

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15105

研究課題名（和文）抗体凝集体の可視化技術を利用した抗体産生細胞クローンの表現型不均一性の解明

研究課題名（英文）Evaluation of antibody-heterogeneity in CHO cells

研究代表者

千賀 由佳子（Senga, Yukako）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20758297

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗体医薬品の商業的利用の拡大に伴い、有効性と安全性の担保された医薬品の製造が求められている。しかし、細胞培養工程において、長期培養すると細胞の性質劣化が観察される。本研究では、細胞内での凝集体解析に最適な評価法を構築し、抗体高産生細胞の凝集体産生を指標に選別することを目的とする。申請者は、抗体凝集体を特異的に認識するペプチド（AF.2A1）を活用して抗体産生細胞を観察することにより、細胞内での抗体凝集体評価法を開発した。この方法により、細胞内における抗体凝集体のモニタリングや凝集体量の評価を行うことが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質である抗体医薬品は、不安定な巨大高分子（分子量15万程度）であるため、製造工程（細胞培養、精製、製剤化）中に劣化しやすく、抗体の凝集形成が問題視されている。しかし、細胞内での凝集体解析に関しては最適な評価方法がなく、細胞内の凝集体に焦点を当てた研究はこれまでに組み込まれていない。本研究の成果は、単量体から凝集体まで異常構造を有する抗体を特異的に検出することが可能であり、抗体医薬品分野の発展に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Biopharmaceuticals for the treatment of serious diseases, such as allergy, cancers, and autoimmune diseases, should be of high-quality to ensure efficacy and safety in their medical use. However, in the cell culture step, deterioration of cell properties is observed after long-term culture. The purpose of this study was to clarify the cause of the heterogeneity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. By observing CHO cells using a peptide (AF.2A1) that specifically recognizes antibody aggregates, we found that there was a large difference in the expression level of antibody aggregates even in the same cell population.

研究分野：分子生物学、蛋白質科学

キーワード：抗体医薬品 凝集化 CHO細胞 イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品の急速な需要拡大に伴い、有効性と安全性が担保された高品質・高効率な製造技術が求められている。タンパク質である抗体医薬品は、不安定な巨大高分子（分子量 15 万程度）であるため、製造工程（細胞培養、精製、製剤化）中に劣化しやすく、抗体の凝集形成が問題視されている。抗体の凝集体は、治療効果の減弱や重篤な有害事象を引き起こす。精製と製剤化工程における凝集体形成メカニズムや凝集抑制・凝集体除去に関しては、申請者のグループも含めて様々な研究が行われている。しかし、培養中の凝集体形成に関しては、メカニズム等の基礎的知見を含めた研究の実例が少ない。その理由は、培養液中には抗体分子以外にも様々な培地成分や宿主細胞由来のタンパク質が含まれており、そのような混雑状況下で抗体分子を特異的に評価することが困難であることが挙げられる。

2. 研究の目的

既にクローン化された抗体産生細胞株でさえ、1細胞レベルで解析すると凝集体を産生する細胞が存在していた。本申請研究では、質の良い安定した抗体産生細胞の取得を可能にするアイデアとして、細胞内での凝集体解析に最適な評価法を構築し、抗体高産生細胞の凝集体産生を指標に選別することを目的とする。それにより、純粋なエリート細胞集団（超高生産細胞）の取得に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識 AF. 2A1 の作製

細胞内の産生抗体と凝集体を蛍光で可視化するために、抗体の非天然型構造抗体に特異的な AF. 2A1 に Fluorescein 標識を行う。AF. 2A1 の特異性を確認するために、ヒト抗体を担体に結合させたセファロースを使用して、*in vitro* で非天然型構造抗体との結合を調べる。方法は、未処理または酸ストレスの IgG セファロースに、抗ヒト IgG 抗体 DL650 および AF. 2A1-F520 の 2 つのプローブと混合し、1 時間インキュベートする。その後、セファロース表面の抗体に結合しなかった蛍光タンパク質を取り除くために、洗浄し、蛍光顕微鏡により観察した。

