

組換えタンパク質を生産するための優れた宿主細胞とは



研究ノート

山野-足立 範子*

What is a good host cell for producing recombinant proteins?

Key Words : Biologics, Recombinant protein production, Host cells, CHO cells, CHL-YN cells

はじめに

バイオ医薬品という言葉が日常会話でも聞くようになった。世界中で売られている医薬品の売上ランキングをみると、近年では、上位10品目の内、その半数以上をバイオ医薬品が占めている。現在では、COVID-19のワクチン及び治療薬開発の動向が注目されている。

バイオ医薬品の半数近くの品目は、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞というチャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) 卵巣由来の細胞を宿主細胞として用いて、現在生産されている。抗体医薬品に限ると、その割合は8割を超えている。CHO細胞は60年以上前に生体外で人工的に増やせるようになって利用されている細胞である。細胞についての知見が多くあることから、現在に至るまで使用され続けているが、課題もある。本稿では、CHO細胞の多様性及び新規宿主細胞樹立の試みについて紹介する。

なぜCHO細胞なのか

現状では、複雑な構造を持つバイオ医薬品を化学合成により生産することは難しい。CHO細胞がこれほどまでに広まった理由としては、糖鎖修飾などの翻訳後修飾が行われること、タンパク質の適正な折りたたみが可能であること、浮遊培養による大量

培養が可能であること、動物由来成分を含まない培養が可能であること、Good manufacturing practice (GMP: 医薬品の製造と品質管理についての国際基準) での生産実績があることなどが挙げられるだろう。

CHO細胞の染色体異数性と抗体生産

実は、CHO細胞の染色体は変化しやすく、培養を続けることで、自然に組換えや本数分布が生じる。大阪大学の政健史教授らが、CHO細胞のゲノムバクテリア人工染色体ライブラリーを作成し¹⁾、その配列断片の染色体上の位置を解析することによりその詳細が世界で初めて明らかになった²⁾。元々のチャイニーズハムスターの染色体は、1-10番染色体と性染色体の計22本であるが、CHO細胞の核型を調べると染色体数が30本以上に増加したものが数%存在した³⁾。そこで自然に生じた染色体数の異なるCHO細胞を単離取得し、それらを宿主細胞として抗体を発現させると、染色体数の多いサブクローンDG44-SC39を宿主細胞とした場合において、より高い生産性を得られる結果を得た³⁾。Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により抗体発現ベクターの導入箇所を確認すると、染色体数が増加した細胞において、複数箇所にベクターが挿入される確率が上がることが示された。よって染色体数の多い細胞では、外来遺伝子の挿入の機会が増加することにより、生産性が向上すると考えられた。一方で、挿入箇所の増加を伴わない細胞でも生産性が向上する知見も得られ、網羅的遺伝子発現解析の結果、高染色体数をもつDG44-SC39細胞において、生産するタンパク質量あたりに必要なmRNA量が少ないことが示唆された⁴⁾。



* Noriko YAMANO-ADACHI

1981年12月生まれ
大阪大学大学院 生命機能研究科 生命機能専攻博士課程修了 (2009年)
現在、大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻 助教 博士(理学)
TEL : 06-6879-4157
FAX : 06-6879-4157
E-mail : yamanori@bio.eng.osaka-u.ac.jp

染色体異数性的人為的誘発

次に、抗体高生産株同士の細胞融合を誘導させると、コントロールには見られない幅広い異数性が観察され、中でも染色体数が少ない細胞と多い細胞が混在した、多様な染色体数分布を保持したクローン由来の細胞集団において、特に高い抗体濃度と比生産速度を示した（その中には、導入遺伝子のコピー数が増加していないクローンも含まれた）⁵⁾。そこで、CHO 細胞において中心体を過剰に形成させることが報告されている 3-aminobenzamide (3-AB) を培地中に添加し、染色体異数性的人為的誘発を行った。その結果、染色体数が有意に増加した細胞は、独立した 2 回の実験において、いずれも 50% 前後の割合で取得できた。一方で、染色体数が有意に減少した細胞は単離されなかった。染色体数が有意に増加した複数のクローンについて、生産宿主細胞としての能力を評価したところ、やはり高染色体数をもつ CHO 細胞において、生産能力が高まる傾向にあった。中には、変異誘導前の CHO-K1 細胞を宿主細胞とした場合と比較して、65 倍もの抗体比生産速度 (IgG1 抗体) を出すクローンも存在し、IgG3 抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体においても一貫して高い比生産速度を示した。取得したこのクローンについては、引き続き詳細な解析を行っているところである。それらの解析を行うことで、何が宿主細胞としての有用性をもたらすのかの解決の糸口になることを期待している。

ゲノム多様性とクロナリティ

CHO 細胞の染色体不安定性 (ゲノム多様性) は種々の培養条件への適応性をもたらしていると考えられるが、生産物の均一性についても考える必要がある。均質な製品を保証するために、CHO 細胞のクロナリティの問題は製薬業界でホットな話題である。単一クローン由来であることが、ヘテロセルプールと比較して生成物の均一性に寄与しているかについては、議論が分かれている。言うまでもなく、生産の安定性は細胞株の構築において重要な課題である。70 世代に渡って生産性の 70% 以上を保持し、生成物の化学的同一性や生物活性等に臨床的に意味のある差がない条件下において、細胞は安定であると考えられる⁶⁾。なお、取得した高染色体数の細胞株については、ほとんどのケースで継代を続けても

その染色体数が保たれている。また、生産した抗体の糖鎖構造は、変異誘導前の CHO-K1 細胞を宿主細胞とした場合と同じであることを確認した。今後引き続き、CHO 細胞の染色体不安定性を積極的に利用した宿主細胞の開発を行っていければと考えている。

