

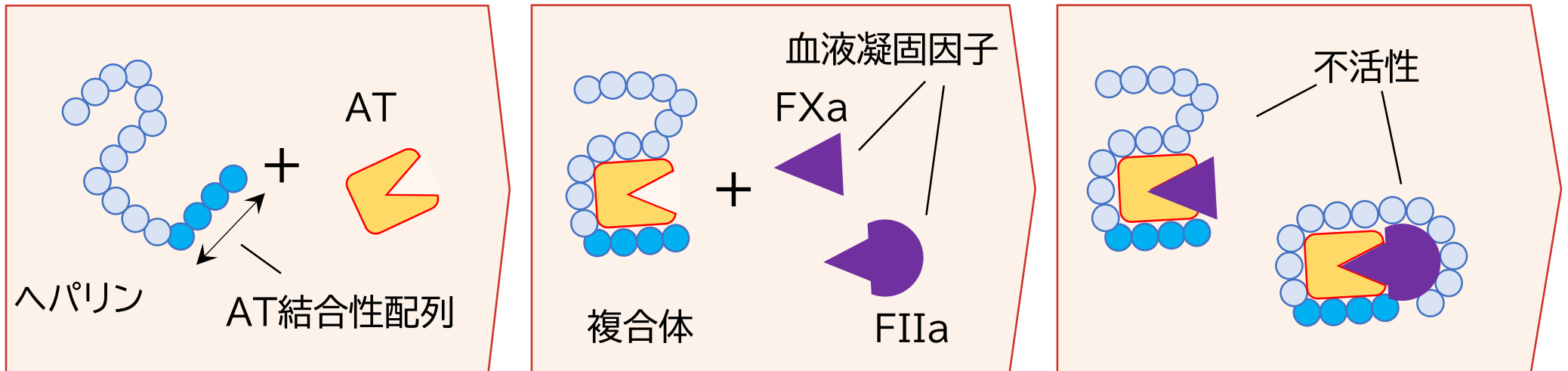
# CHO細胞を用いたバイオヘパリン 生産技術の開発

九州大学 大学院工学研究院 化学工学部門  
教授 上平 正道

## 本技術の背景 ヘパリン

### ヘパリンの性質

- ・ 分子量5～50kDaの硫酸化多糖でグリコサミノグリカン(GAG)に分類される
- ・ 現代医療で最も広く使用されている抗凝血薬の1つ
- ・ 結合性構造を介してアンチトロンビン(AT)と結合し、ATの抗凝固活性を数千倍に高める



### ヘパリンの抗血液凝固薬としての特徴

- ・ 強力で安定した抗凝固作用を支持
- ・ 即効性がある
- ・ 半減期が短く、中和剤が存在する

人工透析や体外循環などの医療現場では必要不可欠

# 本技術の背景 ヘパリン

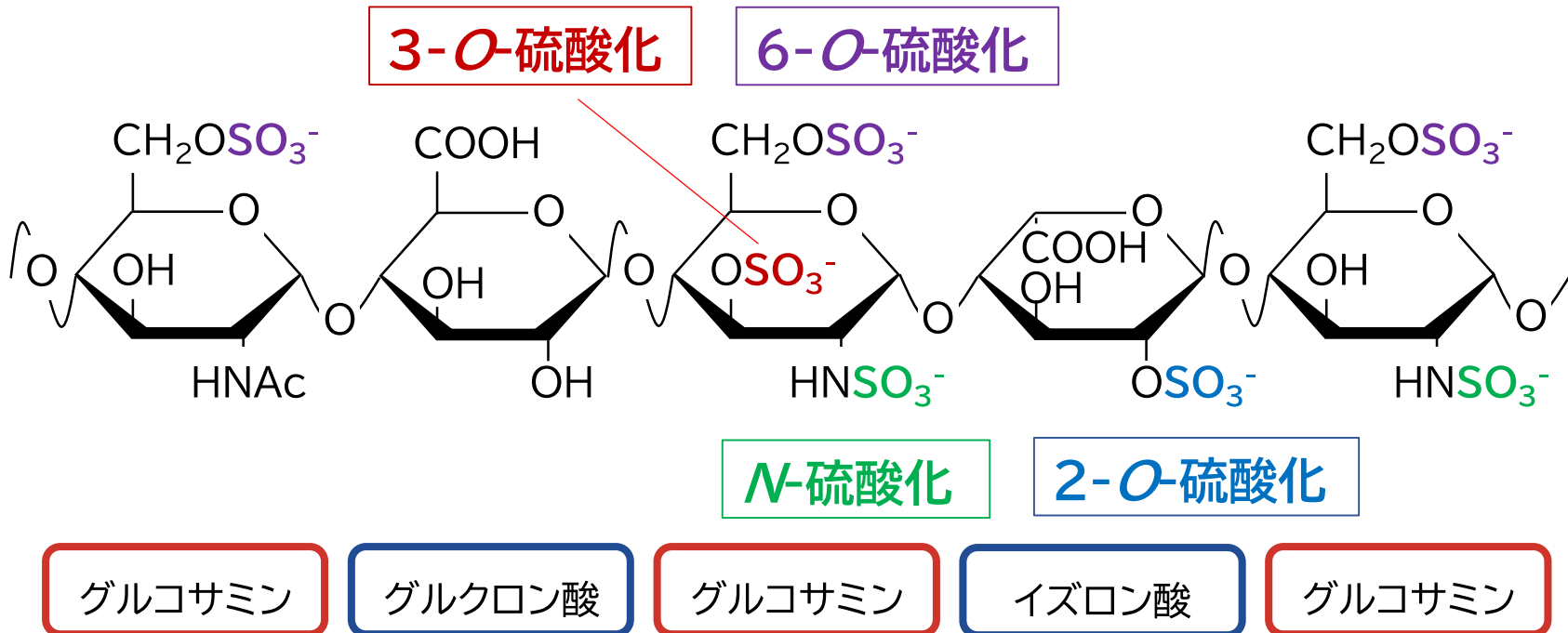
ヘパリンとヘパラン硫酸(ヘパリン類似体)は同一の基本構造を有する

基本構造 グルコサミンとイズロン酸またはグルクロン酸の2糖の繰り返し

硫酸化レベル (2糖あたり) ・ヘパリン: 2.6~2.8個

・ヘパラン硫酸: 0.5~1.5個

硫酸化レベルの高いヘパリンのみが抗凝固活性を示す



## 本技術の背景

現在、**ブタの小腸組織**から調製されている

### 問題点

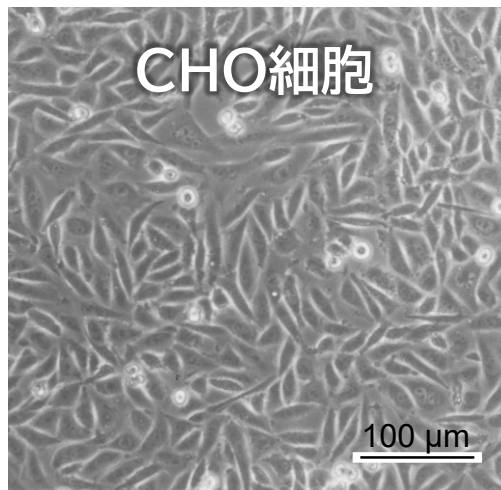
世界のヘパリン原薬の約80%が中国のブタ腸から生産されている

- ・ 人畜共通の感染症のリスク
- ・ 過硫酸化コンドロイチンが混入したことによる医療事故が発生(2008)
- ・ 供給不足のリスク(年間ブタ10億個体が必要)

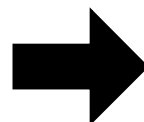
2018年に発生したアフリカ豚熱によって、中国では2019年にブタの飼育頭数が4割減少した

