

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360371

研究課題名(和文)細胞内品質管理プロセスを用いた次世代蛋白質生産システム創製

研究課題名(英文)Next generation protein production on cellular quality-control process

研究代表者

大政 健史 (OMASA, Takeshi)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：00252586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬を代表とする蛋白質医薬品は、世界の製薬産業の成長エンジンとなっている。我が国で上市されている蛋白質性医薬品のうち、26%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おり、CHO細胞は10g/Lを超える高レベル生産も可能である。特に本課題では、CHO細胞内における品質管理プロセスに着目し、品質管理機構の解明と制御を通して次世代型蛋白質を高度に生産可能な次世代の蛋白質生産システムを構築するための基盤的研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic antibody is workhorse for the development of pharmaceutical industries. In Japan, more than quarter of biopharmaceuticals was produced using CHO cell line. Recently, over 10 g/L antibody production was reported using CHO cell line. In this project, we focused on the cellular quality-control system for protein secretion process in CHO cell. On the basis of quality-control mechanism, we constructed the improved protein production system.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：小胞体ストレス応答 チャイニーズハムスター卵巣細胞 蛋白質医薬品 糖鎖 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬を代表とする蛋白質医薬品は、我が国においても大きな市場を形成している。現在、我が国で上市されている蛋白質性医薬品 84 品目のうち、大腸菌(28 品目)に次いで多い 22 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。Nature Biotechnology (2010 年 9 月号)によれば、2010 年までの 5 年間に欧米で上市されたバイオ医薬品 58 品目のうち、32 品目が動物細胞を用いて生産され、そのほとんどが CHO 細胞である。CHO 細胞は 10g/L を超える高レベル生産も可能であり、g/L レベルの生産を行うことにより、その生産コストも大腸菌、酵母と遜色ない g 数ドルのレベルにまで引き下げることができる。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 年近くに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、時間をかけてスクリーニングしても高生産株が得られない場合も多く、生産性が上昇しない理由も十分に解明されていない。申請者はこれまで、NEDO プロジェクト「新機能抗体創製技術開発プロジェクト」を始めとする CHO 細胞を用いた蛋白質生産の第一人者として様々な研究を行ってきた。また、CHO 細胞のゲノム解明や、高発現系構築、さらには、各種動物細胞工学関連の国際学会での招待講演、基調講演、オーガナイザー、さらには多数の企業との産学官共同研究も行ってきた。以上の活動から得られた結論として、CHO 細胞の蛋白質生産における大きなボトルネックの一つが高等真核生物において特に発達している「翻訳および翻訳後プロセス」にあることが明確になってきた。

細胞における蛋白質の分泌生産は、組み込んだ外来 DNA が転写、翻訳された後にフォールディング、翻訳後修飾を受けて分泌される。これまで動物細胞において行われてきた生産性向上法は、ほとんどが転写プロセスに注目した手法であり、高等真核細胞に特徴的な翻訳及び翻訳後プロセスに注目した手法はほとんど無い。微生物ではシャペロンの共発現によって生産性を向上させる試みがなされているが、同様にシャペロンを動物細胞に単に発現させても効果が上がらないことが多数報告されている。

近年になって、小胞体ストレス応答に代表される細胞内の非常に厳密な品質管理プロセスが翻訳及び翻訳後プロセスに存在することが明らかになってきた。細胞内できちんと構造が構築されていない異常な蛋白質が蓄積し、凝集すると細胞は死に至る。そこで、異常な蛋白質が作られた場合には、小胞体に

代表される細胞内小器官はそれらを見分け、適切に処理して、悪影響を及ぼす蛋白質が細胞の中に野放しにならないよう、厳密に制御している。この対処機構を細胞内の蛋白質「品質管理機構」と呼んでいる。小胞体における品質管理機構を見てみると、それは工場などにおける製品の品質管理とよく似た合理的な戦略(異常蛋白質の正常化、異常蛋白質の生産停止、異常蛋白質の排除)を用いている。一方、この品質管理機構は、インシュリンを分泌する膵臓細胞や抗体を分泌するプラズマ細胞においては高分泌を達成する手段として機能している。

