

産業生物化学工学

— 動物細胞の産業応用を目指した次世代バイオ医薬品生産

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻物質生命工学コース 教授
AMED 国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術
プロジェクトリーダー

大政 健史

1. はじめに

筆者は大阪大学大学院工学研究科醸酵工学専攻博士後期課程を平成 4 年 3 月に修了し、同年 5 月から大阪大学工学部応用生物工学科（現、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コース）の助手として採用され、学内講師、助教授（准教授）を経て、平成 22 年 5 月より徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部（工学部生物工学科：現在は生物資源産業学部）に教授として着任、そして、平成 27 年 4 月に現在の大阪大学大学院工学研究科に着任した。また現在も徳島大学生物資源産業学部客員教授も勤めており、徳島大阪間を行き来している。

さて、生物を用いたものづくりは、従来の微生物を用いたワイン、ビール、そして日本酒生産のみならず、各種有機酸、アミノ酸や抗生物質、化学材料等、さらに近年では、バイオ医薬品生産や、細胞療法、再生医療等製品まで、大変幅広い分野に広がってきている。大阪大学工学部における本分野の歴史は大変古く、始まりはちょうど 120 年前に大阪工業学校において灘の醸造業界からの要望等によって醸造科が設立された時点にまでさかのぼる事が出来る。

小生が専門としている「生物化学工学」(biochemical engineering) とは、化学工学のアプローチを、生物および生物由来物質を用いた様々なプロセスに応用する学問と定義づけられる。この生物化学工学という学問分野は、古くは様々な有機酸発酵や、抗生物質生産において用いられていたが、1965 年に合葉修一先生（大阪大学名誉教授）が Humphrey, Millis と共に 執筆された Biochemical Engineering という教科書によって学問分野として体系化された、我が国が世界をリードする分野の一つである。

本稿では、生物を用いたものづくりの中でも近年の発展が著しい動物細胞を用いたバイオ医薬品生産分野をとりあげ、現在の動向ならびに筆者らの研究の取り組み、そして平成 25 年度からスタートしている経済産業省（現

AMED) 国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術プロジェクトならびに、プロジェクト遂行のために発足した次世代バイオ医薬品製造技術研究組合、神戸市に設けた施設について紹介する。

2. バイオ医薬品生産の現状

バイオ医薬品（バイオリジックス）とはリンフォカイン、機能性蛋白質や抗体医薬、さらにウイルス粒子を用いるワクチン、そして、近年では細胞そのものを治療として用いるティッシュエンジニアリング製品まで、様々な生体由来分子や生体そのものを医薬品として用いる医薬品を指す^{1,2)}。これらのバイオ医薬品の製造プロセスは、その製品を生産する手段には主として生体そのものである生物（細胞）が利用されている、もしくは、生物そのものが製品となっている。

言いかえれば、その製造工程に「生きた生物を用いる」合成（生物反応）を用いるため、生物そのものの性質（不確定性、不均一性、特異性、常温常圧での反応等）に大きく影響される。

バイオ医薬品分野でも、特に近注目されているのが抗体医薬である。筆者が委員長となって取りまとめた特許庁、特許出願技術動向調査報告（抗体医薬）（平成 27 年 3 月）³⁾ に基づくと、既に世界の医薬品売上上位ベスト 10 の品目中、1 位ヒュミラ、2 位レミケード、3 位リツキサン、4 位エンブレル、7 位アバスタチン、8 位ハーセプチンと動物細胞を宿主として生産される抗体医薬が 6 品目を占めるようになっている（図1）。この動向は、ベスト 10 に抗体医薬が登場した 2005 年以降非常に顕著になっており、現在の開発品の動向とも併せて、バイオ医薬品はまさに世界の医薬品産業の「成長エンジン」となってきた。

抗体医薬として用いられている抗体分子としては、主にイムノグロブリン G(IgG) もしくは IgG 構造を模した人工蛋白質が用いられている。抗体医薬を遺伝子組換えにて生産する場合、現在、複雑なドメイン構造や糖鎖など

