個別化医療に向けた次世代バイオ医薬品創出基盤技術開発プロジェクト

鬼塚 正義[1], 大政 健史[1]

Next Generation Research and Development Project for Biologics Production

By

Masayoshi ONITSUKA, and Takeshi OMASA

The object of this project is to achieve the next generation research and development for biologics production. We performed the reparation for research project for development of biopharmaceutical production. In this project, our Tokushima university group will perform the cell line engineering and cell culture engineering for production of biopharmaceuticals. In this paper, we reported that the achievements for these topics and introduce our results.

Keywords; Biologics Production, Biochemical Engineering, Biopharmaceutical, Cell Engineering, Therapeutic Antibody

1. はじめに

政府の新成長戦略（平成 22 年 6 月）において、革新的新薬・医療機器等の実用化で 2020 年迄に年間約 7000 億円の経済効果が期待されている。これをうけて、2013 年 1 月に経済産業省から概算要求として「個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発」（H25-H29 年度、全体事業費 405 億円、H25 年度 81 億円()）がなされた。本概算要求では、基盤技術として①IT 創薬、②次世代抗体医薬生産、③体内動態把握の 3 つの項目を行うが、本プロジェクトでは、特に「次世代抗体医薬等の安定生産技術」に関連する徳島大学における拠点形成を行うための準備をおこなった。

次世代抗体医薬安定生産に関連する開発項目としては(1)最適宿主開発、(2)安定生産システム開発、(3) 分離精製技術開発、(4)生産物品質評価開発の 4 つが計画されている。なお、当該事業実施にあたっては徳島大学も含む 29 機関からなる次世代バイオ医薬品製造技術研究組合を立ち上げ、次世代抗体医薬生産に関わる本事業のプロジェクトリーダーとして全体を統括し、さらに主として最適宿主開発ならびに、開発技術の(2)-(4)の項目との連携について実施する予定である。現在、本プロジェクトでは、29 機関（２４社、２大学、３法人）ならびに１０以上の大学からなる再委託先から構成される予定である。

徳島大学 STS 研究部においては、宿主開発、これに連動した測定系開発、さらには糖鎖、凝集体を含む品質評価改変と、本分野の専門家が揃っており、これらの力を結集して、本プロジェクトにおける徳島大学拠点形成を行い、プロジェクト提案を行い、採択された。本報告書では、これらの活動の成果を紹介する。

2. プロジェクト活動の具体的な成果

2.1 次世代のバイオ医薬生産のための基盤技術開発

[1]徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門 Dep. of Biological Science and Technology, Institute of Technology and Science, Tokushima University
連絡先：770-8506 徳島市南常三島町 2-1
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

本分野に関連して、2013 年において生物工学科 A3 研究室において関連論文 7 報、解説総説 1 編、著書 1 冊、国際学会発表 4 件、国内学会発表 11 件、国際・国内招待講演 4 件を行った。具体的な内容は以下の通りである。

2.1.1 関連論文

1) Kyoung Ho Lee, **Masayoshi Onitsuka**, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and **Takeshi Omasa*** "Rapid construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle checkpoint engineering" Applied Microbiology and Biotechnology,Volume **97**, No. 13, pp. 5731-5741(2013).

2) Kyoung Ho Lee, Tomomi Tsutsui, Kohsuke Honda, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Hisao Ohtake, and **Takeshi Omasa*** "Generation of high-producing cell lines by overexpression of cell division cycle 25 homolog A in Chinese hamster ovary cells" Journal of Bioscience and Bioengineering Volume **116**, Number 6, pp. 754-760 (2013).

3) Ahmad M Haredy, Akitoshi Nishizawa, Kohsuke Honda, Tomoshi Ohya, Hisao Ohtake and **Takeshi Omasa*** "Improved antibody production in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression" Cytotechnology Volume **65**, Number 6, pp. 993-1002 (2013).

4) Kyoung Ho Lee, Tomomi Tsutsui, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and **Takeshi Omasa*** " Overexpression of mutant cell division cycle 25 homolog B (CDC25B) enhances the efficiency of selection in Chinese hamster ovary cells" Cytotechnology Volume **65**, Number 6, pp. 1017-1026 (2013).

