

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26249125

研究課題名(和文)工業用動物細胞のゲノム育種に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Fundamental research for genome-wide platform of industrial mammalian cells

研究代表者

大政 健史(Omasa, Takeshi)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：00252586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 24,100,000円

研究成果の概要(和文)：CHO細胞のゲノム育種に関する基盤技術を取りまとめるためには、染色体の安定性解析や、それに影響する因子の解析、さらにはターゲットとする染色体の選定にかかる情報整理等が必要となる。そこで、CHO細胞における染色体安定性に関連する項目として、細胞周期チェックポイントおよびクロマチン構造制御に関わるBRCA1発現抑制により、効率的かつ安定な細胞株構築法を確立した。さらに染色体数の異なる細胞の遺伝子発現について、網羅的に比較し、染色体数変化に伴う変動遺伝子群を同定し、これらの機能に関する知見を得た。さらに安定染色体におけるターゲット領域についても、ゲノム育種の候補となる領域を選定した。

研究成果の概要(英文)：The fundamental research of chromosome stability and selection of targeting region of genome, and analysis of signaling pathway for Chinese hamster ovary cells are necessary for genome-wide platform of industrial mammalian cells. We focused on the chromosome stability and find that BRCA1 repression is effective for the construction of stable and productive cell lines. Moreover, we investigated genome-wide gene expression among the CHO cell lines which have various chromosome numbers and determined the differentially-expressed genes among these cell lines and estimated the functions. Also, we determined the suitable target chromosomal region for site-specific genome integration.

研究分野：生物化学工学、動物細胞工学

キーワード：CHO cell mammalian cell antibody production genome-wide analysis chromosome

## 1. 研究開始当初の背景

2012年、世界における医薬品市場の売上1位が低分子化合物から抗体医薬となり、バイオ医薬品元年の始まりを告げている。2012年の世界市場ベスト10医薬品のうち、すでに6品目がバイオ医薬品、さらにそのうち5品目がチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いて生産されている。CHO細胞は、欧米で上市されたバイオ医薬品202品目のうち、実に27%となる54品目の生産宿主となっており(2010年現在)、バイオ医薬品の生産基盤を支える工業用動物細胞となっている。現在、CHO細胞は10g/Lを超える高レベル生産も可能であり、培養コストも大腸菌、酵母と遜色ないg数ドルのレベルをGMPに対応して達成することができる。一方、これだけ用いられているCHO細胞を用いた蛋白質生産技術は、もはや完成された技術と誤解されがちであるが、大腸菌や酵母と比較して生産細胞の構築には大きな問題点があるといわざるを得ない。

現在、高生産を実現する細胞株の構築は、1年近くわたる長期の試行錯誤による構築期間が必要である。ところが、時間をかけて大量にスクリーニングしても安定な高生産株が得られない場合も多く、その理由も十分に解明されていない。そこで、次世代シーケンサーを活用して、これらの問題点をゲノム解析/育種を応用して解決しようとする試みが世界中で開始されている。象徴的な出来事として、2013年8月号のNature Biotechnologyに、独立した2つのグループ、BGI(北京ゲノムセンター)/John Hopkins 大のグループ、ならびに、オーストリアBOKU大学/ドイツBielefeld大のグループによるCHO細胞株、ならびにチャイニーズハムスターのゲノム解析に関する論文が発表された。

現在CHO細胞における大きな問題点は、株化細胞の不均一性(ヘテロジェネティ)にある。2013年、HeLa細胞株の全ゲノム解析が行われ、ヒトゲノムとの違い、さらに、そのゲノムの不均一性とその複雑さについて話題となっているが、全く同様の複雑な不均一性と不安定性がCHO細胞のゲノムには生じている。現在のCHO細胞を用いた物質生産系の大きな問題点は、この不安定性から生じる細胞株構築時の試行錯誤実験条件ならびに、異なる最適条件にあるが、これは、本質的にこのCHO細胞のゲノム自身の不均一性に由来する。これまで動物細胞において行われてきた様々な生産性向上に関するセルエンジニアリング手法では、動物細胞株に特有のゲノム自身の不安定性・変動を考慮したゲノム育種は全く行われていない。微生物では近年ゲノム情報の活用が進み、ゲノム情報を用いたゲノムスケールモデリングを通じたゲノム育種が盛んになされているが、より複雑な株化細胞については、世界でもその適用は始まったばかりである。

