

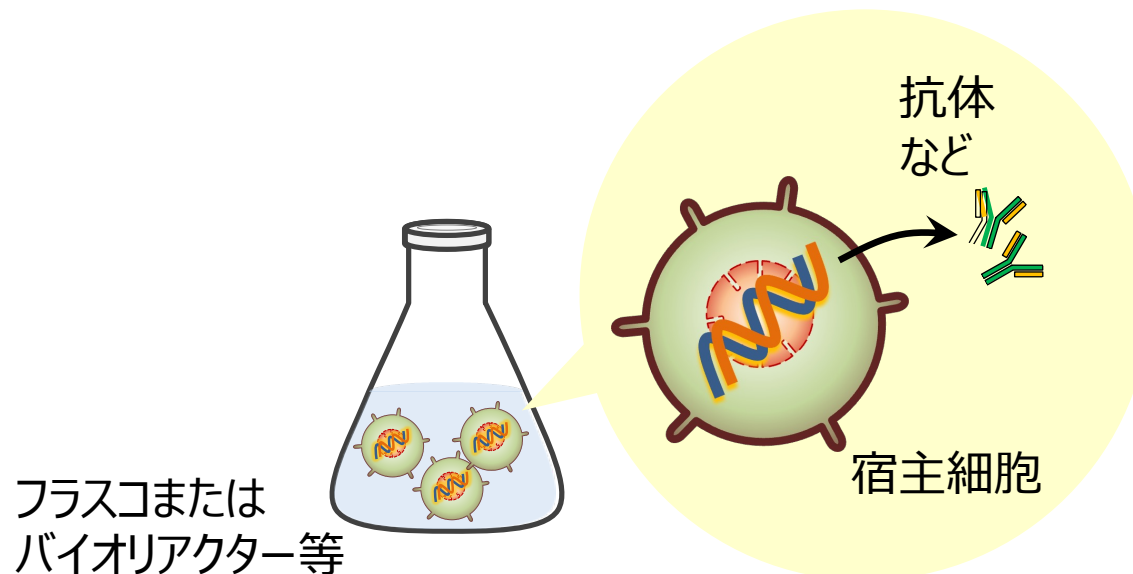
安定かつ長期的に タンパク質を生産可能な細胞

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科
准教授 草森 浩輔

2023年11月9日 (木)

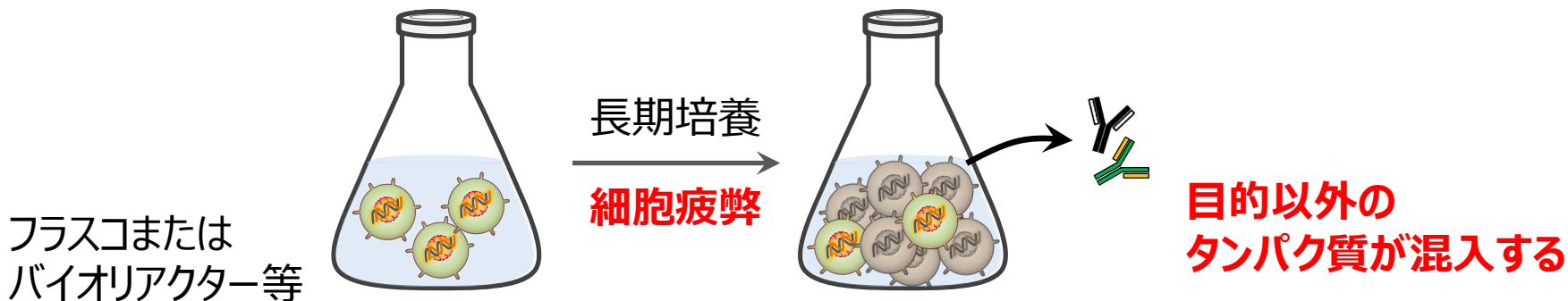
背景：タンパク質の生産

タンパク質は、一般的には人体の生命活動に必須とされる炭水化物や脂質と並ぶエネルギー産生栄養素の一つであるが、その特性や機能は多岐に渡り、疾患治療を目的とした医薬品に限らず、産業用酵素や食品用酵素、バイオエネルギーとしても幅広く応用される。これらタンパク質を生産するプロセスのうち、細胞を利用したタンパク質生産プロセスにおいては、目的タンパク質を産生する遺伝子改変細胞（宿主細胞）を利用し、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）などが汎用されている。



課題：タンパク質の生産における課題

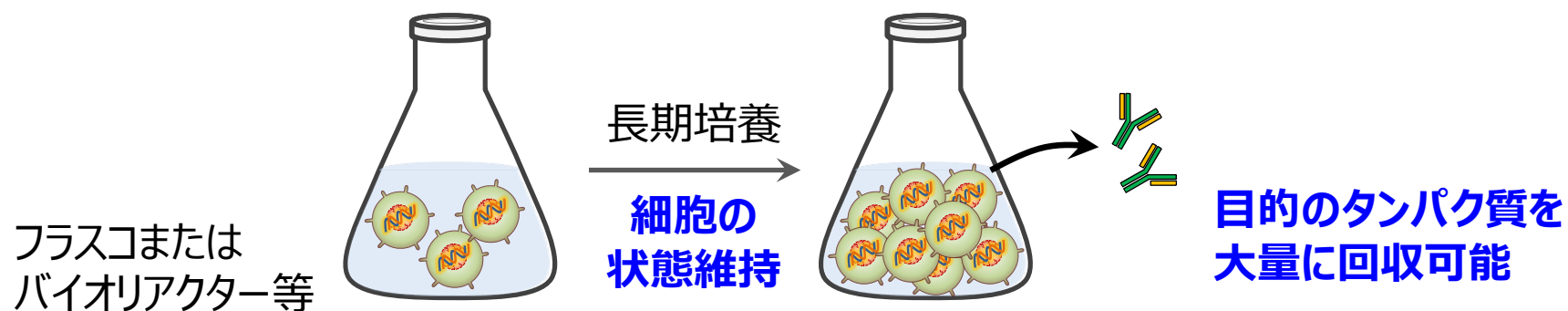
これまでに、宿主細胞を利用して様々なタンパク質が生産されてきた一方で、その工程においては多くの課題が残されている。中でも、「得られるタンパク質の純度」はタンパク質生産プロセスにおいて重要な課題である。従来のタンパク質生産プロセスにおいては、目的タンパク質を産生する宿主細胞が培養期間中に疲弊することが報告されており、培養初期と培養後期では産生されるタンパク質の純度が著しく低下することが知られている。本課題を解決しようとする取り組みや技術開発は多数報告されており、その市場ニーズは高いと考えられるものの、未だ具体的な解決策はないのが現状である。



