OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Engineering of Chinese hamster host cell line highly and stably producing sialylation using gene amplification
Author(s)	Nguyen, Thi Sam
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77459
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　（　NGUYEN THI SAM　）	
論文題名	Engineering of Chinese hamster host cell line highly and stably producing sialylation using gene amplification (遺伝子増幅を利用した高度にかつ安定的にシアル酸付加が可能なチャイニーズハムスター宿主細胞系の開発)

論文内容の要旨

Chapter 1, the general introduction of glyco-engineering Chinese hamster ovary (CHO) cells for pharmaceuticals production by increasing sialylation using dihydrofolate reductase/methotrexate gene amplification method. Sialylation highly contributing to therapeutics quality can occur through α2,6-linkage in human. However, *N*-linked glycans with α2,6-*N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) were not found in CHO. This study aimed to establish CHO cell lines that highly produce α2,6-linked Neu5Ac terminals by overexpressing two Neu5Ac-based key enzymes, β-galactoside α2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL-I) and UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) using gene amplification method.

Chapter 2, to obtain cell line highly and stably producing Neu5Ac, the pcDNA-SG2 containing cDNAs of ST6GAL-I and Gne was used to transfect into CHO-DG44 cells. The transfectant, CHOmt17-0, showed the highest expression in mRNA level. There was an increase of 41.6% free Neu5Ac in CHOmt17-0 as compared to the wild-type. Moreover, the glycoforms from CHOmt17-0 showed an increase by 7-fold in sialylation as compared to the wild type (WT).

Chapter 3, to increase the sialylation of the cell line, CHOmt17-0 was cultivated in the presence of higher methotrexate concentration [MTX] to obtain MTX tolerant lines, CHOmt17-100, CHOmt17-200 and CHOmt17-300 screened by 100, 200 and 300 nM of MTX respectively. The collected glycan structures showed about 12- and 1.4-fold higher in sialylation with an increase of [MTX] to compare to that of WT and non-amplified cells respectively.

Chapter 4, to prove the concept of highly sialylated production from glyco-engineered cell lines, the plasmid contained gene of IgG1 heavy and light chains were transfected into CHOmt17-0 and CHOmt17-100. IgG1 from CHOmt17-100 showed about 53% sialylated structures in its glycoforms and exhibited more than a 14.5-fold higher in sialylation as compared to that of the WT.

In chapter 5, the conclusion of the thesis has been described. Glyco-engineered IgG1 derived from CHOmt17-100 that produces high levels of Neu5Ac will contribute to the examination of glycoforms' efficacy and usefulness toward bio-better products. Also, the CHOmt17-100 is a proof as potential cell line for industrial setting for other biopharmaceutical production.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　NGUYEN THI SAM　）		
論文審査担当者		(職)	氏　名
	主 査	教授	藤山　和仁
	副 査	教授	福崎　英一郎
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	大政　健史
	副 査	教授	渡邉　肇
	副 査	教授	村中　俊哉
	副 査	教授	内山　進
	副 査	教授	本田　孝祐
	副 査	教授	永井　健治

論文審査の結果の要旨

現在、抗体をはじめとするバイオ医薬品の生産が、年々成長を続ける巨大な市場を生み出している。一方で、生物を宿主としたバイオ医薬品の有用性を高めるためにもより高品質かつ高付加価値な生産物の安定的供給が命題である。そのため、生産宿主を遺伝子工学的に改変することは有効な手段の一つである。本論文では、タンパク質の生物学的活性に大きく貢献する翻訳後修飾の一つ、糖鎖修飾に注目している。遺伝子増幅を利用して、バイオ医薬品生産の主たる宿主であるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞のシアル酸結合型糖鎖の合成経路を補強し、高い品質でバイオ医薬品を生産できる新しい CHO 細胞を開発した。当該細胞で生産した抗体へのシアル酸結合型糖鎖量の大幅な向上に成功しており、高品質、高付加価値なバイオ医薬品生産のための有用宿主を樹立した。

第一章では、研究背景として本研究を着想するに至った経緯および目的について記述している。CHO 細胞の特徴ならびにタンパク質の高生産に有効な遺伝子増幅システムを紹介するとともに、糖鎖修飾と糖鎖へのシアル酸付加の重要性を示している。α2,6-シアル酸転移酵素（ST6GAL-I）と UDP-*N*-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ/*N*-アセチルマンノサミンキナーゼ（GNE）を遺伝子増幅を利用して共発現することで、CHO-DG44 細胞でヒトが保持するα2,6-シアル酸結合量を増加させることを目的とした動機に言及している。

第二章では、ST6GAL-I および GNE 遺伝子を安定的かつ高発現した CHOmt17-0 細胞の単一クローン化に成功している。当該細胞では野生株と比較して細胞内シアル酸量が 41.6%上昇し、糖鎖構造解析の結果シアル酸結合型糖鎖量が 7 倍も増加しており、高度にシアル酸結合型糖鎖を合成する有用株の樹立に成功したことが明らかとなった。

第三章では、メトトレキサート（MTX）を利用した遺伝子増幅システムを使うことで、100 nM の MTX 存在下にて馴化した CHOmt17-0（CHOmt17-100）細胞のシアル酸結合型糖鎖量をさらに 1.4 倍向上させることに成功している。

第四章では、CHOmt17-100 細胞でヒト抗体（免疫グロブリン G：IgG）を遺伝子組換え生産し糖鎖構造解析の結果、野生株で生産した IgG と比較して 14.5 倍量のシアル酸結合型糖鎖が付加していることがわかった。

第五章では、本論文内容を総括しており、ST6GAL-I と GNE の共発現が生産タンパク質へのシアル酸結合量を増加できること、本研究の成果より、利用した遺伝子増幅システムの糖鎖修飾経路改変への有用性が証明されたことを記述している。さらに、工業的なバイオ医薬品生産に対する CHOmt17-100 細胞利用の可能性について言及している。

本論文では、タンパク質の生物学的活性に強く影響を与える糖鎖構造に着目し、その分布がタンパク質に有利なように大きく向上可能であることを、選抜した標的酵素、遺伝子増幅システム、医療タンパク質を用いて証明した。上記各章で構築された実験から、現在また将来に向けても需要の高いバイオ医薬品を高品質な状態で生産できる宿主細胞の樹立に成功した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。