

バイオリジックス生産に適した
CHO 細胞株の育種プロセス構築

2015 年 3 月

中村 剛

目次

第1章	序論	4
1.1.	バイオロジックス(バイオ医薬品)の位置づけ	4
1.2.	バイオロジックス生産の発現宿主としての CHO 細胞	4
1.3.	CHO 細胞での発現としての GS-system	5
1.4.	バイオロジックス生産における細胞育種の位置づけ	6
1.5.	細胞株育種の効率化の必要性	8
1.6.	本論文の構成	10
短縮語一覧		11
第2章	限外希釈法による細胞株樹立	13
2.1	緒言	13
2.2	実験材料および方法	17
2.2.1	細胞株(Cell line)	17
2.2.2	培地	17
2.2.3	発現ベクターと挿入遺伝子	17
2.2.4	培養条件	17
2.2.5	限外希釈法による育種	18
2.2.6	生産物濃度評価方法	19
2.2.7	振盪培養評価	19
2.2.8	各種細胞代謝の指標	19
2.3.	結果	21
2.3.1	播種細胞密度の比較	21
2.3.2	スクリーニング期間の比較	24
2.3.3	酸素濃度の比較	28
2.3.4	血清含有培地と無血清培地の比較	28
2.3.5	選択剤 MSX 濃度の比較	31
2.4	考察	31
2.5	結論	32
第3章	シングルセルベースクローニング機器による 細胞株樹立	34
3.1	緒言	34
3.2	実験材料および方法	36
3.2.1	細胞株および培地	36
3.2.2	遺伝子導入	36
3.2.3	シングルセルベースのクローン選抜方法	36
3.2.4	評価指標	37
3.3	結果と考察	38
3.3.1	半固形培地の処方最適化検討	38
3.3.2	Transfectants の MSX 耐性評価	43

3.3.3	半固形培地からのピッキングの最適化	46
3.3.4	半固形培地を用いたシングルセルベースのクローニングの効率	51
3.4	結論	53
第4章	サブクローニングによる安定株樹立	54
4.1	緒言	54
4.2	実験材料および方法	54
4.2.1	細胞株	54
4.2.2	限外希釈法によるクローニング方法	54
4.2.3	ClonePixFL を用いたクローニング方法	55
4.2.4	フローサイトメーター (FCM) による親株の解析	55
4.3	結果	55
4.3.1	限外希釈法による親株ごとの取得効率	55
4.3.2	拡張培養の各段階での評価と分布	56
4.3.3	シングルセルベースのクローンシステムを用いたサブクローニング	59
4.4	考察	62
4.5	結論	62
第5章	総括と今後への展望	63
5.1	研究内容の総括	63
5.2	今後のバイオロジックス生産の育種について	67
	参考文献 (Reference)	69
	本研究に関連する報告	76
	謝辞	77

第1章 序論

1.1. バイオロジックス(バイオ医薬品)の位置づけ

抗体医薬に代表されるバイオロジックス(バイオ医薬品、蛋白質医薬品、生物学的製剤、バイオロジカルズ)は、次世代の医薬品として非常に注目されている。抗体医薬は標的分子(抗原)が明確なため、その標的への高い特異性や親和性で薬効が期待でき、有効な治療法のない Unmet Medical Needs を充足させる新しい医薬品として注目されている。ハイブリドーマ技術の開発によるモノクローナル抗体の産生技術は1970年代に Koler と Milsten らによって確立された [12]。これにより疾患関連分子に対して特異的な結合能を持つ抗体を人工的に作製することが可能となった。しかし、この当時の技術ではマウス由来の抗体を人に投与すると抗抗体が形成されるという重大な副作用が問題となった[28]。これに対処すべく、キメラ型抗体、ヒト化抗体作製技術といったマウスモノクローナル抗体の臨床応用に際して問題となった免疫原性を低減し、血中濃度の維持を可能にする技術が遺伝子工学の発展とともに開発されてきた [37] [25]。それでも当時は、医薬品として広く用いるために必要な経済面の課題に対して、細胞を使った生産性の低さと、高額な培地コストなどがあり商用化には、大きな壁があると考えられていた。しかし、これらに対しても 1980 年代後半から 1990 年代にかけて細胞培養技術や培地条件、発現システムの改良などの技術革新によって、モノクローナル抗体医薬品が 1 g/L 以上の容量生産性を示すようになるのに伴い、欧米のバイオベンチャーやメガファーマが巨大な培養槽を建設し、次々と抗体医薬品を開発・上市してきた [5] [38]。ついに、2010 年には、新規医薬品売り上げの上位の多くを抗体医薬品やその派生製品が占めるようになった [57]。バイオロジックスが、現在の医薬品の大きなセグメントとなっているのである。

1.2. バイロジックス生産の発現宿主としての CHO 細胞

バイオロジックスのうち、現在主流の抗体医薬での目的産物となるモノクローナル抗体などの産生用宿主には、最終産物のタンパク質が、高度な立体構造を必要とすることと、生体内での薬効と免疫原性に影響があると言われている糖鎖修飾を有していることから、動物細胞宿主が用いられることが多い。ただし、バイオ医薬品のうちでも、高度な糖鎖修飾が不要な低分子のインターフェロンや各種成長因子のようなタンパク製剤は大腸菌や酵母など微生物宿主によって生産されているものもある。

さらに現在では、この動物細胞宿主のうち浮遊培養に馴化したチャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary: CHO 細胞)が主に使われている。このほかの動物宿主細胞としては、マウスミエローマ細胞(NS0 や sp2/0 細胞)、ヒト株化細胞(PER.C6 細胞)といった細胞がある。これらのうち、生産系として CHO 細胞が多用さ

れる理由としては、他の細胞に比べて染色体の再編成(rearrangement) や相同組み換え(homologous recombination) などが頻繁に起こるために、無蛋白完全化学合成培地を含む各種培地や高密度浮遊培養といった商用生産で求められるような培養条件への馴化が行いやすい点と、発現系との組み合わせで遺伝子増幅が生じやすく経験的に高生産株が得やすいといった生産面からの利点が挙げられる。また、安全面では、マウス由来の細胞に比べると、糖鎖の構造がヒト型に類似していて抗原性が低いことがある。ヒト細胞を製造に用いるとこの抗原性での安全性は高まるが、生産過程でのヒト感染性ウィルスの混入した際の汚染リスクが常に懸念されるという事情がある。この点、CHO 細胞では齧歯類に特有のレトロウイルス(C 型、A 型または R 型)が多く検出されるが、このウイルス群はヒトには感染しないことが分かっており、ICH Q5A では、CHO 細胞に限って、簡便な安全性評価が認められている点が挙げられる。このように、CHO 細胞を利用したバイオ医薬品は、これまでに上市された製品も含め、規制当局による治療用組み換えタンパク質の使用許可を広く得ているため、世界中で使用されており、抗体医薬品として欧米で承認取得医薬品の 70%がこの CHO 細胞により生産されている [23]。さらに、2006-2010 に欧米で上市されたバイオ医薬品 58 品目のうち動物細胞を宿主としたものが 32 品目、その中で 22 品目が CHO 細胞で生産されている [57]という報告もある。このような理由から現在では Defact standard となった CHO 細胞に対しては、さらに研究が積み重ねられ、生産性向上や機能面の解析が行われ、宿主細胞としてさらに有利な状況となってきている。このような積み重ねで、近年では各社で CHO 使った生産系で、10 g/L を超える容量生産性も報告されている [22]。

1.3. CHO 細胞での発現としての GS-system

CHO 細胞での発現系では、主に①DHFR(Dihydrofolate reductase)欠損株に対する DHFR 遺伝子を marker にした DHFR 発現系 [24] [26] [49]と、②GS (Glutamine synthetase)を MSX (Methionine sulphoximine)が阻害する原理に基づき GS 遺伝子を marker とした GS 発現系の二つがある [4] [5]。

本研究に用いた LONZA-GS System は、その名の通り、GS 遺伝子を marker にしている。この発現系は Lonza Biologics(以下、LONZA)からライセンスされている。LONZA は、古くから細胞発現系の研究を行っていた Celltech Biologics を 1996 年に買収したことでその権利を取得している。この LONZA-GS System では同じベクターでマウスミエローマ系の NS0 細胞を使う系と、CHO 細胞を使う系があるが、現在は前述のような理由で CHO 細胞系が主流である。これまでの報告では DHFR 系の発現系よりも、その高生産取得過程において遺伝子増幅系に頼らないため、評価する細胞数が少なくかつ早期に樹立可能であると言われている [3] [5]。さらに、高生産株は同

時に染色体に取り込まれる GS 遺伝子活性が強いため、グルタミンが分解して放出されて生じ、ある一定濃度以上で細胞毒性を示すアンモニアの蓄積が妨げられるという細胞培養上の利点が言われている [33]。また、グルタミンは細胞の代謝にとって重要なアミノ酸であるが、GS 発現系で構築された生産株は、培地にグルタミンを加えなくて良いというコスト上、操作上の利点もある [18][33]。

宿主の CHO 細胞も当初の CHO-K1 株から、その無血清無蛋白馴化細胞株の CHO-K1SV 株、さらにその CHO-K1SV 株の GS の対立遺伝子を完全に knock-out した CHO-K1SV GS-KO 株など更なる改良がおこなわれている。この CHO 発現系は非常に強力であり、現在多くの医薬品企業で汎用されている [5][8][44]。本研究はこの CHO-K1SV 株を参考にしているが、得られた知見は、他の動物宿主細胞を用いた発現細胞構築にも有効であると考えられる。

1.4. バイオロジックス生産における細胞育種の位置づけ

バイオロジックスにおいてもサイトカインなどの生理活性物質と異なり、近年主流の抗体医薬品の場合は、数 mg ~ 数 100mg 単位、ときにはグラム (g) 単位の臨床投与量が求められるため、製造コストに対しての細胞の生産性の影響は大きい。すなわち、高生産株の樹立および、高生産培養法の樹立は抗体医薬品の安定供給や将来の製造コスト面で非常に重要な点である [50]。

安価で有用なバイオ医薬品の早期上市は多くの患者のために望まれているが、その上市へ向けては多くの過程がある。このうち、バイオロジックス医薬品における分子種決定から、動物細胞宿主を用いたバイオ医薬品産生株の樹立を育種プロセス (Cell Line Development) と言う。上市に向けた最初の第 1 相臨床試験開始までのプロセスを時系列に列挙しその中で育種プロセスの位置づけを示したのが、Figure 1 である。治験開始までに、細胞株の樹立と並行できるプロセスもあるが最終的には製造株の決定後に各種のプロセスが最終化され、そのプロセスにおいて治験原薬製造と治験薬製造がおこなわれることが分かる。

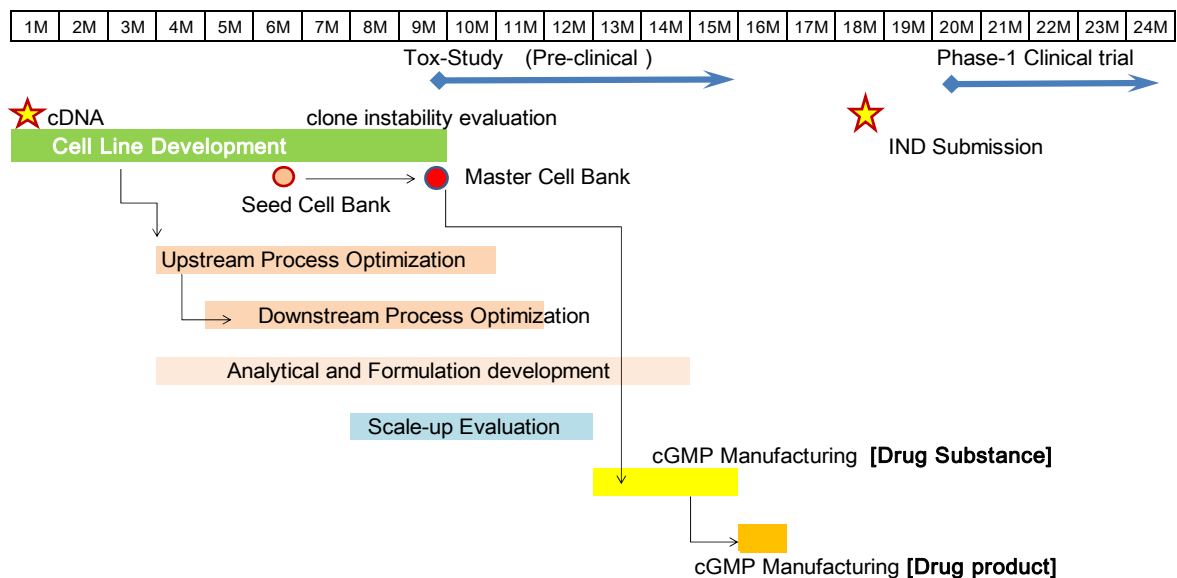


Figure 1 育種と第 1 相治験開始まで
(M は month を意味する)

この育種プロセスの内での各セルバンクの構築フローをお互いの関係を中心に示したのが、Figure 2 である。クローニングを終わったのち、MCB (Master Cell Bank) が作製されてはじめて、治験薬供給の原薬製造が開始される。バイオロジックス医薬品においては、従来の低分子医薬品と異なり、製造に使う細胞株の決定とそのタイミングに依存する要素が大きい。つまり、細胞株の特性が目的産物の品質や安全性および生産性(将来の製造コスト)に及ぼすうえ、臨床開始までのタイムラインにおいても、大幅に短縮できないクリティカルパスになっている。

そのうえ、早期臨床に使用した細胞株を、後期臨床にて変更することは、同等性、安全性の証明に関しての規制当局への説明など、リスクを嫌い避けられる傾向があるので、開発初期であっても安易に製造株を選ぶことは避けることが好ましい。そのため、動物細胞宿主を用いたバイオ医薬品産生株の樹立[育種]は、期間短縮と同時に、高い生産性やプロセスへの適応といった性能、さらには上市後販売終了までの長期間の継続的安定性が求められる非常に重要な工程となっている [50]

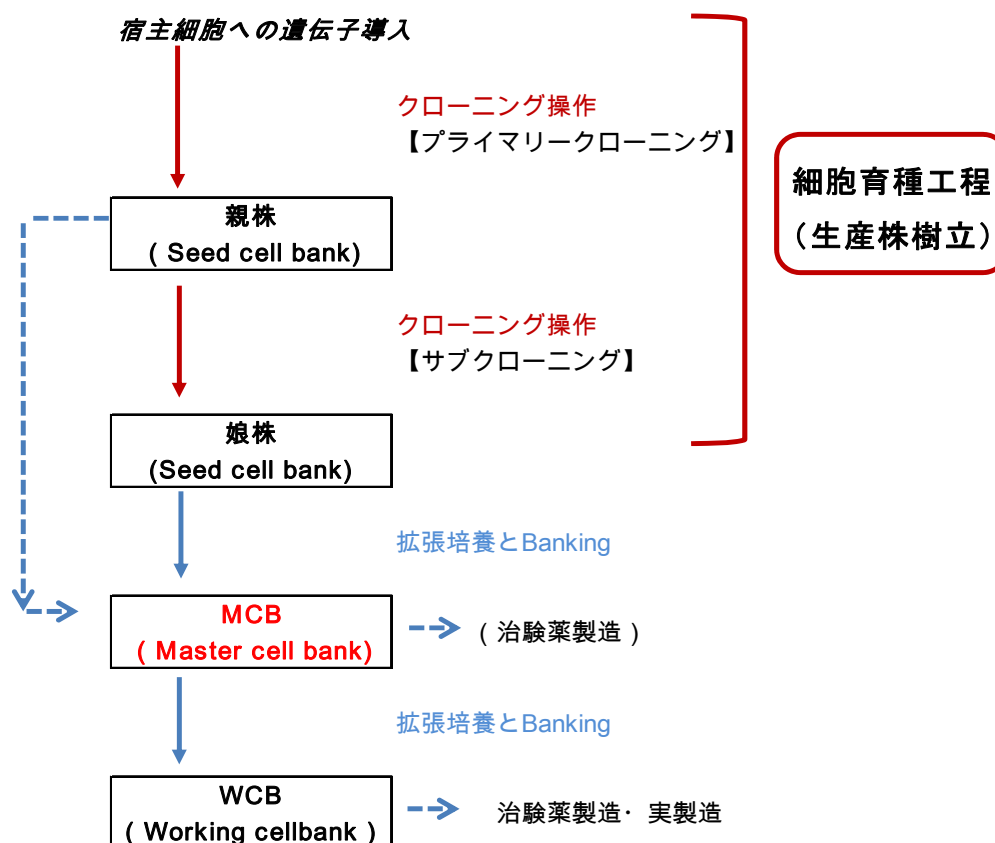


Figure 2 バイオロジックス生産株の構築フロー

1.5. 細胞株育種の効率化の必要性

この育種、[生産細胞樹立]に当たっては、多数の候補株の中から最もふさわしい株を選ぶ宝探しのようなものであり、その対象となる「山(細胞数)」が大きい(多い)ほど良い株が含まれている可能性が高いという“Power Game”のようになっている [6] [20] [50]。その理由として、現在主流の遺伝子導入方法では、ベクタープラスミドに搭載されたマーカ-遺伝子と目的遺伝子のカセットが、宿主染色体上との相同組換えによるランダム挿入を基本原理としているからである [2] [43]。この場合、得られた多数の Transfectants ごとに染色体の挿入された部位が異なっていて、それにより得られた各 Transfectants の特性が異なっている。一つは、Position Effectと言われる挿入遺伝子に対する発現効率の差で、他の配列からの正の亢進効果と負の抑制効果や、クロマチン上で高度に凝集したクロマチン構造をとり転写され難いとされる Heterochromatin と、高次構造がゆるみ、転写因子がアクセスしやすい Euchromatin の違いもあるとされている [30] [56]。二つ目は、相同組換えが起こる際に、目的遺伝子以外の元来宿主細胞が持っていた遺伝子が knock-out されることでの不活化や、シスエレメントの変化による抑制または亢進効果での細胞の特に代謝プロファイルの変化により、高生産株に「さわしい

プロファイル」になるか、「ふさわしくないプロファイル」になるかがある [44] [45] [46]。この代謝プロファイルの変化による目的遺伝子以外の宿主遺伝子の発現レベルの変化は、クローンごとの目的産物の転写後修飾 (PTM: Post translational modification) の違いをもたらすこれは目的産物の品質に違いを生じさせる [51]。三つ目は、スクリーニング期間中に選択圧を掛けられたことに対する宿主細胞の反応としての挿入遺伝子の増幅の程度の差である [40] [54]。このような理由から、遺伝子導入された細胞一つ一つが異なるという Heterogeneity が生じていると考えられている。そして、この違いの大部分は宿主細胞に遺伝子導入された時点で決まってしまうのである [46]。高生産株は希少であり、このうちさらに生産株として望まれる特性を持った株は希少である。そのため、できるだけ多くの細胞を複数の指標 (生産性、増殖性、目的産物の品質等) で早く、正しく評価することが必要である [15] [50]。

遺伝子導入された Transfectants の多様性に関連して、単細胞由来性 (mono-clonality: モノクローナリティ) の担保も重要である [55]。一つ一つの株を評価しているつもりでも、クローニングに複数の細胞株由来であると、徐々に細胞株の見かけの特性や目的産物の特性が変わってきてしまうことになる。一般には、医薬品の治験段階から上市までさらには発売期間中を通じて、同じ品質の製剤が使用されるように規制当局からもこの mono-clonality の説明を求められる。この mono-clonality を担保するためのこれまでの育種法は、限外希釈法 (Limiting Dilution :LD) といって、細胞を単細胞由来の細胞集団が得られるまで希釈してそれを適宜評価しながら拡張培養を行うという方法で、非常に時間と手間のかかる方法が主であったが、手間のかかる割に mono-clonality 性はそれほど高いとは言えなかった。

そこで、単細胞由来であるという高い mono-clonality を担保しつつ多くの細胞を処理する方法として一般化してきたのが、細胞を蛍光標識して高生産細胞を分類してソーティングする fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用いた育種方法である [7] [9] [54]。FACS では蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を定量的に測定し、細胞一つ一つを分別回収する。

これに対して、細胞を半固形培地に播種して、単細胞由来のコロニーを光学的に評価する方法が開発されてきた [10] [32] [48]。このとき、目的タンパク質に対する蛍光標識された二次抗体を半固形培地に含ませることで、高生産株に由来するコロニーの蛍光強度を光学的イメージングし、それに相関する目的産物産生能を序列化することを可能にしている。さらに、これを専用のシングルセルベースのクローニング機器を用い細胞集団コロニーを中空針でピックアップするのである。この場合、FACS 法では確認できない細胞の増殖性も確認できることや、作業中の細胞への物理的影響が少ないという利点がある [13] [14] [32]。このように、医薬品の開発としては他社との開発競争に勝つために

タイムラインの短縮が求められ、医薬品の上市までのアプローチを考えると、出来るだけ多くのターゲットについて生産株構築をしなければならない。そこで、多くの製薬企業でこの育種工程の単細胞由来性を明確に担保した手法での、効率化ハイスループット化が求められている[6]。本研究では、この半固形培地とハイスループットのクローニング機器を組み合わせた ClonePixFL (Molecular Device)を用いて、育種プロセスの最適化を行った。

1.6. 本論文の構成

以下に本研究の概要を記した。

第 2 章では、これまでの主流である限外希釈法による生産株取得の最適化をプライマリークローニングの段階で実施した。複数の目的産物(抗体)を使って、クローニング時の培養条件を変えたことでの取得効率や取得されるクローンの特性に違いがあることを示した。これらを組み合わせて、最適な限外希釈法でのプラットフォーム的な条件を割り出した。

第 3 章は、第 2 章での限外希釈法の欠点である効率の悪さや、細胞株樹立までの期間を短縮することを目的としてハイスループットのクローニング機器を用いたプライマリークローニングを実施した。ここでこの系の根幹を成す、半固形培地の培地成分を最適化することで、生育した総コロニー数と、期間内で十分な大きさまで生育するコロニー数(細胞増殖速度が向上したことを示す)を向上させることに成功した。その結果、評価対象のコロニー数を大幅に向上させることができた。さらに、半固形培地に細胞を播種する前の前培養条件(期間、初期細胞密度、選択剤濃度)を最適にすることで、育種プロセスの効率と期間を大きく改善できた。

第 4 章では、細胞株樹立の上で欠かせないサブクローニングについての研究である。まず、限外希釈法によるサブクローニングについての実施例を示した。遺伝子導入された細胞株をクローニングしたいいわゆる親株より、それを再度クローニング(サブクローニング)して得られる娘株はより高生産であると言われているが、親株ごとの違いを網羅的に検証し、その生産性向上効果を確認しさらにその主たる寄与は細胞ひとつあたりの生産性を保ったままの増殖性の向上にあることを示した。さらに、第 3 章で用いられたシングルセルベースのクローニング機器を用いたサブクローニングも実施し、mono-clonality を確保できる播種密度を確認し、期間短縮に寄与することを示した。また、この系が親株由来の不安定の検証に有効であることも示した。