仮説：技術開発の必要性

したがって、タンパク質を産生する宿主細胞の疲弊を回避し、純度の高いタンパク質を長期的に産生することができれば、半永久的な目的タンパク質の大量生産が可能となる。

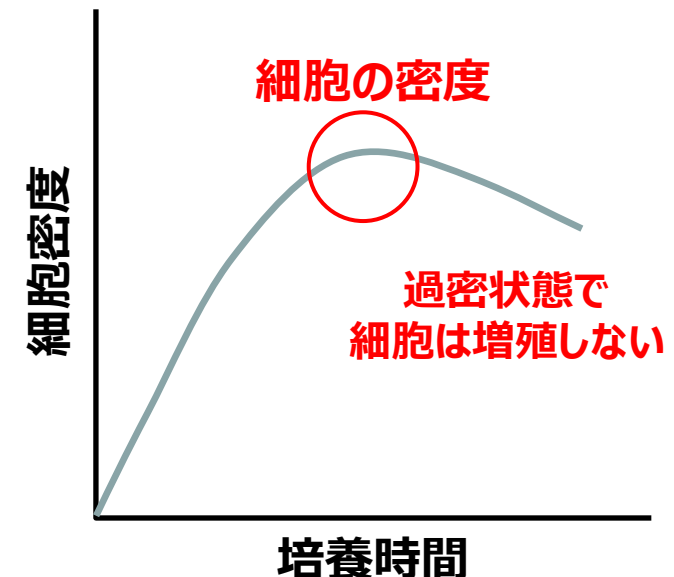
また、タンパク質生産プロセスにおける生産効率とコストを著しく低下させるとともに、省エネに大きく貢献し、プロセスの効率化によるCO₂削減も期待できる。



着眼点：従来のタンパク質生産方法

従来のタンパク質生産方法は、宿主細胞を培養開始後は、継代等を実施せずに一定期間培養を継続する方法が主流である。一方で、**培養時間とともに細胞は増殖し続けるため、一定期間以降は細胞密度が過密状態になる（図）**。実際、タンパク質を生産する宿主細胞の増殖に関する報告を確認すると、その多くが培養後期で細胞を過密状態で培養を継続している。

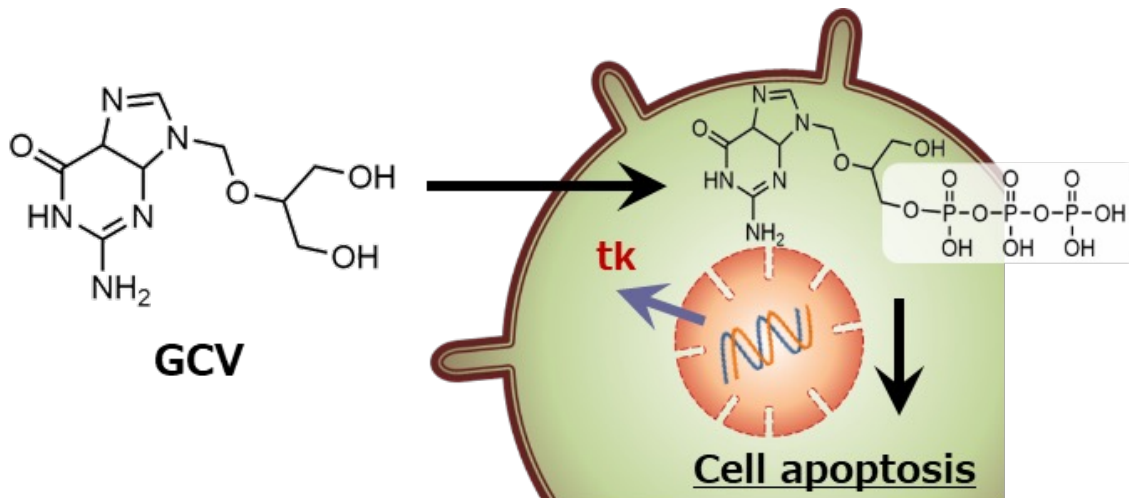
一般に、過密状態の細胞は機能が低下することが知られており、これにより、産生するタンパク質の変異が起こる可能性がある。したがって、**細胞を過密状態にせず、一定の細胞数を維持すれば、高純度なタンパク質を長期的に産生できる**と考えた。



これまでに開発した技術：自殺遺伝子を利用した細胞増殖制御

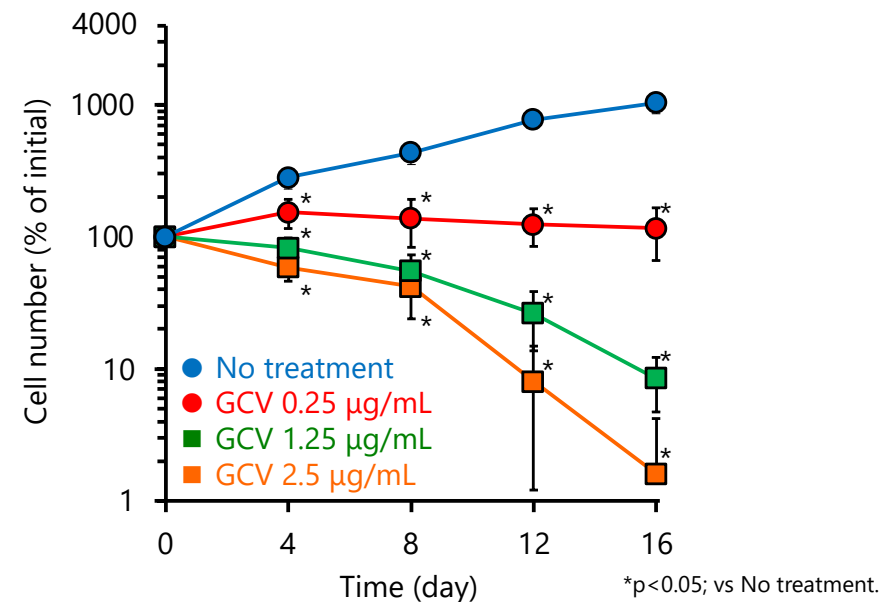
自殺遺伝子は、特定の薬物を代謝することで、細胞のアポトーシスを誘導する代謝物を産生する酵素をコードする遺伝子である。これまでに我々は、**自殺遺伝子を発現する細胞に特定の薬物や化合物を添加することで、選択的にアポトーシスが誘導できることを報告し、その濃度を調整することで細胞の増殖を一定に維持することに成功した。**

