

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) バイオ医薬品生産の新たな道を切り開くための新規チャイニーズハムスター肺由来
CHL-YN 細胞株の開発
(英語) Development of newly obtained Chinese hamster lung (CHL)-YN cell lines to
open new avenues for biopharmaceutical production

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) 山野 範子
(英語) Noriko Yamano

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
国立大学法人大阪大学・大学院工学研究科・助教
(英語) Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB)・Headquarter・Senior Scientist
Osaka University・Graduate School of Engineering・Assistant Professor

II 研究開発の概要

本研究開発を通じて得た成果を以下に記す。本課題で開発を行ったオリジナル宿主細胞 (CHL-YN細胞) は、理化学研究所バイオリソース研究センターの細胞材料開発室—セルバンク—に登録を完了した (RCB5004)。登録後、すぐに連絡があり、既に二つの企業にライセンスアウトをしている。さらに、海外企業も含む他の問い合わせも受けている。得られた成果の一部は、細胞をライセンスアウトした企業に提供しており、社会的ニーズに対応するものであると考える。また、新技術の創出、また医療分野の進展に資するものであると考える。

① CHL-YN細胞の生産プロセスの構築

初めに、従来用いられているCHO細胞との比較のためにCHL-YN細胞の遺伝子発現解析を行った。CHO細胞が上皮細胞様の形態を示すのに対して、CHL-YN細胞は元々線維芽細胞の形態を示していたが、CHO細胞で使用されている無血清培地に馴化培養を行うことにより、線維芽細胞としての特徴の一つ (接着に関する遺伝子発現) が確認できないレベルにまで低下した。また、CHL-YN細胞を無血清培地に馴化することにより、CHO細胞と比較して約2倍の増殖速度を獲得した。細胞全体の遺伝子発現プロファイルを比較した結果、まず血清の有無を含む培地の違いの影響は、細胞の増殖フェーズの違いよりも大きく、培地の違いによって細胞の特徴が変化することが明らか

となった。さらにCHL-YN細胞とCHO細胞の細胞間の違いは、培地の違いの影響よりも大きく、CHL-YN細胞とCHO細胞は特徴の異なる細胞であることが示された。また、RPKM (Reads per kilobase of exon per million mapped reads) 正規化を行った後の各細胞の遺伝子発現ランキングの結果から、CHO細胞で高発現プロモーターとして良く用いられるEF1- α プロモーターをCHL-YN細胞でも用いることができることが示唆された。

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、CHO-K1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、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、網羅的遺伝子発現解析より、CHL-YN細胞における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）の発現が示唆された。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。現在、CHL-YN細胞において、グルタミン酸がグルタミンの代わりとなり得るのか、検証を行っている。その結果、CHL-YN細胞において、グルタミンを含まない培地での増殖が確認されたが、グルタミン添加培養と比較して、細胞の対数増殖期の開始が2日ほど遅く、ラグタイムが確認された。そこで、CHL-YN細胞のグルタミン不含培地への馴化培養を行ったところ、グルタミン添加培養と同等の比増殖速度を得ることに成功した。グルタミン酸とアンモニアの濃度が培養中を通じて減少し、かつグルタミン濃度が培養後半に増加しており、グルタミンが培養後半において合成されていると推定された。グルタミン不含培地での細胞培養終了後の最終アンモニア濃度は、グルタミン添加培地で培養した最終アンモニア濃度と比較して約1/3に低下し、細胞に有害なアンモニア生成の軽減が達成された。

次に、IgG1生産CHL-YN細胞を用いた流加培養における検討を行った。培地中のグルコース濃度が2 g/L以下になった時にFeed培地を加えることで、細胞のIgG1比生産速度および最終IgG1濃度を増加させることに成功した。しかし、流加培養では細胞の培養期間を延ばすことにつながらなかった。そこで次に、IgG1生産CHL-YN細胞の灌流培養による検討を行った。灌流培養の方法として、まずは培養液中の生細胞とそれ以外を膜フィルターで分離し、その液の流れが交互に変化するAlternating tangential flow (ATF)システムを用いた。灌流速度は培養4日目に0.5 volumetric vessel density (VVD)、5日目に0.75 VVD、6日目に1 VVDとした。その結果、22日以上培養に成功し、細胞数は最終的に約 4×10^7 cells/mLで維持可能であった。培地上清中のグルコース濃度を低い濃度で維持することで、培養液中のpHや浸透圧に影響して細胞の増殖や目的タンパク質の生産を阻害する「乳酸」の生成を抑えることが可能となるが、本灌流培養では培養6日目から約2 mMで安定させることができた。抗体濃度についても、流加培養と比較して高い抗体濃度の培養上清を、継続的に生産することに成功した。

