

2P-197 CHO 細胞培養における抗体の凝集体形成過程の解析

○角屋 行紀¹, 鬼塚 正義², 大政 健史²
 (¹徳島大院・先端技科, ²徳島大院・ソシオ)
 omasa@bio.tokushima-u.ac.jp

【背景と目的】抗体医薬品の製造工程において副作用の原因となる抗体の凝集体形成が報告されている。特に細胞培養中に生じる凝集体形成のメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究では Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いた抗体生産プロセスに着目し、凝集抑制を目的とした細胞培養中の凝集体形成過程の解明に取り組んだ。

【方法】IgG1 抗体を産生する CHO 細胞株の無血清浮遊培養を行った。培養上清をゲル濾過クロマトグラフィーで分析し、ゲル濾過データ行列を特異値分解解析することで凝集体成分を推測した。また培養上清から IgG1 抗体を回収し、CD スペクトルにより溶液構造を測定した。

【結果と考察】ゲル濾過データの特異値分解した結果、大きな特異値をもつ 2 成分が抽出され、一方は CHO 細胞由来の蛋白質成分、他方は細胞培養過程で形成された凝集体成分と推定された。CD スペクトル測定の結果、凝集体は単量体抗体と異なり非天然型ストランド構造を多く含むミスフォールド状態であった。更に凝集体と推定される成分の時間変化は細胞培養開始時から 7 日目までは増加し続け、細胞の生存率が低下し始める 8 日目以降に減少を示した。この結果から死細胞に由来する成分に可溶性の凝集体が吸着する事で凝集体成分が減少すると推測した。現在、培養開始時から増加する抗体の凝集体形成について解析している。

Dynamical analysis of antibody aggregation in CHO cell culture.

○Yukinori Kadoya¹, Masayoshi Onitsuka², Takeshi Omasa²
 (¹Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Univ. Tokushima, ²Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

Key words Antibody aggregation, Chinese hamster ovary (CHO) cell, Antibody production, Singular value decomposition (SVD) analysis

2P-199 完全合成培地条件下における Mammalian PowerExpress System™を利用した抗体高産生 CHO 株の迅速構築

○清水 正史, 片山 政彦, 瀧川 倅二, 渡邊 洋介, 四方 靖
 (エーザイ・筑波研)
 m5-shimizu@hhc.eisai.co.jp

【背景・目的】抗体医薬をはじめとしたバイオロジクスの生産用細胞株には目的タンパク質を高い発現量で、かつ長期継代を経ても安定して得られることが必要である。従来、この発現株の樹立は約 1 年の長期間を要し抗体医薬品開発のボトルネックとなっている。またコストダウンや BSE/TSE リスク低減等の観点から動物由来成分を一切含まない条件下で細胞構築を行うことが望まれる。本研究では、CHO 用発現ベクターである Mammalian PowerExpress System を用いて高い安全性かつ高産生能を有する CHO 株を短期間に構築することを目的とし検討を行った。

【方法・結果】抗体発現ベクターを、完全合成培地に馴化した増殖能の高い CHO-S 株へトランスフェクトし、96well50 プレート中で Puromycin および MTX による二重薬剤選択を行った。増殖してきた計 597 株について BIACORE A100 による迅速スクリーニングに供し発現量の高い 55 株を得た。さらに拡大培養過程で 8 株にまで絞り込み、shaker flask スケールで fed-batch 培養を実施した。その結果、0.8~1.8g/L の抗体産生量を持つ株をトランスフェクションから 3 ヶ月以内に樹立することができた。また、選抜した 2 株について 1L バイオリアクターでの fed-batch 培養を行っている。本検討で得られた株は未クローニング株である上、暫定的な培養法を用いていることから、今後セルクローニングや培養法の最適化により、さらなる抗体産生量の向上が可能と考えられる。

Rapidly construction of IgG high-yielding CHO cell line using the Mammalian PowerExpress System™ in a fully chemically defined and animal component-free process

○Masashi Shimizu, Masahiko Katayama, Teiji Takigawa, Yousuke Watanabe, Yasushi Shikata
 (Tsukuba Research Lab., Eisai Co., Ltd.)