新規宿主細胞 CHL-YN 細胞の樹立

CHO 細胞は、大腸菌や酵母と比較すると増殖が遅く、拡大培養や生産細胞株の構築には多くの時間がかかる。そこで、より良い宿主細胞の開発を目指して、チャイニーズハムスターの肺組織から細胞を増殖させ、Chinese hamster lung (CHL)-YN 細胞を樹立した⁷⁾。チャイニーズハムスター由来の細胞は、HIV・インフルエンザ・ポリオ・ヘルペスおよび麻疹を含む 44 種のヒト病原性ウイルスが CHO 細胞で複製しないことが示されている⁸⁾ ため、ウイルス安全性において利点があると考えられる。CHL-YN 細胞は、CHO 細胞と同様に染色体不安定性をもち、自然に無限増殖能を得た。本細胞は、完全合成培地 (無血清培地) での浮遊培養が可能である (図 1)。また、マイコプラズマ否定試験、*In vitro* ウイルス試験、無菌試験、逆転写酵素活性試験の純度試験をクリアしている。細胞は理化学研究所のセルバンクに寄託しており [RCB5004]、国内外からの問い合わせを受けている。

この細胞の最大の特徴は、その増殖の速さである。平均的な哺乳動物細胞の倍加時間は約一日で、従来の CHO 細胞の倍加時間も 20 時間程度であるが、



図 1 CHO 及び CHL-YN 細胞の浮遊培養 (写真左はプラスチック培養、右はリアクター培養)

浮遊化した CHL-YN 細胞の倍加時間はその半分以下の 8.1 時間である。また、培養上清中の成分解析より、CHL-YN 細胞ではグルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸、アンモニウムイオン濃度の経時変化に、従来の CHO 細胞とは異なる特徴が観察された。培地・栄養源の追加を行わない回分培養において、浮遊化した CHL-YN 細胞では、添加していたグルタミンが消費された後も培養途中でグルタミン濃度が増加し、同時にグルタミン酸が消費される結果を得た。また浮遊化した CHL-YN 細胞において、グルタミン合成酵素（グルタミン酸とアンモニアの縮合によってグルタミンを合成する反応を触媒する）の遺伝子発現が増加していることが示された。つまり、CHL-YN 細胞ではグルタミン酸をグルタミンの代わりに利用できる可能性が提示された。熱に不安定なグルタミンを添加する必要がなくなれば、培地の安定性が上がり、培地調製や保存が簡便になる利点がある。またアンモニアは、アミノ酸の窒素の代謝産物として生産される有害物質である。グルタミンは細胞培養培地中で自然に分解され、副産物としてアンモニアを生じる。一方で、グルタミンの代わりにグルタミン酸を添加することで、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンが合成され、アンモニウムの解毒に貢献することが期待される。

おわりに

本稿では、組換えタンパク質を生産する宿主細胞の開発について、CHO 細胞のゲノム多様性や同じチャイニーズハムスターの他臓器由来の細胞に着目した研究について述べた。筆者は元々、同じゲノムを持っていても外部環境の違いによって細胞の性質が変化する分化やリプログラミングに興味を持ち、大学院での研究をスタートさせた。さらにゲノムの変化を容易に伴う CHO 細胞においては、そのバリエーションが無限である。実際に、バイオ医薬品の製造工程において、より良い生産細胞株を選抜するスクリーニングの過程には、多大な時間と労力を要している。我々はこれまで、自然に生じた異数性細胞の単離、積極的なゲノム改変、新規細胞の樹立を通して、ユニークな細胞株の樹立を行ってきた。樹立したこれらの細胞を材料にして、何が優れた宿主細胞をつくるのか、優れた宿主細胞をもたらす因子についての理解を深めたいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成 25 年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成 26 年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（JP17ae0101003, JP18ae0101054, JP19ae0101054, JP18ae0101066, JP19ae0101066, JP20ae0101066）」の支援によって行われた。また、JSPS 科研費（JP26249125, JP17H06157, JP18H05940, JP19K21105, JP21K04788）、日揮・実吉奨学会研究助成金の助成を受けた。

参考文献

- 1) Omasa T, Cao Y, Park JY, *et al.* Bacterial artificial chromosome library for genome-wide analysis of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009 Dec; 104(5):986-994.
- 2) Cao Y, Kimura S, Itoi T, *et al.* Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012 Jun; 109(6):1357-1367.
- 3) Yamano N, Takahashi M, Haghparast SMA, *et al.* Increased recombinant protein production owing to expanded opportunities for vector integration in high chromosome number Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 2016 Aug; 122(2):226-231.
- 4) Yamano-Adachi N, Ogata N, Tanaka S, *et al.* Characterization of Chinese hamster ovary cells with disparate chromosome numbers: Reduction of the amount of mRNA relative to total protein. *J. Biosci. Bioeng.*, 2020 Jan; 129(1):121-128.
- 5) Lai Y, Yamano N, Onitsuka M, *et al.* Increased antibody productivity in Chinese Hamster Ovary cells through induction of chromosomal instability by cell fusion. The 24th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT) 2015, *BMC Proceedings*,

- 2015 Dec; 9(Suppl 9):P11.
- 6) Dahodwala H, Lee KH. The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2019 Dec; 60:128-137.
- 7) Yamano-Adachi N, Arishima R, Puriwat S, *et al.* Establishment of fast-growing serum-free immortalised cells from Chinese hamster lung tissues for biopharmaceutical production. *Sci. Rep.*, 2020 Oct; 10(1):17612.
- 8) Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W, *et al.* Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.*, 2007; 103(10): 40-47.