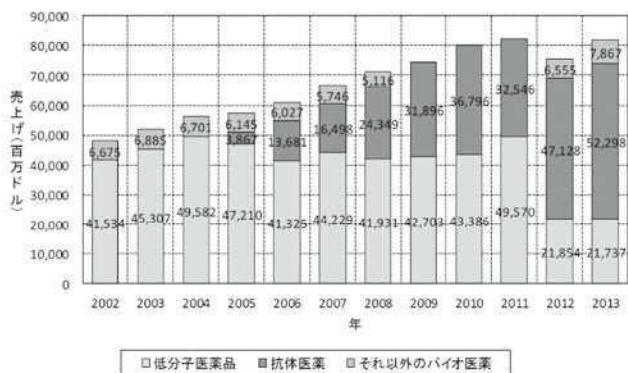


図1 世界の医薬品売上高ランキング上位10位までの合計売上高水位とその内訳(単位: 百万ドル)

の翻訳後修飾のため、大腸菌や下等真核生物ではうまく生産することが困難である。そのため、宿主細胞としては、高等真核生物である動物細胞培養株が主に用いられている。特に、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞は、代表的な宿主動物細胞培養株であり、上記の抗体医薬品も大部分が CHO 細胞を用いて生産されている。

産業界における動物細胞培養を用いた蛋白質医薬品生産はこの20年程で飛躍的に進歩し、CHO細胞を用いた抗体の分泌生産に限れば細胞株の選択方法や培地の改良、培養方法の改良の継続により、十数 mg/L 程度の生産濃度から、流加培養を用いた最大 10g/L での生産が可能となり、1g 抗体あたり数ドル程度で培養可能 (実用化) となっている^{2,4)}。この間、酵母や植物等他の宿主による抗体医薬品生産の研究も活発に大学において研究されているが、現時点では本格的な実用化には至っていない。

では、現在の動物細胞培養を用いた生産技術は「既に実用化されている」=「完成されている技術」なのだろうか。これは全くの誤解であり、現在の CHO 細胞を用いた生産系は、十分に完成されてはいないプロセスとなっている。CHO 細胞は、バイオ医薬品生産において、大腸菌に次いで用いられている宿主であるが、CHO 細胞の解明と応用は意外と進んでいない。特に、細胞構築・細胞培養においては、同じ発現ベクターを同じ宿主 CHO 細胞に導入しても、得られる細胞のキャラクタリゼーションは様々なものとなり、さらに、それぞれの細胞にそれぞれの培養条件、スケールアップ条件が必要となる。これは、CHO 細胞を用いて分泌生産された糖蛋白質分子自身を対象とした解析や評価は盛んに行われているが、生産する手段 (プロセス) としての細胞と培養系の解析については、十分な科学的な解明がなされていないためである。すなわち、株化細胞自身の科学的基盤に基づいた解明と応用が必要となる。

3. 宿主改良にかかるエンジニアリング

培養液中に蛋白質を分泌生産する場合、その培養液中の濃度 P は、生産する細胞の生産能力である比生産速度 ρ_{Ab} と、生細胞濃度 X_v との積分値 (IVC) のとの掛け算である (1) 式にて表現される⁵⁾。すなわち、生産濃度を上昇させるための技術的試みは、細胞自身の改良による細胞あたりの能力である ρ_{Ab} の上昇ならびに、培地や培養方法の改良による IVC の上昇のどちらかに帰属させることができる。

$$P = \rho_{Ab} \int X_v dt \quad (1)$$

この20年間の進歩により、このような高濃度生産が実現できた背景には、培地と培養プロセスの改良が大きな貢献を果たしており、細胞自身の比生産速度はあまり上昇に至っていない。すなわち、まだ細胞自身の改良には、大きな余地があると考えら得ることができる。また、細胞の改造は、得られる生産物である抗体の品質にも密接に関連しており、高品質を保ったままで効率よく生産できる株化細胞を構築するセルエンジニアリングを実現させる必要がある。

現在、細胞あたりの能力である ρ_{Ab} を上昇させるセルエンジニアリングの技術は、現在 (1) 転写プロセス、(2) 翻訳プロセス、(3) 翻訳後プロセスの大きく3つに大別することができると考えられる^{1,5,6)}。(図2)