**動物組織を利用しない新しいヘパリン生産技術の開発が求められている**

### CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞による生産法



- ・ バイオ医薬品生産の実績があるホスト
- ・ 浮遊化が可能で、スケールアップが容易
- ・ ヘパリンと基本構造が同じヘパラン硫酸を生産する



**工業的なヘパリン生産が期待できる**

## CHO細胞での生産法における課題①

低硫酸化レベル: 産生糖鎖の硫酸化レベルが非常に低い

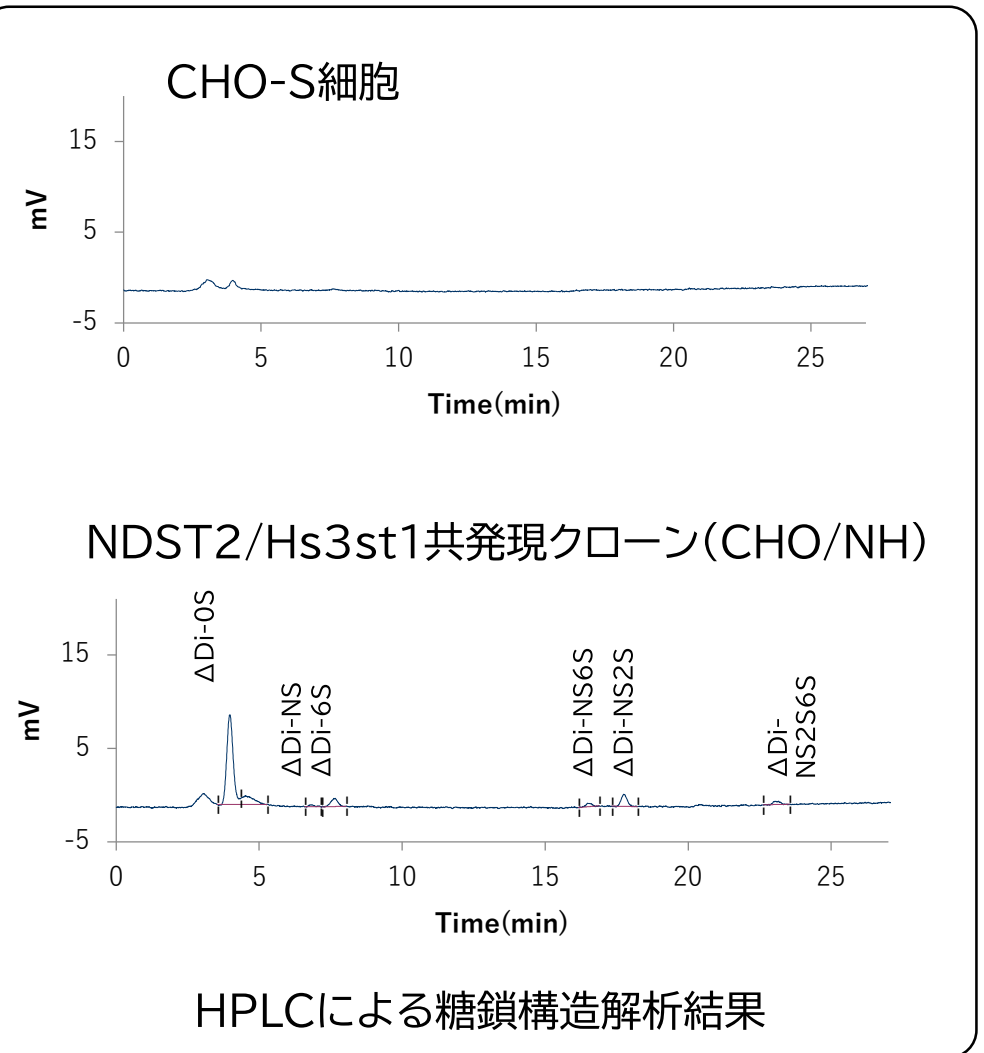
いくつかのヘパリン生合成関連酵素が  
CHO細胞では発現していない



- 不足している硫酸転移酵素  
*NDST2*と*Hs3st1*の遺伝子を導入
- 共発現するCHO細胞(**CHO/NH**)を樹立



**HPLCによる糖鎖構造解析から  
細胞表面上にヘパリン様糖鎖の存在を確認**



## CHO細胞での生産法における課題②

細胞外へ分泌しない: 産生糖鎖が細胞内および細胞表面上のタンパク質に結合している

### 分泌キャリアとして シンデカン(SDC)に着目

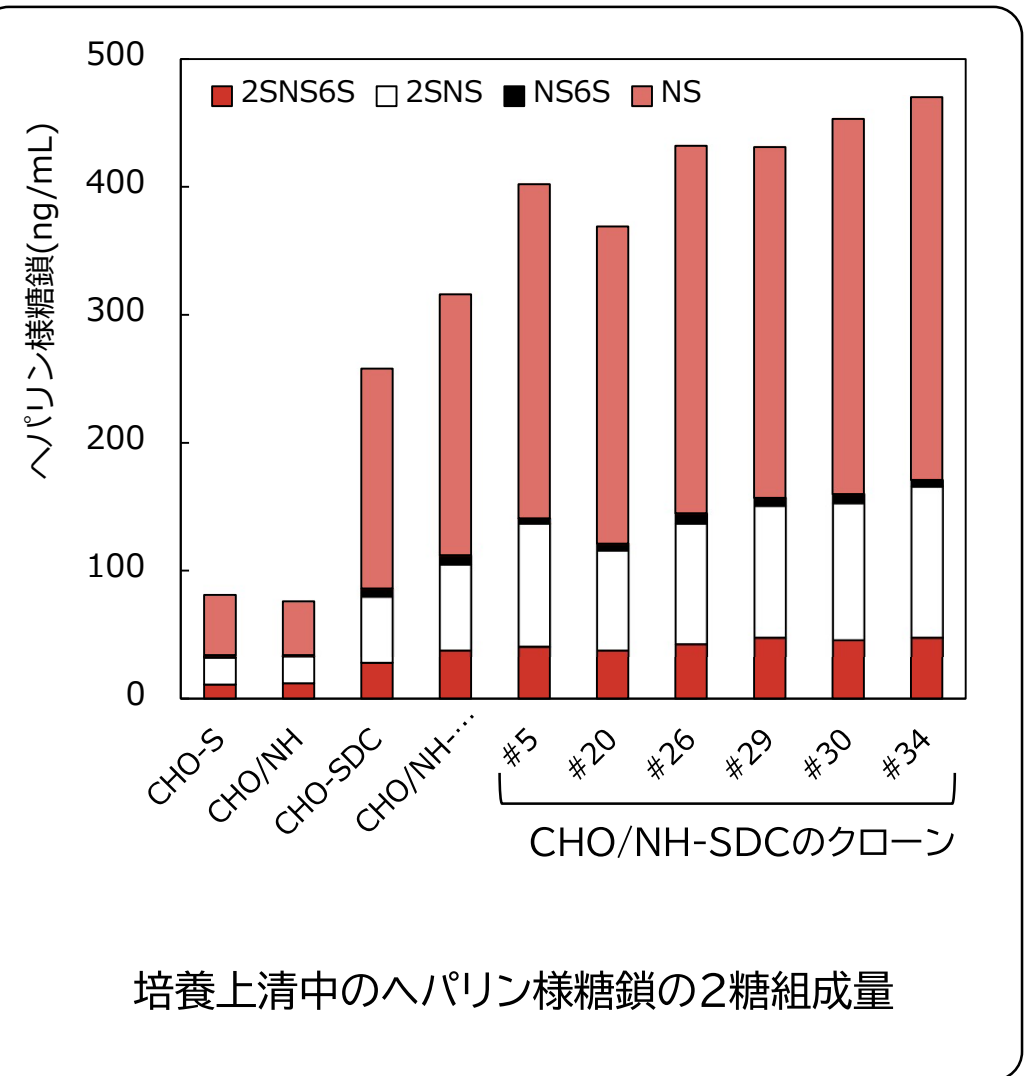
- ・細胞表面に存在する膜タンパク質
- ・ヘパラン硫酸が結合する
- ・SDC細胞外ドメインの遺伝子を合成
- ・CHO/NHへ遺伝子導入



