

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04794

研究課題名（和文）バイオ医薬品生産細胞における老化現象の解明と制御

研究課題名（英文）Elucidation and control of the aging in biopharmaceutical production cells

研究代表者

鬼塚 正義（ONITSUKA, Masayoshi）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・講師

研究者番号：80571174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本課題ではIgG1抗体を生産する組換えCHO細胞を用いた長期間の連続培養を実施し、老化関連酵素と生産抗体品質の関連性の解明を目指した。酵素GLB1とその関連制御因子をCHO細胞で過剰発現させたが、活性変化は認められなかった。老化現象と抗体品質の関連性については、今後、継続的な研究、検証が必要である。一方、長期間の連続培養では、培養条件の変化に応じてIgG1抗体の末端ガラクトシル化量が大きく変動した。解析の結果、N-型糖鎖構造の末端ガラクトース付加量が大きく向上する培養条件を見出した。本成果は抗体医薬品の実生産に応用することで、高い抗腫瘍活性を持つ抗体医薬品を生産できることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体などのタンパク質医薬品は生産に用いる細胞や培養条件によって大きく変動するため、医薬品として最も重要視される「品質」のコントロールが難しい。近年、バイオ医薬品の品質を考えるうえで「クオリティ・バイ・デザイン（QbD）」という概念が着目されている。本研究は応用・実用を想定した基礎研究として、細胞培養条件と抗体医薬品の品質の関連性の解明に取り組んだ。連続培養を用いて培養条件を適切にコントロールする手法を考案し、重要品質特性の1つである糖鎖構造について品質向上の培養条件を同定した。これらの成果は「クオリティ・バイ・デザイン（QbD）」の実現に向けて大きな意義があると評価している。

研究成果の概要（英文）：In this study, recombinant CHO cells producing IgG1 antibodies were cultured continuously for an extended period of time to elucidate the relationship between aging-related enzymes and antibody quality. GLB1 and its related regulators were overexpressed in CHO cells and no changes in activity were observed. Continued research and verification of the relationship between senescence and antibody quality are necessary. On the other hand, in long-term continuous culture, the amount of terminal galactosylation of IgG1 antibody fluctuated wildly in response to changes in the culture conditions. Our analysis revealed the culture conditions under which the terminal galactosylation of the N-glycan structure was primarily enhanced. This result is expected to be useful for producing recombinant antibodies with high anti-tumor activity.

研究分野：細胞・バイオプロセス工学

キーワード：抗体医薬品 CHO細胞 抗体品質制御 バイオプロセス N型糖鎖 連続培養

1. 研究開始当初の背景

組換えバイオ医薬品の生産には動物細胞が汎用されている。現在、バイオ医薬品の生産技術は大きな転換点を迎えており、従来の流加培養法から連続培養(灌流培養)法への移行のための技術開発が進んでいる。連続培養では小規模な培養槽でも大規模な培養槽と同じ生産能力を実現することが出来るため、連続培養技術の開発は産業的に極めて重要な技術トピックスとなっている。連続培養の装置開発は進む一方、主役である生産細胞の理解や制御は十分ではなく、学術的な基礎研究が急務である。研究代表者は IgG1 抗体を生産するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の連続培養による長期培養を実施した結果、細胞の老化マーカーとして広く知られている α -ガラクトシダーゼ活性が培養経過とともに増加し、同時に抗体の N-型糖鎖のガラクトース付加量が減少することを見出した。すなわち連続培養中では生産細胞の老化現象が生じ、抗体医薬品の品質が劣化する可能性が示された。ヒトでは加齢、老化により血中抗体のガラクトース付加量が減少することは古くから知られており、また実験動物にガラクトース単糖を投与し老化モデル動物とする手法も確立されていることから、体内ガラクトース量やガラクトシダーゼ活性と細胞老化との関連性が広く認められている。一方で細胞内のガラクトシダーゼ活性発現機構は複雑である。 α -ガラクトシダーゼ(GLB1)、ノイラミダーゼ1(NEU1)、カテプシンA(CTSA)の各タンパク質因子は複合体を形成し、各因子の酵素活性は互いに制御しあう関係性にある。しかしヒトでさえ GLB1/NEU1/CTSA の各因子による活性制御機構は十分に理解されておらず、「バイオ医薬品生産細胞でガラクトシダーゼ活性発現はどのような制御をうけているのか」という新しく見出された「問い」を解決する必要があった。

