

番 号: Selexis_2014_Jan_Metab. Eng.
分 野: MAR 含有ベクターによる CHO-M の代謝工学

添付6

題名	CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion
雑誌	Metabolic Engineering 21 (2014) 91-102
著者	Vale´rie LeFourn (a,b), Pierre-AlainGirod(a), MontseBuceta(a), Alexandre Regamey(a), NicolasMermoud(b)
所属 組織	(a) Selexis SA,18Ch.desAulx,Geneva,Switzerland (b) Laboratory of Molecular Biotechnology, Instituteof Biotechnology, University of Lausanne,and Center for Biotechnology UNIL-EPFL, Lausanne, Switzerland
要旨	組換えタンパク質を CHO などの哺乳類細胞でから分泌たんぱくとして生産することが望まれているが、産生効率での問題が度々見受けられてきた。 本研究では、易発現性免疫グロブリン産生株(HP)と難発現性免疫グロブリン産生株(LP)における IgG 産生時の各サブユニットの動態比較を行い、細胞内タンパク質合成における間違いを起こしやすい段階のひとつを明らかにした。本例では、L 鎖(LC)のシグナルペプチド切断工程の不具合から、凝集を起こしやすい異常 LC が生じ、免疫グロブリンの高次構造形成に寄与できなくなっていた。ここでは、SRP14 と他の分泌経路たんぱく質を過剰産生させることで免疫グロブリンの産生能の律速段階の部分的緩和に成功した。これにより新たな律速要因の候補のいくつかが明らかになり、さらにその緩和の可能性を示した。

【序 論】

哺乳動物細胞は、バイオ医薬企業により治療用たんぱく質の生産に現在、広く使われている。その大きな理由のひとつとして、哺乳動物細胞が、薬剤有効性や安定性に関わることが多い複雑な翻訳後修飾を上手くこなすことが挙げられる。転写と翻訳過程は DNA ベクター技術をとおとして素晴らしい進歩をとげ、哺乳動物細胞培養系から多くの組換えたんぱく質の効率的生産を可能としている。さらに最近では、かなりの努力がゲノムに安定的に組み込まれる導入遺伝子コピー数を上げるために向けられおり、高レベルの転写に有利なゲノム部位に導入遺伝子を入れること、そして／あるいは MAR のようなクロマチン調節因子を組み入れることなどが行われている。

(Mariati et al., 2012; Nehlsen et al., 2009). モノクローナル抗体や Fc-融合たんぱく質など大きな成功を収めているが、亢進した転写活性は必ずしも組換えたんぱく質の分泌量を増大させるものではない。GOI のコピー数を多くするための増幅操作は最終的にはプラトーに達し、それを超えればたんぱく量の増加は見込めない。このように、非常に高い導入遺伝子コピー数や mRNA 濃度は、同様に上昇しているたんぱく質収量とは必ずしも相関しないのかもしれない。その上、ある程度高いレベルの分泌がうまく行かないいくつかの特殊なたんぱく質ではこのようなアプローチは失敗する可能性がある。そのような例では、細胞が独特な異種性のたんぱく質の合成および加工に対処できず、細胞ストレス応答や細胞毒性を引き起こすのかもしれない。その他の細胞内の障害となりえるものとして、ポリペプチドの加工処理、修飾反応、そして／あるいは分泌に関わる経路下流の細胞機構が挙げられる。例えば、組換えたんぱく質発現の限界が、mRNA やポリペプチドの上流からの大量供給に見合うに必要な転写後修飾を、十分な迅速性と精度をもって処理できないといった当該細胞の能力不足を反映する場合もあろう。そのような例では、特定の翻訳後修飾段階が律速となり、不均一でバラツキの多い修飾をもったたんぱく質が生み出されてしまう。このように、組換えたんぱく質の一貫性のある高収量の組換えたんぱく質生産を実現するには、これらの律速となる障害を特定すると同時に、翻訳後のたんぱく質の加工工程および分泌機構の改善強化を図るための個別的な技術戦略の策定が必要となる。哺乳動物細胞によるたんぱく質分泌の実体は、細胞基質から最終目的地に向かう前に折りたたみと会合が行われる ER 内腔への局在化を含む複雑な経路を構成している。

たんぱく質分泌の最初のステップはシグナルペプチドに依存している。このシグナル配列は、新生ポリペプチドのアミノ末端に位置する特異的な配列で、翻訳作業中のリボソームとシグナル認識たんぱく質(SRP)の会合を仲介する(Keenan et al., 2001)。SRP との会合によってリボソームは翻訳作業を一時中断し、SRP を介して ER 膜上の SRP 受容体(SR)に係留される (Walter and Blobel, 1981)。その後、SRP と SR の GTPase 活性がお互いを活性化して、新生ペプチド-SRP-SR の複合体が解離し、新生ペプチドはトランスロコンに受け渡される。同時に翻訳が再開され、新生ポリペプチドはトランスロコンチャンネルに沿って ER 内腔に入れられる (Gilmore et al., 1982; Walter et al., 1982)。