5) Kyoung Ho Lee, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake and **Takeshi Omasa*** "Construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle checkpoint engineering" BMC Proceedings 2013, 7(Suppl 6):O7 doi:10.1186/1753-6561-7-S6-O7 (国際会議論文)

6) **Masayoshi Onitsuka**, Miki Tatsuzawa, Masahiro Noda and **Takeshi Omasa*** "Chemical chaperone suppresses the antibody aggregation in CHO cell culture" BMC Proceedings 2013, 7(Suppl 6):P68 doi:10.1186/1753-6561-7-S6-P68 (国際会議論文)

7) Masahiro Noda, **Masayoshi Onitsuka**, Miki Tatsuzawa, Ichiro Koguma and **Takeshi Omasa*** "Dynamical analysis of antibody aggregation in the CHO cell culture with Thermo Responsive Protein A (TRPA) column" BMC Proceedings 2013, 7(Suppl 6):P69 doi:10.1186/1753-6561-7-S6-P69 (国際会議論文)

2.1.2 解説総説

1) **大政健史*** "バイオ医薬品生産におけるプロダクションサイエンス" 日本生物工学会誌 Vol.91 (No.9) pp. 507-510 (2013).

2.1.3 著書

1) **大政健史**、荻野千秋、中島田豊、仁宮一章、滝口昇 「基礎から学ぶ生物化学工学演習」日本生物工学会編（編集委員長 **大政健史**）、コロナ社(2013) （執筆項目 1.1 化学工学の基礎 1-7 頁、2.1 酵素の特性とその利用技術 17-26 頁、2.2 微生物の特性とその改良技術 26-39 頁、5.4 バイオプロダクトの分離・精製 135-143 頁、付録 144-151 頁）

2.1.4 国際/国内招待講演

1) **Takeshi Omasa** "Quality control in Chinese hamster ovary cell culture –from cell to antibody-" In; Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), No.519, abstract p.46, New Delhi, India, December 15-19, 2013 **(Invited lecture, Key Note lecture)**

2) **鬼塚正義**、**大政健史**（招待講演） "細胞構築から始まるバイオ医薬品生産におけるプロセスの重要性 -AlphaScreen の応用" PerkinElmer Japan35 周年

記念イベント RGHS×Biotherapeutics 抗体医薬研究の未来を拓くテクノロジー（Revolutionaries for Global Health Summit 2013），2013 年 11/20 東京国際フォーラム、東京

3) **大政　健史**（招待講演）　“セル&ティッシュエンジニアリング-細胞から組織へのネットワーク-” 第 10 回 HBS 公開シンポジウム「再生医学研究の現状と臨床応用への課題」， 要旨集 pp.10-12, 2013 年 11/12、徳島大学、徳島

4) **大政　健史**（基調講演）　“バイオ医薬品生産におけるセルエンジニアリング” 化学工学会第 45 回秋季大会，E103, CD-ROM、2 ページ, 2013 年 9/16-18、岡山大学、岡山

2. 1. 5 国際学会発表

1) Tomomi Tsutsui, Kyoung Ho Lee, Rina Matsuyama, **Masayoshi Onitsuka** and **Takeshi Omasa** "Cell cycle checkpoint engineering: novel construction method of gene-amplified CHO cell line for therapeutic antibody production" In; The 12th Tunisian-Japanese Symposium on Society, Science and Technology (TJASSST2013) O-13(Life Sciences, Food & Agriculture), abstract p.14,November 15-18, Yasmine Hammamet, Tsunisia (2013).

2) Kyoungho Lee, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, **Takeshi Omasa** "Rapid onstruction of transgene-amplified COcell lines by cell cycle checkpoint engineering " In; ESACT Meeting 2013 in Lille, No.O-19, p.31, Lille, France, June 23-26, 2013.

3) Masahiro Noda, Miki Tatsuzawa, **Masayoshi Onitsuka**, Akihiro Shirai, Hideaki Maseda, **Takeshi Omasa**, "Chemical shaperon suppresses the antibody aggregation in CHO cell culture " In; ESACT Meeting 2013 in Lille, No.A121, p.97, Lille, France, June 23-26, 2013.

4) **Masayoshi Onitsuka**, Miki Tatsuzawa, Masahiro Noda, Ichiro Koguma, Akihiro Shirai, **Takeshi OMASA** "Dynamical analysis of antibody aggregation in the CHO cell culture with thermo responsive protein A (TRPA) column " In; ESACT Meeting 2013 in Lille, No.A122, p.97, Lille, France, June 23-26, 2013.

2. 1. 6 国内学会発表

1) 高橋　舞，森下　明彦，**鬼塚　正義**，白井　昭博，間世田　英明，**大政　健史**　“Chinese hamster ovary 細胞株における染色体不安定性解析と抗体生産への応用“，第 65 回日本生物工学会, 1P-221, 要旨集　73 頁, 2013 年、9/18-20、広島国際会議場、広島.

