OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	抗体高生産株構築に向けたチャイニーズハムスター由来細胞の分泌プロセスに関する研究
Author(s)	角田, 悠
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105399
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　角田悠　）	
論文題名	抗体高生産株構築に向けたチャイニーズハムスター由来細胞の分泌プロセスに関する研究

論文内容の要旨

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は抗体医薬品製造に最も広く用いられている生産宿主である。2つの重鎖と軽鎖から構成され、分子構造の複雑なIgG1抗体の生産は翻訳後の分泌プロセス、特に小胞体やゴルジ体において複雑なプロセスを要する。CHO細胞の分泌プロセスに関して多種多様なボトルネックが報告されており、モノクローナル抗体に加え、近年増加している二重特異性抗体等の次世代抗体の生産はより一層分泌プロセスへの負荷を生ずると考えられる。新規の宿主細胞の樹立も急速に進んでおり、様々な抗体や異なる細胞株に共通の分泌プロセスに関する基盤的知見が必要とされている。本博士論文では、生産性低下の原因となる小胞体への抗体の蓄積を解消する手法の開発、様々なIgG1抗体の分泌プロセスにおけるボトルネック推定法の開発、そして、従来のCHO細胞の2倍の増殖速度を有する肺由来の新規宿主細胞、CHL-YN細胞の分泌プロセスに着目した網羅的解析を実施した。

第二章では、先行研究でボトルネックと指摘された小胞体への抗体の蓄積を解消するため、小胞体からゴルジ体への抗体輸送を担うCOPII小胞の形成に関わるタンパク質、Sar1AをCHO細胞で過剰発現させ、抗体生産や分泌プロセスへの影響を解析した。Sar1Aの過剰発現は回分培養における抗体の比生産速度を増加させ、細胞内抗体の蓄積を減少させた。蛍光免疫染色法による細胞内抗体の局在解析ではSar1Aの過剰発現によりゴルジ体への局在化が確認され、抗体の小胞輸送が促進されることが示唆された。Sar1Aの過剰発現は異なるIgG1抗体生産株の比生産速度を改善したが、生産物によっては効果が認められなかった。

分泌プロセスにおけるボトルネックは抗体の重鎖や軽鎖のフォールディングやアセンブリ、小胞輸送など多種多様である。従って、ボトルネックの推定は試行錯誤的に行われ、第二章でも確認されたように、汎用性の高い改善手法の確立は困難である。第三章では、フォールディングとアセンブリ、輸送されるタンパク質の選別、小胞輸送の４つのプロセスに人工的にボトルネックを誘導した細胞株を用いて、各ボトルネックが抗体の比生産速度や細胞内抗体やその中間体の蓄積や分泌に与える影響を明らかにし、得られた知見に基づき、3種類のIgG1抗体生産株におけるボトルネックを推定した。４つのプロセスを担う5種類のタンパク質を高発現を示すTrastuzumabの生産株においてRNA干渉法によりノックダウン(KD)し、ボトルネックを人工的に誘導した5種類のKD細胞を構築した。回分培養における抗体の比生産速度とKDターゲット遺伝子の発現量の関係から、アセンブリにおけるボトルネックが特に比生産速度を減少させることが明らかとなった。小胞輸送阻害剤Brefeldin Aや翻訳阻害剤Cycloheximideを用いて、ボトルネックが抗体や中間体の細胞内濃度の変化に与える影響を解析した。小胞輸送にボトルネックを有する細胞では細胞内抗体の顕著な蓄積を引き起こし、フォールディングにボトルネックを有する細胞ではBrefeldin A添加後の細胞内抗体濃度の増加量が少ないなど、ボトルネックを誘導したプロセスによって特徴的な違いが確認された。RituximabとInfliximab、Bevacizumab生産株を用いて阻害剤添加実験を行い、KD細胞を用いて得られた分泌プロファイルを基に、ボトルネックを推定した。フォールディングおよび小胞輸送にボトルネックがあると推定されたBevacizumab生産株は関連因子の過剰発現により抗体の比生産速度が22.3%と18.9%増加し、推定は妥当であることが検証された。

第四章では、CHL-YN細胞とCHO細胞株のトランスクリプトームとプロテオームを比較し、分泌プロセス等の抗体生産に関わるプロセスやCHL-YN細胞の高増殖能に関与しうる経路を解析した。CHO細胞では小胞体でのプロセッシングに関わる経路や小胞輸送など、分泌に関連するプロセスが広く上方制御されていた。一方、CHL細胞では、エネルギーやバイオマス生産、翻訳や細胞周期に関わる経路が上方制御されていた。この結果はCHL-YN細胞の高増殖能を裏付けるとともに、小胞輸送などの分泌プロセスへの改善の余地が大きく残されていることを示唆した。