2. 研究の目的

本研究は IgG1 抗体を生産する CHO 細胞株を用いて、連続培養中に生じる生産細胞の老化現象を解明し、生産抗体の品質劣化を抑制する手法の確立を目指した。培養中に増加するガラクトシダーゼ活性は、細胞の老化マーカーとして知られている。即ちガラクトシダーゼ活性の発現機構を解明し、制御することが出来れば、抗体医薬品生産細胞の老化現象や品質劣化を防ぐことが出来る可能性がある。具体的な目的として2点を設定した。

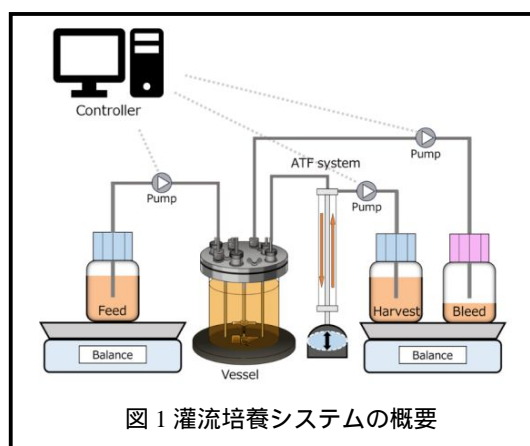
(1) ガラクトシダーゼ活性発現機構における GLB1, NEU1, CTSA の各タンパク質因子を細胞に共導入・過剰発現させ、活性発現を検証した。

(2) IgG1 抗体生産細胞株の長期間連続培養を実施し、培養条件を変動させた際に生じる N-型糖鎖のガラクトース付加量の変動を解析した。

3. 研究の方法

(1) IgG1 抗体生産 CHO 細胞株に対して、GLB1, NEU1, CTSA 各因子の過剰発現実験を実施した。各因子の発現遺伝子を調製し、単独、または共導入により過剰発現し、抗体糖鎖とガラクトシダーゼ活性への影響を評価した。CHO 細胞への遺伝子導入と評価には、研究代表者が開発した遺伝子迅速評価プラットフォームを用いた。抗体の糖鎖構造は Fc レセプターアフィニティークロマトグラフィーにより解析した。

(2) 灌流培養システム(図1)を用いて、組換え IgG1 抗体を生産する CHO 細胞を培養した。ポンプにより培養液を Alternating Tangential Flow Filtration(ATF システム)へと送り込み、培養上清と細胞に分離し、透過した培養液のみを回収できる。培地供給量及び培養液引抜量は電子天秤によって管理されており、フィードコントローラーがポンプを制御することにより、培地供給量と引抜量が同じになる。灌流培養では連続的な培地交換・生細胞数制御により、設定した培養条件を安定に制御することが可能である。実験では培養温度・培養 pH・溶存酸素濃度・攪拌速度・培地交換量(栄養源・老廃物濃度に相当)等の各種培養パラメーターを変数とした条件を設定し、60



日程度の長期灌流培養を複数回実施した。培養液中の抗体生産濃度はバイオレイヤー干渉法により測定した。また培養液から Protein A クロマトグラフィーを用いた抗体精製を行い、サイズ排除クロマトグラフィー、Fc レセプターアフィニティークロマトグラフィーにより、抗体の凝集体量や抗体糖鎖構造(Fc レセプターへの結合能)等の重要品質特性を分析した。

4. 研究成果

(1) GLB1, NEU1, CTSA の各因子の過剰発現は、キャピラリー電気泳動システムにより確認できた。GLB1 単独と共発現 (GLB1+NEU1, GLB1+CTSA, GLB1+ NEU1+ CTSA) の細胞内可溶性成分をガラクトシダーゼ活性により検証した結果、共発現と GLB1 の間に有意な活性変化は認められなかった。更に分泌発現させた組換え IgG1 抗体の N-型糖鎖構造を分析した結果、末端ガラクトース付加量は変化しなかった。これらの結果から、CHO 細胞の培養中に生じる N-型糖鎖のガラクトシル化の変化においては、 β -ガラクトシダーゼ GLB1 とその制御因子が関与しないこと、または本研究では検証しなかった他の制御要因が関わっている可能性が示唆された。