最後に第 5 章では、本研究で明らかになった結果を総括して、今後の課題とともに研究の展望についてまとめた。

短縮語一覽

Abbreviation (略語)	Description (意味)
BSA	Bovine serum albumin
CD	Chemical defined
CDACF	Chemical defined animal component free
cGMP	Current good manufacturing practice
CHO	Chinese hamster ovary
CHOK1SV	Suspension variant of Chinese hamster ovary K1-SV strain
CLD	Cell line development
Conf.	Confluent
CPFL	Clone Pix FL
CM	Clone media
CMV	Cytomegalovirus
CSI	Clone Select Imager
dFBS	Dialyzed fetal bovine serum
DGV	Double gene expression vector
DPS	Days post seeding
DT	Doubling time
dhfr / DHFR	Dihydrofolate reductase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCM	Flow cytometry
GMP	Good manufacturing practice
GS	Glutamine synthetase
HPLC	High performance liquid chromatography
HTS	High throughput
ICC	Initial cell concentration
ICH	International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IgG	Immunoglobulin G
IND	Investigational new drug application
IVC	Integral viable cell density
LD	Limited dilution
LN or Ln	Natural logarithm

mAb	Monoclonal antibody
mg	Milligrams
mL	Milliliters
MCB	Master cell bank
MSX	L-Methionine sulfoximine
MTX	Methotrexate
NA	Not applicable/not available
pCO ₂	Partial pressure of CO ₂ in the culture medium
pg	Pico gram
pcd	Pico gram cell per day = unit of SPR
PDL	Population doubling level
PTM	Post translation modification
Qp	Specific productivity
RCB	Research cell bank (pre-master cell bank)
rAlb	Recombinant Albumin
rpm	Rotation per minute / Revolution per minute
SCB	Seed cell bank (pre-master cell bank)
SD	Seeding cell density
SF	Shake flask
SGV	Single gene expression vector
SPR	Specific productivity
TBD	To be determined
TF or TX	Transfection
VCD	Viable cell density
Via.	Viability
µg	Micro gram
µL	Micro liter
µM	Micro molar
w/	With
w/o	With out
WFI	Water for injection

第2章 限外希釈法による細胞株樹立

2.1 緒言

限外希釈法 (Limiting Dilution :LD) は、Conventional な方法として、これまでバイオロジックス生産細胞株の樹立において用いられている手法である。限外希釈法の原理としては、細胞集団を出来るだけ希釈播種することで、結果的に単細胞に由来する細胞集団として細胞クローニングする手法である。

この方法では、特別高額な実験機器が無くても実施可能であり、細胞の特性を把握しやすく細胞評価にバイアスが入りにくいといった利点がある。しかしながら、①良い株を得ようと多数を評価しようとする工程自体が労働集約的なので工数がかかる。また、②原理上、単細胞からの細胞立ち上がりにおける細胞の脆弱性の為、工程全体に時間がかかり、それを短縮するために培地に血清を用いることがある。③クロナリティの担保は、統計的な手法かこの後のサブクローニングによらざるを得ないという欠点がある。

プライマリースクリーニング時にはプラスミド DNA をトランスフェクションした細胞のうち、低い確率でしか目的遺伝子が導入された安定発現株が出現しないため、数百～数千の細胞が 1 well に入る条件を設定する。そのうち遺伝子導入された統計的に細胞株が 1 cell 以下になる条件のみを採用する。これだけではクロナリティーの保証には十分でないため一般的に 2 step 目のクローニング (サブクローニング) が必須となる。

一方、優良 pool からのクローニングや一度樹立した細胞株からのサブクローニング時には細胞が 1 cell/well 以下となるように希釈、播種を行う。一般的にはこちらの 1cell/well 以下で播種する方法のほうが限外希釈法として知られている。

本研究で用いた CHO-K1SV 宿主細胞 (Lonza Biologics) と GS 発現系システム (Lonza Biologics) では、pEE12.4 と pEE6.4 という二つのプラスミドベクターを使用した。基本的に pEE12.4 (約 7.5kbp) という GS 遺伝子が挿入されたベクターでメインの目的遺伝子 (GOIs : Gene of interests) を発現させるための Single gene expression vector (SGV) を構築する。抗体のように 2 ペプチドが必要な場合は、GS 遺伝子を含まない pEE6.4 (約 5kbp) というベクターでももう一つ SGV を構築し、最終的に両者を組み合わせて一つにした Double genes expression vector (DGV) を作製したものを使用する [3] [5] [11]。この DGV を用いて宿主細胞に遺伝子導入する。このベクターいくつかのバリエーションが存在してはいるが、今回研究で用い

た SGV の元となる pEE12.4 と pEE6.4 のベクターマップを Figure 3 に、構築後の DGV 発現ベクターの例を Figure 4 に示した。この発現系の特徴として以下の6つが挙げられる。

- ① 宿主の CHO-K1SV 細胞が変異株ではない[3]
- ② 宿主染色体への組み込みは、非特異的な相同組換えによる。この結果、遺伝子導入体はすべて異なるゲノム部位(loci)に目的遺伝子を組み込んだヘテロな集団となる。
- ③ 一つのベクターに H 鎖、L 鎖を同時に載せた Double gene vector system である[5],[4]。これにより、H 鎖のみ高発現、L 鎖のみ高発現という不均等がなくなる[45]。
- ④ 宿主細胞へのランダムな integration による安定遺伝子導入系で、生産物遺伝子(GOIs: Genes of Interests)と marker の GS 遺伝子も同じベクターで発現させることで、GS の発現量を指標に GOIs の高発現株を取得しやすい
- ⑤ 強力な hCMV-MIE promoter により GOIs を発現させる[11]
- ⑥ 少し弱めの SV40 promoter により GS 遺伝子を発現させ、GOIs 発現量とのバランスから高発現株を取得する。

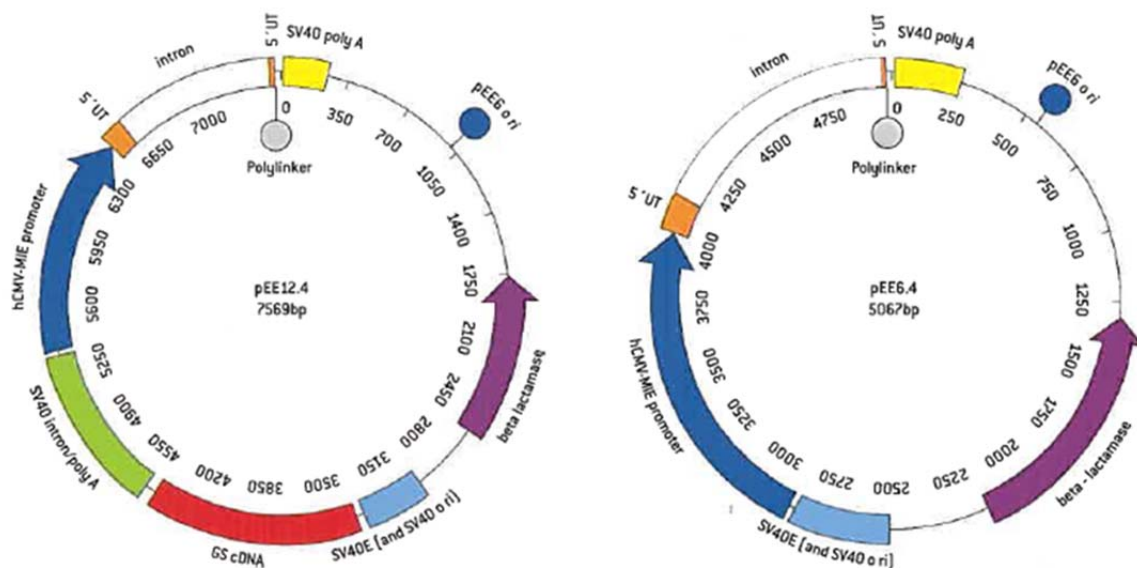


Figure 3 Plasmid map of pEE12.4 and pEE6.4

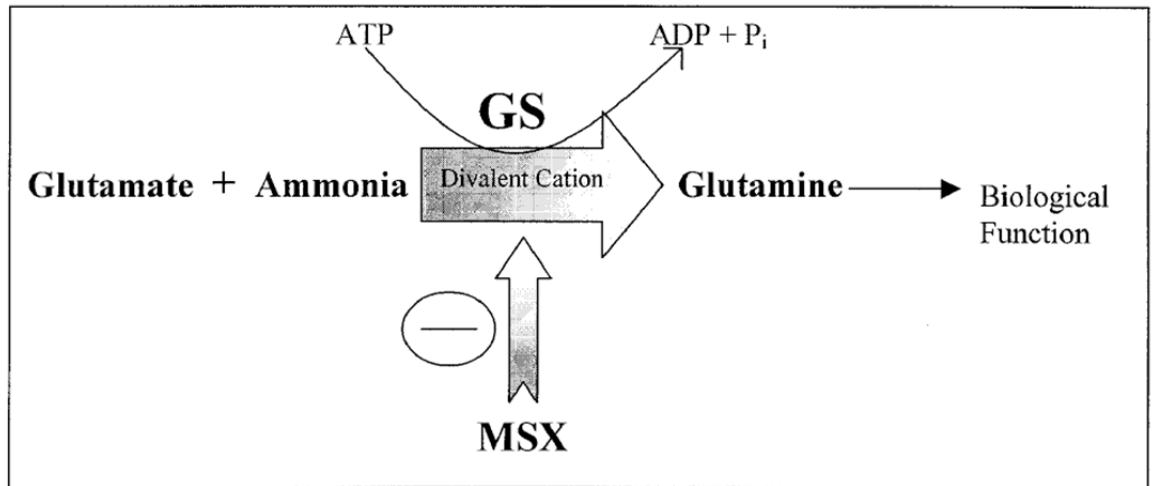


Figure 5 GS (Glutamine synthetase)によるグルタミンの生成と阻害剤の MSX (Methioninesulphoximine)の関係
(Barnes L.M., et al, 2000 より引用[1])

2.2 実験材料および方法

2.2.1 細胞株 (Cell line)

CHO-K1SV 株(Lonza Biologics, Slough, UK)を宿主として使用した。本株は CHO-K1 細胞株由来で、無血清無蛋白含有培地に馴化された細胞である。

2.2.2 培地

細胞株樹立においては、以下の 3 種類の培地を使用した。

- ① CD-CHO medium (Invitrogen) supplemented with 6mM L-glutamine (Invitrogen)
- ② CD-CHO medium supplemented with 25 μ M methionine sulfoximine (MSX)
- ③ CM25 Medium (Lonza Biologics) with 10% dFBS (Fetal bovine serum)

外部からの追加 GS 遺伝子を保有していない宿主細胞 CHO-K1SV の培養に際してはグルタミンを含む①を使用した。グルタミンは 200mM の濃度の濃縮液を凍結状態で保管し、使用時に溶解して使った。プラスミドによる遺伝子導入後の Transfectants の集団や選抜された細胞株の無血清条件での培養には、グルタミンを含まず、さらに選択圧剤である MSX を添加した②を使用した。なお、MSX の基本濃度は 25 μ M であるが、実験条件によって濃度を変化させている場合もある。血清含有条件下での遺伝子導入株取得には③の培地を使用し、必要に応じて MSX を添加した。

2.2.3 発現ベクターと挿入遺伝子

本研究では発現させる目的遺伝子としては、5 種類のヒト化抗体を用いた。本文中では、それぞれ mAb-A、mAb-B、mAb-C、mAb-D、mAb-E とした。

諸言に述べたように、本研究では 2 種類のベクタープラスミド①pEE12.4 と②pEE6.4 を使用し発現ベクターを構築した。

抗体産生ハイブリドーマの cDNA から遺伝情報として取得した H 鎖 (Heavy chain)、L 鎖 (Light chain) それぞれのうち鎖長の短い L 鎖を pEE12.4 に、サイズの大きい H 鎖を pEE6.4 に大腸菌を用いて個別にクローニングしたものをそれぞれ、SGV とした。

2 つの SGV を共通の制限酵素で切断してライゲーションしたものを抗体発現用の DGV とした。DGV は制限酵素 (Pvu I) で線状化され DNA 量として 40 μ g ずつ小分けされた。

2.2.4 培養条件

宿主細胞(CHO-K1SV)の凍結バイアルは液体窒素保管状態からとりだし、素早く

36~37°Cのウォーターバスで溶解後、氷冷した CD-CHO 培地 (Life Technologies) に懸濁した。凍結剤を含む細胞を洗浄するため、150~200xg (15 or 50mL-tube) で 5 分間遠心して。上清を除去した後、細胞のペレットを初期細胞密度 (ICC) が $2.0 \sim 4.0 \times 10^5$ cells/mL となるように、6 mM グルタミン入り CD-CHO に懸濁し、5% CO₂、36.5°Cで振とう培養 (140rpm) する。通常は、125mL のベント蓋つきのディスプレイブルフラスコ (Corning) を使用する。継代はオーバーグロースを防ぎながら ICC を指標に 6mM グルタミン含有 CD-CHO 培地で 2~3 日ごとに行った。

取得された、生産株の培養条件も基本的には同じであるが、培地はグルタミン不含有で適当濃度の MSX を含む培地を使用した。

2.2.5 限外希釈法による育種

安定発現細胞構築のための遺伝子導入は、エレクトロポレーション法で行った。前培養により準備された対数増殖期の細胞を回収し、グルタミン不含有培地で洗浄後 1.4×10^7 cells/mL に調整した宿主細胞懸濁液を使用した。宿主細胞懸濁液 700 μ L (1.0×10^7 cells) に対して、線状化された DNA 溶液 100 μ M (40 μ g) を加え、0.4 cm キュベット (BIO-RAD、165-2088) 内でよく混合した。エレクトロポレーションは、BIO-RAD 社の Gene Pulser Xcell™ を用い、Exponential Decay 法、電圧 300V、静電容量 900 F で実施した。遺伝子導入後の細胞を所定細胞“数”になるように 96well-plate に 50 μ M/well ずつ分注し、その 24 時間経過後に 150 μ L 分の MSX (添加濃度は設定濃度の 4/3 倍) を含む培地を添加した。培地条件としては、無血清 CD-ACF 条件 (Chemical defined animal component free、培地は CD-CHO medium supplemented with MSX) と血清含有条件 (CM25 Medium with 10% dFBS、MSX) で使用する培地が異なる。最初の 96 well-plate での静置培養条件で、4~8 週間培養後、96 well で充分生育が見られるプレートについては顕微鏡観察などによる増殖確認後、50 μ L ずつサンプリングを実施し、生産性評価を行った (2.2.6 項に記載: ELISA または Octet 法)。

選抜された株は、24well-plate → T25 角型フラスコへと選抜評価と拡張培養を繰り返した。血清含有条件では、T-25 flask までは血清含有培地であるが、その後、T-75 角型フラスコに拡張する際、血清の減量による無血清培地への馴化を行ったのち、振盪フラスコへ拡張した。無血清条件では、T25 角型フラスコから直接、振盪フラスコ (125mL、Corning) へ拡張し継代した。

振盪条件での十分な増殖性が確認された細胞は、生産株 (親株) として 7.5% DMSO を含む凍結用培地で保存した。

2.2.6 生産物濃度評価方法

培養培地中の生産物濃度は、サンドイッチ ELISA 法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay: 酵素結合免疫吸着法)又は、バイオレイヤー干渉法(Bio Layer Interferometry: BLI)による生体分子間相互作用解析システム Octet QK (Forte bio, Menlo Park, CA) を用いた(Octet 法)。

ELISA 法に際しては、1 次抗体として goat monoclonal anti-human IgG Fcy antibody (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) を 96well-plate にコーティングし BSA を含むバッファーでブロッキングを行う。サンプル添加後、二次抗体として Horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-human IgG (Jackson Immuno Research) を使用し、酵素基質として TMB を加え酸化して黄色になった溶液を 450nm の波長で測定した。これを標準曲線に照らし合わせて定量した。

Octet 法では、バイオセンサー先端表面上に固定されたレイヤーにリガンドが結合することで生じる表面から反射された白色光の干渉波の波長シフトの変化を、リアルタイムに計測し解析することで定量する。抗体濃度測定用には Protein-A のバイオセンサーを用いた。

2.2.7 振盪培養評価

取得された細胞株は、前培養終了時の生細胞密度から初期細胞密度が同じになるように計算し、初期液量 10-30mL で振盪フラスコでの回分培養(Batch culture)を行った。各ポイントでのサンプリングにより、生細胞密度と目的産物を測定し、次項の細胞増殖性、生産物産生能の指標を算出した。

2.2.8 各種細胞代謝の指標

世代数 (PDL: Population doubling level)、細胞倍加時間 (Dt: Doubling time, [Hrs])、積算生細胞密度 (IVC: Integral viable cell density, [cells-day/L])、比生産性 (Qp: specific production rate, [pg/cell/day]) など各種細胞代謝の指標は以下の計算式で求めた[39]。

$$\textcircled{1} \text{ PDL} = 1 / \text{LN}(2) \times \text{LN}(\text{Cf} / \text{Ci})$$

このとき

Cf = viable cell density (cells/mL) at time f

Ci = viable cell density (cells/mL) at time i (inoculation) And f > i

$$\textcircled{2} \text{ Dt} = (\text{Tf} - \text{Ti}) \times \{ \text{LN}(2) / (\text{Ln}(\text{Cf} / \text{Ci})) \}$$

このとき

Tf = time f, Ti = time i

Cf. = viable cell density (cells/mL) at time f

C_i = viable cell density (cells/mL) at time i (inoculation or previous sampling) , And $f > i$

③ $IVC [10^6 \text{ cell-day/mL}] = IVC_0 + (1/(2 \times 10^6) / \sum (t_i - t_{i-1})(VCD_i + VCD_{i-1}))$

このとき、

t : time point i (day)

VCD : viable cell concentration [cells/mL]

④ $Q_p = \text{titer} / IVC$

このとき、

titer : product concentration [mg/L]

また、Outgrowth efficiency (生育ウェルの取得効率) は以下の計算式を用いた。

⑤ Outgrowth efficiency (%)

= number of cell growing wells / number of total seeding wells X 100

2.3. 結果

2.3.1 播種細胞密度の比較

このクローニング手法のように Transfectants を非生産細胞も交えたまま、同じ well 多数の細胞を播種する限外希釈法では、outgrowth efficiency に影響を与えるスクリーニング時培養条件と、その際の播種細胞密度が重要である[18][41]。

細胞培養用のマイクロウェルプレートの well に播種された細胞は、グルタミン不含有という培地条件、かつ GS 遺伝子の阻害剤である MSX にさらされることでベクターからの GS 遺伝子が導入されていない細胞に対しては2重のスクリーニングを受けることになる。理論上は各 well に数千細胞が含まれるが、そこに遺伝子導入された細胞が存在しなければ、その well からの増殖は認められないことになる。また、そこに遺伝子導入された細胞があっても GS 遺伝子の発現レベルが MSX の抑制に打ち勝つレベルにないと、細胞増殖に必要なグルタミンを産生することができずに、その well からの増殖は認められない。

Figure 6 では、mAb-A を導入した細胞をスクリーニングした際の各初期選択培養条件における outgrowth efficiency を示している、どの条件においても MSX 濃度が低いほど細胞の outgrowth efficiency が高くなっていることが分かる。また、播種細胞密度が高いほど outgrowth efficiency が高くなっている。そして、血清存在下 (w/Serum) では無血清(CD-ACF) 条件より、細胞の立ち上がりが良いことが示されている。

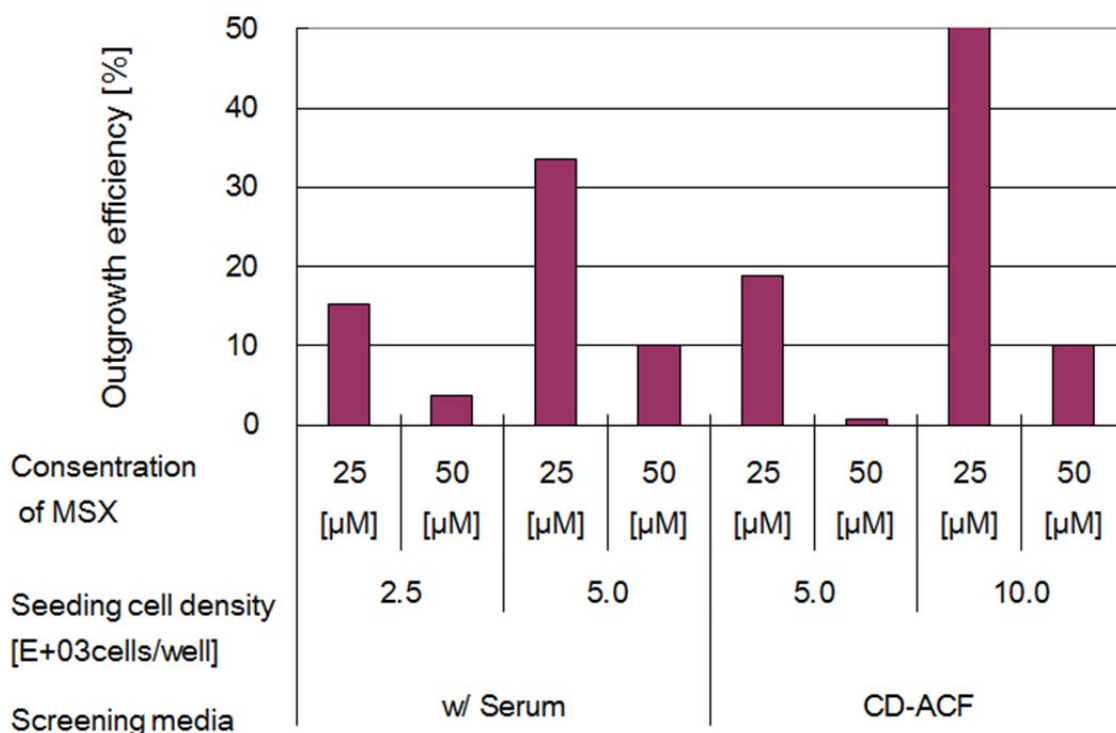


Figure 6 Comparison of outgrowth efficiency with serum containing media vs. CD-ACF

横軸に実際観察される表面上の outgrowth efficiency を示し、縦軸がそのときの各 well の状態をシミュレーションしたものが Figure 7 である(文献[12] の理論をもとに計算)。例えば、半数の well から細胞が立ち上がってくる最右端の条件ではそのうち半分しか 1cell/well のものではなく、他は同じ well に 2cell 以上の transfectants が含まれていることを示している。outgrowth efficiency の低い領域では、single-cell の確率は outgrowth efficiency に比例し、この図からは、5%の outgrowth efficiency のとき single cell である確率は 95.1%であり、同様に、10%の outgrowth efficiency のとき single cell である確率は 90.1%である。その後の効率等も考えると、single cell が 90%を下回るような条件は好ましくないと考えられた。

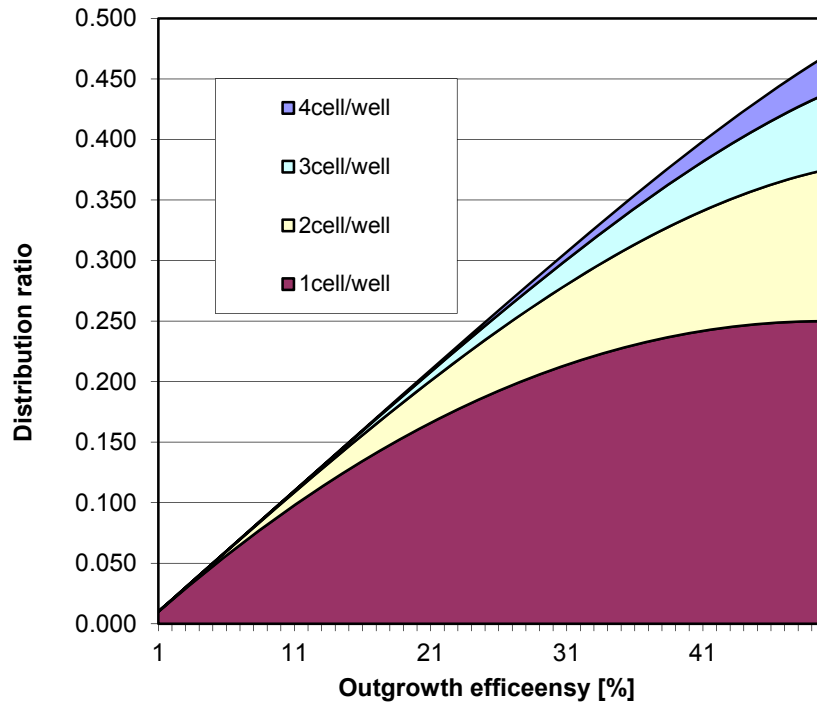


Figure 7 Simulation of outgrowth-efficiency and distribution of existing cell number