② 糖鎖修飾の制御

IgG抗体のN型糖鎖における脱フコシル化は抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を増大させることで知られる。抗体生産のプラットフォームであるCHO細胞において、フコシル化糖鎖を抑制しその影響を評価するため、フコシル化糖鎖合成に関わる酵素の遺伝子をCRISPR-Cas9を利用してノックアウトした。当該細胞は接着培養細胞であったが、抽出した全可溶性タンパク質の糖鎖構造を解析した結果、野生株と比較してフコシル化糖鎖量は半減していたものの、約10%の糖鎖にフコース残基が付加されていた。そこで、さらにフコース転移酵素の基質をゴルジ体内へ輸送するトランスポーターの遺伝子をノックアウトした細胞を構築した。しかしながら、全可溶性タンパク質の糖鎖構造を解析したところ、約1%程度ながらフコシル化糖鎖が検出された。この原因が血清由来の成分に

あると考え、無血清培地に馴化し浮遊化させた。この結果、無血清培地馴化細胞において、質量分析器でフコシル化糖鎖を検出できないレベルまで抑制することに成功した。また、ノックアウトに起因するフコシル化糖鎖合成の抑制が、細胞の増殖速度に影響を与えないことも明らかにした。さらに、無血清培地馴化細胞で生産したヒトIgG抗体にフコースが付加されていないこと、フコース残基を含まない部分の糖鎖構造分布は他の報告に類似することを証明した。

また本研究では、補体依存性細胞傷害に関係するシアリル化糖鎖を抑制することを試みた。手法は上記フコシル化糖鎖抑制と同様に遺伝子のノックアウトを利用した。CRISPR-Cas9を利用してCHO細胞の対立遺伝子に変異が導入できたことを確認した。しかしながら、全可溶性タンパク質の糖鎖構造を解析したところ、野生株と比較してもシアリル化糖鎖量の減少が認められなかった。この原因については不明であるが、別の酵素が機能を補っている可能性もある。現在、他変異株の糖鎖構造解析を進めており、原因の追究に努めている。同遺伝子を破壊したCHL-YN細胞については、残存はあるものの、シアル酸結合型糖鎖の減少が確認できた。

次に、培養条件がCHO細胞の糖鎖合成能力に与える影響を解析した。特に培地に有効成分を添加することを考えた場合、添加量によっては浸透圧等の負荷が大きくなる。本研究では、タンパク質の凝集抑制に有用なトレハロースを添加することで浸透圧を与えたモデルCHO細胞を作成し、浸透圧が細胞内糖鎖構造に与える効果を分析した。CHO-K1およびCHO-DG44細胞の培養液中にそれぞれ50 mMとなるようにトレハロースを添加し48時間、37°Cで培養した。次に、培養後の細胞を一部100 mMトレハロースを含む培地へ継代し48時間、37°Cで培養した。同様に、培養後の細胞を一部150 mMトレハロースを含む培地へ継代し48時間、37°Cで培養した。各トレハロース濃度で培養した細胞を回収し、全可溶性タンパク質を抽出後、N型糖鎖構造を解析した。トレハロースの添加によって、ADCC活性にとって不要なフコシル化糖鎖量は減少したものの、同活性を向上するガラクトシル化糖鎖量も減少する結果となった。これはCHO-K1、CHO-DG44両細胞において同様の傾向を示した。フコシル化あるいはガラクトシル化といった複合型糖鎖が減少することで、高マンノース型糖鎖の含量が増加することが分かった。また、高濃度のトレハロース存在下では細胞の生存率が顕著に低下したが、CHO-K1細胞ではトランスポーターを過剰発現することで生存率を改善できた。さらに、細胞内に取り込んだトレハロースを分解できるように分解酵素を過剰発現させたところ、細胞内タンパク質糖鎖のうち複合型糖鎖量を回復することができた。

