

2P-253 高機能抗体発現系の開発

○増田 兼治^{1,6}, 奥村 武^{1,6}, 種村 裕幸^{1,6}, 川原 弘之^{1,6}, 野中 浩一^{1,6}, 佐藤 和明^{2,6}, 谷内 清人^{2,6}, 堀内 貴之^{3,6}, 窪田 みち^{3,6}, 後藤 希代子^{4,6}, 上野 智規^{4,6}, 佐伯 尚史^{3,6}, 敏田 雅之^{1,6}
⁽¹⁾第一三共・バイオ医薬研, ⁽²⁾第一三共・BOF, ⁽³⁾ちとせ研究所, ⁽⁴⁾ニッピ・バイオマトリックス研, ⁽⁵⁾JX日鉱日石エネルギー・ライフサイエンス部, ⁽⁶⁾次世代バイオ医薬品製造技術研究組合
 nonaka.koichi.k2@daichisankyo.co.jp

【背景と目的】 抗体医薬品は、CHO 細胞発現系により樹立された細胞基材を出発物質とした製造プロセスが確立されている。細胞基材は、宿主細胞および発現ベクターから構成されており、これまでに様々な技術開発が行われているが、これらの技術を使用するには知財に付随して様々な制約が存在する。そこで、これら複雑な権利関係を可能な限り回避した高生産・高効率な製造プロセスの構築を目指し、独自の宿主細胞の樹立および、発現ベクター、産生クローン選択・導入方法の開発を行っている。

【結果と考察】 新規宿主細胞の開発では、少なくとも4ヶ月間継代培養可能な上皮細胞の取得に至り、現在、不死化工程に移行している。一方で、CHO-K1 ATCC® CCL-61™ 由来の独自の CHO-O 株を宿主とした発現系の開発では、抗体発現ベクターによる形質転換後、SSC と FSC を指標に FACS で分画することで高生産株を効率良く濃縮できることを明らかにし、通常のスクリーニングの約4倍の生産性を示す高生産株を取得した。本生産株は、培地改良によって、2.7g/L の生産性を示した。今後、spERt 技術との技術統合を行う計画である。

Development of high-performance monoclonal antibody expression system

○Kenji Masuda^{1,6}, Takeshi Okumura^{1,6}, Hiroki Tanemura^{1,6}, Hiroyuki Kawahara^{1,6}, Koichi Nonaka^{1,6}, Kazuaki Sato^{2,6}, Kiyoto Yachi^{2,6}, Takayuki Horiuchi^{3,6}, Michi Kubota^{3,6}, Kiyoko Ogawa-Goto^{4,6}, Tomonori Ueno^{4,6}, Hisashi Saeki^{5,6}, Masayuki Yabuta^{1,6}
⁽¹⁾BTRL, DaiichiSankyo, ⁽²⁾BOF, DaiichiSankyo, ⁽³⁾Chitose Laboratory, ⁽⁴⁾Nippi Res. Inst. Biomatrix, Nippi, ⁽⁵⁾Life Sci. Dept., JX Nippon Oil & Energy, ⁽⁶⁾Manufacturing Technology Association for Biologics)

Key words CHO, monoclonal antibody, expression system

2P-254 CHO 安定遺伝子座への抗体遺伝子逐次導入による安定高生産株の構築

○山名 良正^{1,2}, 成田 純也², 近藤 雅子^{1,2}, 大竹 敦子^{1,2}, 鈴木 恵介^{1,2}, 河邊 佳典³, 上平 正道³
⁽¹⁾TOTO・総研,⁽²⁾MAB,⁽³⁾九大院・工)
 yoshimasa.yamana@jp.toto.com

【背景と目的】 抗体医薬品生産用 CHO 細胞株には、発現安定性と高生産性が要求される。一般的な細胞株構築手法は、ランダム挿入クローンの遺伝子増幅プールからのスクリーニングだが、安定高生産株の取得には手間と期間を要する。TOTO (株) は CHO の *hprt* 遺伝子座に発現ベクターを組み込むことで、安定発現株を確実に作製できることを見出している。一方、九州大学は Cre/変異 LoxP による逐次遺伝子導入システムを開発しており、ベクターを特定の遺伝子座に複数コピー組み込むことが可能となっている。本研究では二つの技術を融合し、*hprt* 遺伝子座に逐次導入によってベクターを複数コピー導入することで、安定かつ高生産な CHO を作製する技術開発を実施した。

【方法】 CHO の *hprt* 遺伝子座に、逐次導入の起点となる変異 LoxP 配列を相同組換えによって組込み、逐次導入の起点となる CHO AGIS クローンを作製した。ヒト化抗体重鎖、軽鎖発現カセットを搭載した逐次導入ベクターを作製し、上記クローンに Cre 発現プラスミドと共導入することで逐次導入クローンを取得した。

【結果と考察】 *hprt* 遺伝子座への抗体遺伝子逐次導入によって、コピー数と 관련된抗体遺伝子 mRNA の増加を確認した。また、抗体生産量もコピー数にほぼ比例して増加し、3 コピーの組込みによって 1g/L の生産性が得られた。また、選択薬剤非添加での 100PDL 以上の発現性安定性を確認した。

Generation of stable and high producer CHO cell lines of recombinant antibodies by transgene integration into *hprt* locus using an accumulative gene integration system

