

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  
(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)  
事後成果報告書

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 先端技術を集結した新規生産宿主細胞 CHL-YN 細胞の育成  
(英語) Development of the novel production host cell line CHL-YN using integrated advanced Technologies

研究開発実施期間: 令和 3 年 7 月 1 日～令和 8 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) 国立大学法人大阪大学・大学院工学研究科生物工学専攻・准教授  
(英語) Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Osaka

## II 研究開発の概要

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。開発項目として、①CHL-YN 細胞の抗体生産細胞構築及び培養条件の検討、②生産物高次構造評価のための試料調製プロトコルの開発、③CHL-YN 細胞の糖鎖修飾の制御、④単一画素圧縮撮影手法と機械学習を用いた生産株構築法の改善とその評価、の 4 つの課題に対する研究開発を行った。

まず①の「CHL-YN 細胞の抗体生産細胞構築及び培養条件の検討」では、トランスクリプトーム解析にプロテオーム解析・メタボローム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、CHL-YN 細胞において、エネルギーやバイオマス生産、細胞周期に関連するプロセスが、CHO 細胞と比較して活発であることを明らかにし、本細胞の優位性を示した。トランスクリプトーム解析では、有機酸、核酸塩基、脂質の代謝に関連する生物学的プロセスが、CHL-YN 細胞でアップレギュレートされていた。パスウェイ解析の結果、これらのプロセスには、システインおよびメチオニン代謝、アルギニンおよびプロリン代謝、PPAR シグナル伝達経路が含まれることが明らかになった。CHL-YN 細胞におけるアミノ酸代謝経路のアップレギュレーションは、バイオ医薬品生産において CHO 細胞よりも優位に立つ可能性がある。また、CHL-YN 細胞では、TCA サイクル、ミトコンドリア、翻訳に関連するパスウェイがアップレギュレートされた。有機酸代謝、TCA サイクル、ミトコンドリア関連プロセスはすべて、細胞活動に不可欠なエネルギー産生に関与しており、一方、脂質代謝と翻訳はバイオマス産生に関連している。CHL-YN 細胞に

おける強固なエネルギーおよびバイオマス生産過程は、CHL-YN 細胞で観察される急速な細胞増殖に必要である可能性がある。プロテオーム解析では、翻訳、細胞周期、ミトコンドリア関連のプロセスが CHL-YN 細胞でアップレギュレートされており、トランスクリプトーム解析の結果と一致していた。CHL-YN 細胞は、CHO 細胞に比べ、組換えタンパク質発現における翻訳ボトルネックを回避できる可能性が高く、分泌を必要としない膜タンパク質の生産に特に有利である可能性がある。メタボローム解析では、抗体生産 CHO-K1 細胞、抗体生産 CHL-YN 細胞（生産細胞プール及び単離した高生産株）の細胞内アミノ酸濃度の結果の比較から、CHL-YN 細胞培養では、生産細胞プールと高生産株の両方で、複数のアミノ酸が減少していることが示された。興味深いことに、アルギニンとメチオニンは、CHO-K1 細胞とは異なり、CHL-YN 細胞の培養後期でかなり低い値となった。また、CHO-K1 細胞と異なり、CHL-YN 生産細胞プール及び高生産株は、どちらもオルニチン、シトルリン、プトレシンが利用可能であることが示された。オルニチンとプトレシンは、CHO-K1 細胞株では機能していないアルギナーゼとオルニチンデカルボキシラーゼの活性により生成される可能性がある。これらの代謝物は、細胞増殖とタンパク質合成をサポートするポリアミン合成に関連する。さらに、CHL 細胞においてプロリンが時間経過と共に増加しており、これはオルニチンをプロリンに変換する酵素の1つであるオルニチンアミノトランスフェラーゼの高い発現に関連する可能性がある。また、解析の結果、CHL-YN 細胞の培養時にのみシスタチオニンが存在することが明らかとなった。さらに、S-アデノシルメチオニン（SAM）と S-アデノシルホモシステイン（SAH）は CHO-K1 細胞とは異なるパターンで見出された。SAM はメチル基供与体として利用され、SAM/SAH 比は細胞内の潜在的なメチル化の指標とされる。CHL-YN 細胞では、SAM/SAH 比が経時的に減少しており、細胞内のメチル状態の低下を反映していると考えられる。続いて、各種培養法の検討を行った。流加培養では、グルタミンに関わる代謝フェーズの違いに着目して、グルコースの流加速度を変化させることで、培地中グルコース濃度を一定に制御することに成功した。このグルコース添加のダイナミック制御を行うことにより、培養期間が約2倍長くなり、目的タンパク質の生産濃度は3倍近くに増加した。また、培地ブレンドを数学的観点から再評価し、初めてそのためのワークフローを提案した。また、その手法を用いて、CHL-YN 細胞用のオリジナル培地を作製した。さらに、CHL-YN 細胞のスクリーニングにより、外来遺伝子の導入効率が高く、宿主細胞にすると目的とする組換えタンパク質の生産性が上がる CHL-YN 細胞株を単離した。単離した細胞を宿主細胞とすることで、これまでの CHL-YN 細胞由来の高生産株と比較して、約6倍の生産性を示す生産株の取得に成功した。

