

「合理的」な抗体生産CHO細胞構築への挑戦

鬼塚 正義^{1,2*}・緒方 法親²・田地野浩司^{2,3}

はじめに

近年抗体医薬品の市場は急速に拡大しており、安全性の高い高品質な抗体医薬品を生産するプロセス開発は社会的ニーズであると言える。本稿では、経済産業省/AMEDによる「国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術」プロジェクト（2013–2017年度）におけるバイオプロセス開発研究、2018年度から開始した「バイオ医薬品の高度製造技術の開発」プロジェクトにて現在取り組んでいる「合理的」な生産細胞構築への挑戦について、徳島大学や徳島集中研（次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）の取組みを紹介したい。

バイオプロセスにおける抗体の凝集化

2013年度から開始したプロジェクトの初期では、抗体を生産するChinese hamster ovary (CHO) 細胞の培養系の立ち上げが急務であった。プロジェクト用に樹立したCHO細胞株を用いてIgG1抗体産生濃度1 g/Lを達成する培養法、さらに、5–10 L培養へのスケールアップ法を整備した。せっかく大量の培養培地を用いるので、アカデミアらしい基礎研究としてバイオプロセスにおける抗体凝集化に着目した解析を進めた。近年、抗体医薬品の製剤溶液に含まれる凝集化抗体が問題視されており、抗体医薬品の凝集化は抗薬物抗体 (anti-drug antibodies : ADAs) に由来する薬効喪失や免疫原性の誘発などのリスクを含んでいる。抗体の精製プロセスや製剤化など緩衝液中における抗体の凝集化に関しては広く研究されてきた。一方で、生産現場としての細胞培養プロセスにおける抗体の凝集化に関して、現象は知られていたが研究例が少ないため理解が進んでいない。

培養中における凝集抗体の蓄積 IgG1抗体生産CHO細胞のジャーフェーマンター培養を実施し、培養過程で培地中に蓄積する凝集体量変化を観測した¹⁾。発現させたIgG1抗体は、構造安定性が高く、Protein Aクロマトグラフィー時の酸性曝露では凝集体がほとんど形成されないため、培養プロセス時の凝集化を調べるうえで優れたモデル抗体である。フィード培地の添加方法の違いに応じて、同じ細胞を用いた培養でもIgG1抗体生産濃度が0.6 g/Lまたは1.5 g/Lと変化したことが、いずれ

の方法でも培養中の凝集抗体と二量体抗体は培養時間依存的に増加していた。特定の培養時期ではなく培養時間依存的に凝集体量が増加するので、培養液中に凝集体が蓄積する仮説の一つとして、分泌した凝集抗体が培養液中（細胞外）で凝集体に変化することが考えられる。この仮説の検証として無血清培地やHCP (host cell protein) を含む培養液に単量体IgG1を添加するスパイク試験を実施したが、細胞培養中の凝集体形成は再現できなかった。それでは凝集抗体は細胞培養中にどこから発生したのであろうか？細胞外でなければ細胞内から発生している、すなわち、細胞内で形成された凝集抗体が細胞外へ分泌しているという仮説が考えられる。しかし残念ながら、CHO細胞内の凝集抗体を特異的に検出する方法がないために凝集抗体の分泌仮説を直接検証することはできない。そこで間接的ではあるが培養工学的手法の解析（図1）から検討を行った。

凝集抗体蓄積の培養工学的解析 分泌型タンパク質生産において1細胞あたりタンパク質生産能力を評価するためには、累積生細胞数 (integrated viable cell density : IVCD) を算出する必要がある。IVCDは生細胞の増殖曲線の積分値に相当する（図1A, B）。このIVCDと1細胞が1日に生産する抗体量として定義される比分泌生産速度 ρ_{Ab} (pg/cell/day) との積がタンパク質総生産濃度 P (培養液中のタンパク質濃度) である。解析的には実験的に求めることができるIVCDと P をX軸、Y軸にそれぞれプロットし、プロットの傾きが比生産速度 ρ_{Ab} となる（図1C）。傾きが直線性を示すことは培養期間を通じてCHO細胞から常に一定速度でタンパ

