

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

工業用動物細胞を用いた統合バイオプロセスに関する
基盤的研究

Integrated platform for mammalian cell-based
cell and bioprocess engineering

課題番号：17H06157

大政 健史（OMASA, TAKESHI）

大阪大学・大学院工学研究科・教授



研究の概要

抗体医薬に代表される糖蛋白医薬品生産においては生産宿主としてCHO細胞が利用されており、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。本基盤研究では工業用動物細胞としてのCHO細胞を対象に、ゲノム解析と細胞安定性、さらには細胞による蛋白質生産過程の解析とそのバイオプロセス応用を通じた統合プラットフォームの基盤を構築する。

研究分野：バイオ機能応用およびバイオプロセス工学関連

キーワード：バイオ生産プロセス、バイオ医薬品、動物細胞工学

1. 研究開始当初の背景

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、抗体医薬に代表される糖蛋白医薬品生産においては上市されている抗体医薬の6割以上の生産宿主として利用されており、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、酵母と遜色無いg数ドルを達成可能である。一方、これを達成しているCHO細胞自身の科学的解明については、未だ十分になされていない。

2. 研究の目的

本研究では、この生産基盤を支える工業用動物細胞に着目し、ゲノム育種基盤プラットフォームを用いたセルエンジニアリング手法の構築と、工業用動物細胞を用いた高度バイオプロセス構築の課題を組み合わせた工業用動物細胞を用いた統合バイオプロセスの基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

代表研究者および分担研究者と共に、大きく3つの課題に分けて行う。①ゲノム育種基盤プラットフォームを用いたセルエンジニアリング手法の構築（担当：大政、河原、西島）：染色体への特異的組込みと染色体安定性情報を組合せたゲノム改変技術の構築、②工業用動物細胞を用いた高度バイオプロセス構築：連続プロセスや長期流加培養を想定した細胞の品質制御／安定性の解明・解析を通じたバイオプロセスの構築（担当：大政、鬼塚）、③全員で、①および②を統合化し、工業用動物細胞を用いた統合バイオプロセス

の基盤を構築する。

4. これまでの成果

課題①では、BAC-FISHを用いて染色体物理地図を構築し再配列を解析した303個のBACクローンのエンド配列解析より、CHO細胞染色体EとPの広領域において、マウスX染色体と高い相同性がある配列が多く存在しているが、マウス染色体と相関関係がないことを明らかにした。さらにBAC-FISH解析より、クローンCg0180E19は比較的安定な染色体A-D以外の全ての染色体を認識し、クローンに含まれる繰返配列の染色体転座への関わりが推測された。CHO細胞の染色体異数性と遺伝子発現について解析し、染色体数の異なる細胞間で変動する遺伝子群を明らかにした。ターゲット領域の探索の結果、CHO細胞の導入遺伝子高発現部位には少なくとも2種のタイプがあることを明らかにした。課題②では、高密度バイオプロセスを想定した細胞による抗体分泌生産の細胞内律速過程解析の結果、一部の細胞株においてアセンブリの効率に問題があることが示され、タンパク質の折りたたみや組立てに重要な蛋白質を過剰発現させ、生産効率を上昇させた。さらに、長期培養を想定し、染色体異数性を人為的に誘導した結果、染色体数が異常な細胞の増殖能、生存能が低いことが変動の主な原因と考えられた。

5. 今後の計画

今後、CHO 細胞における統合バイオプロセスの基盤プラットフォーム構築を目指し、課題①及び②の結果を統合し、基盤技術を確立する。①で得られた高生産のためのターゲット領域とその安定性、と②長期間の細胞安定性・生産物品質の変化とは密接に関連している。既に課題②において、①の内容を一部統合化しているが、さらに得られた知見を総合化し、工業用動物細胞を用いた統合バイオプロセスの基盤を構築する。