○Yoshimasa Yamana^{1,2}, Junya Narita², Masako Kondo^{1,2}, Atsuko Otake^{1,2}, Keisuke Suzuki^{1,2}, Yoshinori Kawabe³, Masamichi Kamihira³
⁽¹⁾Res. Inst., TOTO Ltd., ⁽²⁾MAB, ⁽³⁾Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words homologous recombination, accumulative gene integration, antibody, CHO

2P-255 MAC ベクターで発現を制御した *VAMP8* 及び *Snap23* による CHO 細胞の抗体生産能の改善

○田地野 浩司^{1,2}, 上田 佳奈^{1,2}, 多田 奈津子^{1,2}, 西村 真由美^{1,2}, 山内 清司^{1,2}, 久野 周一^{1,2}, 鳥澤 亜矢^{1,2}, 源治 尚久^{1,2}
⁽¹⁾chromocenter, ⁽²⁾MAB組合)
 tajino@chromocenter.com

VAMP8 と *Snap23* は細胞内輸送において輸送小胞と標的膜が融合するために必要な SNARE タンパク質のメンバーであり、タンパク質生産を改善することが知られている。しかし、導入箇所やコピー数を調節できない従来のベクターでは、適切な *VAMP8* や *Snap23* の発現量を再現できない。本研究では、宿主染色体とは独立に維持され、導入遺伝子のコピー数を一定に保持可能なマウス人工染色体(MAC)ベクターで *VAMP8* や *Snap23* を発現させ、CHO 細胞の抗体生産能への影響を検討した。

強さの異なる3種類のプロモーター(CMV, CAG, CAGG(CAG + rabbit beta-globin pA))に *VAMP8* 及び *Snap23* を連結し、MAC ベクターに搭載して、ヒト IgG1 生産 CHO 細胞へ移入した。構築した CHO 細胞株の抗体生産能を評価した結果、*VAMP8* では、CMV 株で親株と比べて総生産量が40%以上増加した株を取得できた。*Snap23* では、CAG 株で比生産速度が80%以上、CAGG 株で総生産量が100%以上増加した株を取得したが、全体的に生産能の改善が見られず、更なる検討の必要性が示唆された。

以上から、MAC ベクターでの細胞内輸送に関わる遺伝子の発現は、CHO 細胞での抗体生産の改善に有用であり、他の分泌関連の遺伝子へも応用が期待された。

Improved antibody production in CHO cells by *VAMP8* and *Snap23* expression control with MAC vector.

○Koji Tajino^{1,2}, Kana Ueda^{1,2}, Natsuko Tada^{1,2}, Mayumi Nishimura^{1,2}, Seiji Yamauchi^{1,2}, Shuichi Kuno^{1,2}, Aya Torisawa^{1,2}, Takahisa Genji^{1,2}
⁽¹⁾chromocenter Inc., ⁽²⁾MAB)

Key words Mouse artificial chromosome, *VAMP8*, *Snap23*, CHO

2P-256 MAC ベクターで発現を制御した *ATF4* による CHO 細胞の抗体生産能の改善

田地野 浩司^{1,2}, 上田 佳奈^{1,2}, 多田 奈津子^{1,2}, 西村 真由美^{1,2}, 久野 周一^{1,2}, 鳥澤 亜矢^{1,2}, 源治 尚久^{1,2}, 塚塚 正義^{2,3}, 大政 健史^{2,3,4}, 山内 清司^{1,2}
⁽¹⁾chromocenter, ⁽²⁾MAB組合, ⁽³⁾徳島大院・ソシオ, ⁽⁴⁾阪大院・工)
 tajino@chromocenter.com

小胞体ストレス応答因子の一つである *ATF4* の発現は、CHO 細胞での抗体生産能を改善することが知られている。しかし、*ATF4* はアポトーシス関連因子の発現も誘導するため、導入箇所やコピー数を調節できない従来のベクターでは、適切な *ATF4* の発現を再現できない。本研究では、宿主染色体とは独立に維持され、導入遺伝子のコピー数が一定に保持可能なマウス人工染色体(MAC)ベクターで *ATF4* を発現させ、抗体生産能への影響を検討した。

強さの異なる3種類のプロモーター(CMV, CAG, CAGG(CAG + rabbit beta-globin pA))に *ATF4* を連結し、MAC ベクターに搭載して、ヒト IgG1 生産 CHO 細胞へ移入した。構築した CHO 細胞の抗体生産能を評価した結果、CAG 株で比生産速度が70%以上増加した株を取得することができた。一方、最も高い *ATF4* の発現が想定された CAGG 株は、他の株と比べてその改善効果は低かった。本結果から MAC ベクターによる外因性遺伝子の発現制御は、CHO 細胞でのタンパク質生産を改善する上で有用であることが示唆された。

Improved antibody production in CHO cells by *ATF4* expression control with MAC vector.

Koji Tajino^{1,2}, Kana Ueda^{1,2}, Natsuko Tada^{1,2}, Mayumi Nishimura^{1,2}, Shuichi Kuno^{1,2}, Aya Torisawa^{1,2}, Takahisa Genji^{1,2}, Masayoshi Onitsuka^{2,3}, Takeshi Omasa^{2,3,4}, Seiji Yamauchi^{1,2}
⁽¹⁾chromocenter Inc., ⁽²⁾MAB, ⁽³⁾Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., ⁽⁴⁾Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Mouse artificial chromosome, *ATF4*, Antibody production, CHO