HPLCによる解析において培養上清での  
ヘパリン様糖鎖の顕著な増加を確認

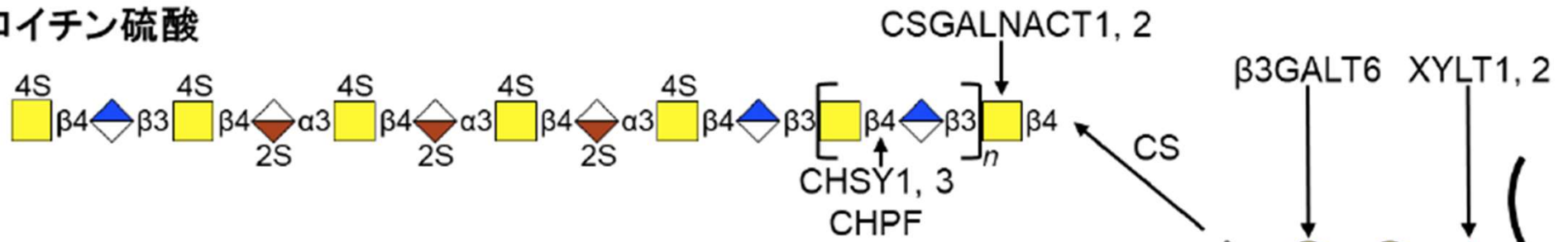
ヘパリン様糖鎖分泌細胞  
(CHO/NH-SDC)を樹立

特願2019-182467

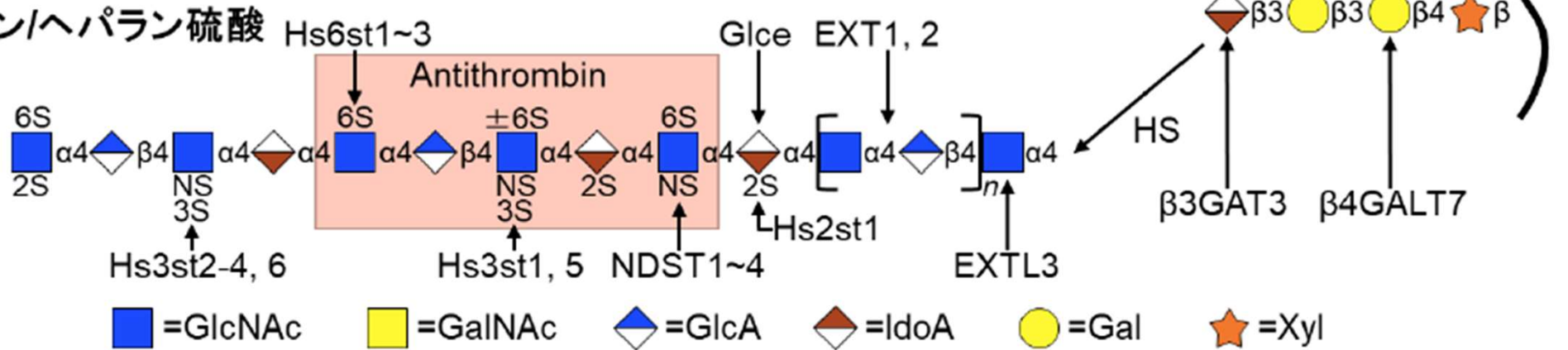


# ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸の生合成に関わる酵素

## コンドロイチン硫酸



## ヘパリン/ヘパラン硫酸



■ =GlcNAc    ■ =GalNAc    ◆ =GlcA    ◇ =IdoA    ● =Gal    ★ =Xyl

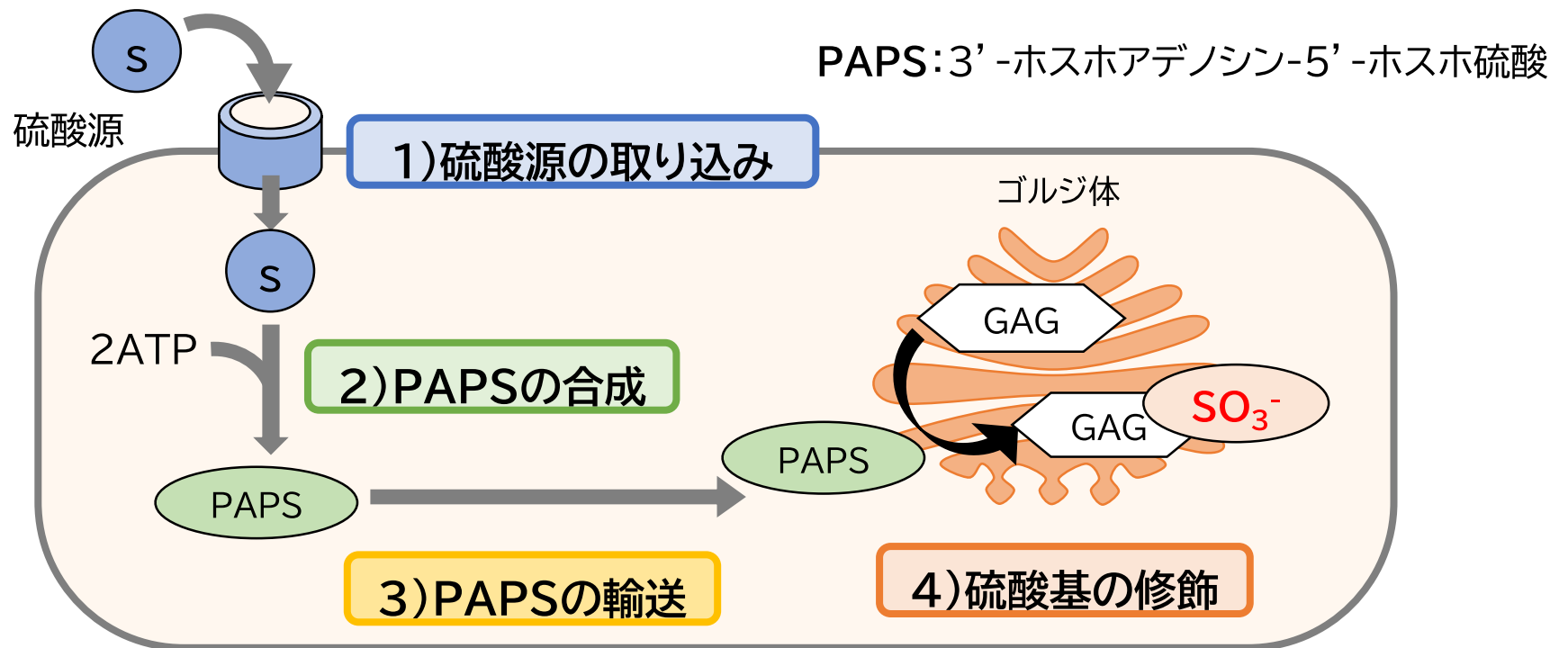
## 研究開発

遺伝子組換えCHO-S細胞の産生ヘパリン様物質

硫酸化レベルはヘパリンの1/6程度、抗凝固活性は 3%程度しかない

→ 実用化に向けて、更に硫酸化レベル・抗凝固活性向上の必要性

細胞内におけるグルコサミノグリカン(GAG)の硫酸化経路



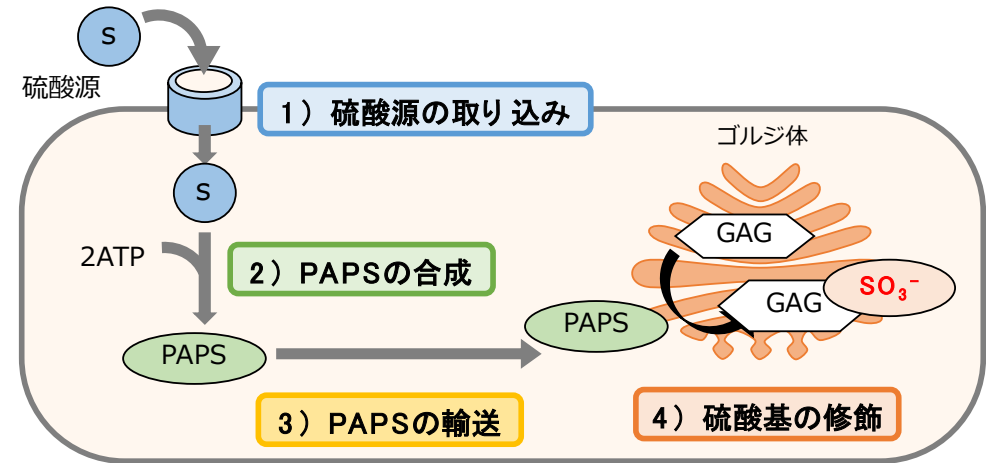
培地成分の改良や遺伝子改変からのアプローチによって高度な硫酸化を達成して高安定かつ高生産可能なヘパリン生産技術の開発を目指した



