

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05240

研究課題名(和文) 低生産性抗がん剤パクリタキセルの高効率培養プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of efficient culture process of paclitaxel with low productivity

研究代表者

山本 進二郎 (YamamotoYamamoto, Shinjiro)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：40262307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：疎水性イオン液体を用いる二相系培養によりパクリタキセル(PTX)生合成が向上する知見を得ていたことから、イオン液体の添加量を増加する実験を行い、細胞増殖量とPTX生産量を増加させることに成功した。また、イオン液体を新鮮なものと交換する培養によってPTX生産性を高めることができ、PTX前駆体を含むタキサン類の生産性も向上できた。イオン液体に代わる媒体として疎水性固体を利用する二相系培養も行い、ポリテトラフルオロエチレンやポリプロピレンがパクリタキセルを効果的に吸着し、ポリプロピレンがPTX生産性を向上させることができた。疎水性媒体を利用する新たな培養プロセスを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、安全で高効率なパクリタキセルの培養生産プロセスの開発を目指した。疎水性媒体を利用する二相培養系を構築することによって、フィードバック阻害を持つパクリタキセルを疎水性媒体に移動させ、パクリタキセルを効果的に生産させることができた。さらに、疎水性イオン液体を適度な頻度で交換することによってパクリタキセルを飛躍的に培養生産でき、工業的生産の可能性も示唆された。疎水性媒体を利用する二相培養系のバイオプロセスの構築によって高価なパクリタキセルを安価に生産できる可能性も見出されたことから、本研究で得られた研究成果は社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on our previously obtained data that paclitaxel(PTX) biosynthesis was improved by two-phase culture system using hydrophobic ionic liquids, experiments were conducted to increase the amount of ionic liquid added, and cell growth and PTX production were successfully increased. In addition, PTX productivity could be increased by replacing the ionic liquid with a fresh one in the culture, and the productivity of taxanes containing PTX precursors could also be improved. A two-phase culture system using hydrophobic solids as an alternative medium to ionic liquids was also performed, where polytetrafluoroethylene and polypropylene effectively adsorbed paclitaxel, and polypropylene enhanced PTX productivity. A new culture process utilizing hydrophobic media was proposed.

研究分野：生物工学

キーワード：植物細胞培養 二相培養系 パクリタキセル 疎水性イオン液体 疎水性媒体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パクリタキセルは、様々ながんの治療に使われている抗がん剤であり、その将来的な需要は極めて大きい。パクリタキセルの主な製造法は、イチイ (*Taxus*) の葉に含まれるタキサン類のパクリタキセル前駆体を初発物質として、劇物指定の多種の有機溶媒を用いて多段の反応を経て合成される“半合成法”である。しかし、葉中の前駆体含量は大きくないため、十分量のパクリタキセルを製造するためには多量の葉を必要とすること、半合成法でのパクリタキセル合成収率が低いことなどからパクリタキセルは高価な薬剤である。パクリタキセルの安心安価な生産技術の開発は、患者の QOL (生活の質) の向上や今後の需要増への対応として極めて重要である。近年、資源やエネルギー使用量を抑制する持続可能な生産技術の開発が期待され、植物組織片から容易に誘導できるカルス(植物培養細胞)を利用する培養技術が再評価されている。しかし、植物細胞は、増殖速度や生産物生産性が小さい上にパクリタキセルのフィードバック阻害を受け、これらを解決することが重要な課題となっている。パクリタキセルの疎水性に着目して疎水性有機溶媒を利用する *in situ* 分離法が報告され、応募者は、パクリタキセル抽出には logP 値が大きい疎水性有機溶媒が有効で、疎水性イオン液体は極めて有用であることを報告している。また、疎水性固体もパクリタキセル生産の向上に有効と考えている。

2. 研究の目的

タキサン類のパクリタキセルは疎水性溶媒に溶けやすい性質を持つ。疎水性イオン液体はパクリタキセルを選択的に抽出すると同時にフィードバック阻害を取り除くことができる。イオン液体を利用する二相培養系において、イオン液体の添加量や交換頻度などを検討し、パクリタキセルを効率的に生産する培養プロセスの構築を目指す。さらに、疎水性固体を用いる二相培養系も検討し、細胞増殖とパクリタキセル生産に有効な疎水性固体を見出す。これらの実験的な検討から、本研究は、安全で高効率なパクリタキセル培養生産プロセスの開発を目指している。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖とパクリタキセル生産に及ぼすイオン液体添加量の影響