また、細胞内輸送に関わる機能性タンパク質を利用してCHO細胞の抗体分泌生産能力を高めることを目的として、分泌経路上に位置する細胞小器官で機能することが報告されているタンパク質を6つ選抜し、それぞれヒト抗体を生産するCHO-K1細胞で一過的に過剰発現した。培養液中に分泌された抗体量をELISAで測定したところ、あるタンパク質の過剰発現が抗体分泌量を約10%高めることを見出した。

③ 連続生産の実用化に向けた品質管理手法研究

本バイオ医薬品の連続生産の際に発生する可能性がある、凝集体のインラインモニタリングを可能とするシステムの構築を進めた。150nm~10 μ m (サブミクロンおよびミクロン) の粒子を評価可能な定量的レーザー回折法 (qLD) にライン組み込み可能なセルを作成の上、用いることとした。qLDは、ラテックス粒子であれば幅広いサイズ領域の粒度分布を定量的に測定可能であり、タンパク質凝集体の場合には、実測により凝集体と溶媒の屈折率を求め、その値を適用すれば信頼性のある粒度分布が得られる (Totoki et al., 2015)。まずは、血清グロブリン製剤に加熱や攪拌ストレスを加えることにより凝集体を作製し、qLDによるタンパク質凝集体定量的直線性、定量限界、検出限界、を求めた。次に、作製した凝集体について、qLD、共振式質量法 (RMM)、ナノトラッキング法 (NTA)、フローイメージング法、光遮蔽法 (LO) を用いて測定し各測定法間の数値の比較を行ったところ、qLDによりサブミクロン領域についてはRMMおよびNTA、ミクロン領域についてはLOおよびFIA、と良い対応関係を持つ値が得られることを確認した。以上、qLDによるサブミクロンとミクロンサイズの凝集体の定量性の確認が出来た。次に、ポンプ等での送液時の凝集体形成のqLDによるモニタリングのためインラインセルを作製し、標準粒子での計測を確認した。

次に、製造のfill/finish過程における凝集体生成のインラインモニタリングの検討のため、ペリスタポンプを用いた循環型流路デバイスをqLDに組み込んだシステムを用いて、タンパク質溶液の送液における凝集体生成のリアルタイムモニタリングを実施した。試料には、代表的なバイオ医薬品である抗体医薬品を用い、流速は製造時の充填速度を考慮し70 mL/minに設定した。オンラインモニタリングでは、はじめは粒子が観測されず、およそ20分後から粒子の経時的な増加が認められた。また、粒子径が小さい粒子(300 nm未満)がはじめに生成し、その後、徐々にサイズの大きな粒子が生成することが明らかとなった。以上の結果から、qLDを用いたサブミクロン粒子のオンラインモニタリングが可能であることだけでなく、qLDを用いたオンラインモニタリングを用いることで、凝集体生成カイネティクスについても解析が可能となることが示された。

そこで、製造条件と凝集体生成との関連について、事前にポンプの配管内にタンパク質溶液を満たし、24時間インキュベーションとした場合の凝集体生成をモニタリングした。その結果、24時間のインキュベーションを行わなかった場合、1 μm 以上の粒子生成は30分後であるが、インキュベーションを行った場合は送液開始後ただちに生成した。特に、インキュベーションを行ったほうが、10~20 μm の粒子の生成が速い傾向にあり、このことからタンパク質がチューブへ吸着すると、ペリスタポンプで流した場合により多くの凝集体が発生することが分かった。さらに、ペリスタポンプ回転中において、界面活性剤を入れなかった場合と入れた場合の比較を行った。界面活性剤を入れなかった場合、ペリスタポンプの回転中に、特に1~10 μm の凝集体が徐々に増加した。界面活性剤を入れると、0.3 μm 以上の凝集体は発生しなかった。よって、ペリスタポンプ回転中における、界面活性剤によるタンパク質凝集体抑制の効果を確認できた。以上から、製造におけるインラインモニタリングの利用により凝集体が発生するポイントの確認が可能となり、適切な凝集体抑制が実現出来る見通しが得られた。