異なるシグナルペプチド配列は異種性たんぱく質の分泌に関して様々な効率を示すが、インターロイキンあるいは免疫グロブリンのシグナル配列が異種性たんぱく質の分泌には通常使われる。類似性があるものの、これらの配列は全てのたんぱく質に一樣に効率的な分泌を促すものではない、これはおそらく本来の配列は本来の状況から逸脱した場合うまく機能しないか、あるいは宿主細胞や分泌工程に関連した差異に起因するのであろう。異種性たんぱく質の効率的な分泌のための適切なシグナル配列の選択は、シグナル配列が翻訳過程において当該ポリペプチドの後に続く部位、例えば、免疫グロブリンでは可変領域、と相互作用するなどの現象のため、さらに複雑なものとなっている (Johansson et al., 1993)。最近の研究は、宿主細胞株の改変技術が

異種性たんぱく質や治療剤の修飾あるいは分泌経路を改善する可能性を報告している(Baik et al., 2012; Goh et al., 2010; Lim et al., 2010; Peng and Fussenegger, 2009; Zhang et al., 2010)。分泌経路や開口分泌(エキソサイトーシス)など様々な翻訳後工程に関与する機能性たんぱく質が研究されており、いくつかのこれらの経路に対して、大量の溢れかえった異種たんぱく質に起因する障害や細胞の隘路を解決するための細胞改変技術が成功裏に適用できた(Mariati et al., 2010; Peng et al., 2010)。小胞体ストレス応答(UPR)そして小胞体ストレス介在アポトーシスに対処するためシャペロンや ER 成分の遺伝子を共導入して新規な宿主細胞株の樹立可能性が示された。例えば、CHO 細胞では、たんぱく質ジスルフィドイソメラーゼ、あるいは、Xbp1 を発現するように改変されている(Borth et al., 2005; Davis et al., 2000; Mohan and Lee, 2010; Tigges and Fussenegger, 2006)。その他の試みとして、ERp57、calnexin、calreticulin そして BiP1 などのシャペロンの CHO 細胞への導入発現がある(Chung et al., 2004; Hwang et al., 2003; Morris et al., 1997)。また、低温ショックたんぱく質(低温誘起 RNA 結合蛋白; CIRP)が組換え γ インターフェロンの収量を増加させることが示された(Tan et al., 2008)。しかしながら、これらの ER たんぱく質がたんぱく質分泌を改善し、多くの組換えたんぱく質の分泌改善に作用する分子的機構は系統的には研究されていない。

本研究では、CHO 細胞株で一貫して低レベルの分泌収量を示す難発現性免疫グロブリンを研究対象とした。まず欠陥ステップの特性を明らかにした。すなわち、難発現性抗体産生株では LC のシグナルペプチドの切断が起こらず、適切な折り畳みが阻害され、ER の中にポリペプチド封入体として蓄積、その結果、定常的な低い分泌量に終始するという顛末であった。SRP 経路の特異的なたんぱく質の過剰発現により適切なたんぱく質分泌が誘起されることを示した。SRP14 の発現など、SRP たんぱく質を発現させた改変 CHO 細胞は難発現性の免疫グロブリンの適切な加工と分泌の能力を獲得し、易発現性の抗体に関しては、分泌能亢進を示した。

これらの結果は、分泌経路が一般的に異種性たんぱく質発現に対しての隘路となっており、代謝工学的に SRP たんぱく質を過剰発現するように改変した CHO 細胞では難発現性たんぱく質も高い分泌を達成できることを示唆した。

【結 果】

1 易発現性および難発現性免疫グロブリン産生細胞の特性評価(図 1)

2種類の抗体遺伝子ベクターは同じ MAR 含有ベクターを用いて作成、シグナル配列も同じ配列。

- 1) 細胞増殖性: 易発現性細胞(HP、ハーセプチン抗体)の半分のクローンが4日目でプラトー(1A 右)、難発現性細胞(LP、抗 TNF α 抗体)は多くのクローンが7日目でも達していない。
- 2) 比産生能では、平均値比較で HP/LP = 4.75。

