

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：82508
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K05178
研究課題名（和文）1細胞1遺伝子1コピー発現系を利用したCHO細胞での迅速な抗体医薬作製方法の開発

研究課題名（英文）Development of rapid production of antibody drugs using a single-copy gene expression system in CHO cells

研究代表者
長谷川 嘉則（Hasegawa, Yoshinori）

公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・グループ長

研究者番号：30387683
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：短期間での機能的な抗体の取得は、タンパク質発現に関する各種遺伝子実験への利用はもとより抗体医薬を使用した治療目的にも求められている。かずさDNA研究所の特許技術である新規の部位特異的組換えシステムを利用した1細胞へ1種類の遺伝子をしかも1コピーだけ効率的に挿入する方法を活用して、CHO細胞において抗体ライブラリーのスクリーニングを行う系を完成させ、スクリーニング後にスクリーニングしたその細胞を用いて抗体の大量合成まで行う方法を確立した。特に抗体医薬に向けて、既存の方法よりも迅速に結合活性の高い抗体を作製する方法を確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは抗体の大量合成にしか用いられてこなかったCHO細胞において、抗体ライブラリーのスクリーニングも行うことにより、既存の方法よりも迅速に結合活性の高い抗体を作製する方法を確立できた。この成果は、特に抗体医薬に向けて有用であり、インフルエンザウイルスやコロナウイルスのように早い対策が望まれるものに対しての活用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The production of functional antibodies in a short period of time is desired not only for molecular genetics experiments but also for therapeutic antibodies. In this study, by using a single-copy gene expression system and human artificial chromosomes, it became possible antibody library screening followed by gene amplification in CHO cells.

研究分野：細胞工学

キーワード：抗体医薬 迅速スクリーニング 1細胞1遺伝子1コピー発現 遺伝子増幅

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

短期間での機能的な抗体の取得は、タンパク質発現に関する各種遺伝子実験への利用はもとより抗体医薬を使用した治療目的にも求められている。しかし、マウスやニワトリを用いた抗体作製法では結合活性の高い抗体が作製できるが、複数回の抗原投与が必要なため、5~6カ月もの期間が必要である。一方、**in vitro** で抗体を作製する方法は、抗体の作製期間は**6~8**週間と短い期間での作製が可能である。現在最も広く利用されているのがファージディスプレイ法とリボソームディスプレイ法の2つの方法である。両方法ともに成果を上げており、特にファージディスプレイ法でスクリーニングを行なった抗体の中には、上市されている抗体医薬品もある。**in vitro** で特異的かつ結合活性の高い抗体を選別するためには、たくさんの候補ライブラリーの中から複数回のスクリーニングを行う工程が必要である。そのため、タンパク質合成された抗体とそれをコードする遺伝子が一対一で対応可能であることが必須条件になる。この条件を満たしている方法としてファージディスプレイ法とリボソームディスプレイ法が広く利用されていた。一方、実際に抗体のタンパク合成に使用されることの多い哺乳類汎用細胞である**HEK293**細胞と**CHO**細胞では、抗体とそれをコードする**1x10⁹**種類以上にも及ぶライブラリー遺伝子を一対一で対応させる細胞を作製する事、つまり1つの細胞に1つの遺伝子を1コピーだけ効率的に挿入することが困難であったため、スクリーニング細胞として利用することは出来なかった。抗体医薬の大量生産にはほぼ**CHO**細胞が利用されている。抗体医薬のためには、既存の方法で選別された抗体は、**CHO**細胞に遺伝子を載せ換えなければならない。**CHO**細胞に移した時に、結合活性が低下する抗体があることも報告されており、実際に抗体医薬作製までの長期化と成功確率を下げる一因になっていた。

2. 研究の目的

かずさDNA研究所の特許技術である部位特異的組換えサイト「**VloxP** サイトおよび **SloxP** サイト」を利用することにより、1細胞1遺伝子1コピー抗体遺伝子発現**CHO**細胞を効率的に作製する。この細胞とセルソーターを活用して抗体ライブラリーのスクリーニング方法を確立して、迅速な上に特異性と結合活性の高い抗体作製の成功確率を高める事が目的である。加えて、抗体遺伝子の搭載場所として、エピソーマルベクターであるヒト人工染色体(**HAC**)ベクターを用いることにより、ホスト**CHO**細胞自身の染色体には変異を起こさず、安全に遺伝子増幅を行う。また、**HAC**ベクターは様々な細胞へのトランスファーが可能である。目的の増幅された抗体遺伝子を搭載した**HAC**ベクターを**HEK293**細胞へトランスファーすることにより、ヒト型の翻訳後修飾を付加したい要望が出てきた時にも簡単に対応可能になる。

3. 研究の方法

1). PCRにより**1.6x10⁹**種類の本鎖抗体(**single chain antibody : scFv**)ライブラリーの両端に**VloxP** サイトおよび **SloxP** サイトを付加したものを作製する。**2).** **dual RMCE (recombinase-mediated cassette exchange)** 法により、**HAC**ベクターへ抗体遺伝子を挿入して、1細胞1遺伝子1コピー発現細胞を作製する。挿入した抗体遺伝子は、**PDGFR Transmembrane Domain**の融合遺伝子として発現させることにより細胞の表面に提示させる。**3).** 蛍光標識抗原ペプチドを用いて迅速にスクリーニングを行う。蛍光標識抗原ペプチドと結合したものをセルソーターでスクリーニング。蛍光標識抗原ペプチドの濃度を段階的に薄くしていき結合活性が強いものを濃縮する。**4).** 3回のスクリーニング後に次世代シーケンサーを用いて配列解析を行う。**ELISA**で結合活性の測定を行う。**5).** 結合活性の高い抗体を取得後、**PDGFR Transmembrane Domain**を除去。抗体が分泌されるようにする。**6).** **Dhfr/MTx**法により遺伝子増幅を行う。**7).** **HEK293**細胞へ、増幅抗体遺伝子搭載**HAC**ベクターのトランスファーを行う。

4. 研究成果

「**VloxP** サイトおよび **SloxP** サイト」搭載**HAC**ベクター保有**CHO dhFr**-株へ**Naive**単鎖抗体ライブラリーの導入を進め、**1x10⁸**種類以上のライブラリーを確保した。次に、**FACS sorting**を利用したスクリーニングができることも確認した。その後、**MTX**法による遺伝子増幅が可能かどうかの検証を行い、搭載した遺伝子の遺伝子増幅を起こすことに成功した。遺伝子増幅を行うことによって、**scFv**抗体の生産量を**10**倍以上増加することが出来た。最後に、遺伝子増幅を行った抗体遺伝子搭載**HAC**を**HEK**細胞に導入することにも成功した。迅速な機能的な抗体の取得システムを完成することが出来た。機能的な抗体医薬のスクリーニングを**3-4**週間で行うことが可能となった。しかし、取得した抗体の中には、結合定数が低いものも少なからずあった。これは、元々のライブラリーの中に強く結合する抗体が含まれていなかったと考えられる。この解決策としては、ライブラリーの種類を増やすことも一つの手段ではあるが、本研究でライブラリーの作製には非常に手間がかかることも分かった。今後は、スクリーニング後に、結合定数が低いものしか取得出来なかった場合は、その抗体配列に**mutation**を入れて結合活性を増強してい

く方法を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------