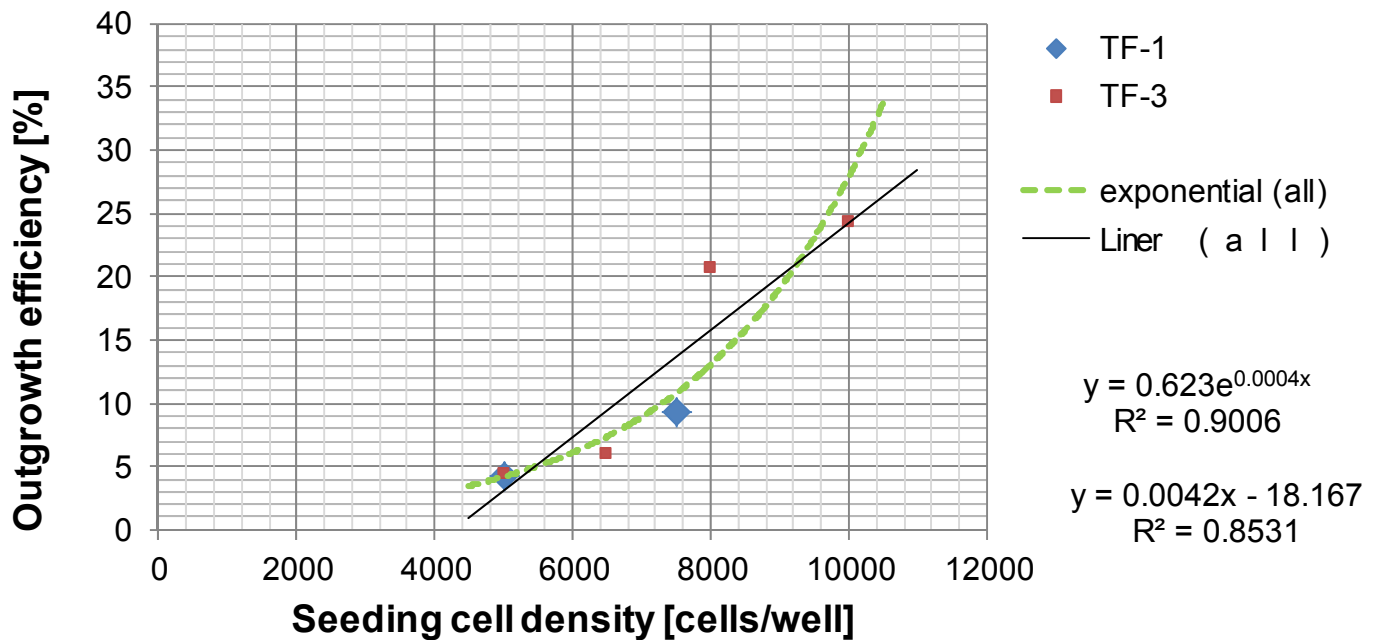


Figure 8 Outgrowth efficiency at each seeding cell density per well 対数

TF-1 と TF-3 はトランスフェクションロットを示す。

指数近似曲線 (exponential: 緑) と線形近似曲線 (liner: 黒)

無血清条件で mAb-E を用いて各 Seeding cell density で播種した際の outgrowth efficiency をプロットしたものが Figure 8 である。この条件の場合、理論上 single cell を 95%以上の確率で得るためには、5,000cells/mL 程度が好ましく、90%以上の確率で得るためには、8,000cells/mL 以上で播種した条件からはクローニングしないことが好ましいと考えられる。

Outgrowth efficiency は、挿入遺伝子、スクリーニング条件によって異なった (Figure 6、Figure 10)。

2.3.2 スクリーニング期間の比較

宿主細胞は、最適培地条件で約 20-24 時間の倍加時間を示すが、スクリーニング条件下では single cell からの立ち上がりになることや、transfection shock により増殖速度はこれより遅くなり、倍加時間は長くなる。細胞が 24 時間で倍になる標準的速度であれば、10 日間で、 $2^{10}=1024 \approx 10^3$ であり、20 日間(3 週間)で、 $2^{(20)}=2^{(10+10)}=1048576 \approx 10^6$ で 96well plate ではコンフルエントであるが、実際は、4-10 週間でコンフルエントになる。

序論でも述べられように、遺伝子導入された transfectants は heterogeneity で不均一な集団であり増殖速度も一定ではない。早い時期に評価すると、増殖が遅くその時点でまだ細胞が充分増えきっていない well は低く評価されてしまう。一方、静置培養でコンフルエント近くに達した well はその時点で適切に培地添加や拡張培養などをされないと、栄養源の枯渇などで細胞が死滅してしまうことになり優良株を取り逃すことになりかねない。

Table 1 Screening culture duration and number of clones at each stage(mAb-A)

左のカラムは、96well での培養期間を示す(5W:3 週間~10W:10 週間)

mAb-A	96well	24well	T25	T75	SF
Serum_5W	138	86	20	11	5
Serum_6W	69	65	10	4	4
Serum_8W	31	24	10	6	4
Serum_10W	9	8	3	3	3
Total	247	183	43	23	16

mAb-A	96well	24well	T25		SF
CD_5W	49	24	20		5
CD_6W	66	38	20		3
CD_8W	49	24	10		5
CD_10W	4	1	1		1
Total	168	87	51	0	14

Table 2 Screening culture duration and number of clones at each stage(mAb-C)

mAb-C	96well	24well	T25	T75	SF
Serum_3W	30	23	21	14	8
Serum_4W	61	48	30	10	6
Serum_5W	208	96	30	12	7
Serum_6W	159	72	27	12	6
Serum_7W	199	72	14	8	6
total	657	311	122	56	33

mAb-C	96well	24well	T25		SF
CD_6W	68	30	20		13
CD_7W	41	23	20		7
CD_8W	43	24	10		6
CD_10W	39	24	10		5
total	191	101	60	0	31

静置培養から、振盪フラスコ(SF: Shaker flask)に拡張する基準は明確とは言えないが、その時点での生産性などが有望な株を選んでいる。それゆえ、Table 1 や Table 2 にあるように最終的な振盪フラスコまでの拡張クローン数をほぼ同程度とみなすと、初段のスクリーニング期間は最大二倍程度の差が付くことがあるということである。血清含有条件のほうが無血清条件より、ピークに達するのが 1-2 週間早いことが分かる。取得された発現株(mAb-C を発現)を振盪培養まで評価して、取得時期ごとに比べたのが、Figure 9 である。傾向として、短いスクリーニング培養期間では、増殖性が良いものが多い(IVC が高い)が、細胞あたりの比生産速度が低い株が多かった。逆に、長いスクリーニング培養では、良好な細胞増殖は望めないが、細胞あたりの比生産速度が高い株が得られている。ただし、長いスクリーニング期間から得られた細胞株では傾向として生産性自体も低くなってきている。

この段階のプラットフォームでは、極端に短い培養期間からは特に、比生産性の観点から確率的に優良クローンが得られにくいということが示された。

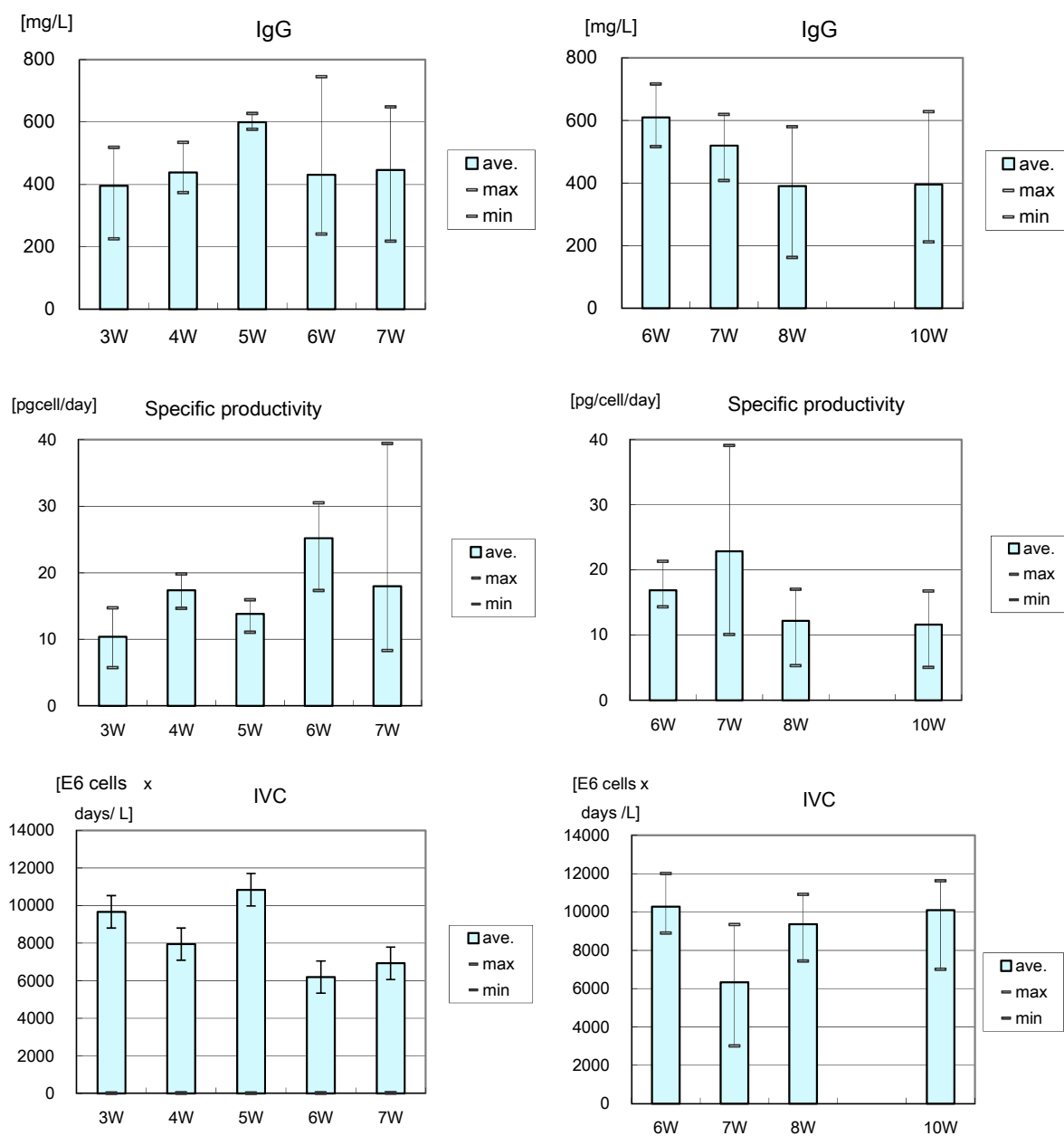


Figure 9 Properties of established cell lines (mAb-C) derived from different screening duration

[Left panel: Serum_TF、Right panel: CDACF_TF]

[最上段:回分培養でのIgGの最終濃度(mg/L)、中段:同じく比生産速度(pg/cell/day)、下段:IVC]

■は好ましい特性

2.3.3 酸素濃度の比較

初代細胞の培養の際などに問題にされる、酸素毒性の影響を確認する為、低酸素条件(10%酸素濃度)でのスクリーニングを mAb-B を導入した細胞集団で試みた。スクリーニング効率の比較結果の一部を Figure 10 に示す。この mAb-B では選択剤の MSX を下げた条件では細胞が生えすぎて評価できなかった。

得られた、細胞株の生産性としては充分足切りされていないためか、低生産株の割合が大きく、平均では、通常酸素濃度(Air)のほうが良くなった。

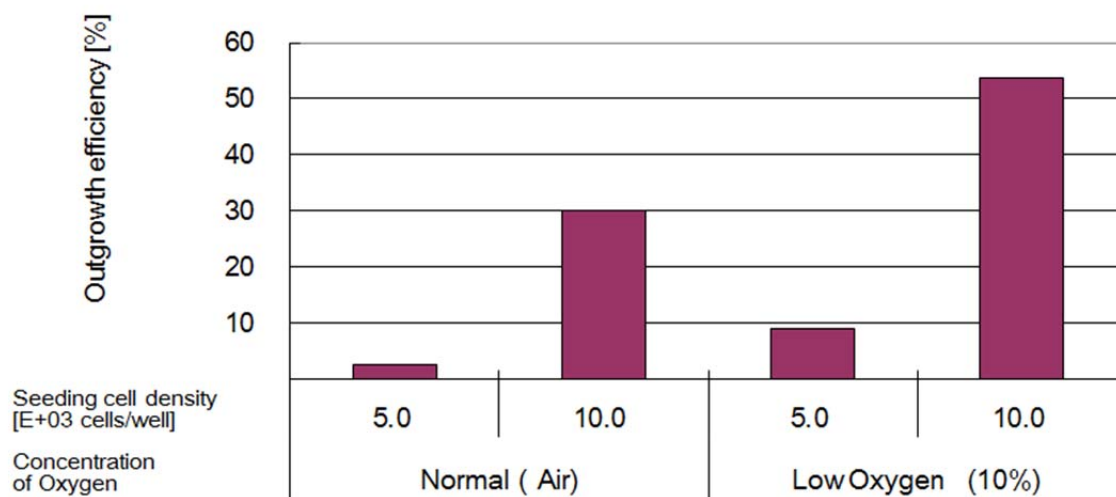


Figure 10 Comparison of outgrowth efficiency with oxygen concentration:

CD-ACF condition (mAb-B), concentration of MSX is 50 μ M

2.3.4 血清含有培地と無血清培地の比較

血清含有条件と無血清条件でのスクリーニングでの違いをいくつかの目的遺伝子で比較した。Figure 11 は mAb-A のスクリーニングの最初の段階である、96well-plate での生産性評価を示している。無血清条件下では、その半分程度が非生産株であったのに対し、血清を含む培地条件では得られる株数も多く、標準の 25 μ M でも多くの生産株が得られている。この段階では、血清があることで well 中の細胞数も多く、また細胞が挿入遺伝子の抗体を産生する際も、血清の生産性向上効果で高くなっていたとも考えられる。

これまでの検討から、無血清条件下では MSX 濃度を高めにスクリーニングすることが良いことが分かったので、この最適な条件で mAb-E の育種を行ったときのデータを Figure 12 に示した。同じく mAb-E のスクリーニングの最初の段階である、

96well-plate での生産性評価を示している。ここでは、無血清条件ではその 40%ほどが、0-1mg/L という低生産性であるのに対して、血清含有培地では、そのような低生産及び非生産株の比率は非常に低い。つまり、血清含有条件では細胞自体の立ち上がりもよいので、同じ細胞数を処理すれば CD-ACF 条件に比べて「多数の」「生産性の良い」株が容易に得られたと言える。

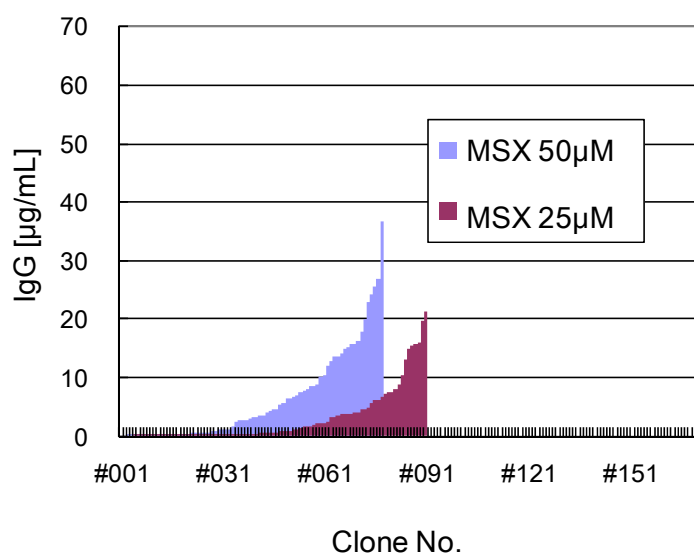
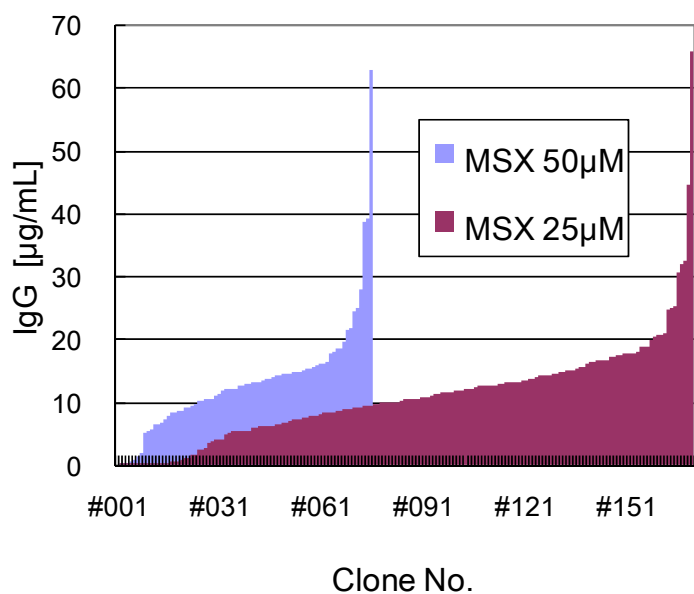


Figure 11 IgG (mAb-A) productivity of individual clones in 96well stage (Upper panel: Serum_TF , Down panel: CDACF_TF)

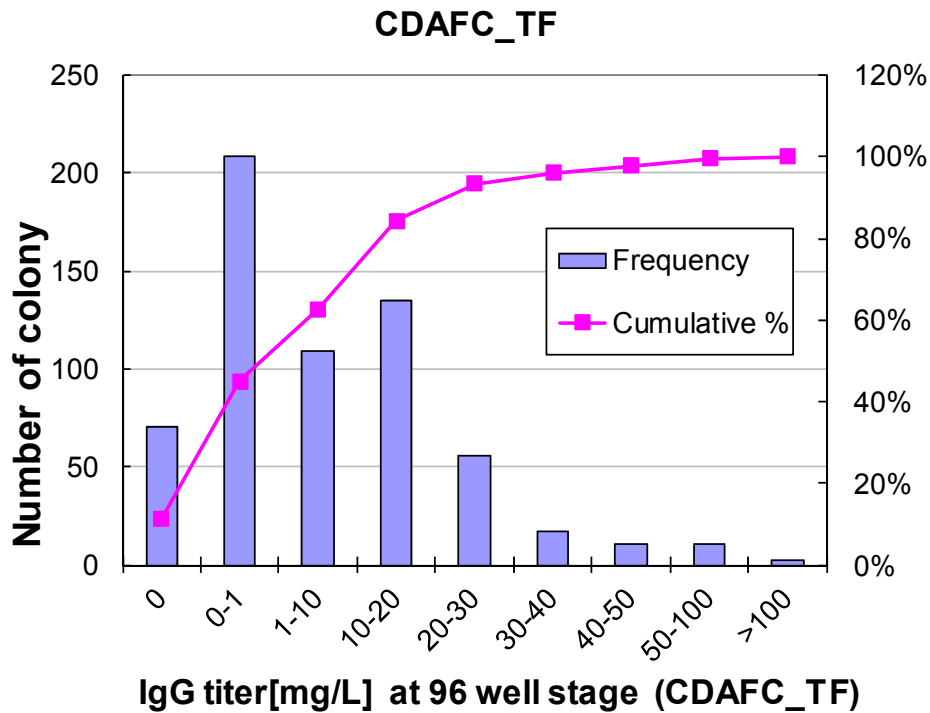
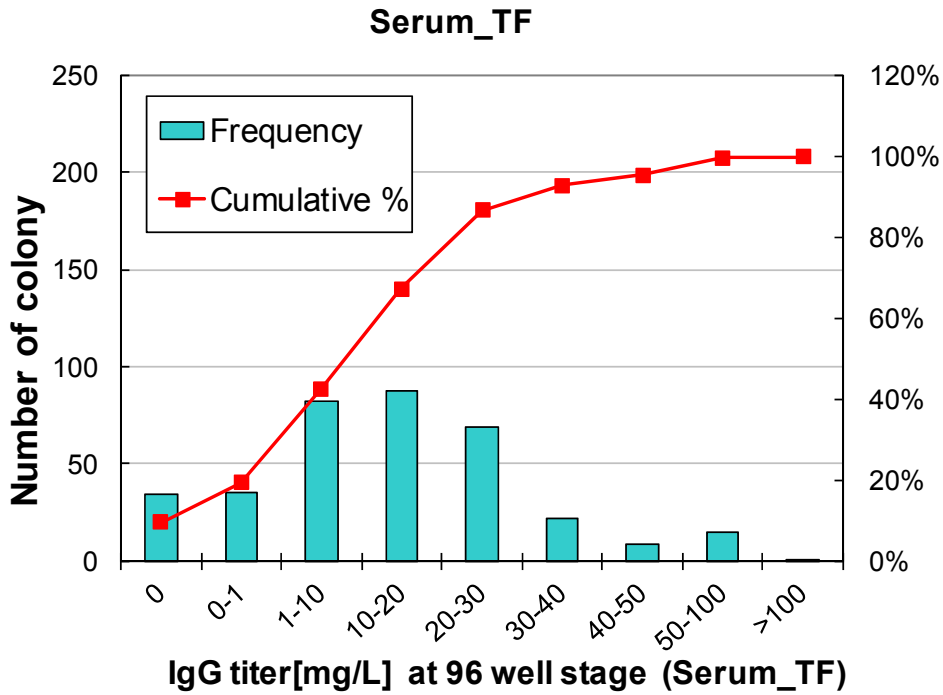


Figure 12 **Distribution of IgG (mAb-E) productivity of cell lines at 96well stage (Upper panel: Serum_TF, Down panel: CDACF_TF)**

2.3.5 選択剤 MSX 濃度の比較

GS 遺伝子の阻害剤である MSX の濃度は各種条件設定の際に、基本的に 2 段階以上設定された (Figure 6、Figure 11)。原理からも自明な通り、低 MSX 濃度では選択圧としての機能が不十分で Outgrowth efficiency が向上し、高 MSX 濃度では、増殖が抑制される。また、特に無血清条件下では、高 MSX 濃度で低発現株に対して「足切り」をすることで効率よく選抜することができる。この際は、播種密度も高く設定する必要がある。

2.4 考察

1st スクリーニング時の培養期間ごとの傾向では、早期に立ち上がってくる細胞は、増殖性の高い細胞が多かった。初期の評価は評価数も膨大であるので、抗体産生量だけで評価せざるを得ないが、その時点での抗体産生量は、抗体産生量を示す以下の式

抗体生産: $\text{Titer [g/L]} = Q_p \times \text{IVC}$

Q_p : Specific productivity [pg/cell/day]

IVC : Integral viable cell density 細胞数と時間の積分値

のうち、

IVC に依存する部分が多くなっているものが多いと言える。また、あまりに立ち上がりが早いものは選択圧が不十分でいわゆる「足切」できなかった低生産性の細胞株が多いことや、さらに選択圧が不十分で本宿主細胞特異的な内在性の GS 遺伝子による非生産株が含まれていることが多いので除く必要がある。

逆に、遺伝子導入から 8 週-10 週といった後半に立ち上がってくる細胞は、選択圧により増殖が制限されているだけでなく、細胞の特性として増殖速度が遅くなっているものが多く、それらを振盪培養などへ進めても細胞が充分増えないケースが多かった。

