

氏名	岸下 昇平		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 7535 号		
学位授与年月日	平成 27年 7月 24日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いた高品質な抗体医薬の高生産培養システムの開発		
主査	筑波大学教授	博士 (農学)	青柳 秀紀
副査	筑波大学教授	博士 (工学)	市川 創作
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧昭
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	柏原 真一

論 文 の 要 旨

高い薬効と安全性に優れた高純度で特異性が高いモノクローナル抗体は、抗体医薬品として、近年、様々な診断や治療に幅広く使用されている。しかしながら、抗体医薬品は低分子医薬品と比べて非常に高価であることが、実用上の大きな課題となっている。抗体医薬品が高価格となっている要因として、(a) 製造に高価な培地や大規模な培養設備が必要なこと、(b) 抗体医薬品が高分子であるとともに、糖鎖等により修飾された複雑な構造を有するため、精製や規格分析等も複雑であること、があげられる。製造コストを低減するためには、抗体の生産性を向上させる事が必須であるが、同時に品質の制御も重要である。これらの現状を踏まえ本研究では、(1) 抗体の生産性向上のための完全合成流加培地の最適化、(2) 生産性と品質の最大化に向けた培養法最適化、について検討を行い、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞による高品質な抗体 (IgG mAb) の実用的な高生産培養システムの開発を試みた。

抗体の生産性向上のための完全合成流加培地の最適化を目指し、はじめに、培養期間中のアミノ酸とアミノ酸類縁体の経時的な消費動態を把握し、顕著な減少を示したアミノ酸を明らかにした。これらのアミノ酸を培地に添加し、抗体産生量の増加を指標にアミノ酸を選抜した結果、3種類のアミノ酸 (Cys、Ser、Tyr) の添加により抗体生産量が約 30%向上した。しかしながら、Tyr は難溶性のため、目的の添加濃度までの高濃度化が困難であることが判明した。そこで、Tyr の可溶化の方策として、Tyr のペプチド化について検討を行った。種々検討した結果、Cys-Tyr-Ser のトリペプチドでは、濃度 50 mM まで流加培地に溶解可能で、3種類のアミノ酸の添加で見られた乳酸濃度の低下および抗体産生量の向上が、ペプチド添加でも同様に得られた。一方で、医薬品製造規格に見合うペプチドの合成はコストが高く、実製造での使用は困難であるとの結論に至った。そこで、Tyr をチロシン塩として添加する方法について検討した結果、Tyr の添加可能濃度を向上させることができた。更に、培地から不要な無機塩や不溶性成分、緩衝剤の除去や低減を行うと共に、Cys、Ser、Tyr の代謝に関わるアミノ酸を増量した高濃度流加培地を作製したところ、3種類のアミノ酸の添加と同等以上の抗体産生量の向上効果が得られた。高濃度流

加培地の実製造への応用に向け抗体の品質への影響を検証したところ、酸性電荷バリエーション量の増加が見られ、その対応が必要となった。

生産性と品質の向上に向けた培養法の最適化を目指し、はじめに、高濃度流加培地の使用により生じた酸性電荷バリエーション量の増加に対して、低減効果のある培養パラメーターのスクリーニングを実施した。主要なプロセスパラメーターについて、抗体の生産性と品質に対するリスク分析を、**Failure Modes and Effects Analysis (FMEA)** を用いて実施した。重大性、頻度、検出可能性の 3 つの項目に対して各プロセスパラメーターの評価を行い、実験で検討する因子を選抜した。次に、**Plackett-Burman** 計画を用いて実験を実施し、酸性電荷バリエーションの生成量を抑制する主要なプロセスパラメーターとして、培養温度シフトを見出した。培養温度シフトについて詳細に検討を実施したところ、シフト温度・シフトタイミング依存的に酸性電荷バリエーションの量が低下することが明らかとなったが、同時に抗体産生量の低下も見られた。この結果、抗体産生量と酸性電荷バリエーション生成量の両方の応答に対してプロセスを最適化する必要性が生じた。工業生産の必要条件としては、品質、生産性の他に頑健性 (**Robustness**) も要求されることから、中心複合計画を用いてプロセスの最適化とともに頑健性の評価も実施した。パラメーターを最適化した結果、コントロールに対して抗体産生量が 70% 向上する一方、酸性電荷バリエーション量は同等のレベルに抑制され、頑健性の高い抗体の高生産培養システムを構築することができた。

審 査 の 要 旨

本研究は、**CHO** 細胞による高品質な抗体医薬品の実用生産を目指し、その基盤となる、抗体生産を向上させる完全合成流加培地の作製と、生産性と品質の最大化を実現する培養法の最適化について検討をおこなった研究である。本研究で独自に開発した高濃度の完全合成流加培地により、抗体の生産性を著しく向上させることに成功し、抗体をより安く恒常的に生産し供給することが可能となった。また、実製造の現場で使用可能な抗体の品質評価指標として、酸性電荷バリエーションを用い種々検討した結果、酸性電荷バリエーション生成量を抑制する培養プロセスパラメーターとして、培養温度シフトを見出した。さらに、中心複合計画でプロセスパラメーターを最適化することにより、**CHO** 細胞による高品質なバイオ医薬品の実用的な高生産培養プロセスの構築に成功した。培養期間中のアミノ酸やアミノ酸類縁体の経時的消費動態に基づく培地の改良・設計や、**Plackett-Burman** 計画や中心複合計画を用いた培養法の最適化の一連のプロセスは、今後の培養製法開発のプラットフォームとして活用されることが期待できる。また、本研究で得られた成果は、実際に、癌やアトピー性皮膚炎、血友病の臨床試験で使用する抗体医薬の製造に必須な抗体原薬の生産に活用されており、実学的研究として高く評価できる。

平成 27 年 5 月 19 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。