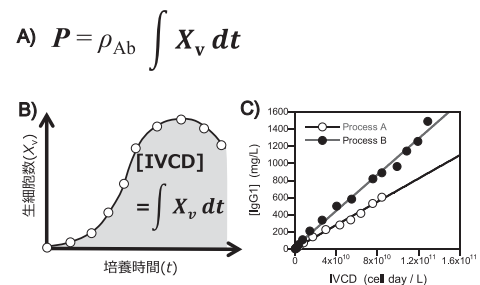


図1. 分泌型タンパク質の培養工学解析. A) 解析式, B) 増殖曲線中の累積生細胞数の算出, C) フィード培地添加方法の異なる培養の解析例。

* 著者紹介 徳島大学社会産業理工学研究部（助教） E-mail: onitsuka@tokushima-u.ac.jp
¹徳島大学社会産業理工学研究部 生物資源産業学域, ²次世代バイオ医薬品製造技術研究組合（MAB）
³株式会社 chromocenter
生物工学 第97巻 第6号（2019）

ク質が分泌生産されていることを示している。CHO細胞培養の難しくも面白い点であるが、同じ細胞株の培養においてもフィード培地の添加方法が異なるだけで生産速度が大きく変化する。同様にゲルろ過クロマトグラフィ分析から算出した凝集体や二量体抗体の面積をIVCDに対してプロットすると、いずれのプロセスでも凝集体や二量体抗体は相関係数の高い直線性を示した。すなわち培養工学的解析からは、凝集抗体や二量体抗体などの副産物も一定速度で細胞内から細胞外に分泌されていることが示唆された。さらに、細胞内外の凝集抗体の溶液構造をCDスペクトル測定で比較すると高次構造の類似性（非天然型 β -ストランド構造の形成）を示した。先のスパイク試験の結果を合わせて包括的に解釈すると、CHO細胞から凝集抗体が分泌していることが強く示唆される。

凝集抗体の構造的特徴 論文準備中のデータ（講演などで発表）ではあるが、細胞培養中の凝集抗体の構造的特徴の一側面を紹介したい。筆者は先述のジャーファーマンター培養液から3種類の親和性カラムProtein Aカラム、Fc γ RIカラム、Fc γ RIIIaカラムを用いてIgG1抗体を精製した（Fc γ Rタンパク質を固定化したゲルは東ソー株式会社様より御提供いただいた）。Protein Aは抗体のFc領域(C_H2ドメインおよびC_H3ドメイン)に、2種類のFc γ Rはヒンジ領域～C_H2ドメインに、それぞれ異なるIgG1抗体領域に部位特異的に結合する(図2)。もし凝集抗体で部位特異的な構造変化が生じているならば、異なる親和性カラムを用いてIgG1抗体を精製した場合、溶液中の凝集体含有量が変わるはずである。

各カラムから精製したIgG1抗体を分析した結果、Protein Aカラムと比較してFc γ Rカラムでは凝集抗体の含有割合が減少した。さらにプロテアーゼ限定分解実験では、凝集抗体ではFc γ Rの結合部位であるヒンジ領域～C_H2ドメインがプロテアーゼ分解を受けにくい結果となった。これはFc γ R結合部位が凝集化に伴う構造変化

