

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26630433

研究課題名(和文)ケミカルシャペロンを利用したタンパク質新規分泌生産法

研究課題名(英文) Novel production of therapeutic protein by using mammalian cell culture with the addition of chemical chaperones

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体生産細胞における凝集体形成について解析した結果、培養中に細胞内に抗体が凝集することにより、凝集体形成が起きていると推定された。トレハロース添加培地の使用により、培養中に発生する凝集抗体量を低減させることが出来たが、添加による培地浸透圧上昇のために、細胞増殖が低下した。そこで、細胞増殖性の改善のため、トレハローストランスポーターを抗体生産CHO細胞に導入することにより増殖能の改善を行えた

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of antibody aggregation during cultivation, the aggregation was analyzed during cultivation. The aggregation was observed in CHO cell. We have developed the CHO cell culture methods to suppress antibody aggregation by trehalose addition. Despite reducing aggregation, the cultivation method causes the inhibition of cell growth due to the increased osmotic pressure by trehalose addition. By introduction of the trehalose transporter we can attain both suppressed antibody aggregation and improved cell growth.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオ医薬品 ケミカルシャペロン トレハロース 抗体医薬 CHO細胞 品質管理

## 1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品としてよく知られている糖蛋白質の生産工程は、細胞株に外来蛋白質遺伝子を組み込み、細胞に分泌させて生産させる。培地中に分泌された糖蛋白質は分離精製工程を経て、原薬として生産され、高濃度の蛋白質溶液として、製剤化される。本プロセスは、生体による合成過程を生産に利用していることから、分子構造上、不均一なものが本質的に存在する。医薬品開発において、このような不均一性の存在は安全性と有効性の確保のうえで好ましいことではないが、バイオ医薬品では不可避の事象として看過されている現状がある。

近年、特に製剤化プロセスや、分離精製プロセスにおいて蛋白質の凝集や断片化、異常なフォールディングによる不均一性が問題になってきた。近年、抗体医薬においては、この蛋白質凝集が、分離精製過程における収率の低下をもたらすだけでなく、ヒトへの投与時に抗原として働き、重篤な副作用が発生する可能性が示唆されている。これらの問題点を解決する手法として、製剤時における安定化剤添加や、よりマイルドな分離精製条件等が試みられているが、十分な解決策には至っていない。そこで、本研究は、ケミカルシャペロンを応用することにより、凝集体形成にかかる細胞培養プロセスにおいて蛋白質が受ける物理的ストレスについて解明することで、凝集を抑制可能ではないかと考えた。

本課題の学術的な特色は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞培養中に、対象抗体にどのように凝集が引き起こされているか、凝集を解決する手段として、製剤プロセスで用いられているケミカルシャペロン等の添加が有効かについて検討する、点にある。

## 2. 研究の目的

蛋白質が様々な環境要因によって凝集や断片化などの変化を受けることは一般によく知られている現象である。これらについては精製・製剤プロセスが主原因とこれまで捉えられてきたが、実際には、細胞培養の過程において、この様な変化が生じ、これが後段のプロセスにまで影響を及ぼしている。これまでの研究では、細胞培養工程における変化については全く解析されて来なかった。そこで、本研究では上流の細胞培養プロセス側に焦点をあて、ケミカルシャペロン添加による凝集体形成の制御をおこなう。

## 3. 研究の方法

まず、ヒト化 IgG 産生 CHO 細胞株である CHO-HcD6 株を 1L 容のバイオリアクターを用いて

無血清浮遊培養した。12 日間の培養期間中、生細胞数、細胞生存率、抗体濃度測定を行い、経時変化を解析した。採取した培養液上清を用いてゲル濾過クロマトグラフィーによる凝集分析を行った。さらに、CHO-HcD6 株に、トレハローストランスポーター Tret 1 遺伝子を導入した CHO-HcD6-TRET 細胞を構築し、これを用いた生産における凝集体形成について検討した。100mL の 100mM トレハロース添加無血清培地、トレハロース無添加無血清培地で培養し、細胞濃度の経時変化を測定し、生産された抗体の凝集を解析した。

