

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術のうち高生産宿主構築の効率化基盤技術の開発に係るもの
3. 研究開発代表者：国立大学法人神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 教授 近藤昭彦
4. 研究開発の成果

抗体は巨大分子で非常に複雑な分子であり、その生産には CHO 細胞が主に用いられており、その生産コストが課題である。一方で、近年、低分子抗体の開発が進んでおり、微生物による安価な生産も可能となってきた。微生物によるものづくりに強みのある我が国の技術を結集し、次世代の抗体医薬等の開発に取り組むべきである。そこで、目的とするバイオ医薬品を効率的に生産する細胞株を構築する基盤技術開発のための第一段階として、まず現状でゲノム情報等が明らかになっており、生産系構築が比較的迅速な宿主である大腸菌や酵母等をモデル微生物として、関連する複数の最適遺伝子配列の設計、正確な長鎖遺伝子クラスターの合成、宿主への遺伝子導入、生産性の検証にまで至る一連のサイクル要素技術を開発する。これらを統合することで、迅速な最適生産株の構築のための技術基盤を確立できると期待される。本研究開発では、長鎖 DNA を迅速かつ正確に合成する自動技術を開発し、この長鎖 DNA を設計する技術を開発することによって、Fv、scFv、Fab、Diabody 等の異なる種類の低分子抗体、および異なる配列を有する特異性の異なる低分子抗体に対して、極めて迅速な生産性の向上と最適化を実現するプラットフォーム技術を構築する（図 1）。

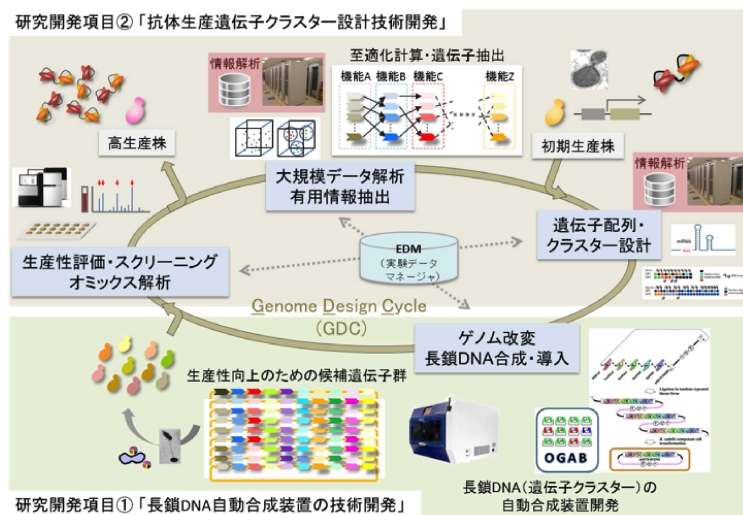


図 1 長鎖 DNA 自動合成装置による革新的低分子抗体生産最適化技術

当該年度において、研究開発項目①「長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発」、研究開発項目②「抗体生産遺伝子クラスター設計技術開発」として、研究開発を進めてきた。

研究開発項目①「長鎖 DNA 自動合成装置の技術開発」

遺伝子集積の自動化を主眼とした枯草菌 (*Bacillus Subtilis*) 独特の OGAB (Ordered Gene Assembly in *B. Subtilis*) 法での遺伝子クラスター収率向上のための要素技術開発を行った。遺伝子の機能単位の制約から離れた OGAB ブロックの設計手法も含めて検討し 10 万塩基対以上のサイズ達成、集積方法の確立を目指している。さらに、研究開発項目②で必要になるコンビナトリアルライブラリーをハイスループットに構築するための要素技術の開発を行った。これに並行して、具体的な長鎖 DNA 自動合成装置の作製を目指して、装置へ搭載する機器やソフトウェア等の要素技術の洗練を行った。

OGAB 法による長鎖 DNA 合成技術に加えて、OGAB 法により作製される遺伝子クラスター (長鎖 DNA) を酵母に正確かつ迅速に導入する系の開発を行った。枯草菌の接合伝達プラスミドを用いて、枯草菌→酵母あるいは、枯草菌→大腸菌→酵母のルートでの遺伝子導入系の開発、遺伝子クラスター (長鎖 DNA) を有するプラスミドを生化学的に精製することなく酵母を形質転換する系の技術開発を行った。

OGAB 法により遺伝子クラスターを得て、迅速に酵母に導入するプラットフォームをハイスループットで実践できる技術を開発し、酵母株を研究開発項目②の項目で検討してさらに再設計を繰り返すゲノムデザインサイクル (GDC) (図 1) の実践に向けて抗体生産に関わる遺伝子群の抽出、最適化が行える系の構築を行った。

研究開発項目②「抗体生産遺伝子クラスター設計技術開発」

生産宿主のゲノム設計や各種の解析支援システムの開発と GDC (図 1) を効率よく回すための技術開発や有用性評価を進めた。

微生物による低分子抗体生産をモデルとして抗体生産基本株を構築し、高生産性に関わる遺伝子やゲノム変異を迅速に同定するための基盤技術を開発した。さらに、細胞内生理状態の網羅的解析と情報解析を組み合わせた鍵因子の探索・推定技術や、長鎖 DNA 合成技術を利用した高生産株の構築技術の開発、即ち、長鎖 DNA で発現するための有用遺伝子を抽出するための変異解析システムや有効な遺伝子組み合わせを推定するためのネットワーク解析システム、さらには遺伝子クラスター全体を合理的に設計・最適化するための基盤技術開発を進めた。

具体的には、まず抗体の遺伝子を酵母等の微生物に導入して生産を行うとともに、変異導入や遺伝子導入等により抗体生産量の変化する株の構築を行った。そして、取得した株の生理状態の変動を網羅的かつ詳細に分析し、情報科学的解析を併用することによって高い生産性を実現するための改変ポイントを推定し、推定した改変ポイントをゲノムや長鎖 DNA 上に集積した株を作成し、生理状態の変動を同様に解析することによって、さらなる改変ポイントの推定を行った。

この過程を繰り返すことによって、目標とする生産性を達成する株の樹立を目指した研究開発を行った。このような方法論をベースに、長鎖 DNA 自動合成装置を核とした遺伝子設計と合成のスキームを開発することで、様々な種類や特異性を有する低分子抗体高生産株を迅速かつ効率的に樹立するためのプラットフォームを確立する研究開発を行った。CHO 細胞での抗体高生産マスター株の作出においても有効な手段として応用できる革新的な研究開発スキームの確立に向けて研究開発を行った。