(2) 灌流培養で回収した IgG1 抗体について、HPLC を用いて各種の分析を行った。抗体分子サイズの解析より、灌流開始後に凝集化抗体量は低減し、通常の培養法である流加培養 (Fed-batch) と比較して低い凝集化抗体量 (HMWS: high molecular weight species) を維持した (図 2)。この結果は、凝集性の高い抗体においては、灌流培養で生産することで品質特性の優れた抗体を生産できる可能性が示された。

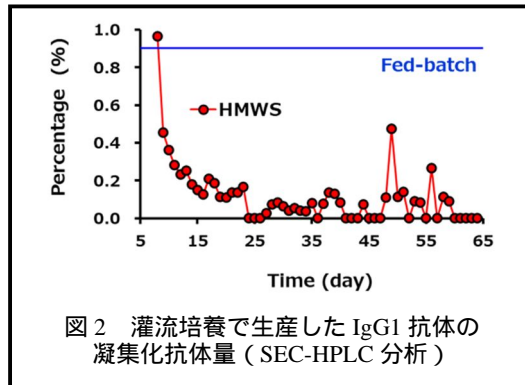


図 2 灌流培養で生産した IgG1 抗体の凝集化抗体量 (SEC-HPLC 分析)

引き続き、抗体 Fc 領域の N 型糖鎖構造を解析した。抗体の N-型糖鎖構造は、抗がん治療の細胞障害活性と深く関連している重要品質特性である。結果、培養条件の変化に応じて末端ガラクトシル化量が大きく変動し、1 日あたりの累積生細胞数と N 型糖鎖末端ガラクトシル化割合に相関性が見出された (図 3)。この結果より、細胞増殖性が高い状態の培養では、細胞障害活性の高い IgG1 抗体が産生されることが示された。さらに複数回の灌流培養全てのデータを用いて解析した結果、細胞増殖性に続く第 2 の要因として、培養液中のアンモニウムイオン濃度が高い場合に末端ガラクトシル化レベルが低減することが明らかになった。

図 3(A) 抗体の N 型糖鎖構造。抗体 N-型糖鎖は不均一性を持ち、糖鎖構造により細胞障害活性が変化する。

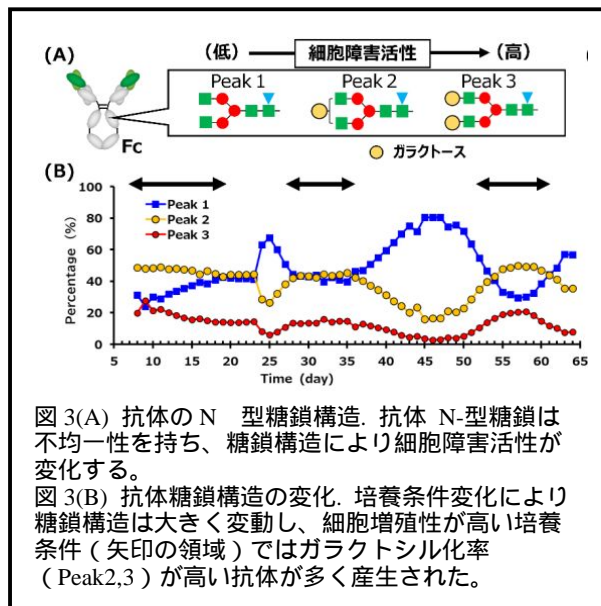


図 3(B) 抗体糖鎖構造の変化。培養条件変化により糖鎖構造は大きく変動し、細胞増殖性が高い培養条件 (矢印の領域) ではガラクトシル化率 (Peak 2,3) が高い抗体が多く産生された。

最後に、全ての灌流培養実験で設定した約 20 種の培養条件変化に対し、IgG1 抗体生産量を解析・評価した結果、抗体生産量が高くなる培養条件が導出された。導出した培養条件の有効性を検証するため、流加培養 (Fed-batch) による培養比較を行った結果、通常の培養条件 (スタンダード) と比較して、最適化した培養条件では抗体生産量が約 39% 増加した。また IgG1 抗体の N-糖鎖構造を評価した結果、導出した培養条件では、高い細胞障害活性を示す糖鎖構造をもつ抗体量が増加した。