細胞は、崇城大学に植樹したイチイの葉から誘導したカルスを用いた。培地は、所定濃度の植物ホルモンとショ糖を含むガンボルグの B5 改変培地を用いた。イオン液体は、脂肪族系の 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium Bis(trifluoromethanesulfonyl)imide (P14TFSI) を、培地量に対して 0.5% を培養に添加した。培養は、所定量のイオン液体と培地を含む 100 mL 容三角フラスコに、前培養した細胞を播種し、100 rpm の回転培養機で 1 週間行った。培養温度は 26 とした。培養後、細胞量を重量測定法で、パクリタキセルは HPLC を使って分析した。

イオン液体の添加量を変える二相培養系の実験を行い、イオン液体の最適添加量を検討した。

(2) エリシターを含むイオン液体-培地二相培養系における細胞増殖とパクリタキセル生産

エリシターは、二次代謝産物のパクリタキセルの生産性を向上する。パクリタキセル生産量のさらなる増加を目指し、エリシターの添加濃度の影響を検討した。エリシターとしてはジャスモン酸メチル (MJ) を利用し、濃度は 1 mM とした。培養は、実験 1 と同様な方法で行った。

(3) 細胞増殖とパクリタキセルを含むタキサン類生産に及ぼすイオン液体の交換頻度の影響

イオン液体を含む二相培養系において、培養中のイオン液体には飽和状態のパクリタキセルが溶解しているため、フィードバック阻害作用をもつパクリタキセルの持続的な抽出効果は期待できない。そこで、使用済みのイオン液体を新鮮なものと交換する培養を行い、パクリタキセルの生産性のさらなる向上を目指した。培養は実験 1 と同様な方法で行った。イオン液体の交換は、培養 1 週間の中で次のように行った。

交換 0 回：イオン液体の入れただけで交換無し (図 4~7 では 0 と記す)

交換 1 回：イオン液体を培養 4 日後に 1 回交換 (図 4~7 では 1 と記す)

交換 2 回：イオン液体を培養 3、6 日後に計 2 回交換 (図 4~7 では 2 と記す)

交換 3 回：イオン液体を培養 2、4、6 日後に計 3 回交換 (図 4~7 では 3 と記す)

(4) イオン液体のエリシターの要素の検討

イオン液体は、パクリタキセルを含むタキサン類の生産性を向上させることがわかっており、抽出だけではなくイオン液体自身にエリシターの要素があることが考察された。イオン液体が酸化ストレスとなってエリシターの的に細胞活性を向上させていることが想定される。イオン液体を含む二相培養系で得られた細胞や培養液に関して、酸化ストレスの指標となる活性酸素種 (Reactive oxygen species ; ROS) を培養時に測定し、ROS とイオン液体添加との関係を検討した。ROS は、2,7-ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA) を利用する蛍光分析法で分析した。ROS によって DCFH-DA が蛍光型の DCFH に変換し、この蛍光を 546 nm で測定した。

(5) イオン液体の最適交換頻度下におけるエリシターの添加効果の検討

上記の最適なイオン液体交換頻度において、よりパクリタキセル生産性を向上させるために、最適な MJ 添加濃度を検討した。このような MJ 添加培養では、疎水的な MJ とイオン液体によって協同的な細胞活性化が誘導され、パクリタキセルのさらなる生産性の向上が期待できる。

(6) 疎水性固体を用いる二相培養系における細胞増殖とパクリタキセル生産

イオン液体に代わる媒体として疎水性固体を検討した。疎水性固体は市販の次の 4 つを利用した。臨界面張力が小さい疎水性固体ほど疎水性が強い。吸着や培養での各添加量は、固液接触面積が 0.00142 m²となるようにした。XAD-4 は 10 mg を用いた。

疎水性担体	略称	直径 [mm]	臨界面張力 [mN/m]
ポリテトラフルオロエチレン	PTFE	3	18
ポリプロピレン	PP	3	22
ポリエチレン	PE	3	31
イオン交換樹脂	XAD-4	0.16	33