②の「生産物高次構造評価のための試料調製プロトコルの開発」については、革新的新技術である Electron Density Topography を用いる事により世界初の生産物逐時高次構造評価系を確立すべく、その鍵となる試料調製プロトコルの開発を進め、最終的に Daily レベルでの連続追跡評価が可能な系の構築を達成した。CHO-K1 細胞を用いて構築された評価手法により、標準的な CHO 細胞と比較して倍速の生産能を有する CHL-YN 細胞に、細胞における生産物の3次元構造評価を行い、CHL-YN 細胞は培養初期段階より CHO と高次構造同等性を有する抗体分子を生産している事を明らかとした。また、研究開発課題実施中の想定外の成果として、評価系構築の初期段階で CHO 細胞を用いたベンチマーク試験を行う段階で、培養上清より回収された抗体分子が、培養日数を追って3次元構造が変化(Y字型から乖離)する全く新しい知見を得た。この現象は、流加培養条件、灌流培養条件のいずれにおいても観察されており、また、CHO 細胞のみならず、CHL-YN 細胞を用いた場合においても見出された。これは動物細胞を用いた抗体分子生産過程の本質的現象を表している可能性がある。今後、この培養日数に伴う3次元構造変化が、実際の機能レベルや薬効レベルでどの様な影響を持つのかの評価検討を進め、更に測定そのもののインライン化を推し進める事により、3次元構造評価をベースとした世界で初めての新たな次世代抗体分子生産制御手法の創出につながる可能性がある。

③の「CHL-YN 細胞の糖鎖修飾の制御」では、フコシル化糖鎖合成関連酵素遺伝子をノックアウトした CHL-YN 細胞、および、シアリル化糖鎖合成関連酵素遺伝子をノックアウトした CHL-YN 細胞の構築に、それぞれ成功した。フコシル化糖鎖合成関連酵素遺伝子をノックアウトした CHL-YN 細胞を宿主としてリツキシマブ IgG 抗体を発現させ、培養液中から抗体を精製して糖鎖構造を解析したところ、質量分析器レベルでフコースの結合した糖鎖は未検出であった。次に、抗体医薬品活性分析用カラムを装備する高速液体クロマトグラフィーを利用して抗

体の Fc $\gamma$  受容体との結合力を調査したところ、野生株よりもフコシル化糖鎖抑制細胞で生産したリツキシマブがより強く Fc $\gamma$  受容体と結合することがわかった。また、シアリル化糖鎖合成関連酵素遺伝子をノックアウトした CHL-YN 細胞を用いて生産したリツキシマブの性質について、同様に、細胞の培養液中よりリツキシマブを精製し、糖鎖構造を解析したところ、質量分析器レベルでシアリル酸の結合した糖鎖は未検出であった。続いて、補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性を測定したところ、野生株よりもシアリル化糖鎖合成関連酵素遺伝子をノックアウトした CHL-YN 細胞株で生産したリツキシマブが低い値を示した。これは、ガラクトース (シアリル酸と同じく CDC 活性に寄与する) が付加した糖鎖量が、野生株よりもシアリル化糖鎖抑制細胞で生産したリツキシマブで低下したことに起因すると考えられた。また新しい試みとして、様々なフコース構造類似糖付加の試みも行った。CHL-YN 野生株およびフコシル化糖鎖合成関連酵素遺伝子のノックアウト細胞株の培養液中に、10 mM となるようにアラビノースを添加し、14 日間培養した。培養後の細胞より全可溶性タンパク質を抽出し質量分析器で糖鎖構造を解析したところ、野生株では全フコシル化糖鎖量の約 4% 量のアラビノシル化糖鎖を検出した。一方で、フコシル化糖鎖合成関連酵素遺伝子のノックアウト細胞株を用いることで、フコシル化糖鎖量を 1% 未満に抑制しつつ、アラビノシル化糖鎖量を野生型の 4 倍以上に増加できることを見出した。本プロジェクトにおいて、培養液中への安価なアラビノースの添加によって新規なアラビノシル化糖鎖を生産できること、また、フコシル化糖鎖抑制細胞を宿主として用いることでアラビノシル化の効率を向上できることを証明した。

