

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) 増殖-分化制御システムを取り入れた CHK 細胞を用いたバイオ医薬品生産細胞の構築  
(英語) Construction of biopharmaceutical producer cells using CHK cells by incorporating a proliferation-differentiation control system

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) 河邊 佳典  
(英語) Yoshinori Kawabe

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/国立大学法人九州大学・大学院工学研究  
院・准教授

(英語) Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB)・Headquarter・Senior scientist /  
Kyushu University, Faculty of Engineering, Associate Professor

## II 研究開発の概要

我々はこれまでに、チャイニーズハムスター腎臓の初代培養から不死化細胞 (CHK-Q 細胞) を樹立し、旺盛な増殖能を保持させたまま無血清馴化・浮遊馴化させることに成功した。細胞増殖と生産では、増殖期には生産を抑えて速やかに高細胞密度に到達させ、その後、機能分化を誘導することで生産モードにシフトさせて目的産物を大量に生産することができれば、長期的な高効率・高安定な生産が期待できる。CHK 細胞は腎幹細胞マーカー (CD24+/CD133+) の発現が認められている。そこで、CHK 細胞は腎幹細胞が形質転換したもので、培養条件を制御することにより、増殖性と機能分化を任意のタイミングで切り換えることが可能な細胞株であると考えた。本研究では、我々が独自に樹立したオリジナル細胞株である CHK 細胞をベースとして、遺伝子工学的手法による細胞改変で、増殖と生産を任意のタイミングで制御可能なバイオ医薬品生産宿主細胞株の創製を目的とした。旺盛な増殖能を有する CHK 細胞の細胞形質を生産モードに特化した状態に分化誘導できる条件を見出すとともに、その条件に合わせた目的生産物の大量発現システムを開発する。これにより、増殖モードと生産モードの切り換えが可能な細胞を作製し、産業応用に資する生産システムの構築を目指した。

はじめに、CHK 細胞に対して短期間で簡便かつ効率的に増殖・機能化性を制御する条件を探索した。一般的に分化誘導試薬としてよく用いられている低分子化合物等を候補として、機能化誘導に適した培養環境条件を調査した。その結果、毒性なく細胞形態の変化とともに増殖性を抑制させる低分子化合物を複数見出した。これらの低分子化合物は、血清含有培地で培養した CHK 細胞だけでなく、無血清・浮遊馴化させた CHK 細胞に対しても同程度の濃度範囲で有効であることがわかった。低分子化合物での増殖-生産制御において、細胞への毒性だけでなく医薬品タンパク質生産物への影響も最小限にしなければならない。そこで、見出した低分子化合物の中のうち、特定のものに絞り、遺伝子発現制御機構の特性を活かした、機能分化誘導による増殖性の制御と生産モードへの切り換えを一体化した遺伝子発現システムを構築した。独自のプロモーターおよび目的遺伝子発現誘導のための人工遺伝子回路を設計し、人工遺伝子発現システムを開発した。これに必要な遺伝子発現ユニットの構成要素を CHK 細胞ゲノムへ遺伝子組み込みし、低分子化合物添加に伴う細胞増殖の抑制と、迅速な目的遺伝子発現可能な細胞をスクリーニングした。期待される応答細胞を簡便にスクリーニングするため、目的遺伝子として、緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を用いた。その結果、低分子化合物添加 2 日間で約 9 割、4 日間でほぼすべての細胞でレポーター遺伝子の発現誘導が可能細胞株を選抜することができた。このことから、迅速な応答性を示す細胞として作製できたことがわかった。次に、この細胞をベースにモデル抗体 (scFv-Fc) をコードする遺伝子発現ユニットを組み込んだ。予備的検討で、高い抗生物質濃度で選抜した場合、抗体生産を増強できることがわかった。そこで、高濃度の抗生物質でスクリーニング後、抗体遺伝子を有した CHK 細胞を作製し、抗体生産を評価した。はじめから低分子化合物の添加有り無しの条件を行ったところ、抗体遺伝子導入 CHK 細胞においても、低分子化合物添加依存的に機能分化誘導による細胞の増殖抑制が観察されるとともに、抗体の生産が認められた。細胞数と培養上清中の抗体生産濃度から比生産速度を算出したところ、100 pg/(cell·day) 以上の生産性を達成することができた。また、増殖をコンフルエント近くまで行い、そこから低分子化合物を添加するという、増殖と生産モードを切り換えた場合の実験を行った。その結果、低分子化合物を添加することで機能分化が誘導され、細胞の増殖が抑制された。抗体生産に関して、添加翌日に培養上清を解析したところ、生産が認められ、その後安定して生産されることがわかった。比生産速度を算出したところ、100 pcd 以上の生産性を示すことができた。細胞播種数をあげたときでは、はじめから低分子化合物を添加した場合において、さらに高い生産濃度および生産性が確認された。本抗体は、Fc 領域で二量化して細胞外へ分泌される。そこで、ウエスタンブロット法を用いて還元・非還元条件でタンパク質を調製し、解析したところ、いずれの条件においても期待される分子量でバンドを検出することができた。このことから、適切なアッセムブリーを経たインタクトなタンパク質構造で培養上清中に分泌されていることが確認された。また、上清中よりモデル抗体分子を精製し、CHK 細胞で生産させた抗体分子における N 結合型糖鎖プロファイル解析したところ、従来の CHO 細胞由来 IgG への糖鎖付加と比べて大きな問題は確認されなかった。培養で使用する培地は糖鎖プロファイルに影響を与えることが知られているため、糖鎖制御工学的なアプローチと併用することで、より活性の高い抗体分子の生産できると考えられる。CHK 細胞において低分子化合物に合わせた人工遺伝子発現系を構築し、高い生産性を達成可能な技術を開発できたと考えられる。

