

CHO細胞を利用した高機能抗体発現系の開発

増田, 兼治

<https://hdl.handle.net/2324/4784583>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 増田 兼治

論 文 名 : CHO 細胞を利用した高機能抗体発現系の開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

抗体医薬品は、CHO 細胞発現系により樹立された細胞株を出発材料とした製造プロセスが確立されている。抗体の製造コストを低減するためには、効率的な製造プロセスを開発するとともに、抗体の高発現・高安定細胞を構築することが求められている。細胞構築プロセスは、宿主細胞、発現ベクター、遺伝子導入方法ならびにスクリーニング方法から構成されている。高発現・高安定細胞を簡便に取得するためには各々の要素技術を選択あるいは開発し、発現システムとして完成させる必要がある。また、構築した高発現・高安定細胞がその生産能力を最大限発揮するためには、細胞培養プロセスで使用する培地を最適化することが求められている。本研究では、改良宿主細胞、発現ベクター、抗体高発現細胞の取得技術、培地から成る一連の細胞構築関連技術を、高発現細胞取得ならびに細胞培養技術としてパッケージ化することを目的とした。

第2章では、フローサイトメトリー (FCM) によって取得し、高い生産性を示した細胞集団からモノクローン化を行い、高発現細胞の取得を試みた。前方散乱 (FSC) と側方散乱 (SSC) を指標に FCM によって分画した P15 画分の細胞、あるいは、ステーブルプール細胞から、ClonePix システムにてそれぞれ約 250、約 500 株をピッキングし、抗体発現株を得た。得られた抗体発現株は、14 日間の Fed-batch 培養を実施し、抗体生産性を比較した。Fed-batch 培養での最終抗体濃度は、ステーブルプール細胞由来の発現株では最大でも 0.9 g/L であったのに対し、P15 画分の細胞に由来する生産量上位 4 株では 0.9–2.4 g/L を示した。ClonePix システムによるモノクローン化の前に、FSC 及び SSC 分割を利用した FCM によるスクリーニングを行うことで、抗体高発現細胞を容易に取得できることを明らかにし、高発現株のスクリーニング以降のモノクローン化工程を確定させた。

第3章では、株式会社ニッピにて開発された spERt™ 技術を第2章で取得した抗体高発現細胞に適用し、抗体生産性、産生抗体の品質ならびに継代安定性に及ぼす影響を評価した。ステーブルプール細胞に由来し、最も高い抗体生産性を示した L002 へ p180 と SF3b4 を過剰発現し、2 因子発現株 M1–M3 を取得した。2 因子発現株 M1–M3 は、Fed-batch 培養 7 日目の抗体濃度が親株の L002 と比較して 2.5 倍以上の値を示し、生産性が上昇していた。そこで、P15 画分の細胞に由来し、より高い抗体生産性を示した L003 を用いて、2 因子の効果を検討した。L003 へ p180 と SF3b4 を過剰発現し、2 因子発現株 N1–N5 を取得した。2 因子発現株 N1–N5 は、Fed-batch 培養初期の抗体生産性が親株の L003 と比較して ~3.1 倍に上昇していた。2 因子の過剰発現による産生抗体の品質への影響を評価するため、Fed-batch 培養 14 日目に得られた抗体を用いて、N 型糖鎖プロファイル、電荷異性体、凝集体ならびに断片体の割合を解析した。その結果、2 因子発現株とその親株間

で抗体の品質に顕著な差は見られなかった。2 因子発現株 4 株を用いて継代安定性の評価を行ったところ、2 株では 16 回の継代培養後でも抗体生産性の低下は見られず、継代培養により 2 因子の発現量が低下していないことが示唆された。2 因子発現株 N5 では、抗体遺伝子の mRNA 発現量が親株 L003 とほぼ同程度であった一方、小胞体のポリリボソームの割合が親株と比較して大きく増加していたことから、小胞体の翻訳装置活性化によって抗体生産性が上昇したと示唆された。そして、最も高い生産性を示した 2 因子発現株 N5 を用いて、スペントメディアアナリシスによるフィード培地組成の最適化を実施し、14 日間の Fed-batch 培養での最終抗体濃度を 4.6 g/L から 5.7 g/L に上昇させることができた。さらに、播種生細胞密度とフィード量を検討し、Fed-batch 培養での抗体濃度の最大化を試みた。その結果、播種生細胞密度を 9×10^5 cells/mL、総フィード量を初発液量の 50% に増加させることで、細胞生存率ならびに抗体生産性を培養後期まで高い値に維持することができ、17 日間の Fed-batch 培養での最終抗体濃度は 9.5 g/L に達した。

p180 と SF3b4 の 2 因子の過剰発現によって抗体発現株の目的抗体発現量が大幅に増大したことから、上述した 2 因子の過剰発現によって宿主細胞の改良が可能であることが示唆された。また、FCM による高発現細胞の濃縮と 2 因子の過剰発現を組み合わせた新規細胞構築ストラテジーが工業生産に用いられる抗体高発現細胞の構築に有用であることを明らかにすることができた。さらに、高発現株を用いたスペントメディアアナリシスによる組成の最適化により、培地の開発に成功した。以上の結果から、本研究では、CHO-K1 細胞を宿主とした発現系において、改良宿主細胞、発現ベクター、抗体高発現細胞の取得技術ならびに培地から成る一連の細胞構築関連技術のパッケージ化に向けて、大きく前進することができた。