図2 生産物濃度上昇にかかる技術開発の俯瞰⁵⁾

転写プロセスの (1) に注目したアプローチとしては、強力なプロモーターの利用や、mRNA の安定化等が挙げられるが、最も汎用されているのが、ゲノム中の目的遺伝子のコピー数を増加させる遺伝子増幅法である。

遺伝子増幅とは、遺伝子がゲノム中に本来あるべき数

よりも増幅されて存在する現象を指すが、これを応用して増幅遺伝子と目的遺伝子と同じベクターに入れ、細胞に導入し、増幅遺伝子の阻害薬剤存在下において、段階的に薬剤濃度を上昇させて細胞を選択する事により、高生産株を得る手法である。我々のグループでは遺伝子増幅 CHO 細胞である CHO-DR1000L-4N 細胞から 12 万クローンからなるバクテリア人工染色体ライブラリー (BAC ライブラリー) を構築し、外来遺伝子増幅領域の構造を解析、さらには BAC クローンをプローブとして用いた蛍光 *in situ* hybridization (BAC-FISH) 法を用いて、CHO 細胞の染色体物理地図を世界で初めて作成し、これを用いた染色体解析を行った (図 3)。現在、バイオ医薬品生産の宿主として汎用されている CHO K1 および CHO DG44 細胞においては、元々の Chinese hamster と比較して、大幅な染色体の再構成が引き起こされており、これが CHO 細胞における生産細胞構築のヘテロジェネティの一因となっていると考えられる (図 3)⁷⁾。

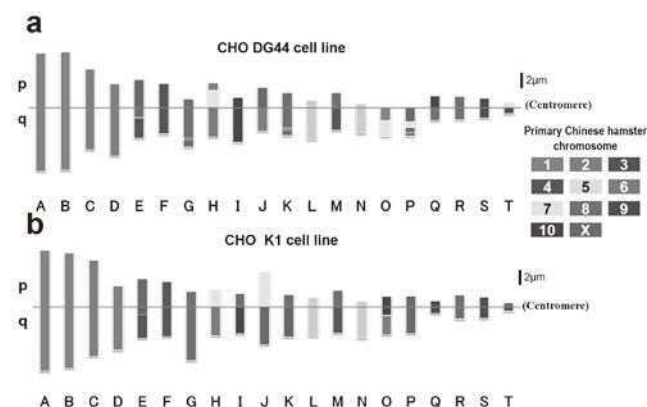


図3 CHO DG44, CHO K1細胞と Chinese hamster 染色体の比較⁷⁾

また、この結果に引き続き、得られたゲノム由来配列を手掛かりとして、遺伝子安定に関わる配列を単離し、企業へ導出、またこの配列をターゲットとした特異的遺伝子組込みによる効率的な発現系構築などを行っている。

実際には、実生産の観点からみると、細胞内反応プロセスは、細胞培養プロセスと培地も含めて全体として捉えて最適化される必要があるが、ここでは省略し、筆者の総説を参考にして頂きたい^{2,6,8)}。

4. 株化細胞の安定性と不均一性

特に近年、細胞培養を用いた物質生産における重要な課題は、細胞株自体の安定性と不均一性である。生体外に取り出して人工的な環境下で無限に増殖できる細胞を細胞株 (株化細胞) と呼ぶ。バイオ医薬品の品質

保証には、バイオ医薬品を生産する細胞株を同じものを準備して、これを用いて生産することにより、生産されたバイオ医薬品の品質を保証する Cell Bank の考え方がある。一方、近年の解析の結果、株化細胞のモノクローナリティを限外希釈法やコロニー形成法、フローサイトメトリー等で保証しても増殖する間にならず不均一性が生じることが知られてきた。この不均一な細胞集団を如何にうまく制御して、物質生産を行わせるのかが、欧米の製薬企業における最も大きな問題点となっている。筆者らは CHO 細胞の不均一性の中でも特に染色体数の変化に着目し、染色体数と安定性、長期培養における安定性、さらには生産性との関連について検討を行っている⁹⁾。さらには、米国製薬会社との共同研究を通して、実際の産業応用されている高生産細胞の特徴的な染色体についても解析を行っている。