6. これまでの発表論文等

1. A. Samy, K. Kaneyoshi, *T. Omasa "Improvement of intracellular traffic system by overexpression of KDEL receptor 1 in antibody - producing CHO cells" *Biotechnol. J.* 1900352 (9 pages) (2020) (in press)
2. *N. Yamano-Adachi, N. Ogata, S. Tanaka, M. Onitsuka, T. Omasa "Characterization of Chinese hamster ovary cells with disparate chromosome numbers: reduction of the amount of mRNA relative to total protein" *J. Biosci. Bioeng.*, **129**: 121-128 (2020)
3. T. Tukamoto, T. Sogo, T. Ueyama, S. Nakao, Y. Harada, D. Ihara, Y. Akagi, Y. S. Kida, K. Hasegawa, T. Nagamune, *M. Kawahara, *T. Kawamura "Chimeric G-CSF receptor-mediated STAT3 activation contributes to efficient induction of cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells." *Biotechnol. J.* **15**, 1900052 (8 pages) (2020)
4. *M. Onitsuka, Y. Kadoya, T. Omasa "Secretory leakage of IgG1 aggregates from recombinant Chinese hamster ovary cells" *J. Biosci. Bioeng.*, **127**: 752-757 (2019).
5. K. Kaneyoshi, K. Kuroda, K. Uchiyama, M. Onitsuka, N. Yamano-Adachi, Y. Koga, *T. Omasa "Secretion analysis of intracellular "difficult-to-express" immunoglobulin G (IgG) in Chinese hamster ovary (CHO) cells" *Cytotechnol.* **71**: 305-316 (2019)
6. K. Kaneyoshi, N. Yamano-Adachi, Y. Koga, K. Uchiyama, *T. Omasa "Analysis of the immunoglobulin G (IgG) secretion efficiency in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cells by using Citrine-fusion IgG". *Cytotechnol.*, **71**:1193-207 (2019)
7. K. Kaneyoshi, K. Uchiyama, M. Onitsuka, N. Yamano, Y. Koga, and *T. Omasa "Analysis of intracellular IgG secretion in Chinese hamster ovary cells to improve IgG production" *J. Biosci. Bioeng.*, **127**: 107-113 (2019)
8. A. Eguchi, M. Nakakido, S. Nagatoishi, D. Kuroda, K. Tsumoto, T. Nagamune, *M. Kawahara "An epitope-directed antibody affinity maturation system utilizing mammalian cell survival as readout" *Biotechnol. Bioeng.* **116**: 1742-1751 (2019)
9. T.D. Nguyen, T. Nagamune, *M. Kawahara "A suicide switch directly eliminates intracellular scFv oligomers in the cytoplasm of mammalian cells" *Biotechnol. J.* **14**, 1800350 (10 pages) (2019)
10. *河原正浩 "人工受容体発現細胞でがん治療？！細胞創製時代の幕開け" *生物工学会誌* **97**(5), 279 (2019)
11. 山野範子、大政健史 (分担執筆)「第1節 組換え体における品質・安全性評価 第3項 動物細胞(CHO細胞)」68-73頁、「バイオロジクスの開発と品質・安全性確保」監修:早川堯夫、エル・アイ・シー(2018)
12. 大政健史 (分担執筆)「第3章 抗体医薬品生産技術:現状と今後への期待」23-32頁、「バイオ医薬品の開発と市場2019」シーエムシー出版(2018)
13. *N. Yamano, T. Omasa "EGCG improves recombinant protein productivity in Chinese hamster ovary cell cultures via cell proliferation control" *Cytotechnol.*, **70**:1697-1706 (2018)
14. S. Kimura, *T. Omasa "Genome sequence comparison between Chinese hamster ovary (CHO) DG44 cells and mouse using end sequences of CHO BAC clones based on BAC-FISH results" *Cytotechnol.* **70**: 1399-1407 (2018).
15. *M. Onitsuka, Y. Kinoshita, A. Nishizawa, T. Tsutsui, T. Omasa "Enhanced IgG1 production by overexpression of nuclear factor kappa B inhibitor zeta (NFKBIZ) in Chinese hamster ovary cells" *Cytotechnol.*, **70**: 675-685 (2018)
16. *大政健史 "バイオ医薬品生産技術—現状と今後の課題" *PHARM TECH JAPAN*, **34**:1441-1445 (2018)
17. 山野範子、大政健史 "CHO細胞における組換えタンパク質生産性向上技術の開発" *PHARM STAGE* **17**: 26-30 (2017)

7. ホームページ等

https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2020/20200306_3

「小胞体保留シグナルに着目した組換えタンパク質生産を増強する新技術」

https://www.eng.osaka-u.ac.jp/ja/research/index_omas.html

「バイオ医薬品生産にむけたプロダクションサイエンス」研究紹介

<https://www.eng.osaka-u.ac.jp/ja/virtual/challenge18/index.html>

「動物細胞を使った抗体医薬品の生産技術開発を体験しよう！」大阪大学工学部 Web Open Campus (高校生向け)