## 2. 研究の目的

以上の様な背景を受けて、本研究においては代表者と本分野における国内新進気鋭の若手研究者の協業により、ゲノム情報を活用したCHO細胞のゲノム育種に関する基盤的研究を行うことを目的とした。

本研究では、これまでの成果を踏まえ、株化細胞を対象としたゲノム編集技術を通じた染色体安定メカニズムの解明と応用、さらには、細胞信号伝達系プロセスのエンジニアリングを通して、ゲノム育種に関する基盤を構築することを目的とする。具体的な技術開発目標として、CHOゲノム情報を活用することにより、高度ゲノム編集技術の活用を目指したターゲット染色体解析、ゲノムスケールリモデリングを指向した細胞応答とそのエンジニアリング、さらに、これらを組み合わせたゲノム育種による新規セルエンジニアリング技術を開発する。

## 3. 研究の方法

目的にあげたサブテーマに分割して実行するとともに、相互に関連したテーマについて総括的に検討した。すなわち、対象として、CHO細胞を最終的なターゲットとして、1)高度ゲノム編集技術の活用を目指した染色体安定メカニズムの解明(担当:大政)、2)ゲノムスケールリモデリングを指向した細胞応答解析(担当:大政、河原)、3)これらに基づいたゲノム育種による新規セルエンジニアリング技術(担当:大政、西島、河原)をさらに並列統合化して検討し、各課題間で得られた知見を互いに組み合わせ、ゲノム育種による基盤技術を取り纏める。

## 4. 研究成果

染色体の安定性ならびにゲノムスケールモデリングを統合し、CHO細胞のゲノム育種に関する基盤技術を取りまとめるためには、染色体の安定性解析や、それに影響する因子の解析、さらにはターゲットとする染色体の選定にかかる情報整理等が必要となる。以下では、成果をまとめて簡潔に記載する。

まず、CHO細胞における染色体安定性に関連する項目として、細胞周期チェックポイントおよびクロマチン構造制御により、長期的に高い生産性を示す細胞株を効率的に構築することを目的とし、両機能に関わる因子Breast Cancer 1(BRCA1)に着目し、BRCA1発現抑制により、効率的かつ安定な細胞株構築法を確立した。次に、染色体数の異なる細胞の遺伝子発現について、HiCEP(High Coverage Expression Profiling)法による網羅的発現比較と、次世代シーケンスによる発現量を比較しながら、発現量を細胞数で補正する方法を確立した。さらに、異なる染色体数を持つ細胞の遺伝子発現を比較するのはこれまで基準となるゲノムの全体量の変動しているため、何を基準として比較するのか、

これまではっきりとした基準が存在しなかった。そこで、細胞あたりの総発現遺伝子について、その発現量と細胞の大きさとの関連についてのプロファイルを作成し、染色体数の異なる細胞間における発現について比較を行い、関連する遺伝子群を同定し、これらの機能に関する知見を得た。さらには増幅領域のゲノム配列から安定性に関する配列も取得し、安定染色体におけるターゲット領域についても、ゲノム育種の候補となる領域を選定した。

以上より、ゲノム育種をして生産性株を構築する手法については、構築基盤としてのプラットフォーム形成ができた。一方、これらの構築した細胞株の長期安定性やそれを用いた実レベル、特に近年非常に注目されている連続生産プロセスへの応用や、その課題については全く実証されていない。本課題の実施期間の間に、世界中でCHO細胞のゲノム解析とその応用が加速度的に進んできており、その更なる展開を緊急に図るため、ゲノム育種のさらなる推進ならびにその応用による統合バイオプロセスの構築が必要とされ、最終年度において新たに採択された基盤研究に引き継がれている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Y.Takagi, T.Yamazaki, K.Masuda, S.Nishii, B.Kawakami and T.Omasa "Identification of regulatory motifs in the CHO genome for stable monoclonal antibody production" *Cytotechnology* Volume 69, No.3, pp.451-460 (2017) DOI: 10.1007/s10616-016-0017-8
2. R.Matsuyama, N.Yamano, N.Kawamura, and T.Omasa "Lengthening of high-yield production levels of monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells by downregulation of breast cancer 1" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 123, Number 3, pp.382-389 (2016) DOI:10.1016/j.jbiosc.2016.09.006
3. N.Yamano, M.Takahashi, S.M.A. Haghparast, M.Onitsuka, T.Kumamoto, J.Frank, and T.Omasa "Increased recombinant protein production owing to expanded opportunities for vector integration in high chromosome number Chinese hamster ovary cells" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume122,Number 2, pp.226-231 (2016) DOI 10.1016/j.jbiosc.2016.01.002
4. R.Matsuyama, T. Tsutsui, K.H.Lee, M.