5. 今後に向けた取り組みーバイオ医薬品製造のプラットフォーム化

バイオ医薬品生産において、大きなボトルネックの一つは実際の物質生産に関わる細胞の構築にあることは間違いないが、実生産系構築においては、それ以外の全体としてのプロセスについても考慮する必要がある。すなわち生産物濃度が一定以上上昇すると、離精製や品質管理、さらには fill and finish といった後工程の最適化についても十分に検討する必要がある。

プロセス全体を設計するためには、g/L を超える培養を実現することも重要ではあるが、それ以降の製剤化までのプロセスも含めてどのように全体を俯瞰するのが重要なポイントとなる。高濃度生産になると、分離精製担体の開発も、それに対応したリガンドが開発される必要がある。また、製剤プロセス一つをとっても、蛋白質医薬品の場合は、高濃度の蛋白質溶液といった形で製剤化される必要があり、糖蛋白質の高濃度溶液の物理化学という科学的基礎研究も必要とされている。

現在、遺伝子組換え CHO 細胞を用いた蛋白質医薬品生産は、多大なる時間と労力をかけて生産性の高い CHO 細胞を構築さえすれば、g/L オーダーの生産が可能である。では、実際のこれらのプロセスは簡単に誰でも構築できるものになっているのであろうか。残念ながら発現ベクターを構築し、CHO 細胞にトランスフェクションしただけでは高いものから低いものまで様々なレベルの発現株が構築されてしまう。これは CHO 細胞自体のヘテロジェネティによるものである。だれでも簡単にかつロバストに生産系を構築する、すなわち、細胞個々の性質の違い

研究開発体制

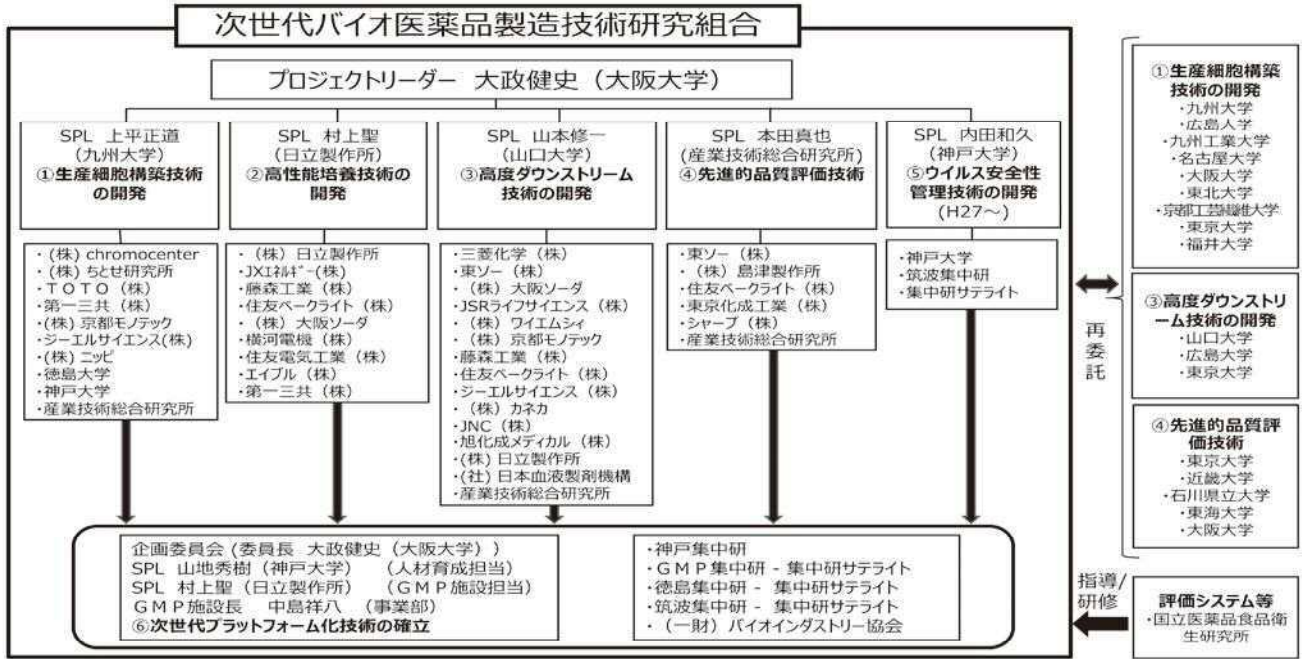


図4 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の概要(平成 28 年 1 月資料)