申請者はこれまでにいち早く小胞体ストレス応答を含めた細胞内品質管理機構に着目し、小胞体ストレスに関わるシグナル伝達経路である PERK 経路の転写因子 ATF4 ならびに GADD34 を CHO 細胞から世界で初めて単離し、これを高発現させることにより、細胞の生産性を 2 倍に上昇させることに成功している。また、小胞体以降のプロセスにおいては、ゴルジ体内への糖鎖前駆体を輸送するトランスポーター発現を調整することにより、糖蛋白質におけるフコース修飾を低下させることにも成功している。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内品質管理に関連する細胞応答として、小胞体ストレス応答に着目し、PERK 経路活性化による生産性向上メカニズムの解明等を通して、次世代蛋白質生産システム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、小胞体ストレス応答と、CHO ゲノム情報を利用することにより、網羅的遺伝子発現解析による生産性向上メカニズムの解明、さらにこれを応用した複雑なドメイン構造をもつ蛋白質を対象とした生産性向上に向けた基盤技術を開発する。

3. 研究の方法

対象細胞としてバイオ医薬品生産に多用されているチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた。これまでに研究室で構築した医薬品に用いられているヒト由来蛋白質ならびに抗体医薬品の例となり得るヒト化抗体を生産する CHO 細胞を宿主細胞として用い、

また、発現遺伝子の比較には high coverage expression profiling (HiCEP) 法を用いた。構築した細胞を培養し、細胞濃度、生産物濃度の経時変化より、各種比速度を算出し、評価した。細胞濃度の測定は血球計算盤または全自動細胞測定装置を、生産物濃度の測定は ELISA 法を用いた。また、関連遺伝子を発現した CHO 細胞株構築においては、発現ベクターに目的遺伝子を組み込み、その後、リポフェクション法によって細胞に組み込み、PCR によって細胞への組み込みを確認した後、細胞を評価した。

4. 研究成果

これまでの研究において、小胞体ストレス応答に関わる因子として ATF4 を発現させると生産性の向上がみられることが得られている。そこで、初発濃度 8.0×10^4 cells/mL にて開始した 100mm dish スケールの回分培養において、対数増殖期のヒト由来蛋白質生産 CHO 細胞株（元株）と、元株に小胞体ストレス応答に関わる ATF4 を高発現させて生産性を向上させた CHO 細胞株から total RNA を抽出し、high coverage expression profiling (HiCEP) 法を用いて 2 株の遺伝子発現を比較した。HiCEP 法は 256 通りのプライマーで選択的 PCR を行い、発現産物を解析することで網羅的遺伝子発現解析を行い比較する手法であるが、本研究ではそのうち、16 通りのプライマーを用いて選択的 PCR を行い発現産物を解析した。その結果、元株と比較して、遺伝子発現がそれぞれ 9.67 倍、2.24 倍、2.07 倍に上昇している 3 つの断片配列を取得した。次に、この配列情報をもとに mRNA の 3' 末端の配列を取得し、元株と ATF4 導入細胞株、さらに小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを用いて小胞体ストレスを誘導した元株において、これら 3 種類の遺伝子の発現を Real-time PCR を用いて解析した。その結果、ATF4 導入細胞株において発現が 9.67 倍となった配列断片については、13D-35D 株と 13D-35D-TN 株に有意な差が見られなかったが、他の 2 遺伝子については、HiCEP 法と同程度の発現上昇が見られた。そこで、この 2 遺伝子について 5' 末端の配列を取得し、13D-35D-ATF4 株において 2.24 倍、2.07 倍に発現上昇した mRNA を同定した結果、2.24 倍に発現上昇した転写産物は 5' 末端側に発現ベクターの配列を持っており、導入した発現ベクター由来のものであった。2.07 倍に発現上昇した転写産物は nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta (Nfkbiz) であると推定された。