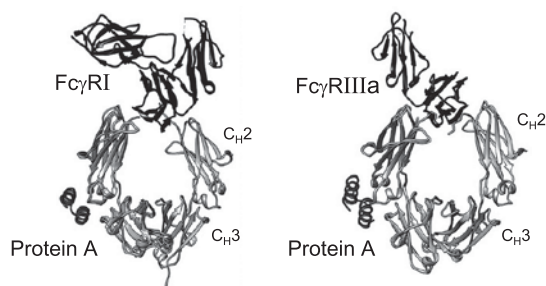


図2. FcRとProtein Aの抗体への結合部位の比較。各複合体の立体構造重ね合わせは、PDB ID: 1L6X4, 4W4O, 3AY4を用いて作製した。

や凝集化の核として多量体の内部に埋もれるために、プロテアーゼ切断を受けにくくなり、結果、Fc γ Rとの結合能が低下し凝集抗体量が減少したと思われる。

凝集抗体の分泌仮説 筆者は「凝集した抗体タンパク質がCHO細胞から分泌的に漏れ出している」という仮説を提唱している。しかしこの仮説は動物細胞発現系の「正しいフォールディング構造を有する活性型タンパク質を生産する」という特徴と一致しないように思える。動物細胞は小胞体内においてタンパク質を正しい立体構造形成に導くタンパク質品質管理機構を備えており、構造形成に失敗したミスフォールドタンパク質やアンフォールド状態のポリペプチドが蓄積すると小胞体ストレス応答が生じる。ストレス発生に応じて、分子シャペロンの発現誘導やタンパク質翻訳抑制、さらに小胞体関連分解など、細胞内で凝集したタンパク質の蓄積を防ぐための応答を行う。この矛盾に対する解釈として「構造依存的に凝集抗体は分泌される」と考えている。抗体は物理化学的ストレスにより、alternatively folded states (AFSs) と呼ばれる、本来とは異なる高次構造を形成することが知られている²⁾。抗体生産CHO細胞内ではAFSsが少量ではあるが自然に形成され、このAFSsの立体構造は細胞内のタンパク質品質管理機構に認識されないため分泌されるのではないだろうか？この仮説は細胞工学的な視点に留まらず、タンパク質科学や細胞生物学的にも興味深いので、今後検証を進めていきたい。

「合理的」な生産細胞構築への挑戦

先に紹介した凝集抗体に関して、バイオプロセス中の凝集抗体を低減するためには、細胞内の抗体生合成プロセスをエンジニアリングすることが必要である。同時にN-型糖鎖や電荷異性体不均一性などの特性制御や、抗体の生産量向上を目指す場合も、CHO細胞に対して外来的遺伝子導入によるセルエンジニアリング(細胞改変)は有効な手法であり、多くの報告例³⁾がある。

現在のセルエンジニアリングの問題点 しかし、文献で報告されているセルエンジニアリング手法は、生産細胞の構築や改良において汎用性のある成功例なのだろうか？筆者は細胞改変法としてNF-kappa-B inhibitor zeta (Nfkbiz)の過剰発現によるIgG1抗体生産性向上を報告している⁴⁾。実験結果を得るまでに、トランスクリプトーム解析からタンパク質高発現細胞で発現量が向上していたNfkbizをエンジニアリング対象の遺伝子として採用し、遺伝子のクローニングと発現プラスミド構築、抗体生産CHO細胞への遺伝子導入と限界希釈によるクローン細胞の構築、細胞培養実験と多大な実験量を行っている。この実験は3人の学生がバトンタッチしな

が引き継ぎ、実に3年近くの実験期間を要した。実験者により実験期間の長短はあるであろうが、本事例はCHO細胞改変の手法としては一般的であり筆者だけのケースではない。1種類の遺伝子の評価に多大な時間と労力を要する手法はリスクが高く、生産細胞の構築において普遍的な成功例にはなり難いと感じる（余談ではあるが、Nfkbiz遺伝子でIgG1抗体の生産量が向上しなかった場合、学生にどうやって納得してもらおうか、当時かなり悩んだ。今思えば冷や汗ものだった。）。

セルエンジニアリング・プラットフォーム では、「合理的」なセルエンジニアリング手法とは何であろうか？この問いに対する1つの回答として、筆者らは各々が要素技術を開発し、統合化した「セルエンジニアリング・プラットフォーム」を2017年までに整備した。そして2018年度から開始した「バイオ医薬品の高度製造技術の開発」プロジェクトにて先端的バイオ製造技術開発「CHO細胞をデザインする：合理的・迅速・ロバストなセルエンジニアリング・プラットフォームに基づいた、向上型バイオプロセスのための細胞開発」という少々長い研究課題において、要素技術を使用した研究開発を進めている。以下にセルエンジニアリング・プラットフォームに関する3つの要素技術を紹介する。

遺伝子を発掘する 本稿筆者の1人である緒方は、発現ネットワークを駆使し、エンジニアリング対象となる候補遺伝子の発掘を担当している。ここで候補遺伝子とは、CHO細胞に導入することで抗体生産量が向上する有用遺伝子の「候補」を指す。現在までCHO細胞のオミクス解析の事例は多くの報告があるが、どのようにして有用遺伝子に着目するのか、合理的な方法は定まっていない。簡単な方法としてタンパク質の高発現および低発現細胞の比較トランスクリプトーム解析を行い、発現の差分から候補遺伝子を見いだすという方法が一般的である。また、他の方法として、遺伝子が互いに調整し