酸素毒性については、これまでも報告がある。今回、CHO-K1SV においても低酸素濃度にすることで細胞の増殖を促進できることが分かった。ただ、遺伝子導入効率などから考えると、outgrowth efficiency は極端に高く、播種細胞密度が増えるとその影響は加算効果だけではない、正の相互作用が見られ 1well から複数コロニーが立ち上がってくるようなことも見られた。さらに、実際取得された細胞株は低生産のものが多かった。低酸素を保つためのマルチガスインキュベーターを充分備えることや、常に窒素ガスを供給することを考えると、特に際立った正の効果のないこともあり、敢えて低酸素条件にしない培養法を基本とした。

限外希釈法で重要なパラメーターは選択剤の濃度設定と播種細胞密度であると考

えられた(Table 3)。

Table 3 Summary of condition setting for Limiting Dilution Cloning

	Item	Condition	Outgrowth efficiency	Efficiency of obtaining high producer
#1	Culture duration at 1st plate (96well)	3weeks through 10weeks	3 to 5 weeks	5 to 8weeks
#2	Screening media	with FBS vs. CDACF	with FBS	with FBS ≒ CDACF
#3	Concentration of oxygen in incubator	Low: 10% O ₂ vs. Normal: 21% (Air)	Low	Low ≒ Normal
#4	Concentration of MSX	25 μM vs. 50 μM	25 μM	Media dependent correlation with MSX with FBS: 25 μM CD-ACF: 50 μM
#5	Seeding cell density	2500-10000 cells/well	Mab dependent correlation with MSX	-

2.5 結論

細胞育種時の条件を各種変えることで細胞取得効率に差があることが示された。比較条件として同じ数(1x10⁷cells)の transfectants を評価して定量化しても、その一つ一つの細胞状態が異なるので同じ評価をしているとは言えない難しさがある。しかし、発現させる目的遺伝子を複数実施しながらいろいろな条件を確認することで、実使用に意味のある条件を導き出すことができた。

すなわち、1 回目のスクリーニング培地(96well-plate)からの評価と拡張培養の時期としては、あまりに増殖の速すぎる細胞を過度に含まないように 5 週目頃に一度行い、そのときまで充分増殖できなかった細胞をその 2 週間程度後に評価と拡張培養を行うと良い。それ以降に増殖してくる細胞は、細胞の増殖能が劣る可能性が高いので積極的に取得する必要はそれほどないことが示された。

低酸素条件では transient な遺伝子発現株や内在性の GS 遺伝子に由来すると思われる非生産株の割合が増すため、評価数が増大する割に高生産株が効率的に習得できないので、特に発現細胞の取得が難しい分子種を発現させるときを除いて基本的に利用する必要はない。

血清の使用に関しては、動物由来原料を極力排するという昨今の規制当局の姿勢から、無血清無タンパク条件を主とする。ただし、血清由来条件に比べて細胞の取得効率が落ちることと、MSX 濃度が低い条件では高生産株が取得確立が高くない為、MSX 濃度は血清含有条件よりも高め(50 μ M)にし、播種細胞密度も高めとする。そして供する transfectants も充分(人手の要る 1 次評価のサンプル数はそれほど増えなくて済む)あるようにすることが好ましい。

血清含有条件は、今後は非主流な方向になると考えられる。ただし、現在でも十分に試験材料の由来を示し適切に記録をとる方法で細胞育種を行えば、規制当局からの要請には充分適合できる。目的タンパク質をきちんと発現する transfectants を効率的に取得できる条件である。また、CHO-K1SV 株の場合、遺伝子導入後の細胞の立ち上がりが無血清条件に比べて約 1 週間程度早いため、血清低減や無血清化のプロセスによる遅れはなく、無血清条件とほぼおなじリードタイムで発現株が SCB/RCB として保存できる(Figure 2)。

細胞の播種密度と選択剤の濃度は、この限外希釈法において最重要な因子である。また、これは、目的遺伝子との作用で一概に決めることは難しい。同じ well に複数の遺伝子導入 transfectants が起き上がってこないような播種密度と選択剤濃度を設定する必要がある。無血清条件の場合、MSXの濃度としては50 μ Mを基本(上限)として予備検討を行うのも効果的である。血清含有条件の場合、25 μ M が基本となる。これも複数の抗体遺伝子を発現させることで分かったことである。

第3章 シングルセルベースクローニング機器による 細胞株樹立

3.1 緒言

第2章で述べた、「限外希釈法」は特別な装置などがなくても細胞株樹立が行えるというメリットはあるが、そのほとんどが作業者の手作業で行われる労働集約的な方法であり効率的ではない[1][15]。

一般に、最適な発現株を取得しようとする場合、できるだけ多くの Transfectants をスクリーニングすることが有効だからである。そこで、単細胞由来であるという高いモノクロナリティーを担保しつつ多くの細胞を処理する方法として一般化してきたのが、細胞を蛍光標識して高生産細胞を分類してソーティングする fluorescence-activated cell sorter (FACS)を用いた育種方法である[7][9][54]。FACSは蛍光抗体で染色した細胞を液流に乗せて流し、レーザー光の焦点を通過させ、個々の細胞が発する蛍光を定量的に測定することのできる FCM (flow cytometry: フローサイトメリー) という機器と同義である。分析専用のアナライザーもあるが、細胞育種には分取可能なセルソーターを用いる。この方法は、非生産細胞と抗体産生細胞を分別できないという限外希釈法の弱点にたいして、これらの細胞を効率よく分別できるという点では有用である。ただし、細胞が液流にある状態で細胞が増殖している状態を直接反映していないことから、蛍光強度と細胞から分泌生産される目的タンパク質の産生量との間に相関がない点や、sortingの際に細胞が物理的ダメージを受けてシングルセルからの細胞回復と増殖が良くない点などが課題となっている[36]。そのため、新しいシングルセルクローニング系の樹立が求められている。

近年、半固形培地 (semi-solid media) を介した細胞評価で細胞表面に分泌される目的タンパク質を評価する系が報告されている[10][32][48]。半固形培地中で単細胞にまで分散された細胞は、その場所に保持されたまま分裂することで単細胞由来のコロニーが形成されるが、そのとき細胞表面に分泌される目的タンパク質も拡散が抑制され、そのコロニー近傍に保持される。目的タンパク質に対する蛍光標識された二次抗体を半固形培地に含ませることで、高生産株に由来するコロニーを蛍光化で可視化、評価できるようになる。このような半固形培地とシングルセルクローニング機器を組み合わせた方法はバイオロジックス生産細胞株樹立にとっても効果的であると期待されている、[13][14][21][48]。しかしながら、無血清馴化 CHO 細胞と、この有効と思われる細胞株スクリーニング方法を組み合わせた詳細な条件検討は報告されていない。

そこで本研究では、半固形培地を使用したハイスループットなシングルセルクローニング系を GS-system の宿主細胞である CHO-K1SV 株に用いた。半固形培地の組成最適化と半固形培地に播種するまでの期間などを最適化することでハイスループット機器でのピッキング効率を向上させ、元々の細胞プールが持っていた多様性 (diversity) を保持したまま、最終的な育種期間の短縮と高生産株の取得を行った。

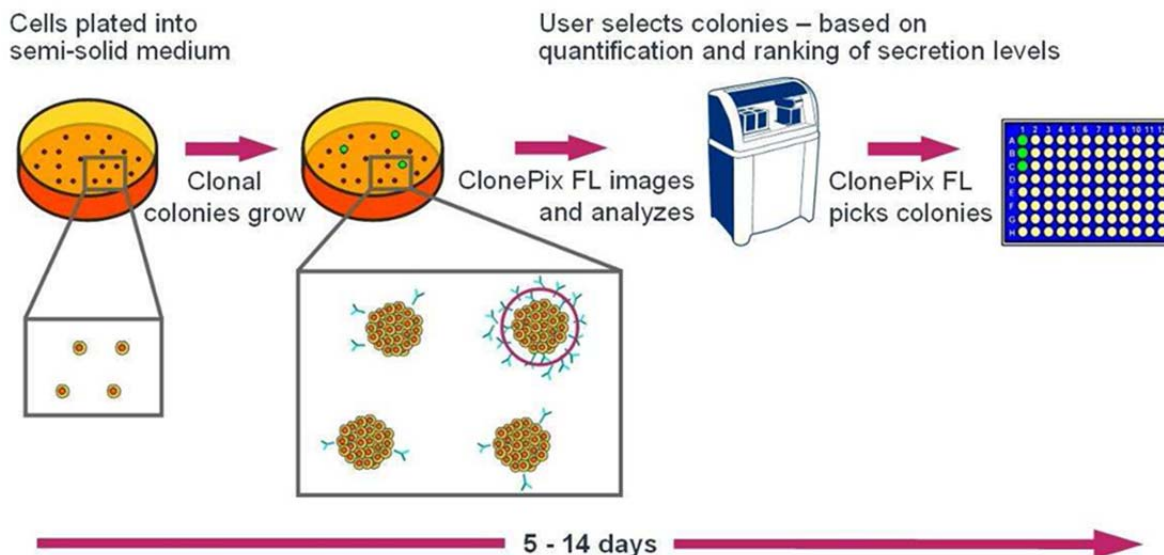


Figure 13 Single cell-based cloning system “Clone Pix FL™”
(Molecular Device 社 Home page “<http://www.moleculardevices.com/>”より抜粋)

3.2 実験材料および方法

3.2.1 細胞株および培地

宿主細胞株と液体培養時の培地および培養条件は前章と同じである。新たに、発現させる目的遺伝子としては、ヒト化抗体 mAb-F も用いた。

半固形培地はメチルセルロースを基材とした、CloneMatrix (Molecular Devices) をベースとし処方最適化を行い、このとき対照として、Pre-mix 処方半固形培地である Clone Media CHO-G (Molecular Devices) も使用した。

半固形培地の処方最適化の際には、組換えアルブミン(rAlb : recombinant albumin)として、Invitro 社製と EMD Millipore 社製の製品を使用した。また、これ以外の添加物として化学合成品のサプリメント(GSEM, Sigma-Aldrich) を使用した。

半固形培地に添加物として使用される培養上清は、宿主の CHO-K1SV 細胞株をグルタミン不含有の CD-CHO 培地で2継代したものを回収し、遠心分離とフィルター濾過で細胞を除いたものを-40°Cに分注保存したものを使用時に再融解して使用した。

3.2.2 遺伝子導入

宿主細胞への遺伝子導入方法は、前章と同じ電圧ポレーション法で実施した。限外希釈クローニングでは、遺伝子導入後すぐにマイクロウェルプレートへ分注(50 μ L/well)したが、シングルセルベースでのクローニング用には、初期細胞密度が 2.0 ~4.0 x 10⁵ cells/mL となるように CD-CHO 培地に希釈し T-25 角型フラスコへ 5mL 又は、T-75 角型フラスコへ 20mL を張り込んで前培養を実施した。

3.2.3 シングルセルベースのクローン選抜方法

遺伝子導入された transfectants pool は 3-14 日間の前培養期間を経たのち、蛍光標識された二次抗体(CloneDetect)を含む半固形培地に 1,000-10,000cells/mL で播種された。シングルセルベースのクローン選抜機器として ClonePixFL (Molecular Device) を使用した。半固形培地上で 10-14 日間培養されたのち、形成されたシングルセルに由来するコロニーを ClonePixFL にて可視光で同定するとともに、蛍光強度で産生している目的産物を評価しソフトウェア上で選択されたコロニーを中空のピンでピックアップする[21]。ピックアップされた細胞集団は 200 μ L の液体培地を含む 96well のマイクロプレートに任意の順序に整列するように、懸濁回収される。96well のマイクロプレートは、5% CO₂ のインキュベータに移され 10-14 日間培養された。この後は、限外希釈法(前章)による育種方法と同様に、評価と拡張培養が行われた。

また、半固形培地最適化の過程では、Clone Select Imager (Molecular Device) による各コロニーの画像評価方法も使用した。

3.2.4 評価指標

Colony formation ratio (コロニー形成率) は以下の計算式で求めた。

Colony formation ratio (%)

= number of particular colonies / viable seed cells X 100

3.3 結果と考察

3.3.1 半固形培地の処方最適化検討

シングルセルベースのクローン選抜機器として使用する ClonePixFL では、クローニングの際に細胞を不動化する半固形培地を用いることを特徴としている[21]。ただし、市販半固形培地の Pre-Mix された Clone Media CHO-G (Molecular Devices) を CHO-K1SV 株に用いると、Colony formation ratio が著しく低く、増殖も遅いため限外希釈法より効率的選抜と期間短縮において利点がありませんでした。

遺伝子導入された同じ細胞 pool をメチルセルロース含有の CloneMatrix に液体培地の CD-CHO が終濃度で 1 倍になるように調整したプロトタイプ処方の自家調製半固形培地 (x2.5 CloneMatrix 40%, x2 CD-CHO 50%, Spent Media 10%) と Clone Media CHO-G に播種した際の ClonePixFL での画像の比較結果を Figure 14 に示す。明らかに、コロニーの数とサイズに違いがあり、自家調製培地のほうが優秀であることが分かる。

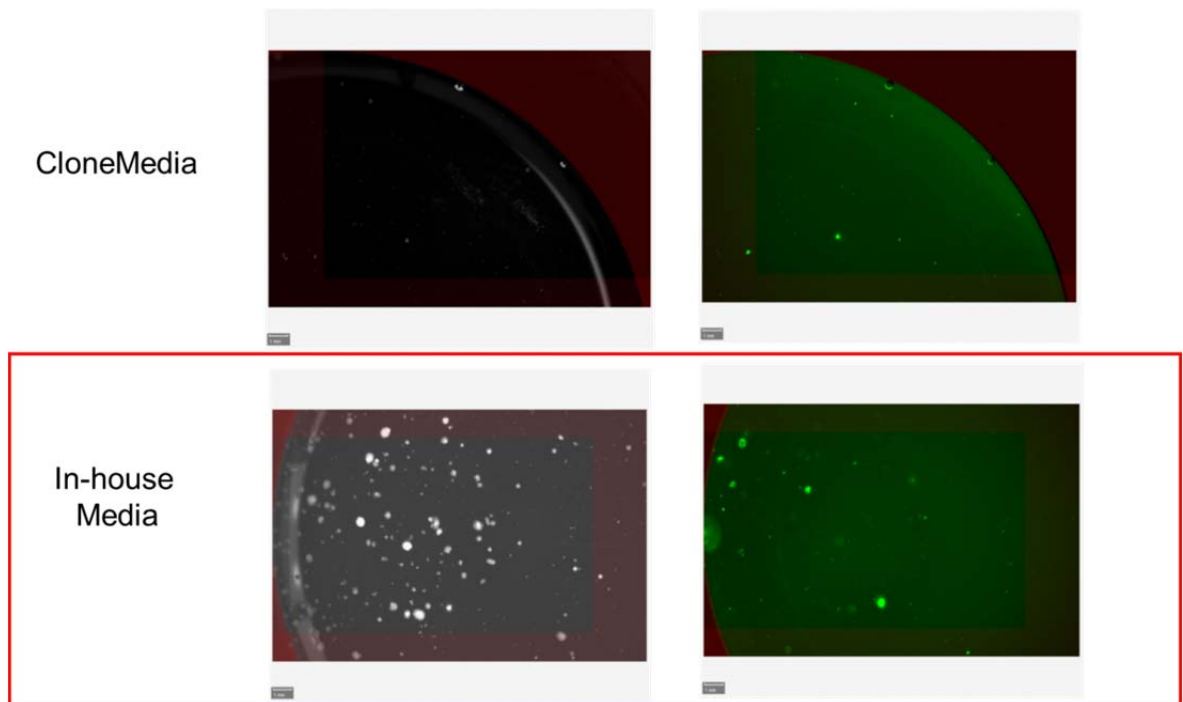


Figure 14 Comparison of semi-solid media between In-house Media vs. pre-mixed CloneMedia by single-cell-based clone selection system ClonePix™ FL

遺伝子導入後 7 日経過した同じ Transfectants を 2500cells/mL で播種し、ClonePix FL の白色光と蛍光画像での画像(緑色の蛍光を発しているコロニーが高生産株)

細胞増殖性を改善させるため、半固形培地の処方最適化を試みた(処方最適化実験-1)。先のプロトタイプ処方を基本として、spent media を 3 水準(0%、10%、

20%)、組換えアルブミンを2水準(0%、0.1%)、サプリメントのGSEMを2水準(0%、2%)の12条件を完全割り付けとした。処方最適実験をいくつか行うにあたり毎回、遺伝子導入体を準備するのは作業性と再現性で効率が悪いいため、限外希釈法で樹立したmAb-E生産株2株の混合poolを用い、評価についても作業性のより高いClone Select Imager(CSI)のイメージング機能を用いた。抗体発現細胞poolを半固形培地に400cells/mLで混合し、6well-plateに播種し培養したものを12日後に、CSIで画像解析した結果をまとめたものが、Table 4であり、グラフ化した結果がFigure 15である。

サプリメントであるGSEMの添加で、コロニー形成効率が改善している。ただし、このとき用いた任意の組換えアルブミン(InVitria)に関しては正の効果は見られなかった。また、spent mediaの添加では、コロニー形成効率が改善し、さらに細胞の増殖速度を示すコロニーの面積も改善されている。このときの画像の一部をFigure 16に示す。ここでは、spent mediaの「あり」:下段と「なし」:上段での違いが解析前の画像でも確認できる。

この実験で最も効果があったのは、spent mediaであった。細胞の無血清条件の液体培養における、spent mediaの効果はこれまでも報告がある[15][41][42]。分泌された物質が、分泌した同種細胞自身に作用するオートクライン因子が、増殖を促進すると考えられている。多くの腫瘍細胞が、増殖因子を産生することが分かっている、線維芽細胞増殖因子(FGF: fibroblast growth factor)、トランスフォーミング増殖因子受容体(TGFR: transforming growth factor receptor)や血管内皮細胞増殖因子(VEGF: vascular endothelial growth factor)などが知られている[47]。今回用いた、spent mediaにもある種の増殖因子が宿主細胞から分泌されていたと考えられ、半固形静置培地という物理的なストレスがないところでも単細胞からの分裂開始によるコロニー形成と増殖亢進に寄与したと考えられる。

Table 4 Results of semi-solid media optimization-1

	Spent Media [%]	rAlbumine [w/v %]	GSEM [%]	Average number of total colonies [colony/ well]	Average number of obtained colonies [colony/well]	Average Area [mm ²]	Colony forming ratio [%]
#01	0	0	0	820	95	0.007	12
#02	0	0	2	708	174	0.009	22
#03	0	0.1	0	650	37	0.006	5
#04	0	0.1	2	604	155	0.008	19
#05	10	0	0	815	129	0.013	16
#06	10	0	2	758	231	0.013	29
#07	10	0.1	0	381	128	0.010	16
#08	10	0.1	2	498	231	0.010	29
#09	20	0	0	545	178	0.013	22
#10	20	0	2	654	210	0.011	26
#11	20	0.1	0	437	150	0.015	19
#12	20	0.1	2	1094	245	0.015	31

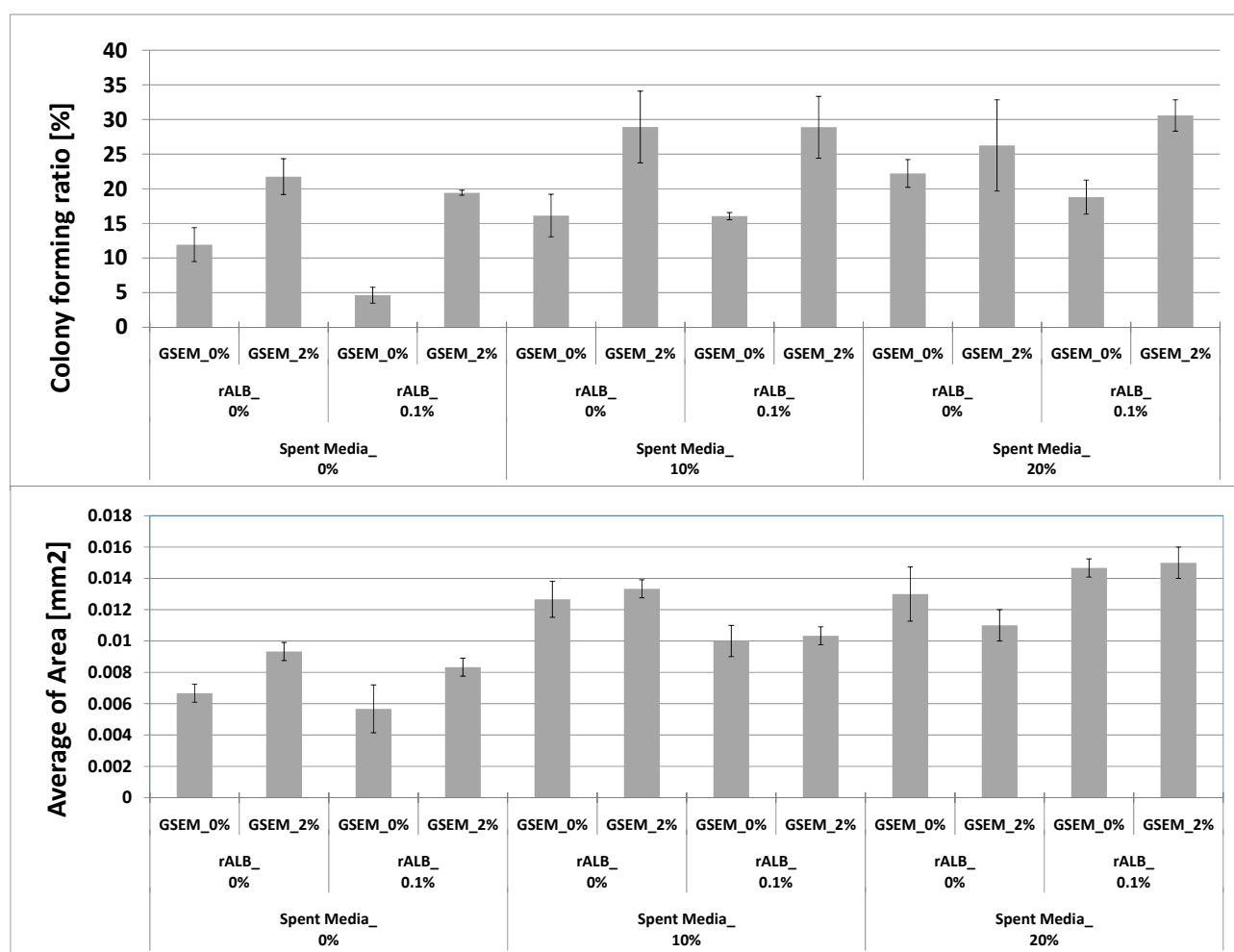
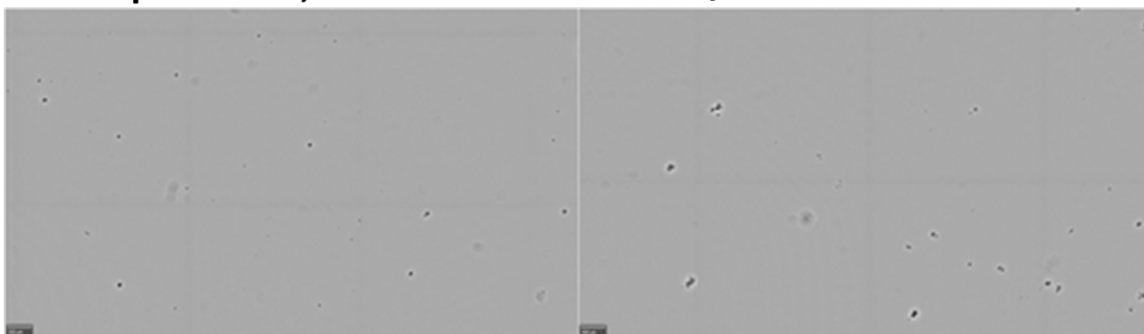


Figure 15 Result of semi-solid media optimization-1 (Graph)