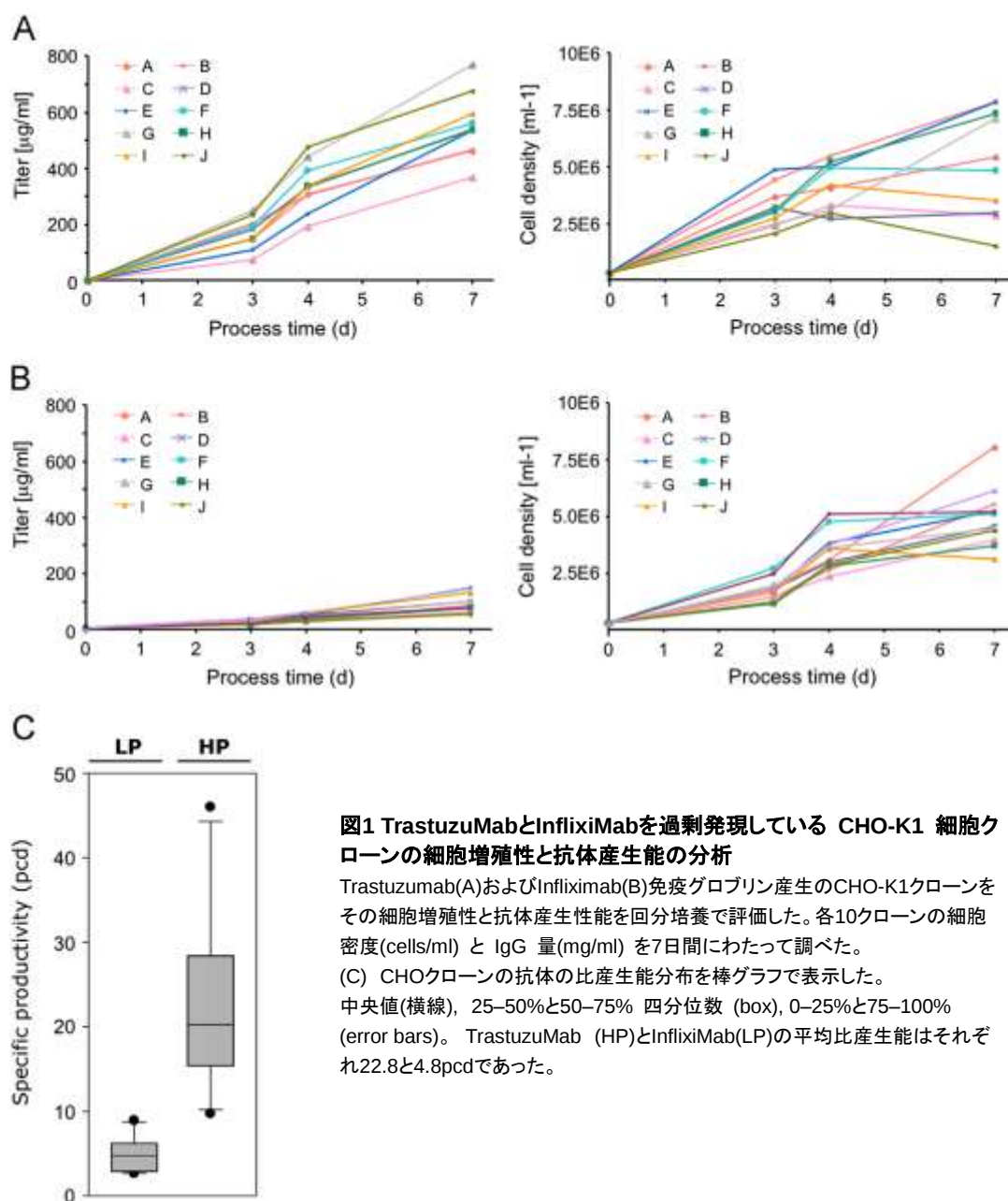


図1 TrastuzuMabとInfliximabを過剰発現している CHO-K1 細胞クローンの細胞増殖性と抗体産生能の分析

Trastuzumab(A)およびInfliximab(B)免疫グロブリン産生のCHO-K1クローンをその細胞増殖性と抗体産生性能を回分培養で評価した。各10クローンの細胞密度(cells/ml)とIgG量(mg/ml)を7日間にわたって調べた。

(C) CHOクローンの抗体の比産生能分布を棒グラフで表示した。

中央値(横線), 25-50%と50-75% 四分位数 (box), 0-25%と75-100% (error bars)。TrastuzuMab (HP)とInfliximab(LP)の平均比産生能はそれぞれ22.8と4.8pcdであった。

2 低産生(LP)と高産生(HP)細胞クローンの小胞体ストレスおよび UPR の性質

二つの LP とひとつの HP を 7 日間培養、UPR 指標の BiP と前アポトーシス段階の指標の CHOP を細胞抽出物のウェスタンブロットで検出(図 2)。

- 1) BiP が、対照の WT-CHO 細胞に比べ LP 細胞で増加しており、HP では低レベルに留まっていた。LP では、ER ストレス応答が誘起されていると考えられた。
- 2) CHOP は、蛋白折りたたみの障害や折りたたみのミスが UPR 応答で解決できない時発現誘導される転写因子。HP と LP で 3 日目までは誘導されるが、LP では 7 日目まで存在するが HP では 3 日以降は減少(培養後期では CHOP 介在応答を完全に解決)。