## 4. 研究成果

リアクター培養の結果、IgG1 産生 CHO HcD6 細胞株は培養 8 日目で生細胞が最高到達濃度  $1.60 \times 10^7$  (cells/ml) に達し、生存率が 80% を切った培養 14 日目に培養を終了した。培養終了時の抗体濃度はおよそ 1490 (mg/L) に達した。次にゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量解析から、培養液中では目的物である単量体や二量体の他に凝集抗体の成分が観測された。凝集抗体の形成過程を解析するために凝集抗体のピーク面積の時間変化を解析したところ、凝集抗体は培養時間を経るにつれて次第に増加し、14 日目には単量体、二量体を含めた全ピーク面積の約 3% に達した。次に培養培地中の凝集体形成を確認するために、模擬培養系による検証実験を行った。精製した単量体抗体を終濃度 450mg/L で培養培地に加え 20 日間インキュベートし、抗体を含んだ培地溶液をゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ、凝集抗体の形成は確認できなかった。この結果から、培養液中に蓄積される凝集抗体は培養液中で形成されたものではなく、むしろ細胞内で形成された凝集抗体が培養液中に分泌されている可能性が示唆された。そこで培養終了時に細胞を回収し、細胞内の抗体蛋白質を精製しゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量解析を行った。すると、細胞内に相当量の凝集抗体が蓄積していることが確認された (図 1)。さらに、細胞内外の凝集抗体の構造を CD スペクトルで評価したところ、共に非天然の  $\alpha$ -ストランド構造を多く含むミスフォールディング状態であった (図 2)。

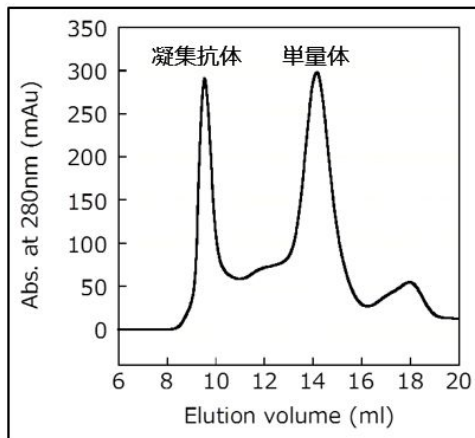


図1 細胞内抗体のゲル濾過クロマトグラフィー分析

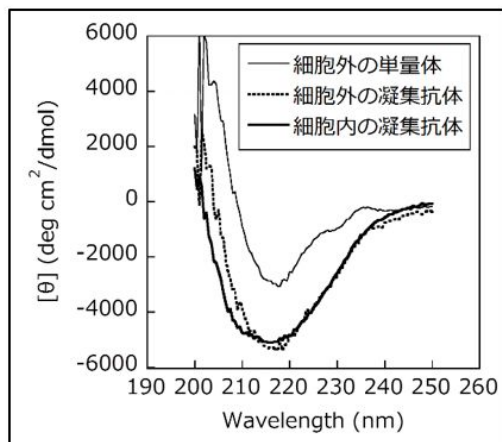


図2 細胞内外の単量体及び凝集体のCDスペクトル

これまで、凝集体の形成は、分泌時に凝集されて生産される、生産後に凝集体形成が促進される、の2つの仮説があり、いずれなのかは明確には示されていないが、一定の結論を得たと考えられた。

ケミカルシャペロン添加として、これまでトレハロース添加により、凝集体抑制が可能となる。一方、トレハロースについては、通常は細胞内に浸透することは無いが、シャペロン効果を発揮するためには、細胞内への浸透も非常に重要な課題であった。そこで、細胞内への能動的なトレハロース取り込みに着目した。トレハロースを能動的に細胞内に輸送することにより、より抗凝集効果や、細胞増殖、生産等が改善されると考えた。そこで、細胞内にトレハロースを取り込むトランスポーターに着目した。抗体生産性チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株に、トランスポーターを導入した CHO-HcD6-Tret1 細胞株を構築し、これを用いて生産性、凝集体形成について検討した。