上段がコロニー形成率の比較で、下段が平均のコロニーサイズの比較

#01 Spent 0%, GSEM 0% #02 Spent 0%, GSEM 2%



#05 Spent 10%, GSEM 0% #06 Spent 10%, GSEM 2%

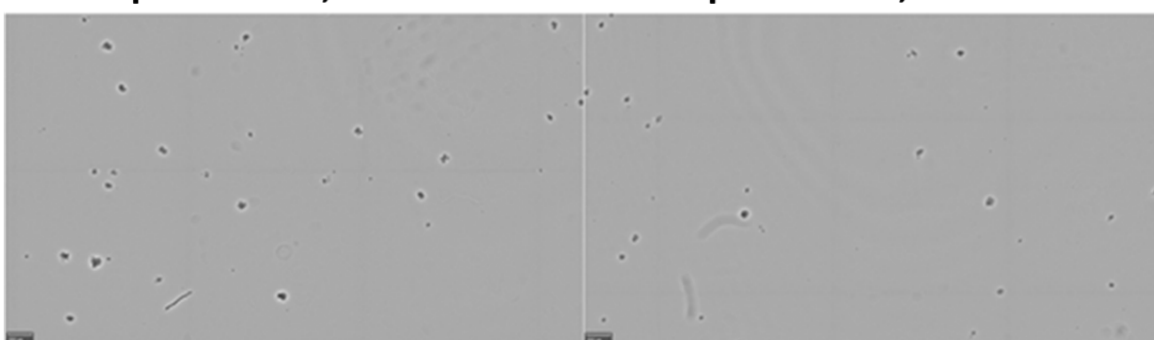


Figure 16 Captured image of cell growth by Clone Select Imager

この実験で使用した組み換えアルブミンについては効果が認められなかったが、現在は、これ以外にも各社から提供されている。そこで同様の実験系でアルブミンについてのスクリーニングを実施した。その結果、Cell Prime rAlbumin AF-G (EMD Millipore Corporation) が最も良好な成績を示したので、今後の検討にはこちらを用いることとした。

次に実際に、培養上清の効果を再確認とスクリーニングした新規の rAlb の効果を確かめる実験を行った。このときは、半固形培地中に目的産物である抗体に作用する、蛍光色素を含有した CloneDetect を加えクローニングを行う ClonePixFL を実際に使って評価を行った (Figure 17)。その結果、spent media により、total colony の "colony forming ratio" が大きく向上している。この spent media の効果を再確認するとともに、また、rAlb でも total colony の "colony formation ratio" が向上している。この実験では、GSEM は単一成分としての有意な効果はほとんど認められなかった。

実際は、微小なコロニーや目的産物を産生していないコロニーは、物理的に取得できなかつたり、低増殖低生産ということで選抜されることはなく、ClonePixFL で選抜可能なサイズのコロニー (pickable colony) の数や目的産物を認識可能なレベルで

分泌しているコロニー (producers colony) の数に意味がある。その点に着目して見てみると、spent media 非含有の左 Panel は GSEM や rAlb が存在しても、pickable colony、producers colony とともに差は認められていない。

このとき spent Medium の存在下で、rAlb があると大きく pickable colony の出現率を向上させている。つまり pickable colony が増えたということは微小な colony が生えたというより、一つ一つのコロニーの増速を促進していることを意味する。この rAlb と spent media には単純な加算効果だけでなく、相互作用があると考えられる。

さらに、GSEM は単一成分としての効果はほとんど認められないが、spent media や rAlb との存在下で Pickable colony の出現率を向上させている。3 成分の存在条件下での pickable colony の向上だけでなく、producers colony の出現率を向上させている。つまり、今回添加した、spent media、rAlb と GSEM は 3 成分が共存することで意味のある組成となっていて、このうち一つが欠けても優れた培地にはならないことを意味する。ここで、重要とした Producers colony も増えているということは、遺伝子未導入の非特異的株にだけ増殖促進効果があるわけではなく、目的産物産生能を有する株の多様性と選択性を維持していることを示している (Figure 17)。結果として、最適の組成と考えられる spent media を 10%、rAlb を 0.5% と GSEM を 2% の処方下で、total のコロニー形成率として 60% を達成し増殖性も良くなったことで、pickable colony の形成率も 30% 程度と向上し、これらが増えることで目的産物の発現が認識できる producers colony が 20% 得られた。

この実験で効果の認められたアルブミンに関しては、培地中での脂質の担体として働くことや抗酸化作用を持つこと、さらに細胞への物理化学的な損傷を低減させるというような生物学的特性が考えられており [19] [31]、実際に液体の化学合成培地に添加することで単細胞からの取得効率が向上したという報告 [43] もあるので、今回、半固形培地に添加した際にも、同様に単細胞での増殖促進効果などが認められたことはその機構解明にも新たな考察を与えると考えられる。各組換えアルブミンで異なる差が認められた理由は定かではないが、脂質成分や他の成分との複合作用で細胞増殖に寄与していると考えられる。また、このような化学的な観点とは別に、医薬品生産の薬事的観点として考えれば、動物由来の成分よりは組換え体により製造されるタンパク質ということで望ましい方向性である。

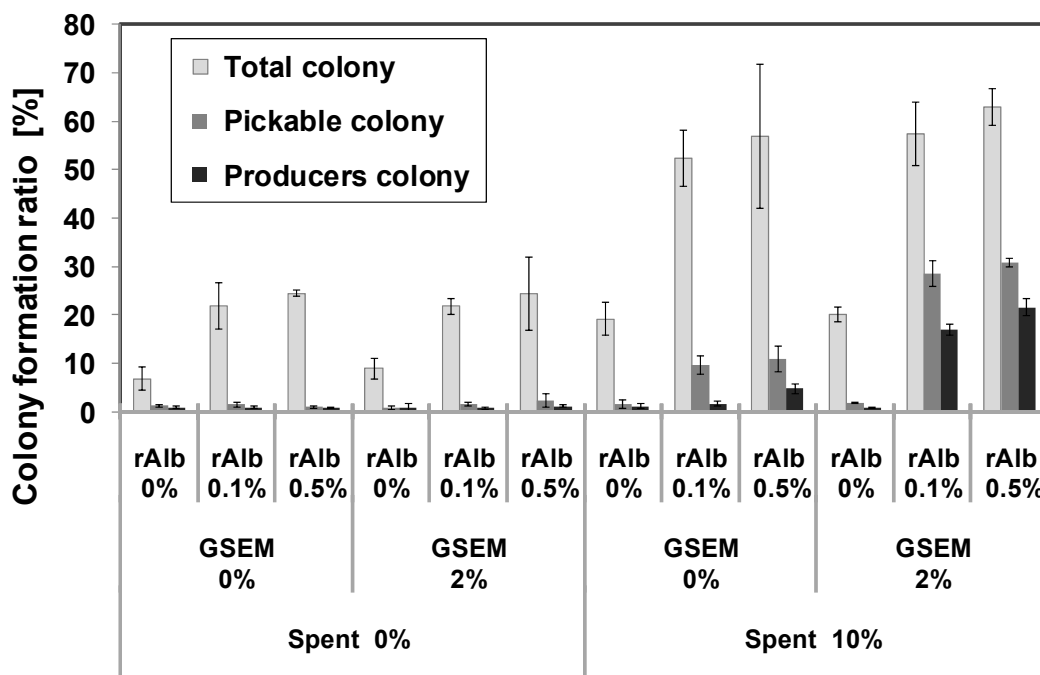


Figure 17 The evaluation of cell growth and productivity using various semi-solid media supplements in single-cell-based clone selection system ClonePix™ FL.

3.3.2 Transfectants の MSX 耐性評価

一般に、生産細胞樹立過程において、非特異的細胞の増殖を効果的に抑制する遺伝子選択剤(この宿主では MSX)は過剰量存在すると、遺伝子導入された細胞の増殖まで抑制することがあったり、この抑制を克服するために細胞の遺伝子増幅機構が働き、目的産物の遺伝子のコピー数まで変化するので影響はとて大きいと考えられている。

本来なら、遺伝子導入後すぐに半固形培地でのスクリーニングを開始しても良いが、半固形培地の処方を最適化しても、100%の細胞が単細胞から立ち上がる条件ではない以上、良い状態の細胞をある程度増殖させてから播種する方が効率的である。そこで、半固形培地に播種する前の細胞状態を良くするために、transfection 後の細胞について初期細胞密度と MSX 濃度を変えて、培養を試みた(Figure 18)。遺伝子導入 24 時間後に選択剤を添加している。初期細胞密度(ICC: Initial cell concentration)を 2 水準(2×10^5 cell/mL と 4×10^5 cell/mL)、MSX 濃度を 4 水準(0, 15, 25, 37.5 μ M)で静置培養された。生存率は、しばらく経時的に低下し、MSX 濃度依存的に無添加では 2 日後から、添加条件では、低濃度側の 15 μ M ではだいたい 4 日後から、高濃度の 37.5 μ M で 12 日後から僅かに上昇に転じる。生細胞密度は徐々に低下し、あるポイントから上昇に転じる。同じ MSX 濃度では、初期細胞密度

が低いほど生細胞密度だけでなく、生存率も低くなる。そして、生存率の回復に伴って生細胞密度も回復する。あまりに低くなった生細胞密度と生存率では細胞が回復にとっても時間がかかる。この生存率低下期間に、遺伝子の導入及び宿主染色体への組換えが上手く起こらなかった株の淘汰が進んでいると考えられる。選択剤である MSX に対する抵抗性は、挿入された目的遺伝子の発現レベルと相関していると考えられる GS 遺伝子の発現レベルに依存する。細胞株によっては、DNA の二本鎖開裂によって、遺伝子増幅が起き GS 遺伝子と目的遺伝子の発現量向上がなされている。実際のクローニング開始前の細胞株のスクリーニングが、高生産株を効率的に取得する為には重要となっている。適切な、初期細胞密度の設定と MSX 濃度の設定が効果的なクローニングに重要となる。ここでは、初期細胞密度 (ICC) が 4×10^5 cell/mL、MSX 濃度が 25 μ M の条件が最適と考えられた。

ただし、同じ細胞密度 (4×10^5 cell/mL) のもと、発現ベクターを含まない (遺伝子導入されない) 条件とベクター有の条件で遺伝子導入操作を行い MSX 含有 (25 μ M) と不含有条件 (0 μ M) で培養を行いその経時変化を比較した (Figure 19)。このとき、MSX が存在しなければ、発現ベクター不含有条件でも高い生存率を保ったまま数日で細胞は対数増殖期に入った。理論的には、適切な MSX 濃度条件下では、発現ベクターを含まない条件では、MSX に対する耐性を得られないために細胞は死滅してゆくはずである。ただ実際には、MSX 含有 (25 μ M) 条件でも、生きながらえ次第に耐性を持った細胞が主流となり、全体として増殖へと向かっている。同じ MSX 含有条件 (ここでは、25 μ M) で発現ベクター含有条件と比較すると、発現ベクター不含有条件のほうが初期の細胞ダメージ (transfection shock) が低いこともあり、生存率低下は緩やかであり、いったん回復に向かった際の立ち上がり早いほどであった。この宿主細胞である CHOK1-SV 株は内在性の GS 遺伝子を完全に欠失しているわけではないので、この GS 遺伝子が高度に発現されれば MSX 存在下でも生育可能となる。また、薬剤耐性 (ここでは MSX) 獲得については耐性遺伝子自体の増幅以外にも、細胞外への排出に関わる遺伝子の活性化など様々な機構があり、この期間に細胞ごとの変化が生じていると考えられた。

ここで確認されたのは、発現ベクター不含有条件でも長期間の培養を行っている宿主細胞が MSX 耐性を持つことが分かったことであり、同時に、発現ベクター存在条件下で遺伝子導入操作をしても、同じように宿主に遺伝子が組み込まれなかった細胞も増殖に転じる可能性があるということである。つまり、遺伝子導入から数日経過した細胞 pool は MSX による選抜を経ても、非生産株を多数含んでいる可能性があるということであり、クローニング過程ではこれらを選別し、高生産などの望まれる株を取得しなければならない (Figure 19)。

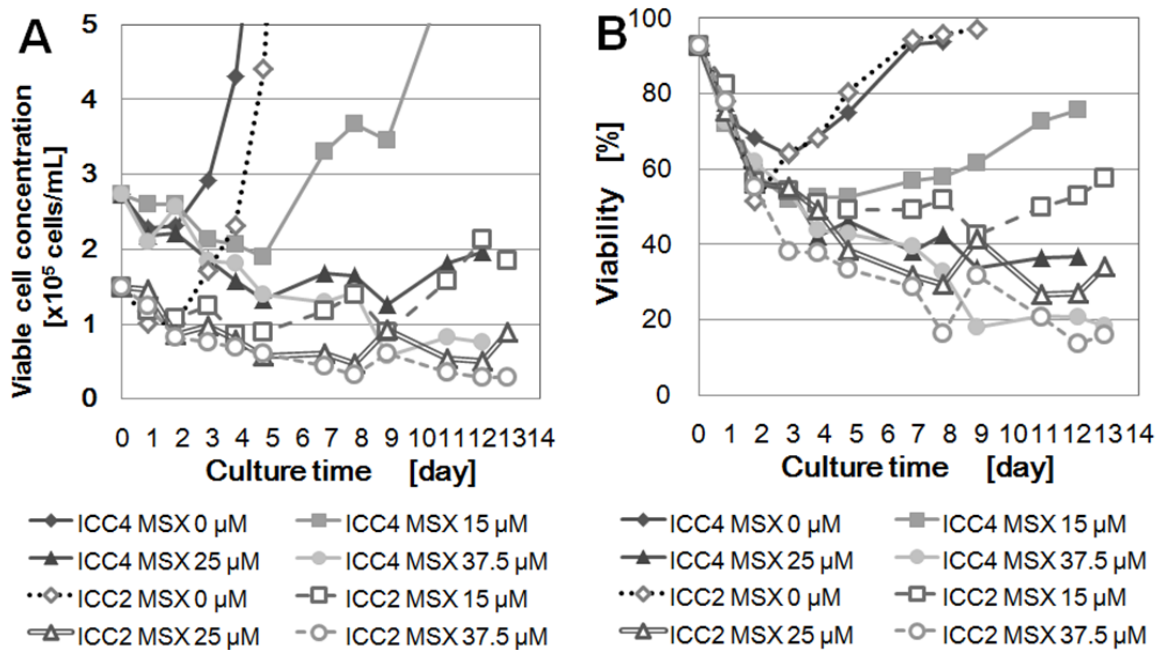


Figure 18 Time course of viable cell concentration and viability of transfection pools in CD-CHO media containing various concentration of MSX.

A: Viable cell concentration of transfectants、 B: Viability of transfectants.

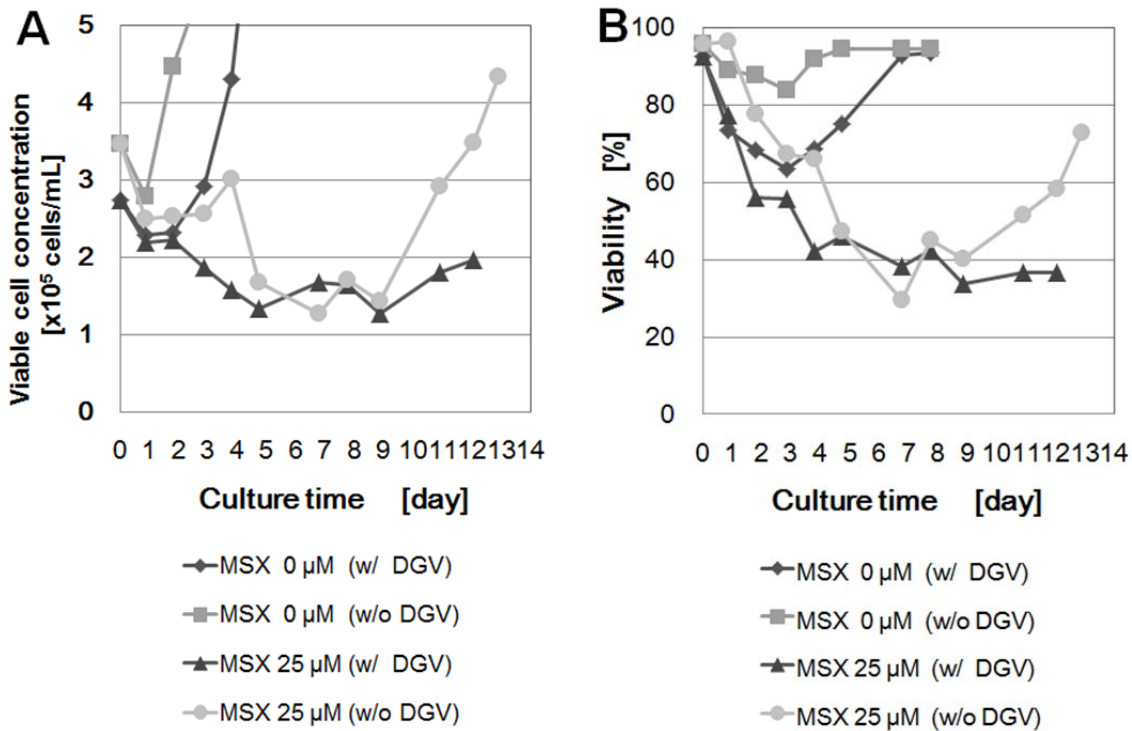


Figure 19 Time course of viable cell concentration and viability of transfectants (w/ double gene expression vector (DGV)) and transfectants (w/o DGV) in CD-CHO media containing 25 μ M MSX.

Cells were inoculated at 4×10^5 (ICC4) cells / mL. A: Viable cell concentration of transfectants, B: Viability of transfectants.

3.3.3 半固形培地からのピッキングの最適化

遺伝子導入された細胞が高い確率で早く増殖するような半固形培地処方を最適化し、半固形培地播種前の前培養時の培養条件を最適化した。しかし、実際に半固形培地に細胞を播種してそれを picking する際の条件として、1)前培養の期間、2)播種細胞数、3)半固形培地中のMSX濃度を設定する必要がある。遺伝子導入操作後、細胞 pool は先の検討で最適化された、初期細胞密度: 4×10^5 cell/mL で開始し24時間後に25 μ MのMSXを含む培地で前培養された。前培養の3日目、5日目、7日目において、MSX濃度を2水準設定した半固形培地に3段階の細胞密度で播種された。生育確認は半固形培地で14日間培養されたところで行われた。これらの結果のうち前培養期間と半固形培地中のMSX濃度についてはTable 5にまとめられている(播種細胞数条件は全て含む)。Totalのコロニー形成率は3日間の7%台から、5日間、7日間(11%台)と長くなるにつれ緩やかに改善されているが、改善率

は 1.5 倍程度であった(A 列)。これに対して、producer colony のコロニー形成率(B 列)は 2 倍近く、さらに、半固形培地上での蛍光認識による生産コロニーではなく、ピッキング後の液体培地での評価で実際に目的産物の産生(1 mg/L、10 days 培養)が確認された Actual producer colony のコロニー形成率(C 列)は、3 日目に比べて 3 倍以上改善されていた。つまり、コロニー形成率などは 5 日間、7 日間と長いほど、高生産株を効率よく取得するのに適していると考えられた。ただし、イメージング&ピッキング時点での解析では 5 日目播種と 7 日目播種による差は認められなかった。そして、半固形培地中での MSX 濃度を高くする効果は、イメージング&ピッキング時点での解析では認められなかった。播種細胞数の違いによるコロニー形成率については統計上有意な差とはならなかった。

半固形培地上の細胞状態の画像の比較などをすると、3 日目では非生産株や染色体に組み込まれない一過性発現株が多く存在する為か、どの細胞播種密度でも夾雑物の多い状態で微小コロニーが多く、5 日目以降になると大きくて丸いコロニーが多くなっていた。同じ 5,000cells/mL のところで比較した画像を示す (Figure 20)。

抗体産生が認められたコロニーは ClonePixFL のソフトウェア上で “total fluorescence intensity” の高い順に選択、ピッキングされ、液体培地を含む 96well-plate で 10 日間静置培養された後、生産物濃度が測定された。このとき、5,000cells/mL で播種されたものから選抜された群での各コロニーを目的産物濃度によって分類した比較を、Figure 22 に示す。イメージング&ピッキング時点で有意な差の見られなかった半固形培地中の MSX 濃度に関しては、25 μ M と高いほうが効率よく生産株を、それも高生産株を取得できていた。同じく、前培養期間の 5 日間と 7 日間の違いにおいても、7 日間のほうが、高生産株を取得できることが示された。

Table 5 The effect of seeding time and MSX concentration on the screening efficiency

Seeding time after transfection (day)	MSX concentration (μM)	Colony forming ratio of total colony [%] (A)	Colony forming ratio of producer colony [%] (B)	Colony forming ratio of actual producer colony [%] (C)	Efficiency of picking [%] = (B/A x100)	Efficiency of post picking [%] = (C/B x100)
3	10	7.8	0.088	0.006	1.12	6.5
	25	7.6	0.104	0.010	1.36	10.1
5	10	11.6	0.120	0.020	1.03	16.7
	25	10.3	0.173	0.022	1.69	12.6
7	10	11.5	0.166	0.024	1.44	14.4
	25	11.6	0.179	0.033	1.54	18.6

Total colony indicates an image area of the cell colony of more than 0.005 mm².

Producer colony indicates a total fluorescence intensity of more than 50,000 fluorescence units (FU).

Actual producer indicates that the antibody production of the picked clone was over 1 mg/L for 10 days of incubation in 96-well plates.

The colony formation ratio was calculated from the results of cell seeding concentrations at 2,500, 5,000, and 10,000 cells/mL

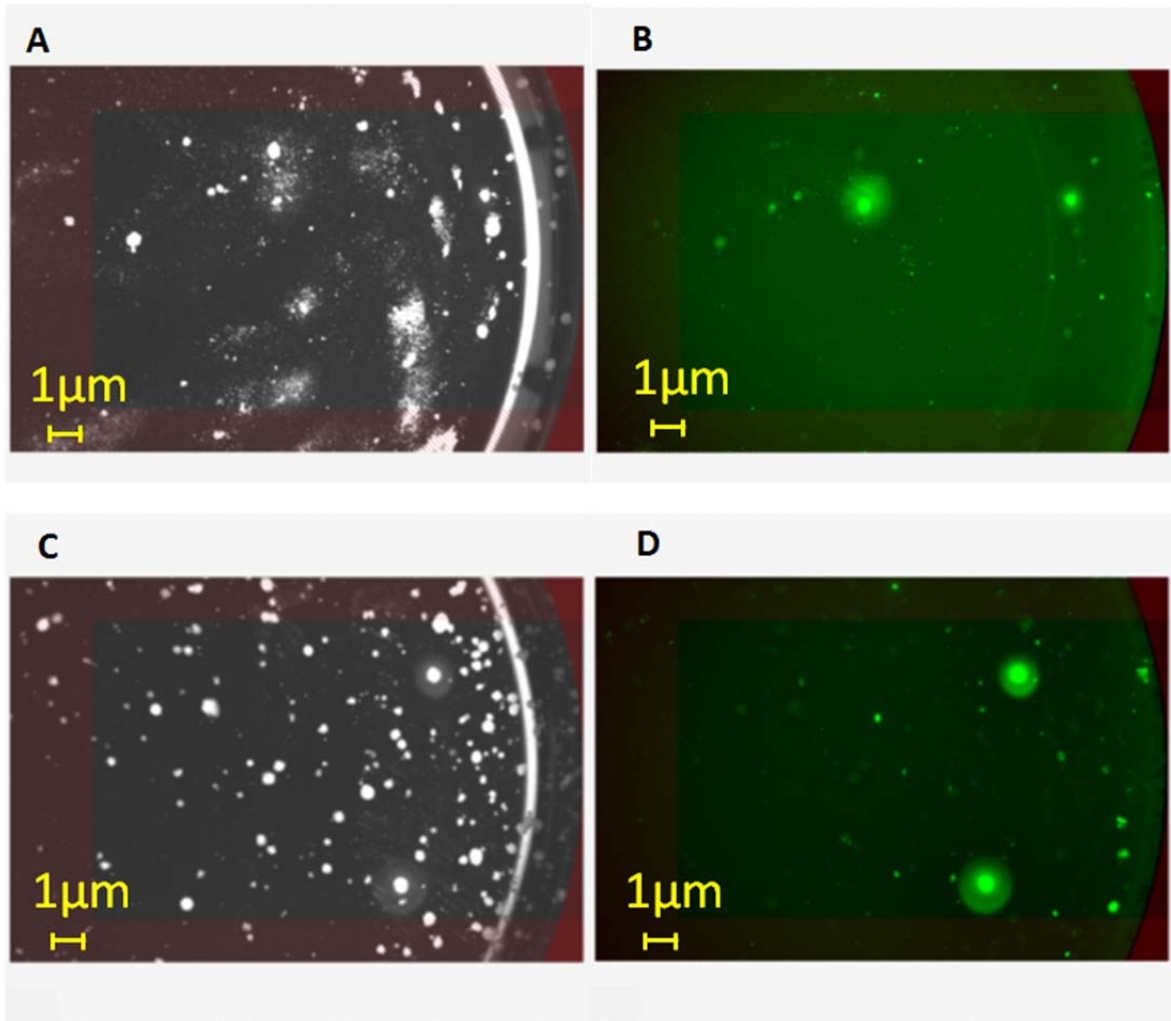


Figure 20 Pre-culture duration difference between 3day and 5days at 5,000cells/mL.