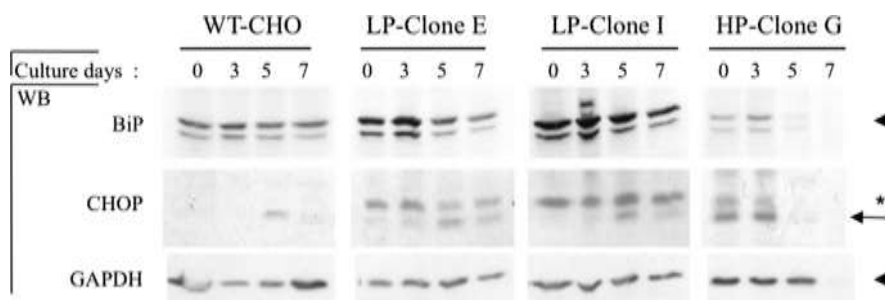


図 2 IgG 抗体産生 HP と LP クローンにおける ER ストレスと UPR 活性化センサーの発現レベル

3 免疫グロブリン発現の代謝的隘路の特性評価

次に、産生された免疫グロブリンの性状比較を行った。細胞抽出物、培養上清を還元条件／非還元条件で SDS-PAGE 後、ウェスタンブロットで調べた。

- 1) HP クローンでは 50K、25K の予測位置にそれぞれ重鎖(HC)および軽鎖(LC)を検出した(F, J, G)。LP では分泌も細胞内由来物も LC は 25K より高めに泳動された。PNGase の消化試験で分子量変化は糖鎖付加は否定された。
- 2) 細胞を Triton X-100 で処理し、溶解画分(Sol)と不溶画分(Ins)に遠心分離。HP の HC、LC は主に溶解画分に存在した。LP の LC のかなりの部分が不溶画分に認められた。非還元条件では LC が高分子領域にのみ存在した。これらから、LP の LC はシグナルペプチドの切断が起こらず高分子側にシフト、ER 内腔内では適切な折りたたみが進行せず蓄積、S-S 結合を含む凝集体を形成したものと推測した。
- 3) IgG の折りたたみ、会合動態そして IgG 凝集体の運命などを探るため、たんぱく質合成阻害剤のシクロヘキシミド処理に基づく追跡試験を実施した(図 3C)。2、4、6 時間 100μM のシクロヘキシミド存在下で培養した HP と LP の細胞を Tx-100 で処理し得られた溶解画分と不溶画分を非還元条件の SDS-PAGE に供した。HC、LC の会合、すなわち IgG、(HC)₂、HC-LC、FreeHC、(LC)₂、FreeLC、凝集 LC の動

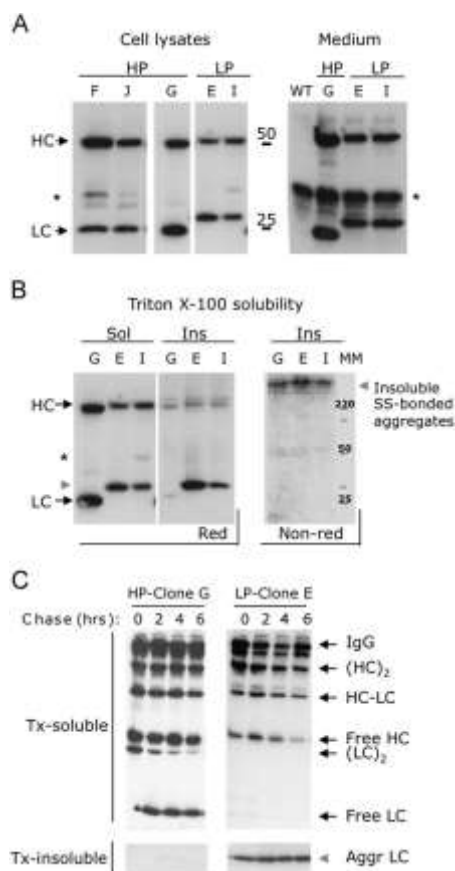


図 3 HP と LP が産生する重鎖、LC の特性

態を調べた。その結果;

- ◆ HP クローン G では大量のモノマー[FreeHC、FreeLC]とダイマー形成 [(HC)2,(LC)2,HC-LC]が認められる。特に、LC 関連のモノマー、ダイマーが経時的に減少し、それと同時に IgG 形成が増加していることが読み取れる(図 3C)。
- ◆ LP クローン E では LC モノマーは凝集 LC としてだけ認められ、FreeLC と(LC)2 が検出出来ない。低濃度の HC-LC と FreeHC そして(HC)2 が経時的に減少しつつ、僅かな量の IgG 形成に寄与している。凝集 LC 量は経時的に変化せず、IgG 形成には寄与していないことが分かる(図 3C)。

4) 凝集 LC の細胞内局在化をさぐるため LP クローンの細胞分画試験を行った(図 4)。

界面活性剤(Tx-100)、膜透過性調節の薬剤(Digitonin)、蛋白分解酵素(トリプシン)を組み合わせた 3 種類の分画を行った。各分画法で得られた溶解画分と不溶画分につき、IgGLC と分画の適切性を確認するための対照として ER 分子 BiP を、ウェスタンブロットで検出した。結果は以下の通り;