自殺遺伝子発現細胞の細胞死メカニズムの例



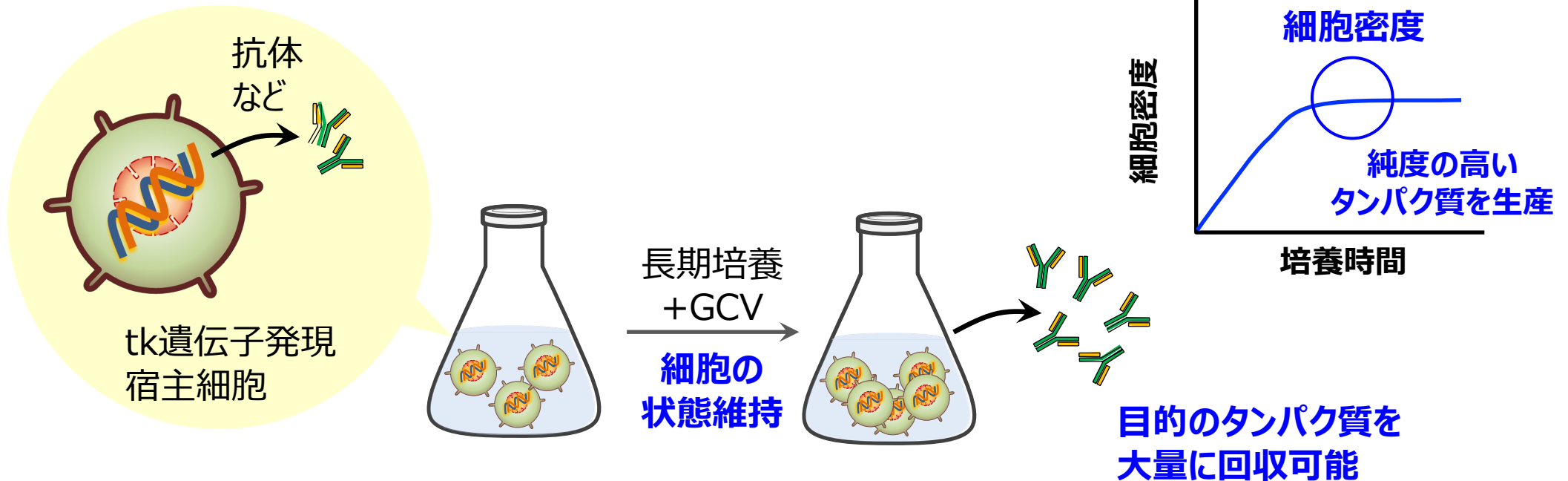
tk: 単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子, 自殺遺伝子の一種
GCV: ガンシクロビル, tk遺伝子発現細胞を特異的に死滅させる化合物

*tk遺伝子を発現するインスリン産生細胞を使用



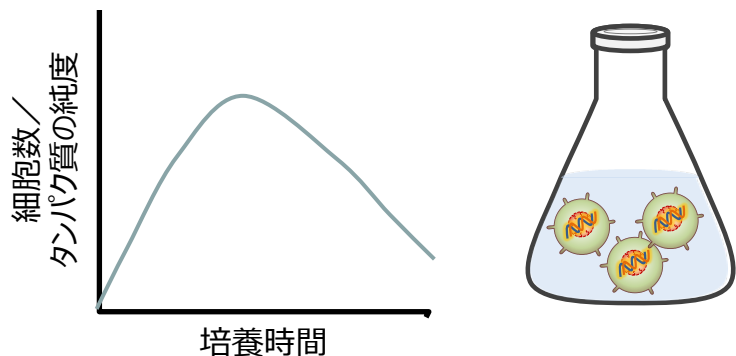
目的：自殺遺伝子を利用することで安定かつ長期的にタンパク質を 生産可能な細胞を開発する。

宿主細胞に自殺遺伝子を導入しておくことで、添加する化合物の
濃度によって培養中の細胞密度を自由に制御可能である。細胞が過
密にならない密度で維持することにより、純度の高いタンパク質を長期
的に生産できる。



従来の技術と今回開発した技術の差異

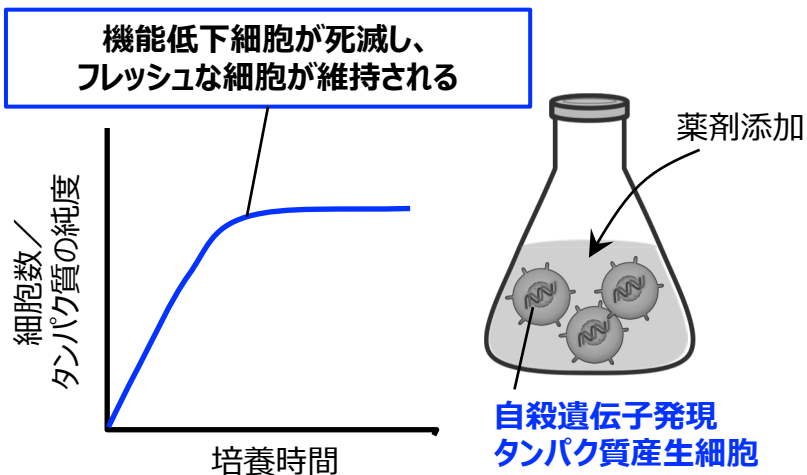
従来のタンパク質の生産プロセス開発



現行の問題点

- ×培養時間の経過とともに細胞の機能が低下する。
 - ×細胞の機能低下に応じて、タンパク質の変異が起こり、純度が低下する。
- ➡培養期間に制限があり、大量生産が困難。
無駄が多く、コストパフォーマンスが悪いプロセス

今回提案するタンパク質の生産プロセス開発

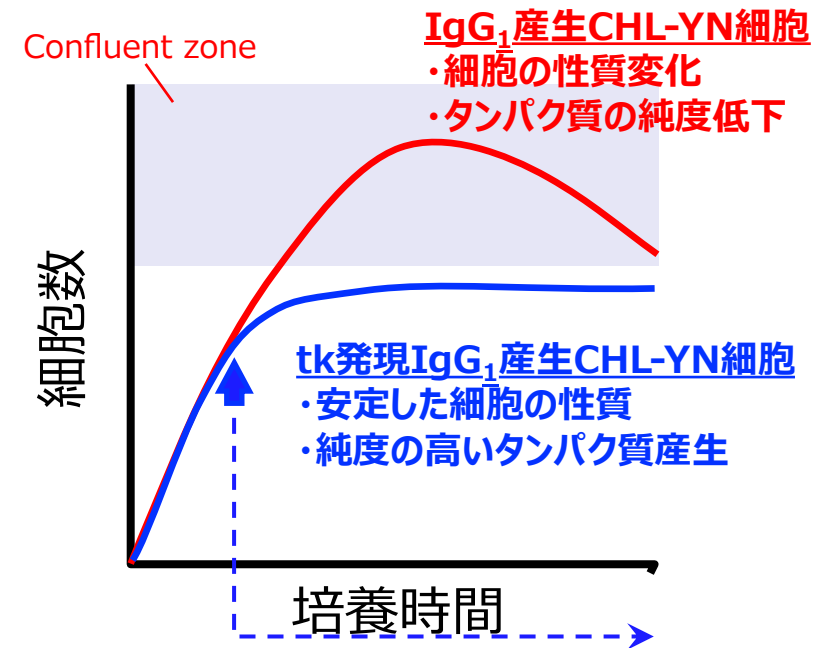
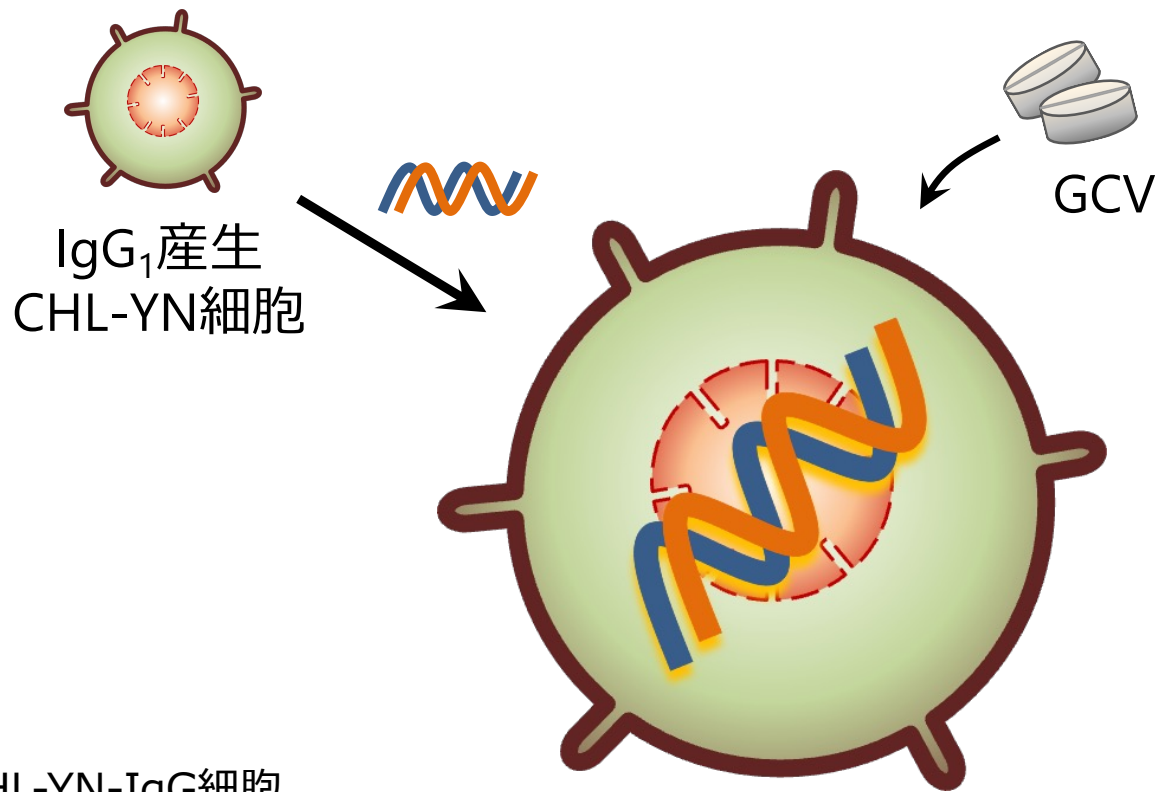