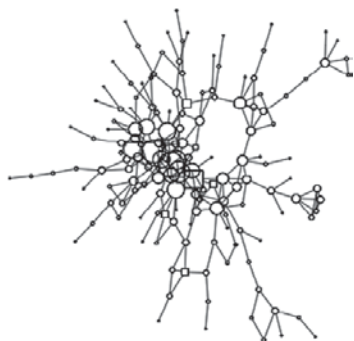


図3. 発現ネットワーク解析の例。点や円は遺伝子を、線は遺伝子間の相関関係を示す。円の大きさは他の遺伝子との相関関係の多さを示す。

合ってネットワークを構築しているという仮定のもと、遺伝子間の共発現相関解析をすることで遺伝子発現ネットワークを推定する方法がある。この解析では抗体生産に重要な遺伝子を支配する遺伝子や、遺伝子操作の対象として有望である遺伝子を間接的に操作している遺伝子を見つけることができる（図3）。このような遺伝子は、既存の遺伝子オンロジーや細胞内パスウェイに基づいた解析では見つけることができないものであり、特に抗体生産CHO細胞のように人工的に遺伝子を組み込んだ細胞では新しいネットワークが組み上がっていることが多い。これら機械的な解析方法を通じて、データから抽出される候補遺伝子に「当たり」が含まれてくるようにするためには、素材となるデータの品質のコントロールが重要である。今回、データ源である生体試料およびその取り扱いが標準作業手順書によって厳格に管理した。また、高品質のデータの中から、目的にあったデータセットを選別することも重要である。生物はその遺伝子発現ネットワークをトポロジカルに変化させることが知られているが⁵⁾、その変化は情報エントロピー⁶⁾あるいはコルモゴロフ複雑性⁷⁾で捉えることができるため、同じネットワークを持つデータだけを集めて解析することでノイズを削減することができる。詳細は特許⁸⁾や文献⁹を参照いただきたい。以上の取組みにより、抗体生産に関係する遺伝子群を制御する（発現ネットワーク上の上流に位置する）遺伝子を、候補遺伝子として「合理的」に発掘できるようになった。

有用遺伝子（高機能化因子）を同定する 筆者の1人である鬼塚は発掘した候補遺伝子进行评估し、有用遺伝子の同定を担当している。筆者らは有用遺伝子を高機能化因子と呼称している。先のNfkbizの例が示す通り、少ない労力と期間で遺伝子の有用性評価ができない限り、セルエンジニアリングによる生産細胞構築は汎用性のある成功例とはならない。そこで、抗体生産CHO細胞にエピソーマル発現システムを導入し、遺伝子迅速評価システムを構築した。EBNA1発現遺伝子をCHO細胞のゲノムに組み込み、評価遺伝子発現用のプラスミドにはoriP配列を導入することで、細胞増殖に伴いプラスミドが細胞内で複製する。このエピソーマル発現システムは従来の安定発現と一過性発現の利点を併せ持つシステムであり、構築した遺伝子迅速評価システムを使用することで、遺伝子導入から10日程度で高機能化因子を同定することが可能となった。しかも労力は細胞培養液にプラスミドと導入試薬を添加するのみである。本評価システムは従来の遺伝子評価法と比較して、労力と期間の点で圧倒的な優位性を持つ「合理的」なシステムであるといえる。また、oriP配列を挿入するプラスミドを

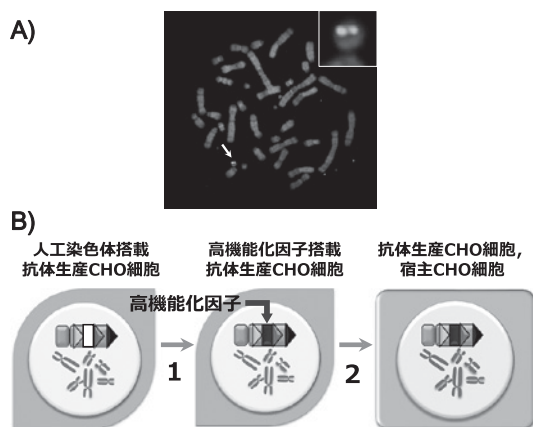


図4. A) CHO細胞内の人工染色体ベクターのFISH解析画像。矢印および右上：人工染色体ベクター，人工染色体ベクター上のスポット；搭載された高機能化因子。B) 育種システムの例。1：人工染色体ベクター搭載CHO細胞に高機能化因子を搭載させ，細胞を高機能化する。2：高機能化因子を搭載した人工染色体ベクターを他のCHO細胞に移植する。