- 1) BiP は予測通り Lane1, 3 で観察され分画操作の正当性を確認。
- 2) LC は大部分不溶画分から回収 (Lane2, 4, 6)、ごく僅かが可溶画分(Lane1, 3)と一緒に回収される。
- 3) この細胞膜、ER 膜の溶解とトリプシン消化の分画法においても凝集 LC は、トリプシンが接近できない区画に存在した(Lane6)。
- 4) DSP(クロスリンカー)処理 LP 細胞の Tx-100 不溶画分あるいは全細胞を SDS-PAGE(還元条件)に供した。BiP は凝集 LC と共沈、両者の会合性が明らかとなった(図 C、Lane2)。

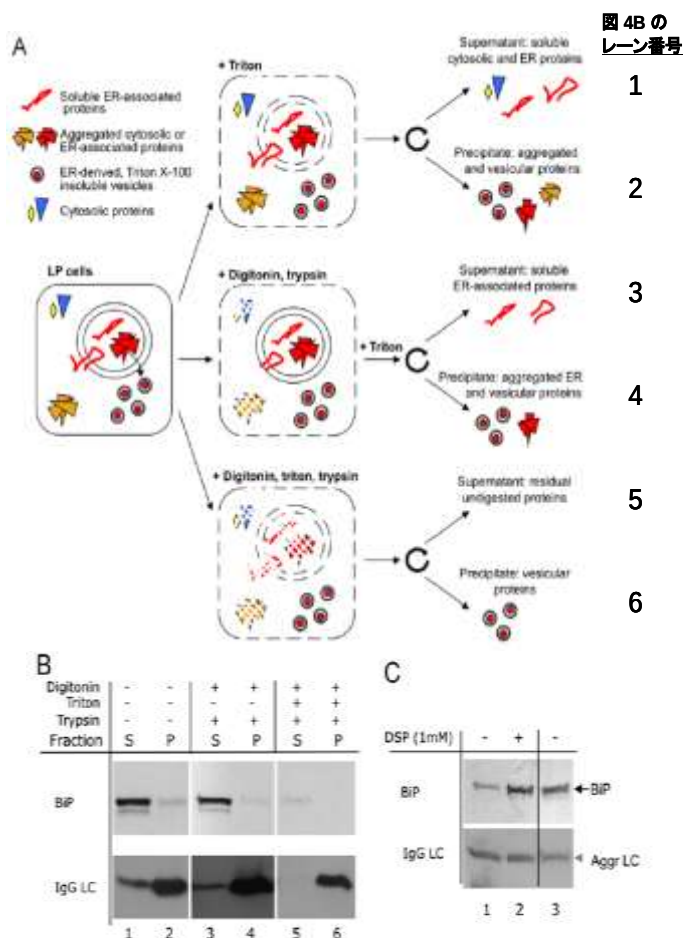


図 4 LP が産生する誤加工 Infliximab 抗体 LC の細胞局在性

4 SRP14 の異種性発現は分泌能と LC プロセッシングを回復させる

LP 細胞の不適切な LC のプロセッシングを改善するため、シグナル配列を認識し、ポリペプチドの小胞体輸送のトリガーとなる SRP 複合体の強化を試みた。ターゲットとして、SRP 複合体のサブユニットであり翻訳アレストを起こすことが報告されている SRP14 を選び、LP よび HP のなかで高性能を示したクローン LP-E と HP-G に SRP14 発現ベクターとネオマイシン耐性遺伝子ベクターを共導入し、各々の安定細胞株を作成した。

- 1) SRP14 発現 LP 細胞は、同 HP 細胞と同レベルの抗体産生を示した(図 5A と B の左グラフ)。
- 2) SRP14 の導入は、細胞生存率に影響は与えないが、HP では増殖速度が親細胞に比べ低下する(図 5A と B の右グラフ)。
- 3) SRP14 発現 LP および HP 細胞サブクローンの IgG 比産生量の分布を調べたところ、LP では中央値が 30pcd を超え、SRP14(-)の親株に比べ 7 倍強となり、HP では約 30%の産生能向上が認められた(図 5C)。LP と HP の産生能は同じレベルとなり、この産生能は半年以上の培養の間維持されていた。
- 4) SRP14 発現量と IgG 産生能の関係を調べた。SRP14-LP のサブクローン 5 株の SRP14mRNA を qPCR で定量した。内因性の SRP-14mRNA の約 50-200 倍量が転写されていたが、最も高い IgG 比産生量の株は、(SRP14 mRNA 転写量)-(比産生能)曲線のプラトーに達している約 100 倍量の転写量を示した(図 5D)。他の分泌経路の成分が律速となっている可能性が高い。