を解析／解明／制御し、構築した細胞を培養、スケールアップ、そして分離精製、品質管理する技術の統合化が今後必要になると考えられる。そこで、これらの背景を受けて、平成 25 年度から経済産業省において、個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術）プロジェクト（現在、日本医療研究開発機構（AMED）次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術））が開始されている。

本プロジェクトは、生産細胞を構築し、培養する上流プロセスと、生産された物質を分離精製する下流プロセス、並びにこれらの品質を評価する技術を開発し、さらにこの3つの要素技術を有機的に結合する実証プロセスを設けることにより、次世代のバイオ医薬品の製造技術基盤を確立することを大きな目的としている。筆者がプロジェクトリーダーとなり 26 企業、3 団体、1 国法、4 大学の合計 34 機関および 12 の再委託先大学からなる 80 以上の課題からなる技術開発項目を統合し、550 人以上の登録研究員にて実施（平成 28 年度事業費 22.8 億円）している。

また、本プロジェクトを遂行するにあたり、技術研究組合制度を活用している。技術研究組合とは、産業活動において利用される技術に関して、組合員（企業、大学等）が自らのために共同研究を行う相互扶助組織（非営利公益法人）である。各組合員は、研究者、研究費、

設備等を出しあって共同研究を行い、その成果を共同で管理し、組合員相互で活用する。そこで、プロジェクトの実現のために、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合を平成 25 年に設立し、この技術研究組合を通して、研究開発を行うだけでなく、得られた成果の一元化、集約化、有効活用、また、本分野における人材育成にも重点を置き、研究開発を実施している。



図5 国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術研究開発概要¹⁰⁾

現在、個々の要素技術を融合し統合するための拠点を徳島大学、つくば市に設けるだけでなく、神戸市、神戸大学の協力の下、神戸ポートアイランド京コンピュータ前に 3000㎡程からなる GMP 準拠のマザー工場機能を持たせるためのシングルユース 200L 培養槽を持つ設備を設けており、この神戸 GMP 集中研において開発研究課題を順次統合し、検証、プラットフォーム化を行う予定である。



図6 神戸ポートアイランドに設けられた設備(4階建の1-3階)外観
(平成27年10月)

6. おわりに

本稿の冒頭にも述べたが、我が国、とくに関西はバイオによるものづくりの長い伝統を持っている。生物工学分野を代表する学会である、公益社団法人日本生物工学会は、90年以上の歴史を持ち、3000名程度の会員が所属しているが、その事務局は、関西、しかも大阪大学工学部内に設置されている。多数の学会において、その事務局が東京に設置されている中、まさに関西はバイ

オ産業の発祥 / 伝統 / 発展の聖地となっている。

本稿にて紹介した著者らの研究は、大阪大学大学院工学研究科および徳島大学においてなされたものである。共同研究者の皆様方、ならびに次世代バイオ医薬品技術研究組合関連の皆様方に感謝いたします。また、本記事は、生産と技術¹⁾、生物工学会誌⁴⁾、に掲載された原稿に加筆修正したものである。

参考文献

(紙面の関係上、筆者らの総説を中心に引用した。)

- 1) 大政健史, 生産と技術, **66**, 54 (2014).
- 2) 大政健史, 生物工学会誌, **91**, 507 (2013).
- 3) https://www.jpo.go.jp/shiryuu/pdf/gidou-houkoku/26_11.pdf
- 4) 大政健史, 生物工学会誌, **88**, 649 (2010).
- 5) 大政健史, 化学工学, **75**, 143 (2011).
- 6) Omasa *et al.*, *Cur. Pharm. Biotechnol.*, **11**: 233 (2010).
- 7) Cao *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, **109**: 1357 (2012).
- 8) 大政健史, 化学と生物, **48**, 255 (2010).
- 9) Yamano *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* (in press) (2016)
- 10) 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合
<http://cho-mab.or.jp/>

(醗酵 昭和61年卒, 63年修士, 平成4年博士)