一方で、本事業を通じて CHK 細胞に関する以下の基礎的特性を明らかにした。CHK 細胞は、初代細胞までもどり、無限増殖化から工業用目的で育種を施すことを試みた細胞である。そのため、培養の取り扱い時の使用原材料の起源や履歴管理、マイコプラズマ試験結果等がすべて明らかにすることができる。そこで、不活化プロセスの各ポイントにおいてマイクロアレイ解析を行った。その結果、不活化プロセスに影響を与えている遺伝子群を抽出することができた。また、CHK 細胞の不活化前初代細胞、不活化後、無血清培地で馴化したのちの細胞における核型を調査したところ、特定の染色体は再編成を受けにくく、ゲノム操作技術を用いた遺伝子導入の有力な候補になりうる可能性が示唆された。培養基材や薬剤添加を用いた生物機能材料工学的アプローチは、腎幹細胞マーカーを発現し、増殖・分化能を有する CHK 細胞の特性を解明する手段に

なりうる。生体内の環境を模倣した三次元培養法、機能発現を向上させる多数の報告がある。検討した三次元培養法において、三次元的な腎様組織形態を示すとともに腎関連遺伝子の高発現が認められた。このことから、CHK 細胞は分化誘導しうる細胞であることが示唆された。さらに、CHK 細胞の高機能化誘導のアプローチのひとつとして、既知の転写因子を薬剤誘導発現型で遺伝子発現させ、タンパク質合成がさかんな細胞に人工的に改変することで、増殖と機能化誘導が可能か検証した。薬剤誘導型既知転写因子発現ユニットおよび抗体発現ユニットを CHK 細胞ゲノムに遺伝子組み込みし、抗体生産を検証したところ、薬剤誘導依存的に細胞増殖を抑制させるとともにモデル抗体を 100 pcd 近くの生産性で生産させることができた。これらのことから CHK 細胞の特性を不死化プロセス、染色体核型ならびに分化誘導の観点から調査し、細胞の質的变化や CHK 細胞そのものの効率的な分化（機能化）誘導法を明らかにするとともに、CHK 細胞の分子生物学的な基礎的解析を行い、製造ホスト細胞として適した細胞改変を行う知見を得た。