Onitsuka, and T.Omasa "Improved gene amplification by cell-cycle engineering combined with the Cre-loxP system in Chinese hamster ovary cells" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 120, Number 6, pp. 701-708(2015). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.009

5. M. Onitsuka and T. Omasa "Rapid evaluation of N-glycosylation status of antibodies with chemiluminescent lectin-binding assay" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 120, Number 1, pp. 107-110 (2015). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.015
6. M.Onitsuka, A. Kawaguchi, R.Asano ,I. Kumagai, K.Honda, H. Ohtake, and T. Omasa " Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 117, Number 5, pp. 639-644 (2014).DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.001

[学会発表] (計53件)

1. T. Omasa "Cell and process engineering for Chinese hamster ovary cell: a workhorse of biopharmaceutical production" *The Antibody-based Bio-therapeutics Forum 2016*, InterContinental Shanghai Pudong Hotel, Shanghai, China, July 13-15,2016 (Invited lecture)
2. T.Omasa et al. "Mammalian cell factory-CHO cell and its application for biopharmaceutical production" In; world congress on *in vitro* biology, A-13, In Vitro Cellular and Developmental Biology -Animal, vol.52 (Suppl 1):S10-S11, San Diego, CA, June 11-15, 2016. (Invited lecture)
3. T.Omasa et al.,"Cre-loxP-controlled cell-cycle checkpoint engineering in Chinese hamster ovary cells" In; ECI Cell Culture Engineering XV, (P-21), La Quinta, CA, May 8-13, 2016.
4. 大政 健史 (招待講演) "バイオ医薬品生産プロセスの現状と将来" 平成 28 年度第 2 回合成フォーラム、近畿化学協会合成部会、2016 年 11/22、神戸市、兵庫
5. 大政 健史 (招待講演) "次世代のバイオ医薬品製造技術について—現状と将来への期待" 第 14 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (JCGG) 要旨集 p.30-31、2016 年 11/1-2、東京