CHO-HcD6 細胞株の培養について、コントロールの比増殖速度は  $0.023(\text{h}^{-1})$  であった。一方トレハロース培地では比増殖速度は  $0.016(\text{h}^{-1})$  であり、最大生存細胞濃度、累積生細胞数も低下していた。構築した CHO-HcD6-Tret1 の培養においても同様に、コントロールと比較するとトレハロース培地では比増殖速度は  $0.0190(\text{h}^{-1})$  と低下した。しかし、最大生存細胞濃度、累積生細胞数は上昇しており、CHO-HcD6 のトレハロース培地での培養と比較すると増殖能は改善したと考えられた。抗体比生産速度については、コントロールの  $5.93(\text{pg}/\text{cell}/\text{day})$  に対して、トレハロース培養の HcD6、HcD6-Tret1 はそれぞれ  $8.71$ 、 $7.23(\text{pg}/\text{cell}/\text{day})$  であり、トレハロース培養による比抗体生産速度の増加が確認できた。

培養上清から精製した IgG1 抗体の凝集性をゲル濾過クロマトグラフィーで分析した結果、HcD6、HcD6-Tret1 のどちらの場合もトレハロース培地での培養では単量体、二量体、凝集体の総ピーク面積に対する二量体 + 凝集体のピーク面積の割合が減少しており、凝集抑制効果が確認された。

Table 1 単量体、二量体、凝集体の面積

面積	単量体	二量体	凝集体	合計
CHO-HcD6	17.7	2.62	0.805	21.1
CHO-HcD6 トレハロース培養	17.3	1.31	0.411	19.1
CHO-HcD6-TRET1	17.0	2.85	0.735	20.6
CHO-HcD6-TRET1 トレハロース培養	20.9	1.39	0.417	22.7

Table 2 総面積に対する単量体、二量体、凝集体の相対面積

相対面積(%)	単量体	二量体	凝集体
CHO-HcD6	83.7	12.3	3.80
CHO-HcD6 トレハロース培養	90.9	6.86	2.15
CHO-HcD6-TRET1	82.5	13.8	3.56
CHO-HcD6-TRET1 トレハロース培養	92.0	6.14	1.83

以上の結果より、ケミカルシャペロンとしてトレハロースを添加した培地を用い、セルエンジニアリング手法を組み合わせることで凝集抑制効果を維持し、高生産を実現できる可能性が示されたと考えられた。