国産オリジナルな CHK 細胞を用いて、細胞の増殖と機能性の切り換えによるバイオ医薬品の高効率生産技術を開発することができた。低分子化合物の添加で細胞増殖と機能分化を切り換えることができ、かつ高い生産性が達成できたことは、バイオ製造の新技术に資するものであるとともに、比生産速度の値が一般的に抗体製造として良好とされる比生産速度の値 (30 pcd 程度) よりも高い値を示したことは優位性が高いと考えられる。概念証明のため、モデル抗体を用いたが、原理的にはどのような組換えタンパク質生産でも可能である。低分子化合物をスイッチとした人工遺伝子発現システムに適した全抗体発現ユニットを CHK 細胞ゲノムに導入し、全抗体生産を評価したところ、低分子化合物添加依存的に全抗体を培養上清中に検出できており、発現ユニットを最適化することでさらに高い全抗体生産が達成可能であると考えられる。増殖-生産切り換えを用いた抗体生産 CHK 細胞に適した無血清培地の開発や糖鎖制御工学的アプローチの導入で、より活性の高い抗体分子創出への応用もできることから、この研究はバイオ医薬品製造のための細胞工学技術をより発展させることが期待できる。

本研究開発は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合（九州大学分室）内で行われ、一部の検討項目事項は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合内の関連する集中研と連携させた。また、研究分担者として九州大学の白木川博士、堺博士、八木博士に参画していただき、遂行した。関係者の皆様に厚く御礼申し上げたい。

We have established spontaneously immortalized cells derived from kidney tissues of the Chinese hamster, designated as CHK-Q cells for biopharmaceutical manufacturing. Adaptation of CHK cells to serum-free conditions could be also accomplished. In a preliminary test, it was confirmed that CHK cells expressed renal stem cell markers, suggesting that the CHK cells derived from kidney stem cells had the potential to be induced towards functional differentiated cells in differentiation medium. Using this feature, given that production can be suppressed during the growth phase to quickly reach pre-determined cell density and the mode can be shifted to production phase with growth arrest, target gene expression will be promoted. In this study, the objective of this research was to create a biopharmaceutical protein production system using CHK cells established from a primary cell culture of CHK tissues. We performed the development of a recombinant protein production system with high and stable productivity. The concept of switching between cell growth and functional differentiation was applied to establish biopharmaceutical producer cells. First, we established an effective differentiation procedure for CHK cells using small-molecule compounds. By focusing on a small molecule, we constructed an artificial gene expression system that simultaneously enables the induction of functional differentiation and the production of target proteins. The expression units necessary for artificial gene expression system were integrated into CHK cell genome. To

easily screen the expected responsive cells, green fluorescent protein (GFP) gene was used as the target gene. It was possible to establish CHK cell lines that allowed rapid induction expression of reporter gene in almost all cells in the presence of small-molecule compounds. Next, recombinant CHK responder cells harboring scFv-Fc antibody expression units were generated. The cell growth was suppressed by addition of small molecule and antibody production was observed in a dependent manner with small molecule. scFv-Fc productivity reached to over 100 pg/(cell·day). When a small molecular was added into the medium at a near confluent state, cell proliferation was suppressed and the specific production rate of scFv-Fc of 100 pcd or more was exhibited. We analyzed the characterization of antibody protein produced by CHK cells by using western blotting and mass spectrometry for glycosylation pattern. These results indicate that recombinant antibody production was enhanced by applying the concept of switching between cell growth phase and production phase of recombinant CHK cells. We also investigated the characteristics of CHK cells in terms of qualitative changes of immortalization process and chromosomal karyotype and efficient induction methods of differentiation. These results will be useful for the findings of cell modification suitable as a production host cell. In conclusion, we could develop a highly efficient production technology for biopharmaceutical production by switching between cell growth and functionality of CHK cells. A model antibody was used to prove the concept, but in principle any recombinant protein production will be applicable. This study will contribute to advancement of cell engineering technology for biopharmaceutical manufacturing.