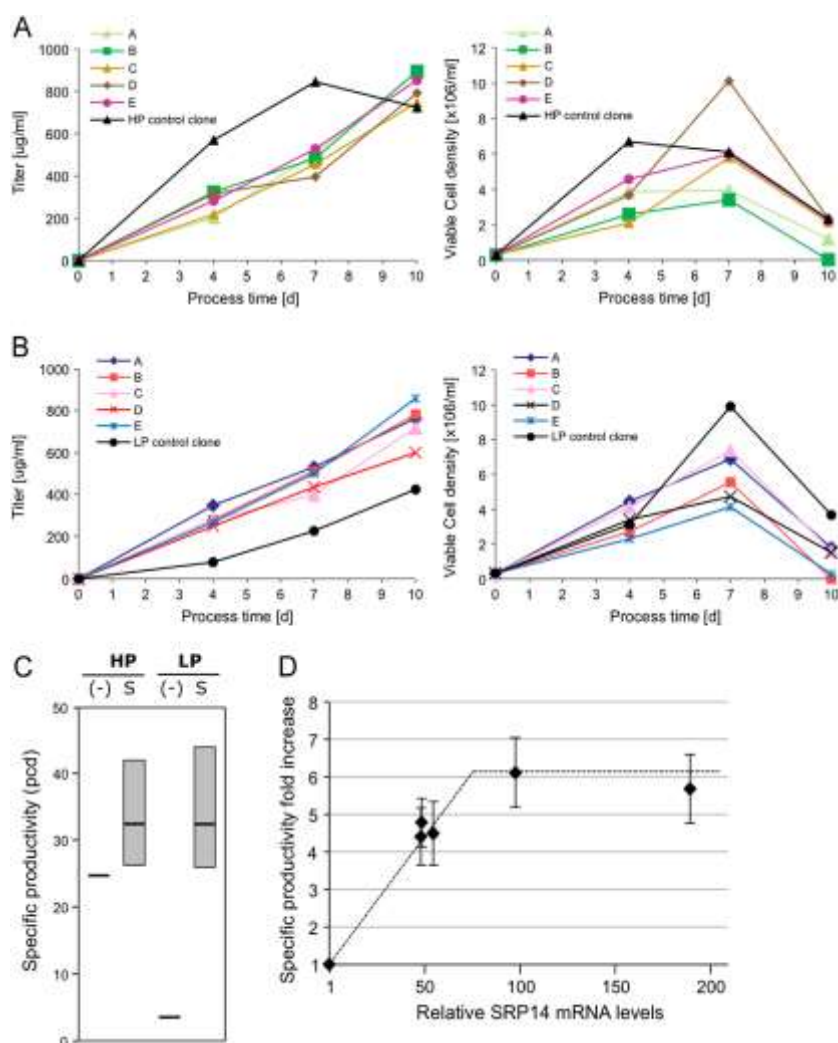


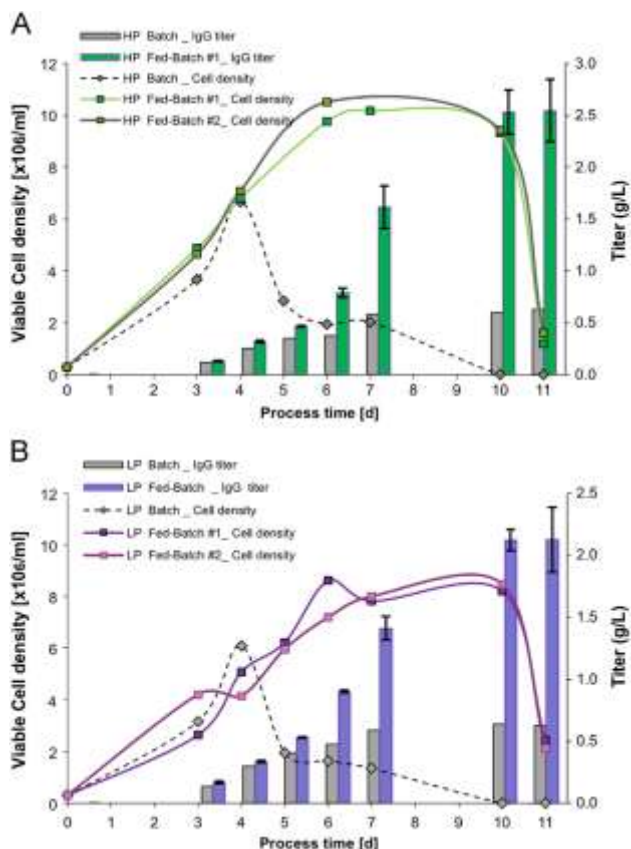
図 5 SRP14の異種性発現のTrastuzumab分泌の改善とInfliximab分泌の回復効果

次に、クローン選別の時得られた比産生能が、生産工程に適用できるか試験した。HP と LP から最適な SRP14 発現サブクローンをそれぞれひとつ選び(HP サブクローン B、LP サブクローン E)、流加培養法で調べた。

- 5) LP サブクローン E は最大 8×10^6 cells/mL の生存細胞密度を示し、生産工程の最後には 2g/L 以上のの産生量を示し、HP サブクローンと同レベルに達していた(図 6A と 6B)。