所定濃度のパクリタキセルを溶解する溶液に疎水性固体を入れ、溶液中のパクリタキセル濃度を経時的に測定し、疎水性固体への吸着速度定数 k を次式を使って求めた。

$$dc/dt = k(c_0 - c) \quad (1)$$

c : 溶液中パクリタキセル濃度 [mg/L]、 c_0 : 溶液中の初期パクリタキセル濃度 [mg/L]、

t : 時間 [min]、 k : 吸着速度定数 [1/min]

所定量の培地を含む 100mL 三角フラスコに、疎水性固体と細胞を入れて培養を開始し、1 週間後に細胞量とパクリタキセル濃度を測定した。

(7) 新規培養プロセスの構築

以上の実験から抗がん剤パクリタキセル生産に適したバイオリアクターを考案し、新規培養プロセスを検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖とパクリタキセル生産に及ぼすイオン液体添加量の影響

図 1 には、パクリタキセル生産に及ぼすイオン液体添加量の影響を示す。イオン液体添加量の増加とともにパクリタキセル生産量が増加し、イオン液体添加量の増加がパクリタキセル生産に有効であることがわかった。

細胞増殖に及ぼすイオン液体添加量の影響を図 2 示す。細胞増殖は、イオン液体無添加 (コントロール) に比べイオン液体 2.5% では低下し、10% では増加した。イオン液体 2.5% での細胞増殖の低下は、培地中パクリタキセル濃度がコントロールよりも高く、パクリタキセルのフィードバック阻害が生じたためである。イオン液体 10% での細胞増殖の増加は、培地中パクリタキセル濃度がコントロールよりも低く、パクリタキセルのフィードバック阻害が軽減されたためと考えられる。

(2) エリシターを含むイオン液体-培地二相培養系における細胞増殖とパクリタキセル生産

イオン液体を含む二相培養系にジャスモン酸メチル (MJ) を添加する培養を行い、パクリタキセル生産に及ぼす MJ の影響を調べた。コントロールとの生産量を比べるため、各条件のパクリタキセル生産量をコントロールのそれで割ったパクリタキセル生産量比 (E_p) を求めた。この生産量比と MJ 添加との関係を図 3 に示す。MJ を含む培養のパクリタキセル生産量は、MJ 無添加に比べ増加し、イオン液体添加量の増加とともに大きくなり、MJ 添加がパクリタキセル生産量向上に寄与することが認められた。

(3) 細胞増殖とパクリタキセルを含むタキサン類生産に及ぼすイオン液体の交換頻度の影響

上記の実験から細胞増殖やパクリタキセル生産に対し

て有効なイオン液体添加量は 10% であるが、イオン液体を交換する培養であれば、初期のイオン液体添加量は少なくとも良いと判断し、本実験ではイオン液体量を 2.5% とした。細胞増殖に及ぼすイオン液体の交換頻度の影響を図 4 に示す。交換頻度を大きくすることによって細胞増殖が向上することが観察された。これはイオン液体に融解したパクリタキセルが除かれ、このフィードバック阻害が軽減されたためである。しかし、3 回のイオン液体交換では低下する現象が見られ、これは増殖に必要なコンディショニング因子 (増殖に必須であるが、未確認の物質) がイオン液体によって除かれたためであり、イオン液体の交換頻度は 2 回が良好であることがわかった。図 5 には、イオン液体交換頻度とパクリタキセル生産量との関係を示す。

イオン液体の交換頻度を大きくすることによってパクリタキセル生産量が増加し、交換頻度 2 回において最大となり、これ以上では低下する現象が観察された。増殖と同様に、交換頻度の増加とともにパクリタキセルがイオン液体によって除かれたため、パクリタキセル生産量が増加するが、3 回以上の交換頻度ではコンディショニング因子の減少によりパクリタキセル生産も低下したと考えられる。効率的な細胞増殖とパクリタキセル生産には適度な交換頻度があり、本研