# 研究開発

## 各ステップに関する遺伝子を導入して硫酸化・抗凝固活性の向上を目指した

ステップ	遺伝子名	機能
①	<i>SLC26A1</i>	細胞内への硫酸イオンの輸送
	<i>SLC26A2</i>	
	<i>SLC13A1</i>	
	<i>SLC13A4</i>	
②	<i>PAPSS1</i>	硫酸イオンからPAPSを合成
	<i>PAPSS2</i>	
③	<i>SLC35B2</i>	PAPSのゴルジ体への輸送
	<i>SLC35B3</i>	
④	<i>Glce</i>	糖鎖の変換
	<i>NDST1</i>	脱 <i>N</i> -アセチル化/ <i>N</i> -硫酸化
	<i>Hs2st</i>	2- <i>O</i> -硫酸化
	<i>Hs6st1</i>	6- <i>O</i> -硫酸化
	<i>Hs6st2</i>	
	<i>Hs6st3</i>	
	<i>Hs3st5</i>	3- <i>O</i> -硫酸化



既に細胞へ導入した実績のある

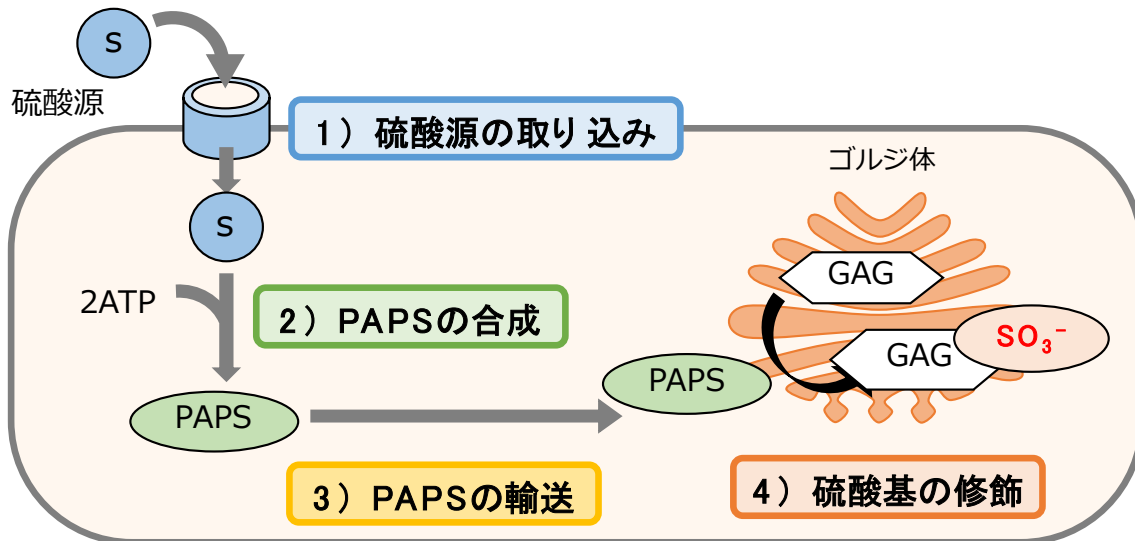
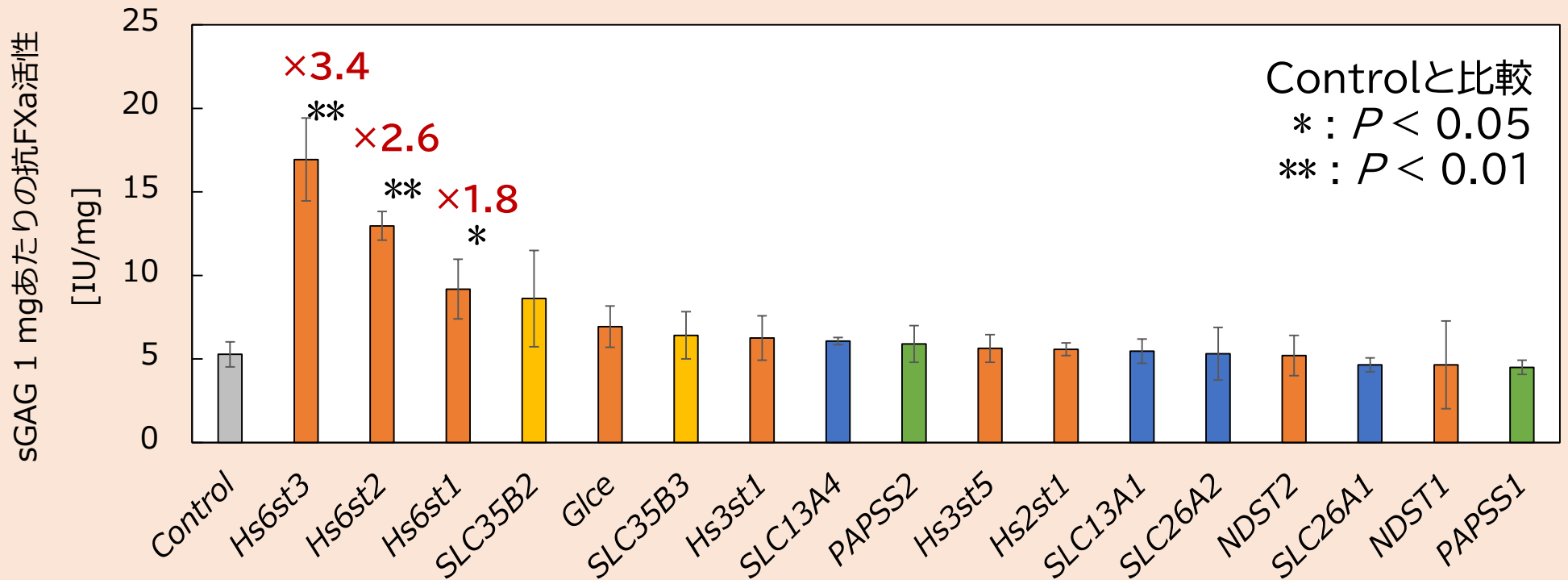
- ・*NDST2*(脱*N*-アセチル化/*N*-硫酸化)
- ・*Hs3st1*(3-*O*-硫酸化)