解決策

- 細胞が過密にならない。
 - 細胞の常時リニューアル化により、産生されるタンパク質の純度が高く、長期培養も可能
- ➡培養期間が無制限となり、大量生産が可能。
省エネで、コストパフォーマンスが良いプロセス

研究概要：安定かつ長期的にタンパク質を生産可能な細胞の開発

tk遺伝子を発現するCHL-YN-IgG細胞を樹立し、細胞の増殖を制御することで回収できる抗体の純度を維持可能か評価した。



CHL-YN-IgG細胞
チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)
細胞と同系統のマウス肺から樹立した
細胞. Human IgG₁抗体を産生.

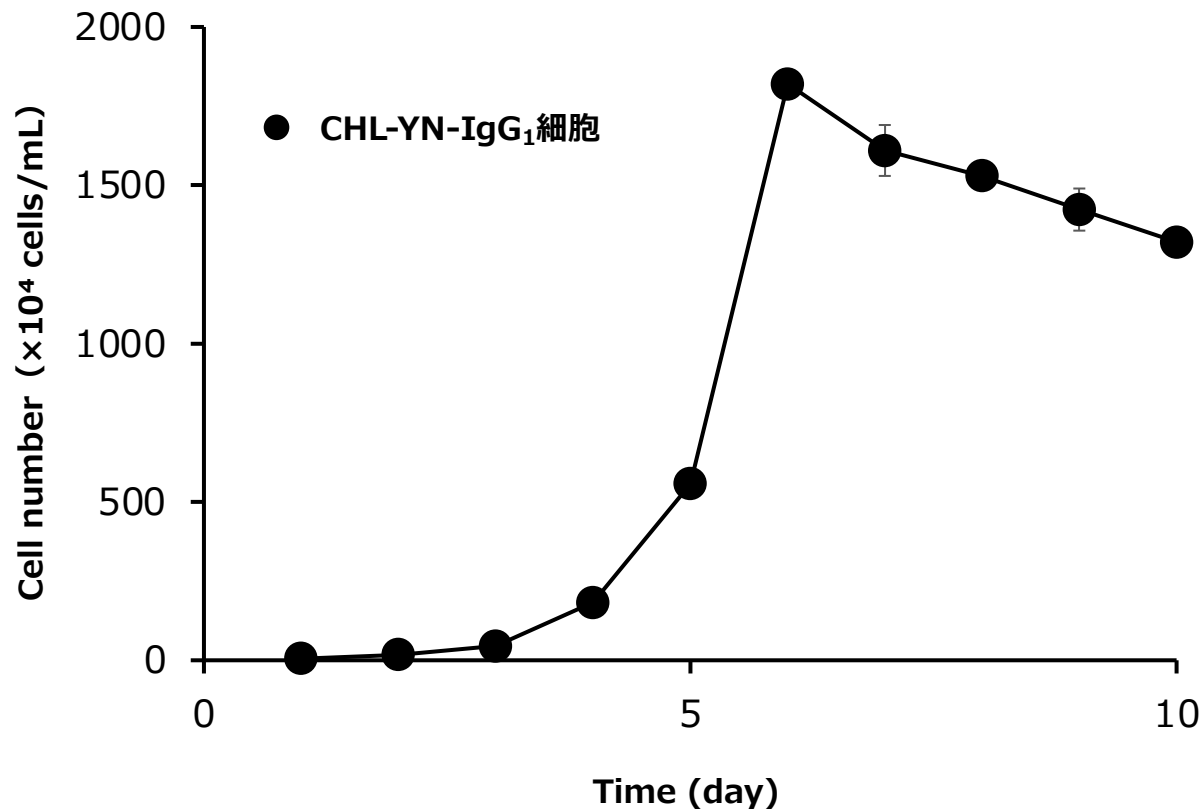
tk発現
IgG₁産生CHL-YN細胞

* 特定のタイミングで、細胞の増殖性を一定に維持可能なGCVを含有する培地で培養

結果1：CHL-YN-IgG₁細胞の増殖性

CHL-YN-IgG₁細胞を125 mLフラスコで培養し、細胞数を経日的に測定した。
培地交換は毎日実施した。

