

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(バイオ医薬品の高度製造技術の開発)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) CHO 細胞をデザインする: 合理的・迅速・ロバストなセルエンジニアリング・プラットフォームに基づいた、向上型バイオプロセスのための細胞開発
(英語) Designing CHO cells: A rational, rapid and robust cell engineering platform for enhanced bioprocessing capabilities

研究開発実施期間: 平成30年5月21日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 鬼塚 正義
(英語) Masayoshi Onitsuka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合・事業部・主任研究員
国立大学法人徳島大学・社会産業理工学研究部・助教

(英語) Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB)・Headquarter・Senior scientist
Tokushima University・Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences・Assistant professor

II 研究開発の概要

本研究開発ではセルエンジニアリング・プラットフォームを駆使し、細胞の性能を向上させる遺伝子(高機能化因子、Production enhancer genes: PEGs)の発掘・同定・搭載を合理的に進めてきた。本プラットフォームでは①de novo 発現ネットワーク解析にもとづいた、エンジニアリング対象候補遺伝子の合理的な選定 ②遺伝子迅速評価システムにもとづく合理的・迅速な遺伝子評価 ③人工染色体へPEG搭載と移植による合理的・ロバストなセルエンジニアリング の3点の要素技術で構成されている。研究開発は緒方 法親博士(MAB組合、日本バイオデータ)、田地野 浩司博士(株式会社 chromocenter)と協力して進め、組換えタンパク質生産性向上に寄与するPEGを同定し、人工染色体に搭載することで、連続培養(灌流培養)に適したIgG抗体生産CHO細胞の改変法の開発を進めた。具体的な研究開発のトピックスと成果を3点にわたり報告する。

①高機能化因子(PEG)の同定

IgG1 抗体生産細胞のトランスクリプトームデータより 27 種類、メタボロームデータに基づいた検討より 3 種類、合計 30 種類の候補因子を選定した。ここで候補因子とは、CHO 細胞に導入することで抗体生産量や抗体品質が向上する有用遺伝子の「候補」を指す。特にトランスクリプトームデータについて、遺伝子が互いに調整し合ってネットワークを構築しているという仮定のもと、遺伝子間の共発現相関解析をすることで遺伝子発現ネットワークを推定する de novo 発現ネットワーク解析を実施した。本解析では抗体生産に重要な遺伝子を支配する遺伝子や、遺伝子操作の対象として有望である遺伝子を間接的に操作している遺伝子を見つけることができる。このような遺伝子は、既存の遺伝子オントロジーや細胞内パスウェイに基づいた解析では見つけることができないものであり、特に抗体生産 CHO 細胞のように人工的に遺伝子を組み込んだ細胞では新しいネットワークが組み上がっていることが多く、候補因子の選定に有用である。

次に選定因子の発現遺伝子を調製し、遺伝子迅速評価システムを用いて候補遺伝子の評価を行った。本システムでは抗体生産 CHO 細胞にエピソーマル発現システムを導入している。具体的には EBNA1 発現遺伝子を CHO 細胞のゲノムに組み込み、評価遺伝子発現用のプラスミドには oriP 配列を導入することで、細胞増殖に伴いプラスミドが細胞内で複製する。このエピソーマル発現システムは従来の安定発現と一過性発現の利点を併せ持つシステムであり、構築した遺伝子迅速評価システムを使用することで、遺伝子導入から 10 日程度で高機能化因子を同定することが可能である。候補因子の評価の結果、IgG1 抗体生産性を向上させる新規遺伝子を 4 種類同定した (TC-19, TC-20, TC-23, TC-24)。さらに同定した 4 種類に対し、同定・評価を終えた PEG2 との共発現実験を行った。遺伝子迅速評価システムを用いた PEG2 と TC-20 の共発現において、IgG1 抗体生産量が加算的に 180%に増加したことから、TC-20 を人工染色体に導入する新規高機能化因子 PEG3 として同定した。さらに灌流培養プロセスにおける抗体品質の改善因子の探索を行い、IgG1 抗体の品質改善因子を同定した。連続培養の上清中に品質変動因子タンパク質の活性を確認し、遺伝子迅速評価システムにより対象タンパク質の発現抑制試験を実施した。結果、2 種類の品質改善因子配列を新規高機能化因子 PEG4 として同定することに成功した。

