

平成27年 2月 9日

学位論文の審査要旨

学位論文申請者氏名：石井 要一

論文題目：抗体産生における高生産性・高品質の株と低生産性・低品質の株との比較：培養工学的，生物物理学的，メタボローム的アプローチ

(Comparison of monoclonal antibody-expressing cell lines with high productivity/high quality vs. with low productivity/low quality: approaches from fermentation engineering, biophysical chemistry, and metabolomic analysis)

論文の概要及び判定理由

抗体医薬品はその高い抗原特異性・低い想定外副作用の発生率から広く用いられるようになった。治療用抗体は高い用量の投与が必要なこと，培養コストの高い動物細胞で発現する必要があることから，生産性の高い製造プロセスが患者の負担軽減のために必要である。一方，培養時のタンパク質の品質は従来，生産性ほど重要視されてこなかった。しかし，培養時のタンパク質の品質が製品の品質に与える影響も無視できなくなってきた。モノクローナル抗体の生産性と品質は使用する細胞株の性質に大きく依存することから，抗体医薬品の開発工程において，大規模生産に適した細胞株を選択する工程は特に重要であると考えられている。本研究では，抗体産生で最も一般的に使用されるチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）について，大規模生産に適した高い品質と高い生産性を有する細胞株の特性を明らかにすべく，以下の3種類の検討が行われた。

まず第一に，高い生産性と低い凝集体含量を示す細胞を特徴づけるために，生産性の指標である抗体濃度，および凝集体含量の指標である高分子種の割合（HMWS(%)）とに密接に関係する因子が決定された。トラスツズマブを産生する28種の安定発現株を調製し，抗体濃度・培養液中のHMWS(%)などを分析し，ステップワイズ多重回帰分析が行われた。その結果，高い抗体濃度は，高い比増殖速度・高い比生産速度・低い細胞内重鎖（HC）タンパク質含量と関係していることが明らかとされた。一方，低いHMWS(%)は，低いprotein disulfide isomeraseのmRNAレベル・高い低分子種の割合・高い比生産速度・高い細胞内軽鎖（LC）タンパク質含量・高い比増殖速度と関係していることが明らかとされた。この結果は，小胞体内での正しく，効率的な抗体分子のアッセンブリーとフォールディングが，高い抗体濃度と低い凝集体含量にとって重要であることを示唆している。

第二に，大規模生産に適した品質の抗体を産生する細胞の特性を明らかにするために，抗体サンプルおよび細胞の特性が，生産性および凝集体含量で対照的な細胞株間で異なるかどうかを調

べられた。28株の中から細胞株 A（高い生産性，低い凝集体含量）および細胞株 B（低い生産性，高い凝集体含量）が選択された。細胞およびそれらの細胞によって生産された抗体分子と凝集体の主要な性質が比較された。その結果，種々の差（増殖能，非共有結合性の凝集体含量，培養液中 LC 含量，細胞内 HC の蓄積など）が存在することが明らかとされた。細胞株 B での高い凝集体含量と低い抗体濃度は LC の低い生産性，およびそれに伴う多くの HC ダイマーとモノマーの蓄積に起因すると考えられた。また，凝集体形成の主要なメカニズムも 2 つの細胞間で異なり。細胞株 A 由来の凝集体は主に共有結合により，細胞株 B 由来の凝集体は主に疎水相互作用により形成されることが示された。

第三に，メタボローム解析を用いて細胞株 A および細胞株 B が比較された。先に，細胞株 A と B の間の生産性（抗体濃度）の違いは，主に細胞数の違い（細胞株 A > 細胞株 B）であることが観察されている。その結果，組換えタンパク質の生産性との間の相関が報告されている「乳酸代謝シフト」は細胞株 A での高い抗体濃度の原因ではないことが示唆された。また，高い生産性と低い生産性の細胞株間で認められた増殖能の違いは，増殖期における細胞内の TCA サイクル中間体レベルの違いに起因することが示唆された。細胞株間での共有結合性の凝集体の割合の違いは，酸化ストレス状態の違いに起因していることが提唱された。

以上のように，本研究では抗体産生に関して高い品質と高い生産性を有する細胞株の特性を明らかにすることに成功しており，その産業的意義は極めて高く，人類の健康増進に貢献するものである。また本研究で見いだされた現象が起こるメカニズムには未知な点が多く，基礎研究の発展も強く刺激すると期待される。そこで，博士（工学）の学位に値するものと判定した。

審査年月日 平成 27 年 2 月 4 日

審査委員

主査	群馬大学学術研究院	教授	武田 茂樹	印
副査	群馬大学学術研究院	教授	角田 欣一	印
副査	群馬大学学術研究院	教授	松尾 一郎	印
副査	群馬大学学術研究院	准教授	外山 吉治	印
副査	群馬大学学術研究院	教授	若松 馨	印

関連論文

1 著者名 Yoichi Ishii, Junko Murakami, Kazue Sasaki, Masayoshi Tsukahara, and Kaori Wakamatsu

論文題目 Efficient folding/assembly in Chinese hamster ovary cells is critical for high quality (low aggregate content) of secreted trastuzumab as well as for high production: stepwise multivariate regression analyses.

(和訳) CHO 細胞内での効率的なフォールディングとアセンブリは分泌されるトラスツズマブの高い生産性と高い品質 (低い凝集体含量) に必須である: ステップワイズ重回帰分析を用いた解析

雑誌名 J. Biosci. Bioeng. 第 118 巻 第 2 号 223 頁~230 頁 2014 年 1 月

2 著者名 Yoichi Ishii, Yasufumi Imamoto, Rie Yamamoto, Masayoshi Tsukahara and Kaori Wakamatsu

論文題目 Comparison of antibody molecules produced from two cell lines with contrasting productivities and aggregate contents.

(和訳) 対照的な生産性および凝集体含量である 2 つの細胞株から生産された抗体分子の比較

雑誌名 Biol. Pharm. Bull. 印刷中

3 著者名 Yoichi Ishii, Yasufumi Imamoto, Rie Yamamoto, Masayoshi Tsukahara and Kaori Wakamatsu

論文題目 Titer of trastuzumab produced by a Chinese hamster ovary cell line is associated with tricarboxylic acid cycle activity rather than lactate metabolism.

(和訳) チャイニーズハムスター卵巣細胞株によって生産されるトラスツズマブの力価は、乳酸代謝よりむしろ、トリカルボン酸サイクルの活性と関連している

雑誌名 J. Biosci. Bioeng. 印刷中

参考論文

1 著者名 Youichi Ishii, Yukihiro Aramaki, Toshihumi Hara, Seishi Tsuchiya, and Toru Fuwa

論文題目 Preparation of EGF labeled liposomes and their uptake by hepatocytes.

(和訳) EGF 修飾リポソームの調製と肝実質細胞による取り込み

雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun. 第 160 巻 第 2 号 732~736 頁 1989 年 4 月

2 著者名 Yukihiro Aramaki, Masayuki Takahashi, Asaichi Inaba, Youichi Ishii, and Seishi Tsuchiya.

論文題目 Uptake of aminoglycoside antibiotics into brush-border membrane vesicles and inhibition of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity of basolateral membrane.

(和訳) 刷子縁膜小球内へのアミノグリコシド系抗生物質の取り込みと側底膜の $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ 活性の阻害

雑誌名 Biochim. Biophys. Acta 第 862 巻 第 1 号 111 頁~118 頁 1986 年 11 月

※ 掲載決定のものも記載すること