3系統の株を選定し、開発を進めた。選定した3系統の細胞株をそれぞれ無血清培地に馴化し、浮遊培養系を確立した。3系統の浮遊細胞から、もっとも増殖性に優れた1系統を絞り込み、培養の履歴管理、使用原材料のオリジンや品質の管理、さらには海外大手受託試験機関 (contract research organization, CRO) におけるウイルス安全性に関する試験を経て、医薬品製造用のホストセルバンクCHO-MK (bank305) の構築を完了した。

CHO-MK細胞はその優れた増殖特性に大きな特徴がある (図2)。浮遊培養系 (フラスコ旋回培養) において、既存のCHO細胞 (CHO-K1) の増殖特性と比較した。CHO-K1細胞の到達密度は、 $10 \times 10^6$  cells/mL程度であるが、CHO-MKはその3~5倍に達する。特筆すべ

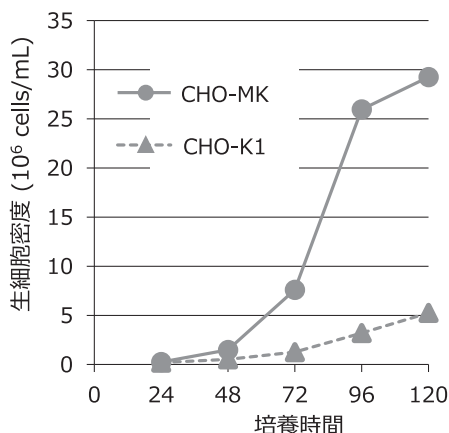


図2. 新規樹立したCHO-MK細胞と既存細胞株CHO-K1の増殖曲線の比較。CHO-MK細胞は、到達細胞密度、増殖速度ともにきわめて高い増殖特性を示す。

きはその増殖速度で、倍加時間に換算して10時間よりも早い(9.7時間)。通常CHO細胞の倍加時間は24～30時間前後であるが、対照に用いたCHO-K1細胞は十分に育種されており、倍加時間17.4時間であった。これは既存のCHO細胞としてはきわめて短い倍加時間であるが、CHO-MKは軽々とそれを超えて余りある。不活化された上皮様細胞としては間違いなく世界一の増殖速度を誇る。ここでは詳細は述べないが、凍結ストックバイアルから数千リットルスケールの培養タンクまでにかかる拡大培養期間を大幅に短縮することができることも、増殖速度の速い細胞の魅力の一つである。

次に筆者らは、モデル抗体MAB1（ヒト化したIgG1）をCHO-MK細胞に導入して安定発現クローンの取得を試みた。しかしながらその結果は、複数回のトライアルにもかかわらず、いずれの発現クローンも14日間のフェドバッチ培養（フラスコ旋回培養）において、わずかに1 g/L前後の生産性を示すにすぎなかった。CHO-K1やCHO DG44などの既存のCHO細胞から得られる発現クローンは、少なくとも2～3 g/L程度の抗体産生能を示すのが一般的である。したがって、CHO-MK細胞のような新参の細胞が抗体医薬品製造市場でシェアを獲得するには、少なくとも現状の5倍程度に細胞そのものの生産性を向上する必要があった。そこで、ちとせ研究所独自の細胞育種技術を適用し、CHO-MK細胞の高機能化を試みた。弊社は、動物由来細胞や微生物などの変異育種において高い技術的アドバンテージを有しており、無数の細胞プールから目的の機能を有する細胞を釣り上げるスクリーニングノウハウに強みがある。高い細胞増殖性を損なうことなく、細胞あたりの生産性を5倍以上に引き上げるための育種の結果、CHO-MK 9Eをはじめ



図3. ちとせ研究所の細胞育種技術によるCHO-MK細胞の高機能化。

とする複数の宿主細胞システムの取得に成功した(図3)。

育種改良したCHO-MK 9E宿主細胞に、モデル抗体MAB1発現ベクターを導入して安定発現クローンの取得を試みた。その結果、5日間のバッチ培養（96穴深底プレート旋回培養）において、1.5 g/L以上もの高い生産性を示すクローンが多数取得された。中でもトップクローンであるCHO-MK CL1002の産生量は2 g/Lに達していた。ここで特筆すべきは、わずか5日間のバッチ培養でグラムオーダーもの産生量を示すクローンが多数取得された点である。これは既存のCHO細胞から取得した発現クローンでは決してみられない特長である。高い増殖性を活かしたまま、細胞あたりの比生産速度を向上したことで、とくに培養初期の生産性に優れた発現クローンの取得が可能となった。