2) 筒井　智美，kyoung Ho Lee，**鬼塚　正義**，白井　昭博，間世田　英明，**大政　健史**　“細胞周期制御による抗体医薬品高生産 CHO 細胞株構築系の確率” 第 65 回日本生物工学会, 1P-222, 要旨集 73 頁, 2013 年、9/18-20、広島国際会議場、広島.

3) 野田　真広, **鬼塚　正義**, 白井　昭博, 間世田　英明, **大政　健史**　“二重特異性抗体のドメイン配置が凝集性に及ぼす影響”　第 65 回日本生物工学会, 3P-229, 要旨集 245 頁, 2013 年、9/18-20、広島国際会議場、広島.

4) 森下　明彦，高橋　舞，**鬼塚　正義**，白井　昭博，間世田　英明，**大政　健史**　“異数性を有する Chinese hamster ovary 細胞における染色体不安定性解析” 第 65 回日本生物工学会, 3P-230, 要旨集 245 頁, 2013 年、9/18-20、広島国際会議場、広島.

5) **鬼塚　正義**，**大政　健史**　“レクチンを用いた抗体糖鎖の迅速検出とその可能性” 化学工学会第 45 回秋季大会，ZB2P56, CD-ROM、一ページ，2013 年 9/16-18、岡山大学、岡山

6) 筒井　智美，Kyoung Ho Lee，**鬼塚　正義**，白井　昭博，間世田　英明，**大政　健史**　“細胞周期エンジニアリングによる Chinese hamster ovary (CHO) 細胞

における効率的な遺伝子増幅システムの構築” 日本動物細胞工学会 2013 年度大会（JAACT2013）要旨集 p.50, 2013 年 7/18-19、ホテルフジタ福井、福井

7) 木下 幸恵, 筒井 智美, **鬼塚 正義**, 白井 昭博, 間世田 英明, **大政 健史** “抗体生産 CHO 細胞株における NFKBIZ 発現の影響” 日本動物細胞工学会 2013 年度大会（JAACT2013）要旨集 p.68, 2013 年 7/18-19、ホテルフジタ福井、福井

8) 松村 しずか, 井川 翔太, **鬼塚 正義**, 白井 昭博, 間世田 英明, **大政 健史** “CHO 細胞における小胞出芽関連因子 Arf のクローニングと発現制御によるタンパク質生産への影響” 日本動物細胞工学会 2013 年度大会（JAACT2013）要旨集 p.83, 2013 年 7/18-19、ホテルフジタ福井、福井

9) 木下 幸恵、筒井 智美、**鬼塚 正義**、白井 昭博、間世田 英明、**大政 健史** "NFKBIZ 発現による高生産 CHO 細胞株の構築と解析",化学工学会第 77 年会, K301, CD-ROM、一ページ、2013 年 3/17-19、大阪大学、豊中

10) 野田 真広、龍澤 実季、**鬼塚 正義**、白井 昭博、間世田 英明、**大政 健史** "トレハロース添加による CHO 細胞培養過程の抗体凝集抑制",化学工学会第 77 年会, K302, CD-ROM、一ページ、2013 年 3/17-19、大阪大学、豊中

11) 森下 明彦、高橋 舞、**鬼塚 正義**、白井 昭博、間世田 英明、**大政 健史** "組換えバイオ医薬品生産 CHO 細胞株構築過程における染色体不安定性解析",化学工学会第 77 年会, K303, CD-ROM、一ページ、2013 年 3/17-19、大阪大学、豊中

2.2 活動成果による受賞

これらの結果として、本プロジェクト関連で下記の学生が受賞された。なお、これ以外に大政は、徳島大学工学部長表彰ならびに Young Asian Biochemical Engineers Community (YABEC) Plaque of Appreciation（Asian Federation of Biotechnology (AFOB)）を受賞している。

1. 野田 真広 公益社団法人日本生物工学会西日本支部学生賞 2013 年 12 月

2. 高橋 舞, 森下 明彦, **鬼塚 正義**, 白井 昭博, 間世田 英明, **大政 健史** “Chinese hamster ovary 細胞株における染色体不安定性解析と抗体生産への応用”第６５回日本生物工学会, 1P-221, 要旨集 p.73、2013 年、9/18-20、広島国際会議場、広島（日本生物工学会セルプロセッシング計測評価研究部会優秀学生発表賞）