初期細胞数： 5×10^4 cells/mL, 培地量：20 mL



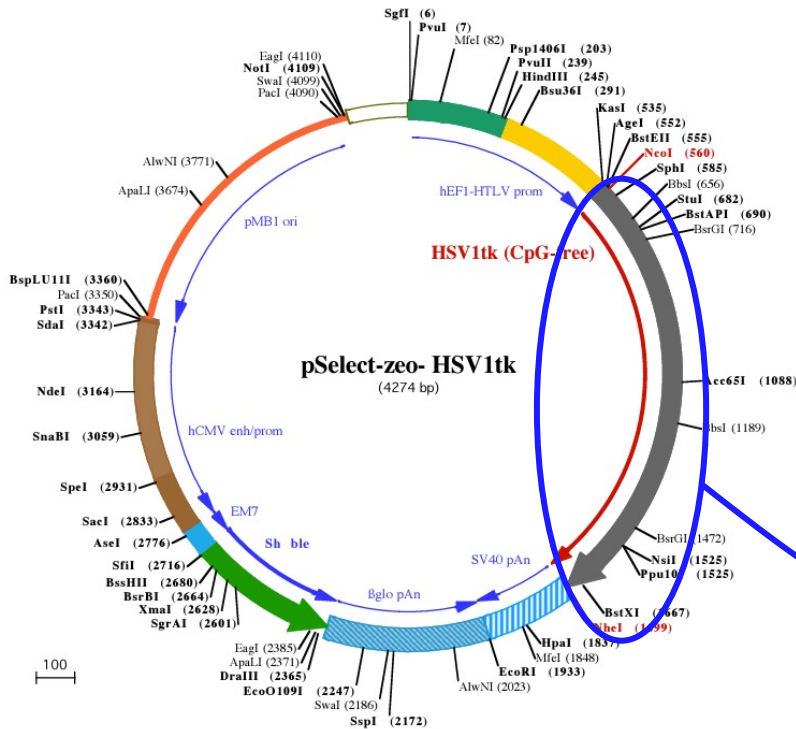
- 培養6日目で細胞数がピークに達し、その後、徐々に細胞数が減少した。
- 培地交換をした場合、細胞数は約 1.5×10^7 cells/mLで維持された。

CHL-YN-IgG₁細胞は長期培養において過密状態の増殖プロファイルを示した。

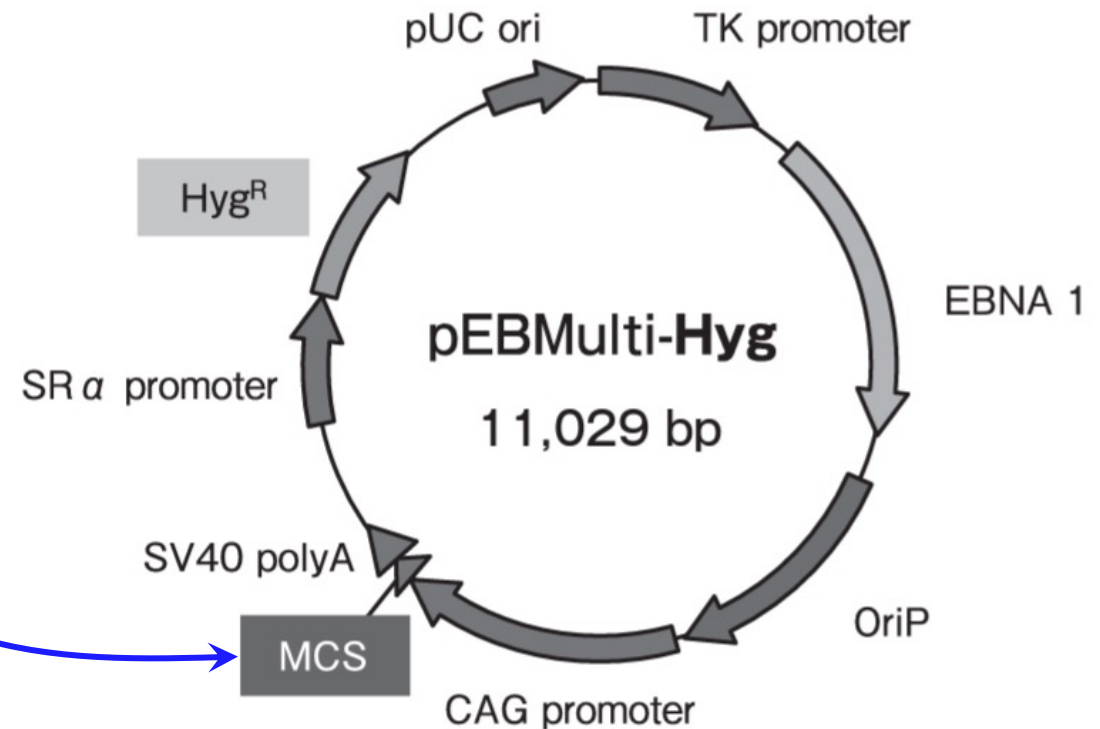
結果2 : CHL-YN-IgG₁細胞に遺伝子導入したプラスミドの情報

pSELECT-zeo-HSV1tk plasmid (市販品)

pEBMulti-Neo (市販品 ; エピゾーマル)



<https://www.invivogen.com/pselect-zeo-hsv1tk>



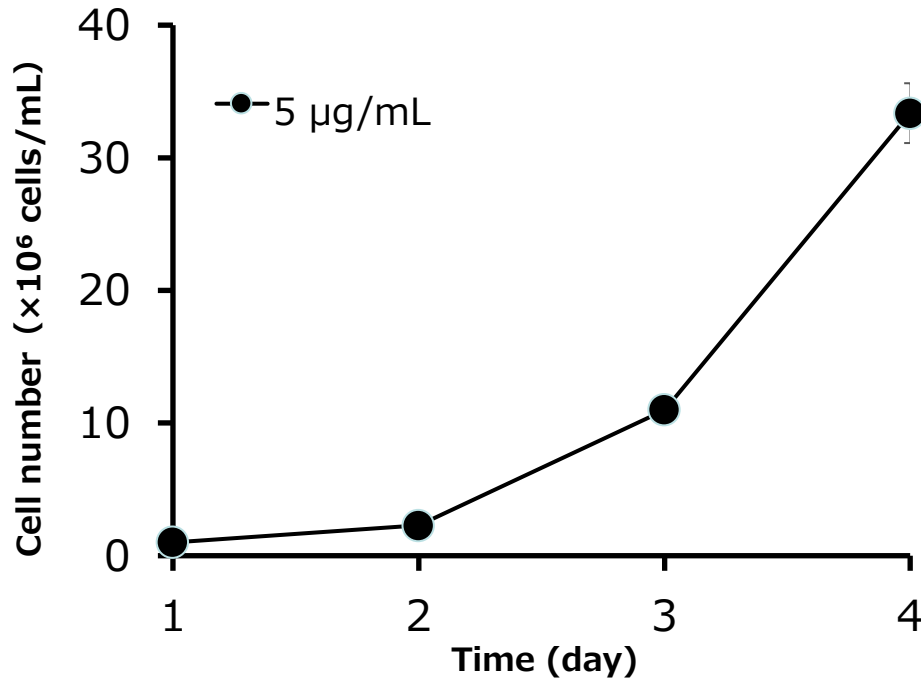
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0105-0812.html>