(2) AF. 2A1 を活用した細胞内抗体凝集体の観察法の開発

細胞内抗体凝集体を観察するために、(1) で作製した AF. 2A1-F520 と細胞内で産生される抗体に特異的な蛍光標識抗体（抗ヒト IgG 抗体 DL650）をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞にトランスフェクションする条件検討を行う。最適なトランスフェクション条件を確立後、共焦点蛍光顕微鏡にて細胞内の抗体凝集体の局在観察に取り組む。

(3) 開発技術を用いた細胞内抗体凝集体量の推定

AF. 2A1-F520 を細胞の品質評価に利用できるのかを検討するために、トレハロース等の添加剤を処理した場合の細胞内凝集体発現量を比較する。(2) で最適化した方法で 2 種類の蛍光タンパク質をトランスフェクションし、共焦点蛍光顕微鏡で細胞の様子を観察する。細胞内抗体凝集体の総量は、 $[\text{抗ヒト IgG 抗体 DL650 (赤色) 蛍光強度}] / [\text{細胞の数}]$ で算出する。また、抗体凝集体の相対量は $[\text{AF. 2A1-F520 (緑色) 蛍光強度}] / [\text{抗ヒト IgG 抗体 DL650 (赤色) 蛍光強度}]$ で算出する。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識 AF. 2A1 の作製

抗体の非天然型構造抗体に特異的な AF. 2A1 に Fluorescein 標識を行い、AF. 2A1-F520 を作製した。CHO 細胞における細胞内抗体凝集体の観察前に、AF. 2A1 の結合特異性をインビトロで調べた。その結果、AF. 2A1-F520 は酸ストレスセファロースビーズに結合するが、天然のセファロースビーズには結合しなかった（図 1）。一方、Fluorescein の場合は結合が観察されなかった（図 1）。このことは、蛍光標識による抗体への非特異的な結合はないことを示唆している。

