



Title	Analysis of antibody secretion processes in CHO cells aiming at establishment of high-producer cells
Author(s)	兼吉, 航平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72349
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

	氏 名 (兼 吉 航 平)
論文題名	Analysis of antibody secretion processes in CHO cells aiming at establishment of high-producer cells (抗体高生産株の構築を目指したCHO細胞内分泌解析)
論文内容の要旨 抗体は特定の分子に対して高い特異性と結合能を示すタンパク質であり、分子標的薬として使用されるがその複雑な構造のために、組換え動物細胞、特にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の培養を行うことにより生産されている。これまで既存の分子細胞生物学的知見に基づいた細胞改変を行って高生産株をスクリーニングし、さらに培養方法の改善を行うことでその生産性を向上させてきた。しかし、これまでの研究では生産された抗体の量と質が主に注目されており、細胞内での抗体の生産過程については未だ不明な点が多い。今後、長期間にわたるスクリーニングと培養方法の最適化を脱却し、効率的に高生産株を構築するためには、医薬品としての抗体を生産するよう改変されたCHO細胞内における抗体の生産過程、特に生産の律速となっていることが指摘されている分泌過程に着目して基盤的な情報を収集し、論理的な高生産株構築方法の樹立を目指す必要がある。本博士論文においては、高生産株の構築を目指し、抗体生産細胞に特有の問題点、律速過程について解析を行った。 第1章においては、すでに構築された抗体高生産株3種類を対象とし、1) 分泌効率、2) 分泌の律速過程、3) 重鎖、軽鎖のアセンブリ、の3つの観点から解析を行った。翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いたチェイスアッセイを行ったところ、すべての細胞株で抗体の分泌は4-6時間程度で停止するが、細胞が生産した抗体のうち少なくとも20%が細胞内に残留して分泌されないことが明らかとなった。細胞内に残留する重鎖、軽鎖の割合は細胞株ごとに異なっており、一部の細胞株では重鎖、軽鎖の量比が適切でないために多量の抗体が残留していることが確認された。蛍光顕微鏡による分泌の律速過程解析を行ったところ、抗体は分泌の最初のステップである小胞体に主に局在しており、一部が次のステップであるゴルジ体に局在している様子が観察された。シクロヘキシミド添加後の、分泌が停止した細胞においても抗体は主に小胞体に局在していたことから、抗体分泌の律速過程は小胞体にあると推定された。サイズ排除クロマトグラフィにより、小胞体で起こる重鎖、軽鎖のアセンブリについて解析したところ、一部の細胞株においてアセンブリが効率よく進行していないことが確認された。 第2章においては、医薬品として上市されていないが、その生産性が向上しない難発現性抗体インフリキシマブを生産する細胞について第1章と同様の解析を行い、難発現性抗体に特有の問題点を特定した。インフリキシマブの分泌はわずか2時間以内に停止したが、他の高生産株と同様に分泌の律速過程は小胞体にあることが推定された。小胞体内で重鎖、軽鎖のアセンブリが完了しているものは少なく、軽鎖が単量体のまま細胞内に滞留している様子が確認された。細胞内の軽鎖についてさらなる解析を行ったところ、一定量が凝集体を形成して分泌されない形態となっていることが確認された。第1, 2章の研究により、既に樹立された抗体生産株でも、その分泌過程に異なる問題点を内包しており、分泌過程の基盤的解析に基づく細胞改変の必要性が示唆された。 第3章においてはCHO細胞内における抗体の分泌過程、律速過程を簡便に解析するための技術として初めて蛍光タンパク質を結合した医薬品抗体を生産する細胞株を樹立し、その使用について検討を行った。2色の蛍光フィルターを有する単細胞単離装置を併用することで、細胞内抗体量と分泌抗体量を単細胞レベルで半定量的に解析した。本装置を用いて高生産株を単離することは困難であったが、樹立した細胞株の顕微鏡観察を行ったところ、蛍光タンパク質標識抗体は標識が行われていない通常の抗体と同様の細胞内局在を示し、簡便に律速過程を解析することが可能であった。生産性の異なる細胞株間で抗体の局在に明らかな違いは確認されなかった。この細胞株の樹立により、初めて細胞内における医薬品抗体の分泌過程を直接解析することが可能となり、今後分泌効率の解析と、細胞改変に対する抗体分泌過程への影響の解析を行うためのモデルとして使用可能と考えられる。 以上の3つの研究により、これまでのスクリーニングと培養条件の最適化に基づいた生産性の向上を脱却し、分泌過程の基盤的な解析に基づいた適切な細胞改変手法を適用する必要があることを示し、また蛍光タンパク質結合抗体を生産する細胞株を構築することで簡便に分泌過程解析を行う技術を開発した。また今回得られた知見を基に、細胞内に残留する抗体量を考慮した新規数理モデルの構築を行った。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (兼 吉 航 平)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	伊東 忍
	副 査	教授	中山 健一
	副 査	教授	高井 義造
	副 査	教授	渡部 平司
	副 査	教授	兼松 泰男 (理学研究科)
論文審査の結果の要旨			
本論文では医薬品として使用される抗体を生産する組換えチャイニーズハムスター卵巣細胞の分泌過程に着目し、抗体の生産性を向上させるべく詳細な解析を行っている。 第一章においては、すでに樹立された抗体高生産株 3 種類を解析の対象とし、チェイスアッセイによる分泌効率の解析、蛍光顕微鏡による分泌律速過程の推定、サイズ排除クロマトグラフィーによる抗体重鎖・軽鎖のアセンブリ効率解析を行っている。これまで研究と議論が不足していた、抗体高生産株の分泌過程について解析、比較を行い、生産性の高い細胞株であっても合成した抗体を完全に分泌することはなく、また 3 種類の細胞株がそれぞれ異なる問題を有していることを明らかにしている。 第二章においては、これまで生産性を向上させることが困難とされてきた難発現性抗体インフリキシマブを生産する細胞株について第一章と同様の解析を行い、分泌における問題点を包括的に解析している。難発現性抗体であっても高生産株と同様の律速過程があるが、抗体軽鎖が凝集体を形成して重鎖とアセンブリしないことが難発現性であることの最たる原因としている。第一章、二章により、今後高生産株を樹立するためには各細胞株の分泌過程の解析に基づいた論理的な細胞改変が必要であると主張している。 第三章においては、抗体の分泌過程を解析するための技術として蛍光タンパク質で標識した抗体を生産する細胞株を構築し、その使用について議論を行っている。まず単細胞解析・単離装置を使用し、細胞内外の抗体量を蛍光強度から推定することで分泌能が異なる細胞を効率的に単離することが可能であるかについて検討している。高生産株の単離には困難な点が残るが、第一章、二章と同様に蛍光顕微鏡を用いて、単離した細胞における抗体の律速過程を解析することは可能であり、抗体の分泌過程とその律速過程を迅速に解析するためのモデルとして使用可能であることを示している。 以上のように、本論文はこれまで不明な点が多かった医薬品抗体を生産する組換え細胞の分泌過程について詳細に解析してその問題点を明らかにし、分泌過程の解析に基づいた論理的な高生産株構築の必要性を主張している。今後の高生産株構築を目指す上で着目すべき点を明らかにするとともに、分泌過程の解析を効率的に行うための技術開発を行った点で重要である。また今回の研究により細胞内に一定量の抗体が残留することが明らかとなり、これを踏まえて新たな数理モデルの構築を行っており、今回の研究を統合、一般化して今後高生産株を取得するための方法を提案している。 よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。			