

## 様式 7

## 論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 208 号	氏 名	奥村 武
学位論文題目	CHO細胞を利用した高効率バイオロジクス生産系の開発		

## 内容要旨

第1章 「序論」

バイオ医薬品の製造プロセス開発は、出発原料である細胞基材の構築から始まる。細胞基材の構築は、いかにして高い生産能力を有する生産細胞を取得するかが非常に重要であり、これを達成するためには、高発現可能な宿主-ベクター系と、高効率スクリーニング方法の開発が肝要である。そこで本研究では、抗体をはじめバイオ医薬品生産に適応可能な高効率バイオロジクス生産系を開発することを目的に、高発現を目指した宿主-ベクター系の開発として4項目、効率的スクリーニング系の開発として2項目を検討した。

第2章 「宿主細胞の特性解析及び発現系の改良」

第2章1節 「無血清浮遊馴化過程の細胞の特性解析」：本検討は、CHO細胞の無血清浮遊馴化過程の細胞を解析することで、抗体生産に適した宿主構築に必要な知見を得ることを目的とした。CHO-K1 (ATCC, CCL-61) 細胞から無血清浮遊馴化した細胞を起点に、さらに継代して得られる一連の細胞について特性解析（増殖性、接着性、抗体生産能、レクチンアレイ解析）を行った。その結果、継代を経るほど、増殖性は向上、接着性は低下、抗体生産能は向上するがPDL38付近で極大、細胞表層のα2, 3シアル酸量は低下するがPDL38付近で極小、を示した。細胞表層のα2, 3シアル酸含量と抗体生産能との間に相関関係が見出され、これを指標に抗体生産に適した宿主を選択できる可能性が示唆された。

第2章2節 「抗体生産能向上を目指した不均衡変異導入による宿主改変」：本検討は、不均衡変異導入法により細胞を改変し、抗体生産能力を向上させることを目的とした。改変は、モノクローナル抗体の生産株に対し、1不均衡変異導入、2評価、3高生産細胞の選抜、を1ラウンドとし、計3ラウンド実施した。改変の結果、元の生産株よりも生産性が約2.2倍向上した細胞が得られた。

第2章3節 「hprt遺伝子座を利用した抗体生産株の構築」：本検討は、部位特異的組換え法の技術評価を目的とした。TOTO株式会社の技術であるhprt遺伝子座を利用した部位特異的遺伝子組換えによって抗体生産株を構築し、その生産性と継代安定性を評価した。その結果、生産性は30～50 mg/L (DNAエレメントあり～180 mg/L) を示し、その生産株における導入遺伝子は継代培養において安定に保持された。

第2章4節 「マウス由来人工染色体 (MAC) ベクターを利用した抗体生産の株構築」：本検討は、人工染色体における目的遺伝子の安定発現に関する技

術評価を目的とした。株式会社クロモセンターの技術であるMACを利用した抗体生産株を構築し、その生産性と継代安定性を評価した。その結果、生産性は100～130 mg/Lで、継代安定性は約70%を示した。

### 第3章「スクリーニング方法の改良」

第3章1節「フローサイトメトリー(FCM)を利用した高生産細胞の濃縮方法の開発」：本検討は、FCMを利用した高生産細胞の濃縮方法の開発を目的とした。不均一な細胞集団であるStable Poolに対し、蛍光標識した抗IgG抗体で染色、FCMにより蛍光強度の高い細胞を分画することで高生産細胞の濃縮を試みた。その結果、単に蛍光強度の高い細胞を分画するだけでは濃縮効果が低く、その生産性は未分画細胞に比べ1.2倍であった。続いて、細胞及び細胞内密度が小さく、かつ蛍光強度が高い細胞を分画したところ、未分画細胞に比べて4.3倍の生産性を示した。

第3章2節「96 deep well plate(DWP)を利用した生産能評価系の構築」：本検討は、96DWPを利用した生産能評価方法を構築することで、スクリーニング方法の効率化を目的とした。Bioreactorの結果を比較的良く反映する125-mL三角フラスコの評価系をベンチマークとして検討した。その結果、攪拌速度、Feed方法、培地の安定性が重要であることを見出し、これらを最適化することで、125-mL三角フラスコの結果を再現する96DWPによる評価方法を構築することができた。

以上

## 様式9

## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 先 第 208 号	氏 名	奥村 武
	主査 宇都 義浩		
審査委員	副査 櫻谷 英治		
	副査 大政 健史		

## 学位論文題目

CHO細胞を利用した高効率バイオロジクス生産系の開発

## 審査結果の要旨

本研究ではバイオ医薬品生産に適応可能な高効率バイオロジクス生産系の開発を目的に、宿主-ベクター系の開発（①～④）、効率的スクリーニング系の開発（⑤、⑥）を検討した。

①「無血清浮遊馴化過程の細胞の特性解析」はCHO細胞の無血清浮遊馴化過程を解析することで抗体生産に適した宿主構築に必要な知見を得ることを目的に、無血清浮遊馴化CHO細胞をさらに継代して得られる一連の細胞について特性解析した結果、継代を経る事により、抗体生産能は向上し、PDL（集団倍加レベル）38付近で極大になり、細胞表層のα2, 3シアル酸量は低下し、PDL38付近で極小となり、両者の相関関係が見出された。②「抗体生産能向上を目指した不均衡変異導入による宿主改変」は不均衡変異導入法により細胞を改変した結果、抗体生産株に対し3ラウンドの不均衡変異導入により改変前に比べ生産性が約2.2倍向上した。③「*hprt*遺伝子座を利用した抗体生産株の構築」は部位特異的組換え法の技術評価を目的に、本技術を利用した抗体生産株を構築、生産性と継代安定性を評価した結果、生産性は低い（30～50 mg/L）ものの、安定生産が得られた。④「マウス由来人工染色体（MAC）ベクターを利用した抗体生産の株構築」は人工染色体における目的遺伝子の安定発現に関する技術評価を目的に、本技術を利用した抗体生産株を構築、生産性と継代安定性を評価したところ、生産性は100～130 mg/L、継代安定性は約70%であった。⑤「フローサイトメトリー（FCM）を利用した高生産細胞の濃縮方法の開発」はFCMを利用した高生産細胞の濃縮方法において、不均一な細胞集団から高生産細胞を濃縮するためには、細胞の大きさ及び細胞密度を考慮することが重要であることを見出し、未分画細胞に比べて4.3倍の生産性を示す細胞を分画可能であった。⑥「96 deep well plate (DWP) を利用した生産能評価系の構築」においては、培養装置の結果を反映する125-mL三角フラスコの培養結果を96DWPで再現させるためには、攪拌速度、Feed方法、培地の安定性が重要であることを見出した。

以上本研究は、CHO細胞を利用した高効率バイオロジクス生産において新しい基盤的な方法論を確立しており、本論文は博士（工学）の学位授与に値するものと判定する。