についても再度導入した

ヘパリン様糖鎖分泌細胞クローンに導入して一過性発現時の培養上清について測定

- ・抗FXa活性
- ・硫酸化グルコサミノグリカン(sGAG)濃度

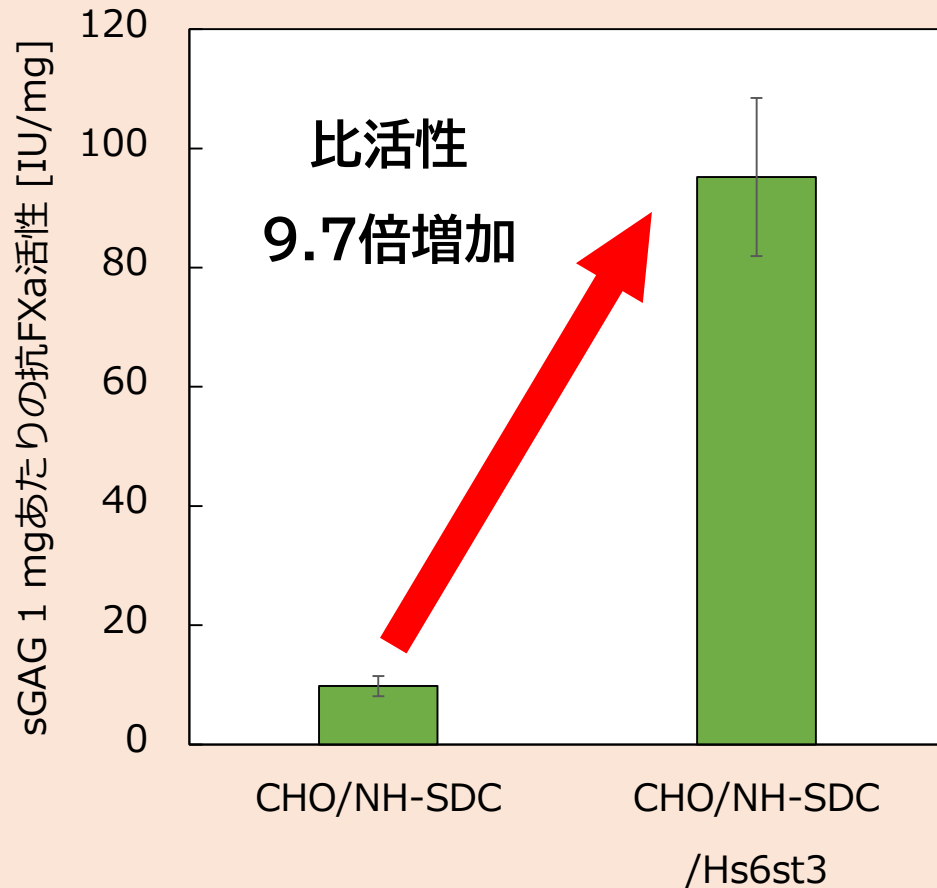
# 研究開発



*Hs6st3*は、これまでに導入した *NDST2*や *Hs3st1*と同様にCHO細胞での発現が確認されていない

***Hs6st3*の過剰発現がCHO細胞でのヘパリン様糖鎖生産に有用**

## 研究開発



sGAG 1 mgあたりの抗FXa活性(比活性)は  
9.7 倍向上して95 IU/mgだった

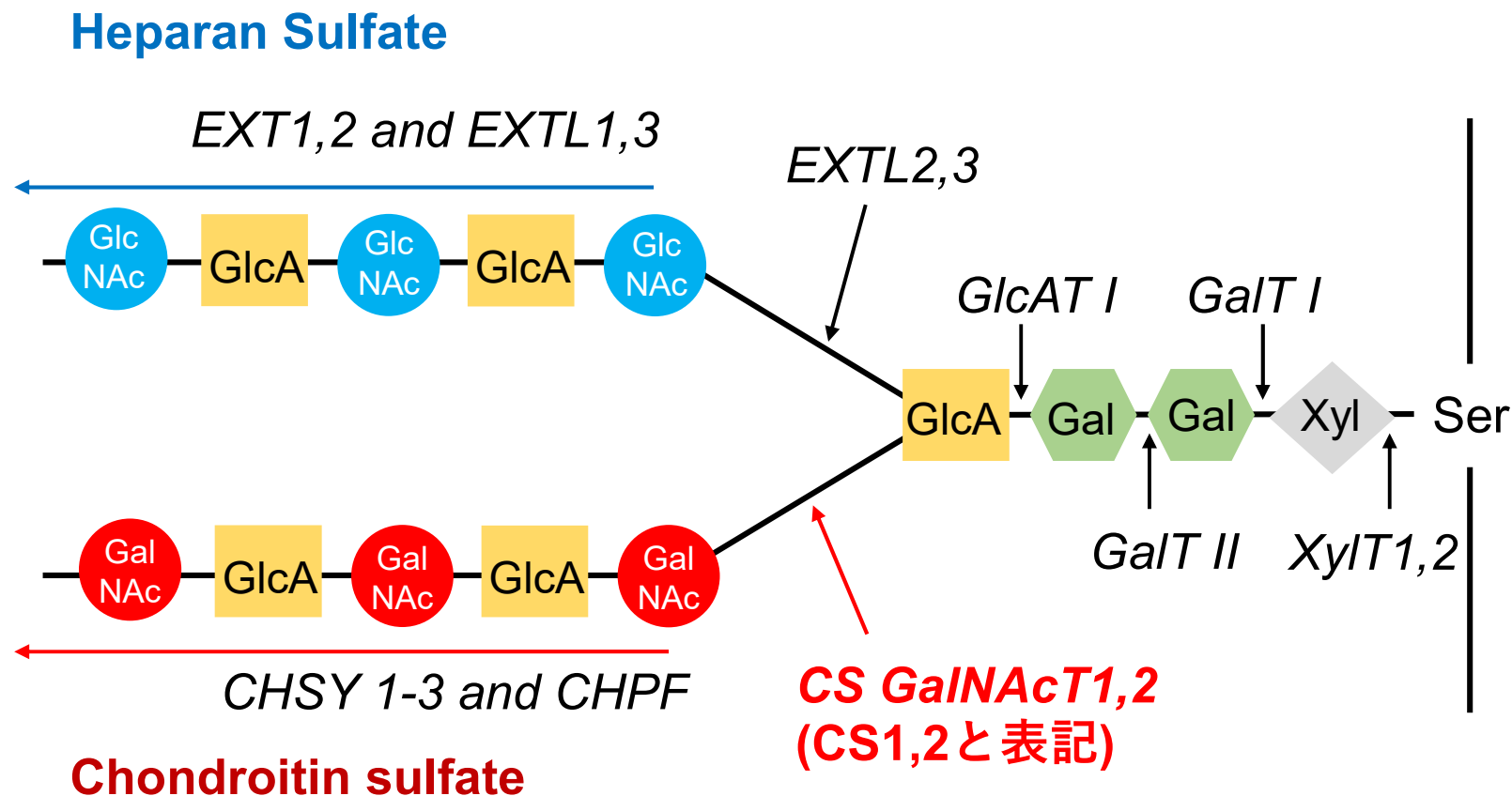
市販ヘパリンの比活性は248 IU/mgであり  
遺伝子組換えCHO細胞産生ヘパリン様物質は  
38% 程度の活性を有している