第五章では第二章で行った試行錯誤的にボトルネックを解析し、改善する手法と第三章で行った簡易にボトルネックを絞り込む方法を組み合わせることの重要性を強調し、CHL-YN細胞の分泌強化に必要な細胞改変を論じた。さらに、第三章で得られた知見に基づき、より定量的かつ汎用性の高いボトルネックの推定手法を確立させるためのモデル化に関して記述した。最後に、抗体生産宿主の分泌プロセスへの理解と高度な制御の達成に必要な第二章が該当する個別のプロセスへのアプローチ、第三章が該当するトップダウンアプローチ、そして第四章が該当する水平方向へのアプローチを満遍なく実施することが、抗体医薬品生産のさらなる効率化、堅牢化に重要であると結論づけ、総括した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　角田　悠　）		
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	大政　健史
	副 査	教授	渡邊　肇
	副 査	教授	内山　進
	副 査	准教授	山野　範子

論文審査の結果の要旨

第一章においては、抗体医薬品製造に最も広く用いられている生産宿主であるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に関する基盤的知見の必要性を述べ、本論文の全体像として、生産性低下の原因となる小胞体への抗体の蓄積を解消する手法の開発、様々な IgG1 抗体の分泌プロセスにおけるボトルネック推定法の開発、そして、従来の CHO 細胞の 2 倍の増殖速度を有する肺由来の CHL-YN 細胞の分泌プロセスに着目した網羅的解析について述べている。

第二章においては、先行研究でボトルネックと指摘された小胞体への抗体蓄積を解消するため、COPII 小胞の形成に関わるタンパク質、Sar1A を CHO 細胞で過剰発現させ、抗体生産や分泌プロセスへの影響を解析した結果について述べ、Sar1A の過剰発現により回分培養における抗体の比生産速度を増加させ、細胞内抗体の蓄積を減少させた結果について報告している。また、蛍光免疫染色法による細胞内抗体の局在解析では Sar1A の過剰発現によりゴルジ体への局在化を確認し、抗体の小胞輸送が促進されることを示唆している。一方、Sar1A の過剰発現は異なる IgG1 抗体生産株の比生産速度を改善したが、生産物によっては効果が認められなかったことも述べている。

第三章では、フォールディングとアセンブリ、輸送されるタンパク質の選別、小胞輸送の 4 つのプロセスを担う 5 種類のタンパク質を、高発現を示す Trastuzumab の生産株において RNA 干渉法によりノックダウン(KD)し、ボトルネックを人工的に誘導した 5 種類の KD 細胞を構築し、ボトルネックが抗体や中間体の細胞内濃度の変化に与える影響を解析している。小胞輸送にボトルネックを有する細胞では細胞内抗体の顕著な蓄積を引き起こし、フォールディングにボトルネックを有する細胞では Brefeldin A 添加後の細胞内抗体濃度の増加量が少ないなど、ボトルネックを誘導したプロセスによって特徴的な違いを確認している。さらに、Rituximab と Infliximab、Bevacizumab 生産株を用いて阻害剤添加実験を行い、KD 細胞を用いて得られた分泌プロファイルを基に、ボトルネックを推定し、フォールディングおよび小胞輸送にボトルネックがあると推定された Bevacizumab 生産株は関連因子の過剰発現により抗体の比生産速度が 22.3%と 18.9%増加し、推定が妥当であることを検証している。

第四章では、CHL-YN 細胞と CHO 細胞株のトランスクリプトームとプロテオームを比較し、分泌プロセス等の抗体生産に関わるプロセスや CHL-YN 細胞の高増殖能に関与しうる経路を解析し、CHO 細胞では小胞体でのプロセッシングに関わる経路や小胞輸送など、分泌に関連するプロセスが広く上方制御される一方、CHL 細胞では、エネルギーやバイオマス生産、翻訳や細胞周期に関わる経路が上方制御されており、CHL-YN 細胞の高増殖能を裏付け、小胞輸送などの分泌プロセスへの改善の余地が大きく残されていることを示唆している。

第五章では第二章で行った試行錯誤的にボトルネックを解析し、改善する手法と第三章で行った簡易にボトルネックを絞り込む方法を組み合わせることの重要性を強調し、CHL-YN 細胞の分泌強化に必要な細胞改変を論じ、第三章で得られた知見に基づき、より定量的かつ汎用性の高いボトルネックの推定手法を確立させるためのモデル化に関して記述している。最後に、抗体生産宿主の分泌プロセスへの理解と高度な制御の達成に必要な第二章が該当する個別のプロセスへのアプローチ、第三章が該当するトップダウンアプローチ、そして第四章が該当する水平方向へのアプローチを満遍なく実施することが、抗体医薬品生産のさらなる効率化、堅牢化に重要であると結論づけ、総括している。

以上のように、本論文は抗体高生産株構築に向けたチャイニーズハムスター由来細胞の分泌プロセスに関する新しい知見とそれを改善する方法論を示しており、本論文は博士論文として価値あるものと認める。