図 6 SRP14の発現が、難発現性IgGの高収率生産を可能とする

SRP14導入Trastuzumab HPサブクローン B (A) とInfliximab LPサブクローンE (B)(図 5に分析結果)を125mlの振とうフラスコ(作業容量25mL)で流加培養を行った。生細胞密度とIgG力価の11日間の経時変化を測定した。



次に、SRP14 過剰発現の IgG 合成への影響を、これら二つのサブクローンで調べた。

- 6) SRP14-LP で、正常に加工され、適切な折り畳みによって IgG 分子の形成に供せられる LC が検出された(図 7A、LP Lane S)。この株では HC の移動位置は変わらず、SRP14 は難発現性 IgG の誤加工された LC のみに作用している。また Tx-100 不溶画分の凝集 LC は消失した(図 7A、Lane S の下段の泳動図)。一方、対照の GFP 導入 LP クローンでは溶解性も LC の加工も異常のままである。また HP サブクローンでは、HC と LC の動態に、SRP14 あるいは GFP 導入は何ら影響を及ぼしていない(図 7A、HP Lane G と S)。
- 7) シクロヘキシミドによるたんぱく合成阻害後の Ig 追跡試験を LP-SRP14 サブクローンをを用い図 3C と同様に行ったところ、Tx-100 不溶性画分の凝集 LC は、期待通り全く認められなかった(図 7B、LP-SRP14 の下段泳動図)。しかしながら、FreeHC に比べ FreeLC は僅かしか検出できなかった。これは産生された LC が HC-LC と IgG に素早く取り込ま

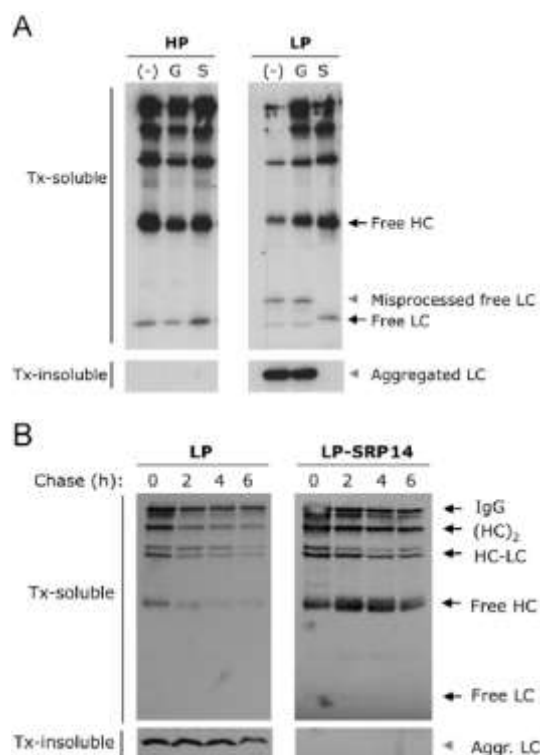


図7 SRP14の発現でLCの凝集を解消

れ、FreeLC としての存在時間が僅かな間であるためと解釈でき、この成熟 LC の供給が、未だ IgG 合成の律速となっていると考えられた。言い換えれば、他の SRP たんぱく質等の遺伝子導入で IgG 産生能の更なる改良が可能なことを示唆している。

5 小胞体輸送の改変による組換え IgG 分泌能の改善

SRP14 の遺伝子導入が、ある閾値まで IgG 産生を亢進することを示した。LP の LC 生合成速度が HC 生合成に追いついていないという実験結果から、SRP14 と直接あるいは間接的にかかわる因子が SRP14-LP 系での IgG 産生の隘路となっている可能性を考えた。単独および数通りの組み合わせの他の経路たんぱく質を SRP14 と一緒に共発現した細胞株を樹立、その IgG 産生能を評価した。

- 1) Infliximab LP クローン E (図 3) に以下の様々な組み合わせの経路たんぱく質遺伝子をトランスポゾンベクターにより遺伝子導入した；
 - ◆ SRP 複合体を構成する SRP19、SRP54
 - ◆ SRP 受容体 (SR) の α サブユニットと β サブユニット
 - ◆ トランスロコンの Sec61 α 、 β 、 γ サブユニット
- 2) 各種経路たんぱくの組み合わせは図 8 の通りで、3 回の独立した培養工程から得られた、ポリクローナル細胞集団の培養上清 IgG 力価の中央値は、SRP14-LP に対して 20~40% 上昇している (図 8A)。特に、三種類の SRP+SR の組み合わせや SRP14+SR+トランスロコンの組み合わせが有望である。
- 3) 比産生能の比較をしたところ、SRP-LP の 30pcd に対して SRP14-SR-トランスロコンが 60pcd 以上の値を示した。