次に、ATF4 を発現させる手法が IgG 分子に代表される複雑なドメイン構造を持つ分子においても有効かどうかを確かめるために、ヒト化 IgG を生産する CHO-DP12 細胞を対象として、ATF4 発現ベクターを導入して、細胞株を構築し、その細胞増殖、生産性を評価した。その結果、DP12 細胞に ATF4 を導入して構築した 3 株において、生産濃度の向上がみられ、細胞あたり生産速度である比生産速度を増強することが可能であった。（以下図 1, 2）

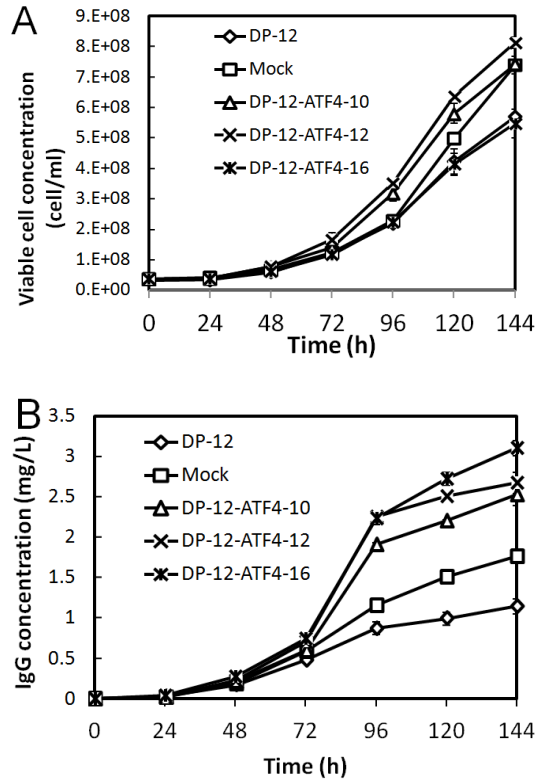


図 1 細胞濃度及び抗体濃度の経時変化

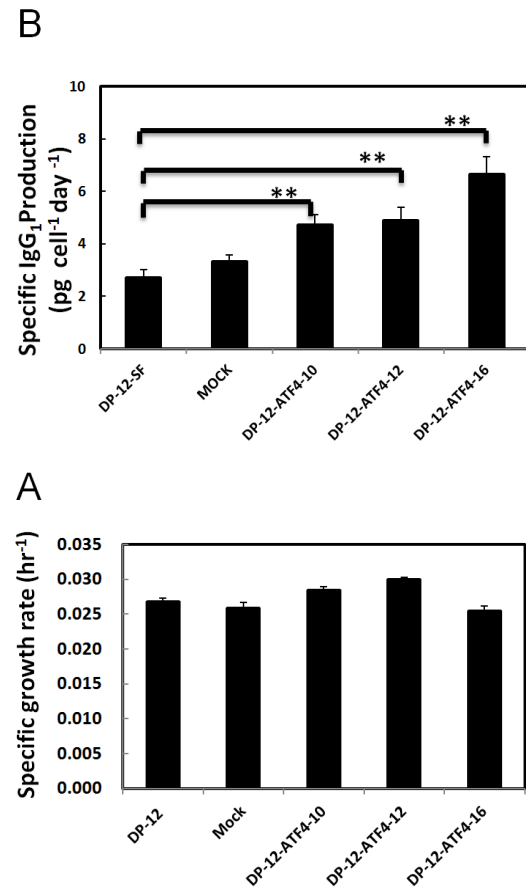


図 2 比増殖速度及び比生産速度の比較

(**P>0.05)

