

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)
研究開発中間進捗／成果概要報告書 (公開版)

令和 5 年 08 月 10 日

1. 公募研究開発課題名：革新的な次世代抗体医薬品製造技術の開発
2. 研究開発課題名：先端技術を集結した新規生産宿主細胞 CHL-YN 細胞の育成
3. 代表機関名：国立大学法人大阪大学
4. 研究開発代表者名：山野 範子
5. 所属・役職：大学院工学研究科生物工学専攻・准教授
6. 全研究開発期間：令和3年7月1日 ～ 令和8年3月31日 (予定)

【研究開発概要】

本課題の目的は、新規に樹立し、従来の生産宿主細胞である Chinese hamster ovary (CHO) 細胞と比較して倍速で増える Chinese hamster lung (CHL)-YN 細胞をさらに発展させ、宿主細胞としての基盤技術を構築し、産業上利用可能な細胞にすることである。CHL-YN 細胞をより扱いやすい細胞にするためには、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析、メタボローム解析を合わせた、総合的な解析を行い、培養方法の最適化と細胞の選別を行う必要がある。加えて、CHL-YN 細胞を宿主細胞とした場合の生産物についても確認をする必要がある。そこで、CHL-YN 細胞の特性評価及び培養方法の検討を行い、その生産物の確認については X 線小角散乱法を利用し、培養液中の抗体分子の構造について、簡単な前処理のみで、フォールディング及び安定性の変化、糖鎖構造をはじめとした翻訳後修飾の変化等、生産物の迅速キャラクタリゼーションを可能とする技術の開発を行う。これは、主に測定のための試料調製方法の検討と構造可視化の手法の改良を中心に進める。また、これまでの研究より、CHL-YN 細胞における細胞内糖鎖は、CHO 細胞と比較して違いがあることが示唆されている。これまで CHO 細胞で行ってきた糖鎖制御の成果を、CHL-YN 細胞に反映させることが次の課題であるが、加えて、抗体の機能を向上できる新規糖鎖構造を見出す研究へ発展させたいと考えている。さらに、人工知能と先端イメージング、マイクロ流体技術を融合し、細胞の形態情報を光圧縮信号として計測し、画像を介さずに高速リアルタイムに解析可能なゴーストサイトメトリー法を用いて、CHL-YN 細胞の特徴の解析、細胞のグループ分けと、ラベルフリーでの抗体生産性の判別を試みる。つまり本研究では、細胞育種のみならず、分析・解析手法として開発を計画している個々の要素技術の確立と、その統合の実施を目標としている。開発した要素技術の統合により、品質の良い CHL-YN 生産株の迅速構築プラットフォームの確立と培養方法の最適化を実現し、従来の CHO 細胞にはない強みを引き出す。

【研究開発中間進捗／研究成果概要】

CHL-YN 細胞は、現在 6 社の企業に導出する成果を得ている。培養方法の検討では、当初のフラスコ回分培養と比較して、グルコース濃度を一定に制御することを可能とした流加培養方法により、生産物の最終濃度が約 10 倍に、さらにクローン取得によりその約 2 倍 (計 20 倍) となった。また、灌流培養においても、グルタミンの消費速度に基づいて、グルタミンの濃度を維持させることに成功し、より長期にわたり 95% 以上の高い細胞生存率を維持することを可能とした。糖鎖修飾の制御では、フコシル化糖鎖合成に関わる酵素をノックアウトした CHL-YN 細胞を構築した。HPLC と質量分析器を用いて糖鎖構造を解析したところ、フコシル化糖鎖は質量分析器の検出限界以下であった。また、シアリル化糖鎖合成酵素に関わる酵素についても、ゲノム上で変異を導入したノックアウト CHL-YN 細胞を構築した。生産物の構造解析については、培養上清中からの試料前処理手法を確立すると共に、目標とした測定時間短縮を達成する事で、生産された抗体の”生きた状態”での構造取得を実現した。培養日数の異なる CHO-K1 株由来および CHL-YN 株由来のターゲット抗体分子の測定・解析の結果、培養日数の経過に伴い、主要コンフォメーションがいわゆる「Y 字型」とは異なる構造へと大きく移行して行く事を初めて見出すと共に、それぞれの特徴的な分子形状の可視化に成功した。さらに単一画素圧縮撮影手法と機械学習を用いた細胞の分類については、ゴーストサイトメトリー技術を用いることで、抗体高生産細胞の分取から抗体生産能の評価に至るワークフロー確立の概念実証を取得できた。