②高機能化因子の部位特異的導入と生産培養評価

高機能化因子 PEG2 を、人工染色体ベクターを搭載した CHO 細胞へ部位特異的に導入した。人工染色体ベクターとは、染色体あるいは染色体を構成するパーツをもとに構築されたミニ染色体であり、既存のベクターでは実現できない、きわめて有用な特徴を有している。すなわち、①細胞内で宿主染色体に組み込まれることなく、独立して複製され、長期間安定に保持される ②発現消失 (サイレンシング) が起きにくい ③部位特異的組換えを使用するため、遺伝子挿入位置による発現の影響が置きにくく、搭載される遺伝子コピー数も一定であり、発現量のばらつきが少ない ④搭載できる遺伝子サイズに制限がない などである。これらの特徴から、組換えタンパク質の発現安定性や恒常性が最重要視される CHO 細胞の育種においては人工染色体ベクターを利用したセルエンジニアリングが適しているといえる。PEG2 は細胞内代謝プロセスに関連する遺伝子である。CHO 細胞由来の PEG2 発現遺伝子を調製し、リコンビナーゼ発現遺伝子と共に CHO 細胞へ遺伝子導入し、人工染色体上への部位特異的組換え反応を行った。部位特異的組換え反応の成否をゲノム PCR、タンパク質発現解析、染色体核型解析により確認した。

人工染色体上に PEG2 が導入された CHO 細胞を用いて、培養評価実験を行った。バイオリアクターを用いたフェドバッチ培養 (16 日間の培養) では、PEG2 搭載前の細胞 (親細胞) と比較して、PEG2 搭載細胞では IgG1 抗体生産量が 175%へと大幅な増加を示した。さらに細胞生存率も親細胞の約 70%に対し、PEG2 搭載細胞では 90%程度であった。PEG2 の導入による細胞内代謝状態の向上により抗体生産量と細胞生存率の大幅な向上が達成できたと考えられる。次に連続培養を模倣した小スケールでのリピーバッチ培養を実施し、使用培地量を低減した際の抗体生産量への影響を検証した。培養は 50-mL チューブで実施し、培地交換量は培養液全量を交換する 1vvd (vessel volume per day) と 30%低減させた 0.7vvd の 2 条件で検討した。培地消費量当たりの IgG1 生産性を比較すると、0.7vvd では IgG1 生産性が増加しており、その結果 0.7vvd においても 1vvd の IgG1 総生産量が維持さ

れ、PEG2 を導入していない親細胞では 0.7vvd にすると IgG1 比生産速度が低下し、同時に IgG1 総生産量も減少した。従って PEG2 導入細胞では、少ない培地消費量においても IgG1 総生産量が低減しない効果が達成された。これは多大な培地使用量が必要となる連続培養において、コスト削減に非常に重要な特性であると考えている。最後に PEG2 搭載 CHO 細胞の灌流培養試験を行った。MAB 内の研究開発協力体制に基づき、試作灌流培養システム（エイブルーバイオット社開発）の評価を兼ねた連続培養を実施した。当初計画では培地消費量 0.8vvd での培養を目標としていたが、先述の小スケール培養での成功（0.7vvd）を受けて、実際の培養実験ではより培地消費量が少ない 0.5vvd に設定した。40 日間の培養において定常状態の生細胞密度は 1×10^8 cells/mL に達し、1 細胞当たりの培地消費量は 4.3 ± 0.9 pL/cell/day と見積もられた。海外競合グループの報告値 (>15 pL/cell/day) と比較して、本研究で見積もった培地消費量は先駆的な達成値であると考えている。即ち高機能化因子 PEG2 の導入により、少ない培地消費量で高密度細胞培養を実現する低コスト細胞培養を達成した。

③高機能化因子の累積的導入と人工染色体ベクターの移植

PEG2 搭載 CHO 細胞に対して、高機能化因子 PEG3 を人工染色体に累積的に導入した。当初は良好な成果が得られなかったが、導入システムのチェックを行い、改善を加えることで部位特異的導入に成功した。研究成果有体物として PEG2-PEG3 搭載人工染色体（CHO 細胞）を樹立し、人工染色体上へ高機能化因子を累積的に導入することに成功した。この成果は一般的なセルエンジニアリング技術である 1 遺伝子導入による細胞改変と比較して、従来技術の限界を大きく打ち破る成果である。今後も累積的な高機能化因子 PEG の導入を続けることで、汎用性の高いステップアップ型の細胞改変、育種技術が確立できるであろう。

さらに高機能化因子 PEG を利用したセルエンジニアリング技術の汎用性を検証すること、同時に実用化を目指した PEG 搭載人工染色体の供給体制の整備を行うために、人工染色体の細胞間移植を実施した。他細胞への人工染色体ベクターの移植を実施した。人工染色体ベクターの特筆すべき特徴として、高機能化因子を一度搭載すれば、同じ発現コンストラクトを異なる細胞に移入することができる。すなわち「人工染色体ベクターの移植」により、搭載した遺伝子の高機能な特性を他の CHO 細胞（抗体生産 CHO 細胞や宿主 CHO 細胞）に一度で移すことができる。したがって、人工染色体ベクターを用いた高機能化因子の搭載と移植は、適用性や拡張性を考えた場合「合理的」なセルエンジニアリング手法であるといえる。PEG 搭載人工染色体を有する CHO 細胞株を染色体提供細胞（ドナー細胞）とし、微小核融合法により IgG1 抗体生産 CHO-MK 細胞（MAB 組合）に導入することに成功した。浮遊細胞間の人工染色体移植における実験成功例と失敗例を全て手順書としてまとめ、実用化を想定したプロトコルを開発した。これらの文書化により、実用化・社会実装に向けた人工染色体供給体制の整備を完了した。