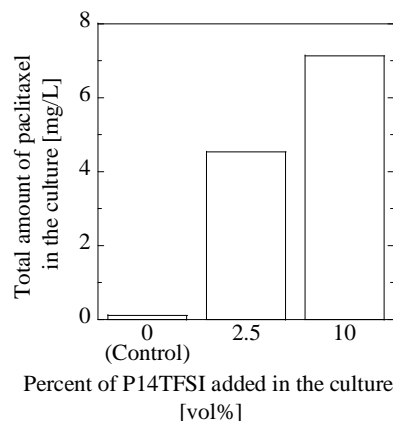


図 1 パクリタキセル生産に及ぼすイオン液体添加量の影響

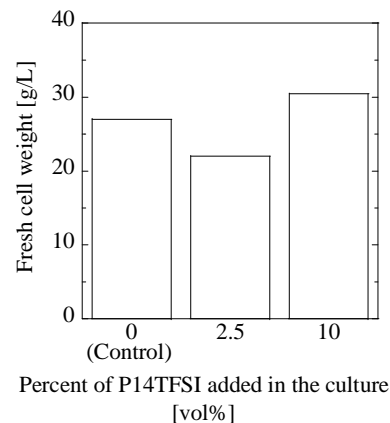


図 2 細胞増殖に及ぼすイオン液体添加量の影響

究では2回が最も効果的であることがわかった。

(4) イオン液体のエリシター的要素の検討

図6には、イオン液体交換頻度とROS(蛍光量)の関係を示す。イオン液体の交換頻度が低い場合はコントロールと同等であったが、交換頻度が大きいとROS発生量が増加する傾向が示された。イオン液体を新鮮なものに交換するとROSが増加し、酸化ストレスを細胞に与えていることがわかる。このストレスに対抗するように細胞活性が向上し、すなわちエリシター的に細胞に作用し、二次代謝産物のパクリタキセルの生産性が増加したと考えられる。イオン液体交換頻度が3回ではROS発生量の減少が見られ、これは上述したように、コンディショニング因子の減少に伴って細胞活性が低下したためと考えられる。

パクリタキセルを含むタキサン類の生産に及ぼすイオン液体交換の影響も検討し、その結果を図7に示す。イオン液体交換頻度の増加に従ってタキサン類生産量の増加が観察された。タキサン類もイオン液体に回収されたため、タキサン類の生産量が増加したと考えられる。イオン液体を3回交換するとタキサン類生産量は低下したが、これは、上記で考察したようにコンディショニング因子が除かれたためと考えられる。

(5) イオン液体の最適交換頻度下におけるエリシターの添加効果の検討

上記実験から最適イオン液体交換頻度は2回であった。この培養条件において、パクリタキセル生産性のさらなる向上を目指し、エリシターのMJを添加する培養を行い、最適なMJの添加濃度を検討した。図8には、細胞増殖に及ぼすMJ濃度の影響を示す。細胞増殖はMJ添加濃度によって増加し、1 μ Mで最大となった後は減少し、コントロールと同等となった。パクリタキセル生産に及ぼすMJ濃度の影響を同図に示すが、パクリタキセル生産も細胞増殖と同様な傾向が見られ、1 μ Mが最も有効であり、この時のパクリタキセル生産量はコントロールに比べ倍以上であった。イオン液体にMJを溶解させると相乗的にパクリタキセル生産を向上できることが明らかとなった。100 μ M以上のMJではパクリタキセルの生産はほぼ無くなることが観察された。高濃度MJはパクリタキセル生産を阻害することが知られ、本研究で用いた細胞は、MG濃度10 μ Mで阻害を受け、100 μ M以上では極めて強く阻害を受けることがわかった。

イオン液体からのパクリタキセルの逆抽出が重要であり、様々な有機溶媒を検討したが、有効なものが見つからず今後の研究課題として残された。

(6) 疎水性固体を用いる二相培養系における細胞増殖とパクリタキセル生産

疎水性固体へのパクリタキセルの吸着特性を調べたところ、数分の内にパクリタキセルの半分以上が固体に吸着することが観察され、固体へのパクリタキセルの吸着速度はかなり大きいことがわかり、各疎水性固体のそれぞれのパクリタキセル吸着速度定数を求めた。臨界面張力の減少とともに吸着速度定数が増加する傾向が見られ、疎水性の高い固体ほどパクリタキセルを吸着しやすいことが明らかとなった。なお、大きな臨界面張力をもつXAD-4の吸着速度定数は大きな値となったが、今回利用したXAD-4の粒径が他と比べて極めて小さく、気液接触面積が大きかったためである。

