

syFISH (systematic FISH) 解析 ～バイオ医薬品の生産に用いられる細胞基材の単クローン性の評価～

クロモセンター 山内 清司

1 はじめに

バイオ医薬品の製造には動物細胞や微生物に目的遺伝子を導入して樹立された細胞（細胞基材）が用いられます。近年、バイオ医薬品の品質を評価するにあたり、特性変化のリスク低減の観点から細胞基材の単クローン性の確保（単一細胞由来であること）が国内外で求められています。本稿では、細胞基材の単クローン性の評価の事例を中心に、染色体の不均一性を生じる細胞において導入遺伝子の染色体上の位置を特定可能な syFISH 解析技術の独自性および解析力を紹介します。

2 細胞基材の単クローン化の意義と FISH 解析 単独では評価困難な理由

バイオ医薬品生産のための細胞基材として、チャイニーズハムスターの卵母（CHO）細胞のような不死化細胞が用いられています。不死化細胞は、培養を続けることで遺伝子型や表現型などの不均一性が増加するため、バイオ医薬品を安定に生産するためには、細胞基材の不均一性を最小限に抑えることが重要です。細胞基材の樹立では、細胞の特性を均一にするために遺伝子導入後の細胞群に対してシングルセルクローニングを行い、細胞基材の単クローン性を確認します。近年、単クローン性を確認するためのイメージング機器も存在していますが、培養プレートのウェルの端での解像度の低下などにより、単クローン性を十分

に確認できないケースがあります。このような場合、樹立後の細胞基材に対して、規制当局から単クローン性に関する裏付けデータが求められます。

導入遺伝子が細胞のゲノムにランダムに挿入（ランダムインテグレーション）された場合、細胞基材の単クローン性は導入遺伝子の染色体上の位置を指標として評価することが可能です。導入遺伝子の染色体上の位置を可視化する方法として、FISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）解析があります。クローン化した細胞基材では導入遺伝子の位置は全ての細胞で同じとなり、FISH シグナルのパターンも解析した全ての細胞で同じになることが期待されます。しかし、ここで問題となるのが不均一性の増加です。CHO 細胞では培養期間の増加に伴い、欠失、重複、転座など、染色体レベルにおいても不均一性が増加します¹⁾。これは、たとえクローン化した細胞基材であっても、個々の細胞における染色体の構成は異なっている可能性があることを意味します。FISH 解析単独では染色体の構成を確認することができないため、異なる FISH シグナルのパターンを持つ細胞が認められた場合、以下の 2 つの可能性を区別することができず、単クローン性を評価することが困難です。