Transfectants were plated on semi-solid media containing 25μM MSX. Seeding cell concentration was 5,000 cells/mL.

A: Day3 : The white-light image (seeding time after transfection was 3 days).

B: Day3 : The fluorescence image of A.

C: Day5: The white-light image (seeding time after transfection was 5 days).

D: Day5: The fluorescence image of C.

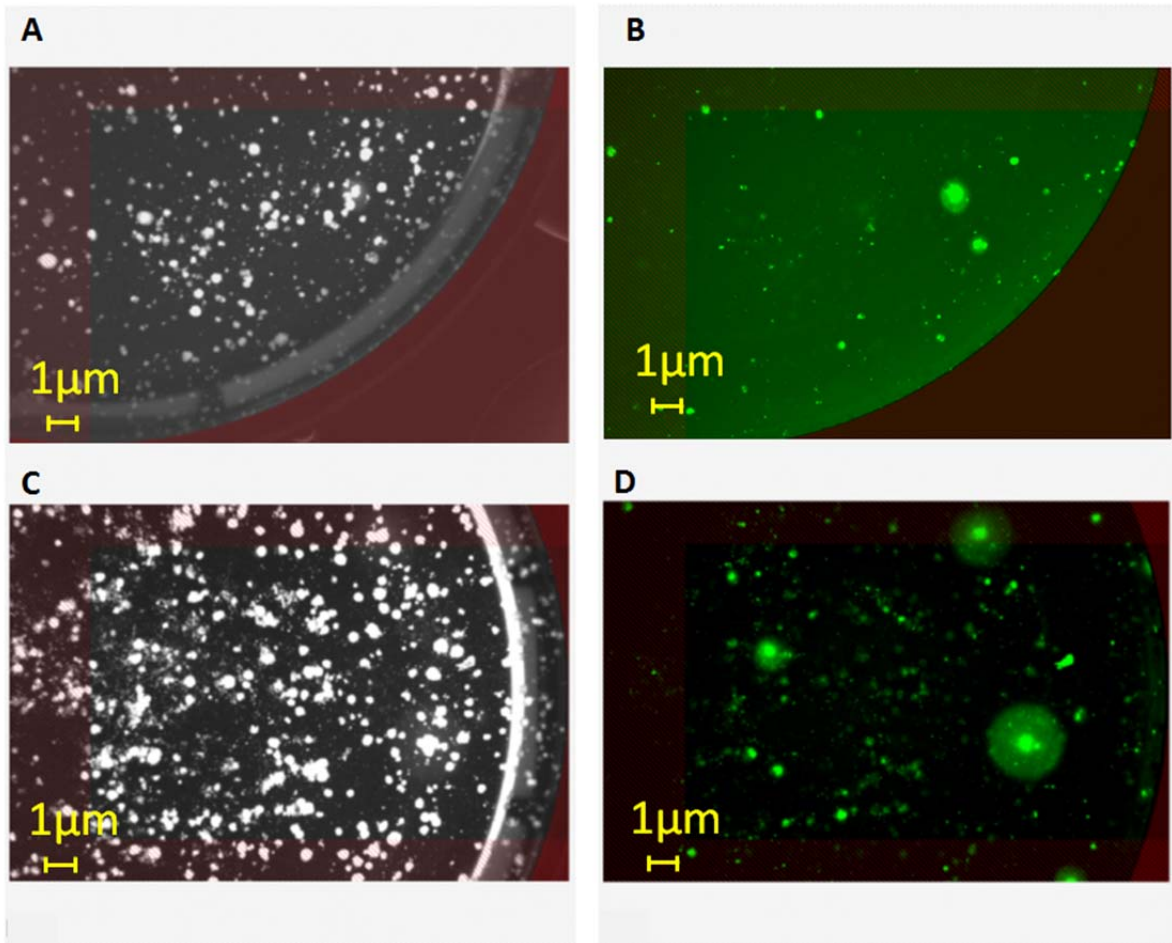


Figure 21 MSX concentration difference between 25µM and 10µM, 5days at 10,000 cells/mL, .

A: 25µM MSX : The white-light image at semi-solid medium

B: 25µM MSX : The fluorescence image of A.

C: 10µM MSX: The white-light image at semi-solid medium

D: 10µM MSX : The fluorescence image of C.

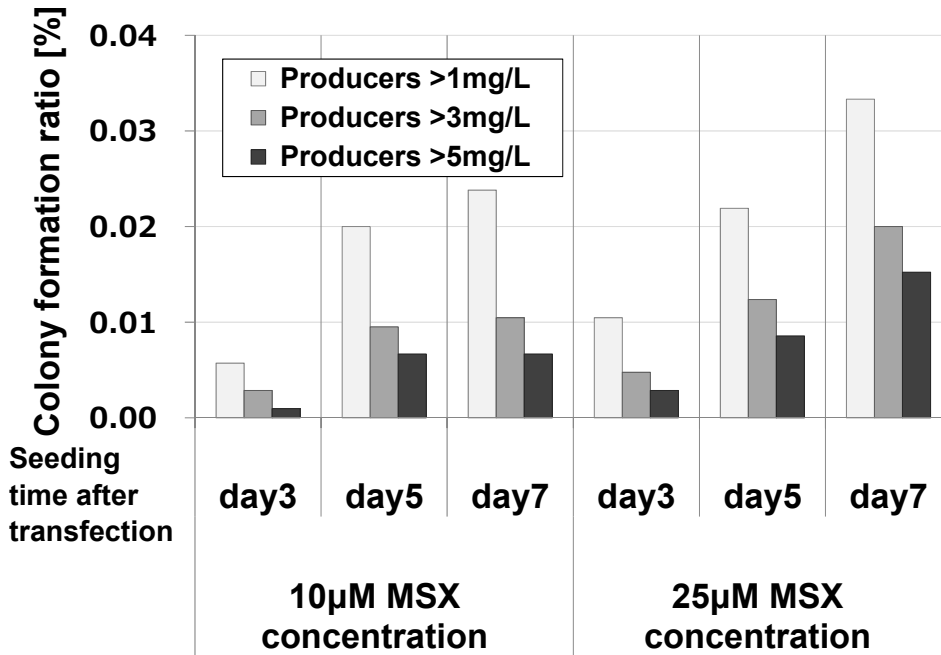


Figure 22 Colony foaming ratio of different seeding time after transfection.

Transfectants were plated on day3, day5, day7 after transfection into 10 µM and 25 µM MSX containing semi-solid media, then were picked after 14 days. The picked colonies were dispensed in CD-CHO media for cell culture. After 10 days incubation, productivity of mAb was evaluated. Each clone was classified by productivity of antibody, meaning of each legend as follows:

- Producers > 5mg/L, (productivity of antibody over 5 mg/L)
- Producers > 3mg/L, (productivity of antibody 3 to 5 mg/L)
- Producers >1mg/L, (productivity of antibody 1 to 3 mg/L)

3.3.4 半固形培地を用いたシングルセルベースのクローニングの効率

従来の限外希釈法と新しいハイスループットのクローニング方法の初期評価段階の比較を示した (mAb-A の例、Table 6)。ここでは、ほぼ同数(16 株と 17 株)の高生産株を得るのに、従来法では、約 3,000wells = 60/96well-plate x 50 枚 必要なのに対して、Clone Pix FL を用いた場合、総数として約 3,000 株を評価するが、半固形培地から選抜された株はその 39 株と 96well 1 枚に集約される程度であった。そして、96well 培養の段階で生産物濃度を測定した結果の high producers であった率は 44%と従来法の約 10 倍の高率であった。

最適化された、クローニング手法で得られた細胞を、順次拡張培養し、振盪培養馴化後に親株 SCB (Seed cell bank) として保存した。ここまでの期間は約 9 週間である。従来法での期間は約 12-15 週間であるので、大きく期間短縮されている。

また、得られた株の振盪培養での生産性などを評価した結果を、Table 7 に示した。同数評価ではないが、mAb-E の場合は、同数の最終 criteria-2 を満たすにあたって、初期の生産物濃度測定や振盪培養をした株数など作業工数が大幅に少なくなっていることが分かる。また、mAb-F の場合では、初期の作業量を 2 倍程度にしたことで、最終的な criteria-2 を満たす株が 8 倍程度取得できたことを示している。

Table 6 Comparison between conventional method (Limited dilution) and HTS method at initial stage

	All clones	High producers (96well-20µg/mL)		
	Number of assay or pick-up /all clones	Number of high producers /assay clones	Number of high producer /assay clones [%]	Ratio of high producer /all clone [%]
Limiting Dilution	354 /2931	16 /354	4.5	
HTS (Clone Pix)	39 /3576	17 / 37	43.6	0.48

Table 7 Comparison between conventional method (Limiting dilution) and HTS (using ClonePix FL) method through final evaluation

*1) ピッキングされたコロニー全てを選抜なしで評価した

mAb	mAb-E		mAb-F	
Cloning Method	LD	HTS	LD	HTS
Numberof 96well used	8700	432	7380	3227
Number of clones				
1) 96wells assaied	953	*1) 432	663	1263
2) 24wells	469	72	144	456
3) T25-flask	193	12	48	122
4) Shake-flask	53	12	16	49
Criteria-1 (>200mg/L)	20	6	14	49
Criteria-2 (>400mg/L)	2	3	4	32
Ratio of efficiency [%] (meet criteria2/ shake-flask)	3.8	25.0	25.0	65.3

3.4 結論

このクローニングシステムの根幹をなす、半固形培地の処方最適化を行った。この際重要であったのが添加物の組換えアルブミンと培養上清であった。これにより、半固形培地上でのシングルセルからの増殖が改善しコロニー形成率が大幅に向上した。中空針でのピッキングが可能なサイズまでの増殖期間も短縮された。他の多くの細胞で既報のように培養上清中に含まれる成長因子などが半固形培地中の CHO 細胞のシングルセルの増殖を促進したと考えられた。また、アルブミンも無血清の浮遊培養などで細胞ダメージを低減させる効果などが報告されていたが、物理的な損傷を受けにくいと考えられる半固形培地中で固定化された CHO 細胞を増殖を促進させた。

効率的な優良株選抜の為には、半固形培地での増殖を改善させただけでなく、遺伝子導入後の細胞の回復と、MSX の選択圧による非遺伝子挿入株の死滅のバランスをはかる半固形培地への播種前の前培養の期間と、そのときの MSX 濃度と初期細胞密度が重要であった。低い細胞密度では、MSX の影響で生存率の低下以上に細胞数減少の影響で細胞が回復しないが、高い細胞密度では MSX の影響を受けにくくなる。培養期間としては、一過的発現細胞もまだ多いため、3 日では短すぎ、10 日間以上では細胞にベクター遺伝子が組み込まれていない細胞まで内在性の GS 遺伝子の働きで MSX に打ち勝ち増殖しだしてしまう。MSX 濃度は 25 μ M 程度で初期細胞密度として 4 \times 10⁵ cells/mL で 5~7 日間の前培養が効果的であった。

このような条件の時は、半固形培地に播種する細胞密度としては 5,000cells/mL 程度が最適であった。早い時期に播種するのであればもう少し高い細胞密度が、もう少し前培養中に選抜をさせた後なら、低い細胞密度が好ましくなる。

この条件でピッキングした細胞を 96well プレートで培養した後の抗体生産性を調べたところ、プレシード培養期間が 3 日と短い条件では生産株を取得している率はとても低く、5 日、7 日と向上していった。コロニー形成率の差以上に実際の生産株取得効率は大きく異なっていて、半固形培地中にも選択圧として MSX を 25 μ M 加えることが有効であった。

この研究で無血清馴化された CHO-K1SV 株を半固形培地上で増殖させ、ClonePixFL というハイスループットのシングルセルピッキング機器を用いて細胞増殖と生産物産生を確認した状態で細胞株を選び、自動的に高生産株を選抜する系を最適化した。各種の抗体分子を目的産物としてでこの系で最終的な生産細胞株の樹立までを行った。従来法に比べると期間が約 30%短縮され、最終生産系に近い浮遊培養系での評価で、優良株の取得効率が大幅に向上したことを確認した。

第4章 サブクロニングによる安定株樹立

4.1 緒言

サブクロニングは細胞株樹立の上で欠かせない工程である。一度得られたクローンとみなされる細胞集団(親株)をもう一度シングルセル(モノセル)にして、それを純粋な細胞集団としてバンク化できるまで拡張培養するのである(Figure 2)。一度シングルセルにするので、それが 10 本以上のバンク(SCB: Seed cell bank、 1×10^7 cells/vial)になるには理論上(1×10^7 cells \times 10 vials = 10^8)1 月以上かかり、場合によっては評価も含めて 3 か月程度かかる工程である。

近年では、生産細胞樹立までの期間短縮をストロングポイントとするベンチャー企業や CMO (Contract Manufacturing Organization: 受託製造機関) などでは、期間短縮のためにこのプロセスを省略している動きもあるが、安定な品質の医薬品を共有するという観点からはなかなか外すことができない。特に、遺伝子増幅を行うことで生産性向上を期する DHFR-MTX 系では多コピーの挿入遺伝子と DHFR 遺伝子を有している為、遺伝的安定性に不安があり、サブクロニングは必須となっている。

限外希釈法によるサブクロニングについて実施例を示す。遺伝子導入された細胞株をクローニングしたいいわゆる親株より、それを再度クローニング(サブクロニング)して得られる娘株はより遺伝的に安定であり、高生産であると言われている。親株ごとの違いを網羅的に見てみた。さらに、第 3 章で用いられたシングルセルベースのクローニング機器を用いたサブクロニングを実施した。

4.2 実験材料および方法

4.2.1 細胞株

抗体産生株 (mAb-E) として限外希釈法で樹立された親株 (14 株)

4.2.2 限外希釈法によるクローニング方法

保存された凍結バイアルを融解し、最初の 3 日間は静置条件で前培養を実施する。その後振盪フラスコで培養され 2 日目もしくは 3 日目に 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 cell/well となるように希釈されて培地 200 μ L を含む 96well マイクロウェルプレートに播種された。低細胞密度側から優先的に各親株あたり 24 株を評価し、24well プレートには各親株から最大 12 株を次の T25 フラスコには 5 株ずつを選抜し、最終的に 3 株ずつを振盪フラスコまで拡張した。

4.2.3 ClonePixFL を用いたクローニング方法

保存された凍結バイアルを融解し、3 日間の前培養ののち半固形培地に 50cell/mL および 200cell/mL で播種した。各株から 48 株ほどを picking し、液体培地 200uL の入った 96well マイクロウェルプレートに回収した。この後の拡張培養は、限外希釈法によるクローニングに準じた。

4.2.4 フローサイトメーター(FCM)による親株の解析

細胞プールの特性解析を行うため、蛍光標識された抗ヒト Fc 抗体による Cold Capture method で細胞表面の分泌抗体を標識することで各親株の特性解析を行った。二次抗体としては、R-Phycoerythrin Affini Pure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson) を用いた。

4.3 結果

4.3.1 限外希釈法による親株ごとの取得効率

各播種密度でプレート 4 枚(60x4=240 wells)に播種した。その時の Outgrowth efficiency を Figure 23 に示す。細胞密度としては各クローンにつき 8 倍まで設定したが、最も低密度でもクロナリティーの担保が 80%程度になるよう株が 2 株ほどあった。これらは、光学イメージング機器の Clone Select Imager で担保を取ってある株を優先的に選択した。このズレについては、細胞のシングルセルでの増殖のしやすさだけでなく、数 1000~数万倍の希釈を行う際のハンドリングも含まれると考えられた。

また、細胞の立ち上がりが悪い株は、すべての希釈プレートからクローンを取得した。

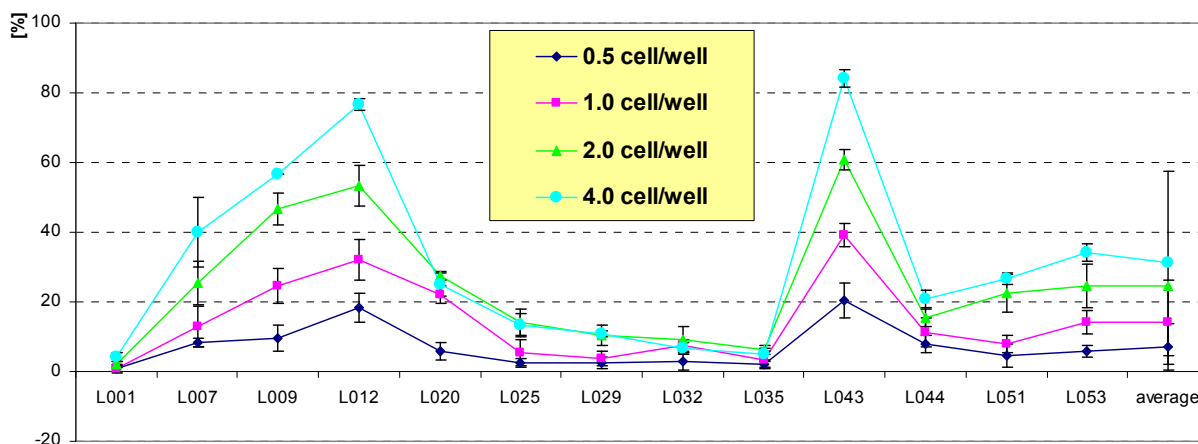


Figure 23 Outgrowth efficiency of subcloning by limited dilution method

4.3.2 拡張培養の各段階での評価と分布

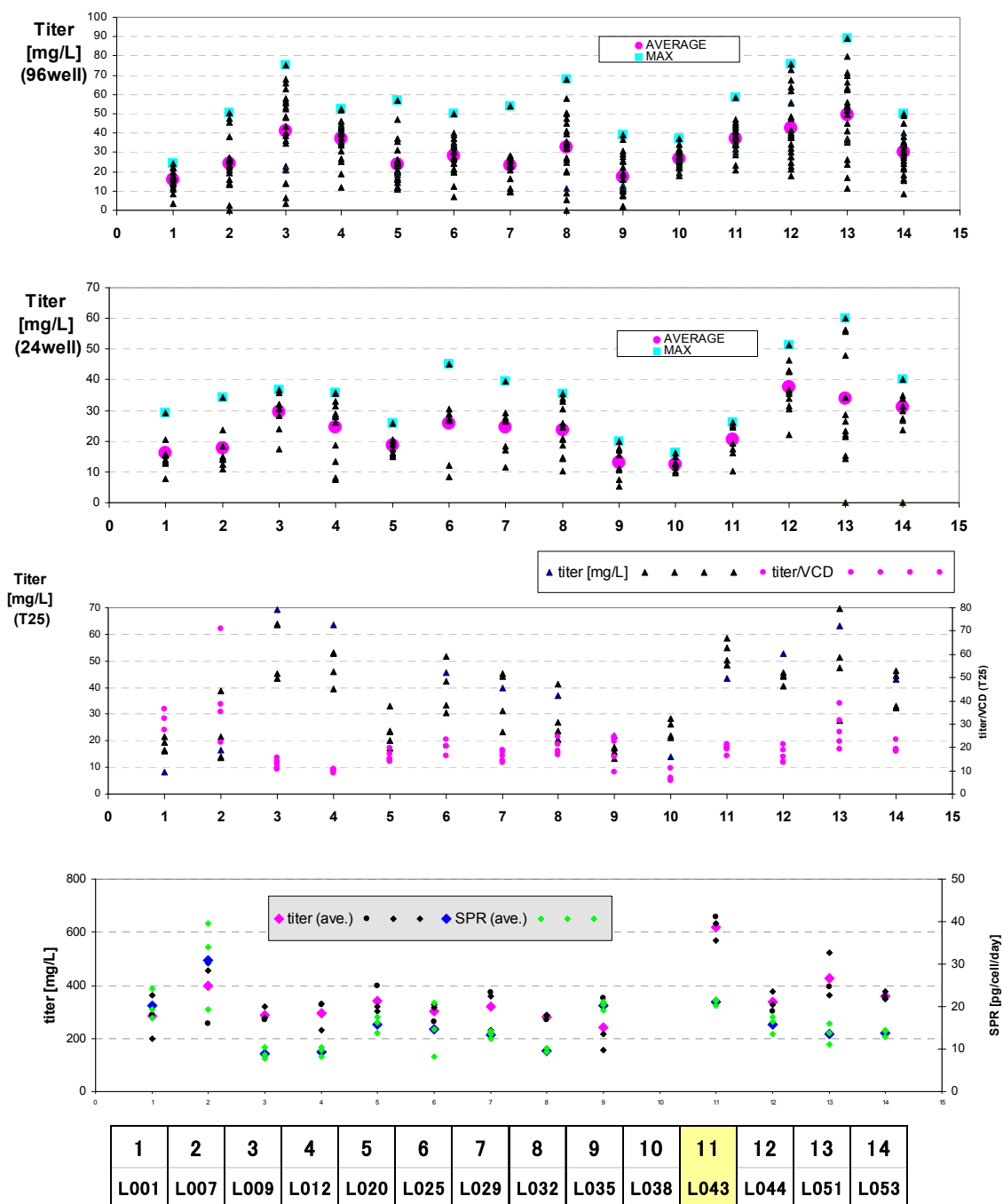


Figure 24 Deviation and range at each subcloning stage for 14 cell lines
 [親株ごとのサブクローニングの各段階での IgG 生産量、上から 96well、24well、T-25flask、最下段が、振盪フラスコでの回分培養結果]

拡張培養の各段階の取得株の生産性を、Figure 24 にプロットした。各 STEP で高い株を選択していきっているが、最初の 96well の段階での平均生産性に関しては、最終の静置培養まで同じ傾向を示している。また、最初の 96well 各株で最高力価を示しているが、平均が低いと最終的には低くなっている(#8-L032 および#12-L044)。

各親株由来の娘株の回分培養評価の結果を、一つ一つの娘株としてプロットしたものが、Figure 25、Figure 26 である。最終的に 3 株まで、選抜すると多くの株で大きなばらつきは無いが、株によっては違いがあるものもある(#2-L007, #9-L035, #13-L051)。さらに、Figure 24 と合わせてみると静置培養での生産性は、振盪培養での生産性とあまり相関がないことが分かる。