6. 大政 健史 (招待講演) “バイオ医薬品生産におけるバイオプロセス-次世代生産に向けて“化学工学会第48回秋季大会, A301, CD-ROM、一ページ, 2016年 9/8、徳島大学、徳島
7. 大政 健史 (招待講演) “次世代バイオ医薬品生産技術～新たな課題に向けて～” 新製剤技術とエンジニアリングを考える会 (NPTE) 第14回講演会, 2016年 7/21-22, 京都国際会議場、京都
8. T. Omasa "Integrated next-generation biologics production - Manufacturing technology association of biologics (MAB) and its activities-" In; 29th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '16) S5-4, abstract p.29, November 9-12, Kobe, Japan (2016).
9. S.Tanaka, N. Yamano, N. Ogata, M. Onitsuka, Y. Koga and T. Omasa "Genome-wide analysis of gene expression in antibody-producing CHO cells with chromosome aneuploidy" In; 29th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '16) P-7, abstract p.77, November 9-12, Kobe, Japan (2016).
10. K. Yoshitomi, N. Yamano, W. Tanaka, M. Onitsuka, Y. Koga and T. Omasa "Improved antibody productivities of CHO cells constructed by targeting gene-rich chromosomal regions on the stable chromosome" In; 29th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '16) P-8, abstract p.78, November 9-12, Kobe, Japan (2016).
11. N. Yamano, T. Kumamoto, K. Yoshitomi, J. Frank, M. Onitsuka, and T. Omasa "Varied productivity according to the differences between targeted locations of antibody expression vectors in Chinese hamster ovary cells" In; ECI Cell Culture Engineering XV, (P-15), La Quinta, CA, May 8-13, 2016.
12. 阿賀 万里菜, 鬼塚 正義, 山野 範子, 大政 健史 "抗体高生産株選抜を目的としたメチル化 DNA 測定法構築の試み" 第3回日本生物工学会西日本支部講演会, C-6, 要旨集 27頁 2016年, 12/10, 徳島大学, 徳島.
13. 吉富 耕太, 山野 範子, 鬼塚 正義, 古賀 雄一, 大政 健史 "CHO 細胞における安定染色体の遺伝子地図作成と CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ターゲティングによる抗体生産株の構築" 第68回日本生物工学会, 1P-2p159, 要旨集 160頁 2016年, 9/28-30, 富山国際会議場, 富山.
14. 田中 翔, 山野 範子, 緒方法 親, 鬼塚 正義, 古賀 雄一, 大政 健史 "染色体異数性を持つ抗体生産 CHO 細胞の網羅的遺伝子発現解析" 第68回日本生物工学会, 1P-2p160, 要旨集 130頁 2016年, 9/28-30, 富山国際会議場, 富山.
15. T. Omasa "Overview of Biologics Production in Japan" In; 2nd Joint International Symposium on Animal Cell Technology for Asian Network by JAACT, TCELS and MU, Bangkok, Thailand, November 18-19, 2015 (Invited lecture)
16. T.Omasa "Next Generation Cell Engineering for Antibody Production – Past and Future" In; Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), Technical Session 2 Biopharmaceutical and Medical Biotechnology, Kuala Lumpur, Malaysia, November 15-19, 2015 (Invited lecture)
17. T.Omasa "Cell and cell culture engineering of CHO cell line for production of biologics" In; The 7th China-Japan Symposium on Chemical Engineering -Green and Sustainable Innovations in Chemical Engineering and Industry-Beijing, China, October 17-18, 2015. (Invited lecture)
18. 大政 健史 (招待講演) “生物を用いた生産プロセスの特徴と課題 —抗体医薬を例として— “日本プロセス化学会 2015 ウィンターシンポジウム 2015年 11/27、徳島大学、徳島
19. 大政 健史 (招待講演) “バイオ医薬品生産を支える工業用動物細胞：現状と未来を考える“ OYC バイオシンポジウム 2015 (タンパク質生産、骨免疫学), 2015年 7/8、日本工業倶楽部会館、東京
20. N. Yamano, T. Kumamoto, M. Takahashi, J. Frank, M. Onitsuka, and T. Omasa "Stability difference of each chromosome in Chinese hamster ovary cell line" In; ESACT Meeting 2015 in Barcelona, No.P-1.01, p.91, Barcelona, Spain, May 31- June 3, 2015.
21. M. Aga, N. Yamano, T. Kumamoto, J. Frank, M. Onitsuka, and T. Omasa "Construction of gene knockout CHO cell line by simple