次に、本研究では、ATF4 発現株において高

発現している事が確認された Nfkbiz をヒト由来蛋白質である元株で恒常的に高発現させる事により、細胞増殖、生産物生産に及ぼす Nfkbiz 発現の影響を検討した。哺乳動物細胞発現用ベクター-pEHX1.1にNfkbizを導入し、元株にトランスフェクションした。ピューロマイシンを用いて細胞株の選択を行い、Genomic PCR と RT-PCR により、単一クローン株の染色体へのベクター導入と Nfkbiz 発現を確認した。さらに、取得株を用いて6日間の回分培養を行い、その比増殖速度およびヒト由来蛋白質比生産速度を測定した。

その結果、Nfkbiz 導入細胞株を選択した結果、Nfkbiz 導入株を3株取得した。取得株を用いて6日間の回分培養を行った結果、全株で元株と比較して生産濃度の増加が確認できたが、比増殖速度は低下した。さらに、比生産速度を算出した結果、最大で約2.9倍に上昇した。

以上より、Nfkbiz 発現は ATF4 同様に生産物の生産性向上に有効であったと考えられる。そこで、対象をヒト化抗体に変更しても同様の効果が得られるかを検証した。本研究室にて構築した生産性の高いヒト化抗体生産株(ヒト抗体生産元株)に対して、CHO 細胞からクローニングした CHO NFKBIZ 遺伝子を導入し、NFKBIZ 発現株を構築した。構築した細胞株を用いて回分培養を行い、比増殖速度および抗体比生産速度を解析した。

ヒト抗体生産元株に NFKBIZ 発現ベクターを導入し、薬剤選択後、PCR 法により染色体へのベクター導入とその発現を確認し、NFKBIZ 発現株(NFKBIZ 株)を構築した。構築した NFKBIZ 株は元株と比べ、比増殖速度が減少する一方で、比生産速度が約2倍上昇した。(図3、図4及び表1)

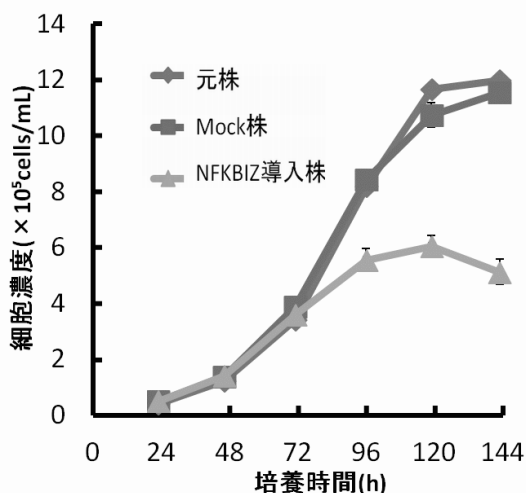


図3 細胞濃度の経時変化

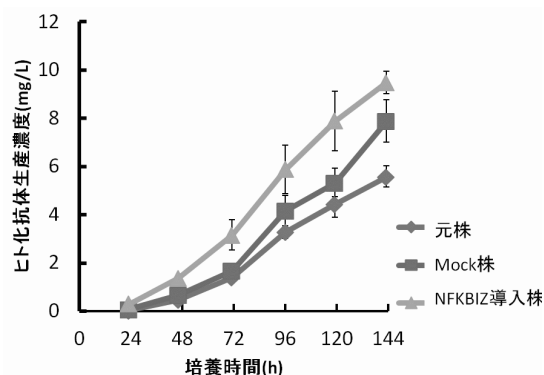


図4 抗体濃度の経時変化

表1 構築した細胞株における比速度

	比増殖速度 (h ⁻¹)	比生産速度 (pg cell ⁻¹ day ⁻¹)
元株	0.0413 ± 0.0015	3.95 ± 0.89
Mock株	0.0397 ± 0.00038	4.16 ± 0.63
NFKBIZ導入株	0.0337 ± 0.0012	7.93 ± 1.8