## 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2件)

1. Masayoshi Onitsuka\*, Miki Tatsuzawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Akihiro Shirai, Hideaki

- Masada and **Takeshi Omasa** "Trehalose suppresses antibody aggregation during the culture of Chinese hamster ovary cells" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume **117**, Number 5, pp. 632-638 (2014). (日本生物工学会第 23 回論文賞受賞)
2. Masayoshi Onitsuka\* and **Takeshi 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).
- [学会発表](計 17 件)
1. **Takeshi Omasa**, Noriko Yamano and Masayoshi Onitsuka "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**)
  2. **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
  3. **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
  4. **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
  5. Ryonosuke Harata, Masayoshi Onitsuka, Takahiro Kikawada, Shizuyo Koide, Noriko Yamano, Yuichi Koga and **Takeshi Omasa** "Suppressed antibody aggregation and improved cell growth by exogenous expression of Tret1 in recombinant CHO cells" In; 29th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '16) P-9, abstract p.80, November 9-12, Kobe, Japan (2016).
  6. Masayoshi Onitsuka and **Takeshi Omasa** "Dynamical analysis of aggregate accumulation of IgG1 in recombinant CHO cell culture" In; 29th Annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '16) P-15, abstract p.85, November 9-12, Kobe, Japan (2016).
  7. Shizuyo Koide, Ryonosuke Harata, Masayoshi Onitsuka, Takahiro Kikawada, Noriko Yamano, Yuichi Koga and **Takeshi Omasa** "Bioreactor cultivation of recombinant CHO cells expressing trehalose" In: The 22nd Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC), No.PA-28, p.65, Miyazaki, Japan, Oct. 28-29, 2016
  8. 川村 菜美子, 鬼塚 正義, 小出 静代, 山野 範子, **大政 健史** "難発現性抗体生産プロセス構築を指向した抗体凝集性の解析と抑制の試み" 第 3 回日本生物工学会西日本支部講演会, C-5, 要旨集 27 頁 2016 年, 12/10, 徳島大学, 徳島.
  9. 原田 涼之介, 鬼塚 正義, 黄川田 隆洋, 小出 静代, 古賀 雄一, 山野 範子, **大政 健史** "Tret1 遺伝子導入による CHO 細胞の抗体凝集抑制と細胞増殖能の改善" 第 68 回日本生物工学会, 1P-2p163, 要旨集 131 頁 2016 年, 9/28-30, 富山国際会議場, 富山.
  10. 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 2G050, 2016 年 3/27-30, 札幌コンベンションセンター、札幌
  11. 齊田 実紗, **大政 健史** "乳酸菌の菌体外多糖類生産における培養工学的検討" 日本農芸化学会 2016 年度大会 3J009, 2016 年 3/27-30, 札幌コンベンションセンター、札幌
  12. 井川 翔太, 鬼塚正義, **大政 健史** "生産性向上を目指した CHO 細胞のメタボローム解析" 2015 年度日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会 (中四国支部第 43 回講演会、西日本支部第 312 回講演会), C-1, p.48, 2015 年 9/17-18, 愛媛大学、松山
  13. 浜垣 秀平, 鬼塚 正義, 角屋 行

紀、山野 範子、白井 昭博、**大政健史** “抗体医薬品の凝集抑制を目指したケミカルシャペロン添加細胞培養法の開発” 第 15 回日本蛋白質科学会年会 2P-090, 要旨集 p.109, 2015 年 6/24-26、あわぎんホール、徳島

14. 鬼塚 正義、野田 真広、浅野 竜太郎、熊谷 泉、山野 範子、白井 昭博、**大政健史** “CHO 細胞培養における非天然型抗体の凝集性解析” 第 15 回日本蛋白質科学会年会 2P-090, 要旨集 p.109, 2015 年 6/24-26、あわぎんホール、徳島
15. 岡 大貴, 鬼塚 正義, **大政健史** “大腸菌宿主を用いた IgG1 抗体生産を目指した分子シャペロン共発現の影響解析” 第 66 回日本生物工学会, 2P-203, 要旨集 157 頁, 2014 年、9/9-11、札幌コンベンションセンター、札幌.
16. 角屋 行紀, 鬼塚 正義, **大政健史** “CHO 細胞培養における抗体の凝集体形成過程の解析” 第 66 回日本生物工学会, 2P-197, 要旨集 156 頁, 2014 年、9/9-11、札幌コンベンションセンター、札幌.
17. **大政健史** “バイオ医薬品生産における最近の話題 プラットフォーム化を目指して ” 第 66 回日本生物工学会, 2S-Ea01, 要旨集 101 頁, 2014 年、9/9-11、札幌コンベンションセンター、札幌.

〔図書〕(計 1 件)

1. 鬼塚 正義、**大政健史** 「第 2 章 第 2 節 [7] 細胞培養過程における抗体凝集抑制-ケミカルシャペロン:トレハロースの影響-」 「最新 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術」76-79 頁 監修: 早川 堯夫・掛樋一晃・平林 淳、技術情報協会 (2014)

〔産業財産権〕  
特になし

〔その他〕  
ホームページ等  
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

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

鬼塚 正義 (ONITSUKA, Masayoshi)

黄川田 隆洋 (KIKAWADA, Takahiro)