



Title	遺伝子組換えタンパク質医薬品の製造における生産性向上に関する研究
Author(s)	大屋, 智資
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48614
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	大屋智資
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第21654号
学位授与年月日	平成20年1月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	遺伝子組換えタンパク質医薬品の製造における生産性向上に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 大竹 久夫 (副査) 教授 塩谷 捨明 教授 福井 希一 准教授 大政 健史

論文内容の要旨

バイオ医薬品の研究開発数は今後も上昇する傾向にあると報告されている。バイオ医薬品は合成医薬品に比べて副作用が少なく、また臨床試験開始後にドロップアウトするリスクが少ないことが利点として挙げられる。一方では、安価に製造できる合成医薬品に対して、バイオ医薬品はその製造コストが非常に高いため、製造コスト低減がバイオ医薬品の研究開発において最重要課題の一つになっている。製造コストを抑制するには生産性を向上させることが最も有効な手段の一つである。そこで本研究では、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* ならびに CHO (Chinese hamster ovary) 細胞を宿主として用いた遺伝子組換えタンパク質医薬品の製造における生産性向上に関する研究を行った。

第2章では、*P. pastoris* にプロウロキナーゼ・アネキシン V 融合タンパク質を分泌発現させたが、培養上清中に存在する様々な酵母由来のプロテアーゼにより分解されていた。培養条件によるプロテアーゼ分解抑制を試み、高い pH 領域においても高い生存率が維持できる株を構築し、pH 8.0 の条件下で高濃度のペプトン溶液を添加することによりプロテアーゼ分解を抑制した結果、生産性が大幅に改善した。

第3章では、*P. pastoris* による遺伝子組換えヒト血清アルブミン生産における生産性向上を目的として、繰り返し Fed-batch 培養の最適化方法を確立した。最初に、シミュレーションモデルを作成し、コンピュータ計算によりメタノールフィード時間あたりの利益を評価することにより、繰り返し Fed-batch 培養における最適な操作方法を探索した。その最適な操作方法により繰り返し Fed-batch 培養を実施したところ、生産量では計算値との乖離が認められたため、最小限の実験を実施して得られた生産量の実験値を用いて最適な操作方法を再計算した。得られた最適な操作方法を実施することにより、年間生産量が 47% 向上することが判明した。

第4章では、糖タンパク質であるヒトアンチトロンビンIII (ATIII) を CHO 細胞により生産させたところ、得られた遺伝子組換え ATIII は血漿由来品と同等の活性を有していたが、細胞あたりの生産性を改善する必要があった。そこで、従来の遺伝子增幅法により得られた高生産株に対して、小胞体ストレス応答に関連する転写活性化因子である ATF4 あるいは XBP-1s (活性型 XBP-1) を導入して生産性の向上を試みた。その結果、ATF4 の過剰発現により比生産速度が約 2 倍に増加したのに対して、XBP-1s の過剰発現では増加しなかった。ATF4 過剰発現では CHOP および GADD34 mRNA の発現量の増加、eIF2 α の脱リン酸化が起こっており、タンパク質の翻訳停止解除により生産量が増加したと考えられた。一方、ATIII 高生産株では IRE1/XBP-1 シグナル伝達経路が XBP-1s の過剰発現とは無関

係に活性化されていたため、XBP-1s の過剰発現の効果がなかったと考えられた。これにより、翻訳が律速段階となっている場合には、ATF4 の過剰発現が CHO 細胞での生産性向上に有効であることを見出した。

論文審査の結果の要旨

バイオ医薬品は合成医薬品に比べて副作用が少なく、また臨床試験開始後にドロップアウトするリスクが少ないことが利点とされており、その研究開発数は上昇する傾向にある。安価に製造できる合成医薬品に対して、バイオ医薬品はその製造コストが非常に高いため、製造コスト低減がバイオ医薬品の研究開発において最重要課題の一つになっている。製造コストを抑制するには生産性を向上させることが最も有効な手段の一つである。本論文では、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* ならびに Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を宿主として用いた遺伝子組換えタンパク質医薬品の製造における生産性向上に関する研究成果がまとめられている。

第2章では、*P. pastoris* にプロウロキナーゼ・アネキシン V 融合タンパク質を分泌発現させ、酵母由来のプロテアーゼによる分解により生産性が低下する事例において、高い pH 領域でも高い生存率が維持できる株を構築し、pH 8.0 の条件下で高濃度のペプトン溶液を添加することによりプロテアーゼ分解を抑制する方法を見出している。

第3章では、*P. pastoris* による遺伝子組換えヒト血清アルブミン生産における生産性向上を目的として、シミュレーションモデルを作成しコンピュータ計算によりメタノールフィード時間あたりの利益を評価することにより、繰り返し Fed-batch 培養における最適な操作方法が探索されている。得られた最適な操作方法を実施することにより、年間生産量が 47% 向上することが判明している。

第4章では、糖タンパク質であるヒトアンチトロンビン III (ATIII) の CHO 細胞による生産において細胞あたりの生産性を改善することを目的として、従来の遺伝子增幅法により得られた高生産株に対して小胞体ストレス応答に関連する転写活性化因子 ATF4 あるいは XBP-1s (活性型 XBP-1) の導入効果が調べられている。その結果、XBP-1s の過剰発現では生産性が増加しなかったものの、ATF4 の過剰発現により比生産速度が約 2 倍に増加することを見出した。生産性向上のメカニズムについて、ATF4 過剰発現ではタンパク質の翻訳停止解除により生産量が増加し、XBP-1s の過剰発現では IRE1/XBP-1 シグナル伝達経路が元株で既に活性化されていたため効果がなかったと考察している。これにより、翻訳が律速段階となっている場合には、ATF4 の過剰発現が CHO 細胞での生産性向上に有効であることを見出している。

以上のように、本論文は遺伝子組換えタンパク質医薬品生産における重要な解決課題である生産性の向上に対して生物化学工学的および細胞工学的観点から詳細に検討し、多くの知見を得るとともに、今後の遺伝子組換えタンパク質医薬品の開発に有用な基礎的資料を与えており、その成果は応用生物工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。