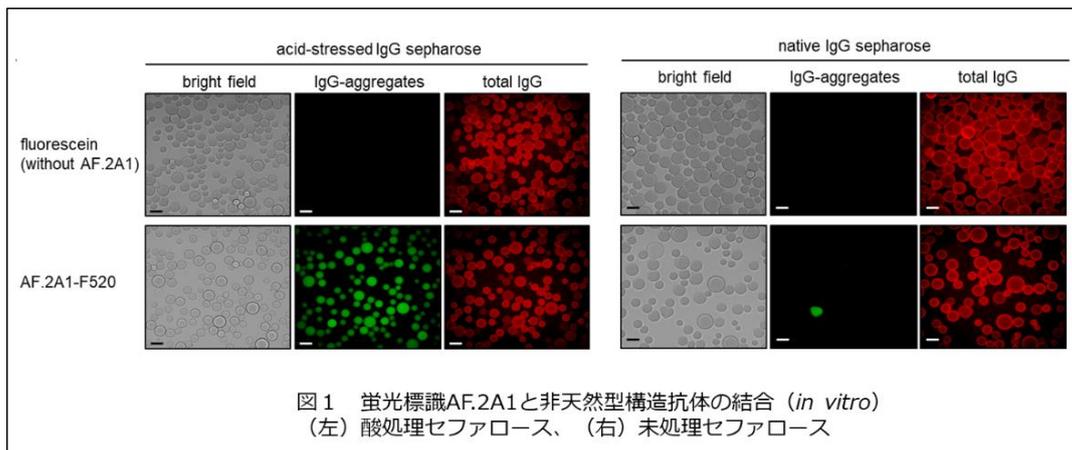


図1 蛍光標識AF.2A1と非天然型構造抗体の結合 (*in vitro*)
(左) 酸処理セファロース、(右) 未処理セファロース

(2) AF. 2A1 を活用した細胞内抗体凝集体の観察法の開発

細胞内抗体凝集体を観察するために、(1) で作製した AF. 2A1-F520 と細胞内で産生される抗体に特異的な蛍光標識抗体 (抗 IgG 抗体 DL650) をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞にトランスフェクションする条件検討を行った。その結果、導入するタンパク質量、時間を最適化することができた。最適なトランスフェクション条件を確立後、共焦点蛍光顕微鏡にて細胞内の抗体凝集体の局在観察を行った。抗 IgG 抗体 DL650 の場合、抗体生産細胞内の広い範囲で赤色の領域が観察された (図 2)。一方、AF. 2A1-F520 の場合は、強い緑色の輝点が複数観察され、数百 nm[~] 数 μ m の直径を有する粒子の細胞内形成が示唆された (図 2)。さらに、CHO-K1 細胞 (抗体を産生しない細胞) の場合、緑色の輝点および赤色蛍光は細胞内では観察されなかった。したがって、AF. 2A1-F520 は細胞内でも抗体凝集体に特異的に結合することが明らかになった。

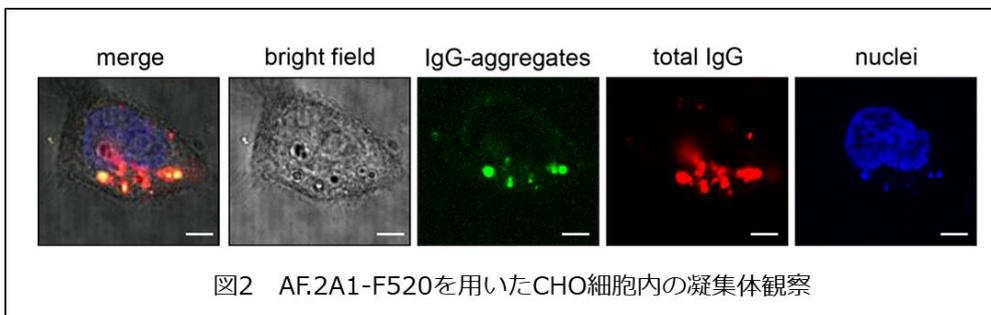


図2 AF.2A1-F520を用いたCHO細胞内の凝集体観察

(3) 開発技術を用いた細胞内抗体凝集体量の推定

AF. 2A1-F520 を細胞の品質評価に利用できるのかを検討するために、細胞内抗体凝集体量の推定を試みた。一般的に、培地に過剰な糖を添加すると、細胞に浸透圧ストレスが生じ、組換えタンパク質発現の状態が変化する。そこで、細胞内抗体凝集体量に対するトレハロース添加の効果を分析した。100 mM トレハロース存在下で培養した時と未添加の状態の細胞を観察し、画像解析によって凝集体量を推定した。その結果、細胞内の抗体総量は、トレハロースの存在下で半分に減少した。一方、抗体凝集体の相対量は少し増加していた。これらの結果は、過剰なトレハロースを培地に添加することによって誘導された浸透圧ストレスの抗体発現への影響を評価できていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Senga Yukako, Doi Motomichi, Onitsuka Masayoshi, Honda Shinya	4. 巻 29
2. 論文標題 Live-cell imaging to analyze intracellular aggregation of recombinant IgG in CHO cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 132.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.08.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Senga Yukako, Ogura Toshihiko, Imamura Hiroshi, Honda Shinya	4. 巻 2313
2. 論文標題 Nano-Microscopy of Therapeutic Antibody Aggregates in Solution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 219 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1450-1_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安澤 葉介、渋谷 理紗、宮房 孝光、千賀 由佳子、本田 真也
2. 発表標題 主鎖環状化したG-CSFの環状化部分の長さの違いが熱安定性と細胞増殖活性に及ぼす影響について
3. 学会等名 第10回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安澤 葉介、渋谷 理紗、宮房 孝光、千賀 由佳子、本田 真也
2. 発表標題 環状G-CSFの環状化部分の長さの違いが熱安定性 (物性) に及ぼす影響を予測構造から考察する
3. 学会等名 第11回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------