④の「単一画素圧縮撮影手法と機械学習を用いた生産株構築法の改善とその評価」では、機械学習、先端イメージング技術およびマイクロ流体技術を融合したゴーストサイトメトリー (Ghost Cytometry: GC) 法を用いて、CHO-K1 細胞において抗体生産能の高い細胞を選別するための分類モデル開発から、構築した分類モデルに基づく分取および ELISA 評価系を用いた抗体生産量評価に至るまでの一連の実験ワークフローおよび関連技術を確立した。具体的には、抗体高生産細胞と低生産細胞の形態的特徴の差異を明確に抽出することを目的として、ヘテロセルプールから単離した異なる抗体生産量を持つ 2 種クローン、すなわち高生産クローン低生産クローンを教師データとして用いた。これらのクローン由来細胞から取得した GC 波形データを用いて、SVM 分類モデルを構築した。次に、GC 波形データに内在する特徴を可視化するため、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) を用いた次元削減を行った。GC 波形データの UMAP プロット上では、各クローン由来データにおいて分布密度の高い領域が異なることが確認された。そこで、密度の高い領域にゲーティングを行い、抽出した各クローンの GC 波形データを用いて再度分類モデルを構築した。これらの結果から、UMAP および密度に基づくゲーティングを組み合わせた特徴抽出手法を導入することで、GC 波形に含まれる形態的特徴差をより明瞭に捉えられることが示された。構築した分類モデルを用いて、ヘテロセルプールから SVM スコア上位 10% の細胞を分取したところ、分取後には抗体生産量が約 28% 増加した。さらに、分取後の細胞を培養し、同様の分取・評価を 2 回繰り返した結果、抗体生産量は約 44% 増加、最終的には約 62% 増加まで段階的に増加した (同一日に測定)。以上の結果から、GC 法を用いた反復ソートにより、抗体生産能の高い細胞集団を段階的にエンリッチメント可能であることが示され、形態情報に基づくラベルフリーな抗体高生産細胞選別手法としての有効性が確認された。さらに、CHO-K1 細胞を用いて確立した分類モデル生成ワークフローを CHL-YN 細胞へ応用し、CHL-YN 細胞を宿主とした抗体高生産細胞を選別するための分類モデルの開発を行った。その結果、高生産クローンと低生産クローンの形態的特徴が分離可能であることが確認された。さらに、2 種類の異なる高生産クローンにおいて同様の結果が得られたことから、本手法の再現性が確認された。CHL-YN 細胞を宿主としたヘテロセルプールからスコアの高い細胞集団の分取を行い、分取後のサンプルと、分取前のセルプールを培養し、培地中抗体生産量を評価したところ、分取後のサンプルでは、分取前のセルプールと比較して、分抗体生産量が 33% 増加した。一方、ウェイトサンプルでは、抗体生産量が約 15% 減少しており、抗体生産能に基づく選別が適切に機能していることが確認された。本結果は CHO-K1 細胞で得られていた知見および結果と整合しており、本手法が異なる宿主細胞間においても適用可能な、汎用性の高い技術であることを示唆している。

以上のように、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をまず確立した。続いて、開発した要素技術を統合して、細胞株構築と培養条件の検討を行い、国際競争力のあ