図9には、細胞増殖率・パクリタキセル生産量と疎水性固体との関係を示す。細胞増殖率とは、培養後の各

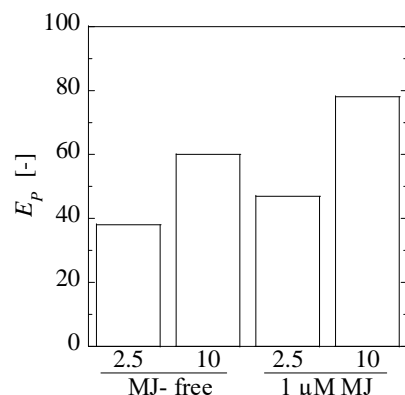


図3 パクリタキセル生産量に及ぼす MJ 濃度の影響

図4 イオン液体交換頻度と増殖との関係

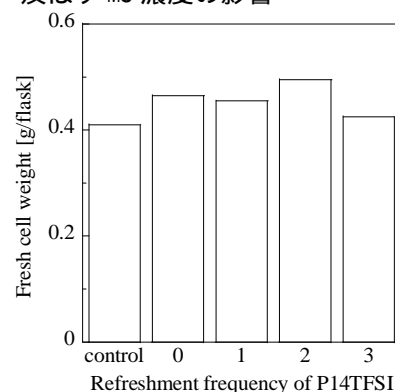


図5 イオン液体交換頻度とパクリタキセル生産量との関係

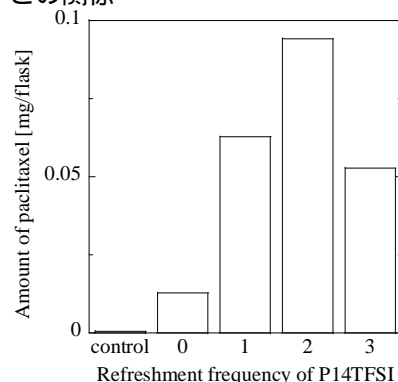


図6 イオン液体交換頻度と ROS 発生量との関係

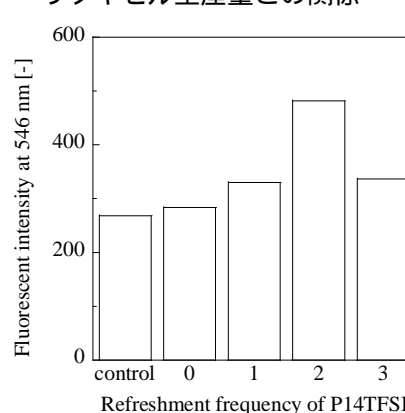


図7 細胞増殖率・パクリタキセル生産量と疎水性固体との関係を示す。細胞増殖率とは、培養後の各

条件の細胞量を播種細胞量で割ったものである。細胞増殖は、PP や XAD-4 がコントロールと同等であった。生産されたパクリタキセルがこれらの固体に吸着し、フィードバック阻害が軽減されたためと考えられる。PTFE と PE はコントロールに比べ低下する結果が得られた。PTFE は、培地より密度が大きく、培養時は三角フラスコの底にたまっていた。振盪に伴ってPTFEは移動し、PTFE の間に挟まれた細胞が振盪によって摩擦し死滅したために、細胞量が低下した。PE 使用時の低い細胞増殖率は、今のところ不明で、今後の検討課題として残された。

コントロールと比べてパクリタキセル生産量は PP が最も高く、これ以外の疎水性固体は低くなった。PP は、細胞増殖と同様に、パクリタキセルを吸着したためである。PP 以外ではパクリタキセル生産量は小さくなったのは、PTFE は細胞を死滅したためであるが、PE と XAD-4 についての原因は不明であり、再実験によって確認すべき課題として残された。

(7) 新規培養プロセスの構築

以上の実験的検討から、疎水性イオン液体を利用する培養では、週 2 回はイオン液体を新鮮なものと交換する培養プロセスがパクリタキセルの効率的生産に有効なことがわかった。この培養に効果的なバイオリアクターとしては、イオン液体をスムーズに交換できるパイプを挿入したもので十分であり、パイプを通してイオン液体の交換も容易である。また、疎水性固体を利用する培養では、通常の市販バイオリアクターをそのまま利用できる。疎水性固体へのパクリタキセルの吸着は迅速なため、培養を開始し、一定時間培養後、疎水性固体を投入して 1 時間以内に取り出すことによって、パクリタキセルのフィードバック阻害を軽減させながら、目的のパクリタキセルを効果的に回収できる。このような操作をもつ培養プロセスが疎水性固体を利用する培養では有効である。