今後の見通し：網羅的遺伝子発現解析より、低酸素誘導因子等の発現について、CHL-YN細胞でCHO-K1細胞と異なる特徴が見いだされている。灌流培養法では、高密度培養時における酸素の供給法が現在課題となっている。肺由来線維芽細胞の低酸素への応答はクローンによって異なり不均一ではあるものの、低酸素環境下において、一部の細胞で増殖性が上がるという報告がある。また、ヒトにおいて、肺で線維芽細胞が異常に増殖・沈着する肺線維症は、炎症や血流障害等をきっかけとして起こる疾患である。CHL-YN細胞では、細胞の最高密度到達後の生存率の低下が、CHO-K1株と比較して緩やかな傾向が得られており、低酸素や栄養不足条件に強い細胞である可能性があると考えている。このように、CHL-YN細胞ならではの特徴を見だし、培養プロセスにおける従来のCHO細胞にはない強みを引き出したい。また、肺胞上皮細胞の代表的な実験室株にA549細胞があるが、この細胞はレシチンを合成し不飽和脂肪酸を高レベルに持つため、膜の維持能が高いと考えられている。CHL-YN細胞は、現状として、肺から増えてきた細胞を継代して維持している状態であり、様々な種類の細胞が混在していることが期待される。今後、細胞のクローニングを行い、もしA549細胞のように不飽和脂肪酸を高レベルで有し、膜の維持能が高い細胞が取得できれば、この細胞でタンパク質やウイルスなどを産生させた場合に膜が受けるダメージからの回復能が高い可能性があり、本細胞のアドバンテージとなり得る。

また糖鎖修飾については、本課題で得られた結果を元に、CHL-YN細胞を用いた制御を開始している。糖鎖構造の制御について、質量分析器で未検出なレベルまでフコシル化糖鎖合成を抑制したCHO細胞を樹立できたことで、今後は生産抗体のADCC活性ならびに抗原認識能力の調査が求められる。CHL-YN細胞ではCHO細胞と比較して細胞内フコシル化糖鎖含量が高いというデータも得ており、同様の酵素遺伝子を標的とすることで、CHL-YN細胞のフコシル化糖鎖の抑制に強い効果を示すことが期待できる。一方、トレハロース添加に起因する浸透圧の増加によって、細胞の生育率やADCC活性に寄与する複合型糖鎖構造量が低下したが、トランスポーターならびに分解酵素を同時発現することで改善できた。この性質を上述のフコシル化糖鎖抑制細胞へと導入し、トレハロース添加による生産抗体の凝集阻害効果のデータを詳細に取得する予定である。また、ある種のタンパク質を過剰発現することでCHO細胞からの抗体分泌生産量を約10%増加することに成功したが、輸送小胞に局在するタンパク質と目的地細胞小器官に局在するタンパク質を組合せて同時に発現することで、さらなる抗体分泌生産量の向上が期待で

きると考えている。

さらに、連続生産の実用化に向けた品質管理手法研究について、本課題で設計したフローセルを用いた定量的レーザー回折法 (qLD) とペリスタポンプを組み合わせた装置により、qLDを用いたサブミクロン粒子のオンラインモニタリングが可能であることだけでなく、qLDを用いたオンラインモニタリングを用いることで、凝集体生成カイネティクスについても解析が可能となることが示された。また実際のタンパク質医薬品を用いた計測より、製造におけるインラインモニタリングの利用により凝集体が発生するポイントの確認が可能となり、適切な凝集体抑制が実現出来る見通しが得られた。

以上のように、研究開発成果のさらなる展開が期待できるものと考ええる。

The results obtained through this research are described below. The original host cell (CHL-YN cell) developed in this project were deposited to RIKEN BioResource Research Center (RCB 5004).