特願2022-22594

***Hs6st3*の過剰発現によって、CHO細胞が生産するヘパリン様物質の機能を  
よりヘパリンに近づけることができた**

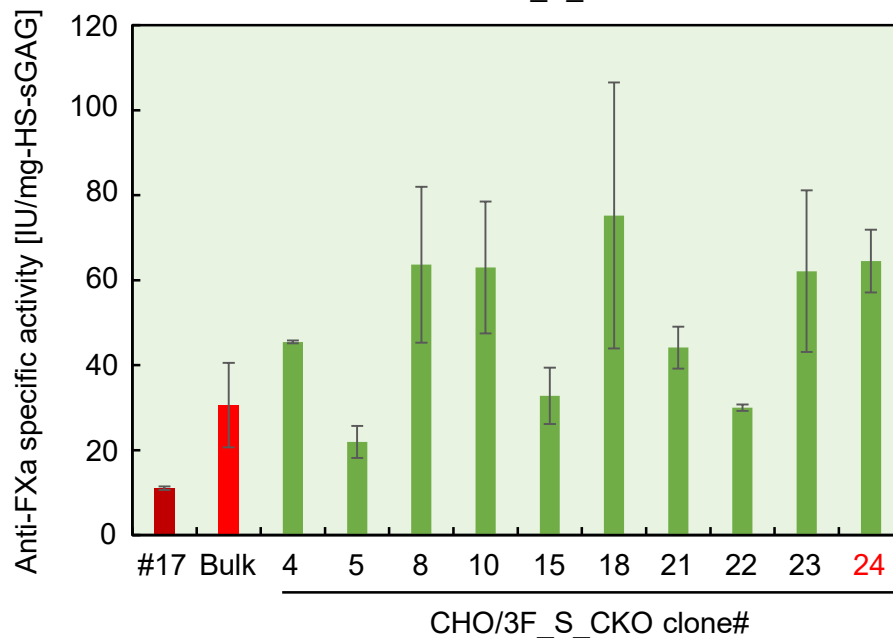
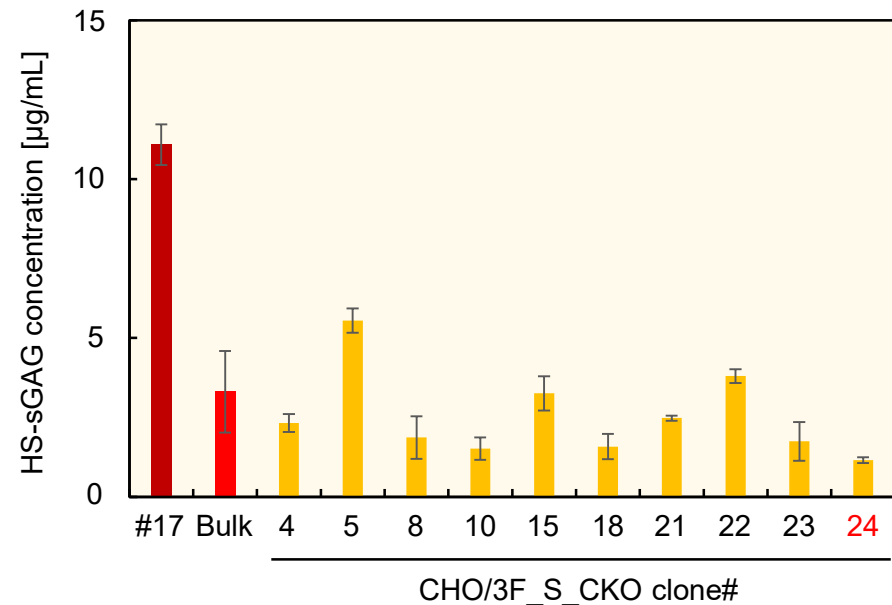
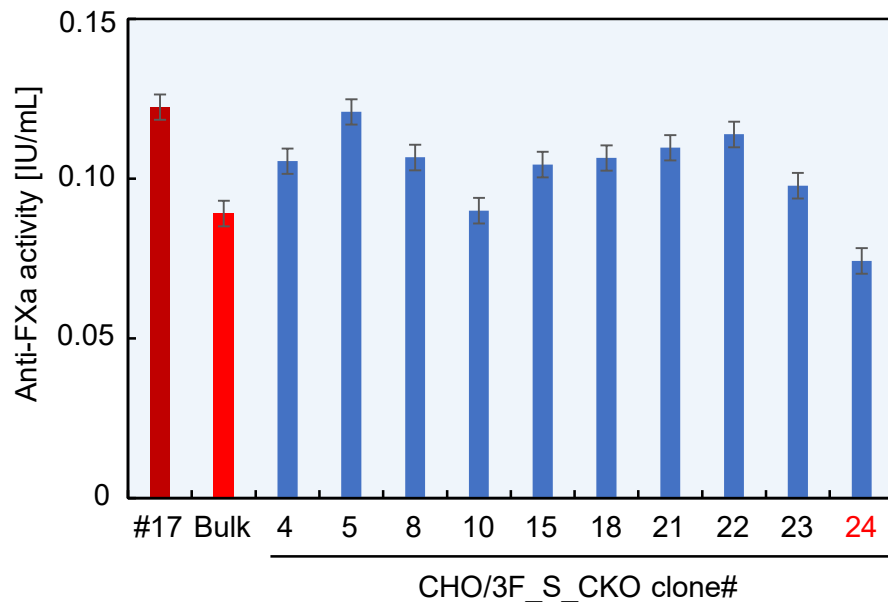
# 新たな遺伝子改変のターゲット(CS糖鎖合成酵素KO)

## 硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)の構造



# コンドロイチン硫酸糖鎖合成酵素のノックアウト

## CHO/3F\_S [#17] の *CS GalNAcT2* ノックアウト細胞のクローン選抜

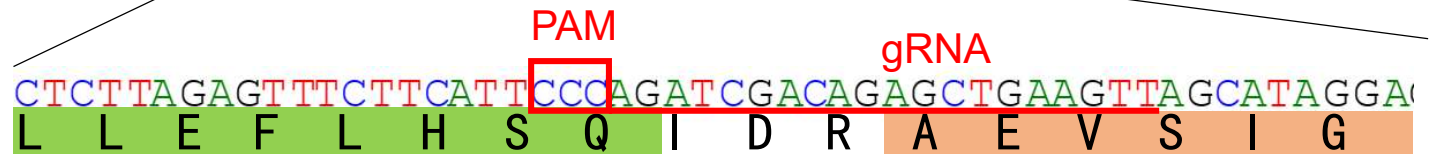
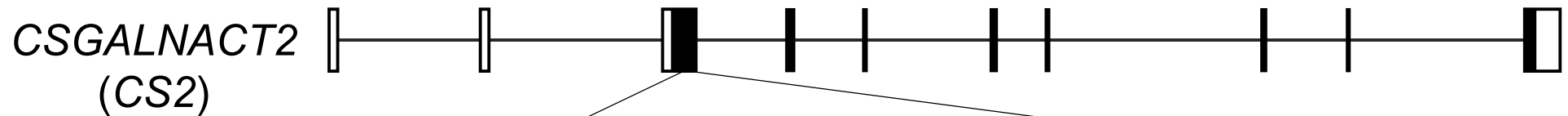


*CS GalNAcT2* のノックアウトにより抗FXa比活性が向上した細胞の内、配列解析で確認できたクローン **#24** を選択した

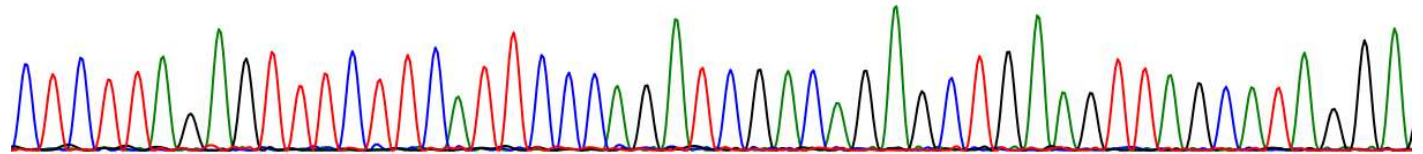
# コンドロイチン硫酸糖鎖合成酵素のノックアウト

## CHO/3F\_S\_CKO[#24] のCS2遺伝子解析

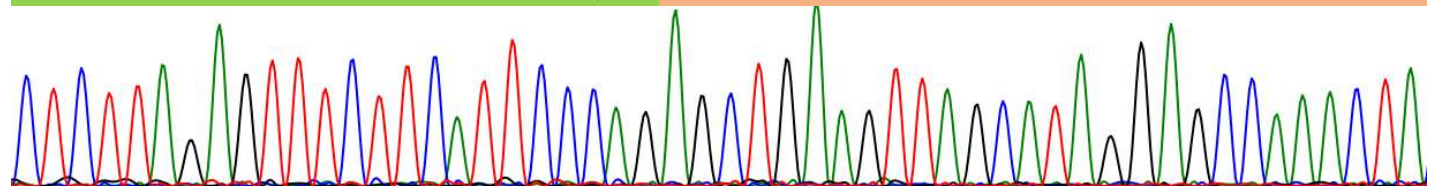
*Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (NW\_003614048)*