る次世代抗体医薬品の生産において、品質の良い CHL-YN 生産株の迅速構築プラットフォームと培養手法を確立した。これらにより、従来の CHO 細胞にはない CHL-YN 細胞の強みを引き出し、本細胞の優位性を示した。

The objective of this project was to further develop the newly established Chinese hamster lung (CHL)-YN cells, which proliferate approximately twice as fast as conventional Chinese hamster ovary (CHO) cells, and to establish fundamental technologies that enable their industrial application as host cells. To achieve this goal, we conducted research and development in four major areas: (i) construction of antibody-producing CHL-YN cells and optimization of culture conditions, (ii) development of sample preparation protocols for higher-order structure analysis of products, (iii) control of glycosylation in CHL-YN cells, and (iv) improvement of cell line development using single-pixel imaging and machine learning technologies.

In the first task, multi-omics analyses integrating transcriptomics, proteomics, and metabolomics were performed to characterize CHL-YN cells. These analyses revealed that biological processes related to energy production, biomass synthesis, and cell cycle regulation were more active in CHL-YN cells than in CHO cells, demonstrating the superiority of CHL-YN cells as host cells. Pathway analyses indicated upregulation of amino acid metabolism, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, mitochondrial processes, and translation-related pathways. Metabolomic analyses further showed characteristic changes in intracellular amino acid metabolism, including reduced levels of arginine and methionine during late culture phases and increased polyamine-related metabolites such as ornithine and putrescine, which are associated with cell growth and protein synthesis.

In addition, various culture strategies were evaluated. By dynamically controlling glucose feeding rates based on metabolic phase differences related to glutamine metabolism, we successfully maintained stable glucose concentrations in fed-batch cultures. This dynamic control approximately doubled the culture duration and increased the target protein concentration nearly threefold. Furthermore, a mathematical workflow was proposed to optimize medium blending, leading to the development of an original culture medium specifically designed for CHL-YN cells. Screening of CHL-YN derivatives also enabled the isolation of host cell candidates with improved transfection efficiency and productivity, resulting in production clones with approximately sixfold higher productivity compared with previously established CHL-YN-derived clones.

In the second task, we developed sample preparation protocols for higher-order structural analysis using Electron Density Topography, an innovative analytical technique. This enabled daily monitoring of three-dimensional structural changes in antibody molecules during culture. The analysis demonstrated that antibodies produced by CHL-YN cells exhibited structural equivalence to those produced by CHO cells from early culture stages. Unexpectedly, benchmark experiments using CHO cells revealed a novel phenomenon in which antibody structures gradually deviated from the typical Y-shaped conformation over time in culture supernatants. This phenomenon was observed under both fed-batch and perfusion culture conditions and in both CHO and CHL-YN cells, suggesting that it may represent an intrinsic feature of antibody production in mammalian cells.

In the third task, glycosylation control was achieved through gene knockout strategies. CHL-YN cells lacking fucosylation-related enzymes and those lacking sialylation-related enzymes were successfully constructed. Antibodies produced using fucosylation-deficient CHL-YN cells showed enhanced binding to Fcγ receptors compared with wild-type-derived antibodies. In contrast, antibodies produced using sialylation-deficient cells exhibited reduced complement-dependent cytotoxicity activity. In addition, supplementation of

arabinose into the culture medium enabled the production of novel arabinosylated glycans, demonstrating a simple and cost-effective approach for glycan modification.

In the fourth task, we improved cell line development using Ghost Cytometry, which integrates machine learning, advanced imaging, and microfluidics. Classification models were developed using support vector machines based on morphological features derived from waveform data. By applying iterative sorting based on model predictions, antibody productivity was gradually enriched, resulting in productivity increases of up to approximately 62% in CHO cells. The workflow was successfully extended to CHL-YN cells, where high-scoring populations showed approximately 33% higher antibody production compared with unsorted cell pools, demonstrating the versatility and reproducibility of the method across different host cell systems.

Overall, this project successfully established key elemental technologies for cell engineering, analytical evaluation, and cell selection. By integrating these technologies, we developed a rapid platform for constructing high-quality CHL-YN production cell lines and optimizing culture processes. These achievements highlight the advantages of CHL-YN cells over conventional CHO cells and contribute to the development of next-generation antibody production systems with enhanced productivity and quality suitable for global industrial applications.