- gene targeting method" In; ESACT Meeting 2015 in Barcelona, No.P-1.02, p.92, Barcelona, Spain, May 31- June 3, 2015. DOI 10.1186/1753-6561-9-S9-P2
22. Y.S. Lai, N. Yamano, M. Onitsuka, and T.Omasa "Increased antibody productivity in Chinese hamster ovary cells through induction of chromosomal instability by cell fusion" In; ESACT Meeting 2015 in Barcelona, No.P-1.29, p.119, Barcelona, Spain, May 31- June 3, 2015. DOI: 10.1186/1753-6561-9-S9-P11
  23. 松山 莉麻,筒井 智美, Kyoung Ho Lee, 鬼塚 正義, 大政 健史 "Chinese hamster ovary (CHO)細胞における効率的な遺伝子増幅システムの構築-Cre-loxP システムを用いた細胞周期チェックポイント制御-" 日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAACT2015) P-20、要旨集 p.76, 2015 年 7/9-10、東北大学、仙台
  24. 阿賀 万里菜、山野 範子、隈元 信貴、Jana Frank、鬼塚 正義、白井 昭博、大政 健史 "de novo 型 DNA メチル化酵素欠損 CHO 細胞株の構築とその応用", 化学工学会第 81 年会, ZBP108, 2016 年 3/13-15、関西大学、吹田
  25. T.Omasa "Chinese hamster ovary cells - A "Workhorse" for biopharmaceutical production-", 化学工学会第 81 年会, F215, 2016 年 3/13-15、関西大学、吹田
  26. 西島謙一、森孔明、金岡英徳、上平正道、大政健史、飯島信司 "CHO 細胞において均一な発現レベルを示すプロモーターの検討", 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3/26-30, 札幌コンベンションセンター, 札幌
  27. 河原正浩、中林秀人、青山幸恵子、沈鐘楚子、長棟輝行 "キメラ受容体を用いた細胞分化誘導の低コスト化", 化学工学会第 47 回秋季大会, 2015 年 9/11, 北海道大学札幌キャンパス, 札幌
  28. 河原正浩、中林秀人、田中健人、長棟輝行 "無血清培養での細胞増殖活性向上のためのキメラ受容体のデザイン", 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10/27, 城山観光ホテル, 鹿児島
  29. R. Matsuyama, T. Tsutsui, K.H.Lee, M. Onitsuka, and T. Omasa "Generation of high-producing cell lines by cell cycle checkpoint engineering in CHO cells" Cell Culture Engineering XIV, Quebec 2014 年 5/4 ~ 9 , Fairmont Le Chateau Frontenac, Canada
  30. T. Kumamoto, M. Takahashi, M. Onitsuka, and T. Omasa "Analysis of chromosome number and its application to antibody production in Chinese hamster ovary cells" Cell Culture Engineering XIV, Quebec 2014 年 5/4 ~ 9 , Fairmont Le Chateau Frontenac, Canada
  31. 西島 謙一、大西 慎太郎、奥寄 雄也、佐藤 里穂、金岡 秀徳、飯島 信司 "φC31 インテグラーゼによる動物細胞誘導発現系" 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9/10, ロイトン札幌, 札幌
  32. 河原 正浩、坂 晃一郎、藤 晋イン、陳 建宏、大津 真、中内 啓光、長棟 輝行 "造血幹細胞の増幅を指向したキメラ受容体の構築" 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014 年 9/18, 九州大学伊都キャンパス, 福岡
  33. R.Matsuyama, T. Tsutsui, K. H. Lee, M. Onitsuka, T. Omasa "Accelerated Gene Amplification by Checkpoint Bypass with Cell Division Cycle 25 Homolog B (CDC25B)" JAACT2014 Kitakyushu, 2014 年 11/14, 北九州国際会議場, 北九州
  34. K. Nishijima, K. Mori, Y. Zaitso, M. Kamihira, S. Iijima "Integration of retrovirus into CHO cells" JAACT2014 Kitakyushu, 2014 年 11/14, 北九州国際会議場, 北九州
  35. T. Omasa "Application of UPR Response and Cell Cycle Checkpoint Engineering for CHO Cell Line Construction" Pep Talk 2015, 2015 年 1/22, Town and Country Resort&Convention Center (USA) (招待講演)
  36. 沈 鐘楚子, 中林 秀人, 河原 正浩, 長棟 輝行 "キメラ受容体を用いた骨髄系前駆細胞株 32Dcl3 の顆粒球分化誘導", 化学工学会第 80 年会, 2015 年 3 月 19 日, 芝浦工業大学 豊洲キャンパス, 東京
- [図書] (計 4 件)
1. 大政健史 (監修、著) 「抗体医薬のための細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて」シーエムシー出版(2015)
  2. 大政健史 「序論 三次元ティッシュエンジニアリングの産業応用への現状と未来展望」, 「三次元ティッシュエンジニアリング」 pp.3-8、(監修) 大政健史、福田淳二、エヌ・ティー・エス(2015)
  3. T. Omasa and K. Lee "Chromosome

rearrangement and gene amplification" in  
Animal Cell Technology (R. Wagner and H.  
Hauser (eds.) ) Walter de Gruyter GmbH  
(2014) ISBN: 978-3-11-027896-5,  
p.127-143

4. 大政健史「8.6.2 染色体工学」(分担執筆)  
「化学便覧 応用化学編 第7版」469-472  
頁 日本化学会編、丸善出版 (2014)

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大政 健史 (OMASA TAKESHI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00252586

##### (2)研究分担者

西島 謙一 (NISHIJIMA KEN-ICHI)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10262891

河原 正浩 (KAWAHARA MASAHIRO)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：50345097