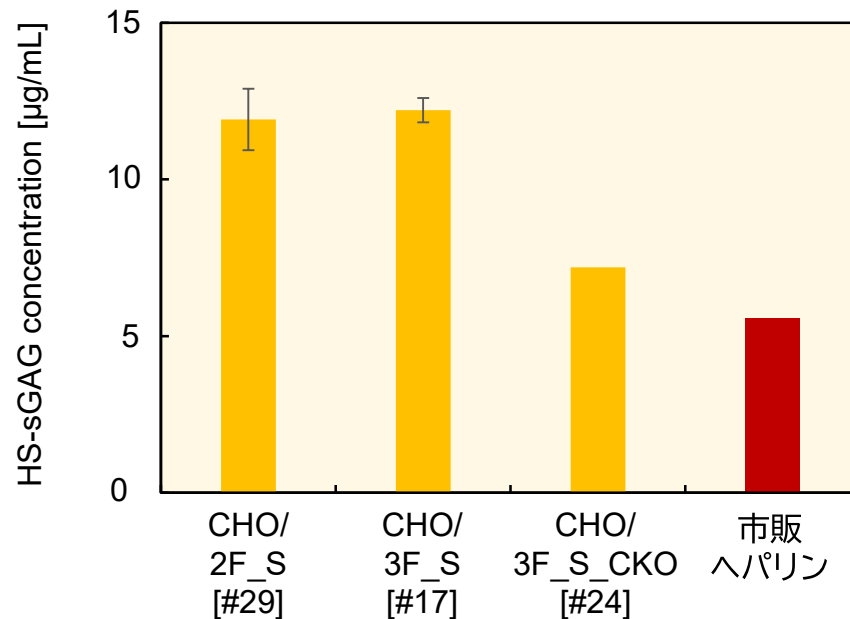
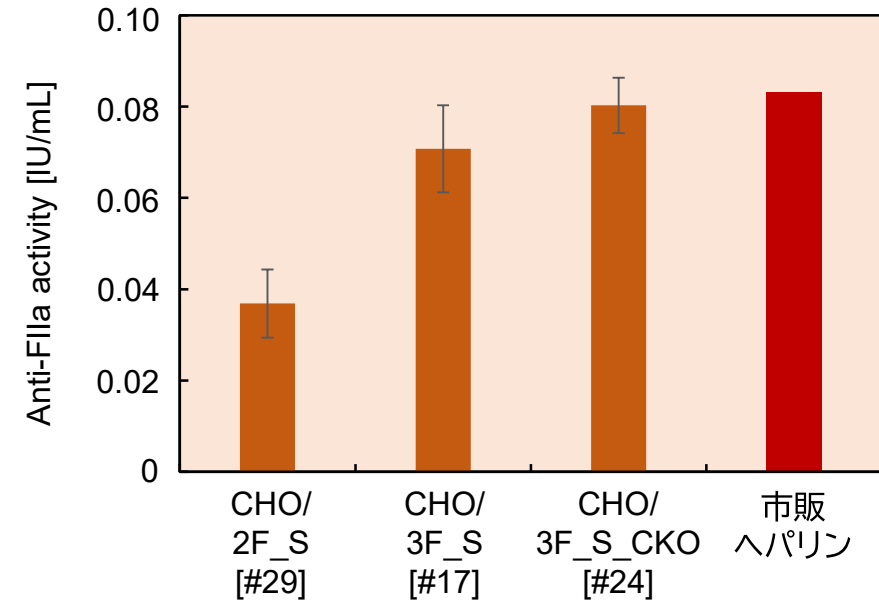
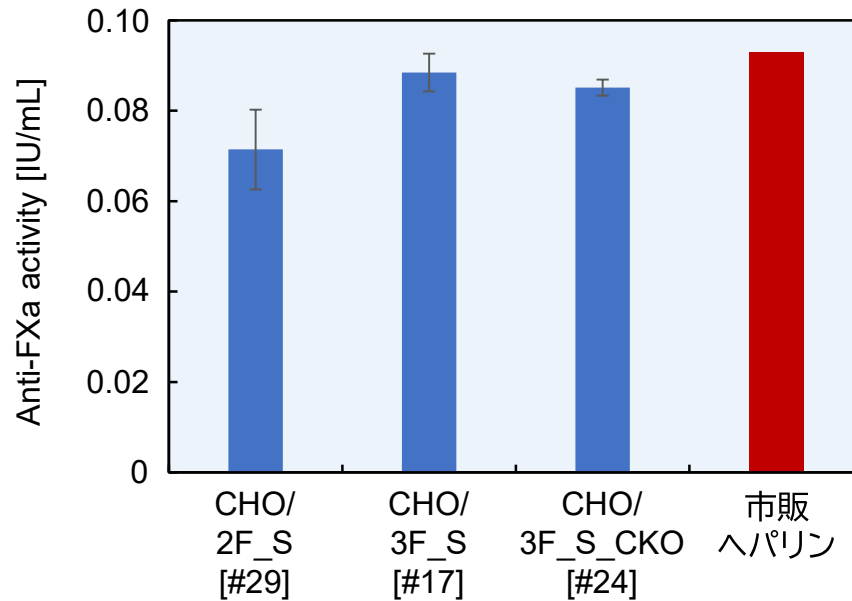
Parental #17



CS2-KO #24

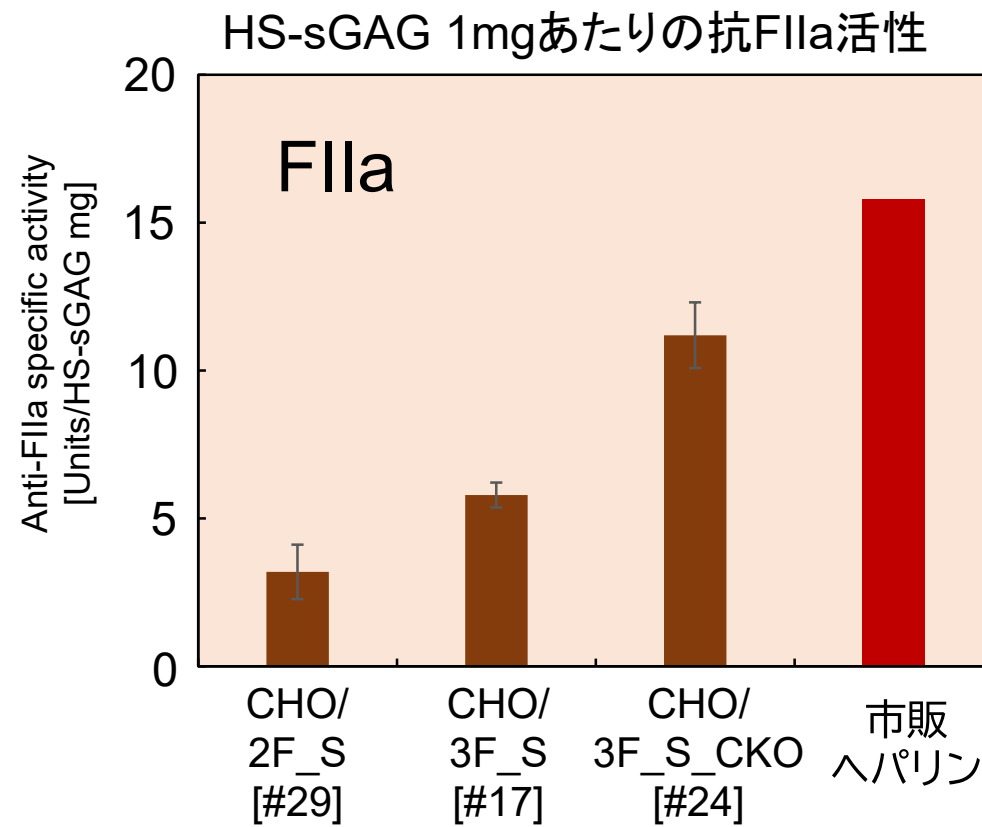
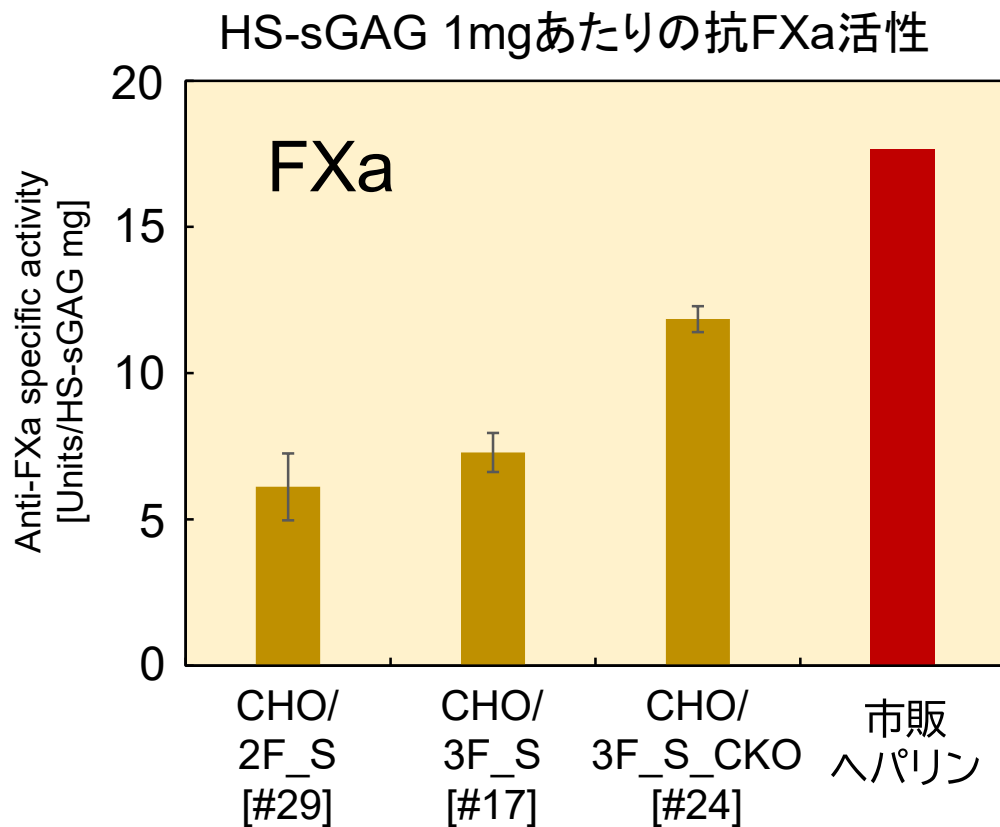