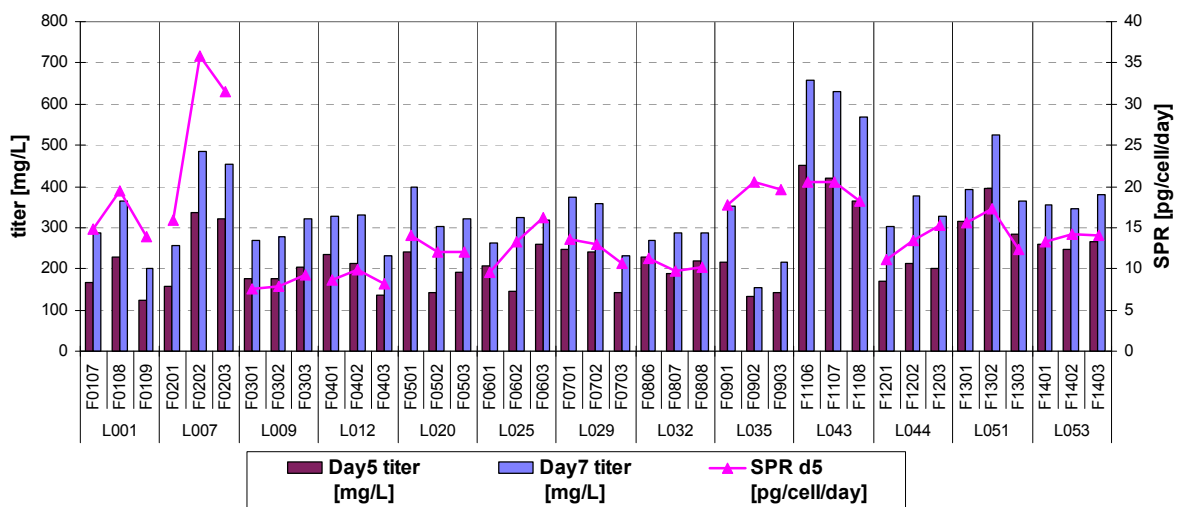


Figure 25 Batch culture evaluation1 (IgG titer and specific productivity)

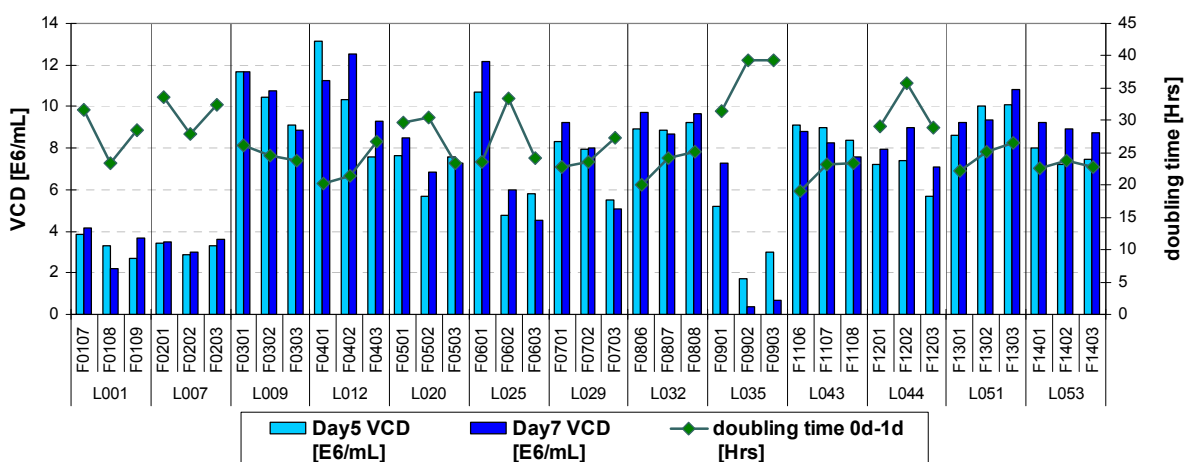


Figure 26 Batch culture evaluation1 (VCD and Doubling time)

Table 8 Comparison between parental clone vs. daughter clones

Parental Clone	Parental _IgG	Daughter _IgG	Improved _IgG [%]	Parental _SPR	Daughter _SPR	Improved _SPR [%]
L001	276	364	32	19	24	25
L007	300	485	61	33	40	19
L009	339	320	-6	12	10	-16
L012	327	329	1	8	10	27
L020	375	399	7	18	16	-11
L025	346	326	-6	16	21	31
L029	219	374	71	21	14	-30
L032	435	286	-34	12	10	-17
L035	264	353	34	16	21	29
L038	-	-		-	-	
L043	514	658	28	26	21	-18
L044	204	378	85	28	16	-41
L051	236	524	122	21	16	-24
L053	255	379	49	13	14	9
	315	398	27	18.8	18.1	-4

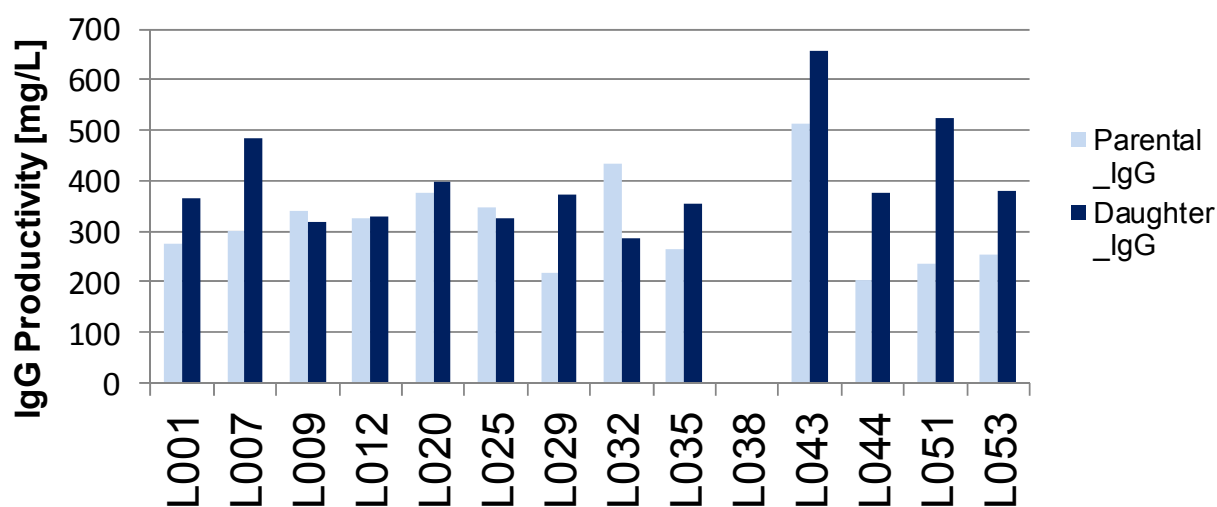


Figure 27 Effect of subcloning comparing productivity

効果を確認するために、subcloningを実施前の14種類の親株と比較すると(Table 8 および Figure 27) 順調に娘株が取得できたのが、13株(L038は取得できなかった)。うち、回分培養評価で最終目的産物濃度が20%以上が向上したのは、8株で、ほとんど変わらなかった株が4株。1株は、大きく最終目的産物濃度が低下した。低下した株も含めて平均で27%改善されていた。

ただし、比生産性で見ると、同じく20%以上改善されていた株は5株にとどまり、低下している株も多く平均では-4%の改善率となった。多くの改善された株では増殖が改善されたことによる。

4.3.3 シングルセルベースのクローンシステムを用いたサブクローニング

限外希釈法との比較の為、第3章で最適化した半固形培地組成で、播種を行った。半固形培地で10日間培養を行ったプレートに CSI で画像解析したものが、Figure 28 である。Heterogeneity の高い、transfectants を播種したプライマリークローニング時と比べると、各コロニーが均一に生育していることが分かる。この同じプレートを CPFL で解析した画像が Figure 29 である。プレートの端で画像がキャプチャー出来なかった部分を除いて、白色光でコロニーが認識されたものがほとんど蛍光を発色している。この時の播種密度は2段階設定したが、サブクローニングの主目的がクロナリティーを担保することにあるので、十分な播種密度の設定を行った。200 cells/mL でもクローンの重なりは見られないが、より低密度が好ましい。

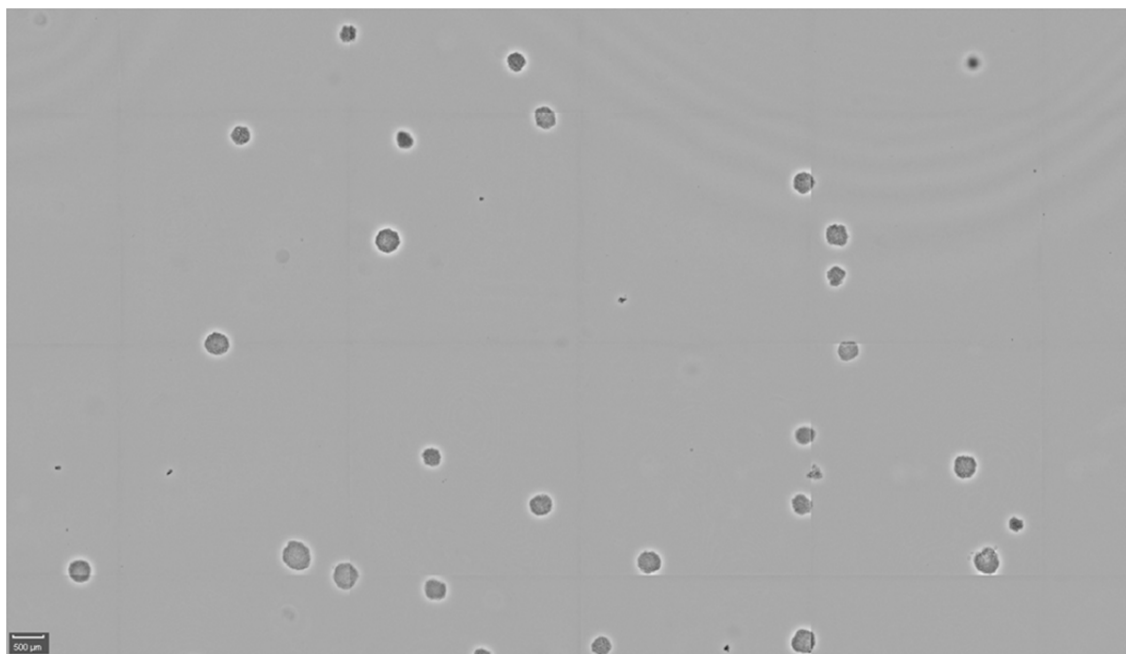


Figure 28 Image of colonies on semi-solid media (analyzed by CSI)
[200 cells/mL]

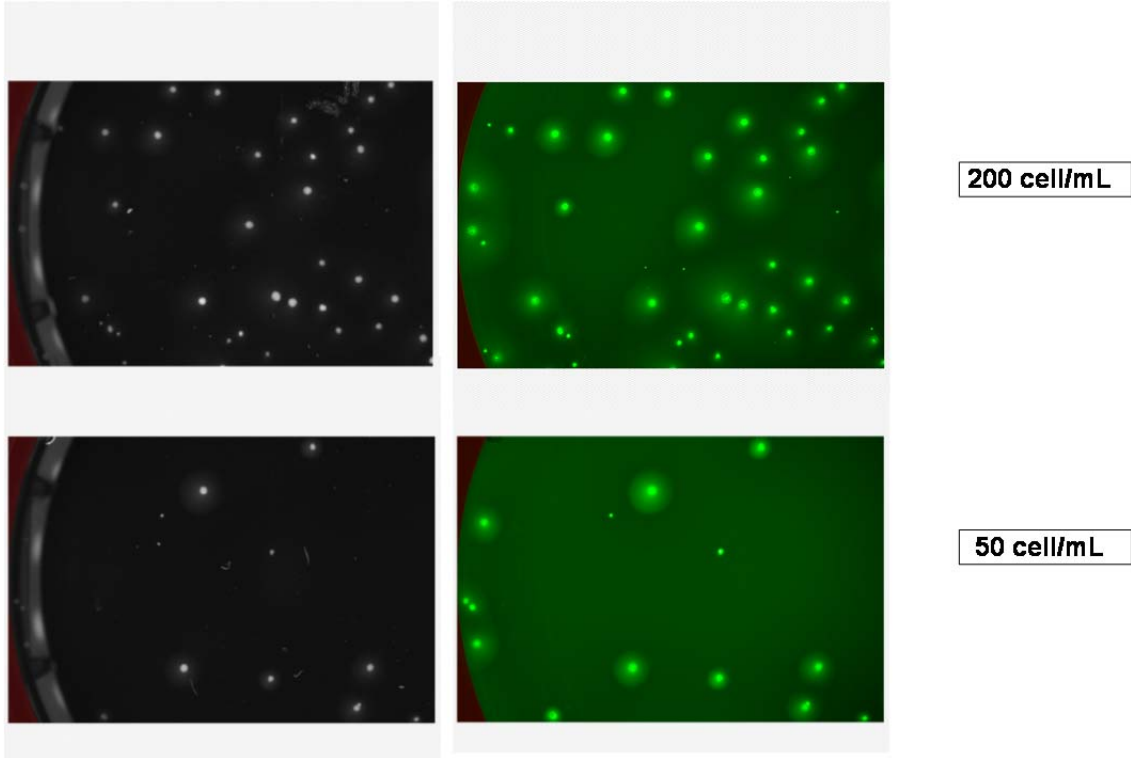


Figure 29 Images of ClonePix FL for subcloning at different cell concentration

[Upper Panel :Seeding cell density at 200 cells/mL,
Lower Panel: Seeding cell density at 50 cells/mL]

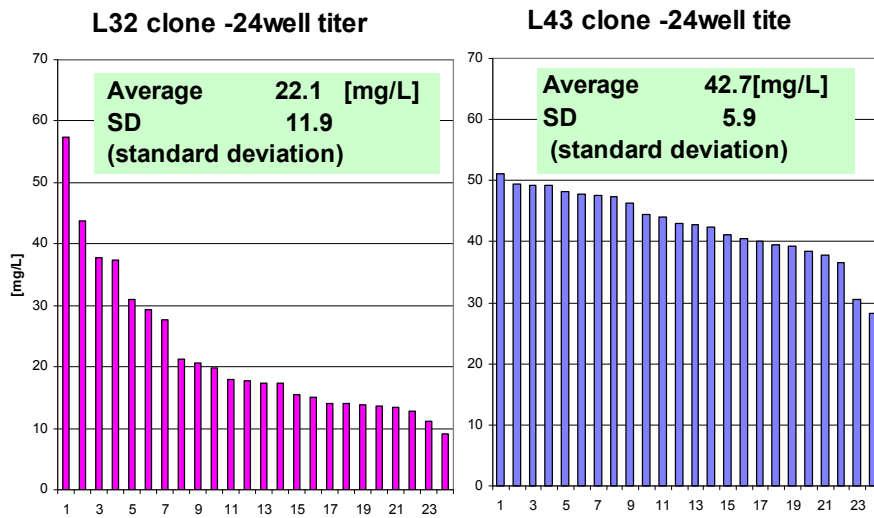


Figure 30 Unstable parental clone and stable parental clone, productivity evaluation on 24well-plate stage

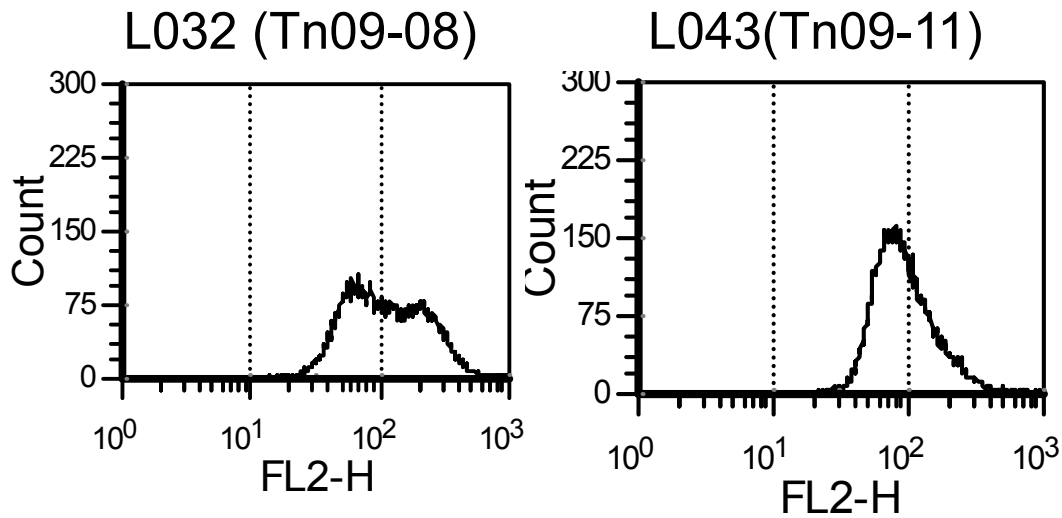


Figure 31 Unstable parental clone and stable parental clone

CPFL でピッキングして 96well→24well と選抜と拡張培養を行った。このとき、元の親株ごとに、取得される subclone の生産性分布に違いがあった。代表的な 2 株において、24well-plate 培養終了時の各株からの 24subclone の生産性をプロットしたのが Figure 30 である。両株の top の株の生産性はほぼ同じであるが、分布に大きな差がある。L032 株は大きくばらつきがあり、それに比べて L043 株は平均値が高く、平均からの外れが少ない。これは、量株の安定の違いによるものと考えられた。この両株の subcloning 開始前の FCM による分布の解析が Figure 31 である。静置培養時の各 subclone のバラつきと同様に、親株段階で、L032 株は sub population があるように広い分布であるのに対して、L043 株では鋭いシングルピークがとして認められた。

4.4 考察

限外希釈法による生産株構築ではスクリーニング開始当初から一つの well に数千という細胞が入っていたということを考えると、これに続くサブクローニングは必須の工程であると言える。そのため、限外希釈法によるサブクローニングではクロナリティーの担保が主目的となり、もとの親株より生産株として適した株を取得するか、遺伝的に安定な株を取得するという観点が欠けてしまいがちである。ただ、本研究で行ったような他の株との相互比較を行うことなどで元の親株が遺伝的に安定な株であるか確認することや、その細胞集団が不均一な集団であるのかが評価できると考えられた。

また、シングルセルベースのクローニング機器を用いたサブクローニングでは、プライマリースクリーニングの段階から播種細胞密度を低く保つことで、クロナリティーを担保できればサブクローニングは不要であるとも考えられた。特に、サブクローニングの前後での生産性の改善は、増殖性の向上が主要因であったという今回の結果からもその可能性は考えられた。そうすることで、育種期間は大きく短縮できる。

4.5 結論

本研究では、限外希釈でのクローニングとともに同じ細胞株に対して前章で記載した、シングルセルベースのクローニング機器を用いたサブクローニングを実施した

限外希釈法を用いたクローニングで実際取得された娘株では、多くの場合で元の親株よりも増殖面性能で改善せれ結果的に、高い生産性を示した。このとき、細胞 1 個当たりの比生産速度は必ずしも上昇していなかった。拡張培養の各段階での評価では、各株親株の特性の違いが異なっていることが分かった。シングルセルベースのクローニング機器を用いたサブクローニングでは、各親株の違いがより明らかに認められた。また、タイムラインに関しても、限外希釈による細胞構築に比べ約 1 週間程度短縮できることを示した。

第5章 総括と今後への展望

5.1 研究内容の総括

この研究でこれまで体系的に行われることのなかった、限外希釈法による細胞株構築の効率化をはかった。さまざまな要素が絡み合う条件と一つ一つの細胞が個別であるため、各条件の有意性を統計的に示すことが難しい点が多かったが、効率的なプラットフォームといえるものが構築できた。シングルセルからの増殖立ち上がりに重要と考えられた血清成分はやはり、Outgrowth efficiency が高く初期の増殖も速いことから有用と考えられた。しかし、同程度の工数と期間で無血清条件でも最終的な生産株の取得が可能であった。それは、この検討で用いた宿主 CHO-K1SV が一旦無血清無タンパク培地で培養できるように馴化されていることから、重大な細胞への悪影響はなかったことによる。また、最終的な製造時に血清を使用しないのであれば、血清に依存しない細胞を取得することが望ましい。条件設定においては、遺伝子導入操作後の well に播種する細胞濃度と MSX 濃度の設定が最も重要であった。限外希釈法には課題が多いが、Transfectants を全数評価しやすいので多様性 (diversity) を確保しやすい。第 3 章で述べたシングルセルベースのクローニング機器を用いた育種とは異なる性質の細胞株を取得できる可能性があるため、並行に実施することも意味がある。

次に、第 3 章では、シングルセルベースのクローニングの導入にあたっての最適化を実施した。限外希釈法の弱点である、労働集約的な点と細胞のクロナリティー担保において改善できる可能性があると言われていた。機器の原理や、特性は優れた点があると考えられたが、実際の使用にあたっては各種実施条件の検討が必要であった。特に半固形培地の処方最適化では細胞保護作用のあると考えられたアルブミンと spent media を加えることと、半固形培地に播種する前に 5-7 日間の前培養を実施し細胞を増殖基調に回復させておくことが重要であった。結果として効率が向上し期間も短縮できた。単純に、高生産株を取得する効率を比較したすると Table 6 になる。数字の上では 10 倍以上と大きく効率化できていることが分かる。今回の研究では、これも体系的な報告が少ないサブクローニングも網羅したが、親株を取得するプライマリークローニングと切り離して考えるのではなく、一気通貫の流れでプロセスを組むことで全体の最適化が可能になると考えられた。バイオ医薬品製造における細胞育種の命題はタイムラインの短縮であるが、半固形培地を使用したシングルセルベースのクローニングを導入することで、細胞がシングルセルからの立ち上がりが良くなったことなどからタイムラインの大幅な短縮が可能となる。

第 4 章においては、これまでに報告がほとんどなかったサブクローニングの効果を確認できた。すなわち、多くの第一段階取得株 (親株) において、別段遺伝子増幅の

操作などをしなくても生産性の向上が確認された。このことから、サブクローニングをする意義が示された。今回の研究では各親株ごとに各段階でのデータを網羅的に取得し解析することで、最終培養系と異なる状態で評価せざるを得ないプライマリースクリーニングの難しさを示すとともに、各株の特性解析も可能であることが示された。今後は、サブクローニングの過程で得られた各株の特性も最終的な株評価に含めることが好ましいと考えられた。

最後に、今回の研究をまとめるとどうなるのかを示したい。今回の対象外の dhfr/MTX の CHO 発現系に比べると遺伝子増幅期間が不要である GS/MSX の CHO 発現系でも、最適化したとはいえ限外希釈法の場合、サブクローニングまで実施すると 6-7 か月の期間と比較的多くの工数もかかることになる。これに対して、今回の研究で示した、半固形培地に基づいたハイスループットのシングルセルベースのクローニング機器 (ClonePix FL) を用いた育種では、株選抜にかかる期間をプライマリークローニングで 30%、サブクローニングで 20% 程度短縮できた。ただ、それだけではなく、限外希釈の場合は各株の増殖速度が不均一なことから全体のプライマリースクリーニングが終わるまでの期間に差があるのである程度待つ時間が必要である。また、次のサブクローニングで工数も多くなりがちなことから親株を充分絞りこんでから一斉に開始したい。これに対して、本研究で示したハイスループットの ClonePixFL を用いる方法では、プライマリースクリーニング終了時の時間的な差が少ない。さらに、親株を充分評価しなくてもかなり優秀な株が選択できているのと、サブクローニングにかかる工数もかなり少ないので、ためらいなく連続的にサブクローニングに移ることが可能となると考えられる (Figure 32, Figure 33)。そのようにすればさらに期間短縮が可能となる。もちろん、プライマリースクリーニングの段階で待つことも可能で、そこは状況によって判断することができる。