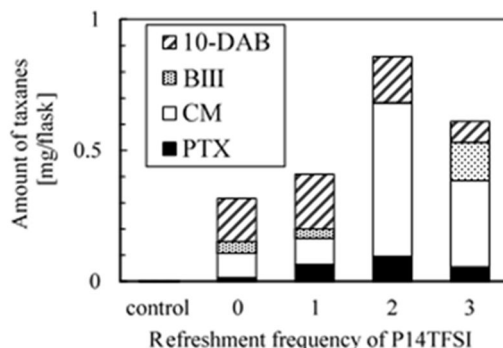


図 7 タキサン類生産に及ぼすイオン液体交換頻度の影響

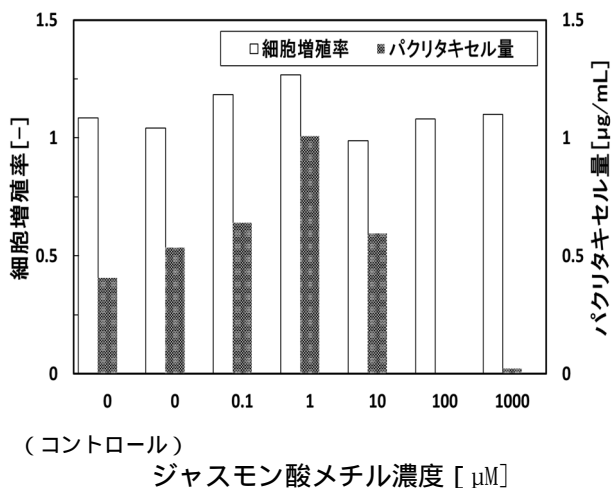


図 8 イオン液体交換を行う培養での細胞増殖とパクリタキセル生産に及ぼす MJ の影響

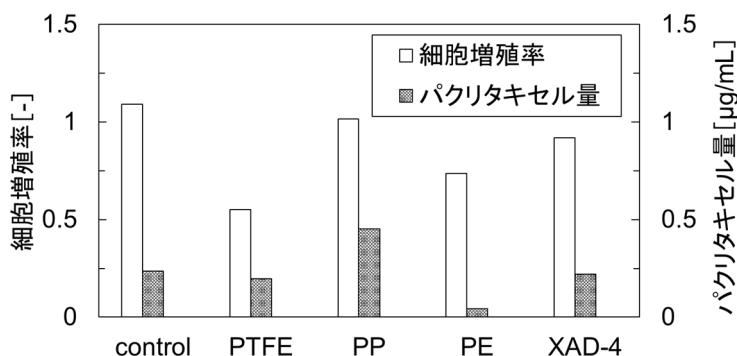


図 9 細胞増殖とパクリタキセル生産に及ぼす疎水性固体の影響

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 2件）

1. 著者名 S. YAMAMOTO, Y. MURAKAMI, S. HAYASHI, H. MIYASAKA	4. 巻 29
2. 論文標題 Production of Paclitaxel in a Plant Cell Culture by In Situ Extraction with Sequential Refreshment of Water-Immiscible 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium Bis(trifluoromethanesulfonyl)imide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.	6. 最初と最後の頁 73 - 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15261/serdj.29.73	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 Shinjiro YAMAMOTO* Yumi KAMIKUBO, Hiroki TANQUE, Michinari IWASAKI, Shuhei HAYASHI, and Hitoshi MIYASAKA	4. 巻 28
2. 論文標題 Enhancement of Paclitaxel Production in Plant Cell Culture Including Increased Amount of Water-immiscible 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium Bis(trifluoromethanesulfonyl)imide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Solvent Extraction Research and Development, Japan,	6. 最初と最後の頁 109-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15261/serdj.28.109	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	宮坂 均 (Miyasaka Hitoshi) (60451283)	崇城大学・生物生命学部・教授 (37401)	
研究分担者	林 修平 (Hayashi Shuhei) (30389522)	崇城大学・生物生命学部・准教授 (37401)	

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