Key words Chinese Hamster Ovary, Cell line development, antibody, Biopharmaceutical

2P-198 細胞表層 FIA 法を用いたヒト抗体高分泌 CHO 細胞株の 1 細胞育種

○木田 晶子, 良元 伸男, 黒田 俊一
 (名大院・生命農学)
 skuroda@agr.nagoya-u.ac.jp

バイオ医薬品の主要な生産株であるハイブリドーマや CHO 細胞等の高生産株の樹立において、従来は limiting dilution 法により 1 細胞化した後、コロニー形成させ、培養増殖後に生産量を ELISA 等により測定して選抜した (1 コロニー育種)。しかし、ハイスループット性に乏しく、同一コロニー内の各細胞間の異種性 (生産性のバラつき) を考慮しないことから、期待した程の生産量が増殖後に得られないことが多かった。従って理想的な高生産株樹立では、大量の細胞ライブラリーから高生産株を 1 細胞単位で迅速に多数選抜し、安定的な高発現細胞を無駄なく育種することが重要である (1 細胞育種) (良元と黒田 J Biosci Bioeng 2014)。既に我々は、タンパク質高分泌細胞を分泌量依存的に 1 細胞単位で蛍光標識可能な「細胞表層 FIA 法 (CS-FIA)」を開発した (木田ら Anal Chem 2013)。CS-FIA は、細胞表層に提示した抗体により分泌タンパク質を捕捉し、蛍光標識 2 次抗体でサンドイッチ検出することで、各細胞のタンパク質分泌量を非侵襲的に超高度でリアルタイム定量できる。本研究では CHO 細胞を含む様々な細胞種における分泌物質の定量を可能にするため、CS-FIA の最適化を行った。さらに、蛍光強度を指標として目的細胞を 1 細胞単位で解析・単離する全自動 1 細胞解析単離装置 (良元ら Sci Rep 2013) を用いて、ヒト抗体高分泌 CHO 細胞の 1 細胞育種を行ったので報告する。

Single-cell breeding of humanized antibody-producing CHO cells by cell surface-fluorescence immunosorbent assay

○Akiko Kida, Nobuo Yoshimoto, Kuroda Shun'ichi
 (Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words single-cell analysis, cell surface engineering, high-throughput screening, antibody

2P-200 *hprt* 遺伝子座を標的とした相同組換え CHO 細胞による安定な抗体生産

○成田 純也, 山名 良正, 近藤 雅子, 鈴木 恵介, 大竹 敦子
 (TOTO・総合研)
 junya.narita@jp.toto.com

【背景】CHO (Chinese hamster ovary) 細胞は医薬品タンパク質等の主要な生産細胞であり、抗体医薬品に関しては約 6 割が CHO 細胞で生産されている。医薬品タンパク質生産用の CHO 細胞に要求される性能としては、目的タンパク質の高生産性、選択薬剤非存在下での生産安定性、生産タンパク質の均一性等が挙げられる。加えて、前記性能を有する生産細胞を短期間で開発・樹立することが産業的競争力を高める上で重要であると考えられる。

TOTO (株) は、*hprt* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) 遺伝子座を標的とした相同組換えによる迅速組換え細胞作製技術を開発した。同技術を用いて作製した CHO 細胞は選択薬剤非存在下において、抗体を長期間安定的に発現可能であった。

【目的】生産安定性を維持しつつ、生産性の向上を図るため、抗体発現遺伝子の複数コピー化について検討する。

【結果】*hprt* 遺伝子座に抗体遺伝子を複数コピー導入した相同組換え株を取得した。抗体発現性を解析した結果、抗体生産性向上と発現安定性を確認した。

Stable antibody expression in CHO cells by using the homologous recombination on *hprt* locus

○Junya Narita, Yoshimasa Yamana, Masako Kondo, Keisuke Suzuki, Atsuko Otake
 (Res. Inst., TOTO Ltd.)

Key words CHO, homologous recombination, antibody, stable expression