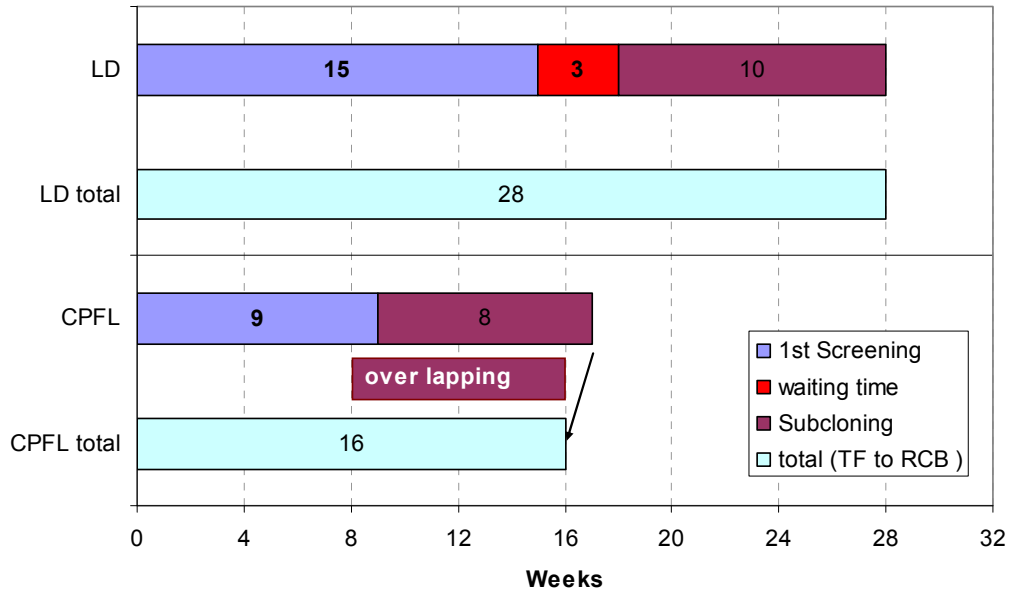


Figure 32 Time Line Comparison between conventional and HTS method
 CPFL: ClonePixFL を用いた新しい育種方法、LD: 限外希釈法による従来育種方法
 数字の単位は 1 週間

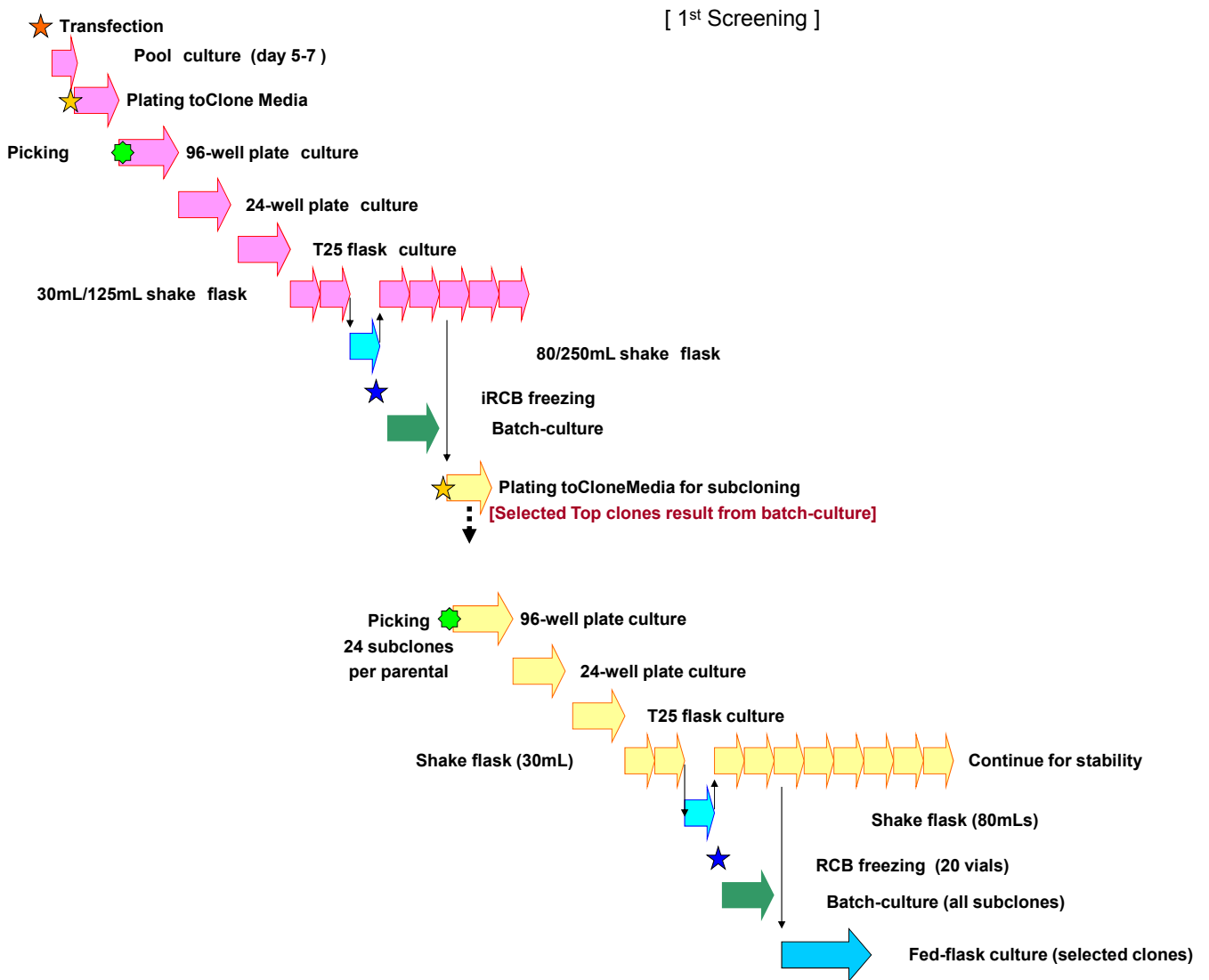


Figure 33 Detail of Schema Flow

Table 9 Summary of comparison between conventional and HTS method

	item	LD method	ClonePixFL
Timeline	1st Screening	15	9
	Subcloning	10	8
	total (TF to RCB)	28	16
Efficiency at 1st Screening	number of 96well plate	30 to 70	10 to 20
	outcome efficiency at 96 well	60 /96well	96 /96well
	1st clones	10%	>40%
Efficiency at Subcloning	number of 96well plate /clone	200 to 400	400 to 800
	outcome efficiency at 96 well	10 to 20	0.25 to 1.0
	clonarity	5 to 20%	about 100%
		using microscope	almost assured

5.2 今後のバイオリジックス生産の育種について

期間短縮を期するために Figure 32 や Figure 33 といったアプローチが可能と考えられる。従来の育種法との比較を Table 9 に纏めたが、多くの点で改善が見込まれる。この機器自体を用いるプロセスでの課題は、二次抗体に含まれる動物由来のタンパク質を組換え体としてリスクを減らすことと、今回、最適化検討した半固形培地処方に含まれる組換えアルブミンや Spent Media を除き完全にどこでも同じ処方の CD protein free 培地の開発が挙げられる。さらに、ここでの理想は、選択剤なしの条件では限りなく 100% に近い colony formation ratio とさらに増殖の速い培地が理想である。そうすれば、遺伝子導入後の細胞プールを前培養なしにすぐに半固形培地に播種可能となりさらに期間が短縮される。

さらには、今回の研究では触れることがなかったが、ピッキング時のパラメータと得られた細胞株の特性を紐づけて、目的の細胞を取りに行くというようなアグレッシブなアプローチも可能であると考えられる。早期の有望株の選択は現場から強く望まれている。ただし、今回のサブクローニングの結果にあったように、一度選択された均一な細胞株もシングルセルからの育種段階で静置培養されると、最終の振盪培養との相関はあまり得られなかったことから課題は多い。早期評価に対するアプローチとして、最終の振盪フラスコまで評価と拡張培養を行うのではなく、小スケールの段階からそのような最終培養系をスケールダウンした 1-数 mL 程度の液量で振盪培養を行う評価法が報告されている[59]。最終の生産培養もプラットフォーム化し、育種段階にスケールダウンできれば効率的な早期評価が可能となる。

今後のバイオ医薬品生産系としては、これまでよりもさらに、プラットフォーム的な最小限のプロセス開発での臨床開始という流れになるだろう。その一つの取りくみがディスポーザブル培養や汎用の精製クロマトスキッドと可能な限りのディスポーザブル製品を取り入れた初期生産系の構築である[60]。これを可能にしたのは、無期接合技術をはじめとするテクノロジーの進化と、宿主発現系と培地処方、培養法の技術開発によって達成された容量生産性の向上がある。

このような現状の延長のような方向性とは別に、細胞育種に関しては大きな技術革新が近づいていると考えている。ランダムな遺伝子導入によるヘテロな集団から best な株を見つけることを目的遺伝子ごとに繰り返す、宝探的なアプローチは廃れていくだろう。一つの方向性としては、どのような分子種が来ても一定の性質を示すような宿主細胞のパワーアップである。これは、現在の TALEN や CRISPR と言ったゲノム DNA の改変技術[35] [58] を利用した、host cell engineering で理想の宿主の特性を持たせてしまうこと。もう一つは、染色体上の特定の部位に目的産物の遺伝子を導入する部位特異的遺伝子導入であろう。いつも一定の部位に遺伝子が

挿入されれば、position effect を受けにくくほぼ一定の細胞が得られるので Upstream のプロセス構築も変更が最小限で良くなる。また、同じ遺伝子を入れたときは同じような株が取得できるのであればクローニングプロセスも不要になるかもしれない。これからも技術革新のに向けて世界各国、各社、各研究機関での、絶え間ない研究は続けられてゆくと考えられ、自身としても微力ながらその一翼を担いたいと望んでやまない。

参考文献(Reference)

- [1] **Barnes LM, Bentley CM, and Dickson AJ:** Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* 32:109-123 (2000).
- [2] **Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ:** Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* Mar 20;81(6):631-9. (2003).
- [3] **Bebbington CR, Renner G, Thomson S, King D, Abrams D, and Yarranton GT:** High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (N. Y.)*. 10:169-175 (1992).
- [4] **Birch JR, Mainwaring DO, and Racher AJ:** Use of the glutamine synthetase (GS) expression system for the rapid development of highly productive mammalian cell processes, in: J. Knaeblein, (Ed.), *Modern Biopharmaceuticals*, WILEY-VCH Verlag GmbH and Co KGaA, Weinheim, 809–832 (2005).
- [5] **Birch JR, and Racher AJ:** Antibody production. *Adv. Drug Del. Rev.* 58:671-685 (2006).
- [6] **Browne SM, and Al-Rubeai M:** Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* 25:425-432 (2007).
- [7] **Brezinsky SC, Chiang GG, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro RI, MacLean A, Sisk W, and Thill G:** A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J. Immunol. Methods* 277:141-155 (2003).
- [8] **Brown ME, Renner G, Field RP and Hassell T :** Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system. *Cytotechnology.* 9:231-236 (1992).
- [9] **Carroll S, and Al-Rubeai M:** The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4:1821-1829 (2004).
- [10] **Caron AW, Nicolas C, Gaillet B, Ba I, Pinard M, Garnier A, Massie B, and**

- Gilbert R:** Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnol* 9:42 (2009)
- [11] **Cockett MI, Bebbington CR, and Yarranton GT:** High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Biotechnology (N. Y.)*. 8:662-627 (1990).
- [12] **Coller HA, Coller BS.**Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality *Methods in Enzymology* 121: 412–417 (1986).
- [13] **Dharshanan S, Chong H, Hung CS, Zamrod Z, and Kamal N:** Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity. *Electron. J. Biotechnol.* 14:1-9 (2011).
- [14] **Dharshanan S, and Hung CS:** Screening and subcloning of high producer transfectomas using semisolid media and automated colony picker. *Methods Mol. Biol.* 1131:105-112 (2014).
- [15] **Dorai H, Corisdeo S, Ellis D, Kinney C, Chomo M, Hawley-Nelson P, Moore G, Betenbaugh MJ, and Ganguly S:** Early prediction of instability of Chinese hamster ovary cell lines expressing recombinant antibodies and antibody-fusion proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 109:1016-1030 (2012).
- [16] **DeMaria CT, Cairns V, Schwarz C, Zhang J, Guerin M, Zuena E, Estes S, and Karey KP:** Accelerated clone selection for recombinant CHO cells using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol. Prog.* 23:465-472 (2007).
- [17] **Estes S, and Melville M:** Mammalian cell line developments in speed and efficiency. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 139:11-33 (2014).
- [18] **de la Cruz Edmonds MC, Tellers M, Chan C, Salmon P, Robinson DK, and Markusen J:** Development of transfection and high-producer screening protocols for the CHOK1SV cell system. *Mol. Biotechnol.* 34:179-190 (2006).
- [19] **Francis GL:** Albumin and mammalian cell culture: implications for

biotechnology applications. *Cytotechnology* 62:1-16 (2010).

- [20] **Hacker DL, De Jesus M, and Wurm FM**: 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol. Adv.* 27:1023-1027 (2009).
- [21] **Hou JJ, Hughes BS, Smede M, Leung KM, Levine K, Rigby S, Gray PP, and Munro TP**: High-throughput ClonePix FL analysis of mAb-expressing clones using the UCOE expression system. *New biotechnology* 31:214-220 (2014).
- [22] **Huang YM, Hu W, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H, and Ryll T.** :Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog.* 26:1400-1410 (2010).
- [23] **Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu W-S, and Yap MGS** : Recombinant protein therapeutics from CHO cells—20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* 103:40-47 (2007).
- [24] **Jun SC, Kim MS, Baik JY, Hwang SO, and Lee GM** : Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:162-169 (2005).
- [25] **Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, and Winter G** : Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321:522–525. (1996)
- [26] **Kaufman RJ** : Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol. Biotechnol.* 16:151-160 (2000).
- [27] **Kim JY, Kim YG, and Lee GM** : CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:917-930 (2012).
- [28] **Kim SJ, Park Y, and Hong HJ** : Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Molecules and Cells* 20:17-29 (2005).
- [29] **Köhler G, and Milstein C** : Continuous cultures of fused cells secreting

antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497 (1975).

- [30] **Kwaks TH and Otte AP** : Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends Biotechnol.* 24:137-142 (2006).
- [31] **Kobayashi M, Kato S, Omasa T, Shioya S, and Suga KI**: Enhancement effects of BSA and linoleic acid on hybridoma cell growth and antibody production. *Cytotechnology* 15:51-56 (1994).
- [32] **Lee C, Ly C, Sauerwald T, Kelly T, and Moore G**: High-throughput screening of cell lines expressing monoclonal antibodies: Development of an immunoprecipitation-based method. *BioProcess Int* 4:32-35 (2006).
- [33] **Li L, Mi L, Feng Q, Liu R, Tang H, Xie L, Yu X, and Chen Z**: Increasing the culture efficiency of hybridoma cells by the use of integrated metabolic control of glucose and glutamine at low levels. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42:73-80 (2005).
- [34] **Li F, Vijayasankaran N, Shen A. (Y), Kiss R, and Amanullah A**: Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2:455–477 (2010).
- [35] **Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, and Yang B** : Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 39:6315-6325 (2011).
- [36] **Meilhoc E, Wittrup KD, and Bailey JE**: Application of flow cytometric measurement of surface IgG in kinetic analysis of monoclonal antibody synthesis and secretion by murine hybridoma cells. *J. Immunol. Methods* 121:167-174 (1989).
- [37] **Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, and Oi VT** : Chimeric human antibody molecules; mouse antigenbinding antigenbinding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 21: 6851–6855. (1984).
- [38] **Omasa T, Onitsuka M, and Kim WD**: Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11:233-240 (2010).

- [39] **Omasa T, Higashiyama K, Shioya S, and Suga K:** Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnol. Bioeng.* 39:556-564 (1992).
- [40] **Omasa T:** Gene amplification and its application in cell and tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 94:600-605 (2002).
- [41] **Ozturk SS, and Palsson BO:** Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. *J. Biotechnol.* 16:259-278 (1990).
- [42] **Ogawa A, Takada N, and Terada S:** Effective antibody production by reusing culture medium previously used in antibody purification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:719-721 (2009).
- [43] **Pilbrough W, Munro TP, and Gray P:** Intraclonal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. *PLoS One* 4:e8432 (2009).
- [44] **Pu H, Cashion LM, Kretschmer PJ, and Liu Z:** Rapid establishment of high-producing cell lines using dicistronic vectors with glutamine synthetase as the selection marker. *Mol. Biotechnol.* 10:17-25 (1998).
- [45] **Schlatter S, Stansfield SH, Dinnis DM, Racher AJ, Birch JR, and James DC:** On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol Prog.* 21:122-133 (2005).
- [46] **Seth G, Charaniya S, Wlaschin KF, and Hu WS:** In pursuit of a super producer-alternative paths to high producing recombinant mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:557-564 (2007).
- [47] **Spens E, and Haggstrom L:** Defined protein-free NS0 myeloma cell cultures: stimulation of proliferation by conditioned medium factors. *Biotechnol. Prog.* 21:87-95 (2005).
- [48] **Serpieri F, Inocencio A, de Oliveira JM, Pimenta AA Jr., Garbuio A, Kalil J, Brigido MM, and Moro AM:** Comparison of humanized IgG and FvFc anti-CD3 monoclonal antibodies expressed in CHO cells. *Mol. Biotechnol.* 45:218-225 (2010).

- [49] **Trill JJ, Shatzman AR, and Ganguly S:** Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:553-560 (1995).
- [50] **Wurm FM:** Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22:1393-1398 (2004).
- [51] **Walsh G, and Jefferis R:** Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.* 24:1241-1252 (2006).
- [52] **Yoshikawa T, Nakanishi F, Itami S, Kameoka D, Omasa T, Katakura Y, Kishimoto M, Suga K:** Evaluation of stable and highly productive gene amplified CHO cell line based on the location of amplified genes. *Cytotechnology* 33:37–46. (2000)
- [53] **Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, Oi D, Omasa T, Katakura Y, Kishimoto M, and Suga K :** Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol Progr.* 16:710–715. (2000)
- [54] **Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, Oi D, Omasa T, Katakura Y, Kishimoto M, and Suga KI:** Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 74:435-442 (2001).
- [55] **Yoshimoto N, and Kuroda S :** Single-cell-based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties. *J Biosci Bioeng.* 117:394-400 (2014)
- [56] **Workman JL, and Kingston RE :** Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.*; 67: 545-579 (1998).
- [57] **Walsh G:** Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat. Biotechnol.* 28:917-924 (2010).
- [58] **Zhou H, Liu ZG, Sun ZW, Huang Y, and Yu WY :** Generation of stable cell lines by site-specific integration of transgenes into engineered Chinese hamster ovary strains using an FLP-FRT system. *J Biotechnol.* 147:122-129. (2010)

本研究に関連する報告

■ 投稿論文

Nakamura T. and Omasa T.

Optimization of cell line development in the GS-CHO expression system using a high-throughput, single cell-based clone selection system

Journal of Bioscience and Bioengineering, accepted

■ 学会報告等

- [59] **Ohira S, Kyung YS, Nakamura T, Takagi Y, Egashira A, Zhu M and Yokota M:** Application of 24 Deep Well Plate Fed-batch Cultures for High Throughput Screening in Stable Cell Line Development. American Chemical Society Meeting (2012)
- [60] **Nakamura T, Ishikami S, Kawai Y, Nishimura S, Makoto Sugiyama, Furuki K, Hayashi A, Zhu M, Noe W, Kasahara N, Egashira A, and Yokota M:** Usability Evaluation of Novel Single Use Bioreactor for Biopharmaceuticals Production, JAACT (Nagoya) 2012
- [61] **中村 剛**「バイオ医薬品生産に適し CHO 細胞株の育種プロセスについて」
第29回 バイオロジカルズ(タンパク医薬)製造技術研究会、[社]バイオインダストリー協会、東京 2013年6月

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を頂いた徳島大学徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部教授 大政 健史博士に心より感謝申し上げます。大政博士には、私の大阪大学工学部応用生物工学科及び大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻在学中より、研究室を超えて面倒を見ていただきました。また、私が山之内製薬株式会社(現アステラス製薬株式会社)へ就職してからも、CHO 細胞を中心とした細胞培養・バイオリジックス生産の分野で数々の助言を頂いておりました。そして再び、アカデミアでの研究の道に導いていただいたことに心より感謝申し上げます。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部教授 中村 嘉利博士、同 教授 櫻谷 英治博士に心より感謝申し上げます。

大政研究室の皆様には、学会などでも含めて多くの貴重なご意見助言を頂きました。深く感謝いたします。事務手続きなどで大変お世話になりました技術補佐員の四方知子様にも心より感謝いたします。また、共に社会人での博士号取得を目指し同じ時期に修了する奥村 武様(第一三共株式会社)には常に励まされ助けられました。深く感謝申し上げます。

本研究の多くは、企業での研究業務を通して行ってきたものです。社会人課程での大学院入学を許可いただき、多大なるご支援を頂きましたアステラス製薬株式会社 技術本部 本部長の松田 充功様、技術推進部長の横田 祥士様、技術企画部長の関 裕史様に深く感謝いたします。このうち所属長でもある横田祥士様におかれましては、折に触れ叱咤激励を頂きました。心より感謝申し上げます。また、グループリーダーとして上司であった勝眞 正孝様からは、業務上の多大なる配慮だけでなく、ご自身の学位取得時の経験も含めた助言と叱咤激励を頂き期限内での修了につながりました。心より感謝申し上げます。

社会人学生としての学位取得を決心した当時の生物工学研究所所長の日野 資弘様、そしてそれを引き継ぎいただバイオリードプロジェクト リーダー(現バイオ技術研究所 所長)の長尾 康次様には、研究所として活動を認めていただいたいただき、高い視点でのご指導ご助言を頂きました。心より感謝いたします。生物工学研究所バイオリジックス生産技術研究室 室長 (現 専任理事)であった横田 匡美様には、進学先や研究テーマについてのご助言と論文執筆中も数々の助言を頂き、心より深く感謝いたします。また、研究内容の大半を長年に渡りご指導いただきましたバイオ技術研究所プロセス第一研究室 室長の江頭 章様に心より感謝いたします。そして設備の不十分な実験室で、不自由しながら一緒に頑張ってくれた林 慎介様、市原 隆光

様、石上 伸也様、大平 俊介様、辻本 真美様、伊東 久仁様、高木 康弘様、栗林 宏和様には深く感謝いたします。この他にもアステラス製薬にてバイオリジックスのプロセス研究に携わっている多くの方々に感謝します。

この研究は、アステラス製薬においてだけでなく、海外子会社の Agensys Inc., に於いても行われました。当時の上司であった Pia Challita-Eid, Ph.D と研究部門の責任者であった Aya Jakobovits, Ph.D との議論は私にとってとても有意義であり、心より感謝しています。研究者としての真摯な姿勢を教えていただいた Marie Zhu, Ph.D に深く感謝します。また、同じ分野を専攻する先輩であり友である Yun Kyung, Ph.D に深く感謝します。そして、分野は異なりましたが共に駐在員として米国で研究生活を送ることができた山地 昇様、山口 秀人様、白砂 謙奈様の協力に深く感謝します。

私が思うことを進めるにあたって、仕事をしながらも辛抱強く支えてくれた妻の美樹と、私に頑張る元気をくれた長男の拓嵩に心より感謝します。両親と妻の両親にもご理解いただき心より感謝いたします。

最後に、これまでに名前を挙げさせていただいた方々だけではなく、私を支えてくださったすべての方に、心よりの感謝の意を込めて謝辞とします。