次に、CHO-MK CL1002クローンにおけるフェドバッチ培養系の確立を試みた。株式会社アイエスジャパン様（現、富士フィルム和光純薬）において、CHO-MKの培養に適した基本培地とフィード培地の開発が進み、あわせて実験計画法によるフィードプロセスの検討をおこなったところ、12日間のフェドバッチ培養（三角フラスコにおける旋回培養）で5 g/LのMAB1抗体産生量を達成した。既存のCHO細胞に由来するMAB1抗体発現クローンと比較すると、前述のとおり、やはり培養初期（1～5日目）における抗体産生量が高いという特長が顕著であった。そこでその特長をさらに引き出すべく、バイオリアクターによる培養プロセスの開発をおこなった。まず、15 mL容量の多連式小型培養リアクターを用いて、実験計画法による培養プロセスの検討をおこなった。pHコントロールや温度、フィードプロセスの最適化によって、12日間の培養期間を6日間に短縮することに成功した。次に、2 L容量のバイオリアクター（エイブル社BCP）へのスケールアップを試みた。溶存酸素濃度をコントロールすることで、わずか5日間の培養期間で5 g/Lもの抗体産生量を達成するプロセスの開発に成功した(図4)。

CHO-MKを宿主細胞とした組換え抗体発現細胞株を構築するための技術プラットフォームを整備した(図5).

1. 任意のアミノ酸配列からDNAを合成し、オリジナルの発現ベクターを構築. CHO-MKに安定導入することで安定発現プールを作製.
2. クローナリティの保証を前提としたシングルセルクローニングと高発現クローンのスクリーニング. リ

サーチセルバンクの作製.

3. 継代安定性試験と小型バイオリアクターでの培養試験. マスターセルバンク候補の選定.
4. 各種特性解析試験と初期の培養プロセス開発.

これら工程を経て、確実かつ迅速に高発現細胞株を構築し、セルバンクを作製することが可能である. 株式会社ちとせ研究所は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の認定事業者としてCHO-MKを宿主細胞とした細胞株構築受託サービスを提供している.

### 5 g/L within 5 days

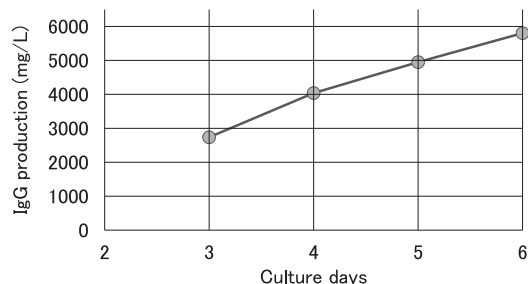


図4. MAB1抗体発現クローンの抗体産生量. 2 L容量のバイオリアクターによるフェドバッチ培養において、5 g/L/5 daysものきわめて高い生産性が確認された.

### 謝 辞

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」の課題番号（JP18ae0101054）の支援によって行われた.

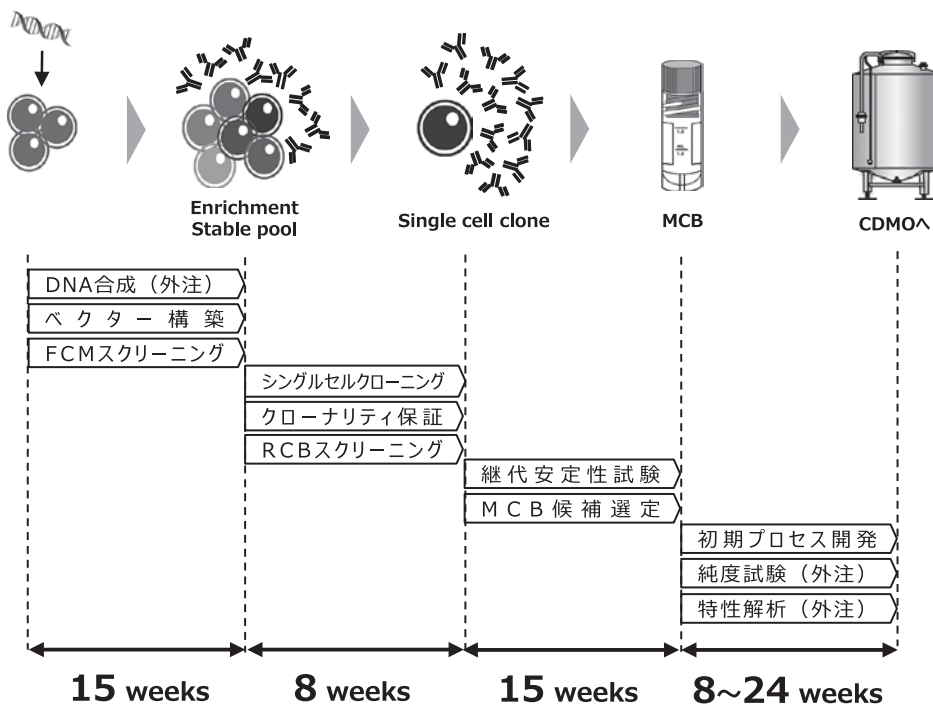


図5. 細胞株構築プラットフォームの概要.

FCM: Flow cytometry, RCB: Research Cell Bank, MCB: Master Cell Bank, CDMO: Contract Development and Manufacture Organization.