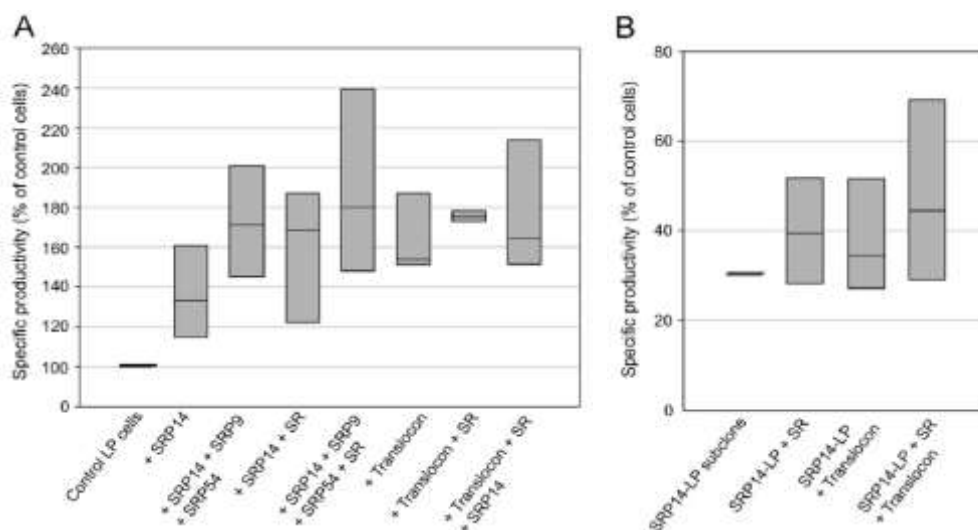


図 8 SRP、SRおよびトランスロコンサブユニットの組み合わせの抗体産生亢進効果

【考 察】

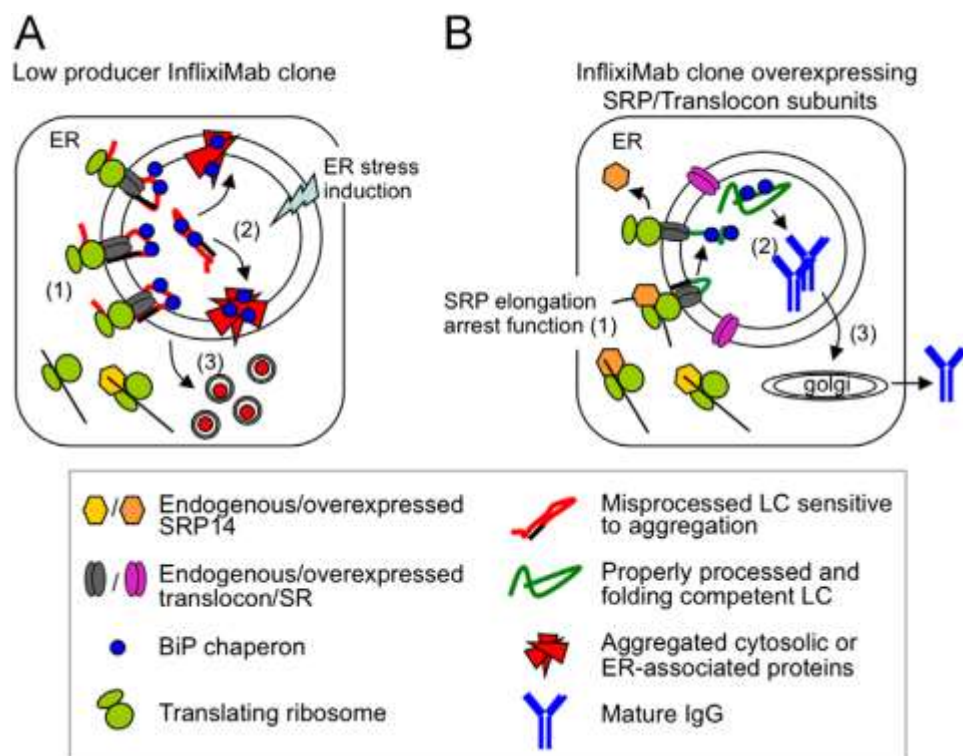


図9 Model for the rescue of Infliximab secretion from SRP14-expressing clones.

Model of the IgG folding and secretion by low producer clones before (A) and after SRP/Translocon subunits overexpression (B). Data reported in the present study indicate that neosynthesized LC produced by low producer clones exhibit improper processing and folding state. Signal peptide misprocessing of the Infliximab LC may lead to the saturation of the ER co-translational translocation machinery (panel A, number 1). Its aggregation in the ER within IgG assembly- incompetent aggregated LC forms (panel A, number 2) induce ER stress and trigger the formation of autophagosome-like structure (panel A, number 3). Overexpression of the SRP14 and others SRP/translocon components proteins fully rescues the processing and secretion of the Infliximab IgG (panel B). SRP14 elongation arrest activity possibly delays LC ER translocation during translation of its mRNA (panel B, number 1). This would favor in turn the correct processing of the LC and its proper interaction with ER folding chaperones (panel B, number 2). The maintenance of the neosynthesized LC in an IgG assembly-competent state thus restores high yield secretion of fully-assembled antibodies (panel B, number 3).