① Construction of the production process of CHL-YN cells

Analysis of the components in the culture supernatant showed that CHL-YN cells had different characteristics from CHO-K1 cells in the time course of glucose, lactate, glutamine, glutamate, and ammonium ion concentrations. In CHL-YN cells, glutamine concentration increased in the middle of culture even after initial glutamine was consumed, and glutamic acid was simultaneously consumed in batch culture. Gene expression analysis suggested the expression of glutamine synthetase (which catalyzes the synthesis of glutamine by the condensation of glutamic acid and ammonia) in CHL-YN cells. Thus, it was suggested that glutamic acid could be used instead of glutamine in CHL-YN cells. Glutamic acid is less expensive than glutamine, and the addition of heat-labile glutamine eliminates the need to prepare media more easily. Ammonia is also a toxic substance produced as a metabolite of the amino acid nitrogen. Glutamine is naturally degraded during cell culture, producing ammonia as a by-product. By adding glutamic acid instead of glutamine, glutamine is synthesized from glutamic acid and ammonia, which is expected to contribute to the detoxification of ammonium. We are now testing whether glutamic acid can replace glutamine in CHL-YN cell culture. The growth of CHL-YN cells was confirmed in the medium without glutamine, but the start of the logarithmic growth phase of the cells was about 2 days later than that of the culture with glutamine, and lag time was confirmed. Therefore, when the CHL-YN cells were adapted to a glutamine-free medium, a specific growth rate equivalent to that of glutamine-added culture was successfully obtained. Glutamate and ammonia concentrations decreased throughout the culture and glutamine concentrations increased in the latter half of the culture. The final ammonia concentration after culturing the cells in a glutamine-free medium was reduced to about 1/3 of the final ammonia concentration cultured in a glutamine-supplemented medium.

The specific production rate and final IgG1 concentration of the cells were successfully increased by adding feed medium (fed-batch culture). However, fed-batch culture did not prolong the cultivation time of the cells. Next, a perfusion culture of IgG1-producing CHL-YN cells was performed using an alternating tangential flow (ATF) system. As a result, the culture was successful for 22 days or more, and the cell number was finally maintained at about 4×10^7 cells/mL. As for the antibody concentration, the culture supernatant having a higher antibody concentration than the fed-batch culture was continuously produced.

② Control of glycosylation

Defucosylation of the N-glycans of IgG antibodies is known to increase antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity. In CHO cells, a platform for antibody production, genes of enzymes involved in fucosylated glycan synthesis were knocked out using CRISPR-Cas9 in order to suppress fucosylated glycans and evaluate their effects. The fucosylated glycan was successfully suppressed to a level where the fucosylated glycan could not be detected by a mass spectrometer in cells conditioned to a serum-free medium, and fucose was not added to the human IgG antibody produced. In addition, the knockout did not affect the growth rate of the cell. We also attempted to suppress the sialylated glycans involved in complement-dependent cytotoxicity. It was confirmed that the mutation was able to be introduced into the allele of the CHO cell using CRISPR-Cas9. However, analysis of the carbohydrate structures of all soluble proteins showed no decrease in the amount of sialylated carbohydrate compared with the wild type strain. In CHL-YN cells in which the gene was disrupted, a decrease in sialic acid-linked oligosaccharides was confirmed, although there was some persistence.

③ Research on quality control methods for practical application of continuous production

An in-line monitoring system for agglomerates, which may occur during the continuous production of the biopharmaceutical, was developed. A cell capable of line incorporation into a quantitative laser diffraction method (qLD) capable of evaluating particles of 150 nm to 10 μm (submicron and micron) was prepared and used. In order to investigate in-line monitoring of aggregate formation in the fill/finish process of production, real-time monitoring of aggregate formation in the feed of a protein solution was carried out using a system in which a circulating flow channel device using a peristaltic pump was incorporated into qLD. Antibody drugs, representative biopharmaceuticals, were used as samples, and the flow rate was set at 70 mL/min in consideration of the filling rate during production. It was shown that not only on-line monitoring of submicron particles using qLD is possible, but also analysis of aggregate formation kinetics can be made by using on-line monitoring using qLD. Therefore, the relation between the production conditions and the aggregate formation was monitored when the protein solution was filled in the piping of the pump in advance and incubated for 24 hours. As a result, in the case of no incubation for 24 hours, particles larger than 1 μm were formed after 30 minutes, but in the case of incubation, they were formed immediately after the start of feeding. In addition, when the surfactant was added, agglomerates larger than 0.3 μm did not form. From the above, it was possible to confirm the point at which agglomerates are generated by using in-line monitoring in manufacturing, and it was possible to obtain the prospect of realizing appropriate agglomerates suppression.