## 樹立した細胞株が生産したヘパリン様糖鎖の活性の比較



- #29, #17, #24の順で培養液中の抗FXaおよび抗FIIa活性は増加した
- #24では生産したsGAG濃度は低下した

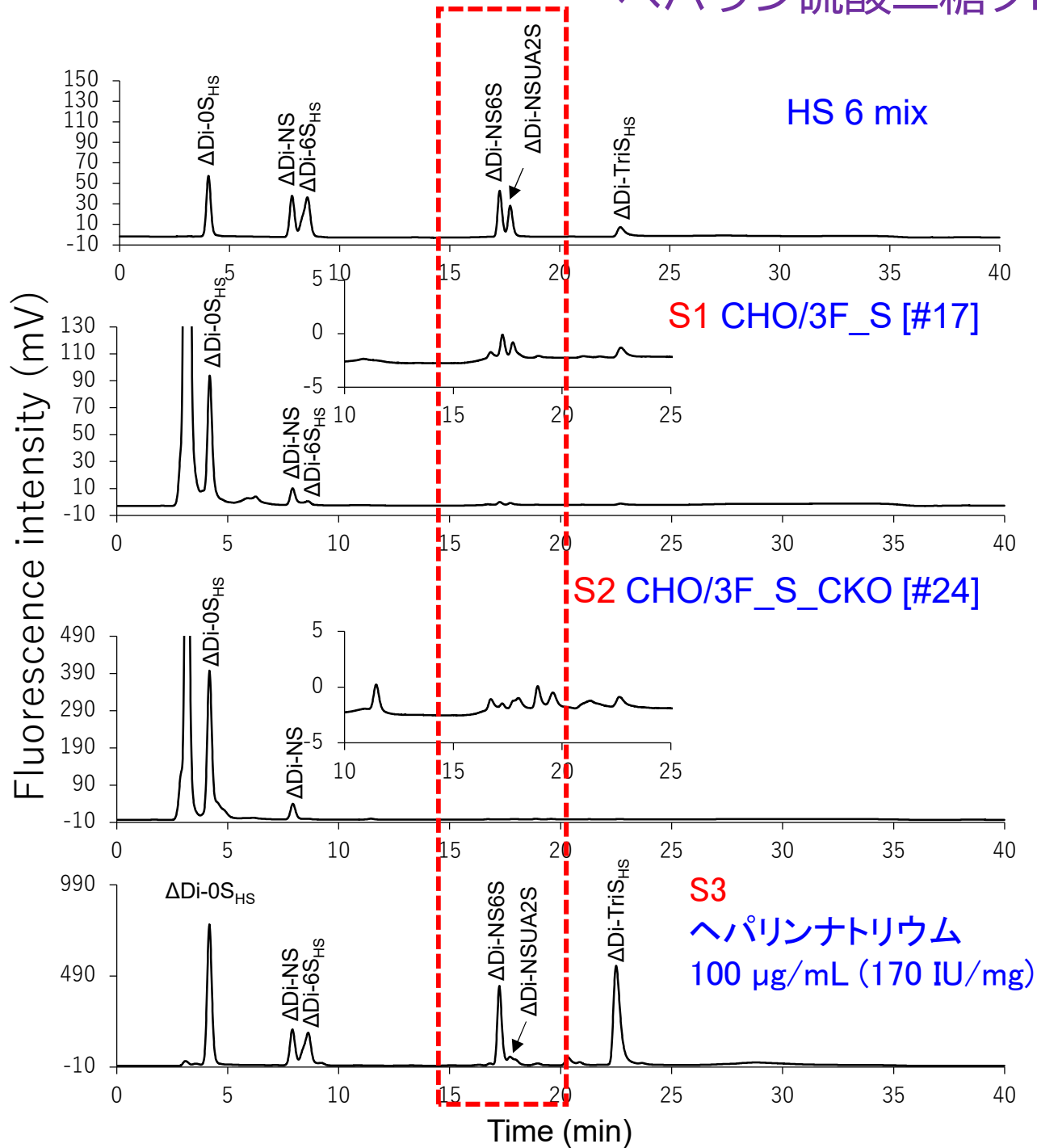
## 樹立した細胞株が生産したヘパリン様糖鎖の活性の比較



CHO/3F\_S\_CKO[#24] が生産したsGAGは市販ヘパリンの約**70%**の抗FXaおよび抗FIIa比活性を有していた



# ヘパラン硫酸二糖クロマトグラム



## 二糖分析結果

#24のサンプルでは、既知の不飽和二糖の他、未同定のピークが多数認められた。グルクロン酸の3位硫酸化の二糖の存在が考えられ、この二糖が抗凝固活性に関与していることが考えられた。

# 樹立した改変CHO細胞の系譜

CHO-S (WT)



CHO/2F (#3)

*NDST2, Hs3st1*

硫酸化強化



CHO/2F\_S (#29)

*SDC*

sGAG分泌化



CHO/3F\_S (#17)

*Hs6st3*

硫酸化強化



CHO/3F\_S  
CS2-KO (#24)

*Csgalnac2 KO*

CSノックアウト



New cell line

*ZNF263, OSR1, NFIL3, NRF1  
SGSH, GNS, ARSG  
Hs3st1&5, Hs6st2&3*

sGAG合成制御  
脱硫酸化酵素  
硫酸化強化

## 従来技術とその問題点

- ヘパリンは需要が高い必須医薬品であるが、原料の大部分を外国に依存している
- 化学合成が事実上不可能である
- ブタ腸組織より調製されており、品質管理、安定生産に問題がある

# 新技術の特徴・従来技術との比較

- 細胞培養によるヘパリン様糖鎖の生産
- 多くの医薬品生産実績のあるCHO細胞を生産宿主として利用する
- 品質管理、安定生産が可能となる

## 想定される用途

- GMP製造が比較的容易である(既存の生産設備が利用できる)
- 血液抗凝固剤としての利用以外に、抗炎症や感染防御における効果が期待されている
- 細胞培養での生産により、構造活性相関における新たな知見の創出の可能性がある

# 実用化に向けた課題

- ✓ 生産sGAGのさらなる**比活性の向上**
  - ➡ 遺伝子の追加、遺伝子KO、培養条件
- ✓ sGAG糖鎖**生産量の増強**
  - ➡ 培地成分の検討
- ✓ sGAGの培養液からの**回収条件の検討**
- ✓ sGAGの効果的な**分析技術の開発**

2022年-2024年 JST A-STEP事業で検討中

## 企業への期待

- 実用化に向けた課題については、現在JST A-STEP事業で取り組んでいる
- 製造技術開発で企業との共同研究を希望
- また、用途開発に興味のある企業との協業を期待している

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 組換えヘパリン様物質、及びその製造方法
- 出願番号 : 特願2022-022594  
PCT/JP2023/005371
- 出願人 : 九州大学
- 発明者 : 上平 正道、他



# お問い合わせ先

九州大学

学術研究・産学官連携本部

知財・ベンチャー創出グループ 秋柴美沙穂

TEL 092-400-0494

e-mail [transfer@airimaq.kyushu-u.ac.jp](mailto:transfer@airimaq.kyushu-u.ac.jp)