



Title	Metabolomic analysis of immunoglobulin G (IgG)-producing Chinese hamster lung-YN cells in glucose-regulated fed-batch cultures
Author(s)	Sukwattananipaat, Puriwat
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101461
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (SUKWATTANANIPAT PURIWAT)	
Title	Metabolomic analysis of immunoglobulin G (IgG)-producing Chinese hamster lung-YN cells in glucose-regulated fed-batch cultures (組換え免疫グロブリンGを生産するChinese hamster lung (CHL)-YN細胞のグルコース制御培養時におけるメタボローム解析)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Chapter 1 General introduction: Recently, the Chinese hamster lung (CHL)-YN cell line was constructed as an optional expression host for producing immunoglobulin G (IgG), the now-top-selling biopharmaceutical product. The CHL-YN cell line demonstrated twice as fast cell proliferation as the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line, the common IgG expression host, while retaining a comparable IgG production ability. Intriguingly, CHL-YN had exclusive glucose and glutamine metabolic characteristics. These unique metabolic properties were still limited and required deeper metabolic investigation to develop culture conditions suitable for these cells. Therefore, a target metabolomic analysis focused on the glucose and glutamine metabolic pathways was proposed for IgG-producing CHL-YN cell cultures. A serum-free fed-batch culture with controlling glucose concentration, typically industrial-scale cultivation, was selected as the prototype for this metabolomics approach. Hence, this research secondly proposed the development of a serum-free fed-batch cultivation and the design of glucose-feeding strategies tailored to IgG-producing CHL-YN cells.</p> <p>Chapter 2 Development of continuous glucose feeding for IgG-producing CHL-YN cells in serum-free fed batch cultures: As the preliminary serum-free fed-batch cultivation, the extracellular metabolic profiles of IgG-producing CHL-YN cell cultures revealed that glucose consumption decreased rapidly during the glutamine production stage. Additionally, the results suggest that glucose consumption of the IgG-producing CHL-YN cells fluctuated in accordance with the glutamine metabolic pathway, which can be divided into three stages: consumption, production, and re-consumption. Then, a scheduled glucose feeding system was designed. With this schedule of glucose feeding, regulable glucose conditions of IgG-producing CHL-YN cell cultures were achieved. Scheduled glucose feeding was also determined to a high-IgG-producing CHL-YN clone and an IgG-producing CHO-K1 cell pool for creating controlled glucose-fed batch cultures. A comparison of controllable glucose culture profiles among cell types was finally conducted to evaluate the metabolic patterns and specific metabolic rates of the cultures.</p> <p>Chapter 3 Combined capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based metabolic profiling of IgG-producing CHL-YN cells in regulated glucose fed-batch conditions: Targeted metabolomic analyses were conducted focused on the first glutamine metabolic shift due to reduction of cell viability and IgG productivity. CE-MS and LC-MS-based approaches were selected to comprehensively analyze the glucose and glutamine metabolic pathways. The applied metabolomic measurements revealed the different metabolic backgrounds of the IgG-producing CHL-YN and IgG-producing CHO-K1 cells in the glutamine production stage. Then, statistical analyses revealed that the levels of several amino acids in IgG-producing CHL-YN cells were significantly lower in the glutamine production stage than in the glutamine consumption stage. Interestingly, abilities to produce ornithine and cystathionine in IgG-producing CHL-YN cells were highlighted, suggesting proline and cysteine prototrophic characteristics specific to IgG-producing CHL-YN cells. Finally, flask-batch transcriptomic and metabolomic analyses were conducted to construct hypothetical metabolic models of arginine and methionine metabolisms in CHL-YN cells.</p> <p>Chapter 4 Conclusion and future perspectives: A serum-free fed-batch IgG-producing CHL-YN cell cultivation with controllable glucose conditions was achieved by a scheduled glucose feeding. Then, targeted metabolomic analyses to distinct metabolic profiles and identify differences among glucose-controlled fed-batch IgG-producing CHL-YN and CHO-K1 cell cultures. Finally, integrated omics analyses were applied to create hypothetical metabolic models of arginine and methionine metabolisms in CHL-YN cells. Limitations of flux information and future aspects for developing fed-batch CHL-YN cell cultures were discussed.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (SUKWATTANANIPAAAT PURIWAT)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	本田 孝祐
	副 査	准教授	山野 範子

論文審査の結果の要旨

本論文では、組換え免疫グロブリン G を生産する Chinese hamster lung (CHL)-YN 細胞のグルコース制御培養時におけるメタボローム解析に関する研究を行っており、以下の4章から構成されている。

第1章「総論」では、免疫グロブリン G (IgG) を生産するための発現宿主として、近年構築されているチャイニーズハムスター肺 (CHL) -YN 細胞株について、一般的な IgG 発現宿主であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) -K1 細胞株と比較して、2 倍の速さで増殖し、同等の IgG 比生産速度を維持していることならびに CHL-YN 細胞株はグルコースとグルタミンの代謝に CHO-K1 細胞と異なる代謝特性を示しており、この CHL-YN 細胞株から構築されている IgG 生産 CHL-YN 細胞に適した無血清培養法の開発とグルコース供給戦略の設計が重要であることが述べられている。

第2章「無血清培養における IgG 生産 CHL-YN 細胞への連続グルコース供給の開発」では、グルコース濃度を制御可能な無血清培養を実現させるために開発されている、近赤外線と静電容量のデュアルインラインセンサーをベースとした自動グルコース供給システムについて述べ、このグルコース供給アプローチを使用した培養において、3.5 日目以降にグルコースの過剰供給が観察され、さらに、グルタミン生産段階ではグルコース消費が急速に減少していることが述べられている。さらに細胞培養プロファイリングにより、IgG 生産 CHL-YN 細胞プールのグルコース消費はグルタミン代謝に従って変動することが示されており、グルタミン代謝は、消費、生産、再消費の 3 つの段階に分けられている。これに基づいてグルコース供給システムが設計され、グルコース濃度を一定に保つことを可能とし、高 IgG 生産 CHL-YN クローンと、IgG 生産 CHO-K1 細胞プールにも応用し、培養の代謝パターンと比代謝速度を評価している。

第3章「グルコース制御流加培養における IgG 生産 CHO-K1 細胞のキャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS) および液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) を組み合わせた代謝プロファイリング」においては、グルタミン代謝シフトに焦点を当てたターゲット型メタボロミクス分析が実施され、グルコースおよびグルタミンの代謝経路が総合的に分析され、グルタミン生産段階における IgG 生産 CHL-YN 細胞と IgG 生産 CHO-K1 細胞の異なる代謝が明らかにされている。次に、統計分析により、IgG 生産 CHL-YN 細胞におけるいくつかのアミノ酸濃度が、グルタミン生産段階ではグルタミン消費段階よりも有意に低いことが明らかになり、特に、IgG 生産 CHL-YN 細胞におけるオルニチンおよびシスタチオニン生産能が際立っていることが示されている。最後に、フラスコ回分培養におけるトランスクリプトームおよびメタボローム解析に基づいて、CHL-YN 細胞におけるアルギニンおよびメチオニン代謝モデルを構築している。

第4章「結論と今後の展望」においては、IgG 生産 CHL-YN 細胞の無血清流加培養におけるグルコース制御培養時におけるメタボローム解析に関する研究を総括すると共に、今後の展望について考察している。

以上のように、本論文は IgG 生産 CHL-YN 細胞の無血清流加培養におけるグルコース制御培養時におけるメタボローム解析について新しい成果を得ており、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。