**pEBMulti-HSVtk plasmidを構築し、
薬剤選択によりtk遺伝子の安定発現株を樹立した。**

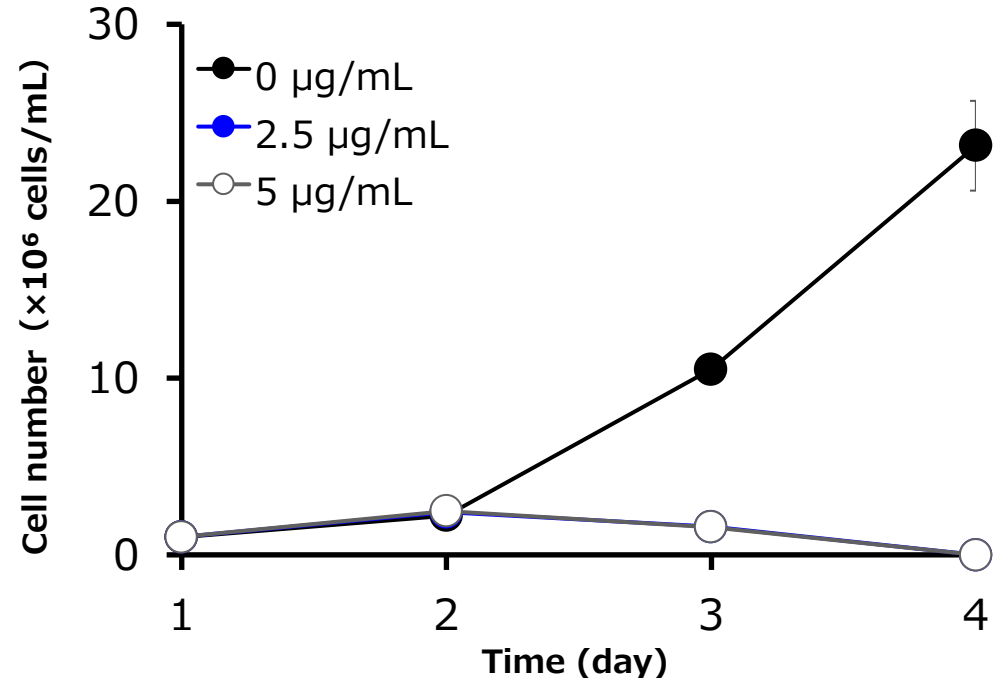
結果3 : CHL-YN-IgG₁-tk細胞のGCV感受性

CHL-YN-IgG₁細胞とCHL-YN-IgG₁-tk細胞（安定発現、以降同様）を6 well plateで培養した. その細胞懸濁液に対し、各種濃度のGCVを添加することで、感受性を評価した.

CHL-YN-IgG



CHL-YN-IgG₁-HSVtk

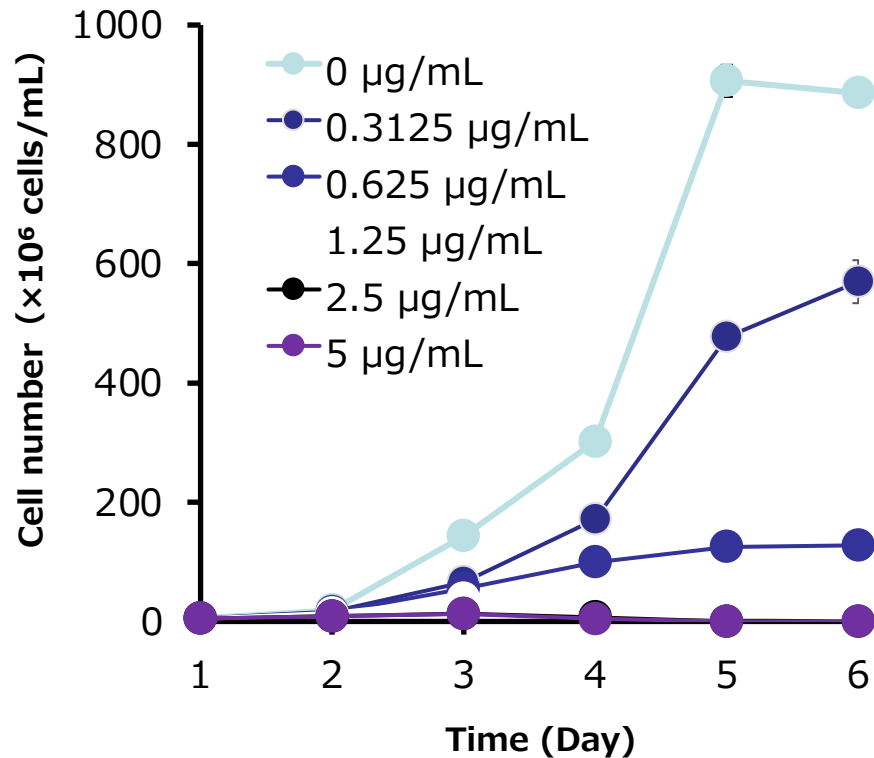


CHL-YN-IgG-HSVtk細胞はGCVに反応して死滅した.