また、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより NFKBIZ 高発現による NF-κB 結合活性の変化を検討した結果、p65-p50 ヘテロダイマー結合活性には差が見られなかったが、p50-p50-NFKBIZ 複合体結合活性は NFKBIZ 発現株で活性が上昇していた。すなわち NFKBIZ 発現株における抗体生産性の向上は、p50-p50-NFKBIZ 複合体形成を介した転写活性の制御と関連があると示唆された。以上より、生産性向上手段の一つとして NFKBIZ 発現が利用可能と考えられる。

以上より、本研究では、細胞内品質管理に関連する細胞応答として、ゲノム発現情報を利用することにより、網羅的遺伝子発現解析による生産性向上メカニズムの解明、さらにこれを応用した複雑なドメイン構造をもつ蛋白質を対象とした生産性向上に向けた基盤技術を開発できた。

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)

Ahmad M. Haredy, Akitoshi Nishizawa, Kohsuke Honda, Tomoshi Ohya, Hisao Ohtake, Takeshi Omasa "Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression" Cytotechnology, Vol. 65, pp. 993-1002 (2013) 査読有, DOI: 10.1007/s10616-013-9631-x
 Kyoung Ho Lee, Tomomi Tsutsui, Kohsuke Honda, Ryutato Asano, Izumi Kumagai, Hisao Ohtake, Takeshi Omasa

“Generation of high-producing cell lines by overexpression of cell division cycle 25 homolog A in Chinese hamster ovary cells” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 116, pp.754-760 (2013), 査読有, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.032>

Kyoung Ho Lee, Masayoshi Onitsuka, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, Takeshi Omasa “Rapid construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle checkpoint engineering” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97, pp. 5731-5741 (2013), 査読有, DOI: [10.1007/s00253-013-4923-9](http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4923-9)

Yihua Cao, Shuichi Kimura, Takayuki Itoi, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and Takeshi Omasa “Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines” *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 109, No.6, pp.1357-1367 (2012), 査読有, DOI:10.1002/bit.24347

Yihua Cao, Shuichi Kimura, Takayuki Itoi, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and Takeshi Omasa “Fluorescence *in situ* hybridization using bacterial artificial chromosome (BAC) clones for the analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cells.” *Methods*, Volume 56, pp.418-423 (2012), 査読有, DOI:10.1016/j.ymeth.2011.11.002

Masayoshi Onitsuka, Wook-Dong Kim, Hiroyuki Ozaki, Akira Kawaguchi, Kohsuke Honda, Hiroyuki Kajiura, Kazuhito Fujiyama, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Hisao Ohtake, Takeshi Omasa “Enhancement of sialylation on humanized IgG-like bispecific antibody by overexpression of 2,6-sialyltransferase derived from Chinese hamster ovary cells” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 94, pp. 69-80 (2012), 査読有, DOI:10.1007/s00253-011-3814-1

[学会発表](計29件)

Takeshi Omasa “Efficient Construction of Transgene-Amplified CHO Cell Lines by Cell Checkpoint Engineering” *Pep Talk 2014*, 2014/1/12, Palm Springs Convention Center (USA).
 筒井智美 他 “細胞周期エンジニアリングによる 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” *日本動物細胞工学会 2013 年*

度大会, 2013/7/18-19, ホテルフジタ福井(福井県)

木下幸恵 他 “抗体生産 CHO 細胞株における NFkBIZ 発現の影響” *日本動物細胞工学会 2013 年度大会*, 2013/7/18-19, ホテルフジタ福井(福井県)

松村しずか 他 “CHO 細胞における小胞出芽関連因子 Arf のクローニングと発現制御によるタンパク質生産への影響” *日本動物細胞工学会 2013 年度大会*, 2013/7/18-19, ホテルフジタ福井(福井県)

Masahiro Noda et al. “Chemical chaperone suppresses the antibody aggregation in CHO cell culture” *ESACT Meeting 2013*, 2013/6/23-26, Congress Centre of Lille (France).