変更することで，過剰発現のみならず，siRNA発現やmicroRNA発現を介した発現抑制の評価も可能である。

高機能化因子を人工染色体に搭載する 筆者の1人である田地野は自社技術である人工染色体ベクターへの高機能化因子の搭載を担当している。人工染色体ベクターとは，染色体あるいは染色体を構成するパーツをもとに構築されたミニ染色体である(図4A)。人工染色体の開発や応用例などの詳細は文献10を参照いただきたい。人工染色体ベクターは既存のベクターでは実現できない，きわめて有用な特徴を有している。すなわち，①細胞内で宿主染色体に組み込まれることなく，独立して複製され，長期間安定に保持される，②発現消失(サイレンシング)が起きにくい，③部位特異的組換えを使用するため，遺伝子挿入位置による発現の影響が起きにくく，搭載される遺伝子コピー数も一定であり，発現量のばらつきが少ない，④搭載できる遺伝子サイズに制限がない，などである。これらの特徴から，組換えタンパク質の発現安定性や恒常性が最重要視されるCHO細胞の育種においては人工染色体ベクターを利用したセルエンジニアリングが適しているといえ，効率よく細胞の高機能化を行う育種システムの開発を行ってきた(図4B)。

また，特筆すべき特徴として人工染色体ベクターは高機能化因子を一度搭載すれば，同じ発現コンストラクトを異なる細胞に移入することができる。すなわち「人工染色体ベクターの移植」により，搭載した遺伝子の高機能な特性を他のCHO細胞(抗体生産CHO細胞や宿主CHO細胞)に一度で移すことができる。したがって，人工染色体ベクターを用いた高機能化因子の搭載と移植

は，適用性や拡張性を考えた場合「合理的」なセルエンジニアリング手法であるといえる。

最後に

現在，各要素技術を駆使し，抗体生産CHO細胞の人工染色体ベクターに複数の高機能化因子の搭載を行っている。高機能化因子の一つはCHO細胞に導入した際，小フラスコを用いた培養試験でIgG1生産量が0.5 g/L(親細胞)から1.9 g/L(改変細胞)に劇的に向上する結果を得ている(未発表)。さらに，次世代製造プロセスとして注目を集めている連続培養においても優位性を発揮することが示唆されている。セルエンジニアリング・プラットフォームを利用した筆者らの細胞開発の進捗状況は良好である。一方で，「バイオ医薬品の高度製造技術の開発」プロジェクトでは研究結果の論文化や外部公表をもってゴールではないはずである。「抗体医薬品を必要とされている方の笑顔のために」という原点を忘れず，実用化・社会実装の達成を目指して今後も努力して参りたい。

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)」および「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)」，およ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」(JP17ae0101003, JP18ae0101062)の支援によって行われた。

本研究を御支援いただいた大政健史教授(大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻)，上平正道教授(九州大学大学院工学研究院化学工学部門)，本稿で紹介したFcγR固定化ゲルの試作品を御提供いただきました東ソー株式会社様に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Onitsuka, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 752 (2018).
- 2) Feige, M. J. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **399**, 719 (2010).
- 3) Fischer, S. *et al.*: *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1878 (2015).
- 4) Onitsuka, M. *et al.*: *Cytotechnology*, **70**, 675 (2018).
- 5) Luscombe, N. M. *et al.*: *Nature*, **431**, 308 (2004).
- 6) Ogata, N. *et al.*: *PLoS one*, **10**, e0144822 (2015).
- 7) Seekaki, P. and Ogata, N.: *Lecture Notes in Computer Science*, 10362, p. 529, Springer, Cham (2017).
- 8) 特許6342533号
- 9) 緒方法親：バイオインフォマティクスを用いた研究開発のポイントと事例，情報機構(2018)。
- 10) 田地野浩司，山内清司：抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームの全て，p. 49，シーエムシー出版(2015)。