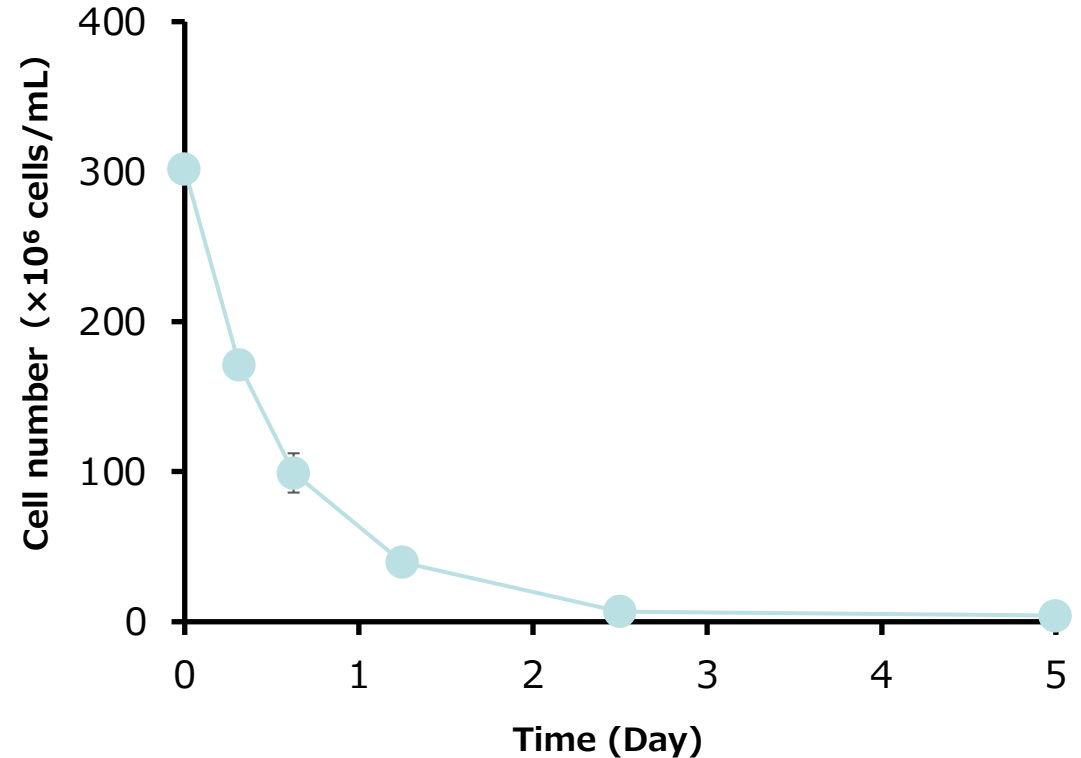
結果4：CHL-YN-IgG₁-tk細胞の増殖制御

各種濃度のガンシクロビルを含有する培地でCHL-YN-IgG-tk細胞を培養し（6 well plate）、細胞数を経時的に評価した. n=3

経日的な細胞数変化（濃度依存性）



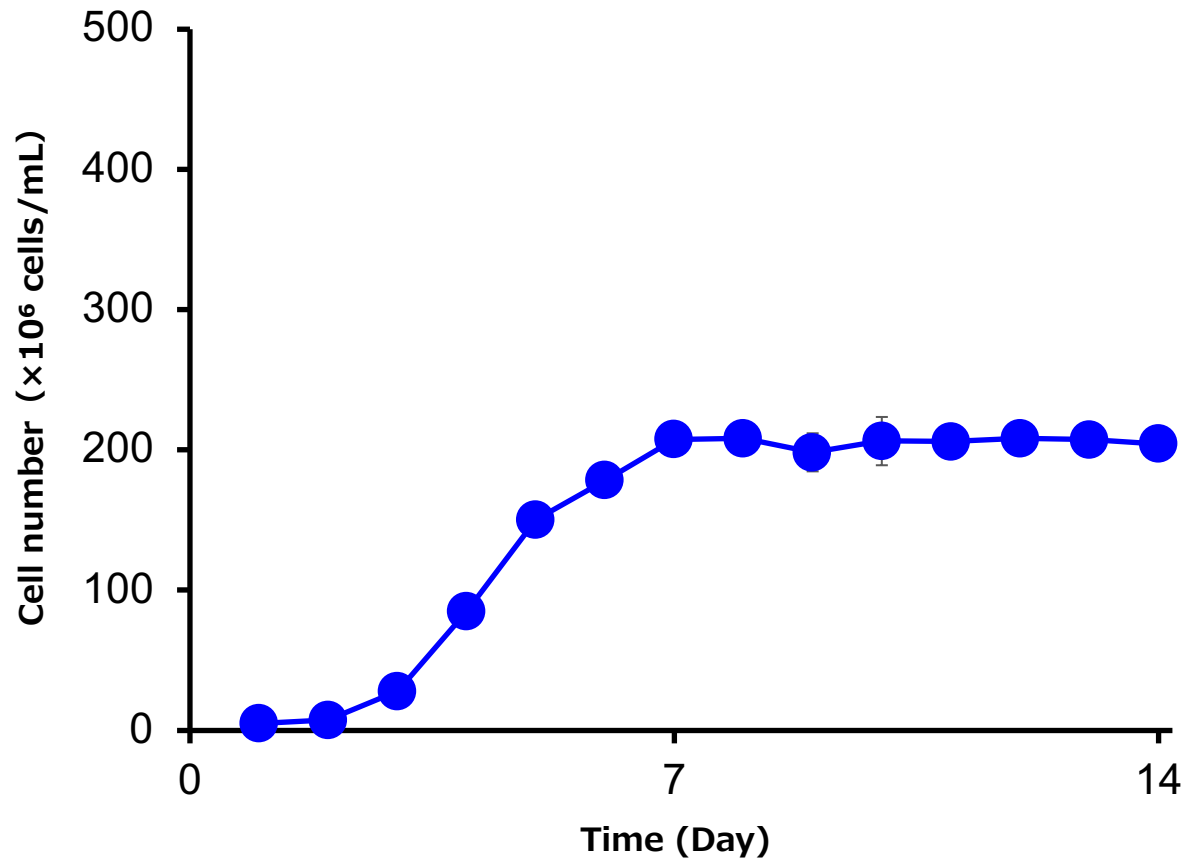
72時間培養後の細胞数（濃度依存性）



GCV濃度依存的に細胞が死滅した.

結果5 : CHL-YN-IgG₁-tk細胞の増殖制御2

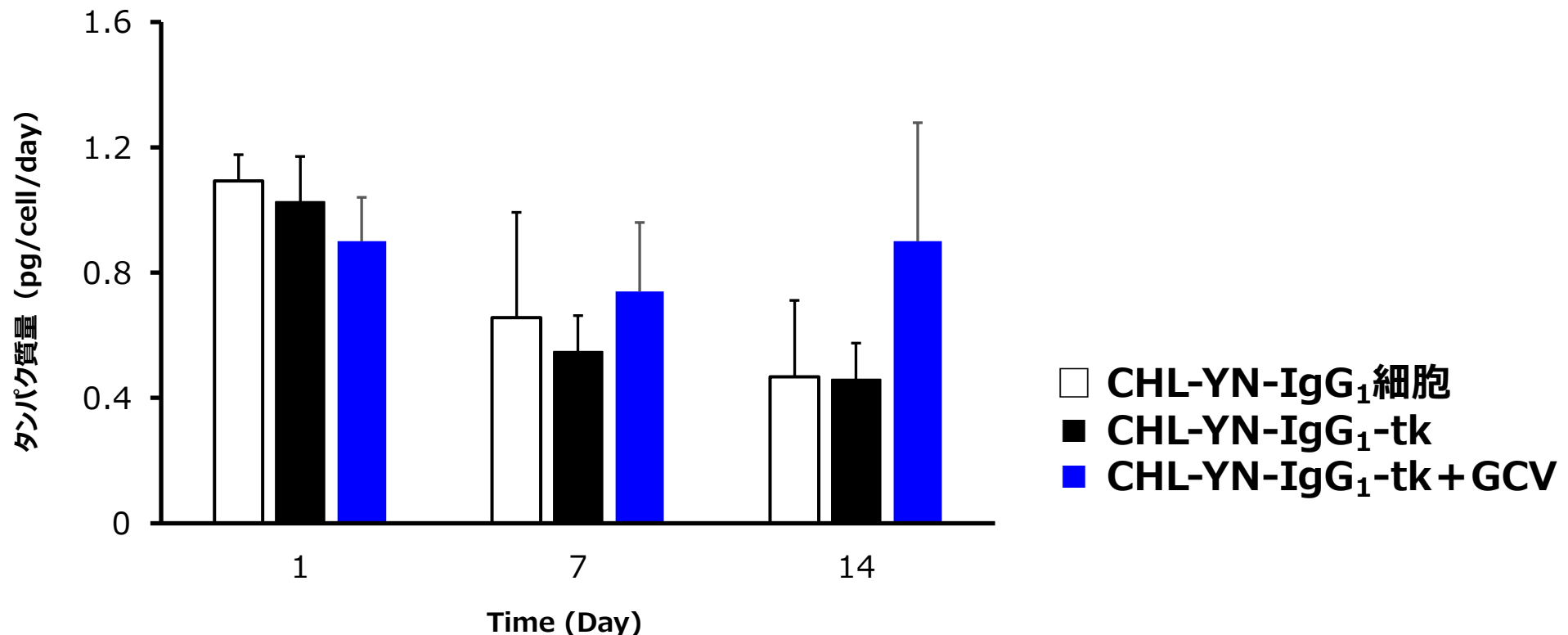
0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のガンシクロビルを含有する培地でCHL-YN-IgG-tk細胞を培養し (6 well plate) 、細胞数を経時的に評価した. n=3.