先述の通り本課題では ①高機能化因子（PEG）の同定 ②高機能化因子の部位特異的導入と生産培養評価 ③高機能化因子の累積的導入と人工染色体ベクターの移植 の 3 点にわたり研究開発を行った。成果として、各種高機能化因子 PEG の配列情報、PEG 搭載 CHO 細胞（研究成果有体物）、人工染色体ベクター移植の手順書などが得られた。本課題で利用した各要素技術を含め、高機能化因子 PEG と人工染色体を用いたセルエンジニアリング手法は世界で類を見ない新技術であると自負している。PEG2 導入により細胞性能が飛躍的に向上したこと、人工染色体上に PEG を部位特異的に繰り返し導入できたこと、人工染色体をそのまま他の細胞に移入できる点は、一般的なセルエンジニアリング技術である 1 遺伝子導入による細胞改変と比較した場合、圧倒的な優位性を備えている。本課題の開発成果は、様々なバイオ医薬品生産へ拡張、展開することが出来ると考えており、今後はバイオ医薬品の品質特性に着目した高機能化因子 PEG の同定をはじめとしたステップアップ型の細胞開発と育種、抗体以外のモダリティであるウイルス様粒子（VLP: virus-like particle）や遺伝子治療用ウイルスベクター生産における宿主動物細胞株へ拡張、展開することが出来る。最後に以上の課題終了後の展開に関して、さらなる研究の推進と実用化を目指し「バイオ医薬品を本当に必要とされる方の笑顔のために」という点にこだわり引き続き努力して参りたい。

英文概要 (Summary)

The project's research objective was to develop the Chinese hamster ovary (CHO) cell line carrying the Production enhancer genes (PEGs) for continuous (perfusion) cell culture. In the project, the principal investigator collaborated with Dr. Norichika Ogata (MAB/ Nihon BioData Corporation) and Koji Tajino (chromocenter Inc.). The achievement in research and development will contribute to rational cell design and engineering for biologics production. The topics and results are summarized as follows.

1) Identification of PEGs.

We selected 30 candidate genes based on the transcriptome and metabolome analysis of the CHO cell line producing IgG1 antibody. We had developed a system for the rapid identification of PEGs based on episomal expression and plasmid replication. This method makes it possible to evaluate PEGs rapidly, within ten days. We assessed the candidate genes using the rapid identification system. As a result, we identified three genes, PEG2, 3, and 4. Co-expression of PEG2 and PEG3 in CHO cells increased IgG1 production level to 180%. PEG4 made it possible to improve the product quality of antibody, which is problematic in long-term cell culture such as perfusion culture.

2) Targeted integration of PEG and cell culture experiments.

We had established a CHO cell line carrying an artificial chromosome vector. The vector harbors site-directed recombination sequence, making it possible to conduct a targeted integration of identified PEGs by recombinase-mediated cassette exchange. PEG2 was successfully integrated into the vector, resulting in a CHO cell line carrying PEG2. Compared to the control cell line, fed-batch culture in bioreactor showed that PEG2 integrated cells increased IgG1 production to 175%. In shaking tube-based scale-down model for perfusion culture, PEG2 integrated cells maintained the volumetric IgG1 production in lower media exchange rate 0.7 vvd (vessel volume per day), compared to 1.0 vvd culture. The results indicate that PEG2 is favorable for perfusion culture by reducing media consumption. Finally, we evaluated the PEG2 integrated cells in 2-L bioreactor-based perfusion culture. The perfusion system was the trial model developed in ABLE-Biott Corporation. The perfusion culture was continued for 40 days and reached a maximum viable cell density of 1×10^8 cells/mL. Media exchange rate (perfusion rate) was set up to 0.5 vvd, resulting in cell-specific perfusion rate (CSPR) of 4.3 ± 0.9 pL/cell/day. As far as we know, the obtained CSPR was much lower than that of other reports. PEG2 integrated cells realized high-density cell culture in the lower media consumption, and PEG2 will contribute to cost reduction in continuous (perfusion) cell culture.

3) Cumulative integration of PEGs and transplantation of artificial chromosome vector.

We integrated the PEG3 into the artificial chromosome in PEG2 CHO cells; that is, we succeeded in the cumulative integration of PEGs in the artificial chromosome vector. Finally, we developed the protocol for the transplantation of artificial chromosome vector from PEG integrated cells (ATCC derived CHO cells) into CHO-MK cells originally developed in MAB, based on microcell-mediated chromosome transfer methods.