成果の総括として、当初に策定した作業仮説である「老化現象・ガラクトシダーゼ活性と抗体品質劣化の関連性」については残念ながら関連性を示すデータが得られなかった。しかし本来の目的である「抗体品質の高度化」については、灌流培養で導出した培養条件を用いることで抗体生産量と品質 (N-型糖鎖構造) が同時に向上していることから、抗体生産バイオプロセスを高度化することに成功したと言える。抗体などのタンパク質医薬品は生産に用いる細胞や培養条件によって大きく変動するため、医薬品として最も重要視される「品質」のコントロールが難しい。近年、バイオ医薬品の品質を考えるうえで「クオリティ・バイ・デザイン (QbD)」という概念が着目されている。本研究は応用・実用を想定した基礎研究として、細胞培養条件と抗体医薬品の品質の関連性の解明に取り組んだ。連続培養を用いて培養条件を適切にコントロールする手法を考案したこと、重要品質特性の 1 つである糖鎖構造について品質向上の培養条件を同定した。これらの成果は「クオリティ・バイ・デザイン (QbD)」の実現に向けて大きな意義があると評価している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡本棟悦, 樋口拓哉, 鈴木真史, 奥谷聡志, 鬼塚正義
2. 発表標題 CHO細胞灌流培養における組換えIgG1抗体特性の動的変化解析
3. 学会等名 第74回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福間奈々子, 山内清司, 田地野浩司, 鬼塚正義
2. 発表標題 高機能化因子を利用した組換えCHO細胞の高度化
3. 学会等名 第74回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼塚正義, 平田結風, 天羽宏枝
2. 発表標題 CHO細胞を用いた組換え抗体生産に有効な高機能化因子の探索
3. 学会等名 第74回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本棟悦, 加藤宏明, 天羽宏枝, 鬼塚正義
2. 発表標題 細胞培養プロセスにおける抗体品質制御への灌流培養の応用
3. 学会等名 第1回日本抗体学会設立記念 学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福間奈々子, 天羽宏枝, 伊藤洋一郎, 石井純, 近藤昭彦, 梅津光央, 鬼塚正義
2. 発表標題 動物細胞を利用したタンデム型二重特異性 scFv 抗体の製造適合性評価
3. 学会等名 第1回日本抗体学会設立記念 学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤優花, 岡本棟悦, 本田真也, 鬼塚正義
2. 発表標題 CHO細胞培養における非天然構造抗体の分泌現象の解析
3. 学会等名 日本生物工学会大会西日本支部大会 第6回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼塚正義
2. 発表標題 動物細胞培養プロセスにおけるタンパク質・抗体医薬品の凝集形成と制御
3. 学会等名 サイエンス&テクノロジー社セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本棟悦, 加藤宏明, 渋谷啓介, 鬼塚正義
2. 発表標題 灌流培養法を利用した抗体生産バイオプロセスの高度化
3. 学会等名 第75回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Muneyoshi Okamoto, Hiroaki Kato, Keisuke Shibuya, Hiroe Amo, Masayoshi Onitsuka
2. 発表標題 Assessing the Impact of Cell Culture Condition on Recombinant Antibody Production in CHO Perfusion Culture
3. 学会等名 The 36th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鬼塚正義
2. 発表標題 組換え抗体生産アップストリームプロセスの課題と今後
3. 学会等名 第75回 日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masayoshi Onitsuka
2. 発表標題 Non-Natively Structured Antibodies in CHO bioprocessing
3. 学会等名 The 36th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 本田二葉、荒戸照世、新見伸吾、岡村元義、尾山和信、平澤竜太郎、福原彩乃、緒方法親、松田朋子、鬼塚正義、日向昌司、西澤翔、石井敏弘、伊達観美、入澤朗	4. 発行年 2022年
2. 出版社 サイエンス&テクノロジー	5. 総ページ数 209
3. 書名 バイオ医薬品の製剤安定化/高品質化のための不純物の規格設定と評価・管理手法	

1. 著者名 大政健史、堀内貴之、森ゆうこ、本田真也、城慎二、鳥巢哲生、内山進、鬼塚正義、須澤敏行、山本修一、生田目哲志、松田博行、上根祐、岡村元義、田中大佑、立花浩司	4. 発行年 2022年
2. 出版社 CMCリサーチ	5. 総ページ数 192
3. 書名 抗体医薬品製造 ~ 基礎から基盤技術開発まで ~	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 遺伝子改変CHO細胞	発明者 鬼塚正義	権利者 徳島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-015195	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>バイオ医薬品の生産プラットフォーム開発 https://www.bb.tokushima-u.ac.jp/app/wp-content/uploads/2022/04/87f3c2263b175e0165bcf57c8e4a18bc.pdf</p>

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
---------	---------