3. 筒井智美, Kyoung Ho Lee, **鬼塚 正義**, 白井 昭博, 間世田 英明, **大政 健史** “細胞周期エンジニアリングによる Chinese hamster ovary (CHO) 細胞における効率的な遺伝子増幅システムの構築” 日本動物細胞工学会 2013 年度大会（JAACT2013）要旨集 p.50, 2013 年 7/18-19、ホテルフジタ福井、福井 (最優秀発表賞、66 件中第一席)

2.3 活動成果の論文化

本提案プロジェクトの直接の成果として、下記の論文を作成し、投稿受理された。

1. **Masayoshi Onitsuka***, Akira Kawaguchi, Ryutaro Asano ,Izumi Kumagai, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake, and **Takeshi Omasa** "Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture" Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume **117**, Number 5, pp. 639-644 (2014).

   N-Glycosylation of therapeutic antibodies contributes not only to their biological function, but also to their stability and tendency to aggregate. Here, we investigated the impact of the glycosylation status of an aggregated antibody that accumulated during the bioreactor culture of Chinese hamster ovary cells. High-performance liquid chromatography analysis showed that there

was no apparent difference in the glycosylation patterns of monomeric, dimeric, and large aggregated forms of the antibody. In contrast, lectin binding assays, which enable the total amounts of specific sugar residues to be detected, showed that both galactose and fucose residues in dimers and large aggregates were reduced to 70-80% of the amount in monomers. These results strongly suggest that the lack of N-linked oligosaccharides, a result of deglycosylation or aglycosylation, occurred in a proportion of the dimeric and large aggregated components. The present study demonstrates that glycosylation heterogeneities are a potential cause of antibody aggregation in cell culture of Chinese hamster ovary cells, and that the lack of N-glycosylation promotes the formation of dimers and finally results in large aggregates. (モノクローナル抗体の抗体の凝集体における N-型糖鎖構造の解析を行った. N-型糖鎖は安定性や凝集性に影響を与える事が知られていたが, 実際の生産プロセスで生じる抗体凝集と糖鎖構造の関連は不明のままであった. 単量体抗体と比較した所, 凝集抗体では微細な糖鎖構造に差はない一方で, N-型糖鎖自体の付加量が減少している事を見出した. この結果から N-型糖鎖の欠損による安定性の減少が凝集の原因である事を報告した.)

2. Masayoshi Onitsuka*, Miki Tatsuzawa, Ryutaro Asano, Izumi Kumagai, Akihiro Shirai, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa "Trehalose suppresses antibody aggregation during the culture of Chinese hamster ovary cells" Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume **117**, Number 5, pp. 632-638 (2014).

The aggregation of therapeutic antibodies during the manufacturing process is problematic because of the potential risks posed by the aggregates, such as an unexpected immune response. One of the hallmark effects of trehalose, a disaccharide consisting of two alpha-glucose units, is as a chemical chaperone with anti-aggregation activity. In this study, Chinese hamster ovary (CHO) cell line producing a diabody-type bispecific antibody were cultured in medium containing trehalose and the aggregation of the secreted proteins during the culture process was analyzed. An analysis of the various forms of the antibody (monomeric, dimeric, and large aggregates) showed that trehalose decreased the relative content of large aggregates by two thirds. The aggregation kinetics indicated that trehalose directly inhibited the polymerization and aggregation steps in a nucleation-dependent aggregation mechanism. Moreover, both specific and volumetric antibody production were increased in CHO cells cultured in trehalose-containing medium. Thus, the addition of trehalose to recombinant CHO cell cultures would offer a practical strategy for quality improvement in the production of therapeutic antibodies. (抗体生産 CHO 細胞の細胞培養過程で生じる抗体凝集の形成を防ぐ方法として, 抗凝集作用を持つトレハロースを添加する培養法を提案した. 二重特異性抗体 Ex3-scDb-Fc 産生細胞をトレハロースを含む培養培地で培養した所, 抗体の生産性が上昇すると共に, 高分子量凝集体の形成が 1/3 に抑制されることを見出した. 凝集形成過程の速度論的解析から凝集抑制メカニズムを提案した.)

3. さいごに

本提案プロジェクトにおいては、単なる研究だけではなく、国プロジェクトの立ち上げのための徳島大学を参画機関とする産学連携をめざした大型プロジェクト立案を視野に入れた活動を行った。その結果、本プロジェクトの産学連携活動を継続していくことにより、本学も中核参画機関となる大型プロジェクトの採択につながった。学側においては産業側のニーズを十分にくみ取った研究開発が必要とされ、産業側には、学に対する目的基礎研究を推進すべく、強いメッセージが必要であると考えられる。