①単クローン性が確保されていない。

②単クローン性は確保されているが、染色体の不均一性の増加によって異なる FISH シグナルのパターンが得られた。

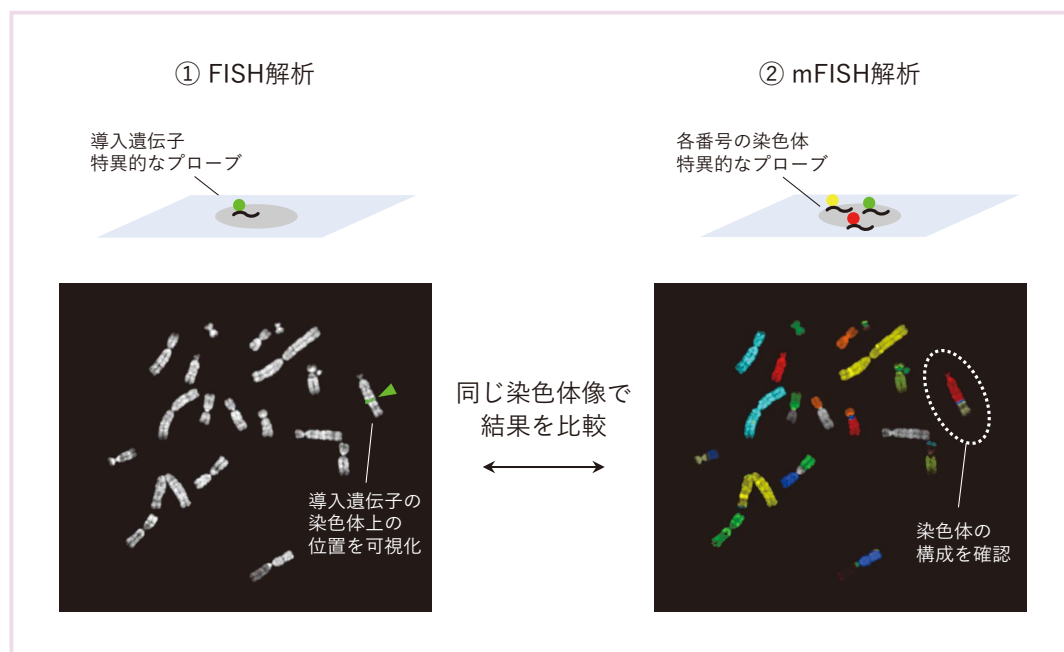


図1 導入遺伝子の染色体上での位置を特定可能にするsyFISH解析の原理

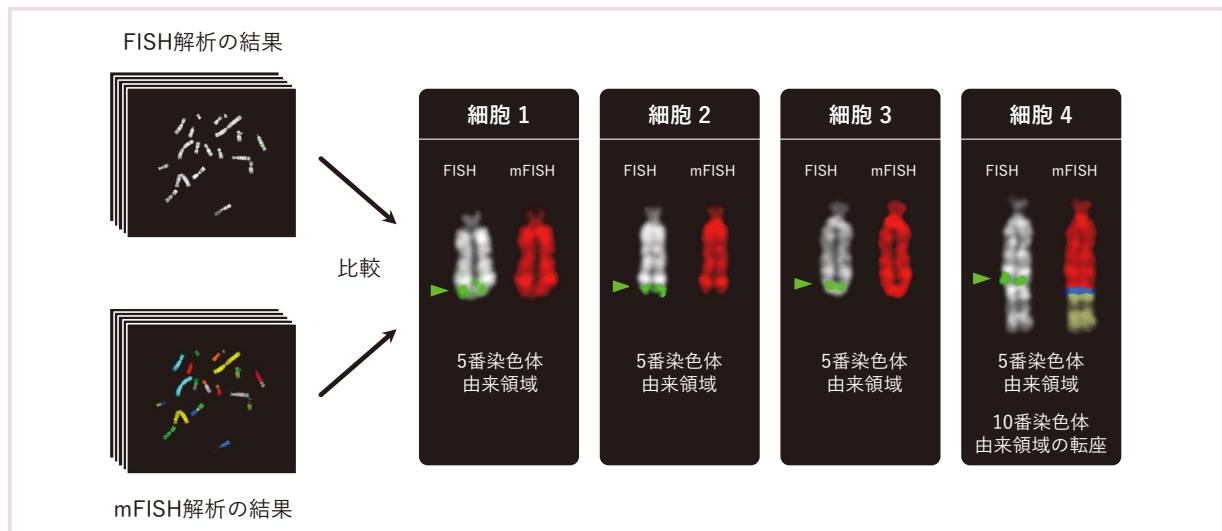


図2 syFISH解析による単クローン性の評価の流れ

3 導入遺伝子の染色体上での位置を特定可能にする syFISH 解析

syFISH 解析は染色体の不均一性に関わらず、導入遺伝子の染色体上の位置を体系的 (systematic) に特定することが可能な解析技術であり、米国 FDA の資料²⁾でも紹介された方法です。

syFISH 解析ではスライドグラス上の染色体像に対して以下の2種類の FISH 解析を連続的にを行います (図 1)。

- ①導入遺伝子に特異的なプローブを用いた FISH 解析
- ②各番号の染色体に特異的なプローブを用いたマルチカラー FISH (mFISH) 解析

①の FISH 解析で導入遺伝子の染色体上の位置を可視化し、②の mFISH 解析では染色体を番号ごとに異なる蛍光の組み合わせで染色することで、各染色体の構成を明らかにします。同じ染色体像で両者の結果を比較することで、導入遺伝子が位置する染色体の構成がわかり、何番の染色体に由来した領域に位置しているかという情報も同時に得ることができます。

4 syFISH 解析による細胞基材の単クローン性の評価の流れ

当社が実施している syFISH 解析による単クローン性の評価の流れを図 2 に示しました。各細胞の染色体像において、FISH 解析と mFISH 解析の結果を比較し、FISH シグナルの位置を特定します。図 2 の細胞 1、細胞 2 および細胞 3 では、FISH シグナルは同じ構成の染色体上の同じ位置 (赤色、5 番染色体由来領域) に存在していることがわかります。

細胞 4 のように、他の細胞と比較して異なる FISH シグナルのパターンを持つ細胞が認められた場合も同様に、mFISH 解析の結果から FISH シグナルの位置が特定可能です。細胞 4 の場合、FISH シグナルは他の細胞と同じく 5 番染色体由来領域 (赤色) に存在していることが明らかとなりました。また syFISH 解析

では染色体に生じた構造変化の考察が可能です。細胞 4 では他の細胞と比較して、10 番染色体由来領域 (鶯色) の転座が生じたことが推察されます。

このように FISH シグナルが観察された染色体の構成およびその位置を確認し、解析した全ての細胞において FISH シグナルの位置が同じであると判断された場合、細胞基材の単クローン性が確保されていると結論付けることができます³⁾。

5 おわりに

syFISH 解析は、単クローン性の評価技術の一つとして有効な手法であり、当社では本解析を信頼性基準対応試験で実施することが可能です。今後は、当社の豊富な分析ラインナップと組み合わせたサービスを提供し、お客様からの多彩なニーズにお応えし、課題解決に向け最大限に取り組んでまいります。

文 献

- 1) S. Vcelar, V. Jadhav, M. Melcher, N. Auer, A. Hrdina, R. Sagmeister, K. Heffner, A. Puklowski, M. Betenbaugh, T. Wenger, F. Leisch, M. Baumann, N. Borth : *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 165, (2018) .
- 2) R. Rawat : *Informa Life Sciences Annual Cell Line Development and Engineering Conference*, (2016)
- 3) 岸岡康博, 多田稔, 栗林亮佑, 堀内貴之, 高倉知朗, 山野-足立範子, 三崎亮, 石井純, 太田康勝, 大屋智資, 片山和彦, 川原彰人, 小山伸吾, 阪下日登志, 瀧村靖, 森本拓也, 中野歩希, 早水健二, 日向昌司, 村上聖, 内田和久, 大政健史, 石井明子 : *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, **25**, 10, (2023) .



山内 清司
(やまうち せいじ)
クロモセンター