Kyoung Ho Lee et al. “Rapid construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle checkpoint engineering” *ESACT Meeting 2013*, 2013/6/23-26, Congress Centre of Lille (France).

大政健史 “遺伝子組換え製剤:生産動物細胞株の作成の現状と課題” *バイオプロセス講演・見学会(招待講演)*, 2013/5/22-23, 東和薬品工業株式会社 山形工場(山形県)

木下幸恵 他 “NFkBIZ 発現による高生産 CHO 細胞株の構築と解析” *化学工学会第 77 年会*, 2013/3/17-19, 大阪大学(大阪府)

鬼塚正義 他 “レクチンを用いた抗体糖鎖の迅速検出とその応用の可能性” *第 5 回先導技術交流会*, 2013/1/21, 機械振興会館(東京都)

Masayoshi Onitsuka et al. “Deglycosylation induces antibody aggregation in culture process of Chinese hamster ovary cell” *The 18th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)*, 2012/10/26-28, 徳島大学(徳島県)

Kyoung Ho Lee et al. “Construction of high-producing CHO cell lines by controlling cell cycle checkpoint” *The 18th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)*, 2012/10/26-28, 徳島大学(徳島県)

Tomomi Tsutsui et al. “Expression profiling in UPR-engineered Chinese hamster ovary cell line” *The 18th Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC)*, 2012/10/26-28, 徳島大学(徳島県)

大政健史 “バイオ医薬品生産におけるプロダクションサイエンス” *第 64 回日本生物工学会*, 2012/10/23-26, 神戸国際会議場(兵庫県)

筒井智美 他 “ATF-4 高発現 CHO 細胞に

おける遺伝子発現解析” 第 64 回日本生物工学会, 2012/10/23-26, 神戸国際会議場(兵庫県)

Kyoungho Lee et al. “Rapid construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle regulator engineering” 第 64 回日本生物工学会, 2012/10/23-26, 神戸国際会議場(兵庫県)

鬼塚正義 他 “糖鎖構造が細胞培養過程の抗体凝集形成に与える影響” 第 64 回日本生物工学会, 2012/10/23-26, 神戸国際会議場(兵庫県)

大政健史 “バイオ医薬品生産における CHO 細胞基盤情報とその応用” 化学工学会第 44 回秋季大会, 2012/9/21, 東北大学(宮城県)

Takeshi Omasa et al. “Chromosome Identification and Its Application in Chinese Hamster Ovary Cells” ESACT Meeting 2011 in Vienna, 2011/5/15, Vienna Hofburg Congress Centre (Austria)

〔図書〕(計 4 件)

大政健史(分担執筆)化学便覧 応用化学編 第 7 版「8.2.6 染色体工学」, 丸善出版(2014), 総ページ数 1788(469-471 担当)

大政健史(分担執筆)新機能抗体開発ハンドブック「第 1 編 2 章 5 節 大量調製 - 細胞培養」, 「第 2 編 4 章 1 節 培養技術の進歩」エヌ・ティー・エス(2014), 総ページ数 680(36-40, 213-216 担当)

大政健史(分担執筆)抗体医薬品の開発と市場 開発編「第 3 章 抗体医薬品生産技術の基礎～動物細胞生産株の樹立、培養、スケールアップからダウンストリームまで～」, シーエムシー出版(2012), 総ページ数 239(27-39 担当)

大政健史(分担執筆)バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発「第 II 編 第 1 章 CHO 細胞におけるタンパク質生産性向上技術、ベクター開発」, シーエムシー出版(2012), 総ページ数 267(36-41 担当)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大政 健史 (OMASA TAKESHI)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・教授
研究者番号：00252586

(2) 研究分担者

鬼塚 正義 (ONITSUKA MASAYOSHI)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・助教
研究者番号：80571174

白井 昭博 (SHIRAI AKIHIRO)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・助教
研究者番号：40380117

間世田 英明 (MASEDA HIDEAKI)
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：10372343