0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GCVにおいて細胞数が一定に維持された。
薬剤添加による細胞数の制御に成功した。

結果6：CHL-YN-IgG₁-tk細胞のタンパク質産生量

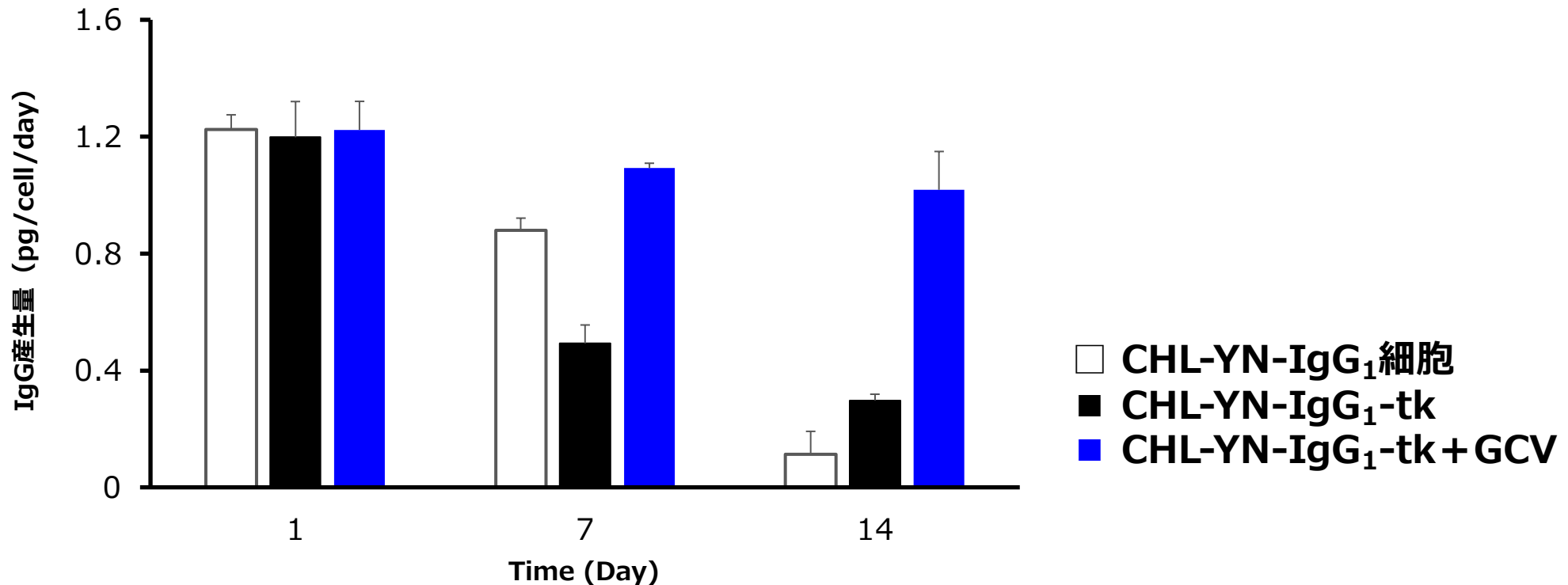
CHL-YN-IgG細胞、CHL-YN-IgG₁-tk細胞を14日間培養した。同様の条件で、0.625 μg/mLのGCVを含有する培地でCHL-YN-IgG₁-tk細胞を培養した。Day 1, 7, 14において細胞を回収し、再播種後24時間培養した。その後、培養上清中のタンパク質量をBCAアッセイにより測定した。



細胞数を制御しない場合、細胞が産生するタンパク質量の変化が大きかった。

結果7：CHL-YN-IgG₁-tk細胞のIgG₁産生量

CHL-YN-IgG細胞、CHL-YN-IgG₁-tk細胞を14日間培養した。同様の条件で、0.625 μg/mLのGCVを含有する培地でCHL-YN-IgG₁-tk細胞を培養した。Day 1, 7, 14において細胞を回収し、再播種後24時間培養した。その後、培養上清を回収し、上清中のIgG₁量をIgG₁ ELISA Kitにより測定した。



細胞数を制御することで、IgGを長期的に産生できることが示された。
構造の完全なIgGが産生されている可能性が高い。

まとめ

- tk遺伝子発現CHL-YN-IgG₁細胞を樹立し、GCVに
応答した細胞増殖制御が可能であった。
- 細胞数を制御しない場合、CHL-YN-IgG₁細胞から
産生される細胞あたりのIgG₁量は培養時間とともに減
少した。
- 細胞数を制御することで、CHL-YN-IgG₁細胞から産
生される細胞あたりのIgG₁量を14日以上ほぼ一定に
維持することが可能であった。

従来技術とその問題点

既に実用化されている技術は、

- 培養時間の経過とともに細胞の機能が低下する
- 細胞の機能低下に応じて、タンパク質の変異が起こり、純度が低下する

等の問題があり、培養期間に制限があり、大量生産が困難。無駄が多く、コストパフォーマンスが悪い。

新技術の特徴・従来技術との比較

今回開発した技術は、

- 細胞が過密にならないため、細胞の機能低下が起こらない。
- 細胞の常時リニューアル化により、産生されるタンパク質の純度が高く、長期培養が可能

などの特長があり、培養期間が無制限となり、大量生産が可能。省エネで、コストパフォーマンスが良い。

想定される用途

- **バイオ医薬品の生産**：抗がん剤等の抗体医薬品、ワクチン、酵素
- **バイオ新素材の生産**：ゴム原料、バイオプラスチック、食品添加物や栄養補助食品、化粧品用途
- **バイオ燃料**

実用化に向けた課題

- フラスコを用いた低スケールでの実証であることから、バイオリアクター等を用いた大スケールでの検討が必要である。
- タンパク質産生細胞への遺伝子導入における導入箇所や発現量を制御する必要がある。
- 死細胞が混入するため、除去する必要があるか検討する必要がある。

企業への期待

- **共同で遺伝子導入細胞を開発し、バイオリアクター等を用いた大スケールでの検討。**
- **付加価値の高い、国産のタンパク質産生細胞の開発。**
- **生産されたタンパク質の純度や安定性などの詳細な評価。**

本技術に関する知的財産権

- **発明の名称** : 形質転換体及び目的タンパク質の生産方法
- **出願番号** : 特願2023-181024
- **出願人** : 東京理科大学
- **発明者** : 草森 浩輔、西川元也、尾花 柊、樋上賀一、小林正樹

お問い合わせ先

**東京理科大学
産学連携機構**

TEL 03-5228-7440

FAX 03-5228-7442

e-mail ura@admin.tus.ac.jp